

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0028168

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자사업 도약연구(전략)

연구과제명 단백질 분해 관련 신약표적 분자의 구조-기능 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2016.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

목적단백질을 코딩하는 유전자와 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가지는_ 보리유래 리보솜 억제 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하고, 숙주 미생물에서 목적단백질과 보리유래 리보솜 억제 단백질을 융합단백질 형태로 발현시킬 수 있는 재조합 벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 목적단백질을 코딩하는 유전자와 보리유래 리보솜 억제 단백질을 코딩하는 유전자의 사이에 효소에 의한 절단서열이 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 절단서열을 절단하는 절단효소는 트롬빈, TEV(tobacco etch virus)프로테아제, 프리시션(PreScission) 프로테아제, Factor Xa 및 엔테로키나아제(Enterokinase)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 보리유래 리보솜 억제단백질은 목적단백질의 N-말단에 발현되도록 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 6

제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 재조합 벡터를 함유하는 재조합 미생물.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 목적단백질을 수용성 상태로 제조하는 방법:

(a) 제6항의 재조합 미생물을 배양하여 목적단백질과 보리유래 리보솜 억제 단백질을 융합단백질을 수용성 상태로 생성시키는 단계 및

(b) 생성된 융합단백질을 분리·정제하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, (c) 절단효소를 처리하여 목적단백질과 보리유래 리보솜 억제 단백질을 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 목적단백질을 수용성 상태로 생산하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 보리에 존재하는 리보솜 억제 단백질 (bRIP1)을 이용하여, 재조합 단백질을 미생물에서 수용성 (soluble)상태로 생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 목적단백질과 리보솜 억제 단백질 (bRIP1)이 융합단백질 형태로 발현되도록 하는 재조합 발현벡터 및 상기 벡터를 이용한 목적단백질을 수용성 상태로 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세균 숙주에서 재조합 단백질을 발현시키는 발현시스템은 원심분리 또는 정밀여과에 의해 세포 성분으로부터 산물을 용이하게 분리시킬 수 있는 장점이 있다 (Kipriyanov and Little, *Molecular Biotechnology*, 12:173-201, 1999). 그러나, 대장균 등의 세균 발현 시스템에는 단백질의 적절한 리폴딩을 촉진시키는 세포 기관이 존재하지 않으며, 일반적으로는 거대 단백질을 배양 배지로 분비하지 못하거나, 발현되는 재조합 단백질이 종종 부분적으로 폴딩된 환원된 단백질 및 미스폴딩된 환원된 단백질의 조밀한 매스로 구성된 봉입체(inclusion body)형태로 발현된다 (Baneyx, *Current Opin. Biotechnology* 10:411, 1999; Villaverde and Carrio, *Biotech. Letts.* 25:1385-1395, 2003).

[0003] 일반적으로 봉입체 형태로 발현되는 재조합 단백질은 불활성이며, 봉입체들로부터 활성 단백질들을 회수하는데 사용되는 일반적인 전략은 단백질을 가용화하여 임의의 응집물들을 파괴하고, 이어서 1 회 이상의 화학적 재-접힘 단계들을 필요로 하나, 재조합 단백질이 이황화물 결합들을 함유하는 경우, 변성된 단백질들의 재변성 효율이 낮아진다 (Clarc, Ed., *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:202, 2001).

