



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0130916  
(43) 공개일자 2012년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/545 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)  
A61K 38/20 (2006.01) A61P 37/04 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2011-0048985  
(22) 출원일자 2011년05월24일  
심사청구일자 2011년05월24일  
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인  
경상대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)  
(72) 발명자  
박찬일  
경상남도 통영시 무전1길 23, 한진로즈힐 107동  
1103호 (무전동)  
(74) 대리인  
특허법인 충청

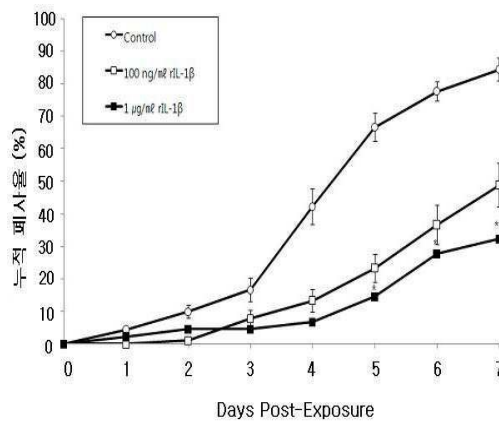
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드 및 이를 유효성분으로 포함하는 어류용 면역증강조성물

**(57) 요약**

본 발명은 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드, 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 어류용 면역증강조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드는 비특이적 면역반응에 작용하는 라이소자임의 활성을 효과적으로 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 응집항체가 및 대식세포의 식균작용을 증가시키는 효과가 있다. 따라서 상기와 같은 효과를 갖는 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 어류의 비특이적인 면역 반응을 증가시켜 세균성 질병으로부터 어류의 폐사를 방지할 수 있으므로, 어류의 면역증강제 또는 백신과 함께 사용하는 면역보조제로서 유용하게 사용될 수 있다.

**대표도 - 도12**



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 03-2009-0296

부처명 국토해양부

연구사업명 영남씨그랜트사업

연구과제명 조피볼락의 면역 유전자를 이용한 면역활성제 개발

주관기관 영남씨그랜트사업단

연구기간 2009.03.01 ~ 2009.12.31

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드.

**청구항 2**

제1항의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 3**

제2항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

**청구항 4**

제2항 또는 제3항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터.

**청구항 5**

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 어류용 면역증강조성물.

**청구항 6**

제5항에 있어서,

상기 어류는 넙치(광어), 조피볼락, 우럭, 감성돔, 참돔, 능성어, 송어, 농어, 전어, 고등어, 전갱이 및 쥐치로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는 어류용 면역증강조성물.

**청구항 7**

제5항에 있어서,

상기 면역증강은 제1항의 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드가 라이소자임의 활성증가를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 어류용 면역증강조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 조피볼락 유래의 신규한 IL-1 $\beta$  폴리펩티드 및 이를 포함하는 면역증강용 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 양식 산업의 발달과 연안의 오염으로 한층 증가되고 있는 양식생물의 질병문제는 우리나라 양식 산업이 직면한 주요 현안문제 중 하나이다. 이러한 질병은 양식생물의 누적 폐사로 인한 직접적인 경제적 피해와 더불어 수산용 약제의 사용 증가와 관리 인력 비용 증가 등 제반 양식비용을 증가시켜 양식생산성을 저하시킴으로서 심각한 경제적 피해를 유발하고 있다.

[0003] 또한 이러한 질병의 사회적 문제화로 인하여 대 국민 소비심리가 위축되어 소비량의 저하가 유발되기도 한다. 그러나 최근 우리나라 국민들의 경제적, 문화적 수준의 향상과 식생활의 급변화로, 청정·건강식품으로서의 수산물의 소비가 급증하고 있을 뿐만 아니라, 특히, 근래 전 세계적으로 발생하고 있는 광우병, 구제역, 조류독감 등의 파동은 단백질의 공급원으로서 동물성 육류에서 어류로 소비의 방향을 전환시키고 있다. 따라서 친환경양식방법의 일환으로서 기존의 항생제를 대체할 수 있는 대체물질개발에 대한 요구가 점점 높아지고 있다.

[0004] 현재 우리나라 남해안 해역에서는 넙치, 조피볼락, 농어, 방어, 돔류가 양식의 주 대상이 되고 있는데 어종에 따라 약간의 차이는 있으나, 비브리오병, 연쇄구균증, 에드워드병, 활주세균증 등에 의한 피해가 해마다 보고되

고 있다. 이러한 어류질병을 치료하기 위하여 각종 화학요법제가 널리 사용되고 있으나 약제를 적정하게 선정하지 못하였거나, 상용하거나 또는 장기간 투여함으로써 치료 효과가 없이 질병을 악화시키고 있다. 또한 약제 투여효과를 높이기 위한 절식으로 어류의 성장저하를 가져올 뿐 아니라, 항생제의 어체 내 잔류로 인한 보건상의 문제 및 항생제가 함유된 사육수의 배출로 인한 주변 해역의 오염 및 자연균주의 약제내성 증가 등 여러 가지 문제를 야기할 수 있다.

[0005] 어류의 면역계는 고등 척추동물이 가지는 주요한 요소를 가진다 하더라도 그 작용면에 있어서는 다소 다르다고 알려져 있다. 특히 항체 의존성인 경우는 항체의 종류에 민감하여 그 작용이 매우 제한적이며, 하등 척추동물에 속하는 어류는 고등 척추동물에 비하여 항체의 유전자수가 적기 때문에 항체의 클래스 및 그 종류도 적어서 항체가 주축이 되는 면역 반응만으로는 충분한 방어기작을 유지하기 어렵다고 알려져 있다.

[0006] 따라서 어류는 고등 척추동물에 비하여 비특이적 방어기구에 대한 의존성이 높을 것으로 기대되며, 그 중에 대표적인 것으로 라이소자임(lysozyme)을 들 수 있다. 실제로 라이소자임은 많은 어류에서 정균효과 있다는 보고가 있었다. 어류의 혈청 중의 라이소자임은 세균의 세포벽 구성 성분의 하나인 펩티도글리칸에 작용하여 세포벽의 항 삼투압 작용을 잃게 함으로써 용균 작용을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 이러한 라이소자임과 같은 비특이적 방어 기작은 어류에 있어서는 매우 중요한 면역 기구로 추측된다.

[0007] 한편 사이토카인의 일종인 인터루킨-1(IL-1)은 사람의 peripheral blood adherent leukocytes의 배양액에서 쥐의 흉선 세포(thymocyte)의 증식을 촉진시키는 인자로서 발견되었다. IL-1은 염증반응에서 중요한 조절자이며, 그 반응을 시작하거나 염증반응 동안 특이적으로 발현되는 다양한 유전자의 기능을 증가시킬 수 있다. 또 세균의 침입, 염증반응, 면역학적인 반응과 상처 입은 조직에 대한 신체의 반응을 조절하는 중요한 역할을 한다. 또한 IL-1은 면역계뿐만 아니라 내열성 발열인자로서 급성기 단백질의 유도 체동의 다양한 생리활성을 가지며 다양한 target cells에 대해 다면적인 활동을 나타낸다. IL-1은 리포폴리사카라이드(LPS)에 의해 유도될 수 있으며 단핵 세포, 대식 세포, 수지상 세포, B 림프구, 내피 세포 및 상피 세포 등에서 각각 그 생성이 보고되었다. IL-1을 생산하는 세포 종류의 다양성과 그 작용을 받는 세포들의 다양성으로부터 기대할 수 있듯이 IL-1의 기능은 상당히 다양하다. IL-1의 다양한 생물학적인 효과는 열의 유도, 혈청에서 코티코스테론 수준(corticosteron levels)의 증가, 사이토카인 네트워크의 활동을 유도하고, 간에서 급성 반응을 유인하며, 혈관의 내피의 활동을 일으키는 것을 포함한다. 게다가 IL-2의 유도를 통해 T-세포 증식을 자극하고, B-세포의 성숙과 항체 생산을 유도한다.

[0008] IL-1은 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  두 개의 서브유닛으로 나누어진다. 사람에서 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 서로 핵산 수준에서는 45%, 아미노산 수준에서는 26%의 유사성을 보인다. 이렇게 낮은 유사성에도 불구하고 IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 동일 수용체에 같은 친화력을 가지고 결합하고 구별 지을 수 없을 정도로 유사한 생물학적인 반응을 유도할 뿐만 아니라 전체적인 구조에서도 두 분자는 아주 유사하며, IL-1 $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 는 각각 271, 269의 아미노산으로 되어있다.

[0009] 인터루킨-1 베타(Interleukin-1 beta: 이하에서는 간편하게 'IL-1 $\beta$ '라 나타냄)는 유해성 감염이나 염증 및 면역반응을 유발하는 초기 급성 반응의 중요한 매개물질 중 사이토카인중의 하나이고, 생체의 항상성 유지에 기여하는 국소호르몬이다. 따라서 IL-1 $\beta$ 는 염증의 초기에 합성되는 고분자 단백질로서 이의 생물학적 효과는 거의 모든 조직이나 장기에서 발현된다. IL-1 $\beta$ 의 분비는 다양한 종류의 자극에 의하여 유발되며, 다른 종류의 사이토카인에 의하여도 발현된다. IL-1 $\beta$ 는 단구, 대식세포, T-세포, B-세포, 섬유아세포, 상피세포 및 내피세포를 포함한 다양한 세포 타입에서 생성되고, 주로 단구와 대식세포가 주생산자이고, 12 $\beta$ -strands의  $\beta$ -trefoil 구조를 가진다. 이러한 IL-1 $\beta$ 는 중요한 염증 매개자로 포유류에서 interleukin-converting enzyme (ICE)에 의해 잘려서 성숙 단백질로 된다. 그리고 성숙 단백질만이 생물학적으로 활성을 가지게 된다. 생성된 IL-1 $\beta$ 는 림프구, 결합조직 세포, 혈관내피 세포의 성장과 증식을 유도하여 세포 매개성 면역을 증강시키면서 염증에서 중요한 역할을 한다.

[0010] 그러나 현재까지 연구된 IL-1 $\beta$ 의 기작은 거의 고등 척추동물을 중심으로 이루어진 것으로서, 넙치, 조피볼락, 농어와 같은 주요 양식 어류에서는 아직도 IL-1 $\beta$ 에 대한 연구가 충분히 이루어지지 않고 있는 실정이다.

[0011] 이에 본 발명자들은 주요 양식어류인 조피볼락에서 IL-1 $\beta$  유전자의 genomic DNA sequence를 밝혔으며, 본 핵산 서열을 이용하여 제조된 재조합 단백질이 라이소자임의 활성을 증가시켜 면역반응을 증가시키는 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

## 발명의 내용

**해결하려는 과제**

- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 이용하여 화학합성 항생제와 같이 어체 내 잔류 또는 내성과 같은 문제점이 없는 어류용 면역증강조성물을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0016] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 어류용 면역증강조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 어류는 넙치(광어), 조피볼락, 우럭, 감성돔, 참돔, 능성어, 송어, 농어, 전어, 고등어, 전갱이, 쥐치로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 면역증강은 IL-1 $\beta$ 가 라이소자임 활성을 증가시키는 기작으로 이루어질 수 있다.

