(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월24일
(11) 등록번호 10-1476383
(24) 등록일자 2014년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/79 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0069043
(22) 출원일자 2011년07월12일
심사청구일자 2012년07월13일
(65) 공개번호 10-2013-0008342
(43) 공개일자 2013년01월22일
(56) 선행기술조사문헌
KR100956893 B1*
KR1020070101190 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
손정훈
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
박순호
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

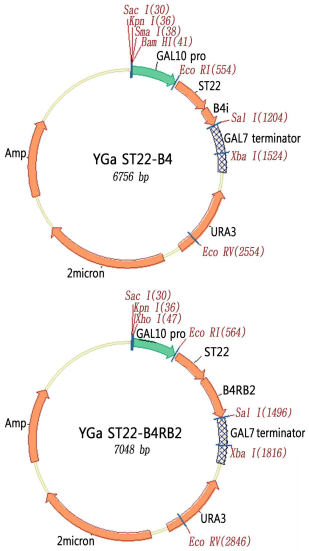
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **단백질 분비융합인자를 포함하는 재조합 벡터 및 이를 이용한 비만백신 단백질의 대량생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 비만백신 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 효모 유래의 단백질 분비융합인자(translational fusion partner, TFP)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 진핵세포를 배양하고 이로부터 비만백신 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 비만백신 단백질의 대량생산방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 사람에게 무해한 효모로부터 사람의 비만백신 단백질을 대량으로 생산할 수 있으므로, 사람 또는 애완동물의 비만치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

김효준

경기도 안산시 상록구 한양대학로 55, 창업보육센터 604호 (사동)

배정훈

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이초롱

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM2430821
부처명 과학기술부
연구관리전문기관 과학기술부
연구사업명 주요사업(연구개발과제)
연구과제명 TFP 기술기반 대규모 단백질 맞춤형 생산 및 산업화
기 여 율 1/2
주관기관 한국생명공학연구원
연구기간 2008.01.01 ~ 2008.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 bb13f077fc8242acaabe7df952cd88d3
부처명 산업자원부
연구관리전문기관 지식경제부
연구사업명 산업핵심기술개발사업
연구과제명 재조합 효모기반 비만백신 대량생산 기술개발
기 여 율 1/2
주관기관 한국생명공학연구원
연구기간 2009.06.01 ~ 2010.05.21

특허청구의 범위

청구항 1

비만백신 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 서열번호 21의 아미노산 서열로 표시되는 효모 유래의 단백질 분비융합인자(translational fusion partner, TFP)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비만백신 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1-서열번호 2-서열번호 2-서열번호 2-서열번호 4의 순서로 연결된 염기서열 또는 서열번호 1-서열번호 2-서열번호 2-서열번호 3-서열번호 2-서열번호 4의 순서로 연결된 염기서열로 표시되는 것인 벡터.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단백질 분비융합인자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 22의 염기서열로 표시되는 것인 벡터.

청구항 6

제1항에 있어서,

도 6의 개열지도로 표시되는 YGaST22-B4 또는 YGaST22-B4RB2인 것인 벡터.

청구항 7

(ⅰ) 제1항, 제3항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 진핵세포를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및,

(ii) 상기 배양물의 배양상등액으로부터 비만백신 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 비만백신 단백질의 대량 생산 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 진핵세포는 효모인 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 비만백신 단백질의 회수는 배양상등액을 농축하고, 이를 음이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 역상 HPLC 크로마토그래피에 순차적으로 적용하여 수행되는 것인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단백질 분비융합인자를 포함하는 재조합 벡터 및 이를 이용한 비만백신 단백질의 대량생산방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 비만백신 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 효모 유래의 단백질 분비융합인자(translational fusion partner, TFP)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 진핵세포를 배양하고 이로부터 비만백신 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 비만백신 단백질의 대량생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 서구적 식생활의 영향으로 비만에 의한 대사성 질환인 당뇨병, 동맥경화증 및 관상동맥질환(coronary atherosclerotic disease: CAD)이 점차적으로 증가추세에 있다. 이러한 질환의 원인이 되는 혈청 지질로는 콜레스테롤(cholesterol), 트리글리세라이드(triglyceride: TG), 유리 지방산(free fatty acid) 및 포스포리피드(phospholipid) 등이 있다. 혈청지질중 VLDL(very low density lipoprotein) 및 LDL(low density lipoprotein)은 지질 대사와 관련된 성인병의 주요 인자이다. 아포지단백질 B-100(Apolipoprotein B-100: Apo B-100)은 이러한 저밀도 지단백질(LDL)의 주된 단백질 성분이며 또한 IDL(intermediate density lipoprotein), VLDL에 존재하고 있기 때문에, 혈중에 있는 항체가 아포지단백질 B-100을 인식하도록 유도한다면 식세포에 의한 LDL-소거(clearance)가 가능하다.

[0003] 이와 같은 근거로 최근 백신을 이용하여 LDL-콜레스테롤의 수치를 낮추고 동맥경화를 감소시키기 위한 연구가 시도되고 있다. 이와 같은 항-콜레스테롤 백신 요법에 의해 유도된 항체는 IgM 타입으로 VLDL, IDL 및 LDL과 결합하는 것으로 보여지며, 이것을 통해서 고콜레스테롤 및 아테롬성 동맥경화증에 대한 예방 및 치료용 백신의 가능성이 제시되고 있다(Bailey, et al., Cholesterol vaccines. Science 264, 1067-1068, 1994; Palinski W., et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 92, 821-5, 1995; Wu R. de Faire U., et al., Hypertension. 33, 53-9, 1999). 아포지단백질 B-100의 에피토프에 대한 모조 펩타이드(mimetic peptide)가 항비만 효과를 가지며, 이를 헬퍼 T 세포 에피토프와 융합시킨 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드(B4 및 B4RB2) 및 이를 포함하는 조성물이 비만을 예방 또는 치료하였다(한국 특허등록 제0639397호, 제0970178호 및 제0472841호).

[0004] 목적하는 단백질의 재조합 발현은 연구 또는 치료 목적 기타 상업적 목적으로 단백질을 대량생산하기 위한 방법으로 널리 사용된다. 재조합 단백질을 대량으로 생산하기 위해서는 다양한 벡터와 숙주들이 이용되고 있으며 일반적으로 대장균을 이용한 방법 등이 널리 사용되고 있다. 현재 비만백신 B4 및 B4RB2는 대장균에서 발현하여 생산하고 있으며 단백질의 발현양은 높으나 비활성 봉입체 형태로 발현되기 때문에 활성을 갖도록 하기 위해서는 정제과정에서 활성화 단계를 반드시 거쳐야하며, 순도가 높은 비만백신을 얻기 위해서는 여러 단계의 정제공정을 거쳐야 하므로 비용이 많이 드는 단점이 있다.

[0005] 진핵 미생물인 효모(Saccharomyces cerevisiae)는 인체에 대해 안전성이 입증된 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로서, 유전자 조작이 용이하며 다양한 발현시스템이 개발되어 있고 대량배양이 용이하다. 뿐만 아니라 인체단백질과 같은 고등세포 유래의 단백질을 재조합 생산할 때 단백질을 세포 밖으로 분비할 수 있는 분비기능과 글리코실화 등과 같은 단백질의 번역 후 수식 기능을 수행할 수 있는 장점을 제공한다. 목표 단백질의 분비생산을 위해서는 단백질 분비 시그날과 목표단백질을 인위적으로 융합(fusion)함으로써 세포외 분비가 가능하다. 단백질의 분비과정을 통해서 단백질의 폴딩이나 이황화 결합의 형성 및 당쇄 부가과정이 진행된다. 따라서, 생물학적으로 완전한 활성을 갖는 재조합 단백질을 생산할 수 있는 장점을 제공한다. 이는 또한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 세포를 깨지 않고 배지로부터 직접 회수할 수 있으며 재접힘 단계를 필요로 하지 않아 매우 경제적이다(Eckart and Bussineau, Curr. Opin. Biotechnol., 1996, 7, 525).

[0006] 그러나, 상기 효모를 이용하여 외래단백질을 분비생산하고자 할 때 가장 큰 문제점은 단백질의 종류에 따라서 단백질 생산량의 차이가 매우 크며 단백질에 따라서 분비생산이 불가능할 수도 있다는 것이다.

