



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0078741
(43) 공개일자 2018년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/705 (2006.01) *C07K 14/46* (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
B82Y 5/00 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/705 (2013.01)
C07K 14/461 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0183813

(22) 출원일자 2016년12월30일

심사청구일자 2016년12월30일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

정태성

경상남도 진주시 진양호로239번길 13, 203동 202호(평거동, 평거하우스토리아파트)

이정석

부산광역시 사하구 감천항로 172, 3층(구평동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

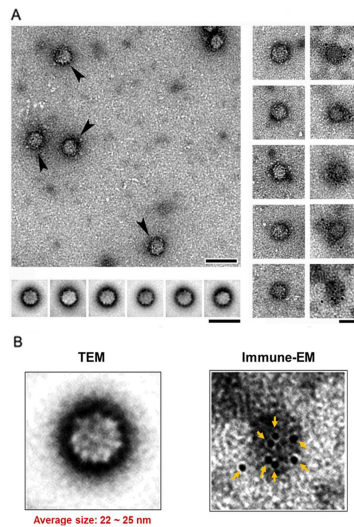
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 포함하는 다량체 다가 중합체**

(57) 요약

본 발명은 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 포함하는 다량체 다가 중합체에 관한 것으로, 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 포함한 다가 중합체를 제조하고 상기 다가 중합체는 자가조립에 의해 나노 크기의 구형을 이루어 탐침 효과를 나타내며 이를 통해 고감도 단백질 나노 칩 개발과 진단 키트 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 33/54346 (2013.01)

G01N 33/68 (2013.01)

B82Y 5/00 (2013.01)

(72) 발명자

임세평

대구광역시 달서구 구마로36길 33, 301동 406호(본동, 그린맨션3차아파트)

김재성

경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

김영립

경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A01003404

부처명 미래부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견과제

연구과제명 원시(무악)척추동물 먹장어의 면역세포가 생산하는 특이적 항체 (VLRs: variable lymphocyte receptors)를 이용한 바이러스, 세포막 및 혈정에서 새로운 바이오마커 개발

기 여 율 5/10

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213004043SB430

부처명 해수부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 골든씨드프로젝트

연구과제명 수출용 터봇 대량생산 시스템 개발

기 여 율 3/10

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2013.07.25 ~ 2017.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 315045031SB010

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 가축질병대응기술개발사업

연구과제명 조류인플루엔자 바이러스 특이 방어항체 생산 및 산업화 기술

기 여 율 2/10

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2015.08.14 ~ 2018.08.13

명세서

청구범위

청구항 1

먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질의 소수성 테일 도메인 및 목적 단백질을 포함하며, 단량체의 자가조립에 의해 구형의 다량체 나노입자를 형성하는 것을 특징으로 하는 다가 중합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 다가 중합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 목적 단백질은 VLR(variable lymphocyte receptor), 항원, 항체, 세포수용체 또는 효소인 것을 특징으로 하는 다가 중합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 구형의 나노입자는 내부에 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인이 위치하고 목적 단백질이 외부로 돌출되는 구조를 갖는 것을 특징으로 하는 다가 중합체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인은 목적 단백질의 C-말단에 융합된 것을 특징으로 하는 다가 중합체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 다가 중합체를 코딩하는 핵산.

청구항 7

제6항의 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터.

청구항 8

제7항의 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 9

- 1) 제1항의 다가 중합체를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계;
- 2) 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- 3) 상기 배양한 숙주 세포로부터 구형의 나노입자를 형성하는 다가 중합체를 수득하는 단계를 포함하는, 구형의 나노입자를 형성하는 다가 중합체의 제조방법.

청구항 10

- 1) 제1항의 다가 중합체를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계;
- 2) 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- 3) 상기 배양한 숙주 세포로부터 상기 다가 중합체를 세포 표면에 발현시키는 단계를 포함하는, 다가 중합체를 세포 표면에 발현시키는 방법.

