(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 14/41 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0107600
(43) 공개일자 2006년10월16일

(21) 출원번호 10-2005-0029771
(22) 출원일자 2005년04월11일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 신정섭
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학
황국정
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학
조성현
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학
옥승한
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학
반성철
서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학

(74) 대리인 김선애

심사청구 : 있음

(54) 이끼에서 분리된 세포독소 단백질 및 그의 제조방법

요약

본 발명은 이끼(*Physcomitrella patens*)에서 분리된 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 유전자, 상기 유전자 염기서열에 의해 코딩되는 세포독소 단백질 및 상기 세포독소 단백질을 제조하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 공지의 방법에 따라 세포독소로 사용되어 의약품 및 식물추출물로 제조된 환경친화적 농약 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도

도 2a

색인어

세포독소, 단백질, 사이토라이신, 이끼

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 이끼(*Physcomitrella patens*)의 프로토네마(protonema)와 개메토포어(gametophore)에서 발현되는 단백질 차이를 보여주는 2차원 전기영동 사진.

도 2a 및 도 2b는 본 발명에 의한 피스코미트린(*physcomitrin*) 유전자의 cDNA 염기서열 및 피스코미트린(physcomitrin) 단백질의 아미노산 서열을 보여주는 도면.

도 3a는 본 발명에 의한 피스코미트린(physcomitrin) 아미노산 서열을 다른 사이토라이신(cytolysin) 아미노산 서열들과 비교한 도면.

도 3b는 본 발명에 의한 피스코미트린의 네이버조이닝(Neighbor-joining) 방식에 의한 분석한 계통분석도.

도 4a는 본 발명에 의한 피스코미트린의 서던 분석 결과를 보여주는 도면.

도 4b는 본 발명에 의한 피스코미트린의 RNA가 개메토포어 조직에서만 발현되는 것을 보여주는 도면.

도 4c는 본 발명에 의한 피스코미트린이 성숙한 개메토포어 조직에서 발현이 증가되는 것을 보여주는 도면.

도 4d는 본 발명에 의한 피스코미트린의 유전자 구조를 보여주는 도면.

도 5a는 본 발명에 의한 재조합 피스코미트린(physcomitrin) 단백질의 발현 유도를 보여주는 도면.

도 5b는 본 발명에 의한 재조합 피스코미트린(physcomitrin) 단백질을 확인하기 위해 히스-프로브(His-probe)를 이용하여 웨스턴 분석을 한 결과를 보여주는 도면.

도 5c는 본 발명에 의한 재조합 피스코미트린(physcomitrin) 단백질을 Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 정제한 결과를 보여주는 도면.

도 6은 본 발명에 의한 피스코미트린(physcomitrin) 단백질이 이끼 조직에 존재하는 지 확인하기 위해 실시한 ELISA 분석 결과를 보여주는 그래프.

도 7a는 본 발명에 의한 재조합 피스코미트린(physcomitrin) 단백질의 용혈분석(hemolysis assay) 결과를 보여주는 그래프.

도 7b는 본 발명에 의한 재조합 피스코미트린(physcomitrin) 단백질의 용혈분석(hemolysis assay) 결과를 보여주는 사진.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 이끼에서 분리된 세포독소 단백질 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 이끼에서 분리된 식물 사이토라이신 단백질 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

사이토라이신(cytolysin) 단백질은 주로 바다의 말미잘에서 발견되며, 그 밖에도 미생물에서 인간에 이르기까지 많은 생물에서 발견되고 있다. 그 크기나 구조, 작용기전들도 다양하다. 말미잘에서 발견된 사이토라이신들은 그 크기에 따라 여러 가지로 구분되는데, 항히스타민 활성(antihistamine activity)을 갖는 5~8 kDa 펩티드, 세포표면에 작은 구멍을 형성하는 20 kDa 정도의 펩티드, 포스포리파제(phospholipase) A2 활성을 갖는 30-40 kDa 정도의 펩티드, 그리고 80 kDa의 메트리듐 세닐의 사이토라이신(*Metridium senile* cytolysin) 등으로 분류된다.

그 중에서 그룹 II(두번째 펩티드 그룹)의 사이토라이신들이 가장 많이 연구되어져 있는데, 이들은 염기성의 작은 구멍을 형성하는 단백질들로써, 액티노포린(actinoporin)이라고도 불린다. 이들이 만드는 구멍은 양이온만 선택적으로 통과시키는 통로로써 대략 2 nm 정도의 지름을 갖는다. 구멍을 만드는 기작은 크게 2단계로 나누어지는데, 먼저 수용성의 단량체들이 세포막에 달라붙고, 다량의 복합체가 되면서 구멍을 형성한다. 이 구멍을 통하여 Na+ , K+ , Ca2+ 이나 작은 물질들이 무작위로 유입되면서 세포가 터지게 된다. 따라서 그룹 II의 사이토라이신들은 세포에 매우 치명적이어서, 혈소판의 응집, 적혈구 파괴, 폐부종, 심장마비 등을 유발한다.

