



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0132516
 (43) 공개일자 2010년12월17일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) Int. Cl. <i>C12N 9/36</i> (2006.01) <i>C12N 15/82</i> (2006.01) <i>C12N 15/56</i> (2006.01) <i>A01H 5/00</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2010-7022193</p> <p>(22) 출원일자(국제출원일자) 2009년03월11일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2010년10월04일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/052832</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2009/112508 국제공개일자 2009년09월17일</p> <p>(30) 우선권주장 UD2008A000055 2008년03월13일 이탈리아(IT)</p> | <p>(71) 출원인 트란스액티바 에스알엘 이탈리아, 우디네51-33100, 비아 자코포 리누씨오</p> <p>(72) 발명자 마세티 스테파노 비아 데이 브라자, 29, I-33010 파그나코 람비 브루노 비아 구이도 레니, 6, I-34123 트리에스테 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인 석기철</p> |
|--|---|

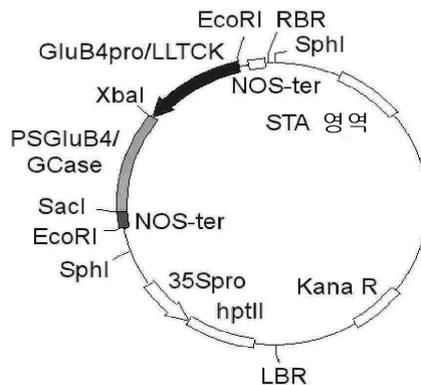
전체 청구항 수 : 총 53 항

(54) 식물에서 인간 단백질, 특히 곡물 내배유에서 인간 재조합 리소솜 효소의 제조를 위한 방법

(57) 요약

식물에서 인간 단백질, 특히 식물 내배유에서 재조합 인간 리소솜 효소의 제조를 위한 방법으로서, 하기의 것들을 포함하는 방법: - 상기 단백질을 얻고, 배아에 궁극적으로 흡수되지 않는 내배유에 상기 단백질을 가두고, 상기 내배유내의 다량의 상기 단백질의 존재가 종자 활력 및 발아 속도에 부정적인 영향을 미치지 않도록 식물을 형질 전환하는 제 1 단계; 상기 식물 형질 전환의 제 1 단계에서, 상기 단백질을 암호화하는 유전자 상류 측의 내배유 특이 프로모터의 사용, 및 조직 특이적 축적을 위한 내배유 세포의 내형질 세망의 내강내로 상기 새로이 합성된 단백질의 번역동시 전달을 위한 신호 펩티드의 사용; - 식물의 종자 내배유내에 단백질을 축적시키는 제 2 단계.

대표도 - 도1



(72) 발명자
파티 타마라
비아 베오르크테, 15, I-33030 부자

크리스틴 피에로
비아 가르자롤리, 77, I-34170 고리지

특허청구의 범위

청구항 1

식물에서 인간 단백질, 특히 식물 내배유에서 제조함 인간 리소좀 효소의 제조를 위한 방법으로서,

- 상기 단백질을 얻고, 배아에 궁극적으로 흡수되지 않는 내배유에 상기 단백질을 가두고, 상기 내배유내의 다량의 상기 단백질의 존재가 종자 활력 및 발아 속도에 부정적인 영향을 미치지 않도록 식물을 형질 전환하는 제 1 단계; 및
- 식물의 종자 내배유내에 단백질을 축적시키는 제 2 단계를 포함하되,

상기 식물 형질 전환의 제 1 단계에서는, 상기 단백질을 암호화하는 유전자 상류 측의 내배유 특이 프로모터이 사용됨은 물론, 상기 단백질의 조직 특이적 축적을 위한 내배유 세포의 내형질 세망의 내강내로 상기 새로이 합성된 단백질의 번역동시 전달을 위한 신호 펩티드가 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 내배유 단백질 저장 액포(PSV) 또는 단백질 체(PB)내에 단백질을 축적시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

하기의 성분들을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 상기 식물의 형질 전환을 위한 발현 벡터를 제작하는 것을 특징으로 하는 방법:

- i) 천연 또는 인위적 기원의 내배유 특이 프로모터;
- ii) 천연 또는 인위적 기원의 5' UTR;
- iii) 내배유 세포의 형질내 세망의 내강내로 제조함 단백질을 표적하기에 적당하고 특이 조직에서 상기 단백질의 축적을 결정하기에 적당한 신호 단백질을 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열;
- iv) 상기 인간 단백질의 성숙 형태를 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열;
- v) 천연 또는 인위적 기원의 3' UTR.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 발현 벡터의 뉴클레오티드 서열은 서열 번호: 1에 나타낸 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 발현 벡터는 식물 형질 전환에 직접 또는 간접적으로 사용되는 균주에 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 균주는 대장균, 아그로박테리움 튜메파시엔스 및 아그로박테리움 리조게네스를 포함하는 균에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형질 전환된 식물은 곡물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 5 항 및 제 7 항 또는 제 6 항 및 제 7 항에 있어서, 상기 균주는 벼(*Oryza sativa* ssp. *japonica*, 동종변식 CR W3)의 배발생 캘러스의 형질 전환에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리소좀 효소는 인간 산 베타-글루코시드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리소좀 효소는 인간 산 알파-글루코시드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서, 식물 종자를 산업적으로 제조하는 제 3 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 산업적 제조 공정은 섬유질 성분, 배, 및 단백질 오염물을 함유하는 호분층을 제거하기 위하여, 형질 전환된 곡물 식물로부터 수확한 성숙한 종자를 외피제거 및 정백하는 작업을 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

상기 항들 중 어느 한 항에 있어서, 제조합 단백질을 정제하는 제 4 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 정제 단계는 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 13 항 또는 제 14 항에 있어서, 상기 정제 단계는 유사한 화학적 조성 및/또는 구조 및/또는 기능을 갖는 크로마토그래피 수지들을 적용하고, 용리 조건을 부분적으로 변형하고, 중복 통과시키는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

식물 내배유에서 인간 단백질, 특히 제조합 인간 리소좀 효소의 발현을 위한 식물 형질 전환에 적당한 뉴클레오티드 서열로서, 하기의 성분들을 포함하는 것을 특징으로 하는 뉴클레오티드 서열:

- i) 천연 또는 인위적 기원의 내배유 특이 프로모터;
- ii) 천연 또는 인위적 기원의 5' UTR;
- iii) 내배유 세포의 형질내 세망의 내강내로 제조합 단백질을 표적하기에 적당하고 특이 조직에서 상기 단백질의 축적을 결정하기에 적당한 신호 단백질을 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열;
- iv) 상기 인간 단백질의 성숙 형태를 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열;
- v) 천연 또는 인위적 기원의 3' UTR.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 프라이머 i)은 베타 글루텔린 프로모터(GluB4pro)인 것을 특징으로 하는 서열.

청구항 18

제 16 항 또는 제 17 항에 있어서, 상기 5' UTR 영역 ii)는 LLTCK로 알려진 리더인 것을 특징으로 하는 서열.

청구항 19

제 16 항, 제 17 항 또는 제 18 항에 있어서, 상기 성분 iii)의 뉴클레오티드 서열은 내형질 세망 내에서 글루텔린 4의 전구체를 표적하기 위해 베타에서 이용되는 단일 펩티드를 암호화하는 PSGluB4 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

는 서열.

청구항 20

제 16 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성분 iv)의 뉴클레오티드 서열은 인간 산 베타-글루코시다제의 성숙한 형태를 암호화하는 GCase 서열인 것을 특징으로 하는 서열.

청구항 21

제 16 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 성분 v)의 3' UTR은 NOS 종결인자 또는 GluB4 유전자의 종결인자인 것을 특징으로 하는 서열.

청구항 22

제 16 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호:1로 나타난 뉴클레오티드 서열.

청구항 23

제 16 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항에 기재된 뉴클레오티드 서열에 상보적인 서열.

청구항 24

제 16 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항의 서열 또는 제 23 항의 상보적인 서열에서 하나 이상의 뉴클레오티드에서 결실, 삽입, 치환 등의 돌연변이로부터 유래한 서열.

청구항 25

산 베타-글루코시다제의 성숙 형태를 암호화하는 제 16 항 내지 제 22 항 중 어느 한 항의 뉴클레오티드와, 프로모터 등의 서열, 서열 번호: 1에 기재된 것과 상이하고 효소 합성 및 종자 내배유에서의 특이적 저장에 적당한 것으로, 내형질 세망 및 5' 및 3' 비번역 영역에 표적하기 위한 프로모터 등의 서열, 또는 이러한 서열에 상보적인 서열의 조합.

청구항 26

제 16 항에 기재된 성분 i), ii), iii), iv) 및 v)와, 인간 종 내부에서 돌연변이 또는 다형성의 존재로 인해 서열 번호: 1에 나타난 것과 상이한 성숙 효소 암호화 서열의 조합, 또는 이러한 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 이용하여 제조한 조합.

청구항 27

제 16 항에 기재된 성분 i), ii), iii), iv) 및 v)와, 다른 리소솜 효소의 성숙 형태 또는 전구체를 암호화하는 서열의 조합, 또는 이러한 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 이용하여 제조한 조합.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 상기 효소는 인간 산 알파-글루코시다제인 조합.

청구항 29

제 16 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형질 전환된 식물은 곡물인 것을 특징으로 하는 서열.

청구항 30

식물에서 인간 단백질, 특히 식물 내배유에서 인간 재조합 리소솜 단백질의 발현을 위한 분자 벡터로서, 제 16 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분자 벡터.

청구항 31

제 30 항에 있어서, 상기 리소솜 효소는 인간 산 베타-글루코시다제인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 32

제 30 항에 있어서, 상기 리소좀 효소는 인간 산 알파-글루코시다제인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 33

제 30 항, 제 31 항 또는 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 플라스미드인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 34

단백질, 특히 인간 리소좀 단백질의 제조를 위한 식물의 형질 전환을 위한 제 30 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 발현 벡터의 용도.

청구항 35

제 30 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 균주.

청구항 36

제 35 항에 있어서, 상기 균주는 대장균, 아그로박테리움 튜메파시엔스 및 아그로박테리움 리조게네스를 포함하는 균에서 선택되는 균주.

청구항 37

제 30 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 발현 벡터로 형질 전환된 식물 세포.

청구항 38

제 37 항에 있어서, 상기 세포는 곡물 세포인 것을 특징으로 하는 세포.

청구항 39

제 38 항에 있어서, 상기 세포는 재배 벼 품종(*Oryza sativa* L.)에 속하는 세포.

청구항 40

제 39 항에 있어서, 상기 세포는 벼과(*Poaceae*)의 성분, 예를 들어 옥수수(*Zea mays* L.), 보리(*Hordeum vulgare* L.) 및 밀(*Triticum* spp.)에 속하는 세포.

청구항 41

인간 단백질, 특히 인간 리소좀 효소의 발현을 위한 형질 전환된 식물의 종자로서, 제 30 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 벡터로부터 유래한 발현 카세트를 함유하는 것을 특징으로 하는 종자.

청구항 42

제 41 항에 있어서, 상기 형질 전환 식물은 곡물에 속하는 것을 특징으로 하는 종자.

청구항 43

제 41 항 또는 제 42 항에 있어서, 상기 형질 전환 식물은 재배 벼 품종(*Oryza sativa* L.)에 속하는 것을 특징으로 하는 종자.

청구항 44

인간 단백질, 특히 인간 리소좀 효소의 발현을 위한 형질 전환된 식물로서, 제 30 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 발현 벡터로 형질 전환된 것을 특징으로 하는 형질 전환된 식물.

청구항 45

제 44 항에 있어서, 상기 형질 전환 식물은 곡물인 것을 특징으로 하는 형질 전환된 식물.

청구항 46

제 44 항 또는 제 45 항에 있어서, 상기 형질 전환 식물은 재배 벼 품종(*Oryza sativa* L.)에 속하는 것을 특징으로 하는 형질 전환된 식물.

청구항 47

제 44 항, 제 45 항 또는 제 46 항의 형질 전환 식물을 자가 수정, 천연 또는 인공교배하여 얻은 자손, 또는 상기 형질 전환 식물로부터 선택된 형질 전환주.

청구항 48

치료 용도를 위한 제 41 항, 제 42 항 또는 제 43 항의 종자.

청구항 49

효소 교체 요법용 약물의 제조를 위한 제 41 항, 제 42 항 또는 제 43 항의 종자의 용도.

청구항 50

질환, 즉, 고세병, 글리코겐증 II형, 파브리병, B형 니만-피크병, 뮤코다당증 I, II 및 IV 의 효소 교체 요법용 약물의 제조를 위한 제 49 항의 종자의 용도.

청구항 51

효소 교체 요법에서 사용하기 위한 제 41 항, 제 42 항 또는 제 43 항의 종자.

청구항 52

질환, 즉, 고세병, 글리코겐증 II형, 파브리병, B형 니만-피크병, 뮤코다당증 I, II 및 IV의 효소 교체 요법에서 사용하기 위한 제 51 항의 종자.

청구항 53

침부 도면을 참조하여 위에서 기재한 바와 같은, 식물에서 인간 단백질, 특히 곡물 내배유에서 인간 재조합 리소솜 효소의 제조를 위한 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 식물, 즉 곡물 종의 형질 전환 및 유전자 조작에 의한 인간 단백질, 특히 인간 재조합 리소솜 효소인 베타-글루코시다제 (E. C. 3.2.1.45)의 제조에 관한 것이다. 본 발명이 바람직하게 적용되는 종(species)은 재배 벼(*Oryza sativa* L)인데, 배(germ) 및 호분층(aleuronic layer), 즉 대부분의 지질 및 단백질 오염물을 제거하면서 산업적인 종자 제조를 수행할 수 있기 때문이다.

[0002] 이러한 기술은 그 기능이 불충분하거나 불완전한 때 병리적 상태가 유발되는 다른 인간 리소솜 효소의 내배유 특이적 발현에 적용될 수 있다.

배경기술

[0003] 희귀 질환은 개체군에서 발병률 및 유병율이 낮은 질환들의 이종 그룹을 나타낸다.

[0004] 이러한 질환은 만성 경과를 나타내고, 심각한 결과를 초래할 수 있거나 치명적일 수 있다.

[0005] 희귀 질환으로는 특정 리소솜 효소 또는 운반 단백질의 결핍에 의해 초래되는 리소솜 축적 질환이 있다. 이러한 부류의 질환으로는 고세병, 글리코겐증 II형, 파브리병, B형 니만-피크병, 뮤코다당증 I, II, IV 등이 있다. 이러한 질환에 대한 치료적 접근 방법은 결실 효소를 정맥내 투여하는 것으로 이루어진다(효소 대체 요법, ERT). 예를 들어, 고세병은 인간 산 베타-글루코시다제를 일생동안 정기적으로 주입함으로써 치료할 수 있다.

그러나 이러한 요법은 아주 비싸므로, 모든 환자에게 이용될 수는 없다. ERT의 높은 가격은 배양된 인간 또는 포유동물 세포에 의해 산 베타-글루코시다제를 제조하는데 있어서의 어려움에 의해 실질적으로 결정된다.

