

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
C07K 13/00  
C12N 15/00

(45) 공고일자 1994년01월 12일  
(11) 공고번호 특1994-0000199

(21) 출원번호	특1988-0010051	(65) 공개번호	특1989-0003801
(22) 출원일자	1988년08월06일	(43) 공개일자	1989년04월 18일
(30) 우선권주장	200514/1987 1987년08월 10일 일본(JP)		
(71) 출원인	시오노기세이야꾸 가부시끼가이샤 요시또시 가즈오 일본국 오오사까후 오오사까시 쥬오구 도쇼오마찌 3쥬메 1방 8고		

(72) 발명자 오까모또 히로시  
일본국 미야기켄 센다이시 쓰노고로 2-15 ,3-205  
이또오 다까꼬  
일본국 효오고켄 다까라즈까시 후지가오까 4-45  
데라오까 히로시  
일본국 오오사까후 사까이시 다까꾸라다이 2-47-10  
쓰즈끼 히로시게  
일본국 고오또후 쓰즈끼군 다나베쥬 오스미가오까 5-12-15  
요시다 노부오  
일본국 효오고켄 니시노미야시 고시엔산반쥬 5-6  
(74) 대리인 이준구, 백락신

심사관 : 정삼섭 (책자공보 제3510호)

(54) 인간 REG 단백질

요약

내용 없음.

대표도

도1

명세서

[발명의 명칭]

인간 REG 단백질

[도면의 간단한 설명]

제1도는 인간 reg cDNA의 염기서열 및 그로부터 추정되는 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

제2도는 쥐 reg cDNA의 염기서열 및 그로부터 추정되는 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

제3도는 hu reg로 약칭된 인간 reg를 위한 형질발현 플라스미드의 형성을 나타낸 것이다.

제4도는 인간 reg를 위한 형질발현 플라스미드를 운반하는 이스트의 3~5일 배양물의 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 제1도에 나타낸 아미노산 서열에서 Ala(1번째), Gly(21번째), Gln(22번째), Glu(23번째), Ala(24번째), Gln(25번째), Gln(30번째), Ala(31번째) 또는 Ile(33번째), Asn(165번째)까지의 아미노산 서열 또는 이 아미노산 서열의 N-말단에 Met를 더 갖는 아미노산 서열을 함유한 인간 reg 단백질 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

인슐린 생산 체장 랑게르한스섬 B 세포는 극히 제한된 재생능을 갖고 있어, 당뇨병 발병의 원인이 되고 있다. 1984년에, 오까모또와 그의 동료들은 체장 90%가 제거된 쥐에 니코틴 아미드와 같은 폴리(ADP-리보오즈) 합성 효소의 억제제(poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor)를 매일 주사함으로써 체장의 랑게르한스섬 B 세포의 재생을 유도하는데 최초로 성공하였다(Yonemura, Y.et al., Diabetes 33, 401, 1984). 또한 최근 니코틴 아미드를 대량으로 경구 투여함으로써 인간 인슐린의 존성 당뇨병의 차도 상태(remission phase)가 연장될 수 있다는 것이 보고되었다(Ph. Vague et al.,

Lancet Vol. I. No. 8533, 619-620, 1987).

본 발명에 사용된 디퍼렌셜 혼성화(differential hybridization) 방법은 이미 다카사와 등에 의해 이미 확립되었다(Diabetes 35, 1178, 1986). 즉, 췌장 B 세포 중앙에서 특이적으로 형질 발현된 유전자는 B 세포 중앙의 폴리(A)<sup>+</sup> RNA로 부터 제조된 cDNA 및 정상 췌장 랑게르한스섬의 폴리(A)<sup>+</sup> RNA로 부터 제조된 cDNA를 탐침으로 사용하여 쥐의 B-세포 중앙 cDNA 라이브러리를 디퍼렌셜 스크리닝(differential screening) 함으로써 성공적으로 확인되었다.

본 발명자들은 쥐의 재생 췌장 랑게르한스섬 B 세포에서 특이적으로 형질 발현되는 유전자를 이전에 발견하였으며, 더우기 인간 췌장-유래 cDNA 라이브러리가 이 유전자의 동족체를 함유한다는 것을 발견하고, 이 유전자를 "reg" (재생 유전자의 약칭)라고 명명하였다(J. Biol. Chem. 263, 2111-2114, 1988).

인슐린의 투여는 현재 인정된 유일한 당뇨병 치료법이다.

한때 효과적인 것으로 기대되었던 술폰일 우레아와 같은 경구용 혈당 감소제는 장기간 투여할때 췌장 B세포의 인슐린 생산능을 방해하여 관상 동맥 경화증을 유발하는 부작용을 갖는다.

상술한 바와 같이, 췌장 랑게르한스섬 B 세포는 니코틴 아미드와 같은 폴리(ADP-리보오즈) 합성 효소의 억제제를 매일 투여함으로써 90%의 췌장 제거된 주위 나머지 췌장으로 부터 재생될 수 있다는 것이 증명되었다. 본 발명자들은 이미 쥐의 재생 췌장 랑게르한스섬 B 세포에서 특이적으로 형질 발현하는 쥐 reg 및 이 쥐 reg에 대응하는 인간 유전자인 인간 reg를 발견하였다. 이들은 췌장 랑게르한스섬 B 세포의 재생에 밀접하게 관련되어 있다.

