

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0140388 (43) 공개일자 2012년12월31일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/37 (2006.01) C12N 9/52 (2006.01) C07K 7/00 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0060094 (22) 출원일자 2011년06월21일 심사청구일자 2011년06월21일	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내 (72) 발명자 이정섭 광주광역시 서구 풍암동 대주파크빌 202동 1305호 박정은 광주광역시 광산구 수등로258번길 10, 우미아파트 101동 201호 (신가동) 박종우 광주광역시 광산구 장수동 179 (74) 대리인 특허법인세신

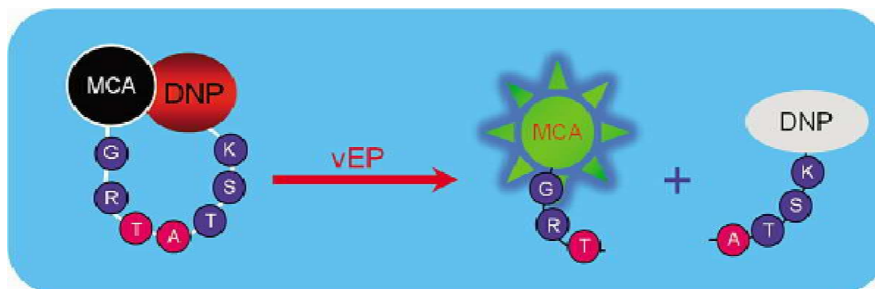
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **기질특이성이 광범위한, 세균 유래의 단백질분해효소에 대한 기질 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 기질특이성이 광범위한, 단백질분해효소에 대한 형광성 발광기질 및 이를 포함하는 진단키트에 관한 것이다. 본 발명은 절단자리가 분명하지 않은 대부분의 단백질 분해효소의 발광기질 제작이 가능함을 보여줄 뿐만 아니라, 제작된 기질을 이용하여 단백질 분해효소의 활성을 매우 정확하게 측정할 수 있고, 세균감염 과정에서의 분비 정도를 모니터링함으로써 세균의 존재유무를 알아낼 수 있어 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

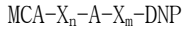
과제고유번호	2010-0026307
부처명	교육과학기술부
연구사업명	중견연구자 지원사업(핵심연구-협동)
연구과제명	생물물리학-나노기반기술-세포생물학의 융합을 통한 세균 단백질분해효소의 염증유발기작
주관기관	조선대학교산학협력단
연구기간	2010.09.09 ~ 2013.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0017022
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자 지원사업(지역대학우수과학자)
연구과제명	VEP 단백질분해효소에 의한 염증반응 매개인자의 유도발현기작
주관기관	조선대학교산학협력단
연구기간	2009.05.01 ~ 2012.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	K204958012
부처명	조선대학교
연구사업명	해양생물 가공산업화 연구용역
연구과제명	완도특산해조류 및 무척추동물 유래가능성 시제품연구 및 개발연구용역
주관기관	조선대학교
연구기간	2010.06.01 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

세균으로부터 유래한 분비형 단백질분해효소에 특이적인 기질로서 하기 화학식 1의 특징을 갖는 것인 형광발광 기질.

<화학식 1>



여기에서, 상기 구조는 MCA와 DNP가 결합된 환형구조이다.

여기에서, X는 친수성 아미노산을 포함하는 모든 종류의 아미노산이며, A는 소수성 아미노산이다.

여기에서 n+m의 값은 6 내지 19이다.

여기에서 n, m은 2 이상의 정수이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 세균은 패혈증 비브리오균인 것인 형광발광기질.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 비브리오균은 *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, 및 *Vibrio metschnikovii* 으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 형광발광기질.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 *Vibrio vulnificus*는 *Vibrio vulnificus* ATCC29307인 것인 형광발광기질.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단백질분해효소는 메탈로프로테아제인 것인 형광발광기질.

