(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0141310
(43) 공개일자 2023년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/20 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/20 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0040699
(22) 출원일자 2022년03월31일
심사청구일자 2022년03월31일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
동아대학교 산학협력단
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
(72) 발명자
진병래
전북 완주군 이서면 출판로 25 혁신도시 에르코1단지 101동 1905호
이광식
부산시 사하구 하신번영로 400 102동 2502호
김보연
부산시 사하구 하신번영로 400 102동 2502호
(74) 대리인
위병갑

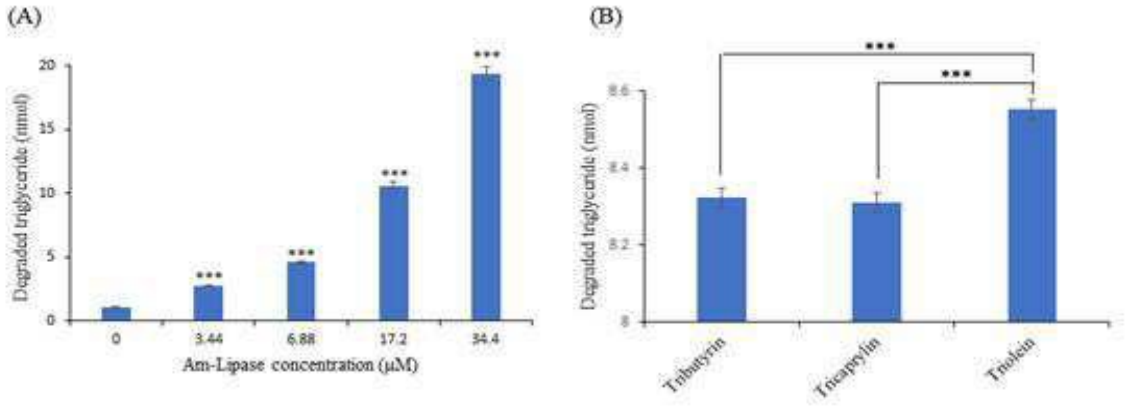
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **꿀벌 유래 지질분해 효소 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 꿀벌 유래 지질분해 효소 및 이의 용도에 관한 것으로서, 본 발명의 꿀벌 유래의 지질분해효소인 Am-Lipase의 염기서열 및 아미노산 서열을 규명하였으며, 꿀벌의 활동 및 기아 환경에 따른 Am-Lipase의 기능을 확인하였다. 또한 Am-Lipase의 최적 온도 및 pH를 확인하고, 효소 활성 및 기질 특이성을 확인하였다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12Y 301/01003 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395074138
과제번호	PJ015755012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	공동연구사업/농업정책기술개발
연구과제명	꿀벌 분자유전육종 기반조성 및 유전체 기반 대체사료 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	동아대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 지질분해 효소(AM-Lipase).

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 효소.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 효소는, 서열번호 2의 염기서열로 코딩되는 것인, 효소.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 효소는 꿀벌 조직 유래인, 효소.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 꿀벌 조직은 지방체, 근육, 중장, 외골격, 신경, 생식 기관 및 체액으로 이루어진 군에서 선택된 조직인 것인, 효소.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 효소는 트리글리세리드(triglyceride) 분해 활성을 가지는 것인, 효소.

청구항 7

제 1항의 꿀벌 유래 지질분해 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 꿀벌 유래 지질분해 효소를 코딩하는 유전자는, 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 벡터.

청구항 9

제 7항의 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 형질전환체는 세포, 세균, 효모 또는 바이러스인 것인, 형질전환체.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 세포는 곤충 세포인 것인, 형질전환체.

청구항 12

제 7항의 형질전환체를 배양하는 단계;

상기 배양된 형질전환체로부터 꿀벌 유래 지질분해 효소를 분리하는 단계; 및

상기 분리된 지질분해효소를 정제하는 단계;를 포함하는, 꿀벌 유래 지질분해 효소의 생산 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 꿀벌 유래 지질분해 효소 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지질은 모든 유기체에서 필수적이고 중요한 기능을 수행한다. 곤충에서 지질은 성장, 발달, 번식, 비행, 기아 및 휴면을 위한 에너지원으로 사용된다(Liu et al., 2009; Arrese and Soulages, 2010; Wang et al., 2010). 곤충 지질은 트리글리세리드, 인지질, 스테로이드 및 왁스의 형태로 존재하며(Jurenka et al., 1988), 트리글리세리드는 에너지 저장 및 대사에 필수적인 역할을 하는 척추동물의 지방 조직 및 간과 유사한 곤충 기관인 지방체에 저장되는 주요 유형의 지질이다(Liu et al., 2009; Arrese and Soulages, 2010).