**발명의 효과**

- [0023] 본 발명의 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드는 비특이적 면역반응에 작용하는 라이소자임의 활성을 효과적으로 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 응집항체가 및 대식세포의 식균작용을 증가시키는 효과가 있다. 따라서 상기와 같은 효과를 갖는 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 어류의 비특이적인 면역 반응을 증가시켜 세균성 질병으로부터 어류의 폐사를 방지할 수 있으므로, 어류의 면역증강제 또는 백신과 함께 사용하는 면역보조제로서 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0024] 도 1은 본 발명의 조피볼락 IL-1 $\beta$  genomic DNA 염기서열과 추정 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 조피볼락 IL-1 $\beta$ 의 아미노산서열을 다른 동물에서 알려진 IL-1 $\beta$  아미노산서열과 비교한 것이다.
- 도 3은 계통발생분석에 따른 본 발명의 조피볼락 IL-1 $\beta$  아미노산 서열의 계통수(Phylogenetic tree)를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 조피볼락 IL-1 $\beta$  유전자의 각 조직별 mRNA 발현을 RT-PCR(reverse transcription PCR)을 통해 분석한 것이다.
- 도 5는 조피볼락 백혈구의 미토젠(LPS, Con A/PMA, Poly I:C)의 자극에 따른 경과시간별 IL-1 $\beta$  유전자 발현 수준을  $\beta$ -actin에 대한 상대적인 정량값으로 그래프화하여 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  유전자가 삽입된 재조합 벡터 pET21-SSIL-1beta의 모식도이다.
- 도 7은 SDS-PAGE 방법을 통해 분리된 본 발명의 재조합 단백질(rIL-1 $\beta$ )의 전기영동 사진이다(Lane 1 : 1 $\mu$ l rIL-1 $\beta$ , Lane 2 : 2 $\mu$ l rIL-1 $\beta$ , Lane 3 : 3 $\mu$ l rIL-1 $\beta$ , Lane 4 : 4 $\mu$ l rIL-1 $\beta$ , M : Protein maker).
- 도 8은 본 발명의 재조합 단백질(rIL-1 $\beta$ )을 연쇄구균 불활화 백신과 함께 조피볼락에 투여한 후 경과시간(1주,

2주, 3주)에 따른 라이소자임의 활성을 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 재조합 단백질(rIL-1 $\beta$ )을 연쇄구균 불활화 백신과 함께 조피볼락에 투여한 후 경과시간(1주, 2주, 3주)에 따른 응집항체를 그래프로 나타낸 것이다.

도 10은 조피볼락 두신(head kidney)에 존재하는 대식세포에 본 발명의 재조합 단백질(rIL-1 $\beta$ )을 농도별(1 $\mu$ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml)로 적용한 다음 대식세포의 식균 작용 정도를 화학발광반응(Chemiluminescence response)으로 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 11은 조피볼락 두신(head kidney)에 존재하는 백혈구 세포에 본 발명의 재조합 단백질(rIL-1 $\beta$ )을 농도별(1 $\mu$ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml)로 적용한 다음 백혈구 세포증식 정도를 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 재조합 단백질(rIL-1 $\beta$ )을 조피볼락에 농도별(1 $\mu$ g/ml, 100ng/ml)로 투여한 다음 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*) 공격실험에 따른 조피볼락의 누적 폐사율을 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 제공한다.
- [0026] ‘IL-1 $\beta$ ’는 유해성 감염이나 염증 및 면역반응을 유발하는 초기 급성 반응의 중요한 매개물질 중 사이토카인 중의 하나이고, 생체의 항상성 유지에 기여하는 국소호르몬이다. 따라서 IL-1 $\beta$ 는 염증의 초기에 합성되는 고분자 단백질로서 이의 생물학적 효과는 거의 모든 조직이나 장기에서 발현되는 것으로 알려져 있다.
- [0027] 상기와 같은 특성을 갖는 IL-1 $\beta$ 는 포유동물에서 주로 연구되었으며, 최근에는 비포유류에서도 연구되고 있지만 아직도 데이터가 부족한 실정이다.
- [0028] 한편 ‘조피볼락(*Sebastes schlegelii*)’은 횡대목, 양복락과, 볼락 속에 속하는 어류로서 동남아 연안의 한국을 비롯한 일본 북해도이남, 중국 북부 연안, 발해, 황해에 분포하고, 특히 우리나라에서는 동, 서, 남해 전해역의 얕은 바다의 암초지대에 서식하는 연안 정착성 어종이다. 본 종은 넙치(*Paralichthys olivaceus*)에 비해 성장이 다소 느리지만 돔류 보다는 빠르고, 볼락류 중에서는 성장이 가장 좋은 어종으로 특히 저온에 강하며 우리나라 전 연안에서 월동이 가능하기 때문에 양식 대상 종으로서 가장 많이 사육될 뿐만 아니라, 최근에 시도되고 있는 바다목장화의 대상 종으로서 적합하다고 알려져 있다.
- [0029] 본 발명에서는 아직 밝혀지지 않은 조피볼락의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드 서열 및 이들의 폴리뉴클레오티드 서열을 최초로 규명하였다.
- [0030] 본 발명에서 IL-1 $\beta$  폴리펩티드는 IL-1 $\beta$ 의 아미노산 서열을 갖는 단백질로서, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하되, 이에 한정되지 않고 상기의 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 표시되는 단백질을 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 IL-1 $\beta$  단백질은 포스포릴화, 글리코실화, 단백질 분해 절단 등을 포함한 해독 후 변형을 포함하는 개념이다.
- [0032] 본 발명의 IL-1 $\beta$  단백질은 조피볼락의 조직으로부터 직접 분리하여 제조하거나, 화학적으로 합성하거나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다.
- [0033] IL-1 $\beta$  단백질은 조피볼락의 조직으로부터 직접 분리하여 제조할 수 있다. 세포 또는 조직에 함유된 IL-1 $\beta$  단백질의 분리 및 정제는 많은 공지 방법에 의해 실시할 수 있다. 이들 방법의 예로는 염 침전 및 용매 침전과 같은 용해성을 이용한 방법, 투석, 한외여과, 겔여과 및 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동과 같은 분자량의 차이를 이용하는 방법, 이온 교환 컬럼 크로마토그래피와 같은 전하의 차이를 이용하는 방법, 역상 고성능 액체 크로마토그래피와 같은 친수성의 차이를 이용하는 방법, 등전점 포커싱 전기영동과 같은 등전점의 차이를 이용하는 방법 등을 예시할 수 있다.
- [0034] 또한 IL-1 $\beta$  단백질은 화학적으로 합성할 수 있다. 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당 분야에 널리 공지된 폴리펩티드 합성법을 이용하여 얻을 수 있다. 폴리펩티드는 통상의 단계적인 액체 또는 고체상 합성, 단편 응축, F-MOC 또는 T-BOC 화학법을 이용하여 제조할 수 있다. 특히, 바람직한 폴리펩티드의 제조방법은 고체상 합성방법(solid phase syntheses)을 이용하는 것이다. IL-1 $\beta$ 는 보호된 아미노산간의 응축반응(condensation reaction)에 의하여 통상의 고체상 방법으로, C-말단으로부터 시작하여 그 서열에 따라 순차적으로 진행하면서



합성할 수 있다. 응축 반응 후 보호기 및 C-말단 아미노산이 연결된 담체를 산분해(acid decomposition) 또는 아미놀리시스(aminolysis)와 같은 공지의 방법에 의해 제거할 수 있다. 상기 언급된 폴리펩티드 합성법은 관련 서적에 상세히 기술되어 있다.

- [0035] 또한 IL-1 $\beta$  단백질은 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우, IL-1 $\beta$  단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드(핵산)를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 벡터를 숙주세포로 형질전환하여 IL-1 $\beta$  단백질이 발현되도록 숙주세포를 배양한 뒤, 숙주세포로부터 IL-1 $\beta$  단백질을 회수하는 과정으로 수득할 수 있다. 단백질은 선택된 숙주 세포에서 발현시킨 후, 분리 및 정제를 위해 통상적인 생화학 분리 기술, 예를 들어 단백질 침전제에 의한 처리(염석법), 원심분리, 초음파파쇄, 한외여과, 투석법, 분자체 크로마토그래피(겔여과), 흡착크로마토그래피, 이온교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등의 각종 크로마토그래피 등을 이용할 수 있으며, 통상적으로 순도가 높은 단백질을 분리하기 위하여 이들을 조합하여 이용한다.
- [0036] 본 발명은 또한 IL-1 $\beta$  단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0037] 본 발명의 목적상 상기 폴리뉴클레오티드는 IL-1 $\beta$  단백질을 암호화하는 염기서열로서, 자연에서 분리되거나 인위적으로 합성 변형된 것일 수 있다.
- [0038] 상기한 바와 같은 IL-1 $\beta$  단백질을 암호화하는 염기서열은 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실 또는 삽입에 의해 변형될 수 있으며, 이러한 변형에 의해 발현된 단백질은 이의 생물학적 작용성에 유의한 변화를 포함하지 않아야 한다. 상기한 변형은 이중의 상동성 유전자로의 변형을 포함한다.
- [0039] 따라서 IL-1 $\beta$  단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하되, 이에 한정되지 않고 상기의 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 갖는 염기 서열로 표시되는 것을 특징으로 한다.
- [0040] 본 발명은 또한, 본 발명의 IL-1 $\beta$  단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공될 수 있다.
- [0041] 상기 발현벡터로는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 당업계에 공지된 플라스미드, 과지, 코스미드, 바이러스 벡터 또는 기타 매개체를 의미한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.
- [0042] IL-1 $\beta$  단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 분자는 프로모터/인핸서 서열과 같은 발현 조절 서열 및 기타 전사, 해독 또는 프로세싱에 필요한 서열들과 함께 결합될 수 있다. 조절 서열은 뉴클레오티드의 구성적 발현(constitutive expression)을 지시하는 것뿐만이 아니라 조직-특이적 조절 및/또는 유도성 서열을 포함한다. 발현 벡터의 설계는 트랜스팩션시킬 숙주 세포, 목적하는 발현 수준 등과 같은 요소에 의해 결정될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 발현벡터는 비바이러스성 벡터 또는 바이러스성벡터이다. 바이러스 벡터는 예를 들어, 복제 결손 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노바이러스-연관 바이러스 등이 포함된다. 바이러스 벡터는 다음의 기준을 충족해야 한다: (1) 목적하는 세포에 감염할 수 있어야 하며 이에 따라 적합한 숙주 범위를 갖는 바이러스 벡터가 선택되어야 하고, (2) 전달된 유전자가 적절한 기간 동안 세포에서 보존되고 발현될 수 있어야 하며, (3) 벡터가 숙주에 안전해야 한다. 세포내로 유전자 전달을 위해 사용할 수 있는 다른 바이러스 벡터로는 무린 백혈병 바이러스(MLV), JC, SV40, 폴리오마, 엡스타인-바르 바이러스 파필로마 바이러스, 백시니아, 폴리오마바이러스, 헤르페스 바이러스, 신드비스 바이러스, 렌티 바이러스, 기타 사람 및 동물 바이러스가 포함될 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 상기 발현벡터는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 세포에 도입할 수 있다. 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적 형질감염(transient transfection), 미세주사, 형질도입(transduction), 세포융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포솜 매개된 형질감염(liposome-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기침공법(electroporation), 유전자 총(gene gun) 및 세포 내로 핵산을 유입시키기 위한 다른 공지의 방법에 의해 세포 내로 도입할 수 있다.
- [0045] 본 발명은 또한, 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 어류용 면역증강조성물을 제공한다.
- [0046] 본 발명에서 IL-1 $\beta$  폴리펩티드는 IL-1 $\beta$ 의 아미노산 서열을 갖는 단백질로서, 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하되, 이에 한정되지 않고 상기의 아미노산 서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 아미노산 서열로 표시되는 단백질을

포함할 수 있다.