- [0006] 유전적으로 조작된 식물은 기술적 및 경제적 관점에서 리소솜 효소, 특히 재조합 산 베타-글루코시다제의 제조를 위한 대안을 나타낼 수 있었는데, 식물 배양이 비교적 값싼 재료 및 토지에 존재하는 농업적 인프라를 필요로 하기 때문이다.
- [0007] WO-A-97/10353 (WO'353)호에서는, 인간 산 베타-글루코시다제를 포함하는 리소솜 효소의 합성이 일, 특히 담배 (*Nicotiana tabacum* L.)와 같은 바이오매스 종의 잎에서만 이루어지는 것을 보고하고 있다. WO'353는 잎 조직의 높은 수분 함량(목적 단백질의 높은 분산을 의미함) 및 다수의 단백질 오염물인 폴리페놀, 고무, 삼출물, 독성 알칼로이드의 존재가 효소 추출 및 정제 과정을 복잡하게 만드는 문제 있는 방법을 개시하고 있다. 또한, 정상 식물 대사의 변화에 의해 초래되는 식물 독성 현상이 배제될 수 없는데, 이러한 현상은 예상치 않게 일어날 수 있고 예측 가능한 방식으로 해결될 수 없기 때문에 특히 문제가 된다. WO'353에서, 산 베타-글루코시다제의 발현은 MeGa 프로모터(HMG2 프로모터 유래의 창상 유도성 프로모터) 또는 CaMV 35S 프로모터를 포함하는 발현 벡터에 의한 담배의 형질 전환 후에 일어난다. 후자는 유전자 전사 제어를 위한 항시적 유형의 잘 알려진 광범위하게 사용된 요소이다. WO'353에서는 이러한 목적을 위해 다른 항시적 프로모터 또는 유도성 프로모터가 사용될 수 있다는 것을 개시하고 있다. WO'353에서는 창상 유도성 프로모터가 관련되는 한에 있어서, 이들의 사용은 앞으로 엄격히 제한되고, 산 베타-글루코시다제를 발현하기 위하여 식물은 미리 상처를 입어야 한다. 예비 창상 유발은 비용을 증가시키고, 제조 과정의 관리를 더욱 복잡하게 만들고, 액포 및 다른 세포 구획에 일반적으로 존재하는 단백질 분해효소에 의해 부분적 효소 분해를 일으킬 수 있고, 상처받은 물질을 세균 및 진균으로 심하게 오염시킬 수 있다.
- [0008] WO'353에서 실질적으로 고려된 경유도성 프로모터(light-inducible promoter)는 투과 광 조사의 부족 및/또는 식물합성 조직에 존재하는 전사 인자의 부족으로 인해 종자, 특히 식물 곡물 종자와 같은 엽육 이외의 조직에서는 효과적으로 발현되지 않는다.
- [0009] 항시적 프로모터의 경우, 모든 예들은 CaMV 35S 프로모터라고 대표적으로 나타낸다. 그러나, 이중 단백질의 합성을 완전히 배제하도록 종자에서 CaMV 35S 전사 효율은 낮은 것으로 확인되었다. 이러한 주장은 이러한 프로모터가 잎 조직에서 직접 고유전자 발현 수준에 덜 적당한 것으로 보이는 곡물과 같은 단자엽 식물의 경우에 아주 더 유익하다.
- [0010] WO-A-03/073839 (WO' 839)에서는, CaMV 35S 프로모터의 조절하에서 베타-글루코시다제의 돌연변이 형태를 암호화하는 유전자는 특이 항체를 이용하여 수행한 면역 분석에서 검출 가능한 수준으로 종자에서 발현되지 않는다는 것을 보고했다. 따라서, WO' 839에서 주장된 것과 함께, WO' 353 특허는 엽육과 상이한 조직, 특히 종자에서 인간 산 베타-글루코시다제 또는 다른 리소솜 효소의 제조를 수행하는 것을 개시하지 않는다는 판단이 가능하다. 또한, 이후의 실험 결과(Reggi 등, 2005, Plant MoI Biol 57: 101-113), 담배 잎에서 베타-글루코시다제에 대하여 WO' 353에 주어진 정보는 공업적으로 흥미 있는 양 미만으로 효소를 얻는 것을 가능하게 한다는 것이 확인되었다. 또한, WO' 353에서 나타낸 바와 같이, 잎 생물자원으로부터 정제될 수 있는 효소량은 효소 활성의 측면에서 발현시 아주 더 작기 때문에, 특히 항시적 프로모터의 사용 시 잎 발현 계에서 기술적 제한이 존재한다는 것을 알 수 있다.
- [0011] WO' 839에서는 종자에서 리소솜 효소의 제조가 가능하고 이러한 계를 이용하여 달성되는 발현 수준은 산업적 이용에 충분하다는 것을 보고했다. 또한, 상기 효소는 아포플라스트(즉, 산성 아래의 pH에 특징이 있는 세포외 구획)에 축적되기 때문에, 아주 장기간동안 안정한 형태로 보존될 수 있다. 그러나 WO' 839는 단자엽 식물에서 리소솜 효소, 특히 베타-글루코시다제의 제조를 개시하지 않고 있고, 종자에서 이러한 효소, 특히 산 베타-글루코시다제의 조직 발현 및 세포내 분포 (subcellular localization)와 관련된 문제 및 한계를 어떻게 회피하고, 최소화하고 극복하는 지에 관한 정보를 제공하지 않고 있다. 사실상, 이러한 측면은 무지 또는 무관심 때문에 취급되지 않고 있다.
- [0012] 실제로, WO' 839호에서, 리소솜 효소의 제조를 위한 발현 벡터의 제작을 다루는 실시예는 쌍자엽 식물의 저장 단백질 프로모터의 사용을 항상 보고하고 있다. 리소솜 효소의 실제 발현에 관한 실시예는 산 베타-글루코시다제로 제한되고, 사용되는 숙주 식물은 항상 담배(*Nicotiana tabacum* L.)이다. WO'839의 설명에서, 종자에서 산 베타-글루코시다제 축적에 의한 형질 전환 담배 식물 또는 이의 자손에 대한 식물독성 효과에 대한 언급이 없기 때문에, 상기 발현계는 리소솜 효소, 특히 산 베타-글루코시다제의 제조와 관련된 문제를 해결하는데 효과적인 것으로 볼 수 있다.

[0013] 그러나, WO'839에서 나타낸 것과 동일한 작제물을 이용하여 형질 전환된 담배 식물에 의해 제조한 종자에 대하여 실시한 이후의 실험 결과, 베타-글루코시다제의 축적은 종자 활력(seed viability)에 중요한 영향을 미치는 것으로 확인되었다. 특히, 종자 1 kg당 200 U(U = 37° C, pH 5.9에서 1 분당 1 마이크로 몰의 4-메틸움벨리페릴-D-글루코시다제를 방출하는 효소의 양)에 근접한 효소 농도에서는, 낮은 활력 및 발육 저지된 발아에 의한 재생 이상상태(reproductive anomalies)가 있다. 또한, 종자 1 kg당 약 500 U 초과에서는, 종자 활력이 완전히 저해된다. 본 출원인에 의해 수행된 그 밖의 실험 결과, WO'839에서 나타낸 것과 동일한 작제물로 형질 전환한 담배의 종자 활력은 어떠한 알려진 방법으로는 회복될 수 없는 것으로 확인되었다. 전자 현미경법으로 실시한 본 출원인의 연구 결과, 생존 불가능한 종자에서 세포막 계의 해체 및 파괴가 입증되어, 효소의 공업적 제조에 이론적으로 이용될 수 있는 형질 전환주로부터 필요한 자손을 얻는 것은 불가능한 것으로 확인되었다. WO'839 작제물로 달성된 축적 부위는 WO'839에서 예상된 것(아포플라스트 공간)에 해당하지 않지만 배아 유조직 세포(embryo parenchymatic cell)내부의 축적 단백질 액포에 해당한다는 것이 전자 현미경법에 의해 확인되었다. WO'839 특허와 마찬가지로, 식물 종자에서 유전자 효소 활성을 갖는 단백질 및 인간 락토페린의 발현을 개시하고 있는 특허 출원 WO-A-00/04146호 (WO' 146)는 리소좀 효소의 최소한 일부인 기능적 활성 효소의 제조를 교시하지 않고 있다. WO' 146에서는, 효소 제조 과정의 효과를 지지하기 위한 증거가 제공되지 않으며, 상기 효소의 안정성, 형태 및 기능성과 관련된 문제가 전체적으로 간과되어 있다. 일반적으로, 공업적 효소 량의 제조에 필요한 식물이 우량 식물의 시험관내 증식을 통해 얻어질 수 있었지만, 이러한 계를 사용하면, 비교적 단시간 내에 토양에 이식될 다수의 식물에 대한 필요성 때문에 제조 사이클이 불가피하게 복잡해진다. 이탈리아의 인간-글루코시다제 수요가 만족되도록 60 톤의 형질 전환 단백질을 계획하기 위해서는, 최소한 150 헥타르의 토지에의 투자 및 최소한 9백만 담배 식물의 시험관내 제조, 그린하우스 순응 및 발 이식이 필요하게 된다. 공정 관리 및 경제적 관점에서, 이렇게 하는 것은 형질 전환 종자를 좁은 열로 살포 또는 파종하기 때문에 명백히 어려운 상황이고, 이러한 후자의 작업은 생존 가능한 종자에 의해서만 실현가능한 것으로, 이를 통해 달성될 수 있는 것 보다 아주 더 높은 식물 밀도의 측면에서 표준 담배 작물과 비교하여 단위 면적당 4배 내지 6배 더 많은 종자 생산을 가능하게 한다. 직접 파종에 의해 얻어질 수 있는 것과 유사한 식물 밀도를 달성하는 것은 이식에 의해서는 상상도 할 수 없는 것인데, 이는 그 가격이 생산성의 관점에서 불충분하게 보상되기 때문이며, 실제로, 단위 면적당 식물 수와 식물 생산량은 반비례한다. 미세증식 비용에 관하여, 각각의 식물은 개별적으로 취급되어야 하며, 이는 각각의 담배 식물에 의해 제조된 매우 적은 종자 량(몇 g)과 함께, 식물을 리소좀 효소 제조용 숙주계로서 이용하는 이점을 크게 감소시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명의 목적은 식물, 특히 단자엽 식물에서 인간 단백질, 특히 곡물 내배유에서 재조합 인간 리소좀 효소의 제조 방법을 수행함에 있다. 이러한 새로이 발명된 방법은 공지된 기술 상태의 단점을 극복하고, 더욱 구체적으로는 하기의 장점이 있다:
- [0015] - 종자 내에서 리소좀 효소, 특히 인간 산 베타-글루코시다제 및 인간 산 알파-글루코시다제의 효과적인 조직 발현 및 세포내 분포를 가능하게 하고;
- [0016] - 단백질 발현 및 정제를 촉진하고;
- [0017] - 식물 독성 현상의 위험을 배제하고;
- [0018] - 식물 활력에 영향을 미치지 않고;
- [0019] - 경제적으로 더욱 편리하고;
- [0020] - 제조 과정의 관리를 크게 촉진하고;
- [0021] - 부분적 효소 분해의 위험을 배제하고;
- [0022] - 세균 및 진균 오염 수준을 크게 감소시킨다.
- [0023] 본 출원인은 상기 배경 기술의 단점을 극복하고 상기 및 다른 목적 및 장점을 얻기 위하여 본 발명을 발명하고, 실험하고 구현했다.

과제의 해결 수단

- [0024] 본 발명은 독립 청구항에서 기재 및 특징짓고 있으며, 그 종속 청구항들은 본 발명의 다른 특징 또는 본 발명의 주요 아이디어에 대한 변형을 기재하고 있다.
- [0025] 상기 목적에 따라, 식물에서 인간 단백질, 특히 식물 내배유에서 재조합 인간 리소솜 효소의 제조를 위한 방법은 하기의 것들을 포함한다:
- [0026] - 상기 단백질을 얻고, 배아에 궁극적으로 흡수되지 않는 내배유에 상기 단백질을 가두고, 상기 내배유내의 다량의 상기 단백질의 존재가 종자 활력 및 발아 속도에 부정적인 영향을 미치지 않도록 식물을 형질 전환하는 제 1 단계;
- [0027] 상기 식물 형질 전환의 제 1 단계에서, 상기 단백질을 암호화하는 유전자 상류 측의 내배유 특이 프로모터의 사용, 및 상기 단백질의 조직 특이 축적을 위한 내배유 세포의 내형질 세망(endoplasmic reticulum)의 내강(lumen)내로 새로이 합성된 단백질의 번역동시 전달(co-translational transfer)을 위한 신호 펩티드의 사용;
- [0028] - 식물의 종자 내배유내에서 단백질을 축적하는 제 2 단계.
- [0029] 본 발명은 종자 배아에 속하지 않는 저장 조직에서 이중 단백질의 축적을 가능하게 한다. 또한, 본 발명은 종자 배아에 속하지 않고 발생 종료 시 괴사 과정을 자발적으로 개시하는 저장 조직에서 높은 식물독성/과과력을 갖는 단백질의 축적을 촉진한다. 또한, 종자 광질 처리(imbibition) 및 발아 후 강한 가수분해 활성을 받게 되는 비생명 조직에서 잠재적으로 식물독성인 단백질을 축적하는 것이 가능하다.
- [0030] 이러한 잠재적으로 위험한 단백질은 세포막과 접촉하거나 세포막을 교차하지 않고 단백질 저장 액포 또는 단백질 체에 축적될 수 있다. 본 발명은 단백질 이동(protein trafficking), 안정성, 생물학적 활성 및 치료용도의 측면에서 잠재적으로 유해하지 않은 경우에 쓸모없게 되는 추가의 아미노산의 존재에 특징이 있는 단백질의 불확실한 변이체 보다는 정확히 목적 아미노산 서열의 제조를 가능하게 한다. 합성된 단백질은 단백질 저장 액포(PSV) 또는 단백질 체(PB)내에 축적된다. PSV 또는 PB로부터 단백질 추출성은 다소 유사하기 때문에, 상기 세포내 구획(subcellular compartment)들 중 하나 이상에서 상기 단백질이 분포(localization)하는 것은 본 발명의 활력의 측면에서 중요하지 않다.
- [0031] 본 발명의 구현에는 하기의 성분을 포함하는 서열을 포함하는 식물 형질 전환용 발현 벡터의 삭제 및 이러한 벡터의 식물 형질 전환을 용도를 포함한다:
- [0032] i) 천연 또는 인위적 기원의 내배유 특이 프로모터;
- [0033] ii) 천연 또는 인위적 기원의 5' UTR;
- [0034] iii) 내배유 세포의 형질내 세망의 내강내로 재조합 단백질을 표적하기에 적당하고 특이 조직에서 상기 단백질의 축적을 결정하기에 적당한 신호 단백질을 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열;
- [0035] iv) 성숙 형태의 인간 단백질을 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열;
- [0036] v) 천연 또는 인위적 기원의 3' UTR.
- [0037] 바람직하게, 상기 발현 벡터의 뉴클레오티드 서열은 서열 번호: 1에 기재된 바와 같다.
- [0038] 본 발명의 구현에 따라, 상기 발현 벡터는 식물 형질 전환에 직접 또는 간접적으로 사용되는 균주내로 도입된다. 바람직하게, 선택된 균주는 대장균(*Escherichia coli*), 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 및 아그로박테리움 리조게네스(*Agrobacterium rhizogenes*)를 포함하는 군에서 선택된다.
- [0039] 형질 전환된 식물은 곡물인 것이 바람직하다.
- [0040] 본 발명의 바람직한 구현에 따라, 상기 균주는 벼(*Oryza sativa ssp. japonica*, 동종변식 CR W3)의 배발생 캘러스의 형질 전환에 사용된다. 유리한 변형예에 따라, 상기 리소솜 효소는 인간 산 베타-글루코시다제이다. 또 다른 변형예에서, 상기 리소솜 효소는 인간 산 알파-글루코시다제이다.
- [0041] 실제로, 본 발명은 산 베타-아미노글루코시다제와 완전히 상이한 분자 질량, 구조 및 기능을 갖는 상당한 양의 인간 알파-글루코시다제 전구체의 합성, 추출 및 정제에 효과적이다.
- [0042] 구현예에 따라, 본 발명은 산업적으로 종자를 제조하는 것으로 이루어지는 제 3 단계를 포함한다.
- [0043] 해결 방안에 따라, 산업적 제조는 섬유질 성분, 배(germ), 및 다수의 단백질 오염물을 함유하는 호분 층을 제거

하기 위하여 재배된 성숙 종자를 외피 제거하고 정백하도록 디자인된다.

