(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년09월11일
(11) 등록번호 10-0857861
(24) 등록일자 2008년09월03일

(51) Int. Cl.
C07K 16/00 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0103512
(22) 출원일자 2007년10월15일
심사청구일자 2007년10월15일
(56) 선행기술조사문헌
FASEB Journal, Vol. 19, pp. 543-548

(73) 특허권자
주식회사 바이오리더스
대전광역시 유성구 용산동 559
한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
성문희
대전 유성구 장대동 283-4번지 갤러리빌 2차 902호
김철중
대전광역시 유성구 신성동 삼성한울아파트 103동 801호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 김지윤

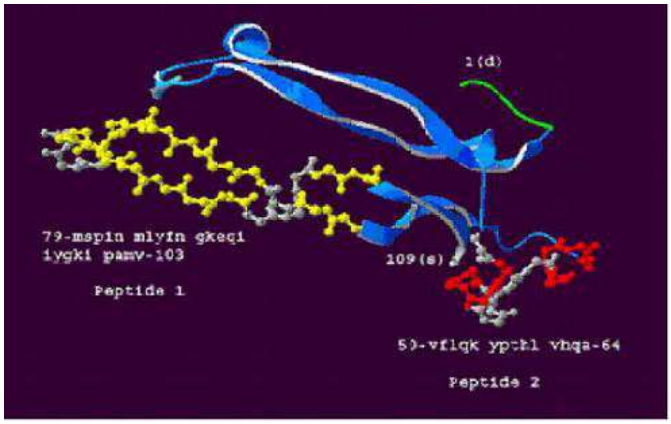
(54) Myo-2 펩타이드 중합체와 마이오스타틴의 융합단백질표면발현용 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 미생물

(57) 요 약

본 발명은 마이오스타틴 유래 항원성 펩타이드인 Myo-2의 중합체와 마이오스타틴 성숙단백질이 융합된 융합단백질, 상기 융합단백질의 표면발현벡터, 상기 벡터로 형질전환된 미생물 및 상기 미생물을 유효성분으로 함유하는 사료첨가제 또는 약학조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 사료첨가제 또는 약학조성물은 가축과 가금류 등의 근육발달 및 조절을 위해 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 근이영양증, 근육위축증과 같은 사람의 근육 소모성 질환 및 퇴행성 질환의 예방 및 치료용으로 사용할 수 있으며, 형질전환 균주는 배양하여 균체 그대로 사용하여도 효과를 나타내므로 매우 경제적이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

부하령

대전 유성구 신성동 대림두레아파트 103동 1405호

김지연

서울 금천구 시흥2동 벽산6단지아파트 601동 511호

김영숙

전북 전주시 덕진구 금암동 1가 525-19

허룡춘

대전 유성구 용산동 559번지 (주)바이오리더스

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 마이오스타틴 유래 펩타이드 Myo-2.

청구항 2

제1항의 마이오스타틴 유래 펩타이드 Myo-2가 2~8개 중합되어 있는 Myo-2 중합체.

청구항 3

제2항의 Myo-2 중합체와 마이오스타틴 성숙단백질이 융합된 융합단백질.

청구항 4

폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상과, 제2항의 Myo-2 중합체를 코딩하는 염기서열 및 마이오스타틴 성숙 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결되어 있는 세포표면 발현벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 마이오스타틴은 포유동물 또는 조류 유래인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 6

제4항의 벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네박테리아, 리스테리아 모노싸이토제네스 및 스트랩토코커스로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 미생물은 유산균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 마이오스타틴 유래 펩타이드(Myo-2) 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 제조하는 방법:

(a) 제6항의 형질전환된 미생물을 배양하여 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질을 미생물 표면에 발현하는 단계; 및

(b) 상기 마이오스타틴 성숙 단백질이 표면발현된 미생물을 회수하는 단계.

청구항 10

제9항의 방법으로 제조되고, 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 사료첨가제.

청구항 11

제9항의 방법으로 제조되고, 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 조성물.

청구항 12

제9항의 방법으로 제조되고, 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 유효성분으로 함유하는 근이영양증 또는 근육 위축증의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 13

제3항의 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 사료첨가제.

청구항 14

제3항의 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 조성물.

청구항 15

제3항의 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 근이영양증 또는 근육 위축증의 예방 또는 치료용 약학조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 마이오스타틴 유래 항원성 펩타이드인 Myo-2의 중합체와 마이오스타틴 성숙단백질이 융합된 융합단백질, 상기 융합단백질의 표면발현벡터, 상기 벡터로 형질전환된 미생물 및 상기 미생물을 유효성분으로 함유하는 사료첨가제 또는 약학조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 골격의 근육 성장을 선택적으로 하향-조절(negative-regulation)하는 성장 조절 인자로서 미오스타틴[myostatin, 또는 GDF-8(Growth and Differentioation Factor-8)이라 함]이 1997년 발견되었다 (McPherron, *et al.*, *Nature*, 387:83, 1997). 과거 190년 동안 근육 질량이 높고 연한고기로 품질이 좋은 소의 품종인 벨젼 블루(Belgian Blue)와 피드몬테스(Piedmontese)의 근육발달의 원인이 마이오스타틴을 코딩하는 유전자 서열상 돌연변이에 기인하고 (MaPherron and Lee, S.J., *PNAS* 94:12457, 1997), 이러한 "이중 근육화(double muscling)" 현상을 보이는 품종의 동물은 보통 동물보다 20-25% 증가된 평균 근육질량을 갖는다.

<3> 실험적으로 마이오스타틴이 넉-아웃(knock-out)된 생쥐 역시 골격 근육량이 증가되었으며, 마이오스타틴 음성 생쥐에서 분리한 근육은 야생형 생쥐의 근육보다 약 2-3배 정도의 무게를 나타내었다. 넉-아웃 생쥐는 야생형 생쥐보다 약 35% 높은 총 체중을 가지고, 마이오스타틴 유전자가 결핍된 생쥐는 정상적인 생쥐에 비해 80%이상의 근육 섬유를 갖는다고 보고되고 있으며, 이러한 넉-아웃 생쥐에서 관찰된 다량의 골격 근육 증대는 근육 섬유의 수 증가뿐 아니라 현저한 근육 섬유의 비대에 기인한 것이다.

<4> 상기와 같이 골격의 근육성장을 선택적으로 하향-조절(negative regulator)하는 성장조절인자인 마이오스타틴은 TGF-α 슈퍼패밀리에 속하며 375개의 아미노산 전구체로 구성되며, 약 109개의 아미노산 잔기의 C-말단 단편은 쥐과, 래트, 인간, 돼지, 닭 및 칠면조에서 100% 동일하며, 원숭이, 소, 양에 있어서는 C-말단 영역에서 세 개의 아미노산 잔기만 다르다. 이러한 C-말단 영역은 마이오스타틴의 생리적인 활성부분을 포함할 것으로 예측된다. 마이오스타틴은 진화과정에서 다양한 종들에 대하여 높은 보존률을 나타내고 있으며, 이는 마이오스타틴이 근육의 생물학적 조절과정에 있어서 필수적인 요소임을 시사한다 (McPherron and Lee, S.J., *PNAs*, 94:12457, 1997).

<5> 마이오스타틴의 발현은 골격 근육에 제한되어 나타나고, 지방조직에서는 낮은 수준으로 발현된다. 마이오스타틴은 골격의 근육 성장에 대한 특이적인 음성 조절자로서 기능하는 것으로 보이나, 성인 개체에서 마이오스타틴의 생리적인 역할은 알려져 있지 않다. 마이오스타틴의 생리적인 역할에 대한 연구는 근육의 손상 후 유발되는 실제적인 비대 또는 재생상의 중요한 기능에 집중되고 있으나, 지방 조직의 성장을 억제한다고도 알려져 있다. 또한 마이오스타틴이 동물의 발육에 있어서 국부적으로 또는 전신적으로 작용하는가에 대해서는 아직까지도 알려져 있지 않다.

<6> 최근에 진행되는 마이오스타틴을 이용한 연구들은, 대표적으로 마이오스타틴 유전자를 불활성화시키거나 마이오스타틴 단백질의 작용을 억제하는 방법으로, 근이영양증이나 근육위축증 같은 근육 소모성 질환이나 AIDS, 암 등으로 인한 근육 소실 등의 질병치료에 적용하기 위한 연구와 좋은 육질의 가축을 생산하기 위한 사료첨가제로서 개발하려는 연구 및 지방축적을 저해하여 비만치료에 사용하기 위한 연구 등이 진행되고 있다.

<7> 마이오스타틴의 작용을 억제시켜 근육성장을 유도하는 방법으로는 대표적으로 두 가지의 연구가 수행되고 있다.

첫째로 마이오스타틴의 활성을 방해하여 그 기능을 억제하는 여러 단백질(follastatin, mutant activin type II receptor, 마이오스타틴 propeptide 등)의 발견 및 이용을 들 수 있다. 두 번째로는 마이오스타틴 폴리펩타이드, 그의 부속체(subsequence) 및 돌연변이 부속체를 이용한 동물의 면역화로 마이오스타틴 폴리펩타이드에 대항하는 항체의 생산을 들 수 있다.

