



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0075318
(43) 공개일자 2013년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
GOIN 33/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0143639
(22) 출원일자 2011년12월27일
심사청구일자 2011년12월27일

(71) 출원인
동양대학교 산학협력단
경상북도 영주시 풍기읍 동양대로 145

(72) 발명자
한미정
경상북도 영주시 휴천3동 남산현대 아파트 207동 1102호

(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 10 항

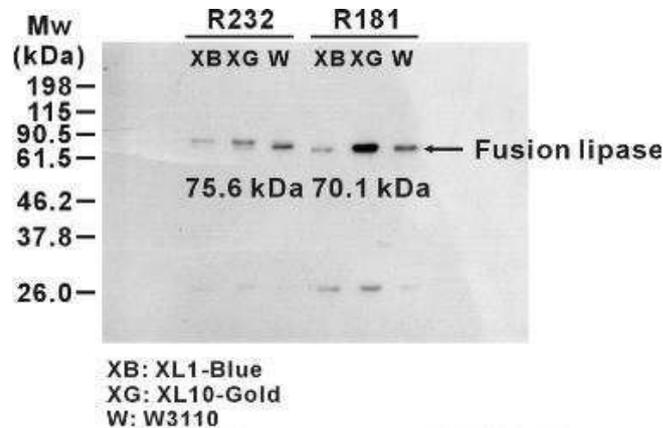
(54) 발명의 명칭 대장균 YiaT 단백질을 이용한 목적단백질의 표면발현 방법

(57) 요약

본 발명은 표면발현모체로 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자가 융합단백질 형태로 발현되도록 결합된 DNA를 포함하는 목적단백질의 표면발현 벡터. 상기 벡터를 이용한 목적단백질을 세포표면에 발현시키는 방법 및 상기 표면발현벡터를 이용한 목적단백질의 개량방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 고분자량의 외래단백질을 세포표면에 안정적이면서도 고효율로 발현시킬 수 있어, 단백질어레이, 항체제작, 생물전환공정 및 외래단백질 개량에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0008826

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구지원사업

연구과제명 녹색에너지 가스 하이드레이트 생산 및 수송에 최적화된 anti-freeze peptide 대량 생산
기술 개발

주관기관 동양대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

표면발현모체로 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자가 융합단백질 형태로 발현되도록 결합된 DNA를 포함하는 목적단백질의 표면발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, C-말단이 제거된 YiaT 단백질은 232 번째 아미노산 이후의 C-말단이 제거된 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, C-말단이 제거된 YiaT 단백질은 181 번째 아미노산 이후의 C-말단이 제거된 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 벡터로 형질전환된 세포.

청구항 5

제4항의 형질전환된 세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 목적단백질을 세포 표면에 발현시키는 방법.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 목적단백질을 세포표면에 발현시키는 방법:

- (a) 표면발현모체로 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자가 융합단백질 형태로 발현되도록 결합된 DNA를 포함하는 목적단백질의 표면발현 벡터를 제조하는 단계;
- (b) 상기 표면발현 벡터를 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 및
- (c) 상기 형질전환된 세포를 배양하여 목적단백질을 표면발현시키는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, C-말단이 제거된 YiaT 단백질은 232 번째 아미노산 이후의 C-말단이 제거된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, C-말단이 제거된 YiaT 단백질은 181 번째 아미노산 이후의 C-말단이 제거된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 목적단백질의 개량방법:

- (a) 목적단백질을 코딩하는 유전자의 변이체 라이브러리를 구축하는 단계;
- (b) 상기 목적단백질의 변이체가 C-말단이 제거된 YiaT 단백질과 융합된 상태로 발현되도록 목적단백질의 유전자 변이체 라이브러리와 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 유전자 제조합체를 제작하는 단계;
- (c) 상기 유전자 제조합체 또는 상기 유전자 제조합체를 포함하는 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계;
- (d) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기 유전자 변이체 라이브러리를 세포표면에 발현하는 단계; 및
- (e) 개량된 형질을 갖는 목적단백질이 발현된 세포를 스크리닝하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 스크리닝 단계는 목적단백질의 활성, 목적단백질에 라벨링된 물질을 인식하는 단백질, 목적단백질에 결합하는 라벨링된 리간드 또는 목적단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 개량방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 표면발현모체로 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자가 융합단백질 형태로 발현되도록 결합된 DNA를 포함하는 목적단백질의 표면발현 벡터. 상기 벡터를 이용한 목적단백질을 세포표면에 발현시키는 방법 및 상기 표면발현벡터를 이용한 목적단백질의 개량방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 세포 표면발현은 단백질이나 펩티드 등을 적절한 표면발현 모체 (anchoring motif)와 융합시켜서 원핵세포에서 진핵세포에 이르기까지 다양한 세포의 표면에 발현시키는 기술을 말한다 (Lee S.Y. *et al.*, *Trends Biotechnol.*, 21:45, 2003). 이러한 세포 표면발현의 응용 범위는 매우 다양하다. 예를 들면, 특정 단백질을 세포표면에 발현하여 펩티드나 항체, 수용체(receptor) 등의 스크리닝을 간단하게 수행할 수 있으며 (Francisco J.A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90:10444, 1993), 항원 에피토프(epitope)를 세포표면에 발현시켜서 강력한 면역반응을 나타낼 수 있는 생백신(live vaccine)을 생성할 수 있다. 또한 정밀화학, 농약, 의약 등에서 요구되는 특정효소를 세포표면에 발현하여 세포 생축매로 사용하거나, 오염물질을 분해하거나, 금속이온을 흡착할 수 있는 단백질을 발현하여 생물적 환경정화 (bioremediation)에도 사용할 수 있다 (Sousa C. *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 14:1017, 1996; Chen W. and Mulchandani A., *Trends Biotechnol.*, 16:71, 1998).

