



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월22일  
(11) 등록번호 10-2604524  
(24) 등록일자 2023년11월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/67 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
C12N 15/62 (2006.01) C12N 9/88 (2006.01)  
C12N 9/90 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/67 (2013.01)  
C12N 15/62 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7010524
- (22) 출원일자(국제) 2019년10월10일  
심사청구일자 2021년04월09일
- (85) 번역문제출일자 2021년04월08일
- (65) 공개번호 10-2021-0046811
- (43) 공개일자 2021년04월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/KR2019/013261
- (87) 국제공개번호 WO 2020/076079  
국제공개일자 2020년04월16일
- (30) 우선권주장  
1020180120547 2018년10월10일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020080086161 A\*  
KR1020070072831 A  
KR1020050119786 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
주식회사 비엘  
경기도 용인시 수지구 신수로 767, 7층(동천동, 분당수지유타워 지식산업센터)
- (72) 발명자  
박영철  
서울특별시 강남구 봉은사로29길 35, 709  
기대은  
서울특별시 성동구 왕십리로 16, 101-2104  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인세원

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 김정태

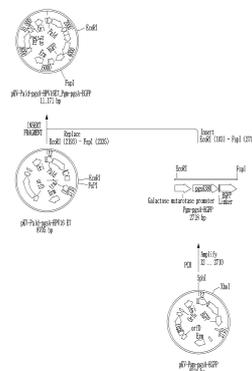
(54) 발명의 명칭 락토바실러스 카제이 유래의 두 종류 프로모터를 이용한 두 가지 목적단백질의 동시 표면발현 벡터 및 이를 이용한 단백질 미생물표면 발현 방법

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 유래의 두 프로모터를 이용하여 두 가지 목적단백질을 미생물 표면에 동시 발현할 수 있는 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 미생물 표면에서 목적단백질을 발현하는 방법에 관한 것이다. 외래 유전자들이 삽입된 상기 벡터는 미생물을 형질전환시키고 각기 다른 외래 단백질이 미생물의 표면에서 안정하게 발현되도록

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



하고, 나아가 pgsA를 가지는 표면발현벡터, 폴리감마글루탐산 합성효소를 코딩하는 유전자 및 상기 벡터를 이용하여 미생물 표면에 목적 단백질을 발현하는 방법에 관한 것으로, 외래 유전자들이 삽입된 상기 벡터는 미생물을 형질전환시키고 외래 단백질이 미생물의 표면에 안정하게 발현되도록 한다.

(52) CPC특허분류

*C12N 9/88* (2013.01)

*C12N 9/90* (2013.01)

*C12Y 401/02013* (2013.01)

*C12Y 501/03003* (2013.01)

*A61K 2039/523* (2013.01)

(72) 발명자

**남경준**

경기도 용인시 수지구 문인로13번길 17-8, 301호

**변세은**

경기도 화성시 향남읍 상신하길로274번길 21,  
708-1804

**문하나**

경기도 용인시 기흥구 기흥로116번길 100,  
203-1303

**강현준**

경기도 고양시 일산동구 숲속마을로 65, 301-901

**함경수**

서울특별시 영등포구 의사당대로 110, C-907

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

제1프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코딩하는 유전자 및 목적단백질을 코딩하는 유전자; 및 제2프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코딩하는 유전자 및 목적단백질을 코딩하는 유전자;를 포함하는 목적단백질의 표면발현벡터로서,

상기 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코딩하는 유전자는 pgsA로서, 서열번호 21 내지 23 및 32 내지 34 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 제1프로모터는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 제2프로모터는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코딩 하는 유전자는 폴리감마글루탐산을 생산하는 바실러스 속 균주에서 유래한 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코딩 하는 유전자의 말단 부위에 링커가 삽입되어 있고, 상기 삽입된 링커에 목적단백질을 코딩 하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, 상기 목적단백질은 표면발현에 유리하도록 목적단백질의 아미노산 서열 중 일부가 제거되거나 위치 특이적으로 돌연변이된 것임을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 제1프로모터는 유산균 유래의 알돌레이즈 프로모터(Pald) 인 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, 상기 제2프로모터는 유산균 유래의 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터(Pgm) 인 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 그람음성균 또는 그람양성균에 적용되는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터.

#### 청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 표면발현벡터로 형질전환된 미생물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 형질전환에 사용된 미생물은 목적단백질의 세포 표면발현에 유리하도록, 발현된 목적단백질을

분해하는데 관련된 세포 내 또는 세포 외의 단백질 분해효소를 생산하지 못하도록 변형된 것임을 특징으로 하는 형질전환된 미생물.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 미생물은 유산균인 것을 특징으로 하는 형질전환된 미생물.

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

제10항의 형질전환된 미생물을 배양하여 목적단백질을 세포표면에 발현하는 단계 및 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 발현방법.

**청구항 23**

하기의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 그람음성 또는 그람양성 숙주세포의 표면에 목적단백질을 발현시키는 방법:

- (a) 제9항의 미생물 표면발현용 벡터에 목적단백질을 코드 하는 유전자를 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;
- (b) 상기 재조합 벡터로 그람음성 또는 그람양성 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및
- (c) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 목적단백질을 숙주세포 표면에 발현하는 단계.

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

제22항에 있어서, 목적단백질은 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소저해제, 신호전달 단백질 혹은 그 일부분, 항체 혹은 그 일부분, 단쇄항체, 결합단백질, 결합도메인, 펩타이드, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절 인자, 혈액응고 인자 및 식물 생체방어 유도 단백질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 26**

제25항의 방법에 의해 제조되고, 항원이 표면에 발현된 세포를 인간을 제외한 척추동물에 투여하여 체액성 면역 또는 세포성 면역을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 27**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 락토바실러스 카제이 (*Lactobacillus casei*) 유래의 알돌레이즈 (aldolase) 프로모터와 갈락토오스 뮤타로테이스 (galactose mutarotase) 프로모터를 이용하여 두 가지 목적단백질을 미생물 표면에 동시에 발현하는 벡터와 이러한 벡터로 형질전환된 미생물에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 바실러스 속 균주 유래의 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질(pgsA)을 이용하여 외래 단백질을 미생물의 표면에 효과적으로 발현시키는 새로운 벡터에 관한 것이고, 나아가 본 발명은 바실러스속 균주 유래의 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질을 이용하여 외래단백질을 미생물의 표면에 발현시키는 단백질의 제조방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 세포 표면발현은 단백질이나 펩타이드 등을 적절한 표면발현 모체(anchoring motif)와 융합 시켜서 그람 음성양성균, 곰팡이, 효모, 동물세포의 표면에 발현시키는 기술을 말한다 (Lee S. Y., et al., Trends Biotechnol., 21:4552, 2003). 최초의 세포 표면발현 기술은 1980년대 상대적으로 표면이 단순한 파아지를 이용하여 펩타이드나 작은 단백질을 필라멘터스 파아지(filamentous phage)의 pIII와 융합하여 발현시켜 이를 표면발현 시스템(surface-expression system)이라고 하였다. 파아지를 이용한 세포 표면발현은 항체의 스크리닝이나, epitope, high-affinity ligand 등의 스크리닝에 사용되었으나, 파아지의 표면에 발현될 수 있는 단백질의 크기가 상대적으로 제한되어 있어서 한계점을 나타나게 되었다. 따라서, 그 대안으로 박테리아를 이용한 세포 표면발현이 개발되었다. 박테리아나 효모와 같은 미생물의 표면 단백질을 표면발현 모체(surface anchoring motif)로 사용하여 외래 단백질을 미생물 표면에 안정적으로 발현시키는 분야이다.

[0004] 특정 유기체의 외막단백질을 이용하여 외래단백질을 세포표면에 발현시키기 위해서는 적당한 표면단백질과 외래 단백질을 유전자 수준에서 서로 연결하여 융합단백질이 생합성되도록 하고, 이들이 안정하게 세포내막을 통과하여 세포표면에 부착되어 유지되도록 해야 한다. 이를 위해서는 다음과 같은 성질을 갖는 단백질을 표면발현의 모체로 사용하는 것이 바람직하다: 첫째, 세포내막을 통과할 수 있는 분비신호(secretion signal)를 N-말단에 가지고 있고, 둘째, 세포 외막 표면에 안정적으로 부착될 수 있는 표적신호(targeting signal)를 가져야 하며, 셋째, 세포의 성장에 악영향을 끼치지 않는 범위 내에서 세포표면에 다량으로 발현되어 단백질의 활성이 높게 나타날 수 있으면서, 마지막으로, 단백질의 크기에 관계없이 안정적으로 발현되어 다양한 반응에 이용될 수 있어야 한다 (Georgiou et al., TIBTECH, 11:6, 1993). 이러한 표면발현 모체는 숙주세포의 표면에 외막단백질의 N-말단이나 C-말단, 또는 단백질의 중앙에 삽입되도록 유전적으로 조작할 필요도 있다 (Lee et al., TIBTECH, 21:45, 2003)

[0005] 세균의 표면에 단백질이 발현되기 위해서는, 세포 내에서 생합성된 단백질이 세포막을 통과할 수 있는 분비신호(secretion signal)가 그 단백질의 일차 서열상에 있어야 한다. 또한 그람 음성 세균인 경우는 세포내막과 세포막공간을 통과하여 세포외막에 삽입 부착되어 막 외부로 돌출되게 안착되어야 한다.

[0006] 세균의 경우 이러한 분비신호와 세포 표면에 안착하게 하는 표적신호(targeting signal)를 갖고 있는 단백질로

는 표면단백질, 특수한 효소, 독소단백질 등을 예로 들 수 있다. 실제로 이들 단백질이 갖는 분비신호와 표적신호 등을 적당한 프로모터와 함께 사용하면 세균의 표면에 단백질을 성공적으로 발현시킬 수 있다.

[0007] 한편, 유산균에서 유용한 외래 단백질을 생산하기 위한 시도는 주로 유도물질을 이용한 inducible promoter를 사용하거나 고효율의 프로모터를 확보하여 진행되어 왔다. 상기에서 기술한 바와 같이 목적단백질을 발현하는 유산균에 대한 다양한 용도 개발과 학문적 연구가 활발하게 이루어지고 있으나, 아직까지는 발현되는 목적단백질의 발현양이 불충분하다는 문제점과 유도적 발현 프로모터를 이용했을 때 체내 투여 시 지속적인 발현이 불가능할 수도 있다는 등의 문제가 있다.

[0008] 최근 들어 미국 및 유럽에서 유산균을 이용한 라이브 백신 개발, 유용한 호르몬제의 장내 운반체에 대한 연구 및 이를 위한 효율적인 유전자원의 확보와 유산균용 삽입 벡터 개발에 대한 연구가 진행되고 있다. 특히, 유산균에 함유된 다량의 구성성분인 비메틸화된(unmethylated) CpG DNA, 지질타이코산(lipoteichoic acid), 펩티도글리칸 등이 면역상승제(adjuvant)로서의 역할을 한다고 알려져 있기 때문에 유산균이 백신전달체(vehicle)로서의 유용성이 높게 평가되고 있다. 또한 유산균은 담즙산 및 위산에 저항성을 나타내어 장까지의 항원전달이 가능하기 때문에 장내 점막면역을 유도할 수 있다는 점에서 많은 장점을 가지고 있다.

[0009] 그러나 유산균의 백신전달체로 사용하기 위해서는 질병 예방용 항체 생성을 위한 항원단백질을 균체의 내부 또는 외부에 제시되어 항원항체반응이 원활하게 이루어지도록 하는 기술의 개발이 필요하다.

[0010] 한편, 갈락토오스 뮤타로테이즈(galactose mutarotase)는 D-galactose의 catabolism에 대한 metabolic pathway인 Leloir pathway에서  $\beta$ -D-galactose의  $\alpha$ -D-galactose 로의 전환을 촉매함으로써 정상적인 갈락토스 대사에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 하지만 유산균에서 이러한 갈락토오스 뮤타로테이즈(galactose mutarotase)의 분자생물학적 특성에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 HPV의 E7 단백질을 세포표면에 발현하는 균주를 이용하여 하나의 벡터 내에서 서로 다른 두 가지 외래단백질을 미생물의 표면에 효과적으로 발현시키는 새로운 표면발현벡터 및 미생물의 표면에 서로 다른 두 가지 외래단백질을 안정적으로 다량 발현시키는 방법을 개발하였고, 나아가 본 발명자들은 바실러스 속 균주 유래의 폴리감마글루탐산의 합성 유전자(pgsA)를 새로운 표면발현 모체로 활용하는 것에 대하여 예의 검토하고 연구한 바, pgsA 유전자를 이용하여, 외래단백질을 미생물의 표면에 효과적으로 발현시키는 새로운 벡터, 및 미생물의 표면에 외래단백질을 다량 발현시키는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 미생물의 표면에 두 가지 외래단백질을 대량 발현시킬 수 있는 표면 발현모체로서 바실러스(*Bacillus subtilis* var. *Chungkookjang*) 속 균주 유래의 폴리감마글루탐산의 합성 복합체 유전자를 사용하고, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 유래의 알돌레이즈(aldolase) 프로모터와 갈락토오스 뮤타로테이즈(galactose mutarotase) 프로모터를 이용하여 두 가지 목적단백질을 미생물 표면에 동시에 발현하는 표면발현벡터와, 이것으로 형질전환된 다양한 형질전환체에서 서로 다른 두 가지 외래단백질이 효율적으로 형질전환체의 표면에 발현시키는 방법을 제공하고자 한다.