<8> 척추동물에 있어서 마이오스타틴 면역원에 대한 항체의 생성방법은 척추동물내에서 내인성 마이오스타틴 활성을 감소시켜 체중의 증가, 근육질의 증가, 근육세포수의 증가, 근육세포 크기의 증가, 체지방량의 감소, 근육강도의 증가 등의 생물학적 효과를 보일 수 있다. 그러나 근육 섬유의 수와 종류는 배아기에 결정되므로 성장한 사육용 동물에 있어서 마이오스타틴 활성 감소를 통해 근육 섬유의 수를 증가시키지는 않을 것이다. 이것은 고기의 품질, 품종의 특성 및 지방비에 부정적인 영향을 줄 수 있지만, 마이오스타틴의 활성이 감소된 동물에서 근육 비대로 인해 얻어지는 성장률 및 5~25%의 최대 체중 증가는 소, 돼지 및 가금류로부터 고기를 생산하는데 있어서 유용한 방법을 제공한다.

<9> 그러나 상기 접근법은 현재까지 마이오스타틴 폴리펩타이드 또는 그 부속체를 인위적으로 합성하거나 대장균에서 발현시켜 정제하고 이를 적용하려는 연구가 대부분으로, 실질적으로 산업적인 적용이 경제적으로 어려운 실정에 있다.

<10> 축산산업에 있어서, 동물의 성장률을 증가시키기 위한 방법으로 사료의 효율성을 증대시키기 위한 여러가지 사육프로그램 방법들이 개발 및 개선되고 있다. 그 중에서 의학적인 접근들로는 항생물질 또는 항생물질 유사 화합물을 사육 동물에게 투여하거나, 성장 호르몬과 같은 호르몬을 투여하는 접근방법들이 있다. 그러나 이러한 항생물질 및 항생물질 유사 화합물을 사육 동물에게 투여하는 것은 인간의 항생작용에 대한 교체-내성을 유발한다는 문제점을 야기할 수 있어, 법적으로 금지되는 추세에 있다. 또한, 사육동물에 성장 호르몬을 이용하는 경우 가격이 비싸고, 성장 호르몬의 짧은 반감기로 인해 다소 단기간으로 처치를 반복해야 하며, 처리된 동물로부터 얻은 고기에 잔류하는 성장 호르몬이 소비자들에게 문제를 야기할 우려가 있다. 이러한 의학적인 접근의 어려움으로 인해 동물의 성장률을 증가시키기 위한 대안으로 사료의 효율성 증대에 의한 사육프로그램들이 지속적으로 개발되고 있다.

<11> 미생물의 세포표면에 원하는 단백질을 부착하여 발현시키는 기술을 세포표면발현(cell surface display)기술이라 한다. 세포표면 발현기술은 박테리아나 효모 등 미생물의 표면단백질을 표면발현 모체(surface anchoring motif)로 사용하여 외래 단백질을 표면에 발현시키는 기술로서 재조합 생백신의 생산, 펩타이드/항체 라이브러리 제작 및 스크리닝, 전세포 흡착제(whole cell absorbent), 전세포 생물전환 촉매 등 다양한 응용범위를 갖는 기술로, 어떤 단백질을 세포 표면에 발현시키는가에 따라 그 응용범위가 결정되며, 따라서 세포표면 발현기술을 이용한 산업적 응용 잠재력은 상당하다고 할 수 있다.

<12> 성공적인 세포표면 발현기술을 위해서는 표면발현모체가 가장 중요하다. 다시 말하면, 이 기술의 핵심은 외래단백질을 효과적으로 세포표면에 발현시킬 수 있는 모체의 선정 또는 개발에 있다. 따라서,표면발현모체는 외래단백질을 세포표면까지 보내기 위해 세포내막을 통과할 수 있도록 도와주는 분비신호가 있고, 둘째 세포 외막 표면에 안정되게 외래단백질이 부착될 수 있도록 도와주는 표적신호가 있으며, 셋째 세포 표면에 다량으로 발현되나 세포의 성장에 거의 영향을 미치지 않고, 단백질의 크기에 관계없이 외래단백질의 3차원 구조에 변화없이 안정적으로 발현될 수 있어야 한다. 하지만 위의 조건을 모두 만족시키는 표면발현 모체는 아직까지 개발되지 않은 상태이다.

<13> 지금까지 알려져 사용된 표면발현모체로는 세포 외막 단백질, 지질 단백질(lipoprotein), 분비 단백질(secretory protein), 편모 단백질과 같은 표면기관 단백질 등 크게 4가지이다. 그람음성균(Gram negative bacteria)의 경우 LamB, PhoE (Charbit *et al.*, *J. Immunol.*, 139:1658, 1987; Agterberg *et al.*, *Vaccine*, 8:85, 1990), OmpA 등과 같은 세포 외막에 존재하는 단백질을 주로 이용하였고, 지질단백질인 TraT(Felici *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:301, 1991), PAL(peptidoglycan associated lipoprotein, Fuchs *et al.*, *Bio/Technology*, 9:1369, 1991) 그리고 Lpp (Francisco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 489:2713, 1992)가 이용되었으며, FimA나 1 형(type 1) 핌브리아(fimbriae)의 FimH 어드헤신(adhesin)과 같은 핌브리아 단백질(Hedegaard *et al.*, *Gene*, 85:115, 1989), PapA 필루(pilu) 서브유닛과 같은 필리(pili) 단백질 등을 세포 표면발현 모체로 이용하여 외래 단백질의 발현을 시도하기도 하였다. 이 외에도 빙핵활성단백질(Jung *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:576, 1998; Jung *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*, 22:348, 1998; Lee *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 18:645, 2000), 클레브시엘라 옥시토카(*Klebsiela oxytoca*)의 폴루라나제(Kornacker *et al.*, *Mol. Microl.*, 4:1101, 1990), 니세리아(Neiseria)의 IgA 프로테아제(Klauser *et al.*, *EMBO J.*, 9:1991,

1990), 대장균의 adhesin인 AIDA-1, shigella의 VirG 단백질, Lpp와 OmpA의 fusion 단백질 등을 표면발현 모체로 사용할 수 있다는 보고가 있다.

<14> 그람양성균(Gram positive bacteria)을 이용하는 경우에는 스타필로코쿠스 오레우스(Staphylococcus aureus) 유래의 protein A 및 FnBPB 단백질을 표면발현 모체로 사용하여 말라리아 항원을 효과적으로 발현시킨 보고가 있으며, 젖산 박테리아의 표면 코트(coat) 단백질을 이용하여 표면 발현에 이용했다는 보고와 *Streptococcus pyogenes* 유래의 M6 단백질(Medaglini, D *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 92:6868, 1995), *Bacillus anthracis*의 S-layer protein EA1, *Bacillus subtilis* CotB 등 그람양성 박테리아의 표면 단백질을 모체로 이용했다는 보고가 있다.

<15> 또한, 본 발명자들은 바실러스 속 균주 유래의 폴리감마글루탐산의 합성 복합체 유전자(pgsBCA)를 새로운 표면발현 모체로 활용하여, 외래단백질을 미생물의 표면에 효과적으로 발현시키는 새로운 벡터와 상기 벡터로 형질전환된 미생물의 표면에 외래단백질을 다량 발현시키는 방법을 개발한바 있다(대한민국 등록특허 제469,800호).

<16> 상기에서 소개된 표면발현 모체들을 이용하여 병원체의 항원 또는 항원 결정기를 유전공학적 방법을 이용하여 대량 생산이 가능한 세균에서 안정하게 발현시키고자 하는 연구가 시도되었다. 특히 비병원성의 세균 표면에 외래 면역원을 발현시켜 살아있는 상태로 경구투여할 경우 종래의 약독화된 병원성 세균이나 바이러스를 이용한 백신들보다 더 지속적이고 강한 면역반응을 유도할 수 있다고 보고되었다. 이러한 면역반응 유도는 살아있는 상태의 균에 대한 체내의 면역 반응에 의한 것으로, 세균의 표면 구조물들이 표면 발현된 외래단백질의 항원성(antigenicity)을 증가시키는 보조제(adjuvant)로서 작용하기 때문인 것으로 알려져 있다. 이러한 표면발현 시스템을 이용한 비병원성 세균의 재조합 생백신의 개발은 주목할 만하다.

<17> 이에, 본 발명자들은 마이오스타틴에 대한 높은 항원성을 나타낼 수 있는 마이오스타틴 융합단백질을 세균표면에 효과적으로 발현시킬수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 바실러스속 균주 유래의 폴리감마글루탐산의 합성 복합체 유전자(pgsBCA)를 표면발현 모체로 활용하여 Myo-2 중합체와 마이오스타틴의 융합단백질을 유산균에 발현시킬 경우, 상기 융합 단백질이 효과적으로 표면발현되고, 상기 융합단백질이 표면발현된 유산균을 동물에의 경구투여하면, 혈중 항체 생성이 증가하고, 체중 및 근육량이 증가한다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<18> 본 발명의 목적은 마이오스타틴 유래 펩타이드 Myo-2 및 상기 Myo-2 중합체를 제공하는데 있다.

