



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0014975

(43) 공개일자 2020년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/46 (2006.01) A23K 20/147 (2016.01)

A23K 20/195 (2016.01) A23K 50/80 (2016.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/461 (2013.01)

A23K 20/147 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2018-0090153

(22) 출원일자 2018년08월02일

심사청구일자 2019년07월16일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

박찬일

경상남도 통영시 광도면 죽림2로 31, 305동 601호

최광민

경상남도 사천시 사남면 새담길 80-4

(74) 대리인

최규환

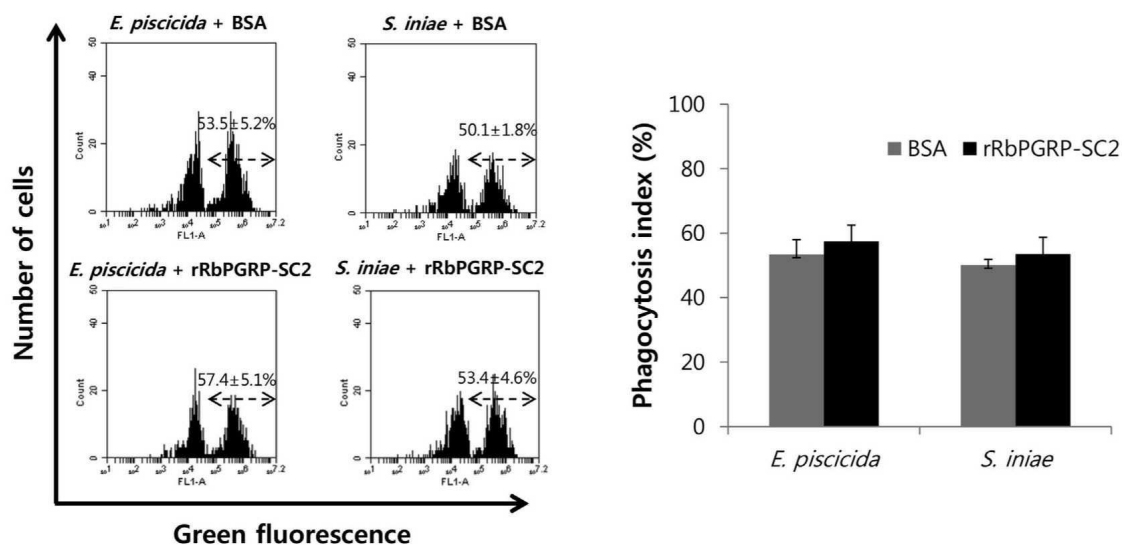
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 돌돔 유래 PGRP-SC2 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래의 OfPGRP-SC2(peptidoglycan recognition protein-SC2) 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 OfPGRP-SC2 단백질은 어류용 항생제 대체 물질로 사용하거나, 양식 어류에 대한 사료첨가제 등으로 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23K 20/195 (2016.05)

A23K 50/80 (2016.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1525007226

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원

연구사업명 포스트게놈 신산업 육성을 위한 다부처 유전체사업(해수부)

연구과제명 참돔 유용유전자 개발 및 기능 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2017.07.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래의 OfPGRP-SC2(peptidoglycan recognition protein-SC2) 단백질.

청구항 2

제1항의 OfPGRP-SC2 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 4

제2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 6

제4항의 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 OfPGRP-SC2 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 OfPGRP-SC2 단백질의 생산방법.

청구항 7

제6항의 방법에 의해 생산된 OfPGRP-SC2 단백질.

청구항 8

제1항 또는 제7항의 OfPGRP-SC2 단백질을 유효성분으로 함유하는 어류용 항균 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제7항의 OfPGRP-SC2 단백질을 유효성분으로 함유하는 어류용 사료첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 돌돔 유래 PGRP-SC2(peptidoglycan recognition protein-SC2) 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 농어목(Perciformes) 돌돔과(Oplegnathidae)에 속하는 돌돔(rock bream, 학명 *Oplegnathus fasciatus*)은 태평양과 인도양 등지에 광범위하게 분포하며, 우리나라에서는 주로 남부이남 해역에 분포하는 경제적으로 중요한 양식대상어종으로 여겨지고 있지만, 어류의 양식이 발전함에 따라 이리도바이러스(iridovirus)에 의한 바이러스성 질병 등 많은 전염성 질병이 동반되어 왔으며, 여러 가지 제한적인 양식환경에 의한 스트레스 요인으로 인해 질병의 발생빈도가 높아져 돌돔 양식 산업에 있어서 막대한 경제적 피해를 입히고 있다.

