

발간등록번호

11-1543000-000658-01

돼지 점막면역증진을 위한 신기술 개발

돼지 점막면역증진을 위한 신기술
개발
(생명산업기술개발사업)
(Development of new mucosal
immunity-enhancing techniques for
swine)

주 의
(편집순서 8)

제주대학교 산학협력단

농림축산식품부

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “돼지 점막면역증진을 위한 신기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2014년 10월 일

주관연구기관명 : 제주대학교

주관연구책임자 : 주 홍 구

세부연구책임자 : 주 홍 구

연 구 원 : 변 윤 영

연 구 원 : 고 은 주

연 구 원 : 김 지 미

연 구 원 : 문 선 영

연 구 원 : 임 설 화

협동연구기관명 : 강원대학교

협동연구책임자 : 한 태 옥

연 구 교 수 : 윤 장 원

연 구 원 : 박 영 순

연 구 원 : 김 기 주

연 구 원 : 박 소 연

협동연구기관명 : (주)고려비엔피

협동연구책임자 : 정 청 환

연 구 원 : 강 정 무

연 구 원 : 이 종 암

연 구 원 : 손 현 희

요 약 문

I. 제 목

돼지 점막면역증진을 위한 신기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

돼지의 질병 중 상당수가 점막을 통해서 감염이 되고 있는 실정이다. 특히 호흡기 및 소화기 질병에서 병원체를 감염초기단계에서 예방하는데 점막면역의 유도가 필수적이다. 이에 돼지 점막을 통한 질병전파를 예방할 목적으로 점막면역을 증진시킬 수 있는 신기술을 개발하고자 한다. 이를 위해, 본 과제에서는 돼지의 점막면역을 효과적으로 유도할 수 있는 어쥬번트 (adjuvant)를 개발하고, 점막유도에 효과적인 것으로 알려진 약독화된 살모넬라 변이주를 이용하여 이중항원을 발현시켜 점막면역을 유도하고자 한다. 이러한 신기술은 돼지에서 날로 늘어나는 급성 전염병을 제어하여 축산농가의 소득증대에 기여하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

돼지의 점막면역을 증진하기 위한 신기술 개발로서 돼지에 적용이 가능하면서도 점막면역을 증진시킬 수 있는 어쥬번트를 탐색한다. 이를 위해 돼지의 수지상세포에서 항체생성에 밀접하게 관여하는 B-cell activation factor (BAFF) 발현체계를 이용하여 어쥬번트를 선별하고자 한다. 또 하나의 신기술 개발전략으로 점막면역을 증진시킬 수 있는 살모넬라 운반체를 개발하고 이중항원을 안정적으로 발현할 수 있는 시스템을 구축한다. 이를 통해 돼지의 위축성비염과 마이코플라즈마성 폐렴을 예방할 수 있는 새로운 점막면역 유도기술을 개발하고자 한다. 이러한 점막면역 유도기술의 실현을 뒷받침하기 위해 어쥬번트 후보물질에 대한 안전성 시험과 후보균주를 이용한 항원을 생산한다. 또한 점막면역 백신의 제품화 과정을 위한 시험 등을 수행한다.

IV. 연구개발결과

[1차년도]

세부팀에서는 표준항원(ovalbumin)을 이용해서 마우스 점종실험(*in vivo*)을 실시했으며 serum, intestinal lavage 등의 시료에서 항원특이적인 IgG, IgA를 정량하였다. 또한 비장세포를 채취한 후 항원재자극시험(*in vitro*)을 실시하였고, inguinal lymph node 세포로 면역시험을 실시하였다. BAFF 단백질의 분석을 위해 western blot과 유세포 분석을 실시하였으며, retinoic acid (RA)의 면역증진효과 확인을 위한 마우스 점종실험(*in vivo*)을 실시하였으며, serum, bronchoalveolar lavage 등의 시료에서 *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) 항원특이적인 IgG, IgA를 정량하였다.

협동1팀에서는 이중항원을 운반하는 운반체로 점막면역을 유도하는 살모넬라 균주를 선발하기 위해 3가지 살모넬라 혈청형 SE($\Delta aroA$), SG($\Delta ssrAB\Delta hmp\Delta rpoS\Delta ppk\Delta aroA$) 및 ST($\Delta ssrAB\Delta hmp\Delta rpoS\Delta ppk\Delta aroA$) 변이주를 제작한 후 마우스 경구 점종과 복강 점종을 실시하여 IgG1과 IgA를 가장 많이 분비하는 혈청형의 변이주를 ELISA와 ELISPOT을 통해 선발하였다.

그 결과 SE 및 ST 변이주가 효과적인 면역반응을 유도하였으며, 특히 SE 변이주를 경구로 접종한 경우 IgG1과 IgA의 생성반응을 가장 잘 유도하는 것으로 나타났다. 따라서 3가지 살모넬라 혈청형 중 이중항원을 운반하는 운반체로 SE 변이주를 경구로 접종할 때 체액성 면역 및 점막면역을 가장 잘 유도하는 것으로 확인되었다.

협동2팀에서는 선발된 어쥬번트 2종류 (retinoic acid와 zymosan)를 마우스와 기니픽에 접종하여 이상 유무를 관찰하였다. 이때 마우스는 복강 내에, 기니픽은 피내에 0.1ml 씩 접종하였다.

[2차년도]

세부팀에서는 현재 동물용백신에 사용하는 Montanide 어쥬번트 4종에 retinoic acid(RA)를 병용투여하여 사용할 수 있는 지, 혼합 후 용해도, 세포독성, 마우스를 이용한 안전성실험을 수행하였다. 비장세포에 fucoidan을 처리해서 활성화마커와 BAFF의 발현, plasma cell의 분화 여부를 확인하였으며, *B. bronchiseptica* 백신항원과 ovalbumin(OVA) 표준항원과 함께 fucoidan을 접종해서 항원특이적인 항체를 확인하였다. 또한 ginsenoside Rp1의 면역조절작용과 젓갈균의 수지상세포에 대한 기능변화를 연구하였다. *B. bronchiseptica* 균체가 면역싸이토카인(IL-12)의 생산을 유도하는지, IL-2의존적인 림프구 생존율에 영향을 주는지 여부를 확인하였다.

협동1팀에서는 최종 구축된 *in vivo* inducible 이중항원 발현 벡터시스템(pJYTH01로 명명)에 대한 primer walking 분석을 실시했으며, 유전체 정보 분석을 통한 염기서열 분석을 완료하였다. 또한 1차년도에서 구축된 이중항원 발현시스템(arabinose-inducible pGEYH01)와 pJYTH01에 이중항원으로서 녹색형광단백질(GFP; green fluorescent protein) 유전자를 삽입한 후 형광현미경 및 막단백질 분획·정제를 통한 재조합 GFP의 표면발현 여부를 확인하였다. 또한 살모넬라균 *ompA* 기반 이중항원이 함유된 재조합 플라스미드를 구축하기 위해 돼지에서 위축성 비염의 원인균인 *B. bronchiseptica*의 병원성 유전자 pertactin(PRN)과 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 원인균인 *M. hyopneumoniae*의 adhesin 단백질인 P97중 epitope motif를 각각 PCR로 증폭하여 arabinose 유도성 과발현 플라스미드(pGEYH01)와 살모넬라 *SsaG* promoter를 가지고 있는 *in vivo* 유도성 플라스미드(pJYTH01)에 도입하여 이중항원 발현시스템을 위한 재조합 플라스미드를 구축하였다.

협동2팀에서는 선발된 어쥬번트 후보물질 6종을 가지고 제조한 시험용 어쥬번트를 실험동물(기니픽)에 접종하였다. 2그룹으로 나누어 한그룹은 0.1ml 씩 피내에 접종하고 다른 한그룹은 2ml를 근육에 접종하여 접종반응 및 접종부위의 이상 유무를 관찰하였다.

[3차년도]

세부팀에서는 마우스에 백신후보물질을 접종한 후 *B. bronchiseptica* 생균을 이용하여 공격 접종실험을 실시하였다. 또한 백신후보물질을 목적동물인 돼지에 접종하여 *B. bronchiseptica* 항원특이적인 항체를 얼마나 많이 생산하는지 검정하였다. 돼지로부터 골수세포를 채취하여 어쥬번트가 세포성면역의 주요 면역싸이토카인인 인터페론-감마의 생산할 수 있는지 확인하였다. 마우스 비장세포를 이용하여 어쥬번트 후보물질의 면역자극 효능실험을 실시했는데 생존율과 핵염색, annexin V/propidium iodide 염색을 통해 고분자 fucoidan이 가장 높은 면역자극능을 가진 사실을 확인했다. 기타 어쥬번트 후보물질을 분석하였는데, 인삼 ginsenoside 중 하나인 ginsenoside(G)-Rp1이 수지상세포에 특이적으로 일정한 농도에서 면역자극효과가 있음을 밝혔고, 본 연구과제에서 백신항원으로 사용되었던 *B. bronchiseptica* 항원이 자체적으로

어췌변트로서 효과가 있어 다른 백신항원의 면역원성을 높이는 역할을 할 수 있다는 사실을 알았다.

협동1팀에서는 1차년도에서 선별된 SE(Δ aroA) 변이주를 대상으로 phage λ -red recombinase system을 이용하여 ompA 유전자를 추가로 제거하여 약독화 살모넬라 변이주 IVK B01M121(SE Δ aroA Δ ompA)를 제작하였다. 또한 살모넬라균 ompA 기반 이중항원이 함유된 재조합 플라스미드를 구축하기 위해 PCR기법으로 *B. bronchiseptica*의 두 가지 pertactin type(1-3a/2-7a, 1-3a/2-8b)의 면역우세 epitope P1과 aP2, bP2 유전자를 각각 증폭하였으며, *M. hyopneumoniae*는 adhesin P97R1, R2 유전자를 증폭하였다. 이들 유전자를 포함한 재조합 항원을 발현하는 *E. coli* 시스템을 구축하였다. 위와 같은 방법으로 *E. coli* plasmid DNA를 SE(Δ aroA Δ ompA) 변이주 내로 형질전환하여 방어항원을 발현하는 재조합 살모넬라 변이주를 구축하였다. 그 다음 염기서열을 분석한 결과, P1aP2, P1bP2, R1R2 유전자가 SE(Δ aroA Δ ompA) 변이주 내로 삽입된 것을 확인하였으며, 각 유전자의 염기서열 또한 NCBI database와 99% 이상 일치하였다. 위와 같이 제작된 이중항원을 발현하는 약독화 살모넬라 변이주를 각각 IVK B01M123(pJYTH-P1aP2), IVK B01M124(pJYTH-P1bP2), IVK B01M125(pJYTH-R1R2)로 명명하였다. 이중항원을 발현하는 살모넬라 변이주를 마우스에 경구와 비강으로 접종한 후 0, 14, 28, 42일 (0, 14, 28, 42 DPI)에 혈청을 채취하여 *Salmonella*-specific IgG의 항체가를 조사하였다. 그 결과, 경구 접종과 비강 접종에 따른 항체가는 경구접종에 비해 비강접종이 더 높은 수준의 항체가를 나타내며 효과적인 점막면역을 유도하였다. 따라서 살모넬라균 운반체를 이용한 ompA 기반의 이중항원 함유 재조합표면단백질의 *in vivo* 발현시스템이 비강점막에서 매우 효과적으로 면역반응을 유도한다고 볼 수 있다.

협동2팀에서는 위축성비염 후보백신을 돼지에 접종하여 안전성 평가와 효능실험을 실시하였다. 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 설사 등의 부작용이 없이 모두 아무 이상 없이 생존 하였다. 백신을 2주 간격으로 2차례 접종한 후 채혈하였고 혈청을 세부팀에 보내 백신항원 특이적인 항체가를 확인하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

백신항원으로 사용되었던 *B. bronchiseptica*를 포함한 백신개발을 통해 돼지에서 위축성비염의 예방을 위한 백신을 상품화할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 관련된 감염증을 효과적으로 예방하여 축산식품의 안전성을 확보함과 동시에 양돈농가의 소득향상이 기대된다. 연구과제의 수행과정에서 축적되었던 기초과학 및 응용기술 들을 통해 학계와 산업계에 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 예상된다. 실제 돼지의 질병예방을 위해 점막면역을 증진시켜야 상황이 많이 있음에도 관련된 연구는 극히 미미한 실정이다. 본 과제에서 돼지 면역세포 중 수지상세포와 관련된 점막면역유도기전 연구와 살모넬라 운반체를 이용한 신개념의 돼지 점막면역유도 기술은 향후 응용 가능성이 매우 많을 것으로 예상된다. 또한 이러한 점막면역 증진기술은 호흡기 및 소화기에서 주로 발생하는 다양한 질병의 예방백신에 적용할 수 있을 것으로 기대된다.

SUMMARY

A variety of diseases in swine are infected through mucosal membrane. Especially, the diseases of respiratory and gastro-intestinal system should be first protected by enhancing mucosal immunity. This study focused the development of adjuvant for mucosal immunity and attenuated Salmonella mutants expressing vaccine antigen. This new technology is expected to increase the farms breeding swine.

To enhance the mucosal immunity, we developed the adjuvants that boost the mucosal immune responses and can be applicable in swine. The BAFF/APRIL expression system was used to screen the candidates of adjuvant. And also, a Samonella carrier system was developed to express vaccine antigen. The target of these strategies is the development of a new vaccine for preventing swine atrophic rhinitis. To support the establishment of inducing technology of mucosal immunity, the safety test for adjuvant and the production of vaccine antigen were performed.

This study used multiple antigens, ovabumin and *Bordetella (B.) bronchiseptica* to investigate antigen-specific immune responses. Western blot and flow cytometric analysis were performed to measure the expression of BAFF. Antigen-specific IgG and IgA was determined. Retinoic acid has been known to closely involve the mucosal immunity. And also, we investigated the its feasibility of in a combination of Montanide adjuvants including solubility, cytotoxicity. Several candidates for adjuvants, fucoidans and ginsenoside-Rp1, were tested for its immunostimulatory activity. We challenged the mice immunized with vaccine candidates with live *B. bronchiseptica* bacteria. The vaccine candidates were inoculated into piglets and then the level of antigen-specific antibody was titrated. The bone marrow cells were treated with adjuvants and the production of interferon-gamma was measured. Several kinds of experiments demonstrated that high molecular-weight fucoidan has high immunostimulating activity.

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhp) and *B. bronchiseptica* (Bb) are highly transmissible respiratory pathogens that is etiological agents of atrophic rhinitis, bronchopneumonia and important primary and secondary pathogens of porcine respiratory disease complex (PRDC) in pigs. The disease constitutes a major public health burden in the swine industry worldwide. Several studies have shown that pertactin is important for protective immunity against *B. bronchiseptica*. Pertactin protein has two repeated regions, and region1(P1) and 2(P2) are identified and characterized as an immunodominant protective-epitope. P97 is a major attachment protein in Mhp and the antibody specific to P97 has been shown protective for Mhp

infection. R1 and R2 motif is major protective epitope in P97 and the recombinant R1 and R2 has been shown protective antigens. In addition, attenuated *Salmonella enterica* serovars Enteritidis (SE) mutant deleted *aroA* and *ompA* gene was constructed by phage λ -red recombinase system and the SE mutant is proved safe and immunogenic. We compared the immunogenicity of oral and intra-nasal (i.n.) vaccination with the recombinant SE mutants expressing P1 and P2 domain antigens of Bb and R1R2 domain of Mhp in BALB/c mice. All immunized mice survived without any symptoms and clinical signs of disease during entire experiment period. Primary immunization with recombinant SE mutant (pJYTH-P1P2) vaccine given both oral and i.n. induced significant levels of serum anti-*Salmonella*, anti-rP1P2, anti-R1R2 immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody responses. A similar trend was observed in BALF samples of inoculated mice. However, feces sample from i.n. immunized mice had detectably low levels of rP1P2- or rR1R1 specific IgA. Our results have shown that oral and i.n. inoculation of the SE mutant expressing P1 and P2 domain of the pertactin of Bb and R1 and R2 domain of Mhp produced good immune responses against Bb, Mhp, but also SE in mice. We suggest that this mutant could be an effective vaccine candidate.

To evaluate their safety and efficacy, we administrated vaccine candidates into swine. There is no significant side effects and the titer of vaccine antigen-specific antibody in the serum of inoculated pigs was evaluated. Two selected adjuvants (retinoic acid and zymosan) were tested for their side effects in mouse and guinea pig. And also, 6 other adjuvant candidates were inoculated into guinea pig (skin and muscle).

From our study, a new vaccine containing *B. bronchiseptica* will be developed and it can protect pigs from the related diseases. This vaccine is expected to increase the income of swine farms. And also, the knowledge acquired during study will be helpful for basic and applied sciences. The study of enhancing mucosal immunity in swine has been required, but very few. This study provides some valuable information about the enhancing technology of mucosal immunity and a carrier system using *Salmonella*. And also, we expect that this technology can be applicable for the development of prophylactic vaccines to prevent respiratory and gastro-intestinal diseases.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Proposal notice	
Summary in Korean	1
SUMMARY	4
CONTENTS (영문목차)	6
Contents in Korean	7
Chapter 1. Introduction of the research project	8
Section 1. Research significance and background	8
Chapter 2. Present state of development of the research	13
Section 1. Present state of the research	13
Chapter 3. Achievement contents and results	15
Section 1. Contents and results of the 1st research year	15
Section 2. Contents and results of the 2nd research year	53
Section 3. Contents and results of the 3rd research year	94
Chapter 4. Achievements and Contribution to related industry	122
Chapter 5. Practical Use and plan for field application	124
Chapter 6. Oversea gathering of information and technology	125
Chapter 7. Report of new research instrument	126
Chapter 8. References	127

목 차

제출문	
요약문	1
SUMMARY	4
CONTENTS (영문목차)	6
목차	7
제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 1 절 연구개발의 중요성 및 필요성	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 1 절 국내외 기술개발 현황	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	15
제 1 절 1차년도 세부과제별 연구내용 및 결과	15
제 2 절 2차년도 세부과제별 연구내용 및 결과	53
제 3 절 3차년도 세부과제별 연구내용 및 결과	94
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	122
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	124
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	125
제 7 장 연구시설·장비 현황	126
제 8 장 참고문헌	127

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 중요성 및 필요성

- 점막면역증진을 위해 약독화백신의 개발과 함께 근육주사용 백신의 개발이 필요함
- 돼지의 점막면역을 효과적으로 유도할 수 있는 Muco-adjvant의 개발이 필요함
- 호흡기 및 소화기 점막면역을 유도하여 병원체의 감염초기단계에서의 예방이 필요함
- 약독화된 살모넬라 변이주를 응용한 이중항원의 발현과 이를 통한 점막면역의 유도가 필요

[세부과제]

점막면역 유도를 위해 근육백신이 개발이 필요

- 점막면역을 유도하기 위해 약독화된 균체를 이용한 점막백신을 주로 사용하고 있다. 그러나 점막백신은 근육백신에 비해 면역세포로의 항원전달 효율이 상대적으로 낮을 수 있다.
: 점막백신의 경우, 백신항원이 장부위의 M cell을 통해 peyer's patch까지 도달해야 면역반응을 일으킬 수 있는데 첫째, 위장관에 들어간 백신항원은 음식물에 의해 희석되기 쉽고 위에서 위산, 십이지장에서 단백질분해효소 등에 의해 공격받아 분해되기 쉽다. 둘째, 위장관 자체의 길이에 의해 식도로부터 M cell까지의 항원전달거리가 멀어 항원전달 또는 면역세포 targeting이 매우 어렵다. 셋째, 돼지와 같은 산업동물의 경우 근육백신에 비해 점막백신은 적용성이 용이하지 않아 노동력이 많이 필요하고 효과측면에서 접종하는 사람에 따른 개인차가 심하다.
- 따라서 점막백신으로 사균백신의 적용가능성은 상대적으로 매우 낮은 반면 생균백신은 특유의 질병발병기전에 의해 M cell, intestinal epithelium, peyer's patch까지 도달이 가능하므로 상대적으로 적용가능성이 높지만 앞에서 열거된 이유들에 의해 효율성이 떨어질 수 있으므로 점막면역증진을 위해 약독화백신의 개발과 더불어 근육주사용 점막백신의 개발이 필요하다.

백신 = 백신항원 + adjuvant + α (Muco-adjvant)

돼지의 점막면역을 향상시킬 수 있는 Muco-adjvant의 개발이 필요

- 백신은 질병의 원인이 되는 병원성 미생물로 이루어진 백신항원과 숙주의 면역체계를 활성화 시킬 수 있는 adjuvant로 구성되어 있다. 그러나 현재 사용되는 백신의 adjuvant는 숙주의 전신(시스템)면역을 활성화시키는 물질로 점막면역의 활성화에는 그 효과가 미미하다. 따라서 점막에서 주로 발병하는 질환을 예방하기 위해서는 점막면역을 효과적으로 자극할 수 있는 점막면역용 adjuvant(**Muco-adjvant**)의 개발이 절실하다.
- 최근 사람과 마우스가 대상인 학술적 연구에서 점막면역을 효과적으로 자극할 수 있는 유효물질이 다수 검색되어 그 작용기전에 대한 연구가 발표되어왔다. 특히 면역세포에서 B

cell-activating factor(이하 **BAFF**)와 a proliferation-inducing ligand(이하 **APRIL**)의 발현은 점막면역의 형성과 밀접한 사실이 밝혀졌다(Massacand JC, et al., 2008). 하지만 돼지와 같은 산업동물에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이어서, 돼지에 실제 적용이 가능한 Muco-adjuvant에 대한 연구가 필요하다.

[협동1과제]

- 점막면역의 유도는 병원체를 감염초기에 방어를 할 수 있기 때문에 숙주에 병원체가 전신성으로 이행되는 것을 제어하는 효율적이고 신속한 방법임. 점막면역을 유도시키기 위해서는 병원체 또는 이로부터 분리된 항원을 점막에 노출시키는 것이 효과적이면서 유일한 방법임. 아래의 표는 점막경로로 백신을 투여 시 나타날 수 있는 장점을 간추린 것임.

표 1. 점막경로를 통해 투여한 백신이 지니는 장점

점막경로	비점막 경로
낮은 반응성	투여후 비교적 큰 반응성 (부작용이 있음.)
높은 적응성/ 순응성이 높음	통증 유발 = 낮은 적응성 및 순응성
투여부위와 목표부위가 일치	투여부위와 목표부위가 상이함
전신성과 점막면역이 동시에 유도	전신성 면역만 유도
임상증상은 물론 감염단계에서 차단	주로 임상증상을 완화시킴
교차오염이 없고 안전성이 높음	교차오염이 일어날 가능성이 높음
투여방법의 수월성	투여방법이 다소 어렵고 전문성이 필요
저렴한 운반비용	운반비용이 다소 높음

- 점막면역을 유도하는 운반체로는 생바이러스, 생균운반체, 점막면역용 부형제 (mucosal adjuvants), 바이러스 입자. ISCOMS, liposomes, microparticle, transgenic plant등이 있으나 이중 생균운반체가 점막면역은 물론 체액성 면역 및 세포매개성 면역을 유도하는데 효과적인 것으로 보고됨. 또한 생균운반체의 경우 생산비용이 다른 운반체에 비해 저렴하고 제조의 수월성이 높으며 환경내에서 긴 반감기, 안정성이 높은 장점을 지님.
- 점막면역을 유도하기 위한 생균 운반체로는 *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholera*, *Shigella* spp., *Mycobacteria bovis*, *Bacillus anthracis*, *Lactobacillus* spp. *Staphylococcus* spp. 등을 사용하였고 이에 대한 연구가 진행되고 있음.
- 이중 *Salmonella*는 다른 세균에 비해 많은 연구가 진행되어 왔고 약독화 변이주에 대한 특성연구가 가장 다양하게 진행되어 왔으며 세균, 바이러스, 기생충, 암세포에서 고안된 이중항원을 운반하여 이들 항원에 대한 국소점막면역은 물론 강한 전신성 면역을 유발하는 것으로 보고되어짐. 따라서 본 연구과제에서는 약독화된 살모넬라균을 점막면역을 유도하는 운반체로 사용하고자 함 (Li et al., 2008).
- 점막면역을 유도하는 운반체중 세균성 운반체로 가장 많이 사용하는 것이 *Salmonella*임. 특히 침투성이 강하여 선호도가 높음.

- 살모넬라는 축종에 관계없이 소, 돼지, 닭에서 주요 식중독의 원인의 수위를 차지하고 있음. 돼지에서는 *S. Typhimurium* (ST)이 가장 많이 분리되지만 *S. Enteritidis* (SE)는 거의 검출이 안되고, 소에서는 숙주특이성이 높은 *S. Dublin*과 *S. Typhimurium* (ST)이 가장 많이 분리되며 *S. Enteritidis* (SE)는 검출율이 비교적 낮음. 닭의 경우는 *S. Enteritidis* (SE)가 가장 많이 분리되고 *S. Typhimurium* (ST)의 경우 분리율이 6번째를 차지함. 흥미로운 것은 사람에서는 *S. Enteritidis* (SE)의 검출율이 살모넬라 혈청형 중 수위를 차지하나 동물에서는 닭을 제외한 소와 돼지에서는 *S. Typhimurium* (ST)이 수위를 차지하고 *S. Enteritidis* (SE)의 검출율은 매우 낮거나 거의 검출이 안됨. 이러한 결과는 나라별로 유사한 양상을 보이고 있음.
- 따라서 산업동물에 있어 살모넬라의 예방으로 백신을 사용해야 함. 불활화 백신과 생균백신으로 나올 수 있지만 살모넬라가 일반적으로 세포매개성 면역에 의해 방어가 되기 때문에 전세계적으로 생균백신의 연구가 활발히 이루어지고 있음. 불활화 백신의 경우 야외 병원성 살모넬라가 실질장기에 침투되는 것을 방어할 수는 있으나 장내의 집락화를 막을 수 없는 것으로 알려짐.

표 2. 1984년부터 2001년까지 네덜란드에서 가장 많이 분리된 살모넬라 혈청형

Source	Serotype	Data for isolates from indicated period					
		1996-2001		1990-1995		1984-1989	
		% (no.)	Rank	% (no.)	Rank	% (no.)	Rank
Human	Typhimurium	32.0 (4,470)	2	33.1 (5,666)	2	57.2 (16,049)	1
	Enteritidis	43.6 (6,097)	1	33.8 (6,642)	1	5.4 (1,526)	2
Pig	Typhimurium	66.4 (2,384)	1	75.7 (2,378)	1	66.0 (2,197)	1
	Enteritis	-	>10	-	>10	-	>10
Chicken	Typhimurium	5.3 (336)	6	14.3 (2,669)	3	26.1 (5,170)	1
	Enteritidis	20.3 (1,290)	1	15.0 (2,802)	2	5.5 (1,088)	6
Cattle	Typhimurium	32.9 (702)	2	31.9 (1,670)	2	53.1 (1,706)	1
	Enteritidis	-	>10	-	>10	-	>10

- 따라서 본 연구과제에서는 살모넬라를 점막면역을 유도하는 운반체로 이용하여 국내에서 문제되는 살모넬라에 대한 백신으로 사용함과 아울러, 돼지에서 문제되는 주요 호흡기 병원체인 돼지 위축성 비염의 병원체인 *Bordetella bronchiseptica*의 초기 부착을 담당하는 pertactin단백질 항원과 돼지의 호흡기복합증후군 (PRDC)의 원발성 병원체인 *Mycoplasma hyopneumoniae*의 주요 부착단백질은 P97 단백질 항원을 발현시켜 점막면역을 유도하여 초기 감염을 방어하는 기술을 확립하고자 함.
- 살모넬라의 투여경로는 경구투여로 하는 것으로 알려져 있음. 그러나 경구투여시 위산에 대한 감수성, 장내미생물의 경쟁적 배제, 소장내 목표세포까지의 긴 이동거리 등으로 효과적인 점막면역을 하지 못하는 보고가 있고 대신 비강내 점막면역이 보다 효과적이라는 보고가 있음 (Herberich et al., 2010; Hindle et al., 2002). 또한 경구투여보다 10배정도 낮은 용량으로 비강내 투여를 하면 nasal lymphoid tissue (NALT)를 자극하여 호흡기 점막면역뿐만 아니라 Peyer's patch를 비롯한 소화기

점막면역도 충분히 유도한다는 보고가 있음. 따라서 본 연구에서는 점막면역을 유도하기 위해 운반체로 사용하는 약독화 살모넬라 균주를 투여경로 (경구 및 비강내 투여)에 따른 점막면역의 유도 차이를 비교하고자 함.

- *Bordetella bronchiseptica*는 돼지 위축성 비염을 일으키는 주요 원인체로서 국내에서 불활화백신으로 접종을 하여 예방을 하고 있음. 그러나 불활화백신은 감염자체를 방어하지 못하고 단지 임상증상만을 완화시키는 역할을 하기 때문에 국내 도축장에서 비감개를 관찰하면 아직도 많은 수의 도축돈에서 위축성 비염병변이 관찰되고 실제 농장에서는 백신접종에도 불구하고 Kanamycin을 비롯한 항생제를 비강내 분무하여 치료를 하고 있는 실정임. *B. bronchiseptica*의 주요 방어항원으로 작용하는 것이 filamentous hemagglutinin(FHA)와 세포외막의 일종인 pertactin (PRN)이고 두 가지 단백질 모두 *B. bronchiseptica*가 호흡기 점막세포에 부착하는데 중요한 adhesin역할을 하고 이들에 대한 항체가 *B. bronchiseptica*의 부착을 방어하는데 효과가 있음이 확인됨. 또한 이들 두 단백질은 *B. pertussis*가 유발하는 백일해를 예방하는 acellular vaccine의 주성분임.
- 국내에서의 돼지 위축성 비염백신은 대부분의 경우 불활화 백신을 사용하는데 이 경우 체액성 면역은 효과적으로 유도하여 항체형성은 잘 일어나나 감염에 대해서는 거의 방어하지 못함. 또한 일부 연구에서 *B. bronchiseptica* 순화 생균백신이 개발 되었으나 이미 항체가 형성되어 있는 개체에서는 효과적이지 못하고 병원성의 복원으로 인해 안전성에 문제가 제기되고 있음. 또한 *B. bronchiseptica*의 주 독소인 dermonecrotic toxin(DNT)을 대장균에서 발현시켜 불활화백신에 혼합하여 사용하는 경우도 있으나 이 경우에도 임상증상은 경감시켜 생산성은 향상시킬 수 있으나 감염에 대해 효과적인 방어를 할 수 없음.
- 2000년도에 *B. pertussis*와 *B. bronchiseptica*의 pertactin을 분석한 결과 중요 motif에서 변이가 일어나는 것을 관찰하였고 이러한 변이는 항원성의 변이를 초래하여 백신주가 지니는 pertactin type과 유행하는 야외분리주가 다른 경우 백신주가 야외 유행주를 효과적으로 방어할 수 없다는 보고가 인정받고 있음.
- 본 연구팀에서는 도축돈에서 분리된 45주의 국내분리주를 대상으로 pertactin type을 분석한 결과 총 5가지 pertactin type으로 분류되고 특히 국내백신생산업체에서 제조하는 기본 백신주인 P4주와는 국내에서의 유행주가 전혀 다른 pertactin type을 지니는 것을 보고함 (Shin et al., 2008).
- *M. hyopneumoniae* (Mhp)는 돼지 마이코플라즈마성 폐렴의 원인체이자 돼지호흡기 복합증후군 (PRDC: porcine respiratory disease complex)의 원발성 병원체로 작용한다. 특히 돼지 썩코바이러스 다음으로 양돈산업에서는 백신을 가장 많이 사용하고 있다. 이와 같이 70%이상으로 사용을 하고 있음에도 백신 자체가 감염을 방어하지 못하고 임상증상과 병변만을 완화시키는 실정이다. 이러한 이유는 백신성분에서 사용되는 항원에 감염에 관련된 항원성분이 전혀 없는 것으로 밝혀져 있다. Mhp의 병원성 기전은 일단 상부호흡기도로 들어온 Mhp가 호흡기 점막을 부착하는데 있어 P97이중요한 역할을 하고 있고 P97에 대한 특이 항체가 Mhp의 집락화를 방어하는 것으로 기존의 보고에서 확인되었다 (Ogawa et al. 2009; Okamba et al, 2007). 따라서 호흡기 점막면역을 유도하는 살모넬라를 운반체에 P97의 이종항원을 발현시켜 점막면역을 유도함으로써 Mhp에 대한 초기 감염에 대한 방어 효과를 분석하고자 하였다. (Mhp의 P97의 항원은 당초 과제 신청시 *Clostridium perfringens*의 β -toxin의 발현에서 변경된 항원으로 수행하였다.)
- 따라서 본 과제에서는 약독화 살모넬라균이 점막면역을 유도하기 위한 운반체로서의 효능역할을 두 가지 측면에서 접근하고자 함. 살모넬라균이 호흡기점막면역 유도를 하는 운반체로 평가하기 위해 목적항원으로는 *B. bronchiseptica*의 PRN과 *M. hyopneumoniae*의 P97을 목적항원으로 사용하여 이

들 목적항원에 대한 점막면역형성, 공격접종에 대한 방어능을 평가하여 살모넬라균이 점막면역을 효과적으로 유도하는 운반체로서의 역할을 평가하고자 함.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 1 절 국내·외 기술개발 현황

○ 점막면역을 효과적으로 증진시키기 위해 개발되어온 대표적인 물질은 retinoic acid였다. 최근 연구에서 (Hammerschmidt SI et al., 2011) retinoic acid가 gut-tropic IgA+ plasma cell의 생산을 유도하였고 그 작용기전으로 면역세포에서 gut-homing receptor의 발현을 증가시키는 사실을 확인했다. 그러나 대부분의 연구에서 retinoic acid의 적용횟수가 많고 면역학적 이점에 비해 물질 자체의 독성이 있어 백신의 어쥬번트로는 사용이 어려운 실정이다. 따라서 점막면역을 증진시킬 수 있으면서도 독성이 낮은 어쥬번트의 개발이 절실한 실정이다.

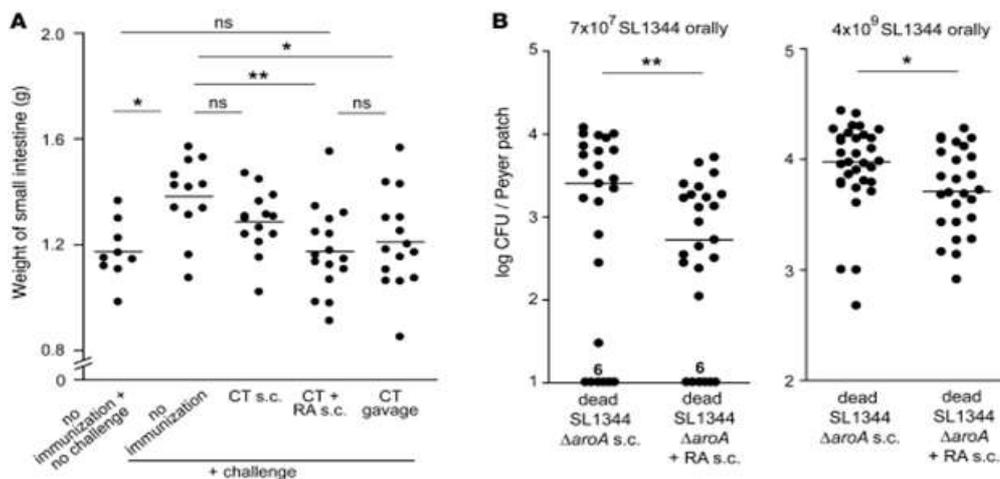


그림 1. Retinoic acid를 첨가한 immunization으로 cholera toxin 유래 설사와 Peyer's patch에서의 *Salmonella* 감염을 감소시킴.

○ Transforming growth factor (TGF)-beta는 점막면역의 형성과 유지에 밀접한 연관성이 있다고 여겨졌다. TGF-beta는 특히 위장관에서 면역관용과 면역력의 균형을 유지하는데 필수적인 매개자이다. 또한 위장관의 림프구 집단의 생성과 기능성에서 결정적인 역할을 한다 (Konkel JE and Chen W, 2011). 그러나 TGF-beta는 면역사이토카인으로서 유전자에서 단백질을 만들어야 하므로 백신 어쥬번트로서 사용하기가 매우 어려운 실정이다.

○ 지금까지의 점막면역증진에 대한 연구는 retinoic acid, TGF-beta와 같은 기초과학 연관물질을 중심으로 진행되어 산업적으로 적용이 힘들었다. 기존에 연구되고 있는 일반적인 백신 어쥬번트 중에서 백신항원과 함께 투여 시 혈청 내의 IgA의 생산을 보다 증진시킬 수 있는 후보물질을 선별하는 것이 보다 좋은 개발전략으로 사료된다.

○ Zhao 등 2008년에 보고된 내용에 따르면 *B. bronchiseptica*의 filamentous hemagglutinin과 Pertactin 항원을 발현하는 약독화 살모넬라 백신 균주 C500을 마우스를 통해 실험한 결과 경구 접종에 비해 피하 접종이 더 안정적인 면역원성을 나타냈으며, 또한 치명적인 *S. enterica* serovar Choleraesuis와 *B. bronchiseptica*를 동시에 방어할 수 있는

면역반응을 유도했다고 보고하였다. 이처럼 방어항원을 발현하는 살모넬라 운반체 시스템을 이용하여 다른 감염성 질병에 대해 다가의 살모넬라 백신을 개발할 수 있기 때문에 잠재성이 매우 뛰어나다.

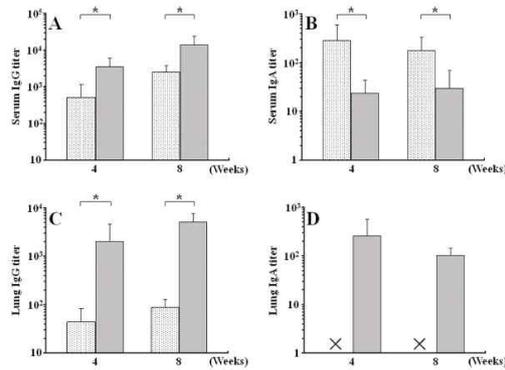


FIG. 2. ELISA of immune responses in mice vaccinated with recombinant *Salmonella* C501(pYA-F1P2) vaccine by the s.c. or oral route. (A) Serum anti-rF1P2 IgG titers. (B) Serum anti-rF1P2 IgA titers. (C) Lung anti-rF1P2 IgG titers. (D) Lung anti-rF1P2 IgA titers. Mice were inoculated with *S. enterica* serovar Choleraesuis vaccine strain C501(pYA-F1P2) or vector strain C501(pYA3493) on days 0 and 14. Samples from five mice were collected at 4 and 8 weeks after primary immunization given s.c. (filled bars) or orally (light patterned bars). Individual samples of mouse sera and lung homogenates were tested for total IgG and IgA antibodies against rF1P2 by ELISA. The titers represent the maximum end-point dilutions from the sample yielding an optical density at 630 nm two times that of undiluted sera from the vector-treated mice. Under these experimental conditions, samples from the vector-treated mice always gave an optical density at 630 nm of $\lt; 0.1$ from the first dilution. "X" represents no detectable antibody levels of titers of ≥ 10 . Mean values for each group were compared using a Student's *t* test. Error bars indicate standard deviations. *, $P < 0.01$ between the s.c. and orally inoculated groups.

그림 2. 마우스에서 재조합 살모넬라 C501(pYA-F1P2) 백신의 피하 및 경구 접종에 따른 ELISA 결과.

○ 최근 Byeon 등(2014)의 보고에 의하면 돼지 폐렴성 파스튜렐라증과 돼지 위축성 비염을 예방하기 위해 FimA, CP39, PtfA, ToxA 그리고 F1P2 항원을 발현하는 약독화 살모넬라 균주를 제작한 후 마우스 모델을 통해 면역반응을 평가한 결과 비면역화 대조군에 비해 상당한 수준의 항원-특이적 serum IgG를 유도하였으며, 게다가 CD3+CD4+, CD3+CD8+, B-cell, IFN- γ 발현 또한 상당히 증가하여 체액성 및 세포 매개성 면역을 효과적으로 유도하였다고 보고됨.

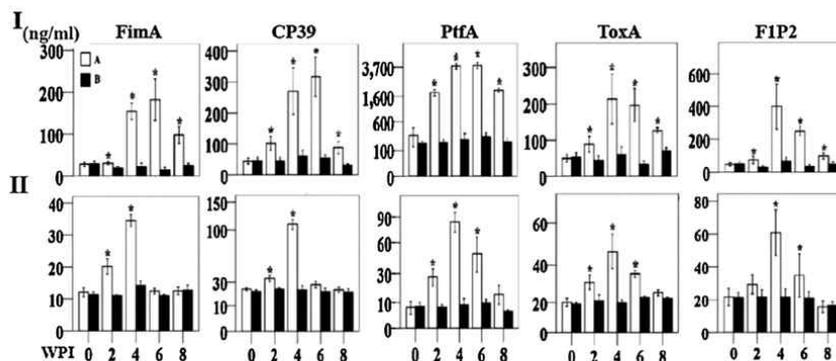


Fig. 2. Antibody responses against the recombinant CP39, FimA, PtfA, ToxA, and F1-P2 antigens: (I) serum IgG (ng/ml) concentrations and (II) secretory IgA (ng/ml) concentrations: A, vaccine strain-inoculated group; B, control group; WPI: weeks post-inoculation. Data are the means of all mice in each group, and error bars show the standard deviations (SD). Asterisks indicate a significant difference between the values of the group inoculated with the delivery strain ($P \leq 0.05$) and those of the control group.

그림 3. FimA, CP39, PtfA, ToxA 그리고 F1P2 항원에 대한 항체반응 결과.

○ 따라서 위와 같이 보고된 약독화 살모넬라 운반체 기술을 이용하여 백신 접종 후 체액성 및 세포 매개성 면역을 효과적으로 유도할 수 있는 백신이 개발될 것으로 전망하며, 보다 개량된 약독화 균주 백신과 접막면역 유도 백신을 통해 모체이행항체의 간섭현상을 억제하는 측면으로 진행될 것으로 보임.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1차년도 세부과제별 연구내용 및 결과

[세부] 돼지용 Muco-adjuvant 개발 및 신규 약효실험체계 확립

연구개발 목표

- Muco-adjuvant 개발체계를 수립
- Muco-adjuvant 1종 이상을 개발

연구개발의 내용

- 마우스 BAFF/APRIL 발현체계를 이용한 Muco-adjuvant 개발 실험
- 돼지 BAFF/APRIL 발현체계를 이용한 Muco-adjuvant 개발 시험체계 수립

계획된 연구개발의 목표 및 내용을 수행하기 위해 아래와 같이 단계별로 계획을 세워 실험하였다. BAFF(B cell-activating factor)와 APRIL(a proliferation-inducing ligand)은 점막면역과 밀접하게 관련된 인자로서 알려져 있으며 1차년도에는 주로 BAFF를 검출하여 선도물질과 상승후보물질을 검색하였다. 또한 마우스 동물모델을 이용하여 표준항원인 ovalbumin에 대한 면역반응과 목표항원인 *Bordetella bronchiseptica*(BB)균에 대한 면역반응을 *in vivo*에서 모두 구현하였으며 *in vitro*에서 항원재자극실험 등을 수행하였다.

1단계 : 선도물질과 상승효과물질 선정 및 효과분석

- 참고문헌 조사를 통한 선도물질(Retinoic acid) 및 상승효과물질(Zymosan) 선정
- 표준항원(ovalbumin)을 이용한 마우스 접종실험(*in vivo*)
- 시료채취 - serum, intestinal lavage
- 항원특이적인 IgG, IgA 정량
- 비장세포를 채취한 후 항원재자극시험(*in vitro*)
- Inguinal lymph node 채취 후 면역반응 시험
- RALDH activity test

2단계 : BAFF 발현 실험

- Western blotting analysis
- Flow cytometry analysis

3단계 : 목표항원(BB균)을 이용한 *in vivo* 동물실험

- BB균의 접종을 위한 최적조건 수립
- RA의 면역증진효과 확인을 위한 마우스 접종실험(*in vivo*)
- 시료채취 - serum, bronchoalveolar lavage
- 항원특이적인 IgG, IgA 정량
- 면역된 마우스 비장세포를 이용한 실험
(항원재자극시험, 항원특이적인 IgG, IgA 정량)

가. 선도물질과 상승효과물질 선정 및 효과분석

표준항원 중 하나인 ovalbumin(OVA)을 사용하여 retinoic acid(RA)가 면역증진효과, 특히 점막면역을 증진시킬 수 있는 지 여부를 확인하였다. 마우스를 대상으로 한 실험에서 OVA를 마리당 50 μg 을 접종하였고 RA는 마리당 150 μg 씩 접종하였다. RA는 지용성물질이므로 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다. 피하주사를 실시하였으며 대조군, OVA접종군, OVA+RA접종군으로 나누어 실험하였다. 2주 간격으로 총 2회 접종한 후 마우스로부터 serum과 intestinal lavage를 채취하였다. 혈액을 채취한 후 4시간동안 응고시킨 뒤 serum을 채취하였으며 (마리당 100 μl 내외), 십이지장에서 5-10 cm 떨어진 지점부터 5 cm 길이의 장을 잘라서 인산완충액 1 ml로 세척하여 intestinal lavage를 얻었다.

이때 RA의 효과를 검증하기 위해 intestinal lavage를 대상으로 한 이유는 점막면역 중 장점막면역에 대해 RA의 효과가 학술적으로 검증되었으므로 본 실험실에서도 점막면역효과를 검증하는 시스템을 구축하면서 RA의 효과를 확인한 후 폐를 대상으로 한 호흡기점막면역증진효과를 연구하기 위함이었다. Serum과 intestinal lavage에 존재하는 OVA-specific IgA, IgG를 정량하기 위해 항원특이적인 ELISA를 실시하였다.

표 3. 면역된 마우스 혈청에서 OVA 특이적인 IgG의 검출

	Serum			Intestinal lavage		
	control	OVA	OVA+ RA	control	OVA	OVA+ RA
10^{-6}	0.118	0.140	0.143	0.121	0.170	0.124
10^{-5}	0.106	0.143	0.122	0.101	0.091	0.107
10^{-4}	0.121	0.233	0.275	0.126	0.137	0.106
10^{-3}	0.126	0.829	0.651	0.105	0.136	0.110
10^{-6}	0.099	0.114	0.114	0.102	0.123	0.105
10^{-5}	0.217	0.107	0.146	0.118	0.148	0.124
10^{-4}	0.119	0.132	0.183	0.116	0.139	0.121
10^{-3}	0.137	0.233	0.456	0.112	0.149	0.106

표 4. 면역된 마우스 혈청에서 OVA 특이적인 IgA의 검출

	Serum			Intestinal lavage		
	control	OVA	OVA+ RA	control	OVA	OVA+ RA
10^{-4}	0.164	0.117	0.133	0.139	0.137	0.139
10^{-3}	0.166	0.122	0.128	0.129	0.120	0.119
10^{-2}	0.248	0.199	0.222	0.117	0.133	0.105
10^{-1}	0.271	0.179	0.348	0.160	0.147	0.737
10^{-4}	0.150	0.119	0.143	0.155	0.115	0.110
10^{-3}	0.172	0.124	0.174	0.109	0.136	0.103
10^{-2}	0.260	0.170	0.230	0.106	0.123	0.111
10^{-1}	0.283	0.204	0.305	0.126	0.145	0.135

OVA+RA접종군이 OVA접종군에 비해 혈청에서 상대적으로 많은 양의 OVA특이적인 IgG와 IgA가 검출되었다. 또한 intestinal lavage(장세척액)에서는 단발성으로 낮은 희석배수에서 IgA의 검출이 높게 검출되었다. 전반적으로 RA에 의해 OVA특이적인 시스템면역과 점막면역이 증가되는 것을 확인했다.

앞선 연구에서 RA의 효과를 점막면역증진효과를 확인한 뒤, 유사한 효과를 나타낼 수 있는 면역증강물질을 검색하였다. RA가 점막면역에는 증진효과가 있음에도 불구하고 전체적인(systemic) 면역체계에서는 regulatory T 세포(Treg cell)를 유도하여 면역억제기전을 일으키는데 착안하여, 최근 세계적으로 수행되었던 유사 연구 중 Treg cell 유도물질을 검색하였다. 매우 흥미롭게도 일반적으로 면역증강물질로 알려진 toll-like receptor(TLR)의 효능자 중 zymosan이 RA와 비슷한 역할을 한다는 사실을 확인하였다. Zymosan은 peptidoglycan과 함께 TLR2의 효능자로서 사용되며 효모의 구성성분이다.

본 실험에서는 zymosan과 RA를 마우스에 단독 또는 병용투여한 후 혈청 내 항원특이적인 isotype별 항체생성능을 확인하고자 하였다. 마우스를 이용한 *in vivo* 실험에서 OVA를 마리당 50 µg을 접종하였고 zymosan은 100 µg, RA는 150 µg씩 접종하였다. 실험에 사용된 물질의 양은 이미 발표된 논문(reference)을 기준으로 하였다. 피하주사를 실시하였으며 대조군, OVA접종군, OVA+zymosan접종군, OVA+RA접종군으로 나누어 실험하였다. 2주 간격으로 총 2회 접종하였으며, 1회 또는 2회 접종 후 2주차에 마우스로부터 시료를 채취하여 실험하였다.

In vivo 접종으로 마우스에서 면역반응이 어떤 형태로, 얼마만한 강도로 일어나는지 알아보기 위해 1회 접종한 마우스로부터 비장을 채취한 뒤 비장세포를 추출하였다. 비장세포는 일반적인 방법으로 추출하였으며 ACK lysis buffer를 사용하여 적혈구를 제거한 후 사용하였다. 본 실험에서는 부착세포(adhesive cells)가 제거된 비장세포를 사용함으로써, 사용된 세포가 주로 CD4+T, CD8+T, CD19+B 림프구로 구성되어 OVA에 특이적인 면역반응성을 가지고 있는 면역기억세포(memory cell) 들이 있을 것으로 추정되었다. 면역기억을 할 수 있는 전구세포(precursor cell)의 수와 면역기억강도에 따라 *in vitro* 실험에서 OVA로 재자극을 할 경우 더 많은 세포가 반응을 더 강하게 한다.

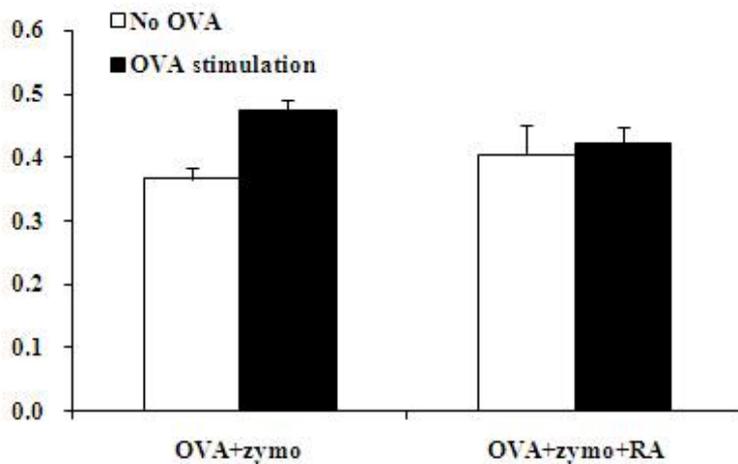


그림 4. 면역된 마우스 비장세포를 채취한 뒤 OVA항원으로 *in vitro*에서 재자극
OVA+Zymosan접종군의 비장세포에 비해 RA를 추가한 접종군에서 반응성이 낮아졌다.

2차 접종을 한 후 2주 뒤에 마우스로부터 serum과 intestinal lavage를 채취하였다. OVA-specific 항체를 정량하였으며, 점막면역에 중요한 isotype인 IgA와 전체 systemic면역에 중요한 IgG를 각각 측정하였다.

