

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
C07K 15/04

(45) 공고일자 1996년02월27일
(11) 공고번호 특1996-0002869

(21) 출원번호	특1992-0007039	(65) 공개번호	특1992-0019818
(22) 출원일자	1992년04월25일	(43) 공개일자	1992년11월20일
(30) 우선권주장	91/P41 13 750.7 1991년04월26일 독일(DE)		
(71) 출원인	뵘링거 만하임 게엠베하 콜브 · 베버 1996년02월27일		

(72) 발명자 루돌프 글록스후버
독일연방공화국, 베-8411 아들만쉬타인, 암 엘바흐 3
마르티나 분더리히
독일연방공화국, 베-8400 레겐스부르크, 노트하프트스트라세 5
아르네 스키라
독일연방공화국, 베-6200 뷔스바덴, 케루스커베그 6
라이너 루돌프
독일연방공화국, 베-8120 봐일하임, 페르버가세 17

(74) 대리인 목돈상, 목영동

심사관 : 이세진 (책자공보 제4354호)

(54) 이황화 결합을 갖는 분비된 단백질의 수율을 증가시키는 방법

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

이황화 결합을 갖는 분비된 단백질의 수율을 증가시키는 방법.

[도면의 간단한 설명]

제1도는 상이한 양의 글루타티온을 배양 비지에 부가한 후에 처리된 가용성 RBI의 검출에 대한 이유노 블롯(immunoblot).

제2도는 발현 플라즈미드 pRBIa1-PDI.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA를 함유한 숙주원핵생물에 의해 이황화 결합이 있는 단백질이 분비될 때 천연 단백질 구조의 형성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

원핵 미생물내에서 단백질의 합성이나 해독은 세포질내에 리보솜에서 일어난다. 재조합 DAN가 숙주 생물인 박테리아내에서 발현될 때 결과하는 재조합 유전자 생성물 또는 단백질이 박테리아의 내막(innermembrane)을 통해 세포질로부터 내막과 외막사이의 외질(periplasmic) 공간으로 분비되는 것이 바람직하다. 이렇게 분산된 단백질은 상투속에 외질로부터 배양 배지로 방출될 수 있다. 이 방법의 단점은 이황화결합이 있는 단백질이 분비될 때 천연 구조가 정확하게 형성되지 않는다는 것인데, 즉 이황화 결합이 적당하지 않게 또는 불완전하게 형성되어 있는 폴리펩티드가 만들어져 생물학적으로 불활성이 된다.

재조합 DNA가 원핵 세포에서 발현될 때 세포질내 봉입체(inclusion bodies)를 형성하는 불용성 단백질의 시험관내 복원방법에 티올 시약을 사용한다. 이러한 티올 시약이 산소 대기하에서 이황화물로 빠르게 산화된다는 것이 공지되었다.

본 발명의 목적은 이황화 결합을 갖는 단백질이 분비될 때 천연 단백질 구조의 형성을 증가시키는 것이다.

특히 천연 단백질 구조의 형성을 촉진하는 것이 불안정한 이황화 결합을 갖는 단백질의 매우 복잡한 시험관내 복원을 대신할 수 있다.

본 발명의 목적은 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA를 함유한 숙주 원핵생물에 의해 이황화 결합을 갖는 단백질이 분비될 때 천연 단백질 구조의 형성을 증가시키는 방법에 의해 성취되며 이 방법에서 상기 숙주 생물은 재조합 DNA를 발현시키기에 적당한 조건하의 적당한 배양 배지내에서 배양되는데, 이 방법은 0.1-20mmol/l의 하나 또는 여러개의 티올 시약을 함유한 배양 배지를 사용하는 것으로 특징된다.

놀랍게도, 본 발명의 방법을 사용해 티올 시약을 발효용 배지에 부가함으로써 이황화 결합이 정확하게 형성되어 있는 단백질의 수율을 증가시키는 것이 가능하다. 본 발명의 방법을 하나 또는 여러개의 이황화 결합을 함유한 모든 단백질에 사용할 수 있다. 특히 소량의 단백질을 필요로 할 때, 예를 들어 성장 인자(신경성장 인자, 인터루킨스 또는 유사한 화합물)를 mg 규모로 얻고자 할 때, 본 발명의 방법을 사용하게 되면 시험관내에 복원시킬 필요가 없다.

0.1-20mmol/l인 하나 또는 여러개의 티올 시약을 함유한 배양 배지가 본 발명의 방법에 적당하다고 판명되었다. 0.1mmol/l 미만의 티올 시약을 함유한 배양 배지를 사용하게 되면 천연 단백질 구조의 농도는 형성이 감지할 수 있을 정도로 증가하지 않는다. 티올의 상한 농도는 약 20mmol/l인데 이것은 세포 성장에 있어서의 상당한 감소로써 명백해진다. 사용한 배양 배지는 바람직하게 1-15mmol/l, 특히 바람직하게 3-12mmol/l인 하나 또는 여러개의 티올 시약을 함유한다. 티올 시약으로서 글루타티온을 사용한다면 이것의 최적 농도는 약 5mmol/l이다.

