

보안과제(), 민원과제(O)

과제번호 107034-3

발급 농축 번호:

11-1541000-000504-01

돼지 흉막폐렴 예방을 위한 사료첨가용 효모 개발 및 산업화

(Development and industrialization of feed
additive-yeast to prevent porcine pleuroneumoniae)

- 제 1세부과제: 형질전환 효모의 효능 평가 및 아와 적용 시험
(Evaluation of efficacy and application of Transgenic Yeast Oral vaccine in a field)
- 제 2세부과제: 돼지 흉막폐렴균 항원빌현 효모 형질전환체 개발
(Development of a Protective Transgenic Yeast Vaccine against Porcine Pleuropneumonia)
- 제 3세부과제: 돼지 흉막폐렴 예방용 사료첨가제 대량생산기술개발
(Research of Mass Production of Transgenic Yeast)

서울대학교

농림수산식품자료실



0004937

농 림 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

o) 보고서를 “돼지 흉막폐렴 예방을 위한 사료첨가용 효모 개발 및 산업화에 관한 연구” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 26일

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 유한상

연구원 : 신민경

정명환

이원정

세부연구책임자 : 김대혁

연구원 : 심현정

고은미

박진아

이종기

협동연구기관명 : (주) 씨티씨바이오

협동연구책임자 : 최대건

연구원 : 조지은

하동진

박영준

요약문

I. 제목

돼지 흉막폐렴 예방을 위한 사료첨가용 효모 개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 효능 평가 및 급여 프로그램 개발
- 돼지 흉막폐렴균의 항원 중 방어 면역반응을 유도할 수 있는 3종의 독소 항원인 ApxI, ApxII 및 ApxIII 단백질을 효모의 세포내 또는 표면에 발현한 형질전환 효모 개발
- 돼지 흉막폐렴 병원성인자를 발현하는 효모의 대량 생산 체계 구축

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 돼지 흉막폐렴 예방을 위한 효모 백신 개발의 기초연구

- 가. 돼지 흉막폐렴 원인균의 병원성 유전인자 분석
- 나. 돼지 흉막폐렴 원인균의 항원단백질 및 다클론 항체 생산
- 다. 돼지 흉막폐렴에 대한 형질전환 효모 백신 평가 기법 개발

2. 돼지 흉막폐렴균 항원 발현 효모 형질전환체 개발

- 가. 돼지 흉막폐렴균 Apx toxin 항원 단백질의 효모세포 내 발현하는 효모 개발
- 나. APXIIA 독소단백질의 효모 세포표면에 발현하는 효모 개발
- 다. 돼지 흉막폐렴균 독소 단백질의 점막면역계 targeting을 위한 리간드의 활용

3. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 체계 구축

- 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 시스템 구축 및 최적 조건 선정

4. ApxII 항원단백질 발현 효모를 이용한 실험동물 및 목적 동물에서의 경구면역 평가

- 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지)에서 형질전환 효모의 경구면역 유도 평가
- 돼지 흉막폐렴 예방효과 극대화를 위한 형질전환 효모 투여량의 최적화
- 형질전환 효모의 ApxIIA 항원단백질 경구 제시 평가

5. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 공정 개발

- 가. 재조합 효모 대용량 배양 후 농축을 위한 최적 공정의 탐색
- 나. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 제품 제형 확립

6. 사료첨가제형 Apx 항원 단백질 발현 형질전환 효모의 야외 효능 평가

- 가. 형질전환 효모의 야외 농장 적용
- 나. 형질전환 효모의 경구 면역 유도능 및 임상증상, 호흡기질병 발생 평가

IV. 연구개발 결과

1. 돼지 흉막폐렴 예방을 위한 효모 백신 개발의 기초연구

흉막폐렴 원인균인 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 국내 분리주로부터 주요 병원성인자인 exotoxin 유전자 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA를 확보하였다. 또한 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA에 대한 재조합 단백질을 생산하였으며, 차후 백신 효능평가를 위한 다클론 항체를 제작하였다. 재조합 Apx toxin에 대한 ELISA 기법을 개발하여 돼지 흉막폐렴에 대한 백신 효과 평가 기법을 확립하였다.