<19> 본 발명의 다른 목적은 상기 Myo-2 중합체와 마이오스타틴 성숙단백질이 융합된 융합단백질을 제공하는데 있다.

<20> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합단백질의 표면발현용 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 미생물을 제공하는데 있다.

<21> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합단백질이 표면발현된 미생물의 제조방법을 제공하는데 있다.

<22> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합단백질 또는 상기 융합단백질이 표면발현된 미생물을 함유하는 사료첨가제를 제공하는데 있다.

<23> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합단백질 또는 상기 융합단백질이 표면발현된 미생물을 함유하는 약학조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<24> 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 마이오스타틴 유래 펩타이드 Myo-2 및 상기 Myo-2가 2~8개 중합되어 있는 Myo-2 중합체를 제공한다.

<25> 본 발명은 또한, 상기 Myo-2 중합체와 마이오스타틴 성숙단백질이 융합된 융합단백질을 제공한다.

<26> 본 발명은 또한, 상기 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상과, 상기 Myo-2 중합체를 코딩하는 염기서열 및 마이오스타틴 성숙 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결되어 있는 세포표면 발현벡터를 제공한다.

<27> 본 발명은 또한, 상기 벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.

<28> 본 발명은 또한, (a) 상기 형질전환된 미생물을 배양하여 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질을 미생물 표면에 발현하는 단계; 및 (b) 상기 마이오스타틴 성숙 단백질이 표면발현된 미생물을 회수하는 단계를 포함하는 마이오스타틴 유래 펩타이드(Myo-2) 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 제조하는 방법을 제공한다.

<29> 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 사료첨가제를 제공한다.

<30> 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 조성물을 제공한다.

<31> 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 유효성분으로 함유하는 근이영양증 또는 근육 위축증의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

<32> 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 사료첨가제를 제공한다.

<33> 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 조성물을 제공한다.

<34> 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질을 유효성분으로 함유하는 근이영양증 또는 근육 위축증의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

<35> 본 발명은 또한, 상기 사료첨가제 또는 약학조성물을 동물에 투여하는 것을 특징으로 하는 동물의 근육세포의 수 또는 근육세포의 크기를 증가시키는 방법을 제공한다.

효 과

<36> 본 발명에 따른 사료첨가제 또는 약학조성물은 가축과 가금류 등의 근육발달 및 조절을 위해 활용할 수 있을 뿐만 아니라, 근이영양증, 근육위축증과 같은 사람의 근육 소모성 질환 및 퇴행성 질환의 예방 및 치료용으로 사용할 수 있으며, 형질전환 균주는 배양하여 균체 그대로 사용하여도 효과를 나타내므로 매우 경제적이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<37> 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 마이오스타틴 유래 펩타이드 Myo-2, 상기 Myo-2가 2~8개 중합되어 있는 Myo-2 중합체 및 상기 Myo-2 중합체와 마이오스타틴 성숙단백질이 융합된 융합단백질에 관한 것이다.

본 발명에서는 마이오스타틴 성숙 단백질의 예측 3차 구조를 바탕으로 myo-2 펩타이드를 선정하고, 상기 myo-2 펩타이드를 종계에 투여하여, 종계가 산란한 계란에서 태어난 병아리가 높은 증체량을 나타내는 것을 확인하였다.

본 발명에 따른 마이오스타틴 유래 펩타이드 Myo-2는 생체 내의 마이오스타틴 단백질에 대하여 항원성을 나타내어, Myo-2로 면역화된 개체에 대하여 체중 증가 효과를 나타내며, 상기 Myo-2 중합체는 Myo-2의 마이오스타틴에 대한 항원성을 증가시키기 위하여, 2~8개의 Myo-2 펩타이드를 중합시킨 것이며, 상기 Myo-2 중합체를 마이오스타틴 성숙 단백질과 융합시킨 융합단백질은 마이오스타틴에 대하여 매우 높은 항원성을 나타내어, 근육의 증체량을 증가시킨다.

본 발명에 따른 Myo-2 중합체와 마이오스타틴 성숙단백질이 융합된 융합단백질을 미생물에 표면발현된 형태로 수득하기 위하여, 본 발명에서는 상기 Myo-2 중합체와 마이오스타틴 성숙단백질이 융합된 융합단백질과 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 융합시킨 융합단백질을 제조하였다.

본 발명에서 상기 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체는 pgsB, pgsC 및 pgsA 유전자에 의해 코딩되는 세포외막 단백질로, 아미노산 일차 서열 구조와 특성상 외래단백질을 세포 표면에 발현시키는 표면발현 모체이다.

<38> 본 발명에서 상기 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 (pgsB, pgsC 및 pgsA)를 함유하는 세포표면 발현벡터는 폴리감마글루탐산을 생산하는 모든 바실러스 속 균주로부터 pgsBCA를 획득하여 제조된 세포표면 벡터를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스 청국장(*Bacillus subtilisvar.*

chungkookjang, KCTC 0697BP) 유래의 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자를 함유하는 세포표면 발현벡터를 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들면, 바실러스 서브틸리스 청국장에 존재하는 pgsBCA 유전자의 염기서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 타균주 유래의 pgsBCA 유전자를 사용하여 제조된 발현 벡터를 이를 이용하는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.

<39> 본 발명은 다른 관점에서, 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코딩하는 유전자 pgsB, pgsC 및 pgsA로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상과, 상기 Myo-2 중합체를 코딩하는 염기서열 및 마이오스타틴 성숙 단백질을 코딩하는 유전자가 작동가능하게 연결되어 있는 세포표면 발현벡터 및 상기 세포표면 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물에 관한 것이다.

<40> 본 발명에 있어서, 상기 마이오스타틴은 포유동물 또는 조류 유래인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 재조합 미생물은 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네박테리아, 리스테리아 모노싸이토제네스 및 스트랩토코커스로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 상기 재조합 미생물은 유산균일 수 있다.

<41> 본 발명의 마이오스타틴은 골격의 근육 성장을 선택적으로 하향-조절 (negative-regulation)하는 성장 조절 인자로서, TGF-α(transforming growth factor-α) 슈퍼패밀리에 속하며 375개의 아미노산 전구체로 구성되어 있으며, 본 발명에 있어서, 마이오스타틴 단백질의 성숙 도메인은 상기 아미노산 전구체에서 분비시그널과 프로도메인을 삭제한 부위로, 마이오스타틴의 활성을 나타내는 부위이다.

<42> 본 발명에 있어서, 상기 마이오스타틴은 포유동물, 조류 또는 어류 유래인 것을 특징으로 할 수 있다. 마이오스타틴은 진화과정에서 다양한 종들에 대하여 높은 보존률을 나타내고 있으며, 특히, 마이오스타틴의 약 109개의 아미노산 잔기의 C-말단 단편은 쥐과, 래트, 인간, 돼지, 닭 및 칠면조에서 100% 동일하며, 원숭이, 소, 양에 있어서는 C-말단 영역에서 세 개의 아미노산 잔기만 다르다. 이러한 C-말단 영역은 마이오스타틴의 생리적인 활성부분을 포함할 것으로 예측된다.

<43> 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 형질전환된 미생물을 배양하여 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질을 미생물 표면에 발현하는 단계; 및 (b) 상기 마이오스타틴 성숙 단백질이 표면발현된 미생물을 회수하는 단계를 포함하는 마이오스타틴 유래 펩타이드(Myo-2) 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 융합 단백질은 발현벡터에 함유된 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체인 pgsB, pgsC 또는 pgsA가 코딩하는 폴리감마글루탐산 합성효소 단백질과 융합된 형태로 발현되며, 상기 융합 단백질은 상기 폴리감마글루탐산 합성효소 단백질에 의하여 미생물의 표면으로 이동하여 위치하게 된다.

상기 융합 단백질은 그 기능을 잃지 않으면서, 미생물의 표면에 발현되기 때문에, 미생물에 표면발현된 상태로 사용될 수 있으며, 미생물에 표면발현된 채로 동물에 투여되어 동물 체내에서 마이오스타틴에 대한 면역반응을 유도할 수도 있다.

본 발명에 따라 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물은 마우스에 경구투여하였을 때, 상기 융합단백질에 대한 항체를 효과적으로 생성하였으며, 융합단백질이 표면발현되지 않은 미생물을 투여한 대조군과 비교하여 체중이 증가하였다. 또한, 근육세포내에서의 마이오스타틴 신호전달에 대하여 높은 저해효과를 나타내었다.

또한, 본 발명에 따른 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 투여한 육계에서 닭 마이오스타틴에 대한 높은 항체가를 나타내었으며, 아울러 대조군에 비하여 높은 증체량을 나타내었다.

<44> 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 사료첨가제를 제공한다.

<45> 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 유효성분으로 함유하는 동물의 근육성장 촉진 또는 증체율 향상용 조성물을 제공한다.

<46> 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 마이오스타틴 유래 펩타이드 중합체와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합 단백질이 표면발현된 미생물을 유효성분으로 함유하는 근육 소모성 질환 또는 퇴행성 질환의 예

방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

<47> 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 사료첨가제 또는 조성물을 동물에 투여하는 것을 특징으로 하는 동물의 근육세포의 수 또는 근육세포의 크기를 증가시키는 방법을 제공한다.