- [0047] 본 발명의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드는 조피볼락의 조직으로부터 직접 분리하여 제조하거나, 화학적으로 합성하거나, 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻을 수도 있다.
- [0048] 본 발명의 일실시예에 따르면, 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 유전자 재조합 기술을 이용하여 얻었으며, 자세하게는 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리뉴클레오티드를 발현 벡터(pET 21)에 삽입하고, 상기 IL-1 $\beta$  폴리뉴클레오티드가 삽입된 발현 벡터를 대장균(BL21(DE3) PLYS)에 형질전환시키고, 상기 형질전환된 대장균을 배양하여 IL-1 $\beta$  단백질을 유도한 다음, 상기 유도된 재조합 단백질을 정제를 통하여 본 발명의 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  재조합 단백질을 제조하였다.
- [0049] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 상기 방법에 의해 제작된 본 발명의 재조합 단백질(조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$ )이 조피볼락의 면역반응에 미치는 영향을 살펴본 결과, 본 발명의 재조합 단백질이 비특이적 면역반응에 작용하는 라이소자임의 활성을 효과적으로 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 응집항체가 및 대식세포의 식균작용을 증가시키는 것을 실험으로 증명하였다.
- [0050] 또한 다른 일실시예에서는, 본 발명의 재조합 단백질(조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$ )이 직접적으로 병원성 세균에 대한 저항력을 나타내는지 알아본 결과, 병원성 세균인 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)의 공격실험에서, 본 발명의 재조합 단백질을 1 $\mu$ g/ml 투입한 실험군에서 조피볼락의 누적 폐사율이 약30%(7일 쯤)로 나타난 반면, 대조군의 경우 이의 3배에 달하는 약 90%의 누적 폐사율을 보여, 본 발명의 rIL-1 $\beta$ 가 실제로 병원성 세균에 대한 저항력을 효과적으로 증가시킬 수 있음을 입증하였다.
- [0051] 상기와 같은 실험 결과들은 본 발명의 재조합 단백질(조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$ )이 어류의 면역을 효과적으로 증강시킬 수 있음을 증명하는 것이다.
- [0052] 따라서 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 어류의 비특이적인 면역 반응을 증가시켜 세균성 질병으로부터 어류의 폐사를 방지할 수 있으므로, 어류의 면역증가 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0053] 상기한 바와 같은 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  폴리펩티드를 유효성분으로 갖는 본 발명의 조성물은 어류의 면역증가를 위한 사료첨가물의 형태일 수 있으며, 백신과 함께 사용할 수 있는 면역보조제 형태일 수도 있다.
- [0054] 본 발명의 조성물을 적용할 수 있는 어류로는 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니나, 바람직하게는 넙치(광어), 조피볼락, 우럭, 감성돔, 참돔, 능성어, 송어, 농어, 전어, 고등어, 전갱이 및 쥐치 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 조피볼락일 수 있다.
- [0055] 본 발명은 또한, 본 발명의 면역증강조성물을 어류에 투여하는 단계를 포함하는 세균성 질병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0056] 상기 세균성 질병은 어류에서 발생할 수 있는 병원성 세균에 의해 발생할 수 있는 질병이면 특별히 한정하는 것은 아니나, 바람직하게는 스트렙토코커스 이니에 (*Streptococcus iniae*)로부터 발생하는 베타 용혈성 연쇄구균 증일 수 있다.
- [0057] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] <실시예 1>
- [0059] 조피볼락의 준비 및 혈액채취
- [0060] 경남 통영시에 위치한 중앙시장에서 평균체중 400-800g인 건강한 조피볼락 4마리를 구입하였으며, 혈액채취를 위하여 조피볼락을 벤조카인(SIGMA, USA)으로 마취하고 헤파린이 첨가된 3ml 주사기를 사용하여 미부정맥으로부터 말초혈액(Peripheral blood leukocytes: 이하 간단하게 'PBLs' 라 함)을 추출하였다.



- [0061] <실시예 2>
- [0062] 조피볼락 유래의 IL-1 $\beta$  cDNA의 클로닝과 시퀀싱
- [0063] 본 발명자들은 상기 실시예 1로부터 수득한 조피볼락의 혈액으로부터 게놈 DNA를 추출한 후, IL-1 $\beta$  유전자에 해당하는 cDNA의 전장을 획득하기 위해 먼저 조피볼락의 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 즉, 이를 위해 Beack et al.(2007)의 방법에 따라 수행하였는데, cDNA 라이브러리는 ZAP-cDNA Synthesis Kit (Stratagene, USA)을 이용하여 제작하였고, 이때 400bp 이상의 cDNA 단편들을 수거하기 위하여 CHROMA SPIN-400 (Invitrogen, USA)을 이용하였다. 과지 형태의 cDNA 라이브러리를 제작하기 위해서 Packaging 과정을 수행하였다. 4 $^{\circ}$ C에 보관된 과지 라이브러리 10  $\mu$ l를 XL0LR competent cell에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에 15분간 반응하고 NZY broth 300  $\mu$ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에 45분간 반응하였다. 반응 후 100  $\mu$ l를 LB 플레이트 (엠포실린 200  $\mu$ l, IPTG 37  $\mu$ l, X-gal 18  $\mu$ l)에 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간동안 배양한 후, 형성되는 블루와 화이트 콜로니가 자라는 것을 관찰하였다. 배양된 블루와 화이트 콜로니들 중에서 화이트 콜로니를 취해, 엠포실린이 첨가된 LB broth에 접종한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다. 플라스미드 DNA는 SolGent Plasmid Mini-Prep kit (SolGent, Korea)를 이용하여 추출하였다.
- [0064] ESTs 해석을 위해 정제된 플라스미드 DNA를 ABI Prism 3100 DNA sequencer (PE Applied Biosystems, USA)와 Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, USA)로 시퀀싱하였다. 뉴클레오티드와 아미노산 서열 및 multiple sequence alignment는 GENETYX ver. 8.0 (SDC Software Development, Japan)을 사용하여 분석하였다. cDNAs의 서열은 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 BLAST 네트워크 서비스 데이터베이스(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 비교 분석하였다. 뉴클레오티드 서열 비교는 BLASTEX 프로그램을 사용하였다.
- [0065] 그 결과 조피볼락으로부터 수득한 IL-1 $\beta$  cDNA 염기서열과 이로부터 추정되는 아미노산 서열은 도 1에서 나타내었으며, 조피볼락의 IL-1 $\beta$  cDNA 전체 서열 길이는 2514 bp인 것으로 나타났고, 252개의 아미노산을 암호화하는 756개의 뉴클레오티드로 이루어져 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, 엑손과 인트론을 구분하기 위해서 cDNA 염기서열과 genomic DNA 염기서열을 비교한 결과 조피볼락의 IL-1 $\beta$  genomic DNA organization은 5개의 엑손과 4개의 인트론으로 구성되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 3'UTR에는 7개의 RNA instability motifs(ATTTA), polyadenylation signal (AATAAA)과 함께 polyadenylated tail이 포함되어 있었다(도 1 참조).
- [0066] <실시예 3>
- [0067] IL-1 $\beta$  유전자의 아미노산 비교 및 계통발생학적 분석
- [0068] <3-1> IL-1 $\beta$  유전자의 아미노산 비교 분석
- [0069] 포유동물 및 비포유동물과 조피볼락 IL-1 $\beta$ 의 아미노산 서열에 의한 다중 비교(Multiple alignment)를 위하여 NCBI의 데이터베이스에서 BLASTX를 이용하여 검색하였다. 그리고 IL-1 $\beta$ 의 뉴클레오티드와 아미노산 서열 그리고 multiple sequence alignments는 Genetyx ver. 8.0 software (SDC software, Japan)를 이용하여 분석하였다.
- [0070] 그 결과 도 2에서 나타난 바와 같이, Sea bream와 뉴클레오티드 유사성(nucleotide identity)이 62.9%로 가장 높게 나타났고 그 다음으로 Turbot, Halibut, Salmon, Goldfish, Cow, Carp, Frog, Chicken, Dog, Human의 순으로 유사했으며 유사성(identity)는 23.6-62.9%의 분포를 나타내었다. 일반적으로 조피볼락을 포함한 다른 어류의 IL-1 $\beta$  cDNA 서열도 인간과는 낮은 유사성을 나타내는 경향이 있었다.
- [0071] 도 2에서 '\*'는 한국산 조피볼락과 동일한 아미노산 서열을 가리키며, '-'는 결실된 아미노산 서열을 가리킨다. 또한 화살표는 포유동물에 있는 ICE(interleukin-converting enzyme) cut site (aspartic acid residue)를 가리킨다.
- [0072] <3-2> IL-1 $\beta$  유전자의 계통발생학적 분석
- [0073] 조피볼락의 IL-1 $\beta$ 의 계통발생분석은 MEGA4 software package에서 neighbor-joining (NJ)법을 이용하여 분석하

였다. 아미노산 염기서열과 진화론적인 간격은 p-distance를 이용하여 산출하였고, alignment gap은 Mega4에서 complete deletion option을 이용하여 삭제하였다. Human (NP\_000567), Salmon(NP\_001117054), Halibut(BAB86882), Cow(XP\_872748), Sea bass(CAC41006), Sea bream(AAP33156), Chicken(NP\_989855), Turbot(CAC33867), Frog(NP\_001079074), Carp(BAA24538), Dog(ABJ51908) 그리고 Goldfish(CAD12102)와 비교분석하였고 1000번의 bootstrap 반복 수행하여 확인하였다.

[0074] 그 결과 도 3에서 나타난 바와 같이, 조피볼락의 IL-1β는 비포유동물인 어류와 같은 그룹화를 형성하고 있었으며, 인간, 쥐 등 포유동물과는 계통발생 분석학적으로 멀리 위치하고 있었고, 다른 그룹화를 형성하고 있음을 알 수 있었다.

[0075] <실시예 3>

[0076] IL-1β 유전자의 발현분석

[0077]

[0078] <3-1> IL-1β 유전자의 각 조직별 발현분석

[0079] IL-1β의 조직별 발현을 알아보기 위하여 실시예1에서 준비된 조피볼락의 말초혈액, 두신, 신장, 비장, 간, 아가미, 뇌, 장 그리고 근육을 추출하였다. 본 실험에서 사용된 프라이머는 상기 IL-1β 유전자 cDNA 전장 서열(cDNA full-length sequence)을 기초로 하여 제작하였으며, 하기 표 1에 나타내었다.

[0080] 추출한 각 장기들을 트리졸 시약(Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 추출하였고, First strand cDNA synthesis kit (TaKaRa, Japan)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 First-strand cDNA로 합성하였다. 여기서 만들어진 cDNA는 PCR 반응에서 주형(template)으로 사용하였다. reverse transcription PCR(이하 간단하게 'RT-PCR' 이라 함)을 PCR thermal cycler (TaKaRa, Japan)를 사용하여, 94℃에서 30초 denaturation, 57℃에서 30초 annealing, 72℃에서 1분 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 30 cycles을 반응시켰다. 그리고 72℃에서 5분간 post-extension time을 주었다. PCR 후, 그 증폭 산물은 0.5μl/ml EtBr (Ethidium Bromide)이 첨가된 1.5% 아가로스 젤 상에서 전기영동을 실시한 후 ImageQuant 300 (GE Healthcare, USA)을 사용하여, 자외선 상에서 검출되는 밴드와 그 크기를 관찰하여 그 증폭 여부를 확인하였다.

**표 1**

[0081] RT-PCR에 사용된 프라이머 서열

유전자	프라이머 서열(5'→3')		서열번호
IL-1β	포워드	CAACCTCATCTCTTCACCATG	3
	리버스	CAGAACTCTGGGTGTAGGGT	4
β-actin	포워드	TTCCCTCCATTGTTGGTCG	5
	리버스	GCGACTCTCAGCTCGTTGTA	6

[0082] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, PBLs(Peripheral blood leukocytes)와 비장에서 약 200 bp의 밴드를 확인하였고, 그 밖의 다른 장기에서는 발현이 되지 않은 것을 확인하였다. 이러한 결과로 미루어 보아 조피볼락의 IL-1β 유전자는 PBLs와 비장과 같은 조혈기관에 존재하는 것을 확인되었다.