현재까지 식물에서 발견된 사이토라이신은 브라질 열대수목에서 발견된 엔테롤로빈(enterolobin) 밖에 없으며, 쥐에 주사로 주입시켰을 때 염증반응을 보인 바 있다(참고문헌 : Fontes,W., Sousa,M.V., Aragao,J.B. and Morhy,L. (1997) Determination of the amino acid sequence of the plant cytolysin enterolobin. Arch. Biochem. Biophys., 347, 201~207.).

한편, 이와 같은 세포독소는 여러 가지 용도로 사용될 수 있는데, 특히 세포독소제가 특수하거나 특수균주 또는 세포형태에 따라 특수하게 변이될 수 있다면 그 세포독소제는 다수의 상이한 형태의 세포를 포함하는 배양균 또는 조직으로부터 특수한 균주 또는 특수 세포형태를 제거하는 데 유용하게 사용될 수 있다. 예를 들면 악성종양의 경우에 보통 또는 건강한 세포를 죽이지 않고 악성종양 세포를 특수하게 제거시키는 방법에 이용될 수 있다. 따라서, 신규한 세포독소 단백질에 대한 요구가 끊임없이 존재하여 왔다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이끼는 가장 오래된 육상식물 중의 하나로서 지구상의 각종 다양한 환경 속에서 살아가고 있다. 피스코미트렐라 파텐스(*Physcomitrella patens*)는 자웅동주의 이끼로써 생활사를 마치기 위한 배양조건이 간단하고, 기내배양이 용이하며, 생활사의 대부분을 차지하는 배우체(gametophyte) 시기가 반수체로 이루어져 있다.

또한 유전자의 기능을 연구하기 위해 필요한, 유전자의 결손(knockout)이 매우 용이한 식물로써 알려져 있어 새로운 모델식물로써 주목을 받고 있다. 피스코미트렐라 파텐스(*P. patens*)의 배우체(gametophyte) 시기는 가는 실 모양의 어린 프로토네마(protonema) 시기와 잎 형태의 성숙한 개메토포어(gametophore) 시기로 크게 두 가지 나뉜다.

본 발명자들은 게메토포어(gametophore) 시기에만 발현하는 새로운 식물 사이토라이신 단백질을 확인하여 피스코미트린(physcomitrin)으로 명명하였으며 그 기능을 분석하여 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 이끼에서 분리된 신규한 세포독소 유전자 및 이 유전자 염기서열에 의해 코딩되는 세포독소 단백질을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 상기 이끼에서 분리된 세포독소 단백질을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 분리된 유전자를 제공한다.

본 발명은 또한 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 재조합벡터 및 상기 재조합벡터에 의해 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

나아가, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 세포독소 단백질을 제공한다. 상기 단백질은 피스코미트렐라 파텐스(*Physcomitrella patens*)에서 분리된 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 크로마토그래피를 이용하여 분리하는 것을 특징으로 하는 세포독소 단백질의 제조방법을 제공한다.

본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 세포독소 단백질에 특이적으로 결합되는 항체를 제공한다.

본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 DNA단편을 증폭하기 위한 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 프라이머를 제공한다.

이하, 본 발명의 구성에 대해 상세히 설명한다. 본 명세서에서 본 발명에 의한 피스코미트린의 영문표기와 관련하여 이탤릭체는 유전자를 보통글씨체는 단백질을 나타낸다.

1) 피스코미트린(physcomitrin)의 추출 분리

본 발명자들은 피스코미트렐라(*P. patens)*의 프로토네마(protonema)와 개메토포어(gametophore) 조직에서 차별적으로 발현하는 단백질을 찾기 위하여, pH 4-7의 조건으로 2-차원 겔 전기영동(2-dimensional gel electrophoresis)을 실시하였고, 1000개 이상의 단백질들을 분리하였다. 그 중에서 프로토네마와 개메토포어에서 차별적으로 발현하는 25개의 단백질을 확인하였다. 상기 단백질 중 하나인 G12를 추출한 후, LC/MS/MS를 이용하여 단백질 조각의 아미노산 서열(INAQEALLFSAR)을 확인하였다(도 1). 피스코미트렐라 EST 데이터베이스(Translated Physcomitrella EST database ; http://moss.nibb.ac.jp./blast/blast.html)를 검색하여 이 단백질이 사이토라이신의 일종이라는 것을 확인하였고, 피스코미트린(physcomitrin ; Physcomitrella protein toxin)이라고 명명하였다.

2) 피스코미트린(*physcomitrin)* 유전자 분석

피스코미트린(*physcomitrin)*의 cDNA 유전자 염기서열을 확인하여, GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록하였다(Accession number, AY762377). 피스코미트린의 전체 유전자 크기는 884 bp이고 178개의 아미노산의 정보를 담고 있다. 피스코미트린(physcomitrin) 단백질은 대략 20.5 kDa 정도이고 등전점은 4.91 정도인 것으로 확인되었다.