[0004] 그러므로, 재조합 단백질을 숙주미생물 내에서 수용성 상태로 발현시키기 위하여, 목적단백질을 6x His tag, 글루타티온-S-전달효소(GST), 스모단백질(SUMO), 말토오스 결합 단백질(MBP)와 융합시켜 발현시키는 방법이 개발되어 왔으나, 이들 중 6x His는 정제 시 장점이 있으나 대부분의 유전자의 soluble한 발현이 힘들며, GST, MBP 및 SUMO를 사용한 경우도 재조합 단백질이 수용성 상태로 발현되지 않는 경우가 많으며, 단백질에 따라서 정제 과정에서 제거가 쉽지 않을 때가 많이 존재하여 이용에 제한이 있었다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 미생물 숙주 내에서 재조합 단백질을 높은 효율로 수용성화 상태로 발현시키면서, 분리가 간편한 수용화 융합 파트너를 개발하고자 예의 노력한 결과, 보리 유래 리보솜 억제 단백질(bRIP1)을 융합 파트너로 사용하여 목적단백질과 융합단백질 형태로 대장균에 발현시킬 경우, 기존의 융합파트너 보다 높은 활성으로 재조합 단백질을 가용화시키면서도, 목적단백질의 분리·정제가 용이하다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 미생물 숙주 내에서 목적단백질을 높은 효율로 수용성화 상태로 발현시킬 수 있는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터를 함유하는 재조합 미생물을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 미생물 숙주 내에서 목적단백질을 높은 효율로 수용성화 상태로 발현시키는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 목적단백질을 코딩하는 유전자와 보리유래 리보솜 억제 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하고, 숙주 미생물에서 목적단백질과 보리유래 리보솜 억제 단백질을 융합단백질 형태로 발현시킬 수 있는 재조합 벡터를 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터를 함유하는 재조합 미생물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 목적단백질과 보리유래 리보솜 억제 단백질의 융합단백질을 수용성 상태로 생성시키는 단계 및

[0011] (b) 생성된 융합단백질을 분리·정제하는 단계를 포함하는 목적단백질을 수용성 상태로 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 종래 제조합 단백질의 수용화 생산을 위하여 사용되었던 단백질 보다, 높은 효율로 원핵세포에서 높은 효율로 제조합 단백질을 수용성 상태로 대량생산 할 수 있으며, 생산된 제조합 단백질의 정제 및 분리 또한 용이하다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 목적단백질의 수용성 발현용 제조합 벡터인 pET-RIP 제조합 벡터의 유전자 지도이다.
 도 2는 보리유래 리보솜 억제 단백질과 융합된 목적단백질의 대량 생산 결과를 나타낸 SDS-PAGE 결과이며, (a)는 바실러스 서브틸리스 유래 YjbH 단백질과 RIP의 융합단백질, (b)는 바실러스 서브틸리스 유래 SepF 단백질과 RIP의 융합단백질, (c)는 사람 Ubr1 단백질의 ClpS-상동성 도메인과 RIP의 융합단백질 및 (e) 효모의 Atg1 단편과 RIP의 융합단백질을 나타낸다. N은 융합단백질을 발현유도시키지 않은 전체 세포 분획을 나타내고, E는 융합단백질을 IPTG로 발현유도시킨 전체 세포 분획을 나타내며, S는 수용성 분획, I는 불용성 분획을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 일반적으로, 리보솜 억제 단백질(ribosom-inactivating protein)은 여러 식물에서 발견되는 단백질로서 병원체로 식물을 방어하는 기작에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 병원체의 리보솜에 손상을 입혀 단백질 합성을 저해하는 기능을 가진다.

[0015] 본 발명자들은 보리 유래 리보솜 억제 단백질을 대장균에서 과발현시켰을 때, 불용성 봉입체를 형성하지 않고 대부분이 수용성 형태로 과발현되는 것을 확인하고 이를 목적단백질의 생산에 적용하고자 하였다.

[0016] 일 관점에서, 본 발명은 목적단백질을 코딩하는 유전자와 보리유래 리보솜 억제 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하고, 숙주 미생물에서 목적단백질과 보리유래 리보솜 억제 단백질을 융합단백질 형태로 발현시킬 수 있는 제조합 벡터 및 상기 제조합 벡터를 함유하는 미생물에 관한 것이다.

[0017] 일 양태에서, 본 발명의 보리유래 리보솜 억제 단백질을 코딩하는 유전자(brip I, barley ribosom-inactivating protein 1)는 대장균에서 발현시키기 위하여, 코돈 최적화를 수행하여 사용하였다.