[0013] 또한, 본 발명은 미생물의 표면에 외래단백질을 대량 발현시킬 수 있는 표면 발현모체로서 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질을 선택하고, 이를 이용하여 외래단백질이나 펩타이드를 미생물 표면에 발현시킬 수 있는 목적단백질의 표면발현벡터를 제조하고, 이것으로 형질전환된 다양한 형질전환체에서 외래단백질이 효율적으로 형질전환체의 표면에 발현시키는 방법을 제공하고자 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제1프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코딩하는 유전자 및 목적단백질을 코딩하는 유전자; 및 제2프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코딩하는 유전자 및 목적단백질을 코딩하는 유전자;를 포함하는 목적단백질의 표면발현벡터를 제공한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 제1프로모터는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0016] 본 발명에 있어서, 제2프로모터는 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코드 하는 유전자는 폴리감마글루탐산을 생산하는 바실러스 속 균주에서 유래한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코드 하는 유전자의 말단 부위에 링커가 삽입되어 있고, 상기 삽입된 링커에 목적단백질을 코드 하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 목적단백질은 표면발현에 유리하도록 목적단백질의 아미노산 서열 중 일부가 제거되거나 위치 특이적으로 돌연변이된 것임을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 제1프로모터는 유산균 유래의 알돌레이즈 프로모터(Pald) 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 제2프로모터는 유산균 유래의 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터 (Pgm) 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 박터는 그람 음성균 또는 그람 양성균에 적용되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명은 또한, 상기 표면발현백터로 형질전환된 미생물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 형질전환에 사용된 미생물은 목적단백질의 세포 표면발현에 유리하도록, 발현된 목적단백질을 분해하는데 관련된 세포 내 또는 세포 외의 단백질 분해효소를 생산하지 못하도록 변형된 것임을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 미생물은 유산균인 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에서 상기 유산균은 락토바실러스 속, 스트렙토코커스 속 및 비피도박테리움 속을 포함할 수 있다. 대표적으로 락토바실러스 속은 락토바실러스 아시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 카제이(*L. casei*), 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*), 락토바실러스 페멘툼(*L. fermentum*), 락토바실러스 델브루에키(*L. delbrueckii*), 락토바실러스 존스니(*L. johnsonii* LJI), 락토바실러스 료터리(*L. reuteri*) 및 락토바실러스 불가리커스(*L. bulgaricus*); 스트렙토코커스 속은 스트렙토코커스 서모필러스(*S. thermophilus*); 비피도박테리움 속은 비피도박테리움 인판티스(*B. infantis*), 비피도박테리움 비피둠(*B. bifidum*), 비피도박테리움 롱검(*B. longum*), 비피도박테리움 슈도롱검(*B. pseudolongum*), 비피도박테리움 브레브(*B. breve*), 비피도박테리움 락티스 Bb-12(*B. lactis* Bb-12) 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*B. adolescentis*) 등을 숙주로 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 락토바실러스 속이다.
- [0025] 본 발명은 또한, 상기 형질전환된 미생물을 배양하여 목적단백질을 세포표면에 발현하는 단계 및 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 발현방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 목적단백질은 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소저해제, 신호전달 단백질 혹은 그 일부분, 항체 혹은 그 일부분, 단쇄항체, 결합단백질, 결합도메인, 펩타이드, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절 인자, 혈액응고 인자 및 식물 생체방어 유도 단백질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명은 또한, (a) 상기 미생물 표면발현용 백터에 목적단백질을 코드 하는 유전자를 삽입하여 제조용 백터를 제조하는 단계; (b) 상기 제조용 백터로 그람 음성 또는 그람 양성 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 목적단백질을 숙주세포 표면에 발현하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 그람 음성 또는 그람 양성 숙주세포의 표면에 목적단백질을 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코드하는 유전자 pgsA와 목적단백질을 코드하는 유전자를 포함하는 목적단백질의 표면발현백터를 제공한다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 pgsA는 폴리감마글루탐산을 생산하는 바실러스 속 균주에서 유래한 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코드하는 유전자 pgsA는 서열번호 21 내지 25 및 32 내지 34 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다. 바람직하게는 상기 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 코드하는 유전자 pgsA는 서열번호 21 내지 24 및 32 내지 34 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 유전자 pgsA의 말단부위에 링커가 삽입되어 있고, 상기 삽입된 링커에 목적단백질을 코딩하는 유전자가 삽입되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 목적단백질은 표면발현에 유리하도록 목적단백질의 아미노산 서열 중 일부분이 제거되거나 위치 특이적으로 돌연변이된 것임을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 프로모터는 유산균 유래의 알돌라아제 프로모터인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 본 발명은 또한, 상기 표면발현벡터로 형질전환된 미생물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 형질전환에 사용된 미생물은 목적단백질의 세포 표면발현에 유리하도록, 발현된 목적단백질을 분해하는데 관련된 세포 내 또는 세포 외의 단백질 분해효소를 생산하지 못하도록 변형된 것임을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] 본 발명은 또한, 상기 형질전환된 미생물을 배양하여 목적단백질을 세포표면에 발현하는 단계 및 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 발현방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 목적단백질은 호르몬, 호르몬 유사체, 효소, 효소저해제, 신호전달 단백질 혹은 그 일부분, 항체 혹은 그 일부분, 단쇄항체, 결합단백질, 결합도메인, 펩타이드, 항원, 부착단백질, 구조단백질, 조절단백질, 독소단백질, 사이토카인, 전사조절 인자, 혈액응고 인자 및 식물 생체방어 유도 단백질로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조되고, 항원이 표면에 발현된 세포를 인간을 제외한 척추동물에 투여하여 체액성 면역 또는 세포성 면역을 유도하는 것을 특징으로 하는 방법을 제공한다.
- [0038] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조되고, 항원이 표면에 발현된 세포를 인간을 제외한 척추동물에 투여하여 면역반응을 유도하고, 상기 면역반응에 의해 생성된 항체를 회수하는 것을 특징으로 하는 척추동물에서 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명은 또한, 상기 벡터는 그람음성균 또는 그람양성균에 적용되는 것을 특징으로 하는 목적단백질의 표면발현벡터를 제공한다.
- [0040] 본 발명은 또한, (a) 제14항의 미생물 표면발현용 벡터에 목적단백질을 코딩하는 유전자를 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 재조합 벡터로 그람음성 또는 그람양성 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 목적단백질을 숙주세포 표면에 발현하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 그람음성 또는 그람양성 숙주세포의 표면에 목적단백질을 발현시키는 방법을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0041] 본 발명에 따른 표면발현벡터는 하나의 벡터 안에 서로 다른 두 개의 프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코딩 하는 유전자 및 상기 폴리감마글루탐산 합성효소복합체 유전자와 연결되는 목적단백질을 코딩 하는 유전자가 존재하므로 종래의 발명들에 비하여 하나의 벡터로 두 가지 목적단백질을 동시에 발현할 수 있으며 동시에, 상기 표면발현벡터로 형질전환된 미생물을 이용하기 때문에 두 번의 형질전환 과정에서 발생할 수 있는 변형 가능성을 최소한으로 할 수 있다는 이점이 있고, 아울러 본 발명은 하나의 벡터 내에 서로 다른 두 프로모터가 존재하며 종래의 발명들에 비하여 보다 짧은 시간 동안 효율적으로 목적단백질을 발현할 수 있고 이를 이용하여 약제 가능성이 높은 물질을 조기에 선별하고 하나의 표면발현벡터로 두 가지 목적단백질을 발현함으로써 약제 개발비용을 획기적으로 감소시키는 효과가 우수하다. 또한, 본 발명에 따른 목적단백질의 표면발현벡터는 목적단백질을 안정하게 발현시킬 수 있으며, 본 발명에 따른 표면발현벡터는 목적단백질을 항시적으로 발현시키면서, 동시에 재조합 미생물에 표면발현시켜 필요로 하는 백신제조용 항원 제작 등에 유용하게 쓰일 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0042] 도 1는 본 발명에 의한 하나의 벡터에서 두 가지 목적단백질을 미생물 표면 발현할 수 있는 표면발현벡터를 구축하는 방법을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명에 의한 표면발현벡터 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.
- 도 3는 본 발명의 표면발현벡터로 형질전환시킨 미생물에서 HPV16 E7 및 EGFP 단백질 발현을 보여주는 웨스턴 블러팅 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명의 표면발현벡터로 유산균 표면에 두 가지 항원이 동시에 안정적으로 발현되고 있는 것을 Confocal 형광 현미경을 이용하여 관찰한 것이다.

도 5는 본 발명에 의한 락토바실러스 카제이를 숙주로 하는 표면발현벡터, pKV-Pald-PgsA-EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 의한 락토바실러스 카제이를 숙주로 하는 표면발현벡터(pKV-Pald-pgsA1), PgsA motif 1-60 a.a -EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 의한 락토바실러스 카제이를 숙주로 하는 표면발현벡터(pKV-Pald-pgsA2), PgsA motif 1-70 a.a -EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명에 의한 락토바실러스 카제이를 숙주로 하는 표면발현벡터(pKV-Pald-pgsA3), PgsA motif 1-80 a.a -EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명에 의한 락토바실러스 카제이를 숙주로 하는 표면발현벡터(pKV-Pald-pgsA5), PgsA motif 1-100 a.a -EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명에 의한 락토바실러스 카제이를 숙주로 하는 표면발현벡터(pKV-Pald-pgsA5), pKV-PgsA 1-188 a.a-EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 의한 락토바실러스 카제이를 숙주로 하는 표면발현벡터(pKV-Pald-pgsA6), PgsA motif 25-60 a.a -EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명에 의한 락토바실러스 카제이를 숙주로 하는 표면발현벡터(pKV-Pald-pgsA7), PgsA motif 25-70 a.a -EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명에 의한 락토바실러스 카제이를 숙주로 하는 표면발현벡터(pKV-Pald-pgsA8), PgsA motif 25-100 a.a -EGFP의 유전자 지도를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 표면발현벡터 pKV-Pald-pgsA1 내지 pKV-Pald-pgsA8로 형질 전환시킨 락토바실러스 카제이에서 EGFP 단백질의 표면발현을 보여주는 웨스턴 블러딩 사진을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0043] **발명의 실시를 위한 최선의 형태**
- [0044] 실시예 1: 이중 항원 동시 표면발현벡터 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP의 구축
- [0045] 상기 이중 항원 동시 표면발현벡터를 제조하기 위하여 pKV-Pald-pgsA-E7(pKV-Pald-pgsA380L-HPV16E7, 대한민국 등록특허 10-1471043 참조)에서 제조된 표면발현 벡터를 사용하여 Pald-pgsA-HPV16E7의 C-terminal에 Pgm-pgsA-EGFP를 코딩하는 유전자를 삽입시켜 유산균에서 두 가지 목적단백질을 동시 표면 발현할 수 있는 벡터 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP를 확보하였다.
- [0046] 먼저, EGFP 발현 벡터를 제조하기 위하여 pKV-Pald-PgsA-E7 (대한민국 등록특허 제10-1471043호 참조)에서 pgsA와 융합된 HPV16 E7 유전자를 제거하고 EGFP를 코딩하는 유전자를 삽입하였다.
- [0047] 합성 EGFP 유전자 단편을 주형으로 서열번호 3과 서열번호 4을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였다.
- [0048] 서열번호 3: 5'-TGGTGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3'
- [0049] 서열번호 4: 5'-TGACTCTAGAACTAGTGTGCGACGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3'
- [0050] 그 결과, 5' 말단에는 BamHI 제한효소 부위를 포함하고, 3' 말단에는 XbaI 제한효소 부위를 포함하고 있는 EGFP 유전자 755bp의 절편을 확보하였다. 확보된 DNA 절편에 BamHI과 XbaI 제한효소를 처리하고, pKV-Pald-pgsA-E7에서 BamHI과 XbaI으로 절단하여 HPV16 E7 유전자 부분을 제거한 후, EGFP 유전자와 절단한 벡터를 연결하여 pKV-Pald-pgsA-EGFP를 완성하였다.
- [0051] 그리고 pKV-Pald-pgsA-EGFP 벡터에서 알돌레이드 프로모터를 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터로 치환하기 위해 락토바실러스 카제이 genome에서 서열번호 5와 서열번호 6을 프라이머로 PCR을 수행하여 5' 말단에는 SphI 제한효소 부위를 포함하고, 3' 말단에는 XbaI 제한효소 부위를 포함하고 있는 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터 절편을 획득하였다. 확보된 DNA 절편에 SphI과 XbaI 제한효소를 처리하고, pKV-Pald-pgsA-EGFP도 동일한 제한효소로 절단하여 알돌레이즈 프로모터 부분을 제거한 후, 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터와 절단한 벡터를 연결하여 pKV-Pgm-pgsA-EGFP를 완성하였다.

- [0052] 서열번호 5: 5'-TACGGCATGCTTGAATTGGTTTCTTACGAT-3'
- [0053] 서열번호 6: 5'-TACGCTCGAGGTTGAATTACCTCCTAATAG-3'
- [0054] 최종적으로 pKV-Pald-pgsA-E7 벡터 E7 부위의 c-terminal에 Pgm-pgsA-EGFP를 삽입하기 위해 pKV-Pgm-pgsA-EGFP 벡터를 주형으로 서열번호 7와 서열번호 8을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행 하였다.
- [0055] 서열 번호 7: 5'-GCGCGAATTCTTGAATTGGTTTCTTACGA-3'
- [0056] 서열 번호 8: 5'-GCGCTGCGCATTACTTGTACAGCTCGTC-3'
- [0057] 그 결과, Pgm-pgsA-EGFP 유전자를 포함하고 있는 2608 bp의 절편을 확보하였으며, 상기 절편의 5' 말단에는 EcoR I 제한효소부위를 포함하고 있으며, 상기 절편의 3' 말단에는 Fsp I 제한효소 부위를 포함하고 있다. 상기 확보된 DNA 절편을 8563 bp 절편의 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7 표면발현 벡터의 EcoR I 및 Fsp I 제한효소부위를 이용하여 Pgm-pgsA-EGFP를 코딩하는 유전자를 삽입하여 1,1171 bp 절편의 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP를 완성하였다(도 1 및 도 2).
- [0058] **발명의 실시를 위한 형태**
- [0059] 본 발명은 미생물의 표면에 두 가지 외래단백질을 대량 발현 시킬 수 있는 표면 발현모체로서 바실러스 (*Bacillus subtilis* var. *Chungkookjang*) 속 균주 유래의 폴리감마글루탐산의 합성 복합체 유전자를 사용하고, 락토바실러스 카제이 (*Lactobacillus casei*) 유래의 알돌레이즈 (aldolase) 프로모터와 갈락토오스 뮤타로테이즈 (galactose mutarotase) 프로모터를 이용하여 두 가지 목적단백질을 미생물 표면에 동시에 발현 하는 표면발현벡터와, 이것으로 형질전환된 다양한 형질전환체에서 서로 다른 두 가지 외래단백질이 효율적으로 형질전환체의 표면에 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0060] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0061] 본 발명은 제1프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코드 하는 유전자 및 목적단백질을 코드 하는 유전자; 및 제2프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코드 하는 유전자 및 목적단백질을 코드 하는 유전자;를 포함하는 목적단백질의 표면발현벡터를 제공한다.
- [0062] 본 발명에 있어서 "프로모터"는, 전사를 이끌기에 충분한 최소한의 서열을 의미한다.
- [0063] 본 발명의 알돌레이즈(aldolase) 프로모터 또는 갈락토오스 뮤타로테이즈(galactose mutarotase) 프로모터는 각각 락토바실러스 카제이 (*Lactobacillus casei*)에 존재하는 알돌레이즈 유전자와 갈락토오스 뮤타로테이즈 유전자의 발현을 유도 하는 프로모터이다. 일반적으로 프로모터는 RNA 중합효소가 결합하여 전사개시를 유도하는 부분을 포함하며 프로모터의 염기서열에 따라 RNA 합성 정도가 결정되기 때문에 프로모터에 따라 유전자의 발현 강도가 다를 수 있다. 본 발명에서는 알돌레이즈 프로모터와 갈락토오스 뮤타로테이즈의 프로모터를 수득하기 위하여, PCR 방법으로 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)의 genome에서 증폭하고, 유전자 클로닝 기술을 이용하여 락토바실러스 카제이 유래 406 bp의 프로모터(서열번호 1) 및 607 bp의 프로모터(서열번호 2)를 분리하였다.
- [0064] 본 발명에 있어서 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 포함하는 유전자 작제물을 의미하는 것으로, 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 벡터는 세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않고 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있으며, 예컨대 플라스미드, 코즈미드, 파아지 입자, 바이러스 벡터일 수 있다.
- [0065] 상기 벡터는 추가적인 프로모터 등을 더 포함할 수 있으며, 상기 제1프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코드 하는 유전자 및 목적단백질을 코드 하는 유전자; 및 제2프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코드 하는 유전자 및 목적단백질을 코드 하는 유전자;의 작동을 방해하지 않고, 목적단백질의 표면발현에 도움이 될 수 있는 구성이면 어느 것이든 더 추가할 수 있다.
- [0066] 본 발명에 있어서 상기 "표면발현벡터"는, 발현시키고자 하는 목적단백질의 암호화 유전자가 작동 가능하게 연결될 경우, 적절한 숙주 세포에서 상기 목적단백질을 높은 효율로 발현시킬 수 있는 목적단백질의 발현 벡터로 사용될 수 있으며, 상기 표면발현벡터는 숙주 세포에서 발현 가능할 수 있다.

- [0067] 본 발명에 있어서 "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 표면발현백터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 제1프로모터는 서열번호 1로 표시될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 제2프로모터는 서열번호 2로 표시될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 상기 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열의 변이체 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 제1프로모터인 알돌레이즈 프로모터 및 제2프로모터인 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터 핵산분자는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, 제1프로모터인 알돌레이즈 프로모터 및 제2프로모터인 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 제1프로모터인 알돌레이즈 프로모터 및 제2프로모터인 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 상기 제1프로모터인 알돌레이즈 프로모터 및 제2프로모터인 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터는 각 서열번호 1 또는 2의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 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 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 겹)를 포함할 수 있다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 제1프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코드 하는 유전자 및 목적단백질을 코드 하는 유전자; 및 제2프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코드 하는 유전자 및 목적단백질을 코드 하는 유전자;는 연이어 배열되는 것으로, "하나의 백터 내"에 위치하는 각기 다른 두 가지 프로모터에 의한 목적단백질의 발현이 서로 독립적으로 이루어지도록 한다. 각각 독립적으로 작동하는 프로모터가 한 백터 내에 존재하므로 종래의 발명에 비하여 표면발현백터의 제조 단계를 효과적으로 생략함으로써 보다 효율적으로 목적단백질을 세포 표면에 발현 시킬 수 있다.
- [0072] 또한, 본 발명은 하나의 백터 내에 서로 다른 두 프로모터가 존재하므로 기존의 두 가지 목적단백질을 표면발현하기 위해 두 번의 형질전환 확립 과정에서 발생할 수 있는 세포 변형 가능성을 최소한으로 할 수 있다는 이점이 있다. 아울러 본 발명에 따른 세포표면발현은 두 개의 유전자 발현이 각각의 프로모터에 의해 독립적으로 발현되는 것으로 각기 다른 목적단백질의 발현을 독립적으로 확인할 수 있다는 이점이 있다.
- [0073] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 표면발현백터로 형질전환된 미생물을 제공하는데 목적이 있다. 바람직하게 상기 미생물은 유산균일 수 있으며, 보다 바람직하게는 프로바이오틱(probiotic)의 그람 양성균인 유산균을 의미한다. 일반적인 프로바이오틱 미생물의 선별기준에는 (i) 인간유래의 미생물일 것; (ii) 담즙, 산, 효소 및 산소에 안정적일 것; (iii) 장내 점막에 부착하는 능력이 있을 것; (iv) 소화기관 내에서 콜로니를 형성할 수 있는 능력이 있을 것; (v) 항박테리아성 물질을 생산할 수 있을 것; 및 (vi) 효능이나 안정성이 증명될 수 있을 것 등의 조건이 포함되어 있다. 상기 조건을 근거로 유산균은 인체 내에서의 생장이 친화적, 무해한 균이라는 것이 명백하다. 따라서, 유산균을 숙주로 하는 형질전환체를 인체에 적용시켜 질병의 예방 또는 치료를 위한 유전자 전달 또는 단백질 전달 등의 용도로 사용할 경우, 균주를 사용하는 통상의 백신제조 방법과는 달리 균주의 비독성화 또는 무독성화의 단계가 요구되지 않는다.
- [0074] 본 발명에서 상기 유산균은 락토바실러스 속, 스트렙토코커스 속 및 비피도박테리움 속을 포함할 수 있다. 대표적으로 락토바실러스 속은 락토바실러스 아시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 카제이(*L. casei*), 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*), 락토바실러스 페멘툼(*L. fermentum*), 락토바실러스 델브루에키(*L. delbrueckii*), 락토바실러스 존스니(*L. johnsonii* LJI), 락토바실러스 료터리(*L. reuteri*) 및 락토바실러스 불가리커스(*L. bulgaricus*); 스트렙토코커스 속은 스트렙토코커스 서모필러스(*S. thermophilus*); 비피도박테리움 속은 비피도박테리움 인판티스(*B. infantis*), 비피도박테리움 비피덤(*B. bifidum*), 비피도박테리움 롱검(*B. longum*), 비피도박테리움 슈도롱검(*B. pseudolongum*), 비피도박테리움 브레브(*B. breve*), 비피도박테리움 락티스 Bb-12(*B. lactis* Bb-12) 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*B. adolescentis*) 등을 숙주로 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 락토바실러스 속이다.