2. 돼지 흉막폐렴균 항원 발현 효모 형질전환체 개발

주요 병원성 인자 중 ApxIIA에 대한 immunodominant epitope에 대한 연구가 선행되었고, ApxIIA #5 fragment를 형질전환 효모에 이용하였다. ApxIIA#5 유전자를 효모 세포내 및 세포표면 발현을 위한 recombinant 벡터 제작, 효모의 형질전환 및 형질전환체 분석을 하여, 단백질 발현을 확인하였다.

3. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 체계 구축

Lab. scale에서 선행 연구된 조건에 대한 scale up 적용여부 평가를 실시하고, 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 시스템 구축 및 최적 조건 선정하였다.

4. ApxII 항원단백질 발현 효모를 이용한 실험동물 및 목적 동물에서의 경구면역 평가

항원 발현 형질전환 효모를 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지) 모델에 적용하여, Apx에 특이적인 IgA와 IgG의 항체가를 분석하였다. 또한 국내 야외 분리 균주 *A. pleuropneumoniae*를 공격 접종하여 백신의 방어능을 확인하였다.

5. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 공정 개발

재조합 효모 대용량 배양 후 농축을 위한 최적 공정의 탐색하여 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 제품제형을 확립하였다.

6. 사료첨가제형 Apx 항원 단백질 발현 형질전환 효모의 야외 효능 평가

사료첨가제형 Apx 항원 단백질 발현 형질전환 효모를 야외 농장에 적용하여, 면역 유도능, 임상증상, 호흡기질병 발생 및 폐사개체 발생률을 분석하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 사료 첨가용 효모를 이용한 효율적인 돼지 흉막폐렴 예방 기술 개발 성공 및 실용화
- 재조합 항원단백질 발현 효모를 이용한 경구백신의 가능성 확인 및 재조합효모 제작 기술 활용
- 경구점막면역계 targeting strategy의 적용가능성 확인을 통한 경구 백신 효율 증진 및 재조합 효모 제작 기술에 적용
- 돼지 흉막폐렴 예방용 미생물 사료첨가제 제품형 확립에 의한 실용화 및 산업화

SUMMARY

I. Title

Development and industrialization of feed additive—yeast to prevent porcine pleuroneumoniae

II. Objectives and Requirements of Research and Development

- Evaluation of efficacy and a feed program for a Transgenic Yeast Oral vaccine against Porcine Pleuropneumonia.
- Development of Surface—displayed Transgenic Yeast and Intracellular expressed ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA.
- Establishment of Mass Production for Transgenic yeast expressed Apx Toxins.

III. Materials, Methods and Results

1. Basic Research to develop a Protective Transgenic Yeast Oral Vaccine against Porcine Pleuropneumonia

- A. Analysis of Virulence Factors
- B. Expression of Antigens and Development of Antibodies
- C. Development of ELISA methods for Antigens

2. Development of a Protective Transgenic Yeast Vaccine against Porcine Pleuropneumonia

- A. Development of Intracellular expressed Transgenic Yeast
- B. Development of Surface—displayed Transgenic Yeast
- C. Application of Ligands in Target Mucosal Immune System

3. Researching Properties and Mass—Culture Condition of Transgenic Yeast

- Establishment and Optimal conditioning of mass production for Transgenic yeast

4. Evaluation of the Vaccine in Experimental Animals (mouse) and Target Animals (Pig).

- A. Evaluation of Transgenic Yeast Vaccine's Immunity and Protection Ability against Porcine Pleuropneumonia
- B. Optimization of the Vaccination program
- C. Presentation of Orally delivered Transgenic Yeast ApxIIA

5. The Development of a Feed Additive–Yeast

- A. The Development of the Optimum Concentration of a Feed Additive–Yeast in a large scale environment
- B. Establishment of a Feed Additive–Yeast against Porcine Pleuropneumonia

6. Evaluation of a Feed Additive–Yeast in a field

- A. Application for a Feed Additive–Yeast in a field
- B. Evaluation of the immunity and protectivity for a Feed Additive–Yeast

IV. Results of Research and Development

1. Basic Research to develop a Protective Transgenic Yeast Oral Vaccine against Porcine Pleuropneumonia

We have isolated and identified exotoxin called Apx, as a major virulence factor, from *Actinobacillus pleuropneumoniae Korean isolated*, which is a causative agent of porcine pleuropneumonia. *ApxIA*, *apxIIA* and *apxIIIA* were cloned and expressed using *E. coli* system. Recombinant proteins of *ApxIA*, *ApxIIA* and *ApxIIIA* and mono-specific polyclonal antibodies against these proteins were obtained and used for evaluating whether the vaccine developed in this study. With these agents, the specific and sensitive ELISA method was developed against porcine pleuropneumonia.