- [0044] 또 다른 구현예에 따라, 본 발명은 재조합 단백질을 정제하는 제 4 단계를 포함한다. 바람직하게, 이러한 정제 단계는 소수성 상호작용 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피 및 겔 여과의 순서로 이루어진다. 또한, 상기 정제 단계는 하기의 실시예에서 나타난 것들과 유사한 화학적 조성 및/또는 구조 및/또는 기능을 갖는 크로마토그래피 수지를 적용하고, 용리 조건을 부분적으로 변화시키고, 예를 들어 용리된 분획을 칼럼내로 다시 로딩함으로써 계대를 반복하는 것을 택일적으로 또는 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 효소는 종자 1 kg 당 100 U 초과, 또는 종자 1kg 당 500 U까지의 양으로 정제된다. 또한, 정제된 효소는 아주 활성이 있고, 결실, 부가 또는 아미노산 치환을 나타내지 않아서, 인간 본래의 대조물과 완전히 동일하다. 또한, 내배유에서 상기 효소의 축적은 종자 활력 또는 발아 속도에 전혀 영향을 미치지 않는다.
- [0045] 효소 제조를 위해 사용되는 분자 카세트는 일반적으로 자손에 유전되고, 어떠한 멘델 인자로서, 동질접합되거나 또는 다른 형질 전환 주에 교잡을 통해 전달될 수 있고, 두 경우 모두 효소 생성을 증가시킬 수 있다.
- [0046] 공지 기술과 반대로, 본 발명에 관한 방법은 산업적으로 적절한 양의 인간 산 베타-글루코시다제를 제조할 수 있는 예를 들어 벼의 형질 전환 주(line)를 얻는 것을 가능하게 하여, 정상 표현형(미시 및 거시 수준 모두)에 변화를 나타내지 않고, 특히 종자 활력 및 발아 속도에 재생적인 이상상태 또는 변화를 나타내지 않고 종자 1 kg당 500 U 초과 효소 농도를 나타내기 때문에 혁신적이고 유익한 것이다.
- [0047] 본 발명에 포함되는 것은 식물 내배유에서 인간 단백질, 특히 재조합 인간 리소솜 단백질을 발현하기 위한 목적으로 식물 형질 전환에 사용하기에 적당한 뉴클레오티드 서열이다. 상기 뉴클레오티드 서열은 하기의 성분들을 포함한다: i) 천연 또는 인위적 기원의 내배유 특이 프로모터; ii) 천연 또는 인위적 기원의 5' UTR; iii) 내배유 세포의 형질내 세망의 내강내로 재조합 단백질을 표적하기에 적합하고 특이 조직에서 상기 단백질의 축적을 결정하기에 적당한 신호 단백질을 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열; iv) 성숙 형태의 인간 단백질을 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열; v) 천연 또는 인위적 기원의 3' UTR.
- [0048] 본 발명의 구현예에 따라, 상기 프로모터 i)은 벼 글루텔린 4 프로모터(GluB4pro)이며, 이의 서열은 서열 번호: 2에 기재되어 있다.
- [0049] 바람직한 구현예에 따라, 상기 5' UTR ii)는 특허 출원 PCT/EP2007/064590호에 기재되어 있고 서열 번호: 3에 나타난 것으로 LLTK로 알려진 리더(leader)이다. 또 다른 구현예에 따라, 성분 iii)의 뉴클레오티드 서열은 내형질 세망내로 글루텔린 4 전구체를 표적하기 위해 벼가 이용하는 신호 펩티드를 암호화하는 서열 번호: 4로 나타난 PSGluB4의 서열이다.
- [0050] 또 다른 구현예에 따라, 성분 iv)의 뉴클레오티드 서열은 서열 번호:5에 나타난 것으로, 성숙한 형태의 인간 산 베타-글루코시다제를 암호화하는 GCase 서열이다.
- [0051] 본 발명의 바람직한 구현예에 따라, 성분 v)의 3' UTR은 서열 번호:6에 나타난 서열을 갖는 NOS 종결인자(terminator)이다. 택일적으로, GluB4 유전자의 종결인자가 사용될 수도 있다. 대표적으로, 상기 발현 카세트의 전체 뉴클레오티드 서열은 서열 번호: 1에 나타난 것과 동일하다.
- [0052] 본 발명에 속하는 것은 상기 언급된 것에 상보적인 뉴클레오티드 서열이다.
- [0053] 본 발명에 속하는 것은 상기 언급된 서열 및 이의 상보적 서열들중 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 삽입, 염기전위(transition) 또는 염기전환(transversion)과 같은 돌연변이 과정으로부터 유래한 서열이다.
- [0054] 본 발명에 속하는 것은 인간 산 베타-글루코시다제의 성숙한 형태를 암호화하는 상기 언급한 서열과, 종자 내배유에서 특이적으로 효소의 합성 및 축적을 얻기에 적당한 것으로, 서열 번호: 1에서 나타난 바와 같은 서열에서 기재된 것들과 상이한 5' 및 3'에서 내형질 세망 및/또는 비번역 영역에의 단백질 표적화를 위한 프로모터 성분 및/또는 서열과의 조합, 또는 상기 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열과의 조합이다.
- [0055] 본 발명의 범위에 포함되는 것은 전술한 성분 i), ii), iii), iv) 및 v)과, 인간 종 내부에서 돌연변이 또는 다형성의 존재에 대하여 서열 번호: 1에 나타난 것들과 상이한 성숙 효소 암호화 서열의 조합, 또는 이들 서열에 상보적인 서열과의 조합이다.
- [0056] 또한, 본 발명에 포함되는 것은 전술한 성분 i), ii), iii), iv) 및 v)와 다른 리소솜 효소의 성숙 형태 또는 전구체를 암호화하는 서열의 조합 또는 상기 서열에 상보적인 서열과의 조합이다.
- [0057] 또한, 본 발명에 속하는 것은 상기 효소가 인간 산 알파-글루코시다제인 전술한 조합이다.

- [0058] 또한, 본 발명에 속하는 것은 형질 전환 식물이 곡물인 전술한 서열이다.
- [0059] 본 발명에 속하는 것은 상기 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것으로, 식물에서 인간 단백질, 특히 식물 내배유에서 인간 리소솜 효소의 발현을 위한 분자 벡터이다. 대표적으로, 상기 분자 벡터는 플라스미드이다.
- [0060] 바람직한 해결방안에 따라, 상기 리소솜 효소는 인간 산 베타-글루코시다제이다.
- [0061] 택일적으로, 상기 리소솜 효소는 인간 산 알파-글루코시다제이다.
- [0062] 또한, 본 발명에 속하는 것은 단백질, 특히 인간 리소솜 효소를 제조하기 위한 목적으로 식물 형질 전환을 위한 상기 발현 벡터의 용도이다.
- [0063] 또한, 본 발명에 속하는 것은 상기 발현 벡터를 함유하는 균주이다. 바람직하게, 상기 균주는 대장균 (*Escherichia coli*), 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 및 아그로박테리움 리조게네스(*Agrobacterium rhizogenes*)를 포함하는 군에서 선택된다.
- [0064] 본 발명에 속하는 것은 상기 발현 벡터로 형질 전환된 식물 세포이다.
- [0065] 본 발명의 해결방안에 따라, 이들 세포는 바람직하게는 재배 벼(*Oryza sativa* L.)에 속하는 곡물 세포이다. 식품으로 사용하기에 부적당한 벼 품종이 바람직하다. 따라서, 본 발명에 속하는 것은 전분 및 이의 부산물의 추출 및 제조를 위해 산업적으로 이용 가능한 찰벼(waxy rice)의 용도이다.
- [0066] 택일적으로, 세포는 벼과(*Graminaceae* family; *Poaceae*)의 성분, 예를 들어 옥수수(*Zea mays* L.), 보리(*Hordeum vulgare* L.) 및 밀(*Triticum* spp.)에 속할 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명에 속하는 것은 상기 발현 벡터를 함유하는 것으로, 인간 단백질, 특히 인간 리소솜 효소의 발현을 위해 형질 전환된 식물의 종자이다.
- [0068] 본 발명의 해결 방안에 따라, 상기 형질 전환된 식물의 종자는 곡물 종에 속하고, 바람직하게는 벼종 *Oryza sativa* L에 속한다.
- [0069] 본 발명에 관한 보호 범위는 전술한 발현 벡터를 이용하여 얻은 것으로, 인간 단백질, 특히 인간 리소솜 효소의 발현을 위한 형질 전환 식물을 포함한다. 바람직하게, 이러한 식물은 바람직하게는 벼종 *Oryza sativa* L에 속하는 곡물이다.
- [0070] 또한, 본 발명에 속하는 것은 자가 수정 또는 교배시켜 얻은 자손, 또는 상기 형질 전환 식물로부터 선택된 형질 전환 주(line)이다.
- [0071] 또한, 본 발명은 치료를 위한 상기 종자에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 ERT 약물의 제조를 위한 상기 종자의 용도에 관한 것이다. 특히 본 발명은 하기의 질환에 대한 효소 교체 요법에 관한 것이다: 고세병, 글리코겐증 II형, 파브리병, B형 니만-피크병, 뮤코다당증 I, II 및 IV. 또한, 본 발명은 효소 교체 요법에서 사용될 상기 종자에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 하기의 질병의 효소 교체 요법에서 사용될 상기 종자에 관한 것이다: 고세병, 글리코겐증 II형, 파브리병, B형 니만-피크병, 뮤코다당증 I, II 및 IV.

도면의 간단한 설명

- [0072] 본 발명의 상기 및 다른 특징은 첨부 도면을 참조한 비제한적인 실시예로서 제공된 바람직한 형태의 구현예의 하기의 설명으로부터 명백해질 것이다.

도 1은 인간 효소 산 베타-글루코시다제의 내배유 특이적 제조를 위해 사용된 최종 발현 벡터 pSV2006[GluB4pro/LLTCK /PSGluB4/GCase/NOSter]의 개략도이다.

도 2A는 GluB4 프로모터 하류 측의 LLTCK 리더의 반복적(recursive) PCR에 의한 합성 방법의 실험 개략도를 나타낸다.

도 2B는 *GCase* 및 *HPT II* 유전자에의 어닐링되는 프라이머 쌍을 이용하여, 추정적으로 형질 전환된 식물로부터 추출한 게놈 DNA로부터 얻은 이중 PCR 생성물의 전기영동 분석 결과를 도시한다. 레인 1: 1 Kb 레더(NEB); 레인 2: 음성 대조군(NC), 즉, 형질 전환되지 않은 식물로부터 추출한 게놈 DNA; 레인 3: 양성 대조군 (PC), 즉 pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOSter] 벡터; 레인 4-16: 시험된 식물.

도 3A 및 도 3B는 *GCase* 형질 전환체의 종자로부터의 추출 과정에서 얻은 단백질 추출물에 대하여 실시한 SDS-

PAGE (A) 및 웨스턴 블롯의 결과를 보여준다. 도 3A 및 3B에서, 레인 1-5는 백미 시료의 일련의 연속적인 추출이 로딩되고, 레인 6 및 7은 표백 폐기물의 두 번의 연속적인 추출이 로딩된다. 양성 대조군(PC): 웨스턴 블롯팅에서, 이는 100 ng의 이미글루세라제(imiglucerase)에 해당한다. 백미에 함유된 대부분의 재조합 인간 산 베타-글루코시다제는 세 번의 일련의 추출에 의해 회수될 수 있음을 알 수 있다.

도 4A는 GCase 형질 전환체의 종자로부터 얻은 단백질 추출물에 대하여 실시한 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한다. 레인 1: 마커 Precision Plus Protein Standard (BioRad); 레인 2: 양성 대조군(PC, 100 ng 이미글루세라제); 레인 3: 음성 대조군(NC, 형질 전환하지 않은 벼인 동종 번식 CR W3로부터 얻은 단백질 추출물); 레인 4-10: 상이한 일차 형질 전환체들의 종자 단백질 추출물;

도 4B는 GCase 형질 전환체 식물로부터 얻은 종자 단백질 추출물의 2차원적 전기영동후 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출된 인간 산 베타-글루코시다제의 세 개의 당형태를 보여준다.

도 5A 및 도 5B는 형질 전환하지 않는 벼(A) 및 GCase 형질 전환체(B)의 종자 부분에 대하여 투과 전자 현미경 분석(12500X 배율)으로 얻은 면역분석(immunolocalization)의 이미지를 보여준다. 재조합 인간 산 베타-글루코시다제의 축적은 단백질 저장 액포(PSV)만을 수반한다는 것을 알 수 있다.

도 6A 및 도 6B는 재조합 인간 산 베타-글루코시다제를 함유하는 용리 피크가 나타나는 HIC (A) 및 IEC (B) 크로마토그램의 예를 도시한다.

도 7은 NC (형질 전환되지 않는 식물) 및 GCase 형질 전환체에 대한 상이한 크로마토그래피 분획을 이용하여 실시한 4-MUG 분석에서 기록된 형광 그래프를 도시한다. 또한, 관련된 웨스턴 블롯 분석의 결과가 도시된다. EX: 원료 추출물; R: 유량; E: 용리 분획; PC: 양성 대조군(이미글루세라제). 진정한 GCase 활성(E2-E3)은 IEC를 이용하여 내인성 GCase 유사체(E6)로부터 분리될 수 있다는 것을 알 수 있다.

도 8A 및 도 8B는 겔 여과를 이용한 최종 정제 단계 후 재조합 인간 베타-글루코시다제에 대하여 실시한 SDS-PAGE 분석의 결과(A) 및 대응하는 웨스턴 블롯 신호(B)를 도시한다.

도 9는 HIC 및 IEC를 이용하여 정제한 GCase 시료에 대하여 MALDI-TOF 분석으로 얻은 질량 스펙트럼을 나타낸다.

도 10은 초기의 인위적으로 합성된 단편들로부터 pUC18에서 GAA 유전자를 조립하는 것을 보여주는 개략도이다.

도 11은 최종 발현 벡터 pSV2006[GluB4pro/LLTCK/GAA/ NOSTer]를 얻기 위해 채용된 방법의 개략도이다.

도 12는 상이한 GAA 형질 전환체들로부터 얻은 전체 단백질 추출물에 대하여 실시한 웨스턴 블롯 분석의 결과를 도시한다. 레인 1: M, 마커 Precision Plus Protein Standard (BioRad); 레인 2: NC(형질 전환되지 않는 식물로부터 얻은 종자 단백질 추출물); 레인 3: PC (100 ng의 미요자임(Myozyme)); 레인 4-10: 상이한 일차 형질 전환체로부터 얻은 종자 단백질 추출물.

도 13은 항-GAA 항체를 이용하여 수행한 성숙한 종자 내배유의 면역금 표지(immunogold labelling)의 결과를 도시한다. GAA는 단백질 저장 액포(PSV)에서 특이적으로 검출되고 단백질 체(PB)에서는 검출되지 않는다는 것을 알 수 있다. 음성 대조군(형질 전환되지 않는 식물에 의해 얻은 종자)에서는 신호가 검출되지 않았다(데이터 미도시). 배율: 16000X.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 본 발명은 특히, 재배 벼(*Oryza sativa* L.)의 종자 내배유에서 인간 산 베타-글루코시다제를 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 하기의 것들을 포함한다:

[0074] - 상기 단백질을 얻고, 배아에 궁극적으로 흡수되지 않는 내배유에 상기 단백질을 가두고, 상기 내배유내의 다량의 상기 단백질의 존재가 종자 활력 및 발아속도에 부정적인 영향을 미치지 않도록 식물을 형질 전환하는 제 1 단계;

[0075] -상기 식물 형질 전환의 제 1 단계에서, 상기 단백질을 암호화하는 유전자 상류 측의 내배유 특이 프로모터의 사용, 및 이의 조직 특이 축적을 위한 내배유 세포의 내형질 세포의 내강내로 새로이 합성된 단백질의 번역동시 전달(co-translational transfer)을 위한 신호 펩티드의 사용;

