

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 9월 16일 (16.09.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/104341 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/04 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/001523
- (22) 국제출원일: 2010년 3월 11일 (11.03.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0020586 2009년 3월 11일 (11.03.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 부산대학교 산학협력단 (PUSAN NATIONAL UNIVERSITY INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 부산 금정구 장전동 산 30 부산대학교, 609-735 Pusan (KR).
- (72) 발명자: 곽
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 이복률 (LEE, Bok Luel) [KR/KR]; 부산 금정구 구서 2 동 롯데캐슬골드 아파트 301-2103, 609-750 Busan (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 서울시 구로구 구로동 188-5 키콕스 벤처센터 209, 152-050 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITIONS FOR DIAGNOSIS OF FUNGAL INFECTIONS

(54) 발명의 명칭 : 곰팡이 감염 진단용 조성물

(57) Abstract: The present invention relates to a marker for diagnosis of fungal infections, which is sequentially activated in vivo in the presence of β -1,3-glucan, which activates the Toll signaling pathway, to compositions for diagnosis of fungal infections in a specimen, and to a method for producing antibacterial substances. More particularly, the present invention has proved that a GNB3-mediated β -1,3-glucan recognition signal reaches pro-Spaetzle using three serine proteases as mediators, namely, modular serine protease (MSP), Spaetzle-processing enzyme activating enzyme (SAE), and Spaetzle-processing enzyme (SPE). Proteins involved with β -1,3-glucan recognition signaling can be effectively used as compositions for detecting fungal infections in blood samples or the like.

(57) 요약서: 본 발명은 β -1,3-글루칸이 유입 시, 체내에서 순차적으로 활성화되어 생체방어 단백질 (Toll) 신호 전달 경로를 활성화하는 곰팡이 감염 진단용 마커, 검체의 곰팡이 감염 진단용 조성물 및 항균 물질을 생산하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, GNB3-매개 β -1,3-글루칸 인식 신호가 3 개의 세린 프로테아제, 즉 MSP (모듈 세린 프로테아제, modular serine protease), SAE (스페즐 처리 효소를 활성화하는 효소, Spz processing enzyme activating enzyme) 및 SPE (스페즐 처리 효소, Spz processing enzyme)를 매개로 하여 pro-스페즐에 도달하는 것을 입증하였으며, 상기 β -1,3-글루칸 인식 신호 전달에 관여하는 단백질은 혈액 등의 검체 중 곰팡이 감염을 검출하는 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2010/104341 A2

명세서

발명의 명칭: 곰팡이 감염 진단용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 β -1,3-글루칸의 유입 시, 체내에서 순차적으로 활성화되어 생체방어 단백질 (Toll) 신호 전달 경로를 활성화하는 곰팡이 감염 진단용 마커, 검체의 곰팡이 감염 진단용 조성물 및 항균 물질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 선천적 면역은 모든 동물의 미생물 감염에 대한 중요한 숙주 방어 메커니즘이다. 자신과 비-자신을 구별할 수 있는 숙주의 능력은 선천적 면역의 중추이다
- [3] 병원성 미생물은 그람-음성 박테리아 내 리포폴리사카라이드, 그람-양성 박테리아 내 펩티도글리칸 (이하 PG라 한다) 및 곰팡이 내 β -1,3-글루칸과 같은 독특한 병원체-관련 분자 패턴 (이하, PAMP라 한다) 을 갖는다. 이 같은 PAMP의 확인은 생식질 (germline) 엔코딩 수용체 및 용해 단백질의 그룹에 의해 이루어진다. 반면, 초파리 (*Drosophila*) 생체방어 단백질 (Toll)의 신호전달 경로는 면역 결핍증 통로가 활성화되어 박테리아의 인식은 그람-양성 박테리아 중 Lys-타입 PG 와 β -1,3-글루칸을 인식할 때 활성화되는데 반해, 면역 결핍 (Imd) 경로는 주로 그람 음성 박테리아 중 디아미노피페린산(DAP)-타입 PG를 인식한 이후 활성화되게 된다. 이들 2가지 경로 모두 NF- κ B와 같은 전사 인자를 매개로 하여 항-곰팡이 펩타이드의 발현을 이끌어낸다.
- [4]
- [5] 초파리 (*Drosophila*) 내 유전자 연구에 의해 Lys-타입 PG는 PG-인식 단백질 (PGRP)-SA/그람 음성 결합 단백질 1 (GNBP1)에 의해 인식되었고 곰팡이 β -1,3-글루칸은 그람 음성 결합 단백질 3 (GNBP3)에 의해 인식되는 것이 증명되었다.
- [6]
- [7] 이 같은 곰팡이에 대한 인식 신호는 척추 보체계와 유사하게 proteolytic SP 캐스케이드에 의해 헤모림프 (곤충의 혈액) 내에서 증폭된다. 이 같은 인식 신호의 증폭은 확고한 면역 체계가 부족한 곤충 내에서 효율적인 숙주 방어 전략을 나타내는 것이다.
- [8] Toll 신호전달 경로의 증폭 메커니즘을 명료하게 하려면, 어떻게 박테리아성 혹은 곰팡이성 인식 신호가 활성화되고 그리고 어떻게 이들 인식 신호가 SP에 의해 증폭될 수 있고, 순차적으로 Spz로 전달되어 AMP의 생성을 이끌어내는지 확인하는 것이 필수적이다. 이러한 문제를 해결하기 위한 경쟁력 있는 생화학적 데이터를 제공하기 위해서, 많은 양의 헤모림프를 정제할 수 있으며, 정제불명의 SP를 특성화할 수 있는 보다 큰 곤충을 사용할 필요가 있다.

- [9] 최근 한 대형 딱정벌레 (*Tenebrio molitor*)의 유충을 사용하여, 본 발명자들은 Lys타입 PG/PGRP-SA/GNBP1 복합물이 Lys-type PG 인식 신호를 3종의 다른 SP들인 Tm-MSP (T. molitor modular serine protease), Tm-SAE (T. molitor Spz processing enzyme activating enzyme) 및 Tm-SPE (T. molitor Spz processing enzyme)를 매개로 하여 최종 하부경로 인자인 Spz까지 이송하는 것을 입증한 바 있다 (Kim, C. H., Kim, S. J., Kan, H., Kwon, H. M., Roh, K. B., Jiang, R., Yang, Y., Park, J. W., Lee, H. H., Ha, N. C., Kang, H. J., Nonaka, M., Soderhall, K., and Lee, B. L. (2008) J Biol Chem 283, 7599-7607). 그 결과를 바탕으로, 본 발명자들은 PGRPSA/GNBP1/MSP/SAE/SPE/Spz 캐스케이드가 그람 양성곰팡이 감염에 대한 응답으로 Lys-type PG 인식 신호전달 경로를 트리거하는 필수 단위라는 것도 제안한 바 있다.
- [10] 그러나 β -1,3-글루칸-의존 갈색거저리 (*Tenebrio*) Toll 경로 내 세포외 SP 캐스케이드의 활성화 메커니즘에 대한 상세 정보는 명확하지 않고, 밝혀진 바 없다. 따라서 곰팡이의 β -1,3-글루칸이 체내에 유입 시, 어떠한 경로로 항균성 물질이 생성되는 지에 대한 연구가 필요한 상태이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [11] 이에 본 발명자들은 곰팡이-의존 Toll 신호전달 경로 내에 포함되는 GNBP3의 바로 아래 분자경로 혹은 pro-Spz의 상부경로인 SP (세린 프로테아제; Serine protease)의 정제 및 생화학적 특성화가 곰팡이 감염에 대한 숙주 방어 이해 및 곰팡이 독성 인자를 감지하는데 필수적이라는 점에 착안하여, 연구를 계속하던 중 Tm-GNBP3의 바로 아래 하부경로 SP (세린 프로테아즈)를 발견하였다.
- [12] 따라서 본 발명의 목적은 정제된 천연 및 재조합 단백질로 체외 재현 실험을 수행함으로써, Tm-GNBP3-매개 β -1,3-글루칸 인식 신호가 pro-Spz로 전달되는 경로를 확인하고 전달에 필요한 성분을 제공하는데 있다. 즉, β -1,3-글루칸의 유입 시, 체내에서 순차적으로 활성화되어 생체방어 단백질 (Toll) 신호 전달 경로를 활성화하는 것을 특징으로 하는 곰팡이 감염 진단용 마커를 제공한다.

[13]

- [14] 본 발명의 다른 목적은 곰팡이 감염 진단용 조성물을 제공하는데 있다.

[15]

- [16] 본 발명의 또 다른 목적은, 거저리에 활성화된 SPE 활성화 효소 (SAE) 또는 처리된 스파즐을 주입하여 항균 물질을 생산하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [17] 본 발명에 사용된 약어들은 다음과 같다:

- [18] PG, 펩티도글리칸; AMP, 항곰팡이 펩타이드; PGRP, PG 인식 단백질; GNBP, 그람 음성 결합 단백질; SP, 세린 프로테아제; Spz, 스파즐(Sp); MSP, 모듈 세린 프로테아제(modular serine protease); SPE, 스파즐 처리 효소 (Spz processing

enzyme activating enzyme); SAE, SPE 활성화 효소 (Spz processing enzyme).