본 발명자들은 이어서 유전자 공학기술을 이용하여 쥐 reg 및 인간 rge를 미생물에서 형질발현시키는데 성공하였다. 즉, 본 발명은 인간 reg에 의해 코오딩된 인간 reg 단백질 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 인간 reg 단백질은 인슐린-생산 췌장 B 세포의 재생에 밀접하게 관련되어 있는 것으로 또한 간주된다. 인간 reg에 의해 코오딩된 단백질의 대량 생산 및 그를 임상적으로 사용할 수 있는 약으로 발전시킴으로써, 즉, 당뇨병 환자의 인슐린 생산 췌장 B 세포의 재생을 유도함으로써 공지의 인슐린 투여 요법을 능가하는 당뇨병 치료에 새로운 장을 열게되었다.

췌장 랑게르한스섬 B 세포의 재생 및 증식 메카니즘을 해명하기 위해, 본 발명자들은 쥐의 재생된 췌장 랑게르한스섬 B 세포에서 특이적으로 형질발현하는 유전자에 대해 조사하여, "reg"라고 명명되는 재생 유전자를 발견하였다. 더우기, 본 발명자들은 쥐의 reg를 탐침으로 사용함으로써 쥐의 reg에 대응하는 인간 유전자를 조사하여, 인간 췌장 cDNA 라이브러리로 부터 인간 reg를 발견하였다. 이어서, 본 발명자들은 인간 reg를 미생물에서 형질발현하여 인간 reg 단백질을 회수하는데 성공하였다.

탐침으로 사용된 쥐의 reg는 하기의 방법으로 제조된다.

## I. 쥐의 재생된 췌장 랑게르한스섬의 분리

### (1) 췌장 90% 제거술

체중 200~300g의 숫컷 위스타르 쥐를 에테르 마취하에 개복후, 방담관 분절(parabiliary segment)을 제외한 췌장(전체 췌장의 90%에 상응)을 제거하고 피복한다. 이 췌장 90% 제거술은 브이.쥐.포글리아(V.G.Foglia, Rev. Soc. Argent. Biol. 20, 21-37, 1944)에 의해 확립되었으며, 인슐린 의존성 당뇨병 모델의 제조를 위해 널리 사용되고 있다. 췌장 90%가 제거된 쥐는 1개월 이내에 당뇨병 상태가 된다.

### (2) 니코틴아미드의 투여

췌장 90% 제거전 7일 부터 췌장 제거후 3개월까지 니코틴아미드(50mg/ml 생리 식염수)를 하루에 한번 0.5g/kg 체중씩 복강내 투여한다.

니코틴아미드의 투여는 췌장 90%가 제거된 쥐의 당뇨병 상태를 예방 및 개선한다.

### (3) 재생된 랑게르한스섬의 분리

상기 단계(1) 및 (2)에 의해 잔여 췌장에서 랑게르한스섬이 재생되어 췌장의 단위 체적당 랑게르한스섬의 수 및 랑게르한스섬 1개당의 크기가 증가한다. 랑게르한스섬 세포의 수의 증가는 그의 크기와 관련이 있다. 증가된 세포의 대부분은 인슐린 생산 B 세포이며, 글루카곤 생산 A 세포 및 소마토스태틴 생산 D 세포의 수는 변화하지 않는다(Yonemura, Y.et al. Diabetes 33, 401, 1984). 수술 3개월후에 90% 췌장 제거 및 니코틴아미드 투여된 쥐를 냄부탈(Nembutal) 마취하에 개복하고, 잔여 췌장을 한크스 용액(Hanks' solution)으로 팽화시킨 후 적출한다. 적출된 췌장을 2개의 잔여 췌장당 5ml의 한크스 용액중에서 세절한 후, 150mg의 소혈청 알부민(Sigma, Type V) 및 40mg의 콜라게나제(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Type IV)를 가하고, 혼합물을 37°C에서 3~5분 동안 진탕하여 소화시킨다. 소화후, 용액을 50ml의 한크스 용액에 현탁시키고, 5분 동안 방치하여 랑게르한스섬을 침전시킨다. 한크스 용액의 상부 반을 제거하고, 25ml의 신선한 한크스 용액을 가한 후 혼합물을 다시 현탁시킨다. 방치, 제거 및 재현탁을 8번 수행한 후, 입체 현미경하에 재생된 랑게르한스섬을 수거한다. 췌장 90% 제거 및 니코틴 아미드 투여된 32마리의 쥐로 부터 1355개의 재생 랑게르한스섬이 수거된다. 상기의 방법은 기본적으로 오카모토의 방법(H.Okamoto, Moleculer and Celluar Biochemistry 37, 43-61, 1984)에 따른다.

## II. 쥐의 재생된 췌장 랑게르한스섬 상보 DNA(cDNA) 라이브러리의 제조

### (1) RNA의 분리

분리된 재생된 랑게르한스섬을 4M 구아니디늄 티오시아네이트, 10mM 소듐 시트레이트(pH 7.0), 0.5% 소듐라우릴사르코신, 0.1M 2-메르캅토 에탄올 및 1% 안티폼 A(Sigma)중에서 초음파 파쇄한다. 혼합 물을 밀도 1.64의 세슘트리플루오르아세트산(Pharmacia)위에 적층하고, 25°C 및 44,000rpm에서 14~16시간 동안 원심 분리한다. 원심 분리후, RNA 침전물을 회수한다. 1355개의 재생된 랑게르한스 섬으로 부터 885µg의 RNA가 수득된다(Chirgwin. J.M.et al., Biochemistry 1979, 18 : 5294~99).

(2) 폴리(A)<sup>+</sup> RNA의 분리

상기 단계(1)에서 수득된 RNA로 부터 올리고(dT) 셀FNF로오즈 컬럼 크로마토그래피에 의해 17.2µg의 폴리(A)<sup>+</sup> RNA를 분리한다(H.Aviv. & P.Leder, Proc. Natl Acad.Sci. 69, 1408~1414, 1972).