2. Development of a Protective Transgenic Yeast Oral Vaccine against Porcine Pleuropneumonia.

Analysis of immunodominant epitope was preceded in *ApxIIA*, major target antigen.

ApxIIA–neutralizing epitope#5 was candidate to expressed in transgenic yeast. ApxIIA–neutralizing epitope was expressed as a secretory as well as surfaced–displayed form in *S. cerevesiae*.

3. Researching Properties and Mass–Culture Condition of Transgenic Yeast

Culture–condition and antigen expression of transgenic yeasts were analysed and confirmed.

4. Evaluation of the Vaccine in Experimental Animal (mouse) and Target Animal (Pig).

Transgenic yeast expressing antigen have been developed and tested using experimental animals (mouse) and target animals (Pig) model. To Optimize the vaccination program, different strategies for immunizing host were analyzed in mouse. Also, protective immunity in pigs was elevated by an oral vaccination with transgenic yeast.

5. The Process Development for a Feed Additive–Yeast

Mass–culture conditioning was performed for the industrialization of transgenic yeast. Also, the optimum concentration process and several protective agents were evaluated for concentration and freezing step.

6. Evaluation of a Feed Additive–Yeast in a field

A Feed Additive–Yeast was applied in field pigs. Protective immunity in pigs was elevated by oral vaccination with a Feed Additive–Yeast.

V. Application of Developed Techniques

- Commercialization and Development of a Protective Transgenic Yeast Oral Vaccine against Porcine Pleuropneumonia.
- Practical use of potential using Transgenic Yeast oral vaccine
- Investigation of potential oral vaccine using targeting strategy in oral mucosal immun system and application of the established transgenic techniques in yeast
- Industrialization and development of a feed additive–yeast

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	13
Part 1. Objective of Research and Development	13
Part 2. Importances and Requirements of Research and Development	14
1. The technical view	14
2. The economical and industrial view	16
3. The social and cultural view	17
Part 3. Range of Research and Development	18
Chapter 2. Present Status of the Technical Development	20
Part 1. Reasearch for Yeast as a feed additive	20
Part 2. Induction of Mucosal Immune Response against Porcine Pleuropneumonia	21
Chapter 3 Materials, Methods and Results	23
Part 1. Introduction	23
Part 2. Materials and Methods	26
Part 3. Results	33
1. Basic Research to Develop a Protective Vaccine against Porcine Pleuropneumonia	33
1-1. Analysis of Virulence Factors	33

1-2. Expression of Antigens and Development of Antibodies	36
1-3. Development of ELISA methods for Antigens	45
2. Development of a Protective Transgenic Yeast Vaccine against Porcine Pleuropneumonia	54
2-1. Development of Intracellular expressed Transgenic Yeast	54
2-2. Development of surface-displayed Transgenic Yeast	60
2-3. Application of Ligands in Target Mucosal Immune System	75
3. Researching Properties and Mass-Culture Condition of Transgenic Yeast	88
3-1. Flask culture for Optimal conditioning of mass production for Transgenic yeast	88
3-2. Optimization of mass production for Transgenic yeast using bioreactor	93
3-3. Establishment of mass production for Transgenic yeast using a large scale bioreactor	101
4. Oral Vaccination of Experimental Animal with Transgenic Yeast Expressing ApxII	103
4-1. Evaluation of the Vaccine with Experimental Animal (mouse)	103
4-2. Presentation of Orally delivered Transgenic Yeast ApxIIA	109
5. Oral Vaccination of Target Animal with Transgenic Yeast Expressing ApxII	115
5-1. Oral Vaccination of Target Animal with Transgenic Yeast Expressing ApxII.....	115
5-2. Induction of Immune Response for Transgenic yeast	119
5-3. Evaluation of Transgenic Yeast Vaccine's Protection Ability against Porcine Pleuropneumonia	126