[19]

[20] 현재, 곰팡이 세포벽 성분인 β -1,3-글루칸을 그램 음성 결합 단백질 3 (GNBP3라 한다)에 의해 확인하는 방법이 제시되어 왔는데, 이는 pro-Sp의 처리를 이끌어내어 차후 Toll 신호전달 경로를 활성화함으로써 세린 프로테아제 캐스케이드를 유발하기 때문이다. 그러나 GNBP3의 분자 하부경로 및 곰팡이 β -1,3-글루칸-의존 Toll 경로 내 활성화 순서는 아직까지 생화학적으로 특징지어지지 못하였다. 또, 어떻게 초기 β -1,3-글루칸 인식 신호가 pro-Sp로 이송되어 Toll 경로 활성화를 유도하는지도 불명확한 상태이다.

[21]

[22] 이에, 본 발명자들은 modular 세린 프로테아제 효소원, 큰 딱정벌레(*Tenebrio molitor*)의 유충 헤모림프(hemolymph) 내 존재하는 모듈(modular) 세린 프로테아제 전구 단백질이 GNBP3의 바로 아래 경로에서 세린 프로테아제로서 작용하는지에 대하여 확인하였다.

[23] 또한, 체외 확인 실험에서 GNBP3-매개 β -1,3-글루칸 인식 신호는 3개의 세린 프로테아제, 즉 modular 세린 프로테아제, SAE (Sp처리 효소를 활성화하는 효소) 및 SPE (Sp처리 효소)을 매개로 하여 pro-Sp에 도달하는 것을 입증하였다. 그런 다음 SPE의 활성화된 형태는 pro-Sp를 처리된 형태로 전환하고, 이는 Toll 수용체로 작용하여 생체 내에서 항-곰팡이 물질을 유도하게 된다(실시예 1,2).

[24] 상기와 같은 결과는 β -1,3-글루칸/GNBP3 착물 및 Sp처리를 결합하는 3 단계 proteolytic 캐스케이드가 갈색거저리(*Tenebrio*) 유충 내에서 곰팡이 β -1,3-글루칸-의존 Toll 신호전달 경로에 필수적이라는 것을 입증하는 것이다.

[25] 이해를 돕기 위하여, 본 발명에 의한 갈색거저리 Toll 신호전달 경로의 3단계 활성화 캐스케이드를 요약한 모델을 도 8로서 제공할 수 있다. 참고로, 도 8은 곰팡이의 β -1,3-글루칸이 곤충에 노출될 경우, Tm-GNBP3는 β -1,3-글루칸에 결합된 다음 Tm-pro-MSP으로 순환되게 된다. Ca^{2+} 의 존재 시, 상기 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP3 착물은 Tm-pro-MSP의 활성화된 Tm-MSP (aTm-MSP)로의 활성화를 유도하게 된다. Tm-MSP의 활성화 형태는 Tm-pro-SAE를 활성화된 Tm-SAE로 전환하며, 이는 추후 Tm-pro-SPE를 활성화된 Tm-SPE로 전환시키게 된다. 활성 Tm-SPE는 pro-Spzf를 처리된 Spz로 분할하여 Toll 수용체를 매개로 하여 Tenecin 1 및 Tenecin 2와 같은 AMPs의 생성을 이끌어낸다.

[26]

[27] 상기의 실험 결과로, 본 발명은 갈색거저리 유래 GNBP-3, MSP, SAE, SPE 및 스페즐로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택된, β -1,3-글루칸의 유입 시, 체내에서 순차적으로 활성화되어 생체방어 단백질(Toll) 신호 전달 경로를 활성화하는 것을 특징으로 하는 곰팡이 감염 진단용 마커를 제공한다.

[28] GNBP-3의 Genbank accession NO.는 Q76DI2.1, GI:52782730 이다.

- [29] MSP 의 Genbank accession NO.는 BAG14264.1, GI:170321839 이다.
- [30] SAE 의 Genbank accession NO.는 BAG14261.1, GI:170321833 이다.
- [31] SPE의 Genbank accession NO.는 BAG14262.1, GI:170321835 이다.
- [32] 스페즐의 Genbank accession NO.는 XP_975083.1 이다.
- [33]
- [34] 또한 본 발명의 다른 형태는, 갈색거저리 유래 GGBP-3 및 β -1,3-글루칸 복합체 (complex)에 특이적인 항체를 포함하는, 검체의 곰팡이 감염 진단용 조성물을 제공한다.
- [35]
- [36] 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 본 발명에 사용되는 항체는 단클로 또는 다클론 항체, 면역학적으로 활성인 단편(예를 들어, Fab 또는 (Fab)₂ 단편), 항체 중쇄, 인간화 항체, 항체 경쇄, 유전자 조작된 단일쇄 Fv 분자, 키메릭 항체 등일 수 있다.
- [37] 본 발명의 마커 단백질들은 공지된 단백질이므로 본 발명에 사용되는 항체는 상기 공지된 단백질을 항원으로 하여 면역학 분야에서 널리 알려져 있는 통상의 방법으로 제조할 수 있다.
- [38] 본 발명에 따른 항체의 항원으로서 사용되는 단백질은 천연에서 추출하거나 합성될 수 있으며 DNA 서열을 기초로 하여 제조할 방법에 의해 제조될 수 있다. 유전자 재조합 기술을 이용할 경우 단백질을 코딩하는 핵산을 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질 전환된 형질 전환체에서 목적으로 하는 단백질이 발현되도록 숙주 세포를 배양한 후 형질전환체로부터 목적으로 하는 단백질을 회수함으로써 수득될 수 있다.
- [39] 상기 항체는 단클론항체임이 바람직하다.
- [40]
- [41] 본 발명의 진단용 조성물은 단백질에 특이적인 항체 이외에 면역학적 분석에 사용되는 당업계에 공지된 시약을 추가로 포함할 수 있다.
- [42] 상기에서 면역학적 분석은 항원과 항체의 결합을 측정할 수 있는 방법이라면 모두 포함될 수 있다. 이러한 방법들은 당 분야에 공지되어 있으며 예를 들어, 면역세포화학 및 면역조직화학, 방사선 면역 분석법(radioimmunoassays), 효소결합면역법(ELISA: Enzyme Linked Immunoabsorbent assay), 면역 블롯 (immunoblotting), 파아르 분석법(Farr assay), 면역침강, 라텍스 응집, 적혈구 응집, 비탁계법, 면역확산법, 카운터-전류 전기영동법, 단일 라디칼 면역확산법, 면역크로마토그래피법, 단백질 칩 및 면역형광법이 있다.
- [43] 면역학적 분석에 사용되는 시약으로는 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제가 포함된다. 또한, 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.
- [44] 한편, 본 발명의 진단용 조성물은 진단의 신속도 및 편리성을 높이기 위해, 적합한 담체 또는 지지체상에 공지된 다양한 방법을 이용하여 고정화된 상태로

제공될 수 있다. 적합한 담체 또는 지지체의 예로는 아가로스, 셀룰로즈, 니트로셀룰로즈, 텍스트란, 세파텍스, 세파로즈, 리포솜, 카복시메틸 셀룰로즈, 폴리아크릴아미드, 폴리스테린, 반려암, 여과지, 이온교환수지, 플라스틱 필름, 플라스틱 튜브, 유리, 폴리아민-메틸 비닐-에테르-말레산 공중합체, 아미노산 공중합체, 에틸렌-말레산 공중합체, 나일론, 컵, 플랫 팩 (flat packs) 등이 포함된다. 그 외의 다른 고체 기질로는 세포 배양 플레이트, ELISA 플레이트, 튜브 및 폴리머성막이 있다. 상기 지지체는 임의의 가능한 형태, 예를 들어 구형 (비드), 원통형 (시험관 또는 웰 내면), 평면형 (시트, 시험 스트립)을 가질 수 있다.

[45]

[46] 본 발명의 또 다른 형태는, 갈색거저리 유래 GGBP-3 및 MSP의 마커를 포함하는, 검체의 β -1,3-글루칸을 세포벽 성분으로 가지는 미생물 감염 진단용 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 조성물은 곰팡이 감염 진단용 조성물이다.

[47] 상기 조성물에는 갈색거저리 유래 SAE, SPE 및 스페즐로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 마커를 더 포함할 수도 있다.

[48] 상기 조성물에서, 검체의 β -1,3-글루칸 존재 여부를 진단하기 위해서, 칼슘이온이 더 포함될 수 있다.

[49] 곰팡이 감염 여부를 진단하기 위해 갈색거저리 유래 SAE, SPE 및 스페즐를 추가하면 하위 프로테아제들의 cascade 반응을 통해 프로테아제들이 증폭되어 진단용 조성물의 감도를 높일 수 있다.

[50]

[51] 상기 검출용 조성물에 있어서, 상기 검체는 수혈용 혈액 또는 사람을 포함한 포유동물의 혈액, 식품 (채소, 육류, 과일 등의 식품 및 조리 또는 비조리된 식품 등), 수돗물, 지하수, 빗물 또는 무균 제품을 포함하며, 기타 미생물 검출이 필요한 모든 검체를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 검출용 조성물은 수혈용 혈액 또는 사람을 포함한 포유동물의 혈액 중 곰팡이 감염 여부에 대한 검출에 유용하게 사용될 수 있다.

[52] 상기 검출용 조성물은 검체의 곰팡이 감염 진단용 키트 또는 마이크로어레이 형태로 사용될 수 있다.