[0083] <3-2> Quantitative real-time PCR

[0084] ① 백혈구 추출

[0085] 조피볼락의 미부정맥에서 추출한 말초혈액(PBLs)을 RPMI-1640 (GIBCO, USA) 배지에 1:1로 희석하여 Percoll (SIGMA, USA)을 이용하여 Nam et al.(2000)의 방법에 준하여 추출하였다. 이때 사용한 Percoll은 100% Percoll 45ml, 10×PBS (Phosphate buffered Saline) 5 ml, 1×PBS 50ml를 혼합하여 45%의 Percoll을 제조하였다. 먼저 제조한 Percoll 3ml를 vacutainer tube에 분주한 다음, 세포현탁액 3ml를 층이 나누어지도록 조심스럽게 분주하여, 400×g로 20분 동안 4℃에서 원심분리를 하였다. 순수 분리한 백혈구들은 DEPC 1×PBS로 3회 세척을 하여

백혈구 펠렛을 사용 전까지 -70℃에 보관하였다.

[0086] ② 추출한 백혈구의 면역유도 자극

[0087] 또한 IL-1β의 면역자극에 의한 유도성을 알아보기 위하여, 백혈구는 RPMI-1640 (GIBCO, USA)에 10% FBS, HyQ Penicillin Streptomycin Solution (HyClone, USA) 및 면역반응유도 미토젠(mitogen)으로 알려진 Con A (70 μl/ml), PMA (0.35 μl/ml) 그리고 LPS (50 μl/ml) 각각을 첨가하여 25℃의 CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 0, 1, 3, 6, 12 그리고 24시간 자극하였다. PBS로 3회 세척하여 펠렛을 사용 전까지 -70℃에 보관하였다.

[0088] ③ 총 RNA 추출

[0089] 총 RNA는 트리졸 시약(Invitrogen, USA)을 사용하여 추출하였다. 즉, 추출한 백혈구에 트리졸 500 μl씩 첨가하여 주사기를 이용하여 lysis하였다. 클로로포름(Invitrogen, USA) 100 μl씩 첨가하여 inverting하여 13,500 rpm으로 15분간 4℃에서 원심분리하였다. 원심분리 후에 상층액을 새로운 E-tube로 옮긴 후에, 이 E-tube와 동량의 이소프로판올 알코올(SIGMA, USA)을 첨가하여 천천히 혼합하여 다시 13,500 rpm으로 15분간 4℃에서 원심분리 하였다. 상층액을 조심스럽게 제거하여 75% DEPC 에탄올 500 μl를 첨가하여 세척하였고, 상층액을 제거하여 상온에서 10분간 자연 건조시켜 DEPC-D.W.로 녹인 후에 사용 전까지 -70℃에서 보관하였다.

[0090] ④ mRNA의 정제

[0091] mRNA는 PolyATtract mRNA Isolation System III Kit(Promega, USA)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 정제하였다. 우선 20×SSC 30 μl와 RNase-free water 1.170 μl를 혼합하여 0.5×SSC를 준비하였고, 20×SSC 7 μl와 RNase-free water 1.392 μl를 혼합하여 0.1×SSC를 준비하였다. 각 시간별로 자극된 백혈구에서 추출한 총 RNA를 미토젠 별(Con A, PMA, LPS)로 pooling하여 RNase-free water 500 μl로 현탁하였다. 그 이후 65℃에서 10분 동안 반응을 시킨 다음 Biotinylated-Oligo(dT) Probe 3 μl와 20×SSC 13 μl를 첨가한 뒤에 10분간 상온에서 방치하였다. 10분간 방치하는 동안 SA-PMPs를 잘 현탁한 후에 magnetic에 붙인 다음 30초 동안 방치한 후에 상층액을 제거하였고, 0.5×SSC 300 μl로 3번 세척한 후에 0.5×SSC 100 μl를 첨가하여 SA-PMPs를 재현탁하였다. 재현탁한 SA-PMPs에 총 RNA 전량을 첨가하여, 10분 동안 상온에서 반응시키면서 1-2분 간격으로 magnetic에 잘 붙을 수 있도록 inverting하였다. 상층액을 버리고 0.1×SSC 300 μl를 다시 첨가하여 4번 세척하였다. 최종적으로 RNase-Free water 100 μl를 SA-PMPs에 첨가하여 잘 현탁시킨 후에 magnetic에 붙인 다음 그 상층액을 새로운 E-tube에 모았다. 다시 한번 SA-PMPs에 RNase-Free water 150 μl를 첨가하여 magnetic에 붙인 다음 그 상층액을 E-tube에 모았다. 이렇게 모여진 250 μl의 mRNA는 cDNA 합성에 사용되기 전까지 -70℃에 보관하였다.

[0092] ⑤ Quantitative Real-Time PCR

[0093] IL-1β mRNA의 수준과 시간별 자극 발현을 알아보기 위하여 수행하였다. 미토젠(mitogen)으로 알려진 LPS, Con A/PMA 및 Poly I:C 각각으로 0, 1, 3, 6, 12 그리고 24시간으로 자극한 조피볼락의 백혈구를 총 RNA 추출하여 cDNA로 합성하여 수행하였다. 합성된 cDNA template 1 μl에 하기 표 2의 프라이머 2 μl, SYBR premix Ex Taq II (TaKaRa, Japan) 12.5 μl를 혼합하여 최종 볼륨을 25 μl로 하였다. 94℃에서 30초 denaturation, 60℃에서 30초 annealing, 72℃에서 1분 extension의 반응을 1 cycle로 하여, 40 cycles을 반응시켰다. 실험의 정확성을 위해 위의 과정을 조건 별로 각각 3회 반복 실험을 수행하였다. PCR machine은 Thermal Cycler DICE Real Time System (TaKaRa Code TP850)를 사용하여 분석하였다.

[0094]

Quantitative Real-Time PCR에 사용된 프라이머 서열

유전자	프라이머 서열(5'→3')	서열번호	
IL-1β	포워드	CTGACTGGTTCATCTGACCAG	7
	리버스	CAGAACTCTGGGTGTAGGGT	8
β-actin	포워드	TTCCCTCCATGTTGGTCG	5
	리버스	GCGACTCTCAGCTCGTTGTA	6

[0095]

그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, 미토젠(mitogen)으로 Poly I:C을 사용한 경우 1시간째 증가하여 그 이후로 발현량이 감소한 것을 알 수 있었으며, Con A/ PMA을 사용한 경우는 시간이 지나갈수록 점차적으로 증가하여 12 시간째에 그 발현량이 최대치를 나타냈으나 그 이후로는 급격히 떨어진 것을 알 수 있었다. 그리고 LPS를 사용한 경우 시간이 지나갈수록 점차적으로 증가하여 24시간째에 그 발현량이 최대치를 나타낸 것을 알 수 있었다. 도 5는 β-actin에 대해 상대적인 정량값을 그래프로 나타낸 것이다.

[0096]

<실시예 4>

[0097]

IL-1β 재조합 단백질의 제조

[0098]

<4-1> 재조합 발현 벡터의 제조

[0099]

재조합 단백질 제작을 위해서 우선 일반 클로닝 벡터에 삽입되어 있는 유전자들을 발현 벡터 (pET 21 vector)로 재 클로닝을 수행하였다. 클로닝 과정은 다음과 같다. 먼저 번역관련 유전자들이 삽입되어 있는 일반 클로닝 벡터(pBluescript SK-)에서 타겟 유전자를 얻기 위하여 제한효소(restrict enzyme) 염기인 *EcoR I-Xho I*로 연결되어 있는 하기 표 3의 유전자 특이 프라이머(gene specific primer)를 제작하였다. 이렇게 제작된 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시킨 후 겔 추출을 통하여 타겟 유전자를 추출한 뒤 *EcoR I-Xho I* pET 21 벡터에 클로닝하여, 재조합 벡터 pET 21-SS IL-1 beta 벡터를 제조하였다. 클로닝 이후 타겟 유전자의 삽입 여부와 아미노산의 서열에 mutation 여부를 sequencing하여 확인하고 재조합 단백질을 제작을 위해 사용하였다. 하기 도 6에서는 본 발명의 재조합 발현 벡터의 개열지도를 나타내었다.

**표 3**

[0100]

타겟 유전자를 얻기 위하여 제한효소 염기인 *EcoR I-Xho I*로 연결되어 있는 유전자 특이 프라이머

프라이머 서열(5'→3')		서열번호	
IL-1β	<i>EcoRI</i> F	cgaattcATGGAATCCGAGATGACATG	9
IL-1β	<i>XhoI</i> R	gcctcgagTTAAGCTCCTCTCGGATG	10

[0101]

<4-2> 재조합 단백질을 생산하는 형질전환 대장균 제조 및 발현 유도

[0102]

IL-1β 유전자가 삽입된 pET 21 벡터를 BL21(DE3) PLYS에 형질전환하였다. 이렇게 중 배양을 통해 소규모로 배양된 대장균의 main culture를 위해서 1/100의 양으로 접종을 하였다. 그 후 재조합 단백질을 유도하기 위해서 OD600 = 0.7로 측정하고 IPTG 0.5 mM을 첨가하여 37°C에서 5시간 동안 재조합 단백질을 유도하였다.

[0103]

<4-3> 재조합 단백질의 정제

[0104]

상기 실시예<4-2>를 통해 재조합 단백질 발현이 유도된 형질전환체들을 6,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 하였다. 그 후 세포 당 용해 버퍼(lysis buffer)를 60ml 첨가하여 재현탁시킨 다음 볼륨이 30ml가 되도록 하였다. 라이소자임을 1mg/ml 첨가하여 30분 동안 얼음에서 shacking을 한 다음 2,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 그리고 10 mM MgSO<sub>4</sub>와 0.01mg/ml DNase을 첨가하여 상온에서 20분 동안 반응 한 후 20,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 그 후에 용해 버퍼를 10ml 첨가하여 재현탁하여 변성 버퍼를 2ml 첨가하여 1시간 동안 얼음에서 shacking하여 0.45 μm로 필터링하였다. His Bind resin

washing을 위하여 1ml의 레진을 첨가한 후 3,000 rpm에서 30초 동안 spin down 한 후 상등액을 버리고 용해 버퍼를 첨가하여 5회 세척하였다. 원심분리한 후 상등액을 취하여 레진을 첨가한 후 4℃에서 4-6시간 동안 돌려주면서 결합을 하였다. 결합이 끝난 후 900 rpm에서 5분간 5회 워싱 버퍼를 이용하여 세척하였다. 칼럼크로마토그래피를 워싱 버퍼로 한번 세척한 후 바인딩 과정에서 얻어진 상등액을 일부 제거한 후 칼럼에 옮긴 다음 flow out시켰다. 아래의 마개를 닫고 Elution buffer를 칼럼에 옮긴 후 피펫팅을 해주어 4℃에서 20분간 반응을 시켰다. Elution buffer에 녹아든 재조합 단백질을 수거한 뒤 다시 한번 0.5ml의 elution buffer를 첨가하고 같은 방법으로 잔류해 있는 재조합 단백질을 수거하였다. 그 후 SDS-PAGE 분석을 통해 재조합 단백질의 순도 및 정제 조건을 결정하였다.

[0105] 이들 재조합 pET 21 벡터 구조체가 재조합 단백질로 발현될 경우 클로닝으로 삽입된 유전자 이외에도 pET 21 플라스미드 벡터 자체에서 아미노산의 펩티드가 연결되어 발현된다. 이 펩티드의 전반부에 6개의 히스티딘으로 구성된 6×His Tag 부위가 있어 상대적으로 강한 양전하를 띄게 되어 음전하의 Ni-column에서 선택적인 흡착이 일어나고 이것을 이용하여 재조합 단백질을 순수 정제하였다. 순수하게 정제한 재조합 단백질은 SDS-PAGE로 관찰했을 때 IL-1β는 약 33kDa (28kDa IL-1β + 5kDa 히스티딘)로써 예상했던 크기로 나타났다(도 7참조). 그리고 정제된 재조합 단백질의 농도는 2.1mg/ml로 나타났다.

[0106] <실시에 5>

[0107] **본 발명의 재조합 단백질인 IL-1β가 조피볼락의 면역반응에 미치는 영향**

[0108] 대조구와 각 실험구 사이의 통계학적 유의성은 Student's t-test로 비교하여 p값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 그리고 재조합 단백질 농도별 실험에서는 one-way ANOVA-test를 실시하여 유의적인 차이가 있으면, Duncan's multiple range test로 평균간의 유의성 (p<0.05)을 분석하였다.