청구항 6

제 1항 내지 5항의 형광발광기질을 포함하는 세균으로부터 유래한 단백질분해효소 진단 키트.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 단백질분해효소에 의해 상기 형광발광기질의 아미노산 A의 N-말단쪽의 펩타이드 결합이 가수분해되어 DNP와 결합되어 있던 MCP의 발광에 의해 단백질분해효소의 유무 및 함량을 측정하는 것을 특징으로 하는 진단 키트.

명세서

기술분야

[0001] 기질특이성이 광범위한, 단백질분해효소에 대한 형광발광기질 및 이를 포함하는 진단키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비브리오 패혈증균은 바다에 서식하는 그람음성 세균으로, 염 농도가 1-3%인 배지에서 잘 번식하는 호염성 세균이다. 이 세균은 *Vibrio parahaemolyticus*와는 달리 젖당(lactose)을 분해한다는 사실이 밝혀져 1979년에 *Vibrio vulnificus*(*V. vulnificus*)로 명명되었다. 비브리오 패혈증은 *Vibrio vulnificus*(*V. vulnificus*)에 의한 감염으로 장관독소와 함께 식중독을 유발하고 혈액 내로 강력한 항원을 분비함으로써 독성 쇼크증을 유발하는 것으로 알려져 있다. 비브리오균은 짧은 잠복기를 거쳐 상처감염증, 원발성 패혈증을 유발하며, 오한, 발열 등의 전신증상과 설사, 복통, 구토, 하지통증 및 다양한 피부병증을 유발시킨다. 비브리오 패혈증은 여름철 해안지역을 중심으로 주로 발생하여, 만성 간질환 등 저항력이 약한 허약자들이 어패류를 생식하거나 해안지역에서 낚시 또는 어패류를 손질할 때 균에 오염된 해수 및 갯벌 등으로부터 피부상처를 통해서도 감염된다. 잠복기는 약 1-2일이며, 피부감염의 경우는 약 12시간 정도인 것으로 알려져 있다. 비브리오균 감염에 의한 치사율은 40-50% 정도로 매우 높기 때문에 조기진단 및 신속한 치료가 필수적이다.

[0003] 이러한 비브리오균의 병원성은 비브리오 균종이 분비하는 단백질 분해효소에 의한 것으로 알려져 있다. 일반적으로 단백질분해효소는 특정서열을 인지하여 C-말단 쪽 펩타이드 결합을 가수분해하는 경우가 대부분이다. 그러나 대부분의 단백질분해효소는 절단서열에 특이성이 없는 특성을 가지고 있어, 이 효소들에 대한 기질 개발이 매우 미흡한 실정이다.

[0004] 한편, 본 발명자들은 *V. vulnificus* ATCC29307 균주로부터 분비되는 메탈로프로테아제계의 단백질분해효소(vEP)를 암호화하는 유전자를 클로닝하여 염기서열을 분석하였으며, 유전자를 대장균에서 과발현시킨 후 순수 분리하여 vEP의 생화학적 특성을 분석한 바 있다(Chang *et al.*, J. Bacteriol. 187:6909-6916, 2005; Chang *et al.*, J. Bacteriol. 189: 6832-6838. 2007).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에, 본 발명자들은 비브리오균으로부터 유래한 단백질분해효소인 vEP의 효소 kinetics를 규명하는 과정에서 vEP는 혈액응고 인자를 포함 거의 대부분의 단백질을 분해하지만, 절단서열에 특이성이 없고, 다만 카르복실 방향 소수성 아미노산의 N-말단 쪽 펩타이드 결합을 가수분해하는 특성을 지니고 있다는 사실을 확인하고 이러한 vEP의 절단특성과 인지하는 아미노산 서열 결과를 기초로 MCA-DNP quenching 특성을 이용하여 매우 민감한 vEP의 형광 발광기질을 합성할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명은 절단서열에 특이성이 없는 단백질분해효소에 대한 기질을 제작하려는 최초의 시도으로써, vEP 단백질분해효소에 대한 기질을 개발하는데 그 목적이 있다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 형광발광기질을 포함하는, 세균 유래의, 특히 비브리오균 유래의 단백질분해효소를 탐지함으로써, 비브리오균 감염여부를 진단하는 비브리오균 진단 키트를 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 N-말단에 MCA (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl - 및 C-말단에 DNP(ϵ -2,3-dinitrophenyl)Lys-amide를 필수 구성으로 하여 중심부에 소수성 아미노산이 하나이상 포함된 7개 아미노산 서열로 이루어진 형광발광기질을 제공한다.