[0018] 따라서, 상기 보리 유래 리보솜 억제 단백질은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 보리유래 리보솜 억제단백질은 목적단백질의 N-말단에 발현되도록 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0019] 보리유래 리보솜 억제 단백질은 비교적 작은 크기(30kDa)로 말토오스 바인딩 프로테인(MBP)과 비슷한 정도로 목적단백질을 수용성 상태로 발현가능하게 하며, 상당히 안정하여 정제 과정 중 다른 단백질의 침전을 유발하지 않으며, 대부분의 단백질과 큰 차이를 가지는 높은 등전점 (pI, 9)를 가지고 있어서, 정제 과정 동안 이온교환 크로마토그래피(ion exchange chromatography)를 통해 쉽게 제거가 가능하다.

[0020] 또한 본 발명의 일 양태에서 bRIP1의 아미노 말단에 6x His를 도입하여 쉽게 정제가 가능하도록 설계하였다.

[0021] 본 발명의 다른 양태에서는, 강력한 프로모터로 알려진 T7 박테리오파지의 프로모터가 삽입된 카나마이신 내성을 갖는 pET-His 벡터에 클로닝을 통해 트롬빈(thrombin) 및 TEV (tobacco etch virus) 프로테아제로 자를 수 있는 서열과 가장 많이 쓰이는 제한효소들을 삽입하고, 6x His bRIP1 유전자를 T7 프로모터와 트롬빈 서열 사이에 클로닝을 통해 삽입하였다 (도 1).

[0022] 따라서, 상기 목적단백질을 코딩하는 유전자와 보리유래 리보솜 억제 단백질을 코딩하는 유전자의 사이에 효소에 의한 절단서열이 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 절단효소는 트롬빈, TEV (tobacco etch virus) 프로테아제, 프리시션(PreScission) 프로테아제, Factor Xa 및 엔테로키나아제(Enterokinase)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