- [0076] - 식물의 종자 내배유내에 단백질을 축적하는 제 2 단계.
- [0077] 상기 식물 형질 전환 방법에서, 하기의 성분들을 함유하는 발현 벡터의 사용이 상상된다:
- [0078] i) 천연 또는 인위적 기원의 내배유 특이 프로모터;
- [0079] ii) 천연 또는 인위적 기원의 5' UTR;
- [0080] iii) 내배유 세포의 형질내 세망의 내강내로 재조합 단백질을 표적하기에 적당하고 특이 조직에서 상기 단백질의 축적을 결정하기에 적당한 신호 단백질을 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열;
- [0081] iv) 성숙 형태의 인간 단백질을 암호화하는 천연 또는 인위적 기원의 뉴클레오티드 서열;
- [0082] v) 천연 또는 인위적 기원의 3' UTR.
- [0083] 상기 발현 벡터에 함유되는 뉴클레오티드 서열은 예를 들어, 서열 번호: 1에 나타낸 것이다. 벼과 식물, 특히 벼의 가능한 알려진 내배유-특이 프로모터들 중에서, 본 발명은 GluB4 유전자의 프로모터(서열 번호:2에 나타낸 서열을 가짐)를 이용하는데, GluB4 암호화 단백질은 종자 내배유내에서 더욱 균일한 분포를 보여주기 때문이다. 또한, GluB4 프로모터는 글로불린, 프롤라민, 또는 GluB4 이외의 글루텔린처럼, 벼 내배유에서 다른 저장 단백질을 암호화하는 유전자들의 프로모터와 비교하여 더욱 높은 전사 활성을 갖는다.
- [0084] 찰벼인 동종번식CR W3 (Ente Nazionale Risi(Milan))에 의해 선택됨)로부터 PCR에 의해 GluB4 프로모터를 이의 리더 영역과 함께 분리했다. 상기 천연 리더는 다소 짧고, 유전자 발현에 긍정적인 영향을 미치는 반복적인 CAA 및 CT 요소가 부족하기 때문에, 이는 LLTCK (De Amicis et al. 2007, Transgenic Res 16: 731- 738)로서 알려져 있고 국제 특허 출원 PCT/EP2007/064590호에 기재되어 있고 서열번호: 3에 나타낸 5' UTR로 실질적으로 치환시켰다. 상기 서열 GluB4pro/LLTCK를 PSGluB4/GCase와 연결했는데, 여기서 PSGluB4는 내형질 세망에 들어가기 위해 벼의 글루텔린 4 전구체가 이용하는 신호 펩티드를 암호화하는 서열(서열 번호: 4에 나타냄)이고, GCase는 인간 산 베타-글루토시다제의 성숙한 형태를 암호화하는 서열(서열 번호: 5에 나타냄)이며, 상기 성숙한 형태는 천연 신호 펩티드가 결실된 전구체 단백질로 이루어진다. 클로닝 또는 서열 연결을 위해 실질적으로 사용되는 엔도뉴클라제 제한 효소의 도입으로 인해 상기 성숙한 단백질의 N-말단에서 외래 아미노산이 첨가되는 것을 회피하기 위하여, 성숙한 GCase 암호화 서열의 초기 부분(천연 발생하는 Hind III 제한 부위까지) 및 PSGluB4 서열에 해당하는 DNA 영역을 인위적으로 합성했다.
- [0085] 이러한 합성으로부터 얻어지는 PSGluB4의 서열은 천연 벼 서열과는 일치하지 않지만, LLTCK와 관련하여 번역 개시 코돈을 더욱 잘 인식하고 회귀 코돈 및 중간 코돈의 발생을 피하기 위하여 신중하게 도입되었던 변화로 인해 천연 벼 서열과 완전히 동의어이다. 반대로, 상기 GCase의 초기 부분은 인간 천연 서열에 대하여는 변화되지 않은 상태로 유지되었기 때문에, 전체 GCase 서열은 뉴클레오티드 위치 553 및 2046 사이에서 GenBank Accession No. M16328과 정확히 일치한다. 상기 합성 서열을 Hind III 제한 부위를 상기 효소의 나머지 부분을 암호화하는 것과 연결한 후, 전체 복합체를, pSV2006 바이너리 벡터에 미리 클로닝한 GluB4pro/LLTCK의 3' 말단에 연결했다. 상기 pSV2006은 pCAMBIA 1300 플라스미드로부터 본 출원인에 의해 개발되었다(www.cambia.org). 상기 인간 산 베타-글루코시다제 작제물에 사용된 폴리아데닐화 신호는 아그로박테리움 튜메파시엔스 노팔린(nopaline) 합성효소 유전자의 종결인자인 NOS ter 이었다. 상기 NOS 종결인자 서열은 서열 번호:6에 나타나있다. 최종 벡터pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOSter] (도 1)의 작제에 사용된 모든 서열을 확인한 후, 상기 벡터를 아그로박테리움 튜메파시엔스의 EHA 105 균주내로 전기천공법으로 도입했다. 다음에, 상기 조작된 균주를, 벼의 배발생 캘러스(*Oryza sativa* ssp. *japonica*, 동종번식 CR W3)의 형질 전환에 사용했다. 선별 배지 상에서 식물 형질 전환 및 재생의 전체 과정을 정기적으로 완료했다. 동일한 빛, 온도 및 습도 조건 하에서 기후 챔버에서 성장한 형질 전환된 식물과 대조군 식물 사이에는 차이가 관찰되지 않았다. 자성 및 음성 기관의 수정률 및 형질 전환 식물에서 꽃의 흡수율은 동종 번식한 CR W3의 형질 전환되지 않은 식물과 대등한 것으로 확인되었다. 모든 일차 형질 전환체는 인간 산 베타-글루코시다제의 발현 수준에 상관없이 95% 이상의 평균 활력을 갖는 종자를 생산했다. 또한, 발아 속도는 상기 종의 최댓값에 필적했다(4-6일 내에, 거의 모든 생육 가능한 종자는 일차 뿌리 및 초엽(coleoptile)을 발생했다).
- [0086] 일차 형질 전환체와 마찬가지로, 이들의 자손은 정상적으로 성장하여, 재조합 인간 산 베타-글루코시다제를 함유하는 종자를 생산했다. 이러한 효소 암호화 유전자의 존재를 모든 추정적으로 형질 전환된 식물(도 2)에서 및 자가수분에 의해 얻은 최상의 일차 형질 전환체의 150 개 이상의 무작위로 표본 추출한 자손에서 PCR 분석을 통해 확인했다. 이러한 분석에서, 형질 전환되지 않은 CR W3 식물의 전체 DNA 및 상기 발현 벡터의 미니프랩

추출물(miniprep extraction)에 각각 해당하는 음성 및 양성 대조군을 사용했다. 또한, 벼 엽록체의 DNA 영역 상에서 디자인한 특정 프라이머 쌍을 이용하여, 각각의 시험된 DNA 추출물의 증폭성(amplifiability)을 확인했다. 한편, PCR 분석 결과, 벼의 게놈은 인간 산 베타 글루코시다제를 암호화하는 서열에 의해 형질 전환되고 상기 형질 전환 유전자는 자손에게 유전되는 것으로 확인되었다. 이러한 유전은 자가 수분된 자손뿐 아니라, 형질 전환 식물을 음성 대조군 또는 다른 형질 전환 식물과 교배하여 유도한 것들에서도 확인되었다. 인간 산 베타-글루코시다제 메신저 RNA의 생성을 확인하기 위하여, 미숙한 벼 종자(개화후 10-15일)를 수확하여 전체 RNA 추출에 사용했다. 다음에, 하기의 분석을 수행했다: a. PCR에 의한 게놈 DNA 오염의 부재; b. RT-PCR에 의한 인간 산 베타-글루코시다제 메신저 RNA의 증폭; RT-PCR에 의한 글루텔린 4 메신저 RNA의 증폭. 이러한 경우 모두에 있어서, GCCase 유전자는 정기적으로 발현되는 것으로 보였으며, 글루텔린 4 저장 단백질을 암호화하는 유전자와 동일한 발현 양상을 나타냈다. 예상된 바와 같이, 음성 대조군 유래의 전체 RNA를 사용한 경우, 글루텔린 4 유전자의 증폭만이 얻어졌다. 또한, 미숙한 종자를 이용하여 투과 전자 현미경법으로 재조합 단백질을 면역분석(immunolocalize)했다. 이러한 분석 결과, 인간 산 베타-글루코시다제는 내배유 세포의 단백질 저장 액포에서만 축적되는 것으로 확인되었다. 위와 동일한 분석을 CR W3 대조군 종자에 대하여 반복 실시한 결과, 신호가 얻어지지 않았는데, 이는 본 발명자들이 사용한 분석의 큰 효과 및 항-GCase 항체의 절대 특이성을 입증하는 것이다. 신뢰가능하고 민감한 형광분석(fluorimetric assay)을 통해 베타-글루코시다제 활성을 측정하기 위한 가능성과 함께 특이 항체의 이용가능성이 최상의 형질 전환주를 선택하고 재조합 단백질의 정제 과정을 개발하기 위해 이용되었다. 추출 및 정제 과정에 관하여, 예비 종자 제조, 미정제 단백질 추출 및 재조합 산 베타-글루코시다제 분리 및 정제를 위한 프로토콜을 개발했다. 정제 프로토콜은 하기의 세 개의 일련의 단계로 이루어진다: 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC), 양이온 교환 크로마토그래피(IEC) 및 겔 여과(GF). 종자 외피 제거 및 정제는 최소 GCCase 손실로서 대부분의 단백질 오염물을 제거하는데 절대적으로 유리했는데, 추출 단계 동안의 손실은 매우 낮았다. GCCase-유사 활성의 원인이 되는 내인성 GCCase-유사 효소의 제거는 양이온 교환 크로마토그래피의 종료시 불연속적인 용리 과정을 통해 달성되었다. 이러한 크로마토그래피는 겔 여과 단계에 의한 단백질 오염물을 더욱 감소시키는 것을 가능하게 했다. SDS-PAGE에서, 상기 정제된 단백질은 이미글루세라제(Cerezyme, Genzyme Corp.)와 실질적으로 동일한 이동도를 나타냈고 약 60 kDa 겔보기 분자량을 나타냈다. 웨스턴 블러팅에서, 상기 정제된 단백질은 토끼에서 상승하는 항-이미글루세라제 항체에 의하여 강하게 검출되었다. 상기 정제된 단백질은 효소 활성이 있는 것으로 확인되었는데, 특히 이는 형광 기질인 4-메틸움벨리페릴 베타-D-글루코시다제를 효율적으로 가수분해하여, 이미글루세라제와 동일한 반응 속도를 나타냈다. 2 차원 전기영동에서, 표준 SDS-PAGE 후에 실시한 웨스턴 블롯 분석에서 반복적으로 검출된 단일 밴드는 최소한 세 개의 단백질 당형태로 분리되었다. 더 이상의 분석 결과, 벼 내배유에서 재조합 산 베타-글루코시다제의 보존성 및 이의 아미노산의 인간 천연 대조물과의 동일성이 확인되었다. N-말단 서열분석(microsequencing)결과, 상기 초기 노나펩티드(nonapeptide)는 인간 천연 산 베타-글루코시다제의 N-말단인 ARPCIPKSF에 해당하는 것으로 확인되었다. MALDI-TOF에서 수행된 펩티드 질량 지문검사(fingerprinting)결과, 상기 단백질의 C-말단은 완전히 보존되고, 천연 효소에서 관찰된 것과 마찬가지로, 다섯번째 N-글리코실화 부위에서 글리칸 사슬이 확인되지 않았다. 이와 다르게, 상기 단백질의 제 1, 제 2, 제 3 및 제 4 N-글리코실화 부위는 점유된 것으로 보였다. 제 1 부위에서 N-글리칸의 존재는 상기 단백질의 효소 활성에 필수적인 것이다.

- [0087] 실시예
- [0088] 실시예 1: GCCase 발현을 위한 분자 카세트의 제작
- [0089] 하기에서는 벼에서 인간 산 베타-글루코시다제의 내배유 특이적 발현을 위한 방법을 설명한다. 유사한 방법을 이용하여, 내형질 세망내로 단백질을 표적하기 위한 다른 내배유 특이적 프로모터 및/또는 서열의 존재에 특징이 있는 작제물의 변이체를 얻을 수 있다.
- [0090] 글루텔린 4 프로모터(GluB4pro)의 분리
- [0091] *Oryza sativa* (GenBank accession No. AY427571)의 글루텔린 4 프로모터를 분리하기 위하여, 동종번식 CR W3의 게놈 DNA에 대한 PCR을 수행했다. 이러한 PCR에서, 하기의 프라이머를 사용했다:
- [0092] 프라이머 GluB4pro (정방향): 서열번호: 7에 나타냄
- [0093] 프라이머 GluB4pro (역방향): 서열번호: 8에 나타냄.
- [0094] 차후의 클로닝을 촉진하기 위하여, GluB4pro 정방향 프라이머를 디자인하여, 증폭물(amplicon)의 5' 말단에 Sph I 및 Eco RI 제한 부위를 삽입하고, 마찬가지로 GluB4pro 역방향 프라이머를 디자인하여 PCR 생성물의 3' 말단

에 Xba I 부위를 도입했다.

- [0095] 사이클: 95 °C 2분; 40x (95 °C 45초; 63 °C 40 초; 72 °C 2분); 72 °C 5분.
- [0096] 상기 증폭 산물을 pGEM-T (Promega)내로 클로닝하고 완전히 서열 분석했다.
- [0097] GluB4 프로모터에서 인위적 LLTK 리더에 의한 천연 리더의 치환
- [0098] 벼의 글루텔린 4 프로모터의 천연 리더를 합성 리더인 LLTK (De Amicis et al. 2007, Transgenic Res 16: 731-738)로 치환하기 위하여, 도 2A의 개략도에 따라 적당한 프라이머(하나의 정방향 프라이머 및 세 개의 역방향 프라이머)를 이용하여 세 번의 일련의 PCR을 수행했다. 첫 번째 PCR에서는, 플라스미드 pGEM-T[GluB4pro]를 주형으로 이용했고, 이후의 두 번의 PCR에서는 이전의 반응 생성물을 주형으로 이용했다. 정방향 프라이머 1은 Bfr I 제한 부위에서 출발하고, GluB4pro 서열의 3' 말단 가까이 어닐링 된다. 역방향 프라이머 1은 리더 영역의 바로 상류 측의 GluB4pro 영역에 그 3' 말단이 어닐링 된다. 어닐링 되지 않는 부위는 초기 LLTK 트랙(tract)의 합성에 기여한다. 역방향 프라이머 2는 후자의 단편에 어닐링 되고 LLTK 리더 서열의 제 2 부분을 결정한다. 끝으로, 역방향 프라이머 3은 3' 말단에 LLTK 서열의 말단 부위 및 Xba I 부위를 도입한다. AccuTaq (Sigma) DNA 폴리머라제 및 하기의 온도 사이클을 이용하여 PCR 반응을 수행했다: 98 for 2분; 15 (I 및 II PCR) 또는 25(III PCR) x (94 °C 30 초; 65 °C 30 초; 68 °C 1 분); 68 °C 10분. 최종 PCR 생성물은 pGEM-T내로 클로닝하고 효소절단 및 서열 분석에 의해 확인했다. GluB4pro 천연 서열을 인위적 LLTK 리더 서열로 치환하기 위하여, Bfr I 및 Xba I 제한 부위를 이용했다. 벡터 및 삽입물을 T4 DNA 리가제와 연결하고, 얻어지는 벡터인 pGEM-T[GluB4pro/LLTK]를 PCR 분석 및 효소 절단에 의해 확인했다.
- [0099] SPGluB4로서 천연 신호 펩티드의 치환
- [0100] 벼에서 GCCase 발현을 증가시키기 위하여, 글루텔린 4의 신호 펩티드(SPGluB4)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 벼 코돈 이용에 근거하여 최적화하고, 인간 산 베타-글루코시다제(GCase)의 성숙한 형태를 암호화하는 서열의 전방에 위치시켰다. 성숙한 효소의 N-말단에 외래 아미노산이 부가되는 것을 방지하기 위하여, 연결될 가장자리에 의사(spurious) 엔도뉴클라제 제한 부위가 첨가되는 것을 회피했다. 이러한 문제를 해결하기 위하여, 5' 말단에서 Xba I 부위, SPGluB4 서열 및 천연 발생 Hind III 부위까지 GCCase 초기 영역을 포함하는 인위적 단편을 제조하여 pUC57 (Fermentas)내로 클로닝했다. 상기 서열을 검사한 후, pGEM-T[GCase] 내측의 천연 신호 펩티드를 암호화하는 단편, 즉 GenBank Nn M1 6328에 보고된 바와 같은 인간 산 베타-글루코시다제를 암호화하는 전체 서열을 암호화하는 플라스미드 대신에 클로닝했다. pUC57[SPGluB4] 및 pGEM-T[GCase]는 모두, Xba I 및 Hind III로 절단하여 삽입물 및 벡터 골격을 각각 발생했다. 이러한 부위들을 T4 DNA 리가제를 이용하여 서로 연결하여 pGEM-T[SPGluB4/GCase]를 얻고 효소 절단으로 확인했다.
- [0101] 벼에서 인간 산 베타-글루코시다제 발현을 위한 분자 카세트의 조립
- [0102] GluB4pro/LLTK 및 SPGluB4/GCase에 해당하는 영역을 pUC18[NOster]내로 두 단계로 서브클로닝하였는데, 상기 플라스미드는 아그로박테리움 튜메파시엔스의 NOS 폴리아데닐화 신호를 포함시켜서 pUC18(Pharmacia)로부터 얻은 것이다. 이러한 목적을 위하여, 각 영역의 5'- 및 3' 말단에 도입된 제한 부위, 즉 GluB4pro/LLTK의 경우 Sph I 및 Xba I, SPGluB4/GCase의 경우 Xba I 및 Sac I를 이용했다.
- [0103] pSV2006rGluB4pro/LLTK/SPGluB4/GCase/NOster1 벡터의 제조
- [0104] 최종 발현 벡터를 얻기 위하여, pSV2006 (pCambia 1300 유도체)를 사용했다. Eco RI 절단을 통해, pSV2006의 원래의 카세트, 및 pUC18rGluB4pro/LLTK/SPGluB4/GCase/NOster]에 함유된 분자 작제물을 제거했다. 상기 pSV2006 골격 및 목적 삽입물을 서로 연결하여 최종 발현 벡터(도 1)를 얻었는데, 이러한 벡터는 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주인 EHA 105내로 전기천공법으로 전달하기 전에 특정 분석을 받았다. 상기 조작된 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주를 *Oryza sativa* ssp. *japonica* 동종변식 CR W3의 형질 전환에 이용했다.
- [0105] 실시예 2: 아그로박테리움 튜메파시엔스를 통한 벼 형질 전환
- [0106] C. Huye (Rice Research Group, Institute of Plant Science, Leiden University) 및 E. Guiderdoni (Biotrop program, Cirad, Montpellier, France)에 의해 변형된 Hiei의 프로토콜(Hiei 등, 1994)에 따라 벼 형질 전환을 수행했다. 이러한 과정의 주요 단계를 설명하면 다음과 같다.
- [0107] 배발생 캘러스의 발생
- [0108] 배반 유래 배발생 캘러스를 이용하여 벼 형질 전환을 수행했다. 배반 조직으로부터 캘러스 증식을 유도하기 위

하여, 벼종자를 외피제거하고, 살균하여 잠재적인 병원균 및 부생식물 오염물을 제거하고, 살균 증류수로 수회 세척하고, 살균 블러팅 페이퍼에서 건조시키고, 캘러스 유도 배지(CIM)를 함유하는 페트리 접시로 옮겼다. 상기 접시를 암소에서 28 °C로 7일간 배양한 다음, 그 유도로부터 배반을 적출하고, 28 °C로 암소에서 14일간 CIM 상에서 배양했다. 배양의 종료시, 캘러스 덩어리를 작은 백색 캘러스를 기준으로 선별했다. 선별된 캘러스를 새로운 CIM에 옮기고 10 일간 배양하여 형질 전환에 적당한 배발생 캘러스를 발생했다.