[0003] 세포의 복잡한 내막구조를 통과해서 세포표면에 성공적으로 발현시키기 위해서는 우선 세포표면에 발현시키고자 하는 외래 단백질을 세포표면까지 안정적이며 효율적으로 이동시킬 수 있는 표면발현 모체의 개발이 가장 중요한 부분이다. 모체는 다음과 같은 이상적인 성질 가지는 것이 바람직하다: (1) 세포내막을 통과할 수 있는 분비 신호 서열(signal sequence)를 가지고 있다; (2) 세포 외막표면에 안정적으로 부착될 수 있는 표적 서열(targeting sequence) 또는 모체(anchoring motif)을 가지고 있다; (3) 세포의 성장을 저해하지 않는 범위 내에서 세포표면에 다량으로 발현되어 단백질의 활성이 높게 나타날 수 있어야 한다; (4) 단백질의 크기에 관계없이 안정적으로 발현되어 다양한 분야에 이용될 수 있어야 한다.

[0004] 세포표면 발현 방법은 크게 모체에 삽입될 외래 단백질의 위치에 따라, N-말단, C-말단, 또는 샌드위치(중앙위치) 형태로 나뉜다. 지금까지 대장균에서 사용된 표면발현 모체는 외막 단백질(LamB, OmpA, OmpC, OmpS, OprF, PhoE), 지질단백질(lipoprotein; Lpp), autotransporter, surface appendage의 subunit, S-layer 단백질 등이 있다. 특히 이 중에서 외막 단백질은 3차원 구조상에서 세포 밖으로 노출된 구조 부분에 외래 단백질을 전시할 수 있으므로 표면발현 모체로 많이 이용되고 있다.

[0005] 하지만 세포표면 발현 시스템은 대부분 표면에 발현하고자 하는 단백질의 크기가 상대적으로 제한된다는 한계점을 가지고 있다. 보고된 대부분의 모체들은 상대적으로 분자량이 작은 펩티드, 항체, 도메인(domain), 수용체 등의 발현에 사용되고 있다. 이는 삽입된 외래 단백질의 C-말단과 N-말단이 입체적으로 가깝게 위치해야 하므로, 단백질이 큰 경우에는 단백질의 안정성이 낮아진다. 실제로 LamB 또는 PhoE의 경우, 50내지 60개 이상의 아미노산으로 이루어진 외래 단백질을 삽입하면, 구조적 제한을 가져와 안정적으로 외막 단백질을 형성하지 못하고, 대장균의 포린(porin) 단백질을 사용하는 경우, 최고 150개의 아미노산으로 구성된 단백질이 아닌 에피토프나 금속결합 모티브(metal binding motif) 등에 국한되어 사용되었다 (Stahl S. and Uhlen M., *Trends Biotechnol.* 15:185, 1997; Kjaergaard K. *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:10, 2000).

[0006] 최근에 상대적으로 분자량이 큰 외래 단백질을 세포표면 발현할 수 있는 모체가 개발되고 있다 (Lee S. H., *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5074, 2004; Lee S. H. *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.* 90:223, 2005). 하지만 세포표면에 발현되는 양이 적은 단점을 가지고 있다. 따라서 분자량이 큰 외래 단백질을 안정적으로 고효율로 세포표면에 발현시키기 위해서는 새로운 세포표면 발현모체 개발이 필요한 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 고분자량의 외래 단백질을 세포표면에 안정적이고 고효율로 발현시키고자 예의 노력한 결과, 대장균의 YiaT 단백질의 C-말단이 제거된 단편을 표면발현 모체로 사용하여, YiaT 단백질의 C-말단이 제거된 단편과 목적단백질이 융합하여 발현되도록 설계한 표면발현용 벡터를 사용할 경우, 고분자량의 외래단백질을 안정적이고 효율적으로 세포표면에 발현시킬 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 고분자량의 외래 단백질을 세포표면에 안정적이고 고효율로 발현시킬 수 있는 표면발현모체를 찾고 이를 포함하는 표면발현용 벡터를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 표면발현용벡터로 형질전환된 세포를 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 또다른 목적은 상기 세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 목적단백질을 세포표면에 발현시키는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 표면발현모체로 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자가 융합단백질 형태로 발현되도록 결합된 DNA를 포함하는 목적단백질의 표면발현 벡터를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 표면발현용벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 형질전환된 세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 목적단백질을 세포 표면에 발현시키는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, (a) 표면발현모체로 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자가 융합단백질 형태로 발현되도록 결합된 DNA를 포함하는 목적단백질의 표면발현 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 표면발현 벡터를 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 세포를 배양하여 목적단백질을 표면발현시키는 단계를 포함하는 목적단백질을 세포표면에 발현시키는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, (a) 목적단백질을 코딩하는 유전자의 변이체 라이브러리를 구축하는 단계; (b) 상기 목적단백질의 변이체가 C-말단이 제거된 YiaT 단백질과 융합된 상태로 발현되도록 목적단백질의 유전자 변이체 라이브러리와 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 유전자 재조합체를 제작하는 단계; (c) 상기 유전자 재조합체 또는 상기 유전자 재조합체를 포함하는 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; (d) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기 유전자 변이체 라이브러리를 세포표면에 발현하는 단계; 및 (e) 개량된 형질을 갖는 목적단백질이 발현된 세포를 스크리닝하는 단계를 포함하는 목적단백질의 개량방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따르면, 고분자량의 외래단백질을 세포표면에 안정적이면서도 고효율로 발현시킬 수 있어, 단백질어레이, 항체제작, 생물전환공정 및 외래단백질 개량에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 YiaT 단백질이 세포 외막에 발현되는 것을 확인한 SDS-PAGE 결과를 나타낸 것으로, T는 전체세포 단백질(total protein), M은 외막 단백질(outer membrane protein), 화살표는 YiaT 단백질을 나타낸다.

도 2은 본 발명에 따른 제조합 플라스미드 제조합 벡터인 pTrcYR₁₈₁, pTrcYR₂₃₂, pTrcY, pTrcYR₁₈₁PL, pTrcYR₂₃₂PL, pTrcYPL, pTrcYR₁₈₁PLFG, pTrcYR₂₃₂PLFG, 및 pTrcYPLFG의 유전자 지도이다.

도 3은 본 발명에 따라 세포표면에 발현된 lipase(리파제)의 활성 여부를 나타내는 고체 평판 사진이다.

도 4는 본 발명에 따라 세포표면에 발현된 리파제의 유무를 나타내는 Western blot 사진이다.

도 5는 pH 변화에 따른 세포표면에 발현된 리파제 활성을 나타낸 것이다.