[0003] 경골 어류(teleosts)에 있어서, 후천 면역 시스템은 선천 면역 시스템(innate immunity)만큼 잘 발달되어 있지 않은데, 이는 어류에 있어서 병원체에 대항하기 위해 선천 면역 시스템이 중요함을 의미한다. 항균 펩티드(antimicrobial peptides, AMPs)는 기존의 항생제에 저항성을 가지는 균주의 문제를 완화할 수 있는 새로운 항

생체 대체물질로 기대되고 있는데, 이는 항균 펩티드가 기회감염균(opportunistic pathogen)으로부터 어류를 보호하는데 있어서 중요한 역할을 하며 선천 면역에서 강력한 무기로 작용하기 때문이다.

[0004] 펩티도글리칸 인식 단백질(peptidoglycan recognition protein, PGRP)은 패턴 인식 수용체(pattern recognition receptor, PRR) 패밀리에 속하며, 병원체의 인식 및 제거를 매개하여 선천 면역 반응 동안에 중요한 역할을 한다. 또한, PGRP는 박테리아에 결합하여 염증 매개자, 식균작용 및 Toll 신호전달 경로 유도 및 같은 다양한 생물학적 과정에도 중요한 역할을 한다.

[0005] PGRP-SC2 단백질은 PGRP 패밀리에 속하는 단형 PGRP로, 박테리아 결합, 응집반응, 장의 항상성 유지를 포함하는 다양한 생물학적 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 초파리에서 PGRP-SC2는 세균 감염 후 면역결핍 신호 경로의 활성화 수준을 조절하며, 유충의 발달 저해 억제 및 생존에 중요한 것으로 보고되었다. 알테미아 시니카(*Artemia sinica*)에서 PGRP-SC2는 그람 음성 박테리아에 대한 선천 면역 반응 및 초기 배아 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. PGRP 단백질은 초파리에서 특히 잘 연구되어 있고, PGRP-SC2는 나일틸라피아(Nile tilapia) 및 박대(tongue sole)를 포함하는 경골 어류에서 확인되었으나, 면역학적 기능에 대한 연구는 제한적이었다. 본 발명에서는 돌돔 유래의 PGRP-SC2의 동정 및 특성분석을 통해, PGRP-SC2 단백질의 면역학적 기능을 확인하였다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1016689호에는 갈색저거리 유래 PGRP에 관한 '펩티도글리칸 인식 신호 전달에 관여하는 단백질, 이를 코딩하는 유전자 및 이를 포함하는 박테리아 감염 검출용 키트'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1486236호에는 돌돔 유래 TRx(Thioredoxin) 1 단백질을 관한 '돌돔 유래의 단백질을 유효성분으로 함유하는 어류용 백신 보조제'가 개시되어 있으나, 본 발명의 돌돔 유래 PGRP-SC2단백질 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 돌돔으로부터 PGRP-SC2(peptidoglycan recognition protein-SC2) 유전자의 cDNA 염기서열을 획득하여 염기서열을 기반으로 재조합단백질을 제작하였다. 또한, 돌돔양식에서 주요 질병의 원인이 되는 병원체의 감염에 따른 OfPGRP-SC2의 발현 양상을 분석한 결과, OfPGRP-SC2의 발현이 유의적으로 상향 조절되는 것을 확인할 수 있었고, 재조합단백질을 이용해 병원체균에 대한 OfPGRP-SC2의 응집기능을 확인하였으며, 재조합 OfPGRP-SC2 단백질이 백혈구의 병원체균에 대한 식균작용을 증진시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래의 OfPGRP-SC2(peptidoglycan recognition protein-SC2) 단백질을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 OfPGRP-SC2 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 OfPGRP-SC2 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 OfPGRP-SC2 단백질의 생산방법 및 상기 방법에 의해 생산된 OfPGRP-SC2 단백질을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 OfPGRP-SC2 단백질을 유효성분으로 함유하는 어류용 항균 조성물 또는 어류용 사료첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에서는 돌돔 유래 OfPGRP-SC2 단백질의 주요 어류 질병 병원체에 대한 면역학적 기능을 확인할 수 있었다. 따라서 OfPGRP-SC2 단백질을 어류용 항생제 대체 물질로 사용하거나, 양식 어류에 대한 사료첨가제 등으로 유용하게 활용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 돌돔(rock bream) 유래 PGRP-SC2와 다른 경골 어류 유래 PGRP-SC2 단백질의 아미노산 서열을 비교분석한 결과이다.
- 도 2는 건강한 돌돔 어체의 다양한 조직 및 기관에서 PGRP-SC2 유전자의 발현수준을 RT-qPCR로 확인한 결과이다.
- 도 3은 에드워드시엘라 피스시사(*Edwardsiella piscicida*), 스트렙토코커스 이니아(*Streptococcus iniae*) 또는 참돔 이리도바이러스(red seabream virus)로 감염시킨 돌돔의 신장(kidney), 비장(spleen), 아가미(gill), 간(liver) 조직에서 PGRP-SC2 유전자의 발현 수준을 시간별로 분석한 결과이다.
- 도 4는 돌돔 유래 PGRP-SC2의 스트렙토코커스 이니아(*S. iniae*) 또는 에드워드시엘라 피스시사(*E. piscicida*)에 대한 응집 활성을 확인한 결과이다.
- 도 5는 병원균에 대한 말초 혈액 림프구(과립구)의 식균작용에 미치는 PGRP-SC2의 영향을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래의 OfPGRP-SC2(peptidoglycan recognition protein-SC2) 단백질을 제공한다.
- [0017] 본 발명에 따른 돌돔 유래 OfPGRP-SC2 단백질의 범위는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 항균 활성을 의미한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 상기 OfPGRP-SC2 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 OfPGRP-SC2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 OfPGRP-SC2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제체를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 겹)를 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 OfPGRP-SC2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0021] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 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. 진핵세포에서 이용가능한 번역 조절 요소인 인핸서(enhancer), 리보솜 결합 부위, 종결신호, 폴리아데닐레이션 신호 및 프로모터는 당업계에 공지되어 있다. 상기 발현 벡터는 당업계에 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 부의 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, pL_λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함