[53] 본 발명의 검출용 키트는 반응성 검출을 위한 시약, 예를 들어, 파라-니트로아닐린 (p-nitroaniline)과 결합된 아미노산 혹은 펩티드 물질 및 다른 pro-PO 활성화 인자 단백질 및 pro-PO 효소의 발색기질 등을 포함할 수 있다. 또한, 상기 검출용 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 가질 수 있으며, 각각의 형태는 당업계에서 통상적인 방법으로 제제화 할 수 있다. 예를 들어, 용액 형태의 검출용 키트는 나트륨-인산, 칼륨-인산, 트리스-염산 및 이외의 여러 종류의 완충액 등의 완충액에 상기 단백질(들)을 별도로 또는 혼합하여 제제화 할 수 있으며, 필요에 따라 냉동시키거나 동결 건조할 수도 있다.

[54]

[55] 또한 본 발명의 일 실시예에서는, β -1,3-글루칸의 갈색거저리 (*Tenebrio*) 유충 내 주입은 2가지 항곰팡이 펩타이드, 테네신 1 (*Tenecin 1*) 및 테네신 2 (*Tenecin 2*)를 유도하는데, 이들은 또한 SAE의 활성화 형태 혹은 처리된 (processed) Spz의 주입에 의해서도 유도되었다 (실시예 4). 즉, 거저리에 활성화 형태의 SPE 활성화 효소 (SAE) 또는 처리된 스페즐 (processed Spz)을 주입하였을 때, β -1,3-글루칸이 체내에 주입되었을 때와 동일한 AMP (*Tenecin 1* 및 *Tenecin 2*)가 유도될 수 있다.

[56]

[57] 따라서 본 발명은 또 다른 형태로서, 거저리에 활성화 형태의 SPE 활성화 효소 (SAE) 또는 처리된 스페즐을 주입하여 항균 물질을 생산하는 방법을 제공한다.

[58]

상기 항균 물질을 생산하는 방법에 있어서, β -1,3-글루칸 또는 Lys-타입 펩티도글리칸을 추가적으로 더 포함할 수 있다.

[59]

바람직하게는, 상기 항균 물질은 곰팡이에 대해 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 한다. 더 바람직하게는, 상기 항균 물질은 포도상 구균 (*S.aureus*), 대장균 (*E.coli*) 또는 효모 (*S.cerevisiae*)에 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 테네신 (*tenecin*) 이다.

[60]

[61] 또한 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 테네신 (*tenecin*)이 갈색거저리의 지방체에서 유도되지 않고, 혈액세포 (*hemocyte*)에서 유도됨이 확인되었다 (실시예 5).

발명의 효과

[62]

본 발명에 따르면, β -1,3-글루칸의 인식 신호 메커니즘을 모두 밝혀냄으로써, 혈액 내의 β -1,3-글루칸 존재 여부를 진단할 수 있는 조성물을 제공해 준다. 즉, 본 발명에 의해 수혈용 혈액 또는 포유동물의 혈액, 식품, 수돗물, 지하수, 빗물 또는 무균 제품 내에 존재하는 곰팡이 감염 여부를 간편하게 진단할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[63]

도 1 중 A는 불용성 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP3 복합물상에 recruit된 35 kDa 단백질을 확인한 도면이다. B는 수집된 35 kDa 단백질의 N-말단 서열 및 활성화된 Tm-MSP의 N-말단 서열을 나타낸 것이다. C는 Tm-MSP 항체를 이용하여 수행한 웨스턴 블롯 분석 결과를 도시한 것이다.

[64]

도 2는 Tm-MSP 및 pro-Spz의 활성화를 위한 체외 재현 실험 결과를 도시한 것이다. A는 Tm-pro-MSP 및 정제된 Tm-GNBP3의 혼합물을 배양시킨 후, 안티-Tm-MSP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 분석한 결과이다. B는 Tmpro-MSP, Tm-GNBP3, Tm-pro-MSP, Tm-pro-SAE, Tm-pro-SPE 및 Tc-pro-Spz로 된 혼합물을 배양시킨 후, 안티-Tc-Spz 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 분석한 결과이다.

[65]

도 3은 β -1,3-글루칸-의존 갈색거저리 헤모림프에 존재하는 갈색거저리 유래

MSP 및 SAE의 활성을 보여주는 것이다. A는 Lys 타입 PG-의존 (레인 1-6) 및 β -1,3-글루칸-의존 (레인 7-11) 갈색거저리의 pro-MSP의 활성을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. B는 Lys 타입 PG-의존 (레인 1-6) 및 β -1,3-글루칸-의존 (레인 7-11) 갈색거저리의 pro-SAE의 활성을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다.

- [66] 도 4는 Lys-타입 PG, β -1,3-글루칸, 활성화된 Tm-SAE 혹은 처리된 Spz의 주입 후, 2개의 유도 가능한 AMP의 정제 및 특성화를 도시한 것이다. A는 곤충 염수 (컬럼 1), Lys타입 PG (50 ng, 컬럼 2), β -1,3-글루칸 (400 ng, 컬럼 3), 활성화된 Tm-SAE (50 ng, 컬럼 4) 혹은 처리된 Tc-Spz (50 ng, 컬럼 5) 주입 후, 포도상 구균 (*S.aureus*), 대장균 (*E.coli*) 또는 효모 (*S.cerevisiae*)에 대한 항균 활성정도를 측정하는 것이다. B는 항곰팡이 활성을 도시한 피크 1 및 피크 2의 C_{18} HPLC 용출 프로파일 그래프이다. C는 정제된 2개의 갈색거저리 AMP의 SDS-PAGE 분석결과를 도시한 것이다. D는 상기 피크 1, 피크 2 및 테네신 1 (20), 코레오프테리신 (Coleopterisin) (25) 각각에 대한 N-말단 서열을 대비한 것이다. E는 테네신 2 (Tenecin 2), 코레오프테리신 (Coleopterisin) 및 호로트리신 2 (Holotricin 2)의 아미노산 서열을 대비한 것이다.

- [67] 도 5는 정제된 테네신 2의 전체 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

- [68] 도 6은 Lys-type PG, β -1,3-글루칸, 활성화된 Tm-SAE 혹은 처리된 Tc-Spz 주입 후 12시간째에 혈액세포 및 지방체 내 테네신 1 및 테네신 2의 mRNA 발현 레벨을 도시한 그래프이다.

- [69] 도 7은 β -1,3-글루칸, 활성화된 Tm-SAE 혹은 처리된 Tc-Spz 주입 후 3, 6, 18, 48 시간째에 혈액세포 및 지방체 내의 테네신 1의 mRNA 발현 레벨을 도시한 그래프이다 (T-bars 평균 $\pm$ 표준편차 ($p<0.05$)).

- [70] 도 8은 본 발명에 의한 갈색거저리 Toll 신호전달 경로의 3단계 활성화 캐스케이드를 요약한 모델을 도시한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [71] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[72]

- [73] 실험에 사용된 동물 및 헤모림프의 수집

- [74] *T. molitor* (갈색거저리) 유충은 밀기울 함유 테라리움내 실험실 벤치에 지시시켰다. 헤모림프는 Zhang, R., Cho, H. Y., Kim, H. S., Ma, Y. G., Osaki, T., Kawabata, S., Soderhall, K., and Lee, B. L. (2003) J Biol Chem 278, 42072-42079에 언급되어 있는 바와 같이 수집하였다.

- [75] 구체적으로는, 헤모림프를 수집하기 위하여, 유충을 25 개이지 니들을 사용하여 찌르고 헤모림프 10 방울을 개질된 항응고 버퍼 (트리소디움

시트레이트 136 mM, 시트르산 26 mM, EDTA 20 mM, 및 소듐 클로라이드 15 mM, pH 5.0) 500 μ l내로 포집하였다.

- [76] 이렇게 포집된 원상태 (crude) 헤모림프는 4°C에서 15분간 20,000 x g으로 원심분리하였다. 그런 다음 상청액은 사용 전까지 -80°C로 보관하였다.

[77]

- [78] Tm-GNBP3, Tm-MSP, Tm-SAE, Tm-SPE, Tribolium Spz 단백질의 정제

- [79] T. molitor 유충의 헤모림프로부터 천연 Tm-GNBP3, Tm-MSP, Tm-SAE 및 Tm-SPE와 재조합 Tribolium castneum Spz (Tc-Spz)를 본 발명자들이 기 발표한 논문인 Kim, C. H., Kim, S. J., Kan, H., Kwon, H. M., Roh, K. B., Jiang, R., Yang, Y., Park, J. W., Lee, H. H., Ha, N. C., Kang, H. J., Nonaka, M., Soderhall, K., and Lee, B. L. (2008) J Biol Chem 283, 7599-7607에 언급된 바와 같이 수득하였다.

[80]

- [81] 체외 재현 실험 및 펩티드 시퀀싱

- [82] 체외 재현실험을 본 발명자들이 기 발표한 논문인 Kim, C. H., Kim, S. J., Kan, H., Kwon, H. M., Roh, K. B., Jiang, R., Yang, Y., Park, J. W., Lee, H. H., Ha, N. C., Kang, H. J., Nonaka, M., Soderhall, K., and Lee, B. L. (2008) J Biol Chem 283, 7599-7607에 언급된 바와 같이 수행하였다.

- [83] 즉, proteolytic 분할 자리를 지도화하기 위하여, β -1,3-글루칸으로 배양 후 반응 혼합물을 환원 조건하에 SDS-PAGE상에서 분석하고, 폴리비닐리덴 디플로라이드 (PVDF)상에서 블롯 (blot)하고 0.1% 쿠마쉬 블루 (CBB) R-250 및 50% 메탄올 함유 용액으로 염색하였다.