다른 사이토라이신(cytolysin) 단백질들과 비교한 결과, 필로디스커스 세모니(*Phyllodiscus semoni)*의 PsTX-20A와 42%, 사가티아 로제아(*Sagartia rosea)*의 사이토라이신 I 전구체(cytolysin I precursor)와 40%, 액티니아 에퀴나(*Actinia equina)*의 구멍형성독소(pore-forming toxin)와 38%, 스티코닥틸라 헬리안서스(*Stichodactyla helianthus)*의 스티코라이신(sticholysin)과 37%의 유사성이 있었다(도 3a)

본 발명에 의한 피스코미트린에서도 알려진 사이토라이신들에서 공통적으로 발견되는 모티브(motif)인 WYSNWWN 아미노산 서열이 발견되었다. 그러나 에퀴나톡신(equinatoxin)의 112번째 아미노산 트립토판(tryptophan)이 피스코미트린(physcomitrin)에서는 라이신(lysine)으로 교체되어 있다. 유전자의 계통수를 분석해 본 결과 본 발명에 의한 피스코미트린은 액티노포린(actinoporin)과는 거리가 있고, PsTX-20A와 더 가까운 관계가 있었다(도 3b). 게놈 DNA 유전자를 확보하여 구조를 분석해 본 결과, 3개의 인트론을 가지고 있었다(도 4d). 또한 서던(Southern) 분석을 통하여 유전자가 하나만 존재하는 것으로 드러났다(도 4a).

3) 개메토포어(gametophore) 조직 특이적인 유전자 발현

노던분석 결과, 피스코미트린(*physcomitrin)*의 RNA는 개메토포어(gametophore; 도 4b에서 G로 표시됨) 조직에서만 발현되었고 프로토네마(protonema; 도 4b에서 P로 표시됨) 조직에서는 발현되지 않았다(도 4b). 또한 발달단계에 따른 발현양상을 조사해 본 결과, 피스코미트린(*physcomitrin)*은 프로토네마 시기에는 전혀 발현되지 않았고, 개메토포어 조직에서는 발달단계에 따라 점차적으로 발현량이 많아졌다. 즉, 초기 개메토포어 조직에서의 발현량을 기준으로 그 발현량이 점차 증가하여 성숙한 개메토포어 조직에서 최대에 이르렀다(도 4c). 도 4c에서 P15, G20, G25, G30, Gm은 각각 15일의 프로토네마, 20일의 개메토포어, 25일의 개메토포어, 30일의 개메토포어, 완전하게 성숙된 개메토포어를 나타낸다. 환경요소에 의해 발현 양상이 변화하는지를 알아보기 위하여, ABA, BA, IAA, CuSO4, NaCl, CdCl2를 각각 처리한 프로토네마에서 노던분석을 실시한 결과 피스코미트린이 발현되지 않음을 확인하였다.

4) 대장균(*E. coli)*에서 피스코미트린(physcomitrin) 단백질 생산

재조합 피스코미트린(physcomitrin) 단백질을 얻기 위하여 피스코미트린(*physcomitrin)*의 오픈리딩프레임(open reading frame)을 pET-32c(+) 벡터에 삽입한 후, 대장균(*E. coli* BL21)에 형질전환을 하였다. 발현되는 단백질은 히스-태크(His-tag)가 C-말단(C-terminal)에서 발현되는 융합(fusion) 단백질이 되도록 고안하였다.

IPTG를 이용하여 재조합 단백질의 발현을 유도한지 3시간 후에 단백질의 양이 최대에 이르는 것을 확인하였고 분자량은 약 32.5 kDa이었다(도 5a, lane 4). 발현된 단백질들은 히스-프로브 토끼 다클론(His-probe rabbit polyclonal) 항체를 사용하여서 확인하였다(도 5b).

피스코미트린 융합단백질(physcomitrin fusion protein)은 Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다(도 5c). 정제된 피스코미트린-히스태크 융합단백질(physcomitrin-His-tag fusion protein)에서 히스-태그(His-tag)를 제거하기 위하여, 엔테로키나제(enterokinase)를 처리하였다(도 5c, lane 2). 그리하여, 21 kDa의 피스코미트린 재조합 단백질을 얻을 수 있었다(도 5c, lane 3-5).

5) 피스코미트린의 용혈활성(physcomitrin의 hemolytic activity)

피스코미트린(physcomitrin)이 이끼의 조직에 존재하는지를 확인하기 위하여, ELISA를 실시하였다. 그 결과 개메토포어 조직에서 추출한 전체 단백질 내에 피스코미트린이 존재하고 있음을 확인하였다(도 6). 그러나 프로토네마 조직에서는 발견되지 않았다.

본 발명에 의한 피스코미트린 단백질의 생화학적 활성을 확인하기 위하여, 용혈분석(hemolysis assay)을 실시하였다. 용혈분석(hemolysis assay)은 독소가 작용하여 적혈구가 용혈될 때, 그 내부의 헤모글로빈(hemoglobin)이 용출되어 나오는데 그 농도를 측정하여서 활성을 측정하는 방법이다.

돼지의 적혈구를 추출하여 용혈활성이 있는지를 측정하여 본 결과, 개메토포어의 전체 단백질과 재조합 피스코미트린은 용혈활성을 보였고, 767.8 ng/μl, 640.8 ng/μl에서 50%의 활성을 보였다(도 7a의 점그래프 및 도 7b의 용혈사진 참조).