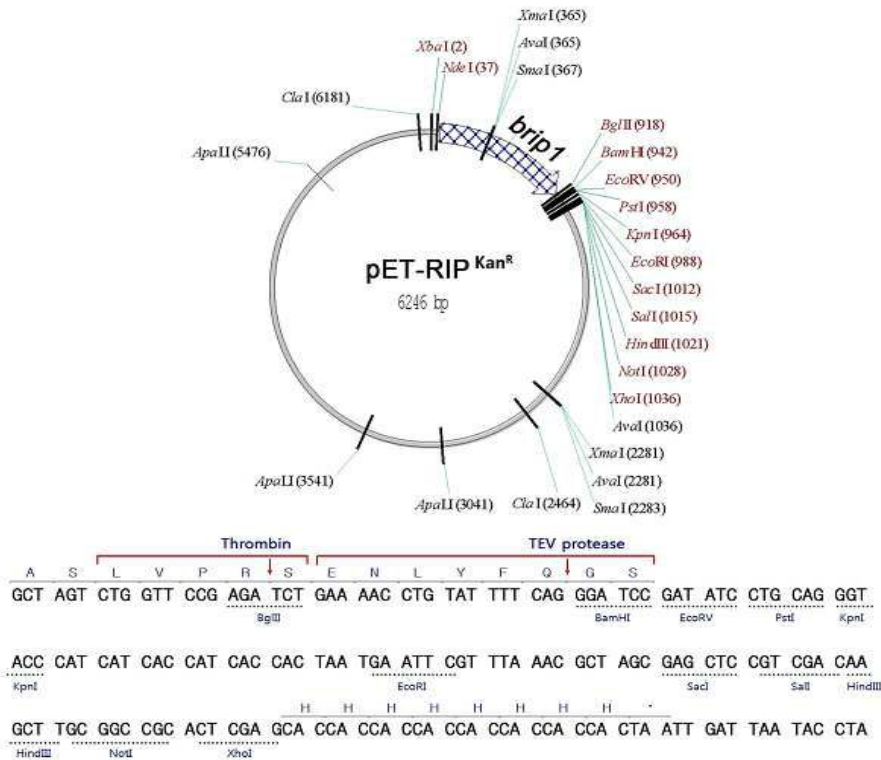
- [0023] 본 발명에 있어서, 사용될 수 있는 backbone 벡터는 플라스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 코스미드 벡터, YAC(Yeast Artificial Chromosome) 벡터를 포함한 다양한 벡터들을 사용할 수 있다. 본 발명의 목적상, 플라스미드 벡터를 이용하는게 바람직하다. 그러한 목적에 사용될 수 있는 전형적인 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c) 외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션(ligation)할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 목적유전자의 과발현을 위하여 사용되는 벡터는 당업계에 공지된 발현 벡터가 사용될 수 있으며, 바람직하게는 pET-His 벡터(Novagen)를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 pET-His 벡터를 사용하여 클로닝을 수행하면, 발현되는 단백질의 말단에 히스티딘기 tag이 결합되어 발현되므로, 상기 단백질을 효과적으로 정제할 수 있다. 클로닝된 유전자로부터 발현된 용합단백질을 분리하기 위해서는 당업계에 공지된 일반적인 방법이 이용될 수 있으며, 구체적으로, 본 발명에서는 Ni-NTA His-결합 레진(Novagen)을 사용하는 크로마토그래피 방법을 이용하여 분리할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 재조합 벡터는 적절한 숙주세포로 형질전환되어야 한다. 본 발명에 있어서, 선호되는 숙주세포는 원핵세포이다. 적합한 원핵 숙주세포는 *E. coli* 균주 BL21(DE3), *E. coli* 균주 DH5a, *E. coli* 균주 JM101, *E. coli* K12 균주 294, *E. coli* 균주 W3110, *E. coli* 균주 X1776, *E. coli* XL-1Blue (Stratagene) 및 *E. coli* B 등을 포함한다. 그러나 FMB101, NM522, NM538 및 NM539와 같은 *E. coli* 균주 및 다른 원핵생물의 종(species) 및 속(genera) 등이 또한 사용될 수 있다. 진술한 *E. coli*에 덧붙여, 아그로박테리움 A4와 같은 아그로박테리움 속 균주, 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)와 같은 바실리(*Bacilli*), 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*) 또는 세라티아 마르케센스(*Serratia marcescens*)와 같은 또 다른 장내세균 및 다양한 슈도모나스(*Pseudomonas*) 속 균주가 숙주세포로서 이용될 수 있다.