(3) cDNA 라이브러리의 제조

먼저 2µg의 재생된 랑게르한스섬 폴리(A)<sup>+</sup> RNA를 주형으로, 및 올리고(dT)를 프라이머로 사용하여 40단위의 역전사 효소와 함께 42°C에서 1시간 동안 배양하여 182ng의 cDNA(단일 가닥)을 합성한다. 수득된 cDNA-RNA 하이브리드를 0.75 단위의 RNase H, 46 단위의 DNA 폴리머라제 1 및 4 단위의 T4 DNA 폴리머라제로 처리하여 284ng의 이중 가닥 cDNA를 수득한다. 상기에 언급된 cDNA의 합성은 기본적으로 유·구블러 등의 방법(Gene 25, 263~269, 1983)에 따라 수행된다.

cDNA(이중 가닥)을 15단위의 EcoRI 메틸라제(New England Biolabs)로 처리하고, 175 단위의 T4 DNA 리가아제(Takara Shuzo)를 사용하여 13°C에서 45시간 동안 반응시켜 EcoR I 링커(450ng)에 결합시킨다.

상기의 생성물을 37°C에서 2시간 동안 76단위의 EcoR I(Takara Shuzo)으로 소화시키고, 세파크릴 S-1000(Pharmacia)에 넣어 cDNA와 소화된 링커로 분리한다. 상기의 단계에 의해, 214ng의 EcoR I 메틸라제-처리된 EcoR I 단면(이중가닥 cDNA)를 회수한다.

상기의 cDNA로 부터 20ng을 T4 DNA 리가아제(Takara Shuzo, 116단위)를 사용하여 13°C에서 15시간 동안 1.23µg의 λgt10 arms(EcoR I 소화후 알칼리포스파타제의 의해 5' 말단을 탈인산화한 Stratagen사 제품)과 결합시킨다. 결합된 λgt10 재생된 랑게르한스섬 cDNA를 지가팩(Gigapack ; Stratagen사 제품)으로 패키징한 후, 이. 콜리 K12-유도 Y1089(DNA cloning, vol.1, 49~78, 1985, IRL Press)에 도입하여 총 2.8 × 10<sup>6</sup> 형질 전환체를 수득한다.

III. 재생된 랑게르한스섬 cDNA 라이브러리의 디퍼렌셜 스크리닝 :

재생된 랑게르한스섬에서 특이적으로 형질발현된 유전자의 분리.

상기 단계 II에서 제조된 재생된 랑게르한스섬 cDNA 라이브러리로 부터 임의적으로 선택된 5000개의 독립 플라크로 부터, 파지를 마이크로타이터 플레이트(96웰)에 0.5 OD<sub>600</sub> 에 상응하는 Y1089를 함유한 NZY-0.2% 말토오즈 배지(1% NZ 아민, 0.5% 박토-이스트 추출물, 0.5% 염화 나트륨 및 0.2% 말토오즈)에 요지를 사용하여 접종하고, 37°C에서 밤새 배양하여 증식시킨다. 수득된 파지용액 2µl 를 니트로셀룰로오즈 필터(Schleicher and Schuel, BA 85)에 스포트하고, 니크번역에 의해 <sup>32</sup>P로 표지된 쥐의 인슐린 II cDNA와 혼성화한다. 그 결과 16%의 클론이 인슐린 cDNA 클론으로 동정되며, 나머지 84% 비-인슐린 cDNA 클론은 후속되는 스크리닝에 이용될 수 있다.

쥐의 재생된 랑게르한스섬으로 부터 또는 비처리된 쥐의 정상 랑게르한스섬으로 부터의 폴리(A)<sup>+</sup> RNA(150ng)를 41ng의 올리고(dT) 12~18' 20mM dATP, 20mM dTTP, 20mM dGTP, 2µM dCTP 및 60µ Ci [α-<sup>32</sup>P]dCTP(Amersham) 존재하에 15단위의 역전사 효소(세이가가꾸오교)와 함께 37°C에서 2시간 동안 배양한다. RNA 사슬을 0.3N 수산화 나트륨으로 분해(100°C에서 2분)한 후, 생성된 <sup>32</sup>P-표지된 단일 가닥 cDNA를 에탄올 침전법으로 회수한다. 이 방법에 의해, 1 내지 2 × 10<sup>8</sup> cpm/µg 폴리(A)<sup>+</sup> RNA의 비활성을 갖는 탐침이 수득된다.

비-인슐린 cDNA 클론의 각 파지용액 2µl 시료를 2세트의 니트로셀룰로오즈 필터에 스포트하고, 실온에서 0.5N 수산화 나트륨/1.5M 염화 나트륨으로 5분 및 0.5M 트리스-염산(pH 8.0)/1.5M 염화 나트륨으로 5분 동안 처리하고, 2×SSC(1×SSC : 0.15M 염화 나트륨 및 0.015M 소듐시트레이트)에 침지시키고, 80°C에서 2시간 동안 고정화 시킨다.