- [84] 상기 막을 단백질 밴드가 가시화되도록 10%초산 함유 50% 메탄올(v/v)을 사용하여 탈색시켰다. 가스상 단백질 시퀀서 (Applied Biosystems)를 이용하여 아미노말단 서열로 pro-Spz 분할 생성물인지를 확인하였다.

[85]

- [86] 항체 및 면역블롯팅

- [87] Tm-MSP and Tc-Spz에 대하여 미리 발현시킨 래빗 안티세라 (antisera) 를 본 발명자들이 기 발표한 논문인 Kim, C. H., Kim, S. J., Kan, H., Kwon, H. M., Roh, K. B., Jiang, R., Yang, Y., Park, J. W., Lee, H. H., Ha, N. C., Kang, H. J., Nonaka, M., Soderhall, K., and Lee, B. L. (2008) J Biol Chem 283, 7599-7607에 기재된 바와 같이 유사-정제 후 사용하였다.

- [88] 구체적으로는, Tm-MSP의 폴리클로날 항체를 KLH (keyhole limpet hemocyanin)-컨쥬게이트된 합성 펩타이드 (VNGKPVKKGDYPWQ)를 사용하여 발현시켰으며, 이는 Tm-MSP의 촉매 SP 도메인의 N-말단에 위치하게 된다. 95% 이상의 순도를 갖는 KLH 컨쥬게이트된 합성 펩타이드는 Peptron, Inc (Daejeon, Korea)로부터 구입하였다.

- [89] 래빗에 프로인드 아쥬반트 (Freund's complete adjuvant) 내 KLH-컨쥬게이트된 펩타이드 500 μ g를 피하 주사하였다. 4주 후 주사제 (프로인드 아쥬반트내

- 250 μ g)를 추가접종 하였으며, 동물을 2-3주후 출혈 (치사)시켰다. 얻어진 항체는 상술한 바와 같이 유사-정제하였다.
- [90] 프로인드 아주반트를 갖는 각 수컷 알비노 래빗 내로 정제된 Spz 재조합 단백질을 10 μ g 를 주사하고 7일 및 14일후 동량의 단백질을 2회 추가 접종함으로써, 정제된 재조합 Tc-Spz 단백질에 대한 폴리클로날 항체를 발현시켰다. 상기 항체 또한 상술한 바와 같이 유사-정제시켰다. 웨스턴 블롯팅을 Park, J. W., Kim, C. H., Kim, J. H., Je, B. R., Roh, K. B., Kim, S. J., Lee, H. H., Ryu, J. H., Lim, J. H., Oh, B. H., Lee, W. J., Ha, N. C., and Lee, B. L. (2007) Proc Natl Acad Sci U S A 104, 6602-6607에 기재되어 있는 바와 같이 수행하였다.
- [91]
- [92] β -1,3-글루칸-특이 아미다제 활성의 측정
- [93] 샘플 내 아미다제 활성을 평가하기 위하여, 상업적으로 입수가 가능한 α -트롬빈기질 (t-부틸옥시-카보닐벤질-L-발리닐-L-프롤리닐-L-아르기닌-4-메틸큐마릴-7-아미드 (Boc-Val-Pro-Arg-MCA))를 사용하였다.
- [94] Tm-SPE의 활성화 형태에 의해 상기 α -트롬빈 기질을 명확하게 분할하였다. 상기 기질을 제조업체의 지시에 따라 디메틸포름아미드에 용해시켰다. 원상태의 헤모림프 혹은 컬럼 크로마토그래피로부터 얻어진 분획 10 μ l를 Tris-HCl 버퍼 (pH 8.0) 20 mM내 기질 20 μ M 함유하는, 반응 용액 490 μ l 존재하에 β -1,3-글루칸으로 배양하였다.
- [95] 혼합물을 30°C에서 1시간동안 배양한 다음, 17% (v/v) 아세트산 500 μ l를 첨가하여 효소 반응을 종결시켰다. 특이적 아미다제 활성은 $\lambda_{ex}=380$ nm 및 $\lambda_{em}=460$ nm에서 형광 분광계에 의해 판독될 수 있다. 아미다제 활성의 일 유닛은 분당 7-아미노-4-메틸큐마린 1nM을 유리시키는 양으로 정의된다.
- [96]
- [97] 항곰팡이 활성 검정
- [98] Tenecin 1 및 Tenecin 2를 정제하기 위한 항곰팡이 활성은 Moon, H. J., Lee, S. Y., Kurata, S., Natori, S., and Lee, B. L. (1994) J Biochem (Tokyo) 116, 53-58에 기술된 바와 같이 검정되었다.
- [99] 구체적으로는, 용해 Lys-타입 PG, β -1,3-글루칸, Tm-SAE의 활성화 형태 및 분할된 Tc-Spz가 주입된 곤충으로부터 얻어진 헤모림프의 항곰팡이 활성을 지시자 박테리아로서 포도상 구균 (*Staphylococcus aureus*) (곰팡이주 Cowan 1) 와 대장균 (*Escherichia coli*) (곰팡이주 K 12)를 사용하여 검정하였다.
- [100] 항곰팡이 배지 내에서 성장된 박테리아를 성장의 지수상대로 수집하고 NaCl 130 mM, pH 6.0 함유 소듐 포스페이트 버퍼 (버퍼 A) 10 mM 내에 부유시켰다. 주입 후 포집된 헤모림프는 순차적으로 0.2% 소 혈청 알부민 (BSA) 함유 버퍼 A로 희석시키고 희석 샘플의 일부 (10 μ l)를 곤충 염수 (NaCl 130 mM/KCl 5 mM/CaCl₂ 1 mM) 200 μ l 내에서 106 포도상 구균 (*S. aureus*) 세포와 37°C에서

60분간 배양시켰다.

- [101] 그런 다음 혼합물을 곤충 염수로 2,000배 희석시키고 분획 $50\mu\text{l}$ 를 Difoc 영양 배지에 살포하였다. 플레이트를 37°C 에서 18시간동안 배양하고 실험군 및 대조군 플레이트상에 군체 수를 대비하였다. 포도상 구균 (*S. aureus*), 대장균 (*E. coli*), 혹은 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*) 세포에 대한 항곰팡이 민감성 디스크 시험을 곤충 염수, 용해 Lys-타입 PG, β -1,3-글루칸, Tm-SAE의 활성화 형태 및 분할된 Tc-Spz의 36시간 주입 후 주입의 총 추출액 $100\mu\text{l}$ 로부터 헤모림프를 동결 건조시켰다.
- [102] 억제 구역은 밤새 배양 후 평가하였다. 데이터는 3회 반복 후 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.
- [103]
- [104] 유도성 AMP의 정제 및 특성화
- [105] 유도성 AMP를 정제하기 위하여, 본 발명자들은 용해 Lys-타입 PG (10 ng/유충), β -1,3-글루칸 ($2\mu\text{g}$), Tm-SAE의 활성화 형태 (50ng), 혹은 분할된 Tc-Spz (50ng)를 주입하고 헤모림프를 수집한 다음 Moon, H. J., Lee, S. Y., Kurata, S., Natori, S., and Lee, B. L. (1994) J Biochem (Tokyo) 116, 53-58에 기재된 후속 공정을 수행하였다.
- [106] 구체적으로는, 주입 48시간 후 갈색거저리 헤모림프를 수집한 다음 100°C 에서 5분간 가열하여 대부분의 단백질을 변성시켰다. 깨끗한 상청액은 15분간 4°C 에서 $20,000 \times g$ 하에 원심분리 후 수득하였다.
- [107] 수집된 깨끗한 용액을 CAPCELL PAK C18 컬럼 (ACR Type 5 4.6 mm I.D. X 250mm, SHISEIDO FINE CHEMICALS)에 적용한 다음 0.05% (v/v) 트리플루오로아세트산 (TFA) 함유 아세토니트릴 0-100% 선형 그라디언트 (linear gradient)로 60분 이상 용출시켰다.
- [108] 항곰팡이 활성을 보이는 활성 분획을 동결 건조시켜 농축한 다음 신크로opak (Synchropak) RP C18 컬럼 (4.6 mm I.D X 250 mm, Synchrom, Inc.)에 적재하고 0.05% (v/v) TFA 함유 아세토니트릴 0-60% 선형 그라디언트 (linear gradient)로 60분 이상 용출시켰다. 3번째 컬럼에 대하여, 농축된 활성 분획을 20 mM Tris/HCl (pH 8.0)로 평형화된 TSKgel G2000SWXL 사이즈 배제 컬럼 (TOSOH)에 적용하고 활성 분획을 수집하였다. 최종 정제를 위하여, 농축된 활성 분획을 TSKgel ODS-100S C18 컬럼 (TOSOH)에 적용한 다음 0.05% (v/v) TFA 함유 50% 아세토니트릴/ H_2O 선형 그라디언트 (linear gradient)로 60분 이상 용출시켰다.
- [109]
- [110] 실시간 PCR 정량 분석
- [111] 총 RNA는 용해 Lys-타입 PG, β -1,3-글루칸, Tm-SAE의 활성화 형태 혹은 분할된 Tc-Spz가 미리 주입된 갈색거저리 유충으로부터 얻은 혈액세포 (hemocyte) 혹은 지방체 (fatbodies)에 대한 RNazol 반응제로 지정된 시점에 채취하였다. 1차 cDNA는 제조업체의 지시에 따라 1차 cDNA 합성 키트

(Roche)를 사용하여 합성하였다. AMP 유전자 발현을 정량화하기 위하여, 형광 실시간 PCR을 이중 스트랜드 DNA 염료, SYBR 그린 (Perkin Elmer, Boston MA)로 수행하였다.