6. The Development of a Feed Additive-Yeast	142
6-1. The Development of the Optimum Concentration of a Feed Additive-Yeast in a large scale environment	142
6-2. Establishment of Transgenic Yeast Vaccine against Porcine Pleuropneumonia as a Feed Additive	145
7. Evaluation of a Feed Additive-Yeast in a field	153
7-1. Application for a Feed Additive-Yeast in a field	153
7-2. Evaluation of the immunity and protectivity for a Feed Additive-Yeast	153
Part 4. Discussion	161
Chapter 4. Achievements and Contributions of Research and Development ..	166
Chapter 5. Products and Application of Research and Development	163
Part 1. Products of Research and Development	163
Part 2. Application of Research and Development	168
Chapter 6. International Scientific and Technical Reference materials	173
Part 1. Analysis of new virulence factor of <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	173
Part 2. Overcoming Immune Tolerance During Oral Vaccination Against <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	173
Part 3. Enhancement of yeast cell viability	173
Chapter 7. References	174

목 차

제 1 장 서 론	13
제 1 절 연구 개발의 목적	13
제 2 절 연구 개발의 중요성 및 연구개발의 필요성	14
1. 기술적 측면	14
2. 경제 · 산업적 측면	16
3. 사회 · 문화적 측면	17
제 3 절 연구범위	18
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
제 1 절 사료 첨가제로서의 Yeast 이용에 관한 연구	20
제 2 절 흉막페렴균에 대한 점막 면역 유도에 관한 연구	21
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	23
제 1 절 서론	23
제 2 절 연구범위 및 연구수행 방법	26
제 3 절 연구개발 결과	33
1. 돼지 흉막페렴 예방을 위한 효모 백신 개발의 기초연구	33
가. 돼지 흉막페렴 원인균의 병원성 유전인자 분석	33
나. 돼지 흉막페렴 원인균의 항원단백질 분석	36
다. 돼지 흉막페렴에 대한 형질전환 효모 백신 평가 기법 개발	45
2. 돼지 흉막페렴균 항원 발현 효모 형질전환체 개발	54
가. 돼지 흉막페렴균 Apx toxin 항원 단백질의 효모세포 내 발현하는 효모 개발	54
나. APXIIA 독소단백질의 효모 세포표면에 발현하는 효모 개발	60
다. 돼지 흉막페렴균 독소 단백질의 점막면역계 targeting을 위한 리간드의 활용	75
3. 돼지 흉막페렴 예방용 효모의 대량 생산 체계 구축	88
가. 돼지 흉막페렴 예방용 효모의 대량 생산 시스템 구축 및 최적 조건 선정을 위한 플라스크 배양	88
나. 생물반응기를 이용한 재조합 효모의 대량 생산 시스템 구축 및 최적 조건 선정	93

다. 500 L 생물반응기를 이용한 재조합 효모의 대량 생산 시스템 구축	101
 4. ApxII 항원단백질 발현 효모를 이용한 실험동물에서의 경구면역	103
가. 실험동물(마우스)에서 형질전환 효모의 경구면역 유도 평가	103
나. ApxIIA 항원단백질 발현 형질전환 효모의 경구 제시	109
 5. ApxII 항원단백질 발현 효모를 이용한 목적동물 (돼지)에서의 경구 면역 평가	115
가. 목적동물 (돼지)에서의 형질 전환 효모의 경구 접종	115
나. 형질전환 효모의 경구 면역 유도능 평가	119
다. 돼지 흉막폐렴에 대한 방어능 평가	126
 6. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 공정 개발	142
가. 재조합 효모 대용량 배양 후 농축을 위한 최적 공정의 탐색	142
나. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 제품 제형 확립	145
 7. Apx 항원단백질 발현 효모 형질 전환체의 약외 효능 평가	153
가. 형질전환 효모의 약외 농장 적용	153
나. 형질전환 효모의 경구 면역 유도능 및 방어능 평가	153
 제 4 절 고찰	161
 제 4 장 목표달성을 및 관련분야에의 기여도	166
 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	163
제 1 절 연구개발 성과	163
제 2 절 성과 활용 계획	168
 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	173
제 1 절 돼지 흉막폐렴에 대한 신 병원성 인자 분석	173
제 2 절 돼지 흉막폐렴에 대한 경구백신의 oral tolerance 극복	173
제 3 절 형질전환 효모의 활성 유지 기술	173
 제 7 장 참고문헌	174