[0109] <5-1> 실험설계 및 준비

[0110] 실험구로는 백신 단독투여구와 백신과 재조합 단백질 혼합투여구로 설정하였고, 대조구로는 PBS(Phosphate buffered Saline)를 이용하였다. 각 실험구마다 전중이 10-15g의 조피볼락 치어 100마리를 이용하였고, 3일 동안 순치시켰다. 백신은 현재 시판되고 있는 넓치 연쇄구균 불활화 백신(대성미생물, 0.3% formalin-killed *S. iniae*)을 이용하였고, 백신에 혼합한 재조합 단백질은 상기 실시예 4를 통해 얻어진 IL-1β로 100ng/ml의 농도로 혼합하여 사용하였다. 실험기간은 총 3주로 매주 마다 치어로부터 혈청을 분리하여 준비하여, 실험 전까지 -70℃에 보관하였다.

[0111] <5-2> 신선 혈청의 분리와 보존

[0112] 실험에 사용한 신선 혈청은 실험어를 벤조카인으로 3-5분간 마취시킨 후 1회용 주사기를 사용하여 미부정맥에서 채혈하여 분리하였다. 채취한 혈액을 60 분간 실온에 방치한 후 4℃에서 1 시간 정도 방치 후 혈병을 수축시킨 후 6,000 rpm에서 5분간 4℃에서 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이렇게 분리된 혈청을 신선 혈청이라 하였으며 실험에 바로 사용하거나 4℃에 보관하여 사용하였다.

[0113] <5-3> 혈청의 라이소자임(lysozyme) 활성 측정

[0114] 본 발명의 재조합 단백질 IL-1β(이하 간단하게 'rIL-1β'라 함)을 투여한 후 기간 경과(1주, 2주, 3주)에 따른 어류의 비특이적 면역계 중 체액성 면역의 일종인 라이소자임 활성을 측정하였다

[0115] 라이소자임 활성은 Lange et al. (2001)의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 마이크로코쿠스 리소데익티쿠스 (*Micrococcus lysodeikticus*)를 현탁액 0.2mg/ml의 농도로 0.05M 나트륨 인산 버퍼(pH 6.2)에 현탁시킨 다음 이 현탁액의 950 μl와 혈청 50 μl를 혼합하여 25℃에 15 분, 30분 그리고 60분 반응시킨 후 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 라이소자임 활성은 unit/ml로 나타내었으며, 1유닛(unit)은 흡광도 값이 0.001/min 감소한 양을 나타낸다.

[0116] 그 결과 도 8에 나타난 바와 같이, 라이소자임 활성은 1 주째에 대조구의 경우 평균 2.885 units/ml로 나타났으



며, 실험구인 백신 단독투여구와 백신+rIL-1 $\beta$ (100ng/ml) 혼합투여구의 경우 평균 각각 1.508 units/ml, 12.659 units/ml 로 나타났다. 특히 2 주째에는 백신+rIL-1 $\beta$ (100ng/ml) 혼합투여구에서 16.202 units/ml로 가장 높은 활성을 보였다. 이를 통해 본 발명의 rIL-1 $\beta$ 가 높은 효율로 어류의 비특이적인 면역반응을 증강시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0117] <5-4> 응집 항체가 측정

[0118] 대조군, 백신 단독투여구 및 백신+rIL-1 $\beta$ (100ng/ml) 혼합투여구로 복강에 100  $\mu$ l씩 주사 후 1, 2 그리고 3주째 채혈하여 혈청을 분리한 다음 분리된 혈청을 이용하여 microtiter 법으로 조사하였다. 즉, 조피볼락으로부터 분리한 혈청을 96 well round bottom plate를 사용하여 각 웰(well)에서 항혈청을 25  $\mu$ l씩 멸균 생리 식염수를 이용하여 2배 단계 희석한 후  $1 \times 10^7$  cfu/ml의 스트렙토코커스 이니에 (*Streptococcus iniae*) FKCs (Formalin Killed Cells)를 동량 넣어 혼합하여 24시간 후에 응집 형성 유무를 관찰하였다.

[0119] 그 결과 도 9에서 나타낸 바와 같이, 백신 단독투여구와 백신+rIL-1 $\beta$ (100ng/ml) 혼합투여구의 경우 점차적으로 증가하여 대조구에 비해 모두 유의적으로 높은 응집항체가를 보였다. 특히 백신+rIL-1 $\beta$  혼합투여구의 경우 2주까지 지속적으로 증가하는 경향을 보였다.

[0120] <5-5> 화학발광반응(Chemiluminescence response) 측정

[0121] 본 발명의 rIL-1 $\beta$ 의 적용에 따른 조피볼락 두신(head kidney, 頭腎)에 존재하는 대식세포의 식균작용을 화학발광반응(Chemiluminescence response)으로 측정하였다.

[0122] ① 두신(head kidney)에 존재하는 대식세포의 준비

[0123] 조피볼락의 미부정맥에서 채혈하여 가능한 한 순환 혈액을 제거한 후 해부하여 두신을 무균적으로 조심스럽게 분리하였다. 이것을 3%의 FBS, 1%의 페니실린과 스트렙토마이신, 0.2%의 헤파린이 함유된 RPMI-1640을 소량 분주한 소형 페트리접시(petri dish)에서 40  $\mu$ m의 나일론 멤브레인(nylon membrane)을 통과시킨 세포 현탁액을 준비하였다. 이 세포 현탁액을 45% 퍼콜(percoll)을 분주해 둔 시험관 위에 조심스럽게 중층시킨 후, 400g에서 30분간 원심분리하여 백혈구를 분리하였다. 분리된 백혈구는 RPMI-1640 medium으로 2회 세척한 다음 0.1% 트리판 블루에서 생존율(viability)을 관찰한 후  $1 \times 10^7$  cells/ml의 농도로 조정하여 microculture well에 각각 100  $\mu$ l씩 분주한 다음 20 $^{\circ}$ C에서 2시간 부착시켰다. 부착시킨 후 각 웰(well) 내의 상등액을 조심스럽게 제거하여 식세포를 준비하였다.

[0124] ② 감작 자이모산(zymosan)의 준비

[0125] 자이모산 0.2g에 어류 혈청 1ml를 첨가하여 20 $^{\circ}$ C, 1시간 반응하였다. 반응한 자이모산을 2,000 rpm에 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 울소니화된 자이모산을 RPMI-1640 medium으로 세척한 후 상등액을 버리고 PBS에 총 25ml가 되게 조정하였다.

[0126] ③ 화학발광반응(Chemiluminescence response)

[0127] 식세포에서 방출되는 Reactive oxygen intermediates (ROIs)는 automatic photoluminometer(Bio-Orbit 1251, Finland)에 의해 정량적으로 분석하였다. 즉 test cuvette는 루미놀 (Sigma, USA) 0.04ml과 세포현탁액 0.1ml를 혼합하여 5분간 실온에서 인큐베이션 한 후 측정 바로 전에 자이모산 0.06ml를 첨가하여 90분간 측정하였다.

[0128] 그 결과 도 10에서 나타낸 바와 같이, 다양한 농도별(1  $\mu$ g/ml, 100ng/ml, 10ng/ml) 본 발명의 rIL-1 $\beta$  시험구에서 대조군에 비하여 유의적으로 높은 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었으며(p < 0.05), 특히 100ng/ml의



농도일 때 대식세포의 식작용이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0129] <5-6> 세포증식 측정

[0130] 본 발명의 rIL-1β의 투여가 조피볼락의 백혈구의 세포증식에 어떠한 영향을 미치는지 측정하기 위하여, 조피볼락 두신 부위에서 백혈구를 분리하여 본 발명의 rIL-1β을 적용한 후 백혈구 세포의 증식을 측정하였다.

[0131] 1×10<sup>5</sup> cell/ml의 농도로 조피볼락 두신백혈구를 분리하여 96-웰 플레이트의 각 웰에 다양한 농도의 본 발명의 재조합 단백질(rIL-1β)과 혼합하여 100 μl 씩 분주하고 25℃, 24시간 동안 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 각 웰(well)에 10 μl cell의 PreMix WST-1 reagent (TaKaRa, Japan)을 첨가하여 4시간 동안 반응시킨 후 흡광도 450nm에서 측정하였다.

[0132] 그 결과 도 11에서 나타낸 바와 같이, 1 μg/ml 와 100ng/ml의 rIL-1β 농도로 자극하였을 때 유의적으로 높은 세포 증식 작용을 가지는 것을 확인할 수 있었다(p < 0.05).

[0133] <실시예 6>

[0134] **본 발명의 재조합 단백질인 IL-1β가 병원성 세균에 미치는 영향**

[0135] 본 발명의 rIL-1β 단독 투여에 대한 시험어의 병원성 세균에 대한 저항력을 조사하기 위하여 국립수산물과학원 병리연구팀에서 분양을 받은 병원성 세균 스트렙토코커스 이니에(Streptococcus iniae) FP5228 균주로 공격실험 하였다. 시험 균주는 BHIB 배지에서 27℃, 24시간 배양한 후 집균하여, 생리식염수로 3×10<sup>7</sup> cfu/ml(OD 600nm = 0.3)이 되도록 현탁시켜 공격 실험용 세균액으로 사용하였다. 공격 실험은 재조합 단백질을 3일 동안 투여한 어체에 스트렙토코커스 이니에 균액을 0.1ml 씩 복강 주사하였다. 공격 실험의 결과는 누적 폐사율로 나타내었다.

[0136] 그 결과 도 12에서 나타낸 바와 같이, 대조구에서 높은 폐사율을 보인 반면, 이에 비해 본 발명의 rIL-1β 투여구는 낮은 누적폐사율을 확인할 수 있었다. 특히 1 μg/ml의 rIL-1β 투여구에서 스트렙토코커스 이니에에 대하여 방어효과가 유의적으로 높게 나타나는 것을 알 수 있었다.

[0137] <실시예 7>

[0138] **본 발명의 재조합 단백질인 IL-1β가 혈액 성분에 미치는 영향**

[0139] 본 발명의 rIL-1β가 혈액 성분에 미치는 영향을 조사하기 위해 혈액 성분을 분석하였다. 우선 실험구로는 rIL-1β 1 μg/ml를 첨가하였고, 대조구로는 PBS를 첨가한 후 1일 반응을 시켰다. 채취한 혈액 중 전혈 3500 μl을 튜브(Axygen Scientific, Inc., USA)에 넣고 2,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 원심분리로 얻은 혈청은 생화학 분석기 (DRI CHEM 4000i, Fuji Photo Film., Co., Japan)를 사용하여 GPT(glutamic pyruvate transaminase), GOT(glutamic oxalacetic transaminase), GLU(blood glucose), TCHO(total cholesterol), TG(triglyceride) 및 TP(total protein)를 검사 항목으로 측정하였다. 측정은 3회 반복 측정하여 평균값을 데이터로 활용하였다.

[0140] 그 결과 하기 표4 에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 rIL-1β 투여군의 경우 GOT가 대조군에 비해서 높게 나온 것을 알 수 있었으나, 전체적으로 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 이를 통해 본 발명의 재조합 단백질의 자체 독성이 없는 것을 알 수 있었다.