- [0026] 원핵세포의 형질전환은 Sambrook *et al.*, supra의 1.82 섹션에 기술된 칼슘 클로라이드 방법을 사용해서 용이하게 달성될 수 있다. 선택적으로, 전기천공법(electroporation)(Neumann *et al.*, EMBO J., 1: 841(1982))이 또한 이러한 세포들을 형질전환하는데 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명에서, 용어 "벡터 (vector)"는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드 (plasmid)" 및 "벡터 (vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 그러나, 본 발명은 당업계에 알려진 또는 알려지게 되는 바와 동등한 기능을 갖는 벡터의 다른 형태를 포함한다. 포유동물 세포 배양물 발현을 위한 전형적인 발현 벡터는 예를 들면 pRK5 (EP 307,247호), pSV16B (WO 91/08291호) 및 pVL1392 (Pharming)을 기초로 한다.
- [0028] "발현 조절 서열 (expression control sequence)"이라는 표현은 특정한 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필수적인 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SRa a 프로모터와 사이토메가로바이러스(cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다.
- [0029] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이더라도 벡터에 사용될 수 있다. 유용한 발현 조절서열의 예에는, 예를 들어, SV40 또는 아데노바이러스의 초기 및 후기 프로모터들, lac 시스템, trp 시스템, TAC 또는 TRC 시스템, T3 및 T7 프로모터들, 파지 람다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 영역, fd 코드 단백질의 조절 영역, 3-포스포글리세레이트 키나제 또는 다른 글리콜분해 효소에 대한 프로모터, 상기 포스포타제의 프로모터들, 예를 들어 Pho5, 효모 알파-교배 시스템의 프로모터 및 원핵세포 또는 진핵세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 RNA 폴리메라아제 프로모터 Φ 10은 *E. coli*에서 단백질 NSP를 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