[0003] 지질분해효소는 트리글리세리드를 유리 지방산과 글리세롤로 가수분해하는 촉매효소이며, 여러 곤충 종에서 보고되었다. 지방체 내의 지질분해효소는 *Manduca sexta*, *Locusta migrataoria* 및 *Pachnoda sinuata flaviventris*에서 특성이 보고되었으며(Arrese and Wells, 1994; Auerswald et al., 2005; Auerswald and Gade, 2006), 이동성 메뚜기의 지방체에서 정제된 트리아실글리세롤 지질분해효소는, 지질 동원에 관여하는 최초의 효소인 것으로 보고되었다(Arrese and Wells, 1994). 이전에 보고된 연구들에서는, 내인성 지방운동 호르몬(AKH) 펩타이드가 트리아실글리세롤 지질분해효소의 활성과 관련이 있다고 보고되었으며(Auerswald et al., 2005; Auerswald and Gade, 2006), *Bombyx mori*와 *Drosophila melanogaster*에 대한 이전 연구에서는 곤충 스테로이드 호르몬 20-하이드록시엑디손(20E)은 탈피 및 번데기 동안 트리아실글리세롤 지질분해효소의 발현촉진을 유도한다고 보고되었다(Wang et al., 2010). 장내 리파아제에 대한 데이터는 여러 곤충 종에 대해 보고되었으며, 소화기관인 장의 지질분해효소가 식이 트리아실글리세롤의 활용에 기여하고(Smith et al., 1994; Santana et al., 2017), 누에의 장액에서 추출 및 정제된 지질분해효소는 항바이러스 기능 및 소화 기능을 수행하는 것이 보고되었다 Ponnuvel et al., 2003). 또한, *Bombus igntius*에서 근육 활동을 위한 지질 활용에 근육 특이적 지질분해효소가 관련하고 있음이 확인되었다(Hu et al., 2008).

[0004] 여러 곤충의 지질 대사에 관여하는 지질분해효소 유전자가 보고되었고 췌장 트리아실글리세롤 및 트리아실글리세리드 지질분해효소와 유사한 유전자의 서열이 GenBank 데이터베이스에 공지되어 있지만, 꿀벌 종에서 지질분해효소의 기능적 역할은 규명 및 유전자의 서열은 공지되어 있지 않은 실정이다.

[0005] 이에 본 연구에서는 작물의 중요한 화분매개자인 꿀벌 *Apis mellifera*에서 지질분해효소의 분자적 특성을 확인하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 지질분해 효소를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기의 꿀벌 유래 지질분해 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기의 형질전환체를 배양하는 단계;

[0010] 상기 배양된 형질전환체로부터 꿀벌 유래 지질분해 효소를 분리하는 단계; 및

[0011] 상기 분리된 지질분해효소를 정제하는 단계;를 포함하는, 꿀벌 유래 지질분해 효소의 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 지질분해 효소를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기의 꿀벌 유래 지질분해 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기의 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기의 형질전환체를 배양하는 단계;

[0016] 상기 배양된 형질전환체로부터 꿀벌 유래 지질분해 효소를 분리하는 단계; 및

[0017] 상기 분리된 지질분해효소를 정제하는 단계;를 포함하는, 꿀벌 유래 지질분해 효소의 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 꿀벌 유래의 지질분해효소인 Am-Lipase의 염기서열 및 아미노산 서열을 규명하였으며, 꿀벌의 활동 및 기아 환경에 따른 Am-Lipase의 기능을 확인하였다. 또한 Am-Lipase의 최적 온도 및 pH를 확인하고, 효소 활성 및 기질 특이성을 확인하여, 식품보조제, 화장품, 접착제, 산업용 윤활제, 고분자 가소제 및 안정제와 같은 원료 분야에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 꿀벌 유래 지질분해효소 단백질과 다른 곤충 유래 지질분해효소와의 상동성을 확인한 도이다(화살표 = 시그널 펩티드(signal peptide) 부위; 푸른색 원(blue circle) = 시스테인 잔기; 붉은색 박스(red box) = 촉매 영역; 붉은색 글 = 펜타펩티드 영역).

도 2는 본 발명의 재조합 Am-Lipase의 정제 및 Am-Lipase 항체를 제작하여 확인한 도이다(A: Am-Lipase 확인, B: Am-Lipase Ab 확인).

도 3는 본 외역봉 및 내역봉 각 조직별 Am-Lipase의 발현량을 확인한 도이다(A: Am-Lipase 발현 확인, B: 발현 결과 정량화).

도 4는 내역봉 꿀벌의 기아 환경에 따른 Am-Lipase의 발현을 확인한 도이다(A: Am-Lipase 발현 확인, B: 발현 결과 정량화).

도 5는 본 발명의 재조합 Am-Lipase의 최적 pH 및 온도에 대한 활성을 확인한 도이다(A: 최적 pH 확인, B: 최적 온도 확인).

도 6은 본 발명의 재조합 Am-Lipase의 트리글리세리드 및 지방산 길이에 따른 분해 활성을 확인한 도이다(A: 트리글리세리드 분해 활성 확인, B: 기질에 따른 분해 활성 확인).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[0021] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0023] 본 발명은 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 지질분해 효소를 제공한다.