본원에서 "티올 시약"이라 함은 SH 그룹을 갖는 환원용 티올 시약이나 또는 SH 그룹을 갖는 환원용 티올 시약과 이황화 그룹을 갖는 산화용 티올 시약의 혼합물을 의미한다.

1분자당 하나의 SH 그룹을 갖는 것들이 환원용 티올 시약으로서 특히 적당하다. 특히 바람직한 물질은 환원된 글루타티온(GSH), 시스테인, N-아세틸시스테인, 시스테인, β -머캅토에탄올 및 유사 화합물이다. N-아세틸시스테인 및 환원된 글루타티온(GSH)이 가장 바람직하다. 티올 시약을 단독으로 또는 혼합물 형태로 사용할 수 있다.

환원용 티올 시약을 단독으로 사용하는 것이 일반적으로 바람직하지만, 환원용 티올 시약과 산화용 티올 시약의 혼합물을 사용함으로써 이황화 결합이 정확하게 형성된 단백질의 수율이 증가하게 된다. 이러한 환원용 및 산화용 티올 시약의 혼합물을 사용할 때, 환원용 티올 시약 대 산화용 티올 시약의 몰비는 바람직하게 2:1 내지 20:1, 특히 바람직하게 5:1 내지 10:1이다. 환원된 티올 시약과 산화된 티올 시약의 혼합물은 예를 들어 환원된 글루타티온(GSH) 및 글루타티온 디설파이드(GSSG)이다.

본 발명의 하나의 예는 E. coli내에서 Eleusine coracana Gaertneri(RBI)로부터 이 가능한 α -아밀라제/트립신 억제제가 이중구조로 발현하는 것이다. 이 억제제는 Shivaraj 및 Pattabiraman(Shivaraj B. & Pattabiraman, T.N., Indian J. Biochem. Biophys. 17(1980), (181-193; Shivaraj B. & Pattabiraman, T. N., Biochem. J. 193(1981), 29-36)에 의해 특징되었다. 이 억제제의 아미노산 서열은 Campos 및 Richardson에 의해 Campos, F. A. P. & Richardson, M., FEBS Letters 152(1983), 300-304에 기술되어 있다. 상기 단백질은 122개의 아미노산으로 구성되며 5개의 분자내 이황화 결합을 함유하여 새로운 α -아밀라제/트립신 억제제부류에 속하므로(Halford와 Biochim. Biophys. Acta 950(1988), 435-440), 이것은 단지 이 기능의 멤버가 된다. 그러나 숙주 생물인 원핵 생물에서 이황화 결합을 갖는 기타 분비된 재조합 단백질(예를 들어, 항체 단편)을 분리하는데 본 발명의 방법을 또한 사용할 수 있음에 주목해야 한다.

분비성 RIB 단백질을 E. coli내에서 기능 형태로 분리하기 위해, 유전자 공학법을 사용해 합성 RBI 유전자를 E. coli의 외막 단백질 A(OmpA)의 신호 서열에 융합시키고 이 융합체를 E. coli내 lac 프로모터(promoter) 조절하의 재조합 플라스미드 상에서 발현시켰다. 재조합 단백질의 폴리펩티드 사슬을 숙주 원핵세포의 외질에 옮기고, 신호 서열을 분해시킨 후 이 세포 격막의 산화 특성의 결과로서 이것이 폴딩(folding)되어 분자내 이황화 결합을 갖는 천연 단백질이 만들어진다. 그러나, 이러한 폴딩으로써 단지 소량의 기능성 단백질을 얻을 수 있다. 그러나 본 발명에 따라 티올 시약이 배양 배지에 존재할 때 기능성 단백질의 수율을 상당히 증가시킬 수 있다(5 팩터(factor)로).

본 발명의 방법에 사용되는 숙주 생물은 원핵생물이다. 재조합 단백질의 발현은 바람직하게 그람-음성(gram-negative) 원핵생물, 특히 바람직하게 E. coli에서 행해진다.

