



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0107500
(43) 공개일자 2021년09월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/255 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/255 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0022602
(22) 출원일자 2020년02월24일
심사청구일자 2020년02월24일
- (71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
- (72) 발명자
오현명
서울특별시 관악구 봉천로23다길 38
김정희
경상남도 거제시 중곡로5길 11 덕진휴먼빌 905호 (고현동)
양정안
부산광역시 영도구 은빛길 76
- (74) 대리인
윤여강

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 단백질의 번역 후 변형을 위한 신규한 포르밀기 전달 효소 및 이의 용도

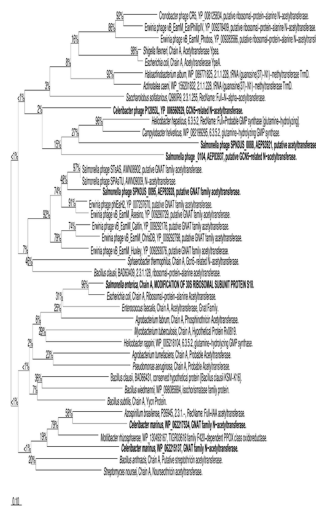
(57) 요약

본 발명은 살모넬라(*Salmonella* spp.) 및 대장균(*Escherichia coli*) O157:H7등을 감염하여 저해하는 "파아지 SPN3US"의 신규 "단백질 아미노 말단 포밀기 전달 효소"활성 및 이의 제조방법과 이용에 관한 것이다.

또한 발현제조합 벡터에 클로닝하고 형질전환된 세포에서 발현되는 "단백질 아미노 말단 포밀기 전달 효소"를 대량 생산 및 분리하는 방법을 제공하고 있다.

본 발명의 신규 "단백질 아미노 말단 포밀기 전달 효소"활성은 기존의 fMet/N-degron과는 다른 단백질의 번역후 변형에 의한 아미노 말단의 포르밀화 한다. 본 발명에 따른 포르밀기 전달 효소는 개선된 면역원성 및 항원성 물질을 스크리닝 하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)

G01N 33/6848 (2013.01)

C12N 2511/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525009424

부처명 해양수산부

과제관리(전문)기관명 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업

연구과제명 세부과제C1_공동3_유용 해양미생물 유전체정보 분석 및 활용기반 구축

기 여 율 1/2

과제수행기관명 부경대학교산학협력단

연구기간 2018.09.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345297702

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)

연구과제명 코스메슈티컬 개발을 위한 용암 해수 미생물 유전체 연구

기 여 율 1/2

과제수행기관명 부경대학교산학협력단

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호 2의 포르밀기 전달 효소.

청구항 2

제 1 항의 효소를 암호화하는 유전자.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 유전자는 서열 번호 1의 핵산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 유전자

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 5

제 4 항에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 6

제 5 항에 따른 형질 전환 숙주 세포를 이용한 서열번호 2의 포르밀기 전달 효소 대량 생산 방법.

청구항 7

시료 단백질을 준비하는 단계;

서열번호 2의 단백질을 이용하여 상기 시료 단백질의 포르밀화를 시키는 단계; 및

상기 시료 단백질의 항원성 또는 면역원성을 확인하는 단계를 포함하는 개선된 항원성 또는 면역원성 단백질 스크리닝 방법.

청구항 8

시료 단백질을 준비하는 단계; 서열번호 2의 단백질을 이용하여 상기 시료 단백질의 포르밀화를 시키는 단계; 및 단백질이 숙주 세포에 의해 분해되어 생성되는 포르밀 펩타이드와 그 수용체들을 확인하는 단계를 포함하는 개선된 포르밀 펩타이드 수용체(formyl peptide receptor) 리간드(ligand) 탐색 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 *Salmonella* 과아지 유전자에서 재조합 발현한 신규한 단백질 아미노 말단 포르밀기 전달효소 활성 확인 및 그 응용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 원핵 생물인 세균 또는 진핵 생물 세포 내 소기관인 미토콘드리아 등의 경우 단백질 합성 시 개시 코돈에 의해 N-포르밀 메티오닌이 아미노 말단에 생성된다(Dohmen RJ, 2015). 단백질 아미노 말단의 포르밀기는 PDF(peptide deformylase)가 제거 하며, 곧 이어 메티오닌 아미노펩티다아제(MetAP; methionine aminopeptidase)가 메티오닌을 제거한 후 단백질 합성 및 접힘(folding) 을 계속 진행하게 된다(Dohmen RJ, 2015; Piatkov KI *et al.*,

2015). 그러나, 진핵 생물의 세포질에서 일어나는 단백질 합성 개시 코돈은 포르밀기가 달리지 않은 메티오닌 아미노 말단을 형성하고, 메티오닌 아미노펩티다아제(MetAP; methionine aminopeptidase)가 메티오닌을 제거 후 말단의 NAT(N-acetyltransferase)가 초산기(acetyl group)를 부착시키고 단백질의 생합성이 진행된다(Dohmen RJ, 2015). 두 가지 경우 모두 단백질의 합성과 접힘(folding)이 잘 진행되기 위해서는 아미노 말단의 메티오닌 제거 전에 포르밀기 제거(원핵생물/세포내 소기관) 또는 메티오닌 제거 후 초산기 부착(진핵생물 세포질)이 필수적이며, 그렇지 못한 경우 단백질은 분해되는 기작이 작동한다(Dohmen RJ, 2015). 아미노 말단의 초산기가 아미노산에 따라 특징적인 분해 신호(예를 들면, 유비퀴틴에 의한)역할을 하며 이를 "N-end rule" 또는 "N-degron"으로 잘 알려져 있다(Hwang CS *et al.*, 2010). 세균의 경우 아미노 말단의 포르밀 메티오닌(formyl-methionine)(fMet)에 빗대어 fMet/N-degron이 존재하며, 이는 진핵생물의 경우에 세포내 소기관에 의해서 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Kim JM *et al.*, 2018; 황철상 and 김정목, 2016).