- [0109] 아그로박테리움 튜메파시엔스의 동시배양
- [0110] 형질 전환에 충분한 양의 아그로박테리움 튜메파시엔스를 얻기 위하여, 상기 발현 벡터를 포함하는 균주를 LB 한천 배지상에서 30 °C로 3 일간 배양했다. 아그로박테리움 세포의 층을 수집하고, 1.00의 O.D.₆₀₀ (약 3-5x10⁹ 세포/mL)에 도달할 때 까지 액상 동시배양 배지(CCML)에 다시 현탁했다. 최상의 캘러스, 즉 치밀하고 백색이고 직경이 2 mm인 것들을 상기 세균 현탁액에 침적했다. 살균 와트만지에 블러팅한 후, 캘러스를 고에지(high-edge) 페트리 접시(Sarstedt)당 20개의 밀도로 동시배양 배지(CCMS)상에 옮기고 암소에서 25 °C로 3일간 배양했다.
- [0111] 하이그로마이신 내성 캘러스의 선별
- [0112] 동시배양의 종료시, 캘러스를 선별배지 I(SMI)에 옮기고, 암소에서 28 °C로 2주간 배양했다. 다음에, 상기 캘러스를 선별 배지II (SMII)상에 옮기고, 동일 조건에서 1 주간 배양했다.
- [0113] 형질 전환된 캘러스로부터 식물 재생
- [0114] 적절한 호르몬 자극을 통해 형질 전환 식물의 재생을 달성했다. 배발생 하이그로마이신 내성 캘러스를 선별하고, 예비 재생 배지(PRM)상에 옮기고, 28 °C에서 1주간 고에지 페트리 접시에서 배양했다. 다음에, 캘러스를 페트리 접시당 8-10개의 수로 재생 배지(RM)상에 옮겼다. 식물 재생은 명소에서 28 °C에서 3-4주간 일어났다. 식물이 캘러스로부터 분리되기에 충분히 성장한 때(3 cm 이하 높이), 25 mL의 발근 배지(ROT)를 함유하는 배양 튜브에 옮겼다. 상기 튜브를 명소에서 28 °C에서 약 3주간 유지했다. 재생 과정의 종료시, 식물을 토탄(peat)에 심고, 금속 할로겐 램프인 Osram Powerstar[®] HQI[®]-BT 400 W/D(16 시간 밝음/8시간 어둠)하에서 24 °C, 85% 상대 습도로 인공기상실(phytotrone)에서 성숙할 때 까지 성장시켰다.
- [0115] 실시예 3: GCCase 작제물로 형질 전환한 벼 종자로부터 전체 단백질의 추출
- [0116] 형질 전환 벼 종자를 외피제거한 다음, Satake TO-92 (Satake Corporation, Japan)를 이용하여 정백했다. 다음에, 정백한 벼 종자를 도정하고 얻어지는 가루를 10:1.5에 해당하는 완충액 체적(mL) 및 가루 중량(g) 사이의 비를 이용하여 추출 완충액 (50 mM 초산나트륨, 350 mM NaCl, pH = 5.5)에서 균질화했다. 4 °C에서 1 시간 배양한 후, 시료를 14000xg에서 45 분간 원심분리했다. 상징액을 회수한 후, 남아있는 펠릿을 상기와 동일 과정에 따라 2번 더 추출했다. 상기 정백된 종자 및 정백 폐기물로부터 얻은 단백질 추출물을 SDS-PAGE (도 3A 및 도 3B) 및 웨스턴 블러팅으로 분석했다. 분석 결과, 상기 재조합 인간 산 베타-글루코시다제의 대부분은 정백 종자에 함유되어 있고, 3번의 연속적인 추출을 이용하여 회수할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0117] 실시예 4: GCCase 형질 전환 종자의 전체 단백질 추출물에 대한 웨스턴 블롯 분석 및 2차원적 전기영동
- [0118] Mini Protean II 장치(BioRad) 및 0.75 mm 두께의 10% 폴리아크릴아미드 겔을 이용한 SDS-PAGE (Laemli, 1970)로 전체 단백질 추출물을 분리했다. 로딩전에, 시료를 베타-머캅토에탄올이 없이 100 °C에서 5분간 변성시켰다. SDS-PAGE 후, 단백질을 15V로 30 분간 Trans-Blot SD 장치((BioRad)를 이용하여 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(PVDF, Immobilon-P^{SO} by Millipore)상에 옮겼다. 다음에, 시료를, 두 마리의 토끼를 상업적인 이미 글루세라제로 면역시켜 제조한 항-GCase 항체와 반응시켰다. 하기의 반응 조건을 사용했다: 블로킹 용액(PBS중 7.5% p/v Oxoid skim milk)에서 1:1000의 희석액을 이용하여 실온에서 1 시간동안 배양. PBS Tween 0.1% v/v에서 세척한 후, 항-토끼 HRP-결합 2차 항체(Sigma, 1:10000 희석)를 실온에서 1 시간 배양했다. 다음에, ECL PlusTM (GE Healthcare)를 이용하여 화학발광을 발생했다. 양성 단백질 밴드의 분자량을 측정하기 위하여, Precision Plus Protein standard (BioRad)를 HRP-결합 Precision Streptactin 항체(BioRad)와 함께 이용했다(도 4A).
- [0119] 약 200 µg의 종자 전체 단백질을 함유하는 두 개의 시료를 등전점전기영동(isoelectrofocusing) 및 SDS-PAGE로 분석했다. 상기 첫 번째 분석은 PROTEAN IEF 포커싱 시스템(BioRad) 및 3-10의 비선형 pH 범위의 7 cm의 ReadyStrip IPG(BioRad)를 이용하여 수행했다. 단백질 추출물을 2D 클린업(Clean-Up) 키트(GE Healthcare)로

침전시킨 후, 130 μ L의 DeStreak 재수화 용액(GE Healthcare) 및 0.6% Byolites 양쪽성전해질 3-10 (BioRad) 로 다시 현탁시켰다. 하기의 러닝(running) 조건을 이용했다:

[0120] 단계 1: 250 V, 15분;

[0121] 단계 2: 4000 V, 2 시간,

[0122] 단계 3: 20000 V, 약 24 시간

[0123] 상기 과정의 종료시, 스트립을 두 개의 상이한 평형 완충액으로 세척했다: 평형 완충액 I (2% DTT, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 6 M 우레아, 30% 글리세롤 및 0.002% 브로모페놀 블루, pH = 8.8), 15분; 및 평형 완충액 II(2.5% 아이오도아세트아미드, 2% SDS, 50 mM Tris-HCl, 6 M 우레아, 30% 글리세롤 및 0.002% 브로모페놀 블루, pH = 8.8), 20 분. 시료를 표준 SDS-PAGE 프로토콜에 따라 두 개의 분리된 겔에서 제 2 치수로 러닝 했다. 하나의 전기영동 겔은 콜로이드 쿠마시에 블루(0.08% Coomassie Blue R-250, 1.6% 오르토 인산, 8% 황산암모늄, 20% 메탄올)로 염색하면서, 다른 겔은 웨스턴 블러팅으로 분석했다(도 4B). 전체 과정은 형질 전환되지 않은 CR W3 종자로부터 얻은 단백질 시료와 병행하여 실시했다.

[0124] 실시예 5: 면역법(immunolocalization)에 의한 GCCase 저장 부위의 측정

[0125] 유백색 상에서 형질 전환 종자를 수확하고, 외피제거하고, 1 mm 단편으로 절단하고, 실온에서 1 시간 동안 0.2% 글루타르알데히드에 고정시켰다. 0.15 M 인산염 완충액에서 세척한 후, 무수 에탄올의 구배(25 에서 100%)를 갖는 탈수화를 수행했다. 탈수된 시료를 LR 백색 수지(London Resin Co.)에 포매하고, 60 °C에서 24 시간 중합했다. 절편(2-3 μ m 두께)을 LKB Nova 마이크로톰을 이용하여 절단하고, 니켈 메시 그리드(Electron Microscopy Sciences)상에 위치시키고, 염소의 정상 혈청 용액(Aurion)과 함께 15분간 배양하고, 완충액 C(0.05 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.2% BSA)에서 1:30으로 희석한 다음, 실온에서 1 시간동안 1차 항-GCase 항체(완충액 C에서 1:500으로 희석)와 반응시켰다. 완충액 B (0.5 M Tris-HCl, pH 7.6, 0.9% NaCl)에서 0.1% Tween 20 w/v (6 x 5 분)을 이용하여 수회 세척한 후, 절편을 완충액 E(0.02 M Tris-HCl, pH 8.2, 0.9% NaCl and 1% BSA 함유)에서 실온에서 1 시간 동안, 콜로이드 금(15 nm, Aurion)이 결합된 이차 항체(1:40으로 희석됨)와 함께 배양했다. 항체와의 배양의 종료시, 절편을 세척하고 우라닐 아세테이트 및 시트르산납(Reynolds, 1963)으로 염색한 다음, Philips CM 10 투과 전자 현미경(TEM)을 이용하여 관찰했다.

[0126] 얻어진 결과는 종자 내배유의 단백질 저장 액포(PSV)에서만 GCCase이 존재하는 것을 나타냈고, 상기 다클론 항체는 유의적인 배경 신호가 없이 강하고 분명한 신호를 갖는 GCCase를 동정하는 것을 가능하게 했다. 형질 전환되지 않은 벼 종자에 대하여 상기와 동일한 분석을 실시한 결과, 기질 결합 교차 반응 부위에 대한 어떠한 증거의 결핍을 통해 항-GCase 항체의 높은 특이성을 확인했다(도 5A 및 도 5B).

[0127] 실시예 6: 벼 종자로부터 재조합 인간 산 베타-글루코시다제의 정제

[0128] 정제의 목적을 위하여, 공업적 규모로 실시할 수 있는 프로토콜을 개발하였는데, 상기 프로토콜은 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)를 이용하여 수행되는 제 1 포착 단계(도 6A); 이온교환 크로마토그래피(IEC)에 기초한 중간 단계(도 6B); 겔 여과를 이용하여 수행되는 최종 마무리 단계에 기초한다. 모든 크로마토그래피 단계는 AKTA 프라임 시스템(GE Healthcare)을 이용하여 수행했다.

[0129] 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)

[0130] 이 단계는 5 mL의 HiTrap Octyl FF (GE Healthcare)를 이용하여 수행했다. 이러한 과정의 초기에, 칼럼을 1배 체적의 로딩 완충액(50 mM 초산나트륨, 350 mM NaCl 및 100 mM 황산암모늄, pH=5.5)로 평형시키고, 시료 로딩후, 3 M 황산암모늄 용액을 추출물에 첨가하여 100 mM 황산암모늄의 최종 농도를 얻은 다음, 상기 추출물을 0.2 mm 필터(Millipore)를 통해 여과했다. 그 시료를 1 mL/min의 유속으로 상기 칼럼에 적용했다. 상기 칼럼을 3배 체적의 로딩 완충액으로 세척한 다음 50 mM 초산나트륨(pH 5.5)으로 평평한 기선까지 세척했다. 50 mM 초산나트륨에서 66% 에틸렌 글리콜을 이용하여 용리를 수행했다. 상기 과정의 종료시, 상기 칼럼을 20% 에탄올로 세척 및 재생했다.

[0131] 이온 교환 크로마토그래피(IEC)

[0132] IEC를 위해, 양이온 수지를 함유하는 5 ml의 HiTrap SP FF를 이용했다. 50 mM 초산나트륨을 이용하여 칼럼을 평형시킨 다음(용액 A), 동일한 완충액으로 1:1로 희석한 HIC 용리 분획을 로딩했다. 칼럼 로딩후, 용액 A에서 1M 용액의 15, 20 및 100%로 NaCl의 양을 증가시키면서 불연속 구배의 용리를 실시했다. 종료시, 20% 에탄올을

이용하여 상기 칼럼을 재생시켰다. 각각의 크로마토그래피 조작으로부터 얻은 분획에 대하여 실시한 면역 분석 결과, 재조합 인간 산 베타-글로불린은 20% NaCl을 함유하는 용액에 의해 용리되는 것으로 확인되었다. 형질 전환되지 않은 종자의 단백질 추출물로부터 얻은 용리 분획에 대하여 실시한 효소 활성 시험 결과, GCCase-유사 활성의 원인이 되는 내인성 성분으로부터 인간 산 베타-글루코시드의 분리가 이러한 크로마토그래피 단계에서 일어나는 것으로 확인되었다. 특히, 20% NaCl 농도에서, 내인성 성분은 상기 칼럼에 효율적으로 유지되는 것으로 확인되었다(도 7).

[0133] 겔 여과

[0134] 겔 여과를 위하여, HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 고분해능(GE Healthcare) 및 20 mM 초산나트륨 및 200 mM NaCl, pH 5.5로 이루어진 용리 완충액을 이용했다. 상기 칼럼을 2배 체적의 완충액으로 세척한 다음, IEC 용리 생성물을 0.3 mL/min의 유속으로 로딩했다. 목적 피이크를 SDS-PAGE 및 웨스턴 블러팅으로 분석했다(도 8A 및 도 8B).

[0135] 실시예 7: GCCase 효소 활성의 측정

[0136] 4-MUG(4-메틸움벨리페릴 β-D-글루코시다제, Sigma)를 기질로 이용하여 재조합 인간 GCCase 활성을 분석했다. 반응 혼합물은 75 mM 인산칼륨 완충액 pH 5.9, 0.125% w/v 타우로콜레이트 및 3 mM 4-MUG를 함유했다. 300 μL의 분석 용액에서 10 μL의 시료를 이용하여 37 °C에서 1 시간 동안 반응을 수행했다. 1690 μL의 0.1 M 글리신-NaOH (pH 10.0)을 첨가하여 반응을 중지했다. 365 ± 7 nm의 여기 파장 및 460 ± 15 nm의 방출 파장에서 형광분석기를 이용하여 효소 활성을 측정했다. 하나의 단위(U)는 분당 1 마이크로 몰의 기질을 방출하는 효소의 양으로 정의되었다. 기지량의 상업적인 이미글루세라제와 비교하여 상이한 시료량을 실험했다. 형광분석 결과, 베타 내배유에서 생성된 재조합 인간 GCCase는 활성이 있고, 상업적인 이미글루세라제와 동일한 반응 속도에 특징이 있는 것으로 확인되었다.