고정화된 니트로셀룰로오즈 필터를 3×SSC에서 65°C로 30분 및 3×SSC 및 1×FBP(덴하르트 용액 ; 0.02% 피콜(Ficoll) 400, 0.02% 소혈청 알부민 및 0.02% 폴리비닐피롤리돈)에서 65°C로 1시간 동안 반응시키고, 1M 염화 나트륨, 50mM 트리스-염산(pH 7.4), 10mM EDTA, 0.1% SDS, 1×FBP, 10µg/ml 연어 정소 DNA 및 250µg/ml 폴리(U)(Pharmacia)에서 65°C로 1시간 동안 예비 혼성화 한다. 1세트의 필터는 탐침으로 쥐의 재생된 랑게르한스섬 폴리(A)<sup>+</sup> RNA로 부터 제조된 cDNA(1.5 × 10<sup>7</sup> cpm)를, 또다른 1 세트의 필터는 탐침으로 비처리 쥐로 부터 분리된 정상 랑게르한스섬 폴리(A)<sup>+</sup> RNA로 부터 제조된 cDNA(1.5 × 10<sup>7</sup> cpm)를 사용하여 1M 염화 나트륨, 50mM 트리스-염산(pH 7.4), 10mM EDTA(pH 8.0), 0.1% SDS 및 250µg/ml 폴리(U)에서 65°C로 16시간 동안 혼성화를 수행한다.

혼성화 후, 필터를 실온에서 1~2분 동안 2×SSC로 2번 및 65°C에서 40분 동안 0.1×SSC/0.1% SDS로 4번 세척하고, 80°C에서 1시간 동안 건조시킨 후, -80°C에서 밤새 오토라디오 그래피 한다. 결과로, 재생된 랑게르한스섬 cDNA와 특이적으로 혼성화 하는 1종류의 클론이 수득될 수 있다.

본 발명을 재현할 때, 이 스크리닝은 제2도에 나타난 염기 서열을 참고로 제조된 탐침을 사용함으로써 용이하게 수행될 수 있다.

IV. 재생된 랑게르한스섬 B 세포에서 특이적으로 형질발현되는 유전자의 서열화.

상기 단계 III에서 수득된 재생된 랑게르한스섬에서 특이적으로 형질발현되는 유전자의 cDNA 클론으로 부터 파지 DNA를 정제하고("Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1982)). EcoR I으로 소화시킨 후, 1% 아가로즈 겔 전기 영동에 의해 파지백타로 부터 cDNA 삽입물을 분리한다. 분리된 cDNA의 염기 서열은 M13(mp 18 및 mp 19, Pharmacia)을 사용하여 생거의 방법(Methods in Enzymology 101, 20~78, 1983)에 의해 분리된 cDNA의 염기서열을 결정한다.

그 결과, 재생된 랑게르한스섬에서 특이적으로 발현하는 전사물은 폴리(A) 부분을 제외하고 전체 749 뉴클레오티드 길이이며, 메티오닌에서 시작하여 알라닌으로 끝나는 165 아미노산 잔기로 구성된 단백질을 코오딩한다. 염기서열 및 추정되는 아미노산 서열은 제2도에 나타낸다.

유러피언 모레클러 바이올로지 레보로토리(European Molecular Biology Laboratory : Heidelberg), 진뱅크(GenBank : Cambridge, Massachusetts) 및 내셔널 바이오 메디칼 리서치 파운데이션(National Biomedical Research Foundation : Washington, DC)의 핵산 및 단백질 데이터 베이스의 컴퓨터 분석(method of Wibur, W.J. & Lipman, D.J.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 1983, 80, 726~730) 결과, 새로이 클로닝된 본 발명의 cDNA의 염기서열 및 추정되는 아미노산 서열은 공지된 유전자 또는 유전자 생성물과는 상이하며, 50% 이상의 유사성을 나타내는 유전자 또는 유전자 생성물은 데이터 베이스에서 발견될 수 없다.

따라서, 재생된 랑게르한스섬 cDNA 라이브러리로 부터 클로닝된 cDNA를 이전에 복된 바 없는 완전히 새로운 유전자로 간주하고, "reg" (재생 유전자)로 명명하였다.

인간 reg는 상술한 reg의 일부를 탐침으로 사용하여 하기의 방법으로 인간 체장 cDNA 라이브러리로 부터 수득된다.

I. 인간 reg의 분리

1. 인간 체장 cDNA 라이브러리의 제조

a) 인간의 재생된 랑게르한스섬을 제조하는 것은 불가능하기 때문에, 조작에 의해 수득된 인간 체장 조직으로부터 cDNA 라이브러리를 형성한다. 위의 체장 조직에서 reg의 mRNA가 검출된다.

b) RNA의 분리

외과적으로 수득된 인간 체장을 4M 구아니딘늄 티오시아네이트, 10mM 소듐시트레이트(pH 7.0), 0.5% 소듐라우릴사르코신, 0.1M 2-메르캅토에탄올 및 1% 안티폼 A(Sigma)에서 폴리트론으로 파쇄한다. 혼합물을 1.64의 밀도를 갖는 세슘트리플루오로아세트산(Pharmacia)에 적층하고, 25°C 및 44,000rpm에서 14~16시간 동안 원심 분리한다. 원심 분리후, RNA 침전물을 회수한다. 500mg의 체장 조직으로부터, 2,526mg의 RNA가 수득된다(Chirgwin, J.M.et al., Biochemistry 1979, 18 : 5294~99).

c) 폴리(A)<sup>+</sup>RNA의 분리.