<48> 본 발명에 있어서, 상기 투여는 경구투여인 것을 특징으로 할 수 있다.

<49> 본 발명에 의한 근육 소모성 질환 및 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물은 인체용의 경구 백신으로, 근육과 관련된 질병인 근이영양증, 근육위축증 같은 근육 소모성 질환 및 퇴행성 질환의 치료 및 예방에 이용될 수 있다.

<50> 본 발명에 의한 약학적 조성물은 인간을 포함한 동물에 경구용 또는 식용으로 섭취할 수도 있고, 피하 또는 복강에 주사할 수도 있고, 비강 투여를 할 수 있다.

<51> 본 발명의 마이오스타틴 융합단백질을 이용한 미오스타틴의 항체 유도 및 이에 의하여, 마이오스타틴의 활성을 감소시키는 방법은 병리적인 미생물에서 교차-내성과 관련된 문제가 발생하지않고 다른 TGF-α 패밀리와 마이오스타틴의 서열 동일성은 아미노산 수준에서 30-40%로 낮기 때문에, 생체 내에서 내인성 마이오스타틴(GDF-8)에 대항하여 유발되는 항체의 교차-반응성에 관하여 문제를 발생시키지는 않을 것이다.

<52> 또한, 동물에서 얻은 고기중에 외생적으로 투여된 성장 호르몬이 잔존할 가능성이 없다. 게다가 벨젼 블루 및 피드몬테스와 같은 소의 품종은 생산에 수반되는 윤리적인 문제점(카이사르의 구획법에 의해 많은 송아지가 태어나고 그밖의 기관은 크기가 감소됨)을, 출산 후 성인기까지만 동물내 미오스타틴을 하향 조절함으로써 완전히 해소할 수 있다. 실제로 균육 질량을 증가시킨 동물이 출산을 해야할 필요가 없고 따라서 도살용으로 키워진 이들 동물에 대해 처치를 유보할 수 있다. 본 발명에 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

<53> 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

<54> 본 발명의 약학조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학조성물은 1일 10 내지 500mg/kg으로, 바람직하게는 50 내지 300mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<55> 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

실 시 예

<56> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<57> 특히, 하기 실시예에서는 융합단백질에 사용되는 마이오스타틴 단백질 유전자로, 성숙(mature) 형태의 마이오스타틴 단백질의 유전자를 적용하였으나, 성숙(mature) 마이오스타틴 단백질에 대한 면역성을 증가시키는 단백질의 유전자와 복합적으로 사용할 수 있다.

<58> 또한, 하기 실시예에서는 바실러스 서브틸리스 청국장(*Bacillus subtilisvar. chungkookjang*, KCTC 0697BP)으로부터 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자 중 pgsBCA를 획득하여 이용하였으나, 유전자는 폴리감마글루탐산을 생산하는 모든 바실러스 속 균주로부터 pgsBCA를 획득하여 제조된 벡터 또는 이 벡터를 이용한 형질전환된 미생물 등도 본 발명의 범위에 포함된다 하겠다. 예컨대, 바실러스 서브틸리스 청국장에 존재하는 pgsBCA 유전자의 염기서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 타균주 유래의 pgsBCA 유전자를 사용하여 백신용 벡터를 제조하거나, 이를 이용하는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.

<59> 또한, 하기 실시예에서는 유전자 pgsBCA 중에서 pgsA만을 활용하여 표면 발현용 벡터를 제작하였으나, 유전자 pgsBCA의 전부 또는 일부만을 사용하여 백신용 벡터를 제작하는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.

<60> 또한, 하기 실시예에서는, 상기 벡터에 대한 숙주로서, 락토바실러스만을 사용하였으나, 이 세균 이외에 여하한 그람음성균 또는 그람양성균도 본 발명에 의한 방법으로 형질전환시키면 동일한 결과를 얻을 수 있다는 사실도 당업자에게는 자명할 것이다.

<61> 또한, 하기 실시예에서는, 백신용 벡터로 형질전환된 미생물 자체를 마우스, 닭 및 돼지의 생체에 적용한 예만이 제시되어 있다. 그러나, 동물용 사료첨가제 및 백신관련 기술분야의 지식으로 보아, 상기 미생물로부터 추출된 미오스타틴 성숙(mature) 단백질 또는 정제된 발현단백질을 생체에 적용하더라도 동일하거나 유사한 결과를 얻을 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 사실일 것이다.

<62> **실시예 1: 마이오스타틴의 항원성 펩타이드 부위 선정**

<63> 마이오스타틴의 면역유도 효능을 증강시키기 위하여, 마이오스타틴 성숙 단백질의 예측 3차 구조를 바탕으로 선정된 두 항원성 펩타이드 부위(Myo-1 및 Myo-2)와 마이오스타틴 성숙 단백질을 각각 정제하여 육용 종계에 경피 투여하였고 면역화된 종계의 계란을 부화시켜 병아리의 성장 촉진 유도 효능을 비교하였다.

<64> 도 1에 나타난 바와 같이, Myo-1(서열번호 2) 및 Myo-2(서열번호 1)는 마이오스타틴 성숙 단백질의 예측 3차 구조를 참고로 항원성 펩타이드 부위로 선정하였으며 실험군은 정제된 마이오스타틴 성숙 단백질 투여군(mAV group), Myo-1 투여군, Myo-2 투여군의 세 개 군과 대조군으로 나누고 각 군당 female 종계 4마리, male 종계 1마리씩 모두 5마리씩 실험모델로 선정하였다.

<65> 1차 경피 투여는 닭의 마이오스타틴 유전자(서열번호 4)를 대장균에서 발현시켜 가용성 정제된 마이오스타틴 성숙 단백질과 carrier protein으로 KLH이 접합된 Myo-1 펩타이드 및 Myo-2 펩타이드를 합성하여(Anygen, 한국), 각각 1 mg 씩 complete Freund's adjuvant와 1:1 비율로 섞어 female 종계에 경피 투여하였고, 3주 후 2차 경피 투여 시에는 각각의 단백질들과 incomplete를 각각 1:1 비율로 섞어 female 종계에 경피 투여하였으며, 다시 3주 경과 후 2차 투여와 같은 방법으로 3차 경피 투여하였다. 각 실험군 별로 면역화된 종계의 계란을 부화시킨 후, 부화된 병아리를 28일까지 사육하여 증체량을 측정하였다.

<66> 상기와 같이 부화된 병아리를 출하 시점인 28일까지 사육하여 증체율을 분석한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 정제된 마이오스타틴 성숙 단백질 투여군 (mAV group)의 체중은 대조군에 비해 약 10%의 체중 증가율(증체율)을 보였고, Myo-2 펩타이드 투여군은 약 13%의 증체율로 가장 높은 증체율을 보였으며, Myo-1 펩타이드 투여군은 대조군에 비하여 체중 증가가 없는 것으로 나타났다. 그러므로, 정제된 마이오스타틴 성숙 단백질과 Myo-2 펩타이드를 모체에 투여하여도 모체이행항체 작용으로 그 후대 병아리에도 높은 증체량을 나타내는 것으로 확인되었다.

<67> **실시예 2: 4Myo-2 펩타이드 중합체(4xMyo-2) 제조 및 표면발현용 벡터(pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom) 제조**

<68> 마이오스타틴 유래 펩타이드 및 성숙 마이오스타틴이 투여된 모계로 부터 얻어진 병아리에서 가장 높은 증체량을 나타낸 닭의 Myo-2 펩타이드를 코딩하는 유전자를 단위체로 사용해서 4번 반복한 중합체(4xMyo-2)를 제조하고 C-말단부위에 닭 마이오스타틴 성숙 단백질(CMyom)을 코딩하는 유전자를 융합시켜 표면발현 할 수 있는 벡터 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom을 제조하였다.

<69> 4Myo-2 펩타이드 중합체를 만들기 위한 단위체를 합성하기 위하여 서열번호 5 (5'-gatccgtttttcttcaaaagtatccacatacacatcttgttcatcaagctggtggttcaagatctggtac-3') 및 서열번호 6 (5'-cagatcttgaaccaccagcttgatgaacaagatgtgtatgtggatactttgaag aaaaacg-3')의 염기서열을 갖는 프라이머를 각각

10pM/㎕로 희석하여 동량의 부피를 혼합한 후 37℃에서 1시간 반응시켜, 도 3과 같이 양쪽에 제한효소 *Bam*HI, *Kpn*I 으로 절단된 형태의 Myo-2 단위체를 형성시키고, 상기 Myo-2 단위체를 pRSET(A)벡터(Invitrogen, USA)의 *Bam*HI, *Kpn*I 제한효소 자리에 삽입하여 pRSET(A):Myo-2를 제조하였다.

<70> pCR T7/NT-TOPO(Invitrogen)에 클로닝되어 있는 약 1.3kb 닭 마이오스타틴 유전자를 주형으로 사용하고 서열번호 7(5'-agatctgtcgacgaggtcagagttacagac-3')과 서열번호 8(5'-ggtacctctagattattagtcgactcatgagcacccgcaacg-3')의 염기서열을 갖는 프라이머를 사용해서 PCR 방법하여, 닭의 마이오스타틴 성숙 단백질을 코딩하는 유전자를 증폭시킨 후, 제한효소 *Bgl*II 및 *Kpn*I으로 절단한 단편을 상기 제작된 pRSET(A):Myo-2 벡터의 *Bgl*II, *Kpn*I 제한효소자리에 삽입하여 pRSET(A):Myo-2-CMyom 벡터를 제조했다.