[0004] 본 발명자들은 *Salmonella* 파아지의 한 종류인 SPN3US의 유전체(Lee JH *et al.*, 2011)의 주석 달기(annotation)를 참조하여, 초산기 전달 효소(acetyltransferase)활용을 연구 하던 중 단백질 전사 후 아미노 말단에 포르밀 기가 생성되는 것을 관찰하고 본 발명을 완성하였다. 단백질의 번역 후 변형(Post-translational modification)에 의한 아미노 말단의 포르밀기가 부착하는 것은 최초로 보고되는 것이며, 이를 통해 개선된 항원성 및 면역원성을 높일 수 있을 것이라고 보고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 관련 선행 기술로는 한국특허공개번호 10-2015-0041669(2015.04.17. 공개)에서는 N-말단 법칙 경로(N-end rule pathway)를 표적으로하는 헤테로밸런트 저해제 및 그 이용이 있다(권용태 and 이민재, 2015). (특허문헌 0002) 또한, 한국특허공개번호 10-2016-0043429 (2016.04.21. 공개)에서는 N-말단 메티오닌에 의한 단백질 분해 조절에 대한 특허가 등록 되어 있다(황철상 and 김정목, 2016)

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) N-degron/C-degron이 다양한 형태와 기작으로 생물들에 존재한다 (Varshavsky A, 2019). (비특허문헌 0002) 세포내 소기관에 포르밀 메티오닌에 의한 fMet/N-degron이 효모의 N-degron 에서도 역할을 수행 한다(Kim JM *et al.*, 2018). (비특허문헌 0003) 세균의 단백질 생합성 시 아미노 말단의 포르밀 메티오닌이 단백질의 분해 신호로서 작용한다(Piatkov KI *et al.*, 2015). (비특허문헌 0004) *Salmonella enterica* 및 일부 대장균 (*Escherichia coli*) O157:H7 균주 저해에 효과를 보이는 살모넬라 파아지 SPN3US가 가금류의 분변 시료에서 분리되었다. SPN3US에는 세 개의 "초산기 전달 효소(acetyltransferase)"가 기술되었다(Lee JH *et al.*, 2011).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 살모넬라 파아지 "포르밀기 전달 효소"(SPN3US_0088)의 기능 및 활성 연구를 활용하여, 이들을 포함하는 약제학적 조성물 및 원핵 생물 및 파아지 유래 N-포르밀 펩타이드를 리간드 및 그 리간드의 수용체로 삼는 조절현상을 활용한 의약 및 생물학적 제재로서 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기한 목적을 위하여 본 발명의 제 1 의 형태는 서열번호 2의 "SPN3US_0088"의 단백질을 제공한다. 상기 "단백

질"이란 용어는, 임의의 길이를 가지는 아미노산 중합체를 의미하는 것으로서, 암호화 및 비 암호화된 아미노산, 화학적 또는 생화학적으로 변형 또는 유도체화된 아미노산, 그리고 변형된 펩타이드 주쇄를 가지는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 제 2 의 형태는 상기 "SPN3US_0088"단백질을 암호화 하는 유전자를 제공하는 것이다. 바람직하게는 상기 SPN3US_0088"단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 유전자이다. 상기 "유전자"란 용어는, DNA에 의해 암호화된 RNA(또는 RNA에 의해 암호화된 DNA), 또는 RNA나 DNA에 의해 암호화되는 단백질을 의미하는 것으로서, 여기서 유전자는 통상적으로 단백질을 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 포함할 뿐만 아니라, 인트론 및 기타 비-암호화 뉴클레오타이드 서열을 포함 할 수도 있다.

[0014] 본 발명의 제 3 의 형태는 상기 "SPN3US_0088"단백질을 암호화 하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다. 상기 "벡터"는 또 다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 합성시킬 수 있는 "발현벡터"로 플라스미드, 코스미드 또는 파아지 등을 이용할 수 있다. 바람직한 벡터는 그것이 결합된 핵산을 자기 복제 및 발현시킬 수 있는 벡터이다. 발현 벡터 내에 사용될 수 있는 기타 조절 요소로서는 전사 인핸서 요소와 전사 종결 인자를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Bitter외 다수 (1987) Methods in Enzymology, 153:516-544]을 참조할 수 있다.

[0015] 발현 벡터는 특정 유형의 숙주 미생물에서만 사용하기 적당하며, 다른 미생물에서는 적당하지 않다. 그러나, 당 업자는 통상의 실험을 통하여, 어느 특정 발현 벡터가 소정의 숙주 미생물에 적당한지를 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 발현 벡터는 숙주 유기체에 도입될 수 있으며, 이후 상기 벡터 내에 포함된 임의의 유전자의 자생력과 발현 여부에 대해 모니터링 된다. 발현 벡터는 또한, 발현시 발현 벡터를 보유하는 숙주 세포를 선별 또는 동정하는데 유용한 하나 이상의 표현형적 특징을 부여하는, 하나 이상의 선별 마커 유전자도 함유할 수 있다.

[0017] 본 발명의 제 4 의 형태는 상기 "SPN3US_0088"단백질을 암호화 하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공하는 것이다. 바람직하게 상기 숙주세포는 원핵세포이다. 더 바람직하게 상기 숙주세포는 알파프로박테리아 또는 대장균을 포함하는 그람 음성 세균이고, 가장 바람직하게는 상기 숙주세포는 알파프로박테리아이다.

[0018] 상기 "형질전환"은 새로운 유전자 또는 존재하는 유전자의 여분의 복제본의 숙주 유기체 내로의 도입을 말한다. 형질 전환법으로서의 미세 주입법, DEAE 텍스트란 매개 형질 전환법과, 아세트산리튬의 존재 하에 열 충격을 주는 방법을 포함한다. 숙주 미생물을 형질 감염시키는데에 지질 복합체, 리포좀 및 덴드리머(dendrimer)도 사용될 수 있다.

[0019] 형질 전환 시, 대상 벡터가 도입된 숙주 세포를 동정하기 위하여, 다수의 방법들이 실시될 수 있다. 한 가지 대표적인 선별법은, 각각의 세포들을 계대 배양하여 각각의 콜로니를 형성시킨 다음, 원하는 유전자 생산물을 발현하는지 여부에 대해 테스트하는 과정을 포함한다. 다른 방법은, 발현 벡터 내에 포함된 선별 마커 유전자를 발현시켜, 주어진 표현형적 특징을 바탕으로 하여 형질 전환된 숙주 세포를 선별하는 과정을 포함한다. 당 업자는 이와 같은 방법 또는 기타 당 업계에 통용되고 있는 방법을 이용하여, 유전자 변형된 숙주 세포를 동정할 수 있다.