본 발명의 방법에서 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA가 박테리아의 내막을 침투하기 위한 신호 펩티드를 암호화하는 DNA 단편과의 작동결합을 갖는 것이 일반적으로 바람직하다. 본 발명에서 "작동 결합"이라 함은 이중구조의 단백질과 신호 펩티드 간에 해독 융합이 있다는 것을 의미한다. 이 방법에서 신호펩티드는 해독 융합부의 N-말단부를 형성한다. 재조합 단백질을 분비할 수 있어야 한다는 사실은 별도로하고 신호 펩티드의 형태는 본 발명에 중요하지 않다. 다수의 이러한 신호 펩티드가 분자 생물학 분야의 숙련자에게 공지되어 있다. 일련의 신호 펩티드가 예를 들어

Winnacker(Gene and Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie, Chemie Verlag Weinheim에 의해 출판 (1985), p. 256)에 의해 열거되었다. 본 발명의 방법이 숙주 생물인 E. coli내에서 행해진다면, E. coli OmpA 단백질로부터의 신호 펩티드가 특히 적당하다.

원핵 숙주생물내에서의 발현을 위해, 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA는 상기 숙주 생물의 전사 시스템에 의해 인지도된 발현 신호나 프로모터의 조절하에 있어야 한다. 원핵 숙주세포내에서 활성적인 이러한 발현 신호는 분자 생물학 분야의 숙련자에게 공지되었다. 유도가능한 발현 신호가 본 발명의 방법에 사용된다. 유도가능한 E. coli 프로모터의 예로는 이소프로필- β -D-갈락토시드(IPTG)에 의해 유도될 수 있는 lac 프로모터 및 lac 프로모터(예를 들어 tac 또는 trc 프로모터)의 합성 유도체가 있다.

이항화 결합을 갖는 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA는 보통 전형방법(transformation)에 의해 원핵 숙주생물내로 도입된다. 상이한 원핵 숙주세포의 전형방법이 당업자에게 공지되어 있으므로 개별적으로 언급할 필요는 없다. 전형된 숙주 세포에 존재하는 재조합 DNA는 보통 염색체외로 존재하거나(예를들어, 플라스미드) 또는 상기 숙주 세포의 게놈(genome)에 통합될 수 있는(예를들어, 박테오리오파지 λ) 재조합 벡터상에 있다. 플라스미드가 벡터로 사용된다. 발현 벡터로서 특별한 플라스미드를 사용하는 것이 본 발명의 방법에 중요하지 않다. 원하는 단백질을 암호화하는 재조합 DNA가 숙주 세포에 의해 적당한 정도까지 전사 및 해독될 수 있는 것이 중요하다. 그러나, 재조합 DNA의 해독 생성물은 박테리아의 내막을 통해 외질로 분비될 수 있는 형태로 존재해야 한다.

상기된 바와 같이, 신호 서열과 융합한 재조합 단백질은 보통 원핵 숙주세포의 외질로 운반된다. 이러한 것이 또한 본 발명의 바람직한 구체예가 도니다. 그러나, 특종의 숙주 균주를 사용할 때 외질내로 분비될뿐 아니라 단백질 덩어리가 배양 배지로 분비된다. EP-A 0 338 410호에 이렇게 단백질 덩어리를 배양 배지내로 분비할 수 있는 E. coli 균주 및 이러한 균주의 생산방법이 기재되어 있다. 이들 분비 돌연변이체를 제조하기 위한 출발균주로서 EP-A 338 410호에 기재된 E. coli 균주인 DS 410(DSM 4513) 또는 BW 7261(DSM 5231)를 사용하는 것이 바람직하다.

배양 배지로서 완전한 배지, 특히 세포 추출물로부터의 물질이나 물질 혼합물을 함유하는 배지를 본 발명의 방법에 사용하는 것이 바람직하다. 이러한 배지의 예로는 효소적으로 분해된 세포 추출물(Bacto-트립톤 및 효모 추출물)로부터의 물질 혼합물을 함유한 LB 배지가 있다. 배양 배지의 pH는 바람직하게는 pH 5 및 pH 9 사이이다. 배양 배지의 pH값은 바람직하게는 6-8이다. 배양 배지로서 LB 배지를 사용한다면 이러한 배지를 제조할 때 pH는 7.4로 조절하는 것이 유리하다. 세포가 증식하는 동안 배지의 pH는 감소하며 이것은 밤새 정상상태의 배양에서 약 6.8이었다(세포수확 시간).

본 발명의 방법을 완전한 배지내에서 교반 배양으로 행하는 것이 바람직하다. 그러나, 또한 폭기가 잘된 발효조내 및/또는 최소 배지의 존재하에서 숙주 생물을 증식시키는 것이 가능하다.