표 5. 면역된 마우스에서 OVA 특이적인 IgG의 생산량

	Serum		Intestinal lavage	
	OVA+ Zymosan	OVA+ Zymosan + RA	OVA+ Zymosan	OVA+ Zymosan + RA
10^{-6}	0.051	0.054	0.051	0.053
10^{-5}	0.149	0.057	0.049	0.049
10^{-4}	0.064	0.075	0.052	0.051
10^{-3}	0.170	0.178	0.050	0.048
	OVA+ Fucoidan	OVA+ Fucoidan + RA	OVA+ Fucoidan	OVA+ Fucoidan + RA
10^{-6}	0.051	0.054	0.058	0.051
10^{-5}	0.049	0.065	0.061	0.057
10^{-4}	0.056	0.122	0.066	0.057
10^{-3}	0.062	0.343	0.052	0.050

표 6. 면역된 마우스에서 OVA 특이적인 IgA의 생산량

	Serum		Intestinal lavage	
	OVA+ Zymosan	OVA+ Zymosan + RA	OVA+ Zymosan	OVA+ Zymosan + RA
10^{-4}	0.049	0.050	0.047	0.050
10^{-3}	0.060	0.062	0.049	0.050
10^{-2}	0.094	0.091	0.052	0.048
10^{-1}	0.108	0.100	1.152	0.131
	OVA+ Fucoidan	OVA+ Fucoidan + RA	OVA+ Fucoidan	OVA+ Fucoidan + RA
10^{-4}	0.050	0.055	0.050	0.050
10^{-3}	0.050	0.071	0.047	0.047
10^{-2}	0.076	0.109	0.053	0.063
10^{-1}	0.109	0.202	0.576	1.277

RA와 zymosan이 비슷한 작용기전을 갖는 것으로 알려졌지만 예상외로 항원특이적인 항체 생산능이 낮았고 상승효과 또한 거의 없었다. 그러나 본 연구팀이 꾸준히 연구해온 천연물질인 ‘ fucoidan ’은 자체적인 항체생산능 뿐 아니라 RA와의 상승효과를 보였다. 특히 IgA의 경우 혈청과 장세척액 모두에서 높은 효과를 보였다.

서혜림프절을 채취한 후 면역세포 반응 분석

마우스에 물질을 접종하는 부위는 오른쪽 또는 왼쪽의 옆구리부위(flank region)이다. 따라서 접종된 면역관련물질 들은 가장 근접한 림프절인 서혜림프절(inguinal lymph node)에 영향을 미칠 수 있다. 본 연구팀은 zymosan이 속해있는 TLR 효능자 중 같은 TLR2 효능자의 일종인 peptidoglycan(PGN)과 TLR4 효능자인 lipopolysaccharide(LPS)를 RA와 함께 접종하여 상승효과를 확인하고자 하였다. 접종군은 OVA+PGN, OVA+PGN+RA, OVA+LPS, OVA+LPS+RA이었고 각 접종군 마우스로부터 서혜림프절을 채취하여 그 세포를 96-well plate에 setup하였다. 이후 OVA항원을 처리하여 재자극한 군과 그렇지 않은 군으로 나누어 MTT assay로 세포의 반응정도를 확인하였다. 실험결과 PGN과 LPS를 처리한 군과 RA를 함께 처리한 군 사이에 유의한 차이는 없었으며, OVA 재자극에 의한 반응성도 미미했다(결과미제시). 이에 체계적인 면역반응을 확인하기 위한 림프장기(lymphoid organ)샘플로서 서혜림프절 보다는 비장이 상대적으로 유용한 것으로 판단되었다.

Retinaldehyde dehydrogenase(RALDH) 활성 분석

RALDH는 aldehyde dehydrogenase군에 속하는 효소로서 retinaldehyde로부터 retinoic acid를 합성하는 반응을 촉진한다. 본 연구에서 점막면역을 증진시킬 수 있는 선도물질로 RA가 선정되었으므로, 그와 유사한 효과를 나타낼 수 있는 약효물질을 선별하거나 면역세포에서 RA를 다량 생산시킬 수 있는 물질을 알아내기 위해 RALDH 활성을 측정하였다. 배양된 수지상세포를 0.5 M Tris-Hcl buffer로 세척한 후 10% Triton X-100용액을 이용해 용해시켰다. 원심분리하여 세포단백질용액(cell lysate)을 얻은 후 100배 농축된 NAD⁺와 propionaldehyde를 넣어준 후 4시간 배양하였다. Microplate reader를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 다양한 TLR 효능자를 수지상세포에 처치한 후 RALDH 활성을 측정한 결과 PGN, polyI:C, LPS, imiquimod, oligodeoxynucleotide(ODN) 2007에서 유의한 활성을 보이지는 않았다(결과미제시). 하지만 향후 실험에서 많은 수의 수지상세포 또는 다른 면역세포를 사용하여 cell lysate내의 단백질 함량을 증가시키고 반응조건을 최적화시킬 필요가 있는 것으로 사료된다.

나. BAFF 발현 실험

Flow cytometry를 이용한 BAFF 발현 분석

점막면역증진 후보물질인 RA와 Zymosan의 면역증진능을 확인하기 위해 mouse BAFF의 발현에 미치는 영향을 알아보았다. 마우스의 대퇴골(femur)에서 골수세포를 채취하여 6-well culture plate에 배양하였고 골수유래 수지상세포의 배양을 위해 mouse GM-CSF 면역싸이토카인을 10 ng/ml의 농도로 처리하였다. 배양 후 4일째 되는 세포를 수거하여 RA 또는 zymosan을 처리하였으며, 이후 세포를 표면 염색하여 flow cytometry 분석에 이용하였다. 배양 후 4일째 되는 세포는 면역싸이토카인 처리에 의해 자란 수지상세포와 B림프구가 포함된 골수세포가 모두 포함되어 체내 면역계에서 점막면역과 관련된 BAFF의 발현세포를 대표할 수 있다.

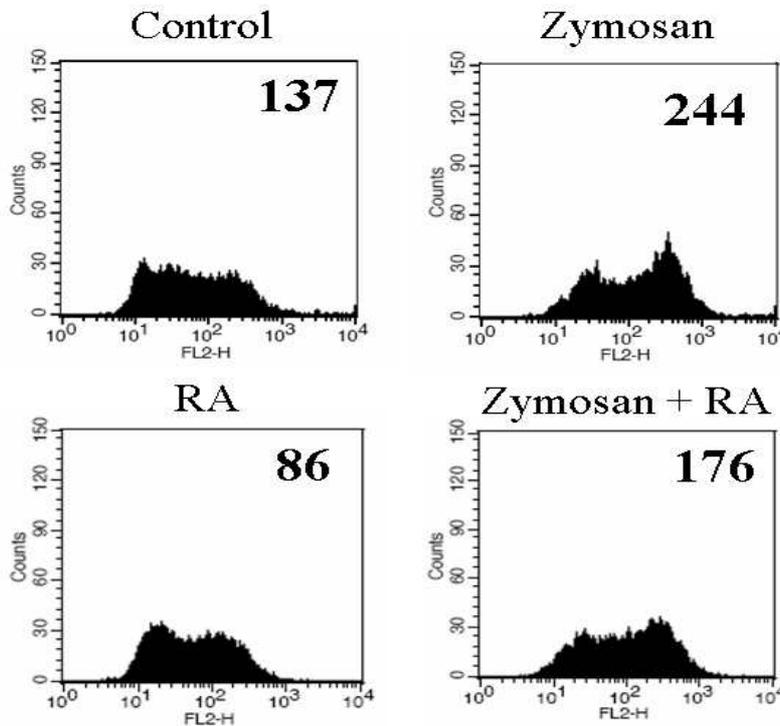


그림 5. 점막면역증진후보물질 처리에 의한 골수 및 수지상세포 표면의 BAFF 발현 변화

BAFF는 APRIL과 함께 점막면역에 밀접한 관련이 있는 면역인자이다. 각 histogram에 있는 수치는 mean fluorescence intensity이며 해당 단백질의 발현양에 비례한다. 세포표면의 BAFF 발현을 조사한 결과, zymosan처리군은 대조군에 비해 현저히 증가하였으나 RA는 오히려 감소시켰다. 또한 zymosan+RA처리군의 경우 zymosan처리군에 비해 감소되어 예상외로 RA가 BAFF의 발현을 감소시키는 현상을 보이는 것으로 추정된다. 이는 RA의 점막면역증진효과가 BAFF의 발현증가 이외에 다른 기전으로 작용할 가능성이 있으며, 사전조사에서 림프구의 gut homing receptor의 발현증가와 같은 기전이 제기된 바 있다. 따라서 향후 점막면역증진용 후보물질 검색에서 BAFF 발현측정과 함께 다른 작용기전의 채용이 고려되어야 할 것으로 사료된다.

Western blot을 이용한 BAFF의 발현 분석

골수세포와 수지상세포에서 zymosan과 RA처리에 의한 BAFF발현을 flow cytometry 분석을 실시하였다. 보다 다양한 방법으로 BAFF의 발현을 분석하고 다른 종류의 면역세포에서 두 가지 후보물질의 효과를 확인하기 위해 비장세포에 두 물질을 처리한 후 BAFF의 발현을 Western blot analysis를 실시했다.

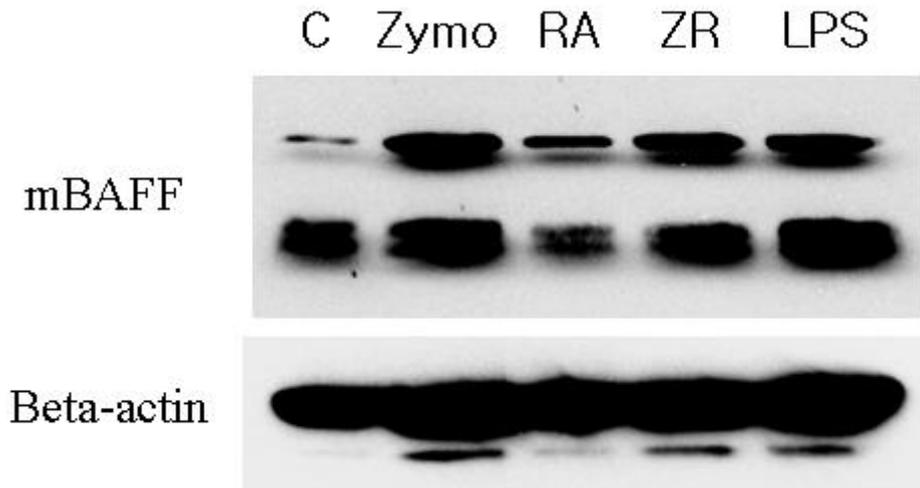


그림 6. 비장세포에 zymosan과 RA를 처리한 후 BAFF의 발현 분석 (Western blot)

C는 대조군(control), Zymo는 zymosan처리군($2 \mu\text{g}/\text{ml}$), RA는 retinoic acid처리군($100 \text{ ng}/\text{ml}$), ZR은 zymosan+RA처리군, LPS는 lipopolysaccharide처리군($0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$)으로 SDS-PAGE의 각 lane별로 $10 \mu\text{g}$ 씩 동일한 단백질을 loading하였다. 아래쪽 beta-actin band를 보면 각 처리군의 단백질이 동일한 양이 투여되었음을 알 수 있다. 본 실험에서 mouse BAFF는 크게 두 개의 band로 감지가 되었고 아래쪽 band는 미세하게 두 개로 나누어져 단백질 modification이 일어난 것으로 추정된다.

전체적으로 zymosan처리군과 zymosan+RA처리군, LPS처리군의 세포에서 발현이 증가하였다. Flow cytometry analysis에서와 같이 RA에 의해 BAFF의 발현은 감소하는 것으로 보였다. 또한 B림프구의 대표적인 mitogen이며 활성화인자인 LPS에 의해 BAFF의 양이 증가하는 것으로 보아 BAFF의 발현은 비장세포의 활성화와 밀접한 관련이 있으며, 특히 사전연구를 고려할 때 B림프구의 활성화와 비례할 것으로 판단된다.

Flow cytometry와 Western blot analysis 결과를 종합한 결과, BAFF 발현검색을 통해 RA의 점막면역증진효과는 예측하기가 어려웠다. 이에 BAFF와 매우 유사한 특징을 보이는 APRIL의 발현측정은 중단하였다. 향후 점막면역증진인자의 검색을 위해서 gut homing receptor의 발현측정을 추가할 예정이다.

다. 목표항원(BB균)을 이용한 *in vivo* 동물실험

Bordetella bronchiseptica(BB)균에 대한 항체생성능 실험(*in vivo*)

이미 수행되었던 표준항원(OVA)을 접종한 마우스 동물모델시험에서 RA와 다른 면역상승물질의 효과를 확인한 후 실제 본 연구과제에서 주요 표적백신항원으로 사용되는 BB균을 대상으로 *in vivo* 실험을 실시하였다. BB균의 생체 내 접종 시 항원성이 어느 정도인지, BB균의 접종량 등 최적의 실험조건은 어떤지를 구하고자 점막면역증진을 위한 백신어쥬번트 후보물질은 RA만을 사용하였다. Serum 내의 항원특이적인 항체를 정량하였고 비장세포를 채취하여 *in vitro* 항원재자극실험을 실시하였다. 대조군, BB균 단독접종군, BB균+RA접종군을 피하로 dorsal flank에 접종하였다.

Spleen cells 결과

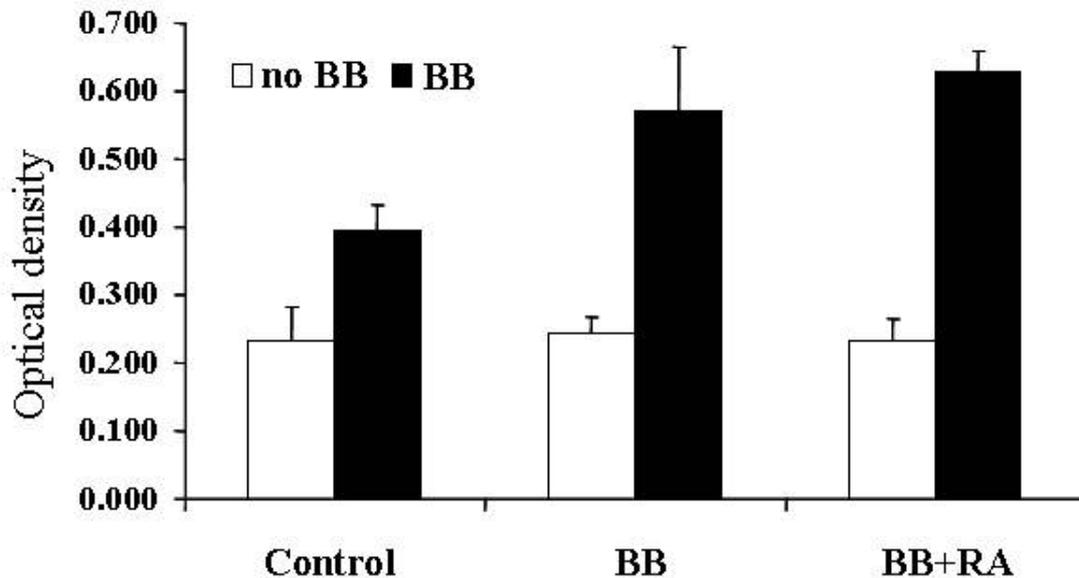


그림 7. BB균과 RA를 접종한 마우스 비장세포의 *in vitro* 항원재자극에 대한 반응성

대조군, BB접종군, BB+RA접종군 마우스로부터 비장세포를 채취한 뒤 96-well culture plate에 배양하였고, BB균을 재자극한 그룹과 하지 않은 그룹을 설정하였다. MTT assay를 통해 비장세포의 성장률을 측정하였다(570 nm에서 흡광도). BB접종군과 BB+RA접종군 모두에서 대조군에 비해 BB균을 *in vitro*에서 재자극 했을 때 크게 성장률이 증가하여 두 군의 마우스 모두에서 BB균에 대한 면역성이 증가하였음을 알 수 있었다. BB+RA접종군은 BB접종군에 비해 반응성이 약간 증가하여 BB균의 접종 시 RA의 면역증진효과가 있음을 알 수 있었다.

앞선 실험에서 BB균에 면역된 마우스 비장세포를 채취한 뒤 BB균을 *in vitro* 재자극 시 면역반응성을 MTT assay로 확인하였다. 동일한 실험 setup에서 비장세포의 배양된 상층액에 BB균에 특이적으로 결합하는 IgG와 IgA의 생산이 얼마나 되는지 확인하였다. 이는 비장세포에 주요면역세포로 포함되어있는 B림프구, 특히 memory B림프구, plasma cell 등 항원특이적인 면역세포 또는 전구세포(precursor cells)가 얼마나 많고 항체생산능이 얼마나 되는지 유추해 볼 수 있는 실험이다.

표 7. 면역된 마우스 비장세포에서 BB균 특이적인 IgG의 생산량

	IgG		
	Control	BB	BB+ RA
No BB	0.086	0.278	0.116
	0.085	0.533	0.118
	0.087	0.509	0.119
	0.087	0.329	0.577
BB	0.168	1.296	1.205
	0.374	1.296	1.282
	0.185	1.321	1.298
	0.165	1.320	1.092

표 8. 면역된 마우스의 비장세포에서 BB균 특이적인 IgA의 생산량

	IgA		
	Control	BB	BB+ RA
No BB	0.086	0.092	0.085
	0.094	0.105	0.090
	0.113	0.088	0.092
	0.093	0.097	0.095
BB	0.095	0.168	0.749
	0.090	0.181	0.172
	0.087	0.124	0.155
	0.099	0.390	0.136

항원특이적인 IgG, IgA 측정용 ELISA 실험을 수행했으며 각 well의 상층액을 두 배 희석한 뒤 실험에 이용했다. 실험결과, BB균 특이적인 IgG는 BB균으로 비장세포를 재자극을 했을 때 BB접종군과 BB+RA접종군의 비장세포 모두에서 현저히 증가하였다. BB균 특이적인 IgA는 BB접종군 보다는 BB+RA접종군의 비장세포에서 상대적으로 많이 생산되었다. 96-well culture plate의 well에 어떤 precursor가 들어가느냐에 따라 well간 차이가 많을 수 있어 장기적인 실험결과의 축적이 필요할 것으로 사료된다. 마우스에 BB균과 RA를 접종하여 BB균에 대한 면역반응이 생겼으며 유효한 항원특이적인 B림프구의 precursor cell과 effector cell이 생긴 것을 확인할 수 있었다.

BB접종군과 BB+RA접종군의 마우스에서 혈청을 얻어 BB균에 특이적인 IgG와 IgA가 얼마나 많이 생성되었나를 알아보았다. 본 실험에서는 BB균의 자연적인 감염경로가 비강, 폐를 포함한 호흡기이므로 bronchoalveolar lavage(BAL)를 얻어 혈청과 함께 항체가 수준을 확인하였다.

표 9. 면역된 마우스에서 BB균 특이적인 IgG의 생산량

	IgG			
		Control	BB	BB+ RA
Serum	10^{-6}	0.243	0.205	0.313
	10^{-5}	0.155	0.436	0.596
	10^{-4}	0.175	1.346	1.151
	10^{-3}	0.167	1.310	1.393
BAL	10^{-4}	0.162	0.915	0.421
	10^{-3}	0.158	1.498	0.694
	10^{-2}	0.132	1.303	1.280
	10^{-1}	0.185	1.699	1.323

표 10. 면역된 마우스에서 BB균 특이적인 IgA의 생산량

	IgA			
		Control	BB	BB+ RA
Serum	10^{-4}	0.202	0.204	0.226
	10^{-3}	0.171	0.223	0.376
	10^{-2}	0.201	0.308	0.555
	10^{-1}	0.172	0.825	1.776
BAL	10^{-4}	0.211	0.179	0.193
	10^{-3}	0.180	0.176	0.178
	10^{-2}	0.185	0.215	0.201
	10^{-1}	0.205	0.347	0.301

혈청과 BAL을 단계별로 희석하여(10^{-2} 은 100배 희석) 실험에 사용하였고 사전연구를 통해 적절한 희석배수범위를 결정하였다. 또한 대조군의 흡광도가 0.1-0.2에 오도록 실험조건을 최적화하였다. BB균 특이적인 ELISA를 실시한 결과, IgG의 경우 BAL에서 예상보다 많은 양의 BB균 특이적인 항체가 검출되었으나 BB접종군, BB+RA접종군의 혈청, BAL 샘플 모두에서 유사하였다. 반면 IgA의 경우 BAL에서는 접종군사이에 유의한 변화가 관찰되지 않았지만 혈청에서는 BB접종군에 비해 BB+RA접종군이 BB균 특이적인 IgA가 현저히 높게 검출되었다. 이러한 결과들은 BB균 특이적 항체생산 중 특히 IgA의 생산을 RA가 현저히 증가시키는 것으로 추정되며 이는 점막면역의 방어기전과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

▶ 실험방법

Muco-adjuvant 개발을 위해 주로 마우스 수지상세포와 비장세포를 이용하여 실험하였다.

- 수지상세포(dendritic cells) 배양 : 마우스의 경우, C57BL/6J 마우스에서 골수세포를 분리한 후 mouse GM-CSF (10 ng/ml)를 처리하여 배양하였다. 6일 후 부유세포를 분리하여 수지상세포로 사용하고 세포표면마커(MHC class II, B7-2, CD11c) 특이항체로 purity를 점검하였다. 돼지의 경우, 20 - 30 ml 혈액에서 monocyte를 분리하여 porcine GM-CSF (20 ng/ml)과 porcine IL-4 (20 ng/ml)를 처리하여 배양한다. 6일 후 부유세포를 분리하여 수지상세포로 사용하고 세포표면마커(porcine MHC class II, CD80 등) 특이항체로 purity를 점검한다.
- 비장세포의 분리 : 마우스의 비장을 채취한 뒤 비장세포를 분리하여 면역기억반응을 분석하였다. 비장을 기계적인 힘으로 으갠 뒤 ACK lysis buffer를 이용하여 다수 포함되어 있는 적혈구를 제거하였다. 비장세포에 포함되어있는 부착세포(대식세포 등)를 제거하고 림프구를 얻기 위해 T75 플라스크에 한 시간 동안 배양한 후 떠있는 세포만을 회수하였다. 묻쳐있는 세포들을 제거하기 위해 40 μ m cell strainer를 이용하여 거른 후 세포계수를 한 후 사용하였다. 96-well culture plate를 이용하여 4×10^5 cells/200 μ l/well의 농도로 배양하였고 항원재자극을 위해 OVA 또는 *Bordetella bronchiseptica* (BB) 균체를 처리하였다. 이후 비장세포의 성장률을 측정하기 위해 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)용액을 사용하였고, 배양된 상층액은 항원특이적인 IgG와 IgA를 정량하는데 사용하였다.
- Muco-adjuvant의 후보물질 또는 선도물질을 선정하기 위해 PubMed을 통한 사전연구조사를 실시하였다. 1차년도에는 비타민A류와 천연물질의 점막면역 증진효과를 주로 시험하였다. 비타민A의 경우 1세대인 retinol, retinal, tretinoin, retinoic acid, isotretinoin, alitretinoin, 2세대인 etretinate, acitretin, 3세대인 tazarotene, bexarotene, adapalene 등이 있지만 사전연구조사에서 다른 파생물은 효과가 매우 적은데 비해 retinoic acid(RA)의 점막면역증진효과가 탁월하여 선도물질로 선정하였다. 또한 천연물질의 한 종류로 해양조류에서 순수하게 분리된 황화다당류의 일종인 fucoidan을 이용해 상승효과를 실험하였다. Toll-like receptor (TLR)의 주요효능자를 체크하였고 그 중 TLR2 효능자의 일종인 zymosan이 RA와 상승효과를 나타낼 수 있는 지 확인하였다.
- 항원특이적인 항체정량 (IgA, IgG) : 항체가 결합할 수 있는 항원을 Maxisorp Nunc-ImmunoTM modules (Thermo Scientific사)에 코팅시킨 후 5% 우태아혈청이 포함된 인산완충액으로 blocking을 시켰다. 세척액은 0.05% Tween 20을 포함하는 인산완충액을 이용하였다. 혈청 또는 비장세포의 배양상층액은 0.5% 우태아혈청이 포함된 인산완충액으로 단계적으로 희석한 후 well에 넣었다. 바닥항원에 결합한 항원특이적인 항체를 정량하기 위해 horseradish peroxidase가 부착된 goat anti-mouse IgG 또는 IgA를 처리한 후 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine용액, stop solution을 차례로 넣어 발색시켰다. Microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 항원특이적인 항체를 정량 또는 비교하였다.
- Western blot analysis : 6-well culture plate에서 배양한 세포에 물질을 처리하였고,

Western blot analysis를 위해 세포용해완충액(lysis buffer)으로 세포를 용해시켰다. 동일한 양의 단백질을 loading하기 위해 Bio-Rad protein assay solution을 이용해 단백질 정량을 실시하였다. SDS-PAGE용 gel에 lane당 15 μ g을 넣어 분석하였고 10% 또는 12% gel을 사용하였다. 단백질의 blotting을 위해 nitrocellulose membrane을 이용하였으며 anti-mouse BAFF antibody와 anti-mouse beta-actin antibody를 일차항체로 사용하였다. 이후 적절한 horseradish peroxidase가 부착된 이차항체를 처리하였고, SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrate (Thermo Scientific사), 감광필름을 이용해 유효밴드를 확인하였다.

- 유세포분석 (flow cytometric analysis) : 단일세포를 채취한 뒤 세포표면에 발현된 마커의 발현을 확인하기 위해 유세포분석을 실시하였다. 먼저 CD16 항체를 이용하여 면역세포의 표면에 다량 발현되어있는 항체수용체를 막아 비 특이적 염색을 억제하였다. Mouse BAFF 등 표면단백질에 특이하게 결합할 수 있는 항체를 이용하여 염색하였으며 수지상세포 여부를 확인하였다.
- 수지상세포와 co-culture 배양액에서 면역싸이토카인 등의 생산량 측정 : 마우스의 수지상세포에 Muco-adjuvant 후보물질을 처리한 후에 점막면역과 밀접한 관련이 있는 BAFF의 측정을 위해 ELISA법을 이용하여 정량을 시도하였다.

[제1협동] 살모넬라 운반체를 이용한 점막면역 유도기술 개발

○ 점막면역 유도를 위한 약독화 살모넬라균 변이주 개발

▶ **연구목표 및 결과요약:** 제작된 살모넬라 변이주중에 점막면역을 가장 많이 유도하는 변이주를 선발하고자 하였다. ST, SG 및 SE 야생주와 변이주를 각각 마우스에 접종한 후 생존성을 파악한 결과 야생주의 경우 모두 폐사되었으나 약독화변이주의 경우 폐사되지 않은 것으로 확인되어 안전한 것으로 확인되었다. 점막면역을 담당하는 IgA를 분비하는 B세포의 측정을 위해 Elispot을 실시한 결과 접종한 살모넬라의 종류에 따라 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 이 결과를 다시 확인하기 위해 재 실험을 실시하고 있다. ELISA의 경우 현재 확립 중에 있어 1차와 2차의 마우스 접종 시험을 통해 가장 좋은 점막유도를 나타내는 살모넬라 변이주를 선발할 수 있으리라 기대된다.

▶ 연구수행내용 및 세부 결과

(가) 재료 및 방법

(1) 실험동물: 7주령 BALB/C female mouse를 이용하였다. Group은 *Salmonella* Galinarum(SG), *Salmonella*Enteritidis(SE), *Salmonella*Typhimurium(ST) 각각의 wild type (STW, SGW, SEW)과 변이주를 접종경로 별로 둘로 나누어 12 군으로 하며, 대조군은 복강투여만을 하여 총 13 군으로 준비하였다. 한 군당 mouse는 5마리로 하였다.

(2) 표준균주: *Salmonella* Galinarum은 강원대학교 수의전염병 실험실에서 보관중인 wild type (B01M105) 과 *ssrAB*, *rpos*, *hmp*, *ppk*, *AroA* gene이 deletion되고 Kanamycin에 저항성이 있는 SG mutant(B01M085)를 사용하였으며, ST는 wild type(B01M101)과 역시 5개의 gene이 deletion되고 kanamycin에 저항성이 있는 ST mutant(B01M080)를 사용하였다. SE는 wild type(B01M106)과

AroA gene만이 deletion되고 항생제 내성이 없는 SE mutant(B01M021)를 이용하였다.

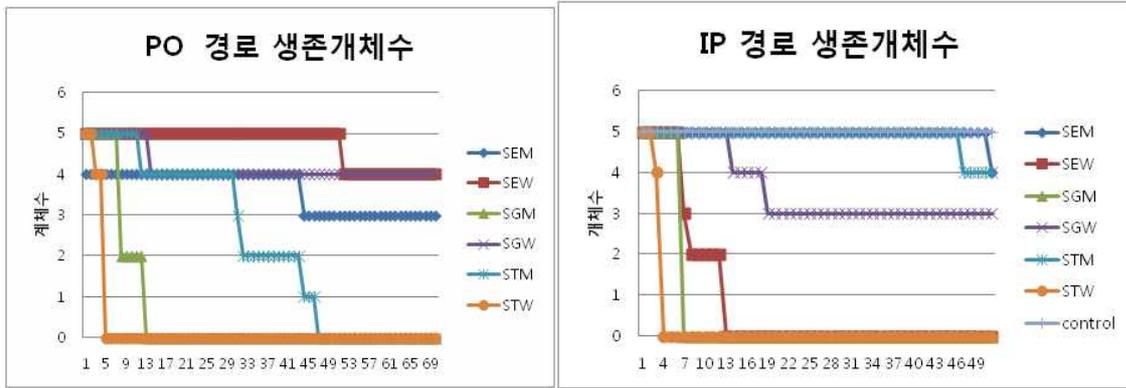
(3) 접종방법: 접종경로는 복강투여(IP)와, 경구투여(PO)로 하며 각각 10^2 CFU, 10^9 CFU로 접종하였다. 접종 4시간 전부터는 급수와 급식을 중단하였다. 복강투여는 Mouse 1마리당 10^2 CFU/100 μ l PBS를 접종하였다. 경구투여는 zonde를 이용하여 Mouse 1마리당 10^9 CFU/100 μ l PBS를 투여하였다.

(4) sample 채취: 접종 후 1주와 4 주에 각각 mouse의 혈액과 분변을 채취하였다. 혈청의 경우 Capillary tube를 이용하여 mouse 개체마다 약 300 μ l를 안와체혈 한 후 eppendorf tube에 담았다. 혈액이 응고 될 수 있도록 4 $^{\circ}$ C에 6h이상 정치한 후 13000rpm에 10min(혹은 4 $^{\circ}$ C 에서 20분이상)에서 centrifuge하였다. 상층액인 serum만을 분리하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 분변 샘플의 경우 마우스의 feces를 개체 당 2~3 (1당 약 0.04g)정도 eppendorf tube에 담았다. Sample 50mg/ PBS 1ml이 되도록 PBS를 sample에 넣고 하루 이상 정치하였다. 15분 이상 Vortex 하여 sample을 균질화 시킨 후 13000rpm에서 5min centrifuge 상층액을 분리하여 ELISA에 이용하기 전까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

(5) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): 면역반응을 보기 위해 ELISA를 통해 serum으로부터 IgG1, IgG2a, IgG2b를 측정하고, 분변샘플로부터 IgA를 측정하였다. Nunc maxisorp F96 plate에 한well당 10^2 ~ 10^3 CFU의 *Salmonella*를 0.05M sodium bicarbonate (pH 9.4)coating buffer를 이용해 4 $^{\circ}$ C 에서 16h 동안 coating하였다. PBST (0.01 M PBS-Tween 20 0.05%)로 3회 washing하고 1% gelatin을 50 μ l/well로 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 방치하여 blocking하였다. Sample은 0.5% gelatin을 이용해 fecal sample의 경우, 1/100, 1/200, 1/400 로 희석하고, serum은 1/300,1/600,1/1200로 희석하여 각 well에 50 μ l씩 가한 후 37 $^{\circ}$ C 에서 1시간 동안 결합시켰다. HRP conjugated goat-anti murine IgG1, IgG2a, IgG2b, IgA를 0.5% gelatin에 희석 하여 1well당 50 μ l씩 가해준 후 37 $^{\circ}$ C 1시간 동안 결합시켰다. 0.1 M Citrate buffer(pH 4.2), ABTS, H₂O₂를 100 : 2 : 1의 비율로 혼합하여 각 well에 50 μ l씩 분주하고, ELISA reader를 이용해 405nm파장에서 OD를 측정하였다.

(5) Elispot Assay: 면역반응을 보기 위해 접종 4주 후 mouse를 희생하여 비장을 적출한 후 cell을 분리하였다. 비장세포로부터 분비되는 *Salmonella* specific IgA를 B Cell Elispot assay를 통해 측정하였다. ELISPOT은 Mouse IgA ELISPOT Plus kit (MABTECH)을 이용하였다. ELISPOT plate에 PBS로 희석한 *Salmonella*를 16시간 동안 4~8 $^{\circ}$ C로 coating하고 PBS로 washing한 후 10% Fetal bovine serum이 포함된 complete medium 200 μ l/well로 30분 동안 실온에서 block하였다. 100,000-500,000 cell/well로 비장세포를 seeding한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 16-24시간 동안 배양하였다. PBS로 washing하여 cell을 제거하고 detection antibody (anti-IgA-biotin)를 0.5% FCS/PBS에 1 μ g/ml로 희석하여 100 μ l/well씩 처리한 후 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 1:1000으로 희석 (in 0.5% FCS/PBS)한 Streptavidin-HRP을 100 μ l/ml씩 처리하여 실온에서 1시간동안 반응 시켰다. ready-to-use TMB substrate solution을 100 μ l/well로 처리 하여 spot이 뚜렷이 나타날 때까지 10~ 30분 동안 develop하였다. develop한 ELISPOT plate는 Elipunch kit(MILLIPORE)를 이용하여 plate로부터 membrane을 분리하여 실사현미경하에서 spot을 counting하였다.

(나) 결과



(1) 마우스에서의 생존성 시험: ST야생주의 경우, 접종 3~4일 내로 IP, PO 경로로 투여한 군이 모두 폐사하였다. 이는 Wild type ST의 Balb/c 마우스에 대한 LD50가, strain별로 차이는 있으나 PO route에서 $10^4 \sim 10^6$ CFU, IP route에서 $10^3 \sim 10^5$ CFU 이하인 것을 감안하고, 이번 실험에 이용한 균주가 닭에서 2차례 계대하여 병원성을 증가시킨 균주인 것을 고려했을 때 접종 dose (IP: 10^2 , PO: 10^9)가 너무 높았기 때문으로 추측된다. SE 야생주도 PO 경로 및 IP 경로로 투여한 마우스의 경우 평균 PO: 6.6일, IP: 8.4일에 폐사하였다 SE 야생주도 10^6 으로 접종시 평균 생존 일 7.5일이라는 연구결과가 있었으며 본 실험에서 모든 mouse가 폐사한 것은 접종 dose가 높았던 것이라 생각한다. SG 변이주의 경우 원래 마우스에서는 감염성이 없는 것으로 보고되고 있으나 본 실험에서는 bedding 교체 후 IP 경로로 접종한 모든 개체가 폐사하고 7일 내로 PO 접종한 모든 개체가 폐사하였다. 이는 bedding 교체시 교차 감염이 된 것으로 추측한다. 한편, ST 변이주의 경우 PO 접종군에서는 채혈 1~2일 후 폐사가 일어난 경우가 있었으나 이는 채혈로 인해 폐사된 것으로 추측한다. 한편 SG 야생주 접종의 경우 폐사한 개체가 많지 않으며, mouse가 SG에 resistance가 있다는 점으로 미루어 보아, SGM 접종군에서 높은 폐사율이 나타난 것은 Contamination이 의심된다. 이들 시험결과를 재확인 하기 위해 현재 2차 마우스 시험을 진행중에 있어 1차년도에 짐작면역을 유도하는 균주 선발이 완료될 것으로 기대된다.

(2) ELISPOT: SE, SG, ST 각각의 약독화균주와 일반균주를 접종시킨 mouse에서 접종 10주 후 비장세포로부터 IgA의 생성수준을 측정하기 위하여 ELISPOT을 실시하였다. 현미경 하에서 membrane에 나타난 spot의 수를 세어 이를 tukey HSD(SAS9.1.3)로 분석한 결과 각 group간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이 같은 결과가 나타난 이유는 일반적으로 ELISPOT 과정에서 spot을 develop한 후 counting이 빠른 시일 내에 일어나야 하나, 본 실험에서는 spot develop 후 counting까지 10일 이상이 경과되었기 때문이라 생각한다. 또한, 현미경 하에서 육안으로 counting 하였기 때문에 이미 흐려진 spot 측정이 불가능했을 뿐 아니라 spot의 크기차이를 결과에 반영할 수 없었다. 한편, mouse가 salmonella에 감염된 후 조직 내에서 완전히 제거되기까지 10여일이 걸린다는 것을 고려할 때, 이미 ELISPOT을 실시할 당시의 mouse는 지속적인 autoinfection이 되지 않는 이상, 비장조직으로부터 완전히 salmonella가 제거되었을 가능성이 있다. 따라서 memory B cell에 의한 IgA를 측정하는 것이 아닌, natural infection에 의해 activation된 B cell로부터 분비된 IgA를 측정하는 이번 실험에서 유의적으로 많은 IgA가 생성되지 않았을 수도 있을 것으로 생각한다. 따라서 현재 마우스 접종 후 재 실험을 하고 있다. ELISA의 경우 확립 중에 있다.

○ 추가적인 살모넬라 변이주의 제작

▶ 연구목표 및 결과요약: 점막유도를 위한 살모넬라 추가 변이주 제작을 λ red recombination system을 이용하여 진행하고 있다. 최근에 LPS합성을 저해하는 유전자를 결손시켜 이 방법을 사용하여 LPS변이주 제작을 완료하였고 In vitro상에서 확인을 하고 있다. 이 결손된 유전자는 기존에 결손된 다중 결손변이주에 각각 접목을 시킬 예정이다.

▶ 연구수행내용 및 연구결과

(가) 방법

(1) 사용된 균주: 균주는 SE 403(wild-type strain)이 사용 되었다(IVKB01403). 또한 본 실험에 사용된 plamid는 표 11과 같다. E.coli와 salmonella strain은 Luria-Bertani (LB) medium에서 37°C에서 진탕배양하였고, kanamycin, ampicillin, chloramphenicol 각각 70 mg/ml, 100 mg/ml, 30 mg/ml가 되도록 성장배지에 첨가하였다.

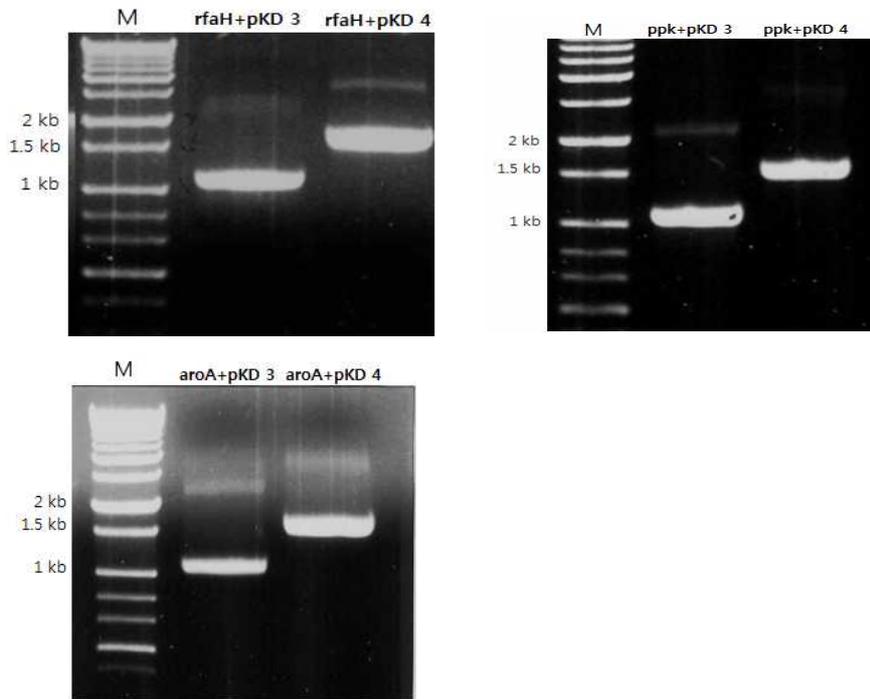
표 11. strains and plasmids used in this study

strain or plasmid	Reference or source
S. enteridis strains	
SE 403	wild-type S. Enteritidis 403
SEΔrfaH	403, ΔrfaH
SEΔ2	403, ΔrfaHΔppk
SEΔ3	403, ΔrfaHΔppkΔAroa
Plasmids	
pTP 233	
pKD3	Template plasmid for amplication of a cat cassette flanked by FLP recognition sites (FRT)(oriR, Amp ^R Cm ^R)
pKD4	Template plasmid for amplication of a kan cassette flanked by FLP recognition sites (FRT)(oriR, Amp ^R Km ^R)
pCP 20	ts (replicates at 30°C) plasmid bearing the flp recombinase gene, Cm ^R Amp ^R

(2) PCR을 이용한 유전자의 증폭: PCR에 사용한 primer는 아래와 같다.

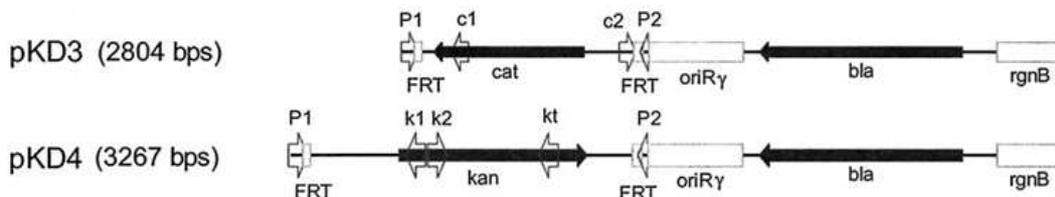
Long primer	Sequence
rfaH- F	5'-CTAAATCTTGCGAAAACCGGTGTTTTTACGCTCTGCTTCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
rfaH- R	5'-GCGGATAAGAGTCATTATGCAATCCTGGTATTTACTGTACCATATGAATATCCTCCTTAG-3'
ppk- F	5'-ATGGGTCAGGAAAAGCTATATATCGAGAAAGAACTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'
ppk- R	5'-TTAGTCTGGTTGCTCGAGTGATTTGATGTAGTCATCATGGGAATTAGCCATGGTCC-3'
aroA- F	5'-ATGGAATCCCTGACGTTACAACCCATCGCGCGGGTCGATGGCGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC-3'
aroA- R	5'-TTAGGCAGGCGTACTCATTGCGGCCAGTTGTTGAAATAATCAGCATATGAATATCCTCCTTAG-3'

*PCR product는 아래와 같이 예상하는 크기를 나타냈다.



(2) Electroporation: : competent cell을 제조하기 위해 균주 LB배지에 IPTG(200mg/ml)를 첨가하여 OD600가 0.3이 되도록 배양하였다. 원심분리(4000rpm, 4°C, 10min)를 하여 균을 침전시킨 후 DDW로 세척을 2회 시행하였다. 10% glycerol을 더한 후 1.7ml tube에 분주하였다 Electroporation (SE 403 + PTP233 + pKD3 or pKD4)을 하기 위해 상기에서 제조한 competent cell 40 μ l에 plasmid(pKD3,4) 3 μ l를 첨가한 후 2분간 정치하였다. 2mm cuvette에 넣고 electroporation 한 후 37°C에서 1시간 배양 후 LB agar(pKD3-CM/pKD4-KM)에 배양 하였다.

(3) Marker 항생제 유전자의 제거: pCP 20는 FRT를 인식하는 flipase에 의해 pKD3와 pKD4의 antibiotic resistance sequence를 제거하는데 사용되었다. Replica test는 pCP20(AMP^R) plasmid가 삽입되어 antibiotic resistance이 모두 제거되었는지 확인하였다.LB Free배지와 Tet , AMP, KM or CM이 포함된 agar 배지에 균을 needle을 이용하여 선을 긋고 배양하였다(24h, 37°C), tetracyclin 20 mg/ml, ampicillin 100 mg/ml, kanamycin 70 mg/ml, chloramphenicol 30 mg/ml을 사용 하였다.



생성된 colony중에서 단일 colony를 얻어서 sDDW에 희석을 한 후 template로 사용하였다. 아래와 같은 primer를 사용하여 DNA를 증폭시킨 후 전기영동을 통해 DNA size를 확인 하였다.

primer	sequence
rfaH- F	5'- GAACGATAGCTAAATCTTGC-3'
rfaH- R	5'-GAACAAGCGGATAAGGA -3'
ppk- F	5'- ATGGGTCAGGAAAAGCTATA -3'
ppk- R	5'- GTTGCTCGAGTGATTTGATGT-3'
aroA- F	5'- TTACAACCCATCGCGCGGGTC -3'
aroA- R	5'- TTAGGCAGGCGTACTCATTTCG -3'

(4) LPS의 확인: *S. enteritidis*의 LPS는 extraction kit(intron)을 이용하여 추출하였고, pattern은 SDS-PAGEsystem을 사용하여 분석하였다. 15% Separating gel, 5% stacking gel에 의해 분리 되었다. Gel은 silver-stain kit를 사용하여 band pattern을 염색하였다.

(나) 결과

(1) LPS결손 SE의 제작:

- SE Δ rfaH::KM, SE Δ rfaH::CM

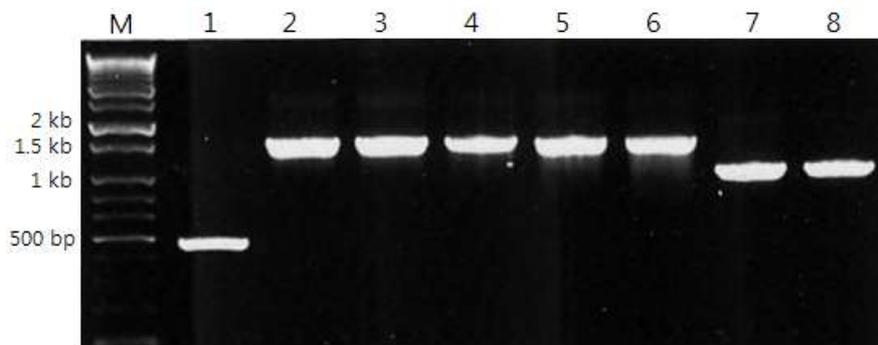


그림 8. Wild type *S. Enteritidis*와 rfaH::cat mutant, rfaH::kan mutant로부터 rfaH gene을 PCR분석하였을 때 WT의 DNA size는 485 bp이고, SE Δ rfaH::KM은 1171 bp, SE Δ rfaH::CM- 1367 bp 밴드를 관찰할 수 있었다. M: marker 1-kb ladder; Lane 1: WT - 485 bp; Lane 2~6: SE Δ rfaH::KM- 1171 bp; Lane 7,8: SE Δ rfaH::CM- 1367 bp.

(2) LPS결손 SE의 제작: LPS결손변이주에서 항생제 유전자의 삭제 (SE Δ rfaH)

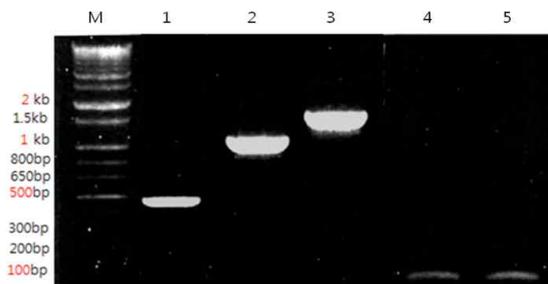


그림 9. Wild type *S. Enteritidis*와 rfaH::kan(KM) 그리고 rfaH::cat(CM) mutant로부터 rfaH gene을 DNA size로 비교하였을 때 WT은 495bp, 그리고 각각의 mutant는 1554bp, 1291 bp에서 밴드를 관찰할 수 있었다. PCP20을 이용하여 antibiotic deletion이 된 mutant는 127bp로 antibiotic이 deletion이 됨을 PCR을 통해 확인 하였다. M: marker 1-kb ladder; Lane 1: 495bp; Lane 2: 1554 bp; Lane 3: 1291 bp; Lane 4: 127 bp; Lane 5: 127 bp.

(3) LPS결손 및 ppK 결손 SE의 제작:SE Δ rfaH Δ ppk:: KM

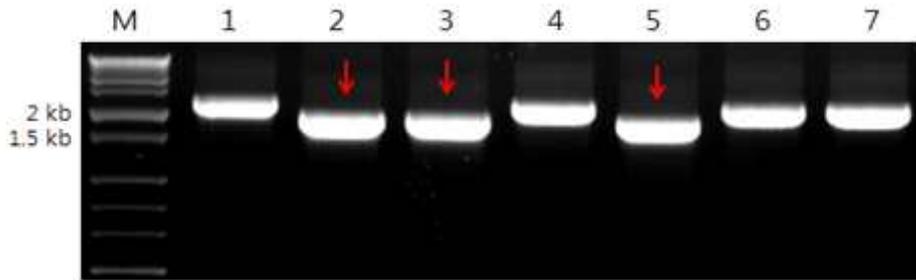


그림 10. Wild type *S. Enteritidis*와 *ppk::kan(KM)* mutant로 *ppk* gene을 DNA size로 비교하였을 때 WT은 2655 bp, 그리고 mutant는 1568 bp에서 밴드를 관찰할 수 있었다. M: marker 1-kb ladder; Lane 1: WT - 2655 bp; Lane 2,3,5: *ppk::kan(KM)* mutant - 1568.

(4) LPS결손 및 ppK 결손 SE의 제작: 항생제 유전자의 삭제 ($SE\Delta rfaH\Delta ppk$)

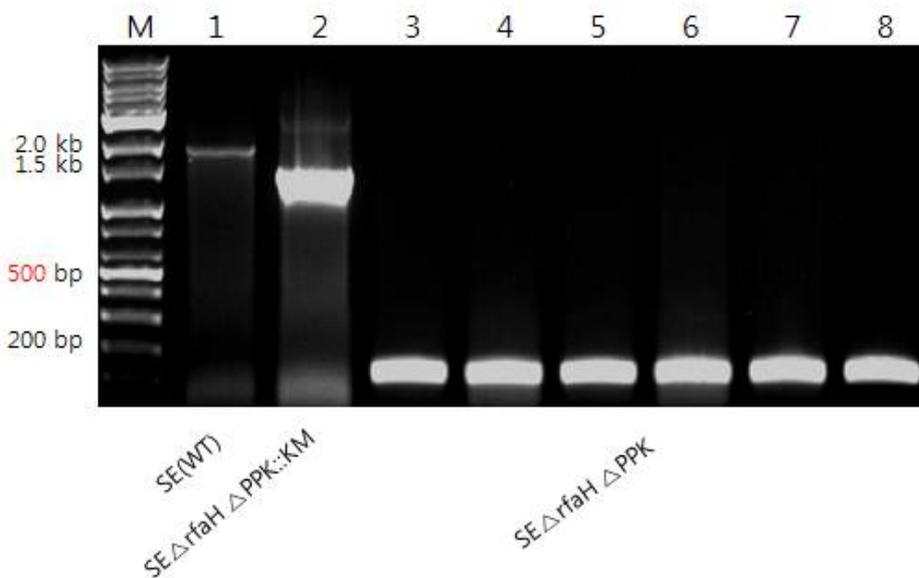


그림 11. Wild type *S. enteritidis*와 *ppk::kan* mutant 그리고 Δppk mutant로부터 *ppk* gene을 PCR분석하였을 때 WT의 DNA는 2459 bp이고, $SE\Delta rfaH\Delta ppk::KM$ 은 1553 bp, $SE\Delta rfaH\Delta ppk$ 는 127 bp에서 밴드를 관찰할 수 있었다. M: marker 1-kb ladder; Lane 1: 2469 bp; Lane 2: 1553 bp; Lane 3~8: 127 bp.