상기 단계(b)에서 수득된 RNA로부터, 17.56μg의 폴리(A)<sup>+</sup> RNA를 올리고(dT) 셀룰로오즈 컬럼 크로마토그래피에 의해 분리한다(H.Aviv & P. Leder, Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 1408~1412, 1972).

d) cDNA 라이브러리의 제조

먼저, 주형으로 1μg의 인간 체장 폴리(A)<sup>+</sup> RNA 및 프라이머로 올리고(dT)를 사용하여 42°C에서 1시간 동안 40 단위의 역전사 효소와 함께 배양하여 약 100ng의 cDNA(단일가닥)을 합성한다. 수득된 cDNA-RNA 하이브리드를 0.75 단위의 RNase H, 46 단위의 DNA 폴리머라제 I 및 4 단위의 T4 DNA 폴리머라제로 처리하여 약 150ng의 이중가닥 cDNA를 수득한다. 상술한 cDNA의 합성은 기본적으로 유·구블러 등의 방법(Gene 25, 263~269, 1983)에 따라 수행된다.

cDNA(이중가닥)를 15 단위의 EcoR I 메틸라제(New England Biolabs)로 처리하고, 175 단위의 T4 DNA 리가아제(Takara Shuzo)를 사용하여 13°C에서 45시간 동안 EcoR I 링커(450ng)에 결합한다.

상기의 생성물을 37°C에서 2시간 동안 76 단위의 EcoR I(Takara Shuzo)으로 소화시키고, 세파크랄 S-1000(Pharmacia)에 넣어 cDNA와 소화된 링커로 분리한다. 상기의 단계에 의해, 17.6ng의 EcoR I 메틸라제-처리된 EcoR I 단편(이중 가닥 cDNA)을 회수한다.

상기의 cDNA를 T4 DNA 리가아제(Takara Shuzo, 116단위)를 사용하여 13°C에서 15시간 동안 1.0μg의 λgt10 arms(EcoRI으로 소화한 후 알카리포스파타제에 의해 5'-말단이 탈인산화된 Stratagene 사 제품)에 결합시킨다. 결합된 λgt10-인간 체장 cDNA를 지기팩(Stratagene)으로 패키징하고, 이. 콜리 K12-유도 Y1089(DNA cloning, vol. 1, 49~78, 1985, IRL Press)에 도입하여 총 6×10<sup>5</sup> 형질 전환체를 수득한다.

2. 인간 체장 cDNA 라이브러리로 부터 인간 reg cDNA의 클로닝

a) 제조된 인간 체장 cDNA 라이브러리의 각 플라크로부터, 파지를 0.50D<sub>600</sub>에 상응하는 Y1089를 함유한 말토오즈 배지(0.2% 말토오즈, 1% NZ 아민, 0.5% 박토-이스트 추출물 및 0.5% 염화 나트륨)에 접종하고, 37°C에서 밤새 배양하여 증식시킨다. 그 결과, 10<sup>6</sup> 플라크가 한천 배지에 형성된다(150mm 직경). 이를 니트로셀룰로오즈 필터에 옮긴다.

b) 쥐 reg(제2도)의 76~135번째 염기 서열에 상응하는 올리고데옥시 리보뉴클레오티드(60염기)를 DNA 합성기(Applied Biosystems Model 380 B)에 의해 합성하고, 그의 5' 말단을 [γ-<sup>32</sup>P] ATP 및 T4

플리뉴클레오티드 키나아제에 의해 <sup>32</sup>P로 표지시킨다.

c) 상기 단계 a)에서 수득된 니트로셀룰로오즈 필터를 실온에서 0.5N 수산화 나트륨/1.5M 염화 나트륨으로 5분 동안 및 0.5M 트리스-염산(pH 8.0)/1.5M 염화 나트륨으로 5분 동안 처리하고, 2×SSC(1×SSC : 0.15M 염화 나트륨 및 0.015M 소듐시트레이트)에 침지시킨 후 80°C에서 2시간 동안 고정화시킨다.

고정화된 니트로셀룰로오즈 필터를 6×SSC, 5×FBP(1×FBP : 0.02% 피콜 400, 0.02% 소혈청 알부민 및 0.02% 폴리비닐피롤리돈), 0.1% SDS 및 200μg/ml 이 . 콜리 tRNA에서 50°C로 4시간 동안 예비 혼성화 하고, 6×SSC, 1×FBP, 0.1% SDS 및 2ng/ml <sup>32</sup>P-표지된 올리고데옥시리보 뉴클레오티드를 함유한 100μg/ml 이 . 콜리 tRNA에서 50°C로 12~16시간 동안 <sup>32</sup>P-표지된 올리고데옥시리보 뉴클레오티드와 혼성화한 후, 50°C에서 6×SSC 및 0.1% SDS로 각각 30분씩 4번 세척한다.

d) 그 결과, 10<sup>6</sup> 인간 체장 cDNA 클론중에서 58클론이 60염기의 쥐 reg 탐침과 혼성화 된다.

e) 양성 클론으로 부터, 가장 긴 cDNA 삽입물(약 900 뉴클레오티드)을 갖는 클론을 선택한다. DNA 삽입물을 클론으로 부터 분리하여 EcoRI로 소화시키고, EcoRI 부위에서 pBS 벡터(Stratagene)에 삽입클로닝한다. 인간 reg는 내부 EcoRI 부위를 갖기 때문에, EcoRI 소화에 의해 2개의 단편, 즉 5' 및 3'-말단의 반으로 분할된다. 이들 두 단편을 각각 pBS 벡터에 서브클로닝 한다.