[0007] 이러한 상황에서, 본 발명자들은 비만백신을 대량으로 생산할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 비만백신 단백질의 유전자 및 단백질 분비융합인자 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 숙주세포에 도입되어 형질전환된 형질전환체를 배양할 경우, 배지로 대량의 비만백신을 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 비만백신 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 효모 유래의 단백질 분비융합인자(translational fusion partner, TFP)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 진핵세포를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 상기 배양물의 배양상등액으로부터 비만백신 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 비만백신 단백질의 대량생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 비만백신 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 효모 유래의 단백질 분비융합인자(translational fusion partner, TFP)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 본 발명의 용어 "비만백신 단백질"이란 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드; 또는 N 말단으로부터 순차적으로 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드, 광견병 바이러스 헬퍼 T 세포 에피토프, 또는 아포지단백질 B-100의 B 세포 에피토프의 모조 펩타이드가 융합된 면역원성 하이브리드 폴리펩타이드를 의미한다.

[0012] 본 발명의 비만백신 단백질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 B4 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 표시되는 B4RB2일 수 있다.

[0013] 본 발명의 용어 "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA(deoxyribonucleic acid) 또는 RNA(ribonucleic acid) 가닥을 의미하는데, 본 발명에서는 비만백신 단백질 또는 효모 유래의 단백질 분비융합인자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0014] 본 발명의 비만백신 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 B4 또는 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 B4RB2일 수 있다.

[0015] 본 발명의 용어 "재조합 벡터"는 숙주세포에 DNA를 도입하여 비만백신 단백질을 미생물에서 효율적으로 발현시키기 위한 수단으로서, 상기 재조합 벡터의 제작시에는 효모 유래의 단백질 분비융합인자 뿐만 아니라, 비만백신 단백질을 생산하고자 하는 숙주세포의 종류에 따라 프로모터(promoter), 종결자(terminator), 인핸서(inhancer) 등과 같은 발현 조절 서열, 막 표적화 또는 분비를 위한 서열 등을 적절히 선택하고 목적에 따라 다양하게 조합할 수 있다.

[0016] 본 발명의 용어 "단백질 분비융합인자(translational fusion partner, TFP)"란 난발현성 단백질을 코딩하는 유전자와 융합되어 난발현성 단백질의 분비생산을 유도하는 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현되는 단백질을 의미한다.

[0017] 본 발명에서 사용되는 TFP는 특별히 이에 제한되지 않으나, ST1(서열번호 9 및 10), ST5(서열번호 11 및 12), ST6(서열번호 13 및 14), ST7(서열번호 15 및 16), ST8(서열번호 17 및 18), ST21(서열번호 19 및 20), ST22

(서열번호 21 및 22) 등을 사용할 수 있고, 특히 ST22를 사용함이 바람직하다.

[0018] 본 발명자들은 비만백신 단백질인 B4 또는 B4RB2를 효모에서 대량으로 생산하기 위하여, 효모에서 유래된 TFP에 주목하게 되었다. 즉, 효모에서 유래된 TFP를 사용할 경우, 효모에서 목적하는 단백질을 대량으로 생산할 수 있다는 점에 착안하여, 상기 비만백신 단백질인 B4 또는 B4RB2를 효모에서 대량으로 생산하는데 사용될 수 있는 효모에서 유래된 TFP를 스크리닝하였다. 그 결과, ST1, ST5, ST6, ST7, ST8, ST21 또는 ST22의 7종의 TFP가 상기 비만백신 단백질인 B4 또는 B4RB2를 효모에서 생산할 수 있도록 보조함을 확인하였다. 이 중에서도 ST22가 상기 B4 또는 B4RB2를 효모에서 대량생산할 수 있도록 보조할 수 있음을 확인하고, 상기 TFP 및 비만백신 단백질의 유전자를 포함하는 재조합 벡터인 YGaST22-B4 및 YGaST22-B4RB2를 제작하였다(도 6). 또한, 이들 재조합 벡터를 각각 효모에 도입하여 형질전환체를 제조하고, 상기 형질전환체를 배양한 다음, 배양상등액에 상기 비만백신 단백질이 존재하는지의 여부를 확인하였다. 그 결과, 상기 두 가지 재조합 벡터가 도입된 두 종류의 형질전환체 모두 배양상등액으로 비만백신 단백질을 분비함을 확인하였다(도 7 내지 9).

[0019] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (ⅰ) 상기 재조합 벡터로 형질전환된 진핵세포를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및, (ii) 상기 배양물의 배양상등액으로부터 비만백신 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 비만백신 단백질의 대량생산 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 용어 "형질전환"이란 유전자를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있도록 하는 것을 의미한다.

[0021] 본 발명의 재조합 벡터를 진핵세포에 도입하여 형질전환하는 방법은 본 발명의 재조합 벡터를 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposem-mediated transfection), DEAE 덱스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation) 등의 공지 방법으로 진핵세포에 도입하여 형질전환시킬 수 있다.

[0022] 상기 재조합 벡터로 형질전환된 진핵세포는 특별히 이에 제한되지 않으나, 효모, 곤충 세포, 식물 세포, 동물 세포를 사용할 수 있고, 바람직하게는 효모, 보다 바람직하게는 사카로마이세스 세르비지애(Saccharomyces cerevisiae)를 사용할 수 있다.

[0023] 상기 형질전환체의 배양은 진핵세포의 배양에 적당한 배양방법에 따라 배양할 수 있으며, 특별히 이에 제한되지 않으나, 회분식, 유가식 또는 연속식으로 배양할 수 있다.

[0024] 상기 비만백신 단백질을 회수하는 단계는 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 형질전환체를 배양한 배양물을 원심분리하여 수득한 배양상등액을 농축하고, 이를 음이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 및 역상 HPLC 크로마토그래피에 순차적으로 적용하여 활성분획을 수득함으로써 수행함이 바람직하다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 단백질 분비융합인자를 포함하는 재조합 벡터 및 이를 이용한 비만백신 단백질의 대량생산방법을 이용하면, 사람에게 무해한 효모로부터 사람의 비만백신 단백질을 대량으로 생산할 수 있으므로, 사람 또는 애완동물의 비만치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 비만백신 B4 및 B4RB2 유전자를 포함하는 각각의 재조합 벡터 pKS-B4와 pKS-B4RB2의 제작방법을 나타내는 개략도이다.

도 2는 단백질 분비융합인자(TFP) 라이브러리를 포함하는 벡터에 B4 및 B4RB2 유전자를 도입하여 발현벡터를 작

제하는 방법을 나타내는 개략도이다.

도 3은 B4RB2 유전자가 도입된 형질전환체를 배양하여 수득한 배양상등액을 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진(A) 및 anti-B4RB2 항체를 이용한 웨스턴 블럿 분석사진(B)이다.

도 4는 B4RB2 및 ST22 유전자가 도입된 형질전환체를 배양하여 수득한 배양상등액을 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진(A) 및 anti-B4RB2 항체를 이용한 웨스턴 블럿 분석사진(B)이다.

도 5는 B4 유전자가 도입된 형질전환체를 배양하여 수득한 배양상등액을 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진(A) 및 anti-B4 항체를 이용한 웨스턴 블럿 분석사진(B)이다.

도 6은 효모에서 B4RB2 및 B4 유전자를 발현시키는 발현벡터 YGaST22-B4 및 YGaST22-B4RB2의 구조를 나타내는 개열지도이다.

도 7은 YGaST22-B4RB2 (A) 또는 YGaST22-B4 (B)를 포함하는 형질전환체의 배양상등액을 SDS-PAGE와 웨스턴 블럿으로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. (A)레인 1, 2, 3은 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체를 배양한 배양 상등액이며 레인 4는 대장균에서 발현 및 정제된 B4RB2 표준품이며 (B)레인 1,2,3은 YGaST22-B4를 포함하는 형질전환체 배양상등액이다.

도 8은 YGaST22-B4를 포함하는 형질전환체의 배양결과를 나타내는 세포의 성장 정도를 나타내는 그래프(A), 배양상등액의 전기영동사진(B) 및 웨스턴 블럿 분석사진(C)이다.

도 9는 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체의 배양결과를 나타내는 세포의 성장 정도를 나타내는 그래프(A), 배양상등액의 전기영동사진(B) 및 웨스턴 블럿 분석사진(C)이다.