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1. 이끼 단백질의 추출]

이끼(*Physcomitrella patens*)를 액체질소에서 마쇄하고 10% (w/v) TCA와 0.07% (w/v) DTT를 포함한 아세톤으로 단백질을 침전시킨 후 원심분리하였다. 추출한 단백질은 0.07% (w/v) DTT, 1 mM (w/v) PMSF, 2 mM EDTA로 씻어서 색소를 모두 제거하였고, 9.9 M urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPA, 100 mM DTT, 2% IPG buffer에 녹였다.

[실시예 2. 추출된 단백질의 2D 전기영동(electrophoresis)]

IPG 스트립(strip)을 재수화버퍼(rehydration buffer; 9 M urea, 0.5% CHAPS, 2% IPG buffer, pH 4-7, 60 mM DTT, 0.003% bromophenol blue)에 넣어 재수화시킨 후, 등전점에 따른 분리를 실시하였다. 등전점 분리는 5시간 동안 재수화, 30 V에서 7시간, 200 V에서 30분, 500 V에서 1분, 8000 V까지 단계적으로 증가시키면서 45 분, 8000 V에서 9시간 동안 하였다.

이 스트립(strip)을 평형(equilibration) 용액 I (6 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% glycerol, 2% SDS, 1% DTT, 0.001% bromophenol blue)과 용액 II (6 M urea, 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 30% glycerol, 2% SDS, 2.5% iodoacetamide, 0.001% bromophenol blue)에 각각 차례로 20분씩 처리하였다.

2-차원 겔 전기영동은 12.5% SDS-PAGE로 실시하였고 질산은(silver nitrate)으로 염색한 후, 프로토네마와 개메토포어에서 차별적으로 발현하는 단백질 중 하나인 G12를 추출하였다(도 1).

상기 단백질을 LC/MS/MS를 이용하여 단백질 펩티드 조각의 아미노산 서열을 분석하였다. 분석되어진 아미노산 서열은 Physcobase (http://moss.nibb.ac.jp./blast/blast.html)를 통하여 해당하는 단백질을 검색하였다.

[실시예 3. 피스코미트린(*physcomitrin)* 유전자의 동정]

피스코미트렐라(*Physcomitrella patens)* cDNA 클론(GenBank accession number: BJ176008)은 일본의 Tadasu Shin-I (National Institue of Genetics, Japan)에게서 분양받았다. 전체 염기서열을 확인하였고, 5'-RACE법과 3'-RACE법을 이용하여 양 말단을 최종 확인하였다. 다중서열정렬(multiple sequence alignment)은 네이버조이닝(Neighbor-joining) 방법으로 실시하였다.

[실시예 4. 서던(Southern) 분석과 노던(Northern) 분석]

게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하여 15 μg을 *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III로 각각 잘랐다. 아가로즈겔(agarose gel)에서 전기영동한 후, 니트로셀룰로오스막(nitrocellulose membrane)에 흡착시켰다. RNA는 포름알데히드(formaldehyde)가 포함된 아가로즈겔에서 전기영동한 후 역시 니크로셀룰로오스막에 흡착시켰다.

이들은 dCTP-비오틴 표지 전장 cDNA 프로브(dCTP-biotin labeled full length cDNA probe)를 이용하여 67℃에서 혼성화(hybridization) 시켰고, 서던-스타 키트(Southern-Star kit; Applied Biosystems, USA)를 이용하여 검출(detection) 하였다. 그 결과를 도 4a - 4d에 나타내었다.

[실시예 5. 대장균(*E. coli*)에서의 재조합 피스코미트린(physcomitrin) 단백질의 생산]

피스코미트린(*physcomitrin*)의 오픈리딩프레임(open reading frame) 부분을 증폭하기 위하여 5'-CATGCCATGGGGATGGCCGAAGCAATTATT-3'(서열번호 3)과 5'-CGGGATCCTAAGCC TTCTCAGTTCCAC-3'(서열번호 4)의 프라이머(primer)를 이용하였다.

PCR은 94도 1분, 55도 1분, 72도 1분의 프로그램을 30회 반복한 후 72도에서 7분간 반응을 계속하였다. 생산된 PCR 산물은 *Nco*I과 *Bam*HI으로 절단된 후, pET-32c(+) 벡터에 삽입되었다. DNA 시퀀싱(sequencing)으로 염기서열을 확인한 후, 이 벡터를 BL21 (DE3) pLysS *E. coli*에 형질전환하였다. 발현되는 단백질은 히스-태그(His-tag)가 C-말단(C-terminal)에서 발현되는 융합(fusion) 단백질이 되도록 고안하였다. 도 4a에 재조합 피스코미트린(physcomitrin) 단백질의 발현 유도 양상이 나타나 있다. 발현된 단백질들은 히스-프로브 토끼 다클론항체(His-probe rabbit polyclonal antibody)를 사용하여 확인하였다(도 5b의 웨스턴 분석 결과 참조).