<71> 상기 pRSET(A):Myo-2-CMyom 벡터를 *Bam*HI, *Kpn*I 제한효소로 절단하여 얻은 DNA 단편과 pRSET(A):Myo-2-CMyom를 *Bgl*II, *Kpn*I 제한효소로 절단하여 벡터를 얻은 후 T4 ligase로 ligation 시켜 두 개의 Myo-2 펩타이드를 코딩하는 유전자가 반복 되어 연결된 pRSET(A):2xMyo-2-CMyom 벡터를 제조하였다.

<72> 동일한 방법으로 pRSET(A):2xMyo-2-CMyom을 *Bgl*II와 *Kpn*I 제한효소자리에 2XMyo-2-CMyom을 반복하여 삽입하는 단계를 거쳐 pRSET(A):4xMyo-2-CMyom을 제조하였다.

<73> 바실러스속 균주에서 유래한 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자(pgsBCA) 중 pgsA를 이용하여 그람음성 미생물 및 그람 양성 미생물을 숙주로 하여 닭의 마이오스타틴 4xMyo-2와 마이오스타틴의 성숙(mature) 단백질을 융합한 목적 단백질을 코딩하는 유전자와 마이오스타틴 성숙 단백질만을 표면발현할 수 있는 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom (도 4a)와 pHCE2LB:pgsA-CMyom (도 4b) 벡터를 제조하였다.

<74> 상기 제조된 pRSET(A):4xMyo-2-CMyom를 *Bam*HI, *Kpn*I 제한효소로 절단하여 4xMyo-2-CMyom을 확보하고, pCR T7/NT-TOPO(Invitrogen)에서 PCR을 통해 CMyom을 확보한 뒤, 표면발현용 벡터인 pHCE2LB:pgsA-HPVL1 (KCTC 10349BP: pHCE2LB:pgsA-HPVL1로 형질전환된 대장균)의 HPVL1 부분이 *Bam*HI과 *Xba*I 제한효소 사이트를 이용하여 제거된 pHCE2LB:pgsA의 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자 pgsA의 C-말단 부위에 번역코돈을 맞추어 각각 연결하여 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom와 pHCE2LB:pgsA-CMyom를 제작하였다.

<75> **실시예 3 : pgsA:4xMyo-2-CMyom 와 pgsA:CMyom의 세포 표면발현**

<76> 실시예 2에서 제작된 마이오스타틴 융합 단백질의 표면 발현용 벡터 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom로 형질전환된 락토바실러스와 마이오스타틴 성숙 단백질의 표면발현용 벡터pHCE2LB:pgsA-CMyom으로 형질전환된 락토바실러스에서 pgsA와 융합된 4xMyo-2 중합체와 성숙 단백질 (pgsA:4xMyo-2-CMyom) 융합체의 발현 및 성숙 단백질 (pgsA:CMyom)의 발현 여부를 조사하였다.

<77> 폴리감마글루탐산을 합성하는 유전자 pgsA의 C-말단과 4xMyo-2-CMyom과 CMyom 단백질의 표면발현을 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom로 형질전환된 락토바실러스 카제이와 pHCE2LB:pgsA-CMyom로 형질전환된 락토바실러스 카제이를 MRS배지 (Lactobacillus MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA), 30℃에서 정치배양하여 유도한 후, 배양 세포를 이용한 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 pgsA 대한 특이 항체를 이용한 웨스턴블럿팅을 수행하여 상기 융합단백질의 발현을 확인하였다.

<78> 구체적으로, 발현이 유도된 락토바실러스 카제이 전세포를 동일한 세포농도에서 얻은 단백질로 디네이쳐(denature)시켜 시료를 준비하고, 이를 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동으로 분석한 다음 분획된 단백질들을 PVDF (polyvinylidene-difluoride membranes, Bio-Rad) 멤브레인에 옮겼다. 단백질들이 옮겨진 PVDF 멤브레인을 블로킹 완충용액(50 mM 트리스 염산, 5 % 스킴 밀크(skim milk), pH 8.0)에서 1시간 동안 흔들어 블로킹시킨 다음, pgsA에 대한 토끼 유래의 폴리클론 1차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 HRP가 접합된 토끼에 대한 2차 항체를 블로킹 완충용액에 10000배 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 세척된 멤브레인에 기질(lumigen PS-3 acridan, H_2O_2)을 첨가하여 약 1분간 발색시키고 CCD 카메라로 pgsA에 대한 특이 항체와 상기 융합단백질간의 특이적인 결합을 확인하였다 (도 5).

<79> 도 5에서 control은 형질전환되지 않은 락토바실러스 카제이이고, CMyom은 락토바실러스 카제이/pHCE2LB:pgsA-CMyom이며, 4xMyo-2-CMyom은 락토바실러스 카제이/pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom이다. 도 5에 나타난 바와 같이, 각각의 유산균 전세포에서 특이 융합 단백질(약 55.5 kDa)의 pgsA-CMyom와 약 66.9 kDA 특이 융합 단백질인 pgsA-4xMyo-2-CMyom을 확인할 수 있었다. pgsA가 약 42 kDa이고, CMyom 단백질이 약 13.5 kDa이며 4xMyo-2-CMyom 단백질이 약 24.9 kDa이므로 도 5의 55.5 kDa과 66.9 kDa을 나타내는 밴드는 각각 pgsA와 CMyom 융합 단

백질과 pgsA와 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질임을 알 수 있었다.

<80> **실시예 4: 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질을 표면발현하는 락토바실러스에 의한 마우스내 면역 반응 유도 및 체중 변화율 조사**

<81> 실시예 3과 동일한 방법으로 발현유도된 락토바실러스를 마우스에 경구투여하고 pgsA와 융합된 표면발현 4Myo-2-CMyom 융합단백질과 CMyom 단백질의 면역 반응 유도 및 체중 변화를 조사하였다.

<82> 구체적으로 락토바실러스 카제이/pHCE2LB:pgsA-CMyom와 락토바실러스 카제이/pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom을 배양하여 수확한 후, 전세포를 완충용액 (PBS, pH 7.4)으로 세척하고, 항원이 표면발현된 락토바실러스를 6주령의 C57BL/6마우스에 경구투여 하였다. 이때 실험군은 4xMyo-2-CMyom와 CMyom이 표면발현된 락토바실러스를 처리하는 두 개의 군(10마리/군)이며, 경구투여로 1일 간격으로 다섯 번, 1주 후 다시 1일 간격으로 다섯 번 투여하였으며, 1회 투여 시, 마리당 5■10^9의 항원 표면발현 락토바실러스를 투여하였다. 그리고 대조군으로 동일한 수의 C57BL/6마우스에 유산균만 배양시킨 배양액을 동일하게 투여하였다.

<83> 처음 경구 투여 후 3주째 각각의 마우스군의 혈청을 취하여 혈청내 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질에 대한 IgG 항체가를 ELISA 방법으로 측정하였다.

<84> 도 6a는 마우스 혈청내 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질에 대한 IgG 항체가를 나타낸 것으로 4xMyo-2-CMyom을 표면발현하는 락토바실러스를 먹인 실험군(A)와 CMyom을 표면발현하는 락토바실러스를 먹인 실험군(B), 일반 락토바실러스를 먹인 대조군(C)으로 나타내었다.

<85> 정제된 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질 항원을 0.1M bicarbonate ($NaHCO_3$) buffer (pH 9.6)로 100ng/100㎕이 되도록 희석한 후, ELISA 용 plate에 well당 100㎕씩 첨가하여 4℃에서 밤새 반응시켰다. PBS-T(PBS+0.05% Tween20)를 300㎕/well 씩 첨가하면서 세 번 세척한 후, 5% skim milk 300㎕를 전체 well에 첨가하여 상온에서 3시간 반응시킨다. 위와 같은 세척방법으로 세 번 세척한 후 스탠다드 및 검체(1st Ab)를 5% 스킴밀크에 1:10부터 1:6400의 비율로 희석하고 각 well당 100㎕씩 첨가한 후 상온에서 3시간 반응시킨다. 위와 같은 세척방법으로 다섯 번 세척한 후 5% 스킴밀크에 1:5000의 비율로 conjugate (2nd Ab)를 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 위와 같은 세척방법으로 다섯 번 세척한 후 TMB 발색용액으로 30분 반응시킨 후 50㎕의 정지용액으로 발색을 고정시켰다. 그리고 450nm에서 ELISA 리더로 측정하여 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질에 대한 항체생성 유무를 확인하였다.

<86> 도 6a에 나타난 바와 같이, 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질을 표면발현하는 락토바실러스를 투여한 C57BL/6 마우스군의 혈청에서 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질에 대한 IgG 항체가가 대조군에 비해 상당히 높게 나타난다는 것을 확인할 수 있었다.