도 6는 온도 변화에 따른 세포표면에 발현된 리파제 활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명에서 "목적단백질"은 당업자가 생산하고자 하는 단백질로서, 제조합 발현벡터에 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 형질전환체에서 발현할 수 있는 모든 단백질을 의미한다.

[0021] 본 발명에서 "융합단백질"은 원래의 외래단백질의 서열의 N-말단 또는 C- 말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산이 부가되어 하나의 폴리펩타이드로 발현되는 단백질을 의미한다.

[0022] 일 관점에서, 본 발명은 표면발현모체로 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자가 융합단백질 형태로 발현되도록 결합된 DNA를 포함하는 목적단백질의 표면발현 벡터에 관한 것이다.

[0023] 대장균의 YiaT 단백질은 현재까지 세포 내의 기능뿐만 아니라 세포 내 위치가 실험적으로 보고된 바가 없었다. 본 발명에서는 세포표면 발현시스템을 제작하기 전에 YiaT 단백질의 정확한 세포내 위치를 확인하고자, 대장균 W3110(ATCC 39936) 염색체로부터 YiaT 유전자를 클로닝하여 대장균 XL1-Blue에서 과발현시킨 후, 세포외막단백질 분획을 분리하고, 상기 세포외막단백질 분획에서 YiaT 단백질이 존재하는 것을 확인하고, YiaT 단백질이 세포표면에 발현하는 표면발현모체로 사용될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에서는 YiaT 단백질의 전체 아미노산 서열(서열번호 9) 중 232번째 아미노산까지를 포함하는 YiaT 단백질 단편 또는 181번째 아미노산까지를 포함하는 표면발현모체를 제작하고 상기 표면발현모체와 목적단백질인 슈도모나스 플루레센스(*Pseudomonas fluorescens*) 유래의 리파제를 각각 융합단백질형태로 발현할 수 있도록 벡터를 제작하여 대장균에 형질전환시킨 후, 리파제가 성공적으로 표면발현되는 것을 확인하였다.

[0025] 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.

[0026] “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 오퍼

레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서가 이에 포함된다. 플라스미드에서 유전자의 발현 양에 가장 영향을 미치는 인자는 프로모터이다. 고 발현용의 프로모터로서 SR α 프로모터와 사이토메가로바이러스 (cytomegalovirus) 유래 프로모터 등이 바람직하게 사용된다.

[0027] 본 발명의 DNA 서열을 발현시키기 위하여, 매우 다양한 발현 조절 서열중 어느 것이라도 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 진핵 세포 또는 이들의 바이러스의 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려진 구성과 유도의 기타 다른 서열 및 이들의 여러 조합이 포함된다. T7 RNA 폴리메라아제 프로모터 $\Phi 10$ 은 *E. coli*에서 단백질 NSP를 발현시키는데 유용하게 사용될 수 있다.

[0028] 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 인헨서는 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, 인헨서 (enhancer)는 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.

[0029] 본원 명세서에 사용된 용어 “발현 벡터”는 통상 이종의 DNA의 단편이 삽입된 재조합 캐리어 (recombinant carrier)로서 일반적으로 이중 가닥의 DNA의 단편을 의미한다. 여기서, 이종 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 (이종) DNA가 생성될 수 있다.

[0030] 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 작동가능하도록 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.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 C-말단이 제거된 YiaT 단백질은 232 번째 아미노산 이후의 C-말단이 제거된 단백질 또는 181 번째 아미노산 이후의 C-말단이 제거된 단백질인 것이 바람직하다.

[0032] 특히, 본 발명의 일실시예에서, YiaT 단백질의 전체서열을 표면발현모체로 사용한 경우에는 표 1에 나타난 바와 같이, 목적단백질인 리파제에 의하여 세포분해가 일어나거나, C- 말단이 제거된 YiaT 단백질 단편을 표면발현 모체로 사용하였을 때보다, 표면발현된 리파아제효율이 현저히 떨어지는 것으로 나타났다.

[0033] 본 발명에서 목적단백질은 당업자가 원하는 모든 단백질이 가능하며, 특히, 의료, 연구용 및 산업용 단백질, 예를 들어, 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소저해제, 신호전달단백질 혹은 그 일부분, 항체, 항원 혹은 그 일부분, 단쇄항체, 세포수용체, 결합단백질, 결합도메인, 펩타이드, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절인자, 혈액응고인자 및 식물 생체방어 유도 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 생물학적 활성을 갖는 다양한 외래단백질을 목적단백질로 발현시킬 수 있다.

[0034] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 표면발현벡터로 형질전환된 세포와 상기 형질전환된 세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 목적단백질을 세포 표면에 발현시키는 방법에 관한 것이다.

[0035] 또다른 관점에서, 본 발명은 (a) 표면발현모체로 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자와 목적단백질을 코딩하는 유전자가 융합단백질 형태로 발현되도록 결합된 DNA를 포함하는 목적단백질의 표면발현 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 표면발현 벡터를 숙주세포에 형질전환시키는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 세포를 배양하여 목적단백질을 표면발현시키는 단계를 포함하는 목적단백질을 세포표면에 발현시키는 방법에 관한 것이다.