(5) LPS결손 SG변이주의 제작 ($SG\Delta 4\Delta rfaH::CM$)

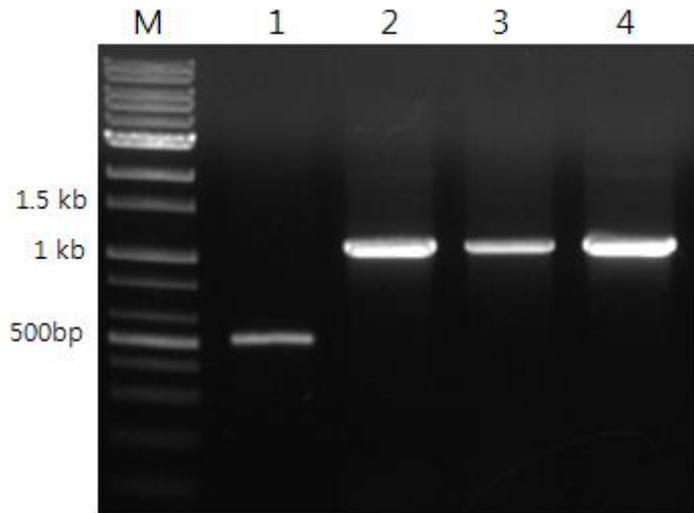
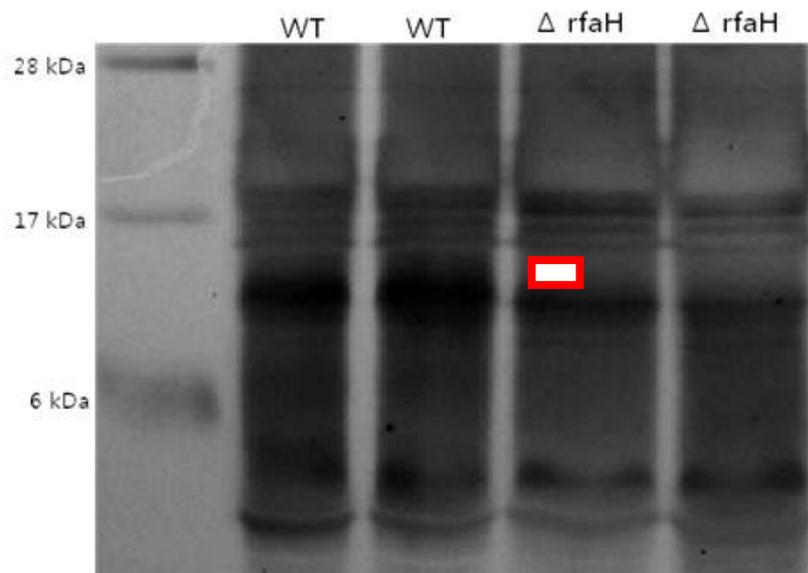


그림 12. Wild type *S. galinarum*와 *rfaH::cat* mutant로부터 *rfaH* gene을 PCR분석하였을 때 WT의 DNA size는 506 bp이고, $SG\Delta 4\Delta rfaH::CM$ 은 1138 bp 밴드를 관찰할 수 있었다. M: marker 1-kb ladder; Lane 1: $SG\Delta 4$ - 2469 bp; Lane 2~4: $SG\Delta 4\Delta rfaH::CM$ - 1553 bp.

(5) LPS결손변이주의 LPS의 확인:



■ 그림 13. Wild type *S. Enteritidis*와 *rfaH::cat* mutant의 LPS 분석을 하였을 때 WT의 LPS와 비교하여 mutant의 LPS의 양이 적게 발현된 것을 볼 수 있었습니다.

○ 향후 공격접종을 위한 살모넬라 균주의 선발 및 닭에서의 병원성 조사

▶ **연구목표 및 결과요약:** 향후 살모넬라 운반체를 이용한 방어효과 시험에 있어서 사용할 공격접종균주를 선발하고 병원성 조사를 닭에서 실시하였다. *In vivo*에서 계대배양 후 각각의 계대배양시간 및 비장에서의 집락수를 측정하여 병원성 조사를 실시한 결과 SG의 경우 계대배양 후 병원성이 증가되어 충분히 공격접종균주로서 활용이 가능한 것으로 나타났다. ST와 SE는 계대배양시간 및 비장에서의 균수가 개체에 따라서 차이가 있는 것으로 나타남. 이 경우 좀더 계대배양을 진행중임.

▶ **연구수행내용 및 연구결과**

(가) 방법

(1) 실험동물: 2주령의 갈색계를 이용하여 균을 접종하였다. 접종 Group은 Salmonella Galinarum(SG), Salmonella Enteritidis(SE), Salmonella Typhimurium(ST) 3가지를 경구접종을 통하여 접종한 3개의 group 이고 각 group 당 병아리(갈색계)는 3~4 마리로 하였다.

(2) 표준균주: 강원대학교 수의전염병 실험실에서 보관중인 균주를 이용하였다. 모두 wild type이며, Salmonella Galinarum (IVKB01071), Salmonella Enteritidis (IVKB011356), Salmonella Typhimurium (IVKN01419)을 사용하였다.

(3) 접종방법: 각 균주를 LB(Lutina-bernati) broth에 접종하고 shaking incubator를 이용하여 180rpm, 37°C에서 24시간 진탕배양 하였다. 배양 후, 총 5ml 중 1ml을 OD (optical density)를 측정하였다. OD값은 0.8~1.2 사이로 배양하였다. 2ml tube에 배양액을 담고 13,000rpm에서 1분 30초 원심분리 후 상층액을 제거하고 PBS 용액 1ml을 넣고 부유후 다시 원심분리하여 총 3번 반복하여 세척하고, 마지막 세척 후 PBS 2ml을 넣고 균질화하였다. 총 volume 2ml 중 1.5ml은 경구투여 균액으로 사용하고(마리당 0.5ml) 나머지 100 μ l는 10진 희석을 하여 LB agar plate에 배양하여 CFU (colony forming unit) 를 측정하였다.

(4) 폐사 후 부검: 개체가 폐사하거나 10일이 지났음에도 폐사하지 않으면 안락사를 하여 부검을 실시하였다. 안락사는 CO₂ 를 이용하여 실시되었다. 간과 비장의 일부를 각각 따로 채취하여 PBS가 담겨진 tube에 넣고 조직을 분쇄한다. 분쇄 된 조직액을 10진 희석을 하여 NA(Nalidixic acid)가 첨가된 SS(Salmonella shigella) agar plate에 spreading 하여 37°C에서 24시간 배양하고 CFU를 측정하였다. 3마리 개체 중 가장 CFU가 높게 나온 plate에서 colony를 따와 다시 '다' 항목과 동일하게 진행을 하였다.

(나) 연구결과

(1) Salmonella Galinarum의 passage 마다 접종 CFU 결과:

Salmonella Galinarum의 각 Passage에서의 접종량은 다음과 같다.

Salmonella Galinarum CFU/ml		
Passage 1	Passage 2	Passage 3
9 x 10 ⁷ cfu	6.5 x 10 ⁸ cfu	4 x 10 ⁹ cfu

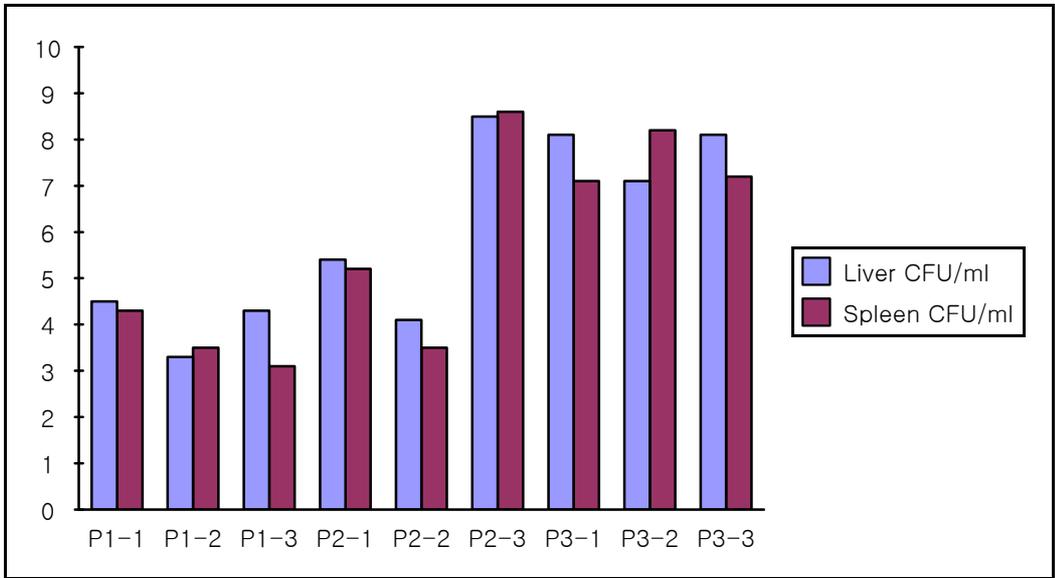


그림 14. Salmonella Galinarum의 passage 마다 부검 후 CFU 결과.

* P1-1 경우 Liver의 CFU는 7.6×10^4 이고, spleen은 1.4×10^4 CFU이다.

(2) Salmonella Enteritidis의 passage 마다 접종 CFU 결과:

Salmonella Enteritidis의 각 Passage에서의 접종량은 다음과 같다.

Salmonella Enteritidis CFU/ml		
Passage 1	Passage 2	Passage 3
5×10^7 cfu	5×10^8 cfu	6×10^8 cfu

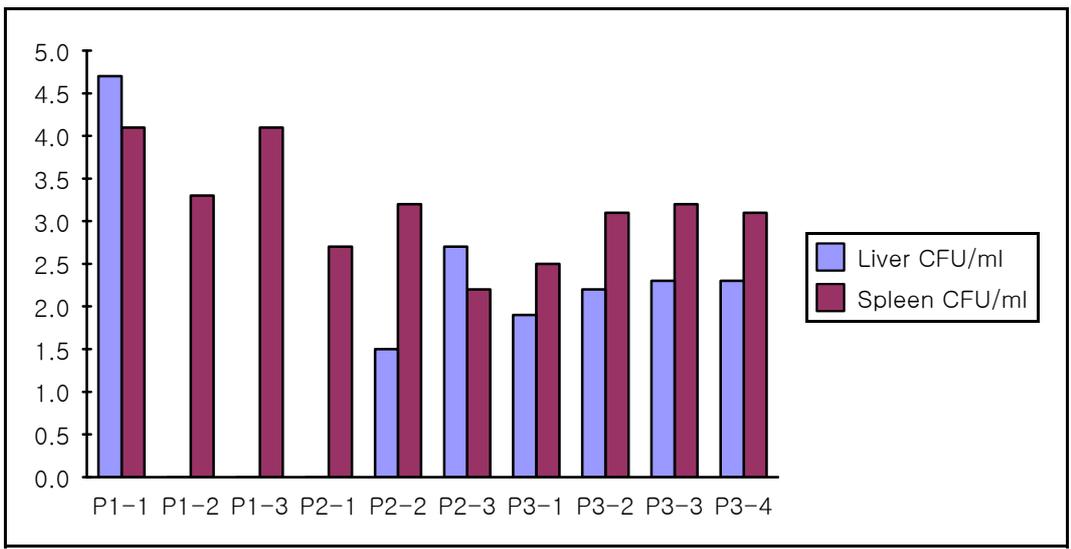


그림 15. Salmonella Enteritidis의 passage 마다 부검 후 CFU 결과.

(3) Salmonella Typhimurium의 passage 마다 접종 CFU 결과:

Salmonella Typhimurium의 각 Passage에서의 접종량은 다음과 같다.

Salmonella Typhimurium CFU/ml		
Passage 1	Passage 2	Passage 3
6.5×10^8 cfu	4.2×10^8 cfu	5×10^9 cfu

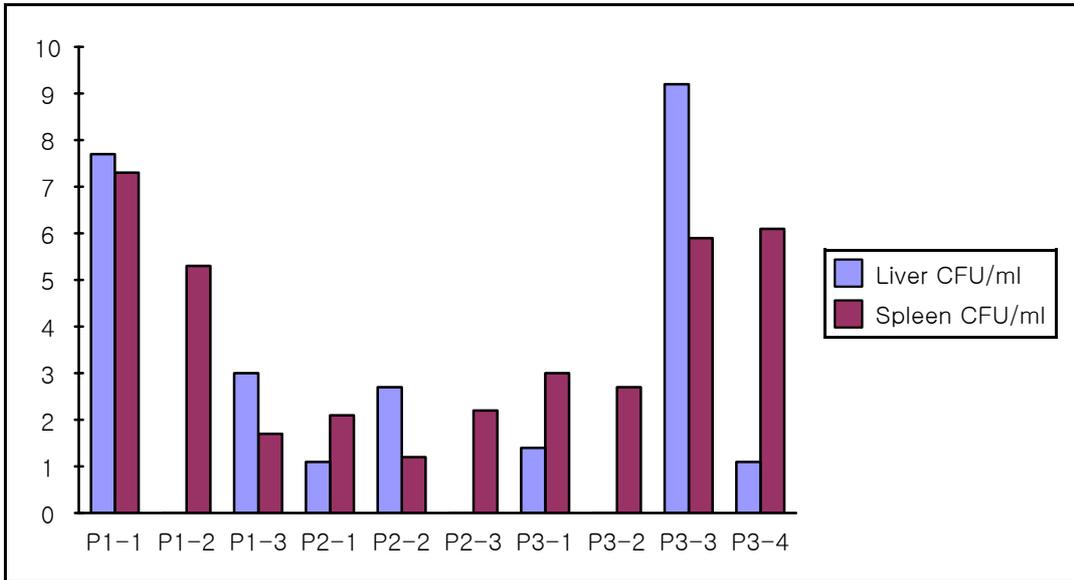


그림 16. Salmonella Typhimurium의 passage 마다 부검 후 CFU 결과.

(4) 고찰

처음 접종 균을 배양하여, 2주령 병아리에게 접종을 하고, 폐사 된 병아리의 간과 비장에서 CFU를 측정 후, 가장 높은 CFU를 보인 것을 선택하여 다음 passage의 접종 균으로 사용하였다. P3까지 종료 후 가장 높게 측정이 된 균을 최종 선택하여 보관을 하였다. LB broth에 최종 선택된 colony를 접종하여 24시간 37°C에서 진탕 배양 후, 100 μ l를 따와 LB agar에 spreading 하고 24시간 37°C에서 배양하였고, 배양된 plate에 LB broth(15% glycerol) 4ml을 붓고 colony들을 spreader로 broth와 함께 섞어 주고, 섞인 균액을 stock tube에 담고 -70°C에 보관하였다.

Salmonella Galinarum은 각 Passage 마다 폐사율이 높아지는 결과를 보여주었다. 조류에게 숙주 특이적인 SG는 SE와 ST보다 높은 폐사율을 보여주었다. 반면에 SE와 ST는 Passage마다 폐사하지 않았다. 2주령의 병아리에게 접종된 균량은 위 접종 CFU에서 절반이(500ul) 접종되었다. SG같은 경우 매 접종 Passage때 마다 10^4 정도의 균이 병아리에게 접종 되었다. SE와 ST도 SG와 비슷하게 10^4 정도 접종이 되었다. SE와 ST는 조류에게 숙주 특이적이지 않아서 좀 더 높은 CFU(10^6)로 접종을 했어야 폐사를 시킬 수 있다고 생각이 된다. 추후 실험 시 LB broth에 접종 균을 배양할 때, OD값(Optical density)을 SG는 1.0~1.2까지 배양을 하고, SE와 ST는 1.2~1.4 까지 배양하는 것으로 계획한다.

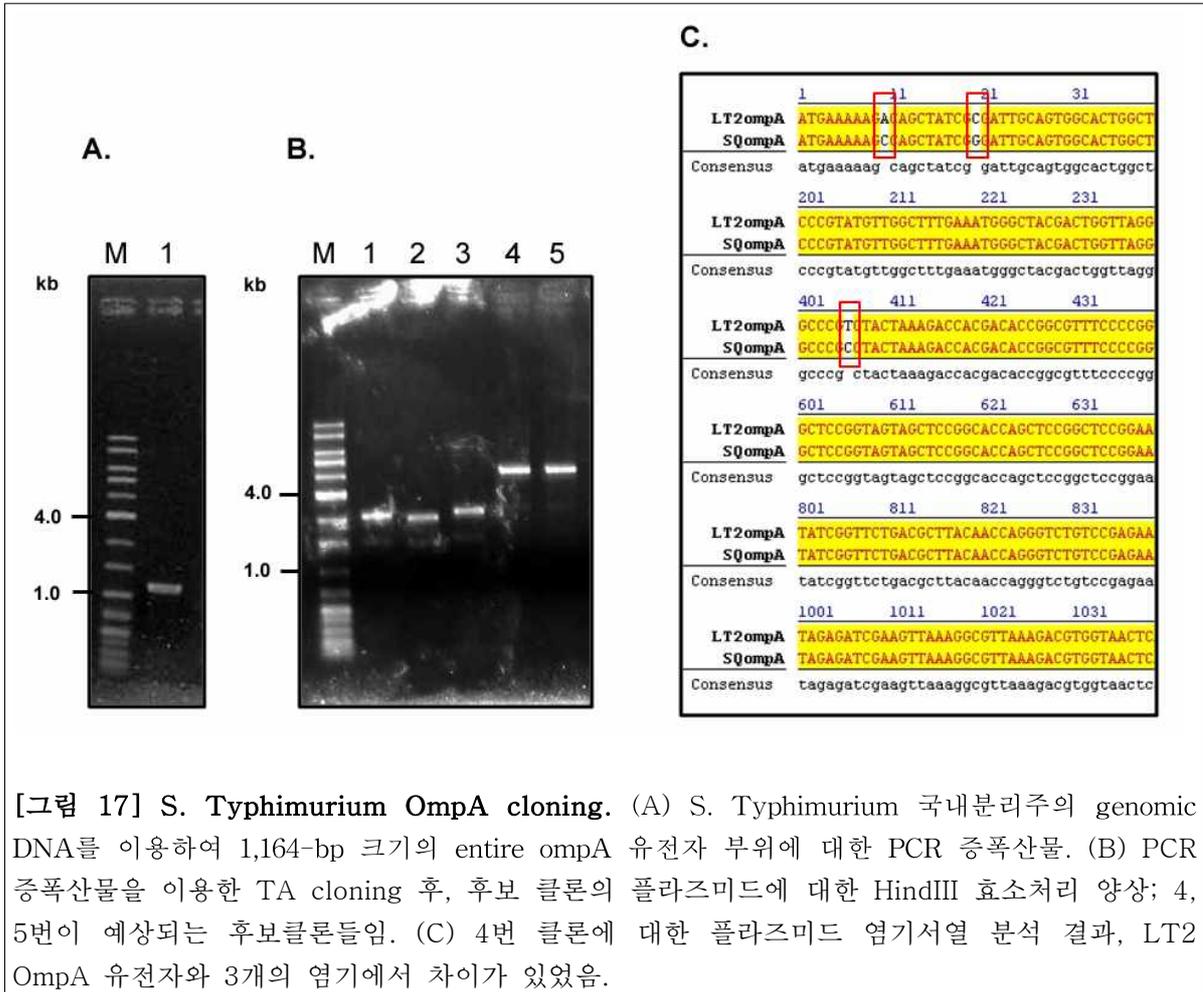
○ 살모넬라균 호환성 이중항원 함유 재조합 표면단백질 발현시스템 구축

▶ **연구목표 및 결과요약:** 살모넬라균 외막 표면단백질 발현을 위한 대표적인 후보 외막 단백질로서 OmpA, LamB, OmpF, OmpC가 기존 문헌보고를 통하여 널리 알려져 있음. 최근 문헌보고에 의하면, 이 중 OmpA는 살모넬라균의 병원성 및 적응면역반응의 개시인자로 규명되었음은 물론, 대장균 OmpA의 경우 X-ray crystallography 구조가 밝혀져 있어, 본 연구과제 수행을 위한 좋은 후보 외막 단백질로 판단됨. 따라서 본 연구팀은 기존 문헌보고를 토대로 OmpA 기반의 이중항원 재조합 표면단백질 발현시스템을 구축하고자 하였으며, 해당 목표달성을 위하여, OmpA 구조분석을 실시함으로써 외부로 노출되어 있는 OmpA transmembrane domains에 존재하는 가변부위를 탐색, 선별하고, 유전학적 기법을 이용하여 변형하여 재조합 표면단백질 발현 벡터 구축을 완료하였음.

▶ 연구수행내용 및 세부 결과

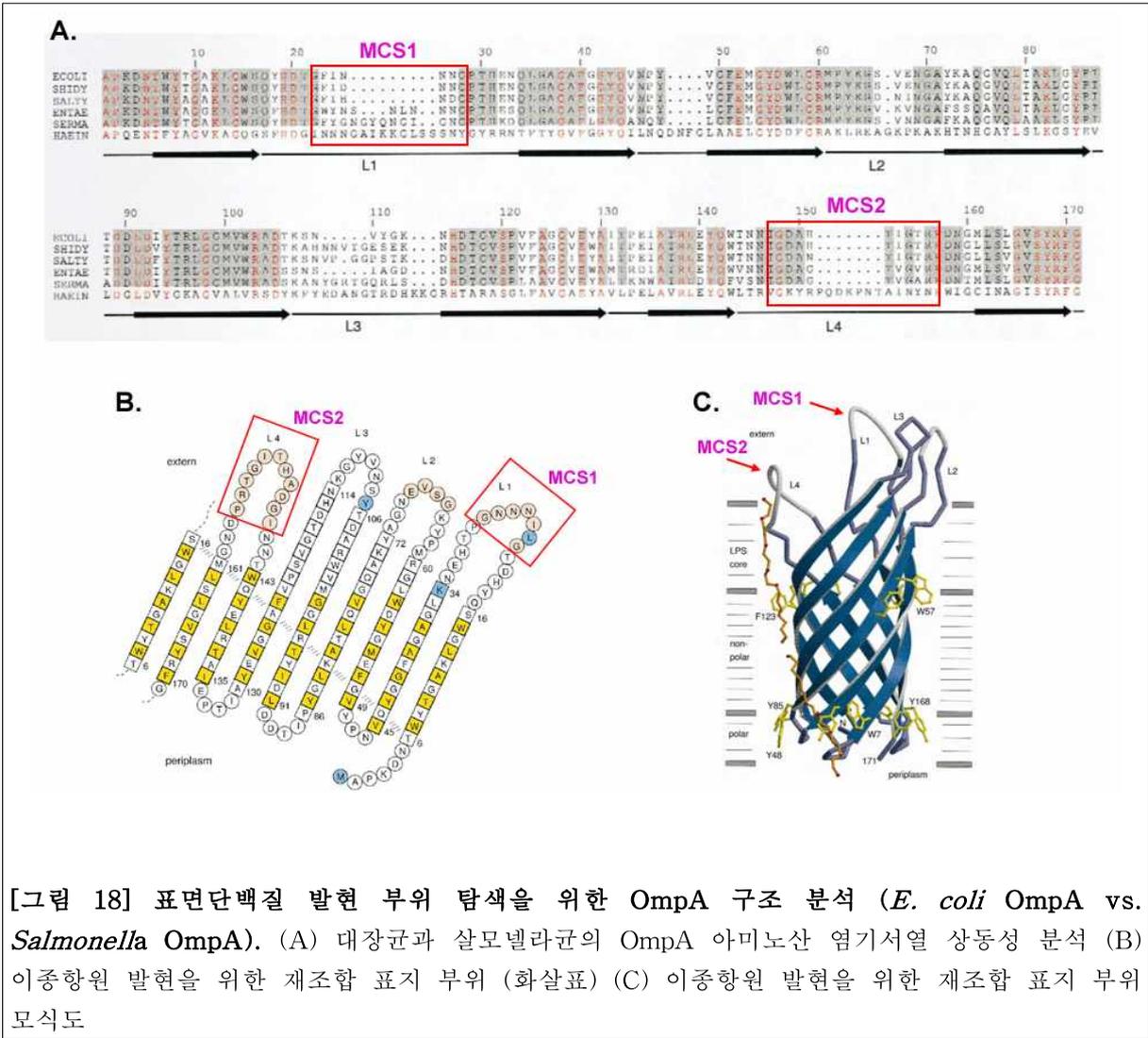
- **살모넬라균 전장유전체(genomic DNA)로부터 OmpA 유전자의 full-length 클로닝:** S. Typhimurium str. LT2의 외막 단백질의 일종인 OmpA에 대한 DNA 염기서열은 NCBI GenBank database (Accession No. NC_003197 complement 1160965-1162017 부위)로부터 염기서열 정보분석을 통하여 확인하였고, 이를 토대로 OmpA 유전자 특이 primers인 J281(LT2 ompA F: 5'-TCT CGT TGG AGA TAT TCA TG-3')과 J282(LT2 ompA R: 5'-GTT GTC ATC CAG ACC AGA GC-3')를 발굴/합성하였음. 10 pmol의 J281/J282 primer set과 S. Typhimurium 국내분리주의 genomic DNA를 이용하여 1,164-bp 크기의 entire ompA 유전자 부위를 PCR 증폭하였음(아래 그림 참고). PCR 반응은 EFII Taq polymerase premix (Solgent)를 이용하여, 95°C/5분간 초기변성 후 95°C/1분, 60°C/1분, 72°C/1분을 1 cycle로 하여 30회 반복, 그리고 72°C/20분간 최종 증폭하였음. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동하였고, EtBr 염색 후 UV transilluminator에서 확인하였음 (아래그림 A 참고). 기대하였던 ~1.2-kb PCR 증폭산물은 pLPS-T (ELPiS) 벡터에 conventional TA cloning 기법을 이용하여 ligation한 후, DH5a에 도입하여 후보 클론들을 선별하였고, 염기서열분석(Marcrogen)을 통하여 증폭산물을 최종 확인하였음 (아래그림 B 참고). S. Typhimurium ompA 유전자를 포함하는 플라스미드는 pLPS-T/ompA라고 명명하였음.

흥미롭게도 pLPS-T/ompA의 염기서열 분석결과, 국내분리주로부터 클로닝된 ompA 유전자의 경우 LT2 표준균주의 ompA와 3개의 염기서열에서 변화를 확인하였음 (아래그림 C 참고). Amber codon과 같이 premature protein 산생 가능성을 분석한 결과, 3개의 염기서열의 변이가 full-length ompA의 발현에 영향을 주지 않았으나, 이들 염기서열위치에서의 변이가 일반적인 것인지, 아니면 국내 분리주 특이적인지 현 단계에서 명확치 않음. 따라서 이들 ompA 염기서열을 GenBank DB에 등록할 계획임 (GenBank DB 등록 추진 중).



[그림 17] *S. Typhimurium* OmpA cloning. (A) *S. Typhimurium* 국내분리주의 genomic DNA를 이용하여 1,164-bp 크기의 entire ompA 유전자 부위에 대한 PCR 증폭산물. (B) PCR 증폭산물을 이용한 TA cloning 후, 후보 클론의 플라스미드에 대한 HindIII 효소처리 양상; 4, 5번이 예상되는 후보클론들임. (C) 4번 클론에 대한 플라스미드 염기서열 분석 결과, LT2 OmpA 유전자와 3개의 염기에서 차이가 있었음.

- 재조합 표면단백질 발현을 위한 OmpA 부위 선정: 대장균 OmpA와 살모넬라균 OmpA는 약 90% 정도의 유전자 상동성을 가지고 있어, 구조적으로 매우 유사함 (그림 A). 따라서 본 연구팀은 기존 문헌보고를 토대로 OmpA의 transmembrane domains을 확인하였고, 그 중 외부환경에 노출되어 있는 가변부위인 L1과 L4 domains을 표면단백질 발현을 위한 후보 표적부위로 선발하였음(아래 그림 참고). 이는 L1과 L4 가변부위가 물리적으로 가장 멀리 위치하고 있어, 상대적으로 근접한 다른 가변부위 보다 발현할 이중항원의 크기 선택성을 높일 수 있다고 판단됨.



[그림 18] 표면단백질 발현 부위 탐색을 위한 OmpA 구조 분석 (*E. coli* OmpA vs. *Salmonella* OmpA). (A) 대장균과 살모넬라균의 OmpA 아미노산 염기서열 상동성 분석 (B) 이중항원 발현을 위한 재조합 표지 부위 (화살표) (C) 이중항원 발현을 위한 재조합 표지 부위 모식도

- 재조합 표면단백질 발현을 위한 OmpA transmembrane L4 domain의 가변부위에 multiple cloning site 2 (MCS2) 삽입: Inverse 혹은 reverse PCR을 기반으로 한 site-directed mutagenesis를 이용하여 ompA의 transmembrane domain (64-588 bp) 중 L4 domain (505 - 555 bp) 내에 존재하는 5개의 아미노산서열 (-ANTIG-)를 제거하고, 인공적으로 합성한 MCS2 site로 치환/삽입하였음.

MCS2 site를 결정하기 위하여, ompA 및 향후 발현벡터로 사용할 arabinose inducible pBAD 플라스미드의 염기서열을 분석하였고, 아래와 같은 단독 제한효소 부위를 활용할 수 있음을 확인하였음 (아래 그림 참고). 다수의 가능한 제한효소 부위 중 일반적으로 이용되고 있는 7종의 제한효소 부위(KpnI-PvuII-SacII-SphI-XhoI-NotI)를 MCS2에 적용하였으며, 이를 참고로 primers J285 (5'-GCA TGC GAG CTC CAG CTG GGT ACC ATC ACC GAT GTT GTT AGT CCA-3')와 J286 (5'-CTC GAG GCG GCC GCA ACC CGT CCG GAC AAC GGC CTG-3')을 합성하였음.

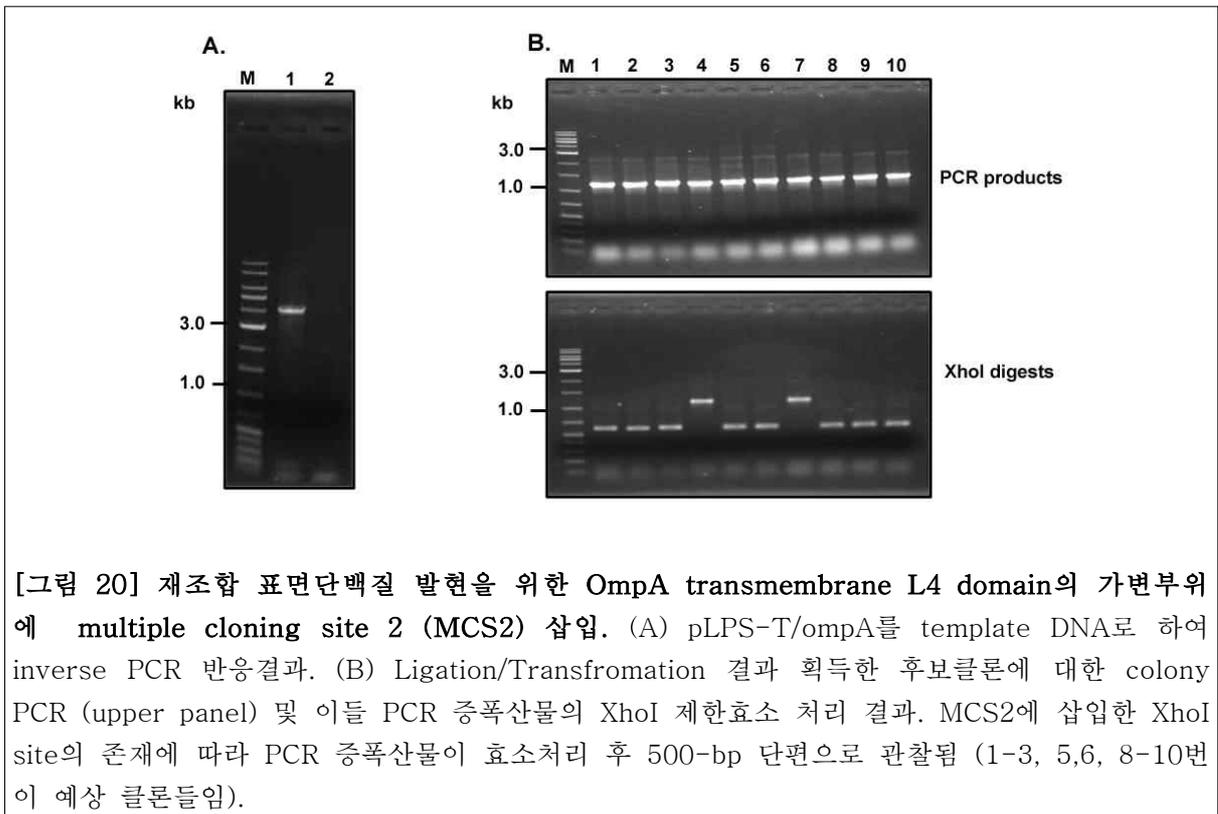
No Sites found for the following Restriction Endonucleases

AatII	AfeI	AscI	AvrII	BbeI	BbsI	BbvCI	BclI	BplI	BseRI	BsiWI
BstXI	DraIII	EagI	EcoNI	EcoO109I		EcoRI	FseI	KasI	KpnI	MscI
NaeI	NarI	NgoMIV	NheI	NotI	PacI	PpuMI	PshAI	PstI	RsrII	SacI
SacII	SanDI	SbfI	SfiI	SfoI	SgfI	SmaI	SnaBI	SpeI	SrfI	StuI
SwaI	XbaI	XcmI	XmaI							

[그림 19] 살모넬라균 이중항원 재조합 표면단백질 발현벡터의 Multi-Cloning Site에 이용 가능한 제한효소 부위 탐색 (노란 색으로 표시된 제한효소는 보편적으로 상용화되어 있음을 암시함)

이렇게 결정된 MCS2 부위를 L4 domain의 가변부위에 치환/삽입하기 위하여, 각각 10 pmol에 해당하는 J285/J286과 위에서 구축한 pLPS-T/ompA를 template DNA로 사용하여 inverse PCR을 수행하였음 (아래 그림 A 참고). 이후 PCR 증폭산물을 EZ change Site-directed mutagenesis kit (Enzymomics)에 적용하여 MSC2 site (5'-KpnI/ PvuII / SacII/ SphI/ XhoI/ NotI-3')를 ompA L4 가변부위에 인공적으로 도입하였음. 생성된 다수의 클론에 대하여 colony PCR 및 해당 증폭산물의 XhoI 제한효소 처리 결과를 비교함으로써 후보 클론을 선별하였음. 인위적으로 삽입한 MCS2는 XhoI 제한효소 부위를 포함하기 때문에, 예상대로 L4 가변부위 변이를 포함하는 함유하는 클론의 경우, XhoI 처리 후 증폭산물이 잘리게 되며, 해당 후보클론의 플라스미드는 염기서열 분석을 통하여 최종 확인하였음 (아래 그림 B 참고). 결과적으로 구축된 플라스미드를 pLPS-T/ompA/MSC2라고 명명하였음.

살모넬라균의 intact OmpA L4 domain(-TNNIGD **ANTIG** TRPDNG-)에 대한 아미노산 서열 비교는, 해당 가변부위의 변형 후 (-TNNIGD **GTQLELACLEAAA** TRPDNG-)로 치환/변경되었음.



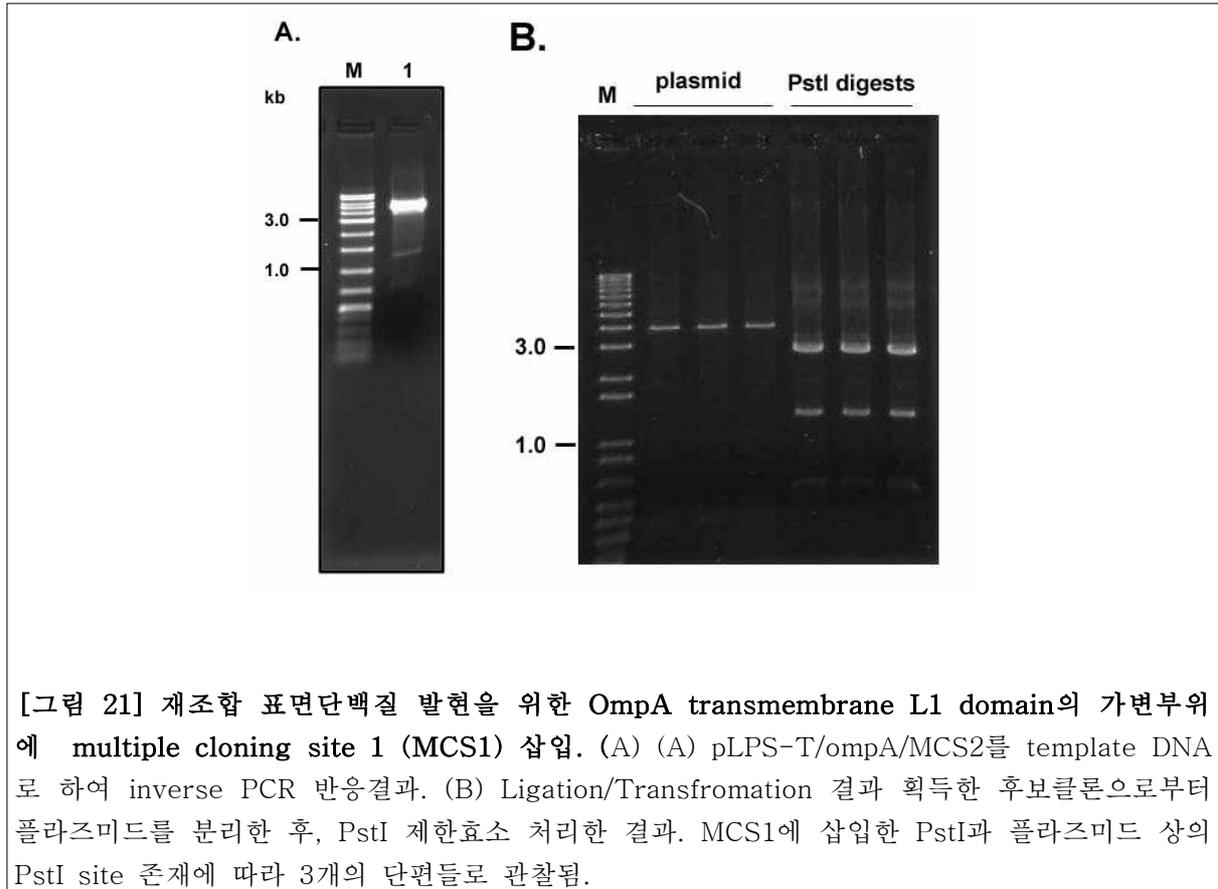
- 재조합 표면단백질 발현을 위한 OmpA transmembrane L1 domain의 가변부위에 multiple cloning site 1 (MCS1) 삽입: 상기 기술한 L4 domain 가변부위의 치환/삽입 전략과 동일한 방법으로 L1 domain의 가변부위를 치환/삽입하였음. Inverse 혹은 reverse PCR을 기반으로 한 site-directed mutagenesis를 이용하여 ompA의 transmembrane domain (64-588 bp) 중 L1 domain (112 - 162 bp) 내에 존재하는 5개의 아미노산서열 (-IHNDG-)를 제거하고, 인위적으로 합성한 MCS1 site로 치환/삽입하였음.

MCS site를 결정하기 위하여, ompA 및 향후 발현벡터로 사용할 arabinose inducible pBAD 플라스미드의 염기서열을 분석을 통하여, 위에서 사용했던 L4 가변부위에 삽입한 제한효소들을 제외하고 이용 가능한 단독 제한효소 부위를 결정하였음. 다수의 가능한 제한효소 부위 중 일반적으로 이용되고 있는 7종의 제한효소 부위(PstI/ XbaI/ SalI/ XmaI[SmaI]/ BglII/ SacII/ BstXI)를 MCS1에 적용하였으며, 이를 토대로 primers J287 (5'-GGG TCG ACT CTA GAC TGC AGG AAG CCG GTG TCA TGG TAC T-3')와 J288 (5'-CGG GAG ATC TCC GCG GCC AAT GCT ATG GCC GAC TCA TGA AAA CCA ACT G-3')을 제작하였음.

이렇게 결정된 MCS1 부위를 L1 domain의 가변부위에 치환/삽입하기 위하여, 각각 10 pmol에 해당하는 J287/J288과 앞서 구축한 pLPS-T/ompA/MCS2를 template DNA로 사용하여 inverse PCR을 수행하였음 (아래 그림 A 참고). 이후 PCR 증폭산물을 EZ change Site-directed mutagenesis kit (Enzymomics)에 적용하여 MCS1 site (5'-PstI/ XbaI/ SalI/ XmaI[SmaI]/ BglII/ SacII/ BstXI-3')를 ompA L1 가변부위에 인위적으로 도입하였음. 생성된 다수의 클론에 대하여 plasmid miniprep을 한 후, 제한효소인 PstI으로 처리하여 예상되는 3.0-kb와 1.1-kb DNA절편을 관찰함으로써, MCS1 부위가 정확히 삽입되었음을 확인하였음 (아

래그림 B 참고). 후보 클론에 대하여 플라즈미드 염기서열 분석을 통하여, 삽입된 MCS1 부위를 재확인하였음. 결과적으로 구축된 플라즈미드를 pLPS-T/ompA/MCS12라고 명명하였음.

살모넬라균의 intact OmpA L1 domain(-QYHDTGF **IHNDG** PTHEN-)에 대한 아미노산 서열 비교는, 해당 가변부위의 변형 후 (-QYHDTGF **LQSRVDPGRSPRPMLW** PTHEN-)로 치환/변경되었음.

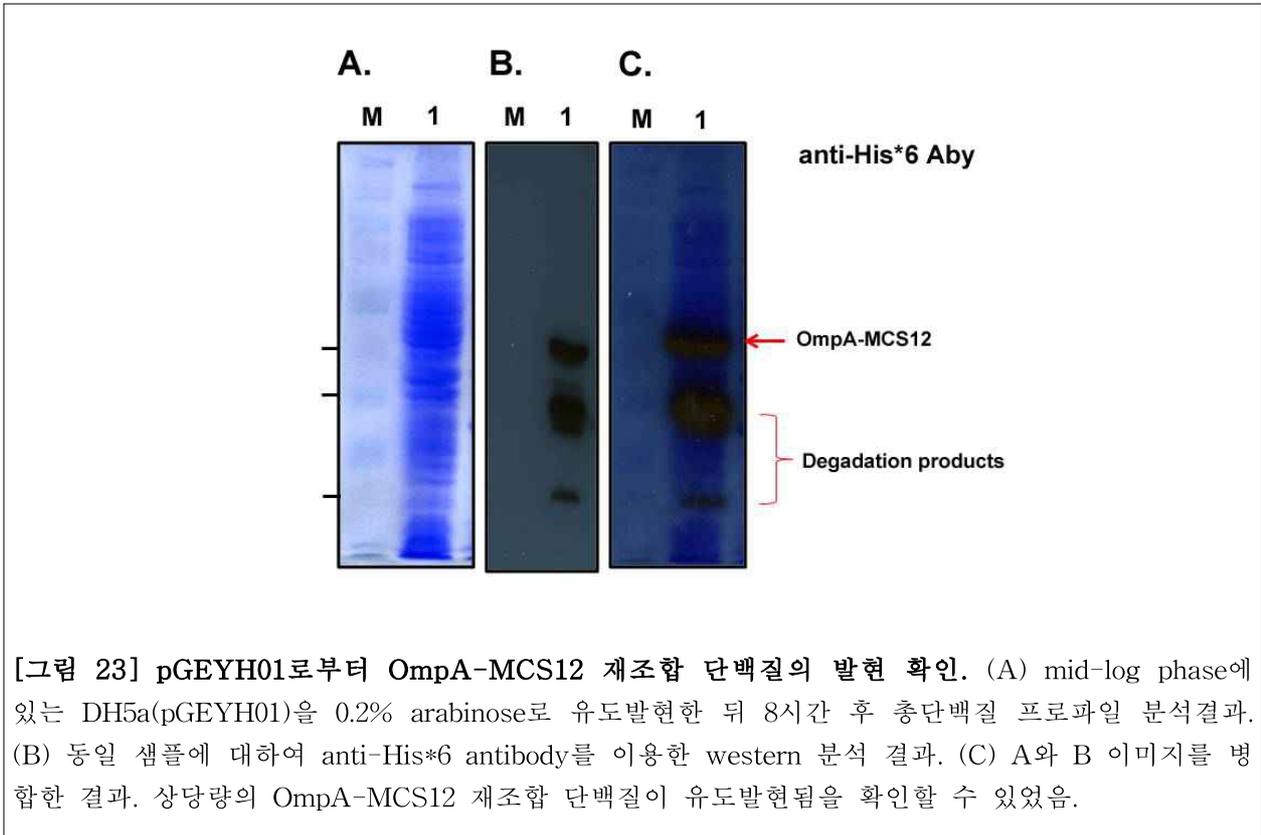


[그림 21] 재조합 표면단백질 발현을 위한 OmpA transmembrane L1 domain의 가변부위에 multiple cloning site 1 (MCS1) 삽입. (A) pLPS-T/ompA/MCS2를 template DNA로 하여 inverse PCR 반응결과. (B) Ligation/Transfromation 결과 획득한 후보클론으로부터 플라즈미드를 분리한 후, PstI 제한효소 처리한 결과. MCS1에 삽입한 PstI과 플라즈미드 상의 PstI site 존재에 따라 3개의 단편들로 관찰됨.

- 구축된 이중항원 재조합 표면단백질 발현 cassette을 pBAD/HisA 발현시스템에 적용: 이상 구축된 pLPS-T/ompA/MCS12는 ompA의 L1과 L4 domains의 가변부위에 MCS1과 MCS2가 포함된 chimeric OmpA를 발현할 것임. 해당 chimeric OmpA의 과발현 유도를 위하여, 엄격한 발현 조절이 가능한 것으로 알려진 arabinose inducible pBAD/HisA 단백질 발현 플라즈미드에 pLPS-T/ompA/MCS12에 존재하는 ompA/MCS12 cassette을 도입하였음. 이를 위하여, J293 (5'-AGA CCA TGG ATA AAA AGA CAG CTA TCG CGA T-3')과 J294 (5'-AGA AAG CTT TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG AGC CTG CGG CTG AGT TAC CAC-3')를 제작하였고, proof-reading 기능이 있는 PfuX Taq polymerase를 이용하여 pLPS-T/ompA/MCS12를 template DNA로 PCR 증폭하였음. PCR 반응조건은 95°C/2분간 초기변성 후 95°C/30초, 55°C/60초, 72°C/4분을 1 cycle로 하여 25회 반복, 그리고 72°C/20분간 최종 증폭하였음. PCR 증폭산물은 1% agarose gel에서 전기영동하였고, EtBr 염색 후 UV transilluminator에서 확인하였음 (아래그림 A 참고). PCR 증폭산물은 gel extraction kit를 이용하여 분리 정제하였으며, 발현백터인 pBAD/HisA 와 함께 NcoI/HindIII 제한효소로

동시 분해하여, 분해 산물 중 insert (약 1.0-kb의 ompA/MCS12 DNA 단편)와 3.0-kb 벡터를 분리 정제하였음 (아래 그림 참고). 분리 정제된 Insert와 벡터 DNA는 T4 DNA ligase (RBC)를 이용하여 ligation 한 후, DH5a에 도입하였고, 항생제가 첨가된 배지에서 후보 클론을 선발하였음. 플라스미드를 분리한 뒤, NcoI-HindIII 제한효소 처리하여, insert를 확인하였고, 후보 클론에 대하여 염기서열 분석을 통하여 삽입유전자를 재확인하였음 (아래그림 참고). 결과적으로 구축된 OmpA-MCS12의 arabinose 유도성 과발현 플라스미드를 pGEYH1로 명명하였음.

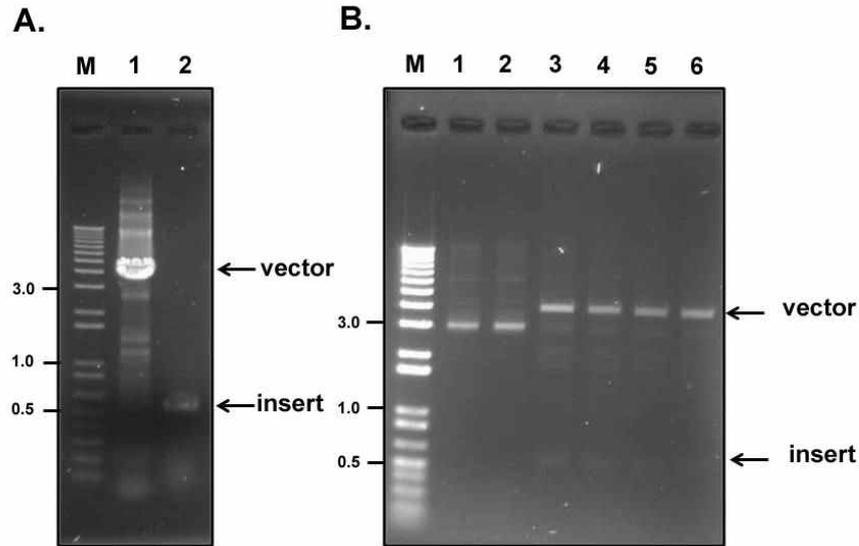
래 그림 참고)



- 최종 구축된 벡터시스템의 염기서열 분석에 의한 mapping: 최종 구축된 발현시스템은 PCR 및 subcloning을 통한 염기서열 데이터 분석을 의뢰(Marcrogen) 진행하였고, 결정된 염기서열은 향후 NCBI GenBank DB에 등록할 계획임.

0004 - 0276 bp	araBAD promoter
0319 - 1449 bp	OmpA-MCS12
1974 - 2834 bp	Amp-resistance gene
4183 - 5061 bp	AraC (-) 이 위치하고 있음.

- 살모넬라균 OmpA 기반 이중항원 함유 재조합표면단백질의 *in vivo* 발현시스템 구축 완료
- ▶ **연구목표 및 결과요약:** 구축된 표면단백질 발현시스템의 *in vivo* 활용성을 향상시키기 위하여 *in vivo* inducing promoter로 치환 및 변형하고자 함. 이를 위하여, *in vivo* inducible promoter로서 최근 문헌 보고된 바 있는 SsaG 유전자의 promoter를 적용함으로써, 향후 live attenuated vaccine 혹은 운반체로서 활용성을 높였음.
- ▶ **연구수행 내용 및 세부 결과**
 - **구축된 pBAD 발현시스템의 *in vivo* 활용을 위한 유전자 조작:** 살모넬라균에 존재하는 SsaG promoter를 PCR 증폭하기 위하여, S. Typhimurium LT2 (GenBank DB Accession number: NC_003197 REGION 1488537-1490752)의 염기서열 정보를 바탕으로 SsaG J295(5'-AGC CAT GGT GCT TTT CCT TAA AAT AAA TAC ATC GTA AGG-3')과 J296(5'-ATG GAA TTC CGC TGG AAT AGC ATT AA-3')를 제작하였음. High fidelity PfuX Taq polymerase를 이용하여 10 pmol의 J295/J296 primers와 국내 살모넬라균 genomic DNA로부터 532-bp의 SsaG promoter 부위를 PCR 증폭하였음 (아래 그림 참고). 또한 pBAD/HisA 벡터에 존재하는 AraC 및 Arabinose inducible promoter 부위를 제거하기 위하여, J297(5'-TGA gaa ttc TAG CCG TCA AGT TGT CAT AA-3')과 J298(5'-CAT CAT CAT CAT CAT CAT-3')을 제작하였고, pGEYH01 플라스미드를 Template DNA로 하여 reverse PCR을 이용하여 증폭하였음 (아래 그림 참고). 각각의 vector/insert 증폭산물을 gel extraction kit를 이용하여 분리 정제한 뒤, 제한효소인 NcoI-EcoRI으로 동시 효소처리하여 T4 DNA ligase로 반응시켰음. 반응 산물을 DH5a에 heat shock 방법에 의하여 도입하였고, 항생제 첨가 배지에서 도입 균주들을 선발하였음. 후보 클론으로 부터의 플라스미드를 분리한 뒤, NcoI-EcoRI으로 동시 효소처리하여 전기영동 후, 예상되는 벡터와 insert 크기를 보이는 클론을 선별하였고, 해당 플라스미드를 염기서열 분석함으로써 최종 확인하였음 (아래 그림 참고). 결과 플라스미드는 pJYTH01로 명명하였음.