도 10은 YGaST22-B4를 포함하는 형질전환체 유래 시료를 음이온 교환 크로마토그래피로 분리한 결과를 나타내는 그래프 및 상기 분리된 각 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 11은 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체 유래 시료를 음이온 교환 크로마토그래피로 분리한 결과를 나타내는 그래프 및 상기 분리된 각 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

도 12는 B4를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 활성분획을 소수성 상호작용 크로마토그래피로 분리한 결과를 나타내는 그래프 및 상기 분리된 각 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. SDS-PAGE의 레인 1은 시초 시료이며 레인 2는 결합하지 않은 시료, 레인 3은 분획 20번, 레인4는 분획 24번, 레인 5는 분획 28번, 레인 6은 분획 29번이다.

도 13은 B4RB2를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 활성분획을 소수성 상호작용 크로마토그래피로 분리한 결과를 나타내는 그래프 및 상기 분리된 각 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. SDS-PAGE의 레인 1은 초기 발효농축액이며 레인 2는 Q pool이며 레인 3, 4는 결합하지 않은 시료, 레인 5는 분획 10F번, 레인 6은 분획 13F번, 레인 7은 분획 15F번, 레인 8은 분획 13E번, 레인 9는 분획 12E번, 레인 10은 분획 11E번이다.

도 14는 B4의 HPLC 분석결과를 나타내는 그래프(A 및 B) 및 전기영동사진(C)이다. 도 14(C)에서 SDS-PAGE의 레인 1은 대장균 유래 표준품 B4이며 레인2는 정제된 효모 B4 단백질이며 레인 3은 도 14(A)의 대장균 유래 표준품 B4의 HPLC peak 1번, 레인4는 대장균 유래 표준품 B4의 HPLC peak 2번이며 레인 5는 도 14(B)의 효모 유래 B4의 HPLC peak 3번, 레인 6은 효모 유래 B4의 HPLC peak 4번이다.

도 15는 B4RB2의 HPLC 분석결과를 나타내는 그래프(A 및 B) 및 전기영동사진(C)이다. 도 15(C) SDS-PAGE의 레인 1은 대장균 유래의 표준품 B4RB2이며 레인2는 효모 유래의 정제된 B4RB2 이며 레인 3은 도 15(A)의 대장균 유래의 표준품 B4RB2의 HPLC peak 1번, 레인4는 대장균 유래의 표준품 B4RB2의 HPLC peak 2번이며 레인 5는 도 15(B)의 효모 유래의 B4RB2의 HPLC peak 1번, 레인 6은 효모 유래의 B4RB2의 HPLC peak 2번이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0028] **실시예 1: 비만백신 B4RB2 및 B4 유전자 제작**

[0029] 비만백신 B4 및 B4RB2 유전자를 인체에 무해한 효모에서 고효율로 발현시키기 위하여, 효모의 코돈 이용도(codon usage)에 적합하도록 재합성하였다.

[0030] 구체적으로, 효모의 코돈 이용도에 맞춰 제작된 DNA서열과 그에 대한 단백질 서열을 4개의 조각으로 나누어 각각 합성하고(서열번호 1 내지 4), XhoI/KpnI site에 SalI/KpnI 조각을 순차적으로 연결하는 방법을 이용하여 B4는 1번-2번-2번-2번-4번으로 B4RB2는 1번-2번-2번-3번-2번-4번의 순서로 연결하여 대장균 벡터 pBluescript KS+에 클로닝하여 pKS-B4와 pKS-B4RB2를 각각 제작하였다(도 1). 도 1은 비만백신 B4 및 B4RB2 유전자를 포함하는 각각의 재조합 벡터 pKS-B4와 pKS-B4RB2의 제작방법을 나타내는 개략도이다.

[0031] **실시예 2: B4RB2 및 B4의 효모 단백질분비 융합인자(TFP) 선별**

[0032] 상기 실시예 1에서 제작된 각각의 재조합 벡터 pKS-B4와 pKS-B4RB2를 주형으로 하고, 하기의 서열번호 5 및 서열번호 6의 염기서열을 가지는 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 B4 및 B4RB2 유전자를 증폭하였다.

[0033] 5'-ctcgccttagataaaagaatggacagaaacgtccca-3'(서열번호 5)

[0034] 5'-actccgttcaagtcgacttagaaggcaatccagtag-3'(서열번호 6)

[0035] 상기 증폭된 각 유전자를 주형으로 하고, 하기의 서열번호 7 및 서열번호 8의 염기서열을 가지는 프라이머를 이용한 PCR을 수행하여 B4 및 B4RB2 유전자 PCR 산물을 수득하였다.

[0036] 5'-ggccgcctcggcctctgctggcctcgccttagataaaaga-3'(서열번호 7)

[0037] 5'-gtcattattaaatatatatatatatattgtcactccgttcaagtcgac-3'(서열번호 8)

[0038] 상기 수득한 PCR 산물을 24종의 단백질 분비융합인자(TFP, Translational Fusion Partner) 라이브러리를 포함하는 벡터에 도입하여(특허등록 제0975596호) 각각의 발현벡터를 작제하였다(도 2). 도 2는 단백질 분비융합인자(TFP) 라이브러리를 포함하는 벡터에 B4 및 B4RB2 유전자를 도입하여 발현벡터를 작제하는 방법을 나타내는 개략도이다.

[0039] 우선, B4RB2 유전자의 발현에 적합한 TFP를 선별하기 위하여, B4RB2 유전자가 도입된 발현벡터를 숙주 효모(Saccharomyces cerivisiae Y2805, Mat a pep4::His3 prb1 can1 his3-200 ura3-52)에 도입하고, in vivo 재조합을 통하여 총 24종의 형질전환체를 수득하고, 상기 수득한 각 형질전환체를 YPDG 배지(1% 효모추출물, 2% 펩톤, 1% 포도당, 1% 갈락토스)에서 40시간 동안 배양한 다음, 원심분리하여 배양상등액을 수득하였다. 상기 수득한 배양상등액 0.6㎖에 0.4㎖ 아세톤을 가하여 단백질 성분을 침전시키고, 상기 침전물을 SDS-PAGE 및 anti-B4RB2 항체를 이용한 웨스턴 블럿 방법으로 분석하여, B4RB2의 분비발현 여부를 확인하였다(도 3). 도 3은 B4RB2 유전자가 도입된 형질전환체를 배양하여 수득한 배양상등액을 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진(A) 및 anti-B4RB2 항체를 이용한 웨스턴 블럿 분석사진(B)이다. 상기 도 3에서 보듯이, 24종의 TFP 중 7종(ST1, ST5, ST6, ST7, ST8, ST21 및 ST22)을 포함하는 형질전환체가 B4RB2를 분비생산할 수 있음을 확인하였다. 이때, 상기 7종의 TFP인 ST1(서열번호 9 및 10), ST5(서열번호 11 및 12), ST6(서열번호 13 및 14), ST7(서열번호 15 및 16), ST8(서열번호 17 및 18), ST21(서열번호 19 및 20) 및 ST22(서열번호 21 및 22)는 각각 특허등록 제975596호에 기재된 TFP중 TFP1, TFP1 pre-TFP19(MFa) pro 융합체, TFP19, TFP9, TFP10, TFP29 및 TFP37에 해당한다.

[0040] 상기 확인된 7종의 형질전환체로부터 각각 단일균주를 확보하기 위하여 각 형질전환체 별로 단일균주를 3개씩 골라서 동일조건으로 배양하고, 이로부터 배양상등액을 수득하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블럿을 수행하였다(도 4). 도 4는 B4RB2 및 ST22 유전자가 도입된 형질전환체를 배양하여 수득한 배양상등액을 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진(A) 및 anti-B4RB2 항체를 이용한 웨스턴 블럿 분석사진(B)이다. 상기 도 4에서 보듯이, 7종의 형질전환체 중에서 ST22를 포함하는 형질전환체가 B4RB2를 가장 효율적으로 분비생산할 수 있음을 확인하였다. ST22는 효모 YGP1(YNL160W) 유전자 유래의 138개의 아미노산을 코딩하는 유전자이며 세포벽 관련 분비 당단백질이다.