[0020] 본 발명의 유전자가 숙주 세포에 도입되었는지 여부는 여러 가지 방법들(예를 들어, PCR, 서던 블롯 혼성화 또는 노던 블롯 혼성화)에 의해 확인할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 결과로 생성된 숙주 세포로부터 생산될 수 있으며, 목적으로 하는 특이 서열은 목적 서열에 특이적인 프라이머를 이용하는 PCR에 의해 증폭될 수 있다. 증폭된 생성물을 사용하여 아가로스 겔 전기 영동법, 폴리악릴아미드겔 전기 영동법 또는 모세관 전기 영동법을 실시한 다음, 브롬화에티듐 또는 SYBR 그린 용액 등으로 염색을 하거나, 또는 UV 검출법을 수행하여, DNA를 검출한다. 대안적으로, 목적 서열에 특이적인 핵산 프로브가 혼성화 반응에 사용될 수 있다. 특이적인 유전자 서열의 발현 여부는, 역전사 커플링 된 PCR, 노던 블롯 혼성화를 통하여 상응하는 mRNA를 검출하거나, 또는 암호화된 유전자 생성물과 반응성인 항체를 사용하는 면역 검정법에 의해 확인될 수 있다. 대표적인 면역 검정법의 예로서는 ELISA, 방사성 면역 검정법 및 샌드위치 면역 검정법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 제 5 의 형태는 상기 "SPN3US_0088"단백질을 이용한 개선된 항원성 또는 면역유발성 단백질 스크리닝 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 시료 단백질을 준비하는 단계; "SPN3US_0088"단백질을 이용하여 상기 시료 단백질의 포밀화를 시키는 단계; 및 상기 시료 단백질의 항원성 또는 면역원성을 확인하는 단계를 포함하는 개선된 항원성 또는 면역원성 단백질 스크리닝 방법이다. 시료 단백질의 포밀화 여부는 시료 단백질의 MALDI/TOF 질량분석을 통해서 확인할 수 있다. 또한 포밀화 여부는 3중 수소 표시(tritium-labeling)나 $^{14}\text{C}/^{18}\text{O}$ 표시(^{14}C -labeling) 태깅된 포르밀기의 포밀화 여부를 통하여 확인할 수 있다.

[0023] 본 발명의 제 6 의 형태는 시료 단백질을 준비하는 단계; 서열번호 2의 단백질을 이용하여 상기 시료 단백질의 포르밀화를 시키는 단계; 및 단백질이 숙주 세포에 의해 분해되어 생성되는 포르밀 펩타이드와 그 수용체들을 확인하는 단계를 포함하는 개선된 포르밀 펩타이드 수용체(formyl peptide receptor) 리간드(ligand) 탐색 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 신규 "단백질 아미노 말단 포르밀기 전달 효소"활성은 기존의 fMet/N-degron과 달리 단백질 생합성의 개시와 관련 없이, 번역후변형(post-translational modification)에 의한 단백질의 아미노 말단의 포르밀화 반응을 일으킨다. 본 발명에 따른 포르밀기 전달 효소는 개선된 항원성 및 면역원성 물질을 탐색하는데 사용되어 질 수 있다. 개선된 항원성 및 면역원성 물질은 미생물과 인체를 포함하는 동물의 선천적인 면역 반응 연구 및 조절에 활용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 포르밀기 전달 효소에 의해 생성되는 포밀화된 펩타이드에 의한 분해 조절에 따른 미생물의 유전자 조절 또는 억제 연구; 또는 살모넬라(*Salmonella* spp.) 또는 대장균(*Escherichia coli*) O157:H7 등의 세균의 방제와 저해에 연구에 활용가능하다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 살모넬라 파아지의 유전자를 참조로 발현한 "단백질 아미노 말단 포르밀기 전달 효소"(SP3US_0088)과 다른 미생물 균주 및 파아지의 아미노산 서열에 근거한 단백질간의 유사성을 보여주는 수형도이다.

도 2는 살모넬라 파아지의 유전자를 참조로 발현한 "단백질 아미노 말단 포르밀기 전달 효소"(SP3US_0088)과 셀러리박터(P12053L) 및 살모넬라(SPN3US) 파아지의 아미노산 서열 중에 "초산기 전달 효소"(acetyltransferase) 유전자들을 클로닝한 것을 보여주는 그림이다. (a)는 합성된 SPN3US_88, 95, 104(제한효소 사이트 포함)를 삽입하기 위한 pTOP Blunt V2 벡터를 보인다. (b)는 pGEMT-easy 클로닝을 이용하여 재조합 벡터를 제조하는 공정을 보인다.

도 3은 "단백질 아미노 말단 포르밀기 전달 효소"(SP3US_0088)과 셀러리박터(P12053L) 및 살모넬라(SPN3US) 파아지의 아미노산 서열을 코딩하는 "초산기 전달 효소"(acetyltransferase) 유전자를 pET24(a) 발현 벡터에 서브 클로닝한 그림이다.

도 4는 "단백질 아미노 말단 포르밀기 전달 효소"(SPN3US_0088)과 셀러리박터(P12053L) 및 살모넬라(SPN3US) 파아지의 아미노산 서열을 코딩하는 "초산기 전달 효소"(acetyltransferase) 유전자를 pET24(a) 발현 벡터에 서브 클로닝한 후 대장균 숙주 BL21(DE3)에 형질 전환 후 발현을 확인하는 그림이다. "단백질 아미노 말단 포르밀기 전달 효소"(SPN3US_0088)의 분자량이 18kDa 정도이므로 Tricine-SDS-PAGE를 사용하여 단백질의 밴드를 확인 하였다. Ni-NTA 크로마토그래피를 통해서 히스티딘 태그(6xHis)가 작동하는지도 확인하였다.

도 5는 "단백질 아미노 말단 포르밀기 전달 효소"(SPN3US_0088)를 대량 발현한 것을 보인다.

도 6은 "단백질 아미노 말단 포르밀기 전달 효소"(SPN3US_0088)를 LC/MS법으로 질량 분석한 결과이다. Tricine-SDS 겔상의 밴드를 오려서 트립신으로 처리하여 분석했으며, 발현 벡터에 클로닝 되었으므로(서열 2 참조) 아미노 말단의 서열이 각각 PDF 및 MetAP에 의해 ASMTGGQQMGR에 해당하는 질량/전하(M/z)값을 얻었다.

도 7은 단백질 아미노 말단 포르밀기 전달 효소"(SPN3US_0088)를 LC/MS법으로 질량 분석한 결과이다. Tricine-SDS 겔상의 밴드를 오려서 트립신으로 처리하여 분석했으며, 발현 벡터에 클로닝 되었으므로(서열 2 참조) 아미노 말단의 서열이 각각 PDF 및 MetAP에 의해 ASMTGGQQMGR에 해당하는 질량/전하(M/z)값을 얻어야 하지만,

formyl-ASMTGGQQMGR에 해당하는 질량 값을 얻었다.

도 8은 아미노산 서열 ASMTGGQQMGR의 펩타이드 합성결과를 보여주는 LC/MS 질량분석 결과 그림이다.

도 9은 아미노산 서열 ASMTGGQQMGR의 펩타이드의 아미노 말단에 포르밀 기를 합성한 펩타이드 formyl-ASMTGGQQMGR의 LC/MS 질량분석 결과 그림이다.