[그림 24] 구축된 pGEYH01 ompA-MCS12 재조합단백질 발현시스템의 *in vivo* 활용을 위한 유전자 조작. (A) pGEYH01을 주형 DNA로 inverse PCR 반응 결과 및 살모넬라균에 존재하는 *in vivo* inducible promoter인 PssaG 부위에 대한 PCR 증폭산물. 정제된 증폭산물을 제한효소 NcoI-EcoRI으로 동시 절단한 후, ligation하여 후보 클론을 확보하였음. (B) 후보 클론에 대한 제한효소 NcoI-EcoRI 처리 결과. 예상되는 벡터와 insert를 가지는 클론을 획득하였음.

- 최종 구축된 벡터시스템의 염기서열 분석에 의한 mapping: 최종 구축된 발현시스템은 PCR 및 subcloning을 통한 염기서열 데이터 분석을 의뢰(Marcrogen) 진행하였고, 결정된 염기서열은 향후 NCBI GenBank DB에 등록할 계획임.

0001 - 0548 bp PssaG (SsaG promoter sequence)

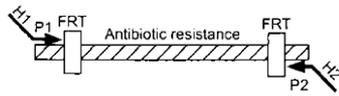
0551 - 1681 bp OmpA-MCS12

2206 - 3066 bp Amp-resistance gene 이 위치하고 있음.

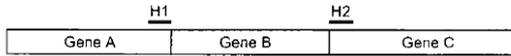
○ 살모넬라 운반체에서 이중항원의 안정적인 발현을 위한 균주 최적화

▶ 연구목표 및 결과요약: 살모넬라균 운반체 균주로 부터 OmpA, Lon, OmpT의 λ -red recombinase 기반 non-polar mutation 수행. 세균에 존재하는 다수의 특이/비특이 단백질분해효소의 작용에 의하여 과발현된 이중항원의 분해 가능성을 배제하기 위하여, 기존 문헌보고를 통하여 잘 알려진 Lon protease와 세균 외막 단백질 분해효소의 하나인 OmpT를 선발된 살모넬라균 이중항원 운반체로부터 λ -red recombinase를 이용하여 제거함. 살모넬라균 이중항원 운반체로부터 Lon과 OmpT proteases의 제거는 정상적인 살모넬라균에서 발현된 이중항원의 안정성을 증가시킬 수 있으며, 정제 혹은 사균 처리 과정에서 일어날 수 있는 이중항원의 분해를 방지할 수 있음.

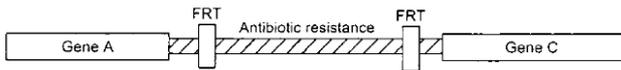
Step 1. PCR amplify FRT-flanked resistance gene



Step 2. Transform strain expressing λ Red recombinase



Step 3. Select antibiotic-resistant transformants



Step 4. Eliminate resistance cassette using a FLP expression plasmid

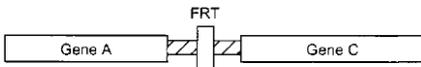


Fig. 1. A simple gene disruption strategy. H1 and H2 refer to the homology extensions or regions. P1 and P2 refer to priming sites.

▶ 1 단계: 제거할 표적유전자에 특이적인 H1P1/H2P2 primer를 이용하여 Template plasmid에 존재하는 FRT-인근 항생제 내성 유전자부위에 대한 PCR 증폭



▶ 2 단계: λ -red recombinase가 과발현된 살모넬라균 백신주에 PCR 산물을 electroporation에 의해 도입



▶ 3 단계: 항생제 내성 변이주 선발 및 표적유전자 결손부위 검증



▶ 4 단계: FRT 인식 flipase에 의해 항생제 내성 유전자 제거

▣ 살모넬라균 백신후보주로부터 Lon과 PgeT(OmpT) protease 제거를 위한 primer sequences (unpublished 2011)

lon_sal_delta_F (H1+P0): 5'-AGCGTTCTGAACGCAATTGAAATCCCCGATTGCCCTTGC GCGATG**TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'**

lon_sal_delta_R (H2+P2): 5'-CGTTTTGCAGAGCAAGCGTCAGAAGCTTCTCAATGCGCTTCACAG**CATATGAATATCCTCCTTAG-3'**

pgeT_sal_delta_F (H1+P0): 5'-AGTAATGATGATCGCCGATTTTCTGAGTCGGTTTATGCGGAGT**TGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG-3'**

pgeT_sal_delta_R (H2+P2): 5'-CATGCCACCAAATACGCCGATACCGCTGTTTATCTATG**CATATGAATATCCTCCTTAG-3'**

▶ 연구수행 내용 및 세부 결과

- 선발된 살모넬라균 백신후보주에 λ -red recombinase의 유도 발현: Datsenko 등의 방법을 토대로, arabinose에 의해 유도 발현되는 λ -red recombinase를 보유하고 있는 온도민감성 플라스미드 pKD46을 선발된 살모넬라균(5종 항원변이주) 이중항원 운반체에 electroporation에 의해 도입한 후, 단일 클론을 선발/순수 분리 (완료)

- 표적 유전자 제거용 프라이머 합성 및 PCR 증폭: S. Typhimurium str. LT2의 전장유전체 염기서열정보를 NCBI GenBank database로부터 확보하여, Lon protease에 해당하는 유전자(Accession No. NC_003197.1; 505,542-507,896 부위)와 대장균의 OmpT에 해당하는 PgtE protease 유전자(NC_003197.1; complement 2,506,055-2,506,993 부위)의 염기서열 정보를 바탕으로, 아래 그림에서와 같이 homologous recombination을 유도할 수 있는 60-65 mer 프라이머를 제작한 뒤 template plasmid로 알려진 pKD4를 이용하여 PCR 증폭하였음 (완료)

- PCR 증폭산물의 linear transformation에 따른 homologous recombination 유도: PCR 증폭산물을 정제한 뒤, electroporation에 의하여 λ -red recombinase가 과발현되어 있는 살모넬라균 이중항원 운반체에 도입함으로써, 동종유전자재조합을 유도하여 표적 유전자를 제거/불활화 함 (진행 중).

- 후보 클론에 대한 검증 및 항생제 저항 유전자 제거: 항생제 내성 존재 유무 및 PCR을

이용하여 유전자 결손부위를 검증할 수 있음. 또한 FRT를 인식하는 flipase를 보유하고 있는 온도민감성 플라스미드 pCP20을 도입하여, 81-bp scar region을 제외한 항생제 내성 유전자를 제거함으로써, polar effect가 없는 변이주를 구축할 계획임. 구축된 플라스미드를 이후 단계의 백신후보주로 사용할 예정임.

[제2협동] 돼지 위축성비염 백신효능시험 및 시제품 개발

1. 실험방법

선발된 adjuvant 2종류

- 1) Retinoic acid를 DMSO에 150 μ g/0.1ml 농도로 희석
- 2) Zymosan을 DMSO에 100 μ g/0.1ml 농도로 희석
- 3) Retinoic acid+Zymosan을 DMSO에 위와 동일한 농도로 희석
- 4) 마우스는 각각의 그룹별 5마리를 사용하여 시험용 adjuvant를 0.1ml 씩 복강내에 접종하고 접종반응 등 이상 유무를 관찰한다.
- 5) 기니픽은 각각의 그룹별로 시험용 adjuvant를 0.1ml 씩 피내에 접종하고 접종반응 등 이상 유무를 관찰한다.
- 6) 자돈은 각각의 그룹별로 시험용 adjuvant를 2ml 씩 근육에 접종하고 접종반응 등 이상 유무를 관찰한다.

2. 결과

- 1) 마우스 : 접종 후 7일간 관찰한 결과 이상없이 내과 생존하였다.
- 2) 기니픽 : 접종 후 7일간 관찰한 결과 3그룹 모두 접종부위에 염증반응이 관찰되었다.

	
Retinoic acid(150 μ g/0.1ml)접종 1일 후	Retinoic acid (150 μ g/0.1ml)접종 4일 후
	
Zymosan (100 μ g/0.1ml)접종 1일 후	Zymosan (100 μ g/0.1ml)접종 4일 후
	
Retinoic acid(150 μ g)+zymosan(100 μ g)/0.1 ml 접종 1일 후	Retinoic acid(150 μ g)+zymosan(100 μ g)/0.1ml 접종 4일 후

- 3) 자돈 : 자돈 안전성 정상임

[공동연구]

마우스를 대상으로 RA와 Zymosan의 안전성실험을 수행하였다. 사전조사에 따라 물질의 사용량은 RA는 마리당 150 μg , Zymosan은 마리당 100 μg 을 접종하였다. 국가검정기준에서 안전성시험을 위해 마우스는 복강으로 접종하도록 되어있고, 대부분의 백신접종부위는 근육 또는 피하주사이므로, 본 실험에서는 복강과 피하로 각각 접종하여 후보물질들의 안전성을 확인하였다. 또한 면역기관에 특이적인 독성여부를 확인하기 위해 접종 후 비장을 채취하여 종대되었는지 여부를 확인하였다.

기니픽을 이용한 앞선 실험에서 피하접종 시 염증반응이 생겼으므로 그 원인을 여러 가지 측면에서 고려하였다. DMSO(dimethylsulfoxide)를 용매로 마리당 비교적 많은 양을 접종하여 염증이 생겼을 가능성을 배제하기위해 본 실험에서는 DMSO의 양을 최소화시키고 **인산완충액**을 기본용매로 사용하여 접종하였다. DMSO는 RA가 지용성물질이므로 사용하였지만, 연구2차년도 부터 돼지에 적용을 위해서는 많은 양의 DMSO를 사용하기에는 현실적으로 어려운 측면이 많다. 따라서 세부1팀과 협동2팀은 돼지에서 RA를 적용할 수 있도록, 현재 사용하는 백신어쥬번트를 대상으로 RA의 용해성을 확인하여 임상적용을 시도할 예정이다.



그림 25. RA+Zymosan을 접종한 후 2일째 사진. (왼쪽) 복강으로 접종한 마우스의 복강절제, (가운데) 피하접종한 마우스의 외부모습, (오른쪽) 피하접종한 마우스의 피부박리 후 모습.

RA+Zymosan을 마우스에 복강 또는 피하로 접종한 경우 대조군의 마우스에 비해 특별한 이상이 없었음.



그림 26. RA+Zymosan을 마우스에 접종한 후 비장의 크기 확인. 대조군(왼쪽), RA+Zymosan의 복강접종(가운데), 피하접종(오른쪽)한 마우스의 비장 모습

대조군과 비교해서 RA+Zymosan을 접종한 마우스의 비장은 크기와 모양 면에서 매우 비슷했고 특별히 비장종대의 특징을 보이지는 않았음.

* 기니픽에 접종한 모든 군에서 염증이 생긴 현상은 접종 시 실수, 용액(vehicle)으로 사용된 dimethylsulfoxide(DMSO)에 대한 기니픽의 비특이적 피하염증반응을 추정할 수 있지만 정확한 원인분석을 위한 추가실험이 더 필요함

제 2 절 2차년도 세부과제별 연구내용 및 결과

[세부] 돼지용 Muco-adjuvant 개발 및 신규 약효실험체계 확립

1단계 : Retinoic acid의 적용성 연구

점막면역증진 후보물질인 retinoic acid(RA)를 백신에 실제 적용하기 위해, 현재 동물용백신에 사용 중인 Montanide 어쥬번트와 혼합하여 in vitro 독성시험과 in vivo 안전성시험을 수행하였다. 또한 일반적으로 백신을 2회 접종하므로 최적 횟수를 알아보고자 하였다.

- Montanide adjuvant와 retinoic acid(RA) 혼합 후 용해도, 세포독성시험
- Montanide를 포함한 후보어쥬번트의 안전성시험
- Retinoic acid(RA)의 접종시기에 의한 항체생산능 및 세포생존율 변화

2단계 : 점막면역증진 후보물질에 대한 연구

해양조류에서 추출한 황화다당류인 fucoidan과 ginsenoside의 일종인 Rp1이 비장세포와 수지상세포에 어떤 영향을 미치는지, 점막면역을 증진시킬 수 있는 지에 대해 연구하였다. 또한 염장/발효음식에 있는 젓갈균을 입수할 기회가 있어, 이들의 수지상세포에 대한 효과를 알아보았다.

- Fucoidan의 in vitro 면역증진효과 측정
- Fucoidan의 in vivo 백신어쥬번트 효능 실험
- Ginsenoside Rp1의 면역조절효과 연구
- 수지상세포를 이용한 젓갈균의 면역증진효과 분석

3단계 : *Bordetella bronchiseptica*(BB) 백신항원의 면역원성에 대한 연구와 기타

BB균체는 본 연구에서 백신항원으로 사용되는데 그 자체의 면역원성에 대한 조사는 수행된 바 없다. 효율적으로 어쥬번트를 선정, 혼합, 제조하기 위해 BB백신항원 자체 면역원성에 대한 연구를 수행하였다.

- *Bordetella bronchiseptica*(BB)백신항원 자체의 면역원성 시험
- 점막면역증진물질이 처리된 비장세포에서 gut homing receptor의 발현 조사

○ Montanide adjuvant와 retinoic acid(RA) 혼합 후 용해도, 세포독성시험

Montanide adjuvant 4종류(왼쪽에서 순서대로 ISA201VG, IMS-K, IMS1313, ISA70)를 이용해 RA의 병용 시 적합성을 알아보기 위해 세 가지의 combination을 준비했다. 먼저 각 Montanide adjuvant 또는 DMSO를 이용해 RA를 10 mg/ml로 녹인 stock solution을 준비하였다(Monta/RA, DMSO/RA로 명명). 그리고 세 가지 combination group을 다음과 같이 준비하였다.

- Group 1. 증류수(D.W.) 90% + Monta/RA 10%
- Group 2. Montanide adjuvant 90% + DMSO/RA 10%
- Group 3. Montanide adjuvant 90% + Monta/RA 10%

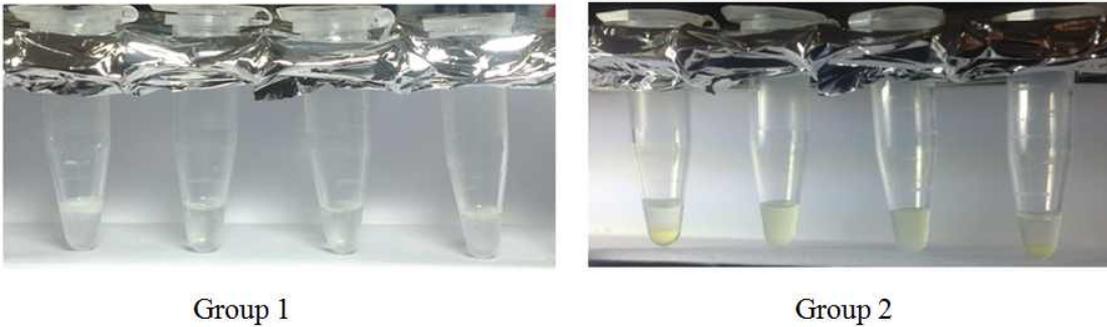
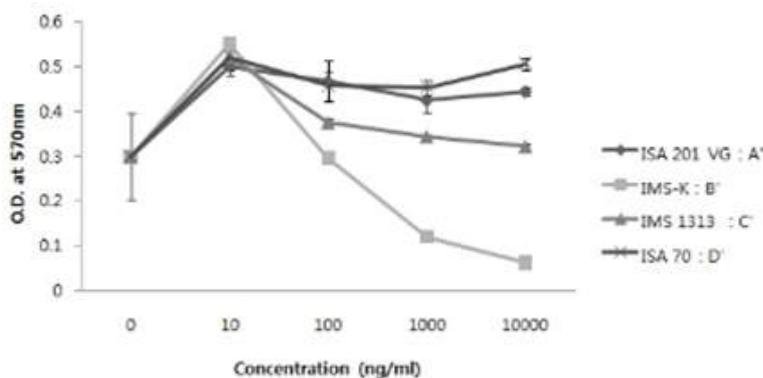


그림 27. 용매별 Montanide adjuvant 용해도의 육안관찰

Combination의 용해도를 육안으로 관찰하고 A와 B를 제시하였다(그림 27). 양쪽 모두 해당 농도에서 균일하게 용해되었으며, D.W. 희석 group(A)의 경우 투명한 성상을 나타낸 것에 비하여 DMSO group(B)은 좀 더 yellowish한 성상을 나타내면서 약간 섞이지 않는 양상을 보였다. 이로써 용매 내의 RA의 최종농도는 1 mg/ml로 제조하였으며, 면역세포를 이용한 *in vitro* 시험에 이용하였다.

Cell viability (Montanide + RA)



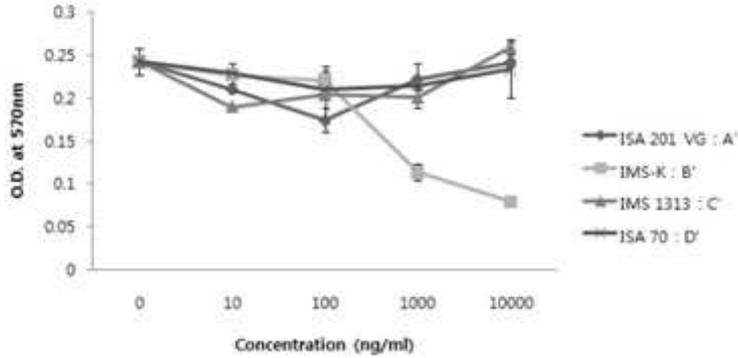


그림 28. 비장세포(윗)와 골수유래 수지상세포(아래)에 sample 처리 후 세포생존율 변화

비장세포에 준비된 sample(Group 1-3)을 0 ~ 10000 ng/ml로 처리하여 4일간 배양 후 세포의 생존율을 측정하였다. 앞서 제조된 샘플들의 최종농도가 1 mg/ml이므로 MTT assay의 최고농도는 100배 희석된 10 µg/ml(10,000 ng/ml)이었다. 그림에 있는 A-D는 Montanide adjuvant 4종류(ISA201VG, IMS-K, IMS1313, ISA70)를 순서대로 명명하였다. 그림 28에 제시된 것은 대표적인 결과로서, Group 3(Montanide adjuvant 90% + Monta/RA 10%, A'-D'로 표시) 샘플을 비장세포(윗)와 골수유래수지상세포(아래)에 처리하여 MTT assay를 하여 세포생존율의 변화를 측정하였다. Group 1과 Group 2도 Group 3과 매우 유사한 결과를 나타내었다. 모든 결과에서 Montanide adjuvant의 일종인 IMS-K가 심각한 세포독성을 나타냈다.

Cell morphology (Montanide + RA)

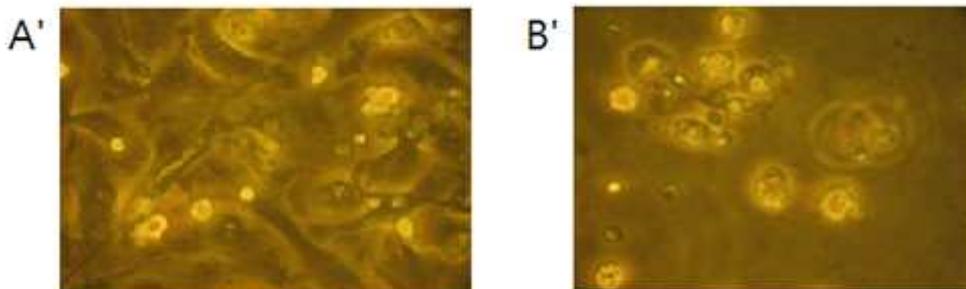


그림 29. 골수유래 수지상세포의 현미경상 관찰

MTT assay에서 IMS-K가 유의한 세포독성을 나타내어 골수유래 수지상세포에 각 adjuvant를 처리한 후 4일간 배양한 후 사진을 촬영하였다. A'(ISA201VG)가 처리된 세포는 정상 모습을 보이는데 반해 B'(IMS-K)가 처리된 세포는 심각한 세포독성을 나타내는 사실을 확인했다.

○ Montanide를 포함한 후보어쥬번트의 안전성시험

현재 상용화된 Montanide adjuvant를 기반으로 본 연구과제에서 선발된 물질을 첨가한 후

안전성시험을 실시하였다. 마우스실험은 제주대에서, 기니픽실험은 (주)고려비엔피에서 수행하였다. 앞서 효과를 확인한 retinoic acid, Fucoidan을 첨가물질로 사용하였고, 표준항원으로 *Bordetella bronchiseptica*를 사용하였다. Montanide adjuvant는 A-D 중 B(IMS-K)는 독성이 심해 사용하지 않았다. A, C, D 중에서 현재 돼지백신에 가장 많이 사용하는 A(ISA201VG)와 C(IMS1313)를 대표로 선정하여 사용했다. 또한 이들은 지용성과 수용성 어쥬번트이므로 첨가물질들의 병용성을 확인할 수 있는 점도 고려되었다.

1차 접종

접종물질	Monta	Fuco	RA	BB	total vol	Survival
MonA	100µl				200µl	○
MonA+ RA	100µl		○		200µl	○
MonA+ RA+ Fuco+ BB	100µl	○	○	○	200µl	×
MonC	100µl				200µl	○
MonC+ RA	100µl		○		200µl	○
MonC+ RA+ Fuco+ BB	100µl	○	○	○	200µl	×

1차접종으로 Montanide adjuvant(Mon)는 전체 volume 중 50%를 차지했으며 (100µl) 기타물질과 PBS로 총 200µl/mouse를 만들어 복강에 접종하였다. 또한 기타물질로서는 Fucoidan(Fuco) 2 mg/mouse, Retinoic acid(RA) 150 µg/mouse, *Bordetella bronchiseptica*(BB) 10 µg/mouse을 사용하였다. 시험결과 모든 물질을 투여한 마우스가 죽어 RA+Fuco의 혼합 시 침전 또는 예기치 못한 부작용을 의심하였다.

2차 접종

접종물질	Monta	Fuco	RA	BB	total vol	Survival
MonA+ RA+ Fuco	100µl	○	○		200µl	○
MonA+ RA+ BB	100µl		○	○	200µl	○
MonA+ Fuco+ BB	100µl	○		○	200µl	○
MonC+ RA+ Fuco	100µl	○	○		200µl	×
MonC+ RA+ BB	100µl		○	○	200µl	○
MonC+ Fuco+ BB	100µl	○		○	200µl	×

2차 접종에서는 RA와 Fuco를 combination하여 어떤 물질의 조합이 위험한 지를 검증하고자 하였다. 그러나 예상과는 달리 MonC계열의 후보어쥬번트만을 투여한 마우스가 죽어 다시 3차 접종을 실시하였다.

3차 접종

접종물질	Monta	Fuco	RA	BB	total vol	Survival
MonA+ RA+ Fuco	100µl	○	○		200µl	○
MonC+ Fuco+ BB	100µl	○		○	200µl	○

2차 접종에서 죽었던 후보어쥬번트를 다시 접종한 결과, 모두 생존했다. 육안으로 관찰한 바 심각하지는 않지만 약간의 설사를 하였다. 한 가지 가능성은 Montanide계열의 A와 C 자체적으로 복강을 손상시키고 BB 백신항원자체의 과도한 자극능력에 의해 설사를 유도하는 것이다.

▶ 토의 및 결론

본 연구에서는 점막면역증진 후보물질인 RA를 연구하고 있는데, 기본적인 용매없이 RA 단독으로는

백신에 투여하기 어렵다. 이에 동물용 백신에 다용되는 4종의 Montanide 어쥬번트를 선별하여 RA와 혼합하고 그 독성 등을 알아보았다. RA는 Montanide 어쥬번트의 성상(지용성/수용성 등)에 따라 혼합할 때 용해도가 결정되었다. IMS-K는 비장세포와 수지상세포를 대상으로 한 실험에서 세포독성이 심했다. 마우스를 이용한 안전성실험에서 여러 물질을 복합적으로 복합으로 투여했을 때 죽은 경우도 있었지만 대체로 생존했다. 그러나 각 물질을 최대용량으로 혼합하여 투여하였으므로 후속실험에서는 효과를 나타내면서도 독성을 줄일 수 있는 최적의 농도 조합비를 찾을 필요가 있다.

○ Retinoic acid(RA)의 접종시기에 의한 항체생산능 및 세포생존을 변화

RA는 점막면역을 증진시킬 수 있는 주요 후보물질이다. 그러나 대부분의 경우 전염성질환을 막기 위해 백신을 2회 정도 접종한다. RA는 점막면역을 증진시키는 능력이 있음에도 전신면역에서 일정부분 억제하는 능력도 있기 때문에 2회 모두 접종할 경우 예상치 못한 부작용이 있을 수 있다. 이에 본 실험에서는 RA를 백신에 어쥬번트로 사용할 경우 횟수와 최적 투여시기를 결정하기 위한 연구를 진행하였다.

BB항원을 백신항원으로 사용하였고 2주 간격으로 2회 접종하였다. RA는 어쥬번트로 사용하였고, 1차에만 사용(Pre-RA), 2차에만 사용(Post-RA), 1차와 2차 모두에 사용(All-RA)으로 3개 실험군을 설정하였다. 두 번째 투여 후 2주 뒤에 혈청을 얻어 BB항원특이적인 항체가(IgA와 IgG)를 측정하였다. IgA는 혈청을 10배 - 10,000배 희석(10^{-1} - 10^{-4})하여, IgG는 혈청을 1,000배 - 1,000,000배 희석(10^{-3} - 10^{-6})하여 사용하였다. 항원특이적인 IgA, IgG의 수준은 다음과 같다(O.D. at 450 nm).

표 12. BB특이적인 IgA level

실험군	대조군	Pre-RA	Post-RA	All-RA
10^{-4}	0.073	0.075	0.103	0.090
10^{-3}	0.099	0.084	0.145	0.134
10^{-2}	0.253	0.147	0.532	0.232
10^{-1}	1.015	0.214	1.298	0.491

표 13. BB특이적인 IgG level

실험군	대조군	Pre-RA	Post-RA	All-RA
10^{-6}	0.094	0.130	0.240	0.448
10^{-5}	0.134	0.183	1.196	1.421
10^{-4}	0.072	0.846	2.871	2.463
10^{-3}	0.099	2.257	2.679	3.018

BB특이적인 항체가를 측정한 결과, IgA의 경우 2차 접종에만 투여한 Post-RA에서 가장 높은 항체가가 측정된 반면, 오히려 1, 2차 접종 시 모두 투여한 All-RA에서는 상대적으로 낮았다. IgG의 경우 Post-RA와 All-RA에서 높은 항체가가 측정되었다.

따라서 RA를 백신에 어쥬번트로 넣을 경우 1차보다는 2차에 투여하는 것이, 2회 모두 투여하는 것보다는 1회만 투여하는 것이 효율적일 것으로 판단된다. 본 실험은 실제 백신을 제조할 때 RA를 점막면역증진제로 사용할 경우 이용할 수 있는 중요한 노하우가 될 수 있을 것으로 사료된다. 또한

RA와 같이 점막면역을 증진하면서도 전신면역의 일정기능을 억제하는 특성이 있는 물질의 경우 고려해야 할 요소로 판단된다.

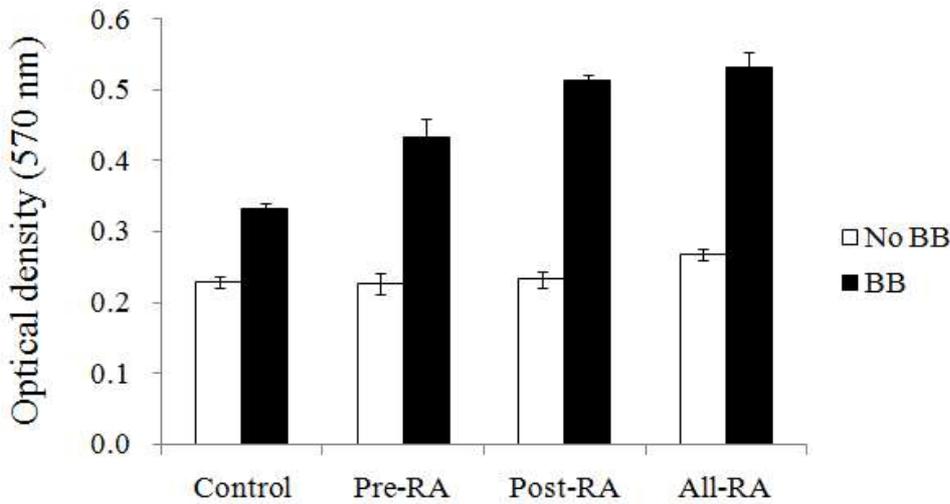


그림 30. RA를 시기별로 접종한 마우스 비장세포의 *in vitro* BB항원 재자극 후 생존율 시험

RA를 시기별로 접종한 뒤 마우스 비장세포를 채취한 뒤 *in vitro*에서 BB항원에 대한 재자극을 실시하여 그 반응성을 관찰하였다. MTT assay로 생존율을 측정한 결과 Post-RA와 All-RA군에서 가장 높은 반응성을 보였다.

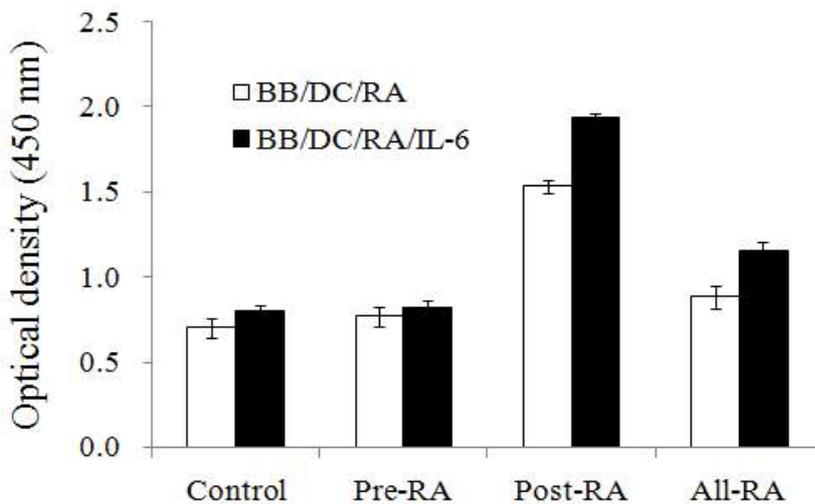


그림 31. RA를 시기별로 접종한 마우스 비장세포에 대한 IL-6 영향 분석

RA와 IL-6의 점막면역관련 IgA 생산유도능력을 확인하기위해 *in vitro* 실험을 실시하였다. 대조군을 포함한 세 가지 실험군 마우스의 비장세포를 채취하여 96-well culture plate에 넣었다. 골수유래 수지상세포를 배양하여 백신항원인 BB균을 pulse시킨 뒤 비장세포와 함께 coculture하였다. 또한 점막면역증진 후보물질인 RA와 IL-6를 첨가하였다. 전반적으로 백신항원을 pulse시킨 수지상세포에 의해 IgA의 생산능력이 가장 높았던 실험군은 Post-RA군이었고 그 다음이 All-RA군이었다. Post-RA군의 경우 수지상세포와 함께 IL-6없이 RA만을 투여하여서도 높은 IgA 유도능을 보였다. 이는

Post-RA군의 경우 생체 내에서 IgA을 생산할 수 있는 잠재능력이 조성된 것으로 보인다.

▶ 토의 및 결론

BB항원특이적인 ELISA에서 Post-RA군이 가장 높은 항체가를 보였으며, *in vitro*에서 면역된 비장세포를 이용한 BB항원 재자극실험과 IL-6에 대한 영향분석 실험에서 Post-RA군이 높은 생존율을 나타냈다. 따라서 일반적으로 동물에 백신을 두 번 접종할 경우 ‘1회’ 또는 ‘두 번 모두’ 보다는 ‘2회’에만 RA를 투여하는 것이 효과적인 것으로 확인되었다. 이는 RA의 투여횟수를 줄일 수 있어 RA의 사용량 감소와 잠재적인 RA독성의 감소시키는 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

○ Fucoidan의 *in vitro* 면역증진효과 측정

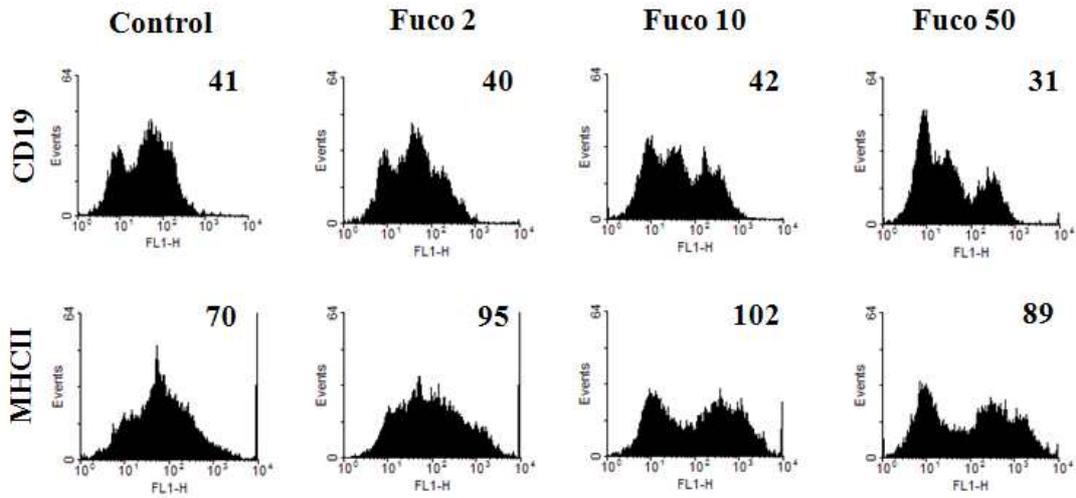


그림 32. Fucoidan 처리에 의한 림프구 표면마커의 발현 변화

Fucoidan이 면역세포를 자극하여 subset과 기능에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해, 비장세포에 fucoidan을 농도별로 처리하였다. B림프구의 세포표면마커인 CD19, MHC 제한적인 항원제시(antigen presentation)를 담당하는 MHC class II(MHCII)의 발현을 측정한 결과 CD19의 발현은 fucoidan 2와 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 별다른 변화가 없었지만 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 저하되었다. 이러한 현상은 CD19+세포인 B림프구가 항체를 생산하는 plasma cell로 분화하였을 수도 있지만, fucoidan에 의해 B림프구가 활성화되어 lymphoblast가 되면서 CD19의 발현이 소실되었을 가능성도 있다. MHCII의 경우 대조군에 비해 fucoidan 처리군에서 전반적으로 그 발현이 증가하였다.

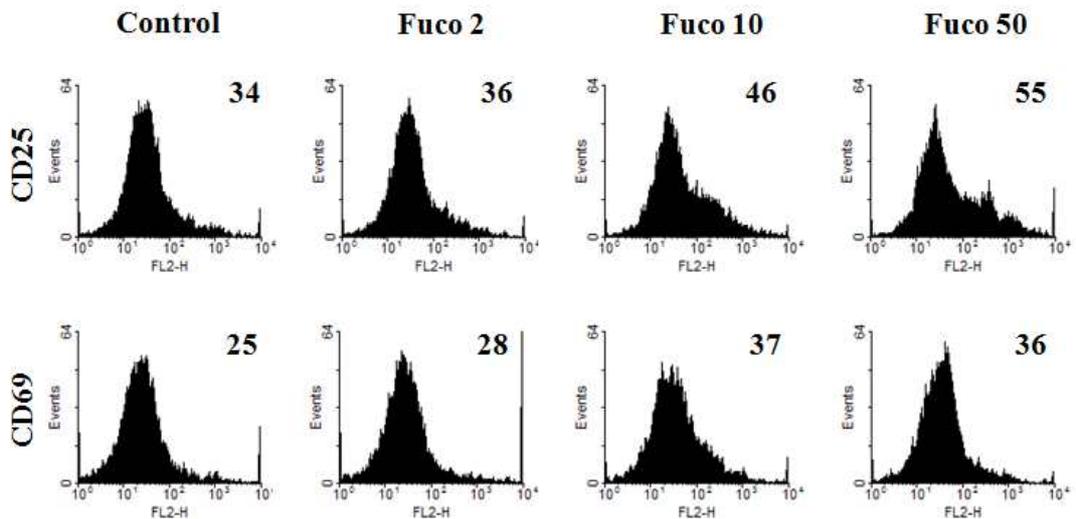


그림 33. Fucoidan 처리에 의한 림프구 활성화마커의 발현 변화

림프구의 활성화마커인 CD25와 CD69의 발현도 측정하였다. CD25는 IL-2 수용체의 alpha chain으로

림프구가 성장과 생존에 필요한 IL-2에 대한 친화도를 높여주는 역할을 한다. CD69는 림프구의 초기 활성화마커로서 알려져 있다. 대조군에 비해 CD25와 CD69 모두 처리된 농도에서 그 발현이 증가하였다. Fucoidan이 림프구를 활성화시켜 그 기능을 변화시킬 수 있음을 확인하였다.

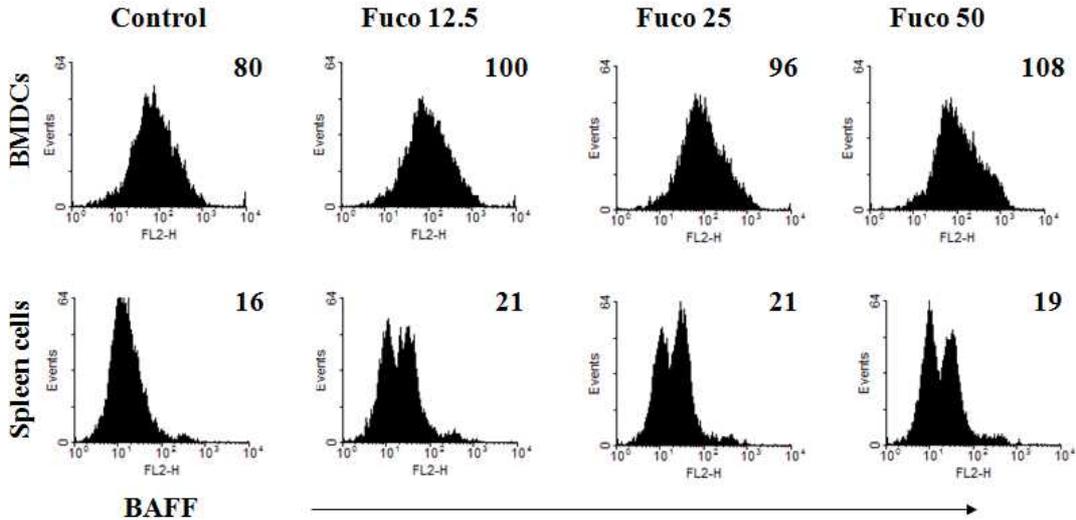


그림 34. Fucoidan을 처리한 수지상세포와 비장세포에서의 BAFF 발현도 측정

수지상세포와 비장세포에 각각 Fucoidan을 0, 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하여 3일간 반응시켰다. FACS 분석을 이용하여 세포표면에서 B-cell activating factor(BAFF)의 발현을 측정하였는데 유의한 결과를 얻을 수 없었다. 이차시도로 세포내에서 BAFF 발현을 측정한 결과 위와 같이 증가를 확인할 수 있었다. BAFF는 체내에서 항체생성을 유도시키는 데 필수적인 요소 중 하나로, fucoidan처리에 의해 특히 수지상세포의 내부에서 그 발현이 증가하였다. 이는 fucoidan이 체내에서 항체를 증가시킬 수 있는 백신 어쥬번트로 사용될 수 있는 가능성을 보여주는 것이다.

○ Fucoidan의 *in vivo* 백신어쥬번트 효능 실험

백신 어쥬번트로 Fucoidan을 사용할 수 있는지 알아보기 위해 마우스를 이용해 동물실험을 실시하였다. 마우스 복강에 BB백신항원을 20 $\mu\text{g}/\text{마리}$ 로 투여하고 fucoidan을 50 mg/kg(마우스 무게)로 1회 투여하였다. 실험군은 BB백신항원만 투여한 군과 BB백신항원+fucoidan 투여군을 설정하였다. 접종한 지 2주후에 마우스를 안락사를 시키고 혈청을 채취한 후 BB항원특이적인 항체가(IgG)를 측정하였다. ELISA plate 바닥에 먼저 BB항원을 overnight 동안 coating시키고 혈청을 $10^{-1} - 10^{-8}$ 의 희석배수로 반응시켰다. 이후 anti-mouse IgG HRP와 substrate를 차례로 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

표 14. Fucoidan의 *in vivo* 효능시험

희석배수	BB only	BB+ Fuco	희석배수	BB only	BB+ Fuco
10^{-4}	1.339	1.386	10^{-8}	0.093	0.095
10^{-3}	1.386	1.423	10^{-7}	0.147	0.296
10^{-2}	1.432	1.469	10^{-6}	0.474	0.564
10^{-1}	1.420	1.456	10^{-5}	0.912	1.199

BB균 단독투여군에 비해 BB+Fuco 투여군의 혈청에서 BB항원특이적인 항체가 많음을 알 수 있었다. 백신항원으로 사용된 BB균은 자체적으로 항원성(면역원성)이 크기 때문에 어췌번트 효과가 작게 나타날 수 있다. 따라서 이후 실험에서는 BB균 접종량을 20 μg /마리에서 10 μg /마리로 줄여 실험하였다. 또한 본 실험에서는 1차접종만을 하였으므로 2차접종을 한 후 항체가의 차이가 더욱 커질 것으로 예상된다.

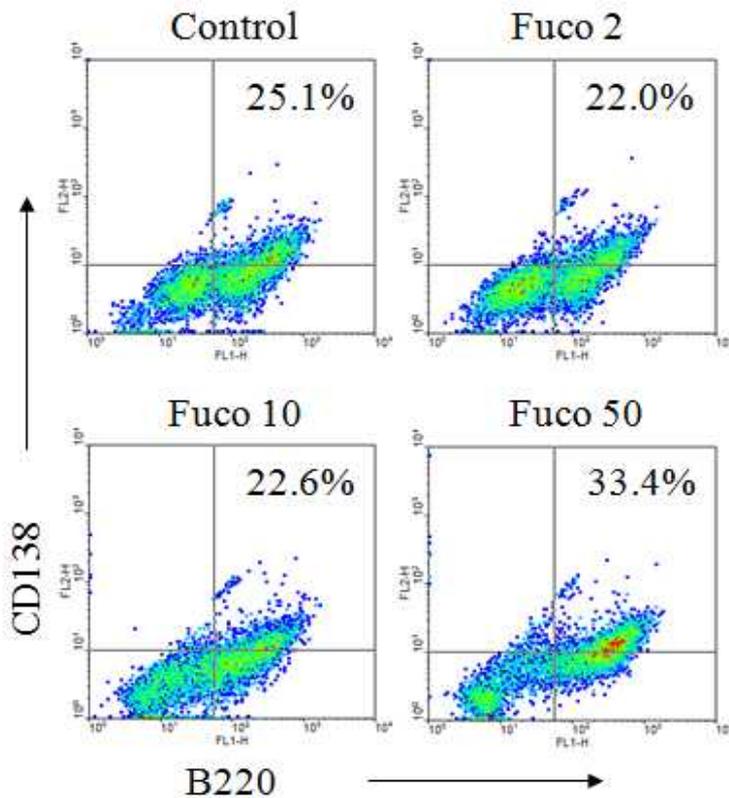


그림 35. Fucoidan을 처리한 비장세포에서의 plasma cell로 분화

Plasma cell의 마커는 B220와 CD138이다. Fucoidan을 비장세포에 5일간 처리한 뒤 B220+ 세포에서 CD138의 증감여부를 확인하였다. Fucoidan 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 비장세포가 가장 높은 비율의 B220+CD138+ 세포를 보였다. 본 실험을 통해 Fucoidan이 *in vitro*에서 비장세포의 plasma cell로의 분화를 촉진하는 사실을 확인할 수 있었다. Plasma cell은 항체를 생산하는 주요 면역세포이므로, 앞선 실험결과에서 fucoidan이 항체생산능을 증가시키는 사실과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

Ovalbumin(OVA)항원을 백신표준항원으로 사용하였고 2주 간격으로 2회 접종하였다. Fucoidan을 어췌번트로 사용하였고, 아무것도 접종하지 않은 control(대조)군, OVA 단독투여군, OVA+Fucoidan 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여군, OVA+Fucoidan 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 투여군을 설정하였다. 마우스를 안락사 시킨 후 혈청을 채취해서 OVA항원특이적인 항체가(IgA와 IgG)를 측정하였다. IgA는 혈청을 10배 - 10,000배 희석(10^{-1} - 10^{-4})하여, IgG는 혈청을 1,000배 - 1,000,000배 희석(10^{-3} - 10^{-6})하여 사용하였다. 항원특이적인 IgA, IgG의 수준은 다음과 같다(O.D. at 450 nm).

표 15. OVA특이적인 IgA level

실험군	대조군	OVA	OVA+ Fuco25	OVA+ Fuco100
10 ⁻⁴	0.092	0.107	0.081	0.146
10 ⁻³	0.156	0.241	0.170	0.312
10 ⁻²	0.377	0.519	0.400	0.604
10 ⁻¹	0.281	0.436	0.319	0.825

표 16. OVA특이적인 IgG level

실험군	대조군	OVA	OVA+ Fuco25	OVA+ Fuco100
10 ⁻⁶	0.060	0.081	0.428	0.353
10 ⁻⁵	0.068	0.516	1.305	0.996
10 ⁻⁴	0.082	0.183	3.020	2.628
10 ⁻³	0.146	1.395	4.345	4.444

OVA특이적인 항체가를 측정 한 결과, IgA는 OVA+Fuco100군에서 가장 높았으며, IgG는 OVA+Fuco25군과 OVA+Fuco100군에서 모두 높았다. 따라서 fucoidan은 OVA를 백신표준항원으로 투여하였을 때 항원특이적인 IgA와 IgG 항체의 생산을 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다.

▶ 토의 및 결론

해양조류에서 분리한 물질로서, 황화다당류인 fucoidan이 점막면역증진효과를 갖고 있는 지 여부를 확인하였다. *In vitro* 실험에서 주요 면역세포인 비장세포에 fucoidan을 처리하여 항원제시분자인 MHC class II, 림프구 활성화마커인 CD25와 CD69의 발현이 증가하는 사실을 알았다. 또한 fucoidan에 의해 항체생산을 유도하는데 필요한 BAFF의 발현이 증가하였고, 주로 항체생산을 담당하는 plasma cell의 분화가 촉진되었다. *In vivo* 실험에서 BB백신항원과 함께 fucoidan을 접종하여 BB항원특이적인 항체생성능을 증가시켰고, OVA표준항원과 함께 fucoidan을 접종하여 OVA항원특이적인 항체생성능(IgG와 IgA)을 증가시키는 사실을 알았다. Fucoidan은 본 실험에서 백신항원과 함께 투여 시 어쥬번트 효과를 나타냈다. 따라서 **fucoidan은 전신면역과 점막면역 모두 증가시킬 수 있는 강력한 어쥬번트 후보물질**이 될 수 있을 것으로 판단된다.

○ Ginsenoside Rp1의 면역조절효과 연구

Ginsenoside Rp1(Rp1)은 인삼에서 추출한 saponin derivative 중 하나이며 합성이 가능하다. 최근 연구에서 Rp1은 NF-κB를 억제하여 암세포의 전이를 막거나 항염증작용이 있는 사실이 밝혀졌다. 본 연구팀은 Rp1의 면역조절기능을 알아보기 위해 주요 면역세포인 비장세포와 골수유래 수지상세포에 처리하여 그 기능변화를 알아보았다.

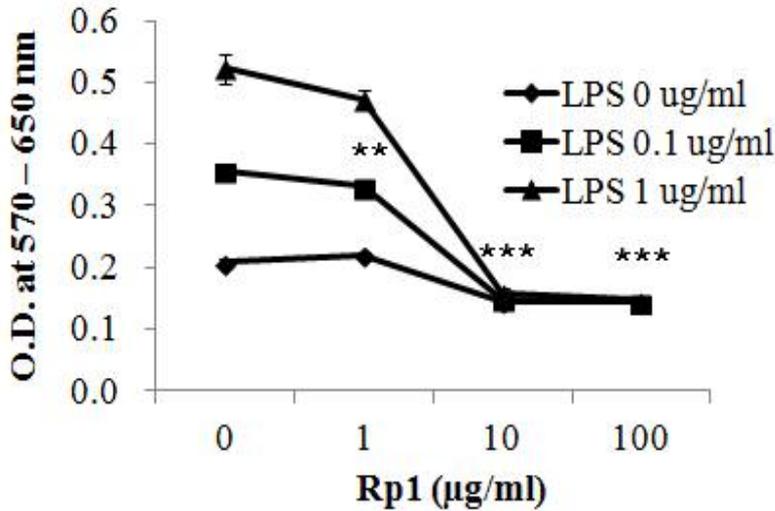


그림 36. Naive 및 LPS에 의해 활성화된 비장세포에 대한 Rp1의 생존을 저하효과

비장세포의 생존율에 대한 Rp1의 효과를 알아보기 위해 LPS를 처리하지 않은 naïve 비장세포와 LPS에 의해 활성화된 비장세포에 Rp1을 처리하였다. 이때 LPS는 대표적인 염증성물질로 선택되어 사용되었다. 비장세포에 Rp1을 0~100 µg/ml, LPS를 0~1 µg/ml 처리하여 2일간 배양한 후 MTT assay를 실시한 결과, LPS에 의한 세포생존율이 Rp1에 의해 고농도에서 유의하게 감소하였고, Rp1 10 µg/ml에서 현저히 감소하는 것을 알 수 있었다

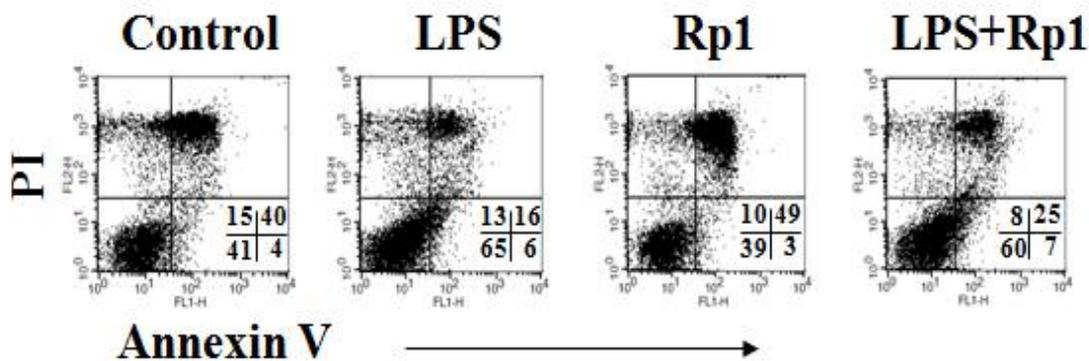


그림 37. 비장세포에 대한 Rp1의 apoptosis 유도

Cell death에 대한 Rp1의 효과를 알아보기 위해 Annexin V-FITC/PI 염색을 실시하였다. 사분면의 lower-left는 살아있는 세포, lower-right는 early apoptosis, upper-right는 late apoptosis와 upper-left는 necrosis를 포함하는 세포를 나타낸다. LPS처리군의 경우 lower-left가 증가하여 살아있는 세포 수가 증가한 반면, Rp1처리군은 control 및 LPS처리군에 비해 upper-right가 높아서 late apoptosis가 많이

일어났음을 알 수 있었다.