하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*E. coli*)이 이용되는 경우, 대장균의 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파지(λ)의 좌향 프로모터(pL λ 프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0023] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드(예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지(예: λ gt4, λ B, λ -Charon, λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스(예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다. 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0024] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 제조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0026] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, 대장균(*E. coli*) JM109, 대장균 BL21, 대장균 RR1, 대장균 LE392, 대장균 B, 대장균 X1776, 대장균 W3110, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 쉼린겐시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 사람 세포(예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법(Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법(Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법(Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)) 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc.Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한, 상기 제조합 벡터로 숙주세포를 형질전환시켜 OfPGRP-SC2 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 OfPGRP-SC2 단백질의 생산방법 및 상기 방법에 의해 생산된 OfPGRP-SC2 단백질을 제공한다.

[0030] 본 발명의 단백질을 생산하는 방법은 제조합 벡터로 형질전환된 숙주세포(형질전환체)를 공지된 기술을 이용하여 제조합 단백질의 생산에 적합한 배지에서 배양하는 것일 수 있다. 예를 들어, 세포들은 적합한 배지와 단백질이 발현 및/또는 분리되는 것을 허용하는 조건 하에 실시된 실험실 또는 산업용 발효기에서 소규모 또는 대규모 발효, 웨이크 플라스크 배양에 의해서 배양될 수 있다. 배양은 공지기술을 사용하여 탄소, 질소원 및 무기염을 포함하는 적합한 배지에서 일어난다. 적합한 배지는 상업적으로 입수하거나 예를 들면, ATCC(American Type Culture Collection)의 카탈로그와 같은 간행물에 기재된 성분 및 조성비에 따라 제조할 수 있다.

[0031] 상기 생산방법에서는 발현된 단백질을 당업계에 공지된 단백질 분리방법을 이용하여 회수할 수 있다. 예를 들어 단백질은 원심분리, 여과, 추출, 분무 건조, 증발 또는 침전을 포함하는 통상적인 방법에 의해서 영양배지로부터 분리될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 더 나아가 단백질은 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기별 배제), 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), SDS-PAGE 또는 추출을 포함하여 공지된 다양한 방법을 통해서 정제될 수 있다.