- [0075] 또한, 본 발명에서 형질전환에 사용된 미생물은 목적단백질의 세포 표면발현에 유리하도록, 발현된 목적단백질을 분해하는데 관련된 세포 내 또는 세포 외의 단백질 분해효소를 생산하지 못하도록 변형된 것임을 특징으로 하는 형질전환된 미생물을 포함한다.
- [0076] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 표면발현백터로 형질전환된 미생물을 배양하여 목적단백질을 세포표면에 발현하는 단계 및 목적단백질이 표면에 발현된 세포를 회수하는 단계를 포함하는 목적단백질의 세포표면 발현방법을 제공하는데 그 목적이 있다. 특히, 본 발명의 표면발현백터를 이용하여 외래단백질을 미생물의 표면에 발현시킴으로써 세포의 파쇄 또는 단백질의 분리정제 과정을 거치지 않고 효율적으로 목적단백질을 이용할 수 있는 목적단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0077] 또한, 본 발명에서 상기 "목적단백질" 또는 "외래 단백질"은 상기 단백질을 발현하는 형질전환된 숙주세포에서는 정상적으로는 존재할 수 없는 단백질을 의미한다. 예를 들면, 유산균에서 바이러스 유래 또는 종양 유래 단백질을 인위적으로 발현하도록 조작하였을 경우, 상기 단백질을 목적단백질이라 한다.
- [0078] 보다 구체적으로, 상기 목적단백질은 바람직하게는 감염성 미생물, 면역질환 유래 항원 또는 종양 유래의 항원, 예를 들면 진균성 병원체, 박테리아, 기생충, 장내 기생충(helminth), 바이러스 또는 알러지 유발물질 등을 포함할 수 있으며, 이에 한정된 것은 아니다. 보다 상세하게는, 상기 항원은 파상풍 독소이드(tetanus toxoid), 인플루엔자 바이러스의 헤마어글루티닌(hemagglutinin) 또는 핵단백질, 디프테리아 독소이드(diphtheria toxoid), HIV의 gp120 또는 그 단편, HIV의 gag 단백질, IgA 프로티나아제(protease), 인슐린 펩티드 B, 스폰고스포라 서브테라네(*Spongospora subterranea*) 항원, 비브리오즈(*Vibriose*) 항원, 살모넬라(*Salmonella*) 항원, 뉴모코쿠스 항원(*Pneumococcus*), RSV(Respiratory syncytial virus) 항원, 헤모필러스 인플루엔자(*Hemophilus influenza*) 외막 단백질, 스트렙토코쿠스 누모니아(*Streptococcus pneumoniae*) 항원, 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*)의 уре아제(urease), 네세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)의 필린(pilin), 네세리아 고노로에아(*N. gonorrhoeae*)의 필린(pilin), 멜라노마-관련 단백질(melanoma associated antigens: TRP2, MAGe-1, MAGe-3, gp100, 티로신아제, MART-1, HSP-70, beta-HCG), HPV-16, -18, -31, --35, 또는 -45에서 유래하는 E1, E2, E6 및 E7을 포함하는 인간파필로마바이러스(Human papilloma virus)의 항원, CEA 종양항원, 정상 또는 변이된 ras 단백질, 정상 또는 변이된 p53, Muc1, pSA 등을 포함하며, 또한, 콜레라, 디프테리아, 헤모필러스(Haemophilus), A형 간염, B형 간염, 인플루엔자, 홍역, 뇌염, 이하선염, 백일해, 수두, 폐렴(pneumococcal pneumonia), 소아마비, 공수병, 루벨라(rubella), 파상풍, 결핵, 애디슨병(Addison's disease), 면역반응 유발물질(immunogen), 알레르기 유발 물질(allergen), 고형 종양 및 혈액종양을 포함하는 암, 후천성 면역결핍증, 신장, 심장, 이차, 폐 뼈, 간 등의 이식 거부 시 관여하는 인자 등에서 유래하는 당업계에 알려진 항원 및 자가면역을 유발하는 항원 등을 포함할 수 있다.
- [0079] 따라서, 본 발명의 표면 발현 방법으로 생산된 목적단백질을 다양한 용도에 제공할 수 있다. 본 용도에는 항체 및 효소의 효과적인 생산이 있으며, 이외에도 항원, 부착 또는 흡착 단백질 및 새로운 생리 활성 물질을 스크리닝하기 위한 펩티드라이브러리의 생산 등이 포함된다.
- [0080] 또 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 상기 미생물 표면발현용 백터에 목적단백질을 코드 하는 유전자를 삽입하여 재조합 백터를 제조하는 단계; (b) 상기 재조합 백터로 그람 음성 또는 그람 양성 숙주세포를 형질전환하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 목적단백질을 숙주세포 표면에 발현하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 그람 음성 또는 그람 양성 숙주세포의 표면에 목적단백질을 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0081] 구체적으로 본 발명은 락토바실러스 카제이 (*Lactobacillus casei*) 유래의 알돌레이즈 (aldolase) 프로모터와 갈락토오스 뮤타로테이즈 (galactose mutarotase) 프로모터를 이용하여 두 가지 목적단백질을 미생물 표면에 동시에 발현 하는 표면발현백터 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP를 제공한다.
- [0082] 특히 일 실시예에 따르면, 락토바실러스 카제이 유래의 알돌레이즈 프로모터와 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터를 이용하였으나, 락토바실러스 카제이 유래의 알돌레이즈 프로모터와 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터 유전자의 염기서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 타 균주 유래의 알돌레이즈 프로모터와 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터 유전자를 사용하여 백터를 제조하거나 외래 단백질을 표면발현시키는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.
- [0083] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 단백질이 효율적으로 유산균 표면에 발현되는지 알아보기 위하여 HPV 유래의 단백질인 E7 및 향상된 녹색형광단백질(enhanced Green fluorescent protein, EGFP)을 모델 단백질로 선택하여 확인하였다.

- [0084] 상기 "HPV16E7" 은 암을 일으키는 발암성(oncogenic) HPV type16의 유전자로서 E7 단백질은 모두 HPV를 매개로 한 세포의 불멸화 및 세포 형질 전환에 관계한다. E7 단백질은 직접 Rb 단백질과 결합하여 과-인산화를 유도하며 이러한 HPV 유래의 단백질인 E7은 오로지 HPV에 감염된 암만을 죽일 수 있는 특정 타겟으로 HPV에 의해 유도된 암 치료에서 약물 표적으로 활용되고 있다. 또한, 상기 "EGFP(enhanced green fluorescent protein)"는 생체 내에서 녹색 빛을 내 해당 단백질을 발현하는 세포를 쉽게 관찰하게 해주는 유전자로, 형광 현미경으로 관찰이 가능한 이점이 있다. GFP는 jellyfish(*Aequorea Victoria*)에서 기원한 초록 형광 단백질로써 여러 연구분야에서 유전자 발현의 중요한 마커로 이용되고 있다. EGFP는 GFP의 돌연변이체로써 본래 GFP의 64번째 페닐알라닌(Phenylalanine) 아미노산 서열이 류신(Leucine)으로, 65번째에 위치되어 있는 세린(Serine) 아미노산 서열은 트레오닌(Threonine)으로 교체함으로써 본래의 GFP보다 더 강한 형광신호를 발광하는 장점이 있다.
- [0085] 본 발명자들은 상기 제작된 표면발현백터에 HPV16E7 및 EGFP 유전자를 삽입하여 표면발현백터를 제작하고, 이를 이용하여 락토바실러스 카제이를 형질변환시킨 다음, 배양하여 발현을 유도하고, 배양액을 일정량 채취하여 단백질을 수득하였다. 수득한 상기 단백질을 SDS-PAGE로 분석하고, 항-EGFP 및 항 HPV16E7 항체를 이용하여 웨스턴 블로팅(western blotting)을 수행한 결과, 상기 제작된 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP 표면발현백터에 단백질 HPV16E7 및 EGFP가 성공적으로 삽입되어 세포표면에 동시 발현되었음을 확인하였다.
- [0086] 상기 실시예에서는 HPV16E7 및 EGFP 단백질을 외래 단백질로 사용하였으나, 기타 다른 효소, 항원, 항체, 부착 단백질 또는 흡착단백질 등 어떠한 단백질도 외래 단백질이 될 수 있을 것이다.
- [0087] 또한, 본 발명의 표면발현백터에 의하여 발현되는 두 가지 서로 다른 목적단백질은 균체 표면에 발현되며, 따라서 본 발명의 형질전환된 미생물은 백신(vaccine)으로 사용할 수 있다.
- [0088] 본 발명은, 또 다른 관점에서, 상기 표면 발현백터로 형질전환된 유산균을 이용하는 것을 특징으로 하는 미생물 백신의 제조방법에 관한 것이다.
- [0089] 백신은 질병에 대한 예방의 목적으로 생유기물을 사용하여 면역 시스템을 자극하는데 사용되는 약제이다. 면역 활성화는 유기체 내에서 항체 생성, T-림프구의 자극, 또는 다른 면역세포(예: 대식세포)를 자극하여 항원을 효율적으로 제거하기 위한 과정을 의미한다. 상기에 대한 자세한 면역학의 개관은 당업계의 통상의 기술을 가진 자들은 쉽게 이해된다(Barrett, J. T., Textbook of Immunology, 1983).
- [0090] 항원으로서의 목적단백질을 발현하는 형질전환된 미생물 백신의 투여대상은 포유동물일 수 있으며, 보다 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0091] 상기 백신 조성물의 제법은 표준 기법을 사용하여 실시할 수 있으며, 투여자에게 적합한 투여량은 유전자 생성물의 항원성에 따라 변하며 존재하는 백신의 전형적인 면역 반응을 유도하기에 충분한 양이면 되며 일상적 실험 과정을 거쳐 필요량을 쉽게 판단할 수 있다. 전형적인 초기의 백신 용량은 체중kg당 항원 0.001 내지 1mg이며, 바람직한 수준의 보호를 제공하기에 필요에 따라 양을 증가하거나 다중 용량을 사용한다. 상기의 양은 당해 기술분야에 속하는 전문가에 의해 결정될 수 있고, 제제화 방법, 투여 방식, 투여자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해서도 다양하게 처방될 수 있다.
- [0092] 백신이 항체를 생성함에 있어 효과적이기 위해서는, 항원성 물질이 백신 처리된 대상의 항체-생성 기전이 실현될 수 있도록 체내로 방출되어야 한다. 따라서 면역반응을 위해서는 유전자 산물의 미생물 운반체가 체내에 우선 도입되어야 한다. 본 발명의 형질전환체에서 제시되는 항원에 의한 바람직한 반응을 자극하기 위해서는, 정맥주사, 근육주사, 피하주사 등과 같은 투여방법이 가능하지만, 경구 투여, 위 삽입에 의해 또는 분무체 형태로 장 또는 폐로 직접 투여함이 바람직하다.
- [0093] 백신 조성물을 투여자에게 경구 투여하기 위해서는 친액성 형태, 예를 들면 캡슐 형태로 제공되는 것이 유용하다. 상기 캡슐은 Eudragate S, Eudragate L, 셀룰로오스 아세테이트, 셀룰로오스 프탈레이트 또는 히드록시 프로필메틸 셀룰로오스를 포함하는 장용피복으로 제공된다. 상기 캡슐류는 그 자체로 사용하거나 투여하기 전에 현탁액과 같이 친액성 물질을 제조성하여 사용할 수도 있다. 제조성은 형질전환된 미생물의 생존에 적합한 pH의 완충액에서 수행하는 것이 효과적이다. 위산으로부터 상기 형질전환된 미생물 및 백신을 보호하기 위하여 매회 백신 투여 이전에 중탄산나트륨 제제를 투여하는 것이 유용할 수 있다. 선택적으로 백신은 비경구투여, 비내투여 또는 유선내 투여용으로 제조될 수 있다.
- [0094] 본 발명의 프로모터를 포함하며 항원으로서 작용할 수 있는 목적단백질을 발현하는 유전자를 함유하고 있는 형

질전환된 유산균은 소화기관 내 점막에서 콜로니를 형성하면서 목적하는 효능이 얻어질 수 있도록 하며, 상기의 유산균이 목적하는 형질 전환성질을 유지하며, 원활한 콜로니 형성을 위해 배터 내 선택 항생물질을 동시에 투여할 수 있으며, 상기의 수단으로써 형질전환체가 분열하는 과정에서 파생될 수 있는 배터를 가지지 않은 목적하지 않는 유산균의 발생을 제어할 수 있다. 상기의 선별방법은 당업계의 통상의 기술로 용이하게 수행될 수 있으며, 상기 과정에서 사용될 수 있는 선택항생물질은 발현배터 내 포함되어 있는 항생물질 유전자에 따라 달라질 수 있다.

- [0095] 또한, 본 발명은 하기 실시예 4에서 제조된 표면발현 배터(pKV-Pald-PgsA-EGFP)를 사용해서 유산균 숙주에서 보다 안정적으로 높은 발현율을 나타낼 수 있도록 PgsA의 유전자를 단편으로 하는 개량을 실시하였다.
- [0096] 먼저, PgsA 단편 중 1-60 a.a, 1-70 a.a, 1-80 a.a, 1-100 a.a, 1-188 a.a를 포함하는 PgsA 단편을 확보하기 위하여, 표면발현 배터 (pKV-Pald-PgsA-EGFP)을 주형으로 서열번호 11 내지 20의 프라이머를 사용해서 PCR을 수행하여 수득하였다.
- [0097] 그 결과, 알돌레이즈 프로모터를 포함하며, 각각의 PgsA motif 단편을 포함하는 DNA 절편을 확보 하였으며, 상기 절편의 5' 말단에는 SphI 제한효소를 포함하고 있으며, 상기 절편의 3' 말단에는 BamHI 제한효소 부위를 포함하고 있다. 확보된 DNA 절편에 SphI과 BamHI을 처리하여 절편을 확보하였다. 또한, 각각의 PgsA1 내지 A5 motif 단편이 서열번호 21 내지 25의 염기서열을 갖는 것을 확인하였다.
- [0098] 한편, PgsA 단편 중 25-60 a.a, 25-70 a.a, 25-100 a.a를 포함하는 PgsA 단편을 확보하기 위하여, 표면발현 배터 (pKV-Pald-PgsA-EGFP)을 주형으로 서열번호 26 내지 31의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 수득하였다.
- [0099] 그 결과, 각각의 PgsA motif 단편을 포함하는 DNA 절편을 확보 하였으며, 상기 절편의 5' 말단에는 EcoRV 제한효소를 포함하고 있으며, 상기 절편의 3' 말단에는 BamHI 제한효소 부위를 포함하고 있다. 확보된 DNA 절편에 EcoRV와 BamHI을 처리하여 절편을 확보하였다. 또한, 각각의 PgsA motif 단편이 서열번호 32 내지 34의 염기서열을 갖는 것을 확인하였다.
- [0100] 본 발명은 미생물의 표면에 외래단백질을 대량 발현 시킬 수 있는 새로운 표면 발현모체로서 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질을 선택하고, 이를 이용하여 외래단백질이나 펩타이드를 미생물 표면에 발현 시킬 수 있는 표면발현배터를 제조하고, 이것으로 형질전환된 다양한 형질전환체에서 외래단백질이 효율적으로 형질전환체의 표면에 발현시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0101] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 이루는 유전자 pgsA를 포함하는 미생물 표면발현배터 및 상기 배터에 의해 형질전환된 균주를 제공한다.
- [0102] 본 발명은 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 상기 미생물 표면발현배터를 이용하여 외래 단백질을 형질전환 균주의 표면에 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0103] 유전자 pgsA가 코딩하는 단백질은 바실러스 속에 존재하는 세포외막 단백질로서 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis* IF03336; *나토포균*; *Biochem. Biophys. Research Comm.*, 263, 6-12, 1999), 바실러스 리체니포미스(*Bacillus licheniformis* ATCC9945; *Biotech. Bioeng.* 57(4), 430-437, 1998), 바실러스 안쓰라시스(*Bacillus anthracis*; *J. Bacteriology*, 171, 722-730, 1989) 등으로부터 생산되는 식용, 수용성, 음이온성, 생분해성 고분자물질인 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 단백질이다.
- [0104] *나토포균*(*Bacillus subtilis* IF03336)의 경우, 세균으로부터 분리된 세포외막 단백질은 총 922개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 pgsB, pgsC 및 pgsA로 이루어져 있으며, pgsB는 393 아미노산으로, pgsC는 149 아미노산으로 그리고 pgsA는 380 아미노산으로 구성이 되어 있다. 아시우찌(Ashiuchi) 등은 바실러스 *나토포균* 유래의 폴리감마글루탐산의 합성 유전자획 클로닝하고 대장균에 형질전환하여 대장균에서의 폴리감마글루탐산의 합성을 관찰한 바 있다[Ashiuchi et al., *Biochem. Biophys. Res. Communications*, 263: 6-12 (1999)].
- [0105] 그러나 상기 폴리감마글루탐산 합성효소 복합체를 이루는 단백질 pgsA의 구체적인 역할 및 기능은 아직 밝혀지지 않았다. 다만, 복합체 구성 단백질 중 pgsB는 아마이드 리게이스계로서 pgsB의 N-말단의 특이 아미노산이 세포막 혹은 세포벽과 상호작용을 하고, pgsA의 경우 N-말단과 C-말단에 친수성의 특이 아미노산 서열을 갖고 있어서, pgsB의 도움과 더불어 이들 아미노산 서열이 세포내막을 통과할 수 있는 분비신호 와 표적 및 부착신호를 갖고 있는 것으로 추측된다.
- [0106] 본 발명자들의 연구결과, 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질은 그의 아미노산 일차 서열 구조와 특성상 외래단백질을 세포 표면에 발현시키는 표면발현 모체로서 많은 장점이 있음이 밝혀졌다: 첫째, 폴

리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질은 폴리감마글루탐산의 합성 및 세포외로의 분비를 위해서 세포 표면에 다량 발현될 수 있고, 둘째, 발현된 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질은 세포 주기상 휴지기에서도 안정하게 유지되며, 셋째, 구조적으로 특히 pgsA의 경우 세포 표면에 돌출되어 있으며, 넷째로는 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질은 그 기원이 그람양성 세균의 표면으로 다양한 그람양성 세균 뿐만이 아니라 그람음성 세균의 표면에서 안정되게 발현될 수 있다는 점등의 장점이 있다.