- [0030] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결(operably linked)"된다. 이것은 적절한 분자 (예를 들면, 전사 활성화 단백질)은 조절 서열(들)에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결된 유전자 및 조절 서열(들)일 수 있다. 예를 들면, 전서열(pre-sequence) 또는 분비 리더(leader)에 대한 DNA는 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로서 발현되는 경우 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결되고 프로모터 또는 인핸서(enhancer)는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 서열의 전사에 영향을 끼치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 배치되는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열이 접촉하고, 또한 분비 리더의 경우 접촉하고 리딩 프레임 내에 존재하는것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 접촉할 필요가 없다. 이들 서열의 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 라이게이션(연결)에 의해 수행된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터(oligonucleotide adaptor) 또는 링커(linker)를 사용한다.
- [0031] 본원 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 통상 이중의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어(recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이중 DNA는 숙주 세포에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이형 DNA를 의미한다. 발현 벡터는 일단 숙주 세포내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 벡터의 수 개의 카피 및 그의 삽입된 (이중) DNA가 생성될 수 있다.
- [0032] 당업계에 주지된 바와 같이, 숙주세포에서 형질감염 유전자의 발현 수준을 높이기 위해서는, 해당 유전자가, 선택된 발현 숙주 내에서 기능을 발휘하는 전사 및 해독 발현 조절 서열에 작동 가능하도록 연결되어야만 한다. 바람직하게는 발현 조절서열 및 해당 유전자는 세균 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함되게 된다. 발현 숙주가 진핵세포인 경우에는, 발현 벡터는 진핵 발현 숙주 내에서 유용한 발현 마커를 더 포함하여야만 한다.
- [0033] 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 미생물을 배양하여 목적단백질과 보리유래 리보솜 억제 단백질의 융합단백질을 수용성 상태로 생성시키는 단계 및
- [0034] (b) 생성된 융합단백질을 분리·정제하는 단계를 포함하는 목적단백질을 수용성 상태로 제조하는 방법에 관한 것이다.
- [0035] 상기 방법은 추가적으로, (c) 절단효소를 처리하여 목적단백질과 보리유래 리보솜 억제 단백질을 분리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 미생물은 대장균을 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 다른 양태에서는 다양한 종 유래의 다양한 사이즈의 외래 유전자를 목적유전자로 사용하여 본 발명의 재조합 벡터에 도입하여, 목적단백질의 수용성 상태로의 발현을 확인하였으며, 대표적으로, *Bacillus subtilis* 의 SepF, YjbH 단백질과, 효모의 Atg1, 인간의 Ubr1의 일부 도메인으로 시험해 본 결과, 종래 사용되는 수용화 모티프인 6x His 및 GST과 비교해서 수용성 단백질을 최대 100배 이상 발현시킬 수 있는 것을 확인하였다.
- [0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0039] **실시예: 보리유래 리보솜 억제 단백질을 이용한 목적단백질의 수용화 생산**
- [0040] 보리유래 리보솜 억제 단백질을 코딩하는 유전자(*brip1*)를 융합파트너로 목적단백질을 발현시키기 위한 재조합 벡터를 제작하기 위한 backbone 벡터로는 pET-His 벡터(Novagen, USA)를 사용하였다.
- [0041] *brip1* 유전자는 대장균에서 발현가능하도록 코돈최적화를 수행하여 합성하였으며, 서열번호 1에 염기서열을 기재하였고, 서열번호 2에 아미노산 서열을 기재하였다(Cosmo Genetech, 한국).
- [0042] pET-His 벡터의 아미노말단과 TEV 프로테아제(tobacco etch virus protease)분해 부위(cleavage site)에 *brip1* 유전자를 EF(enzyme-free) 클로닝법(Tillett, D. & Neilan, B. A., Nucleic Acids Res. 27:e26, 1999)으로 삽입하여, pET-RIP 벡터를 제작하였다 (도 1).