피스코미트린 융합단백질은 Ni-NTA 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다(도 5c). 정제된 피스코미트린-히스태그 융합 단백질(physcomitrin-His-tag fusion protein)에서 히스-태그를 제거하기 위하여, 엔테로키나제(enterokinase)를 처리하여(도 5c의 lane 2), 21 kDa의 피스코미트린 재조합 단백질을 얻을 수 있었다(도 5c의 lane 3-5).

[실시예 6. 피스코미트린(physcomirin)의 항체 생산]

융합 단백질의 히스티딘 태그(histidine tag)는 엔테로키나제(enterokinase)를 이용하여 잘랐고, SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 아크릴아미드젤(acrylamide gel)에서 직접 분리된 단백질은 쥐에 주입시킬 항원으로 사용되었다.

6-8 주 정도 성장한 쥐에 2.5 mg의 수산화알루미늄겔(aluminium hydroxide gel)과 혼합된 100 μg의 항원을 주입하였고, 11 일째에 다시 이차로 주입하였다. 7일 후에 혈액을 받아서 원심분리한 후 상등액을 추출하였다.

[실시예 7. 효소결합면역흡수분석법(Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay; ELISA)]

상기 실시예에서 생산된 항체 단백질들을 코팅버퍼(coating buffer; 10 mM Na2CO3, 41 mM NaHCO3)에 섞은 후, 플레이트(plate)에서 37도에서 2시간 동안 보관하였다. PBS버퍼(PBS buffer; 11 mM Na2HPO4, 1.3 mM NaH2PO4, 0.15 M NaCl)와 0.05% Tween20을 혼합한 워싱버퍼(washing buffer)로 씻어준 후, 1% BSA가 첨가된 PBS버퍼(PBS buffer)를 블락킹버퍼(blocking buffer)로 플레이트를 처리하였다.

블락킹버퍼(Blocking buffer)에 항체를 1/500로 희석한 후 1시간 동안 37도에서 보관하였다. 워싱버퍼(Washing buffer)로 결합(binding)이 안된 항체를 씻어낸 후, 다시 HRP-conjugated anti-mouse IgG를 1/5000로 블락킹버퍼(blocking buffer)로 희석한 후 37도에서 1시간 동안 보관하였다. 기질인 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine)을 첨가하였고, 인산(phosphoric acid)을 넣어서 반응을 멈추었다. 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 의한 피스코미트린(physcomitrin) 단백질이 개메토포어 조직에서 추출한 전체 단백질 내에서만 존재하고 프로토네마 조직에서는 존재하지 않은 것으로 확인되었다.

[실시예 8. 피스코미트린의 용혈분석(hemolytic assay)]

신선한 돼지의 혈액을 10% EDTA에 섞어서 응고를 방지하였고, 적혈구를 균질하게 풀기 위해, PBS 버퍼를 섞고 원심분리를 하였다. 상등액이 맑게 될 때까지 상기 과정을 반복하였다.

단백질을 0.5%의 적혈구와 섞고 25도에서 4시간 동안 보관하였다. 원심분리를 한 후 상등액으로 용출되어진 헤모글로빈(hemoglobin)의 농도를 540 nm의 파장에서 측정하였다. 그 결과를 도 7a 및 도 7b에 나타냈으며, 도 7b에서 RPP, CEP, CEG는 각각 recombinant protein of physcomitrin, crude extract of protonema, crude extract of gametophore의 약자이며, 상단의 1번에서 7번은 첨가된 단백질의 농도 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 ng/μl를 나타내고, 8번은 무처리 적혈구를 의미한다.

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 이끼의 개메토포어에서 추출한 피스코미트린(physcomitrin) 단백질은 용혈활성을 갖는 세포독소 단백질인 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명은 공지에 방법에 따라 세포독소로 사용되어 의약품 및 식물추출물로 제조된 환경친화적 농약 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 분리된 유전자.

청구항 2.

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 재조합벡터.

청구항 3.

제2항의 재조합벡터에 의해 형질전환된 숙주세포.

청구항 4.

서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 분리된 세포독소 단백질.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 단백질은 피스코미트렐라 파텐스(*Physcomitrella patens*)에서 분리된 것을 특징으로 하는 세포독소 단백질.

청구항 6.

제3항의 숙주세포를 배양하여 크로마토그래피를 이용하여 분리하는 것을 특징으로 하는 제4항의 세포독소 단백질의 제조방법.

청구항 7.

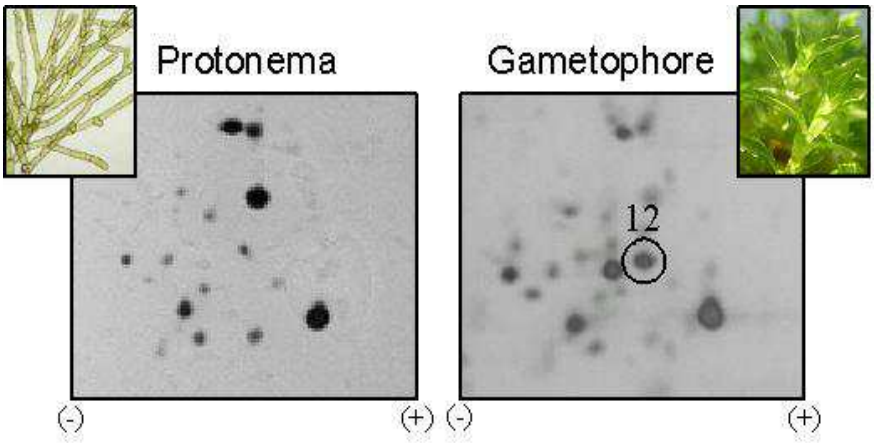
서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 세포독소 단백질에 특이적으로 결합되는 항체.