도 10은 합성한 아미노산 서열 ASMTGGQQMGR의 MALDI-TOF 질량분석 결과 그림이다.

도 11은 합성한 아미노산 서열 formyl-ASMTGGQQMGR의 MALDI-TOF 질량분석 결과 그림이다.

도 12은 합성한 아미노산 서열 ASMTGGQQMGR의 MALDI-TOF 질량분석 결과의 개별 피크(peak)를 분석한 그림이다.

도 13은 합성한 아미노산 서열 formyl-ASMTGGQQMGR의 MALDI-TOF 질량분석 결과의 개별 피크(peak)를 분석한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 이 발명이 속 하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0029] <실시예 1> *Celeribacter marinus* IMCC12053 균주에 감염하는 파아지 P12053L 및 살모넬라(SPN3US) 파아지의 서열을 코딩하는 "초산기 전달 효소"(acetyltransferase)의 아미노산 서열 비교
- [0030] 해양환경에서 분리 동정된 셀러리박터 마리누스 IMCC12053(*Celeribacter marinus* IMCC12053)(Baek K *et al.*, 2014)은 박테리오파아지 P12053L을 분리하는 숙주로 사용된 바 있다(Kang I *et al.*, 2012). 파아지 P12053L의 초산기 전달 효소(acetyltransferase)를 이용하여 PFAM 데이터 베이스(accession PF00583)와 NCBI nr 단백질 서열 데이터 베이스를 활용 하여 효소의 서열을 정리하였다(도 1 참조).
- [0031] 셀러리박터 파아지 P12053L의 경우(*Celeribacter* phage P12053L, YP_006560929, "GCN5-related N-acetyltransferase")와 달리 살모넬라(SPN3US) 파아지의 경우 "초산기 전달 효소"(acetyltransferase; PF00583)에 해당하는 단백질을 3가지 관찰 할 수 있었다; SPN3US_0088(AEP83921, putative acetyltransferase), SPN3US_0095(AEP83928, putative GNAT family acetyltransferase), SPN3US_0104(AEP83937, putative GCN5-related N-acetyltransferase). 살모넬라(SPN3US) 파아지의 경우 *Salmonella enterica* 및 일부 대장균 (*Escherichia coli*) O157:H7 균주 저해를 보이며, 이는 SPN3US 및 P12053L 각각의 파아지의 감염 및 증식 생활사에 도움이 되는 기능을 할 것으로 예상되었다.
- [0032] P12053L의 숙주 *Celeribacter marinus* 의 경우 두개의 "초산기 전달 효소"(WP_062217534[GNAT family N-acetyltransferase], WP_062215137[GNAT family N-acetyltransferase]) SPN3US의 숙주인 *Salmonella enterica* 의 경우 리보솜 단백질 S18의 알라닌 아미노 말단에 초산을 전달하는 효소(Chain A(CNM_A), ribosomal protein S18-alanine N-acetyltransferase)가 알려져 있다(Vetting MW *et al.*, 2008)(도 1참조).
- [0034] <실시예 2> 파아지 P12053L 및 살모넬라(SPN3US) 파아지의 "초산기 전달 효소"(acetyltransferase)의 클로닝 및 이중 발현
- [0035] 살모넬라(SPN3US) 파아지의 "초산기 전달 효소"(acetyltransferase) 세 가지는 유전자 합성을 통해서 확보 하였다. 파아지 P12053L "초산기 전달 효소"(acetyltransferase)유전자는 파아지 플라스미드에서 직접 PCR법으로 확보하였다(도 2). 사용된 프라이머는 P12053L-포워드 프라이머로 5'-ATGAGCTGTGCTAAAAACAACAA-3'(서열번호 3) 및 P12053L-백워드 프라이머로 5'-TTCTCGAGGATTTCCTTCATGTAGTGGG-3'(서열번호 4)를 이용하였다.
- [0036] 이상의 유전자를 발현 벡터인 pET24(a)의 XhoI/SalI 제한 효소 위치에 클로닝하였고 유전자 염기 서열을 분석하여 확인하였다(도 3).
- [0037] 유전자 염기 서열이 확인된 경우 발현 숙주인 대장균 BL21(DE3)에 각각의 유전자를 발현하였으며, Tricine-SDS-PAGE를 통하여 단백질의 발현을 확인 하였다. 모든 단백질이 카르복시 말단(C-term)에 6개의 히스티딘 꼬리(Hexahistidine tag)를 가지고 있으므로 Ni-NTA 크로마토 그래피를 활용 하여 세포질에 발현이 잘되는지 확인하였다(도 4).