- [0036] 본 발명에서는 목적 단백질을 세포표면에 안정적으로 다량 발현시키는 시스템을 개발하였으며 이는 단백질어레이, 항체제작, 생물전환공정 및 외래단백질 개량 등의 다양한 생명공학 분야에 이용될 수 있다.
- [0037] 또다른 관점에서, 본 발명은 (a) 목적단백질을 코딩하는 유전자의 변이체 라이브러리를 구축하는 단계; (b) 상기 목적단백질의 변이체가 C-말단이 제거된 YiaT 단백질과 융합된 상태로 발현되도록 목적단백질의 유전자 변이체 라이브러리와 C-말단이 제거된 YiaT 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 유전자 재조합체를 제작하는 단계; (c) 상기 유전자 재조합체 또는 상기 유전자 재조합체를 포함하는 벡터로 숙주세포를 형질전환하는 단계; (d) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기 유전자 변이체 라이브러리를 세포표면에 발현하는 단계; 및 (e) 개량된 형질을 갖는 목적단백질이 발현된 세포를 스크리닝하는 단계를 포함하는 목적단백질의 개량방법에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 숙주세포는 그람 음성균, 그람 양성균, 방선균, 효모 곰팡이로 구성된 군에서 선택될 수 있고, 상기 스크리닝 단계는 목적단백질의 활성, 목적단백질에 라벨링된 물질을 인식하는 단백질, 목적단백질에 결합하는 라벨링된 리간드 또는 목적단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 목적단백질 개량방법에 있어서, 유전자 라이브러리를 구축하는 단계는 DNA 서플링법 (Stemmer, Nature, 370:389-91, 1994), StEP법 (Zhao, H., et al., Nat. Biotechnol., 16: 258-61, 1998), RPR법 (Shao, Z., et al., Nucleic Acids Res., 26:681-3, 1998), 분자육종법 (Ness, J.E., et al., Nat. Biotechnol. 17:893-6, 1999), ITCHY법 (Lutz S., et al., Cur. Opi. Biotechnol., 11:319-24, 2000), 에러 유발(error-prone) PCR (Cadwell, R.C., et al., PCR Methods Appl., 2:28-33, 1992), 포인트 돌연변이법 (Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)을 이용하여 야생형 목적단백질의 유전자를 변이시킴으로써 얻을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 목적단백질의 개량방법에 있어서, 상기 스크리닝 단계는 목적단백질의 활성, 목적단백질에 라벨링된 물질을 인식하는 단백질, 목적단백질에 결합하는 라벨링된 리간드 또는 목적단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 상기 스크리닝 단계는 유세포 분석기 (Georgiou, G., Adv Protein Chem., 55:293-315, 2000)를 이용하여 실시할 수도 있고, 단백질의 활성을 이용하는 경우에는 단백질이 발현되는 숙주의 성장을 측정하거나, 또는 단백질에 의해 촉매되는 발색반응을 측정하여 스크리닝할 수 있다.
- [0041] 상술한 바와 같은 특징을 갖는 본 발명의 단백질 개량방법을 이용할 경우, 종래의 방법으로는 용이하게 얻을 수 없는, 생물학적으로 발생하지 않는 화학반응을 촉매하는 효소(예: Diels-Alder 촉합반응), 비자연적인 입체 선택성 또는 레지오선택성(regioselectivity)을 갖는 효소, 유기용매 또는 유기용매-수용액 이상의 용액에서 반응을 촉매할 수 있는 효소, 그리고 고온 고압과 같은 극한 조건에서 반응을 촉매하는 효소 등을 야생형 효소로부터 신속하게 얻을 수 있다
- [0042] 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 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0043] **실시예 1: YiaT 단백질의 세포 내의 위치 확인**
- [0044] YiaT 단백질은 현재까지 세포 내의 기능뿐만 아니라 세포 내 위치가 실험적으로 보고된 바가 없다. 따라서 세포 표면 발현시스템을 제작하기 전에 YiaT 단백질의 정확한 세포내 위치를 확인하고자, YiaT 단백질을 과발현시켜, 전체세포 단백질과 외막 단백질을 분리하여 SDS-PAGE로 분석하였다. 대장균 유래의 *yiaT* 유전자를 획득하기 위하여, 대장균 W3110(ATCC 39936) 염색체(chromosomal DNA)를 주형으로 하고, 서열번호 1과 2번의 프라이머를 사용하여 PCR (첫번째 변성 95℃ 5분, 두번째 변성 95℃ 30초, 교잡 55℃ 1분, 연장 72℃ 1분 30초, 30회 반복)을 수행하였다.
- [0045] 서열번호 1: 5-**ggaattc**ATGTTAATTAATCGCAATATTGTG
- [0046] 서열번호 2: 5-**ccaagctt**TTAAAAACGCCAGCTCACCCCG