<87> 따라서 본 발명에 의한 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질이 표면발현된 미생물은 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질에 대한 항체를 효과적으로 생성할 수 있다는 것을 확인하였다.

<88> 또한, 처음 경구 투여 후 매주 C57B/6 마우스의 체중을 측정하여 각 군의 체중 차이를 비교 분석하였다. 도 6b에 나타난 바와 같이, 약 4주부터 4xMyo-2-CMyom가 pgsA로 표면발현된 락토바실러스를 투여한 C57BL/6 실험군의 체중이 CMyom 실험군과 대조군에 비해 상당히 높게 나타났으며 시간의 흐름에 따라 계속적으로 차이를 보였다. 이러한 향상된 체중 증가 현상은, 본 발명에 의한 락토바실러스에 표면발현된 4xMyo-2-CMyom 융합단백질에 대한 항체가 작용하여 그 효과를 나타낸 것이라 할 수 있다.

<89> **실시예 5. 마우스내 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질을 표면발현하는 유산균에 의해 유도된 항체에 의한 근육세포에서의 신호전달 저해 효과 탐색**

<90> 실시예 4와 동일한 방법으로, 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질과 CMyom 단백질을 표면발현하는 유산균을 마우스에 경구투여한 후 근육세포에서의 신호전달 저해 효과를 검색하기 위하여 마우스내에서 유도된 항체를 사용하여 A-204 세포에서의 마이오스타틴에 대한 중화능을 농도별로 측정하였다.

<91> 구체적으로 96 웰 플레이트에 A-204 세포를 1ㅅ10^5/well 로 분주하여 24시간 동안 CO_2 배양기에서 배양한 후, 0.2 ㎍의 pGL(CAGA)12 DNA와 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000, Invitrogen, USA) transfection reagent 0.5㎍을 각각의 Opti-MEM 배지 50 ㎍에 희석하고, 5분 후에 두 개의 튜브에 담긴 배지를 섞어서 20분간 방치한다. 그 후 A-204 세포가 들어있는 96웰 플레이트에 pGL(CAGA)12 DNA와 리포렉타민 2000 복합체를 100㎕씩 골

고루 분주하고, 4~6시간 후에 96well 플레이트의 배지를 버린 후 새로운 DMEM 배지로 바꿔준다. 24시간 후에 혈청을 ㅊ첨가하지 않은 배지로 6시간동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양시킨 후 마이오스타틴(mGDF-8 ; R&D System) 10ng/ml과 마이오스타틴 단백질에 대한 마우스 항체를 농도별로 희석하여 ice에서 한 시간 동안 반응시키고, 96 웰 플레이트에 분주하여 6시간 동안 배양한 후 상등액에서 루시퍼라아제 어세이 시스템(Promega, USA)을 이용하여 A-204 세포내로 항체와 반응하고 남은 마이오스타틴 단백질에 의한 신호 전달에 의해 발현되는 루시퍼라아제 활성을 측정함으로서 A-204 세포에서의 마이오스타틴 단백질에 대한 중화능을 측정하였다.

<92> 도 7은 마우스 혈청 내 마이오스타틴 단백질에 대한 근육세포에서의 신호전달 저해효과를 루시퍼라아제 활성으로 나타낸 것으로, A는 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질을 표면발현하는 유산균을 투여군이고, B는 CMyom 단백질을 표면발현하는 유산균을 투여군이며, C는 일반 유산균을 투여한 대조군을 나타내었으며, 그 결과, 4xMyo-2-CMyom 융합단백질 투여군이 가장 많은 항체를 유발하여 근육세포에서의 마이오스타틴에 의한 신호전달 저해효과가 현저하게 크다는 것을 확인할 수 있었다.

<93> **실시예 6. 육용계에서 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질을 표면발현하는 락토바실러스에 의한 면역 반응 유도 및 체중 변화율 조사**

<94> 락토바실러스 카제이/pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom을 이용하여 육용계에서의 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질에 대한 면역 반응 유도 및 체중 변화율을 조사하였다.

<95> 구체적으로, 락토바실러스 카제이/pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom을 코브육용 계품종에게 일반적으로 공급하는 배합사료에 섞어 실험을 수행하였다. 형질전환된 유산균을 배양하고 수확한 후, 전세포를 완충용액 (PBS, pH7.4)으로 세척한 유산균을 동결건조한 상태로 배합사료에 섞어서 실험을 수행하였다.

<96> 실험군으로는 암컷 코브(cobb) 육용계 72마리, 대조군으로 72마리를 사용하여 실험을 수행하였고 총 6주동안 사육하였다. 실험군은 1, 2, 3주는 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질을 표면발현된 유산균 동결건조 분말(8.1ㅅ 10^5cell/g)을 배합사료에 0.2% 첨가하여 먹인 후 4, 5, 6주는 배합사료만 먹였으며 대조군은 1주부터 6주까지 배합사료만 먹였다.

<97> 실험시작 후 6주 후에 실험군 및 대조군의 병아리 혈청을 취하여 혈청내 닭마이오스타틴 성숙 단백질에 대한 IgG 항체가를 ELISA 방법으로 측정하였다.

<98> 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 배합사료만 먹인 대조군의 항체가에 비해 실험군에서 항체가가 높게 나타나는 것을 확인하였다. 따라서, 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질이 표면발현된 유산균은 마이오스타틴 성숙 단백질에 대한 항체를 병아리에서도 효과적으로 생성할 수 있다는 것을 알 수 있다.

<99> 또한, 4xMyo-2-CMyom이 표면발현된 유산균을 먹인 실험군과 일반 유산균을 먹인 대조군의 병아리 체중을 매주 측정하여 각군의 체중 차이를 비교 분석하였다.

<100> 그 결과, 도 9의 a)에 나타난 바와 같이, 대조군과 실험군의 체중 변화를 나타낸 그래프에서 매주 체중 차이가 증가되는 것을 확인할 수 있으며, 6주 후에 실험군과 대조군 각각 체중 평균을 비교 분석한 결과, 도 9의 b)에 나타낸 바와 같이, 실험군이 대조군에 비해 평균 체중이 6.6% 증가됨을 확인할 수 있었다. 이러한 체중증가 현상은 4xMyo-2-CMyom 융합 단백질이 표면발현된 유산균에 의해 생성 유도된 마이오스타틴 성숙 단백질에 대한 항체가 작용하여 그 효과를 나타낸 것이라 할 수 있다.

<101> 더불어, 실험군과 대조군의 사료 효율을 측정하였으며, 섭취한 사료의 총량을 병아리의 체중으로 나눈 값을 그래프로 나타내었다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 상기 실험군의 사료 효율이 7.4% 개선되었음을 확인하였다.

<102> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

<103> 도 1은 본 발명에 따른 닭의 마이오스타틴 성숙 단백질의 예측 3차 구조와 항원성 펩타이드 부위(Myo-1, Myo-2)를 나타낸 것이다.

<104> 도 2는 본 발명에 따른 닭의 마이오스타틴 성숙 단백질과 항원성 펩타이드를 사용하여 면역화 시킨 종계의 계란에서 부화된 병아리의 체중 증가율을 나타낸 것이다.

<105> 도 3은 본 발명에 따른 Myo-2 펩타이드 중합체 구축을 위한 단위체의 구조를 나타낸 것이다.

<106> 도 4a는 본 발명에 따른 닭의 마이오스타틴의 항원성 펩타이드 중합체(4xMyo-2)와 마이오스타틴 성숙 단백질의 융합체를 발현하는 표면발현벡터인 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom의 유전자 지도를 나타낸 것이고, 도 4b는 닭의 마이오스타틴 성숙 단백질을 발현하는 표면발현벡터인 pHCE2LB:pgsA-CMyom의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

<107> 도 5는 본 발명에 따른 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom와 pHCE2LB:pgsA-CMyom로 형질전환된 유산균을 배양하여 수득된 세포를 pgsA에 대한 특이 항체로 웨스턴블럿팅한 결과를 나타낸 것이다.

<108> 도 6a는 본 발명에 따른 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom와 pHCE2LB:pgsA-CMyom로 형질전환된 유산균을 경구투여한 마우스의 혈청내에서 4xMyo-2-CMyom 항원에 대한 IgG 항체가를 ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent assay) 방법으로 측정한 결과를 나타낸 것이고, 도 6b는 경구투여한 마우스에서의 체중 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다 (A는 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom으로 형질전환된 유산균 투여군이고, B는 pHCE2LB:pgsA-CMyom으로 형질전환된 유산균 투여군이며, C는 대조군으로 일반 유산균 투여군이다).

<109> 도 7은 본 발명에 따른 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom와 pHCE2LB:pgsA-CMyom로 형질전환된 유산균을 경구투여한 마우스의 혈청내에 존재하는 항체의 근육세포에서의 신호전달 저해 효과를 나타낸 것이다.