[112] 테네신 1 (Tenecin 1)의 프라이머 쌍 (센스, 5'-ATG AAG CTT ACA ATC TTC GCA-3'; 서열번호 1, 안티센스, 5'-TTA TCT GCA AAC GCA GAC CC-3'; 서열번호 2), 테네신 2 (Tenecin 2)의 프라이머 쌍 (센스, 5'-CAG CAA AAC GGA TGG T-3'; 서열번호 3, 안티센스, 5'-TGC GTT GAA ATC GTG ATC TTG-3'; 서열번호 4), 및 대조군 리보솜 L-27A (RPL27A)의 프라이머 쌍 (센스, 5'-GCA TGG CAA ACA CAG AAA GCA TC-3'; 서열번호 5, 안티센스, 5'-ATG ACA GGT TGG TTA GGC AGG C-3'; 서열번호 6)를 타겟 유전자 전사 유전정보를 탐지하는데 사용하였다.

[113] SYBR 그린 분석은 제조업체의 지시에 따라 ABI PRISM 7700 system (PE Applied Biosystems) 상에서 수행하였다. 모든 샘플은 3회 수행하였으며, 탐지된 mRNA의 레벨은 대조군 RPL27A 값으로 표준화하였다. 표준화 데이터가 ΔC_t 분석에 따라 주어진 mRNA의 상대 레벨을 정량화하는데 사용되었다.

[114]

[115] 실험결과 분석

[116] 실시에 1. 불용성 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP-3 복합체의 downstream 인자 확인

[117] 최근에 갈색거저리 (Tenebrio)의 원상태 헤모림프가 헤파린 토요펄 (Toyopearl) 컬럼상에서 3개의 분획 (E1, E2 및 E3)으로 분획되었고, E2와 E3 분획물이 시험관 내에서 β -1,3-글루칸 의존적 아미다제 활성화에 충분하다는 것을 보여주어 상기 두 분획물이 β -1,3-글루칸 인식 신호를 전달하는데 필수적인 성분을 포함하고 있음을 입증한 바 있다.

[118] 불용성 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP-3 복합체가 끌어 모을 수 있는 (recruiting)조기 다운스트림 인자를 동정하기 위해 불용성 β -1,3-글루칸을 정제된 야생형 Tm-GNBP3과 정치배양한 후 Tm-GNBP-3과 결합한 불용성 β -1,3-글루칸을 E2 분획물과 정치배양 하였다.

[119] 얻어진 결과를 도 1에 정리하였다.

[120] 참고로, 도 1 중 (A) 내 레인들은 다음을 의미한다: 레인 1은 정제된 Tm-GNBP3 (lane 1)이고; 레인 2는 E2 분획과 불용성 β -1,3-글루칸을 배양한 후 결합되지 않은 (U) 분자이고; 레인 3은 E2 분획과 불용성 β -1,3-글루칸을 배양한 후 결합된(B) 분자이고; 레인 4는 E2 분획과 불용성 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP3 착물을 배양한 후 결합되지 않은 분자이고; 레인 5는 E2 분획과 불용성 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP3 착물을 배양한 후 결합된 분자를 의미한다. 상기 E2 분획은 헤파린-토요펄 (Heparin-Toyopearl) 칼럼 크로마토그래피를 통하여 갈색거저리 헤모림프로부터 획득되었다. 상기 겔은 쿠마쉬 블루 R-250 (CBB)로 염색되었다.

[121] 도 1 중 B는, 수집된 35 kDa 단백질의 N-말단 서열 및 활성화된 Tm-MSP의 N-말단 서열을 나타낸 것이다. 도 1 중 C는 Tm-MSP 항체를 이용하여 수행한

웨스턴 블롯 분석 결과를 도시한 것이다. 레인 1은 E2 분획과 불용성 β -1,3-글루칸을 배양한 후 결합되지 않은 (U) 분자를 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅으로 분석한 것이며; E2 분획과 불용성 β -1,3-글루칸을 배양한 후 결합된 (B) 분자를 동일한 방식으로 처리한 것이다. 레인 3은 E2 분획과 불용성 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP3 착물을 배양한 다음 결합되지 않은 분자이며; 레인 4는 E2 분획과 불용성 β -1,3-글루칸/TmGNBP3 착물을 배양한 다음 결합된 분자이다.

[122] 도 1A에 도시한 바와 같이, Tm-GNBP-3과 결합한 불용성 β -1,3-글루칸이 끌어들여 모으는 분자를 환원 조건에서 SDS-PAGE로 분리한 결과, 35kDa 밴드 (도 1A에서 레인 5)가 Tm-GNBP3과 비결합한 불용성 β -1,3-글루칸에 비하여 Tm-GNBP3과 결합한 불용성 β -1,3-글루칸에서 특이적으로 풍부하였다 (레인 3). 35kDa 단백질의 N-말단 서열이 활성화된 Tm-MSP의 촉매성 SP 도메인과 완전히 일치함으로써 불용성 β 1,3-글루칸/Tm-GNBP3 복합체가 활성화된 Tm-MSP를 끌어들여 모으고 (recruiting) 있음을 보여주었다.

[123] 또한, 35kDa 밴드가 β -1,3-글루칸/Tm-pro-MSP로부터 생성되는 것인지 여부를 확인하기 위해, E2 분획물과 β -1,3-글루칸 및 Tm-GNBP3 모두를 정치배양한 후 Tm-MSP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다 (도 1C). E2 분획물에서 Tm-pro-MSP는 Tm-GNBP-3의 부재 조건에서 활성화되지 않은 반면 (레인 1), Tm-GNBP3과 가용성 β -1,4-글루칸이 E2 분획물에 추가되었을 때 35kDa의 활성화 형태의 Tm-MSP로서 활성화되었다 (레인 3과 4). 이러한 결과는 활성화된 Tm-MSP가 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP3의 조기 다운스트림 분자임을 보여준다.

[124]

[125] 실시예 2: Tm-pro-MSP는 Ca^{2+} 의 존재 하에서 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP3의 인식 후에 활성형인 Tm-MSP로 처리됨.

[126]

[127] 시험관 내에서 Tm-GNBP3과 β -1,3-글루칸의 존재 하에서 Tm-pro-MSP가 활성형 Tm-MSP로 전환되는지 조사하기 위해, β -1,3-글루칸과 Ca^{2+} 의 존재 하에서 정제된 Tm-pro-MSP와 정제된 Tm-GNBP3을 정치 배양하였으며 그 결과를 도 2에 정리하였다.

[128]

[129] 참고로, 도 2중 A는 β -1,3-글루칸 및 Ca^{2+} 의 존재 조건에서 정제된 Tm-pro-MSP 및 정제된 Tm-GNBP3의 혼합물을 60분간 배양 시킨 다음, 유사-정제된 안티-Tm-MSP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. 그 결과를 레인 1로 나타내었다. 82 kDa Tm-pro-MSP 및 35 kDa 활성화된 Tm-MSP는 화살표로 표시하였다. Tm-GNBP1가 Tm-GNBP3 대신 첨가될 때, Tm-pro-MSP는 분할되지 않았다 (레인 5 참조). Ca^{2+} , Tm-GNBP3 혹은 β -1,3-글루칸 (레인 2-4 각각에 해당함)과 같은 일종의 성분들 부재 하에, Tm-pro-MSP는 그 활성화 형태로 전환될 수 없었다.

[130]

[131] 보다 구체적으로는, 예상된 바와 같이, β -1,3-글루칸과 Ca^{2+} 의 존재 하에서 60분간 정치배양한 후 N-말단의 아미노산 서열을 분석한 결과, Tm-pro-MSP가 활성형의 Tm-MSP로 거의 완전히 전환되었음을 확인하였다 (도 2A에서 라인 1). 그러나 두 성분 중 하나의 부재 조건에서는 Tm-pro-MSP가 활성형 Tm-MSP로 전환되지 않았다 (도 2A의 라인 2-4). 이러한 결과는 Tm-pro-MSP는 Ca^{2+} 의 존재 하에서 β -1,3-글루칸/Tm-GNBP3의 인식 후에 활성화된다는 것을 입증하며, β -1,3-글루칸에 대한 초기 인식 신호가 Tm-GNBP3과 Tm-MSP 분자에 의해 엄격하게 관리됨을 암시한다.

[132]

[133] 또한, Tm-GNBP3이 특이적인 β -1,3-글루칸 인식 단백질로서 작용하는지 여부를 확인하기 위해, 정제된 Tm-pro-MSP와, Lys-타입 PG 인식에 관여하는 것으로 알려진 Tm-GNBP1을 β -1,3-글루칸 및 Ca^{2+} 의 존재 하에서 공동으로 정치배양하였다. 예상된 바와 같이 35kDa의 밴드가 형성되지 않아 (도 2A에서 라인 5) Tm-GNBP3가 특이적인 β -1,2-글루칸 인식 단백질임을 확인할 수 있었다.

[134]

[135] 실시예 3: 시험관내 5가지 성분은 β -1,3-글루칸 인식 신호를 pro-Spz로 전달하는데 충분함.

[136] 본 발명자들은 Tm-pro-MSP가 β -1,3-글루칸/GNBP3 복합체의 존재 하에서 활성화되었기 때문에 다운스트림 SPs는 Lys형 PG 인식 신호전달 경로와 동일할 것이라고 추정하였다.