[0137] 실시예 8: 재조합 GCCase의 N-말단 서열의 결정

[0138] GCCase N-말단 서열의 정확도를 단백질 서열 분석으로 확인했다. 이를 위하여, 효소 분획을 HIC 및 IEC로 정제하고, SDS-폴리아크릴아미드 겔에 로딩하고, 전기영동의 종료시, Trans-Blot Semi-Dry 장치를 이용하여 PVDF 막에 전달했다(전달 조건: 10 mM CAPS 완충액 및 10% 메탄올, pH 11.0에서 25 V로 30 분). 전달 후, 상기 막을 50% 메탄올에서 5분간 0.25% (w/v) 쿠마시에-블루 R-250 용액으로 염색하고, 물로 세척하고, 50% 메탄올 용액으로 탈염색하여 목적 단백질에 해당하는 밴드를 시각화했다. Edman 분해 과정(Edman, 1950)에 따라 서열분석을 수행했다. 상기 분석 결과, 인간 산 베타-글루코시다제의 성숙 형태의 N-말단 서열과 완전히 겹치는 노나펩티드(ARPCIPKSF)의 존재가 확인되었다. 따라서, 베타의 글루텔린 4 신호는 ER 막계에 의해 잘 인식되고, 내재화(internalization) 과정 동안 정확히 제거되는 것으로 판단될 수 있다.

[0139] 실시예 9: 정제된 GCCase에 대한 MALDI-TOF 분석

[0140] 트립신에 의한 단백질 절단

[0141] 겔 전기영동 및 0.25% (w/v) 쿠마시에-블루 R-250 수용액, 50% 메탄올, 10% 빙초산을 이용한 염색 후, 재조합 GCCase에 해당하는 단백질 밴드를 절단하고 37 °C에서 300 μL의 100 mM NH₄HCO₃ 및 100% 아세토니트릴(ACN) (50:50 v/v) 용액으로 세척하고, 분쇄(pestle)한 다음, 100 μL of ACN을 이용하여 탈수시켰다. 다음에, 단백질 밴드를 56 °C로 100 mM NH₄HCO₃에서 50 μL의 20 mM DTT로 처리하여 이황화물 결합을 감소시키고, 100 mM NH₄HCO₃에서 30 분간 50 μL의 50 mM IAA (아이오도아세트아미드)를 이용하여 알킬화했다. 또한, 단백질 밴드를 300 μL의 100 mM NH₄HCO₃로 세척한 다음, 300 μL의 20 mM NH₄HCO₃ 및 100% ACN (50:50 v/v) 용액으로 세척하고, 100 μL ACN을 첨가하여 탈수시켰다. 다음에, 단백질 밴드를 100 mM NH₄HCO₃ 및 50 ng/μL 트립신(Promega)을 함유하는 5-10 μL의 분해 완충액으로 다시 수화시키고, 30 분후, 20 μL의 20 mM NH₄HCO₃를 첨가했다. 37 °C에서 시료를 밤새 배양한 후, 트립신 펩티드를 함유하는 완충액을 제거하고, 상기 시료에 10 μL의 2% 포름산 및 60% ACN (50:50 v/v) 용액을 첨가하여 펩티드 추출을 더욱 더 수행했다. 상기 두 추출액을 풀링(pooling)한 다음, MALDI-TOF 분석(Perkin Elmer)에 사용했다.

[0142] C18 수지의 펩티드 정제

[0143] 상기 트립신 소화물을 정제하고, C18 zip-tip(Millipore)을 이용하여 탈염시켰다. 팁(tip)을 10 μL의 100% ACN로 4회 세척하고 10 μL의 0.1% TFA (트리플루오로아세트산)으로 3회 세척했다. 다음에, 시료를 상기 활성

화된 팁에 첨가하고, 0.1% TFA로 세척한 후, C18 zip-tip의 반전상 수지에 결합된 펩티드를 10 μ L의 100% ACN 및 0.1% TFA (70:30 (v/v))를 이용하여 용리시켰다.

[0144] MALDI-TOF 질량 분광분석에서 펩티드 질량 지문검사(Fingerprinting)에 의한 단백질 동정

[0145] 금속 지지체 상에 위치한 1 μ L의 CHCA 수지(α -시아노-4-히드록시심남산) 농축 용액을 1 μ L의 정제 펩티드에 첨가하여 MALDI-TOF 분석용 시료 제조를 수행했다. 분석 결과(도 9), 실시예 6에서 설명한 과정으로 정제한 단백질은 확실히 인간 산 베타-글루코시다제에 해당하는 것으로 확인되었다. 특히, 이의 동정은 10^{-32} 의 스코어로서 얻었고 53%의 인식 펩티드와의 서열 커버리지로서 얻었다. 이러한 결과는 유의적인 수준이 10^{-6} 의 스코어 및 30% 이상의 커버리지로서 달성된다는 것을 나타낸다. 흥미롭게도, 상기 단백질의 N-말단 및 C-말단은 MALDI-TOF에서 인식된 펩티드들 중에서 확인되었다(완전한 목록은 도 1 참조).

【표 1】

MALDI-TOF 질량 분광분석에 의해 분석된 트립신 펩티드의 주요 지정

| M 이론 | ΔM | 지정 |
|----------|------------|--------------|
| 840.864 | -0.010 | 1-7 N-말단 |
| 883.451 | 0.104 | 322-329 |
| 932.472 | 0.122 | 426-433 |
| 950.461 | 0.102 | 347-353 |
| 976.586 | 0.073 | 286-293 |
| 988.655 | 0.045 | 156-163 |
| 1002.517 | 0.084 | 278-285 |
| 1086.628 | 0.209 | 464-473 |
| 1281.585 | 0.008 | 121-131 |
| 1459.792 | 0.023 | 396-408 |
| 1527.722 | 0.006 | 199-211 |
| 1630.818 | 0.995 | 263-277 |
| 1646.794 | 0.018 | 107-120 |
| 1664.806 | 0.038 | 347-359 |
| 1714.937 | 0.087 | 426-441 |
| 1870.896 | 0.120 | 330-346 |
| 2099.099 | 0.170 | 304-321 |
| 2304.190 | 0.074 | 442-463 |
| 2562.432 | 0.205 | 164-186 |
| 2846.256 | 1.025 | 132-155 |
| 3087.435 | 1.005 | 132-157 |
| 3139.530 | 0.325 | 199-224 |
| 3217.641 | 1.521 | 258-285 |
| 3424.784 | 1.007 | 506-535 C-말단 |

[0146]

실시

예 10: GAA 발현 벡터의 제조

[0147] 이 실시예는 벼에서 인간 산 알파-글루코시다제의 내배유 특이적 발현을 위한 방법을 설명한다. 특히, 최종 발현 벡터 pSV2006[GluB4pro/LLTCK/GAA/NOStcr]의 구현이 기재된다. 이러한 벡터는 전술한 pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOStcr] 벡터에서 GCase 유전자를 GAA 유전자로 교체함으로써 구현되었다.

[0148] 벼 내배유에서 형질 전환 유전자 발현 수준을 증가시키기 위하여 인간 산 알파-글루코시다제(GenBank Accession No. NM 000 152)의 암호화 서열을 변형시키고, 상기 새로운 GAA 암호화 서열은 벼 코돈의 이용에 근거하여 제작되었다. 또한, 천연 GAA 신호 펩티드를, ER 내강에서 재조합 GCase를 표적하기 위해 사용된 것과 동일한 운반 펩티드인 PSGluB4로 치환했다. 상기 GAA 암호화 서열은 길이가 2850 bp 이므로, 이는 세 개의 단편(A, B 및 C)에서 인위적으로 합성하였다. 분명히 배향된 형태로 이러한 단편을 조립하기 위하여, 이들의 가장자리에 특정 효소 제한 부위를 동의 점 돌연변이를 통해 도입했다. Xba I 및 Sac I 부위를, 제 1 단편의 5' 말단 및 제 3 단편의 3' 말단에 도입하여 전체 GAA 유전자의 pSV2006내로의 클로닝을 용이하게 했다. 상기 세 개의 GAA 단편들의 조립은 pUC 18 벡터(도 10)에서 수행한 다음, 이의 전체 서열(서열 번호: 9)을 확인한 후, Xba I 및 Sac I로 절단하여 pUC 18로부터 상기 유전자를 분리한 다음, pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSGluB4/GCase/NOStcr]내

의 GCCase 유전자를 치환하도록 클로닝하여, 최종 발현 벡터 pSV2006[GluB4pro/LLTCK/PSG1ub4/GAA/NOster] (도 1)를 얻었다.

[0149] 실시예 11: GAA 단백질 추출물에 대한 웨스턴 블러딩

[0150] 5 개의 외피 제거한 종자를 막자사발을 이용하여 50 mM 인산나트륨 완충액(pH = 6.2)에서 1 mL의 350 mM NaCl로써 분쇄했다. 얻어지는 균질액을 교반하에 얼음위에서 1 시간동안 배양한 다음, 4 °C에서 15000xg으로 45분간 원심분리했다. 그 상청액(20 µg의 안정한 단백질)을, Precision Protein Standard (BioRad)과 함께 10% 폴리아크릴아미드 겔에 로딩했다. 상기 겔을 트랜스 블러트 SD 장치를 이용하여 0.2 µm PVDF 막에 전기 블러딩했다. 상기 블러트를 실온에서 1 시간 동안 PBS 완충액에서 7.5% 비지방 건조 밀크로 블로킹했다. 세척 후, 동결건조한 알파 글루루코시다제(Myozyme™, Genzyme Corp.)를 항원으로 이용하여 제조한 일차 토끼 다클론 항체를 블로킹 완충액에 1:5000으로 희석하고, 상기 블러트를 실온에서 1 시간 동안 배양했다. 다음에, HRP-결합 이차 항체(Sigma Aldrich)를 1:10000으로 희석하고, 상기 막을 실온에서 1 시간 동안 배양했다. 최종 세척 후, ECL 플러스(GE Healthcare Bio-Sciences)를 이용하여 화학발광을 전개했다(도 12).

[0151] 실시예 12: 벼 내배유에서 재조합 GAA의 면역분석

[0152] 과정은 GCCase 작제물로 형질 전환한 벼 종자에 대하여 기재한 것과 아주 유사했다.

[0153] 간략히 말해서, 개화 후 약 10-15 일에, 미숙한 벼 종자를 탈수시키고, LR 백색 수지(London Resin Co. Ltd., Hamshire, UK)에 포매했다. 블록을 60 °C에서 24 시간 중합했다. 초박형 절편을 울트라마이크로톰 LKB Nova (Reichter)를 이용하여 절단하고, 면역분석을 위해 니켈 그리드(Electron Microscopy Sciences)에 장착했다. 절편을 완충액 C에서 1:30으로 희석한 정상 염소 항혈청(Aurion)과 15 분간 배양한 다음, 완충액 C에 1:100으로 희석한 항-GAA 혈청(웨스턴 블러트 분석에서 사용된 것과 동일함)과 함께 실온에서 1.5 시간 동안 배양했다. 세척 후, 상기 절편을 0.9% NaCl 및 1% BSA를 함유하는 0.02 M Tris-HCl(pH 8.2)에 1:40으로 희석한 15 nm 콜로이드 금(Aurion)이 결합된 염소 항-토끼의 용액과 함께 1 시간 동안 배양했다. 절편을 0.1% 시트르산납(Reynolds, 1963)으로 염색하고 Philips CM10 투과 전자 현미경(TEM)을 이용하여 검사했다. 동일한 과정을 형질 전환되지 않은 벼에서 유래한 시료에 대하여 실시했다.

[0154] GCCase 종자의 절편에서 관찰된 바와 같이, GAA 종자 내배유의 면역금 표지 결과, 재조합 효소는 단백질 저장 액포(PSV)내에 특이적으로 편재하는 것이 확인되었다(도 13). 단백질체(PB) 또는 CR W3 대조군에서는 신호가 검출되지 않았다.

[0155] 실시예 13: GAA 단백질 추출물에 대한 ELISA

[0156] ELISA를 실시하기 전에, 실시예 11에서 설명한 바와 같이 제조한 2 ml의 항-GAA 항혈청 항체를 1 ml의 Hitrap rProtein A FF 칼럼(GE Healthcare)으로 정제했다. 다음에, 상기 정제된 IgG를 하기의 프로토콜에 나타낸 바와 같이 EZ-Link® 말레이미드 활성화 양고추냉이 퍼옥시다제 키트(Pierce)를 이용하여 양고추냉이 퍼옥시다제에 결합시켰다: 100 µL의 말레이미드 결합 완충액을 2-MEA의 6-mg 바이알에 첨가하고, 그 용액을 IgG 시료에 첨가하고, 그 혼합물을 37 °C에서 90 분간 배양했다. 실온에서 평형시킨 후, 상기 IgG/2-MEA 용액을, 30 mL의 말레이미드 결합 완충액으로 미리 평형시킨 탈염 칼럼에 가했다. 다음에, 말레이미드 결합 완충액을 상기 칼럼에 첨가하고, 0.5 mL의 분획을 수득했다. 단백질 피크를 위치시키기 위하여, 각 분획의 흡광도를 280 nm에서 관독하고, 환원된 IgG를 함유하는 분획을 풀링하고 활성화 HRP의 바이알에 첨가했다. 그 반응물을 실온에서 1 시간 동안 배양했다. 다음에, 말레이미드 코팅 용액(PBS 및 EDTA 함유)에서 슈퍼텍스 200 10/300 GL 칼럼을 이용한 겔 여과를 수행했다. 용리된 피크를 Amicon Ultra-10 (Millipore)를 이용하여 0.85 µg/µL의 농도까지 농축했다. HRP-결합 항-GAA 항체의 품질을 ELISA에 의해 테스트했다. 이를 위하여, 1 mg/mL의 항원 미묘자임을 플레이트상에 코팅하고, 블로킹한 후, 결합 항체를 상이한 희석액으로 첨가하고, 37 °C에서 30 분간 배양했다. TMB 기질(3, 3', 5, 5'-테트라메틸벤지딘)을 이용하여 검출을 수행하고, HRP-결합 항-GAA 항체의 1:1000 희석액을 이용하여 상기 항원의 최저 검출 한계를 얻었다.

[0157] 다음에, 이러한 항체를 이용하여 후술하는 바와 같이 미정제 단백질 추출물에 대한 샌드위치 ELISA를 수행했다. ELISA 플레이트의 마이크로웰에 100 µL의 15 ng/µL 정제 항-GAA 항체를 첨가하고 4 °C에서 밤새 배양하여 코팅을 수행했다. 실온에서 한 시간 동안 PBS에서 3% BSA로 블로킹하고 PBS 0.1% Tween-20으로 세척한 다음, 전체 단백질 추출물(PBS(0.1% Tween-20 및 1% BSA)에 1:10 또는 1:100으로 희석)을 첨가하고 37 °C에서 30 분간 배양했다. 배양의 종료시, 3회 세척을 실시한 다음, HRP-결합 항-GAA 항체를 PBS(0.1% Tween-20 및 1% BSA)에서 1:40으로 희석하여 첨가하고 37 °C에서 30 분간 배양했다. 4회 세척한 후, TMB 기질을 이용하여 검출을 수

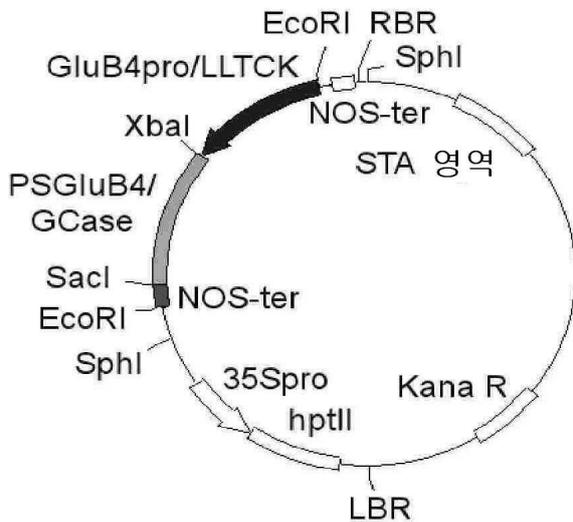
행했다. 기지량의 표준 미묘자임을 이용하여 수행한 ELISA 실험결과, GAA 일차 형질 전환체로부터 얻은 종자 단백질 시료는 전체 가용성 단백질의 0.5%에 해당하는 평균 GAA 함량을 나타냈다.

[0158] 전술한 바와 같이, 식물에서 인간 단백질, 특히 곡물 내배유에서 인간 재조합 리소솜 효소의 제조를 위한 방법에 대한 부분 및 단계들의 변경 및/또는 부가가 본 발명의 범위를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다는 것이 명백하다.