청구항 8.

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 DNA단편을 증폭하기 위한 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 프라이머.

도면

도면1



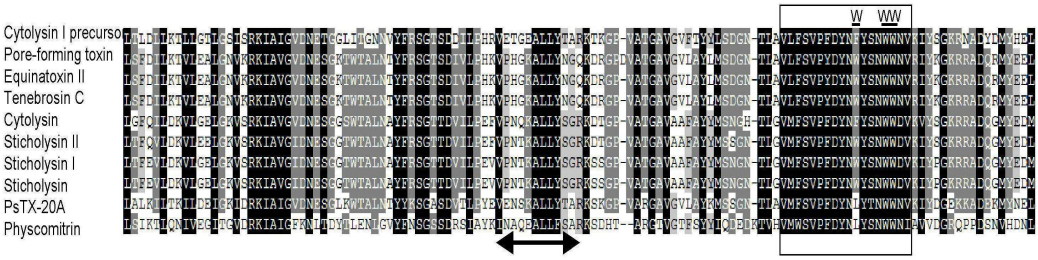
도면2a

atcacgtcactgcatcaatcactgtccgccttgtcgcactacgtaccgagcaaccagttcgtcgctttggcacta
ctgagctatcgatcaataatctctcccgcattgttcctgcaacctcgaaagaaaaccgcaagg**ATG**GCCG
AAGCAATTATTCCAGCTGCTGAGCTCTCAATTAAGACCCTCCAGAACATTG
TGGAGGGGATAACCGGAGTTGATCGAAAGATCGCAATCGGTTTCAAGAAC
CTCACGGACTATACCCTTGAGAACTTGGGGGTATACTTTAACAGTGGGTC
GAGCGATCGGAGCATCGCCTATAAGATTAACGCCCAAGAAGCTCTTCTGT
TCTCTGCGCGCAAGTCGGATCATACTGCCCGCGGTACAGTTGGCACATTC
TCCTACTACATACAGGACGAGGACAAGACGGTCCATGTGATGTGGTCCGT
CCCCTTCGACTACAACTTGTACTCGAATTGGTGGAACATAGCTGTAGTTGA
TGGACGTCAGCCACCCGACTCGAATGTCCATGACAACTTGTACAATGGAT
CTGGTGGGATGCCGTACCCCAACAAACCTGATCAGTATATCAATAACGAA
CAGAAGGGCTTCCACTTGTTTGGGAGCATGACCAACAATGGACAAGCCAC
TATCGAGGTGGAACTGAAGAAGGCT**TAG**agtgccacaagcccccggcaagttgtcccgt
gttcaagaggctttggaaaaagggcctgagatgtttgtacaacttcctcgtagttactgtcacaaaacatgtgct
acgtatagtgaatatttgtaaatgcgggggatctcatggattctccatggatcttcctagacctgtgacatggttgg
ttgaatatgatacattgcccttcccc

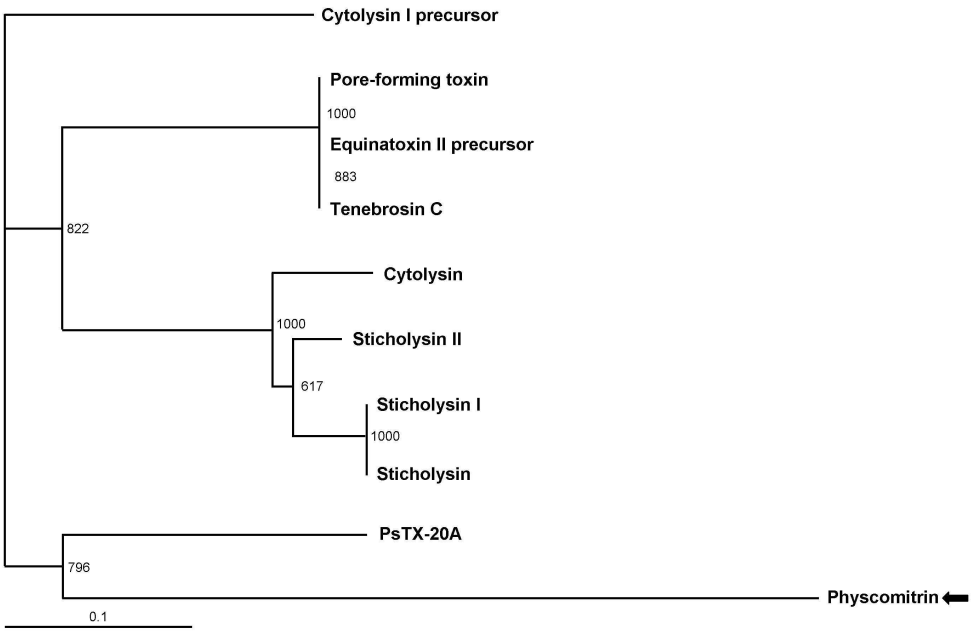
도면2b

MAEAIIPAAELSIKTLQNIVEGITGVDRKIAIGFKNLTDYTLENLGVYFNSGSS
DRSIAYKINAQEALLFSARKSDHTARGTVGTFSYYIQDEDKTVHVMWSVPF
DYNLYSNWWNIAVVDGRQPPDSNVHDNLYNGSGGMPYPNKPDQYINNE
QKGFHLFGSMTNNGQATIEVELKKA-