[137] 이에 β -1,3-글루칸 인식 신호가 3개의 SP 자이모겐 (zymogen)을 통해 pro-Spz로 실질적으로 전달되는지 여부를 조사하기 위해, 5개의 정제된 단백질 Tm-GNBP3, Tm-pro MSP, Tm-pro-SAE, Tm-pro-SPE 및 Tc-pro-Spz를 사용하여 생체외 인식 실험을 수행하였으며, 그 결과를 도 2B에 도시하였다.

[138]

[139] 참고로, 도 2B에서 Tmpro-MSP, Tm-GNBP3, Tm-pro-MSP, Tm-pro-SAE, Tm-pro-SPE 및 Tc-pro-Spz로된 혼합물이 β -1,3-글루칸 및 Ca^{2+} 존재 하에 60분간 배양되고 유사-정제된 안티-Tc-Spz 항체로 웨스턴 블롯팅에 의해 분석된 결과를 라인 1로 나타내었다. 30 kDa pro-Spz 및 12 kDa 처리된 Spz를 화살표로 표시하였다. 대조군으로서, Lys-type PG/Tm-PGRPSA/Tm-GNBP1/Tm-MSP/Tm-SAE/Tm-SPE/Tc-Spz과 같은 8개 성분이 함께 배양될 때, 분할된 12 kDa Spz가 생성되었다 (라인 9 참조).

[140] 이들 성분 중 어떠한 일종의 부재 시, Tc-Spz는 처리된 Spz로 전환될 수 없다는 것을 확인할 수 있었다 (라인 2-8 참조).

[141]

[142] 보다 구체적으로는, pro-Spz 분자로부터 처리된 Spz가 3개의 자이모겐 (zymogen)의 순차적인 활성화 후에 생성된다는 것이 웨스턴 블랏 분석에서

확인됨에 따라 (도 2B에서 레인 1), β -1,3-글루칸 및 Ca^{2+} 와 함께 GNB3/MSP/SAE/SPE의 존재 조건에서 pr-Spz가 Spz로 특이적으로 절단된다는 것을 보여주었다. 동일한 조건 하에서 Lys-타입 PG 인식 신호는 Lyz-타입 PG와 Ca^{2+} 의 조건하에서 6개의 필수 성분인 PGRPSA/GNB1/MSP/SAE/SPE를 통해 pro-Spz를 Spz로의 절단을 유도하였다(도 2B에서 레인 9).

[143] 이는 원상태의 헤모림프를 이용하여 얻어진 데이터에 의해 뒷받침되었다: E2 및 E3 분획물이 β -1,3-글루칸 및 Ca^{2+} 와 정치 배양되었을 때 활성화된 Tm-MSP 또는 활성화된 Tm-SAE의 특이적인 생성이 관찰되었다 (도 3).

[144] 참고로, 도 3은 β -1,3-글루칸-의존 갈색거저리 헤모림프에 존재하는 갈색거저리 유래 MSP 및 SAE의 활성을 보여주는 것이다. A는 Lys 타입 PG-의존 (레인 1-6) 및 β -1,3-글루칸-의존 (레인 7-11) 갈색거저리의 pro-MSP의 활성을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. E1, E2, E3 분획을 사용하였으며, 화살표는 갈색거저리 pro-MSP와 활성화된 MSP의 잘려진 catalytic 도메인을 나타낸다. 화살표 (a)는 non-specific 밴드를 나타낸다. 도 3 중 B는 Lys 타입 PG-의존 (레인 1-6) 및 β -1,3-글루칸-의존 (레인 7-11) 갈색거저리의 pro-SAE의 활성을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 화살표는 pro-SAE 및 잘려진 활성화된 SAE의 잘려진 catalytic 도메인을 나타낸다.

[145]

[146] 이러한 결과는 GNB3에 의해 매개된 β -1,3-글루칸인식 신호가 MSP/SAE/SPE를 통하여 3단계의 프로테오리틱 캐스케이드를 유도하여 pro-Spa의 Toll 수용체에 대한 리간드인 절단된 Spz로의 처리로 이어진다는 것을 명백히 입증하였다.

[147] 또한, 이러한 데이터는 β -1,3-글루칸 및 Lys-타입 PG 인식 신호는 3단계의 프로테오리틱 캐스케이드를 공유하여 그들의 인식 신호를 Toll 수용체로 전달한다는 것을 보여준다.

[148]

[149] 실시예 4: 거저리에서 AMP를 생산하는 물질 확인

[150] β -1,3-글루칸 인식 신호가 Toll 수용체의 리간드인 pro-Spz로 어떻게 전달되는지 생화학적인 증거를 제시하였지만, β -1,3-글루칸 의존적 3단계의 프로테오리틱 캐스케이드가 생체 내 조건에서 작동하는지 여부에 대하여 입증하지 못하였다.

[151] 이러한 β -1,3-글루칸 의존적 캐스케이드가 생체 내에서 작동한다고 가정한다면, 제안된 β -1,3-글루칸 의존적 Toll 신호전달 경로에 관여하는 어떠한 성분이 갈색 거저리에 주입되었을 때, 동일한 항미생물 펩타이드가 곤충 헤모림프에서 생산되어야 할 것이다. 또한, 항미생물 펩타이드는 Lys-타입 PG의 주입에 대해서도 유도될 수 있다.

[152] 이러한 가정을 증명하기 위해, β -1,3-글루칸, 활성화된 Tm-SAE 또는 처리된 Spz를 갈색거저리에 Lys-타입 PG도 마찬가지로 주입하였으며, 얻어진 결과를 도

4에 정리하였다. 참고로, 도 3에서 A는 곤충 염수 (컬럼 1), Lys타입 PG (50 ng, 컬럼 2), β -1,3-글루칸 (400 ng, 컬럼 3), 활성화된 Tm-SAE (50 ng, 컬럼 4) 혹은 처리된 Tc-Spz (50 ng, 컬럼 5) 주입 후, 항균 활성을 포도상 구균 (*S.aureus*), 대장균 (*E.coli*) 또는 효모 (*S.cerevisiae*)에 대하여 측정한 결과를 나타낸다.

[153]

[154] 도 4중 B는 항곰팡이 활성을 도시한 피크 1 및 피크 2의 C_{18} HPLC 용출 프로파일 그래프이다. 이중에서 (a)는 Lys-타입 PG, (b) β -1,3-글루칸, (c) 활성화된 Tm-SAE, (d) 처리된 Tc-Spz의 주입 결과를 각각 나타낸다. 도 4중 C는 정제된 2개의 갈색거저리 AMP의 SDS-PAGE 분석결과를 도시한 도면이다.

[155] 레인 1 및 3 혹은 레인 2 및 4와 같은 레인 쌍은 정제된 테네신 1 (Tenecin 1) (피크 1) 및 7.5 kDa 단백질 (피크 2)을 각각 나타낸다. 레인 1-2 및 3-4는 환원 조건 및 비환원조건 각각 하에 이들 단백질의 겔 이동성을 도시한 것이다.

[156] 도 4 중 D는 상기 피크 1, 피크 2 및 테네신 1 (Tenecin 1 (20)), 코레오프테리신 (Coleopteracin (25)) 각각에 대한 N-말단 서열을 대비한 것이다. 나아가, 도 4중 E는 테네신 2 (Tenecin 2), 코레오프테리신 (Coleopteracin) 및 호로트리신 2 (Holotricin 2)의 아미노산 서열을 대비한 것이다 (Lee, S. Y., Moon, H. J., Kurata, S., Kurama, T., Natori, S., and Lee, B. L. (1994) J Biochem 115, 82-86).

[157]

[158] 보다 구체적으로는, 상기 4개의 분자를 주입한 후 개별적으로 수집된 혈액 세포 (hemolymph) 시료는 포도상 구균 (*S.aureus*), 대장균 (*E.coli*) 또는 효모 (*S.cerevisiae*)에 대한 강력한 항미생물 활성을 나타내었다 (도 4A에서 컬럼 2-5).

[159] 동일한 AMP가 유도될 수 있는지 조사하기 위해, 4개의 각 분자가 주입된 larvae에서 유래된 4개의 상이한 배치의 헤모림프로부터 유도된 AMP를 정제하였다. C_{18} -HPLC 및 크리매제 크로마토그래피를 포함한 몇 개의 컬럼 크로마토그래피를 수행한 후 각 larvae의 배치 (batch)로부터 두 개의 동일한 AMP를 동질성 (homogeneity)으로 정제하였다 (도 4C).

[160] 피크-1의 N-말단 서열은 그램-양성 박테리아에 대하여 항박테리아 활성을 가진 항미생물 펩타이드인 테네신-1 (Tenecin-1)과 완벽하게 일치하였다. 테네신-1 (Tenecin-1)의 아미노산 서열과 이의 디설파이드 본드는 성체 초파리과 (*D. melanogaster*) 곤충의 디펜신 (defensin)과 매우 유사하였다. 피크 2의 N-말단 서열은 다른 딱정벌레과 (coleopteran) 곤충의 AMP, 소위 콜리오프테란 (Coleopteran)과 높은 상동성을 보여주었다.