청구항 11

먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질의 소수성 테일 도메인을 유효성분으로 함유하는 다량 중합체의 구형의 나노입자 제조용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 포함하는 다량체 다가 중합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 특정 단백질-단백질 상호 작용, 예를 들어, 항원-항체를 기반으로 하는 단백질 검출 기술에 있어서 중요한 요소는 단백질 탐침(probe)의 활성화 및 표적물질과의 특이적 결합 능력을 유지하는 것이다. 다양한 종류의 단백질 칩 교체 기관 표면에 단백질을 접착하는 기존의 방법은 단순 흡착/확산 또는 단백질의 일차 아민 그룹의 공유결합에 의한 고정화 또는 그것을 기반으로 한 방법이 많다. 그러나 단백질은 일반적으로 기관 표면 위에서 무작위적으로 접착되고, 단백질의 구조가 쉽게 변형되므로 단백질의 활성이 저해되며, 이로 인해 표면 물질과의 결합이 불가능해져 특이적 결합이 효율적이지 못한 큰 문제점이 있다. 또한 단순 흡착으로 기관 표면에 단백질 탐침이 고정화 된 경우, 검출 과정 중 강도 높은 세척 조건으로 단백질 탐침이 씻겨 나가거나 기관 표면에 더 높은 친화력을 가지는 다른 분자로 전이될 수 있으며, 무엇보다도 단백질 칩 기관 표면에 고정화되는 단백질 탐침의 정량적 제어와 활성화 유지가 어렵다는 큰 문제점이 있다.

[0003] 인위적으로 합성되는 기존의 유·무기 나노입자 (금속 나노입자)와는 달리, 단백질 나노입자는 생명체의 세포 내에서 자가조립에 의해 합성되는 나노소재로서, 균일한 입도 분포 및 안정성을 확보하고 있음은 물론, 미생물 세포 내에서도 손쉽게 경제적 대량생산이 가능한 소재이다. 또한 유전공학적 표면 개질을 통해 다양한 특성/기능을 가진 단백질 나노입자로 개발할 수 있으며, 특히 표면에 질환 마커 검출 펩타이드 또는 단백질(질환 마커 검출용 탐침)을 표출시켰을 때 일정한 배향성과 높은 직접도 및 구조적 안정성을 확보할 수 있다는 장점을 가지고 있어 고감도 진단시스템을 위한 탐침(probe) 소재로 활용되고 있다.

[0004] 그러나 기존에 보고된 단백질 3차원 나노구조체를 만드는 기술은 pH 조건이 산성이거나 제조 온도가 고온이거나 하는 등의 제조 조건이 단백질에는 적합하지 않고, 또한 쌓아올리는 재료물질에 특별한 화학적 처리가 필요하고, 공정시간이 상대적으로 긴 문제점이 있었다.

[0005] 한편, 제일 하위 척추동물인 무악류인 칠성장어(lamprey)와 먹장어(hagfish)에서 동정된 VLR은 LRR(leucine-rich repeat) 모듈을 1~12개를 재배열(somatic rearrangement)하여 만들어진 폴리펩타이드로 항체처럼 적응면역 기능을 한다. 이는 multi-domain 결합체로 형성되는 분자량이 큰(면역글로불린의 경우 약 150kDa) 유악류 유래 항원 수용체에 비해 크기가 작은 단일 폴리펩타이드로 현재까지 발견된 면역글로불린 구조를 사용하지 않는 유일한 항원 수용체로 기존의 항체 대용물질이 될 수 있다.

[0006] 근래 들어 VLR 동정 및 분리 이후 기존의 항체 대용 물질로 유용하기 위해서 특정 항원에 결합하는 VLR 단백질을 쉽고 빠르게, 대량으로 만들 수 있는 방법 개발이 이루어지고 있다.