[0024] 본 발명의 “지질분해 효소”는 라이페이즈(Lipase)를 뜻하여, 트리글리세리드(triglyceride)를 가수분해시켜 글리세롤(glycerol)과 지방산을 생성시키는 효소이다. 또한, 라이페이즈는 다른 에스터(ester) 화합물의 가수분해와 에스터 교환반응(transesterification), 에스터 합성 등을 촉매하는 효소활성도 가지고 있다. 지질분해효소는 대부분의 생명체에서 지질의 소화와 이동, 식이성 지질의 이동과 공정에 중요한 역할을 하고 있다. 상기의 지질분해효소는 매우 특이적인 화학변환(chemical transformation)을 수행하기 때문에 식품, 화장품, 세제, 유기산 합성, 제약산업 등에 널리 이용되고 있는 효소이다. 특히, 아밀레이즈(amylase), 프로테이즈(protease)와 함께 3대 소화효소의 하나로서, 의약소화제로 주로 이용되고 있으며, 식품 가공에서는 유제품의 향미 강화와 에스테르 교환반응에 의한 유지의 개질에 응용되고 있으며, 유지를 라이페이즈로 가수분해한 가수분해물을 직접 비누 원료로 가공할 수 있다. 또한 피부착용 의류의 세척에서, 중성지방이 주요한 오염원으로 존재하고 있고, 이러한 중성지방의 오염은 의류 황색변화의 원인중 하나로 여겨지며, 이를 해결하기 위하여 라이페이즈를 세척용 조성물로 이용하려는 시도가 있었으며, 라이페이즈를 화장료 조성물로서 이용하고자 하는 연구도 진행중이다. 또한, 라이페이즈의 에스테르화합물을 합성하는 활성을 기반으로하여, 텔펜알코올에스테르와 게나릴부틸레이트 등을 합성할 수도 있어, 다양한 산업에 응용이 가능한 효소이다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 효소는 서열번호 2의 염기서열로 코딩되는 것일 수 있다.

[0027] 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 유전자 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 효소 외에도 상기 서열들의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 본다. 변이체는 염기서열 또는 아미노산 서열은 변화되지만, 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열로 이루어진 유전자 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 유전자는 서열번호 2의 염기서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있으며, 본 발명에 따른 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0028] 또한, 상기 본원 발명의 꿀벌 유래 지질분해 효소는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 효소에 대해 기능적 동등물일 수 있다. 상기 “기능적 동등물”이란, 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 효소와 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서, “실질적으로 동질의 활성”이란 상기에서 기재한 효소의 활성을 의미한다. 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함될 수 있다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환일 수 있으며, 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산 (Asp, Glu), 염기성 아미노산 (His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 본 발명의 효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치할 수 있다. 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 효소의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함될 수 있다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 효소는 꿀벌 조직 유래인 것일 수 있으며, 상기 조직은 지방체, 근육, 중장, 외골격, 신경, 생식 기관 및 체액으로 이루어진 군에서 선택된 조직인 것일 수 있고, 바람직하게는 지방체이나, 이에 제한되지는 않는다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 효소는 트리글리세리드(triglyceride) 분해 활성을 가지는 것일 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기의 꿀벌 유래 지질분해 효소를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0033] 본 발명에 있어서 “벡터(vector)”는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 DNA 서열을 보유하는 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.

[0034] 또한, 상기 벡터는 발현 벡터일 수 있으며, 본 발명에서 사용된 용어 “발현 벡터”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0035] 본 발명의 "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 뜻한다.

[0036] 또한, 상기의 발현 벡터는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기의 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0039] 본 발명에서 용어 "형질전환(transformation)"이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.

[0040] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 형질전환체는 당업계에 공지된 어떠한 형질전환체도 이용할 수 있으며, 예컨대, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110와 같은 대장균; 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주; 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스; 슈도모나스 속과 같은 균주 등이 있다.

[0041] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 형질전환체로서, 효모(Saccharomyce cerevisiae), 곤충세포(*Spodoptera frugiperda*, Sf9), 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 벡터를 형질전환체 내로 운반하는 방법은, 형질전환체가 원핵 세포인 경우, CaCl2 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법(Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포좀-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc.Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 형질전환체 내로 주입할 수 있다.

[0043] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 형질전환체는 세포, 세균, 효모 또는 바이러스인 것일 수 있다.

[0044] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 세포는 곤충 세포인 것일 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 상기의 형질전환체를 배양하는 단계;

[0047] 상기 배양된 형질전환체로부터 꿀벌 유래 지질분해 효소를 분리하는 단계; 및

[0048] 상기 분리된 지질분해효소를 정제하는 단계;를 포함하는, 꿀벌 유래 지질분해 효소의 생산 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명에 있어서, 형질전환체의 배양은 다양한 배지에서 수행할 수 있으며, 예를 들어 페드-배치(fedbatch) 배양 또는 연속 배양 등을 수행할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 구체적인 배지의 조성 및 배양 조건은 숙주세포 및 기질의 종류에 따라 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0050] 숙주 세포 내 또는 외에서 발현된 효소는 통상의 방식으로 회수 또는 분리될 수 있다. 예를 들어 염석(예를 들어 황산암모늄 침전, 인산 나트륨 침전 등), 용매 침전(예를 들어, 아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전 등), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 컬럼 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을

단독 또는 조합으로 적용하여 회수 또는 분리할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 당업계의 통상적인 방법에 의해 회수 또는 분리할 수 있다(Sambrook, J et al. Molecular Cloning 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001).