[0032] 본 발명의 상기 OfPGRP-SC2 단백질은 그람 양성균 또는 그람 음성균에 결합할 수 있으며, 림프구의 식균작용을 증진시키는 활성이 있는 단백질이다.

[0033] 본 발명은 또한, OfPGRP-SC2 단백질을 유효성분으로 함유하는 어류용 항균 조성물 및 어류용 사료첨가제를 제공

한다.

- [0034] 용어 "항균(antimicrobial)"은, 어떤 농도에서 미생물의 성장 또는 생존을 감소, 방지, 억제, 또는 제거하는 능력을 의미하며, 바람직하게는 항세균(anti-bacterial)을 의미할 수 있다. 본 발명의 상기 세균은 그람 양성균 또는 그람 음성균일 수 있고, 바람직하게는 상기 그람 양성균은 스트렙토코커스 이니아(*Streptococcus iniae*)이고, 그람 음성균은 에드워드시엘라 피스시사다(*Edwardsiella piscicida*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 사료첨가제는 바람직하게는 면역증강용이며, 어류용 사료첨가제로 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 본 발명의 사료첨가제에는 아미노산, 무기염류, 비타민, 항생물질, 항균물질, 항산화, 항곰팡이 효소, 다른 생균 형태의 미생물 제제 등과 같은 보조제 성분; 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩 및 해바라기를 주성분으로 하는 것; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조성분; 지질, 예를 들면 가열에 의해 임의로 액화시킨 동물성 지방 및 식물성 지방 등과 같은 주성분; 영양보충제, 소화 및 흡수향상제, 성장촉진제, 질병 예방제와 같은 첨가제가 추가로 포함될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 사료첨가제는 분말 또는 액체 상태의 제제 형태일 수 있으며, 사료 첨가용 부형제를 포함할 수 있다. 사료 첨가용 부형제로는 예를 들어, 탄산칼슘, 말분, 제올라이트, 옥분 또는 미강 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 사료첨가제는 하나 이상의 효소 제제를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어 리파제와 같은 지방 분해 효소, 피틴산(phytic acid)을 분해하여 인산염과 이노시톨인산염을 만드는 파이타제(phytase), 녹말과 글리코젠 등에 포함되어 있는 알파-1,4-글리코시드 결합(α -1,4-glycoside bond)을 가수분해하는 효소인 아밀라제, 유기 인산에스테르를 가수분해하는 효소인 포스파타제(phosphatase), 말토오스를 두 분자의 글루코스로 가수분해하는 말타제 및 사카로스를 가수분해하여 글루코스-프룩토스 혼합물을 만드는 전환효소 등을 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 사료첨가제는 어류에게 단독으로 투여되거나 식용 담체 중에서 다른 사료첨가제와 조합되어 투여될 수 있다. 통상적으로, 당업계에 잘 알려진 바와 같이 단독 일일 섭취량 또는 분할 일일 섭취량을 사용할 수 있다.
- [0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] **재료 및 방법**
- [0042] **1. 서열 정렬 및 계통학적 분석**
- [0043] 돌돔 유래 PGRP-SC2 서열을 포함하는 ORF(open reading frame)는 돌돔 창자(intestine) 시료의 NGS(next generation sequencing) 분석을 통해 획득하였고, Sanger 시퀀싱으로 서열을 검증하였다. BLAST 프로그램(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>)을 사용하여 공지된 다른 염기 서열과의 유사성을 조사하였고, 아미노산 서열을 예측하였다. 아미노산 도메인은 SMART 툴(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)을 사용하여 조사하였으며, GENETYX 프로그램 버전 8.0(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)은 다중 서열 정렬을 위해 사용하였다. 계통발생학적 위치를 확인하기 위해 MEGA(Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 버전 6.0으로 최우법(maximumlikelihood method)을 사용하여 계통수를 제작하였으며, bootstrap 샘플링은 1,000번 반복 수행하였다.
- [0044] **2. 실시간 정량적 PCR 분석(Real-time quantitative PCR analysis)**
- [0045] **2.1 실험 어류 및 병원균 인위감염**
- [0046] 건강한 돌돔(무게: 140.4 ± 39.7 g, 길이: 19.0 ± 1.8 cm)은 통영의 지역 시장으로부터 구매하였으며, 실험이 종료될 때까지 20~22℃의 통기 조건의 바닷물에서 사육하였다.
- [0047] 병원균 인위감염 실험은 스트렙토코커스 이니아(*Streptococcus iniae*) FP5228 (3×10^6 세포/어체), 에드워드시엘라 피스시사다(*Edwardsiella piscicida*) FSW910410 (2×10^6 세포/어체) 또는 참돔 이리도바이러스(red seabream virus, RSIV) (1.04×10^4 copies/어체)를 건강한 돌돔의 복강 내로 주사하여 감염시켰으며, 실험 기간 동안 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 바닷물에서 사육하였다.