[0007] 한편, 한국공개특허 제2015-0037959호에는 '단량체 및 다량체 분자의 제조 방법 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1587386호에는 '인 비보 이미징을 위한 재조합 형광 단백질 나노입자'가 개시되어 있으나, 본 발명의 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 포함하는 다량체 다가 중합체에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 먹장어 VLR(variable lymphocyte receptor) B(VLRB) 단백질의 단량체 단백질이 뭉쳐서 대략 1,700 ~ 650 kDa 크기의 다량체를 형성하며, 이는 VLRB C-말단 부분 소수성 테일(hydrophobic tail, hydrophobic clustering, HC)이 정중앙에 코어를 형성하여 구형의 다량체 항체를 형성함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인 및 목적 단백질을 포함하며, 자가조립에 의해 구형의 나노입자를 형성하는 것을 특징으로 하는 다가 중합체를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 다가 중합체를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포로부터 구형의 나노입자를 형성하는 다가 중합체를 수득하는 단계를 포함하는, 구형의 나노입자를 형성하는 다가 중합체의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포로부터 상기 다가 중합체를 세포 표면에 발현시키는 단계를 포함하는, 다가 중합체를 세포 표면에 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질의 소수성 테일 도메인을 유효성분으로 함유하는 다가 중합체의 구형의 나노입자 제조용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명은 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인을 포함한 다가 중합체를 제조하고 상기 다가 중합체는 자가조립에 의해 나노 크기의 구형을 이루어 탐침 효과를 나타내며 이를 통해 고감도 단백질 나노 칩 개발과 진단 키트 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 칠성장어(lamprey)의 VLRB 단백질(A) 및 먹장어(hagfish)의 VLRB 단백질(B) 구조를 비교한 결과이다.
- 도 2는 먹장어 혈장에서의 VLRB 단백질 복합체를 확인한 결과이다. A, native-PAGE 또는 SDS-PAGE를 통한 VLRB 단백질의 웨스턴 블롯팅 결과; B, 다양한 농도의 SDS로 처리한 혈장 단백질로부터 VLRB 단백질의 웨스턴 블롯팅 결과; C, 먹장어 혈장 시료의 단백질 크기에 따른 분획 및 각 분획물로부터 분리되는 VLRB 단백질의 닛 블롯팅 결과; D, 각 분획물로부터 분리되는 VLRB 단백질의 웨스턴 블롯팅 결과.
- 도 3은 먹장어 혈장 시료의 분획물 표준 시료의 용출 시간별 분자량 곡선(A) 및 각 분획물 내 용출된 VLRB 복합체의 추정되는 모노머 개수를 나타낸 결과(B)이다.
- 도 4는 FPLC를 통해 사이즈로 분리된 VLRB 분획물 중 메이저 집단(major population)으로 분리된 16분, 17분 분획물들을 Negatively stained TEM으로 실제 VLRB 이미지를 분석한 결과(A) 및 VLRB 특이 항체인 11G5를 이용하고 금 표지된(gold labeling) 2차 항체로 VLRB를 검출하여 검증한 결과(B)이다.
- 도 5는 RFP-stalk 말단에 먹장어 C-말단 절편(30개 아미노산)을 크기 별로 (5,6,7,8,9,10,15,20,25,30)융합시켜 293세포주에 발현시킨 재조합 단백질의 native-PAGE(A) 또는 SDS-PAGE(B)를 통한 VLRB 단백질의 웨스턴 블롯팅 결과이다.
- 도 6은 RFP, RFP-stalk 또는 RFP-HC를 발현하는 세포외막에서의 재조합 단백질 발현 위치 여부를 유세포 분석을 통해 확인한 결과이다.
- 도 7은 RFP-stalk, RFP-HC를 293 세포주에서 발현시킨 후 포스포리파제 C(phospholipase C, PLC) 효소를 1 unit/ml, 3 unit/ml 농도 별로 처리하였을 때 세포막 외부에 GPI linkage로 연결된 RFP-HC 단백질의 결합이 가수분해되는 것을 유세포 분석을 통해 확인한 결과이다.
- 도 8은 RFP-stalk 또는 RFP-HC를 발현하는 세포에서의 재조합 단백질 발현 위치를 면역세포화학분석을 통해 확인한 결과이다.
- 도 9는 먹장어 VLRB, 칠성장어 VLRB 및 면역글로불린 항체의 구조를 비교한 유연관계를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인 및 목적 단백질을 포함하며, 자가조립에 의해 구형의 나노입자를 형성하는 것을 특징으로 하는 다가 중합체를 제공한다.
- [0019] 상기 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 및 이

의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 활성"이란 자가조립에 의해 구형의 나노입자를 형성하는 활성을 의미한다.

- [0020] 본 발명에서 '목적 단백질'은 당업자가 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 발현벡터에 상기 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 형질전환체에서 발현할 수 있는 모든 단백질을 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 목적 단백질은 당업자가 원하는 모든 단백질이 가능하며, 예를 들어 VLR, 효소, 항체, 항원 혹은 그 일부분, 단쇄항체, 세포수용체, 결합단백질, 결합도메인, 펩타이드, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절인자, 혈액응고인자 및 식물 생체방어 유도 단백질로 이루어진 군에서 선택되는 생물학적 활성을 갖는 다양한 외래단백질을 목적단백질로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 상기 구형의 나노입자는 내부에 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인이 위치하고 목적 단백질이 외부로 돌출되는 구조를 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면 본 발명의 다가 중합체는 자가 조립에 의하여 구형 나노입자를 형성하며 크기 배제 크로마토그래피 및 정량분석을 통하여 나노입자 당 16~42개 목적 단백질을 가질 수 있음을 확인하였다. 또한 전자 현미경 관찰을 통해 본 발명의 다가 중합체가 22~25 nm의 직경을 가진 구형 나노입자를 형성함을 확인하였다.
- [0024] 본 발명에서 '다가 중합체'는 원래의 목적 단백질의 서열의 N-말단 또는 C- 말단에 다른 단백질이 연결되거나 다른 아미노산이 부가되어 하나의 폴리펩타이드로 발현되는 단백질을 의미한다.
- [0025] 상기 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인은 목적 단백질의 C-말단에 직접적으로 또는 간접적으로 융합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 먹장어 유래 VLRB 단백질의 소수성 테일 도메인은 목적 단백질의 C-말단에 융합될 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 다가 중합체를 코딩하는 핵산을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 다가 중합체를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터 및 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0028] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0029] 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소 (translation control element)를 가지는 것이다.
- [0030] 본 발명의 다가 중합체를 코딩하는 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 벡터를 원핵세포에 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 대장균(*E. coli*) Rosetta, 대장균 JM109, 대장균 BL21, 대장균 RR1, 대장균 LE392, 대장균 B, 대장균 X 1776, 대장균 Da, 대장균 W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0032] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*),