[0052] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0054] **<실시예 1> 꿀벌 유래 지질분해효소 cDNA 클로닝 및 서열 분석**

[0055] 본 발명의 꿀벌 유래 지질분해효소(*Apis mellifera* lipase, Am-Lipase)를 분리 및 서열 분석을 위하여, cDNA를 클로닝하고자 하였다. 구체적으로, TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 *A. mellifera* 일벌로부터 총 RNA(Total-RNA)를 분리하였다. 분리된 총 RNA를 RT-PCR(reverse transcription PCR)로 cDNA를 제작하였다. RT-PCR에 사용된 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0056]

	Sequence (5`-3`)
Forward	ATGTCACCGGTTGAAACACTC
Reverse	TTATTTTATTGCGAACGGAGG

[0057] RT-PCR 종료 후 수득된 산물을 pGemT 벡터(Promega, Madison, WI, USA)에 연결하고 3730XL DNA Analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 cDNA 서열을 분석하였으며, DNASIS 및 BLAST(http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST) 프로그램을 사용하여 서열 비교를 수행하였다. 그 후 아미노산 서열 비교를 위하여, MacVector(ver. 6.5, Oxford Molecular Ltd., Oxford, UK)를 사용하였으며, 펩타이드 서열은 SignalP 5.0 프로그램(https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0)을 이용하여 예측하였다. 그 후 공지된 곤충 유래의 지질분해 효소(*A. cerana*(XP_016905457), *Habropoda labiosa*(XM_017797625), *Megachile rotundata*(XP_003702411), *Osmia bicornis*(XP_029053357), *Bombus terrestris*(XP_003396103), *Camponotus floridanus*(EFN64413.1) 및 *Solenopsis invicta*(XP_025989814))와 아미노산 서열을 비교하고 분석하였다.

[0059] 그 결과, Am-Lipase는 19개의 아미노산으로 구성된 신호 펩타이드(화살표), 302개의 아미노산 성숙 단백질 서열을 포함하는 321개의 아미노산으로 구성된 것을 확인하였다(도 1).

[0061] 또한, Am-Lipase는 *A. cerana, H. labiosa, M. rotundata, O. bicornis, B. terrestris, C. floridanus* 및 *S. invicta*의 지질분해효소와 높은 유사성을 나타내는 것을 확인하였으며, 특히 같은 벌목 곤충인 *A. cerana*(100%), *M. rotundata*(96%), *O. bicornis*(96%), *H. Laboriosa*(95%) 및 *B. terrestris*(94%) 유래의 지질분해효소와 높은 상동성을 나타내었다(도 1).

[0062] 또한, Am-Lipase는 Ser-Glu-His로 구성된 효소활성 촉매영역(red box)과 공통 활성 영역인 GXSXG(펜타펩티드 영역, red type) 포함하고 있어, 전형적인 지질분해효소의 특징을 가지는 것을 확인하였다(도 1).

[0064] **<실시예 2> 재조합 Am-Lipase의 생산**

[0065] 본 발명의 꿀벌 유래 지질분해효소를 벡터를 이용하여 생산하고자 하였다. 구체적으로, 재조합 Am-Lipase는 배큘로바이러스 발현 벡터 시스템을 사용하여 생산하였으며, Am-Lipase 서열은 하기 표 2의 프라이머를 사용하여 pGemT-Am-Lipase로부터 PCR을 이용하여 증폭하였다.

표 2

[0066]

	Sequence (5`-3`)
Forward	GGATCCATGTCACCGGTTGAAACACTC
Reverse	GAATTCTTAATGATGATGATGATGATGTTTTATTGCGAACGGAGG

[0067] 재조합 Am-Lipase의 정제를 위하여, Am-Lipase cDNA 서열을 증폭하는 프라이머에 His-tag(Reverse primer의 밑줄 친 영역)과 제한효소 부위를 포함시켰으며, Am-Lipase 단편은 *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV) 다각체 프로모터 조절하에 pBacPAK8 전이벡터 (Clontech, Palo Alto, CA, USA)에 삽입하였다. 그 후 상기 전이벡터와 100ng의 AcNPV 바이러스 DNA를 co-transfection 하여 재조합 Am-Lipase를 발현하는 재조합 배큘로 바이러스를 제작하였다. 제작된 배큘로 바이러스는 27℃에서 곤충세포주인 *Spodoptera frugiperda*(Sf9) 세포주에서 증식되었으며, 10% 소태아혈청(Gibco BRL)이 첨가된 TC100 배지(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 세포를 배양하였다. 그 후 Sf9 세포주에서 Am-Lipase를 분리하고, 분리된 Am-Lipase는 MagneHisTM Protein Purification System(Promega)을 사용하여 정제하였다.

[0069] 그 결과, 도 2A에 나타낸 바와 같이, 정제된 재조합 Am-Lipase는 37 kDa의 분자량을 가지는 단일 밴드로 확인되었다.

[0071] **<실시예 3> 재조합 Am-Lipase 항체 제작 및 웨스턴블랏 분석**

[0072] 재조합 Am-Lipase의 발현 확인을 위하여, Am-Lipase에 대한 항체를 제작하였다. 구체적으로 정제된 Am-Lipase 5 μg을 동일한 부피의 Freund's complete adjuvant(총 200 μL)와 혼합하고 BALB/c 마우스(Samtako Bio Korea, Osan, 한국)에 주사하였다. 그 후 1주 간격으로 동일한 부피의 Freund 불완전 보조제와 혼합된 재조합 Am-Lipase를 사용하여 2회의 연속 주사하였다. 재조합 Am-Lipase의 마지막 주입 후 3일 후에, 마우스로부터 혈액을 수집하고, 4 ℃, 10,000 × g에서 10분간 원심분리하여, 항체를 포함하는 상층액을 수득하였다. 수득된 상층액은 -70℃에서 보관하였다. 그 후 정제된 Am-Lipase를 이용하여, Am-Lipase 항체(Am-Lipase antibody, Am-Lipase Ab)가 제대로 제작되었는지 확인하였다.