본 발명의 방법의 또 다른 구체예는 하나 또는 여러개의 단당류 및/또는 올리고당류가 사용한 원핵 숙주생물에 의해 대사될 수 있는 배양 배지에 부가된다는 것을 특징으로 한다. Bowden 및 Georgiou 에 의해 출판된 J. Biol. Chem. 265(1990), 16760-16766에 대사가 가능하지 않은 당을 부가함으로써 천연 단백질 구조의 형성을 촉진시킬 수 있음이 공지되어 있다. 본 발명의 범위내에서 이들 대사가 가능하지 않은 당을 부가적으로 사용하므로써 분비된 단백질의 천연 단백질 구조의 형성에 또 다른 효과를 미친다. 대사가 가능하지 않은 당의 예로는 소르보스(단당류), 사카로스(이당류) 및 라피노스(삼당류)가 있다. 배양 배지내 대사가 가능하지 않은 단당류 및/또는 올리고당류의 농도가 0.1mol/l-1mol/l, 바람직하게 0.3mol/l-0.7mol/l인 것이 본 발명의 방법에 유리하다.

본 발명의 특히 바람직한 구체예는 이항화 결합을 갖는 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA의 발현과 함께 숙주생물내 단백질 디설파이드 이소머라제유전자의 과발현을 포함한다. 그람-음성 박테리아종의 단백질 디설파이드 이소머라제유전자를 사용하는 것이 바람직하며 E. coli의 단백질 디설파이드 이소머라제유전자를 사용하는 것이 특히 바람직하다. 이러한 유전자의 DNA서열을 서열번호 :3을 표시하였다.

놀랍게도 배양 배지에 티올 시약을 부가하는 것과 함께 숙주 생물 자체의 단백질 디설파이드 이소머라제유전자의 공동발현 및 공동분비로써 분비된 기능성 단백질의 수율이 증가하였음이 확인되었는데 이것은 티올 시약만을 부가했을때의 효과보다 더 큰 효과를 나타낸다. 대조하여, 티올 시약을 부가함없이 단백질 디설파이드 이소머라제(PDI)만의 공동발현으로는 수율이 증가하지 않는다.

본 발명에서 "과발현"이라 함은 특별한 경우에 사용된 원핵 숙주생물의 야생형에 비교하여 단백질 디설파이드 이소머라제발현에 있어서의 증가를 의미한다. 이러한 과발현은 예를들어 단백질 디설파이드 이소머라제유전자를 강하고 유도가능한 발현 신호(예를들어, lac 프로모터 또는 이것의 유도체)의 조절하에 동으로써 이루어질 수 있다. 상기 PDI 유전자의 과발현은 박테리아의 내막 침투용 신호 펩티드와의 "작동 결합"에서 일어난다. 이러한 목적을 위해 천연 PDI 신호 서열을 사용하는 것이 특히 바람직하다.

본 발명에 따른 방법의 구체예에서 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA 및 단백질 디설파이드 이소머라제유전자는 예를들어 숙주세포내의 하나의 발현 벡터상에 존재할 수 있다. 이러한 발현 벡터는 바람직하게 염색체외 벡터, 즉 플라스미드이지만 숙주 세포(예를들어, 람다 파지)의 염색체에 통합되어 존재할 수 있다. 하나의 발현 벡터를 사용할 때 재조합 DNA 및 단백질 디설파이드 이소머라제유전자가 디시스트로닉 오퍼론(dicistronic operon)형태인 하나의 발현 신호의 조절하에 있는 것이 바람직하다.

그러나, 한편 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA 및 단백질 디설파이드 이소머라제유전자가 상호 양립하는 두개의 염색체의 발현 벡터상의 존재하는 것이 가능한데 이 벡터 각각은 그것 자체의 발현 신호(프로모터)조절하에 있다.

서열번호 1-5에 대한 설명과 함께 다음 실시예는 본 발명을 더 설명한다.

1번 서열은 E. coli W3110으로부터의 단백질 디설파이드 이소머라제(PDI) 및 RBI의 공동발현에 사용한 플라스미드 pRBIa1-PDI의 DNA 서열을 표시한다.

2번 서열은 OmpA/RBI 유전자의 서열을 표시한다. 이본쇄(double-stranded) DNA는 14개의 합성 올리고뉴클레오타이드로 구성되며 제한 분해 부위 XbaI 및 HindIII에 의해 결합된다. 서열 프로토콜에 표시된 DNA 사슬은 7개의 올리고뉴클레오타이드로 구성되며 이것은 다음 부분에 해당한다.

- 1 : 2-62염기들
- 2 : 63-126염기들

- 3 : 127-195염기들
- 4 : 196-258염기들
- 5 : 259-322염기들
- 6 : 323-396염기들
- 7 : 397-455염기들

또한 상반되는 사슬은 7개의 올리고뉴클레오타이드로 구성되는데 이것은 다음과 같은 DNA 사슬의 부분들에 상보적이다.