- [0047] 상기 PCR 산물을 아가로스 겔 전기영동법으로 전기영동한 후, 아가로스 겔에서 약 741bp 크기의 DNA 절편을 분리하고, 제한효소 *EcoRI*과 *HindIII*으로 절단하였다. 이를 *trc* 프로모터를 갖고 있는 플라스미드 pTrc99A (Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)를 상기와 동일한 제한효소인 *EcoRI*과 *HindIII*으로 절단하여 수득한 DNA 절편과 연결시켜 재조합 플라스미드를 수득하고, 열충격 (heat shock) 방법으로 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환시킨 다음, 엠포실린(50 μ g/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하여, 이로부터 재조합 플라스미드 pTrcYE를 성공적으로 수득하였다.
- [0048] 형질전환균주 XL1-Blue (pTrcYE)와 대조균으로 XL1-Blue (pTrc99a)을 엠포실린(50 μ g/L)이 첨가된 100 mL의 LB 액체배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하고, 배양액의 흡광도가 600nm에서 0.4일 때 IPTG 농도가 1mM이 되도록, 첨가하여 YiaT 단백질의 발현을 유도하였다. 발현유도 4시간 경과 후, 4 $^{\circ}$ C, 6000 rpm에서 5분 동안 배양액을 원심분리 하여 세포를 수득하고, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) 용액으로 세척한 후, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) 용액 0.2mL 으로 재현탁하였다. 현탁된 세포를 초음파법을 이용하여 파괴시킨 후, 실온에서 10,000rpm, 2분 동안 원심분리 하여 파괴되지 않은 세포는 제거하고 다시 18 $^{\circ}$ C, 10,000 rpm에서 30분 동안 상등액을 원심분리하여 펠렛 (pellet)을 0.5% sarcosyl 용액 0.5 mL에 현탁하였다. 이 현탁액을 4 $^{\circ}$ C, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하여 펠렛을 수확한 후, 다시 10 mM Na₂HPO₄ (pH 7.2) 용액 0.5 mL으로 재현탁하여 같은 조건으로 원심분리 하였다. 펠렛을 증류수에 현탁하여 최종적으로 세포의 외막 단백질을 획득하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 이들 외막 단백질과 전체세포 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분자량 크기별로 분리한 결과, YiaT 단백질(약 27 kDa)이 세포 외막에 위치함을 알 수 있었다 (도 1).
- [0049] **실시예 2: 재조합 벡터들 pTrcYR₂₃₂, pTrcYR₁₈₁ 및 pTrcY의 제조**
- [0050] 세포 외막 단백질을 발현시키기 위해서 3 가지 형태의 모체들을 제조하였다. 대장균 *yiaT* 유전자의 C-말단 제거 하여, 대장균 W3110(ATCC 39936) 염색체(chromosomal DNA)를 주형으로 하고, 서열번호 1과 3, 및 서열번호 1과 4번의 프라이머를 사용하여 PCR (첫번째 변성 95 $^{\circ}$ C 5분, 두번째 변성 95 $^{\circ}$ C 30초, 교잡 55 $^{\circ}$ C 1분, 연장 72 $^{\circ}$ C 1분 30초, 30회 반복)을 수행하였다. 또한 정지신호서열(stop codon)만 제거된 정상적인 전체 *yiaT* 유전자를 서열번호 1과 5번의 프라이머를 사용하여 PCR를 수행하였다.
- [0051] 서열번호 3: 5-gctctagaACGATCAATCATCGGGCTGTCGGT [Arg₂₃₂]
- [0052] 서열번호 4: 5-gctctagaACGACGGGACTCACTCTGAAAT [Arg₁₈₁]
- [0053] 서열번호 5: 5-gctctagaAAAACGCCAGCTCACCCG [full gene]
- [0054] 상기 PCR 산물로 아가로스 겔 전기영동을 수행하여, 아가로스 겔 절편에서 각각 약 696bp, 543bp, 741bp 크기의 DNA 절편을 분리하고, 제한효소 *EcoRI*과 *XbaI*으로 절단하였다. 이를 *trc* 프로모터를 갖고 있는 플라스미드 pTrc99A (Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)에 같은 제한효소 *EcoRI*과 *XbaI*으로 절단하여 수득한 DNA 절편과 연결시켜 재조합 플라스미드를 수득하고, 열충격 (heat shock) 방법으로 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질전환시킨 다음, 엠포실린(50 μ g/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별하여, C 말단이 제거되어, YiaT 단백질 서열 중 232번째 Arg까지의 단편을 코딩하는 유전자 단편이 삽입된 재조합 플라스미드 pTrcYR₂₃₂, C 말단이 제거되어, YiaT 단백질 서열 중 181번째 Arg까지의 단편을 코딩하는 유전자 단편이 삽입된 재조합 플라스미드 pTrcYR₁₈₁, 및 YiaT 단백질 전체를 코딩하는 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드 pTrcY를 성공적으로 수득하였다 (도 2).
- [0055] **실시예 3: 리파제 효소를 발현하는 재조합 벡터들 pTrcYR₂₃₂PL, pTrcYR₁₈₁PL, pTrcYPL, pTrcYR₂₃₂PLFG, pTrcYR₁₈₁PLFG 및 pTrcYPLFG의 제조**
- [0056] 슈도모나스 플루레센스(*Pseudomonas fluorescens*) 유래의 리파제 효소를 세포표면에 발현하는 재조합 플라스미드를 다음과 같이 제작하였다. 슈도모나스 플루레센스(Ahn J.H. et al., *J. Bacteriol.*, 181:1847, 1999)의 염색체(chromosomal DNA)를 주형으로 하고, 서열번호 6과 7, 서열번호 6과 8의 프라이머를 사용하여, PCR (첫번째 변성 95 $^{\circ}$ C 5분, 두번째 변성 95 $^{\circ}$ C 30초, 교잡 55 $^{\circ}$ C 30초, 연장 72 $^{\circ}$ C 1분 30초, 30회 반복)을 수행하였다

- [0057] 서열번호 6: 5-gctctagaATGCTTCATGCCTTCGAACGC
- [0058] 서열번호 7: 5-cccaagctttcaactgatcagcacacc
- [0059] 서열번호 8: 5-cccaagcttttacttgtcgtcatcgtccttgtagtcACTGATCAGCACACC

[0060] 상기 PCR 산물로 아가로즈 젤 전기영동을 수행하고, 아가로즈 젤로부터 각각 약 1.4kb와 1.5kb 크기의 DNA 절편인 리파제 유전자와 리파제에 FLAG 꼬리가 융합된 형태의 유전자를 수득하였다. 이들 유전자들을 *Xba*I과 *Hind*III으로 절단하고, 실시예 2에서 제작된 플라스미드들 pTrcYR₂₃₂, pTrcYR₁₈₁ 및 pTrcY에 삽입시켜서, 재조합 발현벡터 pTrcYR₂₃₂PL, pTrcYR₁₈₁PL, pTrcYPL, pTrcYR₂₃₂PLFG, pTrcYR₁₈₁PLFG 및 pTrcYPLFG를 각각 제조하고, 열충격 방법을 이용하여 대장균 XL1-Blue에 도입하여 형질 전환시켰다 (도 2). 형질전환된 균주는 엠퍼실린 (50µg/L)이 첨가된 LB 평판배지에서 선별되었고, 선별된 균주는 LB 액체배지에서 배양하여 -80°C 냉동고에 보관하였다. 또한, 다른 숙주 세포 XL10-Gold(Stratagene Cloning System, La Jolla, CA)와 W3110에 제작된 재조합 발현벡터 pTrcYR₂₃₂PL, pTrcYR₁₈₁PL, pTrcYPL, pTrcYR₂₃₂PLFG, pTrcYR₁₈₁PLFG 및 pTrcYPLFG를 도입하여 형질전환시켜서, 최종적으로 형질전환세포들을 선별하여 획득하였다.