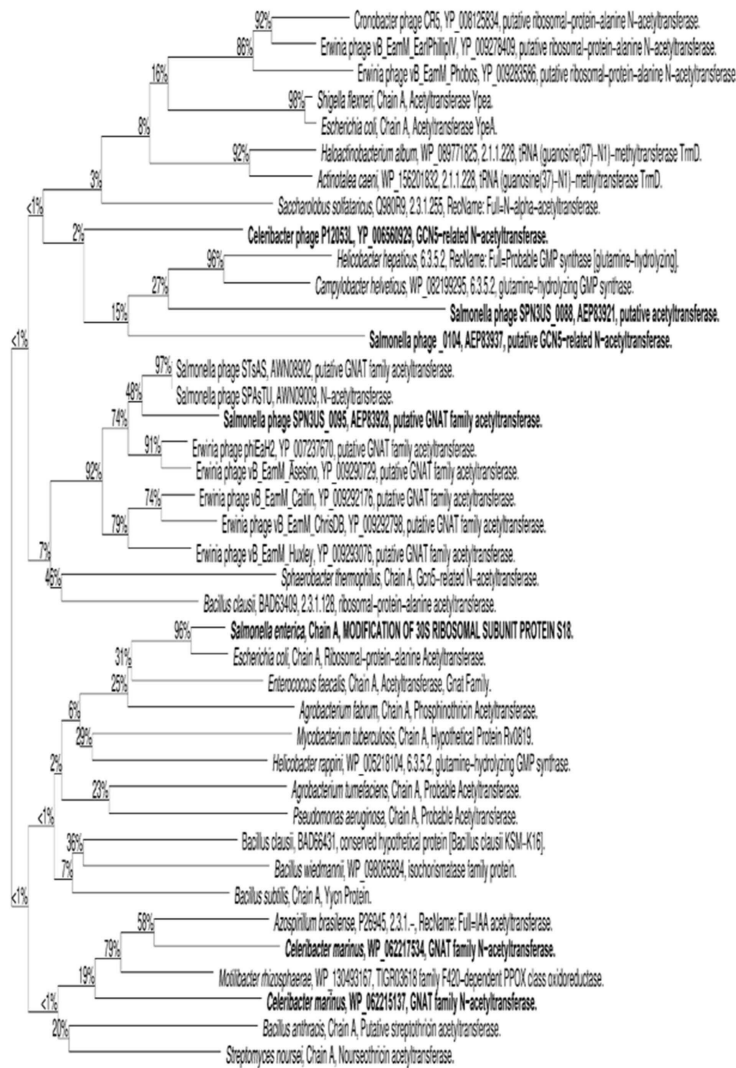
- [0039] <실시예 3> 살모넬라(SPN3US) 파아지의 SPN3US_0088 단백질의 과량 발현 및 LC/MS 질량분석
- [0040] 살모넬라(SPN3US) 파아지의 SPN3US_0088 단백질이 Ni-NTA 크로마토 그래피 결과가 만족할 만하여 대량 정제를 시도 하였다(도 5).
- [0041] 발현된 단백질을 동정하기 위해 표준 방법으로 트립신(trypsin) 처리후 LC/MS를 분석하였다. 박테리아의 경우 아미노 말단의 포르밀메티오닌의 포르밀기와 메티오닌이 제거 되는 것이 예상되는 상황이었다. 즉 서열 2의 경우에 비추어 펩타이드 서열 ASMTGGQQMGR 이 관찰 되었다(도 6).
- [0042] 그러나, 아미노 말단이 포르밀 기가 붙은 formyl-ASMTGGQQMGR에 해당하는 펩타이드 서열 또한 관찰 되었다(도 7).
- [0043] SPN3US_0088 단백질이 아미노 말단의 경우 "초산 기 전달 효소"(acetyltransferase)가 아닌 "포르밀 기 전달 효소"(formyltransferase)의 활성을 나타냈다.
- [0045] <실시예 4> 아미노 말단 트립신 처리시 생성되는 펩타이드 서열 합성 및 질량 확인
- [0046] SPN3US_0088 단백질의 말단 부분의 트립신 처리 펩타이드의 포르밀 기가 결합하는 것이 LC/MS의 완충용액 및 시료 전처리에 사용하는 개미산(formic acid)의 오염일수도 있다는 토의 결과 ASMTGGQQMGR 와 formyl-ASMTGGQQMGR을 합성하였다. 합성 후 LC/MS 분석 결과 완충용액의 개미산이 합성된 펩타이드 중 ASMTGGQQMGR에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(도 8 및 도 9).
- [0047] 추가적으로 MALDI-TOF 질량 분석을 통해서 펩타이드의 질량을 다시한번 확인하였다(도 10 및 도 11).
- [0048] 아미노 말단 트립신 처리시 생성되는 펩타이드 서열의 스펙트럼의 확인 및 서열 분석 결과를 제공하였다(도 10 및 도 11).
- [0050] <예측예 1> 개선된 면역원성 및 항원성 물질 스크리닝 방법
- [0051] 면역을 조절하는 물질 또는 면역을 일으키게 하는 단백질의 수명은 면역원성 및 항원성에 크게 영향을 미친다. 본 발명자는 N-말단에 포르밀화를 시키는 효소를 최초로 규명하였으며, 이전 연구를 통하여 박테리아 N-말단 단백질의 포르밀-메티오닌은 단백질 분해의 신호로 알려져 있다(Piatkov 등, Microbial Cell, Vol. 2, No. 10, pp. 376 - 393; doi: 10.15698/mic2015.10.231). 펩타이드 수용체의 포르밀화에 의한 생물학적 기능에 대해서는 Panaro 등의 연구에 따르면 형태학적 극성화, 이동, 활성산소의 생성 및 단백질 분해 효소의 분비 등과 관련된 세포 활성을 일으키는 것으로 보고 되었다(Panaro 등, Immunopharmacology and Immunotoxicology, 28:103-127, 2006). Shoffmann 등은 백혈구의 케모어트랙턴트로의 N-포르밀메티오닌에 대해 밝히고 있다(Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 72, No. 3, pp. 1059-1062, March 1975). 따라서 면역원성 및 항원성을 가지는 단백질의 번역 후 포르밀화는 단백질의 수명에 영향을 줄 것으로 예상이 되며, 본 발명에 따른 포르밀화 효소는 단백질의 수명을 조절하여 개선된 면역원성 및 항원성을 가지는 물질을 만들 것으로 예상이 된다. 따라서 본 발명에 따른 포르밀기 전달 효소는 개선된 면역원성 및 항원성 물질을 스크리닝 하는데 유용하게 사용될 수 있을 것이다.
- [0052] 보다 구체적으로 본 발명은 시료 단백질을 준비하는 단계; "SPN3US_0088"단백질을 이용하여 상기 시료 단백질의 포르밀화를 시키는 단계; 및 상기 시료 단백질의 항원성 또는 면역원성을 확인하는 단계를 포함하는 개선된 항원성 또는 면역원성 단백질 스크리닝 방법일 수 있다. 시료 단백질의 포르밀화 여부는 시료 단백질의 MALDI/TOF 질량분석을 통해서 확인할 수 있다. 또한 포밀화 여부는 3중 수소 표시(tritium-labeling)나 $^{14}\text{C}/^{18}\text{O}$ 표시(^{14}C -labeling) 태깅된 포르밀기의 포밀화 여부를 통하여 확인할 수 있다.
- [0054] [참고문헌]
- [0055] Baek K, Choi A, Kang I, and Cho JC. 2014. Celeribacter marinus sp. nov., isolated from coastal seawater. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **64**, 1323-1327.
- [0056] Dohmen RJ. 2015. Starting with a degron: N-terminal formyl-methionine of nascent bacterial proteins

contributes to their proteolytic control. *Microb Cell* **2**, 356-359.