- [0107] 본 발명은 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 특성을 이용하여 외래단백질을 세균의 표면에 발현할 수 있는 유용한 벡터를 제공하는데 그 목적이 있다. 특히, 본 발명의 목적단백질의 표면발현벡터는 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 일차 서열상에 갖고 있는 분비신호와 표적신호를 포함한다.
- [0108] 또한, 본 발명은 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 특성을 이용한 표면발현벡터를 사용하여 외래단백질을 미생물의 표면에 발현시키는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다. 특히, 본 발명은 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질을 이용하여 외래단백질을 미생물의 표면에 발현시킴으로 세포의 파쇄 또는 단백질의 분리정제 과정을 거치지 않고 효율적으로 외래단백질을 이용할 수 있는 외래단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0109] 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질을 포함한 모든 종류의 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 유전자를 이용한 표면발현벡터는 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0110] 또한 본 발명의 폴리감마글루탐산의 합성 유전자를 이용한 표면발현벡터는 외래단백질을 미생물의 표면에 발현하기 위해 모든 균주에 적용할 수 있고, 바람직하게는 그람음성 세균, 더욱 바람직하게는 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피리움, 비브리모 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 그리고 그람양성 세균, 바람직하게는 바실러스, 락토바실러스, 락토코커스, 스테필로코커스, 리스테리아 모노사이토제네스, 스트렙토코커스 균주 등에 적용할 수 있다. 상기 균주를 이용한 모든 외래단백질의 제조방법은 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0111] 필요에 따라 폴리감마글루탐산의 합성 유전자의 N-말단 혹은 C-말단에 모든 또는 일부 제한 효소의 다양한 인식 부위를 삽입할 수 있고, 이들 제한효소 부위가 삽입된 표면발현벡터는 모두 본 발명의 범위에 포함된다.
- [0112] 구체적으로 본 발명은 바실러스 속 균주에서 유래한 폴리감마글루탐산 합성 유전자인 pgsA를 포함하고, pgsA의 C-말단에 제한효소 인식부위를 삽입하여 다양한 외래단백질 유전자를 손쉽게 클로닝할 수 있는 표면발현벡터 pKV-Pald-pgsA1 내지 pKV-Pald-pgsA8를 제공한다.
- [0113] 본 발명은 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 복합체중 세포외막 단백질의 복합체인 pgsA로 구성되어 pgsA의 C-말단에 EGFP 단백질의 N-말단을 연결하여, EGFP 단백질을 융합단백질 형태로 그람양성균의 표면에 발현할 수 있는 표면발현벡터 pKV-Pald-pgsA1 내지 pKV-Pald-pgsA8을 제공한다.
- [0114] 특히 일 실시예에 따르면, 바실러스 서브틸리스 청국장(*Bacillus subtilis* var. *chungkookjang*, KCTC 0697BP)로부터 폴리감마글루탐산 합성에 관여하는 세포외막 단백질의 유전자 pgsA를 획득하였으나, 유전자는 폴리감마글루탐산을 생산하는 모든 바실러스 속 균주로부터 pgsA를 획득하여 벡터를 제조하거나 외래 단백질을 표면발현시키는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다. 예컨대, 바실러스 서브틸리스 청국장에 존재하는 pgsA 유전자의 염기서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 타 균주 유래의 pgsA 유전자를 사용하여 벡터를 제조하거나 외래 단백질을 표면발현시키는 것도 본 발명의 범위에 포함될 것이다.
- [0115] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 단백질이 효율적으로 대장균 세포표면에 발현되는지 알아보기 위하여 향상된 녹색형광단백질(enhanced Green fluorescent protein, EGFP)을 모델 단백질로 선택하여 확인하였다. "EGFP(enhanced green fluorescent protein) 유전자"는 생체 내에서 녹색 빛을 내 해당 단백질을 발현하는 세포를 쉽게 관찰하게 해주는 유전자로, 형광 현미경으로 관찰이 가능한 이점이 있다. GFP는 jellyfish(*Aequorea Victoria*)에서 기원한 초록 형광 단백질로써 여러 연구분야에서 유전자 발현의 중요한 마커로 이용되고 있다. EGFP는 GFP의 돌연변이체로써 본래 GFP의 64번째 페닐알라닌(Phenylalanine) 아미노산 서열이 류신(Leucine)으로, 65번째에 위치되어 있는 세린(Serine) 아미노산 서열은 트레오닌(Threonine)으로 교체함으로써 본래의 GFP보다 더 강한 형광신호를 발광하는 장점이 있다.
- [0116] 본 발명자들은 상기 제작된 pKV-Pald-pgsA1 내지 pKV-Pald-pgsA8 재조합 벡터에 EGFP 유전자를 삽입하여 표면발현벡터를 제작하고, 이를 이용하여 락토바실러스 카제이를 형질변환시킨 다음, 배양하여 발현을 유도하고, 배양액을 일정량 채취하여 단백질을 수득하였다. 수득한 상기 단백질을 SDS-PAGE로 분석하고, 항-EGFP 항체를 이용하여 웨스턴 블로팅(western blotting)을 수행한 결과, 상기 제작된 pKV-Pald-pgsA1 내지 pKV-Pald-pgsA8 재조

합 박테리에 단백질 EGFP가 성공적으로 삽입되어 세포표면에 발현되었음을 확인하였다.

- [0117] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0118] 또한, 하기 실시예에서는 EGFP 단백질을 외래 단백질로 사용하였으나, 기타 다른 효소, 항원, 항체, 부착단백질 또는 흡착단백질 등 어떠한 단백질도 외래 단백질이 될 수 있을 것이다.
- [0119] 또한, 하기 실시예에서는 그람양성균에 적용되는 표면발현박터를 제조하고, 숙주세포로 락토바실러스 카제이를 사용하였으나, 락토바실러스 카제이 이외의 여하한 그람양성균을 숙주세포로 활용할 수 있을 것이며, 그람양성균 이외에 여하한 그람음성균 및 그 밖의 세균들로 형질전환시키는 것도 당업자에게는 자명할 것이다.
- [0120] 실시예 1: 이중 항원 동시 표면발현박터 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP의 구축
- [0121] 상기 이중 항원 동시 표면발현박터를 제조하기 위하여 pKV-Pald-pgsA-E7(pKV-Pald-pgsA380L-HPV16E7, 대한민국 등록특허 10-1471043 참조)에서 제조된 표면발현 박터를 사용하여 Pald-pgsA-HPV16E7의 C-terminal에 Pgm-pgsA-EGFP를 코딩하는 유전자를 삽입시켜 유산균에서 두 가지 목적단백질을 동시 표면 발현할 수 있는 박터 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP를 확보하였다.
- [0122] 먼저, EGFP 발현 박터를 제조하기 위하여 pKV-Pald-PgsA-E7 (대한민국 등록특허 제10-1471043호 참조)에서 pgsA와 융합된 HPV16 E7 유전자를 제거하고 EGFP를 코딩하는 유전자를 삽입하였다.
- [0123] 합성 EGFP 유전자 단편을 주형으로 서열번호 3과 서열번호 4을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행하였다.
- [0124] 서열번호 3: 5'-TGGTGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG-3'
- [0125] 서열번호 4: 5'-TGA CTCTAGAACTAGTGTGACGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3'
- [0126] 그 결과, 5' 말단에는 BamHI 제한효소 부위를 포함하고, 3' 말단에는 XbaI 제한효소 부위를 포함하고 있는 EGFP 유전자 755bp의 절편을 확보하였다. 확보된 DNA 절편에 BamHI과 XbaI 제한효소를 처리하고, pKV-Pald-pgsA-E7에서 BamHI과 XbaI으로 절단하여 HPV16 E7 유전자 부분을 제거한 후, EGFP 유전자와 절단한 박터를 연결하여 pKV-Pald-pgsA-EGFP를 완성하였다.
- [0127] 그리고 pKV-Pald-pgsA-EGFP 박터에서 알돌레이드 프로모터를 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터로 치환하기 위해 락토바실러스 카제이 genome에서 서열번호 5와 서열번호 6을 프라이머로 PCR을 수행하여 5' 말단에는 SphI 제한효소 부위를 포함하고, 3' 말단에는 XbaI 제한효소 부위를 포함하고 있는 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터 절편을 수득하였다. 확보된 DNA 절편에 SphI과 XbaI 제한효소를 처리하고, pKV-Pald-pgsA-EGFP도 동일한 제한효소로 절단하여 알돌레이즈 프로모터 부분을 제거한 후, 갈락토오스 뮤타로테이즈 프로모터와 절단한 박터를 연결하여 pKV-Pgm-pgsA-EGFP를 완성하였다.
- [0128] 서열번호 5: 5'-TACGGCATGCTTGAATTGGTTTCTTACGAT-3'
- [0129] 서열번호 6: 5'-TACGCTCGAGGTTGAATTACCTCCTAATAG-3'
- [0130] 최종적으로 pKV-Pald-pgsA-E7 박터 E7 부위의 c-terminal에 Pgm-pgsA-EGFP를 삽입하기 위해 pKV-Pgm-pgsA-EGFP 박터를 주형으로 서열번호 7와 서열번호 8을 프라이머로 사용하여 PCR을 수행 하였다.
- [0131] 서열 번호 7: 5'-GCGCGAATTCTTGAATTGGTTTCTTACGA-3'
- [0132] 서열 번호 8: 5'-GCGCTGCGCATTACTTGTACAGCTCGTC-3'
- [0133] 그 결과, Pgm-pgsA-EGFP 유전자를 포함하고 있는 2608 bp의 절편을 확보하였으며, 상기 절편의 5' 말단에는 EcoR I 제한효소부위를 포함하고 있으며, 상기 절편의 3' 말단에는 Fsp I 제한효소 부위를 포함하고 있다. 상기 확보된 DNA 절편을 8563 bp 절편의 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7 표면발현 박터의 EcoR I 및 Fsp I 제한효소부위를 이용하여 Pgm-pgsA-EGFP를 코딩하는 유전자를 삽입하여 1,1171 bp 절편의 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP를 완성하였다(도 1 및 도 2).
- [0134] 실시예 2: 웨스턴 블로팅을 통한 두 가지 목적단백질의 발현 확인
- [0135] 본 실시예에서는 실시예 1에서 제작된 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP 표면발현박터로 락토바실러스 카제이를 형질전환 시키고, 상기 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이를 배양하여 HPV16E7 및 EGFP 단백질의 발

현을 확인하였다. 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이에서 HPV16E7 및 EGFP 단백질의 발현 여부를 웨스턴 블러팅을 이용하여 조사하였다.

- [0136] 본원발명의 표면발현벡터로 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이를 MRS배지 (Lactobacillus MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA), 30℃에서 정치배양하여 HPV16E7 및 EGFP 단백질의 표면발현을 유도하였다.
- [0137] 상기 배양된 락토바실러스 카제이의 전세포를 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 pgsA, HPV16E7, EGFP 각각에 대한 특이 항체를 이용한 웨스턴 블러팅을 수행하여 상기 융합단백질의 발현을 확인하였다.
- [0138] 구체적으로 발현이 유도된 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이 전세포를 동일한 세포농도에서 얻은 단백질로 디네이처(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 Tris-HCl, 5 % 스킵 밀크(skim milk), pH 8.0)에서 1시간 동안 블로킹 시킨 다음, pgsA, HPV16E7 및 EGFP 각각에 대한 토끼 유래의 폴리클론 1차 항체를 블로킹 완충용액에 1000배 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 HRP (Horseradish Peroxidase)가 접합된 토끼 유래 항체에 대한 2차 항체를 블로킹 완충용액에 10000배 희석하여 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 멤브레인은 완충용액으로 세척하고 세척된 멤브레인에 기질(Lumigen PS-3 acridan, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 첨가하여 약 2분간 발색 시키고 CCD 카메라로 pgsA, HPV16E7, EGFP 각각에 대한 특이 항체와 상기 융합단백질간의 특이적인 결합을 확인하였다 (도 3).
- [0139] 도 3은 본원발명의 세포표면발현벡터로 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이 전세포에서 pgsA, HPV16 E7, EGFP의 발현양을 확인하기위한 웨스턴 블러팅 수행결과를 나타낸 것이다. 각각 Lane SM은 Protein size marker, Lane 1은 *Lactobacillus casei* (empty vector), Lane 2는 *Lactobacillus casei* (pKV-Pald-pgsA), Lane 3은 *Lactobacillus casei* (pKV-Pald-pgsA-HPV16E7), Lane 4는 *Lactobacillus casei* (pKV-Pgm-pgsA-EGFP), Lane 5는 *Lactobacillus casei* (pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP)의 발현을 나타낸다.
- [0140] 목적단백질의 단일 표면발현벡터 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7(Lane 3) 및 pKV-Pgm-pgsA-EGFP(Lane 4)와 대비하여 본원발명의 pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP(Lane 5) 표면발현벡터에서 두 가지의 목적단백질이 효과적으로 동시 발현하는 것을 확인하였다. 이는 서로 상이한 두 가지 프로모터가 각 독립적으로 표면발현벡터 내에서 서로 간섭하지 아니하고 목적단백질을 안정적으로 동시 발현 시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0141] 실시예 3: Confocal 형광 현미경을 이용한 두 목적단백질의 미생물 표면 발현 확인
- [0142] 본원발명의 표면발현벡터의 발현정도를 확인하기 위해 형광이미지를 공초점 현미경(Confocal microscopy, Carl Zeiss LSM800)을 통해 관찰하였다.
- [0143] 본원발명의 표면발현벡터(pKV-Pald-pgsA-HPV16E7\_Pgm-pgsA-EGFP)로 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이를 MRS배지 (Lactobacillus MRS, Becton Dickinson and Company Sparks, USA), 30℃에서 정치배양하여 HPV16E7 및 EGFP 단백질의 표면발현을 유도하였다. 그리고 각각의 특이 항체로 binding 시킨 후 HPV16 E7은 Alexa594 (red), EGFP는 Alexa488 (green)로 각각 immunostaining 하여 공초점 현미경으로 각 항원의 세포 표면발현을 확인 하였다.
- [0144] 그 결과, 도 4에 도시된 바와 같이, 본원발명의 표면발현벡터로 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이에서 안정적으로 두 가지 색의 형광이 동시에 발현되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0145] 따라서, 본원발명의 표면발현벡터는 유산균에 형질전환을 통해 통상의 백신제조 방법과는 달리 균주의 비독성화 또는 무독성화의 단계가 요구되지 않는 각기 다른 두 가지 목적단백질을 동시에 보다 짧은 시간 동안 효율적으로 발현하는 방법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.
- [0146] 실시예 4 : 표면발현벡터 pKV-Pald-pgsA-EGFP의 제조
- [0147] 상기 EGFP 발현 벡터를 제조하기 위하여 pKV-Pald-PgsA-E7 (대한민국 등록특허 제10-1471043호 참조)에서 제조된 표면발현 벡터를 사용해서 PgsA의 C-terminal에 EGFP 단백질을 코딩하는 유전자를 삽입시켜서 유산균에서 표면발현할 수 있는 벡터 pKV-Pald-PgsA-EGFP를 확보하였다.
- [0148] 먼저, pKV-Pald-PgsA-E7 벡터에서 pgsA와 융합된 HPV16 E7 유전자를 제거하고 EGFP를 코딩하는 유전자를 삽입하였다. 합성 EGFP 유전자 단편을 주형으로 서열번호 1과 서열번호 2을 프라이머로 사용해서 PCR을 수행하여 수득

하였다.