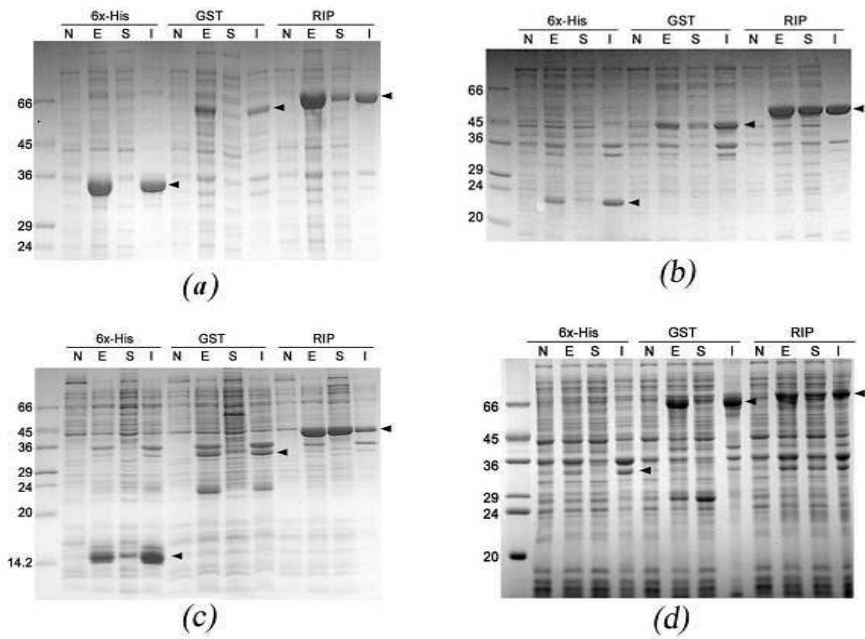
- [0043] 사용된 프라이머는 다음과 같다: pET-His 벡터를 프라이머 5'-ATG GTG ATG GTG GTG ATG CAT ATG TAT ATC TCC TTC TTA AAG-3'(서열번호 3) 와 5'-CAT ATG TAT ATC TCC TTC TTA AAG-3'(서열번호 4), 5'-GCT AGT CTG GTT CCG AG-3' (서열번호 5)와 5'-CCG AGA TCT GAA AAC CTG-3'(서열번호 6)로 얻은 PCR 산물과 bRIP1 유전자를 프라이머 5'-CAT CAC CAC CAT CAC CAT TCC GCG GCG AAA ATG G-3'(서열번호 7)와 5'-TCC GCG GCG AAA ATG G-3'(서열번호 8), 5'-AAC CAG ACT AGC TTT GCC GCC GCT CGC-3'(서열번호 9)와 5'-TTT GCC GCC GCT CGC-3'(서열번호 10)를 이용한 PCR 산물을 연결하여, pET-RIP 벡터를 제조한 후, *E. coli*에 도입하였다.
- [0044] 결과적으로, 상기 pET-RIP 벡터에 의해서 생산되는 융합단백질은 MHHHHHH-[bRIP]-ASLVPRSENLVYFQGS-[목적단백질]의 형태로 발현되게 되며, MCS(multiple cloning site)는 BglII 인식부위(918)로 부터 시작하며 8개의 C- 말단 히스티딘 잔기가 붙어있게 된다.
- [0045] *brip1* 유전자와 융합되는 유전자로는 바실러스 서브틸리스 유래의 *yjbH* 유전자, 바실러스 서브틸리스 유래의 *sepF* 유전자와 사람 유래 *ubr1* 유전자의 ClpS-상동성 도메인 및 효모 유래 *atg1* 유전자 단편의 4가지 유전자를 각각 사용하였으며, 각각의 유전자를 *brip1* 유전자와 융합된 형태의 단백질이 생산되도록 pET-RIP 벡터에 삽입하였다. 각각의 유전자는 이미 다른 벡터에 클로닝 되어있던 것을 *Bam*HI 과 *Eco*RI, *Hind*III, *Xho*I 등의 제한효소를 이용하여 자른 후, 동일한 효소를 처리하여 준비된 pET-RIP 벡터에 T4 DNA 리가제를 이용하여 삽입하고 연결하였다.
- [0046] 융합 파트너로서의 RIP에 대한 대조군으로는 6xHis를 사용한 pET-His 벡터와 GST(글루타티온-S-전달효소)를 사용한 *pET-GST* 벡터 (Novagen pET 벡터에 GST 유전자를 삽입)를 사용하였다.
- [0047] 상기 제작된 4개의 재조합 벡터를 각각 *E. coli* BL21(DE3)에 도입하고, LB (Luria Broth) 배지 (USB corporation, USA) 100 ml 에서 37°C에서 배양한 후, 배양액의 O.D. 가 0.5 일 때, 최종농도가 1mM이 되도록 IPTG를 첨가하여 융합유전자의 발현을 유도하고, 추가적으로 18°C에서 18 시간 배양하였다.
- [0048] 배양된 숙주세포는 원심분리로 수용성 부분과 펠렛 부분을 분리하였으며, 융합단백질의 발현 및 수용화 정도를 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 확인하였다 (도 2).
- [0049] 도 2에서 N은 융합단백질을 발현유도시키지 않은 전체 세포 분획을 나타내고, E는 융합단백질을 IPTG로 발현유도시킨 전체 세포 분획을 나타내며, S는 수용성 분획, I는 불용성 분획을 나타내고, (a)는 바실러스 서브틸리스 유래 *YjbH* 단백질과 RIP의 융합단백질, (b)는 바실러스 서브틸리수 유래 *SepF* 단백질과 RIP의 융합단백질, (c)는 사람 *Ubr1* 단백질의 ClpS-상동성 도메인과 RIP의 융합단백질 및 (e) 효모의 *Atg1* 단편과 RIP의 융합단백질을 나타낸다.
- [0050] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, RIP과 융합단백질 형태로 발현된 목적단백질은 4가지 단백질 모두 수용성 형태로 과발현되는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, 6x HIS만으로 융합된 단백질의 경우는 대부분의 단백질이 불용성 형태로 관찰되었으며, GST로 융합된 단백질의 경우 또한, 불용성 형태로 발현되는 양이 훨씬 많은 것으로 확인되었다.
- [0051] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