- 8 : 6-68염기들
- 9 : 69-132염기들
- 10 : 133-201염기들
- 11 : 202-264염기들
- 12 : 265-328염기들
- 13 : 329-402염기들
- 14 : 403-459염기들

3번 서열은 천연 신호 서열과 리보솜 결합 부위를 갖는 단백질 디설파이드 이소머라제유전자의 서열을 표시한다.

4번 서열은 PDI 유전자의 증폭(amplification)을 위한 N-말단 프라이머(primer)를 표시한다.

5번 서열은 PDI 유전자의 증폭을 위한 C-말단 프라이머를 표시한다.

[실시예 1]

[유전자 합성]

분자 유전자 방법은 Maniatis와의 Molecular Cloning A Laboratory Manual(1982), Cold Spring Harbor Laboratory, New York을 기초로하고 있으며 포스포아미디트 방법(Sinha외, Nucl. Acids Res. 12(1984), 4539-4557 : Kaplan, B. E., Trends Biotechnol. 3(1985), 253-256)에 따라 Applied-Biosystems GmbH 컴퓨터에서 시판하는 자동 합성 장치 380 A에서 올리고뉴클레오타이드를 제조했다.

OmpA 신호 서열과 RBI 간의 융합체를 암호화하는 합성 유전자는 14개의 합성 올리고뉴클레오타이드(2번 서열)로 구성되었다. 올리고뉴클레오타이드를 폴리아크릴아미드/우레아 젤 전기영동법으로 정제하고 유전자의 5' 말단과 3' 말단에 있는 두개의 돌출한 올리고뉴클레오타이드를 제외하고 각각 그것의 5'말단에서 포스포릴화하였다. 그후에 모든 올리고뉴클레오타이드를 동등한 몰비로 결합시키고 잡종분자를 형성시키면 단일 제제로 리게이팅(ligating)시켰다. 이 유전자를 제한 부위 XbaI 및 HindIII에 의해 결합시켰다. OmpA 신호 서열의 아미노산이 음성 싸인으로써 표시되었다.

[실시예 2]

[발현 플라스미드 pRB1a1의 구성]

실시예 1에서 얻은 합성 유전자를 제한 부위 XbaI 및 HindIII에 의해 발현 플라스미드 pASK 40(Skerra외, BIO/TECHNOLOGY 9(1991), 273-278) 내로 클로닝(cloning)시켰다. 합성 유전자의 서열을 디데옥시 시퀀싱(sequencing)으로써 결과의 플라스미드는 pRB1a1이었다.

[실시예 3]

[E. coli의 외질내 RBI의 기능적 발현]

pRB1a1은 전현시킨 E. coli JM83의 배양물(Yannish-Perron외, Gene 33(1985), 103-119)을 암피실린(100µg/ml)을 함유한 2.5l의 LB 배지 [11의 LB 배지는 10g의 Bacto-tryton(Difco Factories, Detroit, Michigan USA), 5g의 효모 추출물(Difco Factories) 및 5g의 NaCl(pH 7.4)을 함유함]를 사용해 1 : 100 비율로 희석시키고 OD₅₅₀이 1.0으로 될 때까지 26°C에서 교반하였다. 그후에 이 배양물을 250ml씩 9개 부분으로 나누고 각각의 배양물을 IPTG(이소프로필-β-D-갈락토시드 : 최종 농도는 1mmol/l)로 유도시키면 상이한 양의 글라타티온(GSH)을 부가했다. 이 세포를 26°C에서 밤새 또 교반하고 원심분리(Sorvall SS34, 4°C, 15000 rpm, 15분)로 회수했다. 그후에 이 세포를 4°C의 100 mmol/l Tris/HCl pH 7.5, 20 mmol/l Na-EDTA에 용해시켜 각 경우에 세포밀도가 200(OD₅₅₀)이 되도록 했다. 연속해서 이 세포를 18000 PSI의 프렌치 프레스 셀 프레스(Aminco)에서 용균시켰다. 이 용균물을 원심 분리시키고(Sorvall SS34, 4°C, 15000 rpm, 30분) 가용성 상등액을 가용성이며 기능성인 RBI의 함량에 대해 테스트했다.

상기 각각의 가용성 상등액 5µl를 15% 폴리아크릴아미드/SDS 젤상에서 분리시켰다(Fling & Gregerson, Anal. Biochem. 155(1986) 83-88). 분리된 단백질을 전자-용리에 의해 니트로셀룰로스막상으로 옮기고 토끼의 항-RBI 항체를 이용해 RBI 밴드를 면역특이적으로 염색시켰다. Blake외, Anal. Biochem. 136(1984), 175-179에 따라 이유노블롯팅(immunoblotting)을 행하였다.