곤충세포, 사람세포 및 동물세포(예컨대, CHO(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은

[0034] 1) 상기 다가 중합체를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계;

[0035] 2) 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0036] 3) 상기 배양한 숙주 세포로부터 구형의 나노입자를 형성하는 다가 중합체를 수득하는 단계를 포함하는, 구형의 나노입자를 형성하는 다가 중합체의 제조방법을 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은

[0038] 1) 상기 다가 중합체를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제작하는 단계;

[0039] 2) 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포를 배양하는 단계; 및

[0040] 3) 상기 배양한 숙주 세포로부터 상기 다가 중합체를 세포 표면에 발현시키는 단계를 포함하는, 상기 다가 중합체를 세포 표면에 발현시키는 방법을 제공한다.

[0041] 또한, 본 발명은 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질의 소수성 테일 도메인을 유효성분으로 함유하는 다가 중합체의 구형의 나노입자 제조용 조성물을 제공한다. 본 발명의 다가 중합체의 구형의 나노입자 제조용 조성물은 먹장어 유래 VLRB(variable lymphocyte receptor B) 단백질의 소수성 테일 도메인을 유효성분으로 함유하며, 상기 소수성 테일 도메인에 목적 단백질을 결합시켜 목적 단백질의 구형의 나노입자를 형성할 수 있는 것이다.

[0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] **실시예 1. 먹장어 혈청 내 VLRB 다량체 복합체로 존재함을 확인**

[0044] 먹장어(hagfish)와 칠성장어(lamprey)의 VLRB 단백질 구조는 도 1과 같이 시그널 펩타이드(signal peptide, SP), LRRNT(N-terminal capped LRR), LRR1, LRRVs(variable LRR modules), CP(connecting peptide), LRRCT(C-terminal capped LRR), stalk, 그리고 C-말단으로 구성되어 있으며 U자 모양의 3D 구조가 아주 유사하였다. 칠성장어의 C-말단은 시스테인(Cys) 잔기가 8개 존재하여 이미 보고된 바와 같이 8~10개 모노머(monomer)가 합쳐져 400 kDa 정도의 VLRB 복합체가 형성되어 세포 표면에 발현되고, 또한 혈청 속으로 분비된다. 하지만, 먹장어 VLRB C-말단은 소수성(hydrophobicity)이 높은 아미노산들로 구성되어 있음을 확인하였다(도 1).

[0045] 먹장어 혈액 내 VLRB의 자연적 형태를 확인하기 위하여 추출한 혈장 단백질을 native-PAGE 또는 SDS-PAGE에서 분리한 후 마우스 항-VLRB 항체(11G5)를 이용한 웨스턴 블롯을 수행하였다. 혈청 단백질을 native-PAGE로 분리하였을 때 스택킹 겔(stack gel)에 VLRB 단백질이 모두 존재하는 것을 확인하였다(도 2A). 반면 SDS가 처리된 혈청에서는 각각의 VLRB 단백질들이 모노머 형태로 분리되어 약 40 kDa의 분자량 크기로 분리되었다. 이는 소수성 결합(hydrophobic interaction)을 제거할 수 있는 SDS를 농도 별로 처리하였을 때 모두 모노머 형태로 분리된다는 사실을 확인할 수 있었다(도 2B).