서열목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Vector for Mass Producing of Recombinant Protein Using Barley
 Ribosome-inactivating Protein and Method for Mass Producing of
 Protein Using the Same

<130> P12-B158

<160> 10

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 846

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bRIP1

<400> 1

atggcggcga aaatggcgaa aaacgtggat aaaccgctgt ttaccgac ctttaacgtg 60

caggcgagca gcgcggatta tgcgaccttt attgcgggca ttcgcaaca actgcgcaac 120

ccggcgatt ttagccataa ccgcccgtg ctgcccgcg tggaaccgaa cgtgccgccg 180

agccgctggt ttcattggt gctgaaagcg agcccgacca gcgcggcct gaccctggcg 240

attcgcgagg ataacattta tctggaagc tttaaaagca gcgatggcac ctggtgggaa 300

ctgaccccg gcctgattcc gggcgcgacc tatgtggct ttggcggcac ctatcgcgat 360

ctgctgggag ataccgataa actgaccaac gtggcgctgg gccgccagca gctggcggat 420

gcggtgaccg cgctgcatgg ccgcacaaa gcggataaac cgagcggccc gaaacagcag 480

caggcgcgag aagcggtag caccctgctg ctgatggtga acgaagcgac ccgcttcag 540

accgtgagcg gctttgtggc gggcctgctg catccgaaag cggtggaata aaaaagcggc 600

aaaattggca acgaaatgaa agcgcaggtg aacggctggc aggatctgag cgcggcgctg 660

ctgaaaaccg atgtgaaacc gccgccgggc aaaagtccgg cgaaatttgc gccgattgaa 720

aaaatgggag tgcgaccgc ggtgcaggcg gcgaacaccc tgggcattct gctgtttgtg 780

gaagtgccgg gcgcctgac cgtggcgaata gcgctggaac tgtttcatgc gagcggcggc 840

aaataa 846

<210> 2

<211> 281

<212> PRT

<213> Hordeum vulgare L.

<400> 2

Met Ala Ala Lys Met Ala Lys Asn Val Asp Lys Pro Leu Phe Thr Ala
 1 5 10 15
 Thr Phe Asn Val Gln Ala Ser Ser Ala Asp Tyr Ala Thr Phe Ile Ala
 20 25 30
 Gly Ile Arg Asn Lys Leu Arg Asn Pro Ala His Phe Ser His Asn Arg
 35 40 45
 Pro Val Leu Pro Pro Val Glu Pro Asn Val Pro Pro Ser Arg Trp Phe
 50 55 60

 His Val Val Leu Lys Ala Ser Pro Thr Ser Ala Gly Leu Thr Leu Ala
 65 70 75 80
 Ile Arg Ala Asp Asn Ile Tyr Leu Glu Gly Phe Lys Ser Ser Asp Gly
 85 90 95
 Thr Trp Trp Glu Leu Thr Pro Gly Leu Ile Pro Gly Ala Thr Tyr Val
 100 105 110
 Gly Phe Gly Gly Thr Tyr Arg Asp Leu Leu Gly Asp Thr Asp Lys Leu
 115 120 125
 Thr Asn Val Ala Leu Gly Arg Gln Gln Leu Ala Asp Ala Val Thr Ala

 130 135 140
 Leu His Gly Arg Thr Lys Ala Asp Lys Pro Ser Gly Pro Lys Gln Gln
 145 150 155 160
 Gln Ala Arg Glu Ala Val Thr Thr Leu Leu Leu Met Val Asn Glu Ala
 165 170 175
 Thr Arg Phe Gln Thr Val Ser Gly Phe Val Ala Gly Leu Leu His Pro
 180 185 190
 Lys Ala Val Glu Lys Lys Ser Gly Lys Ile Gly Asn Glu Met Lys Ala
 195 200 205

 Gln Val Asn Gly Trp Gln Asp Leu Ser Ala Ala Leu Leu Lys Thr Asp
 210 215 220
 Val Lys Pro Pro Pro Gly Lys Ser Pro Ala Lys Phe Ala Pro Ile Glu
 225 230 235 240
 Lys Met Gly Val Arg Thr Ala Val Gln Ala Ala Asn Thr Leu Gly Ile
 245 250 255

Leu Leu Phe Val Glu Val Pro Gly Gly Leu Thr Val Ala Lys Ala Leu

260 265 270

Glu Leu Phe His Ala Ser Gly Gly Lys

275 280

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

atggtgatgg tgggatgca tatgtatc tccttcttaa ag 42

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

catatgtata tctccttctt aaag 24

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400>

> 5

gctagtctgg ttccgag 17

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ccgagatctg aaaacctg 18

<210> 7

<211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 catcaccacc atcaccattc cgcggcgaaa atg 34
 <210> 8
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 tccgcggcga aaatgg 16
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 aaccagacta gctttgccgc cgctcgc 27
 <210> 10
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 tttgccgcgc ctgc 15