제1도는 이유노블롯팅에 의한 가용성 RBI의 발현 수율에 대한 분석을 표시한다. 레인 1인 표준 분자량이며 Eleusine coracana Gaertneri로부터 정제된 0.8µg RBI를 레인 2에 사용했다. 상이한 양의 부가된 글루타티온과 동등한 양의 세포 추출물을 레인 3-6에 사용했다. 레인 3에서는 GSH를 배양 배지

에 부가하지 않았다. 레인 4, 5 및 6에서는 1mmol/l, 5mmol/l 및 10mmol/l GSH를 배양 배지에 부가했다.

표준 방법(Sambrook외, Molecular Cloning. A Laboratory Manual(1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Chapter 18)에 의해 뉴질랜드산 토끼를 Eleusine coracana Gaertneri로부터 정제된 RBI로 2번 면역시켜 제조한 다클론(polyclonal)항-RBI 항혈청을 항체로서 사용했다.

GSH를 부가하므로써 면역특이적으로 염색된 밴드의 강도가 증가함을 도면에서 알 수 있다. 이러한 것은 특히 GSH의 농도가 5mmol/l 및 10mmol/l일때 명백하다.

소의 체장으로부터 얻은 트립신에 대한 억제활성을 측정하므로써 상기 세포 추출물의 가용성 부분내 RBI의 양을 정량하였다. 세포내 기능성 억제제의 양이 상기와 같이 배지에 부가함 없이 발현에 비교하여 5배까지 증가할 수 있음을 알 수 있다(표 1).

또한 환원된 글루타티온(GSH)과 글루타티온 디설파이드(GSSG)와의 혼합물을 부가하므로써 기능성 억제제의 수율이 증가함을 표 1에서 알 수 있다.

행해진 모든 테스트에서 1ml의 100ml/l NaCl, 50mmol/l Tris/HCl(pH 8.0), 10mmol/l CaCl₂, 0.005% (v/v) Triton X-100 내 소의 체장으로부터 얻은 5μg의 트립신을 25°C에서 30분간 측정될 RBI와 함께 인큐베이션시켰다. 20μl의 10mmol/l N-α-벤조일-L-아르기닌-4-니트라닐리드(발색 테스트용기질)를 부가한 후 405nm에서의 흡광도 증가를 시간 경과에 따라 기록하므로써 트립신의 잔류 활성을 측정하였다. 억제제를 부가하지 않은 프리(free)효소의 활성과 각 경우에 측정된 잔류 활성간의 차이로부터 테스트에서의 억제제농도를 측정했다.

다음 표 1은 GSH 또는 GSH와 GSSG와의 혼합물을 부가하므로써 기능성 RBI의 발현이 증가함을 나타낸다.

[표 1]

	mg/l · OD*	상대적 증가	mg/l*	상대적 증가
GSH가 없음	0.07	1.0	0.36	1.0
5mmol/l GSH	0.37	5.3	1.65	4.6
10mmol/l GSH	0.34	4.9	1.38	3.8
5mmol/l GSH+				
1mmol/l GSSG	0.25	3.9	1.18	2.7

*세포내 기능성 RBI의 수율은 mg/l · OD(리터 × 광학밀도)로 표시되며 수율용량은 mg/l로 표시된다.

[실시에 4]

또 다른 티올 시약으로서 N-아세틸-L-시스테인의 사용.

실시에 3에서 처럼 플라스미드 pRBIaI로 전형시킨 E. coli JM 83의 배양물을 암피실린(100μg/ml)을 함유한 LB 배지내 26°C에서 증식시키고 OD₅₅₀=1에서 IPTG(최종 농도 : 1mmol/l)로 유도시켰다. 동시에 고체형의 N-아세틸-L-시스테인(최종 농도 : 5 및 10 mmol/l)을 부가했다. 배양물을 방배 교반하고 실시에 3에서처럼 트립신 억제테스트로써 기능성 RBI의 함량에 대해 테스트했다. 결과를 표 2에 요약하였는데 N-아세틸-L-시스테인이 활성적으로 되는 농도 범위가 환원된 글루타티온의 농도 범위와 매우 유사함을 표 2에서 알 수 있다.

[표 2]

N-아세틸-시스테인을 부가함에 의한 기능성 RBI의 발현

배지에 부가한 것	mg/l · OD*	상대적인 증가	mg/l*	상대적인 증가
부가하지 않았음	0.07	1.0	0.36	1.0
5mmol/l의 N-아세틸-시스테인	0.31	4.4	1.27	3.5
10mmol/l의 N-아세틸-시스테인	0.25	3.6	0.83	2.3
5mmol/l GSH	0.37	5.3	1.65	4.6

* 세포내 기능성 RBI의 수율은 mg/l · OD로 표시되며 수율용량은 mg/l로 표시된다. 전체 세포 추출물의 가용성 부분에서의 트립신 억제테스트로써 RBI 활성을 측정하였다(실시에 3을 참조).