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구 개발의 목적

축산업의 생산성에 영향을 미치는 요인은 매우 다양할 수 있으나, 일반적으로 축산업의 생산성은 가축에 유발되는 질병에 의하여 입은 피해의 정도에 의하여 크게 좌우된다고 알려져 있다. 따라서 축산업에 있어서 질병의 예방 및 효과적인 방제방법의 개발은 산업의 생산성과 밀접한 관계가 있다고 할 수 있겠다. 국내의 여러 축산업 분야 중 유일하게 국제적 경쟁력을 갖춘 산업으로 알려진 양돈 산업의 경우만 하더라도 다양한 질병에 의한 생산성 저하가 심각한 형편인데, 특히 호흡기 질병으로 인한 피해가 약 700억원 이상으로 추정될 만큼 질병에 의하여 산업의 생산성이 심각하게 영향을 받고 있다. 따라서 축산업에 영향을 미치는 질병의 예방 및 치료에 효과적으로 적용할 수 있는 방안의 마련은 산업의 생산성을 제고 시키는데 커다란 기여를 할 수 있을 것으로 판단되며, 아울러 국가의 경쟁력 제고에도 큰 기여를 할 수 있을 것으로 여겨진다.

질병예방을 위한 방법으로 여러 가지 방법들이 적용되고 있으나, 그 중 병원성 세균의 주요 항원을 투여 하여 숙주체내에서 면역반응을 유도하는 방법이 가장 많이 적용되는 방법 중 하나이다. 이러한 방법은 현재까지는 백신으로 알려져 있으나, 이러한 백신은 생산 및 적용까지 여러 단계를 거쳐야하는 어려움이 있다. 이러한 어려움을 극복하기 위하여 축산업에서는 사료첨가제용으로 개발하여 경구투여에 의한 면역 반응의 유도가 가장 효율적인 방법 중 하나로 대두되고 있다. 이러한 투여 방법은 사료에 첨가하여 입으로 섭취하기 때문에 접종의 수월성과 접종에 요구되는 전문 의료인력 투입의 불필요성에 따른 접종의 경제성과 또한 장점막에 부착하여 충식하면서 지속적으로 항원으로 생산하여 면역반응을 유도할 수 있는 등의 많은 장점을 가지고 있다.

본 연구개발은 접종의 경제성, 접종의 수월성, 백신의 안정성, 그리고 면역 반응 유도의 효율성에 의하여 새로운 백신 운반체인 경구백신 기술을 돼지 흉막 폐렴에 적용시켜보고자 하는 연구이다. 본 연구는 특히 돼지 호흡기 질병 중 임상학적, 경제적으로 매우 중요한 질병인 돼지 흉막폐렴 (Porcine pleuropneumonia)에 대하여 산업체와 공동 연구를 포함하여 백신 적용에 있어서의 실용성 제고를 추구할 수 있다고 생각한다.

이에 본 연구에서는 돼지 흉막폐렴 원인균 중 중요한 병원성 인자를 발현하는 Yeast를 개발

하여 사료 첨가제로 사용할 수 있는 체계를 구축하여 돼지 흉막폐렴을 예방하고자 하는 목적이 있다.

제 2 절 연구 개발의 중요성 및 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

본 과제에서는 Yeast(효모)를 변이 유도방법 또는 유전공학적 기법을 이용하여 효모에서 흉막 폐렴균의 주요 병원성인자인 외독소(exotoxin, ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA)를 발현하였고, 이를 바탕으로 사료 첨가제로서 효용성을 알아보고자 한다. 효모의 유전공학적 연구는 오랜 기간동안 연구되어 왔고, 빵효모나 맥주 효모로써 현재로도 사용되고 있다. 본과제의 기본적인 개념은 유전적으로 조작한 효모를 사용하여 사료 첨가제로 사용함으로서 동물의 생산성 증대 및 질병 예방 효과를 나타내는데 있다.