- [0149] 서열번호 9: 5' TGGTGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG 3'
- [0150] 서열번호 10: 5' TGA CTCTAGAACTAGTGTGACGGTACCTTACTTGTACAGCTCGTCC 3'
- [0151] 그 결과, EGFP 유전자를 포함하고 있는 755bp의 절편을 확보하였으며, 상기 절편의 5'말단에는 BamHI 제한효소 부위를 포함하고 있으며, 상기절편의 3'말단에는 XbaI 제한효소 부위를 포함하고 있다. 확보된 DNA 절편에 BamHI과 XbaI 제한효소를 처리하여 절단하여 741bp 절편을 확보하였다.
- [0152] pKV-Pald-PgsA-E7를 BamHI과 XbaI으로 절단하여 HPV16 E7 유전자 부분을 제거하고 벡터부분을 확보하였다.
- [0153] BamHI과 XbaI으로 절단한 E7 유전자를 함유하고 있는 DNA 단편을 같은 제한효소로 절단한 벡터와 연결하여 pKV-Pald-PgsA-EGFP을 완성하였다 (도 5).
- [0154] 실시예 5: 표면발현벡터 PgsA motif 개량
- [0155] 본 실시예에서는 실시예 4에서 제조된 표면발현 벡터(pKV-Pald-PgsA-EGFP)를 사용해서 유산균 숙주에서 보다 안정적으로 높은 발현율을 나타낼 수 있도록 PgsA의 유전자를 단편으로 하는 개량을 실시하였다.
- [0156] 먼저, PgsA 단편 중 1-60 a.a, 1-70 a.a, 1-80 a.a, 1-100 a.a, 1-188 a.a를 포함하는 PgsA 단편을 확보하기 위하여, 표면발현 벡터 (pKV-Pald-PgsA-EGFP)을 주형으로 아래의 프라이머를 사용해서 PCR을 수행하여 수득하였다.
- [0157] PgsA motif 1-60 a.a
- [0158] 서열번호 11:
- [0159] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT 3'
- [0160] 서열번호 12: 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGTACGTCGTCAGAATACGTT 3'
- [0161] PgsA motif 1-70 a.a
- [0162] 서열번호 13:
- [0163] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT3'
- [0164] 서열번호 14:
- [0165] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGTACGTCGTCAGAATACGTT 3'
- [0166] PgsA motif 1-80 a.a
- [0167] 서열번호 15:
- [0168] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT3'
- [0169] 서열번호 16:
- [0170] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGTACGTCGTCAGAATACGTT 3'
- [0171] PgsA motif 1-100 a.a
- [0172] 서열번호 17:
- [0173] 5' TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT3'
- [0174] 서열번호 18:
- [0175] 5'TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGTACGTCGTCAGAATACGTT 3'
- [0176] PgsA motif 1-188 a.a
- [0177] 서열번호 19
- [0178] :5 TCGAGCATGCAATACCCACTTATTGCGATTTGCT 3'

- [0179] 서열번호 20:
- [0180] 5' TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGACTTTCTGGTACGAAATTTCTTT 3'
- [0181] 그 결과, 알돌레이즈 프로모터를 포함하며, 각각의 PgsA motif 단편을 포함하는 DNA 절편을 확보 하였으며, 상기 절편의 5' 말단에는 SphI 제한효소를 포함하고 있으며, 상기 절편의 3' 말단에는 BamHI 제한효소 부위를 포함하고 있다. 확보된 DNA 절편에 SphI과 BamHI을 처리하여 절편을 확보하였다. 또한, 각각의 PgsA1 내지 A5 motif 단편이 아래와 같은 염기서열을 갖는 것을 확인하였다.
- [0182] PgsA 1-60 a.a 단편서열(PgsA1)
- [0183] 서열번호 21:
- [0184] 5' ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAACAGCAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTT TTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGACTCTCA 3'
- [0185] PgsA 1-70 a.a 단편서열(PgsA2)
- [0186] 서열번호 22:
- [0187] 5' ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAACAGCAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTT TTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGACTCTCAGCCTCATTGTAGGCGATATTA TGATGGGA 3'
- [0188] PgsA 1-80 a.a 단편서열(PgsA3)
- [0189] 서열번호 23:
- [0190] 5' ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAACAGCAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTT TTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGACTCTCAGCCTCATTGTAGGCGATATTA TGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAA 3'
- [0191] PgsA 1-100 a.a 단편서열(PgsA4)
- [0192] 서열번호 24:
- [0193] 5' ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAACAGCAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTT TTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGACTCTCAGCCTCATTGTAGGCGATATTA TGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAAAGGGGCAGACAGTATTTTCAATATGTTGAACCGATCTTTAGAGCCTCGGATTATGTAGCA 3'
- [0194] PgsA 1-188 a.a 단편서열(PgsA5)
- [0195] 서열번호 25:
- [0196] 5' ATGAAAAAAGAACTGAGCTTTCATGAAAAGCTGCTAAAGCTGACAAAACAGCAAAAAAGAAAACCAATAAGCACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTT TTGTCCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCGAAGGTCAAAACGTATTCTGACGACGACTCTCAGCCTCATTGTAGGCGATATTA TGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAAAGGGGCAGACAGTATTTTCAATATGTTGAACCGATCTTTAGAGCCTCGGATTATGTAGCAGGAA ACTTTGAAAACCCGGTAACCTATCAAAAAGATTATAACAAGCAGATAAAGAGATTCATCTGCAGACGAATAAGGAATCAGTGAAAGTCTTGAAGGATATGA ATTTACGGTTCTCAACAGCGCAACAACACGCAATGGATTACGGCGTTCAGGGCATGAAAGATACGCTTGGAGAATTTGCGAAGCAAAACCTTGATATCG TTGGAGCGGGATACAGCTTAAGTGATGCGAAAAAGAAAATTTCTGACCAGAAAGTC 3'
- [0197] 상기 pKV-Pald-PgsA-EGFP를 SphI과 BamHI으로 절단하여 알돌레이즈 프로모터와 PgsA 유전자 부분을 제거한 벡터 부분을 확보하였다.
- [0198] SphI과 BamHI으로 절단한 알돌레이즈 프로모터를 포함하며, 각각의 PgsA motif 단편 유전자를 함유하고 있는 DNA 단편을 같은 제한효소로 절단한 벡터와 연결하여 개량된 벡터를 완성하였다(도 6 내지 도 10).
- [0199] 한편, PgsA 단편 중 25-60 a.a, 25-70 a.a, 25-100 a.a를 포함하는 PgsA 단편을 확보하기 위하여, 표면발현 벡터 (pKV-Pald-PgsA-EGFP)을 주형으로 아래의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 수득하였다.
- [0200] PgsA motif 25-60 a.a
- [0201] 서열번호 26:

- [0202] 5' CGCTGGATATCTACATGCACGTATTTATTGCCATTCCG 3'
- [0203] 서열번호 27:
- [0204] 5' TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCTGAGAGTACGTCGTCAGAATACGTT 3'
- [0205] PgsA motif 25-70 a.a
- [0206] 서열번호 28:
- [0207] 5' CGCTGGATATCTACATGCACGTATTTATTGCCATTCCG 3'
- [0208] 서열번호 29:
- [0209] 5' TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCTCCCATCATAATATCGCCTACAAAT 3'
- [0210] PgsA motif 25-100 a.a
- [0211] 서열번호 30:
- [0212] 5' CGCTGGATATCTACATGCACGTATTTATTGCCATTCCG 3'
- [0213] 서열번호 31:
- [0214] 5' TACGGGATCCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCAGAACCACCTGCTACATAATCCGAGGCTCTAAAG 3'
- [0215] 그 결과, 각각의 PgsA motif 단편을 포함하는 DNA 절편을 확보 하였으며, 상기 절편의 5' 말단에는 EcoRV 제한 효소를 포함하고 있으며, 상기 절편의 3' 말단에는 BamHI 제한효소 부위를 포함하고 있다. 확보된 DNA 절편에 EcoRV와 BamHI을 처리하여 절편을 확보하였다. 또한, 각각의 PgsA motif 단편이 아래와 같은 염기서열을 갖는 것을 확인하였다.
- [0216] PgsA 25-60 a.a 단편서열(PgsA6)
- [0217] 서열번호 32:
- [0218] 5' CACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTTTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCAAGGTCAAACGTATTCTGACGAGC TACTCTCA 3'
- [0219] PgsA 25-70 a.a 단편서열(PgsA7)
- [0220] 서열번호 33:
- [0221] 5' CACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTTTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCAAGGTCAAACGTATTCTGACGAGC TACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATTATGATGGGA 3
- [0222] PgsA 25-100 a.a 단편서열(PgsA8)
- [0223] 서열번호 34:
- [0224] 5' CACGTATTTATTGCCATTCCGATCGTTTTTGTCTTATGTTTCGCTTTCATGTGGCGGGAAAAGCGGAAACGCCAAGGTCAAACGTATTCTGACGAGC TACTCTCAGCCTCATTTGTAGGCGATATTATGATGGGACGCTATGTTGAAAAAGTAACGGAGCAAAAAGGGGCAGACAGTATTTTTCAATATGTTGAACCGA TCTTTAGAGCCTCGATTATGTAGCA 3'
- [0225] pKV-Pald-PgsA-EGFP를 EcoRV와 BamHI으로 절단하여 PgsA 유전자 부분을 제거한 벡터부분을 확보하였다.
- [0226] EcoRV와 BamHI으로 절단한 각각의 PgsA motif 단편 유전자를 함유하고 있는 DNA 단편을 같은 제한효소로 절단한 벡터와 연결하여 개량된 벡터를 완성하였다(도 11 내지 도 13).
- [0227] 실시예 6: PgsA motif 개량 표면발현벡터 형질전환체의 발현 확인
- [0228] 본 실시예에서는 실시예 2에서 제작된 PgsA motif 개량 표면발현벡터로 락토바실러스 카제이를 형질전환 시키고, 상기 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이를 배양하여 EGFP 단백질의 발현을 확인하였다. 형질전환 된 재조합 락토바실러스 카제이에서 개량된 단편 pgsA1 내지 A8 중 어느 하나와 융합된 EGFP 단백질의 발현 여 부를 조사하였다.
- [0229] PgsA motif 단편 표면발현벡터로 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이를 MRS배지 (Lactobacillus MRS,

Becton Dickinson and Company Sparks, USA), 30°C에서 정치배양하여 폴리감마글루탐산을 합성하는 유전자 단편 pgsA1 내지 A8 중 어느 하나의 C-말단과 융합된 EGFP 단백질의 표면발현을 유도하였다.

[0230] 상기 배양된 락토바실러스 카제이의 전세포를 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 및 EGFP에 대한 특이 항체를 이용한 웨스턴블롯팅을 수행하여 상기 융합단백질의 발현을 확인하였다.

[0231] 구체적으로 발현이 유도된 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이 전세포를 동일한 세포농도에서 얻은 단백질로 디네이처(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 % 스킵 밀크(skim milk), pH 8.0)에서 1시간 동안 흔들어 블로킹시킨 다음, EGFP에 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, H202)을 첨가하여 약 2분간 발색시키고 CCD 카메라로 EGFP에 대한 특이 항체와 상기 융합단백질간의 특이적인 결합을 확인하였다 (도 14).

[0232] 도 14은 본원발명과 비교하여 대조군으로 설정된 개량되지 않은 pgsA가 삽입된 pKV-Pald-pgsA 재조합 발현벡터에 따른 락토바실러스 카제이에서의 발현양상(lane 6 및 11) 및 본원발명에 따른 개량된 pgsA1 내지 A8가 삽입된 pKV-Pald-pgsA1 내지 A8 재조합 발현벡터에 따른 락토바실러스 카제이에서의 발현양상(lane 1 내지 5 및 lane 7 내지 10)을 나타낸다.

[0233] 구체적으로, 도 14의 lane 1은 PgsA motif 1-60 a.a에 EGFP를 발현시킨 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이이고, lane 2은 PgsA motif 1-70 a.a, lane 3은 PgsA motif 1-80 a.a, lane 4는 PgsA motif 1-100 a.a에 EGFP를 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이의 발현이다. lane 5는 PgsA motif 1-188 a.a에 EGFP가 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이의 단백질 발현을 나타낸다. lane 6은 pKV-Pald-PgsA-EGFP가 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이의 단백질 발현을 나타낸다.

[0234] 또한, 도 14의 lane 7은 PgsA motif 25-60 a.a에 EGFP를 발현시킨 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이이고, lane 8은 PgsA motif 25-70 a.a, lane 9는 PgsA motif 25-100 a.a에 EGFP를 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이의 발현이다. lane 10는 PgsA motif 1-188 a.a에 EGFP가 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이의 단백질 발현을 나타낸다. lane 11은 pKV-Pald-PgsA-EGFP가 형질전환된 재조합 락토바실러스 카제이의 단백질 발현을 나타낸다.

[0235] 개량되지 아니한 pKV-Pald-pgsA-EGFP 표면발현벡터에 의한 EGFP 융합단백질의 발현과 비교하면 개량된 PgsA motif 단편을 포함하는 EGFP 융합 단백질이 더 강하게 발현됨을 확인하였다.

**산업상 이용가능성**

[0236] 본 발명은 락토바실러스 카제이 (*Lactobacillus casei*) 유래의 알돌레이즈 (aldolase) 프로모터와 갈락토오스 뮤타로테이스 (galactose mutarotase) 프로모터를 이용하여 두 가지 목적단백질을 미생물 표면에 동시에 발현하는 벡터와 이러한 벡터로 형질전환된 미생물 및 바실러스 속 균주 유래의 폴리감마글루탐산의 합성에 관여하는 세포외막 단백질(pgsA)을 이용하여 외래 단백질을 미생물의 표면에 효과적으로 발현시키는 새로운 벡터에 관한 것으로, 본 발명에 따른 표면발현벡터는 하나의 벡터 안에 서로 다른 두 개의 프로모터, 표면발현을 위한 폴리감마글루탐산 합성효소복합체를 코드 하는 유전자 및 상기 폴리감마글루탐산 합성효소복합체 유전자와 연결되는 목적단백질을 코드 하는 유전자가 존재하므로 종래의 발명들에 비하여 하나의 벡터로 두 가지 목적단백질을 동시에 발현할 수 있으며 동시에, 상기 표면발현벡터로 형질전환된 미생물을 이용하기 때문에 두 번의 형질전환 과정에서 발생할 수 있는 변형 가능성을 최소화할 수 있다는 이점이 있고, 아울러 본 발명은 하나의 벡터 내에 서로 다른 두 프로모터가 존재하며 종래의 발명들에 비하여 보다 짧은 시간 동안 효율적으로 목적단백질을 발현할 수 있고 이를 이용하여 약제 가능성이 높은 물질을 조기에 선별하고 하나의 표면발현벡터로 두 가지 목적단백질을 발현함으로써 약제 개발비용을 획기적으로 감소시키는 효과가 우수한 점에서 산업상 이용가능성이 인정될 수 있다고 할 것이다.