[0073] 재조합 Am-Lipase는 10% SDS-PAGE와 western blot을 이용하여 동정하고자 하였으며, 샘플 2 μg을 단백질 샘플 완충액(0.0625M Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 10% 글리세롤, 5% β-mercaptoethanol 및 0.125% bromophenol blue)과 혼합하고 5분간 가열하였다. 그 후 10% SDS-PAGE를 이용하여 재조합 Am-Lipase를 분리하였으며, 전기영동 후 겔을 고정하고 0.1% Coomassie bright blue R-250으로 염색하였다. 그 후 western blot 시스템(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 웨스턴블랏을 수행하였다. 상기와 같이 10% SDS-PAGE로 고정된 단백질을 니트로셀룰로오스 전이막(Schneicher & Schuell, Dassel, Germany)으로 옮기고 1% 소혈청 알부민 용액에서 실온에서 30분간 인큐베이션하여 막을 차단하였다. 그 다음, 막을 Am-Lipase 항체(희석 1:1,000[v/v]) 또는 His-tag 항체(희석 1:5,000[v/v]; BETHYL Laboratories, TX, USA)와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 Tween 20(TBST; 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl, 및 0.05% [w/v] Tween 20)이 포함된 Tris 완충 식염수로 막을 세척하고, 1시간 동안 1:5,000(v/v)으로 희석된 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG와 함께 인큐베이션 하였다. 반응 종료 후 TBST로 세척한 막을 브레인을 ECL 검출 시약(Amersham Biosciences)과 함께 반응시키고, 방사선 촬영 필름에 노출시켜, 재조합 Am-lipase의 발현을 확인하여 추후 실험에 이용하고자 하였다.

[0075] 그 결과, 도 2B에 나타낸 바와 같이, Am-Lipase에 대한 항체가 마우스에서 정상적으로 생산된 것을 확인하였다.

[0077] **<실시예 4> 기아 조건에 따른 Am-Lipase 발현 확인**

[0078] 본 발명의 Am-Lipase의 발현 양상을 확인하기 위하여, 기아 실험으로 발현 양상을 확인하였다. 구체적으로, 20-25일령의 꽃가루를 수집하는 외역봉(field bee, F), 5-15일령 내역봉(house bee, N)을 채집하였다. 그 후 5-15일령의 내역봉을 작은 케이지(11.3 × 7 × 4.3 cm)에 무작위로 투입하였다. 그 후 각 케이지를 두 그룹으로 분

류하고, 그 중 한 그룹에는 식단(40% 설탕 용액과 bee bread)을 급여한 군(control, C), 다른 한 그룹에는 식이를 급여하지 않은 기아 군(starvation, S)으로 분류하였다. 그 후 상기 케이지를 34° C, 상대 습도 80% 조건에서 4 시간 또는 6시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 각 군의 벌을 실체현미경(Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 얼음 위에서 해부하여, 지방체(Fat body), 근육(Muscle) 및 중장(Midgut)의 조직을 수집하고 0.1% DEPC가 포함된 물로 조직을 세척하였다. 수득된 조직은 균질화하고 TRIzol 시약(Invitrogen)을 사용하여 총 RNA(Total-RNA)를 분리하였다. Am-Lipase의 발현 정도를 알아보기 위해 total RNA에서 Am-Lipase cDNA를 RT-PCR을 이용하여 증폭하였고, 대조군으로 β-actin을 사용하였다. RT-PCR에 이용된 프라이머는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

[0079]

Gene	sequence(5`-3`)
Am-Lipase	F: ATGTCACCGGTTGAAACACTC
	R: TTATTTTATTGCGAACGGAGG
β-actin	F: ATGTGTGACGACGAAGTAGCA
	R: TCCTTTTGACCCATACG

[0080] Thermocycler(Takara Bio, Otsu, Japan)를 사용하여 PCR을 수행하였으며, PCR 산물은 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 관찰하였다. cDNA band는 컴퓨터 영상분석시스템(Alpha Innotech Co., San Leandro, CA, USA)인 AlphaEaseFC(VER. 4.0)를 이용하여 분석하였다. 또한 채집된 외역봉에서도 상기와 동일한 방법으로 Am-Lipase의 발현을 분석하여, 외역봉과 내역봉에서의 Am-Lipase 활성을 비교하였다.

[0082] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 외역봉(F) 및 내역봉(N) 일벌의 지방체(Fat body)에서 Am-Lipase가 주로 발현하는 것을 확인하였다(도 3A). 또한, 외역봉 일벌에서, 내역봉 일벌과 비교하여 유의적으로 Am-Lipase의 발현이 증가된 것을 확인하였다(도 3B). 이는 화분 및 꿀을 모으기 위하여 비행 활동에 참여하는 외역봉에서 에너지 요구가 중요하며, Am-Lipase의 발현이 외역봉에서 유의적으로 증가한 것이, 지방체에 저장된 지질의 이용에 의한 것임을 시사한다.