돼지의 면역력은 다양한 과정을 통하여 증진 또는 약화되며, 결과적으로 돈군의 내병성 및 생산성에 영향을 미치게 된다. 이를 위해 항생제 및 백신이 사용되고 있다. 항생제는 최근 내성 문제 및 잔류의 문제로 사용이 제한이 되고, 질병 예방의 목적으로 백신의 사용량이 증가하고 있는 추세이다. 그러나 주사기를 이용한 백신 접종의 경우 안전성(safety), 순응성(compliance), 불편함(discomfort), 접종 기술 및 백신 전달의 속도 그리고 비용과 보관 등의 문제들을 고려하여 최근 주사기를 사용하지 않는 'Needle-free vaccine delivery'가 주 관심사가 되고 있다. (Erin L.G. 2006). 그 배경에는 점막 면역이란 개념이 있으며, 점막은 구강, 비강, 폐, 결막 및 질에 이르기까지 대부분의 체내에 분포한다. 점막에는 많은 면역 기관이 분포하여 외부 항원 또는 병원체에 대한 면역 감시가 이루어지는 곳이기도 하다. 이런 점막 부분 중에서 구강과 비강 그리고 공기를 통한 접근 방법이 주로 연구되어지고 있다 (Erin L.G. et. al, 2006). 그 중에도 폴리오나 로타 바이러스와 같은 바이러스, typhoid fever 같은 세균의 외부 항원 그리고 형질전환 시킨 식물 백신 등이 현재 구강접종을 위해 개발되었다 (Dietrich G. et al. 2003; Tacket C.O. et al., 2004).

본 연구에서 형질 전환체 제조의 대상으로 고려하는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 진핵세포로서

- ▷ 인체에 안전한 미생물로서 GRAS(Generally Recognized As Safe) organism이며,
- ▷ 술과 다양한 발효 식품에서 알 수 있듯이 오랜 동안의 사용 경험으로 사회적으로 친숙할 뿐 더러, 그간 많은 경험을 바탕으로 대량배양 및 균주 조작에 대한 "know-how"가 축적되어 있고,(Valunzuela, P. et al., 1982)
- ▷ 진핵세포로 구성되어 있어 고등동물 세포의 유전자와 전사 및 번역방식이 비교적 유사하여 산업적으로 이용가치가 있는 고 부가가치의 많은 이종 단백질과 희귀 단백질의 생산에 적합하며(Power, U.F.1997),
- ▷ 생산된 단백질의 분비효율이 월등하여 많은 경우에 생산된 단백질의 순순 분리·정제를 용이하게 한다.
- ▷ 그러나, 효모 자체를 사용할 경우 고도의 정제과정이 필요치 않고 그 자체로 추가적인 adjuvant의 사용 없이 장기간에 걸친 면역 반응을 유도 할 수 있으므로 더 쉽게 사용할 수 있고, 더 저렴하게 백신을 생산 할 수 있는 장점이 있다. (Jonasson. P. 2000; Leclerc, C. 1991).

일반적으로 적절한 사료 영양, 원료 구성 및 환경은 면역력 증진에 가장 직접적인 영향을 미친다고 할 수 있다. 이러한 관점에서 사료 내 영양수준개선이나 사료 첨가제를 통한 돈군의 면역력을 개선하려는 노력뿐만 아니라 최근에는 면역력 강화 성분의 조절을 통하여 특정 기능성 축산물을 생산하려는 연구도 시도되고 있다. 이런 점에서 Yeast는 기존에도 때때로 사료의 품질을 향상시키기 위하여 사료에 첨가되어 왔다.