[0058] 재조합 OfPGRP-SC2 단백질의 림프구의 식균작용에 미치는 영향을 유세포 분석기를 사용하여 분석하였다. 준비된 병원균은 0.5% 포르말린으로 2일간 반응시켜 비활성화시키고, PBS로 3회 세척하였다. 그 후, 각 세포들을 희석시킨 FITC와 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBS로 3회 세척하였다. 건강한 돌돔 어체의 전혈로부터 준비된 말초혈액 림프구는 배양 배지에 재현탁시키고, 말초혈액 림프구 세포(10^6 세포/ml)를 $10\mu\text{M}$ 염화아연 및 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 OfPGRP-SC2 단백질 또는 BSA와 반응시키고, 5% 이산화탄소 조건에서 1시간 동안 반응시켰다. FITC-표지된 세균(10^8 세포/ml) 및 말초혈액 림프구를 혼합하고, 암조건의 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후, 차가운 RPMI 배지를 첨가하여 반응을 종료시키고, 얼음에 보관하였다. 식균작용의 백분율은 Accuri™ C6 유세포 분석기(BD biosciences, 미국)를 사용하여 결정하였다.

[0059] 6. 통계처리

[0060] 모든 실험은 3반복으로 수행하였으며, 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 결과값은 SPSS 프로그램 버전 19를 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 방법으로 평가하였으며, 병원균 감염 후 각 조직별 유전자의 발현 분석은 던칸의 다중 비교 검정(* $p<0.05$)을 사용하여 분석하였다. 식균작용 분석은 독립표본 t 검정(* $p<0.05$)을 사용하여 분석하였다.

[0061] 실시예 1. 돌돔 유래 PGRP-SC2 유전자의 서열 분석

[0062] 돌돔(*Oplegnathus fasciatus*) 유래 PGRP-SC2 유전자(이하 OfPGRP-SC2)는 167개의 아미노산으로 이루어진 펩티드를 코딩하는 것으로 예측되었으며, 분자량은 17.85kDa, 이론적인 등전점은 8.72인 것으로 예측되었다. OfPGRP-SC2 단백질은 5번째~147번째 아미노산 위치에 펩티드글리칸 인식 도메인이 위치하는 것으로 추정되었다(도 1). OfPGRP-SC2 단백질의 아미노산 서열을 다른 종의 PGRP-SC2 단백질 아미노산 서열과 정렬한 결과, 참조기(yellow croaker)의 PGRP-SC2와 79.6%로 가장 유사한 것으로 확인되었다.

[0063] 실시예 2. 돌돔 유래 PGRP-SC2 유전자의 조직별 발현 수준 분석

[0064] 건강한 돌돔 어체를 대상으로 OfPGRP-SC2 유전자의 각 조직별 발현 수준을 분석한 결과, 다양한 조직에서 흔하게 발현되는 것으로 확인되었으며, 말초혈액 림프구(PBLs)와 비교하여 근육 조직에서 OfPGRP-SC2 유전자가 가장 높게 발현한 것을 확인할 수 있었다(도 2).

[0065] 실시예 3. 병원균 인위감염 후 돌돔 유래 PGRP-SC2 유전자의 발현 수준 분석

[0066] 스트렙토코커스 이니아(*S. iniae*), 에드워드시엘라 피스시사다(*E. piscicida*) 및 참돔 이리도바이러스(RSIV) 인위감염 후 OfPGRP-SC2 유전자의 발현 수준을 분석한 결과, 테스트한 모든 조직에서 병원균 무 감염과 대비하여 OfPGRP-SC2 유전자의 발현 수준이 증가되는 것이 확인되었고, 아가미 조직을 제외하고 바이러스 감염보다 세균 감염 조건에서 발현 수준의 증가가 현저한 것으로 관찰되었다(도 3).