도면3a



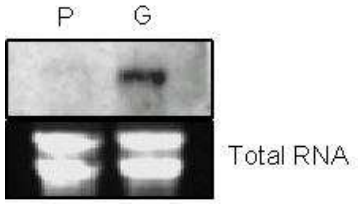
도면3b



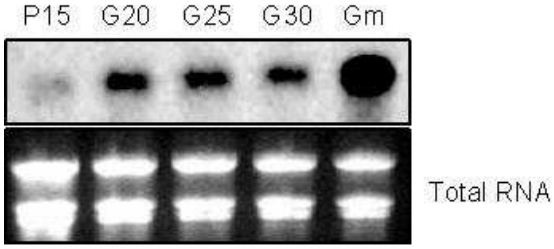
도면4a



도면4b



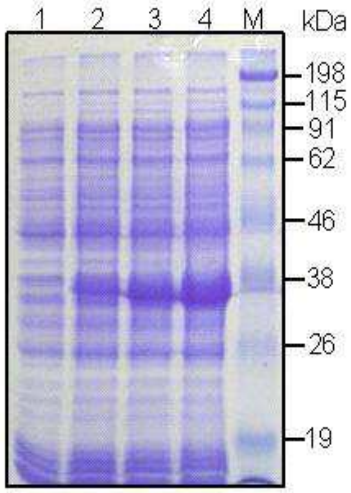
도면4c



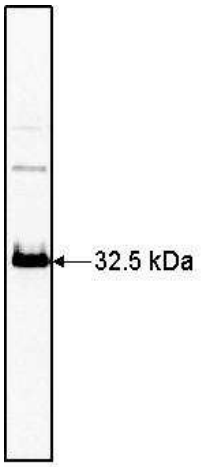
도면4d



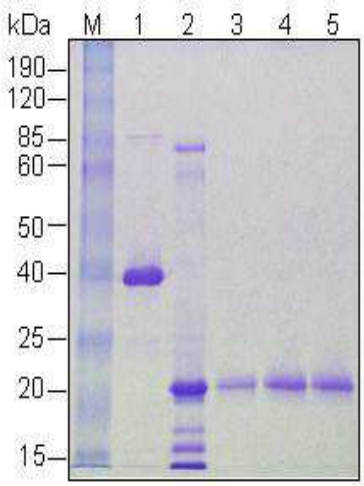
도면5a



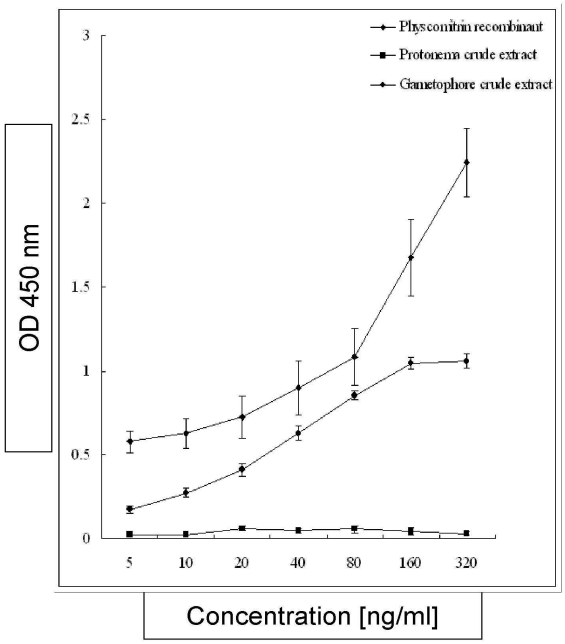
도면5b



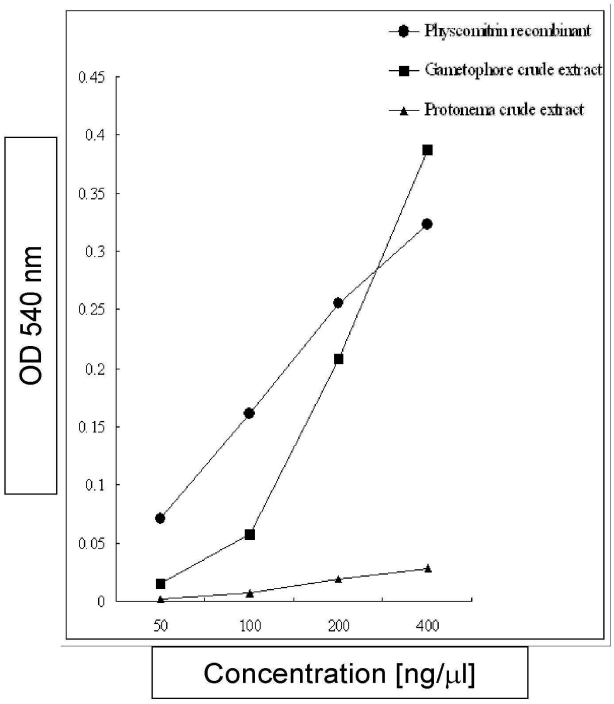
도면5c



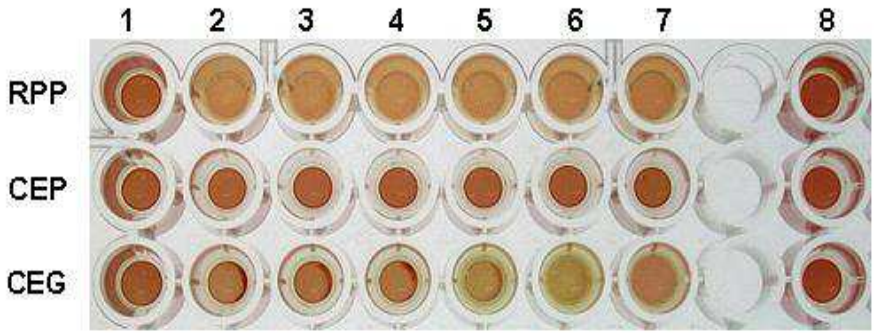
도면6



도면7a



도면7b



서열목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> toxin protein isolated from moss and process for production thereof

<130> P11-050406-01

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 884
<212> DNA
<213> Physcomitrella patens

<400> 1
atcacgtcac tgcatcaatc actgtccgcc ttgtcgcact acgtaccgag caaccagttc 60

gtcgctttgg cactactgag ctatcgatca ataatctctc ccgcattgtt cctgcaacct 120

cgaaagaaaa ccgcaaggat ggccgaagca attattccag ctgctgagct ctcaattaag 180

accctccaga acattgtgga ggggataacc ggagttgatc gaaagatcgc aatcggtttc 240

aagaacctca cggactatac ccttgagaac ttgggggtat actttaacag tgggtcgagc 300

gatcggagca tcgcctataa gattaacgcc caagaagctc ttctgttctc tgcgcgcaag 360

tcggatcata ctgcccgcgg tacagttggc acattctcct actacataca ggacgaggac 420

aagacggtcc atgtgatgtg gtccgtcccc ttcgactaca acttgtactc gaattggtgg 480

aacatagctg tagttgatgg acgtcagcca cccgactcga atgtccatga caacttgtac 540

aatggatctg gtgggatgcc gtaccccaac aaacctgatc agtatatcaa taacgaacag 600

aagggcttcc acttgtttgg gagcatgacc aacaatggac aagccactat cgaggtggaa 660

ctgaagaagg cttagagtgc cacaagcccc cggcaagttg tcccgtgttc aagaggcttt 720

ggaaaaaggg cctgagatgt ttgtacaact tcctcgtagt tactgtcaca aaacatgtgc 780