[0046] 혈장 단백질을 분자 크기 별로 분리하기 위해 사이즈 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)에 의해 시간에 따라 획득한 용출 분획물(1~48분, 0.5ml/min)을 VLRB 특이 항체(11G5)를 이용한 닷 블롯팅(dot blotting)으로 VLRB 단백질 분획물을 선별한 결과, 분획물 중 용출(elution) 후 15분과 23분 정도에서 VLRB 단백질이 분리된다는 사실을 확인하였다(도 2C). 또한 분리된 단백질들을 각각 native-PAGE와 SDS-PAGE를 처리하였을 때 VLRB 특이 항체에 의해 감지되었다(도 2D). 특히 용출 후, 16분과 20분 사이에서 VLRB 단백질들이 가장 많이 분포하는 것을 확인하였다. 이를 Ferguson plot으로 용출 VLRB 단백질들의 분자량을 유추해 보았을 때 대략 1,700 kDa 에서 600 kDa의 거대한 단백질 복합체로 존재한다는 사실을 확인하였다(도 3). 이를 약 40 kDa에 상응하는 VLRB 모노머에 대하여 계산해 보았을 때 16개에서 42개 정도의 VLRB 단백질들이 C-말단의 소수성 클로스터링(hydrophobic clustering) 부위로 인해 복합체로 존재한다는 사실을 유추할 수 있다.

[0047] 상기 사이즈 배제 크로마토그래피로 분리된 VLRB 단백질 복합체의 실제 이미지를 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy, TEM)으로 조사하였다. FPLC를 통해 사이즈로 분리된 VLRB 분획물 중 메이저 집단(major population)으로 분리된 16분, 17분 분획물들을 Negatively stained TEM으로 실제 VLRB 이미지

를 분석해본 결과, 22~25 nm 크기의 구 형태 단백질 덩어리로 존재함이 관찰되었다(도 4). 특히 구형 입자의 중심 코어가 흰색으로 나타나는 것은 소수성 클로스터링이 내부에 위치함을 보여준다. 또한 VLRB 특이 항체인 11G5를 이용하고 금 표지된 2차 항체로 VLRB를 검출하여 검증하였다(도 4).

실시예 2. 먹장어 VLRB C-말단을 포함하는 형광단백질의 다량체 복합체 형성 및 세포 표면 발현 확인

먹장어 VLRB 단백질의 C-말단, 소수성 부위(HC)가 복합체를 이루기 위한 실제 요소인지 확인하기 위해 stalk 부위부터 C-말단까지를 RFP(red fluorescent protein) 유전자 C-부위에 클로닝하고, 또한 각각의 C-말단 부위의 연속적 결실(serial deletion) 변이체들을 제작하여 293 세포주(인간 배아 신장 세포주)에서 발현시켰다(표 1). RFP-stalk 및 RFP-HC5 까지만 함유한 RFP 단백질들은 모두 모노머 형태로 세포의 분비되었으나, C-말단 부위가 늘어날수록 모노머 단백질들의 함유량은 감소하면서 멀티머(multimer) 생성량은 증가하는 것이 관찰되었다(도 5). HC8가 축합된 RFP-stalk 단백질에서 처음으로 멀티머가 생성되었으며, HC15에서부터는 완전한 멀티머만이 생성되었다.

표 1

	Signal peptide	Report protein	Stalk	Hagfish HC
RFP-stalk			-	
RFP-HC5			YFPSY	
RFP-HC6			YFPSYI	
RFP-HC7			YFPSYIF	
RFP-HC8			YFPSYIFL	
RFP-HC9	Igx	RFP	Stalk	YFPSYIFLH
RFP-HC10				YFPSYIFLHL
RFP-HC15				YFPSYIFLHLVHGLA
RFP-HC20				YFPSYIFLHLVHGLAAVPLV
RFP-HC25				YFPSYIFLHLVHGLAAVPLVYLICH
RFP-HC				YFPSYIFLHLVHGLAAVPLVYLICHASQLL

림프구 세포 표면에 VLRB 단백질이 실제로 발현되는지 관찰하기 위해 VLRB 특이 항체를 이용하여 FACS 분석을 하였다. 음성대조군 대비 많은 림프구 세포 표면에 디스플레이(display)된 VLRB 단백질 존재를 확인하였다. 또한, HC를 함유한 RFP가 형질도입된 293 세포에서만 세포 표면에 RFP-HC 단백질이 존재함을 확인하였다(도 6).