[0067] 실시예 4. 돌돔 유래 PGRP-SC2 단백질에 의한 병원성 세균의 응집 분석

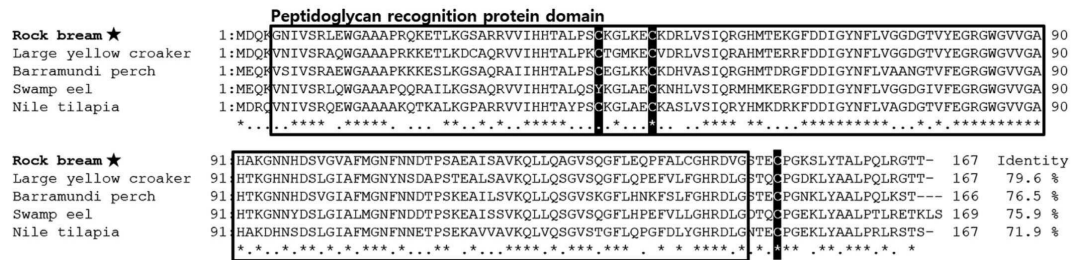
[0068] 병원성 세균인 스트렙토코커스 이니아 및 에드워드시엘라 피스시사다에 대해서 재조합 OfPGRP-SC2 단백질이 아연 이온의 존재 하에 세균의 응집을 유도하는 것으로 확인되었다(도 4). 이를 통해, OfPGRP-SC2 단백질이 세균 감염에 대하여 선천 면역에 중요한 역할을 하며, OfPGRP-SC2의 활성화는 아연 이온에 의해 조절반응을 유도할 수 있었다.

[0069] 실시예 5. 돌돔 유래 PGRP-SC2 단백질에 의한 식균작용 활성 분석

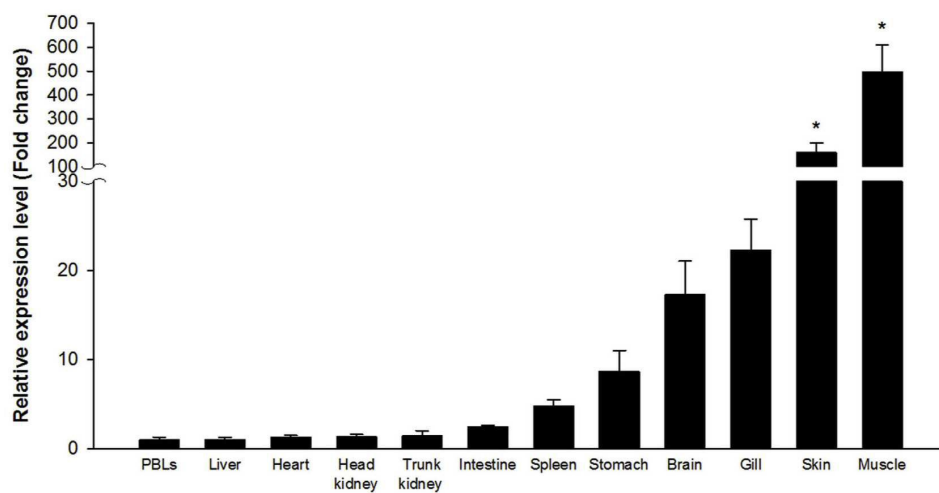
[0070] 식균작용은 선천 면역 시스템에서 병원체의 인식 및 제거를 위한 숙주 방어 시스템의 첫 번째 전선이다. 본 발명의 재조합 OfPGRP-SC2 단백질이 림프구의 식균작용에 미치는 영향을 평가하기 위해, 림프구 세포와 재조합 단백질 그리고 형광 표지한 병원성 세균을 반응시킨 후, 유세포 분석기로 확인한 결과, BSA 단백질을 처리한 군에 비해 재조합 OfPGRP-SC2 단백질을 처리한 군에서 림프구의 식균작용이 약간 증가된 것으로 확인되었다(도 5). 이를 통해, OfPGRP-SC2 단백질이 림프구 항상성 유지에 관여함을 유추할 수 있었다.