- ▷ 효모와 생성물(yeast product와 fermentation product): 사료 첨가제 효과 : 배양물, 향기 증진, 영양치료제, 효소 (invertase, galactosidae), 생화학물 (ATP, NAD, RNA), 비타민 B군, 색소, 곰팡이 독소 흡착제, 글리칸 (유화제 Emulsifer, 농화제 Thickening agent), 글리세롤 (Glycerol)
- ▷ 글루칸(glucan=soluble fiber): 식세포를 활성화하여 면역반응(Immune response)을 증가
- ▷ 베타-글루칸 : 면역체계활성을 억제하는 질병에 대한 항생제 및 다른 치료법에의 반응을 증진, 줄기세포 (stem cells) 보호, 항암작용
- ▷ 만난 (Mannan) : 장의 건강 증진, 병원균의 장상피 세포에 부착 방지
- ▷ 글루코만난 (Yeast cell wall glucomannan, Bio-Mos) : 살모넬라를 증식을 감소 (Spring, 2000)

한편, 1990년대 후반 phage display library 기술의 제안 후 이의 target panning을 통한 target-specific delivery 기술은 2000년대에 이르러 많은 종류의 target을 대상으로 연구가 확대되고 있다. 이는 표적 target을 사용하여 이에 특이적으로 결합하는 peptide를 분리하는 기술로서 적절한 screening 기술이 겸비될 경우 매우 강력한 delivery 체제 구축을 가능하게 한다.

따라서, 효모(*S. cerevisiae*)는 기초 학문분야에서도 유전학 및 생화학적 지식이 많이 축적되어 있으며, 외래유전자의 도입을 위한 형질전환방법이 확립된 후 유전자 조작과 유전자 치환 및 선택적 파괴 등 다른 고등생물에서 시도하기 어려운 많은 기술들이 가능하다. 현재 이러한 유전자 조작을 통하여 식·약품첨가제 외에 enzyme, enzyme inhibitor, cytokine, antigen 등과 여러 희귀 단백질 생산에 있어서 매우 중요한 expression host로 이용되고 있다.

이에 본 연구에서는 효모의 발현 벡터를 이용해 돼지 흉막폐렴 독소(Apx toxin)를 발현시키는 *S. cerevisiae* 대량 생산 및 일반 농장에서 실질적으로 사용할 수 있는 산업화 기반 시설 구축에 관한 연구 및 평가를 실시하고자 하며, 위에 언급된 효모의 장점과 흉막폐렴의 독소를 분비하는 효모를 사료 첨가제로 사용하여 준 백신 수준의 면역 유도체로서 질병 예방 효과를 얻고자 한다. 또한 기존의 발현 시스템을 개선하여 효모의 이러한 장점을 바탕으로 항원유전자를 점막면역계 targeting strategy를 부가하여 발현하며, 이를 통하여 효모에 면역 활성이 있는 단백질을 발현시켜 가축의 항병성 사료 첨가물로서 사용될 수 있는 경구제제용 새로운 효모제제를 개발하고자 한다.

2. 경제·산업적 측면

현재 재조합 항원을 이용한 경구백신이 상업적으로 적용되고 있지는 않지만, 최근의 임상실험에서 그 가능성에 인정되고 있는 최신 기술이기 때문에 기술의 확산은 그 중요성을 무시할 수 없다. 백신을 포함한 바이오 신약분야에 대한 시장규모는 2003년 380억 달러에서 2010년에는 1300억 달러로 급성장할 것으로 전망하고 있는데, 현재 사용되고 있는 백신의 대부분은 주사용 백신이며, 경구백신은 소아마비 백신이 가장 널리 이용되고 있고, 장티푸스 백신과 바이러스성 설사를 일으키는 로타 바이러스에 대한 백신이 경구백신으로서 개발 중에 있다.

우리나라의 경우 사람을 대상으로 하는 경구백신보다는 가축을 대상으로 하는 경구백신의 개발이 더 합리적일 것으로 판단되는데, 이에는 다음과 같은 몇 가지 이유가 있다.

- 우리나라의 경우 사람용 백신개발에 대한 전체적인 know-how의 축적이 선진국에 비하여 상대적으로 높지 않으며, 따라서 지역적 특성을 갖는 질병이 아닐 경우에는 경쟁력의

확보가 어렵다는 측면을 들 수 있다.