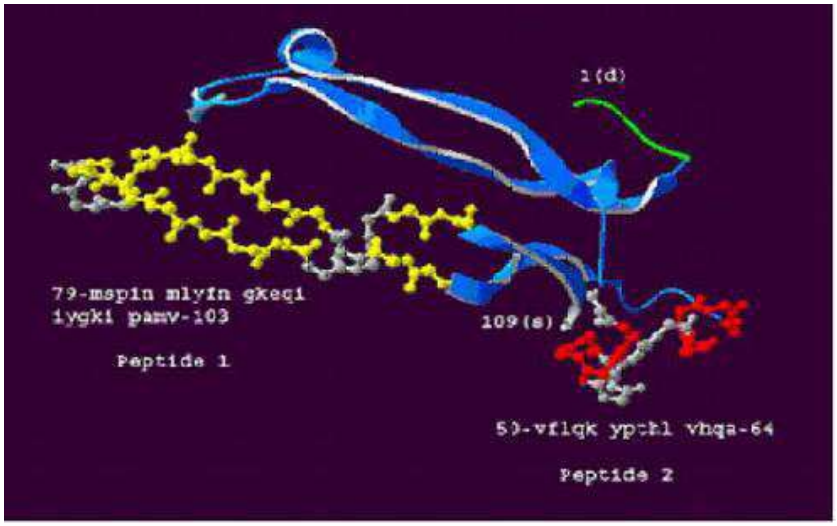
<110> 도 8은 본 발명에 따른 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom로 형질전환되어 4xMyo-2-CMyom을 표면발현하는 유산균을 사료와 함께 경구투여한 병아리들의 혈청내에서 닭 마이오스타틴 성숙(mature) 항원에 대한 IgG 항체가를 ELISA 방법으로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

<111> 도 9a는 본 발명에 따른 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom로 형질전환되어 4xMyo-2-CMyom을 표면발현하는 유산균을 사료와 함께 경구투여한 병아리들의 체중변화를 측정한 결과이고, 도 9b는 실험종료 (6주)시 병아리 체중의 평균을 비교해서 나타낸 것이다.

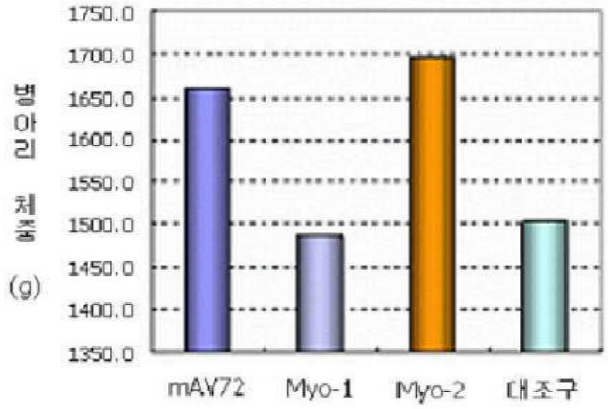
<112> 도 10은 본 발명에 따른 pHCE2LB:pgsA-4xMyo-2-CMyom로 형질전환되어 4xMyo-2-CMyom을 표면발현하는 유산균을 사료와 함께 경구투여한 병아리에서의 사료효율을 나타낸 것이다.

도면

도면1

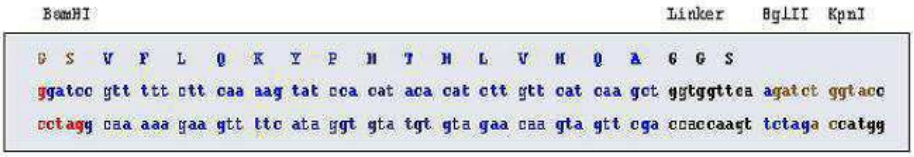


도면2

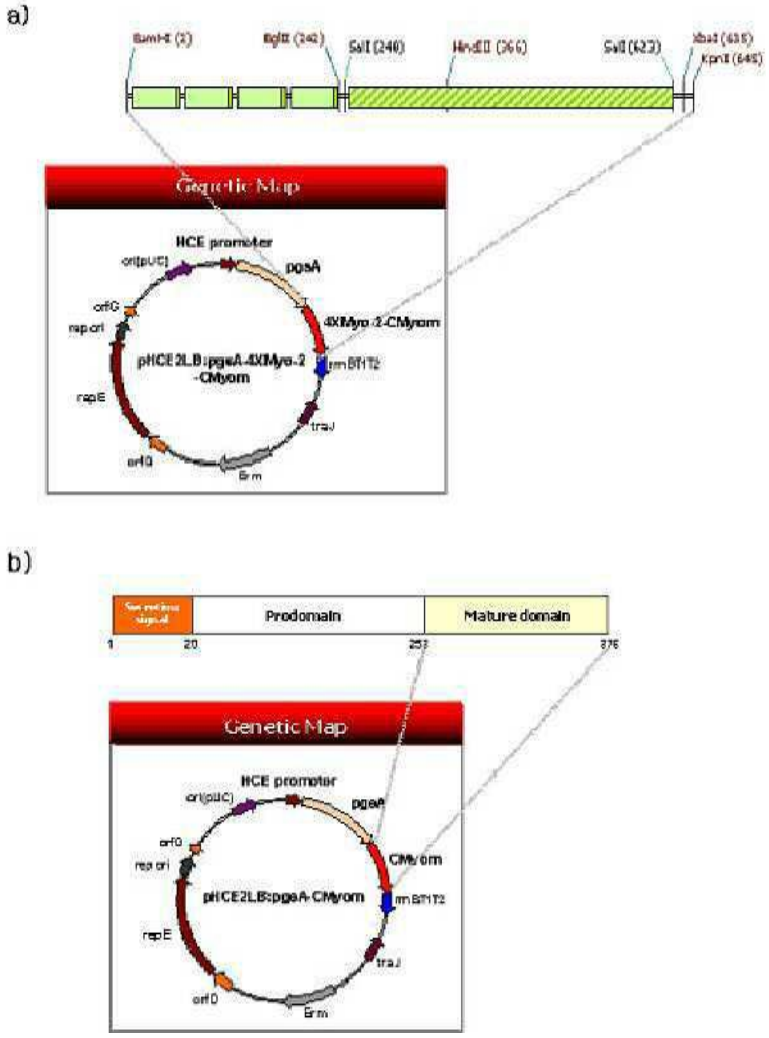


	mAV72	Myo-1	Myo-2	대조구
Average	1659.71	1486.44	1695.46	1502.51

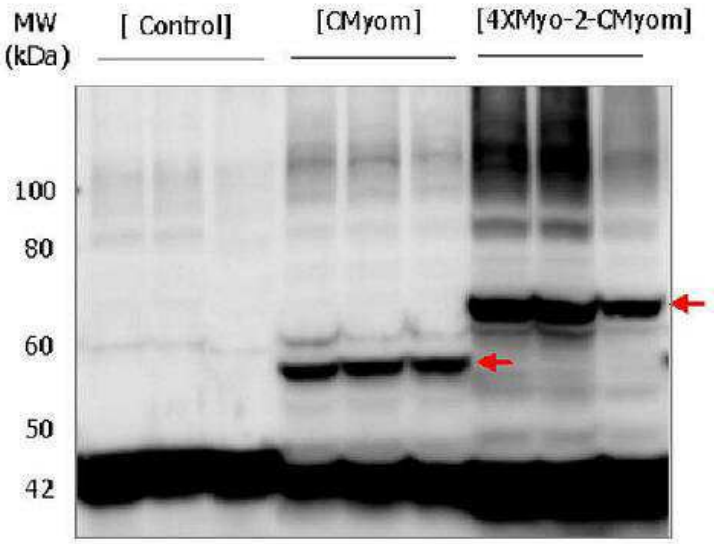
도면3



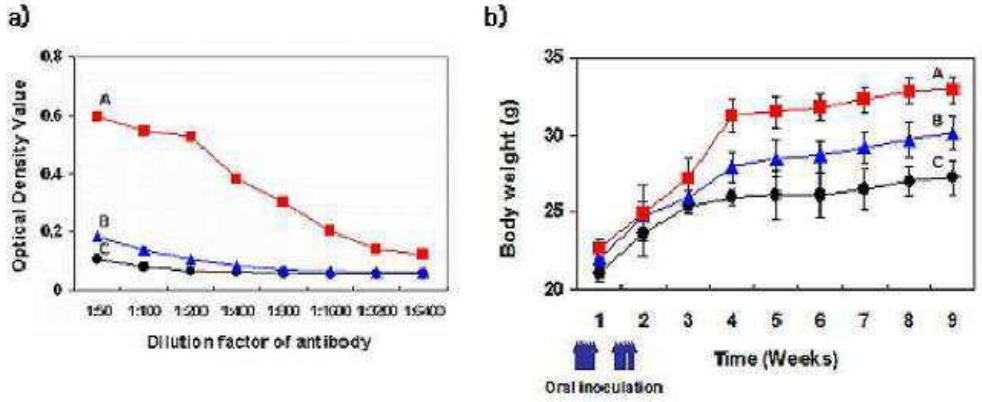
도면4


a)
Genetic Map
HCE promoter
pgsA
4XMyo-2-CMyom
pHCE2LB:pgeA-4XMyo-2-CMyom
repE
traJ
Erm
b)
Prodomain
Mature domain
1
20
253
376
Genetic Map
HCE promoter
pgeA
CMyom
pHCE2LB:pgeA-CMyom
repE
traJ
Erm