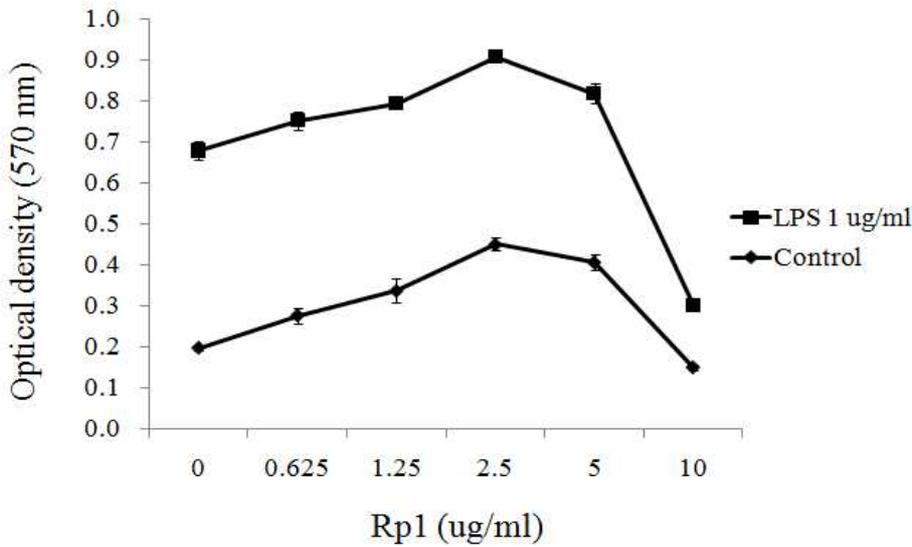


그림 38. Rp1이 처리된 수지상세포의 생존율 분석

골수유래 수지상세포를 배양해서 Rp1을 0 - 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 MTT assay를 이용하여 생존율을 측정하였다. 비장세포에 Rp1을 처리하였때는 농도의존적으로 면역억제효과가 나타났던 반면, 수지상세포에서는 0 - 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 생존율이 증가하는 경향을 보였다. 이후 5와 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 생존율이 유의하게 저하되었다. 수지상세포의 생존율에 대한 Rp1의 효과는 전반적으로 biphasic 현상을 보였다. Rp1의 효과가 생존율에 국한되는 것인지 여부를 확인하기 위해 세포표면마커의 발현을 조사하였다.

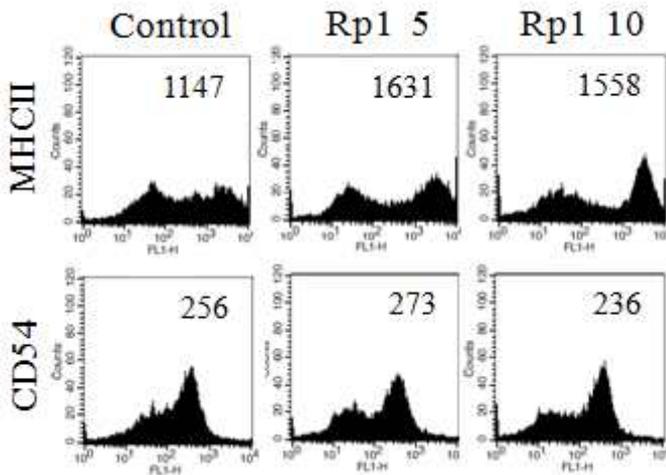


그림 39. Rp1에 의한 수지상세포 표면마커 발현 변화

대조군에 비해 Rp1을 5 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 수지상세포는 MHC class II 표면마커가 현저히 증가하였으며 10 $\mu\text{g/ml}$ 이 처리된 수지상세포는 약간 감소하였다. CD54는 ICAM-1으로서 수지상세포가 활성화될 때 증가하는 표면마커의 일종으로 MHC class II의 발현양상과 유사한 경향을 보였다. 예상과는 달리, Rp1은 일정한 농도범위에서 수지상세포를 활성화시키고 생존율을 증가시킬 수 있다는 사실을 확인했다.

▶ 토의 및 결론

Ginsenoside Rp1을 비장세포와 수지상세포에 처리하여 면역학적 기능을 분석한 결과, 비장세포에서는 농도의존적으로 세포독성을 나타냈으나 수지상세포에서는 일정농도에서 오히려 세포를 활성화시키는 효과를 보였다. 이는 Rp1이 농도에 따라 면역증진효과와 면역억제효과를 나타낼 수 있음을 의미하여 면역조절제로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다. Ginsenoside 중에서는 보기 드문 특징으로 보이며, 백신에서의 응용성을 포함한 후속연구가 필요할 것으로 사료된다.

○ 수지상세포를 이용한 짓갈균의 면역증진효과 분석

짓갈균은 우리 고유의 발효 및 염장음식인 젓갈에 존재하는 균이다. 따라서 음식물의 섭취에 의해 장(intestine)내에서 존재하면서 장관면역에 영향을 미칠 가능성이 높다. 하지만 짓갈균에 대한 면역학적인 연구는 매우 부족한 실정이다. 본 연구팀은 짓갈균이 점막면역에 관여해 긍정적인 효과를 미칠 수 있는 지 여부를 확인하기, 국내에서 분리된 짓갈균 5종을 전문가로부터 입수하여 주요 면역세포인 수지상세포에 처리한 후 그 형태 및 기능상의 변화를 확인하였다.

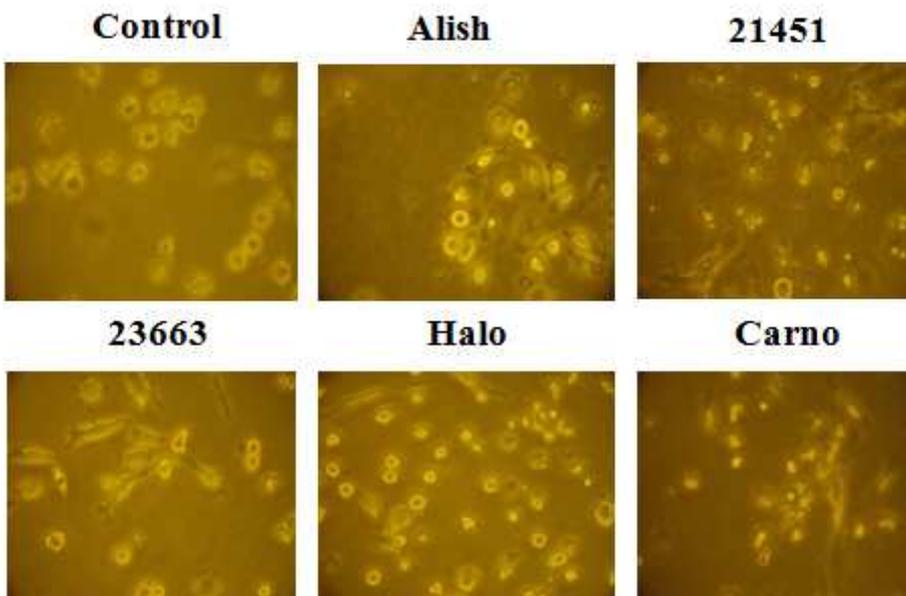


그림 40. 짓갈균 처리에 의한 수지상세포의 형태 변화

골수세포에 재조합 GM-CSF를 처리해 배양한 수지상세포에 짓갈균을 처리한 후 세포형태를 현미경으로 관찰하였다. 대조군(Control)에 비해 짓갈균으로 처리된 세포들은 대부분 분화된 모습을 보였다. 특이하게 23663 짓갈균의 경우 긴 가지모양의 fibroblast 유사모양을 보였고, Alish의 경우 세포가 군집된 모양을 보여 세포표면의 adhesion molecules(부착분자)의 변화를 추정하게 했다.

수지상세포의 생존율(viability, proliferation 포함)에 대한 짓갈균의 영향을 알아보기 위해, 배양된 수지상세포에 짓갈균을 처리한 후 배양하였다. 생존율 측정을 위해 trypan blue exclusion test와 MTT assay가 사용되었다. MTT assay는 96-well culture plate에 수지상세포를 넣은 후 짓갈균을 농도별로 처리한 후 배양하였고 MTT 시약을 넣어 발색시켰다. Trypan blue exclusion test는 6-well culture plate에 수지상세포를 넣은 후 짓갈균을 각 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 배양하였고 trypan blue staining solution으로 세포를 염색한 뒤 hemocytometer로 죽은 세포와 살아있는 세포 수를 세어 측정하였다.

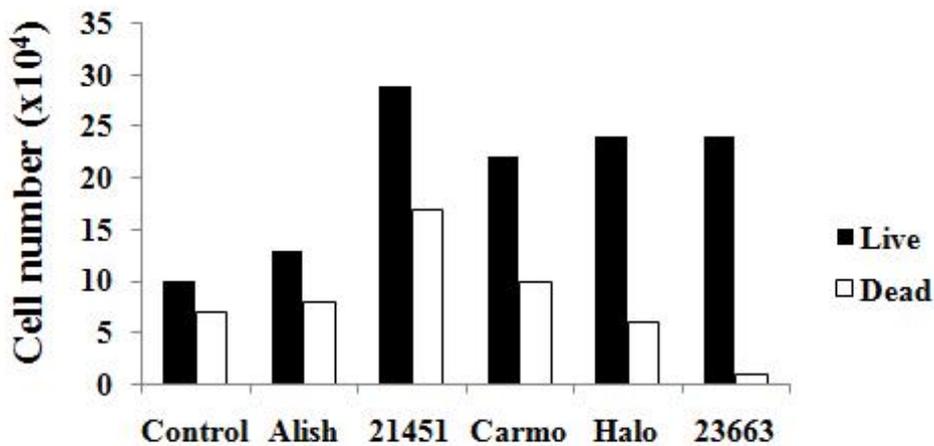
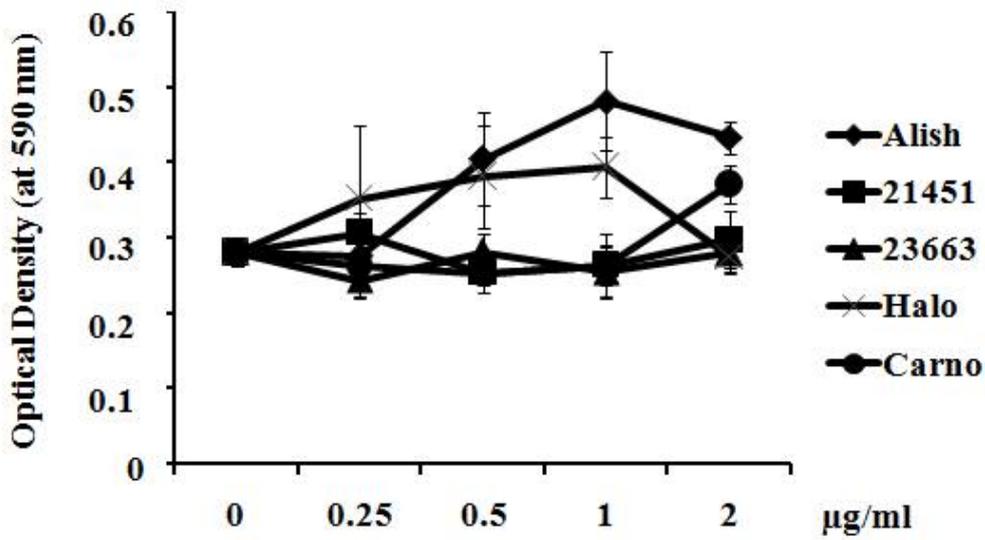


그림 41. 짓갈균 처리에 의한 수지상세포의 생존률 변화

MTT assay를 이용해 짓갈균을 수지상세포에 처리한 후 생존율을 측정한 결과, carno는 2 $\mu\text{g/ml}$ 에서, Halo는 0.25 - 1 $\mu\text{g/ml}$ 에서, Alish는 0.5 - 2 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 생존율이 증가하였다. 다른 짓갈균은 농도별로 생존율에 변화가 적었다.

Trypan blue exclusion test에서는 수지상세포에 짓갈균을 각 1 $\mu\text{g/ml}$ 으로 처리하여 배양한 뒤 염색하여 살아있는 세포와 죽은 세포의 수를 세었다. 23663과 Halo에서 가장 높은 생존율을 보였던 반면 21451은 살아있는 세포의 수는 증가하였으나 가장 낮은 생존율을 보였다.

두 가지 실험을 통해 Halo가 가장 높은 생존율을 나타냈다.

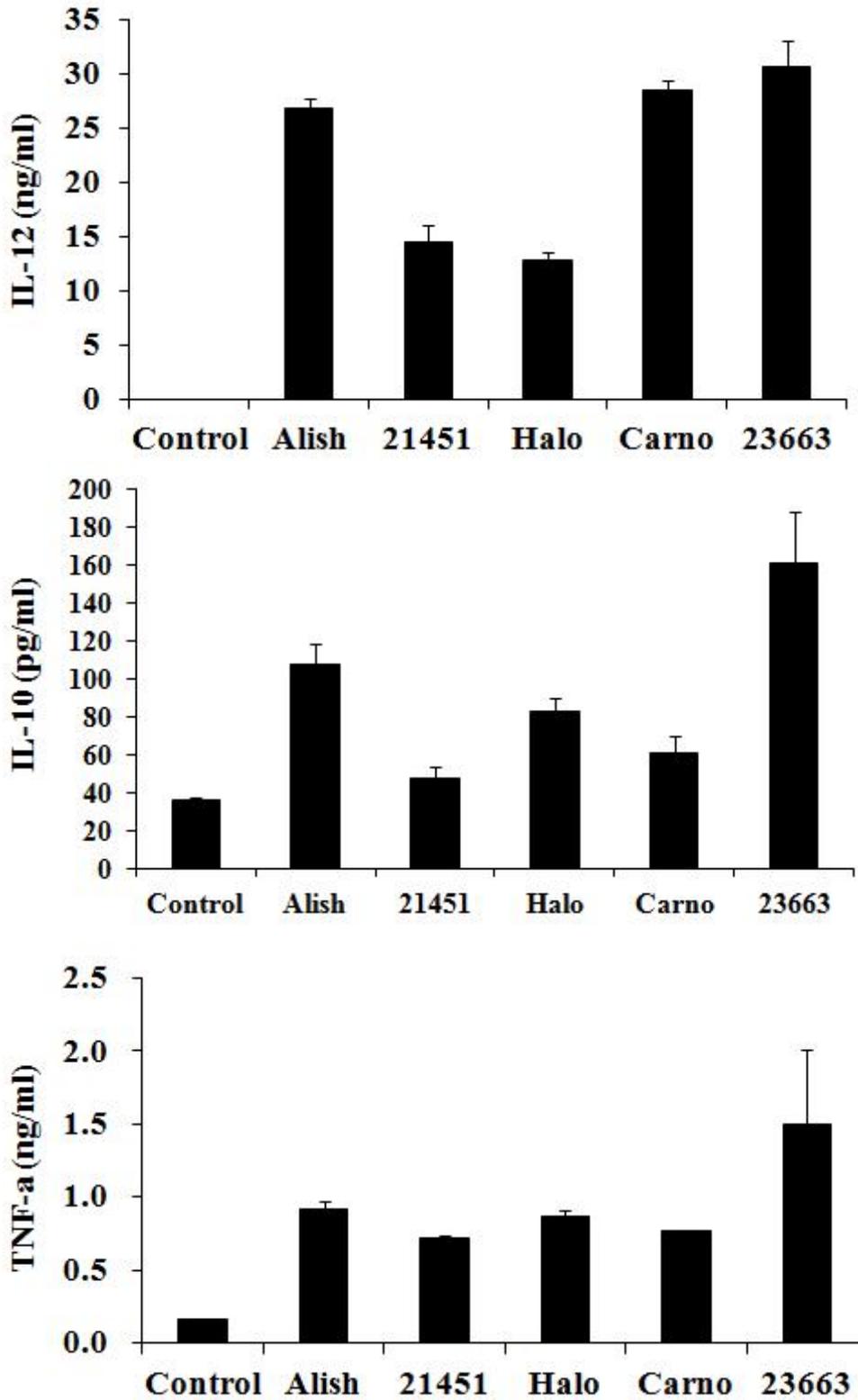


그림 42. 젓갈균이 처리된 수지상세포에서 면역사이토카인의 생산량 변화

젓갈균이 수지상세포가 생산하는 면역사이토카인의 생산에 관여하는 지 여부를 확인하기 위해 ELISA법을 통하여 알아보았다. IL-12은 세포매개성 면역, TNF-alpha는 자연면역, IL-10은

항염증기능에서 중요한 역할을 하는 면역사이토카인이다. 또한 IL-12는 T helper(Th) 1, IL-10은 Th2 면역반응을 유도하는 필수 사이토카인이다. IL-12는 Alish, Carno, 23663에서, IL-10은 Alish와 23663에서, TNF-alpha는 23663에서 가장 높은 생산량을 보였다. 이 결과를 통해 각종 젓갈균이 면역반응과 관련된 사이토카인의 생산에 영향을 주고 서로 다른 생산양식을 보이는 사실을 확인하였다.

▶ 토의 및 결론

젓갈균은 식품에 있는 호염성균으로서 식품을 통해 장내에서 존재할 수 있는 probiotics이다. 본 연구에서는 젓갈균을 주요 면역세포인 수지상세포에 처리한 후 그 면역학적인 변화를 확인하였다. 특히 ELISA를 통해 젓갈균이 수지상세포의 주요 면역사이토카인의 생산량을 변화시키는 사실을 알았으며, 이러한 특징을 이용해 젓갈균을 전신면역과 점막면역을 증진시키는 면역보조제로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

○ *Bordetella bronchiseptica*(BB)백신항원 자체의 면역원성 시험

본 연구과제는 새로운 점막면역증진기법을 연구하는데 초점을 맞추고 있으며, *Bordetella bronchiseptica*(BB) 균체를 백신항원으로 사용하고 있다. 하지만 지금까지 몇몇 상업용 BB백신이 시판되고 있음에도 BB균체의 면역원성에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 백신항원으로 사용되는 균체 또는 subunit의 면역학적 성상에 따라 백신의 효능과 사용해야할 어쥬번트의 종류가 결정되므로 관련 연구는 중요하다. 본 연구팀은 백신항원으로 사용되는 BB균체를 주요 면역세포인 비장세포에 처리하여 형태나 기능면에서 어떤 변화를 보이는 지 확인하였다.

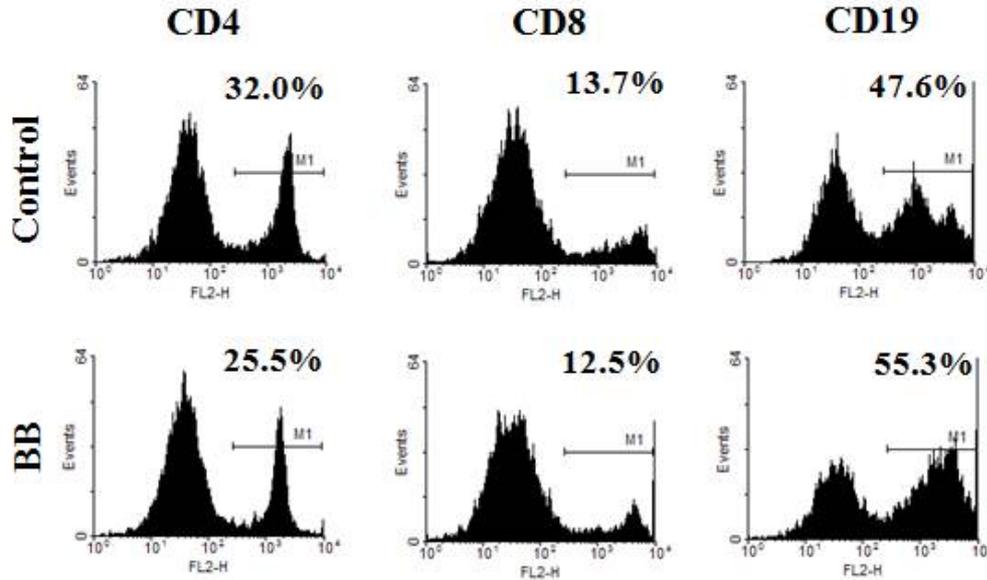


그림 43. BB백신항원이 처리된 비장세포의 subset 변화

비장세포에 BB백신항원을 처리한 후, subset변화를 살펴본 결과 CD4, CD8은 약간 감소한 반면 CD19는 증가하였다. 이는 CD19를 세포표면마커로 사용하는 B 림프구가 BB백신항원에 반응하여 증식하였음을 의미한다.

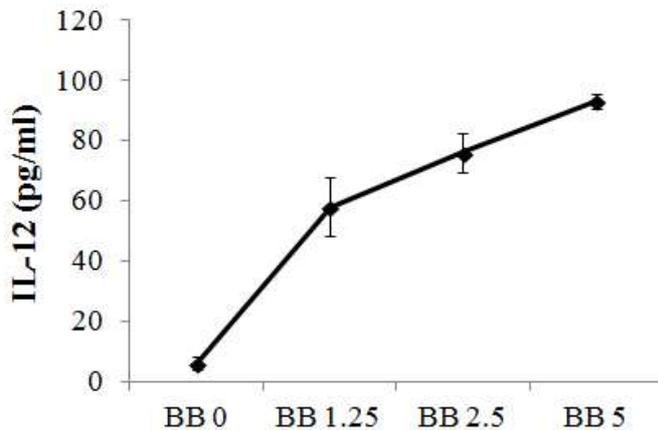


그림 44. BB백신항원이 처리된 비장세포의 IL-12 생산 증가

또한 주요 면역사이토카인인 interleukin(IL)-12의 생산 여부, 증감을 확인하였다. IL-12는

선천면역에도 관여하지만 주로 세포성면역을 담당하고 Th1 면역반응에서 주로 작용하는 면역사이토카인이다. BB백신항원은 IL-12의 생산을 농도의존적으로 증가시켰다.

앞선 실험을 통해 BB백신항원으로 비장세포를 처리한 결과, B림프구가 많이 증식되었고 IL-12의 생산이 증가하여 BB백신항원 자체적으로 면역반응을 유도시킬 수 있는 가능성을 확인하였다. 다음 실험을 통해 활성화된 비장세포가 림프구 성장인자인 IL-2에 얼마나 반응하는 지 여부를 확인하고자 하였다. IL-2에 대한 반응성은 림프구가 effector cell로서 활동할 수 있도록 충분한 세포수를 확보하는데 필수적이다(clonal expansion)

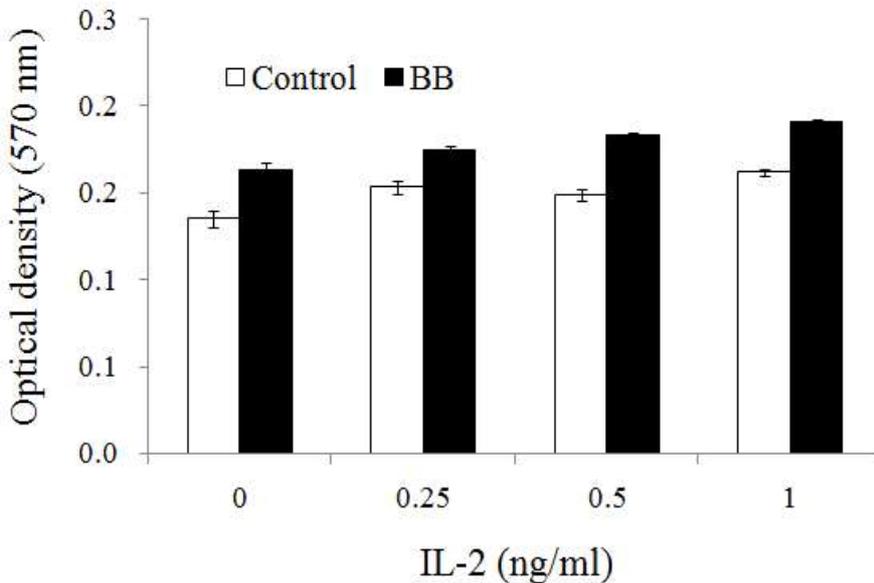


그림 45. BB군체에 처리된 비장세포의 IL-2 의존적 생존율 증가

마우스로부터 비장세포를 추출하여 BB항원이 없는 상태 또는 있는 상태로 배양하였다. 이후 비장세포를 회수하여 IL-2가 0 - 1 ng/ml의 농도로 존재하는 배양조건에서 3일간 배양한 후 MTT assay를 이용하여 생존율을 확인하였다. 활성화된 림프구는 세포표면에 CD25(IL-2 receptor alpha chain)를 다량 발현하여 IL-2에 대한 반응성을 높여 clonal expansion을 할 수 있는 특징을 갖고 있다. 실험결과 BB군체로 처리된 비장세포는 IL-2에 대해 농도의존적으로 생존율이 증가하였다. 반면 대조군의 비장세포는 농도의존적으로 증가하지 않았다.

▶ 토의 및 결론

BB백신항원은 자체적으로 IL-12의 생산과 IL-2의존적인 림프구 생존율을 증가시킬 수 있으므로, BB백신항원의 면역원성은 보호하면서도 점막면역 등을 증가시킬 수 있도록 백신어쥬번트를 선정해야 할 것 판단된다.

○ 점막면역증진물질이 처리된 비장세포에서 gut homing receptor의 발현 조사

LPAM-1은 gut homing receptor이며, 림프구의 표면에서 발현할 경우 림프구가 장점막으로 이동하는 것을 주도하는 molecule이다. 본 연구에서는 이미 알려진 BCR stimulation 유도인자인 IgM과 RA, IL-6을 비장세포에 복합처리하여 LPAM-1이 실제로 어느정도 발현하는 지 알아보려고 하였다.

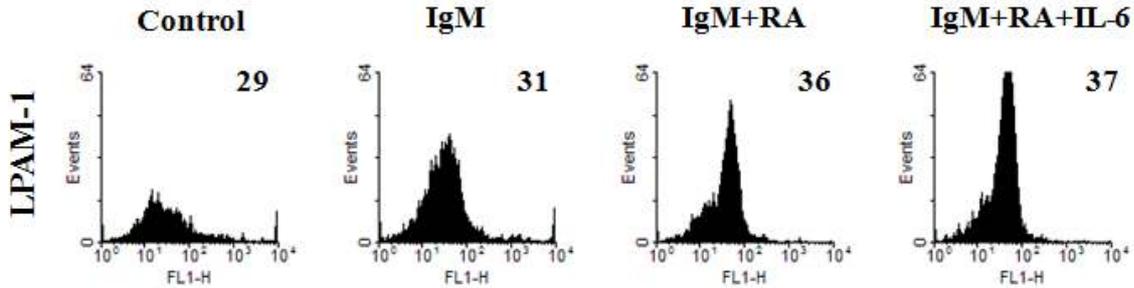


그림 46. 점막면역증진물질이 처리된 비장세포 표면에서의 gut homing receptor의 발현

BCR자극을 일으키는 IgM은 대조군에 비해 LPAM-1이 약하게 발현하였고, RA에 의해 가장 높은 발현증가를 보였다. 반면 본 실험에서는 IL-6가 발현에 미치는 영향은 미미하였다. RA의 유도효과에 겹쳐지는 것으로 추정된다.

마우스의 장간막 림프절 harvest

점막면역과 관련된 면역기관을 채취해 연구하기 위해 폐조직에 비해 상대적으로 잘 연구된 위장관의 림프절의 채취를 시도하였다. 그 중에서 장간막에 있는 lymph node에서 면역세포를 얻었다. 비장이나 골수에 비해 기관의 크기가 작아 세포채취가 어려웠고 익숙해 지면 관련된 후속 실험을 진행시킬 예정이다. 다음은 현재까지 본 실험실에서 정립한 실험법이다.

Balb/c 마우스의 사지를 고정할 후, 복강을 갈라 복막의 mesenteric lymph node (mLN)을 3-5개 떼어내고 PBS가 담겨있는 dish에 넣는다. clean bench에서 1 ml의 새 PBS로 갈아준 뒤, 1 ml 주사기의 뒷면으로 조직을 으개서 세포가 나오도록 한다. 으갠 세포를 15 ml conical tube로 옮기고 총 5 ml이 되도록 dish를 PBS로 세척 하여 tube로 옮긴다. centrifuge 1500 rpm, 6~7 min 하고 나서 상층액을 제거한다. 세포 pellet을 10% LCM 2 ml로 풀어준다. 10% LCM 로 세포가 있던 conical tube를 세척 한 후 40 μ m cell strainer에 통과시킨다. 총 5 ml의 10% LCM에 세포가 풀리게 한 뒤, cell count를 하고 세포를 알맞은 수 (주로 2×10^6 cell/ml)로 setting한다.

[1협동] 살모넬라 운반체를 이용한 점막면역 유도기술 개발

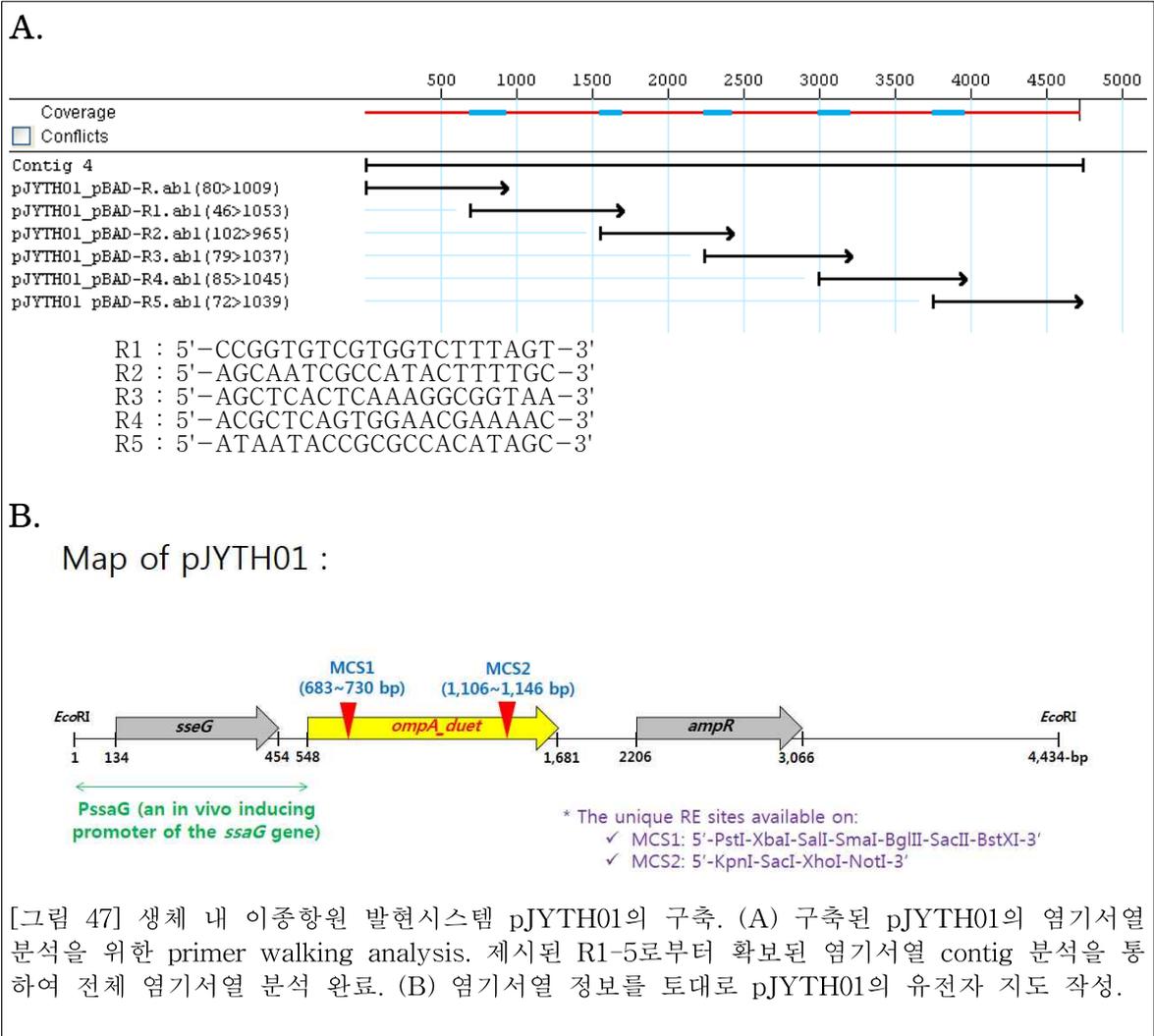
○ 이중항원 함유 재조합 살모넬라균 표면단백질 발현시스템 기능성 검증

▶ **연구목표 및 결과요약:** 살모넬라균에 존재하는 대표적인 외막 표면단백질의 일종인 OmpA는 살모넬라균의 병원성 및 적응 면역반응의 개시인자로 규명되었음은 물론, 구조적 상동성이 높은 대장균 OmpA의 경우 X-ray crystallography 구조가 밝혀져 있어, 본 연구과제의 1차년도 연구로부터 이중항원 발현을 위한 후보 외막 단백질로 선발하였고, 1차년도 연구수행을 통하여 살모넬라균 OmpA 기반의 이중항원 재조합 표면단백질 발현시스템(pGEYH01으로 명명)을 구축하였음. 본 2차년도 연구에서는, *in vitro* arabinose-inducible 발현시스템인 pGEYH01과 더불어 생체 내에서 이중항원의 발현을 최적화할 목적으로 유전자 치환기법을 이용하여 *in vivo* inducible promoter 조절 하에 OmpA 발현시스템을 구축하였고, primer walking을 통하여 염기서열 분석을 완료하였음. 또한, 구축된 OmpA 기반 이중항원 발현시스템에 표지단백질로서 녹색형광단백질(GFP; green fluorescence protein)을 탑재하여 표면 단백질로 발현됨을 형광현미경을 통하여 확인하였고, 현재 막 단백질을 분획 및 정제하여 Western blot을 수행하여 재확인 하였다.

▶ 연구수행내용 및 세부 결과

- **살모넬라균 OmpA 기반 이중항원 함유 재조합표면단백질의 *in vivo* 발현시스템 구축:** 1차년도 연구로부터 구축된 arabinose-inducible 이중항원 발현시스템 pGEYH01의 염기서열 정보를 토대로 inverse PCR을 이용하여, araBAD promoter를 *in vivo* inducing promoter로 알려진 532-bp SsaG 유전자 promoter로 치환하였음(그림 47의 모식도 참조). 구축된 생체 내 이중항원 발현시스템은 primer walking 분석을 통하여 전체 염기서열을 분석 완료하였고, pJYTH01로 명명하였음(그림 47A). 염기서열 분석 결과, multiple cloning site 2 (MCS2) 부위에 인위적으로 첨가한 SacII 제한효소 염기서열 내 단일 유전자 변이가 일어났음을 확인하였으며, 따라서 MSC1 부위의 SacII 제한효소 염기서열은 unique site로 확인되었음(그림 48). 염기서열 분석을 토대로 한 pJYTH01의 유전자 지도 및 결정된 제한효소 부위는 아래 도식과 같음(그림 47B).

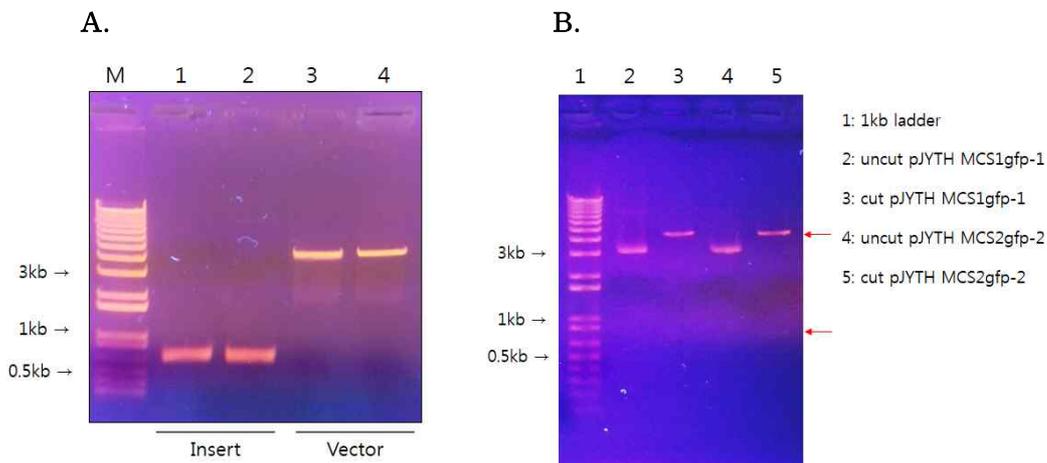
구축된 ompA는 서로 다른 2종의 외부 항원을 탑재하여, 균 외부환경으로 노출시킬 수 있는 장점을 지니고 있으며, cytoplasmic tail에 6개의 histidine epitope tag을 함유하고 있어, 발현량을 정량적으로 모니터링 할 수 있음(그림 48).



- 표지단백질을 이용하여 구축한 이중항원 함유 표면단백질 발현시스템의 기능성 검증: 구축된 in vivo inducible 이중항원 발현시스템의 기능성을 검증하기 위하여, 본 연구팀은 녹색형광단백질을 표지유전자로 pJYTH01의 존재하는 단일제한효소 부위를 이용하여, MCS1과 MCS2 부위에 각각 in frame fusion을 유도하였음(그림 48). 이를 위하여, 녹색형광단백질을 포함하고 있는 pKEN-gfpmut2를 주형으로 하여, unique restriction sites를 선별하여 high fidelity PCR을 수행하였으며, 제시된 제한효소로 처리된 pJYTH01 vector와 insert를 제조합하였음. MCS1에 탑재하기 위한 PCR primers로써 Fwd: 5'-CTACTGCAGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC-3' & Rev: 5'-CTAGTCGAC TTTGTATAGTTCATCCATGCC-3'를 사용하였으며, MCS2에 탑재하기 위하여 Fwd: 5'-CTAGGTACCAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTC-3' & Rev: 5'-CTACTCGAG TTTGTATAGTTCATCCATGCC-3'를 사용하였음. 아래 도표에서 제시된 바와 같이, MCS1 내부의 PstI-SalI 부위에 *gfp* 유전자를 삽입하여 pJYTH01/MCS1_gfp를 구축하였고, MCS2 내부의 KpnI-XhoI 부위에 삽입하여 pJYTH01/MCS2_gfp를 완성하였음. 해당 제조합 부위는 염기서열분석을 통하여 in frame fusion 되었음을 재확인하였음.

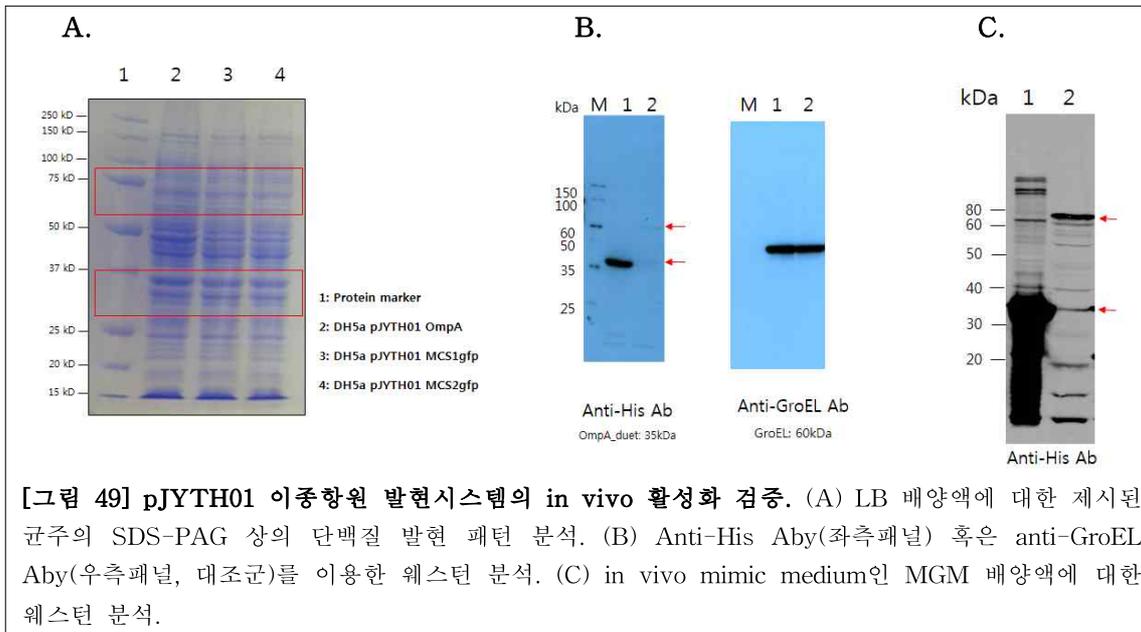
[표17] 녹색형광단백질과 pJYTH01에 존재하는 단일 제한효소 부위 분석 결과

MCS1			MCS2		
RE	Buffer	Temp.	RE	Buffer	Temp
PstI	3	37 °C	KpnI	1	37 °C
XbaI	4	37 °C	PvuII	2	37 °C
SalI	3	37 °C	SphI	2	37 °C
SmaI	4	25 °C	XhoI	4	37 °C
BglIII	3	37 °C	NotI	3	37 °C
BstXI	3	37 °C			

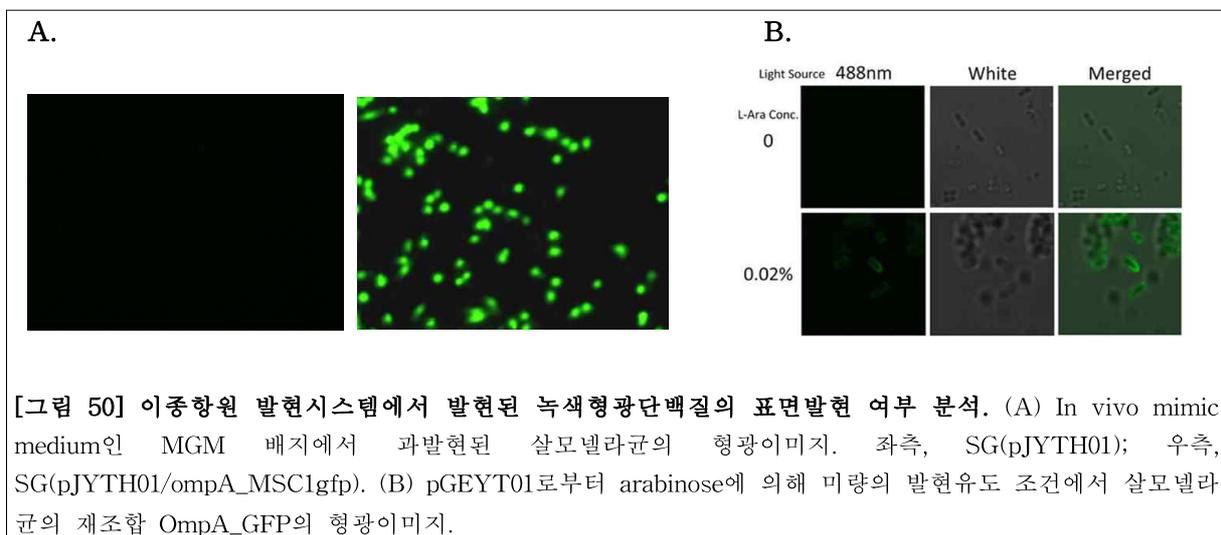


[그림 48] pJYTH01의 MCS1과 2 부위에 녹색형광단백질 재조합 OmpA 발현시스템 구축. (A) Ligation을 위한 vector와 inserts. Lanes M, 1-kb plus ladder; 1, PstI-SalI digested MCS1_gfp-2; 2, KpnI-XhoI digested MCS2_gfp-2; 3, PstI-SalI digested pJYTH01; 4, KpnI-XhoI digested pJYTH01. (B) 구축된 발현후보 플라스미드에 대한 RE pattern 분석.

해당 클론으로부터 재조합 단백질 생성 여부를 확인하기 위하여, 대장균 DH5a 균주에 개별 플라스미드와 empty vector를 도입한 후 LB broth overnight 배양액을 가지고, SDS-PAGE와 Western 분석을 실시하였음(그림 49 & B). 하지만 SDS-PAGE 분석 결과, 재조합 OmpA(약 35-kDa)와 OmpA_GFP(약 72-kDa)의 과발현을 확인할 수 없었음(그림 49A). 이것은 1차년도 arabinose-inducible 이중항원 발현시스템인 pGEYT01의 발현양상과 많은 차이를 보여주는 결과였고, 이러한 차이에 원인으로 pJYTH01에 치환된 PssaG promoter가 in vivo condition에서 발현 활성화되는 반면 in vitro condition 하에서는 발현 억제되는 것으로 유추하였음. 이를 증명하기 위하여 anti-histidine antibody를 이용하여 Western blot을 실시한 결과, 예상대로 매우 극소량의 재조합 단백질의 발현을 확인할 수 있었음(그림 49B). 특히 pJYTH01 vector 자체에서 발현되는 재조합 OmpA보다 OmpA-GFP 단백질의 발현이 현저히 저하됨을 확인하였음(그림 49B). 따라서 PssaG promoter가 활성화되는 것으로 알려진, in vivo mimic conditioned media에서 발현량을 조사하였음(그림 49C). Magnesium minimal medium (MGM)에서 배양액 시료를 채취한 뒤 Western blot을 통하여 확인한 결과, 재조합 OmpA와 OmpA-GFP 단백질의 발현이 현저히 증가함을 확인하였음(그림 49C). 본 연구에서 pJYTH01로 부터 재조합 OmpA의 발현량이 OmpA_GFP의 발현량보다 상대적으로 많은 이유를 설명하기 어려우나, 구축된 pJYTH01 이중항원 발현시스템이 in vivo condition에서 활성화됨을 확인할 수 있었음.

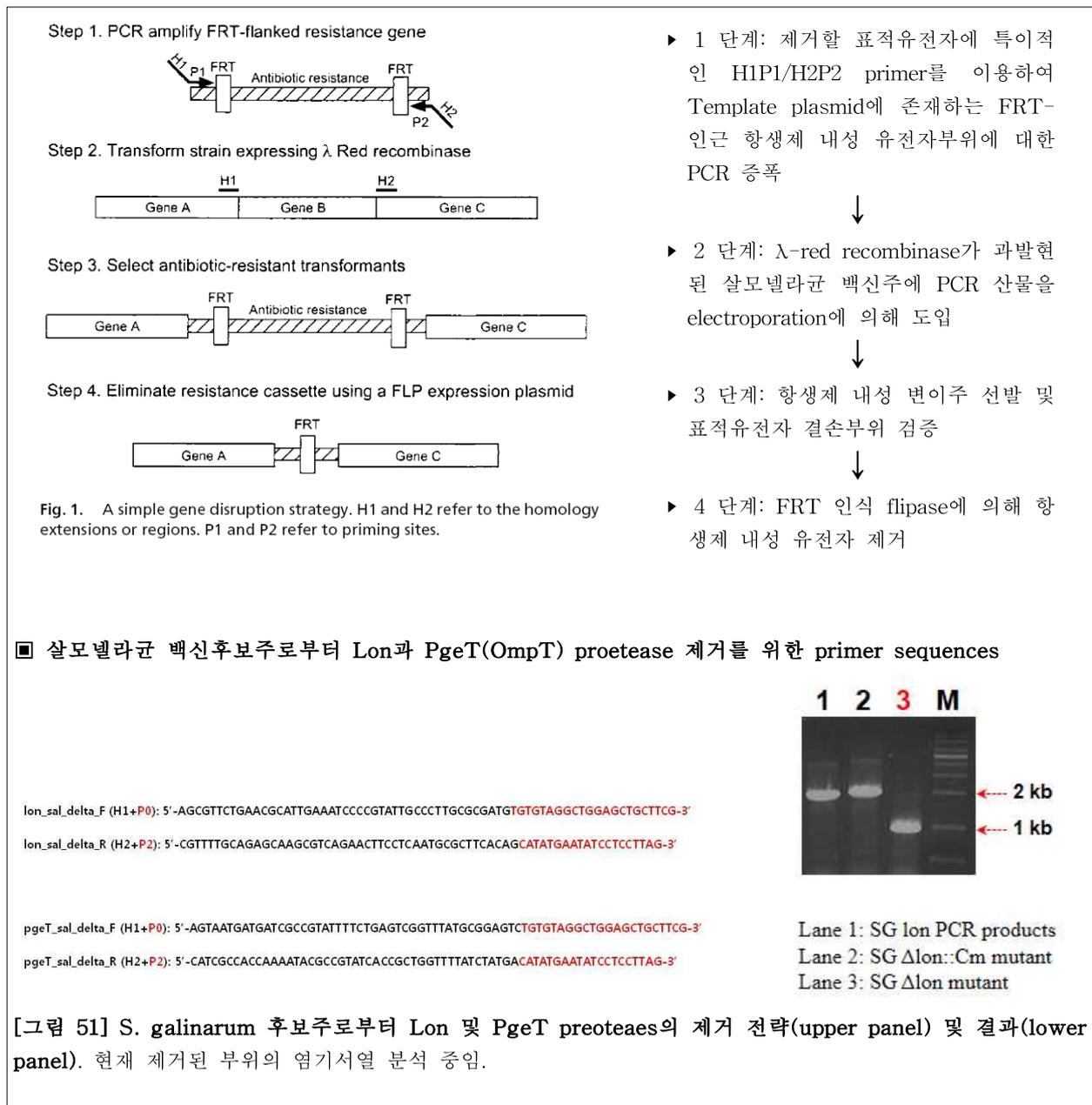


본 연구에서 구축된 pJYHP01이 생체 내 환경에서 발현 활성화됨을 확인하였기 때문에, 이중항원 탑재부위에 삽입된 GFP가 표면에 노출되는지 여부를 확인하기 위하여 형광현미경 분석을 수행하였음(그림 50). 하지만 in vivo mimic medium인 MGM 배양액의 경우, 세포 전체에 녹색형광이 강하게 관찰되어 단백질 발현 위치를 확인하기 어려웠음(그림 50A). 따라서 1차년도에 구축된 arabinose 농도에 tightly regulated 되는 pGEYT01을 이용하여 매우 낮은 농도로 Omp_GFP를 발현한 뒤 laser confocal microscope로 관찰한 결과, 부분적이지만 막 주변에 상대적으로 강한 녹색형광을 관찰할 수 있었음(그림 50B). 이는 구축된 이중항원 발현시스템이 탑재된 이중항원을 세포 표면으로 잘 노출시킬 수 있음을 암시함. 현재 막 단백질 정제 및 fractionation 후, Western blot을 통해 정확한 cellular location을 재확인 중임.



○ **살모넬라 운반체에서 이중항원의 안정적인 발현을 위한 균주 최적화(진행 중)**

▶ **연구목표 및 결과요약:** 살모넬라균 운반체 균주 후보주인 *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis로부터 OmpA, Lon, OmpT의 λ-red recombinase 기반 non-polar mutation 수행 중임. 세균에 존재하는 다수의 특이/비특이 단백질분해효소의 작용에 의하여 과발현된 이중항원의 분해 가능성을 배제하기 위하여, 기존 문헌보고를 통하여 잘 알려진 Lon protease와 세균 외막 단백질 분해효소의 하나인 OmpT를 선발된 살모넬라균 이중항원 운반체로부터 λ-red recombinase를 이용하여 제거함. 살모넬라균 이중항원 운반체로부터 Lon과 OmpT proteases의 제거는 정상적인 살모넬라균에서 발현된 이중항원의 안정성을 증가시킬 수 있으며, 정제 혹은 사균 처리 과정에서 일어날 수 있는 이중항원의 분해를 방지할 수 있을 것으로 기대함.