[0061] 실시예 4: 세포표면에 발현된 리파제의 활성도 측정

[0062] 실시예 3에서 제조된 형질전환균주 XL1-Blue (pTrcYR₂₃₂PL), XL1-Blue (pTrcYR₁₈₁PL), XL1-Blue (pTrcYPL), XL10-Gold (pTrcYR₂₃₂PL), XL10-Gold (pTrcYR₁₈₁PL), XL10-Gold (pTrcYPL), W3110 (pTrcYR₂₃₂PL), W3110 (pTrcYR₁₈₁PL), 및 W3110 (pTrcYPL)을 엠퍼실린(50µg/L)이 첨가된 100 mL의 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 배양액의 흡광도가 600nm에서 0.4일 때 최종농도가 1mM이 되도록 IPTG를 첨가하여 리파제 유전자 발현을 유도하였다. 발현유도 4시간 경과 후, 배양액을 회수하고, 4°C, 6000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 세포를 수득하고, 세포를 PBS로 세척한 후, 리파제의 활성은 *p*-nitrophenyl decanoate를 기질(substrate)로 사용하여, 생성물의 발색정도를 분광광도계로 측정하였다 (Lee SH, *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 90:223, 2005). 10 mM *p*-nitrophenyl decanoate를 acetonitrile에 용해시킨 용액, 에탄올, 50mM Tris-HCl (pH 8.0)를 각각 1:4:95 부피비율로 섞어서 기질 용액을 제조하였다. 리파제가 발현된 세포에 3 mL의 기질 용액을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후, 0.5mM EDTA를 2µL 첨가하여 반응을 종결하였다. 최종적으로 리파제 활성은 405nm 파장에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 그 결과, XL10-Gold (pTrcYPL)와 W3110 (pTrcYPL)는 리파제 발현을 유도 한 후, 세포성장이 저해되면서 세포 용해(cell lysis)로 인해 더 이상 실험을 수행할 수 없었다. 또한, XL1-Blue (pTrcYPL)는 세포성장에는 문제가 없지만, 세포표면에 발현되는 리파제가 매우 약함을 알 수 있었다 (표 1).

[0063] 반면, *viaT* 유전자 단편을 형질전환 모체로 사용한, 형질전환균주 XL1-Blue (pTrcYR₂₃₂PL), XL1-Blue (pTrcYR₁₈₁PL), XL10-Gold (pTrcYR₂₃₂PL), XL10-Gold (pTrcYR₁₈₁PL), W3110 (pTrcYR₂₃₂PL), 및 W3110 (pTrcYR₁₈₁PL)들은 전체 *viaT* 유전자를 모체(pTrcY)로 사용한 것에 비해 훨씬 리파제 활성이 높음을 보였다. 세포 표면 발현 균주 중에서 XL10-Gold가 가장 좋은 것으로 나타났으며, 제작된 모체 중에서 YiaTR232가 가장 효율적으로 안정하게 리파제를 세포표면에 전사시킴을 알 수 있었다.

[0064] 또한, 본 발명에서 제작된 시스템이 기존에 보고된 세포표면 발현시스템에 사용된 OprF 및 FadL의 모체로 형질 전환된 균주 XL1-Blue (pTrcOprFPL), XL1-Blue (pTrcFadLPL), XL10-Gold (pTrcOprFPL), XL10-Gold (pTrcFadLPL), W3110 (pTrcOprFPL), 및 W3110 (pTrcFadLPL)에 비해 훨씬 효율적으로 리파제를 발현시킴을 알 수 있었다.

표 1

[0065] 리파제가 표면발현된 재조합 균주의 리파제 활성

균주명	리파제특이활성(U/mg동결건조세포)	레퍼런스
XL1-Blue	0	

XL1-Blue (pTrcYR ₂₃₂ PL)	4340 ± 121	
XL1-Blue (pTrcYR ₁₈₁ PL)	177 ± 9	
XL1-Blue (pTrcYPL)	18 ± 2.83	
XL1-Blue (pTrcOprFPL)	206 ± 18	Lee et al., 2005
XL1-Blue (pTrcFadLPL)	240 ± 17	Lee et al., 2004
XL10-Gold	0	
XL10-Gold (pTrcYR ₂₃₂ PL)	7440 ± 277	
XL10-Gold (pTrcYR ₁₈₁ PL)	3230 ± 121	
XL10-Gold (pTrcYPL)	Cell lysis	
XL10-Gold (pTrcOprFPL)	378 ± 35	Lee et al., 2005
XL10-Gold (pTrcFadLPL)	243 ± 33	Lee et al., 2004
W3110	0	
W3110 (pTrcYR ₂₃₂ PL)	2427 ± 92	
W3110 (pTrcYR ₁₈₁ PL)	767 ± 27	
W3110 (pTrcYPL)	Cell lysis	
W3110 (pTrcOprFPL)	Cell lysis	Lee et al., 2005
W3110 (pTrcFadLPL)	176 ± 38	Lee et al., 2004

[0066] 실시예 5: 고체 평판 위에서의 세포표면에 발현된 리파제의 활성 확인

[0067] 대장균 세포표면 발현된 리파제가 활성을 가지는지 여부를 확인 하기 위해서, 실시예 3에서 제조된 형질전환균주 XL1-Blue (pTrcYR₂₃₂PL), XL1-Blue (pTrcYR₁₈₁PL), XL10-Gold (pTrcYR₂₃₂PL), XL10-Gold (pTrcYR₁₈₁PL), W3110 (pTrcYR₂₃₂PL), 및 W3110 (pTrcYR₁₈₁PL)을 엠피실린(50µg/L), 1 mM IPTG과 트리뷰티린(1% v/v)이 첨가된 고체 LB 평판배지에서 배양하였다. 하지만, 형질전환균주 XL1-Blue (pTrcYPL), XL10-Gold (pTrcYPL), W3110 (pTrcYPL) 들은 세포 용해 및 리파제 활성이 낮은 이유로 더 이상 추가 실험을 진행하지 않았다. 20시간 경과 후, 리파제 활성으로 인하여 배지에 투명한 구역(clear zone)가 생성되었다 (도 3). 대조균 XL1-Blue (pTrcYE)는 세포 주위에 투명한 구역이 생성되지 않았다.