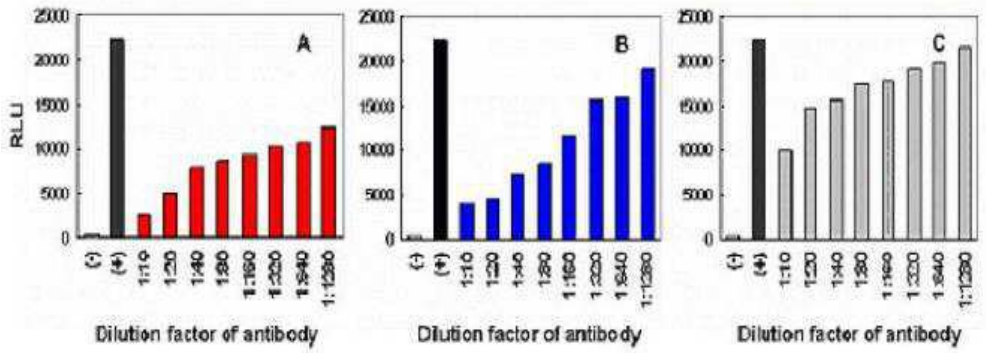
도면5


MW
(kDa)
[Control]
[CMyom]
[4XMyo-2-CMyom]
100
80
60
50
42

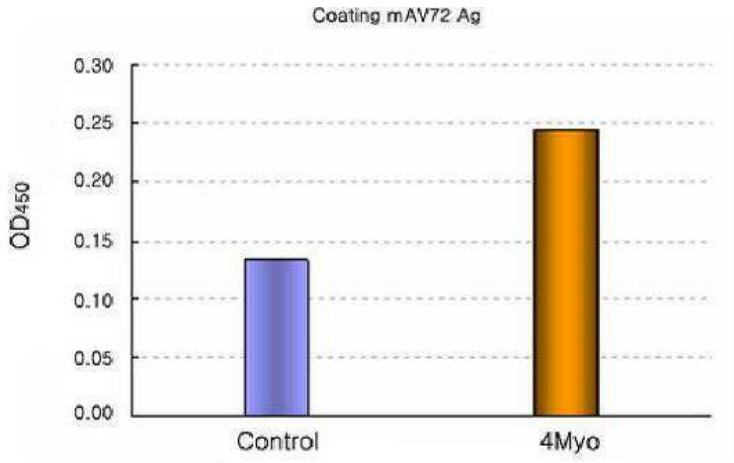
도면6


a)
Optical Density Value
Dilution factor of antibody
b)
Body weight (g)
Time (Weeks)
Oral inoculation
A
B
C

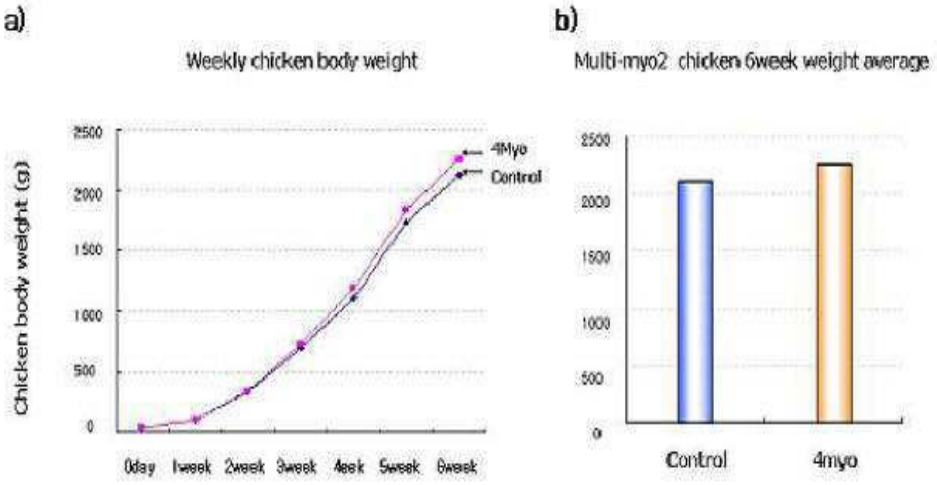
도면7


RLU
A
B
C
Dilution factor of antibody
Dilution factor of antibody
Dilution factor of antibody

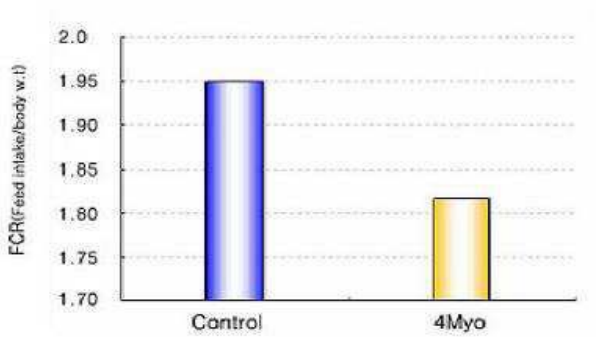
도면8


Coating mAV72 Ag
OD450
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
Control
4Myo

도면9



도면10



서 열 목 록

<110> BioLeaders Corp.

<120> Surface Expression Vector for Fusion Protein of Myo-2 Peptide Multimer and Myostatin, and Microorganism Transformed by Therof

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 15
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Myo-2 peptide

<400> 1
Val Phe Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala
1 5 10 15

<210> 2
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Myo-1 peptide

<400> 2
Met Ser Pro Ile Asn Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile
1 5 10 15

Tyr Gly Lys Ile Pro Ala Met Val
20

<210> 3
<211> 122
<212> PRT
<213> Gallus sp.

<400> 3
Glu Val Arg Val Thr Asp Thr Pro Lys Arg Ser Arg Arg Asp Phe Gly
1 5 10 15

Leu Asp Cys Asp Glu His Ser Thr Glu Ser Arg Cys Cys Arg Tyr Pro
20 25 30

Leu Thr Val Asp Phe Glu Ala Phe Gly Trp Asp Trp Ile Ile Ala Pro
35 40 45

Lys Arg Tyr Lys Ala Asn Tyr Cys Ser Gly Glu Cys Glu Phe Val Phe
50 55 60

Leu Gln Lys Tyr Pro His Thr His Leu Val His Gln Ala Asn Pro Arg
65 70 75 80

Gly Ser Ala Gly Pro Cys Cys Thr Pro Thr Lys Met Ser Pro Ile Asn
85 90 95

Met Leu Tyr Phe Asn Gly Lys Glu Gln Ile Ile Tyr Gly Lys Ile Pro
100 105 110

Ala Met Val Val Asp Arg Cys Gly Cys Ser
115 120

<210> 4
<211> 1128
<212> DNA
<213> Gallus sp.

<400> 4
atgcaaaagc tagcagtcta tgtttatatt tacctgttca tgcagatcgc ggttgatccg 60

gtggctctgg atggcagtag tcagcccaca gagaacgctg aaaaagacgg actgtgcaat 120

gcttgtacgt ggagacagaa tacaaaatcc tccagaatag aagccataaa aattcaaatc 180

ctcagcaaac tgcgcctgga acaagcacct aacattagca gggacgttat taagcagctt 240

ttacccaaag ctcctccact gcaggaactg attgatcagt atgatgtcca gagggacgac 300

agtagcgatg gctctttgga agacgatgac tatcatgcca caaccgagac gattatcaca 360

atgcctacgg agtctgattt tcttgtacaa atggagggaa aaccaaaatg ttgcttcttt 420

aagtttagct ctaaaataca atataacaaa gtagtaaagg cacaattatg gatatacttg 480

aggcaagtcc aaaaacctac aacggtgttt gtgcagatcc tgagactcat taagcccatg 540

aaagacggta caagatatac tggaattcga tctttgaaac ttgacatgaa cccaggcact 600

ggtatctggc agagtattga tgtgaagaca gtgctgcaaa attggctcaa acagcctgaa 660

tccaatttag gcatcgaaat aaaagctttt gatgagactg gacgagatct tgctgtcaca 720

ttcccaggac cgggtgaaga tggattgaac ccatttttag aggtcagagt tacagacaca 780

ccgaaacggt cccgcagaga ttttggcctt gactgtgatg agcactcaac ggaatcccga 840

tgttgtcgct acccgctgac agtggatttc gaagcttttg gatgggactg gattatagca 900

cctaaaagat acaaagccaa ttactgctcc ggagaatgcg aatttgtgtt tctacagaaa 960

tacccgcaca ctcacctggt acaccaagca aatcccagag gctcagcagg cccttgctgc 1020

acacccacca agatgtcccc tataaacatg ctgtatttca atggaaaaga acaaataata 1080

tatggaaaga taccagccat ggttgtagat cgttgcgggt gctcatga 1128

<210> 5
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 5
gatccgtttt tcttcaaaag tatccacata cacatcttgt tcatcaagct ggtggttcaa 60

gatctggtac 70

<210> 6
<211> 62
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6

cagatcttga accaccagct tgatgaacaa gatgtgtatg tggatacttt tgaagaaaaa 60

cg 62

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
agatctgtcg acgaggtcag agttacagac 30

<210> 8
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
ggtacctcta gattattagt cgactcatga gcacccgcaa cg 42