[0083] 또한, 기아 상태에서 내역봉 일벌의 지방체에서 Am-Lipase의 발현을 확인한 결과, 기아 상태의 내역봉(S)의 지방체에서 Am-Lipase의 발현이 식이 급여 내역봉(C)과 비교하여 유의적으로 감소된 것을 확인하였으며(도 4), 기아 상태의 꿀벌들이 운동성이 감소한 것을 확인하였다. 이로부터 기아 상태의 벌의 운동성 감소는 에너지 소비를 감소시키고, 이로 인해 Am-Lipase의 발현이 감소하게 되는 것을 확인하였다.

[0084] 상기의 결과를 토대로, Am-Lipase는 에너지 대사를 위한 지질 저장고인 지방체에 저장된 지질을 활용하는 역할을 하는 것으로 추론되었다.

[0086] **<실시예 5> 재조합 Am-Lipase 효소 활성 확인**

[0087] 본 발명의 재조합 Am-Lipase의 효소 활성을 확인하고자 하였다. 구체적으로 재조합 Am-Lipase의 최적 온도 및 최적 pH를 평가하기 위하여, p-nitrophenyl butyrate(p-NPB)에서 방출되는 p-nitrophenol(p-NP)의 양을 분석하였다. 구체적으로 재조합 Am-Lipase(237 μM)를 검출 용액(50mM Tris-HCl[pH 8.0], 100 μL의 0.4%[v/v] Triton X-100 및 10 μL의 1.76% p -NPB [아세토니트릴 중 v/v]) 880 μL과 혼합하여 각각의 pH(5 ~ 9) 및 온도 조건(20 ~ 60 ℃)에서 30분간 반응시킨 후 405 nm에서 p-NP의 양을 측정하였다.

[0088] 또한, 재조합 Am-Lipase의 트리글리세리이드(triglycerides) 분해 분석은 제조업체의 지침에 따라 Chemical Chemistry Analyzer(Bio-Rad)를 사용하여 수행하였으며, 재조합 Am-Lipase(0-34.4 μM)를 6 nM 트리글리세리드와 함께 20분 동안 인큐베이션하고 트리글리세리드 분해를 측정하였다. 또한, 효소의 기질 특이성을 평가하기 위하여 트리부티린(Tributyrin, C4), 트리카프릴린(Tricaprylin, C8) 및 트리올레인(Triolein, C18:1)을 기질로 사용하여, 트리글리세리드 분해를 측정하였으며, 재조합 Am-Lipase(17.2 μM)를 10nM 기질과 함께 20분 동안 반응시켜 활성을 평가하였다. 지방분해 활성과 상대적 발현 패턴의 차이에 대한 통계적 유의성을 확인하기 위해 통계 소프트웨어(SPSS 18.0, IBM, Chicago, IL, USA)를 사용하여 독립적인 unpaired two-tailed Student's t-test를 이용하여 수득된 데이터를 분석하였다.

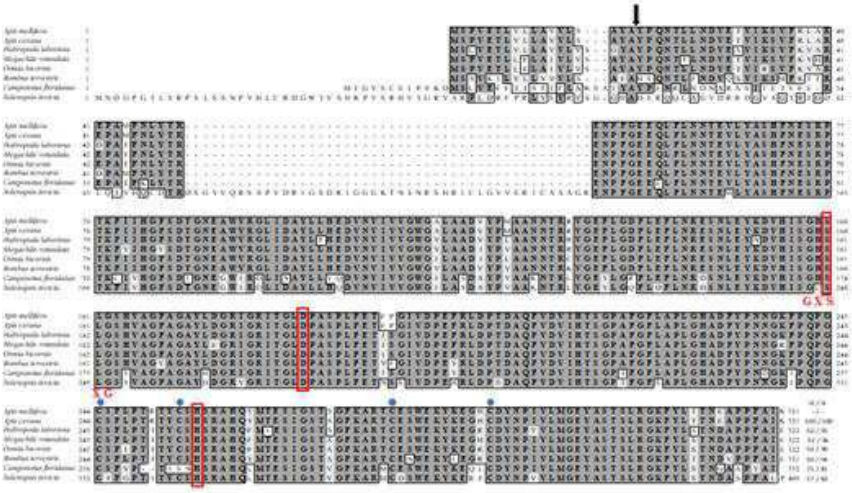
[0090] 그 결과, 본 발명의 Am-Lipase를 30℃에서 30분간 각기 다른 pH 조건에서 효소활성을 확인한 결과, pH 6에서 최적의 활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 5A). 또한, pH 7에서 30분 동안 각기 다른 온도 조건에서 효소 활성을 확인한 결과, 최적의 활성을 나타내는 온도는 50℃인 것을 확인하였다(도 5B).

[0091] 또한, 본 발명의 Am-Lipase가 전형적인 지질분해 효소의 특징을 가지기에, 트리글리세리드에 대한 분해 활성을 확인하여 본 결과, Am-Lipase가 농도 의존적으로 트리글리세리드를 분해하는 것을 확인하였으며(도 6A), Am-Lipase의 기질 특이성을 분석한 결과, Am-Lipase가 트리올레인(C18:1)과 같은 장쇄 사슬 지방산에 대하여 높은 분해 활성을 가지는 것을 확인하였다(도 6B). 상기의 결과를 토대로, 본 발명의 Am-Lipase가 꿀벌의 지방체 내에서 트리글리세리드를 분해하고, 지질 대사 기능을 하는 지질분해제로 작용함을 확인하였다.