tacgtatagt gaatatttgt aaatgcgggg gatctcatgg attctccatg gatcttccta 840

gacctgtgac atggttggtt gaatatgata cattgcccct cccc 884

<210> 2
<211> 178
<212> PRT
<213> Physcomitrella patens

<400> 2
Met Ala Glu Ala Ile Ile Pro Ala Ala Glu Leu Ser Ile Lys Thr Leu
1 5 10 15

Gln Asn Ile Val Glu Gly Ile Thr Gly Val Asp Arg Lys Ile Ala Ile
20 25 30

Gly Phe Lys Asn Leu Thr Asp Tyr Thr Leu Glu Asn Leu Gly Val Tyr
35 40 45

Phe Asn Ser Gly Ser Ser Asp Arg Ser Ile Ala Tyr Lys Ile Asn Ala

```
     50                  55                  60

Gln Glu Ala Leu Leu Phe Ser Ala Arg Lys Ser Asp His Thr Ala Arg
 65                  70                  75                  80

Gly Thr Val Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr Ile Gln Asp Glu Asp Lys Thr
                 85                  90                  95

Val His Val Met Trp Ser Val Pro Phe Asp Tyr Asn Leu Tyr Ser Asn
            100                 105                 110

Trp Trp Asn Ile Ala Val Val Asp Gly Arg Gln Pro Pro Asp Ser Asn
        115                 120                 125

Val His Asp Asn Leu Tyr Asn Gly Ser Gly Gly Met Pro Tyr Pro Asn
    130                 135                 140

Lys Pro Asp Gln Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Lys Gly Phe His Leu Phe
145                 150                 155                 160

Gly Ser Met Thr Asn Asn Gly Gln Ala Thr Ile Glu Val Glu Leu Lys
                165                 170                 175

Lys Ala
```

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 3
catgccatgg ggatggccga agcaattatt 30

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR PRIMER

<400> 4
cgggatccta agccttctca gttccac 27