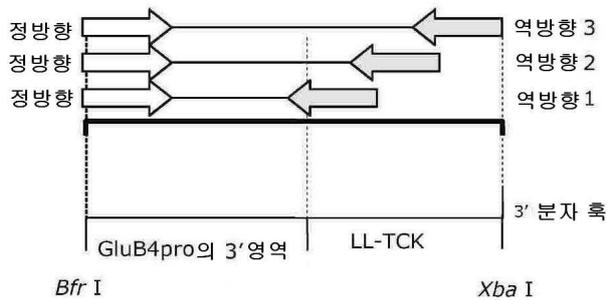
[0159] 또한, 본 발명은 일부의 특정 실시예를 참조로 설명하였으나, 당업자는 특허청구범위에서 기재되고 따라서 특허청구범위에 의해 정의되는 보호범위에 속하는 특징을 갖는 것으로, 식물에서 인간 단백질, 특히 곡물 내배유에서 인간 재조합 리소솜 효소의 제조를 위한 방법의 많은 다른 균등 형태를 달성할 수 있다는 것이 명백하다.

도면

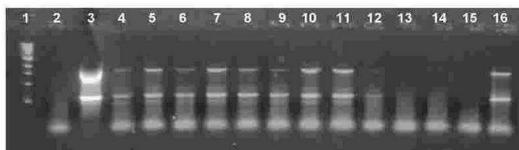
도면1



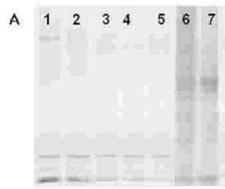
도면2a



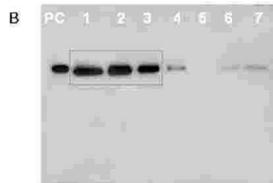
도면2b



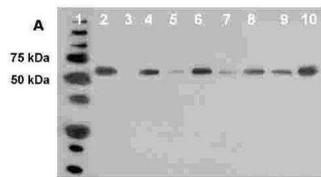
도면3a



도면3b



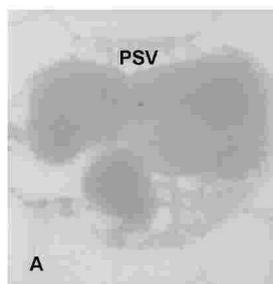
도면4a



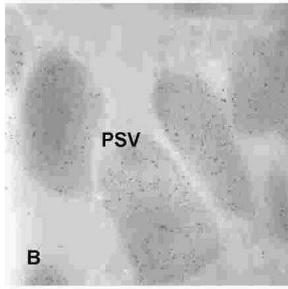
도면4b



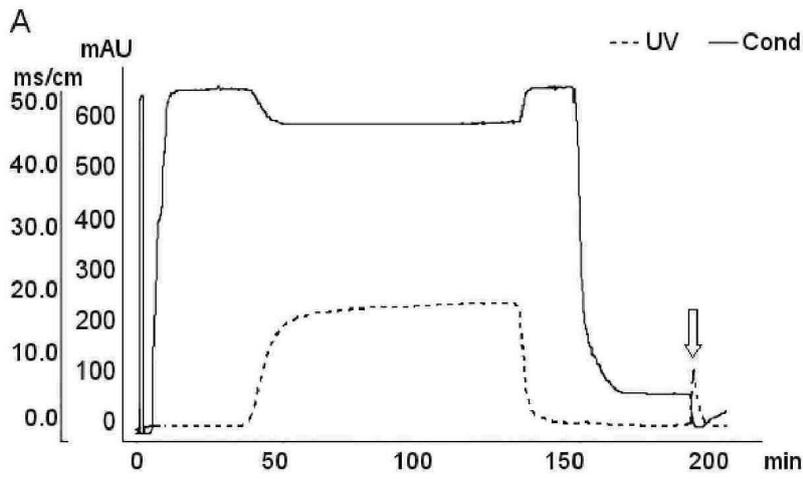
도면5a



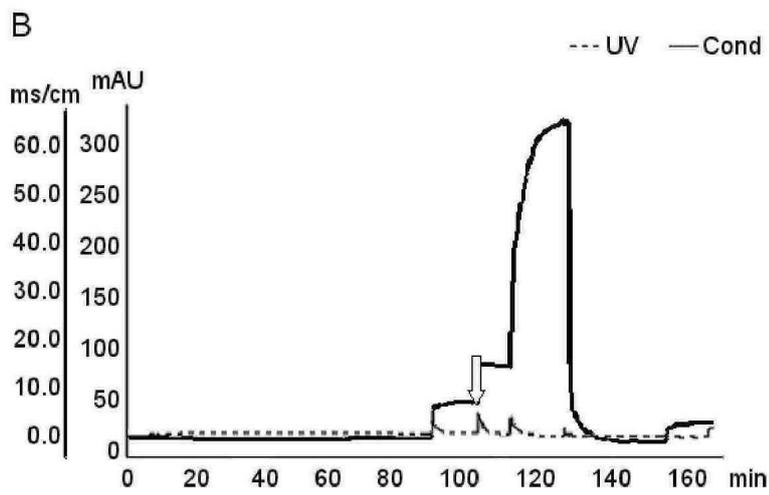
도면5b



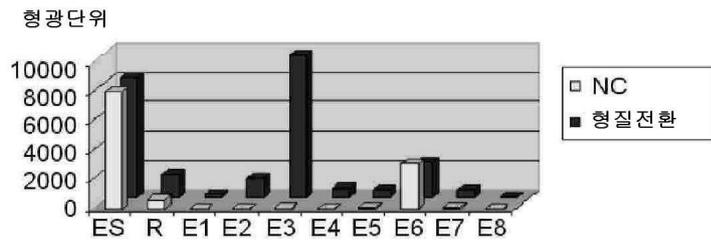
도면6a



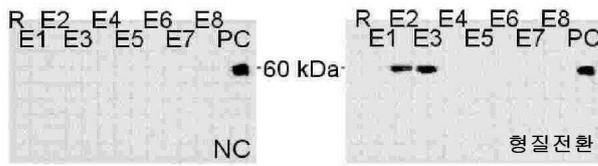
도면6b



도면7



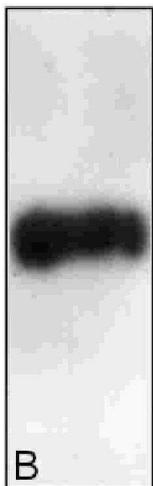
IEC 크로마토그래피 분석



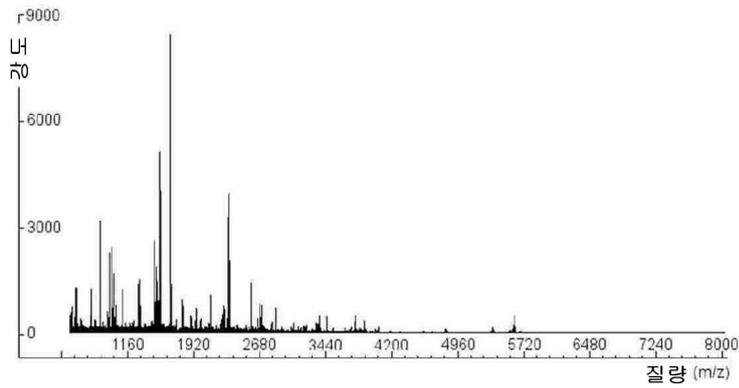
도면8a



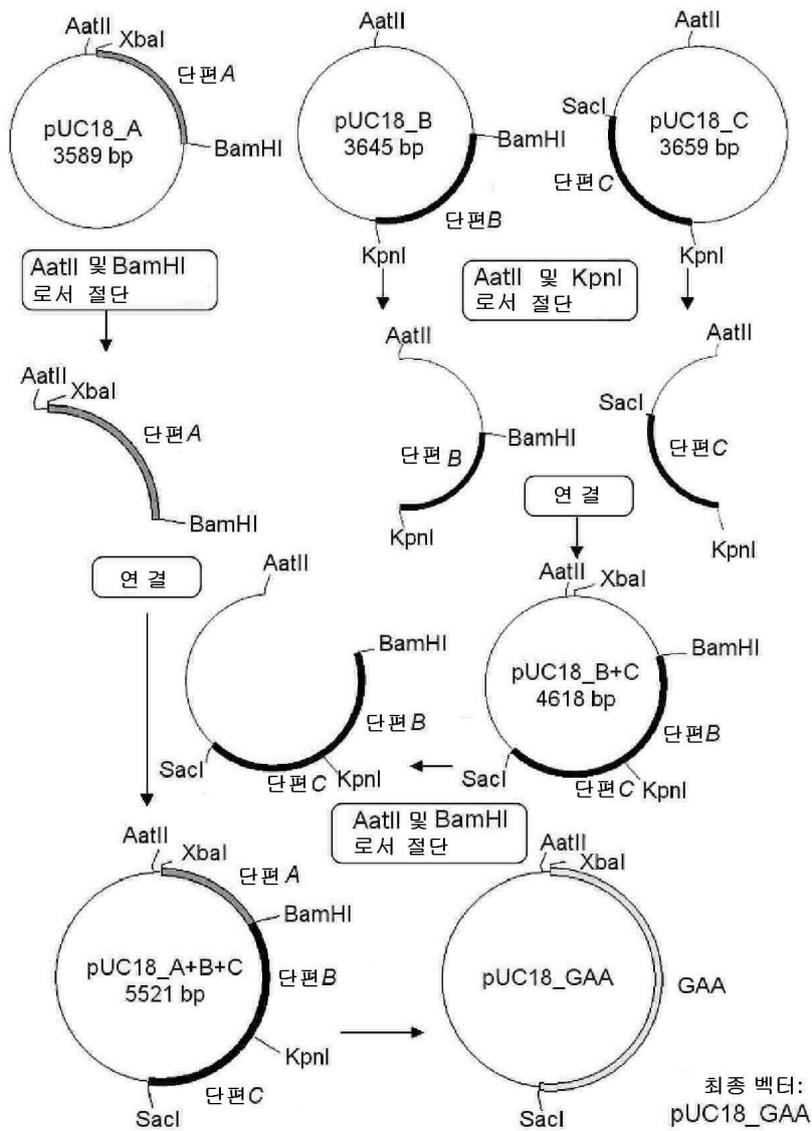
도면8b



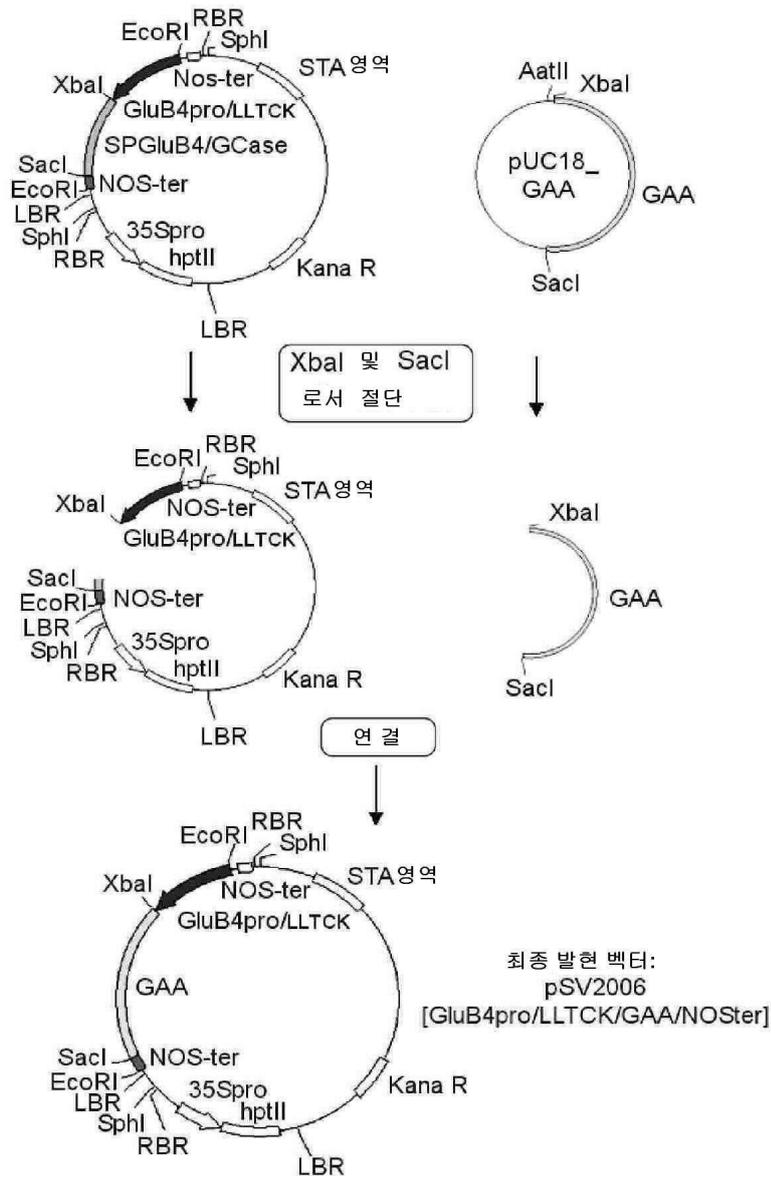
도면9



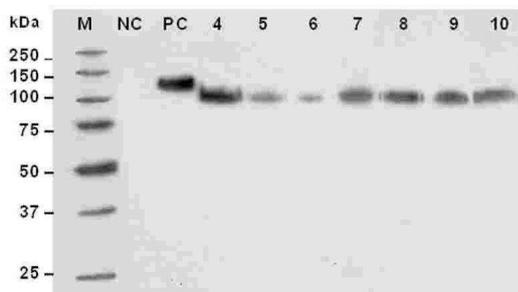
도면10



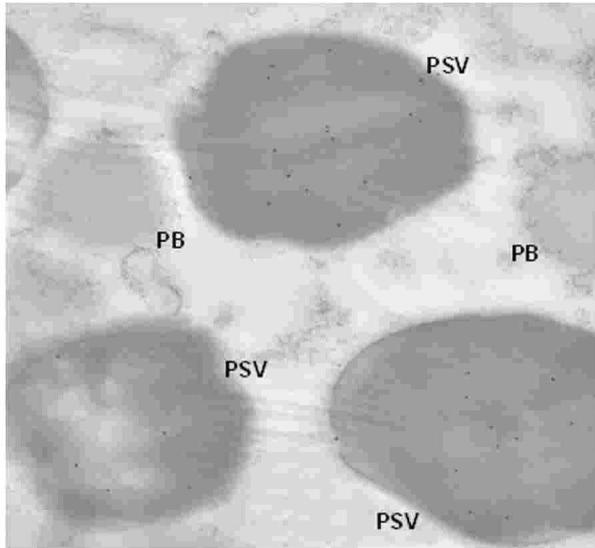
도면11



도면12



도면13



서열 목록

<110> Transactiva S.r.l.