[0009] 상기 형광발광기질은 특히 패혈증 비브리오균 유래의 단백질분해효소에 민감한 기질로서, 아직 잘 밝혀지지 않은 비브리오균 유래의 단백질분해효소의 효소 kinetics를 규명하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [0010] 또한, 상기 형광발광기질을 포함하는, 비브리오균의 감염을 진단하는 비브리오균 진단 키트를 제공한다.
- [0011] 상기 진단 키트는 비브리오균과 같은 세균의 존재유무를 알아내는데 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 세균감염 과정에서 나타나는 세균 유래의 단백질분해효소의 분비 정도를 모니터링할 수도 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 해결 수단, 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용, 실시예 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 패혈증 비브리오균 유래의 단백질분해효소에 대한 형광발광기질 및 이를 포함하는 비브리오균 진단키트에 관한 것으로, 본 발명의 형광발광기질 및 진단키트를 이용하여 아미노산의 N-말단 쪽 펩타이드 결합을 가수분해하는 특성을 지니고 있는 단백질분해효소의 활성을 매우 정확하게 측정할 수 있을 뿐만 아니라, 세균감염 과정에서 세균 유래의 단백질분해효소의 분비 정도를 모니터링함으로써 세균의 존재유무를 알아낼 수 있어 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 재조합 단백질 분해효소(vEP) 생산을 위한 유전자 클로닝 단계로, PCR을 이용하여 1,080 bp 크기의 해당 유전자 부위를 증폭시키고 발현벡터 pFLAG-ATS에 *Xho*I 과 *Kpn*I를 이용하여 클로닝하고, 재조합 플라스미드인 pFLAG-ATS-vEP를 얻는 과정을 도시한 것이다.
- 도 2는 본 발명에 사용한 비브리오균 유래 단백질 분해효소(vEP)를 분리하여 분자량 측정을 위해 SDS-polyacryamide 겔에서 전기영동한 것을 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 비브리오균 유래 단백질 분해효소(vEP)에 민감한 형광 발광기질의 염기 서열 및 구조를 도시한 것으로, 기질은 (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl -Gly-Arg-Thr-Ala-Thr-Ser-(ϵ -2,3-dinitrophenyl)Lys-amide의 서열의 환형구조를 이루고 있으며, 단백질 분해효소에 의해 Thr과 Ala 사이의 펩타이드 결합이 가수분해 되면 DNP와 결합되어 있던 MCA 그룹이 분리되며 발광된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이하, 본 발명의 구성을 상세하게 설명한다.
- [0016] 본 발명은 세균 유래의, 특히 비브리오균 유래의 단백질분해효소에 특이적인 형광발광기질에 관한 것이다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 형광발광기질을 포함하는, 세균의, 특히 비브리오균의 진단키트에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명의 형광발광기질은 세균 유래의 단백질분해효소에 특이적인 것으로서, 특히 패혈증을 일으키는 비브리오균 유래의 단백질분해효소에 특이적인, N-말단에 MCA (7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl - 및 C-말단에 DNP(ϵ -2,3-dinitrophenyl)Lys-amide를 필수 구성으로 하여 소수성 아미노산이 하나 이상 포함된 아미노산 서열로 이루어진다. 상기 형광발광기질은 MCA와 DNP가 결합된 환형 구조이나, 단백질분해효소에 의해 분해되어 환형 구조가 깨어지면 MCA와 DNP의 결합이 분리되어 MCA가 발광되는 것이 특징이다(도 3 및 하기 구조에서 참조).
- [0019] 또한 상기 형광발광기질은 7개 이상의 아미노산으로 구성되며, 상기 소수성 아미노산은 중심부에 위치하는 것이 가장 바람직하다. 상기 아미노산의 바람직한 수로는 7 개 내지 20 개로서, 상기 아미노산 수가 7개 이하이거나, 20개 이상일 경우 짧은 서열 길이로 인하여, 또는 아미노말단 및 카복시 말단의 MCA 및 DNP의 결합 외에 아미노산 끼리의 반응으로 인하여 환형구조가 형성되지 않거나 찌그러지는 형태를 가지는 등, 결합된 기질이 가지는 형광발광 값과 추후 기질-효소결합 후에 형광발광 값의 차가 작아져 진단기질로 사용하기에는 무리가 되는 문제가 있다. 여기에서 보다 바람직한 아미노산의 수는 7개 내지 14개이며, 더 바람직하게는 7개 내지 9개이며, 가