[161] 밴드 2 단백질의 전체 아미노산 서열은 지정된 부분적, 라이실 (lysyl) 엔도펩티다제 및 엔도프로테이나제 Asp-N으로 처리된 펩타이드로부터 수득한 아미노산 서열의 어셈블리에 의해 결정되었다 (도 4E 및 도 5). 테네신 2 (Tenecin 2)는 딱정벌레과 (oleopteran) 곤충인 *Zophobas atratus* 및 참검정풍뎅이 (*Holotrichia diomphalia*) 유충으로부터 각각 정제된 유도성 항박테리아 펩타이드인 코레오프테리신 (Coleopteracin) 및 호로트리신 2 (Holotricin 2)와 높은

서열 동일성을 보여주었다 (65% 및 36%).

- [162] 이러한 결과는, 테네신 1 (Tenecin 1)과 테네신 2 (Tenecin 2)가 β -1,3-글루칸 및 Lys-타입 PG의 주입에 의해 유도되고, 같은 두 개의 AMP가 활성화된 SAE 또는 처리된 Spz에 의해 유도되어, 생체 내에서 β -1,3-글루칸 인식 Toll 신호 경로가 GGBP3/MSP/SAE/SPE/Spz에 의해 매개되고 3단계의 프로테오리틱 캐스테인드가 β -1,3-글루칸 및 Lys-타입 PG 인식 신호 간에 공유된다는 것을 보여준다.

[163]

- [164] 실시예 5: 테네신 유전자의 발현이 혈액세포에서 유도됨.

- [165] 병원성 미생물을 성체의 초파리 (*Drosophila*)로 주입하면, 대부분의 초파리 (*Drosophila*) AMP 유전자는 성체의 지방체에서 유도된다고 알려져 있다. 이에 테네신 1 (Tenecin 1) 및 테네신 2 (Tenecin 2)가 갈색거저리의 지방체에서 유도되는지 여부를 조사하기 위해, Lys-타입 PG, β -1,3-글루칸, 활성화된 SAE 또는 절단된 Spz 주입 후 12시간째에 지방체 또는 혈액세포 (hemocyte)로부터 수득한 mRNA 분획물에 대하여 실시간 PCR 분석을 수행하였고, 얻어진 결과를 도 6에 정리하였다.

[166]

- [167] 참고로, 도 6은 도 6중 (A) 및 (B)는 각각 혈액세포와 지방체 (fatbody) 내 테네신 1 (Tenecin 1)의 mRNA 레벨을 나타낸 것이다. 도 6중 (C) 및 (D)는 각각 혈액세포와 지방체 내 테네신 2 (Tenecin 2)의 mRNA 레벨을 나타낸 것이다. 각 도면에서 곤충 염수는 컬럼 1, Lys-타입 PG는 컬럼 2, β -1,3-글루칸은 컬럼 3, 활성화된 Tm-SAE는 컬럼 4로 그리고 처리된 Tc-Spz는 컬럼 5로 나타내었다. 곤충 염수가 주입된 갈색거저리 유충과 대비된 테네신 1 (Tenecin 1) 혹은 테네신 2 (Tenecin 2)의 상대 mRNA 레벨이 도시되었다.

[168]

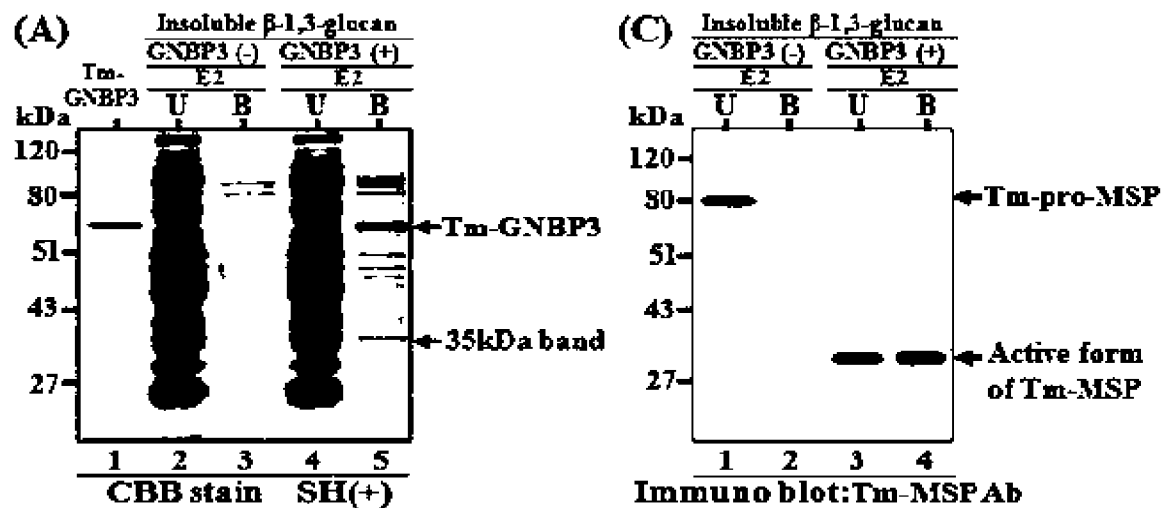
- [169] 그 결과, 놀랍게도, 테네신 1은 거저리 혈액세포 (hemocyte)에서 현저하게 유도된 반면에, 지방체에서는 약하게 유도되었다 (도 6A 및 6B). 테네신 2는 혈액세포 (hemocyte) 및 지방체에서 중간정도로 유도되었다 (도 6C 및 6D). 테네신 1의 동량의 mRNA 발현 수준이 혈액세포 (hemocyte)에서 상기 분자의 주입 후 3시간, 6시간 및 18시간째에 관찰되었다 (도 7). 이러한 결과는 초파리 성체와 달리 갈색 거저리는 테네신 1의 생산에 주로 혈액세포 (hemocyte)를 이용한다는 것을 보여준다.

[170]

청구범위

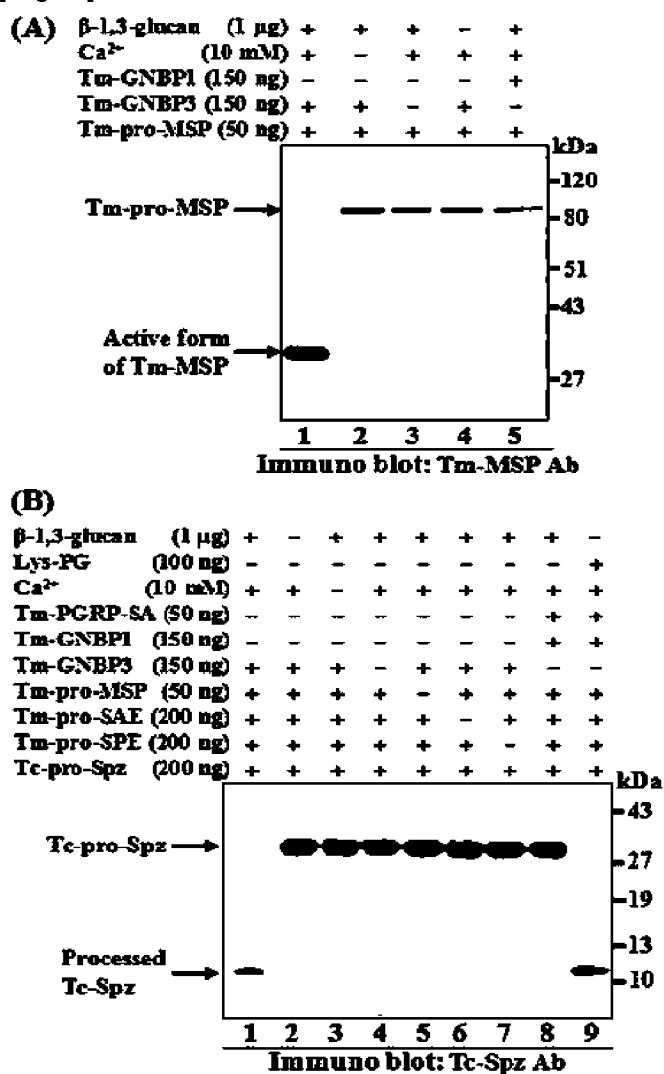
- [청구항 1] 갈색거저리 유래 GGBP-3, MSP, SAE, SPE 및 스페즐로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택된, β -1,3-글루칸의 유입 시, 체내에서 순차적으로 활성화되어 생체방어 단백질 (Toll) 신호 전달 경로를 활성화하는 것을 특징으로 하는 곰팡이 감염 진단용 마커.
- [청구항 2] β -1,3-글루칸 및 갈색거저리 유래 GGBP-3로 이루어진 복합체에 특이적인 항체를 포함하는 검체의 곰팡이 감염 진단용 조성물
- [청구항 3] 갈색거저리 유래 GGBP-3 및 MSP의 마커를 포함하는 검체의 곰팡이 감염 진단용 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 갈색거저리 유래 SAE, SPE 및 스페즐로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 마커를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 제 2항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 키트 또는 마이크로어레이 형태로 사용되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 6] 제 2항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물에 칼슘 이온이 더 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 7] 제 2항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 검체는 수혈용 혈액 또는 포유동물의 혈액, 식품, 수돗물, 지하수, 빗물 또는 무균 제품인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 거저리에 활성화 형태의 SPE 활성화 효소 (SAE) 또는 처리된 스페즐을 주입하여 항균 물질을 생산하는 방법.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서, β -1,3-글루칸 또는 Lys-타입 펩티도글리칸을 추가적으로 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 10] 제 8항에 있어서, 상기 물질은 곰팡이에 대해 항균활성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 11] 제 8항에 있어서, 상기 물질은 포도상 구균 (*S.aureus*), 대장균 (*E.coli*) 또는 효모 (*S.cerevisiae*)에 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 12] 제 8항에 있어서, 상기 항균 물질은 테네신 (tenecin) 인 것을 특징으로 하는 방법.