▶ **연구수행 내용 및 세부 결과**

- 선발된 살모넬라균 백신후보주에 λ-red recombinase의 유도 발현: Datsenko 등의 방법을

토대로, arabinose에 의해 유도 발현되는 λ -red recombinase를 보유하고 있는 온도민감성 플라스미드 pKD46을 선발된 살모넬라균(5종 항원변이주) 이중항원 운반체에 electroporation에 의해 도입한 후, 단일 클론을 선발/순수 분리 (완료)

- **표적 유전자 제거용 프라이머 합성 및 PCR 증폭:** *S. Enteritidis* 의 전장유전체로부터 약 2.3-kb Lon protease에 해당하는 유전자와 대장균의 OmpT에 해당하는 약 0.9-kb PgtE protease 유전자를 표적으로, 아래 그림에서와 같이 homologous recombination을 유도할 수 있는 60-65 mer 프라이머를 제작한 뒤 template plasmid로 알려진 pKD4(Cm cassette)를 이용하여 PCR 증폭하였음 (완료)

- **PCR 증폭산물의 linear transformation에 따른 homologous recombination 유도:** PCR 증폭산물을 정제한 뒤, electroporation에 의하여 λ -red recombinase가 과발현되어 있는 살모넬라균 이중항원 운반체에 도입함으로써, 동종유전자재조합을 유도하여 표적 유전자를 제거/불활화 함 (진행 중).

- **후보 클론에 대한 검증 및 항생제 저항 유전자 제거:** 항생제 내성 존재 유무 및 PCR을 이용하여 유전자 결손부위를 검증할 수 있음. 또한 FRT를 인식하는 flipase를 보유하고 있는 온도민감성 플라스미드 pCP20을 도입하여, 81-bp scar region을 제외한 항생제 내성 유전자를 제거함으로써, polar effect가 없는 변이주를 구축하고, 구축된 플라스미드를 이후 단계의 백신후보주로 사용(진행 중).

○ 점막면역 유도를 위한 약독화 살모넬라균 변이주 개발

▶ **연구목표 및 결과요약:** 본 실험은 이중항원을 운반하는 운반체로 점막면역을 유도하는 살모넬라 균주를 선발하기 위해 3가지 살모넬라 혈청형 SE, SG 및 ST에 대해 경구 접종과 복강 접종을 실시하여 IgG1과 IgA를 가장 많이 분비하는 혈청형의 변이주를 ELISA와 ELISPOT을 통해 선발하고자 한 것이다. 그 결과 SE 및 ST 변이주가 효과적인 면역반응을 유도하며, 특히 SE 변이주(Δ aroA)를 경구로 접종한 경우 IgG1과 IgA의 생성반응을 가장 잘 유도하는 것으로 나타났다. 본 연구결과를 종합하건대, 3가지 살모넬라 혈청형 중 이중항원을 운반하는 운반체로 SE 변이주를 경구로 접종할 때 체액성 면역 및 점막면역을 가장 잘 유도하는 것으로 확인되었다.

▶ 연구수행내용 및 세부 결과

(가) 재료 및 방법

(1) 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 실험실에서 보관중인 SE 야생분리주(wild-type) B01M106과 SE 변이주 B01M021(Δ aroA)을 사용하였으며, SG 야생분리주 B01M105와 SG 변이주 B01M085(Δ ssrAB Δ hmp Δ rpoS Δ ppk Δ aroA)를 사용하였다. 그리고 ST 야생분리주 B01M101과 ST 변이주 B01M080(Δ ssrAB Δ hmp Δ rpoS Δ ppk Δ aroA)을 사용하였다[표 18]. 각각의 변이주는 이전의 연구에서 보고된 phage λ red recombinase system을 이용하여 제작하였으며, 제거된 유전자의 세포 내 역할은 다음과 같다. ssrAB(SPI-2의 여러 operon의 발현 조절), hmp(NO로부터 organism 보호), rpoS(세포 밀도 조절), ppk(Poly P의 생합성 조절), aroA(미생물세포의 적응).

[표 18] 본 연구에서 사용된 살모넬라 균주.

Table 1. *Salmonella* (*S.*) strains used in this study

Strain	Relevant characteristic(s)	Resistance	Remarks
<i>S. Enteritidis</i>			
B01M106	Wild-type	Nalidixic acid	Isolate from chicken cecal contents
B01M021	$\Delta aroA$	-	Isogenic mutant of B01M106
<i>S. Gallinarum</i>			
B01M105	Wild-type	Nalidixic acid	Isolate from chicken cecal contents
B01M085	$\Delta ssrAB\Delta hmp\Delta rpoS\Delta ppk\Delta aroA$	Kanamycin	Isogenic mutant of B01M105
<i>S. Typhimurium</i>			
B01M101	Wild-type	Nalidixic acid	Isolate from chicken cecal contents
B01M080	$\Delta ssrAB\Delta hmp\Delta rpoS\Delta ppk\Delta aroA$	Kanamycin	Isogenic mutant of B01M101

ssrAB: Transcription factors of SPI-2, *hmp*: Flavohemoprotein, *rpoS*: RNA polymerase sigma factor, *ppk*: Polyphosphate kinase, *aroA*: Aromatic amino acid.

(2) 실험동물 및 접종방법

실험동물은 7주령의 BALB/c 암컷 마우스(Narabiotech, Korea)를 이용하였다. 모든 마우스는 IVC Rack(MVCS; Threeshine, Korea)에서 사육하였으며, 실험동물의 윤리적 사용을 위해 3R원칙에 따라 동물실험을 수행하였다. 또한, 모든 실험은 국립강원대학교의 동물실험윤리위원회 규정하에서 국내 법에 따라 실시하였다(허가번호 KW-121120-1). 한 군당 5마리의 마우스를 사용하였으며 SE, SG 및 ST 각각의 야생 분리주와 변이주를 복강 혹은 경구로 접종한 12군의 실험군과, 생리식염수 (PBS)를 복강으로 투여한 대조군을 포함하여 총 13군으로 실험을 실시하였다. 각 군의 접종경로와 접종량은 [표 19]과 같다. 야생분리주와 변이주의 접종량, 경구 투여량과 복강 접종량은 예비실험을 통해 마우스가 폐사되지 않는 범위로 맞추어 결정하였으며 동일비교대상 조건 하에서는 살모넬라 균주별 접종량은 동일하게 맞추었다. 접종 4시간 전부터는 급수와 급식을 중단하였다. 복강 투여는 마우스 1마리당 PBS에 희석한 접종액 100 μ L를 1 mL 주사기로 접종하였고, 경구투여는 마우스 1마리당 PBS로 희석한 균액 100 μ L를 zonde를 이용하여 투여하였다. 대조군은 PBS 100 μ L만을 투여하였다.

[표 19] 접종 경로와 접종량

Table 2. Route and inoculation amount (colony forming unit, CFU) of *Salmonella* serovars

Strain type		Route	Inoculation amount (CFU)	Survivor rate (%)
<i>S. Enteritidis</i>	W	IP	10	0/5 (0)
		PO	10^2	4/5 (80)
	M	IP	10^2	5/5 (100)
		PO	10^9	5/5 (100)
<i>S. Gallinarum</i>	W	IP	10	5/5 (100)
		PO	10^2	4/5 (80)
	M	IP	10^2	5/5 (100)
		PO	10^9	5/5 (100)
<i>S. Typhimurium</i>	W	IP	10	5/5 (100)
		PO	10^2	5/5 (100)
	M	IP	10^2	5/5 (100)
		PO	10^9	5/5 (100)
Control				6/6 (100)

W: wild-type, M: mutant, IP: Intra-peritoneal, PO: Per oral.

(3) 시료의 채취

접종 후 8, 14, 21일에 각각의 마우스 혈청과 분변을 채취하였다. 혈청의 경우 모세관을 이용하여 마우스 개체마다 약 300-500 μ L의 혈액을 안와 채혈 한 후, microcentrifuge tube에 담았다. 혈액을 응고시킨 후 12,000 \times g로 10분간 원심분리하였고, 상층액인 혈청을 분리하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관한 후 향후 실험에 사용하였다. 분변의 경우 마우스 개체당 분변을 2~3개(1개당 약 0.04 g)정도 tube에 담은 후 분변 시료가 50 mg/PBS 1 mL이 되도록 PBS를 첨가한 후 하루 동안 정치하였다. 분변 시료가 균질화 될 때까지 15분 이상 강하게 vortex하여 12,000 \times g로 5분간 원심분리하였고, 상층액을 분리하여 -70 $^{\circ}$ C에 보관한 후 향후 실험에 사용하였다.

(4) Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

실험에 이용한 살모넬라 균주의 체액성 면역 및 점막면역 유도 효과를 비교하기 위하여 indirect ELISA를 실시하였다. ELISA에 이용된 항원은 접종에 사용했던 각각의 살모넬라 혈청형에 대한 야생분리주의 세포외막 단백질(outer membrane protein: OMP)을 추출하여 이용하였다. MaxiSorp 96well plate(Nunc, Denmark)에 OMP를 0.05M sodium bicarbonate buffer(pH 9.4)에 희석하여 각 well당 0.3 μ g/100 μ L씩 분주한 뒤 4 $^{\circ}$ C에서 16~24시간 동안 코팅한 후, TPBS(0.05% Tween 20/PBS)로 3번 세척하였다. PBS에 1% bovine serum albumin(BSA)을 희석(BSA/PBS)하여 각각의 well에 분주한 후 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 blocking하고 TPBS로 3번 세척하였다. 마우스 혈청 및 분변 시료를 0.1% BSA/PBS로 계단 희석하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응한 뒤 TPBS로 3번 세척하였다. 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG1 horseradish peroxidase(HRP, Fitzgerald, USA)와 goat antimouse IgA HRP(Fitzgerald)를 각각 사용하여 100 μ L/well씩 첨가하여, 4 $^{\circ}$ C에서 16~24시간 동안 반응시켰다. 기질로는 tetramethyl-benzidine(TMB, Surmodics, USA)을 100 μ L/well씩 첨가하여 실온에서 암반응 후, 2N H₂SO₄로 100 μ L/well씩 첨가하여 반응을 중단하였다. 450 nm 파장에서 흡광도(OD)를 측정하였으며, 양성판정에 대한 기준은 MaxiSorp 96well plate의 blank에 대한 OD₄₅₀ 평균값의 3배보다 큰 값을 역가로 산출하였다.

(5) Enzyme-linked immunospot assay(ELISPOT assay)

살모넬라를 접종한 마우스의 B 림프구에서 분비되는 IgA를 측정하기 위하여 접종 4주 후 마우스를 도태시킨 후 비장세포를 분리하였다. 비장세포로부터 분비되는 살모넬라 specific IgA 측정을 위해 마우스 IgA ELISPOT Plus kit(MABTECH, Sweden)를 사용하였다. ELISPOT plate에 PBS로 희석한 살모넬라를 16시간 동안 4~8 $^{\circ}$ C에서 코팅하고 PBS로 세척한 후, complete medium [10% antibacterial antibiotic과 10% fetal bovine serum(FBS)이 포함된 RPMI 1640(Sigma, USA)]을 200 μ L/well씩 첨가하여 30분 동안 실온에서 blocking하였다. 100,000~500,000 cells/well이 되도록 비장세포를 각 well에 분주한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 16~24시간 동안 배양하였다. PBS로 각 well을 세척하여 세포를 제거하고 detection antibody(anti-IgA-biotin)를 0.5% FBS/PBS에 1 μ L/mL로 희석하여 100 μ L/well씩 분주한 후, 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 0.5% FBS/PBS에 1 : 1000으로 희석한 streptavidin-HRP를 100 μ L/well씩 분주한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. Ready-to-use TMB substrate solution을 100 μ L/well씩 분주하여 spot이 뚜렷이 나타날 때까지 10~30분 동안 전개시키고 세척한 후, 충분히 건조하여 ELISPOT reader(Aelvis, Germany)로 spot을 측정하였다.

(6) 통계분석

통계적 해석은 one way ANOVA를 이용하였으며, ELISA와 ELISPOT 결과는 p value < 0.05인

경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 유의성이 인정되는 경우, Tukey의 다중비교검정과 Dunnett의 다중비교검정을 추가적으로 실시하여 군간의 차이를 비교하였다.

(나) 결과

마우스에서의 IgG1 항체가 조사

SE, SG 및 ST의 OMP를 추출하여 ELISA항원으로 사용하여 각각의 혈청형에 대해 특이적인 IgG1, IgG2 및 IgA의 항체를 측정하였다. [그림 52]은 SE, SG 및 ST의 야생분리주와 변이주를 경구와 복강으로 접종한 후 8, 14, 21일에 IgG1을 조사한 결과이다. SE 접종군의 경우, 야생분리주를 복강으로 접종한 군이 8일 이전에 모두 폐사하여 역가를 측정할 수 없었다. 그러나 SE 변이주를 복강으로 접종한 군은 8일째부터, 경구로 접종한 군은 14일째부터 대조군에 비해 약 1.4~1.6배 높은 역가를 나타내며 유의성 있는 차이를 보였다[그림 52-a]. SG 접종군은 대부분 대조군과 비슷한 수준의 역가를 보였지만, 야생분리주를 복강으로 접종한 후 21일째에 관찰한 경우, 대조군에 비해 약 1.3배 높은 유의적인 증가를 보였다[그림 52-b]. ST 접종군은 변이주를 복강으로 접종한 군에서 IgG1의 증가가 가장 먼저 관찰되었고, 접종 14일째에는 야생분리주를 복강으로 접종한 군에서도 IgG1의 증가를 보였다. 접종 21일째에는 야생분리주와 변이주 모두 접종 경로와 무관하게 비슷한 수준의 IgG1 역가를 나타냈으며, 대조군에 비해 약 1.5~1.6배 높은 유의성 있는 차이를 보였다[그림 52-c]. 상기의 결과를 요약하여, 접종 21일째에 살모넬라 변이주에 대한 접종 경로별 IgG1 역가의 차이를 비교하였다[그림 53]. SG 변이주는 접종경로와 무관하게 대조군에 비해 별 다른 차이를 보이지 않았으나, SE 및 ST 변이주는 경구 및 복강접종 모두 대조군에 비해 약 1.3~1.4배 높은 역가를 나타냈다.

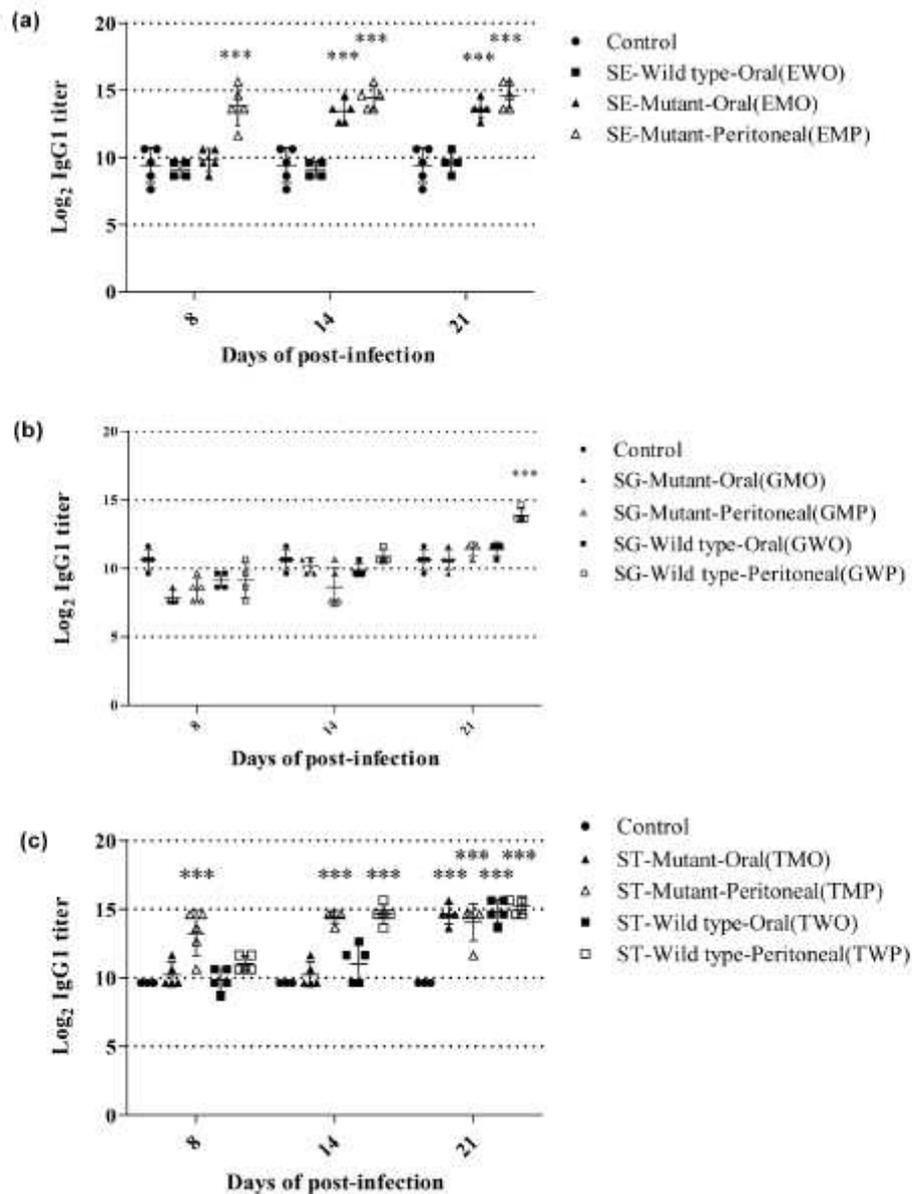


Fig. 1. IgG1 antibody titer of serum. (a) *S. Enteritidis*, (b) *S. Gallinarum*, (c) *S. Typhimurium*. Asterisks (***) indicate a p value of < 0.001 .

[그림 52] SE, SG, ST 접종에 따른 IgG1 항체 역가.

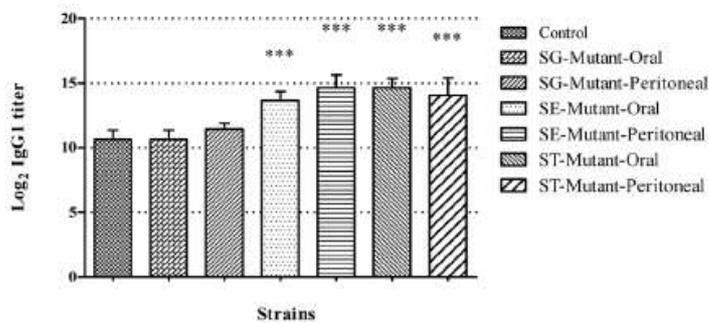


Fig. 2. IgG1 titer of serum after 21 days. Asterisks (***) indicate a p value of < 0.001 .

[그림 53] 접종 21일 후 IgG1 항체 역가.

마우스에서의 IgA 항체가 조사

접종군의 혈청 내 IgA 수준을 비교하기 위해 살모넬라 OMP항원에 특이적인 ELISA를 실시하여 양성반응을 측정하였다[표 20]. SE 접종군은 변이주가 접종경로와 무관하게 접종 후 8, 14, 21일째 모두 양성반응을 나타냈으며 높은 수준의 역가를 보였다. 이는 야생분리주를 경구로 접종한 결과와 비교했을 때 8일째 하나의 시료만이 양성 반응을 나타낸 것과 대조적이다. SG 접종군은 IgG1의 결과와 유사하게, 야생분리주를 복강으로 접종한 군을 제외한 대부분의 군에서 매우 낮은 수준의 역가를 나타내었다. ST 접종군은 야생분리주를 경구로 접종한 군과 변이주를 복강으로 접종한 군에서 양성반응을 나타냈다. 또한 접종 21일째에는 SE, SG 및 ST 변이주 접종군 모두 양성반응을 나타냈으며 비교적 높은 수준의 역가를 보였다. 이에 반해 대조군은 측정 전 기간 동안 매우 낮은 수준의 역가를 보였다. 이들 중에서 가장 높은 역가를 나타낸 군은 SE 변이주를 경구로 접종한 군이었으며, 복강으로 접종한 군도 유사한 수준의 역가를 나타냈다. 다음으로 ST 변이주를 복강으로 접종한 군과 SG 야생분리주를 복강으로 접종한 군이 높은 역가를 나타내었다. 한편 혈청 내 IgG2의 수준과 장내 점막에서 분비하는 IgA 수준을 비교하기 위해 각각의 혈청과 분변 시료를 대상으로 ELISA를 실시하였지만 어떠한 군에서도 양성반응이 나타나지 않았고, 역가 또한 산출할 수 없었다.

[표 20] 살모넬라 혈청형에 따른 IgA 항체 역가.

Table 3. Serum IgA titer to different *Salmonella* serovars (ELISA)

Strain	Route	Days of post-infection						
		8		14		21		
		Positive / total	Log ₂ titer Mean ± S.D	Positive / total	Log ₂ titer Mean ± S.D	Positive / total	Log ₂ titer Mean ± S.D	
SE	W	IP	ND	ND	ND	ND	ND	
	PO	1/4	4.9 ± 0.0	0/4	< 4.9	0/4	< 4.9	
		IP	2/5	5.4 ± 0.7	2/5	5.9 ± 0.0	4/5	6.7 ± 1.3
	M	PO	5/5	5.3 ± 0.6	3/5	6.2 ± 0.6	5/5	6.9 ± 0.0
W		IP	4/5	4.9 ± 0.0	4/5	5.9 ± 0.0	5/5	6.1 ± 1.3
SG	PO	0/4	< 4.9	0/4	< 4.9	0/4	< 4.9	
		IP	0/5	< 4.9	0/5	< 4.9	4/5	5.4 ± 0.6
	M	PO	0/5	< 4.9	0/5	< 4.9	3/5	5.6 ± 0.6
		W	IP	0/5	< 4.9	0/5	< 4.9	1/5
ST	PO	3/5	5.2 ± 0.6	4/5	5.4 ± 0.6	3/5	5.6 ± 0.6	
		IP	5/5	5.3 ± 0.6	4/5	6.2 ± 1.0	5/5	6.3 ± 0.6
	M	PO	0/5	< 4.9	0/5	< 4.9	3/5	5.6 ± 1.2
		Control	0/6	< 4.9	0/6	< 4.9	0/6	< 4.9

SE: *S. Enteritidis*, ST: *S. Typhimurium*, SG: *S. Gallinarum*, ND: not done, W: wild type, M: mutant, IP: intraperitoneal, PO: per oral.

살모넬라 특이 IgA 분비 비장 세포 수 측정

접종 4주 후 분리한 비장으로부터 비장세포를 추출하여 이들 중 살모넬라 특이 IgA를 분비하는 세포 수를 ELISPOT assay를 사용하여 측정하였다[그림 54]. 그 결과 spot 수의 평균에 있어 SE 변이주를 경구로 접종한 군에서 가장 높은 값을 나타내며 대조군과 유의적인 차이를 보였다. 이는 대조군에 비해 8배 이상 증가된 수치이며, 아울러 혈청 내에서 SE 변이주를 경구로 접종한 군에서의 IgA 역가 수준을 비교한 결과와 일치한다(data not shown). 다른 군에서는 spot 수의 평균값이 대조군과 유의성 있는 차이를 나타내지 않았으나, SE 야생분리주를 경구로 접종한 군에서 spot의 수가 최대값을 나타내는 시료가 있었다(19 spot/10⁵ cells). 또한 ST 변이주를 경구로 접종한 군에서 역시 비교적 많은 spot이 나타나는 시료(15 spot/10⁵ cells)가 관찰되었으나, 평균값(5.2 spot/10⁵ cells)은 유의성 있는 차이를 보이지 않았다.

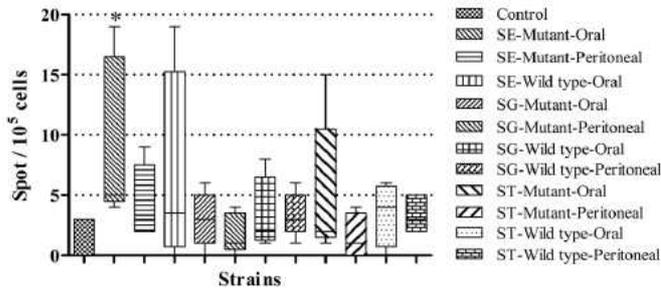


Fig. 3. Measurement of *Salmonella* specific-IgA secreting splenocyte levels against after 4weeks of infection. The number of splenocyte was measured by ELISPOT. Compared with the other strain, SE mutant strain elicits the highest level of IgA secreting splenocyte. Data are expressed as median, interquartile range and range of values. Asterisks (*) indicate a *p* value of < 0.05.

[그림 54] 접종 4주 후 살모넬라 특이 IgA 비장세포 수 측정.

○ 살모넬라균 OmpA 기반 이중항원 함유 재조합 플라스미드 구축

▶ **연구목표 및 결과요약** : 본 연구에서는 살모넬라균 OmpA 기반 이중항원이 함유된 재조합 플라스미드를 구축하기 위해 돼지에서 위축성 비염의 원인균인 *Bordetella(B.) bronchiseptica*의 병원성 유전자 pertactin(PRN)과 돼지마이코플라즈마성 폐렴의 원인균인 *Mycoplasma(M.) hyopneumoniae*의 adhesin 단백질인 P97중 epitope motif를 각각 PCR로 증폭하여 arabinose 유도성 과발현 플라스미드(pGEYH01)와 in vivo 활용을 위한 플라스미드(pJYTH01)에 도입하였다.

▶ **연구수행내용 및 세부 결과**

1. 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 pGEYH01(DH5a)과 pJYTH01(DH5a)을 사용하였다. PRN 유전자는 국내에서 가장 많이 발견되는 두 가지 타입(1-3a/2-7a, 1-3a/2-8b)의 *B. bronchiseptica* 균주를 사용하여 증폭하였으며, P97 유전자는 *M. hyopneumoniae* 725 균주를 사용하여 증폭하였다. 증폭된 PRN 유전자와 P97 유전자를 각각 pGEYH01(DH5a)과 pJYTH01(DH5a) vector에 도입하여 이중항원을 함유한 재조합 플라스미드를 제작하였다[표 21].

[표 21]. Plasmid used in this study

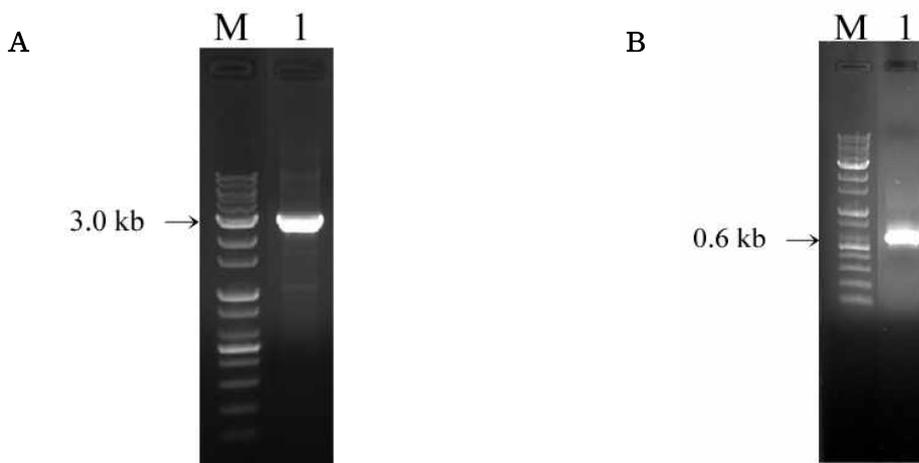
Plasmid	Characteristic	Resource
pGEYH01	araBAD promoter, OmpA-MCS12, AraC(-)	
pJYTH01	SsaG promoter, OmpA-MCS12	
pKV006	PRN13/pJYTH01(1-3a/2-7a)	This study
pKV008	PRN4/pJYTH01(1-3a/2-8b)	This study
pKV010	P97/pJYTH01	This study

2. Polymerase chain reaction(PCR)

PRN 유전자와 P97 유전자는 long PCR을 사용하여 증폭하였으며, 사용된 프라이머는 표 22와 같다. PCR solution은 각각의 50-200ng DNA 1uL, 10X buffer 5uL[50% Glycerol, 100mM KCl, 1mM DTT, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% Tween 20, 20mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM PMSF], 10mM dNTP mix, 10pM primers, SolgTM *Pfu*-X(2.5U/uL), 10% DMSO로 총 50uL의 혼합액을 사용하였다. PCR 반응조건은 94℃에서 4분 initial denaturing 한 후, 94℃에서 45초, 52℃에서 45초, 72℃에서 2분 45초로 30번 반복하여 72℃에서 8분 extension 하였다.

[표 22]. Primers used in this study.

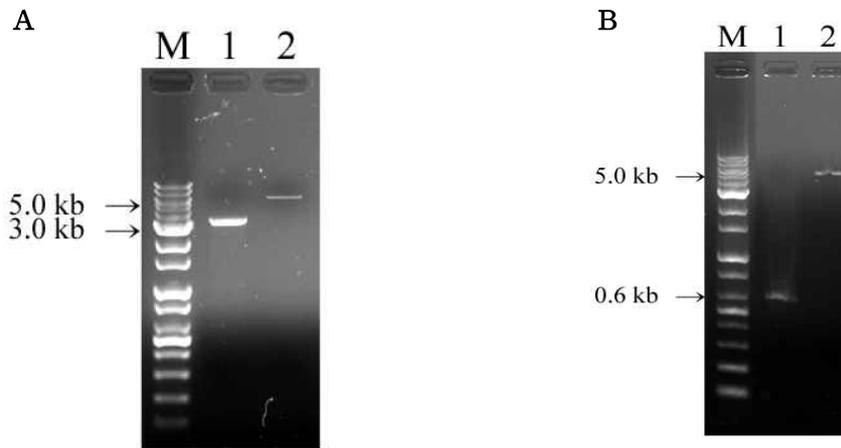
Primers	Sequence 5'-3'
PRN-F	ACCGAGCTCAACATGTCTCTGTACGCAT
PRN-R	ATTGCGGCCCGCCAGCTGTACCGGTAGCCCG
P97-F	ATCATGCGCTCTAGAGCTCCCCAGACTATTAC GAA
P97-R	TCATGATCCCCGCGGGCCAAGCTTAGTAGCAACTG



[그림 55] PRN과 P97 gene PCR 증폭. (A)Lane M, 1-kb plus ladder; Lane 1, *B. bronchiseptica* PRN gene(2,880bp); (B)Lane M, 1-kb plus ladder; Lane 1, *M. hyopneumoniae* P97 gene(590bp)

3. Double digestion & Ligation

PCR을 통해 증폭된 PRN, P97 유전자와 arabinose 유도성 과발현 플라스미드 pGEYH01(5,087 bp) DNA에 각각 MCS2와 1에 해당하는 제한효소를 동시 처리하여 insert와 vector를 준비하였다. 그 방법은 다음과 같다. 각각의 2-400ng/uL DNA, 10X digestion buffer 2uL, 1st enzyme 1uL, 2nd enzyme 1uL, ddWater를 넣어 총 20uL의 혼합액을 37℃에서 2시간 동안 반응하였다. 목적하는 insert와 vector를 T4 DNA ligase(NEB, UK)와 혼합하여 37℃에서 30분 동안 반응한 뒤 *E. coli* 형질전환을 실시하였다.



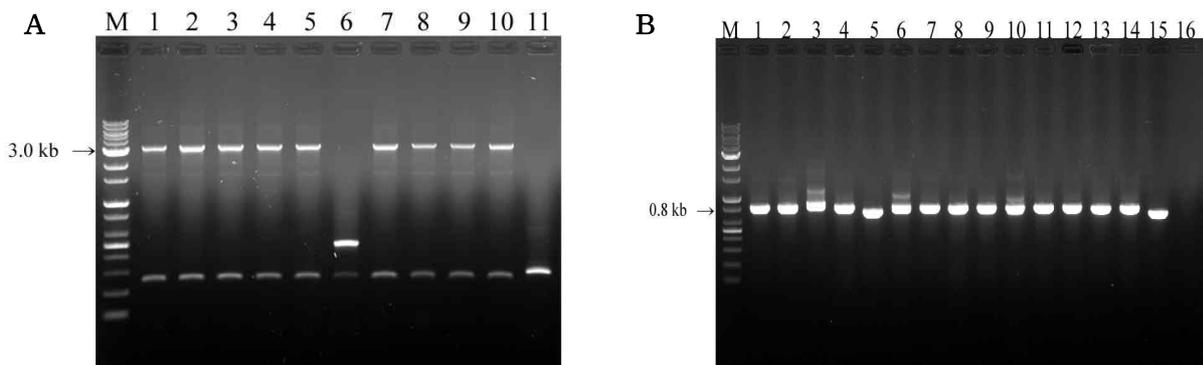
[그림 56] Ligation을 위한 insert와 vector DNA의 제한효소 처리. (A)Lane M, 1-kb plus ladder; Lane 1, PRN gene/Sac I+Not I; Lane 2, pGEYH01 plasmid DNA/Sac I+Not I, (B)Lane M, 1-kb plus ladder; Lane 1, P97/Xba I+Sac II; Lane 2, pGEYH01 plasmid DNA/Xba I+Sac II.

4. PRN and P97 gene cloning

E. coli 형질전환은 heat shock 방법을 사용하였다. 50ng의 재조합 플라스미드를 100uL *E. coli* competent cell(DH5a)에 혼합하여 얼음위에서 10분간 반응한 뒤 42℃에서 45초, 얼음위에서 2분간 반응하였다. 1mL Luria-Bertani(LB; Difco, USA) broth에 넣어 37℃에서 1시간 동안 배양한 뒤 ampicillin이 포함된 LB(Difco) plate에 배양액 100uL를 도말하였다. 37℃에서 16시간 동안 배양 후 colony를 무작위로 선별하여 colony PCR을 시행하였다.

5. Colony PCR

재조합 플라스미드(PRN/pGEYH01, P97/pGEYH01)가 *E. coli*에 올바르게 삽입되었는지 확인하기 위해 Colony PCR을 실시한 후 전기영동 확인 결과 대부분의 lane에서 PRN과 P97 유전자를 확인할 수 있었다.



[그림 57] Colony PCR. (A)Lane M, 1-kb plus ladder; Lane 1-10, PRN/pGEYH01 colony; Lane 11, pGEYH01 colony, (B)Lane M, 1-kb plus ladder; Lane 1-15, PRN/pGEYH01 colony; Lane 16, pGEYH01 colony

6. Sequencing analysis

Colony PCR을 통해 확인된 형질전환체를 선별하여 염기서열 데이터 분석(Cosmo GeneTech, Korea)을 의뢰한 결과 PRN, P97 유전자가 pGEYH01 벡터에 삽입된 것을 확인하였으며, 각 유전자

의 염기서열 또한 NCBI database와 99% 이상 일치하였다.

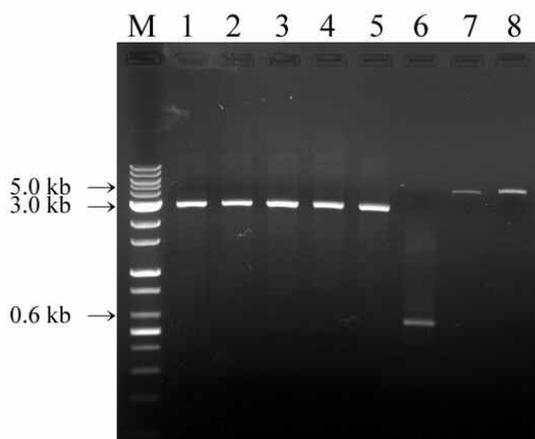
○ 이중항원 발현시스템을 위한 *in vivo* inducible 재조합 플라스미드 구축

▶ 연구목표 및 결과요약 : 본 연구에서는 상기에서 확보한 *B. bronchiseptica* PRN, *M. hyopneumoniae* P97 유전자를 생체 내에서 이중항원의 발현을 최적화하기 위해 살모넬라 SsaG promoter를 가지고 있는 pJYTH01 vector에 각각 삽입하여 *in vivo* inducible 이중항원 발현시스템을 위한 재조합 플라스미드를 구축하였다.

▶ 연구수행내용 및 세부 결과

1. Double digestion & Ligation

PCR을 통해 증폭된 PRN, P97 유전자와 *in vivo* inducible promoter를 함유한 플라스미드 pJYTH01(4,434 bp) DNA에 각 MCS2와 1에 해당하는 제한효소를 동시 처리하여 insert와 vector를 준비하였다. 그 방법은 다음과 같다. 2-400ng/uL DNA, 10X digestion buffer 2uL, 1st enzyme 1uL, 2nd enzyme 1uL, ddWater를 넣어 총 20uL의 혼합액을 37°C에서 2시간 동안 반응하였다. 목적하는 insert와 vector를 T4 DNA ligase(NEB, UK)와 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응한 뒤 *E. coli* 형질전환을 실시하였다.



[그림 58] Ligation을 위한 insert와 vector DNA의 제한효소 처리. Lane M, 1-kb plus ladder; Lane 1, PRN gene/Sac I+Not I; Lane 2, PRN13 gene/Sac I+Not I; Lane 3, PRN14 gene/Sac I+Not I; Lane 4, PRN4 gene/Sac I+Not I; Lane 5, PRN39 gene/Sac I+Not I; Lane 6, P97 gene/Xba I+Sac II; Lane 7, pJYTH01 plasmid DNA/Sac I+Not I; Lane 8, pJYTH01 plasmid DNA/Xba I+Sac II.

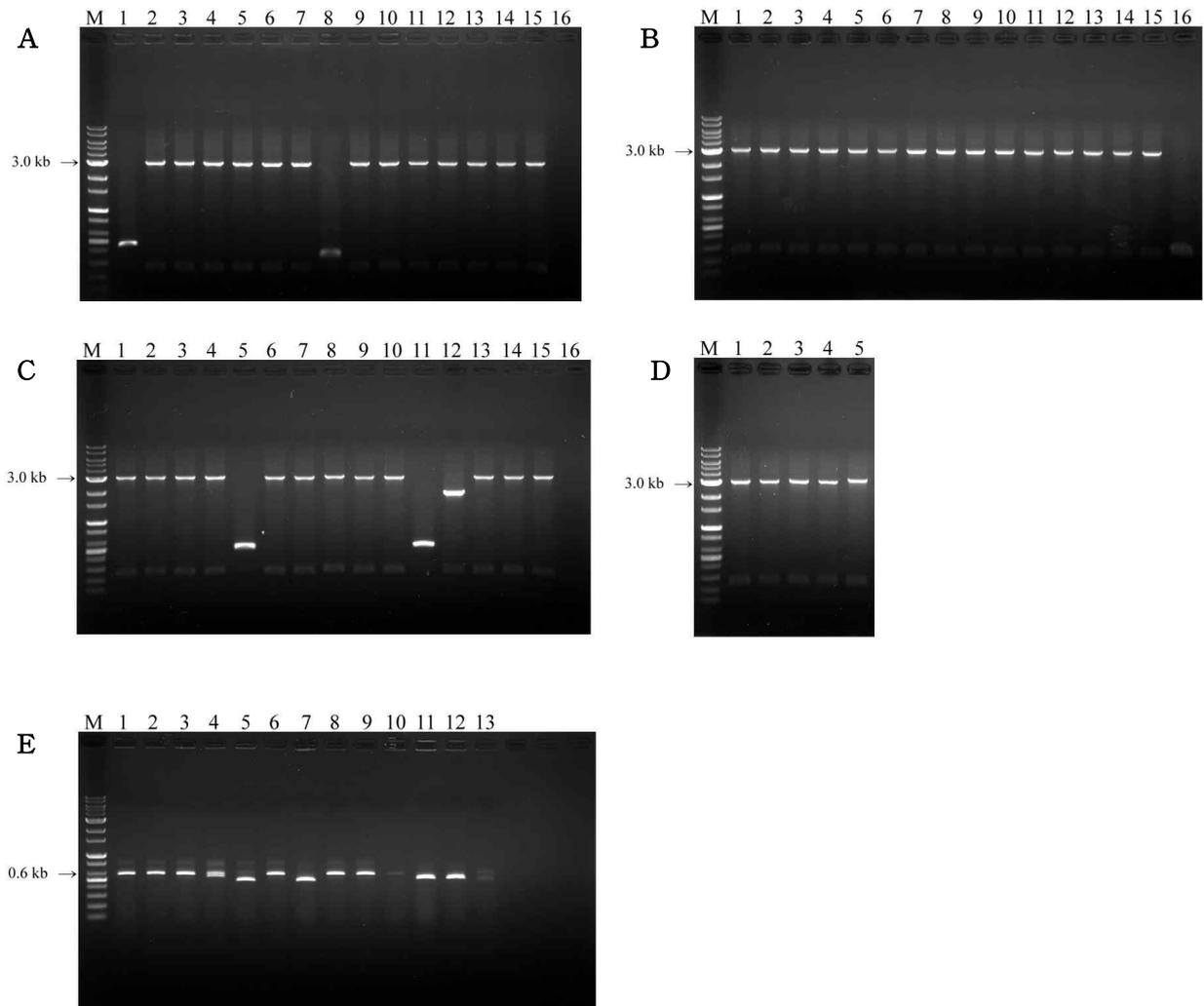
2. PRN and P97 gene cloning

50ng의 재조합 플라스미드를 100uL *E. coli* competent cell에 혼합하여 얼음위에서 10분간 반응한 뒤 42°C에서 45초, 얼음위에서 2분간 반응하였다. 1mL Luria-Bertani(LB, Difco, USA) broth에 넣어 37°C에서 1시간 동안 배양한 뒤 ampicillin이 포함된 LB(Difco) plate에 배양액 100uL를 도말하여 37°C에서 16시간 동안 배양 후 형질전환된 colony를 무작위로 선별하여 colony PCR을 시행하였다.

3. Colony PCR

재조합 플라스미드(PRN/pJYTH01, PRN13/pJYTH01, PRN14/pJYTH01, PRN4/pJYTH01,

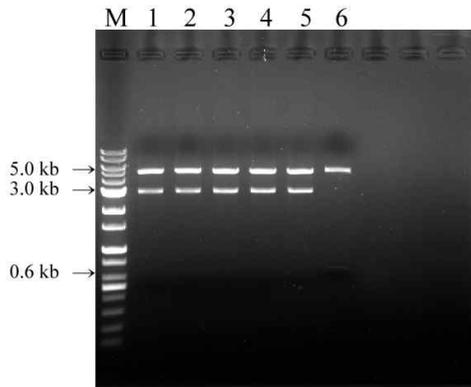
PRN39/pJYTH01, P97/pJYTH01)가 *E. coli*에 올바르게 삽입되었는지 확인하기 위해 colony PCR을 실시한 후 전기영동 확인 결과 대부분의 lane에서 PRN과 P97 유전자가 증폭된 것을 확인할 수 있었다.



[그림 59] Colony PCR. (A)Lane M, 1-kb plus ladder; 1-10, PRN/pJYTH01; 11-15, PRN13/pJYTH01, (B)Lane M, 1-kb plus ladder; 1-5, PRN13/pJYTH01; 6-15, PRN14/pJYTH01; 16, pJYTH01, (C)Lane M, 1-kb plus ladder; 1-10, PRN4/pJYTH01; 11-15, PRN39/pJYTH01, (D)Lane M, 1-kb plus ladder; 1-5, PRN39/pJYTH01, (E)Lane M, 1-kb plus ladder; 1-12, P97/pJYTH01; 13, pJYTH01.

4. Double digestion

재조합 플라스미드(PRN/pJYTH01, PRN13/pJYTH01, PRN14/pJYTH01, PRN4/pJYTH01, PRN39/pJYTH01, P97/pJYTH01)의 insert와 vector를 확인하기 위해 각 MCS에 해당하는 제한효소를 동시에 처리하여 전기영동을 실시한 결과 모든 lane에서 insert와 vector를 확인할 수 있었다.



[그림 60] 재조합 플라스미드(PRN/pJYTH01, PRN13/pJYTH01, PRN14/pJYTH01, PRN4/pJYTH01, PRN39/pJYTH01, P97/pJYTH01) 확인을 위한 double digestion. Lane M, 1-kb plus ladder; Lane 1, PRN/pJYTH01(Sac I+Not I); Lane 2, PRN13/pJYTH01(Sac I+Not I); Lane 3, PRN14/pJYTH01(Sac I+Not I); Lane 4, PRN4/pJYTH01(Sac I+Not I); Lane 5, PRN39/pJYTH01(Sac I+Not I); Lane 6, P97/pJYTH01(Xba I+Sac II).

5. Sequencing analysis

각각의 선별된 형질전환체를 대상으로 염기서열 데이터 분석(Cosmo GeneTech, Korea)을 의뢰한 결과 PRN13(1-3a/2-7a), PRN4(1-3a/2-8b), P97 유전자가 pJYTH01 vector에 삽입된 것을 확인하였으며, 각 유전자의 염기서열 또한 NCBI database와 99% 이상 일치하였다.

(A) PRN13 full sequence 2,744-bp

```
GAGCTCAACATGTCTCTGTACGCATTTGTC AAGGCGGGCCCTGCGCCGACCCACTGGCCATGGCGCTGGGCGCGCTGGGCGCCGCG
CCGCGCGGTACGCCGATGGAACAACAGTCCATCATCAAGGCGGGCAGCGCCAGCACGGCATCCACATCAAGCAAAGCGATGGCGC
CGGCGTACGGACCGCCACCGGAACGACCATCAAGGTAAGCGGTCGTCAGGCCAGGGCGTCTTCTGGGCAACCGTCAAGGCGCGC
AAGCTGGTCGCCGATCACGCCACGCTGGCCAACGTCAGCGACACCCGGGACGACGACGGCATCGCGCTCTATGTGGCCGCGCAGCAGGC
CCAGGCCAGCATCGCCGACAGCACCCCTGCAGGGCGGGGCGGGTGCAGGGTGCAGCGCGGCCAATGTCACGGTCCAACGACGACCAT
CGTTGACGGGGCTTGCATATCGGCACCCTGCAGCGCTGCAGCGGAAGACCTTCCGCCAGCCGGTGGTGTGGGCGACACCAGCG
TGACCGCGTGCAGCGCGCGCCGCGGGTGTCTGTATTCGGGGCAATGAGCTTACGGTTGATGGCGGGCACATCACCGGG
GGGCGGGCAGCGGGGTGGCGGCCATGGACGGGGCGATCGTGCATCTGCAGCGCGCAGGATACGGCGGGGGACGCGCTGCCGGCGG
TGCGGTTCCAGCGGTGTGTTCCCGGGCGCTTCGGCCCCCTCCTTGACGGCTGGTATGGCGTGGATGTATCGGATTCCACCGTGGACC
TCGCTCAGTCGATCGTCGAGGCGCCGAGCTGGGCGCCGCGATCCGGGCGGCCGCGCGCCAGGGTGCAGGTGTCGGGCGCAGCTTGT
CCGCACCGCACGGCAATGTCATCGAGACCGGGCGGGCGCGCTCGCTTCCCGCTCCGGCTCGCCCTGTGATCACCTTGCAGGCGG
GCGCACGGGCGCAGGGGAGGGCGCTGTGTACCGGTCTGCGCGAGCCCGTGAAGCTGACGCTGGCGGGCGCGCCAGGGGCGAGGGCG
ACATCGTCGCGACGGAGCTGCCTCCATTCAGGCGCGTCGAGCGGGCCGCTCGACGTGGCGCTGGCCAGCCAGGCCGATGGACGGGCG
CTACCCGCGCGTGCAGCTCGCTGTCATCGACAACGCCACCTGGGTCATGACGGACAACCTCGAACGTCGGCGCGCTGCGGCTGGCCAGC
GACGGCAGCGTCGATTTCCAGCAGCCGCGCAAGCTGGGCGGTTCAAGGTCCTGATGGTCGATAACGCTGGCGGGTTCGGGGCTGTTCCG
CATGAATGTCTTCGCGGACCTGGGGCTGAGCGACAAGCTGGTTCGTCATGCGGGACGCCAGCGGCCAGCAGGCTGTGGGTCCGCAACA
GCGGCAGCGAGCCCGCCAGCCCAACACCATGCTGTGTCAGACGCCACGAGGCAGCGCGGCGACCTTACCCTTGCCAACAAGGAC
GGCAAGGTCGATATCGGTACCTACCCTATCGATTGGCCGCCAACGGCAATGGGCAGTGGAGCCTGGTGGGCGGAAGGCGCCGCGGCG
GCCAAGCCCGCGCCGAGCCCGGTCCCGAGCCCGGTCCCGAGCCCGCGAGCCCGCGAGCCCGCGAGCCGCCACAGAGGCGAGCCGGAA
GCGCCGCGCGCCGAACCGCGCGGGCAGGGAGTTGTCCGCGCGCCAACCGCGCGGTCAACACGGGTGGGGTGGGCTGGCCAGCACG
CTCTGGTACGCCAAAGCAATGCGTTGTCCAAGCGCTGGGCGAGTTGCGCTGAATCCGGACGCCGGCGCGCTTGGGGCCGCGGCTT
CGCGCAACGCCAGCAACTGGACAACCGCGCGGGCGCGCTTCGACCAGAAGGTGGCCGGCTTCGAGCTGGGCGCGCACCACGGGTGGC
GGTGGCCGCGGGCGCTGGCACCTGGGCGGGTGGCCGGCTATACGCGCGCGACCGCGCTTACCAGCGACGGCGCGGCCACACCGA
CAGCGTGCATGTGGGGGCTATGCCACCTATATCGCAACAGCGGTTTCTACCTGGACGCGACGCTGCGCGCCAGCCGCTCGAAAATG
ACTTCAAGGTGGCGGGCAGCGATGGGTACGCGGTCAAGGGCAAGTACCGCACCCATGGGGTAGGCGCTCGCTCGAGGCGGGCCGCGCGC
TTCGCCCATGCCAGCGGTGGTTCCTCGAGCCGAGCCGAGCTGGCGGTGTTCCGGGTGGGCGGGTTCGTACCGCGCGGCCAATGGC
CTGCGGGTGCAGCACGAAGGCGGACGCTCGGTGCTGGTTCGCTGGGCTGGAGTGGCAAGCGCATCGAACTGGCAGGCGGCAGGCA
GGTGCAGCCATACATCAAGGCCAGCGTGTGTCAGGAGTTCAGCGCGCGGGTACGGTACGCACCAACGGCATCGCGCACCGCACCGAAC
TGCGCGGACGCGCGCCGAACCTGGGCTGGGCATGGCCGCGCGCTGGGCGCGGCCACAGCCTGTATGCCTCGTACGAGTACTCCAAGG
```

GCCCCAAGCTGGCCATGCCGTGGACCTTCCACGCGGGCTACCGGTACAGCTGGGCGGCCG //

(B) PRN4 full sequence 2,753-bp

GAGCTCAACATGTCTCTGTACAGCATTGTCAAGGCGGCGCCCTGCGCCGACACACTGGCCATGGCGCTGGGCGCGCTGGGC
GCCGCGCCCGCCGCGTACGCCGACTGGAACAACCAGTCCATCATCAAGGCCGCGAGCGCCAGCACGGCATCCACATCAAGCA
AAGCGATGGCGCCGCGGTACGGACCACCAGGAACGACCATCAAGGTAAGCGGTCGTCAGGCCAGGGCGTCTGTGGAAA
ATCCCGCGGCCGAGCTGCGGTTCCAGAACGGCAGCGTCACGTCTTCGGGACAGCTGTTTCGACGAAGCGTCCGGCGCTTCTG
GGCACCGTACCGTCAAGGCCGGCAAGCTGGTCGCCGATCAGCCACGCTGGCCACGTCAGCGACACCCGGGACGACGACGGC
ATCGCGCTCTATGTGGCCGGCAGCAGGCCAGGCCAGCATCGCCGACAGCACCTGCAGGGCGCGGGCGGCGTGCGGTTCGAG
CGCGGCCCAATGTACGGTCCAACGCAGCACCATCGTTGACGGGGCTTGCATATCGGCACCCTGCAGCCGCTGCAGCCGGA
AGACCTTCGCCCAGCCGGTGGTGTGGGCGACACCAGCGTGACCGCGTGCAGCCGAGCGGGCGCCCGCGGGCGGTGTCTGT
ATTGGGGCCAATGAGCTTACGGTTGATGGCGGGCACATCACGGGGGGCGGGCAGCGGGGGTGGCGGCCATGGACGGGGCGA
TCGTGCATCTGCAGCGCGCAGGATACGGCGGGGGACGCGCTGCCGGCGGTGCGGTTCCAGGCGGTGCTGTCCCGCGGGCT
TCGGCCCCCTCTTGACGGCTGGTATGGCGTGGATGTATCGGATTCCACCGTGGACCTCGCTCAGTCGATCGTCGAGGCGCCG
CAGCTGGGCGCCGCGATCCGGCGGGCGCGGGCGCCAGGGTGACGGTGTTCGGCGGCAGCTTGTCCGCACCGCACGGCAATGTC
ATCGAGACCGGCGGGCGCGCGTTCGCCCTCCGGCTCGCCCTGTCGATCACCTTGCAGGCGGGCGCACGGGCGCAG
GGGAGGGCGTGTGTACCGGGTCTTCGGGAGCCCGTGAAGTGAAGCTGGCGGGCGCGCCAGGGGAGGGGACATCGTC
GCGACGGAGCTGCCCTCCATTCCAGGCGGTGAGCGGGCCGCTCGACGTGGCGCTGGCCAGCCAGGCCGATGGACGGGGCGCT
ACCGCGCGGTGACTCGCTGTCCATCGACAACGCCACCTGGGTCATGACGGACAACCTCGAACGTCGGCGCGCTGCGGGTGC
AGCGACGGCAGCGTCGATTTCCAGCAGCCGCGGAAGCTGGGCGGTTCAAGGTCCTGATGGTCGATACGCTGGCGGGTTCGGG
GCTGTTCCGCATGAATGCTTCGCGGACCTGGGGCTGAGCGACAAGCTGGTCGTCATGCGGGACGCCAGCGGCCAGCACAGGC
TGTGGGTCCGCAACAGCGCAGCAGCCGCGCCAGCGCAACACCATGCTGCTGGTGCAGACGCCACGAGGCAGCGCGCGACC
TTTACCCTTGCCAACAAGGACGGCAAGGTCGATATCGGTACCTACCGCTATCGATTGGCCGCAACGGCAATGGGCAGTGGA
GCCTGGTGGGCGGAAGGCGCCGCGGCCAAGCCCGCGCCGACGCCGCTCCAGCCGGTCCCGAGCCCGCGCAGCCGCC
GCAGCCGCCGAGCCCGCAGCCGCCACAGAGGCAGCCGAAAGCGCCGGCGCCGAACCGCCGGCGGGCAGGGAGTTGTCCGC
CGCCGCAACGCGCGGTCAACACGGGTGGGTGGGCTGGCCAGCAGCTCTGGTACGCCGAAAGCAATGCGTTGTCCAAGC
GCTGGGCGAGTTGCGCTGAATCCGGACCGCGCGCGCTTGGGGCCGCGCTTCGCGCAACGCCAGCAACTGGACAACCGCG
CCGGGCGCGCTTCGACCAGAAGGTGGCCGGCTTCGAGCTGGGCGCCGACCACGCGGTGGCGGTGGCCGGCGGGCGCTGGCACC
TGGGCGGGCTGGCCGGCTATACGCGCGCGACCGCGGCTTACC GGCGACGCGCGCGGCCACACCGACAGCGTGCATGTCGGGG
GCTATGCCACCTATATCGCAACAGCGGTTTCTACTGGACGCGACGCTGCGCGCCAGCCGCTCGAAAATGACTTCAAGGTG
GCGGGCAGCGATGGGTACGCGGTCAAGGGCAAGTACCGCACCCATGGGGTAGGCGCTCGCTCGAGGCGGGCCGGCGCTTCGC
CCATGCCGACGGTGGTTCTCGAGCCGAGCCGAGCTGGCGGTGTTCCGGTTCGGCGGCGGTTTCGATACCGCGCGGCAATGG
CCTGCGGGTGCAGCAAGGCGGCGAGCTCGGTGCTGGGTCGCTGGGCTGGAGGTCGGCAAGCGCATCGAACTGGCAGGGC
GCAGGCAGGTGCAGCCATACATCAAGGCCAGCGTGTGCAGGAGTTCGACGCGCGGGTACGGTACGCACCAACGGCATCGCG
CACCGCACCGAACTGCGCGGCACGCGGCCGAACCTGGGCTGGGCATGGCCGCGCGCTGGGCGCGGCCACAGCCTGTATGCC
TCGTACGAGTACTCCAAGGCCCGAAGCTGGCCATGCCGTGGACCTTCCACGCGGGCTACCGGTACAGCTGGGCGGCCG //

(C) P97 full sequence 588-bp

TCTAGAGCTCCCCAGACTATTACAGAACTATGTTCCGAATATCGCAACACACAAATATATACGATAAATGACAAAATACTATCATAT
ACGGAATCGATGGCAGGCAAAAAGAGAAATGGTTATCATTACATTTAAGAGCGGCGCAACATTTTCAGGTGGAAGTCCCGGGCAGTCAA
CATATAGACTCCCCAAAAAAGCCATTGAAAGGATGAAGGACACATTAAGAATCGCATATCTGACCGAGACCAAAATTGATAAATT
ATGTGTATGGAATAATAAAACCCCAATTCAATTGCGGCAATCAGTATGGGGATCCCTACAAAAGAAGTAAAAGAGAAGAAGTAG
ATAAAAAAGTTAAAGAATTAGATAATAAAAATAAAAGGTATATTACCTCAGCCCCAGCAGCTAAACCAGAAGCAGCAAAACCAGTA
GCAGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCTGAAGCAGCAAAACCTGAAGCAGCAAAACCAGTAGCGGCTAAACCTG
AAGCAGCAAAACCAGTAGCAGCTAAACCTGAAGCAGTAAACCTGACTACTAAGCTTGGCCCGCG //

[그림 61] PRN 13, PRN 4, P97 유전자의 DNA 염기서열.