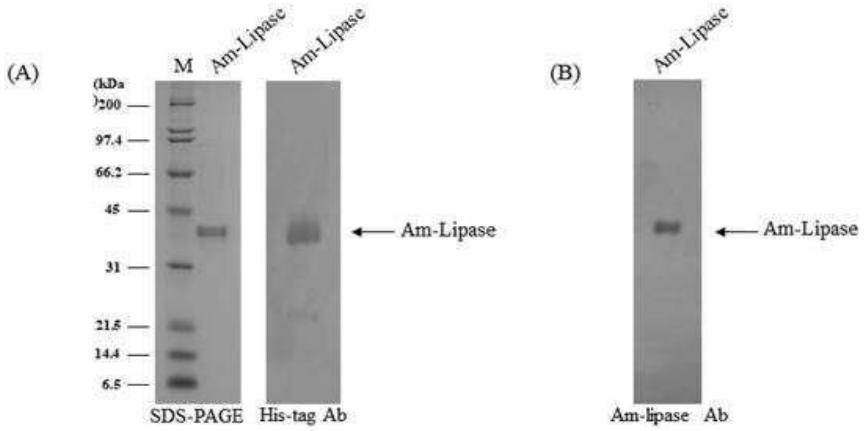
[0093] 따라서, 본 발명의 꿀벌 유래의 지질분해효소인 Am-Lipase의 염기서열 및 아미노산 서열을 규명하였으며, 꿀벌의 활동 및 기아 환경에 따른 Am-Lipase의 기능을 확인하였다. 또한 Am-Lipase의 최적 온도 및 pH를 확인하고, 효소 활성 및 기질 특이성을 확인하였다.

도면

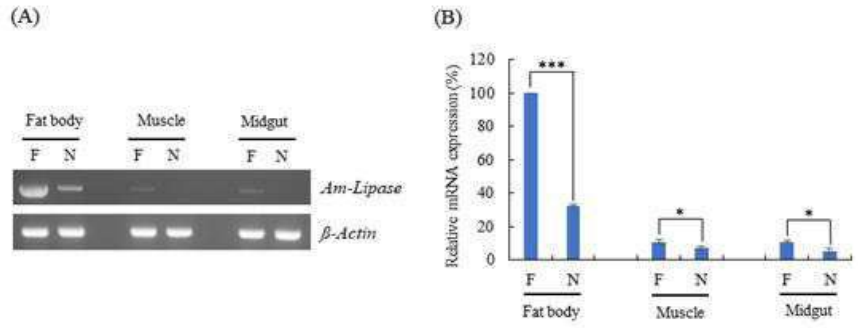
도면1



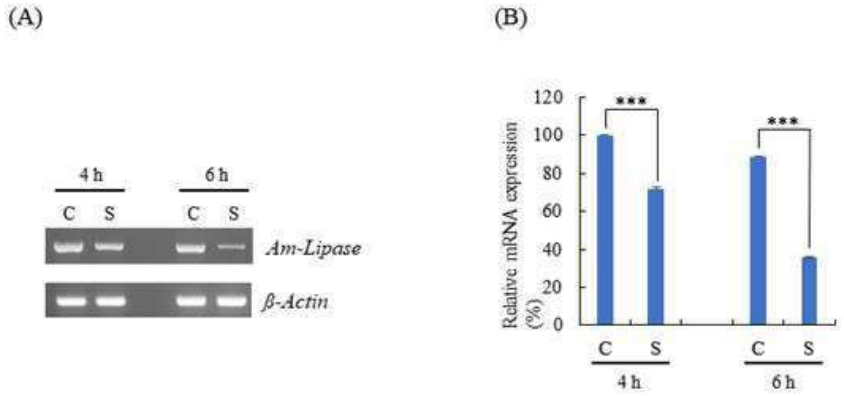
도면2



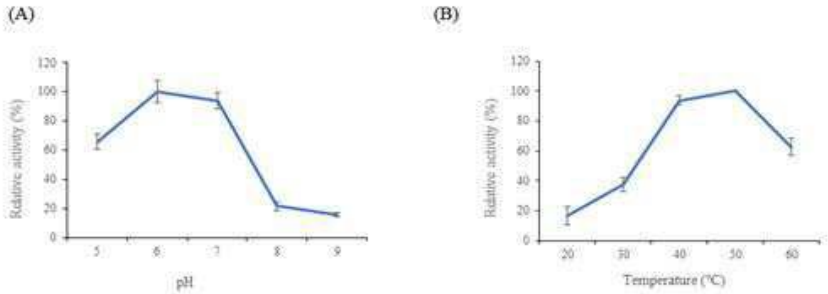
도면3



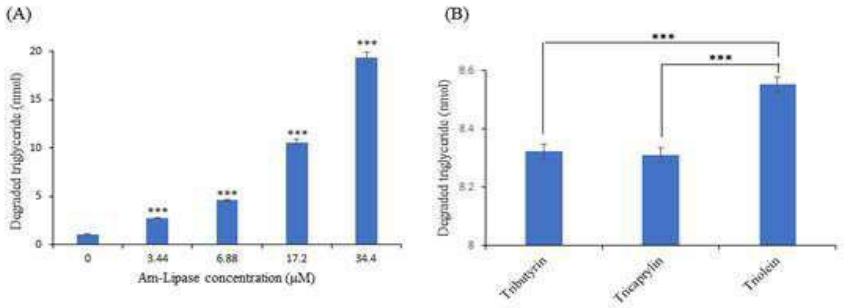
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110> Dong-A University Research Foundation For Industry-Academy Cooperation