**서열목록 자유텍스트**

[0238] 서열목록 1

5` ccattgcaata cccacttatt gcgatttctg tttctattag ttagcatttt aaattgtgaa acgtgccact tataaacaata tttccgtctt  
ctttttatga gagtaatctc atttaacttt gactaaatat cggattgctg tcacacaact accagtttca aacaaatttc aatttgatgg  
tcatttttta ttttgcggc aaaaagtgag caaatcagta gcattttccc tgattacggg gtacattcaa agtgactttg cgtacacaca  
gacatatgta tgacgggtgt tataaaaagc cgtcacgctg ctcgagtagc tctcatcatt tctcgcctt tttctcccgc aacatatgat  
aaaatacaac ggttgtgaat tgtttatttc ctaggaggat atctac 3`

서열목록 2

5` aattcagcaa gccgaatac aatgtttctg ttttgaagct tgaagttcca gttgatcaaa agtttgttga aggctacacc gatgacggcg  
ttaccctgt ttacagcaag gaagaagccg ctaagtatta caaggaacag tcagatgcaa cggatctccc attcatcttc ctgtccgctg  
gtgtcaccaa cgaattgttc cttgaagaac tcaagtttgc taagcaagca ggttcagcct ttaatggtgt tctctgtggc cgtgcaactt  
ggaagccggg tgtaaagcca tatgtctgctg aaggcgaagc tgctggttaag aagtggctgc agaccgaagg caaggctaac attgatcgtt  
tgaacaaggt gcttgcagaa actgcaacc cttggactga caaagttgaa ggttaacttt taacatagt tgcaagaaag gaccgattat  
gatgatcggg tcttttttta tgactgcgga catgtttttg tgaccactgc aaacatcaaa atgaagtctg aaaaacttgc taacaatcat  
tacaggtcag tgatccagtg gtagactggg attgaatgcg ttttctgcta ttaggagga attcaac 3`

서열목록 3

5` tgggtgatcc gtgagcaagg gcgaggagct g 3`

서열목록 4

5` tgactctaga actagtgtcg acggtacctt acttgtacag ctcgtcc 3`

서열목록 5

5` tacggcatgc ttgaattggt ttcttacgat 3`

서열목록 6

5` tacgctcgag gttgaattac ctccaatag 3`

서열목록 7

5` gcgcaattc ttgaattggt ttcttacga 3`

서열목록 8

5` gcgctgcgca ttacttgtac agctcgtc 3`

서열목록 9

5` tgggtgatcc gtgagcaagg gcgaggagct g 3`

서열목록 10

5` tgactctaga actagtgtcg acggtacctt acttgtacag ctcgtcc 3`

서열목록 11

5` tcgagcatgc aataccact tattgcgatt tgct 3`

서열목록 12

5` tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gagagtacgt cgtcagaata cgtt 3`

서열목록 13

5` tcgagcatgc aataccact tattgcgatt tgct 3`

서열목록 14

5` tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct cccatcataa tatcgcttac aaat 3`

서열목록 15

5` tcgagcatgc aataccact tattgcgatt tgct 3`

서열목록 16

5` tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct tttgctccg ttactttttc aaca 3`

서열목록 17

5` tcgagcatgc aatacccaact tattgcgatt tgct 3`

서열목록 18

5` tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gctacataat ccgaggctct aaag 3`

서열목록 19

5` tcgagcatgc aatacccaact tattgcgatt tgct 3`

서열목록 20

5` tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccaccg actttctggt acgaaatfff cttt 3`

서열목록 21

5` atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcgttt ttgtccttat gttcgtttc atgtgggcgg gaaaagcggg aacgccgaag gtcaaacgt attctgacga cgtactctca 3`

서열목록 22

5` atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcgttt ttgtccttat gttcgtttc atgtgggcgg gaaaagcggg aacgccgaag gtcaaacgt attctgacga cgtactctca gcctcatttg taggcgatat tatgatggga 3`

서열목록 23

5` atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcgttt ttgtccttat gttcgtttc atgtgggcgg gaaaagcggg aacgccgaag gtcaaacgt attctgacga cgtactctca gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa 3`

서열목록 24

5` atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcgttt ttgtccttat gttcgtttc atgtgggcgg gaaaagcggg aacgccgaag gtcaaacgt attctgacga cgtactctca gcctcatttg taggcgatal tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa ggggcagaca gtatttttca atatgtttaa ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca 3`

서열목록 25

5` atgaaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcgttt ttgtccttat gttcgtttc atgtgggcgg gaaaagcggg aacgccgaag gtcaaacgt attctgacga cgtactctca gcctcatttg taggcgatal tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa ggggcagaca gtatttttca atatgtttaa ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca ggaaactttg aaaaccgggt aacctatcaa aagaattata aacaagcaga taaagagatt catctgcaga cgaataagga atcagtgaaa gtcttgaagg atatgaattt cacggttctc aacagcgcca acaaccacgc aatggattac ggcgttcagg gcatgaaaga tacgcttggg gaatttgcga agcaaacct tgatatcggt ggagcgggat acagcttaag tgatgcgaaa aagaaaatff cgtaccagaa agtc 3`

서열번호 26

5` cgctgggat ctacatgcac gtatttattg ccattccg 3`

서열번호 27

5` tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gagagtacgt cgtcagaata cgtt 3`

서열번호 28

5` cgctgggat ctacatgcac gtatttattg ccattccg 3`

서열번호 29

5` tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct cccatcataa tategcctac aaat 3`

서열번호 30

5` cgctggatat ctacatgcac gtatttattg ccattccg 3`

서열번호 31

5` tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gctacataat cggaggctct aaag 3`

서열번호 32

5` cacgtattta ttgccattcc gatcgTTTTT gtccttatgt tcgctttcat gtgggcggga aaagcggaaa cgccgaaggt caaacgtat  
tctgacgacg tactctca 3`

서열번호 33

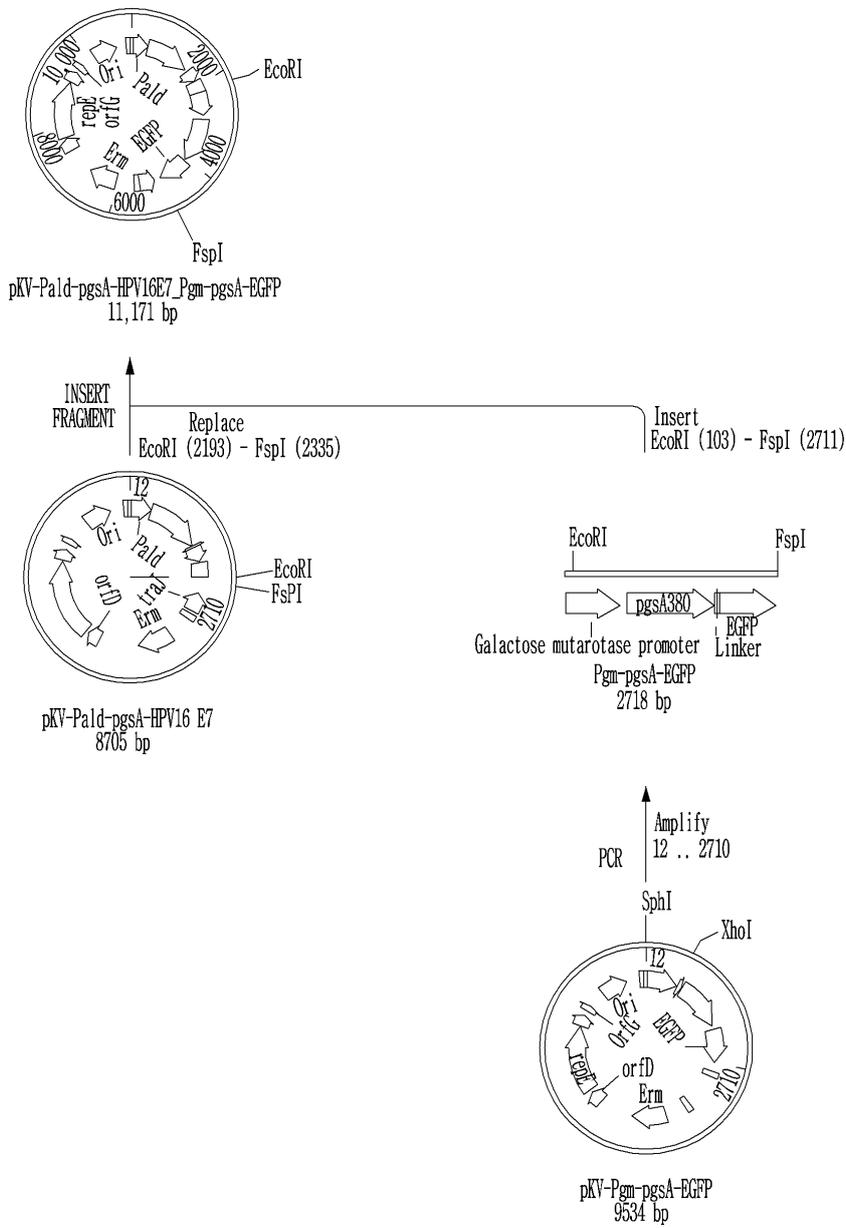
5` cacgtattta ttgccattcc gatcgTTTTT gtccttatgt tcgctttcat gtgggcggga aaagcggaaa cgccgaaggt caaacgtat  
tctgacgacg tactctcagc ctcatttgta ggcgatatta tgatggga 3`

서열번호 34

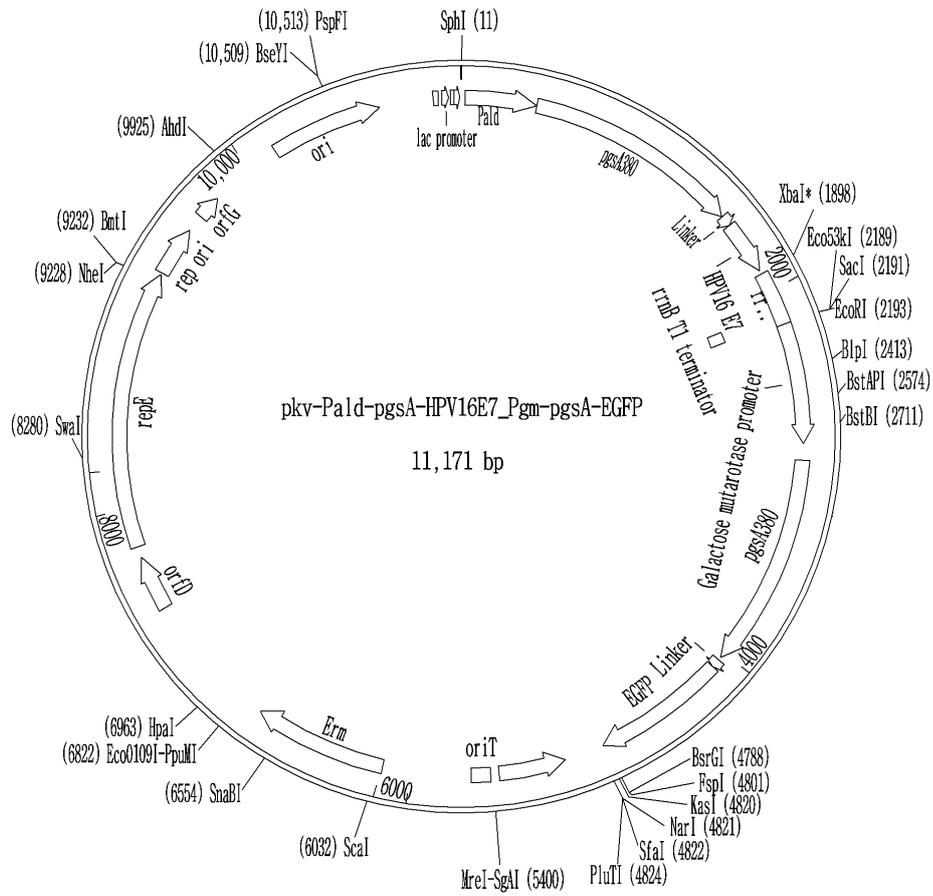
5` cacgtattta ttgccattcc gatcgTTTTT gtccttatgt tcgctttcat gtgggcggga aaagcggaaa cgccgaaggt caaacgtat  
tctgacgacg tactctcagc ctcatttgta ggcgatatta tgatgggacg ctatgttgaa aaagtaacgg agcaaaaagg ggcagacagt  
atTTTTcaat atgttgaacc gatctttaga gcctcggatt atgtagca 3`