#### II. 인간 reg cDNA의 서열화

a) pBS 벡터에서 cDNA 서브 클로닝된 염기 서열을 생거의 방법(Methods in Enzymology 101, 20~78, 1983)에 따라 결정한다.

b) 그 결과, 인간 reg cDNA는 폴리(A)부분을 제외하고 총 길이 749 뉴클레오티드를 함유하며, 메티오닌으로 부터 출발하여 아스파라진으로 끝나는 166 아미노산 잔기로 구성된 단백질을 코오딩 한다.

c) 인간 reg에 의해 코오딩되는 단백질은 165 아미노산 잔기로 구성된 쥐의 reg-코오딩 단백질 보다 1개의 아미노산 잔기 만큼 더 길다. 인간 reg의 코오딩 부분의 염기서열 및 그로부터 추정되는 아미노산 서열은 쥐 reg의 것과 각각 75% 및 68%의 유사성을 나타낸다.

d) 인간 reg 단백질의 N-말단 주변의 서열은 소수성 아미노산 잔기가 풍부하다. 이것은 분비 단백질의 시그널 펩티드의 주요 특성이다. 결과적으로, 인간 reg 단백질에서 Met(-1)로 부터 출발하여 Gln(20), Gly(21), Gln(22), Glu(23), Ala(24), Pro(29), Gln(30), Arg(32)로 끝나는 서열은 시그널 펩티드로 추정된다.

수득된 cDNA를 통상적 방법에 의해 형질 발현시킬 수 있다.

예를 들면, cDNA는 적당한 프로모터(lac, Tac, Trp, P<sub>L</sub> 등)의 조절하에 있도록 적당한 형질발현 벡터(pKK223-3, pBS, pDR540, pDR720, pPL-람다 등)에 삽입하고, 이를 숙주(이 . 콜리 K-12 AG-1, MM294, DH1, HB101, C600 등)에 도입할때 형질발현될 수 있다. 이스트 및 원숭이 세포와 같은 진행 세포를 숙주로 사용할때, 배지에 목적하는 단백질을 분비할 수 있기 때문에 배양물로 부터 목적하는 단백질을 회수하는 것이 용이하다. 예를 들면, 이스트를 사용할때, pGPD-1, pMF α8, AAR6, ABade8, AH5, YEp52, pACF301 및 pAM82와 같은 각종 공지의 벡터를 형질발현 벡터로 사용할 수 있다. 원숭이 세포 COS를 사용할때, pKSV-10 등을 형질발현 벡터로 사용할 수 있다. 상기의 숙주-벡터계와는 별도로, 대부분의 공지의 숙주-벡터계가 reg의 형질발현에 적합하다.

형질발현된 reg 단백질은 원심 분리, 크로마토그래피, 투석, 염석 등의 방법을 적당히 배합하는 공지의 정제방법에 따라 정제될 수 있다.

본 발명의 reg 유전자에 의해 코오딩되는 reg 단백질은 제1도에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단백질에 제한되는 것은 아니다. 아미노산 서열의 아미노 말단에 시그널 서열을 나타내며, 성숙 reg 단백질은 Gly(21번째), Gln(22번째), Glu(23번째), Ala(24번째), Gln(25번째), Gln(30번째), Ala(31번째) 또는 Ile(33번째)로 시작한다. 그러므로, 이런 상술된 reg 단백질은 본 발명에 포함된다. 단백질을 유전자 공학 기술에 의해 제조할때, 메티오닌을 단백질의 N-말단에 가한다. 그러므로 메티오닌 이 상기 단백질의 N-말단에 첨가된 단백질도 본 발명에 포함된다.

#### [실시에]

사카로미세스 세레비시아에에서 “인간 reg”의 형질발현 재료 및 방법 균주 및 배지

이 .콜리 K-12, 균주 C600(F<sup>-</sup>, hsdR<sup>+</sup>, hsdM<sup>+</sup>, recA<sup>+</sup>, thr, leu, thi, lacY, supE, tonA)를 플라스미드 형성을 위한 숙주로 사용한다.

사카로미세스 세레비시아에 균주 AH22(leu2, his4, can1, cir<sup>+</sup>)(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929~1933(1978))를 플라스미드를 위한 수용 균주로 사용한다.

이스트 세포를 YPDA 배지(1% 이스트 추출물, 2% 폴리펩톤, 2% 글루코오즈 및 20mg/l 아데닌) 중에서 30°C에서 성장시킨다.

히 스티 딘(20mg/l)를 보충한 부르크홀더의 최소 배지(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4504~4508(1980))를 11당 1.5g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 함유한 Pi-풍부 배지(Pi(+) 배지로 약칭) 또는 Pi 대신 11당 1.5g의 KCl을 함유한 Pi-결핍 배지의 제조를 위해 사용한다.

#### [효소 및 링커]

제한 효소, T4 DNA 리가아제 및 클레노우 단편은 다카라 바이오 케미칼즈(일본 교오또)에서 시판되고 있으며, XhoI 링커는 파마시아(일본 교오또)에서 시판하고 있다.

#### [플라스미드]

이스트-이.콜리 셔틀 벡터 pAM82(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1-5(1983), 유럽 특허 공고 제 0103201호 및 일본국 특허 공고 제61-55951호)를 사용한다. 벡터 pAM82를 운반하는 사카로미세스 세레비시아에 AH22는 일본국 이바라끼켄 305 쓰구바시 히가시 1쵸메 1-3의 통상산업성 공업기술원 미생물 공업 기술연구소에 1982년 8월 16일 이래로 부다페스트 조약하에 FERM BP-313의 수탁번호로 사카로미세스 세레비시아에 AH22/pAM82의 명칭으로 기탁되어 있다. 이 벡터는 ARS1, 2- $\mu$  ori 및 Leu2를 운반하는 세레비시아에종 DNA로 부터의 5.5kb 단편 및 Ap<sup>R</sup> 마커 및 ori를 운반하는 이.콜리 플라스미드 pBR322로 부터의 3.7kb 단편으로 구성되어 있다. 또한 PH05 프로모터 부분을 함유한 2.7kb 이스트 DNA 단편을 운반한다.