[Fig. 1]

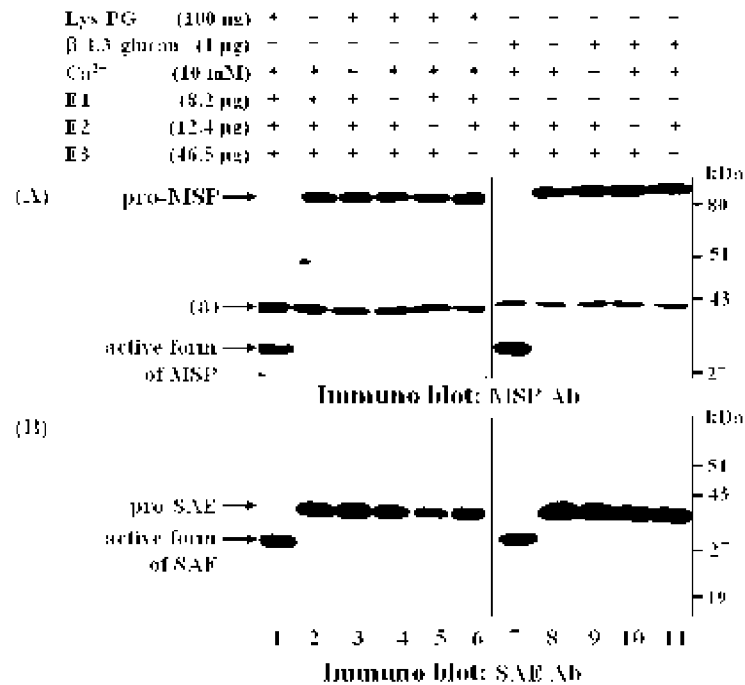


(B) Tm-MSP: 375 IVNGKP VKKG 384
35kDa band: 1 IVNGKP VKKG 10

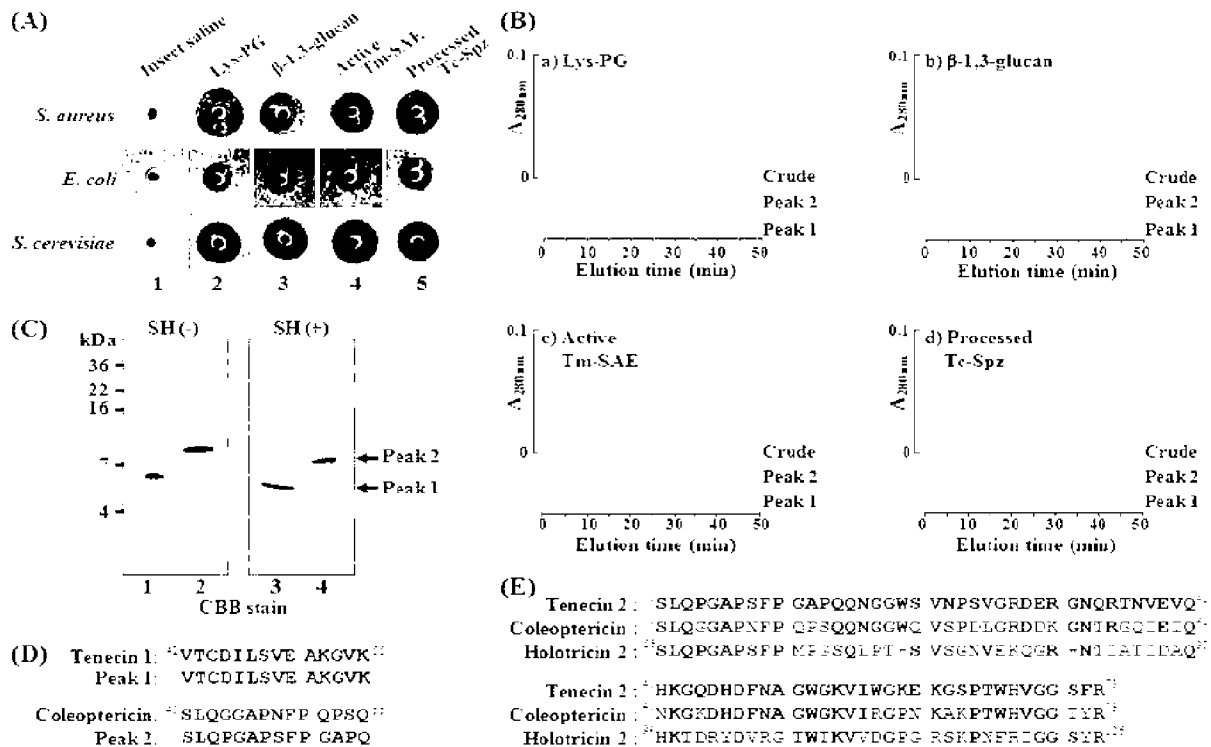
[Fig. 2]



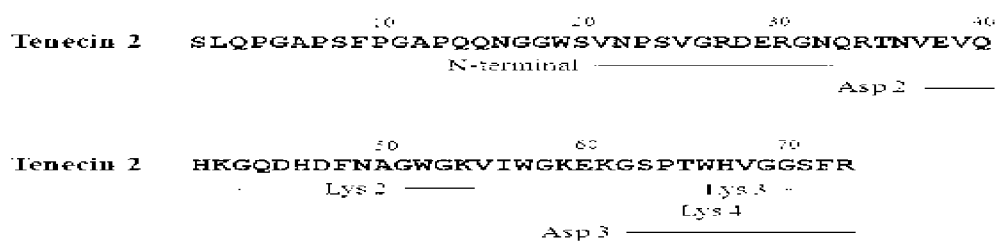
[Fig. 3]



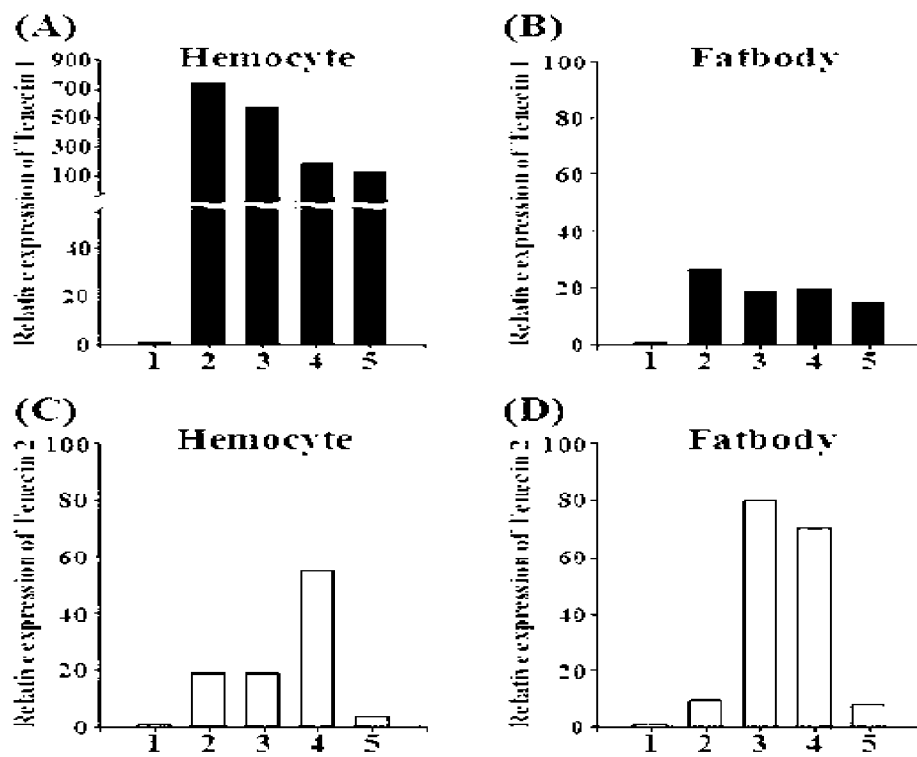
[Fig. 4]



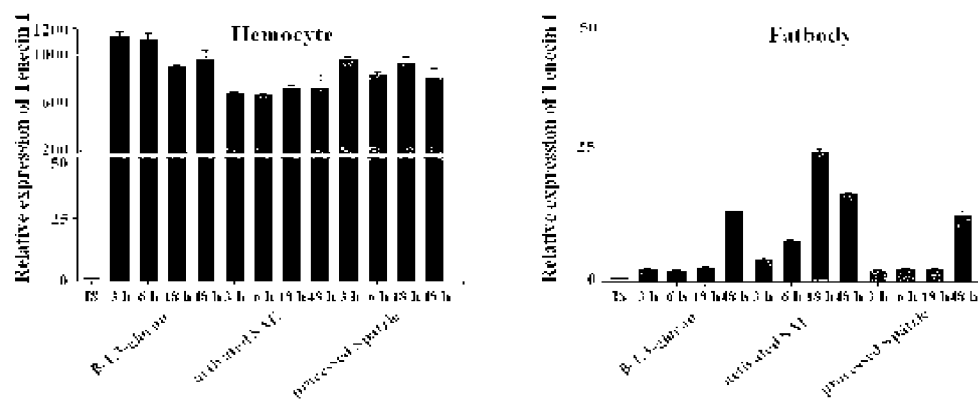
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