[실시예 5]

외질 단백질 디설파이드 이소머라제(PDI)의 공동 발현과 공동분비 및 배양배지에 티올 시약의 동시 부가.

숙주 생물 자체의 외질 단백질 디설파이드 이소머라제(PDI)를 공동발현시키기 위해, PDI 유전자를 우선 중합효소 연결반응(PCR)에 의해 E. coli K12 야생형 균주 W3110의 게놈으로부터 증폭시켰다 (Bachmann, B. J.(1972), Bacteriol, Rew. 36, 525-557). 이 유전자의 공지된 염기 서열(Bardwell, J. C. A., McGovern, K. & Beckwith, J., "Identification of a Protein Required for Disulfide Bond Formation in vivo", Cell 67, (1991), 581-589)은 당해 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 만들기 위한 출발점으로서의 역할을 한다.

PDI 유전자를 증폭시키기 위해 프라이머로서 다음과 같은 올리고뉴클레오타이드를 사용했다.

N-말단 프라이머 : (4번 서열)

5' TTGCAATTAACAAAGCTTGAATTCTCGGAGAGAGTAGATCATGAAAAAGAT 3'

C-말단 프라이머 : (5번 서열)

5' GGGCTTTATGTAAGCTTGGATCCTTATTTTTCTCGGACAGATATTTTC 3'

신호 서열과 리보솜 결합부위를 포함해서 완전한 PDI 유전자를 함유한 증폭된 DNA 단편을 분리하고 제한 효소 HindIII 및 BamHI로 분해시켰다. 플라스미드 pRB1a1을 상기와 동일한 효소로 분해시키고, 벡터 단편을 분리하여 PDI 유전자로 리게이팅시켰다. 결과의 플라스미드 pRB1a1-PDI는 lac 프로모터의 조절하에서 디시스트로닉 오페론으로서 OmpA/RBI 및 PDI는 lac 프로모터의 조절하에서 디시스트로닉 오페론으로서 OmpA/RBI 및 PDI에 대한 유전자를 함유한다(제3도). 이 플라스미드의 완전한 뉴클레오타이드서열을 1번 서열에 표시하였다.

PDI의 공동발현 및 공동분비의 효과를 분석하기 위해, E. coli JM 83을 플라스미드 pRB1-PDI로 전형시켰다.

만들어진 세포내 RBI의 배양 및 이것의 측정을 실시예 3 및 4에 기술된 바와같이 행하였다. PDI의 공동 발현 및 공동분비와 동시에 환원된 글루타티온을 부가할 때 글루타티온만을 부가했을 때의 증가된 수율보다 상당히 더 많이 수율이 증가했으며 한편 PDI의 발현만으로는 기능성 외질 RBI의 양에 영향을 미치지 않았다 (표 3).

[표 3]

E. coli로부터의 PDI 공동발현에 의한 기능성 RBI의 증가된 발현

배지에 부가한 것	mg/l · OD*	상대적인 증가	mg/l*	상대적인 증가
부가하지 않았음	0.08	1.0	0.38	1.0
5mmol/l GSH	0.37	4.6	1.65	4.3
PDI	0.08	1.0	0.39	1.0
PDI+ 1mM GSH	0.42	6.0	1.71	4.4
PDI+ 5mM GSH	0.97	13.7	4.33	11.1
PDI+10mM GSH	0.54	7.7	2.17	5.6
PDI+ 1mM GSH +0.5mM GSSG	0.38	5.4	2.00	5.1
PDI+ 5mM GSH +0.5mM GSSG	0.60	8.6	2.54	6.5
PDI+10mM GSH +0.5mM GSSG	0.46	6.6	1.93	4.9
PDI+0.5mM GSSG	0.10	1.4	0.57	1.5

* 세포내 기능성 RBI의 수율은 mg/l · OD로 표시되며 수율 용량은 mg/l로 표시된다. 전체 세포 추출물의 가용성 부분에서의 트립신 억제테스트로써 RBI활성을 측정하였다(실시예 3을 참조).