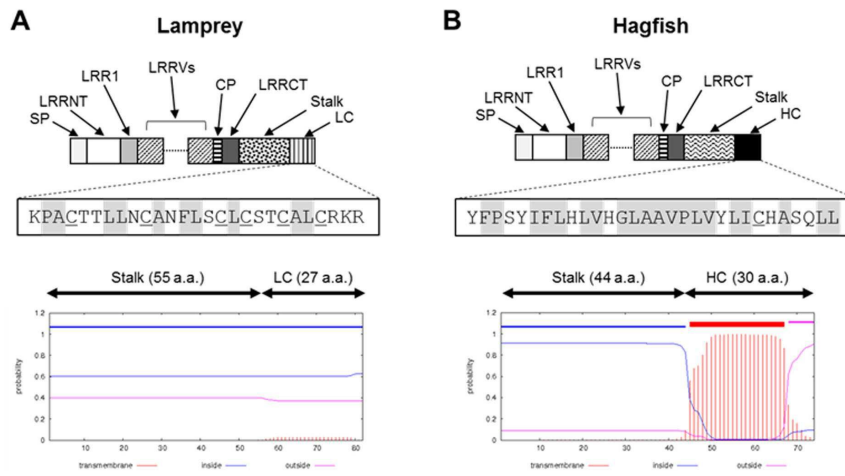
RFP-stalk 유전자에 HC를 연결시켜 제작한 RFP-HC는 293 세포주에서 발현되고 세포 외부로 중합체 형태로 분비될 뿐만 아니라, 세포 외막 바깥쪽에 디스플레이(display)되는 형태가 GPI(glycosylphosphatidylinositol) linkage에 의해 연결되어 있음을 밝혔다(도 7). RFP-stalk, RFP-HC를 293 세포주에서 발현시킨 후 PLC(phospholipase C) 효소를 1 unit/ml, 3 unit/ml 농도 별로 처리하였을 때, 세포막 외부에 존재하지 않는 RFP-stalk은 아무런 영향을 받지 않았으나, 세포막 외부에 GPI linkage로 연결된 RFP-HC 단백질은 PLC에 의해 그 결합이 가수분해되는 것을 유세포 분석을 통해 확인하였다.

또한 먹장어의 소수성 C-말단부위 전체가 연결된 RFP 단백질(RFP-HC)이 세포외부로 분비될 뿐만 아니라 포유류의 IgG, IgM 처럼 분비되기 전 세포 표면에 디스플레이되는지 확인하기 위해 공초점 현미경(confocal microscopy)으로 관찰하였다. 형질도입(transfection) 여부를 확인하기 위해 발현 벡터 시스템은 RFP 이외에 GFP 단백질 발현 부위를 함유하였다. RFP-HC로 형질도입된 293 세포에서만 세포 표면에 RFP-HC 단백질들이 축적된다는 사실을 관찰하였다(도 8).

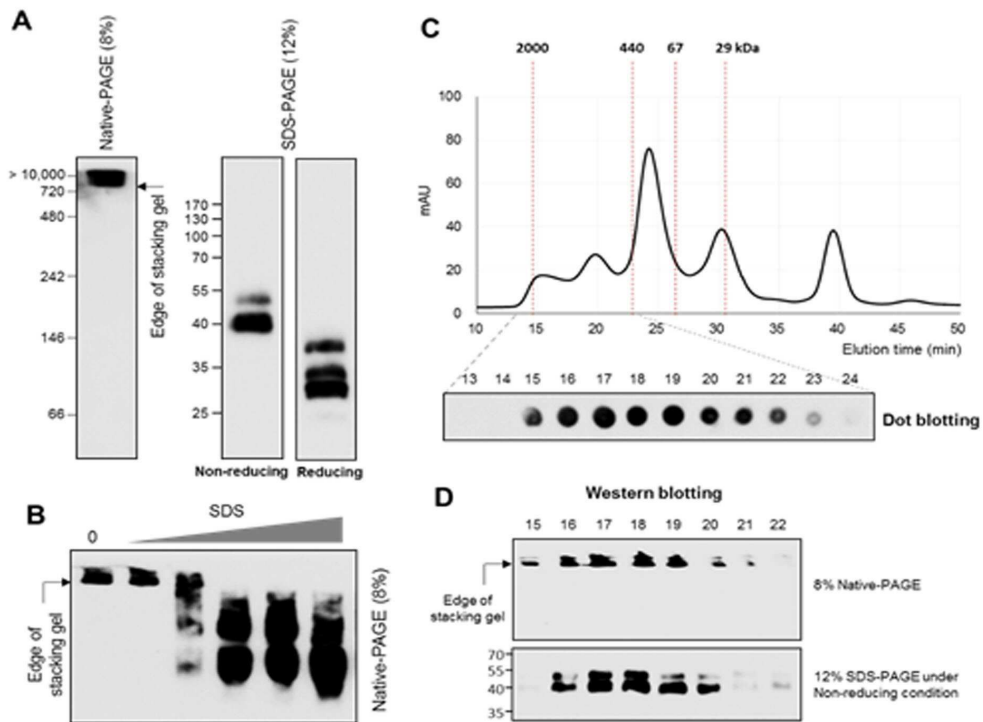
결론적으로, VLRB 단백질은 발현 후 구 모양 (globular-shaped)의 복합체 형태로 세포 외부, 즉 혈액으로 분비되며, 이는 칠성장어의 펜타머(pentamer) 구조와는 완전히 다른 형태로 분비된다는 사실을 확인하였다(도 9). 이는 포유류나 다른 종에서 전혀 발견되지 않은 특이한 형태의 항체구조를 가진다.