[2협동] 돼지 위축성비염 백신효능시험 및 시제품 개발

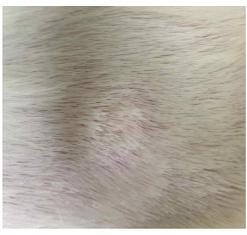
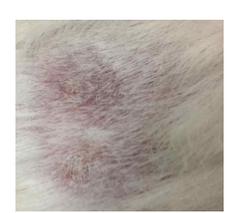
1. 실험방법

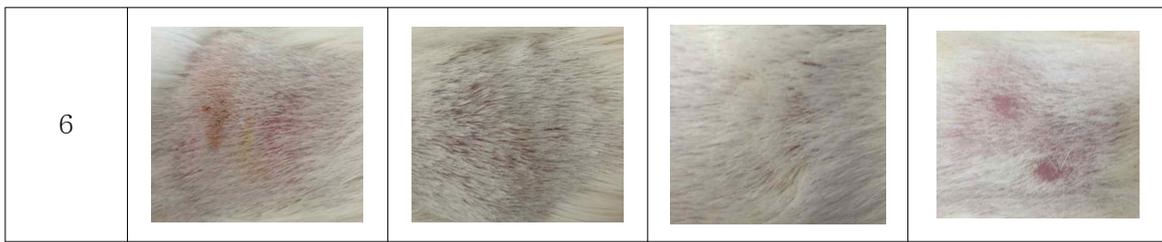
선발된 adjuvant 후보물질 6종류

- 1) 기니픽은 각각의 그룹별로 시험용 adjuvant를 0.1ml 씩 피내에 접종하고 접종부위 염증 등 이상 유무를 관찰하였다.
- 2) 기니픽은 각각의 그룹별로 시험용 adjuvant를 2ml 씩 근육에 접종하고 접종반응 등 이상 유무를 관찰하였다.

2. 결과

- 1) 기니픽 피내 접종 : 후보물질 6종을 기니픽 피내에 접종 후 14일간 관찰한 결과 6그룹 모두 접종 부위에 염증 등 은 관찰되지 않았으며 내과생존 하였다.

후보 물질 No.	피내 접종			
	1일 경과 후	4일 경과 후	7일 경과 후	14일 경과 후
1				
2				
3				
4				
5				



2) 기니픽 근육 접종 : 후보물질 6종을 기니픽 근육에 접종 후접종 후 14일간 관찰한 결과
 1,2,3,5,6번 후보물질 접종부위의 근육이 경직됨을 관찰하였으며 4번 후보물질
 접종부위는 이상이 없이 내과 생존하였다.

후보 물질 No.	대퇴부 근육 접종	
	4일 경과 후	14일 경과 후
1		
	근육 경직	근육 경직
2		
		근육 경직
3		
	근육 경직	근육 경직
4		
		양호

5		
		근육 경직
6		
	근육 경직	근육 경직

3. 결론
Adjuvant 후보물질 6종류 가운데 4번 물질이 실험동물에 접종하였을 때 가장 안전한 것으로 확인 되었다.

▶ 토의 및 결론

1세부과제에서 마우스실험(1차)을 실시한 6종류의 Montanide 어쥬번트 혼합물질을 (주)고려비엔피에 기니픽실험을 의뢰하였다. 시험은 접종물질의 종류를 알려주지 않고 번호만 주어 blind test를 했다. 샘플은 1. MonA, 2. MonA+RA, 3. MonA+RA+Fuco+BB, 4. MonC, 5. MonC+RA, 6. MonC+RA+Fuco+BB 순서였다. MonA와 MonC는 현재 돼지백신에 다용되는 ISA201VG, IMS1313 이었다.

마우스실험에서는 복합처치군이 간헐적으로 죽었으나 반복실험에서 유의성이 적었다. 기니픽실험에서는 염증은 관찰되지 않았지만 대부분 근육경직이 관찰되었다. RA, Fucoidan, BB의 경우 개별 최고함량이 사용되었으므로, 후속실험에서 효과를 유지하면서도 최소함량을 사용할 수 있도록 최적의 비율을 얻어야 할 것으로 판단된다. 또한 Montanide 어쥬번트를 백신 basic media로 사용하지 않고 천연물질과 백신항원 만으로 백신제조를 시도할 예정이다.

제 3 절 3차년도 세부과제별 연구내용 및 결과

[세부] 돼지용 Muco-adjuvant 개발 및 신규 약효실험체계 확립

○ 마우스에 백신후보물질을 접종한 후 *B. bronchiseptica* 생균 공격접종실험

마우스에 백신후보물질을 접종한 후, *B. bronchiseptica* 생균에 대한 생체 내 방어효과를 알아보기 위해 실험하였다.

▶ 실험방법

백신후보물질을 마우스에 접종

- 대조군, 백신항원 단독군, 백신항원 + 어쥬번트 복합군
- 백신항원은 *B. bronchiseptica*을 10 ug/마우스 용량으로 접종하였으며, 어쥬번트는 fucoidan을 100 mg/kg의 용량으로 접종하였음.
- 2주 간격으로 2회 백신후보물질 접종

B. bronchiseptica 생균 공격접종

- 백신후보물질을 마우스에 마지막으로 접종한 뒤 2주 후에 생균을 공격접종하였음.
- 제주대학교 공과대학 식품생명공학과에서 배양한 *B. bronchiseptica*를 공격접종에 이용
- 생균원액을 인산완충액으로 2배 또는 3배 희석한 뒤 마우스에 250 ul/마리의 용량으로 접종하였고, 이후 1주일간 관찰하였음 (그룹당 3-4마리씩 구성하였으며 반복 실험하였음)

▶ 결과

생균원액을 인산완충액으로 3배 희석한 후

- 접종 후 1일째

대조군 - 경련을 보이며 후지마비, 괴사를 일으키고 눈을 잘 뜨지 못함

백신항원 단독군 - 호흡곤란, 기면상태를 보임

백신항원 + 어쥬번트 복합군 - 거동이 둔해졌으나 거의 정상이었음

- 접종 후 2일째

대조군 - 마우스 전부 사망

백신항원 단독군 - 전날보다 상태가 비교적 회복되었으나 어쥬번트 복합군에 비해 상대적으로 상태가 좋지 않음

백신항원 + 어쥬번트 복합군 - 거의 정상이었음

○ 돼지를 이용한 *B. bronchiseptica* 백신의 항체 생산능 검정

Bordetella bronchiseptica (*B. bronchiseptica*) 항원을 어쥬번트와 함께 돼지에 접종한 후 혈청에서 *B. bronchiseptica* 항원 특이적인 항체를 정량하였다.

▶ 백신접종 후보물질 준비

- 대조군 - PBS
- 백신항원 단독군 - *B. bronchiseptica* 항원 마리당 1 mg
- 백신항원 + 어쥬번트 복합군 - *B. bronchiseptica* 항원 마리당 1 mg + HMF fucoidan 마리당 100 mg

▶ 실험방법

- 백신접종은 고려비엔피에서 2주 간격으로 두차례 접종하였으며, 분리된 혈청을 제주대로 냉장보관 상태로 보내 항체가 분석에 이용하였다.
- *B. bronchiseptica* 항원을 ELISA plate에 5 ug/ml의 농도로 100 ul/well 씩 분주하여 coating 하였다. 이때 *B. bronchiseptica* 항원은 intact bacteria를 사용하였으며 Bradford 법으로 단백질 정량을 실시하였다.
- 혈청은 5배 희석법을 사용하였으며 $5^3 - 5^6$ 배로 희석하여 항체가 분석을 실시하였다. ELISA plate에 항원, 혈청(샘플), anti-swine IgG horseradish peroxidase (HRP), substrate 순으로 처리하였으며 microplate reader를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하여 항체가를 비교하였다.

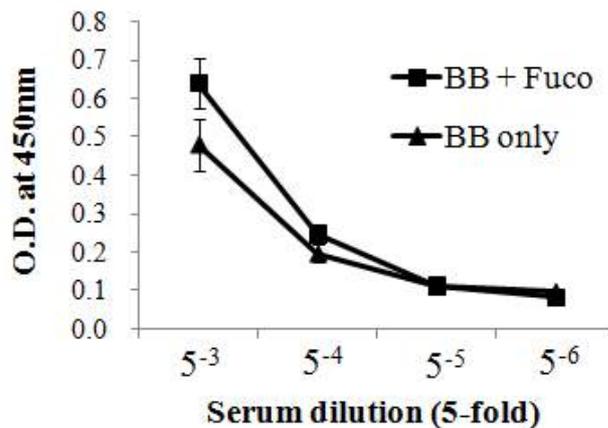


그림 62. 백신후보를 돼지에 접종한 후 혈청 내 항원(*B. bronchiseptica*, BB)특이적인 항체가

▶ 결과

- 혈청 $5^3, 5^4$ 희석농도에서 백신항원 단독군에 비해 백신항원 + 어쥬번트 복합군은 유의한 항원특이적인 항체가 증가를 보였다. 어쥬번트를 첨가함으로써 백신항원의 항체생산능이 증가된 사실을 확인하였다.
- 대조군 혈청은 본 실험에서 사용한 가장 높은 희석배수인 5^3 에서 분석하였으며, 평균 흡광도는 이었다. 이 수치는 다른 백신항원 접종군에 비해 매우 낮아 본 실험에서 비특이반응이 상대적으로 적었음을 알 수 있었다.

○ 돼지 골수세포를 이용한 어쥬번트의 인터페론-감마 생산능 실험

마우스를 이용한 실험에서 효과가 있었던 어쥬번트 후보물질 들을 목적동물인 돼지 골수세포에 실험하였다. 세포성면역에 중요한 인터페론-감마의 생산능을 분석하였다.

▶ 돼지 골수세포의 준비

- 4-6주령의 흰색 piglet (10 kg 전후)
- 안락사 후 사지 절단 (femur 또는 tibia 1개)
- 피부와 살을 발라내고, 뼈의 양끝을 절단하여 빨간색의 골수를 노출시킨다. 대부분의 골수채취과정은 멸균환경에서 실시하였으며, 골수를 scapel로 얇게 긁어내었다. 인산완충액을 넣은 후 vortex를 하여 골수세포를 얻었고 ACK lysis buffer로 적혈구를 제거한 후 사용하였다.

▶ 실험방법

- 골수세포를 계수한 후 배지에 부유시켰다. 실험 전체과정에서 5% 우태아혈청이 포함된 RPMI 1640 배양배지를 사용하였다.
- 96-well culture plate에 200 ul/well씩 넣은 후 시험물질을 농도별로 처리하였다. 이후 4일간 배양한 뒤 얻은 세포배양 상층액을 인터페론-감마의 정량시험에 이용하였다.
- 전반적인 분석과정은 제조사에서 제시한 protocol에 준하여 실험하였다.

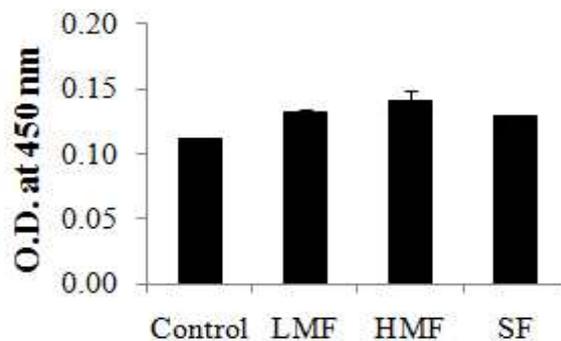
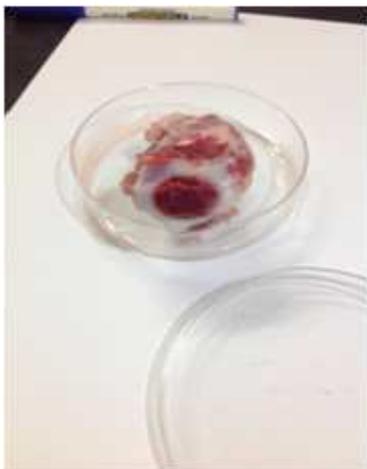


그림 63. 돼지 골수세포 채취(왼쪽)와 fucoidan을 골수세포에 처리하여 인터페론-감마 분석

▶ 결과

- 물질을 처리하지 않은 대조군은 매우 낮은 수치를 보였으며, 전체 fucoidan 처리군에서 인터페론-감마의 생산이 측정되었다.
- 고분자 fucoidan (HMF)은 저분자 fucoidan (LMF)과 Sigma사의 fucoidan (SF)에 비해 더 많은 인터페론-감마를 생산하였다. 따라서 체내에서 HMF는 다른 fucoidan에 비해 세포성면역을 증가시킬 가능성이 높은 것으로 기대된다.

○ 마우스 비장세포를 이용한 어쥬번트 후보물질의 면역자극 효능실험

▶ 연구개요

- Fucoidan은 갈조류에서 추출한 물질로써 식용이 가능한 황화다당체이다. 조혈 촉진작용 과 면역조절작용 등 다양한 생리활성을 나타내며, 주요 면역세포인 대식세포와 B 림프구에 대한 면역자극 효과가 알려져 있다. 기존의 연구에서 면역반응의 중요한 부분인 항원제시를 담당하는 골수유래 수지상세포에 대한 fucoidan의 강한 면역자극 효과가 밝혀진 바 있다.
- 분자량이 서로 다른 fucoidan의 효과에 대한 연구는 시작단계에 있다. 최근의 연구에 따르면 고분자와 저분자 fucoidan은 콜라겐에 유도된 마우스 관절염 모델에서 서로 다른 효과를 나타냈다. 또한 동맥의 이형성 및 자가이식에 대한 연구와 심장 자가이식에 대한 연구에서는 저분자 fucoidan이 neointimal의 증식을 억제한다는 사실을 확인하였다. 하지만 분자량이 서로 다른 fucoidan 들의 면역세포에 대한 효과는 연구가 매우 부족한 실정이다.
- 본 실험에서는 분자량에 따라 분리된 fucoidan을 면역세포에 처리한 후 그 효과를 비교하고자 하였다. 대표적인 면역세포인 비장세포에 저분자 및 고분자 fucoidan을 각각 처리하여 배양한 후 세포의 생존율 및 싸이토카인 생산과 같은 기능적인 변화들을 세포수준에서 비교, 관찰하였다.

▶ 샘플준비

- Low molecular weight fucoidan (LMF, 저분자)와 high molecular weight fucoidan (HMF, 고분자)는 (주)해림후코이단 (완도, 대한민국)에서 제공받아 사용하였다. Fucoidan은 *Undaria pinnatifida sporophylls*로부터 추출하였으며 겔 투과 크로마토그래피 방법으로 분리하였다. 제조사에 따르면 LMF과 HMF의 평균 분자량은 각각 30 kDa and 130 kDa이다. LMF와 HMF의 성분은 $21 \pm 3\%$ fucose, $20 \pm 5\%$ galactose, $2 \pm 2\%$ mannose, $30 \pm 3\%$ sulfate으로 서로 유사하다. *Fucus vesiculosus*에서 추출한 fucoidan은 시그마사 (세인트루이스, 미국)에서 구매하였으며 양성대조군(positive control, PC)으로 사용하였다. 시그마사 fucoidan의 분자량은 20 - 200 kDa이다.
- 모든 fucoidan은 Endosafe[®] (Charles River, Charleston, SC, USA)를 이용한 내독소 검사를 실시하였다. 내독소는 실험에 사용한 fucoidan의 최대농도(50 μ g/ml)에서 0.1 EU/ml이하로 검출되었다.

▶ 연구성과 및 의의

- 분자량이 서로 다른 fucoidan 들이 면역세포의 생존율과 기능에 차별된 효과를 보이는 사실을 확인하였다 (Jang JY et al., 2014). 특히 HMF는 높은 면역증진효과를 보여 본 연구과제에서 개발하려는 신규 어쥬번트의 후보물질이 될 수 있을 것으로 기대된다.
- 본 연구는 논문(SCI journal, IF 3.0)으로 발표되었으며 특허출원되었다.

Jang JY, Moon SY, Joo HG. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. Food Chem Toxicol. 2014, 68, 234-238.

특허출원번호 10-2014-0093298, 발명자 : 주홍구, 장지영, 발명의 명칭 : 후코이단을 함유하는 비장세포의 생존 및 기능 증진 효과를 가진 면역증강용 조성물

○ 마우스 비장세포를 이용한 어쥬번트 후보물질의 면역자극 효능실험

어쥬번트 후보물질 처리에 따른 비장세포의 생존율 변화를 알아보기 위해 MTT assay를 수행했다.

▶ 실험방법

마우스 비장세포의 준비

- 이미 확립된 방법에 따라 비장세포를 분리하였다. 간략히 기술하면, 마우스 비장을 떼어내 물리적으로 분쇄시켜 비장세포를 얻은 후 저삼투압성 용액을 이용하여 적혈구를 용혈시켰다. 40 μ m cell strainer에 통과시켜 단일세포를 분리하였다.

- 비장세포를 배양하기 위해 10% 우태아혈청, 2 mM L-glutamine 등이 첨가된 RPMI 1640배지를 림프구 배양배지로 사용하였다.

▶ 세포의 생존능력 측정

- 비장세포를 2×10^6 cells/ml의 농도로 96-well plates에 200 ul/well씩 넣은 후, 분자량이 서로 다른 fucoidan을 처리하여 3일간 배양하였다. 생존능력을 평가하기 위해 MTT assay를 실시했다.

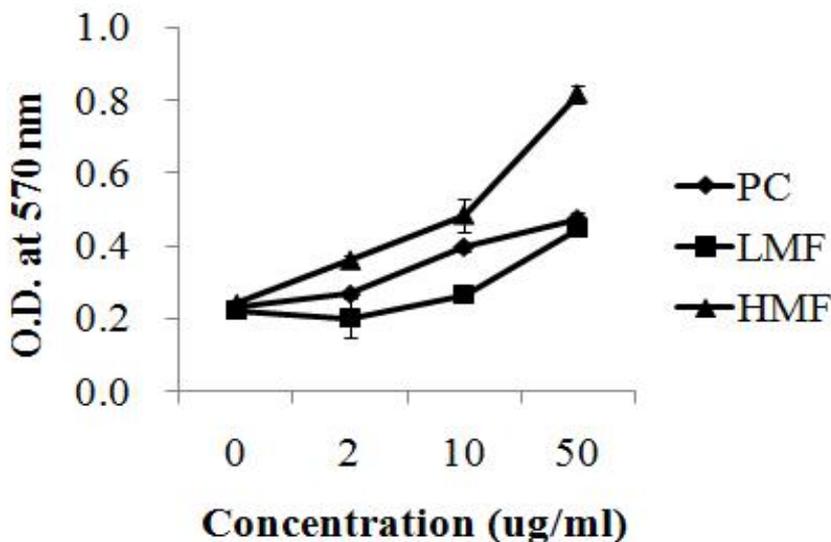


그림 64. 각종 fucoidan의 비장세포 생존율/활성화에 대한 효과. PC는 positive control로서 시그마사의 unfractionated fucoidan, LMF (low molecular weight fucoidan)와 HMF (high molecular weight fucoidan).

▶ 결과

- 모든 fucoidan이 농도의존적으로 비장세포의 활성을 증가시켰다. 특히, HMF는 다른 후코이단과 비교하여 보다 높은 수준의 세포활성 자극효과를 나타내었다.

- 따라서 HMF는 세포자멸사로부터 비장세포를 보호하고 효과적으로 세포분열을 증가시킬 수 있을 것으로 추정된다.

○ 마우스 비장세포를 이용한 어쥬번트 후보물질의 면역자극 효능실험

비장세포의 세포사멸에 대한 어쥬번트 후보물질의 효과를 알아보기 위해 형광염색과 Annexin V/propidium iodide (PI) 염색을 실시한 후 세포를 분석하였다.

▶ 실험방법

핵염색을 통한 apoptotic cells (자멸사세포)분석

- 비장세포의 생존능력에 대한 후코이단의 효과를 알아보기 위하여 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 Hoechst 33342 fluorochrome와 propidium iodide를 이용하여 핵을 염색하였다. 그 후 형광현미경 (Olympus Optical, 도쿄, 일본)을 이용하여 분석하였다. 염색된 세포에서 핵의 색 변화를 관찰할 수 있었으며, 온전한 형태의 푸른색, 흰색, 핑크색의 핵은 각각 생존한 세포, 자멸사한 세포, 괴사된 세포를 나타낸다.

Annexin V/PI 염색 후 유세포분석

- 비장세포를 6-well culture plate에 2×10^6 cells/ml의 농도로 넣은 후 50 $\mu\text{g/ml}$ PC, LMF, HMF 후코이단을 처리한 후 2일간 배양하였다. 세포들은 실험실에 확립된 방식으로 염색하였다. 세포 자멸사와 괴사를 모두 포함하는 세포사를 분석하기 위하여 세포들은annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/propidium iodide (PI) 키트 (Life Technologies, 미국)로 염색하였으며 제조사의 사용법을 따랐다.

- Annexin V는 자멸세포표면의 phosphatidylserine와 특이적으로 결합한다. 미토콘드리아의 세포막전위를 측정하기 위하여 10 $\mu\text{g/ml}$ rhodamine 123 (Sigma)을 처리한 후 30분간 실온에서 배양한 후 FACSCaliber 유세포분석기와 CellQuest software (BD biosciences)를 이용하여 측정하였다.

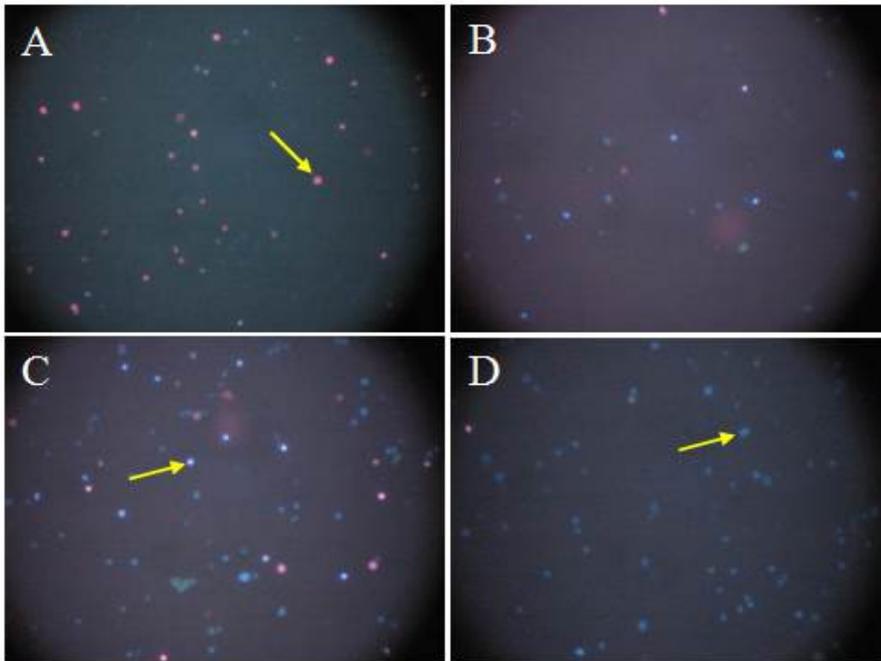


그림 65. 비장세포 생존율에 대한 어쥬번트 후보물질의 효과 분석 (핵염색)

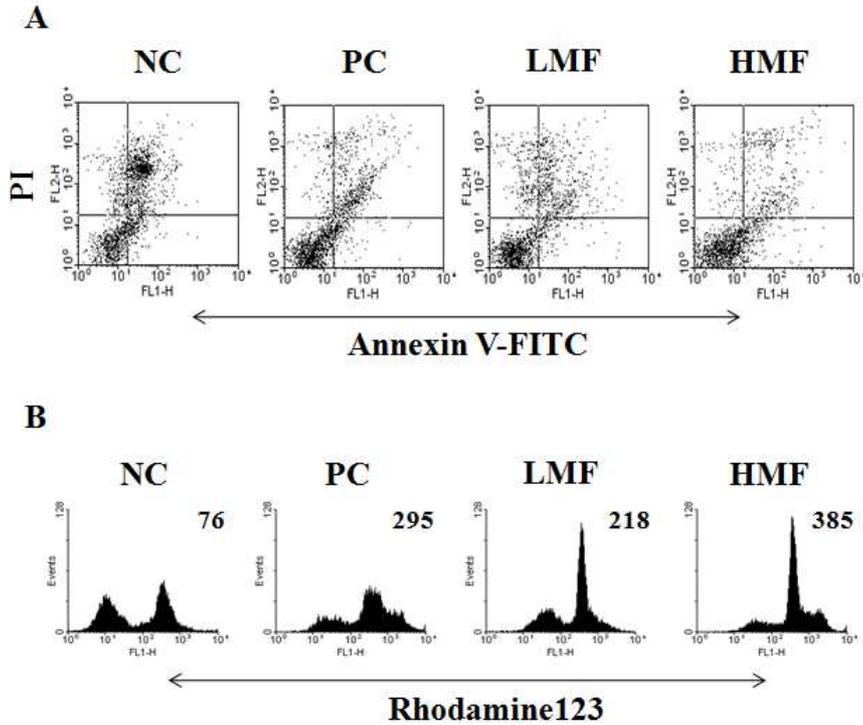


그림 66. A. 사분면 괴사된 세포 (upper left), 후기 세포자멸사된 세포 (upper right), 생존세포 (lower left), 초기 세포자멸사된 세포 (lower right). B. 미토콘드리아 막전위 (수치는 MFI, mean fluorescence intensity)

▶ 결과

- 비장세포 생존능력에 대한 후코이단의 효과

: 형광염색을 통해 비장세포의 염색질(핵)을 분석한 결과, LMF와 HMF는 비장세포의 생존능력에 대해 서로 다른 효과를 나타냈다 (그림 65). 대조군에서는 세포자멸사 또는 세포괴사를 의미하는 핑크색의 핵을 포함한 비장세포가 다수 관찰되었다. PC와 LMF의 처리는 핑크색의 핵을 갖는 비장세포의 수를 감소시켰다. HMF를 처리한 비장세포에서는 생존세포를 의미하는 푸른색을 띠는 핵을 포함한 세포가 다수 관찰되었다.

- 비장세포 사멸에 대한 후코이단의 효과

: 생체 내에서는 비장세포를 보호하고 분열을 촉진하는 사이토카인이 분비된다. 하지만 획득된 비장세포에는 부족하게 되므로 점차 세포자멸사가 진행된다. PC로 처리된 비장세포에서는 후기 세포자멸사가 증가한 반면, LMF가 처리된 경우 괴사 세포 수가 증가하였다. 하지만 HMF가 처리된 비장세포에서는 생존세포의 비율이 매우 높게 관찰되었다. 미토콘드리아는 세포사에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어 rhodamine123으로 세포를 염색하여 관찰하였다. 세포괴사 또는 세포자멸사가 진행되고 있는 세포의 미토콘드리아 막의 전위는 생존세포보다 낮게 유지된다. HMF가 처리된 세포에서 미토콘드리아 막전위가 현저히 증가하여 가장 효과적인 세포 보호효과가 있음을 알 수 있었다.

○ 마우스 비장세포를 이용한 어쥬번트 후보물질의 면역자극 효능실험

인터페론-감마와 nitric oxide (NO)는 선천 및 후천면역에 있어 중요한 효과물질로서, 어쥬번트 후보물질의 면역자극 효능을 측정하기 위해 분석하였다.

▶ 실험방법

인터페론-감마 (IFN- γ) 생산량 측정

- 부착세포가 포함된 비장세포를 96-well culture plates에 4×10^6 cells/ml 농도로 넣고 fucoidan 들을 각각 50 μ g/ml 농도로 처리한 후 4일간 배양하였다. CytoSet™ antibody pairs (Life Technologies)를 이용한 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 통하여 상층액의 싸이토카인 농도를 측정하였다.

NO 생산량 측정

- 세포배양 상층액의 NO농도를 측정하기 위해 Griess reagent (Sigma)를 사용하였다. 비장세포는 4×10^6 cells/ml의 농도로 배양하였으며, 각각 50 μ g/ml농도의 PC, LMF, HMF 을 처리하였다. 4일 동안 배양한 후 상층액을 NO생산량 측정에 사용하였다.

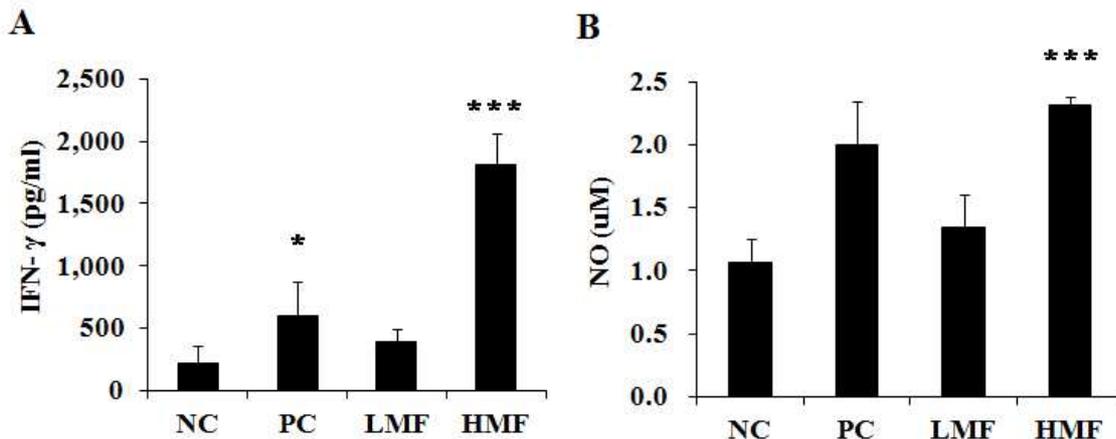


그림 67. 비장세포의 인터페론-감마와 NO의 생산능에 대한 fucoidan의 효과.

▶ 결과

- 서로 다른 분자량의 fucoidan 처리는 IFN- γ 생성에 있어 서로 다른 효과를 나타냈다. PC와 HMF는 IFN- γ 수준을 증가시켰으며, 특히 HMF는 PC에 비해 2배가 넘는 효과를 나타냈다. 즉, fucoidan은 분자량에 따라 비장세포의 필수 면역싸이토카인 생성을 증가시키는데 있어 차별화된 효과를 나타내었다.

- NO는 대식세포와 수지상세포와 같은 항원제시세포에서 내부에 있는 병원체를 사멸시키는 등 세포성면역과 밀접한 관련이 있다. IFN-와 같은 면역자극은 항원제시세포의 NO생성을 증가시킨다. HMF는 NO생성을 높은 수준으로 증가시켰다. 따라서, HMF는 비장세포에서 세포성면역에서 중요한 역할을 하는 NO의 생성을 촉진하는 강력한 면역자극물질로 작용하는 사실을 확인했다.

○ 마우스 수지상세포를 이용한 어쥬번트 후보물질, G-Rp1의 면역자극 효능실험

▶ 개요

- 인삼은 예로부터 동북아시아에서 건강식품으로 사용되어왔다. 다양한 효능의 ginsenoside가 함유되어있으며, 최근 각 성분의 효능 연구가 이루어지고 있다.
- 그중 ginsenoside (G)-Rp1은 항암효과와 항염증효과를 갖고 있는 것으로 알려졌으며, 특히 암에서 항전이효과와 암세포의 성장정지 및 세포자멸사 유도가 밝혀졌다. G-Rp1의 면역세포에 대한 효과는 매우 제한적으로 연구되어왔는데, 본 연구에서는 항원제시기능이 있으며 면역중심세포인 수지상세포에 G-Rp1을 처리하여 각종 면역기능에 대한 영향을 분석하고자 한다.

▶ 실험방법

마우스 수지상세포, 비장세포의 준비

- 이미 확립된 방법에 따라 골수세포를 분리한 후 배양하였다. 간략히 기술하면, 마우스의 femur와 tibia를 적출해 골수세포를 얻고, GM-CSF를 10 ng/ml의 농도로 처리한 후 6-10일간 배양한다.
- 비장을 분리한 후 앞서 제시된 방법에 따라 비장세포를 분리한 후 배양하였다.

세포의 생존율 측정 및 기타 실험방법

- 세포의 생존율과 활성도를 측정하기 위해 MTT assay를 이용하였다. G-Rp1을 수지상세포에 처리한 후 NO의 생산능을 검정하였으며, 유세포분석을 통해 몇 가지 표면마커의 발현정도를 분석했다.
- G-Rp1을 처리한 수지상세포의 항원제시능 비교를 위해 mixed lymphocyte reaction (MLR, 혼합백혈구반응)을 실시했다. 간략히 설명하면, Balb/c 마우스의 비장세포를 채취하여 allogeneic 림프구로 사용하였고, C57BL/6 마우스의 골수세포유래 수지상세포와 함께 배양하였다. 이후 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 용액을 넣고 microplate reader를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

▶ 연구성과 및 의의

- 인삼의 유효성분 중 G-Rp1을 수지상세포에 처리하여 일정한 농도범위에서 면역싸이토카인의 일종인 IL-12의 생산을 증진시키고, 항원제시능을 증가시키는 사실을 확인했다. 따라서 항암제와 함께 투여하는 용도를 포함하여 면역증진제로서 개발이 기대된다.
- 본 연구는 논문(SCI journal, IF 2.5)에 submit 중임.

Moon SY, Joo HG. Ginsenoside-Rp1 activates the function of dendritic cells *via* up-regulating the production of interleukin-12 and antigen-presenting capability. *In submit.*

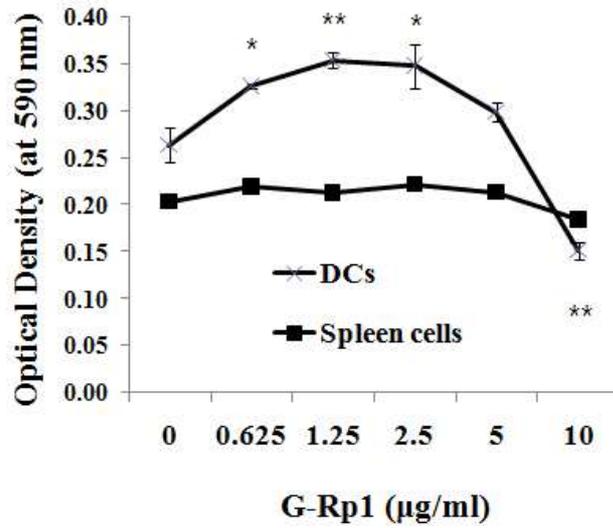


그림 68. 수지상세포와 비장세포에 차별되는 G-Rp1의 효과.

▶ 결과

- G-Rp1은 비장세포에 전반적으로 활성을 떨어뜨린 반면, 수지상세포에서는 0.625-2.5 µg/ml의 농도범위에서 세포활성을 상승시켰다.

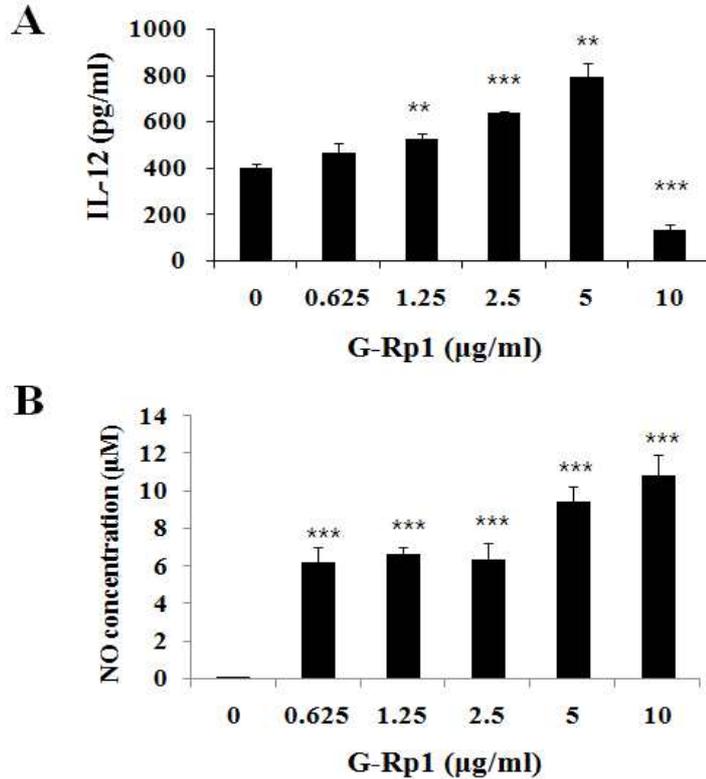


그림 69. 수지상세포의 IL-12와 NO 생산에 대한 G-Rp1의 증진효과

▶ 결과

- G-Rp1은 1.25-5 ug/ml의 농도범위에서 핵심 면역사이토카인의 일종인 IL-12의 생산을 증진시켰다. 또한 전반적으로 세포성면역의 주요 인자인 NO의 생산을 증진시켰다.

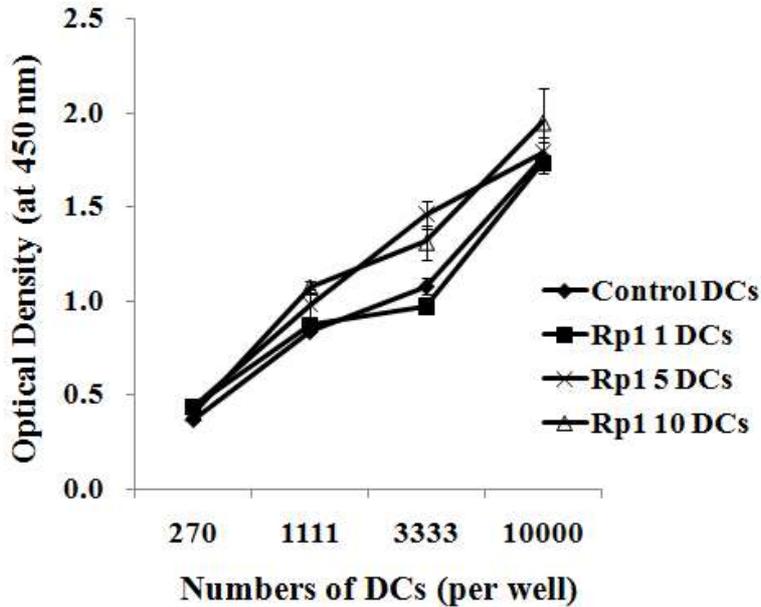


그림 70. 수지상세포의 항원제시능에 대한 G-Rp1의 증진효과

▶ 결과

- G-Rp1은 5와 10 ug/ml의 농도에서 수지상세포의 항원제시능을 증가시켰다.

연구결과의 중요성

- G-Rp1은 면역계의 주요세포인 수지상세포와 비장세포에 서로 다른 효과를 보였다. 비장세포에는 전반적으로 세포활성을 떨어뜨린 반면, 수지상세포에서는 일정농도에서 오히려 세포활성을 증진시켰다.

- 또한 G-Rp1은 비슷한 농도에서 면역계의 핵심 사이토카인인 IL-12과 NO의 생산을 증진시켰다. 이는 G-Rp1이 수지상세포에서 생존을뿐만 아니라 기능면에서도 증진효과가 있음을 의미한다.

- G-Rp1은 항암제와 항염증제로서 사용될 수 있는 후보물질이다. 본 연구를 통해 수지상세포와 같은 특정 면역세포의 활성을 높임으로써 항암제와 G-Rp1을 복합사용해 항암효과와 면역기능을 증진시킬 수 있는 새로운 치료법의 개발이 기대된다.

○ 어쥬번트 후보물질로서 *B. bronchiseptica* 항원의 면역자극 효능실험

▶ 연구개요

- *Mycoplasma hyopneumonia* (*M. hyopneumonia*)는 산업현장에서 돼지의 주요한 생산손실을 일으키고 있는 만성 호흡기질환인 enzootic pneumonia의 원인균이다. *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*)는 돼지에서 atropic rhinitis를 일으키는 주된 원인체 중 하나이다. 이로 인해 돼지 농가에서는 증체율 감소와 성장률 저하로 인한 막대한 경제적 손실을 입고 있다. 골수는 B cell의 생산과 분화가 이루어지는 장소이다. 항원을 인식한 B cell은 여러 단계의 활성화 과정을 거쳐 memory B cell로 분화된다. 또한 항체를 생산하는 plasma cell이 되며, 이들이 분비하는 항체는 면역체계에서 중요한 역할을 수행한다.
- 이전의 연구에서, *M. hyopneumonia*의 면역원성은 낮게 나타났다. 따라서 *M. hyopneumonia* 백신 제작 과정에서 독성이 제거된 *M. hyopneumonia* 항원 이외에 면역원성을 증가시킬 수 있는 어쥬번트 조합에 대한 연구가 좀 더 필요하였다. 또한 이전의 다른 연구에서, *B. bronchiseptica*은 어쥬번트 없이 단독으로도 면역세포에 대한 증식유도와 사이토카인 생산량이 높게 형성되었다. 따라서 단독으로만 백신을 제작해도 효능을 나타낼 수 있을 것으로 기대되었다.
- 본 실험에서는 *M. hyopneumonia*를 면역세포에 처리한 후, 저농도의 *B. bronchiseptica*를 처리하여 *B. bronchiseptica*의 어쥬번트 능력을 알아보려고 하였다. 대표적인 면역세포인 골수세포에 농도별로 *M. hyopneumonia*를 처리하고, 일정 농도의 *B. bronchiseptica*를 처리하여 배양한 후 세포의 생존율 및 immunoglobulin G (IgG) 생산과 같은 기능적인 변화들을 세포수준에서 비교, 관찰하였다.

▶ 백신항원 준비

- *M. hyopneumonia*는 (주)중앙백신연구소에서, *B. bronchiseptica*는 (주)고려비엔피에서 제공받아 사용하였다. 이들은 bovine serum albumin (BSA)을 standard로 하여 단백질정량을 한 후 실험에 사용하였다.

▶ 연구성과 및 의의

- 별도의 인공적인 어쥬번트 대신 *B. bronchiseptica* 항원을 이용하여 *M. hyopneumonia* 항원에 대한 면역원성을 증가시키는 효과를 확인하였다. 특히 B cell immunity와 관련된 IgG 생산량이 증가하는 효과를 확인하였다. 따라서 *B. bronchiseptica* 항원은 백신항원으로서 기능 뿐만 아니라 본 연구과제에서 개발하려는 신규 어쥬번트의 후보물질이 될 수 있을 것으로 기대되며, 마이코플라스마와 위축성비염을 동시에 예방할 수 있는 신규백신의 개발 가능성을 보여주고 있다.

○ 마우스 골수세포를 이용한 *B. bronchiseptica* 항원의 면역자극 효능실험

B. bronchiseptica 항원과 *M. hyopneumoniae* 항원의 처리에 따른 골수세포의 생존을 변화를 알아보기 위해 MTT assay를 수행했다.

▶ 실험방법

마우스 골수세포의 준비

- 이미 확립된 방법에 따라 골수세포를 분리하였다. 간략히 기술하면, 마우스 후지의 장골을 떼어내 골수강을 씻어내어 골수세포를 얻은 후 저삼투압성 용액을 이용하여 적혈구를 용혈시켰다. 40 μ m cell strainer에 통과시켜 단일세포를 분리하였다.
- 골수세포를 배양하기 위해 5% 우태아혈청 등이 첨가된 RPMI 1640배지를 사용하였다.

접종된 마우스 혈청의 준비

- 이미 확립된 방법에 따라 혈청을 분리하였다. 간략히 기술하면 2주 간격으로 2번 항원을 접종하고 마우스 심장을 천자하여 혈액을 얻은 후 혈병을 제거하고 혈청을 분리하였다.

세포의 생존능력 측정

- 골수세포를 1×10^6 cells/ml의 농도로 96-well plates에 200 ul/well씩 넣은 후, *M. hyopneumoniae* 항원과 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 4일간 배양하였다. 생존능력을 평가하기 위해 MTT assay를 실시했다.

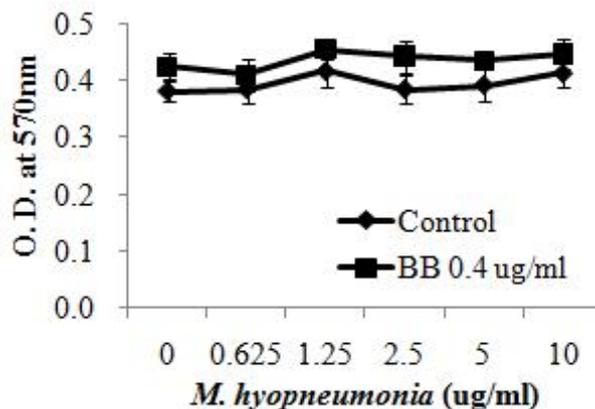


그림 71. *M. hyopneumoniae* 항원의 농도에 따른 *B. bronchiseptica* (BB) 항원의 골수세포 생존율/활성화에 대한 효과.

▶ 결과

- *B. bronchiseptica* 항원에 의해 생존율/활성화 정도는 약간 증가하였으나, 유의적인 차이는 없었다. 따라서 *B. bronchiseptica* 항원은 골수세포의 생존율/활성화에 별다른 영향을 미치지 않는다. 또한 *M. hyopneumoniae* 항원도 농도증가에 따른 영향은 보이지 않았다.

NO 생산량 측정

- 세포배양 상층액의 NO농도를 측정하기 위해 NO detection kit (iNtRON)를 사용하였다. 골수세포는 1×10^6 cells/ml의 농도로 96-well plates에 200 ul/well씩 넣은 후, *M. hyopneumonia* 항원과 *B. bronchiseptica* 항원을 처리하여 3일간 배양하였다. 이후 상층액을 NO생산량 측정에 사용하였다.

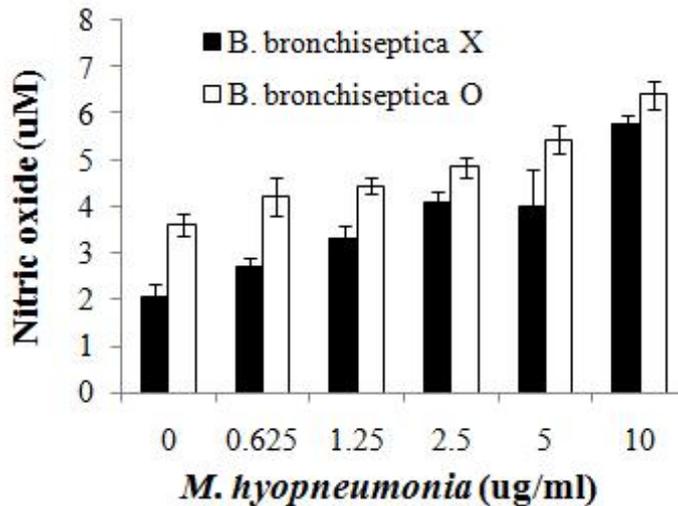


그림 72. 골수세포의 NO의 생산능에 대한 *B. bronchiseptica* 항원과 *M. hyopneumoniae* 항원의 효과.