플라스미드 pGEM4는 프로메가 바이오텍(미합중국)에서 시판하고 있다.

인간 reg cDNA(J. Biol. Chem. 263, 2111-2114(1988))는 구조 유전자에 EcoRI 부위를 가지며, 그러므로 2 EcoRI 단편이 각각 pBS 벡터의 EcoRI 부위에 삽입된다.

#### [이스트 세포의 형질 전환]

기무라 등의 방법(J. Bacteriol. 153, 163-168(1983))에 따라 형질 전환을 수행한다. Leu<sup>+</sup> 형질 전환체를 2% 한천을 함유한 부르크 홀더 최소 배지에서 선택한다.

#### [이스트 세포 성장 및 유도]

산 포스파타제 프로모터(PH05)는 배지내의 Pi 농도에 의해 조절되는 것으로 알려져 있다(The EMBO Journal 1, 675-680(1982)).

먼저, 히스티딘(20 $\mu$ g/ml)로 보강된 Pi(+) 부르크 홀더 최소 배지에서 30 $^{\circ}$ C에서 2일 동안 통기하면서 이스트 세포를 성장시키고, 분액(200 $\mu$ l)을 히스티딘(20 $\mu$ g/ml)이 보강된 100ml의 Pi(-) 배지에 옮긴다.

약 3-5일후, 인간 reg 단백질이 배양 배지에서 검출된다.

#### [형질발현 플라스미드의 형성]

표준 DNA 기술을 사용한다(Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1982)). 인간 reg 형질 발현 플라스미드는 제3도에 나타낸 바와 같이 형성된다.

pBS 벡터에 서브클로닝된 인간 reg cDNA는 2부분, 즉 각각 5'-및 3'-말단의 반(전자 및 후자의 반)으로 구성되어 있다.

먼저 5'-말단 반을 AflIII로 소화시키고, 클레노우 단편으로 처리한 후, XhoI 링커를 가하고 EcoRI으로 소화시킨다.

다음, 3'-말단 반을 EcoRI 및 XbaI으로 소화시킨다.

생성된 2개의 인간 reg cDNA의 단편을 SacI 부위를 XhoI 링커에 의해 미리 XhoI 부위로 교환한 pGEM4(XhoI)에 삽입한다.

pGEM4(XhoI) 인간 reg를 XhoI 및 Hinc II로 소화시키고, pAM82(XhoI 및 PvuII로 소화) 벡터에 삽입한다.

이 플라스미드를 pAM82-인간 reg라고 정의한다.

각 제한 엔도뉴클레아제를 3u/ $\mu$ g DNA의 농도에서 사용하고, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양한다.

#### [인간 reg 단백질의 제조]

상술한 바와 같이 형성된 인간 reg cDNA를 위한 형질발현 플라스미드로 이.코릴 K-12, 균주 C600를 형질전환 시키고, 암피실린 내성 균체를 선택한다. 이들 형질전환체를 사용하여 대량의 플라스미드 DNA를 제조한다.

이.콜리 세포에서 증식된 재조합 플라스미드를 표준 형질 전환 방법에 의해 이스트 수용체 세레비시아에 종의 균주 AH22를 형질전환 시키고, Leu<sup>+</sup> 균체를 선택한다.

플라스미드를 운반하는 이스트 세포를 Pi(+) 배지에서 2일 동안 성장시키고, Pi(-) 배지에 옮김으로써 유도한다. Pi(+) 및 Pi(-) 배지에서 이스트 세포를 30 $^{\circ}$ C에서 격렬하게 진탕하면서 배양한다.

Pi(-) 배지에서 배양후 3,4 및 5일째에 브로스의 분액을 회수하고 원심분리하여 세포를 제거한다.

수득된 배양배지를 센트리콘-10(Amicon) 및 N<sub>2</sub> 기체 버블링에 의해 약 100배 농축한다.

농축된 시료(0.75ml의 배양 배지에 해당)를 코마시브 브릴리언트 블루 R 염색에 의해 16% SDS-PAGE에서 분석한다.

제4도에 나타낸 바와 같이, 배양 배지에서 세포로부터 인간 reg 단백질이 제조 및 분비된다는 것이 발견된다.

제4도로 부터 증명될 수 있는 바와 같이, 인간 reg 단백질이 우세하게 검출되며, 반면에 소량의 부

수 단백질이 분비되기도 한다.

[배양배지에서 인간 reg 단백질의 면역학적 검출]

이스트 배양배지를 센트리콘-10(Amicon) 및 N<sub>2</sub> 기체 버블링에 의해 100배 농축한다.

농축된 배지를 16% SDS-폴리아크릴아미드 겔(SDS-PAGE)(FEBS Lett. 58, 254-258(1975))(Nature(London) 227, 680(1970))에 의해 전기 영동하고, 인간 reg 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석(J. Virol. 10, 211(1972))를 수행한다.

제4도에 나타낸 바와 같이, 약 15K-Da 및 16K-Da를 갖는 2개의 상이한 밴드가 나타나므로, 이스트로부터 분비된 주 단백질이 reg 단백질이라는 것이 확인된다.