도면

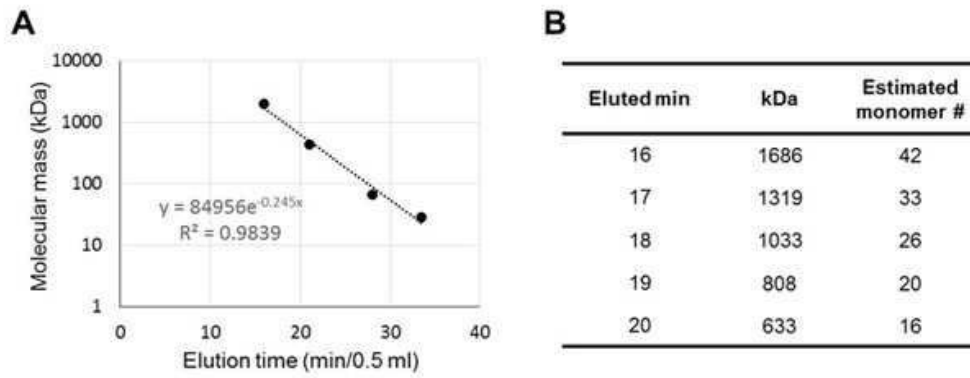
도면1



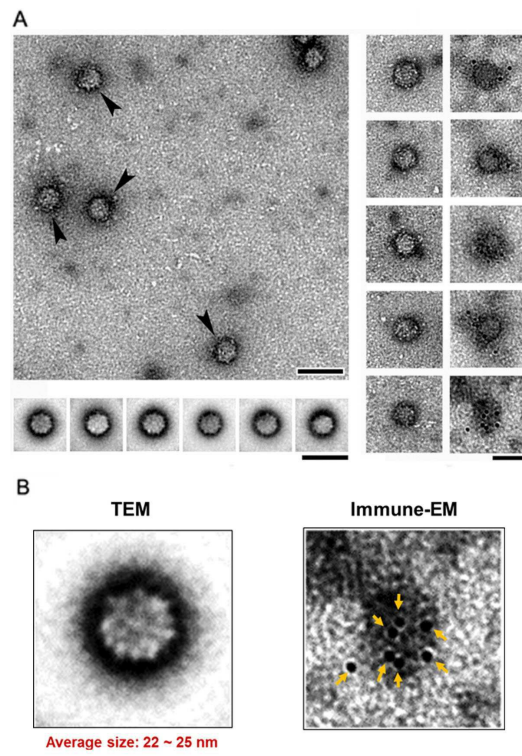
도면2



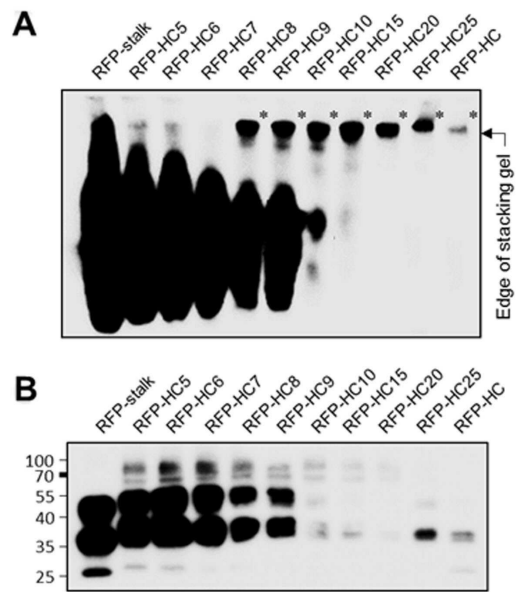
도면3



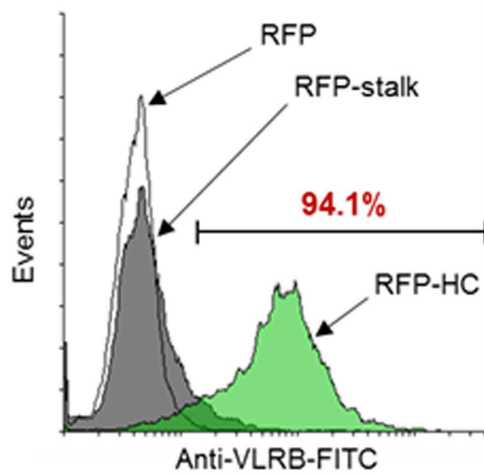
도면4



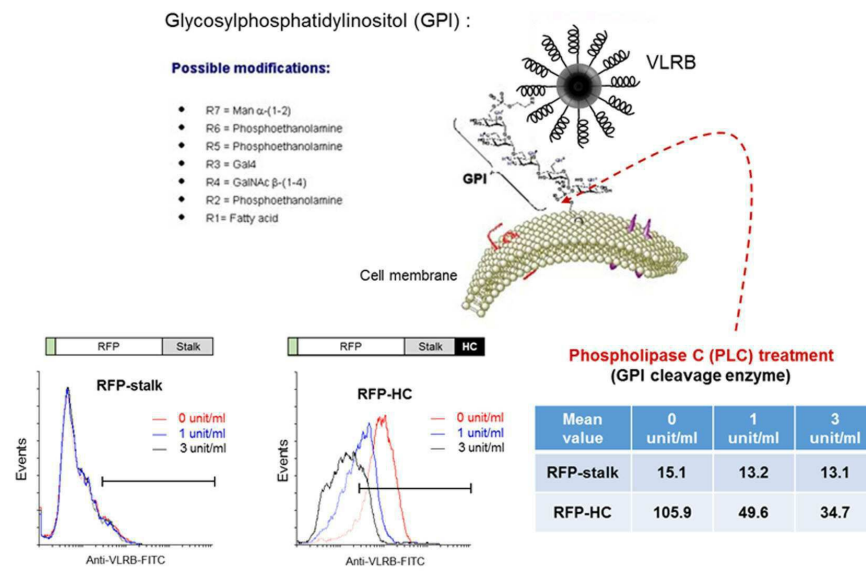
도면5



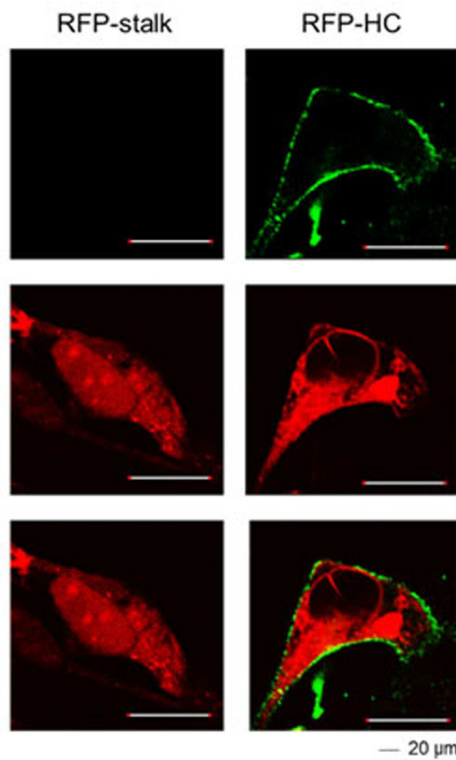
도면6



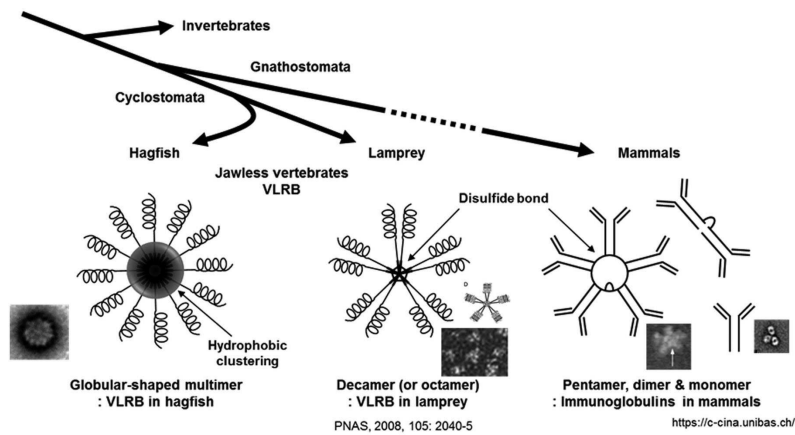
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Multimer fusion protein comprising hagfish VLRB hydrophobic tail domain

<130> PN16450

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Eptatretus burgeri

<400> 1

Tyr Phe Pro Ser Tyr Ile Phe Leu His Leu Val His Gly Leu Ala Ala

1 5 10 15

Val Pro Leu Val Tyr Leu Ile Cys His Ala Ser Gln Leu Leu

20 25 30