도면

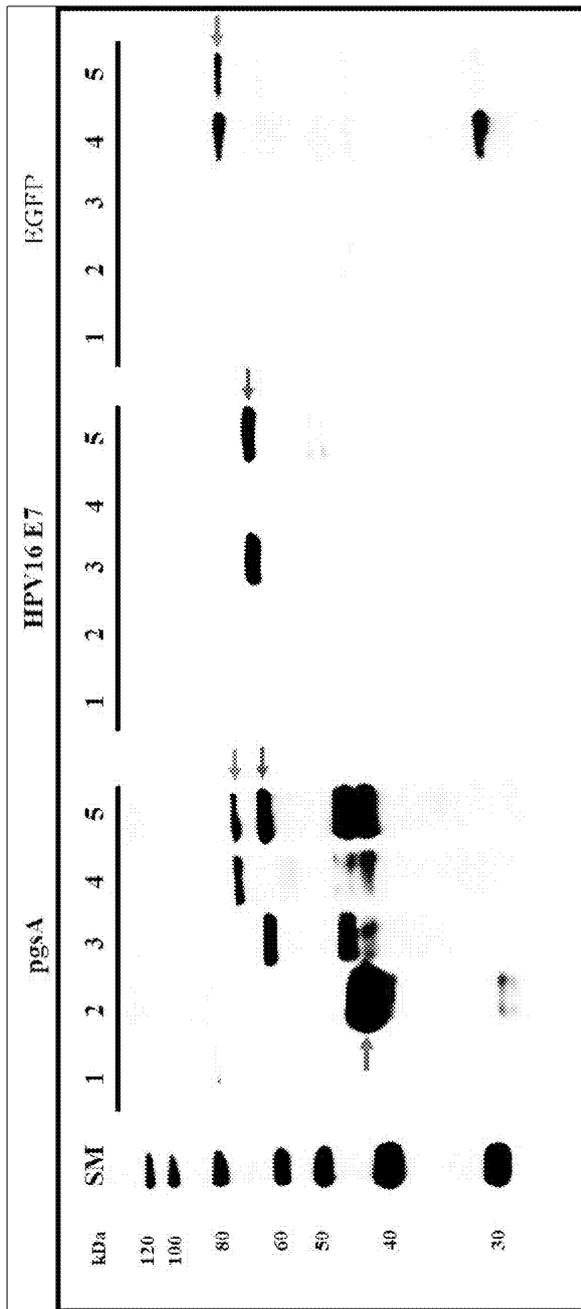
도면1



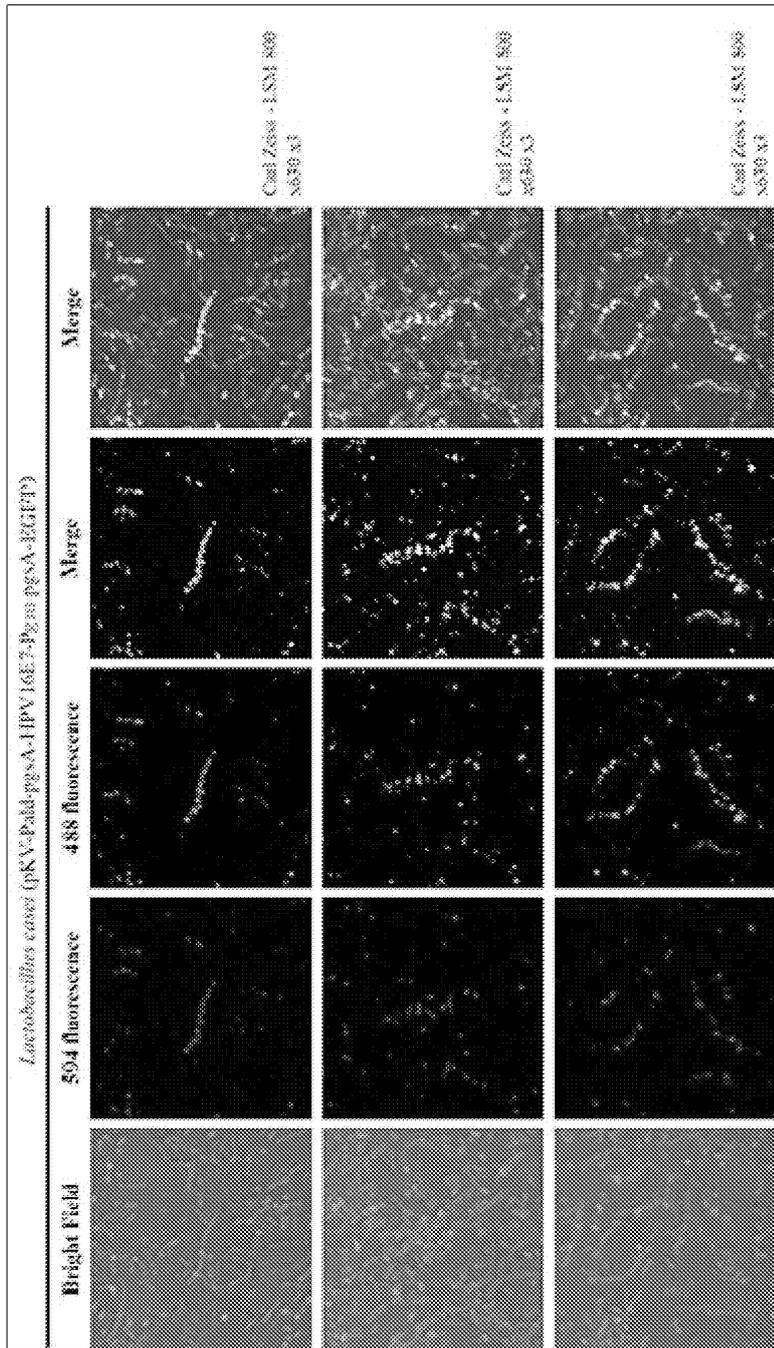
도면2



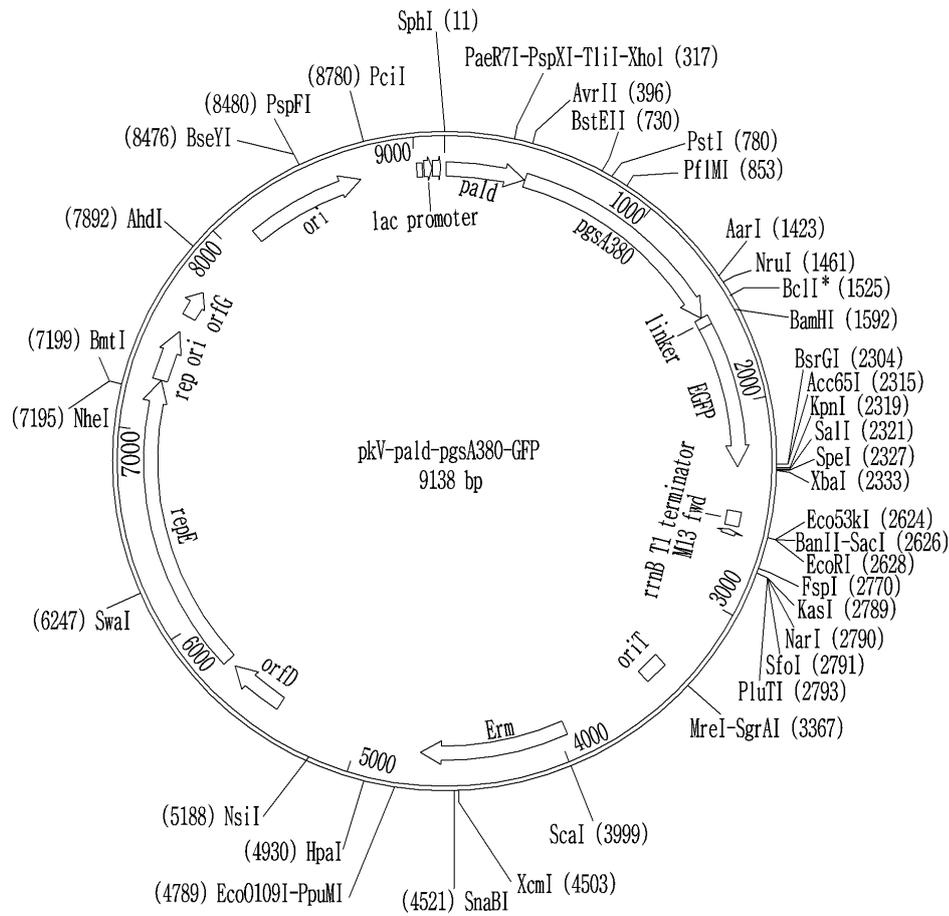
도면3



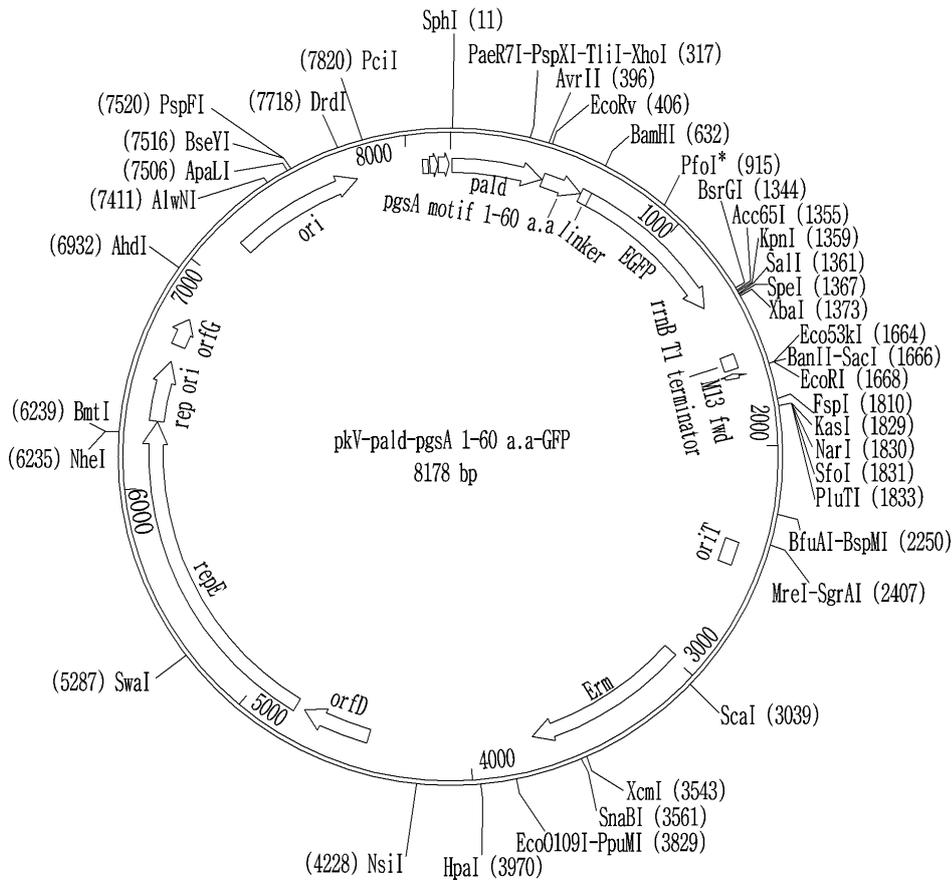
도면4



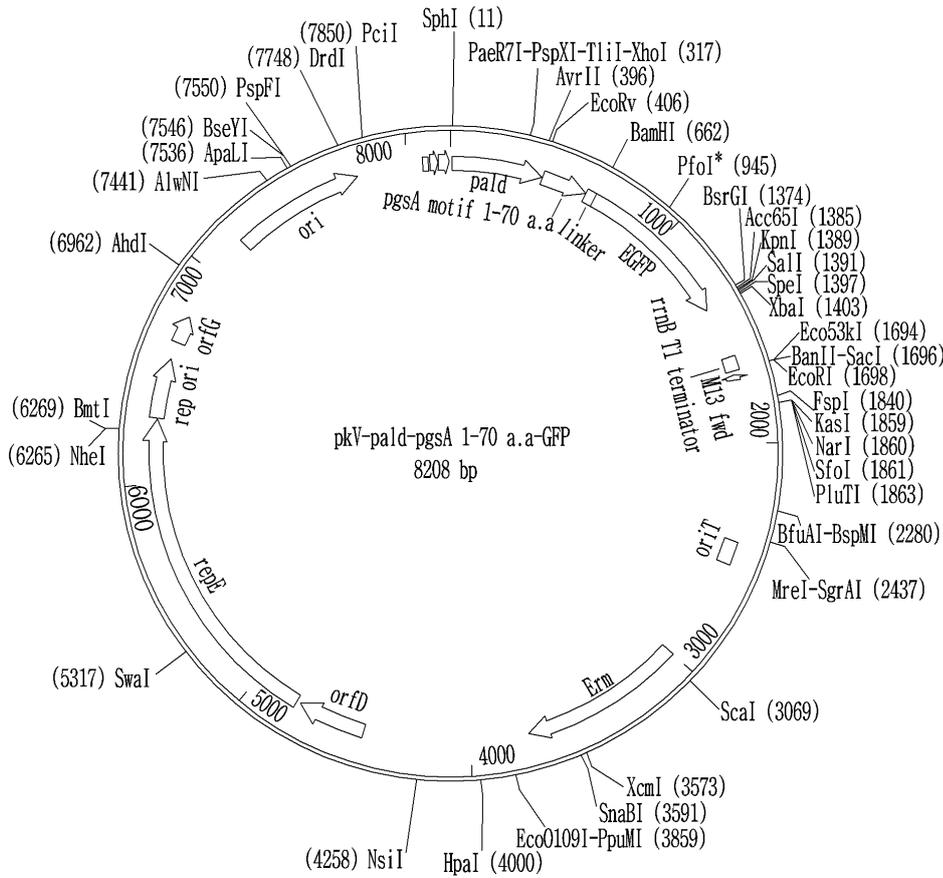
도면5



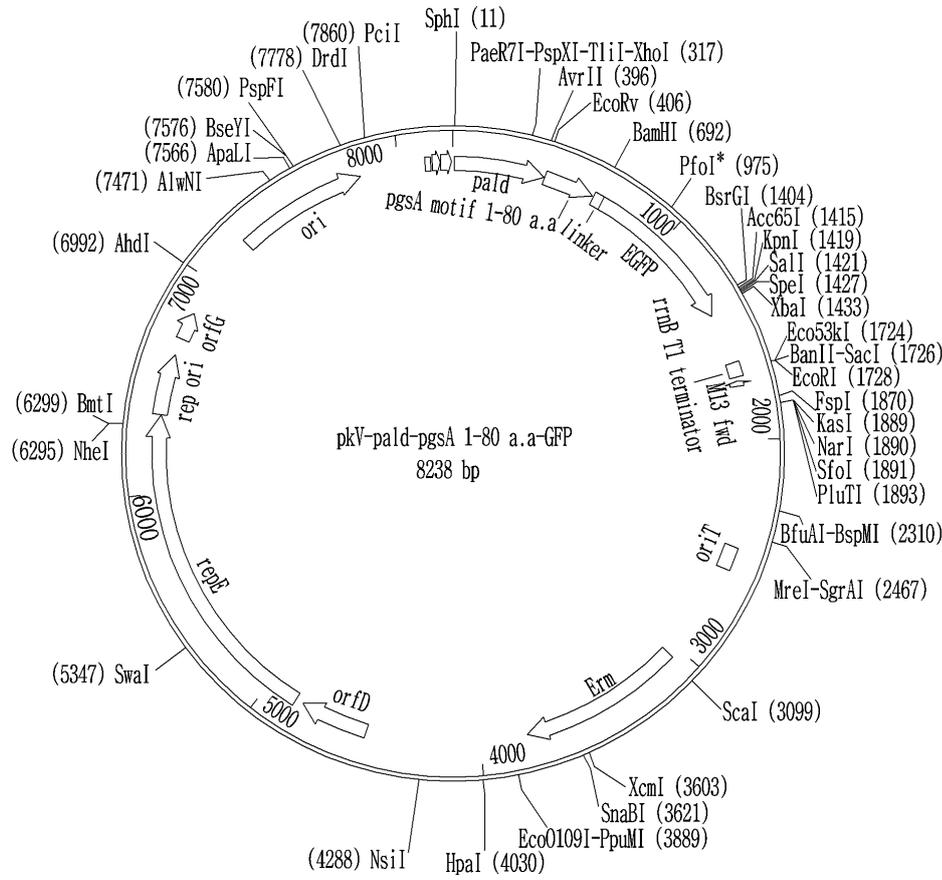
도면6



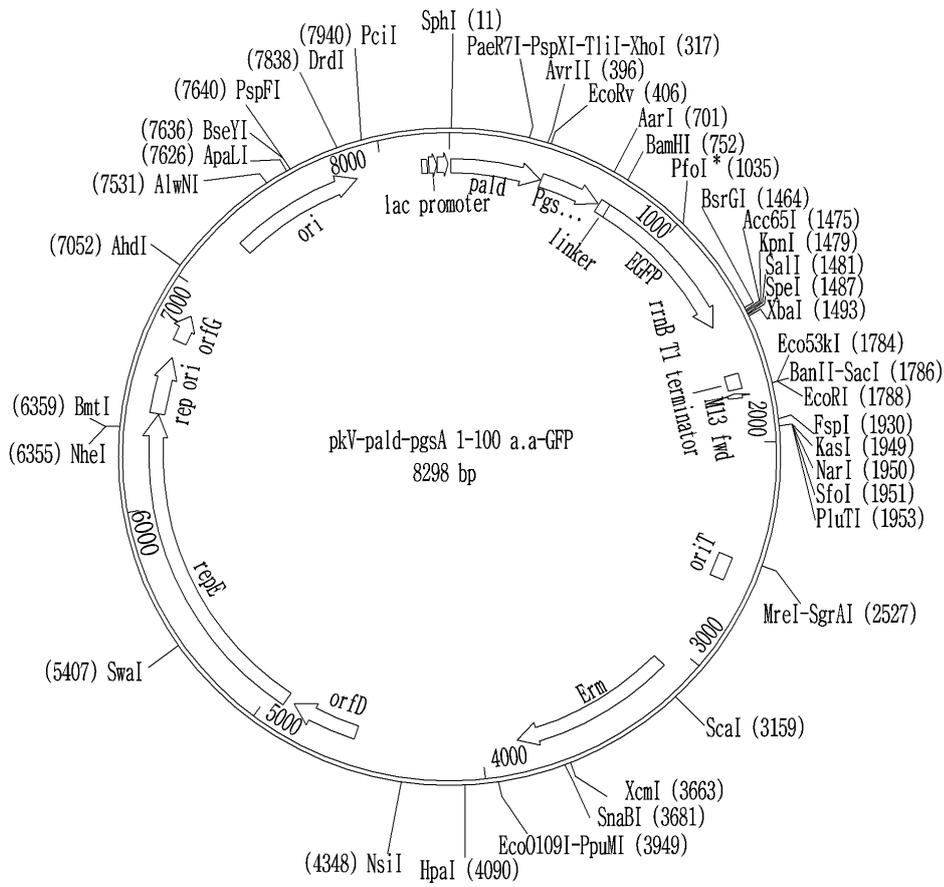
도면7



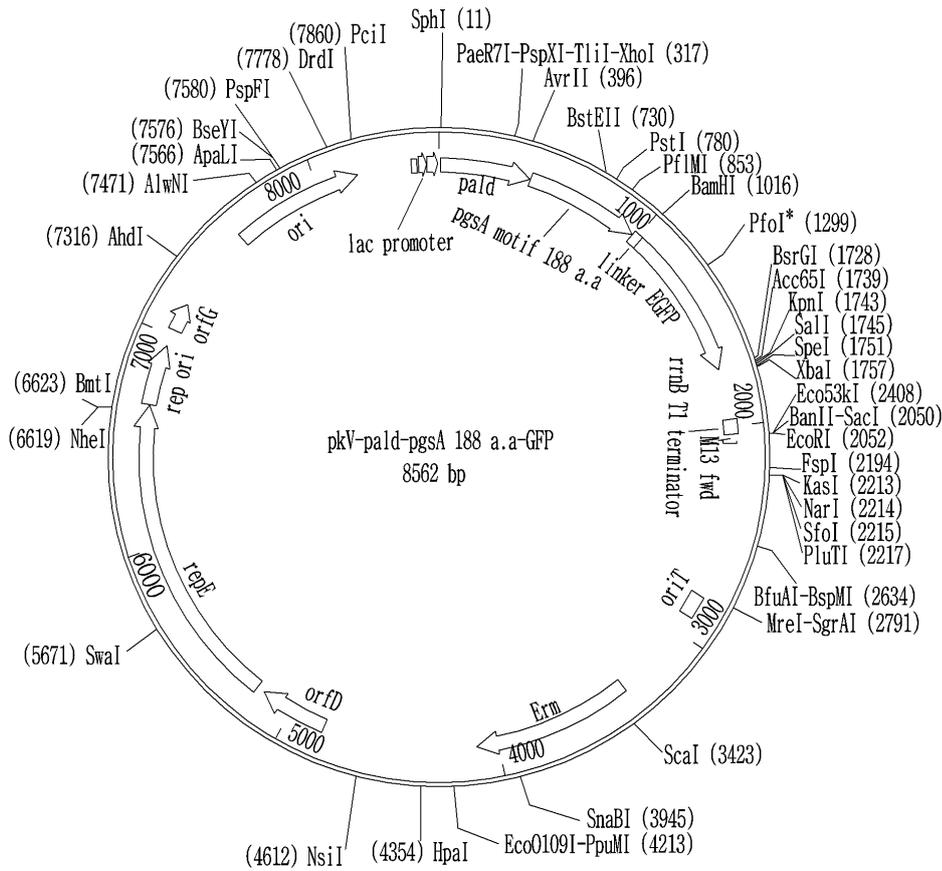
도면8



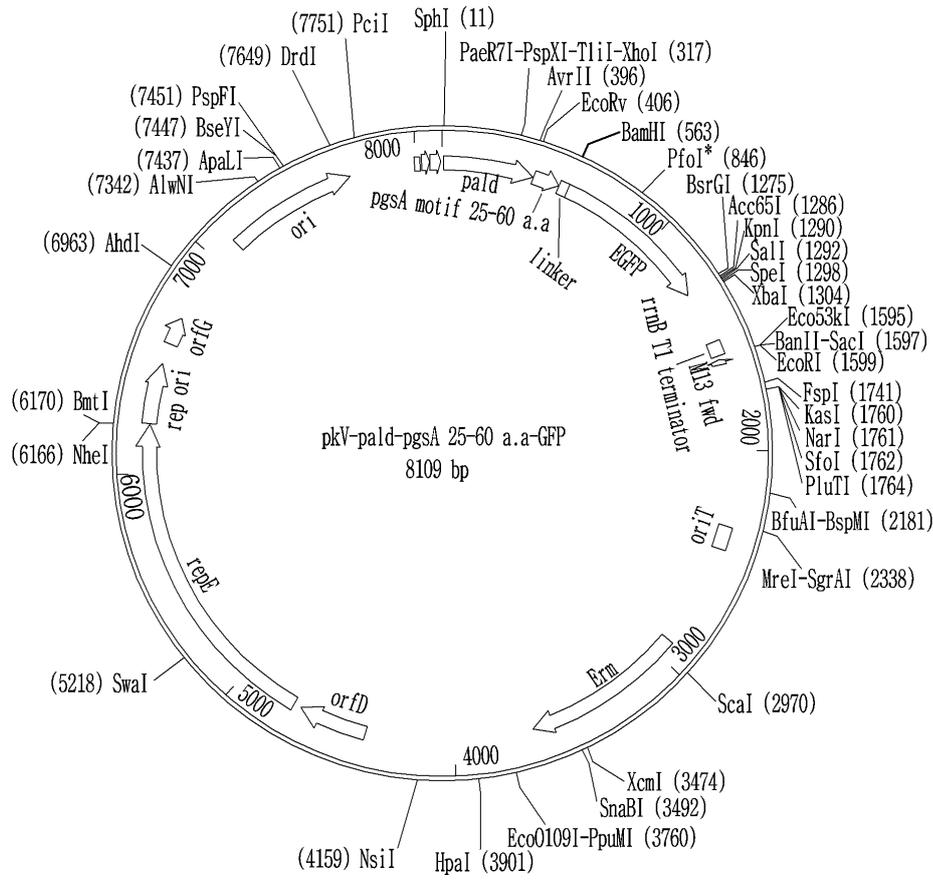
도면9



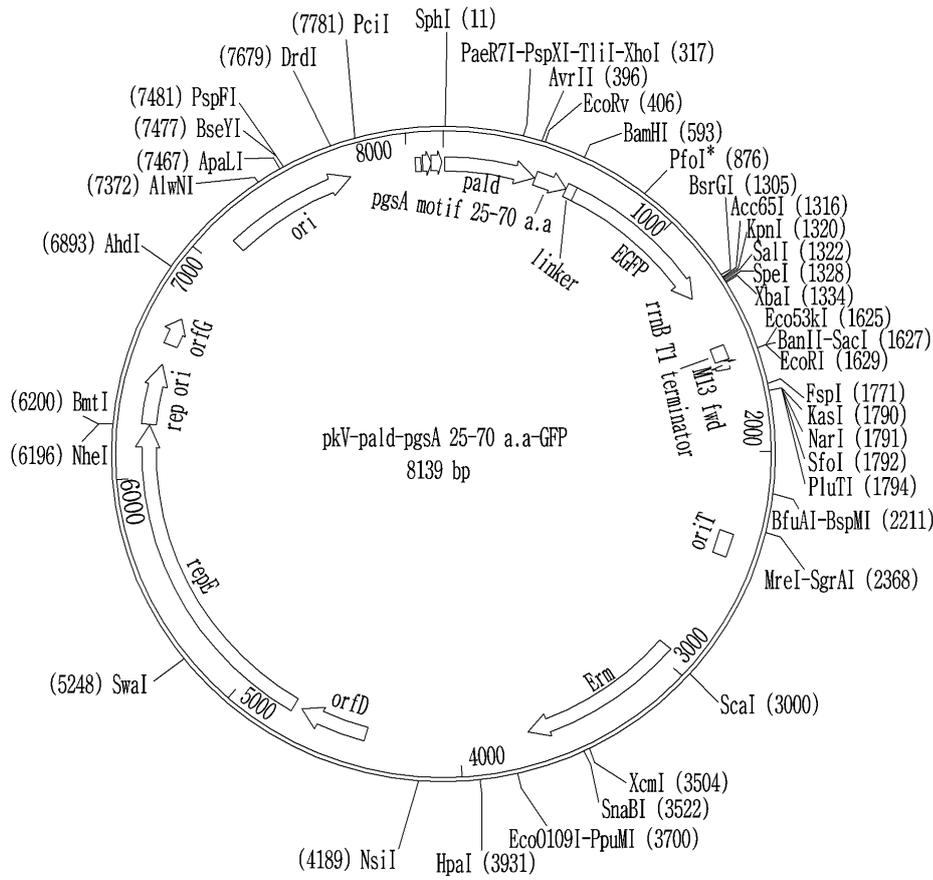
도면10



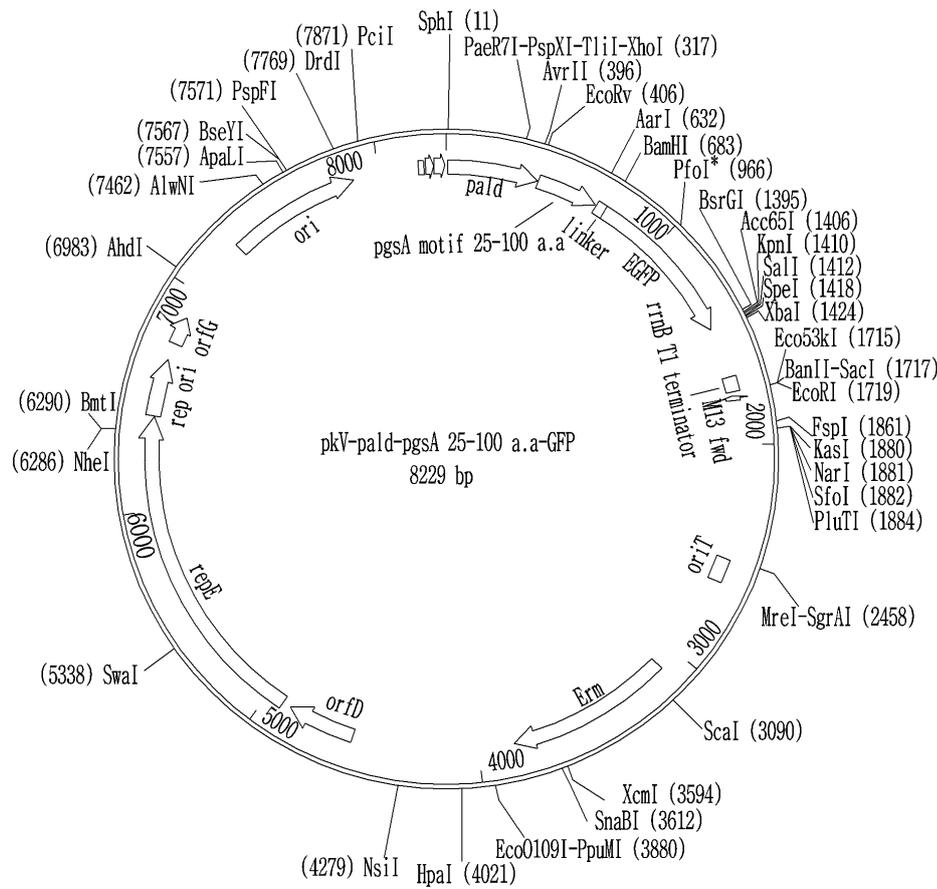
도면11



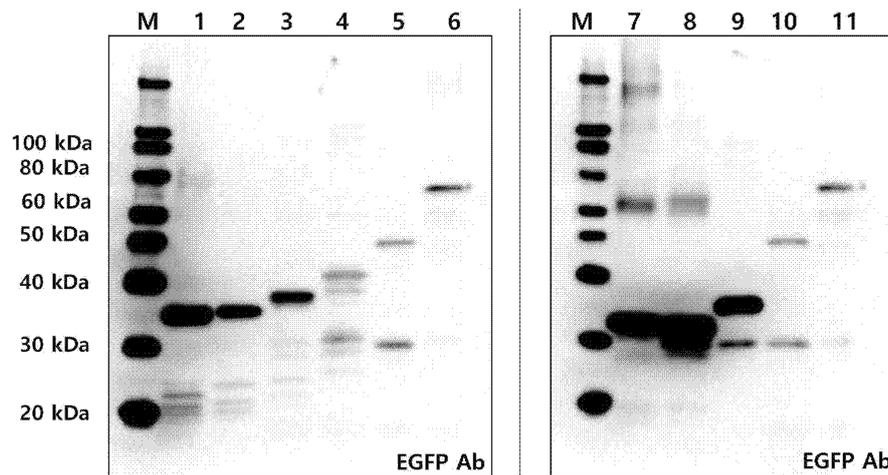
도면12



도면13



도면14



서열 목록

- <110> SEWON
- <120> Simultaneous surface display vector of dual antigen using
- <130> PA19-QQ038
- <150> KR 10-2018-0120547
- <151> 2018-10-10

<160> 34  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 406  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus casei  
 <400> 1  
 ccatgcaata cccacttatt gcgatttgct tttctattag ttagcatttt aaatttgtaa 60  
 acgtgccact tataaacaaa tttccgtctt ctttttatga gagtaatctc atttaatttt 120  
 gactaaatat ccgattgcgg tcacacaact accagtttca aacaaatttc aatttgatgg 180  
  
 tcatttttta ttttgcggc aaaaagtgag caaatcagta gcattttccc tgattacggg 240  
 gtacattcaa agtgactttg cgtacacaca gacatatgta tgacgggtgt tataaaaagc 300  
 cgtcacgctg ctcgagtage tctcatcatt ttctgcctt tttctcccgc aacatatgat 360  
 aaaatacaac ggttgtgaat tgtttatttc ctaggaggat atctac 406  
 <210> 2  
 <211> 607  
 <212> DNA  
 <213> Lactobacillus casei  
 <400> 2  
 aattcagcaa gcccaatac aatgtttctg ttttgaagct tgaagttcca gttgatcaaa 60  
 agtttgttga aggctacacc gatgacggcg ttaccctgt ttacagcaag gaagaagccg 120  
  
 ctaagtatta caaggaacag tcagatgcaa cggatctccc attcatcttc ctgtccgctg 180  
 gtgtcaccaa cgaattgttc cttgaagaac tcaagtttgc taagcaagca ggttcagcct 240  
 ttaatggtgt tctctgtggc cgtgcaactt ggaagccggg tgtaagcca tatgctgctg 300  
 aaggcgaagc tgctggtaag aagtggctgc agaccgaagg caaggctaac attgatcgtt 360  
 tgaacaaggt gcttgcagaa actgcaacc cttggactga caaagttgaa ggttaatctt 420  
 taacatagt tgcaagaag gaccgattat gatgatcggg tcttttttta tgactcggga 480  
 catgtttttg tgaccactgc aaacatcaaa atgaagttcg aaaaacttgc taacaatcat 540  
  
 tacaggtcag tgatccagt gtagactggt attgaatgcg ttttctcta ttaggaghta 600  
 attcaac 607  
 <210> 3  
 <211> 31

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer  
 <400> 3  
 tggatgatcc gtgagcaagg gcgaggagct g 31  
 <210> 4  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse primer  
 <400> 4  
 tgactctaga actagtgctg acggtacctt actgttacag ctcgtcc 47  
  
 <210> 5  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer  
 <400> 5  
 tacggcatgc ttgaattggt ttcttacgat 30  
 <210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse primer  
 <400> 6  
 tacgctcgag gttgaattac ctcctaatag 30  
 <210> 7  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Forward primer  
 <400> 7  
 ggcgcaattc ttgaattggt ttcttacga 29

<210> 8  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Reverse primer  
 <400> 8  
 gcgctgcgca ttacttgtag agctcgtc 28  
 <210> 9  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 9  
 tggatgatcc gtgagcaagg gcgaggagct g 31  
 <210> 10  
 <211> 47  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 10  
 tgactctaga actagtgtag acggtacctt actgttagag ctctgtcc 47  
 <210> 11  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 11  
 tcgagcatgc aataccactt tattgagatt tgct 34  
 <210> 12  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 12

tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gagagtacgt 60  
 cgtcagaata cggt 74  
 <210> 13  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213>  
 > Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 13  
 tcgagcatgc aataccact tattgcgatt tgct 34  
 <210> 14  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 14  
 tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct cccatcataa 60  
 tatcgctac aaat 74  
 <210> 15  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 15  
 tcgagcatgc aataccact tattgcgatt tgct 34  
 <210> 16  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 16  
 tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct ttttgetceg 60  
 ttactttttc aaca 74  
 <210> 17

<211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 17  
 tcgagcatgc aataccact tattgcgatt tgct 34

<210> 18  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 18  
 tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gctacataat 60  
 ccgaggctct aaag 74

<210> 19  
 <211> 34  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 19  