도면

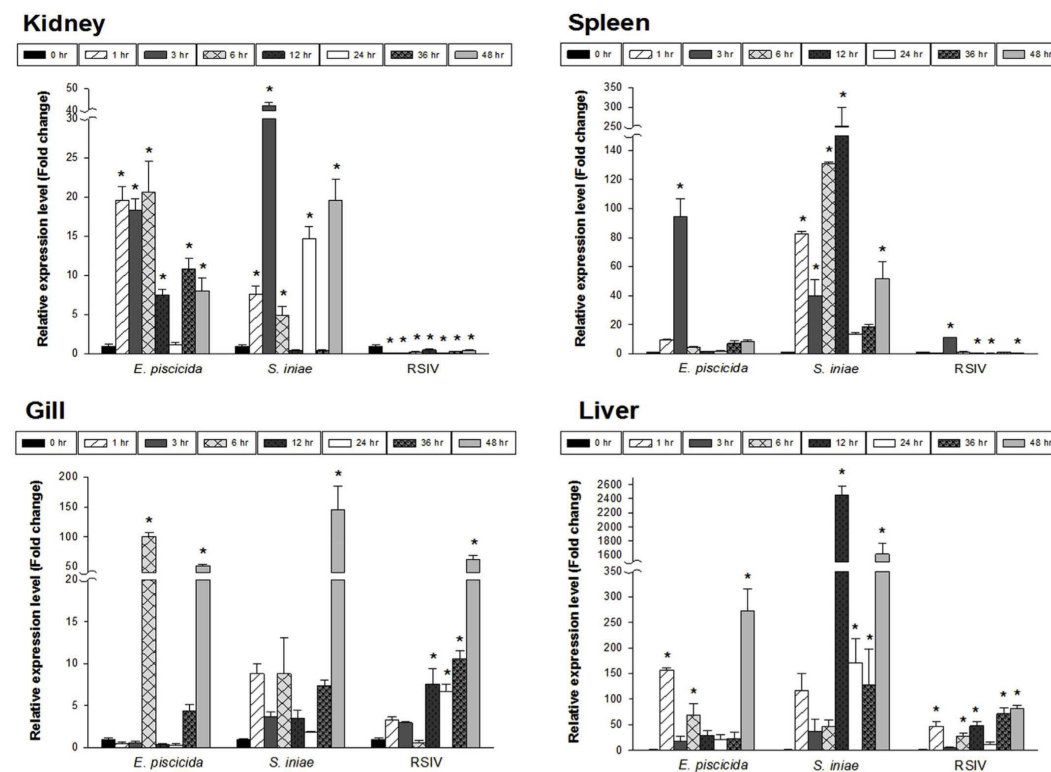
도면1



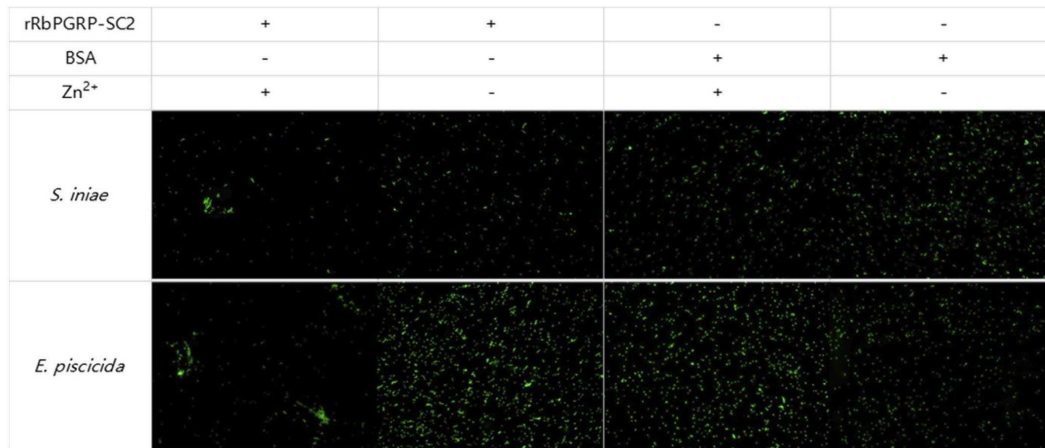
도면2



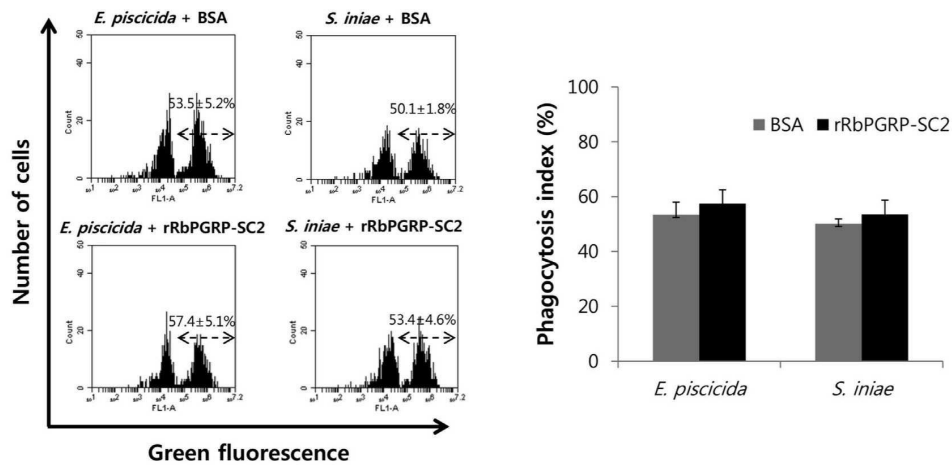
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> PGRP-SC2 protein from Rock bream and uses thereof

<130> PN18238

<160> 8

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 504

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Oplegnathus fasciatus

<400> 1

atggacacaa aggggaacat tgtttcaagg ctggagtggg gagcggctgc ccctcgacaa

60

aaggagactt tgaaggctc tgcccggaga gtcgtcatc accacactgc cctcccaagc 120
tgcaaaggcc tgaagagtg taaggaccgc cttgtcagca ttcagagagg acatatgacc 180

gaaaaaggct ttgatgacat tggatataat ttccttgtcg gaggagatgg taccgtgtac 240
gagggccgtg gctgggggtg gtaggagca catgccaagg gcaacaatca tgactcagt 300
ggggttgcct tcatgggcaa tttcaacaat gacacaccaa gcgcagagc aatatcagca 360
gtcaaacagc tgctgcaggc tggagtctct cagggtttt tagagcaacc gtttgcctg 420
tgtgggcaca gagatgtggg atccaccgaa tgtccaggaa aaagtcttta tactgcgctg 480
ccacaactga ggggcaccac ataa 504

<210> 2
<211> 167
<212> PRT

<213> Unknown
<220><223> Oplegnathus fasciatus
<400> 2

Met Asp Gln Lys Gly Asn Ile Val Ser Arg Leu Glu Trp Gly Ala Ala
1 5 10 15
Ala Pro Arg Gln Lys Glu Thr Leu Lys Gly Ser Ala Arg Arg Val Val
20 25 30
Ile His His Thr Ala Leu Pro Ser Cys Lys Gly Leu Lys Glu Cys Lys
35 40 45
Asp Arg Leu Val Ser Ile Gln Arg Gly His Met Thr Glu Lys Gly Phe
50 55 60

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

130	135	140	
Asp Val Gly Ser Thr Glu Cys Pro Gly Lys Ser Leu Tyr Thr Ala Leu			
145	150	155	160
Pro Gln Leu Arg Gly Thr Thr			
	165		
<210>	3		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer		
<400>	3		
cccctgcagg acgtctacaa		20	
<210>	4		
<211>	19		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>			
primer			
<400>	4		
aacacgaccg acgggtaca		19	
<210>	5		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer		
<400>	5		
aagcgagag gcaatatcag		20	
<210>	6		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer		
<400>	6		
tgtggcagcg cagtataaag		20	
<210>	7		

<211> 49

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ctgttcact ctagaaataa tttgtttta ctttaagaag gagatatac 49

<210> 8

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gatatggctc tcgagttagt ggtggtggtg gtggtgcgtg gtaccacgca actgc 55