- [0057] Hwang CS, Shemorry A, and Varshavsky A. 2010. N-terminal acetylation of cellular proteins creates specific degradation signals. *Science (New York, N.Y.)* **327**, 973-977.
- [0058] Kang I, Jang H, Oh H-M, and Cho J-C. 2012. Complete Genome Sequence of Celeribacter Bacteriophage P12053L. *Journal of virology* **86**, 8339.
- [0059] Kim JM, Seok OH, Ju S, Heo JE, Yeom J, Kim DS, Yoo JY, Varshavsky A, Lee C, and Hwang CS. 2018. Formyl-methionine as an N-degron of a eukaryotic N-end rule pathway. *Science (New York, N.Y.)* **362**.
- [0060] Lee JH, Shin H, Kim H, and Ryu S. 2011. Complete genome sequence of Salmonella bacteriophage SPN3US. *Journal of virology* **85**, 13470-13471.
- [0061] Piatkov KI, Vu TTM, Hwang C-S, and Varshavsky A. 2015. Formyl-methionine as a degradation signal at the N-termini of bacterial proteins. *Microb Cell* **2**, 376-393.
- [0062] Varshavsky A. 2019. N-degron and C-degron pathways of protein degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 358.
- [0063] Vetting MW, Bareich DC, Yu M, and Blanchard JS. 2008. Crystal structure of RimI from Salmonella typhimurium LT2, the GNAT responsible for Na-acetylation of ribosomal protein S18. *Protein Science* **17**, 1781-1790.
- [0064] 권용태 and 이민재. 2015, Heterovalent inhibitors targeting N-end Rule Pathway and its use. 10-1569966-0000, KIPO, 대한민국, <https://doi.org/10.8080/1020130119039>
- [0065] 황철상 and 김정목. 2016, CONTROL OF PROTEIN DEGRADATION BY N-TERMINAL METHIONINE. 10-1662397-0000, KIPO, 대한민국, <https://doi.org/10.8080/1020140137805>

도면

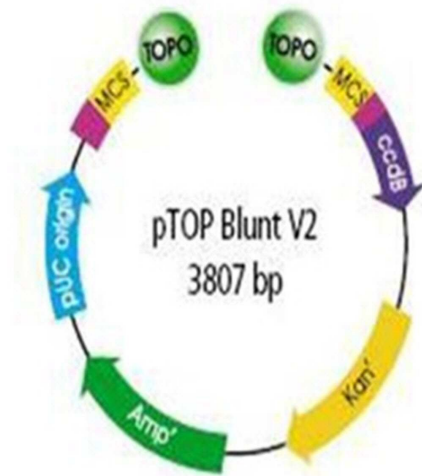
도면1



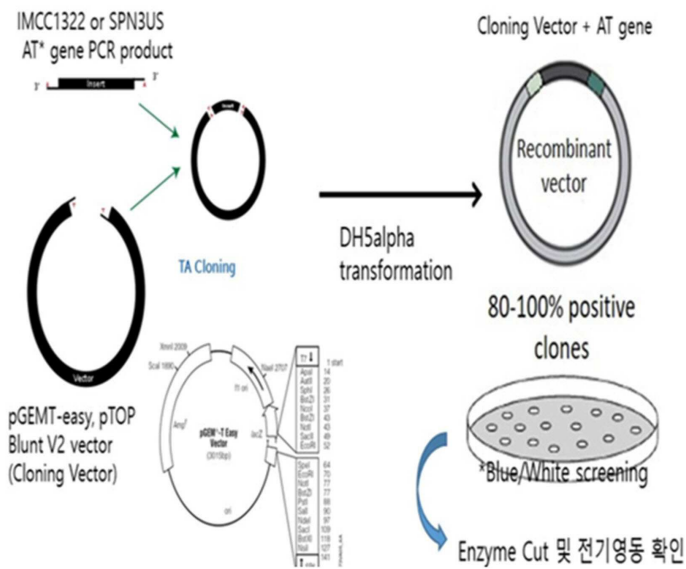
0.10

도면2

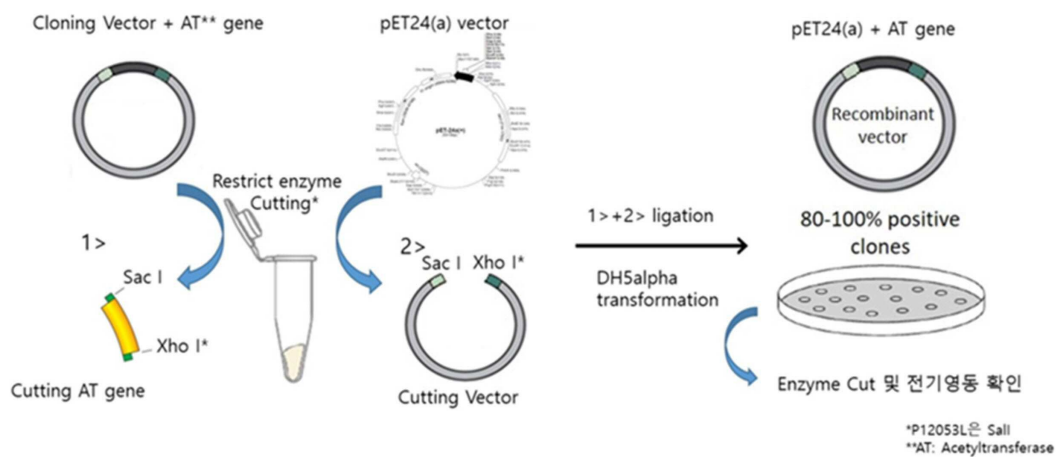
(a)



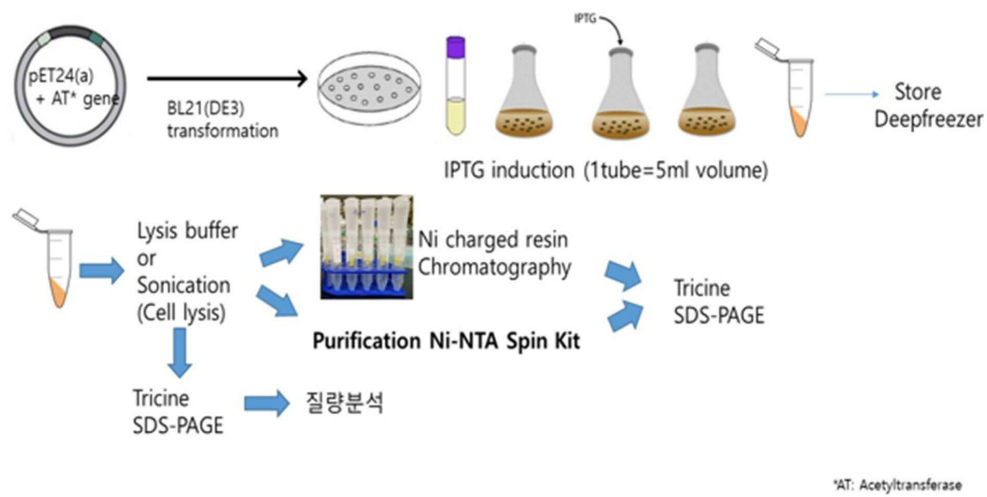
(b)