장 바람직하게는 7개이다.

[0020] 하기 예시는 본 발명의 형광발광기질의 예시를 아미노산의 서열 및 구조로 나타낸 것이다.

[0021] [본 발명의 형광발광기질의 예시]

[0022] $MCA-X_n-A-X_m-DNP$

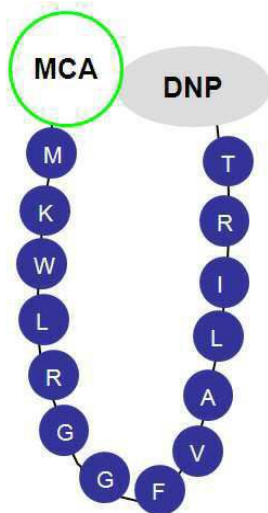
[0023] 여기에서, 상기 MCA와 DNP가 결합된 환형구조이다.

[0024] 여기에서, X는 친수성 아미노산을 포함하는 모든 종류의 아미노산이며, A는 소수성 아미노산이다.

[0025] 여기에서 n+m의 값은 6 내지 19이며, 바람직하게는 6 내지 13이며, 가장 바람직하게는 6 내지 8이다.

[0026] 여기에서 n, m은 2 이상의 정수이며, 가장 바람직하게는 3 이상의 정수이다.

[0027] [본 발명의 형광발광기질의 구조예시]



[0028]

[0029] 본 발명의 형광발광기질은 이러한 구조를 가짐으로써, 절단서열에 특이성이 없으나, 아미노산의 N-말단의 펩타이드 결합을 가수분해하는 단백질분해효소에 대해서도 정확한 활성을 측정할 수 있다.

[0030] 상기에서, 소수성 아미노산은 페닐알라닌, 트립토판, 이소류신, 류신, 프롤린, 메티오닌, 발린, 알라닌 등이 포함되며, 바람직하게는 페닐알라닌, 이소류신, 류신, 메티오닌, 알라닌이며, 가장 바람직하게는 알라닌이다.

[0031] 또한, 상기에서 아미노산 X는 바람직하게는 친수성을 가진다.

[0032] 또한, 본 발명에서 가장 바람직한 형광발광기질의 예시로는 MCA-Gly-Arg-Thr-Ala-Thr-Ser-DNP 서열의 환형구조이다.

[0033] 상기에서, 단백질분해효소는 세균이 분비하는, 특히 폐혈증 비브리오균이 분비하는 단백질분해효소로서, 바람직하게는 메탈로프로테아제이며, 더 바람직하게는 비브리오 볼리니피쿠스(*V. vulnificus*) 유래의 메탈로프로테아제이며, 가장 바람직하게는 비브리오 볼리니피쿠스(*V. vulnificus*) ATCC29307 유래의 메탈로프로테아제인 vEP이다.