[0041] 다음으로, B4 유전자의 발현에 적합한 TFP를 선별하기 위하여, B4 유전자가 도입된 발현벡터를 사용하는 것을 제외하고는, 상술한 바와 동일한 방법으로 적합한 TFP를 스크리닝하였다(도 5). 도 5는 B4 유전자가 도입된 형질전환체를 배양하여 수득한 배양상등액을 분석한 결과를 나타내는 전기영동사진(A) 및 anti-B4 항체를 이용한 웨스턴 블럿 분석사진(B)이다. 상기 도 5에서 보듯이, 24종의 TFP 중 B4 유전자를 발현하기에 가장 적합한 것은 ST22임을 확인할 수 있었다. 이처럼, 두 가지 단백질에 대하여 동일한 TFP가 선별된 이유는 상기 두가지 단백질이 구조적으로 매우 유사하기 때문인 것으로 판단되었다.

[0042] 상술한 결과를 종합하면, 인체 비만백신 B4RB2 및 B4을 고분비생산하는 발현 벡터, YGaST22-B4 및 YGaST22-B4RB2는 갈락토스에 의하여 발현이 강력히 유도되는 GAL10 프로모터와 B4 및 B4RB2 단백질의 분비를 유도하는 ST22로 구성되며 YEGα-HIR525 벡터(Sohn 등, Process Biochem. 1995, 30, 653)의 골격을 포함한다(도 6). 도 6은 효모에서 B4RB2 및 B4 유전자를 발현시키는 발현벡터 YGaST22-B4 및 YGaST22-B4RB2의 구조를 나타내는 개열지도이다.

[0043] 상기 각 발현벡터 YGaST22-B4 또는 YGaST22-B4RB2를 효모 Y2805에 도입하여 제조한 각 형질전환체를 배양하고, 이들의 배양상등액을 SDS-PAGE와 웨스턴 블럿으로 분석하였다(도 7). 도 7은 YGaST22-B4 또는 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체의 배양상등액을 SDS-PAGE와 웨스턴 블럿으로 분석한 결과를 나타내는 사진으로, (A)의 레인 1, 2 및 3은 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체를 배양한 배양 상등액을 나타내고, 레인 4는 대장균에서 발현 및 정제된 B4RB2 표준품을 나타내며, (B)의 레인 1,2,3은 YGaST22-B4를 포함하는 형질전환체 배양상등액을 나타낸다.

[0044] **실시예 3: 재조합 효모 유가식 발효를 통한 B4와 B4RB2의 생산**

[0045] 상기 각 발현벡터 YGaST22-B4 또는 YGaST22-B4RB2를 함유하는 형질전환체를 5ℓ 발효조를 이용하여 유가식으로 배양하였다.

[0046] 본 배양에 들어가기 전에 상기 각 형질전환체를 50㎖ YNB(0.67% 아미노산이 결여된 효모기질, 0.5% 카사미노에시드, 2% 글루코스)배지에서 초기 배양하고, 이를 다시 200㎖의 YEPD 액체배지(2% 포도당, 4% 효모추출물, 1% 펩톤)에서 배양한 다음, 1.8ℓ의 배양액(2% 포도당, 4% 효모추출물, 1% 펩톤)에 접종하여 30℃에서 배양하였다. 배양중 포도당이 완전히 소모되면 공급배지(30% 포도당, 30% 갈락토스, 15% 효모추출물)를 균체의 성장에 따라 시간당 2g/ℓ에서 20g/ℓ로 점차로 추가하면서 50시간 동안 배양하면서 GAL 프로모터에 의한 B4 또는 B4RB2 단백질을 발현시켰다.

[0047] 우선, YGaST22-B4를 포함하는 형질전환체의 경우, 배양중 세포의 성장 정도는 시간별로 시료를 취하여 600nm 파장에서 흡광도를 측정하였고(도 8의 A), 배지로 분비 생산된 B4는 농축하지 않은 배양상등액 10㎕를 SDS-PAGE 분석(도 8의 B) 및 Anti-B4를 이용한 웨스턴 블럿(도 8의 C)을 수행하여 분석하였다. 도 8의 A는 YGaST22-B4를 포함하는 형질전환체의 배양중 세포의 성장 정도를 나타내는 그래프이고, 도 8의 B는 YGaST22-B4를 포함하는 형질전환체의 배양상등액을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진이며, 도 8의 C는 YGaST22-B4를 포함하는 형질전환체의 배양상등액을 웨스턴 블럿으로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. 도 8에서 보듯이 YGaST22-B4를 포

함하는 형질전환체를 유가식으로 배양할 경우, B4를 효과적으로 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0048] 다음으로, YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체의 경우에도, 배양중 세포의 성장 정도는 시간별로 시료를 취하여 600nm 파장에서 흡광도를 측정하였고(도 9의 A), 배지로 분비 생산된 B4RB2는 농축하지 않은 배양상등액 10 ㎕를 SDS-PAGE 분석(도 9의 B) 및 Anti-B4RB2를 이용한 웨스턴 블럿(도 9의 C)을 수행하여 분석하였다. 도 9의 A는 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체의 배양중 세포의 성장 정도를 나타내는 그래프이고, 도 9의 B는 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체의 배양상등액을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진이며, 도 9의 C는 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체의 배양상등액을 웨스턴 블럿으로 분석한 결과를 나타내는 사진이다. 도 9에서 보듯이 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체를 유가식으로 배양할 경우, B4RB2를 효과적으로 생산할 수 있음을 확인하였다.

[0049] 상기 방법으로 생산된 각 단백질을 정제하기 위하여, 상기 각 배양물을 원심분리(3,500rpm X 20min X 4℃)하여 배양상등액을 수득하고, 이를 0.1마이크론 크기의 여과막으로 여과하여 균체를 완전히 제거한 다음, 한외여과(분자량 30kDa cut-off) 방법에 적용하여 농축하여 배양농축물을 수득하고, 투석을 통해 상기 배양농축물에 포함된 배양액을 20mM 트리스 완충액(pH8.5)으로 교체하였다.

[0050] **실시예 4: B4와 B4RB2의 정제**

[0051] **실시예 4-1: 음이온 교환 크로마토그래피**

[0052] 상기 실시예 3에서 준비된 각 시료에 우레아를 가하여 최종농도가 8M이 되도록 하고, 음이온 교환 수지인 Q Sepharose(GE healthcare)가 충진된 컬럼(2.2 X 7cm)에 가하여 흡착시키며, 상기 컬럼을 8M 우레아를 포함하는 20mM 트리스 완충액(pH8.5)으로 세척하고, 0 내지 1M NaCl 농도구배 8M 우레아 20mM 트리스 완충액(pH8.5) 300 mℓ로 용출시켜 각 분획을 수득한 다음, 이를 SDS-PAGE로 분석하였다(도 10 및 11). 도 10은 YGaST22-B4를 포함하는 형질전환체 유래시료를 음이온 교환 크로마토그래피로 분리한 결과를 나타내는 그래프 및 상기 분리된 각 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진이고, 도 11은 YGaST22-B4RB2를 포함하는 형질전환체 유래시료를 음이온 교환 크로마토그래피로 분리한 결과를 나타내는 그래프 및 상기 분리된 각 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진이다.

[0053] 도 10에서 보듯이, 상기 형질전환체로부터 발현된 약 5KDa 크기의 B4가 0.1M NaCl에서 용출됨을 확인하였고, 도 11에서 보듯이 상기 형질전환체로부터 발현된 약 19KDa크기의 B4RB2가 0.3M NaCl에서 용출됨을 확인하였다.