<120> Lipase from honybee Apis mellifera and uses thereof

<130> PN2202-116

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 321

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apis mellifera Lipase amino acid sequence

<400> 1

Met Ser Pro Val Glu Thr Leu Val Leu Leu Ala Val Val Leu Ser Ala
1 5 10 15

Tyr Ala Tyr Pro Gln Asn Thr Leu Leu Asn Asp Val Glu Thr Val Ile
20 25 30

Lys Ser Val Phe Arg Leu Ala Arg Glu Pro Ala Met Phe Asn Leu Tyr
35 40 45

Thr Arg Glu Asn Pro Phe Gly Glu Glu Gln Leu Phe Leu Asn Asn Thr
50 55 60

Glu Val Leu Tyr Ala Ser His Phe Asn Glu Ser Arg Pro Thr Lys Phe
65 70 75 80

Ile Ile His Gly Phe Ser Asp Thr Gly Asn Glu Ala Trp Val Arg Gly
85 90 95

Leu Ile Asp Ala Tyr Leu Leu His Glu Asp Val Asn Val Ile Val Val
100 105 110

Gly Trp Gly Ala Leu Ala Ala Asp Val Tyr Pro Met Ala Ala Asn Asn
115 120 125

Thr Arg Arg Val Gly Glu Phe Leu Gly Asp Phe Leu Glu Phe Leu Asn
130 135 140

Arg Glu Ser Asn Leu Glu Tyr Lys Asp Val His Ile Ser Gly His Ser
145 150 155 160

Leu Gly Ser His Val Ala Gly Phe Ala Gly Ala Tyr Leu Asp Gly Arg

165 170 175

Ile Gly Arg Ile Thr Gly Leu Asp Pro Ala Ser Pro Leu Phe Glu Thr

180 185 190

Phe Pro Gly Ile Val Asp Pro Glu Phe Arg Leu Asp Pro Thr Asp Ala

195 200 205

Gln Phe Val Asp Val Ile His Thr Ser Gly Pro Ala Phe Gly Phe Leu

210 215 220

Ala Pro Leu Gly His Ala Asp Phe Tyr Pro Asn Asn Gly Lys Phe Pro

225 230 235 240

Gln Pro Gly Cys Ser Phe Leu Pro Thr Arg Thr Tyr Cys Ser His Ser

245 250 255

Arg Ala His Gln Tyr Met Thr Glu Ser Ile Gly Ser Thr Ser Gly Phe

260 265 270

Lys Ala Arg Thr Cys Glu Ser Trp Glu Lys Tyr Lys Glu Gly His Cys

275 280 285

Asp Tyr Asn Pro Ile Val Leu Met Gly Glu Tyr Ala Ser Thr Ser Leu

290 295 300

Arg Gly Lys Phe Tyr Leu Thr Thr Asn Glu Ala Pro Pro Phe Ala Ile

305 310 315 320

Lys

<210> 2

<211> 966

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apis mellifera Lipase gene sequence

<400> 2

atgtcaccgg ttgaaacact cgtccttctg gcggtcgttc tctcagcgta cgcgtatccg 60

cagaacacgc tgctgaacga tgtggaaaca gtcatcaaat ctgtattcag gcttgcccgt 120

gaaccggcta tgttcaattt atacaccaga gaaaatccat ttggtgaaga acaattgttt 180

ctaaacaaca ccgaggttct ttatgcatct cactttaacg aaagtcgtcc aacgaagttc 240

attattcacg gatttagtga caccggaaac gaagcttggg tacgaggttt gatagatgcg 300

tatctacttc atgaagatgt aaacgtgata gtcgtcggat ggggtgcttt ggcagctgat 360

gtttatccga tggcagcgaa caatacgcga cgagtgggtg aatttctcgg agatttcctg 420

gaatttttaa atcgcgaatc gaatcttgaa tacaaggatg ttcacattag tggtcacagt 480

ttgggatcac atgttgcagg atttgctgga gcttatctgg acgggcgtat cggcagaata 540

acaggtttag atccagccag tccattattc gagacatttc ccgggattgt tgacccagag 600

ttcagattag atccaactga tgcgcaattt gtggatgtaa ttcatacaag cggacctgca 660

tttggatttt tggctccact tggccatgct gatttttatc ctaacaacgg aaaatttcca 720

cagcctggtt gttcgttttt accgacaaga acttactgca gccattcgcg agctcatcag 780

tatatgacag agagtatagg aagtacatct ggtttcaagg caagaacttg tgaaagttgg 840

gaaaaataca aagagggaca ttgcgattac aatccaattg ttctaatggg agaatacgca 900

tccacgtcat tacgaggaaa attttattta actacaaacg aagctcctcc gttcgcaata 960

aaataa 966