- [0034] 상기에서, 세균은 바람직하게는 패혈증을 일으키는 비브리오균이며, 더 바람직하게는 비브리오 볼리니피쿠스(*V. vulnificus*)이며, 가장 바람직하게는 비브리오 볼리니피쿠스(*V. vulnificus*) ATCC29307이다. 상기에서 패혈증 비브리오균은 *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio metschnikovii* 등이 포함되나, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 따라서, 본 발명의 키트로 진단할 수 있는 균의 대상은, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio fluvialis*, *Vibrio furnissii*, *Vibrio hollisae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio cincinnatiensis*, *Vibrio metschnikovii*이며, 바람직하게는 비브리오 볼리니피쿠스(*V. vulnificus*)이며, 가장 바람직하게는 비브리오 볼리니피쿠스(*V. vulnificus*) ATCC29307이다.
- [0036] 상기 진단키트는 균의 존재여부 뿐만 아니라, 균의 단백질분해효소의 kinetics를 분석하는 용도로도 사용될 수 있다.
- [0037] 이하, 본 발명을 실시 예에 의해 상세히 설명한다.
- [0038] 단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0039] 비브리오균 유래 단백질 분해효소 유전자의(vEP) 클로닝

- [0040] 비브리오균(*V. vulnificus*) ATCC29307 균주로부터 전체 게놈 DNA를 분리하고, 이미 알려진 비브리오균(*V. vulnificus*) ATCC29307 유래의 메탈로프로테아제(vEP) 유전자 염기서열을 기초로 중합효소 연쇄반응을 통해 유전자를 증폭시켰다. 이때 사용한 프라이머 염기 서열은 다음과 같으며 발현 벡터로의 클로닝을 위해 forward에는 XhoI, reverse에는 KpnI 제한효소 사이트를 삽입하여 디자인하였다.
- [0041] Forward : 5'-CTTCTCGAGATGAACTCAATCAACGT-3'
- [0042] Reverse : 5'-CGGGGTACCTCAATATTGCAGCTTTAA-3'
- [0043] 유전자 증폭을 위한 PCR 반응조건은 94℃에서 1분 변성, 50℃에서 45초 결합, 72℃에서 2분 동안 신장반응을 30 회 반복하였다. 증폭된 유전자 산물의 크기는 1,800 bp이며, XhoI과 KpnI을 이용하여 절단한 후 pFLAG-ATS 벡터에 클로닝하여 대장균 DH5 α에 형질전환하여 형질전환체를 얻었다. 이때 얻어진 재조합 플라스미드를 pFLAG-ATS-vEP라 명명하였다(도 1).

실시예 2

[0044] 재조합 단백질 분해효소의(vEP) 정제

- [0045] 재조합 vEP의 발현을 위해 대장균 DH5 α 균주를 이용하였다. 재조합 플라스미드 pvEP를 함유하고 있는 단일 클론을 100 µg/ml의 암피실린 항생제를 포함하고 있는 50 ml LB 배지에 접종하고 37℃에서 밤새 배양하였다. 그 후, 10 ml의 배양액을 500 ml의 신선한 항생제 포함 LB 배지에 접종하고, A₆₀₀에서 0.8에 이를 때까지 배양하였다. 배양 후 단백질 발현 유도를 위해 0.2 mM isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 20℃에서 6시간 동안 처리한 후 원심 분리기를 이용하여 세포를 수집하였다. 수집한 세포를 100 ml의 용출 완충액(30 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20% sucrose, 1 mM EDTA, 0.3 mg/ml lysozyme, 1 mM PMSF)에 녹이고 4℃에서 30분간 반응시킨 후 세포 파쇄기를 이용하여 세포를 파괴하였다. 세포 파쇄물을 6,000 g에서 20분간 원심분리하여 상층액만을 모은 후, 70% ammonium sulfate를 이용하여 농축한 후, 두 가지 종류의 이온교환 크로마토그래피(Hiprep 16/10 Q FF column과 Source 15 Q 4.6/100 PE column)를 이용하여 분리하였고, 45 kDa과 35 kDa의 두 가지 크기로 존재함을 확인하였다(도 2).