[0054] **실시예 4-2: 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC)**

[0055] 상기 실시예 4-1에서 수득한 약 5KDa 크기의 B4 또는 약 19KDa크기의 B4RB2를 포함하는 각 활성분획을 수집 및 농축하여 8M 우레아 20mM 트리스 완충액(pH8.5)에 포함된 각각의 시료를 수득하고, 이에 1M 암모늄설페이트를 가하여 소수성 특성을 향상시켰다. 이어, 상기 각 시료를 소수성 상호작용 수지인 Phenyl sepharose(GE healthcare)가 충진된 컬럼에 가하여 흡착시키고, 상기 컬럼을 8M 우레아 및 1M 암모늄설페이트를 포함하는 20mM 트리스 완충액(pH8.5)으로 세척하며, 1 내지 0M 암모늄설페이트 농도구배 8M 우레아 20mM 트리스 완충액(pH8.5) 50mℓ로 용출시켜 각 분획을 수득한 다음, 이를 SDS-PAGE로 분석하였다(도 12 및 13). 도 12는 B4를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 활성분획을 소수성 상호작용 크로마토그래피로 분리한 결과를 나타내는 그래프 및 상기 분리된 각 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진으로서, 레인 1은 시초 시료이며 레인 2는 결합하지 않은 시료, 레인 3은 분획 20번, 레인4는 분획 24번, 레인 5는 분획 28번, 레인 6은 분획 29번을 나타낸다. 또한, 도 13은 B4RB2를 포함하는 음이온 교환 크로마토그래피 활성분획을 소수성 상호작용 크로마토그래피로 분리한 결과를 나타내는 그래프 및 상기 분리된 각 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과를 나타내는 사진으

로서, 레인 1은 초기 발효농축액이며 레인 2는 Q pool이며 레인 3, 4는 결합하지 않은 시료, 레인 5는 분획 10F번, 레인 6은 분획 13F번, 레인 7은 분획 15F번, 레인 8은 분획 13E번, 레인 9는 분획 12E번, 레인 10은 분획 11E번을 나타낸다.

[0056] 도 12 및 13에서 보듯이, 약 5KDa 크기의 B4와 약 19KDa크기의 B4RB2가 부분적으로 정제되었음을 확인할 수 있었다.

[0057] **실시예 4-3: 역상 HPLC 크로마토그래피**

[0058] 상기 실시예 4-2에서 수득한 약 5KDa 크기의 B4 또는 약 19KDa크기의 B4RB2를 포함하는 각 활성분획을 수집 및 농축하고, 이를 PD-10 컬럼(GE healthcare)에 가하여 흡착시키며, 증류수로 용출시켜 탈염된 각각의 시료를 수득하였다. 상기 수득한 탈염된 각 시료를 건조시키고, 0.1% TFA에 용해시켜서 HPLC용 시료를 각각 수득하였다.

[0059] 우선, B4를 포함하는 HPLC용 시료를 pro C18 column(Agilent)에 가하여 흡착시키고, 0 내지 70% 아세토나이트릴 농도구배 용액으로 30분 동안 용출시켜 각 분획을 수득한 다음, 표준품인 대장균 유래 B4 및 효모 유래 B4의 HPLC 결과와 비교하였다(도 14). 도 14는 B4의 HPLC 분석결과를 나타내는 그래프(A 및 B) 및 전기영동사진(C)으로서, A는 대장균 유래 B4의 HPLC 결과를 나타내는 그래프이고, B는 효모 유래 B4의 HPLC 결과를 나타내는 그래프이며, C는 B4를 포함하는 HPLC용 시료의 HPLC 결과를 나타내는 전기영동사진으로서, 도 14(C)에서 SDS-PAGE의 레인 1은 대장균 유래 표준품 B4이며 레인2는 정제된 효모 B4 단백질이며 레인 3은 도 14(A)의 대장균 유래 표준품 B4의 HPLC peak 1번, 레인4는 대장균 유래 표준품 B4의 HPLC peak 2번이며 레인 5는 도 14(B)의 효모 유래 B4의 HPLC peak 3번, 레인 6은 효모 유래 B4의 HPLC peak 4번을 나타낸다.

[0060] 도 14에서 보듯이, 표준품인 대장균 유래 B4 및 효모 유래 B4의 HPLC 결과와 비교하였을 때 동일한 RT(retention time) 13분대에서 용출되었고, 각 단백질 피크에 해당하는 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과 B4 단백질이 정제되었음을 확인할 수 있었다.

[0061] 다음으로, B4RB2의 경우에도 B4에서와 동일한 방법으로 pro C18 column(Agilent)에 로딩하고 아세토나이트릴 농도 0부터 70%까지 30분 동안 직선 농도구배로 용출시켜 각 분획을 수득한 다음, 표준품인 대장균 유래 B4RB2 및 효모 유래 B4RB2의 HPLC 결과와 비교하였다(도 15). 도 15는 B4RB2의 HPLC 분석결과를 나타내는 그래프(A 및 B) 및 전기영동사진(C)으로서, A는 대장균 유래 B4RB2의 HPLC 결과를 나타내는 그래프이고, B는 효모 유래 B4RB2의 HPLC 결과를 나타내는 그래프이며, C는 B4RB2를 포함하는 HPLC용 시료의 HPLC 결과를 나타내는 전기영동사진으로서, 도 15(C)의 레인 1은 대장균 유래의 표준품 B4RB2이고, 레인2는 효모 유래의 정제된 B4RB2 이며, 레인 3은 도 15(A)의 대장균 유래의 표준품 B4RB2의 HPLC peak 1번, 레인4는 대장균 유래의 표준품 B4RB2의 HPLC peak 2번이며 레인 5는 도 15(B)의 효모 유래의 B4RB2의 HPLC peak 1번, 레인 6은 효모 유래의 B4RB2의 HPLC peak 2번을 나타낸다.

[0062] 상기 도 15에서 보듯이, 표준품인 대장균 유래 B4RB2 및 효모 유래 B4RB2의 HPLC 결과와 비교하였을 때 동일한 RT 13분대에서 용출되었고, 각 단백질 피크에 해당하는 분획을 SDS-PAGE로 분석한 결과 B4RB2 단백질이 정제되었음을 확인할 수 있었다.

[0063] **실시예 5: N 말단 서열분석을 통한 특성분석**

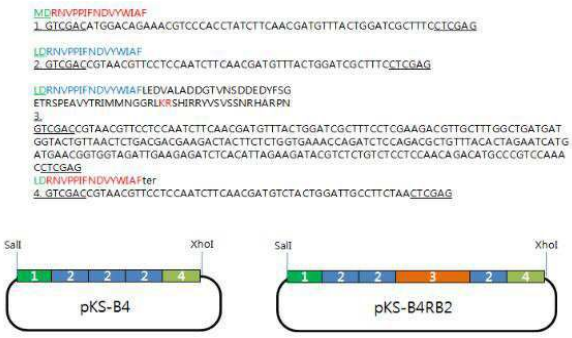
[0064] 실시예 4-3에서 수득한 효모에서 분비 및 정제된 비만백신 B4 및 B4RB2의 특성을 분석하기 위해 이들의 아미노 말단 서열분석을 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 분석하였다. 각 정제단백질을 SDS-PAGE하고 이를 PVDF막으로 전이시켰으며, 상기 PVDF 막을 코마시 블루로 염색하고 50% 메탄올로 탈색한 다음, 자연건조시켜 서열분석용 시료를 준비하였다. 상기 준비된 서열분석용 시료를 Edman degradation 방법을 수행할 수 있는 서열분석장치에

적용하여, N 말단 7개 아미노산의 서열을 분석하였다.

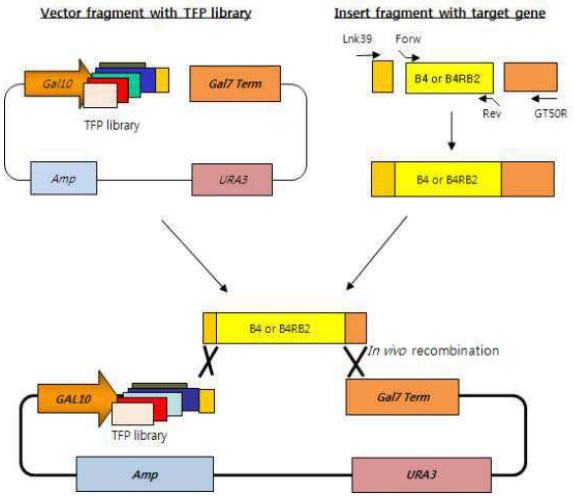
[0065] 그 결과 B4와 B4RB2 모두 DNA 서열로부터 예측한 MDRNVPP와 동일한 서열이 확인되어 효모에서 재조합 생산된 비만백신이 단백질 분비융합인자와 융합상태에서 분비과정중에 정확히 프로세싱되어 완벽한 단백질이 제조되었음을 확인하였다.