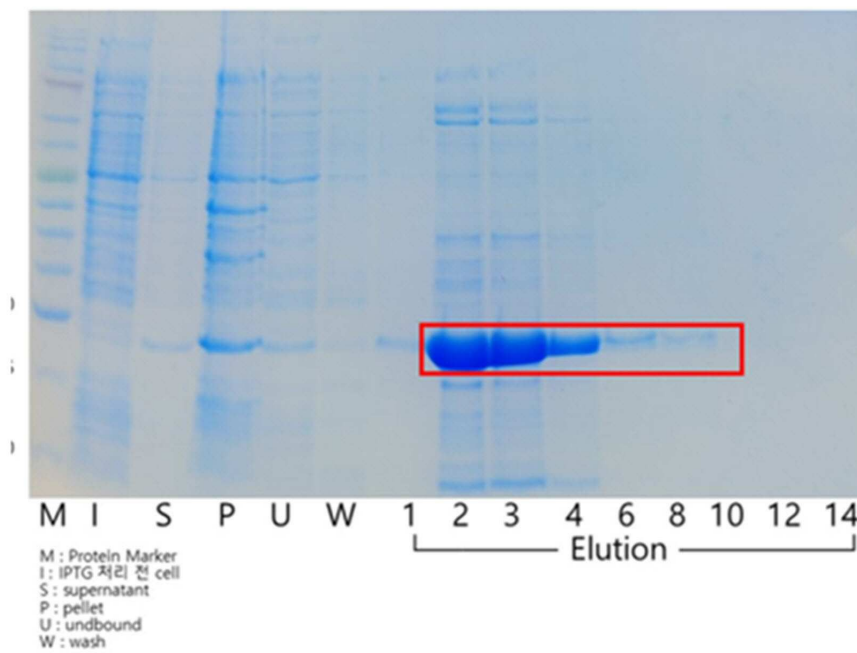
도면3



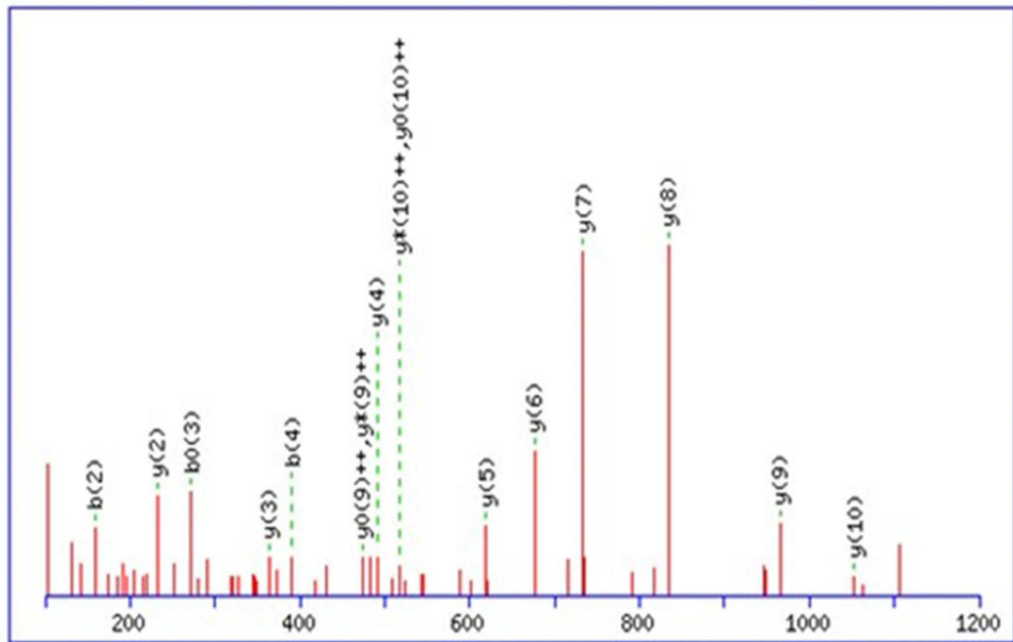
도면4



도면5



도면6



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1122.4910

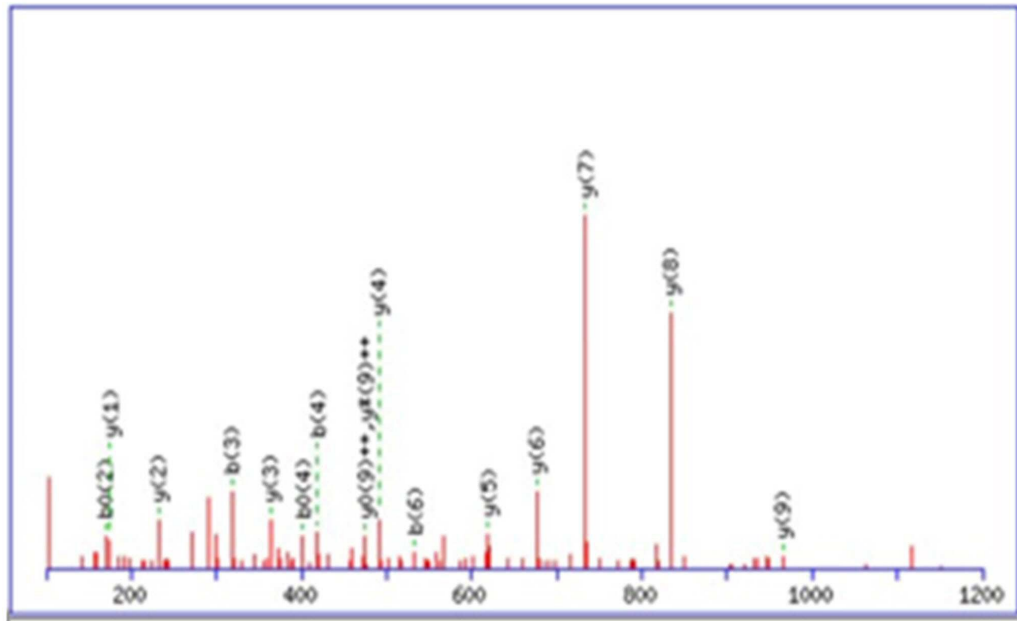
Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) (apply to specified residues or termini only)

Ions Score: 89 Expect: 1.2e-009

Matches : 17/92 fragment ions using 22 most intense peaks (help)