[0068] 실시예 6: Western blot 실험을 통한 외래 단백질 리파제의 세포표면 발현 확인

[0069] 외래 단백질 리파제가 세포 표면에 정확히 위치하는지를 확인하기 위하여, 세포의 외막 단백질을 분리하여 FLAG 꼬리를 인식하는 항체를 이용하여 Western blot 분석을 수행하였다. 실시예 3에서 제조된 형질전환균주 XL1-Blue (pTrcYR₂₃₂PLFG), XL1-Blue (pTrcYR₁₈₁PLFG), XL10-Gold (pTrcYR₂₃₂PLFG), XL10-Gold (pTrcYR₁₈₁PLFG), W3110 (pTrcYR₂₃₂PLFG), 및 W3110 (pTrcYR₁₈₁PLFG)을 엠피실린(50µg/L)이 첨가된 100 mL의 LB 액체배지에 접종하여 37°C에서 배양하였다. 분광광도계로 600nm 파장에서 측정된 흡광도가 0.4일 때 1 mM IPTG를 첨가하여 리파제 유전자 발현을 유도하였다. 발현유도 4시간 경과 후, 4°C, 6000 rpm에서 5분 동안 배양액을 원심분리 하여 세포를 수득하고, 실시예 1과 같은 방법으로 외막 단백질을 분리하였다. 이들 외막 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분자량 크기별로 분리한 후, PVDF 막에 이동시켜서 3 wt% BSA가 첨가된 PBS용액에 1:500의 비율로 1차 항체인 mouse anti-FLAG 항체 (monoclonal ANTI-FLAG M2; Sigma-Aldrich, Inc., cat. F1804)를 첨가한 후, 실온 (room temperature)에서 1시간 배양하였다. PBS용액으로 5번 세척한 후, horseradish peroxidase가 컨쥬게이트된 2차 항체 goat anti-mouse IgG (Invitrogen Corp., cat. AMI3404)를 1:20,000의 비율로 첨가해준 후, 실온에서 1시간 배양하였다. 반응하지 않은 2차 항체를 제거하기 위하여, PBS용액으로 5번 세척한 후, ECL(enhanced chemiluminescence) 키트(GE Healthcare) 용액의 화학반응을 통하여 발생하는 빛을 필름에 노출하여 사진을 획득하였다. 그 결과, 정확히 리파제가 세포표면에 발현된 것을 확인하였다 (도 4).

[0070] 실시예 7: pH 변화에 따른 세포표면에 발현된 리파제 활성의 영향

[0071] 실시예 3에서 제작된 형질전환균주 중에서 리파아제의 효율이 가장 우수한 XL10-Gold (pTrcYR₂₃₂PL)를 이용하여 외부의 pH 변화에 따른 세포표면에 발현된 리파제 활성의 영향을 조사하였다. 실시예 4과 동일한 방법으로 수득한 세포를 동일한 온도 (37°C)에서 다양한 pH값의 50 mM Tris-HCl (pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12)가 첨가된

기질용액을 사용하여 리파제 활성을 실시예 4에 나타낸 것과 동일한 방법으로 측정하였다. 도 5에서 Y축의 상대적 활성도(relative activity)는 37℃, pH 8.0에서 리파제 활성도를 100%로 할 때의 상대적인 값을 의미한다. 그 결과, pH 10에서 가장 높은 리파제 활성을 나타내었다 (도 5).

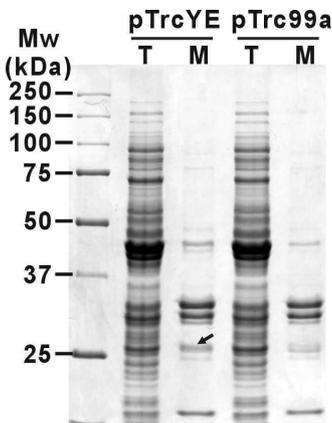
[0072] 실시예 8: 온도 변화에 따른 세포표면에 발현된 리파제 활성의 영향

[0073] 실시예 3에서 제작된 형질전환균주 중에서 리파아제 효율이 가장 우수한 XL10-Gold (pTrcYR₂₃₂PL)를 이용하여 외부의 온도 변화에 따른 세포표면에 발현된 리파제 활성의 영향을 조사하였다. 실시예 4과 동일한 방법으로 수득한 세포를 동일한 pH 8 조건에서 다양한 온도 16℃, 30℃, 37℃, 40℃, 45℃, 55℃, 65℃, 75℃에서 리파제 활성을 실시예 4에 나타낸 것과 동일한 방법으로 측정하였다. 도 6에서 Y축의 상대적 활성도(relative activity)는 37℃, pH 8.0에서 리파제 활성도를 100%로 할 때의 상대적인 값을 의미한다. 그 결과, 온도 40℃에서 가장 높은 리파제 활성을 나타내었다 (도 6).

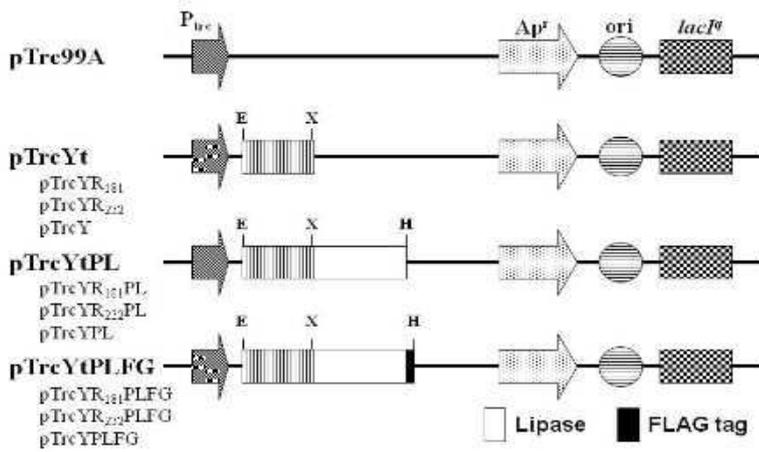
[0074] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