도면

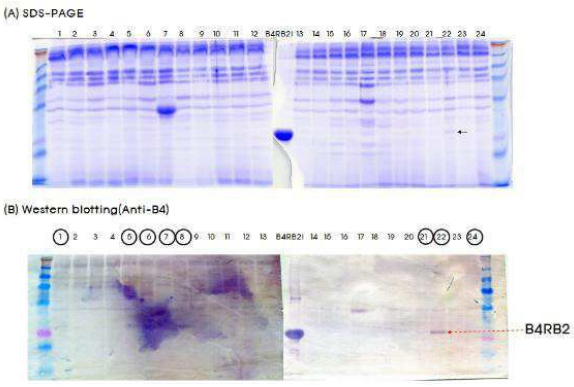
도면1



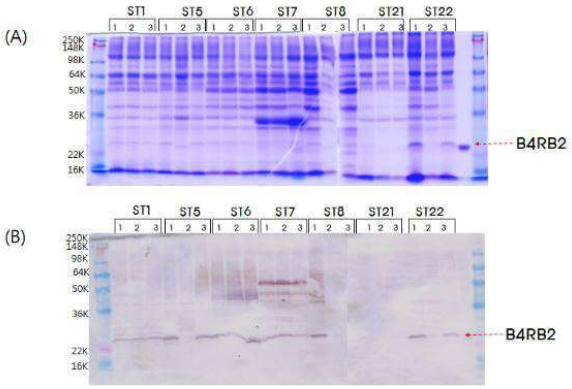
도면2



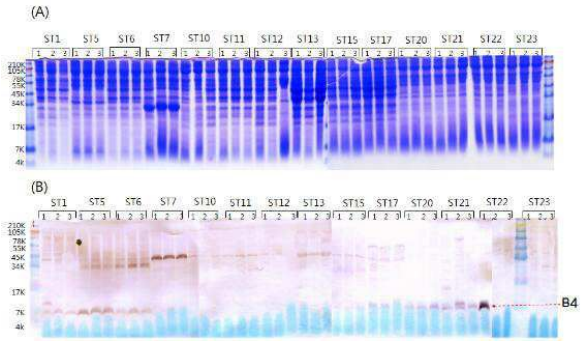
도면3



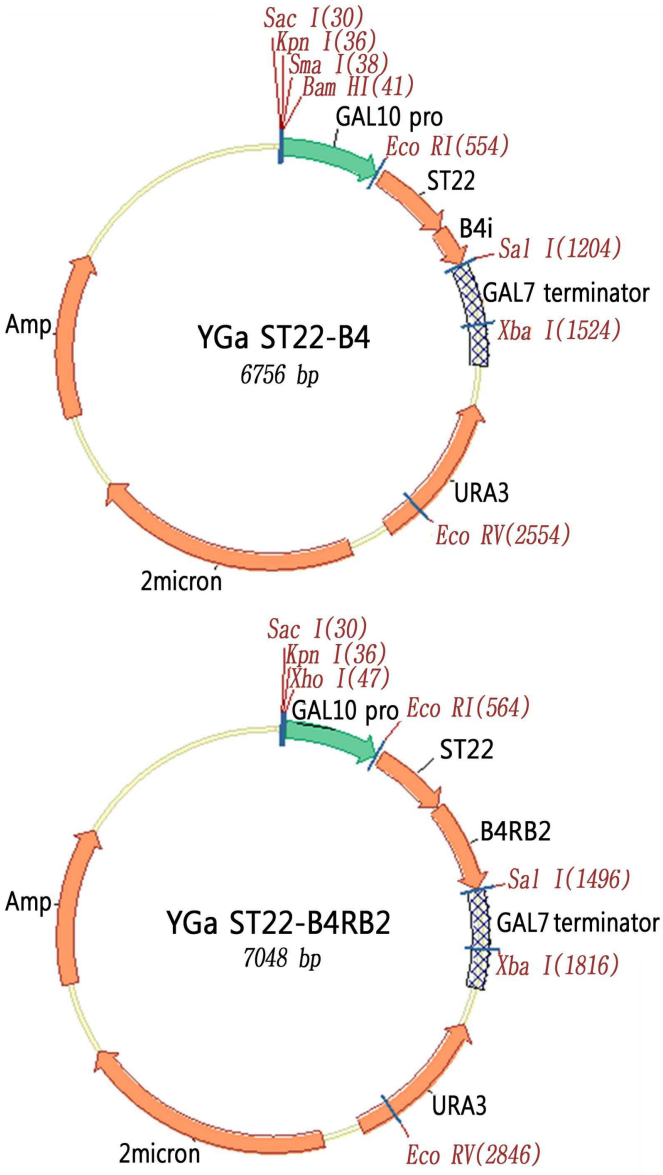
도면4


(A)
ST1
ST5
ST6
ST7
ST8
ST21
ST22
250K
148K
98K
64K
50K
36K
22K
16K
B4RB2
(B)
ST1
ST5
ST6
ST7
ST8
ST21
ST22
250K
148K
98K
64K
50K
36K
22K
16K
B4RB2

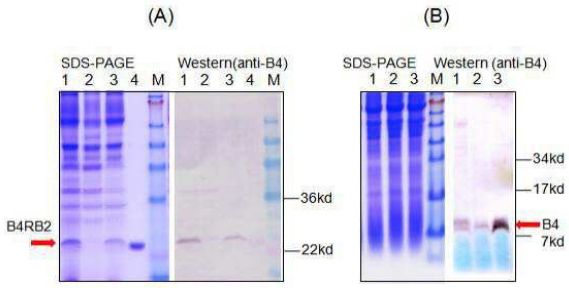
도면5


(A)
ST1
ST5
ST6
ST7
ST10
ST11
ST12
ST13
ST15
ST17
ST20
ST21
ST22
ST23
(B)
ST1
ST5
ST6
ST7
ST10
ST11
ST12
ST13
ST15
ST17
ST20
ST21
ST22
ST23
B4

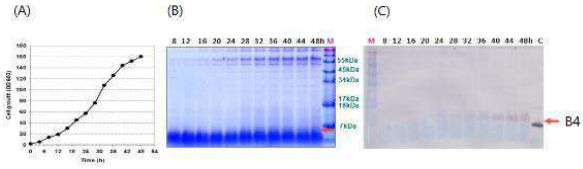
도면6


Sac I(30)
Kpn I(36)
Sma I(38)
Bam HI(41)
GAL10 pro
Eco RI(554)
ST22
B4i
Sal I(1204)
GAL7 terminator
Xba I(1524)
Amp
YGa ST22-B4
6756 bp
URA3
Eco RV(2554)
2micron
Sac I(30)
Kpn I(36)
Xho I(47)
GAL10 pro
Eco RI(564)
ST22
B4RB2
Sal I(1496)
GAL7 terminator
Xba I(1816)
Amp
YGa ST22-B4RB2
7048 bp
URA3
2micron
Eco RV(2846)

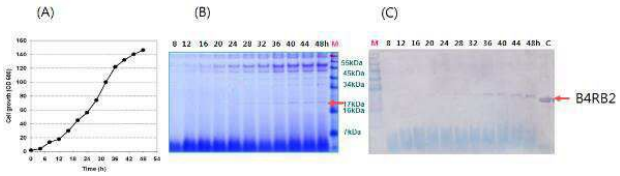
도면7


(A)
SDS-PAGE
1 2 3 4 M
Western(anti-B4)
1 2 3 4 M
B4RB2
36kd
22kd
(B)
SDS-PAGE
1 2 3 M
Western (anti-B4)
1 2 3
34kd
17kd
B4
7kd