[Reg 단백질의 정제 및 특성화]

이스트 배양배지로 부터 reg 단백질의 정제

reg 단백질을 함유한 이스트 배양배지 11에 1N 염산을 가하여 pH 3.4로 조절하고, 최종 도전율이 0.3mmho가 되도록 증류수로 희석한다. 이 용액에 5mM 초산 나트륨 완충액(pH 3.4)(완충액 A)으로 미리 평형화된 S-세파로오즈(급류형) 100ml를 가하고, 혼합물을 4°C에서 16시간 동안 서서히 휘젓는다. reg 단백질이 흡착된 S-세파로오즈를 컬럼(5×8cm)에 패킹하고, 0.3M NaCl을 함유한 완충액 A로 세척한 후, reg 단백질을 0.6M NaCl을 함유한 완충액 A로 컬럼으로 부터 용출시킨다. SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)(15% 겔)에서 약 15,000 및 약 16,000의 2개의 다른 분자량을 나타내는 reg 단백질 분획을 모아서, 완충액 A에 대해 4°C에서 16시간 동안 투석한다. 투석된 물질을 완충액 A로 평형된 S-세파로오즈 컬럼(0.7×25cm)에 넣고, 컬럼을 0.3M NaCl을 함유한 완충액 A로 세척한다. reg 단백질을 컬럼의 10배 부피의 0.3M NaCl을 함유한 완충액 A 내지 0.6M NaCl을 함유한 완충액 A의 직선 구배로 용출시킨다. 15K 및 16K의 reg 단백질을 각각 0.47M 및 0.44M NaCl 농도를 갖는 완충액 A로 용출시킨다. 이들은 SDS-PAGE(15% 겔)에서 균질하다.

정제된 reg 단백질을 아미콘 YM-10 막으로 한외여과하여 농축 및 탈염시키고, 0.1mg/ml 농도의 10mM AcOH에 저장한다. 11의 이스트 배양배지로 부터 약 200μg의 reg 단백질을 수득한다.

[정제된 reg 단백질의 특성화]

(a) 분자량

15K 및 16K의 정제된 reg 단백질의 분자량을 SDS-PAGE에 의해 결정하면 각각 14,500 및 16,000이며, 이것은 cDNA로 부터 추정되는 아미노산 서열로 부터 계산된 이론적 분자량 15,023 및 16,275와 일치한다(15K-reg 단백질과 16K-reg 단백질의 N-말단은 각각 제1도에서 33위치의 Ile 및 22 위치의 Gln으로 추정된다).

(b) 아미노산 조성

16K-reg 단백질의 일부를 HPLC(Brownlee, aquapore RP-300 컬럼)로 탈염시키고, 110°C에서 24시간 동안 4M 메탄술폰산(0.2% 3-(2-아미노에틸)인돌을 함유)으로 가수분해 한다. 히다찌 아미노산 분석기(모델 835)로 아미노산 분석을 수행한다.

제1도에 나타낸 바와 같이 16K-reg 단백질의 아미노산 조성은 대부분 이론치와 일치한다.

(c) reg 단백질의 부분적 N-말단 아미노산 서열

16K-reg 단백질의 아미노산 서열을 어플라이드 바이오 시스템즈 477A 프로테인 시팍서로 결정한다. 그러나, N-말단 및 하기의 아미노산이 검출되지 않는다. 그러므로 피로글루타메이트 아미노펩티다제로 처리한 후, 16K-reg 단백질을 상기의 방법으로 서열화 한다.

표 11에 나타낸 바와 같이, 효소 처리된 단백질의 N-말단 29 아미노산 잔기를 결정한다. 이 단백질의 N-말단 아미노산은 글루탐산이며, 이 아미노 말단 서열(Glu-2 내지 Glu-30)은 cDNA로 부터 추정된 것과 일치한다.

그러므로, 16K-reg 단백질의 N-말단 아미노산은 Gln(22번째) 또는 Glu(23번째)인 것으로 추정된다. 따라서, 본 발명자들은 쥐 reg 단백질중 하나의 N-말단 아미노산이 인간 reg 단백질의 Glu(23번째)에 상응하는 Glu라는 것을 발견하였다.

15K-reg 단백질에 있어서, 형질발현 후 16K-reg 단백질을 트립신-유형효소에 노출시키면 15K-reg 단백질이 될 것으로 추정된다. 그러므로, 15K-reg 단백질의 N-말단 아미노산은 Arg(32번째) 뒤의 Ile(33번째)일 것으로 추정된다.

[표 1]

아미노산	실측치	이론치
Asp	17.1	17
Thr	6.9	7
Ser	15.7	17
Glu	14.8	14
Pro	6.4	6
Gly	10.2	10
Ala	8.0	8
1/2Cys	5.5	6
Val	9.9	10
Met	1.0	1
Ile	3.9	4
Leu	8.1	8
Tyr	7.1	7
Phe	7.0	7
Lys	9.1	9
His	2.2	2
Arg	4.8	5
Trp	5.8	6
총		144

[표 2]

분해단계	Reg 단백질 잔기	피수율(%)
1	(Gln) <sup>*1</sup>	
2	Glu	17.3
3	Ala	18.1
4	Gln	20.6
5	Thr	11.9
6	Glu	14.9
7	Leu	15.8
8	Pro	15.2
9	Gln	14.7
10	Ala	14.2
11	Arg	7.9
12	Ile	9.8
13	Ser	35.6
14	(Cys) <sup>*2</sup>	
15	Pro	7.5
16	Glu	5.7
17	Gly	8.6
18	Thr	12.2
19	Asn	5.9
20	Ala	5.8
21	Tyr	5.6
22	Arg	3.5
23	Ser	22.0
24	Tyr	4.5
25	(Cys) <sup>*2</sup>	
26	Tyr	4.8
27	Tyr	6.4
28	Phe	4.4
29	Asn	4.1
30	Glu	2.7

\*1 미확인 잔기(피로글루타메이트 아미노펩티다제 실험으로 부터 추정된 Gln)

\*2 미확인 잔기(cDNA로 부터 추정된 Cys)

**(57) 청구의 범위**

청구항 1