<120> A method for the production of human recombinant lysosomal enzymes in a cereal endosperm

<130> V3-4707

<150> UD2008A000055

<151> 2008-03-13

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3357

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Expression cassette

<400> 1

gaattctaca gggttccttg cgtgaagaag ggtggcctgc ggttcacat taacggtcac 60

gactacttcc agctagtact ggtgaccaac gtcgcggcgg cagggtcaat caagtccatg 120

gaggttatgg gttccaacac agcggattgg atgccgatgg cacgtaactg gggcgcccaa 180

tggcactcac tggcctacct caccggtcaa ggtctatcct ttagggtcac caacacagat 240

gaccaaacgc tcgtcttcac caacgtcgtg ccaccaggat ggaagtttgg ccagacattt 300

gcaagcaage tgcagttcaa gtgagaggag aagcctgaat tgataccgga gcgtttcttt 360

tgggagtaac atctctggtt gcctagcaaa catatgattg tatataagtt tcgtttgtcgc 420
 tttattcttt cgggtgtgtaa aataacatac atgctttcct gatattttct tgtatatatg 480
 tacacacaca cgacaaatcc ttccatttct attattattg aacaatttaa ttgcgagggc 540
 gagtacttgt ctgtttacct ttttttttc agatggcatt ttatagtta acctttcatg 600

 gaccggcagt agttctaacc atgaatgaaa agaaatcata gtccacacca cgcagggaca 660
 ttgtggtcat tttagacaag acgatttgat taatgtcttg tatgatatgg tcgacagtga 720
 ggactaacia acatatggca tattttatta cggcgagtt aaataaattt atgtcacagt 780
 aataaactgc ctaataaatg cagccagaa aatataatga taaaaaaaaag aaaagataca 840
 taagtccatt gcitctactt ttttaaaaat taaatccaac attttctatt ttttggata 900
 aacttgaag tactagtggg atatgcaaaa tcatctaacc tccatatatt tcatcaattt 960
 gtttacttta catatgggag aggatagtat gtcaaagaaa atgacaacia gcttacaagt 1020

 ttcttatttt aaaagtccg ctaacttacc aagcatagtg tgccacgcaa aactgacaac 1080
 aaaccaacia atttaaggag cgcctaactt atcatctatg acataccgca caaaatgata 1140
 acatactaga gaaactttat tgcacaaaag gaaatttacc cataaggcaa aggaacatct 1200
 taaggctttg gatatacatt taccaacaag cattgtttgt attacccta aagcgcaaga 1260
 catgtcatcc atgagtcata gtgtgtatat ctcaacattg caaagctacc ttttttctat 1320
 tatacttttc gcattatagg ctatagatatta tctatacatg tcaacaaact ctatccctac 1380
 gtcatatctg aagattcttt tcttactat ataagttggc ttcctgtca ttgaactcac 1440

 atcaaccage ccaacacgta tttttacaac aataccaaca acaacaacia caaacaacat 1500
 tacaattacg tatttctctc tctagaatgg ccaccattgc gttctcccgg ctgtccatct 1560
 acttctgcgt gctgctgctg tgccacggct ccatggccgc ccgccctgc atccctaaaa 1620
 gcttcggcta cagctcggtg gtgtgtgtct gcaatgccac ataactgtgac tectttgacc 1680
 ccccgacctt tctgacctt ggtaccttca gccgctatga gactacacgc agtgggcgac 1740
 ggatggagct gactatgggg cccatccagg ctaatcacac gggcacaggc ctgctactga 1800
 ccctgcagcc agaacagaag ttccagaaaag tgaagggatt tggaggggcc atgacagatg 1860

 ctgctgctct caacatcctt gccctgtcac ccctgcca aaatttgcta cttaaatcgt 1920
 acttctctga agaaggaate ggatataaca tcatccgggt acccatggcc agctgtgact 1980
 tctccatccg cacctacacc tatgcagaca ccctgatga tttccagtgc cacaacttca 2040
 gcctcccaga ggaagatacc aagctcaaga taccctgat tcaccgagcc ctgcagttgg 2100
 cccagcgtcc cgtttactc cttgccagcc cctggacatc acccacttgg ctcaagacca 2160
 atggagcggg gaatgggaag gggctactca agggacagcc cggagacatc taccaccaga 2220

cctgggccag atactttgtg aagttcctgg atgcctatgc tgagcacaag ttacagttct 2280

gggcagtgac agctgaaaat gagccttctg ctgggctggt gagtggatac cccttccagt 2340

gcctgggctt caccctgaa catcagcgag acttcattgc ccgtgaccta ggtcctacce 2400

tcgccaacag tactcaccac aatgtccgcc tactcatgct ggatgaccaa cgcttctgctc 2460

tgccccactg ggcaaagggt gtaactgacag acccagaagc agctaaatat gttcatggca 2520

ttgctgtaca ttggtacctg gactttctgg ctccagccaa agccacccta ggggagacac 2580

accgcctgtt ccccaacacc atgctctttg cctcagaggc ctgtgtgggc tccaagttct 2640

gggagcagag tgtcgggcta ggctcctggg atcgagggat gcagtacagc cacagcatca 2700

tcacgaacct ccigtacat gtggctcggct ggaccgactg gaaccttgcc ctgaaccccg 2760

aaggaggacc caattgggtg cgtaactttg tcgacagtcc catcattgta gacatcacca 2820

aggacacgtt ttacaaacag cccatgttct accacctgg ccacttcagc aagttcattc 2880

ctgagggtc ccagagagtg gggctgggtg ccagtcagaa gaacgacctg gacgcagtgg 2940

cactgatgca tcccgatggc tctgctgttg tggctgtgct aaaccgctcc tctaaggatg 3000

tgctcttac catcaaggat cctgctgtgg gcttcttga gacaatctca cctggetact 3060

ccattcacac ctacctggtg catgccagt gagagctcga tcgttcaaac atttgcaat 3120

aaagtttctt aagattgaat cctgttgccg gtcttgcat gattatcata taatttctgt 3180

tgaattacgt taagcatgta ataattaaca tgtaatgcat gacgttattt atgagatggg 3240

ttttatgat tagagtccc caattataca ttaatacgc gatagaaaac aaaatatagc 3300

gcgcaaaacta ggataaatta tcgcgcgcggtgtcatctat gttactagat cgaattc 3357

<210> 2

<211> 1448

<212> DNA

<213> *Oryza sativa*

<400> 2

tacagggctt cttgcgtgaa gaagggtggc ctgcggttca ccattaacgg tcacgactac 60

ttccagctag tactggtgac caacgtcgcg gcggcagggt caatcaagtc catggaggtt 120

atgggttcca acacagcggg ttggatgccg atggcacgta actggggcgc ccaatggcac 180

tcactggcct acctcaccgg tcaaggctca tcctttaggg tcaccaacac agatgaccaa 240

acgctcgtct tcaccaacgt cgtgccacca ggatggaagt ttggccagac atttgaagc 300

aagctgcagt tcaagtgaga ggagaagcct gaattgatac cggagcgttt cttttgggag 360

taacatctct ggttgcctag caaacatatg attgtatata agtttcgttg tgcgtttatt 420

ctttcgggtg gtaaaataac atacatgcct tctgatatt ttcttgata tatgtacaca 480
cacacgacaa atccttccat ttctattatt attgaacaat ttaattgcga gggcgagtac 540

ttgtctgttt accttttttt ttccagatgg ctttttatag tttaaccttt catggaccgg 600
cagtagttct aaccatgaat gaaaagaaat catagtccac accacgcagg gacattgtgg 660
tcattttaga caagacgatt tgattaatgt cttgtatgat atggtcgaca gtgaggacta 720
acaaacatat ggcatatfff attaccggcg agttaaataa atttatgtca cagtaataaa 780
ctgcctaataaatgcacgcc agaaaataa atgataaaaa aaagaaaaga tacataagtc 840
cattgcttct acttttttaa aaattaatc caacattttc tttttttgg tataaacttg 900
gaagtactag ttggatatgc aaaatcatct aacctccata tatttcatca atttgittac 960

tttacaatg ggagaggata gtatgtcaaa gaaaatgaca acaagcttac aagtttctta 1020
ttttaaaagt tccgctaact tatcaagcat agtgtgccac gcaaaactga caacaaacca 1080
acaaatftaa ggagcgccta acttatcatc tatgacatac cgcacaaaat gataacatac 1140
tagagaaact ttattgcaca aaaggaaatt tatccataag gcaaaggaac atcttaagge 1200
tttggatata catttaccaa caagcattgt ttgtattacc cctaaagcgc aagacatgtc 1260
atccatgagt catagtgtgt atatctcaac attgcaaagc tacctttttt ctattatact 1320
tttcgatta taggctagat attatctata catgtcaaca aactctatcc ctacgtcata 1380

tctgaagatt cttttcttca ctatataagt tggcttccct gtcattgaac tcacatcaac 1440
cagcccaa 1448

<210> 3
<211> 73
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> LLTK Leader sequence
<400> 3

acacgtatft ttacaacaat accaacaaca acaacaacaa acaacattac aattacgtat 60
ttctctctct aga 73

<210> 4
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> Nucleotide sequence encoding SPGlub4
<400>

> 4

atggccacca ttgcgttctc ccggctgtcc atctacttct gcgtgctgct gctgtgccac 60

ggctccatgg cc 72

<210> 5

<211> 1494

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Nucleotide sequence encoding the mature form of human acid
beta-glucosidase

<400> 5

gccccccct gcatccctaa aagcttcggc tacagctcgg tgggtgtgtg ctgcaatgcc 60

acatactgtg actccttga cccccgacc ttctctgccc ttggtacctt cagccgctat 120

gagagtacac gcagtgggcg acggatggag ctgagtatgg ggcccatcca ggctaatac 180

acgggcacag gctgctact gacctgcag ccagaacaga agttccagaa agtgaaggga 240

tttgaggagg ccatgacaga tgctgctgct ctcaacatcc ttgcctgtc accccctgcc 300

caaaatttg tacttaaatc gtacttctct gaagaaggaa tcggatataa catcatccgg 360

gtacctatgg ccagctgtga cttctccatc cgcacctaca cctatgcaga caccctgat 420

gatttccagt tgcacaactt cagcctccca gaggaagata ccaagctcaa gataccctg 480

attcaccgag cctgcagtt ggcccagcgt cccgtttcac tccttgccag ccctggaca 540

tcaccactt ggetcaagac caatggagcg gtgaatggga aggggtcact caagggacag 600

cccggagaca tctaccacca gacctgggcc agatactttg tgaagttcct ggatgcctat 660

gctgagcaca agttacagtt ctgggcagtg acagctgaaa atgagccttc tgctgggctg 720

ttgagtggat accccttcca gtgcctgggc ttaccacctg aacatcagcg agacttcatt 780

gccccgtacc taggtctac cctcgccaac agtactcacc acaatgtccg cctactcatg 840

ctggatgacc aacgcttct gctgccccac tgggcaaagg tggactgac agaccagaa 900

gcagctaaat atgttcatgg cattgctgia cattggtacc tggactttct ggctccagcc 960

aaagccacc taggggagac acaccgctg ttcccaaca ccatgctctt tgctcagag 1020

gctgtgtgg gctccaagtt ctgggagcag agtgtgcggc taggtcctg ggatcgaggg 1080

atgcagtaca gccacagcat catcacgaac ctctgtacc atgtggtcgg ctggaccgac 1140

tggaaccttg cctgaacc cgaaggagga cccaattggg tgcgtaactt tgtcgacagt 1200

cccatcattg tagacatcac caaggacacg ttttacaac agcccatggt ctaccacctt 1260

ggccacttca gcaagttcat tcctgagggc tcccagagag tggggctggt tgccagttag 1320

aagaacgacc tggacgcagt ggcaactgatg catcccgatg gctctgctgt tgtggtcgtg 1380
 ctaaaccgct cctctaagga tgtgcctctt accatcaagg atcctgctgt ggcttcctg 1440

gagacaatct cacctggeta ctccattcac acctacctgt ggcatcgcca gtga 1494

<210> 6
 <211> 253
 <212> DNA
 <213> Agrobacterium tumefaciens
 <400> 6

gatcgttcaa acatttgcca ataaagtffc ttaagattga atcctgttgc cggctcttgcg 60
 atgattatca tataatttct gttgaattac gttaagcatg taataattaa catgtaatgc 120
 atgacgttat ttatgagatg ggtttttatg attagagtcc cgcaattata catttaatac 180
 gcgatagaaa acaaaatata gcgcgcaaac taggataaat tatcgcgcgc ggtgtcatct 240
 atgttactag atc 253

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Artificially synthesized primer sequence
 <400> 7

gcatgcgaat tctacagggt tccttgcgtg 30

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Artificially synthesized primer sequence
 <400> 8

tctagaagct attgaggat gttattggaa 30

<210> 9
 <211> 2850
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Artificially synthesized GAA sequence

<400> 9

atggccacca ttgcgttctc ccggetgtcc atctacttct gcgtgctgct gctgtgccac 60
 ggctccatgg cgggceacat cctgetgcat gacttctctgc tggatgctcg ggagctgtcc 120
 ggctccagcc cggtgctgga ggagaccac ccggcgcacc agcagggcgc gtccccggccg 180
 ggccctcggg atgcgcaggc gcaccggggc cggcctcggg ccgtgccac ccagtgcgat 240
 gtgcctccca actcccgggt cgactgcgcg ccggacaaag ccatcacca ggagcagtgc 300
 gaggcgcgtg gctgctgcta catcccggcc aagcagggcc tgcagggcgc gcagatgggc 360
 cagccctggt gcttcttccc tccctcctat ccctcctaca agctggagaa cctgtcctcc 420

 tccgagatgg gctacaccgc caccctcacc cggaccacgc ccaccttctt tcccaaagac 480
 atcctcacc tgcggctgga tgtgatgatg gagaccgaga accggctgca tttcaccatc 540
 aaagaccgg ccaaccggcg gtatgagggt cctctggaga cgctcgggt gcattcccgg 600
 gcgccagcc ctctgtactc cgttgagttc tccgaggagc ccttcggcgt gattgtgcgg 660
 cggcagctgg atggccgggt gctgctcaac accaccgttg cgctctgtt cttcgccgac 720
 cagttctctg agctgtccac ctccctgecc tcccagtaca tcaccggcct ggcccagcac 780
 ctgagccctc tcatgctgtc cacctcctgg acccgatca ccctgtgaa cggggacctg 840

 gcgcccacgc cgggcgccaa cctgtatggc tccatccct tctacctgac gctggaggat 900
 ggccgatccg cgcatggcgt gttcctgctc aactccaatg ccatggatgt tgtgctgcag 960
 cccagcccgg cgtgtctctg gcggtccacc ggccgcatcc tggatgtgta catcttctg 1020
 ggccccggagc cgaagtccgt tgtgcagcag tacctggatg ttgttgcta tcccttcatg 1080
 cctccctact ggggcctggg cttccacctg tgcgggtggg gctactcctc caccgcatc 1140
 acccgccagg ttgttgagaa catgaccggc gcgcatttcc ctctggatgt gcagtggaat 1200
 gacctggact acatggactc ccggcgggac ttcacctca acaaagatgg cttccgggac 1260

 ttccccgcca tggatgcagga gctgcaccag ggcggccggc ggtacatgat gattgtgac 1320
 ccggccatct cctcctccgg cccggccggc tcctaccggc cctatgatga gggcctgcgg 1380
 cgtggcgtgt tcatcaccaa tgagaccggc cagcctctca ttggcaaagt gtggccgggc 1440
 tccaccgct tcccggactt caccaatcc accgcctgg cgtggtggga ggacatggtt 1500
 gccgagtcc atgaccaggt gcccttcgat ggcattgga ttgacatgaa tgaccctcc 1560
 aacttcatcc gtggctccga ggatggctgt cccaacaatg agctggagaa ccctcctat 1620
 gtgccccggc ttgttgccg caccctgcag gccgccacca tctgcgcgtc ctcccaccag 1680

ttctgtcca cccattacaa cctgcacaac ctgtatggcc tcaccgaggc cattgcgtcc 1740
 caccgggcgc tggtagaaagc gcgtggcacc cggcccttcg tgatctccc gtccacctc 1800
 gccggccatg gccggtatgc cggccattgg accggcgatg tgtggtcctc ctgggagcag 1860
 ctggcgtcct cggtagccga gatcctgcag ttcaacctgc tgggcgtgcc tctggttggc 1920
 gccgatgtgt gcggcttctt gggcaacacc tccgaggagc tgtgcgtgcg gtggaccag 1980
 ctgggcgcgt tctatccctt catgcggaac cacaactccc tgctgtccct gcctcaggag 2040
 ccctactcct tctccgagcc ggcgagcag gccatgcgga aggcgctcac cctgcggtac 2100

 gcgctgctgc ctacactgta caccctgttc caccaggcgc atgttgccgg cgagaccgtt 2160
 gcgggcctc tgttcttga gtttccaaa gactcctcca cctggaccgt tgaccaccag 2220
 ctgctgtggg gcgaggcgt gctcatcac cgggtgctgc aggcggcaa agccgaggtg 2280
 accgctaact tcccttggg cacctggtat gacctgcaga ccgtgccat tgaggcgtg 2340
 ggctccctgc ctctcctcc ggccgcct cgggagccgg ccatccattc cgaggccag 2400
 tgggtgacc tgccggcgc tctggacacc atcaatgtgc acctgcgggc cggctacatc 2460
 atccctctgc agggcccggg cctcaccacc accgagtccc ggcagcagcc catggcgtg 2520

 gccgttgcgc tcacaaagg cggcgaggcg cgtggcgagc tgttctggga tgatggcgag 2580
 tccttggagg tgctggagcg tggcgcgtac acccaggtga tcttcttggc gcggaacaac 2640
 accattgtga atgagctggt ccgggtgacc tccgaggcg ccggcctgca gctgcagaaa 2700
 gtgaccgtgc tggcgcttc caccgcct cagcaggtgc tgtccaatgg cgtgccggtg 2760
 tccaacttea cctacagccc ggacacaaa gtgctggaca tctgcgtgtc cctgctcatg 2820
 ggcgagcagt tctggtgtc ctggtgctag 2850