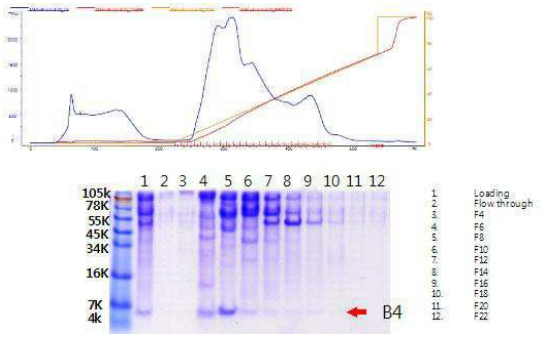
도면8



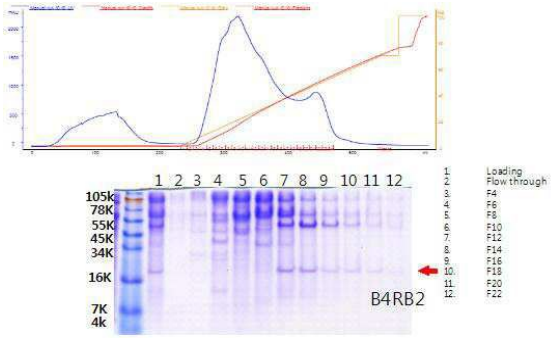
도면9



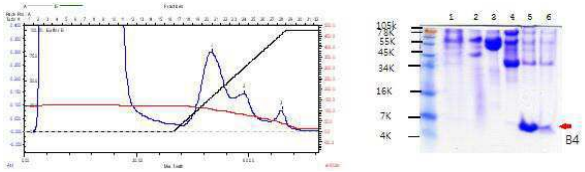
도면10



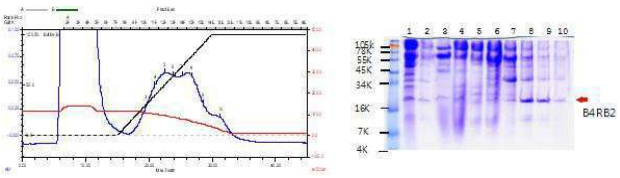
도면11



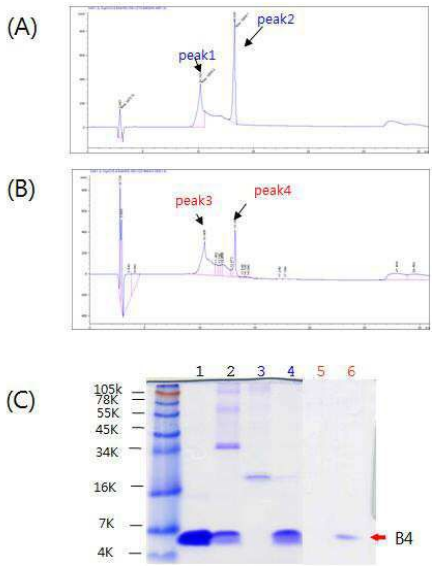
도면12



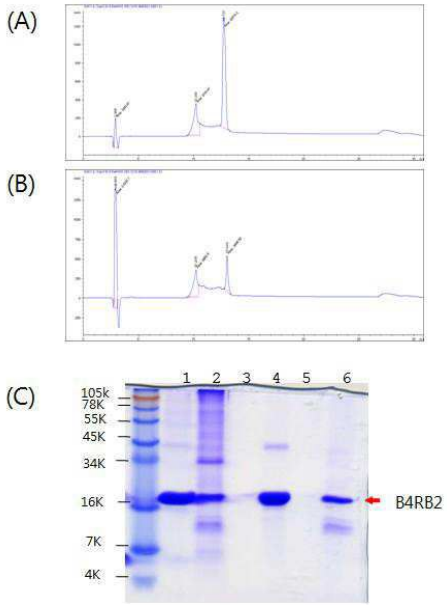
도면13



도면14



도면15



서 열 목 록

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

<120> A recombinant vector comprising translational fusion partner and

a method for mass producing anti-obese vaccine protein using the same

<130> PA110316/KR

<160> 22

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment No. 1

<400> 1

gtcgacatgg acagaaacgt cccacctatc ttcaacgatg tttactggat cgctttcctc 60

gag 63

<210> 2

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment No. 2

<400> 2

gtcgaccgta acgttcctcc aatcttcaac gatgtttact ggatcgcttt cctcgag 57

<210> 3

<211> 240

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment No. 3

<400> 3

gtcgaccgta acgttcctcc aatcttcaac gatgtttact ggatcgcttt cctcgaagac 60

gttgctttgg ctgatgatgg tactgttaac tctgacgacg aagactactt ctctggtgaa 120

accagatctc cagacgctgt ttacactaga atcatgatga acggtggtag attgaagaga 180

tctcacatta gaagatacgt ctctgtctcc tccaacagac atgcccgtcc aaacctcgag 240

240

<210> 4

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fragment No. 4

<400> 4

gtcgaccgta acgttcctcc aatcttcaac gatgtctact ggattgcctt ctaactcgag 60

60

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> primer

<400> 5

ctcgccttag ataaaagaat ggacagaaac gtccca 36

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

actccgttca agtcgactta gaaggcaatc cagtag 36

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ggccgcctcg gcctctgctg gcctcgcctt agataaaaga 40

<210> 8

<211> 49

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gtcattatta aatatatata tatatatatt gtcactccgt tcaagtcga 49

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST1

<400> 9

Met Phe Asn Arg Phe Asn Lys Phe Gln Ala Ala Val Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Ala Leu Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Ser Thr Ser Ser
20 25 30

Ala Asp Leu Ser Ser Ile Thr Ser Val Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ala
35 40 45

Thr Ala Ser Asp Ser Leu Ser Ser Ser Asp Gly Thr Val Tyr Leu Pro
50 55 60

Ser Thr Thr Ile Ser Gly Asp Leu Thr Val Thr Gly Lys Val Ile Ala
65 70 75 80

Thr Glu Ala Val Glu Val Ala Ala Gly Gly Lys Leu Thr Leu Leu Asp
85 90 95

Gly Glu Lys Tyr Val Phe Ser Ser Glu Ala Ala Ser Ala Ser Ala Gly

100 105 110

Leu Ala Leu Asp Lys Arg
115

<210> 10

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST1

<400> 10

atgttcaatc gttttaacaa attccaagct gctgtcgctt tggccctact ctctcgcggc 60

gctctcggtg actcttacac caatagcacc tcctccgcag acttgagttc tatcacttcc 120

gtctcgtcag ctagtgcaag tgccaccgct tccgactcac tttcttccag tgacggtacc 180

gtttatttgc catccacaac aattagcggt gatctcacag ttactggtaa agtaattgca 240

accgaggccg tggaagtcgc tgccggtggt aagttgactt tacttgacgg tgaaaaatac 300

gtcttctcat ctgaggccgc ctcggcctct gctggcctcg ccttagataa aaga 354

<210> 11

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST5

<400> 11

Met Phe Asn Arg Phe Asn Lys Phe Gln Ala Ala Val Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15

Leu Ser Arg Gly Ala Leu Gly Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp
20 25 30