(57) 청구의 범위

청구항 1

분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA를 함유하며 재조합 DNA 발현조건하의 배양 배지에서 배양되는 원핵 숙주생물에 의해 이항화 결합을 갖는 단백질이 분비될 때 천연 단백질 구조의 형성을 증가시키는 방법에 있어서, 0.1-20 mmol/l의 하나 또는 여러개의 티올 시약을 함유하는 배양배지가 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 1-15 mmol/l의 하나 또는 여러개의 티올 시약을 함유하는 배양배지가 사용되는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 3-12 mmol/l의 하나 또는 여러개의 티올 시약을 함유한 배양배지가 사용되는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서, SH 그룹을 갖는 환원용 티올 시약이 사용되는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 1분자당 하나의 SH 그룹을 갖는 환원용 티올 시약이 사용되는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 글루타티온(GSH), 시스테인, N-아세틸시스테인, 시스테인, β-머캅토에탄올 또는 이것의 혼합물이 환원용 티올 시약으로서 사용되는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, SH 그룹을 갖는 환원용 티올 시약과 디설파이드 그룹을 갖는 산화용 티올 시약의 혼합물이 사용되는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 환원용 티올 시약 대 산화용 티올 시약의 몰비가 2:1 내지 20:1인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 몰비가 5:1 내지 10:1인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 환원된 글루타티온(GSH)과 글루타티온 설파이드(GSSG)의 혼합물이 사용되는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 재조합 DNA의 발현이 그람-음성인 원핵 숙주생물내에서 행해지는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 숙주 생물로서 E. coli가 사용되는 방법.

청구항 13

제10항 또는 제11항에 있어서, 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA가 박테리아 내막 침투용인 신호 펩티드를 암호화하는 DNA 단편과의 작동 결합에 있는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 신호 펩티드가 E. coli OmpA 단백질로부터 유도되는 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA가 유도가능한 발현 신호의 조절하에 있는 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 배양 배지로서 완전한 배지가 사용되는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 세포 추출물로부터 얻은 물질 혼합물을 함유한 완전한 배지가 사용되는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, LB 배지가 사용되는 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, pH가 5-9인 배양배지가 사용되는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서, pH가 6-8인 배양배지가 사용되는 방법.

청구항 21

제 1항에 있어서, 상기 숙주생물에 의해 대사될 수 없는 하나 또는 여러개의 단당류 또는 올리고당류, 및 이들의 혼합물을 상기 배양배지에 부가적으로 부가하는 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 소르보스, 사카로스, 라피노스 또는 이것의 혼합물로 구성된 그룹으로부터 선택된 하나 또는 여러개의 단당류 또는 올리고당류, 및 이들의 혼합물을 사용하는 방법.

청구항 23

제 21항 또는 제 22항에 있어서, 배양 배지내 대사가가능하지 않은 단당류 또는 올리고당류, 및 이들의 혼합물의 농도가 0.1 mol/l-1 mol/l인 방법.

청구항 24

제 23항에 있어서, 배양 배지내 대사가가능하지 않은 단당류 또는 올리고당류, 및 이들의 혼합물의 농도가 0.3 mol/l-0.7 mol/l인 방법.

청구항 25

제 1항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제유전자의 과발현이 이황화결합을 갖는 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA의 발현과 함께 숙주생물내에서 행해지는 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서, 그람-음성 박테리아로부터의 단백질 디설파이드 이소머라제유전자의 과발현이 행해지는 방법.

청구항 27

제 26항에 있어서, E. coli로부터의 단백질 디설파이드 이소머라제유전자의 과발현이 행해지는 방법.

청구항 28

제 25항 내지 제 27항중 어느 한 항에 있어서, 단백질 디설파이드 이소머라제유전자가 유도가능한 발현 신호의 조절하에 있는 방법.

청구항 29

제 25항에 있어서, 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA 및 단백질 디설파이드 이소머라제유전자가 하나의 염색체의 발현 벡터상에 존재하는 방법.

청구항 30

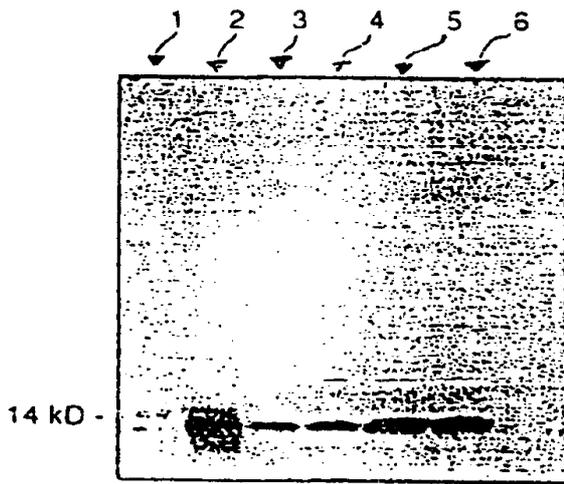
제 29항에 있어서, 상기 재조합 DNA 및 단백질 디설파이드 이소머라제유전자가 하나의 발현 신호의 조절하에 있는 방법.

청구항 31

제 25항에 있어서, 분비된 단백질을 암호화하는 재조합 DNA 및 단백질 디설파이드 이소머라제유전자가 두개의 상호 양립하는 염색체 외 발현 벡터상에 존재하는 방법.

도면

도면1



도면2

합성 올리고뉴클레오타이드 pRBla1-PDI