실시예 3

[0046] **vEP의 선택적 발광기질 개발을 위한 vEP 절단자리 규명**

[0047] vEP의 절단자리를 규명하기 위하여 여러 종류의 혈청단백질(10 μ g)과 vEP(0.3 μ g)를 상온이나 37℃에서 10분간 반응시키고 SDS-polyacryamide 겔 상에서 전기영동하였다. 전기영동 후 완충액을(10 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propane sulfonic acid, pH 11 with NaOH, 10 % Methanol) 이용하여 단백질 조각들을 PVDF 막에 이동시키고 절단된 단백질 조각들의 N-말단서열을 분석을 한국기초과학 지원연구원에 의뢰하였다. 그 결과, vEP의 절단자리는 항상 카르복실 쪽에는 페닐알라닌이나 메티오닌 같은 소수성 아미노산이 존재하며, 그 아미노산의 N-말단쪽 펩타이드 결합이 항상 가수분해된다는 사실을 확인하였다(표 1).

표 1

기질단백질	인지서열 및 절단자리*
Prothrombin	His-Gln-Asp ²⁰⁷ - ↓ Phe-Asn-Ser-Ala-Val
	Gly-Arg-Thr ²⁷² - ↓ Ala-Thr-Ser-Glu-Tyr
Plasminogen	Arg-Val-Tyr ⁸⁰ - ↓ Leu-Ser-Glu-Cys-Lys
Procaspase-3	Glu-Pro-Lys ¹⁹ - ↓ Ile-Ile-His-Gly-Ser
	Ser-Thr-Gly ⁶⁰ - ↓ Met-Thr-Ser-Arg-Ser

[0049] *) ↓ : 절단자리

실시예 4

[0050] **vEP의 발광기질의 개발과 효소의 kinetics 분석**

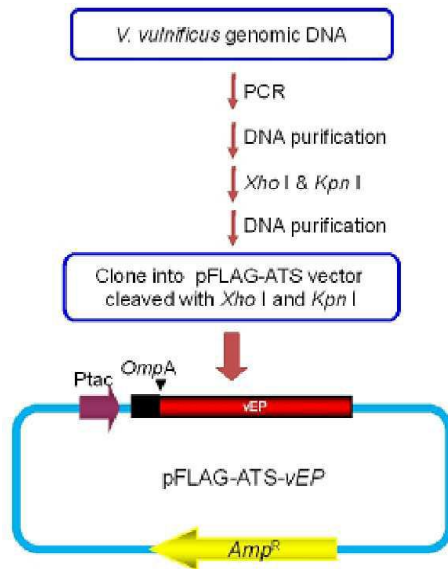
[0051] MCA-DNP quenching 구조는 DNP가 형광에너지의 공여체로 작용하는 MCA와 결합되어 있을 때는 발광이 억제되지만 단백질 분해효소에 의해 펩타이드 서열 내부에 절단이 일어나면 DNP로부터 MCA가 떨어져 나와 발광하는 특성을 갖고 있다. 이러한 특성을 이용하여 여러 가지 기질단백질의 절단자리를 중 프로트롬빈의 절단 부위를(Thr²⁷²-Ala²⁷³) 삽입하여 형광기질을(7-methoxycoumarin-4-yl)acetyl-Gly-Arg -Thr-Ala-Thr-Ser-(ε-2,3-dinitrophenyl)Lys-amide 합성하였다(도 3). 효소의 kinetics 분석을 위해 효소와 기질은 각각 37℃에서 10분 동안 미리 반응시키고, 1 μ g/ml의 효소와 여러 가지 농도의 기질과 혼합한 후 형광 분석기를 이용하여 10분 동안 형광 방출량을 측정하여 효소의 kinetics를 결정한다(표 2). 이때 분석에 사용한 합성 기질의 발광과 방출 파장은 328과 393 nm이다.

표 2

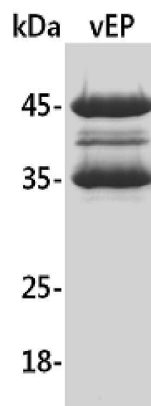
Enzyme	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (mM ⁻¹ /s ⁻¹)
vEP	0.117	4.2	35.6

도면

도면1



도면2



도면3