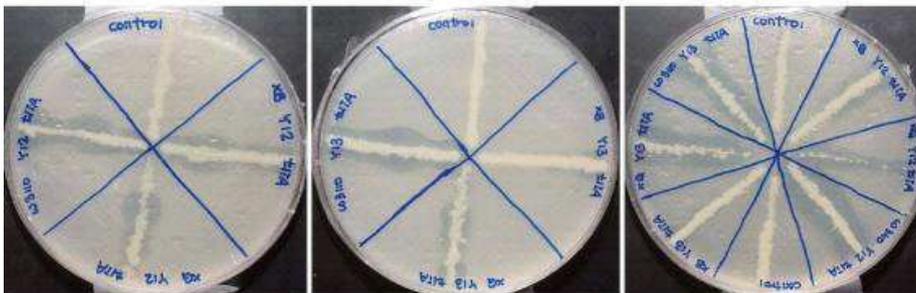
도면1



도면2



도면3



pTrcYR₂₃₂PL

pTrcYR₁₈₁PL

pTrcYR₁₈₁PL
pTrcYR₂₃₂PL

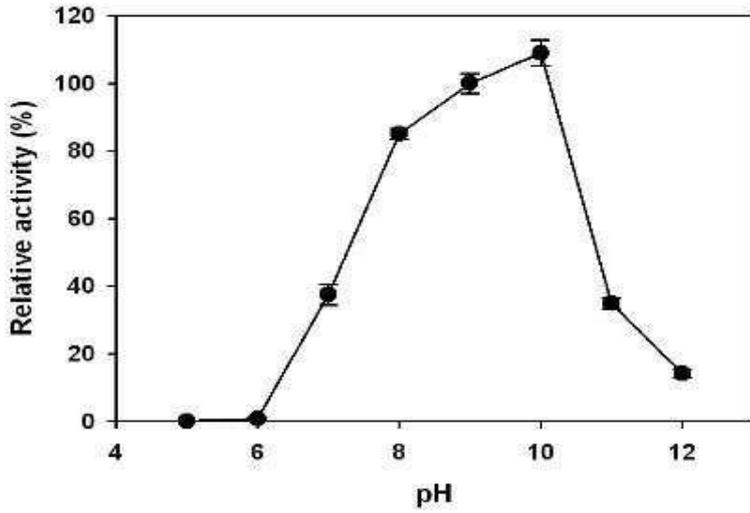
- Plasmids- Control, pTrcYE; Y12tliA, pTrcYR₂₃₂PL; Y13tliA, pTrcYR₁₈₁PL
- Hosts- XB, XL1-Blue; XG, XL10-Gold; W3110

도면4

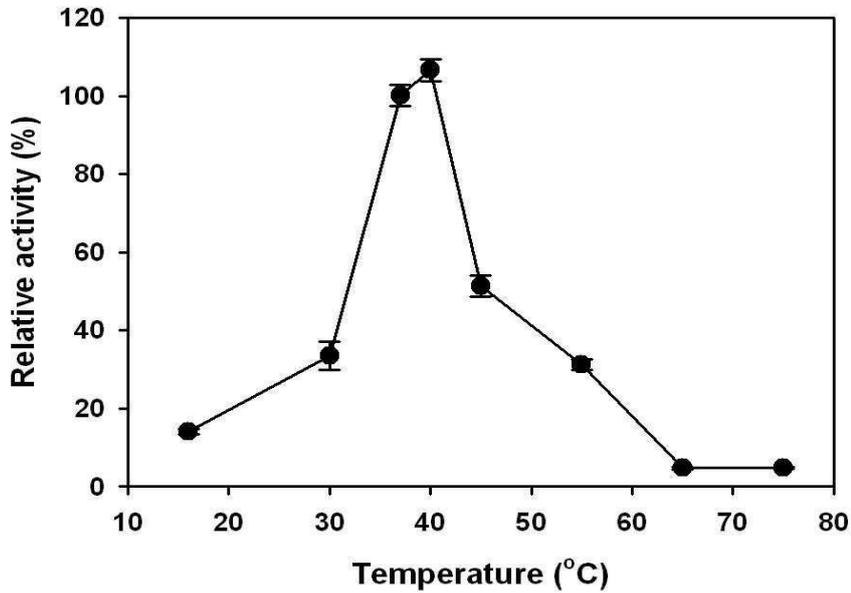


XB: XL1-Blue
 XG: XL10-Gold
 W: W3110

도면5



도면6



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION OF DONGYANG UNIVERSITY
- <120> Method for Surface Expressing of Target Protein Using E. coli
YiaT Protein
- <130> P11-B142
- <160> 9
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1

<211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 1
 ggaattcatg ttaattaatc gcaatattgt g 31
 <210> 2
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 cccaagcttt taaaaacgcc agctcacccc g 31
 <210> 3
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 gctctagaac gatcaatcat cgggctgtcg gt 32
 <210> 4
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 gctctagaac gacgggactc actctctgaa at 32
 <210> 5
 <211> 27
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5

gctctagaaa aacgccagct caccocg 27

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gctctagaat gcttcatgcc ttcgaacgc 29

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

cccaagcttt caactgatca gcacacc 27

<210> 8

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

cccaagcttt tacttgtcgt catcgtcctt gtagtactg atcagcacac c 51

<210> 9

<211> 246

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 9

Met Leu Ile Asn Arg Asn Ile Val Ala Leu Phe Ala Leu Pro Phe Met

1 5 10 15

Ala Ser Ala Thr Ala Ser Glu Leu Ser Ile Gly Ala Gly Ala Ala Tyr

20 25 30

Asn Glu Ser Pro Tyr Arg Gly Tyr Asn Glu Asn Thr Lys Ala Ile Pro

35 40 45

Leu Ile Ser Tyr Glu Gly Asp Thr Phe Tyr Val Arg Gln Thr Thr Leu
 50 55 60
 Gly Phe Ile Leu Ser Gln Ser Glu Lys Asn Glu Leu Ser Leu Thr Ala
 65 70 75 80
 Ser Trp Met Pro Leu Glu Phe Asp Pro Thr Asp Asn Asp Asp Tyr Ala
 85 90 95
 Met Gln Gln Leu Asp Lys Arg Asp Ser Thr Ala Met Ala Gly Val Ala
 100 105 110
 Trp Tyr His His Glu Arg Trp Gly Thr Val Lys Ala Ser Ala Ala Ala
 115 120 125
 Asp Val Leu Asp Asn Ser Asn Gly Trp Val Gly Glu Leu Ser Val Phe
 130 135 140
 His Lys Met Gln Ile Gly Arg Leu Ser Leu Thr Pro Ala Leu Gly Val
 145 150 155 160
 Leu Tyr Tyr Asp Glu Asn Phe Ser Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ile Ser Glu
 165 170 175
 Ser Glu Ser Arg Arg Ser Gly Leu Ala Ser Tyr Ser Ala Gln Asp Ala
 180 185 190
 Trp Val Pro Tyr Val Ser Leu Thr Ala Lys Tyr Pro Ile Gly Glu His
 195 200 205
 Val Val Leu Met Ala Ser Ala Gly Tyr Ser Glu Leu Pro Glu Glu Ile
 210 215 220
 Thr Asp Ser Pro Met Ile Asp Arg Asn Glu Ser Phe Thr Phe Val Thr
 225 230 235 240
 Gly Val Ser Trp Arg Phe

245