표 4

	rIL-1β 1 μg/ml (n=3)	(n=3)
GPT (U/l)	15±3.60	11.66±3.21
GOT (U/l)	29±12.52	21.66±2.30
GLU (mg/dl)	6.33±4.50	2.66±1.15
TCHO (mg/dl)	421.66±35.38	296.33±44.16

TG (mg/dl)	76.66±29.56	52±12.16
TP (g/dl)	5.26±0.95	4.53±0.47

[0142] 결론적으로, 본 발명의 rIL-1β는 비특이적 면역반응에 작용하는 라이소자임의 활성을 효과적으로 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 응집항체가 및 대식세포의 식균작용을 증가시키는 것을 실험으로 증명하였다. 또한 이러한 본 발명의 rIL-1β가 직접적으로 병원성 세균에 대한 저항력을 나타내는지 알아본 결과 병원성 세균인 스트렙토코커스 이니에(*Streptococcus iniae*)의 공격실험에서, 본 발명의 rIL-1β를 1g/ml 투입한 실험군에서 조피볼락의 누적 폐사율이 약30%(7일 쯤)로 나타난 반면, 대조군의 경우 이의 3배에 달하는 약 90%의 누적 폐사율을 보여, 본 발명의 rIL-1β가 실제로 병원성 세균에 대한 저항력을 효과적으로 증가시킬 수 있음을 입증하였다.

[0143] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1

```

1   CTAAATACAGCATCTAAATCTACTGACCTTAAAGGgtaacttgaacttttcttctcattatattttttattct  70
71   taatctgppacpatttttaaacapactcttttctcttgcactactttgataaaactcagtpgptttctcttg  140
141  aaeactctctcccttctcapat aaeactctctactctcactctceaaacttctctcttttctaaataat  210
211  tgtttttttaatctccatctctctgcaaatatpacgpccttagtccaggtgcttctatpaggatpctctpat  280
281  pataaatatattatataaaapattataaaaceaaacaaatataaatataaacattttttctatcttctctcga  350
351  TTTTTCTTCATTGAGAAAAAATGAAATGCGAGATGACATGCAATGATGAGCGAGATGATGAGAGCCCGAGA  420
      H T G N V S E H K S P K
421  TGCCCGAGGGACTGACATTTGAGATTTCCGATCATCCACTGACNATGAAAGCCCGTGGTCAACCTCATCTT  490
      H P E G L D F E I S H H P L T H K R V V H L I F
491  CCGCTTGGAGAGGATTTAAGAGGCGCCCGCTCAGAAACCGTGCAGGSCACTGGAATTCAGAGATGAAAGCCTG  560
      A H E R F K G G R S E T V Q G T S F R D E O L
561  CTCACATCATGCTGGAGAACCTGGTGGTAGgttaapcaaaapacacpacttacttctctatgttttctg  630
      L N I H L E L V V
631  gactcagatcacaaacttttgcattttctgttaactgttaaaccaatcaaacapacttaccacacactatttt  700
701  caactatttacttatttgaactcaactccactcttccactttcacttttgaattttatctaccactatttaaa  770
771  acatcatagcctcagptttatttaattgaactgtatttaccagcttggttaaappccttttgcctttcactg  840
841  ctctcaaaccttaaacctcaacatgattatctcgaactgppppagatpaggattatgaataaatgaatgaat  910
911  tactcagaaagpttgcctcaatttctgactttcaaacacacttctctgtcagpppaaapacaaactctcact  980
981  tctataatpaaagattcaaacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac  1050
      E E
1051  TTGTGTTCCGGTGTGAAATGACCTGCGAGGCTCAGATGACCTGAGCGCGGCGAGGAGGAGTGCAGCATCAG  1120
      I V F G G E S A P P A G I T H T G E E G G S I T
1121  CGACCGCGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  1190
      G G E K R S L V G V G N S H E L H A U H L G G
1191  GGCGGTGGAGCGAGAAAGgttaatttgaactttatttatatttttttttttttttttttttttttttttt  1260
      G G G T K
1261  ataaccttcaaacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac  1330
1331  aatatacaaaaatcaactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactc  1400
1401  acagpppctgacacacacttcttctgacttcttcttcaactgaacctgtatcactctctctctctctctct  1470
      U
1471  TGACCTGAAAGCATGTCAGCTACTTGCACCCCTAGCCCGAGGATTTCTGGGAGAGACTATGAGCTGAGGATC  1540
      H L N H S T V L H P T P R V L G R T V A L G I
1541  GGAAGCCAGAAATCCAAATCTCTAGCTGTGTTGCGGCAAGAGTGGTCCCAATCGGAGCTTGATCTGAAAG  1610
      R G T R P N L V L S C R K N G A N P T L H L E
1611  CGGTGGAAGgttaaacctcactcacttaccatgaaactctcactgaaacttaccacacacttgcacttct  1680
      A V E
1681  aagpppcaaaccttgcacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac  1750
1751  acgptcacttctcactgactgacttctcttctgactgactgactgactgactgactgactgactgactgact  1820
1821  ccttttctcttctcaccacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac  1890
      N K S L L S G A G V S I S P D
1891  GCGACATGATGCGATTTCTCTTCTAGAGACAGACACCGGAGTGAACATGACGACCGCTCATGTCTGTGCG  1960
      S D H V R F L F Y R G D T G V N I T T L H S V A
1961  CTAGCCTGACTGATTCATCTGACACAGCAGACAGGACAGGACAGGACAGGACAGGACAGGACAGGACAG  2030
      Y P D H F I C T A E G D N K P L E H G H E S A
2031  AACCTCTACCGGAGCTTCAACATCCGAGAGGAGGCTTAAgccccacacttgaagagagaaatTTGATTA  2100
      N L Y R T F N I R E E R *
2101  TGAACACTGCACCTACCAATGCTGCTAAAGAGCCTTCTGCAAGTATTGCAAGATGTCTATTACTGTATG  2170
2171  TACCAAGTACAGAAAGTAAATATTTCGTGATTGACATAGTCAAGCCTGACGAGAAAGTGGACCCATT  2240
2241  GTGCTATCAGGTGAGCAGCCTGTATTIIATTTGTGCTGAATGACATGACACACTGTTATTGCTTTTATCT  2310
2311  ATTAATTTATTTATCTATTTTGCACGATTTTAAACATATGATIIATTTTTAAATCTGCTTACTAATAAT  2380
2381  TATTTAATTCATGTGCGAGTGAATATTIIAATAAAGCCTTGTGAAGCTGAAAGAAAGAAAGAAAGAAAG  2450
2451  AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  2514

```

도면2a

Korean rockfish	1:-----MESEMTCNVSEMSPKMPEGLDFEISHHPLTKRVVNLIFA 41
Bastard halibut	1:-----MESKMECNVSGMWSAKMPQGLNLEISHHPMTMRSVVNLIIA 41
Atlantic salmon	1:-----MEFESNYSLIKNTSESKAWSSKLPQGLDLEVSHPHITMRHIANLIIA 47
Sea bream	1:-----MESEMTCNVREMSKMP EGLGLEIAHHPITMKSVVNLVIA 41
Turbot	1:-----MEYNMECNMSEMSKMPQGLLEISHHPMTMRRVVNLIIA 41
Goldfish	1:---MECIGHYILHSDALKKIDITYPDSAGFDEPDCPDLHGMQGDMDHEDIKLEPSPHPHSMKVVNI 67
Carp	1:MACHEYYHQLDLSEAFETDSAIFYSDSADSDELDCPDQSMQSDCMH-DIKLELSSPHSMRQVNI 69
Cow	1:-----MATVPEPI NEMMAYYS-DENELLF EADGP-KQMKSCIQHLDLGSMDGN IQLQISHQFYNKS 60
Dog	1:-----MAAVPELTSEMAYSSNMNDLFF EADGPGNDVKCCQDLNHSSLVDEG IQLQVSHQLCNKS 62
Frog	1:-----MALVPDLSSIPMEGYSGDDEM FYSDSPSGMKDDMGAAGMGSSTS HCSLDLHVQITHGKGLSHS 64
Rat	1:-----MATVPELNCEIAAF-DSEENDLFF EADRP-QKIKDCFQALDLGCP-DESIQLQISQGLDKS 59
Human	1:-----MAEVPPELASEMMAYYSGNEDDLFF EADGPK-QMKCSFGQDLDL-CPLDGGIQLRISDHYYSKG 60
Chicken	1:-----MAFVPDLD-VLESSSLSEETFYG-PSCLC-LQKKPRLDSE-HTTVDVQVTVRKGRGA-RS 55

Korean rockfish	42:MERFKGGRSETVQGTGFRDEDLLNIMLENLYVEEIVFGESEAPP-----AQITWTGEEQ-CSITDGEKRS 105
Bastard halibut	42:MERLKGSHSESVLSTFTDENLLNIMMENIYXEHIVCE RSSSP-----DQFSRRGGYT-CNITDSQKRN 105
Atlantic salmon	48:MERLKGGEVYTGTEFKDKDLNLFLESAAVEEHIVLELESAPPTS RREAFSSTSQY-ECSVTDSEMK 115
Sea bream	42:MERLKGIVLDS PRGTEFTDENLLNILL ESAVEERTVFERTAKPA-----QYTYNFQSL-YSVMDSEGRH 104
Turbot	42:MERLRAGAGSEPLGTEFRDENLLSVMLESI VE EHVIFERS SPP-----DQFSRTGVHR-CSVTDEQKRN 105
Goldfish	68:VERLKHIKEMS--SGKFCEDALLNF ILENI EERLWKPLMVSQT-----YSKSRTLGCTICDKYKKT 128
Carp	70:VERLKHIKEMS--SGKFCDE ELLGF ILENI EERLWKPLNETP I-----YSKTSRTLGCTICDKYKKT 130
Cow	61:FRQVSVIVAMEKLRN--SAYAHV FHDDLRSLIFSE EEPVIFET-SSDEF-LCDAPV-QSIKKQLQD 125
Dog	63:LRHFVSVIVALEKLRN--PCPQV LQEDDLKSI FCYIFEE EPI ICKT-DADNF-MSDAA M-QSVDCKLQD 126
Frog	65:FRKAVLVVAVEKLRN--RGKERF FGDEDLGLLDSIFVE EEIFGSQAKETYASASTYRYQRATTCR IKD 131
Rat	60:FRKAVSLIVAVEKLRNPMSCPWSFGQEDPSTFFSIFEE EEPVLCDSWDDDLVCDVPI-RQLHCLRD 128
Human	61:FRQAASVVVAMDKLRKMLVPCPQT FQENDLSTFFP I FEE EPI FFDTKDNEAY-VHDAPV-RSLNCTLRD 128
Chicken	58:FRRAAVLVVAMTKLLR--RPRSRDFADSDLSALLEEVF--EPVTFQRLESSYAGAPAFRYTRSGSFDIFD 121