▶ 결과

- NO는 대식세포와 수지상세포와 같은 항원제시세포에서 내부에 있는 병원체를 사멸시키는 등 세포성면역과 밀접한 관련이 있다. *B. bronchiseptica* 항원은 낮은 농도에서, *M. hyopneumoniae* 항원은 높은 농도에서 NO생성을 증가시켰다.

접종된 마우스 혈청의 준비

- 마우스는 PBS, *M. hyopneumonia*, *B. bronchiseptica*, *M. hyopneumoina* + *B. bronchiseptica*를 접종한 4 그룹으로 나누어 실험에 사용하였다. 2주 간격으로 2회 접종하였으며, 매 회마다 *M. hyopneumonia*는 마리당 10 ug이, *B. bronchiseptica*는 마리당 5 ug이 접종되었다. 두 번째 접종을 한지 2주 뒤에 이미 확립된 방법에 따라 혈청을 분리하였다. 간략히 기술하면 마우스 심장을 천자하여 혈액을 얻은 후 혈병을 제거하고 혈청을 분리하였다.

IgG 생산량 측정

- *B. bronchiseptica* 항원과 *M. hyopneumoniae* 항원을 접종한 마우스의 혈청 내 IgG 농도를 측정하기 위해 ELISA 기법을 이용하였다. 항원특이적인 항체의 생산량을 알아보기 위해 각각 *M. hyopneumonia* 항원(A)과 *B. bronchiseptica* 항원(B)을 각각 coating하여 실험을 진행하였다.

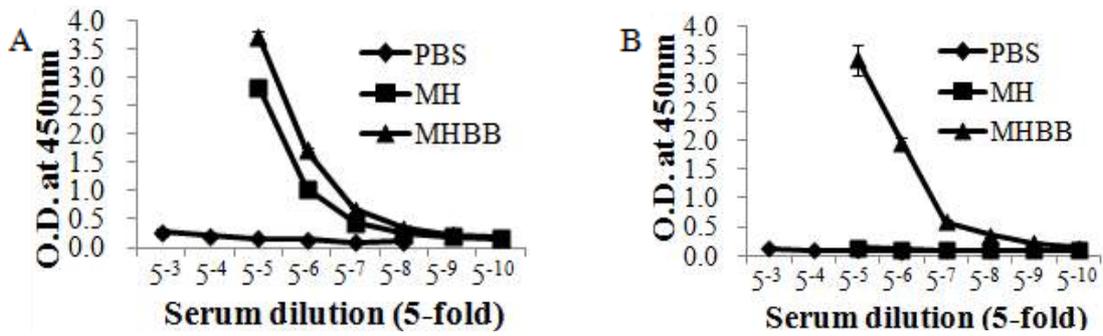


그림 73. A. *M. hyopneumonia* 특이적인 항체 생산량 비교. B. *B. bronchiseptica* 특이적인 항체 생산량 비교.

▶ 결과

- *M. hyopneumonia* 항원과 *B. bronchiseptica* 항원을 함께 접종한 경우, *M. hyopneumonia* 항원을 단독으로 접종한 경우에 비해 *M. hyopneumonia* 특이적인 항체 생산이 증가하였다. 따라서 *B. bronchiseptica* 항원은 B cell immunity를 증가시켜 *M. hyopneumonia* 항원에 대한 체액성 면역을 촉진한 것으로 추정된다.

[1협동]

1. 실험방법

○ 살모넬라균 OmpA 기반 이중항원 함유 재조합 플라스미드 및 살모넬라 변이주 구축
가. 사용균주

본 실험에 사용된 균주와 플라스미드는 아래의 표와 같다. 돼지 위축성 비염의 원인균인 *Bordetella bronchiseptica* 균주를 사용하여 국내에서 가장 많이 분리되고 있는 두 가지 pertactin type(1-3a/2-7a, 1-3a/2-8b)의 균주를 사용하였으며, 마이코플라즈마성 폐렴의 원인균인 *Mycoplasma hyopneumoniae* 균주를 사용하였다. 이중항원 함유 재조합 플라스미드는 pJYTH01 vector를 사용하였으며, 살모넬라 운반체는 *Salmonella* Enteritidis Δ aroA Δ ompA 변이주인 IVK B01M121을 제작하여 사용하였다.

표 23. 본 연구에서 사용된 균주 및 플라스미드

Strain/plasmid	Description	Source
Strain		
<i>E. coli</i>		
DH5a	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1</i> <i>hsdR17</i> (r _k ⁻ ,m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96rel A1</i> λ ⁻	Lab stock
BL21(DE3)	<i>E.coli</i> BF ⁻ <i>dcmompThsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>galA</i> (DE3)	Lab stock
IVK B03M027	BL21 with pET-P1	This study
IVK B03M028	BL21 with pET-aP2	This study
IVK B03M029	BL21 with pET-bP2	This study
IVK B03M024	DH5a with pJYTH-P1aP2	This study
IVK B03M025	DH5a with pJYTH-P1bP2	This study
IVK B03M026	DH5a with pJYTH-R1R2	This study
<i>Salmonella</i> Enteritidis		
IVK B01501	<i>Salmonella</i> Enteritidis wild type	Lab stock
IVK B01M120	<i>Salmonella</i> Enteritidis Δ aroA	This study
IVK B01M121	<i>Salmonella</i> Enteritidis Δ aroA Δ ompA	This study
IVK B01M122	IVK B01M121 with pJYTH01	This study
IVK B01M123	IVK B01M121 with pJYTH-P1aP2	This study
IVK B01M124	IVK B01M121 with pJYTH-P1bP2	This study
IVK B01M125	IVK B01M121 with pJYTH-R1R2	This study
<i>Bordetella bronchiseptica</i>		
IVK B04135	<i>Bordetella bronchiseptica</i> wild type(Pertactin type(1-3a/2-7a))	Lab stock
IVK B04137	<i>Bordetella bronchiseptica</i> wild type(Pertactin type(1-3a/2-7b))	Lab stock
<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>		
IVK B00022	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> wild type	Lab stock
Plasmid		
pJYTH01	In vivo inducible vector containing <i>Salmonella</i> promoter <i>S</i> seg gene	This study
pET-28a	IPTG-inducible expression vector; Km ^r	Novagen

나. Polymerase chain reaction(PCR)

*B. bronchiseptica*의 DNA를 추출하여 두 가지 pertactin type(1-3a/2-7a, 1-3a/2-8b)의 면역

우세 epitope P1과 aP2, bP2 유전자를 각각 증폭하였으며. *M. hyopneumoniae*는 adhesin P97R1, R2 유전자를 증폭하였다. 본 실험에 사용된 프라이머는 아래의 표와 같다. PCR solution은 각각의 50-200ng DNA 1 μ l, 10X buffer 5 μ l[50% Glycerol, 100mM KCl, 1mM DTT, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% Tween 20, 20mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM PMSF], 10mM dNTP mix, 10pM primers, SolgTM *Pfu*-X(2.5U/ μ l), 10% DMSO로 총 50 μ l의 혼합액을 사용하였다. PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 4분 initial denaturing 한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 52 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분 45초로 30번 반복하여 72 $^{\circ}$ C에서 8분 extension 하였다.

표 24. 본 연구에서 사용된 PCR primer.

Primer	Sequence (5'-3')	Size(bp)	Enzyme site
P1 Pertactin	P1_F ACC <u>TCTAGAC</u> CAGCGCGCGACGATACGG	150	<i>Xba</i> I
	P1_R AAT <u>CCGCGG</u> CTGAGCGAGGTCCACGGT		<i>Sac</i> II
	P2_F ATAGAGCTC <u>G</u> GCGCGAAGGCGCCGCCG	170	<i>Sac</i> I
	P2_R ATT <u>GCGGCCGC</u> GCGCGCGGACAACCTCCCT		<i>Not</i> I
R1 P97	R1_F CGC <u>TCTAGAG</u> GGGATCCCTACAAAAGAA	279	<i>Xba</i> I
	R1_R GCA <u>CCGCGG</u> GTTAGTAGCAACTGGTTTTGC		<i>Sac</i> II
	R2_F CTC <u>GAGCTC</u> GGAAGGAACCTAACCAA	137	<i>Sac</i> I
	R2_R GAT <u>GCGGCCGC</u> GGTAGTTGGGCTTTGTTG		<i>Not</i> I

다. 재조합 항원을 발현하는 *E. coli* 구축

PCR을 통해 증폭된 각각의 유전자와 arabinose 유도성 과발현 플라스미드 pGEYH01(5,087 bp) DNA를 제한효소를 동시 처리하여 insert와 vector를 준비하였다. 그 방법은 다음과 같다. 각각의 2-400ng/ μ l DNA, 10X digestion buffer 2 μ l, 1st enzyme 1 μ l, 2nd enzyme 1 μ l, ddWater를 넣어 총 20 μ l의 혼합액을 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 반응하였다. 목적하는 insert와 vector를 T4 DNA ligase(NEB, UK)와 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 반응한 뒤 *E. coli* DH5a competent cell과 혼합하여 micropulser electroporator(Bio-Rad, USA)를 이용하여 2,500V로 전기충격을 가하였다. 그 다음 1ml Luria-Bertani(LB; Difco, USA) broth에 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양한 뒤 100ug/ml의 ampicillin이 포함된 LB(Difco) plate에 배양액 100 μ l를 도말하였다. Plate는 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 동안 배양한 후 생성된 colony를 선별하여 실험에 사용하였다.

라. Sequencing analysis

Double digestion을 통해 확인된 형질전환체를 선별하여 염기서열 데이터 분석(Cosmo GeneTech, Korea)을 의뢰한 결과 P1aP2, P1bP2, R1R2 유전자가 pJYTH01 벡터에 삽입된 것을 확인하였으며, 각 유전자의 염기서열 또한 NCBI database와 99% 이상 일치하였다.

마. 방어항원을 발현하는 재조합 살모넬라 변이주의 구축

염기서열 분석을 통해 확인된 pJYTH-P1aP2, pJYTH-P1bP2, pJYTH-R1R2 plasmid DNA를

추출하여 위와 동일한 방법으로 micropulser electroporator(Bio-Rad)를 이용하여 SE mutant($\Delta aroA\Delta ompA$) competent cell 내로 integration을 실시하였다. 준비된 SE mutant($\Delta aroA\Delta ompA$) competent cell을 0.2 cm cuvette에 넣고 각 플라스미드 0.1ug과 섞은 후 Bio-Rad micropulser (Bio-Rad)의 Ec2에 따라 전기충격을 가하였다. 그 다음 1ml Luria-Bertani(LB; Difco, USA) broth와 혼합하여 15ml round tube로 옮겨 37°C에서 1시간 동안 배양한 뒤 100ug/ml의 ampicillin이 포함된 LB(Difco) plate에 배양액 100 μ l를 도말하였다. 37°C에서 16시간 동안 배양 후 생성된 colony를 선별하여 SE의 DNA를 추출한 뒤 염기서열 분석(CosmogeneTech)을 통해 이중항원 함유 재조합 살모넬라 변이주를 최종 확인하였다.

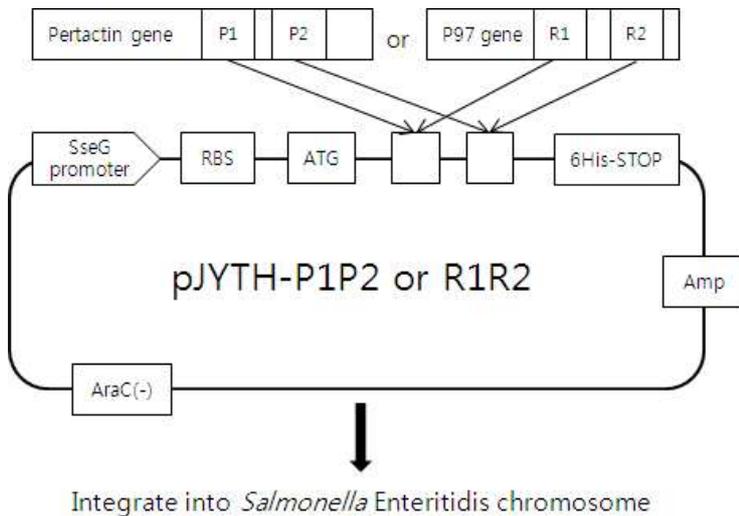


그림 74. 이중항원을 발현하는 재조합 살모넬라 변이주의 모식도

바. 실험동물 및 접종방법

실험동물은 6주령의 BALB/c 암컷 마우스(Orientbio, Korea)를 이용하였다. 모든 마우스는 IVC Rack(MVCS; Threshine, Korea)에서 사육하였으며, 실험동물의 윤리적 사용을 위해 3R 원칙에 따라 동물실험을 수행하였다. 또한, 모든 실험은 국립강원대학교의 동물실험윤리위원회 규정하에서 국내법에 따라 실시하였다(허가번호 KW-140416-2). 한 군당 5마리의 마우스를 사용하였으며, 각각의 방어항원을 발현하는 약독화 살모넬라 변이주를 마우스 경구 및 비강으로 접종하였다. 접종 4시간 전부터는 급수와 급식을 중단하였다. 경구 투여는 마우스 1마리당 PBS에 희석한 접종액 100 μ l(1×10^9 CFU)를 zonde로 접종하였고, 비강투여는 마우스 1마리당 PBS로 희석한 균액 20 μ l(1×10^5 CFU)를 pipet으로 투여하였다. 대조군은 PBS만을 동일한 양으로 투여하였다.

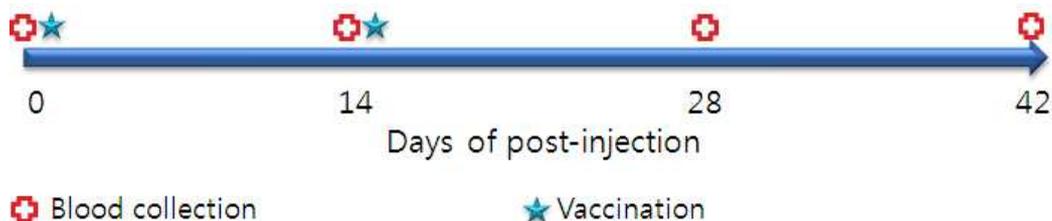


그림 75. 백신 접종에 따른 마우스에서 면역원성 평가 일정표

사. ELISA

재조합 살모넬라 변이주의 마우스 접종에 따른 체액성 면역 및 점막면역 유도 효과를 비교하기 위하여 indirect ELISA를 실시하였다. ELISA에 이용된 항원은 80도에서 15분간 열처리한 약독화 살모넬라 변이주(Δ aroA Δ ompA)의 whole cell(1×10^{10} CFU/ml)을 이용하였다. MaxiSorp 96well plate(Nunc, Denmark)에 SE whole cell을 0.05M sodium bicarbonate buffer(pH 9.4)에 1:200으로 희석하여 각 well당 100 μ l씩 분주한 뒤 4°C에서 16~24시간 동안 코팅한 후, PBS-T(0.05% Tween 20/PBS)로 3번 세척하였다. 1% BSA/PBS를 각각의 well에 100 μ l씩 분주한 후 37°C에서 2시간 동안 blocking하고 PBS-T로 3번 세척하였다. 마우스 혈청 및 분변 시료를 0.1% BSA/PBS로 계단 희석하여 37°C에서 2시간 동안 반응한 뒤 PBS-T로 3번 세척하였다. 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase(HRP) conjugate(SouthernBio, USA)와 goat anti-mouse IgA HRP conjugate(SouthernBio)를 각각 PBS-T에 희석하여 100 μ l/well씩 첨가한 후 37°C에서 1시간 동안 반응하였다. 기질로는 tetramethyl-benzidine(TMB, Surmodics, USA)을 100 μ l/well씩 첨가하여 실온에서 암반응 후, 2N H₂SO₄를 100 μ l/well씩 첨가하여 반응을 중단하였다. 450 nm 파장에서 흡광도(OD)를 측정하였으며, 양성판정에 대한 기준은 OD 0.1보다 큰 값을 역가로 산출하였다. 통계적 해석은 one way ANOVA를 이용하였으며, ELISA 결과는 p value < 0.05인 경우 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 유의성이 인정되는 경우, Dunnett의 다중비교검정을 추가적으로 실시하여 군 간의 차이를 비교하였다.

2. 연구결과

○살모넬라균 OmpA 기반 이중항원 함유 재조합 플라스미드 및 살모넬라 변이주 구축
가. 이중항원을 발현하는 운반체로 사용할 약독화 살모넬라 변이주 구축

S. Enteritidis IVK B01501를 대상으로 λ -red recombinase system을 이용하여 *aroA* 유전자가 제거된 약독화 살모넬라 변이주를 제작하였으며, 같은 방법으로 *ompA* 유전자를 추가로 제거하여 SE (Δ aroA Δ ompA) double mutant를 제작하였으며, IVK B01M121로 명명함. 항 후 lon protease와 *ompT*를 추가로 제거한다면 살모넬라 운반체로 사용하기 위해 과발현된 이중항원의 분해 가능성을 배제할 수 있을 것으로 사료됨.

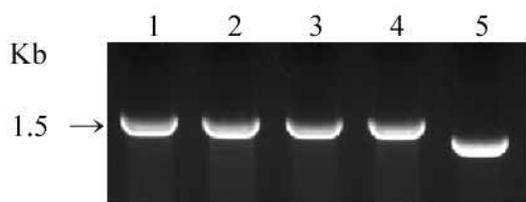


그림 76. SE *aroA*::KM cassette PCR 결과. Lane 1~4, *aroA*::KM cassette gene; 5, *aroA* gene.

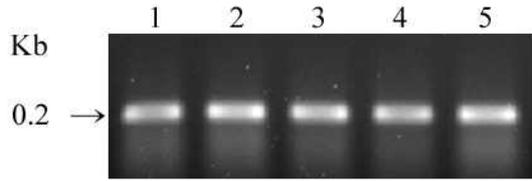


그림 77. SE *aroA* 삭제 변이주의 colony PCR 확인

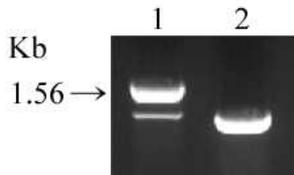


그림 78. SE *ompA::KM* cassette PCR 결과. Lane 1, *ompA::KM* cassette gene; 2, *ompA* gene.

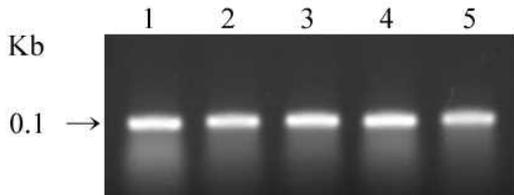


그림 79. SE *aroAompA* 삭제 변이주의 colony PCR 확인.

나. 목적 항원의 유전자 증폭

B. bronchiseptica P1, aP2, bP2 그리고 *M. hyopneumoniae* adhesin P97R1, R2 유전자는 long PCR을 사용하여 증폭하였으며, 사용된 프라이머는 아래의 표와 같다. PCR solution은 각각의 50-200ng DNA 1 μ l, 10X buffer 5 μ l[50% Glycerol, 100mM KCl, 1mM DTT, 0.5% Nonidet P-40, 0.5% Tween 20, 20mM Tris-HCl(pH 8.0), 1mM PMSF], 10mM dNTP mix, 10pM primers, SolgTM *Pfu*-X(2.5U/ μ l), 10% DMSO로 총 50 μ l의 혼합액을 사용하였다. PCR 반응조건은 94 $^{\circ}$ C에서 4분 initial denaturing 한 후, 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 52 $^{\circ}$ C에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 2분 45초로 30번 반복하여 72 $^{\circ}$ C에서 8분 extension 하였다.

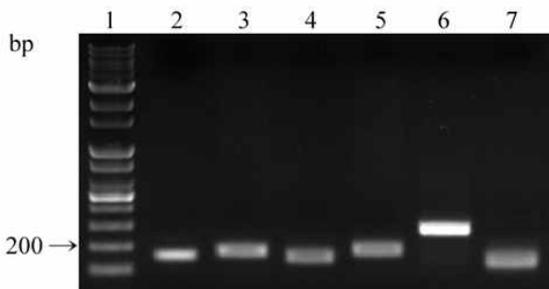


그림 80. *B. bronchiseptica* Pertactin P1, P2와 *M. hyopneumoniae* P97R1, R2의 PCR 증폭 결과. Lane 1, 1Kb DNA Ladder; 2, PRNaP1; 3, PRNaP2; 4, PRNbP1; 5, PRNbP2; 6, P97R1; 7,

P97R2.

다. 재조합 항원을 발현하는 *E. coli* 구축

PCR을 통해 증폭된 각각의 유전자와 arabinose 유도성 과발현 플라스미드 pGEYH01(5,087 bp) DNA를 제한효소를 동시 처리하여 insert와 vector를 준비하였다. 그 방법은 다음과 같다. 각각의 2-400ng/μl DNA, 10X digestion buffer 2μl, 1st enzyme 1μl, 2nd enzyme 1μl, ddWater를 넣어 총 20μl의 혼합액을 37°C에서 2시간 동안 반응하였다. 목적하는 insert와 vector를 T4 DNA ligase(NEB, UK)와 혼합하여 37°C에서 30분 동안 반응한 뒤 *E. coli* DH5a competent cell과 혼합하여 micropulser electroporator(BIO-RAD, USA)를 이용하여 2,500V로 전기충격을 가하였다. 그 다음 1ml Luria-Bertani(LB; Difco, USA) broth에 넣어 37°C에서 1시간 동안 배양한 뒤 100ug/ml의 ampicillin이 포함된 LB(Difco) plate에 배양액 100μl를 도말하였다. 37°C에서 16시간 동안 배양 후 생성된 colony를 무작위로 선별하여 실험에 사용하였다.

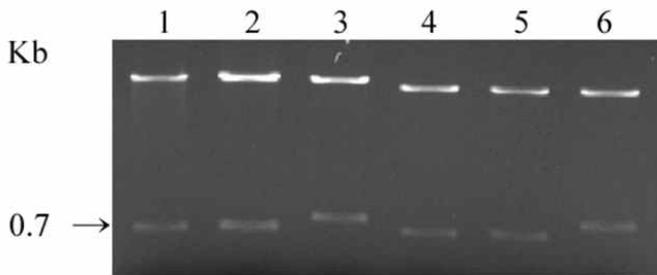


그림 81. 제한효소 *Xba* I과 *Sac* I를 이용한 재조합 플라스미드 확인. Lane 1, pGEYH-P1aP2; 2, pGEYH-P1bP2; 3, pGEYH-R1R2; 4, pJYTH-P1aP2; 5, pJYTH-P1bP2; 6, pJYTH-R1R2.

라. Sequencing analysis

Double digestion을 통해 확인된 형질전환체를 선별하여 염기서열 데이터 분석(Cosmo GeneTech, Korea)을 의뢰한 결과 P1aP2, P1bP2, R1R2 유전자가 pJYTH01 벡터에 삽입된 것을 확인하였으며, 각 유전자의 염기서열 또한 NCBI database와 99% 이상 일치하였다.

마. 재조합 살모넬라 변이주의 방어항원 발현 및 정제

각 후보 항원을 발현하는 pJYTH-P1aP2, pJYTH-P1bP2, pJYTH-R1R2 플라스미드를 약독화된 살모넬라 변이주(SE) 내로 형질전환시킨 후 항원의 발현 및 분비 여부를 SDS-PAGE와 western blot을 통해 확인하였다. 그 결과, 모든 재조합 살모넬라 변이주에서 목적 항원의 발현이 잘 이루어졌으며, anti-His antibody를 이용한 western blot에서도 목적 항원의 뚜렷한 밴드를 확인하였다. (rP1aP2=49.2 kDa, rP1bP2=49.2 kDa, rP1aP2=52.7 kDa)

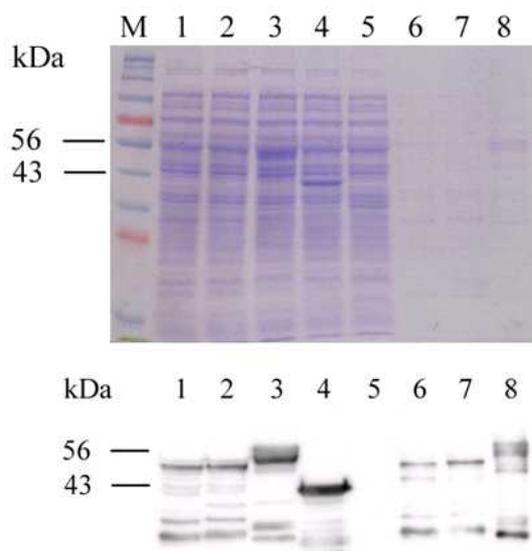


그림 82. 이중항원을 발현하는 살모넬라 변이주의 목적항원 발현 및 정제. Lane 1, IVK B01M123(P1aP2); 2, IVK B01M124(P1bP2); 3, IVK B01M125(R1R2); 4, IVK B01M122(pJYTH01); 5, IVK B01M121(*Salmonella* Enteritidis *aroAompA*); 6, purified P1aP2; 7, purified P1bP2; 8, purified R1R2.

사. 마우스에서의 안전시험 및 면역원성 평가

이중항원을 발현하는 살모넬라 변이주 백신을 마우스 경구 및 비강으로 접종하여 약 7일간 생존율을 조사하였다. 그 결과 총 24마리의 모든 마우스가 생존하여 100%의 생존율을 나타냈으며, 이상증상 또한 나타나지 않았다. 또한 마우스 혈청 내 *Salmonella*-specific IgG의 항체가를 조사한 결과 경구 접종에 따른 항체가는 백신접종 전에는 모든 군에서 대조군과 유사한 항체가를 나타냈지만, 접종 후 14일부터 백신 접종군의 항체가가 증가하기 시작하여 접종 후 42일에는 대조군과 비교하였을 때 약 1.2배 이상의 높은 항체가를 나타냈다. 게다가 IVK B01M121(SE Δ *aroA* Δ *ompA*)을 접종한 군은 접종 28일부터 대조군에 비해 약 2배 이상의 매우 높은 항체가를 보이며 유의적인 차이를 나타냈다($P < 0.001$). 반면에 IVK B01M122(pJYTH01)의 경우 모든 구간에서 대조군과 유사한 낮은 수준의 역가를 나타냈다. 비강 접종 결과는 경구 접종과는 달리 접종하기 전에는 모든 군에서 대조군과 유사한 항체가를 나타냈지만, 접종 후 14일부터 백신 접종군의 항체가가 증가하기 시작하여 접종 후 42일에는 대조군과 비교하였을 때 높은 수준의 항체가를 나타냈다. 특히 IVK B01M123(pJYTH-P1aP2), IVK B01M121(SE Δ *aroA* Δ *ompA*)을 접종한 군은 접종 42일에 대조군에 비해 매우 높은 항체가를 보이며 유의적인 차이를 나타냈다($P < 0.01$, $P < 0.001$). 경구와 비강 접종 경로에 따른 *Salmonella*-specific IgG 항체가를 비교하면 경구접종에 비해 비강접종이 대조군에 비해 더 효과적인 항체가를 유도했다. 마우스 혈청 내 *Salmonella*-specific IgA 분석 결과 또한 경구 접종에 비해 비강 접종이 더 효과적인 면역반응을 유도했다. 그러나 마우스 분변 내 *Salmonella*-specific IgA는 경구 접종이 대조군에 비해 약간 더 높게 나타났다. 위 결과를 종합하면, 살모넬라균 운반체를 이용한 *ompA* 기반의 이중항원 함유 재조합표면단백질의 in vivo 발현시스템이 비강점막에서 매우 효과적으로 면역반응을 유도한다고 볼 수 있다.

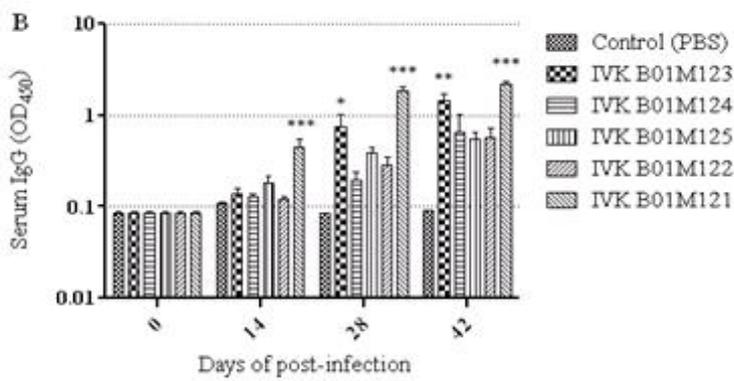
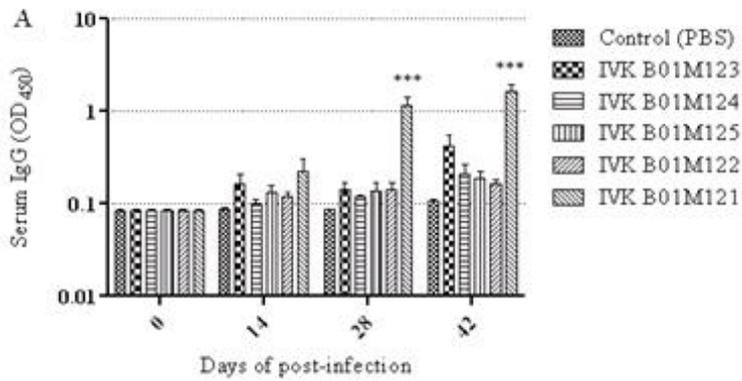
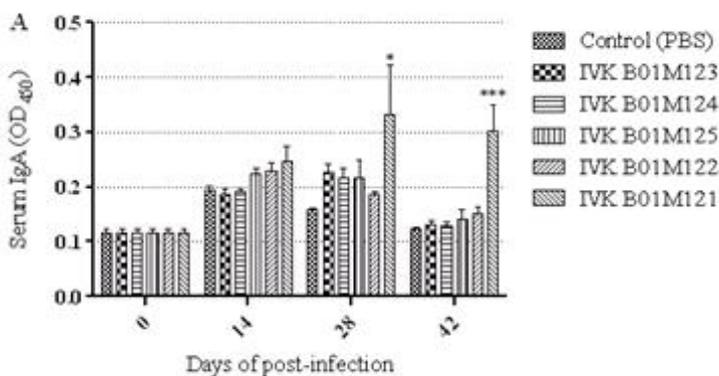


그림 83. 재조합 SE 변이주에 대한 마우스 혈청 내 *Salmonella*-specific IgG levels. (A), Oral route; (B), I. N. route. Mice were inoculated with SE vaccine strain(IVK B01M123~5) or vector strain(IVK B01M122) on days 0 and 14. Samples from five mice were collected at 0, 14, 28 and 42 days after primary immunization.



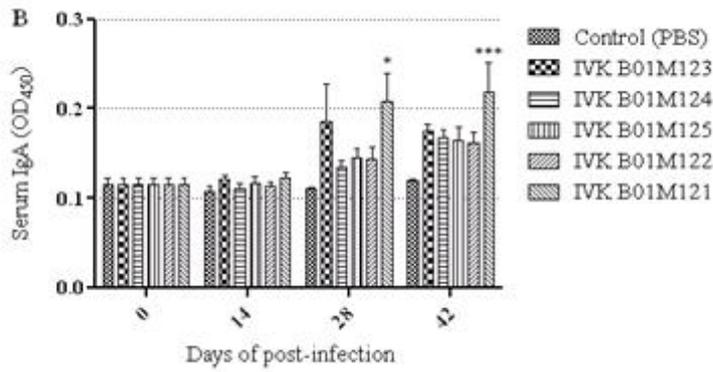


그림 84. 재조합 SE 변이주에 대한 마우스 혈청 내 *Salmonella*-specific IgA levels. (A), Oral route; (B), I. N. route. Mice were inoculated with SE vaccine strain(IVK B01M123~5) or vector strain(IVK B01M122) on days 0 and 14. Samples from five mice were collected at 0, 14, 28 and 42 days after primary immunization.

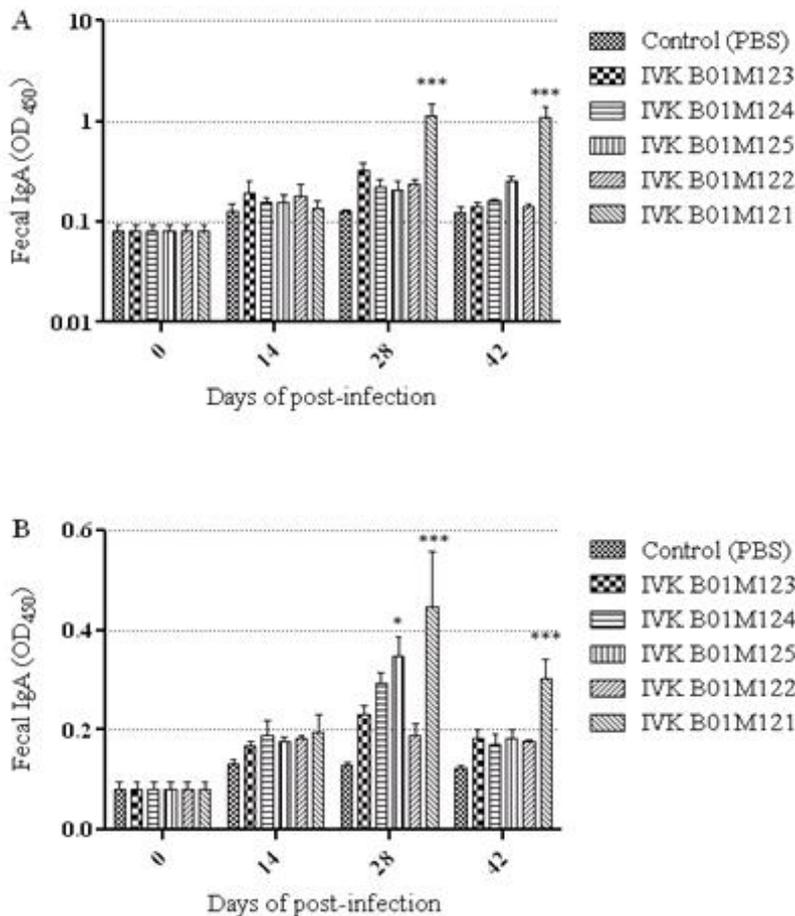


그림 85. 재조합 SE 변이주에 대한 마우스 분변 내 *Salmonella*-specific IgA levels. (A), Oral route; (B), I. N. route. Mice were inoculated with SE vaccine strain(IVK B01M123~5) or vector strain(IVK B01M122) on days 0 and 14. Samples from five mice were collected at 0, 14, 28 and 42 days after primary immunization.

[2협동] 돼지 위축성비염 백신효능시험 및 시제품 개발

○ 돼지에서의 안전성 평가

시험백신 3그룹에 대한 안전성을 시험하기 위하여 5주령 자돈에 각 5마리에 권장 접종량의 2배용량으로 근육접종 하였다. 접종 후 1-2시간 내에 과민반응이 없었고, 21일간 관찰하는 동안 주사부위의 화농, 괴사, 발열 및 설사 등의 부작용이 없이 모두 아무 이상 없이 생존 하였다(표 26, 그림 86, 87).

표 26. 자돈에 대한 안전시험

시험백신	공시수	접종량	접종경로	관찰기간	결과
Group 1	2마리	2 dose	근육	21일	이상 없음
Group 2	2마리	2 dose	근육	21일	이상 없음
Group 3	2마리	2 dose	근육	21일	이상 없음



시험백신 접종 전 채혈 1
(2014. 06.24)



시험백신 접종 전 채혈 2
(2014. 06.24)



시험백신 1차 접종
(2014. 06.24)



시험군 그룹별 돈방관리
(2014. 06.24)

그림 86. 시험백신 접종 전 채혈 및 1차 접종



시험백신 1 (2차 접종) - 2014. 07.08



시험백신 2 (2차 접종) - 2014. 07.08



시험백신 1 (2차 접종) - 2014. 07.08

그림 87. 시험백신 그룹별 2차 접종

○ 돼지에서 면역원성 평가

시험백신을 목적동물 돼지(5주령 자돈) 3그룹(총 15마리)으로 나누어 한 그룹당 5마리씩 각 1.0ml씩 2주 간격 으로 근육 접종하고, 2차 접종 2주 후 채혈하여 백신의 면역항체가를 확인 하였다.

시험백신 접종 전 채혈 및 접종 후 채혈 혈청을 세부팀에 보내 항체가 시험을 실시하였다. 실험 결과 접종군이 대조군 비교결과 증가된 면역원성 형성을 확인하였다 (세부팀 연구결과 참조).

○ 시험백신의 유효성 및 안정성 평가

점막 후보물질을 이용 시제품을 불활화 백신이기에 제조 24개월 후 이상 지속성으로 시험백신에 대한 안정성 부분을 목적동물인 돼지에서 시험 진행 할 예정입니다.

○ 결과 토의

점막 시험백신을 목적동물인 5주령 자돈에 접종시험결과 접종부위의 화농, 괴사, 발열 등의 부작용이 없이 모두 건강하게 성장하여 백신의 안정성이 우수함을 확인하였고, 백신 접종 후 채혈 혈청의 항체가 시험결과 대조군과 비교하여 향상된 면역형성을 확인함으로써, 향후 돼지 점막백신 상용화가 가능하리라 전망됩니다.

○ 허가 진행

제품 상용화를 위해서는 시험백신에 대한 전 임상시험 결과를 가지고 임상시험계획서를 농림축산검역본부에 서류를 제출하여 임상 승인을 받은 후, 야외 임상시험을 3개 농장에서 시험 결과(6개월 ~ 1년)와 시험백신 안정성 시험결과(24개월 이상)등 기술검토 자료 준비하여, 농림축산검역본부에 제출, 제품 허가 등록 절차가 진행되기에, 향후 2-3년 후에 신제품 등록을 위한 진행이 가능할 것으로 예상 됩니다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

[세부, 협동2]

구분	연구개발의 목표	연구개발 목표 달성도	관련분야의 기여도
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ Muco-adjuvant 개발체계를 수립 ○ Muco-adjuvant 1종이상을 개발 ○ 선발된 어쥬번트의 실험동물 및 목적동물 안전시험 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Flow cytometry, Western blot 분석법을 이용한 BAFF발현 조사 [완료] ○ 선도 및 상승효과물질 선정, 실험 ; RA, Zymosan, fucoidan [완료] ○ 선발된 어쥬번트인 zymosan, retinoic acid의 실험동물 및 목적동물의 안전시험 [완료] 	<p>점막면역을 증진시키는 어쥬번트를 개발하는 시도는 일반 어쥬번트와는 차별화되는 연구이며, 향후 관련분야에서 응용가능성이 많을 것으로 사료됨.</p>
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연물질 등에서 돼지에 적용가능한 Muco-adjuvant 2종이상 개발 ○ Muco-adjuvant 적용시 유도되는 점막면역 작용기전 연구 ○ 선발된 어쥬번트의 실험동물 및 목적동물 안전시험 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연물질 유래 후보물질 실험, 마우스 주요 면역세포에 적용실험 [완료] ○ IgA 생성과 관련된 면역반응실험, Plasma cell 분화유도 증명 등 [완료] ○ 선발된 어쥬번트 후보물질 6종류에 대한 실험동물 안전시험 [완료] 	<p>효과가 뛰어나면서도 독성을 최소화시킨 천연물질 유래의 어쥬번트를 개발하기위한 시도로서 점막면역과 관련된 기전연구, 안전성시험은 유용한 정보를 제공할 수 있음.</p>
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 점막면역백신에 투여가 가능한 어쥬번트 후보물질의 최적농도 설정 ○ Muco-adjuvant 적용시 유도되는 점막면역 작용기전 연구(계속) ○ 실험동물을 이용한 최소면역원성 확인 및 목적동물에 대한 효능시험 ○ 특허출원 및 논문발표 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연물질과 BB항원의 최적 조합비율을 구하기 위한 면역시험, 다양한 종류의 면역반응 실험 [완료] ○ 후보물질을 돼지유래 면역세포에 적용하여 기능성시험 [완료] ○ 목적동물에서의 효능시험 [완료] ○ 특허출원 및 논문발표 [특허1건 출원, 논문발표 해외 3건 국내 6건] 	<p>선별된 후보어쥬번트를 목적동물인 돼지에 항원과 함께 접종하여 효능을 평가하였으며, 돼지의 골수세포와 마우스 면역세포를 이용한 다양한 실험을 수행하여 특허와 논문을 발표하였음. 향후에도 학술적, 산업적 이용가치를 증대할 수 있을 것으로 기대됨.</p>

[협동1]

구분	연구개발의 목표	연구개발 목표 달성도	관련분야의 기여도
1차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 약독화 살모넬라균 백신후보주 개발 및 이종항원 함유 살모넬라균 표면단백질 발현시스템 구축 ○ 점막면역 유도를 위한 약독화 살모넬라균 변이주 개발(선정) 및 이종항원 함유 살모넬라균 표면단백질 발현시스템 구축 ○ 시험백신의 <i>in vivo</i> 접종시험 (안전성 및 유효성 검증) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 점막면역 유도 이종항원 운반체로서 약독화 살모넬라균 변이주 특성 분석을 통한 점막면역 유도를 위한 운반체 살모넬라 균주 선발[완료] ○ 이종항원 발현을 위한 살모넬라균 백신후보주의 최적화 [완료] ○ 살모넬라균 호환성 이종항원 함유 재조합 표면단백질 발현시스템 구축[완료] ○ 시험백신의 목적동물 접종시험(안전성 및 효능시험)[완료] 	<p>이종항원을 발현하는 운반체로 사용할 약독화 살모넬라 변이주는 처음으로 시도되는 결과임. 향후 타 병원체의 방어항원을 이용하여 다양한 질병을 예방할 수 있는 백신 가능성을 제시.</p>
2차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 이종항원 함유 재조합 살모넬라균 표면단백질 발현시스템 기능성 검증 ○ 돼지 호흡기 병원균에 대한 단독/복합 이종항원 발현 및 점막면역 유도 분석 ○ 시험백신의 <i>in vivo</i> 접종시험 (안전성 및 유효성 검증) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 검증된 발현시스템을 이용한 <i>B. bronchiseptica</i> 및 <i>M. hyopneumoniae</i> 방어항원 발현 [완료] ○ 실험동물 면역접종에 의한 면역원성 조사[완료] 	<p><i>ompA</i> 기반의 pertactin P1P2와 P97 R1R2 유전자의 <i>E. coli</i>를 이용한 목적 단백질 발현과 정제는 최초로 시도되는 것임.</p>
3차년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 근육주사용 점막면역백신 개발 ○ 특허출원 및 논문발표 ○ 돼지 호흡기 병원체에 대한 이종항원의 발현 및 점막면역 유도 분석 ○ 재조합 이종항원 발현 살모넬라균 백신주의 방어효능 분석 및 점막면역 증진효과 비교 	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>B. bronchiseptica</i> 및 <i>M. hyopneumoniae</i> 예방용 점막백신 개발[완료] ○ 투여경로에 따른 점막면역 증진 효과 비교 분석[완료] ○ 특허출원 및 논문발표[진행중] 	<p><i>B. bronchiseptica</i> 및 <i>M. hyopneumoniae</i>의 방어항원을 발현하는 살모넬라 운반체에 대한 마우스 비강 접종에 따른 면역원성 비교는 처음으로 시도되는 결과임.</p>

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

* 실용화 · 산업화 계획(기술실시 등)

○ 본 연구과제를 통해 발굴한 점막면역증진효과가 있는 어쥬번트 후보물질은 천연성분으로 독성을 최소화시킬 수 있어 근육주사를 비롯해 동물에 적용 시 종전의 어쥬번트에 비해 안전할 것으로 기대됨. 다양한 동물용백신의 개발에 이용될 수 있는 가능성이 높음.

○ 본 연구과제를 통해 면역원성이 우수한 약독화 살모넬라 변이주(SE Δ aroA Δ ompA)를 제작하였고, 이 변이주를 이용하여 *Bordetella bronchiseptica* pertactin과 *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 항원을 발현하는 효과적인 점막면역 유도백신을 제작하였다. 따라서 이 백신을 이용한 산업화 가능성은 매우 높을 것으로 판단됨. 또한 이를 새로운 백신 개발에 응용하고자 함.

* 교육 · 지도 · 홍보 등 기술확산 계획

○ 국내에서 사용되는 어쥬번트는 Seppic사를 비롯한 외국회사에서 공급되어왔다. 본 연구과제를 통해 국내에서도 어쥬번트의 후보물질을 선별하고, 그 효능을 체계적으로 평가할 수 있는 연구능력을 배양했다고 사료된다. 개발과정에서 다수의 연구원 들이 참여하여 교육과 연구경험을 축적했으며, 관련된 기술이 국내 학계와 산업계에 확산될 수 있을 것으로 기대된다.

○ 본 연구과제를 통해 이중항원을 발현하는 약독화 살모넬라 변이주 개발기술을 습득한 전문인력을 양성하고, 필요할 경우 해당 기술을 참여기업과 함께 응용기술을 개발, 구현할 계획이다. 또한 국내외 백신학회를 포함한 면역관련학회에서 포스터 발표와 구두발표를 실시할 예정이다.

* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획

○ 어쥬번트 후보물질을 선별하는 과정에서 효능평가와 관련된 다수의 면역반응을 연구하였다. 연구결과는 특허를 이미 1건 출원하였으며, 다수의 논문으로 발표되거나 계획 중에 있다.

○ 본 연구과제를 통해 제작된 약독화 살모넬라 변이주를 백신후보 균주로써 특허를 출원하고, 이중항원을 발현하는 재조합 살모넬라 운반체 백신 후보주를 돼지에서 면역원성 시험을 통해 특허를 출원하고, 관련 논문을 투고할 계획임.

* 추가연구, 타연구에 활용 계획

○ 향후 2-3년간 관련된 후속연구를 계획하고 있다. 이미 효능이 밝혀진 기초과학분야의 마무리 연구와 실용화가 가능하도록 임상연구를 진행시킬 계획임 (기존백신과의 비교)..

○ 본 연구과제를 통해 제작된 약독화 살모넬라 변이주를 이용하여 타 병원균에 대한 방어항원을 발현하는 백신 균주를 개발하며, 목적동물에서 안전성, 백신효능 실험을 실시할 계획임 (산업화에 응용).

○ 본 연구과제의 결과를 토대로 향후 백신효능 증진을 위한 점막연구를 더욱 진행시킬 예정임 (점막면역세포를 이용한 연구, 작용기전 등 기초연구 포함)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

○ 국내에서 동물용백신을 만드는데 이용되는 어쥬번트는 Seppic사의 Montanide 계열 (Jang SI et al., 2013)과 liposome을 비롯한 기타 어쥬번트 들로 나뉜다 (Awate S et al., 2013). 하지만 일정수준의 세포독성을 갖고있는 어쥬번트 들이 많아 개선이 필요한 실정이다. 해외에서 백신용 어쥬번트를 연구하는 팀들도 점막면역의 증진을 목적으로 하는 어쥬번트를 특별히 제작하지는 않고 (근육주사가 가능한), 효능평가에서 IgA 생산량을 제시하는 수준이었다. 학술적으로 retinoic acid와 TGF-beta가 점막면역을 유도하는 것으로 밝혀졌지만 자체 독성 등의 이유로 제품에 이용할 가능성은 매우 낮은 것으로 판단된다. 점막면역에 대한 연구가 이제 시작단계인 만큼 본 연구를 지속적으로 수행한다면 충분히 경쟁력을 확보할 수 있을 것으로 판단된다.

○ 돼지에서 위축성 비염을 일으키는 *Bordetella bronchiseptica*와 마이코플라즈마성 폐렴 원인균인 *Mycoplasma hyopneumoniae*의 백신개발에 관련된 국내 연구진의 연구는 미비하며, 두 질병에 대한 백신의 경우 대부분 어쥬번트를 이용한 아단위백신(subunit)이 널리 상용되고 있다. 또한 국내에서 사용되고 있는 백신은 국내 분리주에 대한 homogenous clone으로 제조하지 않았기 때문에 효능에 있어 다국적 백신보다 열세인 것으로 야외에서 인정받고 있음. 따라서 본 연구를 진행하는 동안 학회를 참가하여 정보를 공유함으로써 인해 이와 관련된 많은 해외과학기술정보를 습득하였음.

제 7 장 연구시설·장비 현황

- 없음.

제 8 장 참고문헌

Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol* 2013, 4, 114.

Byeon H, Hur J, Kim BR, Lee JH. Generation of an attenuated *Salmonella*-delivery strains expressing adhesin and toxin antigens for progressive atrophic rhinitis and evaluation of its immune responses in a murine model. *Vaccine* 2014, 32, 5057-5064.

Hammerschmidt SI, Friedrichsen M, Boelter J, Lyszkiewicz M, Kremmer E, Pabst O, Forster R. Retinoic acid induces homing of protective T and B cells to the gut after subcutaneous immunization in mice. *J Clin Invest* 2011, 121, 3051-3061.

Herberich E, Sikorski J, Hothorn T. A robust procedure for comparing multiple means under heteroscedasticity in unbalanced designs. *PLoS One* 2010, 5, e9788.

Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, Cosgrove CA, Ghaem-Maghami M, Sexton A, Khan M, Brennan FR, Everest P, Wu T, Pickard D, Holden DW, Dougan G, Griffin GE, House D, Santangelo JD, Khan SA, Shea JE, Feldman RG, Lewis DJ. Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (*ssaV*) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect Immun* 2002, 70, 3457 - 3467.

Husseiny MI, Hensel M. Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine carrier strains. *Infect Immun* 2005, 73, 1598-1605.

Jang JY, Moon SY, Joo HG. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem Toxicol* 2014, 68, 234-238.

Jang SI, Kim DK, Lillehoj HS, Lee SH, Lee KW, Bertrand F, Dupuis L, Deville S, Ben Arous J, Lillehoj EP. Evaluation of Montanide ISA71VG adjuvant during profilin vaccination against experimental coccidiosis. *PLoS One* 2013, 8, e59786.

Konkel JE, Chen W. Balancing acts: the role of TGF-beta in the mucosal immune system. *Trends Mol Med* 2011, 17, 668-676.

Li Y, Wang S, Xin W, Scarpellini G, Shi Z, Gunn B, Roland KL, Curtiss R 3rd. A *sopB* deletion mutation enhances the immunogenicity and protective efficacy of a heterologous antigen delivered by live attenuated *Salmonella enterica* vaccines. *Infect Immun* 2008, 76, 5238-5246.

Ogwa Y, Oishi E, Mueneta Y, et al. Oral vaccination against mycoplasma pneumonia of swine using a live *Erysipelothrix rhusiopathiae* vaccine strain as a vector. *Vaccine* 2009, 27, 4343-4550.

Okamba FR, Moreau E, Cheikh Saad Bouh K, Gagnon CA, Massie B and Arella M. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of th *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. *Clin Vaccine Immunol* 2007, 14, 767-774.

Shin EK, Jung R, Hahn TW. Polymorphism of pertactin gene repeat regions in *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs J Vet Med Sci 2008, 69, 771-774.

Zhao Z, Xue Y, Wu B, Tang X, Hu R, Xu Y, Guo A, Chen H. Subcutaneous vaccination with attenuated *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis C500 expressing recombinant filamentous hemagglutinin and pertactin antigens protects mice against fatal infections with both *S. enterica* serovar Choleraesuis and *Bordetella bronchiseptica*. Infect Immun 2008, 76, 2157-2163.

Zhao Z, Xue Y, Tang X, Wu B, Cheng X, He Q, Zhang C, Guo A, Jin M, Chen H. Immunogenicity of recombinant protective antigen and efficacy against intranasal challenge with *Bordetella bronchiseptica*. Vaccine 2009, 27, 2523-2528.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.