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

Glu Gly Asp Phe Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn
50 55 60

Asn Gly Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys
65 70 75 80

Glu Glu Gly Val Ala Ala Ser Ala Ser Ala Gly Leu Ala Leu Asp Lys
85 90 95

Arg

<210>

12

<211> 291

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST5

<400> 12

atgttcaatc gttttaacaa attccaagct gctgtcgctt tggccctact ctctcgcggc 60

gctctcggtg ctccagtcaa cactacaaca gaagatgaaa cggcactaat tccggctgaa 120

gctgtcatcg gttacttaga tttagaaggg gatttcgatg ttgctgtttt gccattttcc 180

aacagcacaa ataacgggtt attgtttata aatactacta ttgccagcat tgctgctaaa 240

gaagaagggg tggccgcctc ggcctctgct ggcctcgcct tagataaaag a 291

<210> 13

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST6

<400> 13

Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser

1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln

20 25 30

Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Leu Asp Leu Glu Gly Asp Phe

35 40 45

Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu

50 55 60

Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val

65 70 75 80

Ala Ala Ser Ala Ser Ala Gly Leu Ala Leu Asp Lys Arg

85 90

<210> 14

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST6

<400> 14

atgagatttc cttcaatttt tactgcagtt ttattcgcag catcctccgc attagctgct 60

ccagtcaaca ctacaacaga agatgaaacg gcacaaattc cggctgaagc tgtcatcggt 120

tacttagatt tagaagggga tttcgatgtt gctgttttgc cattttccaa cagcacaaat 180

aacgggttat tgtttataaa tactactatt gccagcattg ctgctaaaga agaaggggtg 240

gccgcctcgg cctctgctgg cctcgcctta gataaaaga 279

<210> 15

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST7

<400> 15

Met Val Phe Gly Gln Leu Tyr Ala Leu Phe Ile Phe Thr Leu Ser Cys
1 5 10 15

Cys Ile Ser Lys Thr Val Gln Ala Asp Ser Ser Lys Glu Ser Ser Ser

20 25 30

Phe Ile Ser Phe Asp Lys Glu Ser Asn Trp Asp Thr Ile Ser Thr Ile
35 40 45

Ser Ser Thr Ala Asp Val Ile Ser Ser Val Asp Ser Ala Ile Ala Val
50 55 60

Phe Glu Phe Asp Asn Phe Ser Leu Leu Asp Ser Leu Met Ile Asp Glu
65 70 75 80

Glu Tyr Pro Phe Phe Asn Arg Phe Phe Ala Asn Asp Val Ser Leu Thr
85 90 95

Val His Asp Asp Ser Pro Leu Asn Ile Ser Gln Ser Leu Ser Pro Ile
100 105 110

Met Glu Gln Phe Thr Val Asp Glu Leu Pro Glu Ser Ala Ser Asp Leu
115 120 125

Leu Tyr Glu Tyr Ser Leu Asp Asp Lys Ser Ile Val Leu Phe Lys Phe
130 135 140

Thr Ser Asp Ala Tyr Asp Leu Lys Lys Leu Asp Glu Phe Ile Asp Ser
145 150 155 160

Cys Leu Ser Phe Leu Glu Asp Lys Ser Gly Asp Asn Leu Thr Val Val

165 170 175

Ile Asn Ser Leu Gly Trp Ala Phe Glu Asp Glu Asp Gly Asp Asp Glu
180 185 190

Tyr Ala Thr Glu Glu Thr Leu Ser His His Asp Asn Asn Lys Gly Lys
195 200 205

Glu Gly Asp Asp Leu Ala Ala Ser Ala Ser Ala Gly Leu Ala Leu Asp

210 215 220

Lys Arg

225

<210> 16

<211> 678

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST7

<400> 16

atggtgttcg gtcagctgta tgccctttc atcttcacgt tatcatgttg tatttccaaa 60

actgtgcaag cagattcatc caaggaaagc tcttccttta tttcgttcga caaagagagt 120

aactgggata ccatcagcac tatatcttca acggcagatg ttatatcatc cgttgacagt 180

gctatcgctg tttttgaatt tgacaatttc tcattattgg acagcttgat gattgacgaa 240

gaatacccat tcttcaatag attctttgcc aatgatgtca gtttaactgt tcatgacgat 300

tcgcctttga acatctctca atcattatct cccattatgg aacaatttac tgtggatgaa 360

ttacctgaaa gtgcctctga cttactatat gaatactcct tagatgataa aagcatcgtt 420

ttgttcaagt ttacctcgga tgcctacgat ttgaaaaaat tagatgaatt tattgattct 480

tgcttatcgt ttttggaaga taaatctggc gacaatttga ctgtggttat taactctctt 540

ggttgggctt ttgaagatga agatggtgac gatgaatatg caacagaaga gactttgagc 600

catcatgata acaacaaggg taaagaaggc gacgatctgg ccgcctcggc ctctgctggc 660

ctcgccttag ataaaaga 678

<210> 17

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST8

<400> 17

Met Leu Gln Ser Val Val Phe Phe Ala Leu Leu Thr Phe Ala Ser Ser

1 5 10 15

Val Ser Ala Ile Tyr Ser Asn Asn Thr Val Ser Thr Thr Thr Thr Leu

20 25 30

Ala Pro Ser Tyr Ser Leu Val Pro Gln Glu Thr Thr Ile Ser Tyr Ala

35 40 45

Asp Asp Leu Ala Ala Ser Ala Ser Ala Gly Leu Ala Leu Asp Lys Arg

50 55 60

<210> 18

<211> 192

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST8

<400> 18

atgcttcaat ccgttgtctt tttcgctctt ttaaccttcg caagttctgt gtcagcgatt 60

tattcaaaca atactgtttc tacaactacc actttagcgc ccagctactc cttggtgccc 120

caagagacta ccatatcgta cgccgacgac ctggccgcct cggcctctgc tggcctcgcc 180

ttagataaaa ga 192

<210> 19

<211> 176

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST21

<400> 19

Met Lys Phe Ser Ser Ala Leu Val Leu Ser Ala Val Ala Ala Thr Ala

1 5 10 15

Leu Ala Glu Ser Ile Thr Thr Thr Ile Thr Ala Thr Lys Asn Gly His

20 25 30

Val Tyr Thr Lys Thr Val Thr Gln Asp Ala Thr Phe Val Trp Gly Gly

35 40 45

Glu Asp Ser Tyr Ala Ser Ser Thr Ser Ala Ala Glu Ser Ser Ala Ala

50 55 60

Glu Thr Ser Ala Ala Glu Thr Ser Ala Ala Ala Thr Thr Ser Ala Ala

65 70 75 80

Ala Thr Thr Ser Ala Ala Glu Thr Ser Ser Ala Ala Glu Thr Ser Ser

85 90 95

Ala Asp Glu Gly Ser Gly Ser Ser Ile Thr Thr Thr Ile Thr Ala Thr

100 105 110

Lys Asn Gly His Val Tyr Thr Lys Thr Val Thr Gln Asp Ala Thr Phe

115 120 125

Val Trp Thr Gly Glu Gly Ser Ser Asn Thr Trp Ser Pro Ser Ser Thr

130 135 140

Ser Thr Ser Ser Glu Ala Ala Thr Ser Ser Ala Ser Thr Thr Ala Thr

145 150 155 160

Thr Leu Leu Ala Ala Ser Ala Ser Ala Gly Leu Ala Leu Asp Lys Arg

165 170 175

<210> 20

<211> 528

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST21

<400> 20

atgaaattct cttccgcttt ggttctatct gctgttgccg ctactgctct tgctgagagt 60

atcaccacca ccatcactgc caccaagaac ggtcatgtct acactaagac tgtcacccaa 120

gatgctactt ttgtttgggg tggtgaagac tcttacgcca gcagcacttc tgccgctgaa 180

tcttctgccg ccgaaacttc tgccgccgaa acctctgctg ccgctaccac ttctgctgcc 240

gctaccactt ctgctgctga gacttcttct gctgctgaga cttcttctgc tgatgaaggt 300

tctggttcta gtatcactac cactatcact gccaccaaga acggtcacgt ctacactaag 360

actgtcaccc aagatgctac ttttgtctgg actggtgaag gcagcagcaa cacctggtct 420

ccaagtagta cctctaccag ctcagaagct gctacctctt ctgcttcaac cactgcaacc 480

accctgctgg ccgcctcggc ctctgctggc ctcgccttag ataaaaga 528

<210> 21

<211> 138

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST22

<400> 21

Met Lys Phe Gln Val Val Leu Ser Ala Leu Leu Ala Cys Ser Ser Ala

1 5 10 15

Val Val Ala Ser Pro Ile Glu Asn Leu Phe Lys Tyr Arg Ala Val Lys
20 25 30
Ala Ser His Ser Lys Asn Ile Asn Ser Thr Leu Pro Ala Trp Asn Gly
35 40 45
Ser Asn Ser Ser Asn Val Thr Tyr Ala Asn Gly Thr Asn Ser Thr Thr
50 55 60
Asn Thr Thr Thr Ala Glu Ser Ser Gln Leu Gln Ile Ile Val Thr Gly
65 70 75 80

Gly Gln Val Pro Ile Thr Asn Ser Ser Leu Thr His Thr Asn Tyr Thr
85 90 95
Arg Leu Phe Asn Ser Ser Ser Ala Leu Asn Ile Thr Glu Leu Tyr Asn
100 105 110
Val Ala Arg Val Val Asn Glu Thr Ile Gln Asp Asn Leu Ala Ala Ser
115 120 125
Ala Ser Ala Gly Leu Ala Leu Asp Lys Arg
130 135

<210> 22

<211> 414

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ST22

<400> 22

atgaagttcc aagttgtttt atctgccctt ttggcatgtt catctgccgt cgtcgcaagc 60

ccaatcgaaa acctattcaa atacagggca gttaaggcat ctcacagtaa gaatatcaac 120

tccactttgc cggcctggaa tgggtctaac tctagcaatg ttacctacgc taatggaaca 180

aacagtacta ccaatactac tactgccgaa agcagtcaat tacaaatcat tgtaacaggt 240

ggtcaagtac caatcaccaa cagttctttg acccacacaa actacaccag attattcaac 300

agttcttctg ctttgaacat taccgaattg tacaatgttg cccgtgttgt taacgaaacg 360

atccaagata acctggccgc ctcggcctct gctggcctcg ccttagataa aaga 414