도면2b

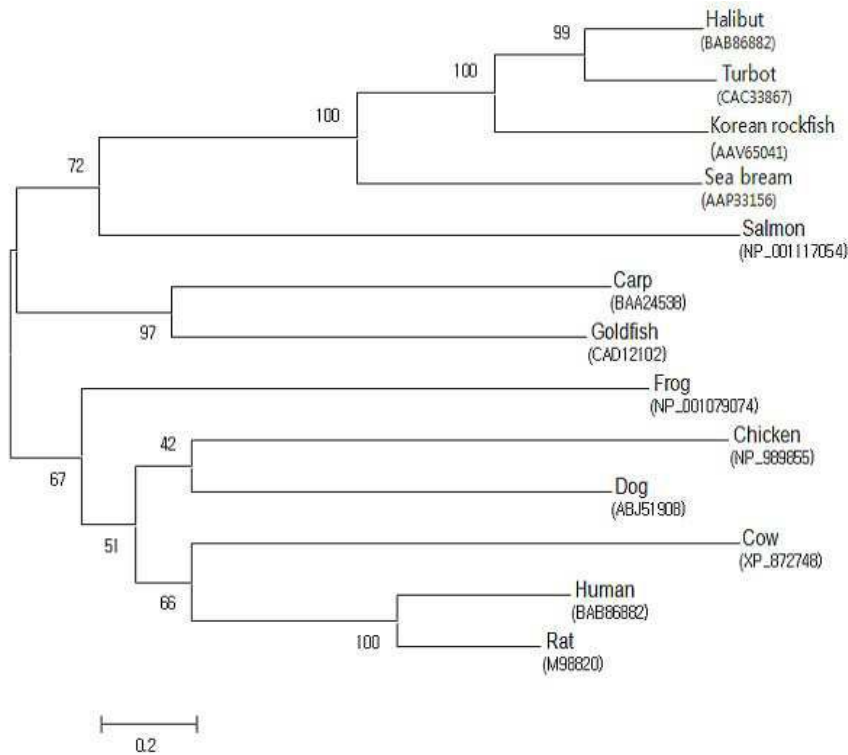
Korean rockfish	105:LV-----QVQNSMELHAVMLQGGGTTK VHLNMSTYLHPTP-RVLGRTVALGIRGTNPMLYLCCRK-NGAN 169
Bastard halibut	105:FI-----LVQNSMELHAVMLQGGGSSNRKVLNLMSTYVHPSP-TIEARPVVLG IKDITD--FFLSQK-NGAE 167
Atlantic salmon	116:WV-----LMSEAMELHAVMLQGGGSGYHKVHLNLSTYVTPVP IETKARPVALG IKGSN--LYLSCSK-SGGR 178
Sea bream	105:LV-----RVPNSMELHAVMLQGGTGMQVGLNMATYLPTP-SAEAVTYLCKIDTN--LYLSCHK-EGDD 166
Turbot	106:FV-----LVRNSMELHAVMLQGGSDNRKVLNLMSTYVHPS-STARPVVALGIRGTN--LYLSCQ-EDGV 167
Goldfish	129:LVQSNKLMNEDLHLKAVTL SAGNIQYKVRFSMSTYLSAP-QNKGPVCLAISNSN--LYIACTESDGS 197
Carp	131:MQGSKLSDEPLHLKAVTL SAGAMQYKVFMSSTFVSSAT-QKEADPVCLGISNSN--LYLACTQLDGS 195
Cow	126:REQKSLVLS--PCVYLKALHLLSGEMNREVVFMSFV-----QGEEEDNKIPVALG IKDKNLYLSC--V 185
Dog	127:ISHKYLVL SN--SYELRALHLNGENNKQVVFMSFV-----HGDESNNKIPVVLG IKDKNLYLSC--V 186
Frog	132:TSNKCFVMQFKHENAQLVALQLQGANIQREEKVSMAFY--ATQPHGSGSKRPVALGLAGKNLYLSCRAT 198
Rat	129:EQKCLVLS--PCE LKALHLNGQNI SQQVVFMSFV-----QGETSNDKIPVALGLKGNLYLSC--V 188
Human	129:SQKSLVMSG--PYELKALHLGGQMEQQVVFMSFV-----QGEESNDKIPVALGLKEKNLYLSC--V 188
Chicken	122:INQKCFVLES--PTQLVALHLQGPSSSQKVRNIALYRPRGRGSA GTGQMPVALG IKGYLYMSC--V 186

Korean rockfish	170:PTLHLEAVENKSLSSGAGVSI SPDSDMVRFLFYRQDTG-VNITTLMSVAHPDWFICTA--EQDNKPLEMC 238
Bastard halibut	168:PTLHLE RVENKCDL-----EAFSRDSEMVRFLFYKQDGGVSI STLMSARFPNMYISTS--EQDNRPVMVG 231
Atlantic salmon	179:PTLHLE EVANKEQL-----KSI SQQSDMVRFLFYRRTNG-VDITLSE SAGFRMWFISTDMQDNTKPVDMC 243
Sea bream	167:PSLHLEAVDDKDSL-----LRITP GSDMARFLFYKHVTG-LNMS TLVSVFPMYI STA--EENKPVDMC 229
Turbot	168:PTLHLEE VEDKSSL-----LAISGESDMVRFLFYKRD SG-VNITLMSARFPNMYISTS--EQDNKPYEMC 230
Goldfish	198:PILILKEVSGPLMT-----IKVGDQMSYDSSLFFRKE TG-TAYNTFESVYKPYGMYI STAFDDWEKRYEMIQV 260
Carp	188:PVLLI LKEASGSVNT-----IKAGDPN--D SLLFRKE TG-TRYNTFESVYKPYGMYI STAFDDWEKRYEMIQV 260
Cow	186:KKGD-PTLQLE EVDPKYYPKRMMEKRFVFNK-----TEIKNTVEFESVLYPNWYISTSQIEERP VFLGHF 250
Dog	187:MKDGK-PTLQLEKVDPKYYPKRMMEKRFVFNK-----TEIKNTVEFESSQYPNWYISTSQVEGMPVFLGNT 251
Frog	199:EDGQD SPKLYLEISNIKDVKGEDLNRFI FMKSQDGLNETSTNSFESVAFPGWYISTSQRENELVGMHQ 268
Rat	189:MKDGT-PTLQLE SVDPKYYPKRMMEKRFVFNK-----IEVKTVEFESAQFPNMYISTSQAEHRPVFLGNS 253
Human	189:LKDDK-PTLQLE SVDPKYYPKRMMEKRFVFNK-----IEINMKLEFESAQFPNMYISTSQAEHMPVFLGGT 253
Chicken	187:MSGTE-PTLQLE EADVMDRIDSVELTRFI FYR-LD SPTEGTTT-RFESAAPFGWFI CTSLQPRQPVGI TMQ 253

도면2c

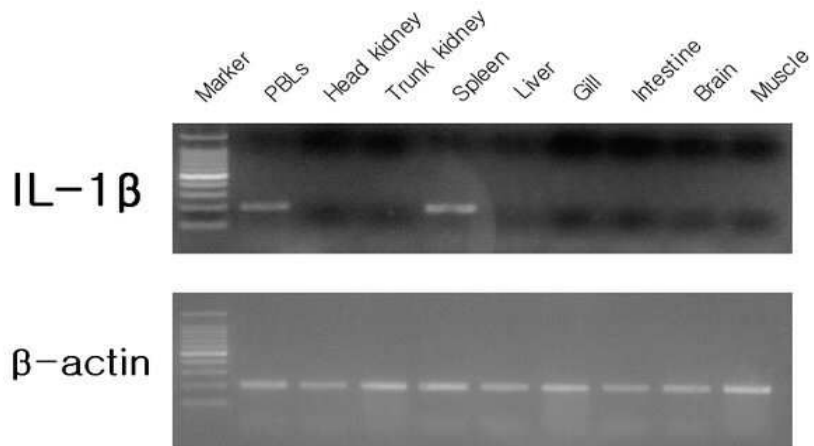
Korean rockfish	237: MESAN~LYRTFNI REEA~	252
Bastard halibut	232: QKNAR~CYQTFN IQHQS~	247
Atlantic salmon	244: QKAAPNRLTTFT IQRHN~	260
Sea bream	230: QESAR~RHR IFKFLPPK PEVEGGEC	253
Turbot	231: QESAQ~RYQTFS IQRQI~	246
Goldfish	261: PTDRTTNFT LED~	272
Carp	261: PTTRTTNFT LEDQKR I~	276
Cow	251: RGGQD I TDFRMTLSP~	266
Dog	252: RGGQD I TDFMEFSS~	266
Frog	269: K NQEA IKDF NLFVSI~	283
Rat	254: NG~RD I VDFTEPVSS~	268
Human	254: KGGQD I TDFTMQFVSSL~	270
Chicken	254: PDQVN IATYKLSGR~	267