#	b	b ⁺⁺	b ⁺	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y ⁺	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	72.0444	36.5258					A							11
2	159.0764	80.0418			141.0659	71.0366	S	1052.4612	526.7342	1035.4346	518.2210	1034.4506	517.7289	10
3	290.1169	145.5621			272.1063	136.5568	M	965.4291	483.2182	948.4026	474.7049	947.4186	474.2129	9
4	391.1646	196.0859			373.1540	187.0806	T	834.3887	417.6980	817.3621	409.1847	816.3781	408.6927	8
5	448.1860	224.5967			430.1755	215.5914	G	733.3410	367.1741	716.3144	358.6609			7
6	505.2075	253.1074			487.1969	244.1021	G	676.3195	338.6634	659.2930	330.1501			6
7	633.2661	317.1367	616.2395	308.6234	615.2555	308.1314	Q	619.2981	310.1527	602.2715	301.6394			5
8	761.3247	381.1660	744.2981	372.6527	743.3141	372.1607	Q	491.2395	246.1234	474.2129	237.6101			4
9	892.3652	446.6862	875.3386	438.1729	874.3546	437.6809	M	363.1809	182.0941	346.1544	173.5808			3
10	949.3866	475.1969	932.3601	466.6837	931.3761	466.1917	G	232.1404	116.5738	215.1139	108.0606			2
11							R	175.1190	88.0631	158.0924	79.5498			1

도면7



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1150.4559
 Fixed modifications: Carbamidomethyl (C) (apply to specified residues or termini only)
 Variable modifications:
 N-term : Formyl (Protein N-term)
 Ions Score: 83 Expect: 5.6e-009
 Matches : 17/92 fragment ions using 29 most intense peaks (help)

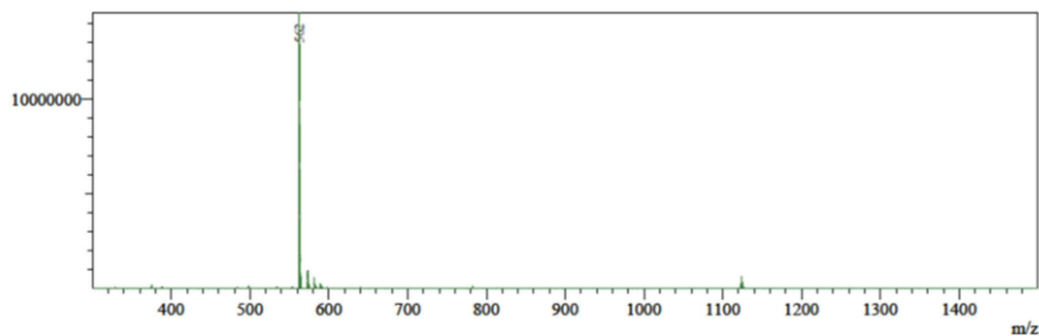
#	b	b ⁺⁺	b ⁺	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y ⁺	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	100.0393	50.5233					A							11
2	187.0713	94.0393			169.0608	85.0340	S	1052.4612	526.7342	1035.4346	518.2210	1034.4506	517.7289	10
3	318.1118	159.5595			300.1013	150.5543	M	965.4297	483.2182	948.4026	474.7049	947.4186	474.2129	9
4	419.1595	210.0834			401.1489	201.0781	T	834.3887	417.6980	817.3621	409.1847	816.3781	408.6927	8
5	476.1810	238.5941			458.1704	229.5888	G	733.3410	367.1741	716.3144	358.6609			7
6	533.2024	267.1049			515.1919	258.0996	G	676.3195	338.6634	659.2930	330.1501			6
7	661.2610	331.1341	644.2345	322.6209	643.2504	322.1289	Q	619.2981	310.1527	602.2715	301.6394			5
8	789.3196	395.1634	772.2930	386.6502	771.3090	386.1581	Q	491.2395	246.1234	474.2129	237.6101			4
9	920.3601	460.6837	903.3335	452.1704	902.3495	451.6784	M	363.1809	182.0941	346.1544	173.5808			3
10	977.3815	489.1944	960.3550	480.6811	959.3710	480.1891	G	232.1404	116.5738	215.1139	108.0606			2
11							R	175.1190	88.0631	158.0924	79.5498			1

도면8

No.	Name	R Mass
1	p03301-11	1122.53

Line#1 R Time:0.616(Scan#:38)
 MassPeaks:3
 Spectrum Mode:Single 0.616(38) Base Peak:562(13003623)
 BG Mode:None Segment 1 - Event 2

MS Spectrum



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
 <120> New formyl transferase for post-translational modification of a
 protein and uses thereof}
 <130> PN200012
 <160> 4
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 480
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220><223> Salmonella phage SPN3US_0088

<400> 1

atgctggtga ttaacgtggt ggaagataaa attccggcga acgtgtatcc ggaactggtg	60
gaatgggtgc gcgatctgaa cagcattcgc gaagaaccga ttaaactgac catgtttgtg	120
gaagatgata ttgtgcgcgg cattatggcg tgggaaccgg gccatctggt gtatatggtg	180
gtgccggaag aaagccgccg cgccggcgtg ggccgcttta tctgaaata tctgcagcag	240
aacagcgatc gcaaacatgt gagctgccgc gtgcatccga ccaacattcc ggcgctgggc	300
ttttttcatc agcagggtt tcagattgat cgctggtata ttgcggcgga tggccagcgc	360
tattttcgca tgaccaacta taacgtgatt agcagccata ccccgccgga agaaaaactg	420
ctgaccatt atgcggaaag cgtgccgatt tttctgagca tggcggaagg ccagtttgtg	480
	480

<210> 2
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Unknown

<220><223> Salmonella phage SPN3US_0088

<400> 2

Met Leu Val Ile Asn Val Val Glu Asp Lys Ile Pro Ala Asn Val Tyr
1 5 10 15
Pro Glu Leu Val Glu Trp Val Arg Asp Leu Asn Ser Ile Arg Glu Glu
20 25 30
Pro Ile Lys Leu Thr Met Phe Val Glu Asp Asp Ile Val Arg Gly Ile

35 40 45
Met Ala Trp Glu Pro Gly His Leu Val Tyr Met Val Val Pro Glu Glu

50 55 60
Ser Arg Arg Gly Gly Val Gly Arg Phe Met Leu Lys Tyr Leu Gln Gln
65 70 75 80
Asn Ser Asp Arg Lys His Val Ser Cys Arg Val His Pro Thr Asn Ile
85 90 95
Pro Ala Leu Gly Phe Phe His Gln Gln Gly Phe Gln Ile Asp Arg Trp
100 105 110
Tyr Ile Ala Ala Asp Gly Gln Arg Tyr Phe Arg Met Thr Asn Tyr Asn
115 120 125

Val Ile Ser Ser His Thr Pro Pro Glu Glu Lys Leu Leu Thr His Tyr
130 135 140
Ala Glu Ser Val Pro Ile Phe Leu Ser Met Ala Glu Gly Gln Phe Val
145 150 155 160

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> P12053L-forward primer
<400> 3

atgagctcgt gctaaaaaca acaa 24

<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> P12053L-backward primer
<400> 4

ttctcgagga tttccttcac gtagtggg 28