 tcgagcatgc aataccact tattgcgatt tgct 34

<210> 20  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213>  
 > Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 20  
 tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccaccg actttctggt 60  
 acgaaatfff cttt 74

<210> 21  
 <211> 180  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PgsA1  
 <400> 21  
 atgaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag 60  
 aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt cggatcgttt ttgtccttat gttcgctttc 120  
 atgtgggcgg gaaaagcggg aacgccgaag gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca 180  
 180  
 <210> 22  
 <211> 210  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PgsA2  
 <400> 22  
 atgaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag 60  
 aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt cggatcgttt ttgtccttat gttcgctttc 120  
 atgtgggcgg gaaaagcggg aacgccgaag gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca 180  
 gcctcatttg taggcgatat tatgatggga 210  
 <210> 23  
 <211> 240  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PgsA3  
 <400> 23  
 atgaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag 60  
 aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt cggatcgttt ttgtccttat gttcgctttc 120  
 atgtgggcgg gaaaagcggg aacgccgaag gtcaaaacgt attctgacga cgtactctca 180  
 gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa 240  
 240  
 <210> 24  
 <211> 300  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PgsA4

<400> 24  
atgaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag 60  
aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcgttt ttgtccttat gttcgtttc 120  
atgtggcgg gaaaagcgga aacgccgaag gtcaaacgt attctgacga cgtactctca 180  
gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa 240  
ggggcagaca gtattttca atatgttgaa ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca 300  
300

<210> 25  
<211> 564  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PgsA5

<400> 25  
atgaaaaag aactgagctt tcatgaaaag ctgctaaagc tgacaaaaca gcaaaaaaag 60  
aaaaccaata agcacgtatt tattgccatt ccgatcgttt ttgtccttat gttcgtttc 120  
atgtggcgg gaaaagcgga aacgccgaag gtcaaacgt attctgacga cgtactctca 180  
gcctcatttg taggcgatat tatgatggga cgctatgttg aaaaagtaac ggagcaaaaa 240  
ggggcagaca gtattttca atatgttgaa ccgatcttta gagcctcgga ttatgtagca 300  
ggaaactttg aaaaccggg aacctatcaa aagaattata aacaagcaga taaagagatt 360  
  
catctgcaga cgaataagga atcagtgaaa gtcttgaagg atatgaattt cacggttctc 420  
aacagcgcca acaaccagc aatggattac ggcgttcagg gcatgaaaga tacgcttggg 480  
gaatttgca agcaaacct tgatatcgtt ggagcgggat acagcttaag tgatgcgaaa 540  
aagaaaattt cgtaccagaa agtc 564

<210> 26  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> PCR primer

<400> 26  
cgctggatat ctacatgcac gtatttattg ccattccg 38

<210>  
> 27  
<211> 74

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 27  
 tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gagagtacgt 60  
 cgtcagaata cggt 74  
 <210> 28  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 28  
 cgctggatat ctacatgcac gtatttattg ccattccg 38  
 <210> 29  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 29  
 tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct cccatcataa 60  
 tatcgctac aaat 74  
 <210> 30  
 <211> 38  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 30  
 cgctggatat ctacatgcac gtatttattg ccattccg 38  
 <210> 31  
 <211> 74  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> PCR primer  
 <400> 31

tacgggatcc accagaacca ccagaaccac cagaaccacc agaaccacct gctacataat 60

ccgaggctct aaag 74

<210> 32

<211> 108

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PgsA6

<400> 32

cacgtattta ttgccattcc gatcgTTTT gtccttatgt tcgctttcat gtgggcggga 60

aaagcggaaa cgccgaaggt caaaacgtat tctgacgacg tactctca 108

<210> 33

<211> 138

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PgsA7

<400> 33

cacgtattta ttgccattcc gatcgTTTT gtccttatgt tcgctttcat gtgggcggga 60

aaagcggaaa cgccgaaggt caaaacgtat tctgacgacg tactctcagc ctcatttgta 120

ggcgatatta tgatggga 138

<210> 34

<211> 228

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PgsA8

<400> 34

cacgtattta ttgccattcc gatcgTTTT gtccttatgt tcgctttcat gtgggcggga 60

aaagcggaaa cgccgaaggt caaaacgtat tctgacgacg tactctcagc ctcatttgta 120

ggcgatatta tgatgggacg ctatgttgaa aaagtaacgg agcaaaaagg ggcagacagt 180

atTTTTcaat atgttgaacc gatctttaga gcctcggatt atgtagca 228