도면3

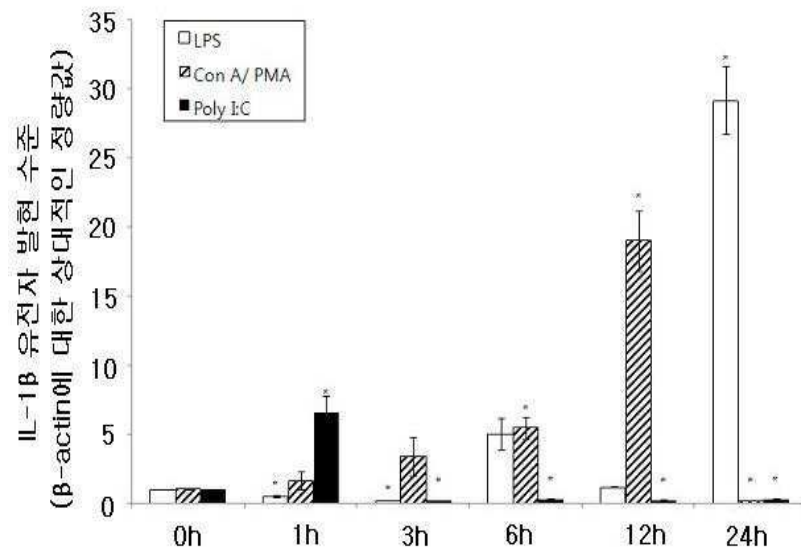




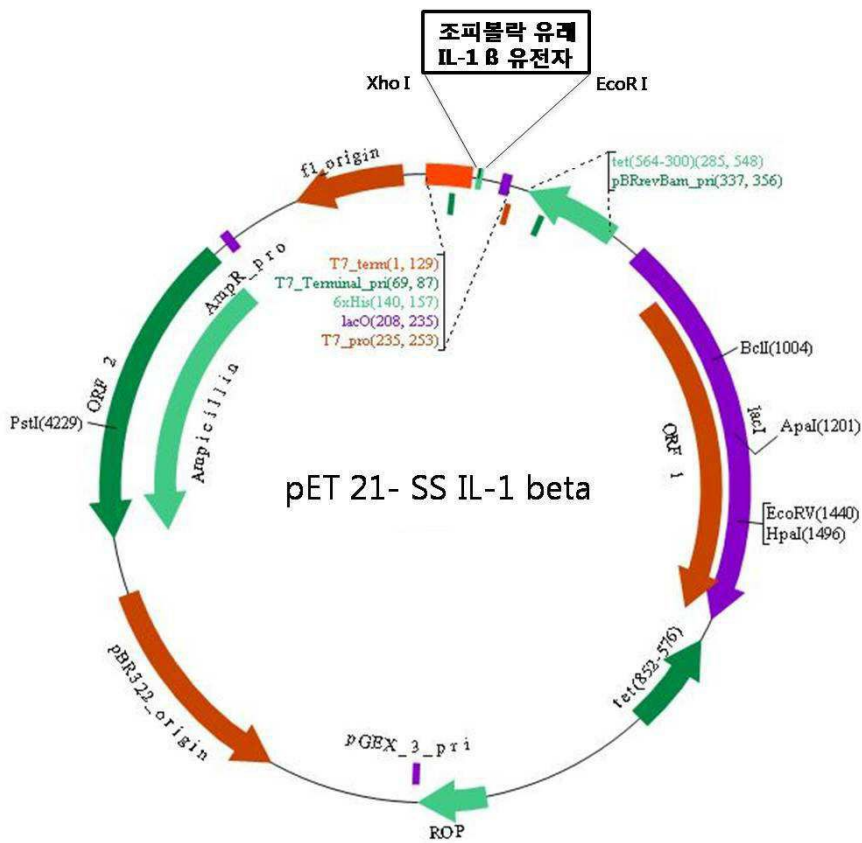
도면4



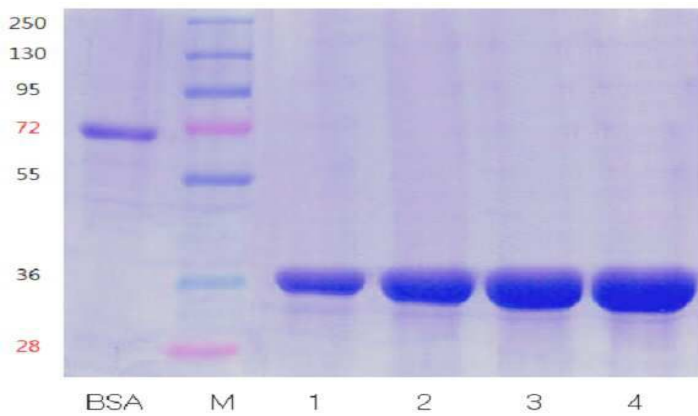
도면5



도면6

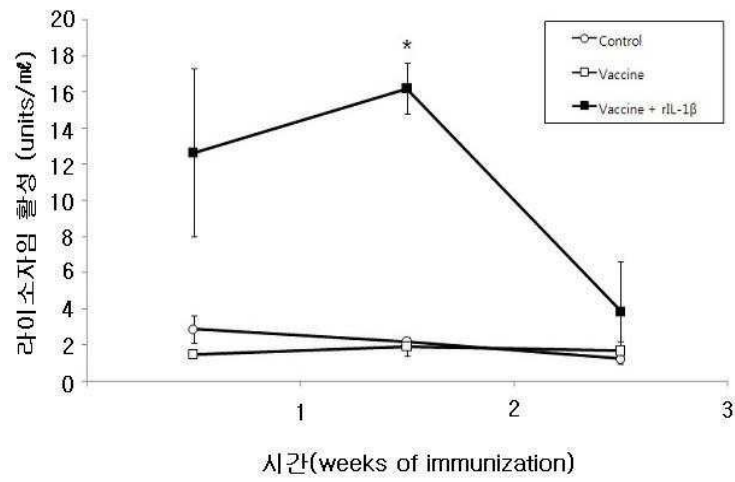


도면7

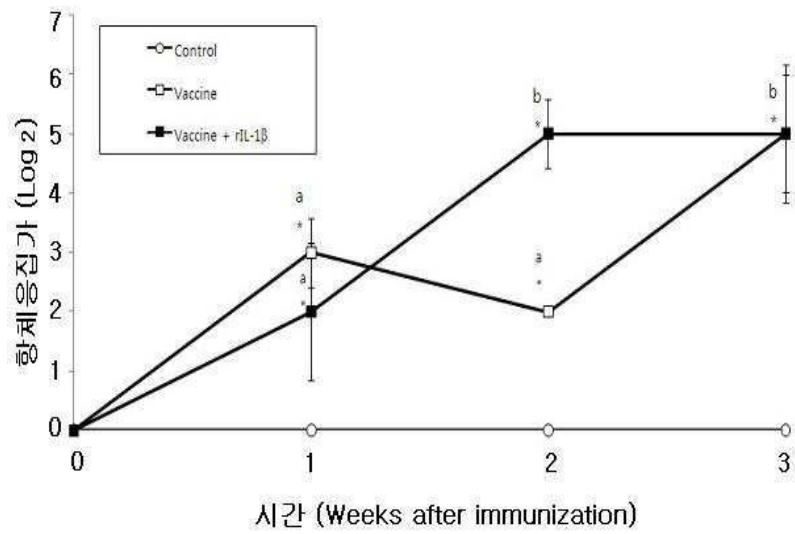




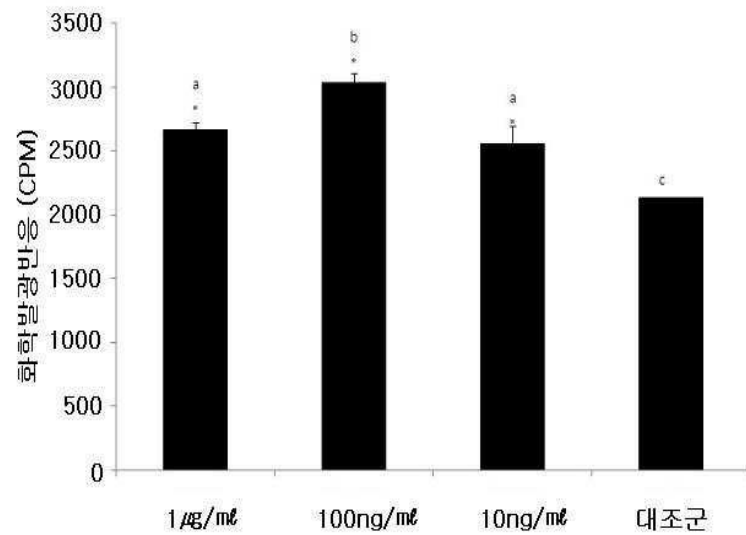
도면8



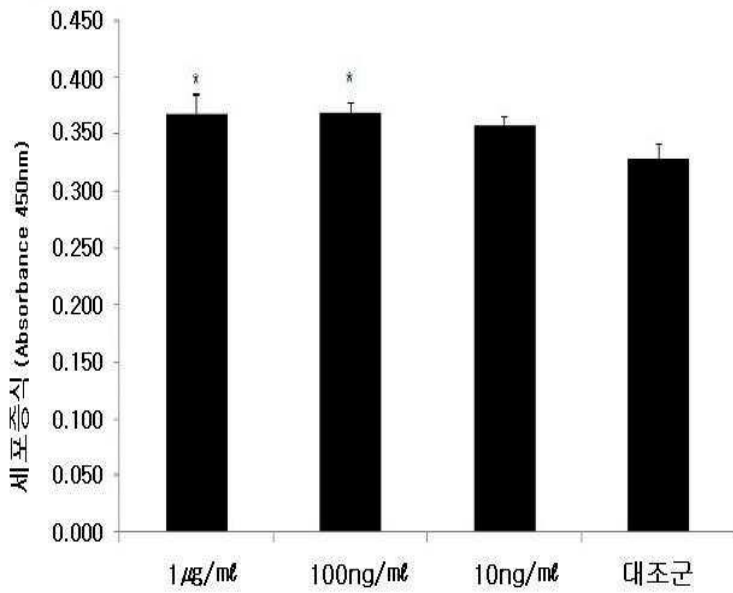
도면9



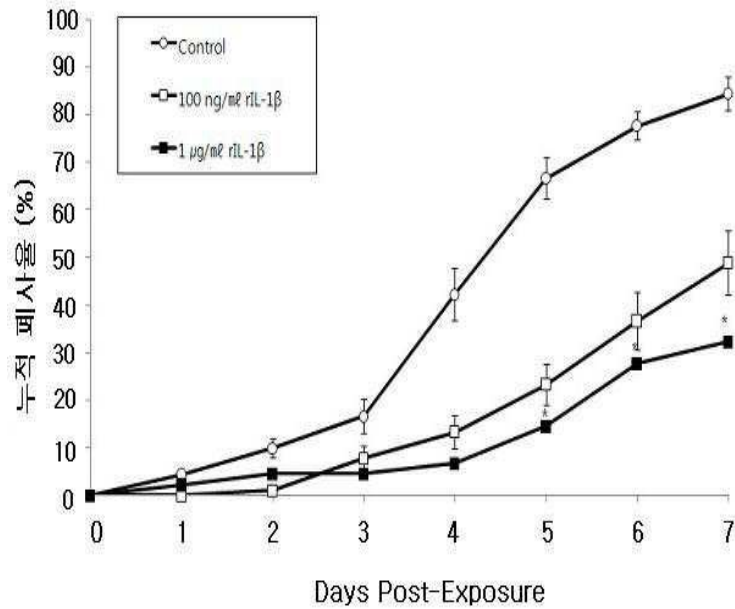
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> The polypeptide derived from seabastes schlegelii and Immune Booster Composition for fish Comprising thereof
- <160> 10
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1

<211> 756  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> polynucleotide sequences of korean rockfish  
 <400> 1  
 atggaatccg agatgacatg caacgtgagc gagatgtgga gcccgaagat gcccgagga 60  
 ctggactttg agatttccca tcatccactg acaatgaagc gcgtggtcaa cctcatcttc 120  
  
 gccatggaga ggtttaaggg cggccgctca gaaacctgc agggcactgg attcagagat 180  
 gaagacctgc tcaacatcat gctggagaac ctggtggaag aggaaattgt gttcgggtgt 240  
 gaatcagctc caccagctca gatcacctgg acgggcgagg aacagtgcag catcaccgac 300  
 ggcgagaaga ggagcttagt tcaggtccaa aacagcatgg agctccacgc agtgatgctg 360  
 cagggaggcg gtggcaccac aaaagttcac ctgaacatgt cgacctactt gcacctaca 420  
 cccagagttc tgggcagaac tgtggtctg ggcatccgag gcacaaatcc aaatctctac 480  
 ctgtgttgcc gcaagaatgg tgccaatcca accttgcatc tggaggcggg ggagaacaaa 540  
  
 agtctgttga gtggagcggg tgtgagcatc agccccgaca gcgacatggt gcgatttctc 600  
 ttctacagac aggacaccgg ggtgaacatc accacctca tgtctgtcgc ccacctgac 660  
 tggttcatct gcacagcaga gcaggacaac aagccgttgg aaatgtgcat ggagtccgcc 720  
 aacctctacc ggaccttcaa catccgagag gaggct 756

<210> 2  
 <211> 252  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> amino acid sequences of korean rockfish  
 <400> 2  
 Met Glu Ser Glu Met Thr Cys Asn Val Ser Glu Met Trp Ser Pro Lys  
  
 1 5 10 15  
 Met Pro Glu Gly Leu Asp Phe Glu Ile Ser His His Pro Leu Thr Met  
 20 25 30  
 Lys Arg Val Val Asn Leu Ile Phe Ala Met Glu Arg Phe Lys Gly Gly  
 35 40 45  
 Arg Ser Glu Thr Val Gln Gly Thr Gly Phe Arg Asp Glu Asp Leu Leu  
 50 55 60

Asn Ile Met Leu Glu Asn Leu Val Glu Glu Glu Ile Val Phe Gly Cys  
65 70 75 80

Glu Ser Ala Pro Pro Ala Gln Ile Thr Trp Thr Gly Glu Glu Gln Cys  
85 90 95

Ser Ile Thr Asp Gly Glu Lys Arg Ser Leu Val Gln Val Gln Asn Ser  
100 105 110

Met Glu Leu His Ala Val Met Leu Gln Gly Gly Gly Gly Thr Thr Lys  
115 120 125

Val His Leu Asn Met Ser Thr Tyr Leu His Pro Thr Pro Arg Val Leu  
130 135 140

Gly Arg Thr Val Ala Leu Gly Ile Arg Gly Thr Asn Pro Asn Leu Tyr

145 150 155 160

Leu Cys Cys Arg Lys Asn Gly Ala Asn Pro Thr Leu His Leu Glu Ala  
165 170 175

Val Glu Asn Lys Ser Leu Leu Ser Gly Ala Gly Val Ser Ile Ser Pro  
180 185 190

Asp Ser Asp Met Val Arg Phe Leu Phe Tyr Arg Gln Asp Thr Gly Val  
195 200 205

Asn Ile Thr Thr Leu Met Ser Val Ala His Pro Asp Trp Phe Ile Cys  
210 215 220

Thr Ala Glu Gln Asp Asn Lys Pro Leu Glu Met Cys Met Glu Ser Ala  
225 230 235 240

Asn Leu Tyr Arg Thr Phe Asn Ile Arg Glu Glu Ala  
245 250

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1beta forward primer(RT-PCR)

<400> 3

caacctcacc tcttcacccat g

<210> 4

<211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> IL-1beta reverse primer(RT-PCR)  
 <400> 4  
 cagaactctg ggtgtagggt 20  
 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> beta-actin forward primer  
 <400> 5  
 ttccctcca ttgttggtcg 20  
 <210> 6  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> beta-actin reverse primer  
 <400> 6  
 gcgactctca gctcgttgta 20  
  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> IL-1beta forward primer(Quantitative Real-Time PCR)  
 <400> 7  
 ctgactggtt catctgacca g 21  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> IL-1beta reverse primer(Quantitative Real-Time PCR)  
 <400> 8

cagaactctg ggtgtagggt 20  
<210> 9  
<211> 27  
<212> DNA  
<213>  
Artificial Sequence  
<220><223> IL-1 beta EcoRI F  
<400> 9  
cgaattcatg gaatccgaga tgacatg 27  
<210> 10  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> IL-1 beta XhoI R  
<400> 10  
gcctcgagtt aagtcctct cggatg 26