- 둘째, 가축질병의 경우 지역성이 강하고 제품의 임상적 응용이 사람에 비하여 수월하기 때문에 빠른 시일 내에 투자의 효과를 얻을 수 있다는 점이다.
- 셋째, 가축을 대상으로 하는 경구백신 기술은 나아가 사람의 질병에 대한 경구백신 기술 개발의 중요한 초석이 될 수 있기 때문에 가축 경구백신 기술은 미시적으로는 축산업의 경쟁력 제고에 큰 기여를 할 수 있을 것으로 판단되며, 거시적으로는 백신산업 전반에 커다란 기여를 할 수 있는 기술로 판단된다.

본 실험에서 연구하고자 하는 흉막폐렴은 육성기에 도달한 20 – 50 kg의 돼지에서 출하기의 비육돈까지 주로 발병하여 축산 농가에 막대한 경제적 피해를 입히는 주요 호흡기 질병중의 하나로 기존의 주사 방법 및 백신 방법으로는 노동력 및 접종의 어려움으로 인한 부가적인 손실을 줄이고자 흉막폐렴 독소를 발현하는 효모를 사료 첨가제로서의 상용화하여 흉막폐렴의 예방 수단으로서 제공되어 양돈 농가와 국가의 경제적 손실을 대폭 줄 일수 있을 것으로 생각된다. 또한, 양돈 산업을 수출산업으로 육성하기 위해 흉막폐렴 예방을 통한 돼지의 생산성 증대 수단으로 제공할 수 있는 기술로 활용될 수 있으며, 아울러 산학협동 연구를 통하여 본 기술의 전수 및 제품 판매가 가능할 것으로 기대되어 양돈 산업뿐만 아니라 사료 산업에 대한 경제적 파급효과도 클 것으로 본다. 한편, 유전공학을 이용한 기능성 효모의 개발은 다양한 방면에서 사용가능하기에 본 과제에서 개발 및 상용화 하고자 하는 항원 유전자 발현 효모는 생명 공학을 통한 다른 유용 단백질의 생산에도 적용될 수 있는 핵심 기술과 경험이 될 것이다. 또한, 항원 단백질의 효율적인 체내 전달을 위한 연구 결과는 경구 백신 개발 및 적용에 중요한 기반 기술이며, 점막 면역계 이해의 중요한 방법이 될 수 있을 것이다.

3. 사회 · 문화적 측면

사회가 발전하고 경제적 수준이 향상될수록 건강에 대한 욕구가 커지며 국민의 보건복지향상이 국가의 가장 중요한 목표로 대두되고 있는 실정이다. 현재까지 가축의 성장을 촉진하고 설사 등 질병을 예방, 치료하기 위해서는 일반적으로 항생제가 많이 이용되어 왔다. 그러나 항생제는 장기간 사용하거나 남용하게 되면 항생제에 대한 내성이 생기고 또한 식품으로서의 축산물에 대한 항생제 잔류문제를 초래하게 된다. 따라서 항생제를 대체할 항병성 수단으로서 경구 백신의 개발은 well-being을 추구하는 현대인의 사회문화적 욕구를 충족시킬 수 있으며, 이를 위한 방법으로 생균제 또는 효모제를 이용한 백신의 연구 및 개발이 절실히 필요로 하게 되는 것이다.

이에 본 연구를 통해 개발된 산업화 적용 기술은 항원 발현 효모의 효과적인 사용을 가능하게 하여 양돈 농가에서의 돼지 흉막폐렴 예방을 적극적으로 유도 할 수 있을 것이다. 국가기간 산업인 축산업이 시장개방과 함께 존폐의 의지를 맞고 있는 열악한 환경에서 본 연구는 사료 첨가제 개발의 기반 기술의 확립한다는 데 의미가 있으며, 이를 통해 축산의 생산성 증대를 통하여 농업 기반의 견실한 구축에 일익을 담당할 것으로 판단된다. 또한, 사료 첨가용 효모의 개발은 고부가가치 생산물의 개발 측면 외에도 본 기술을 이용한 새로운 사료 첨가제의 개발로 축산업을 포함한 농업의 안정적인 생산기반 유지에 큰 기여를 할 것으로 생각된다.

제 3 절 연구범위

1. 돼지 흉막폐렴 예방을 위한 효모 백신 개발의 기초연구

- 가. 돼지 흉막폐렴 원인균의 병원성 유전인자 분석
- 나. 돼지 흉막폐렴 원인균의 항원단백질 및 다클론 항체 생산
- 다. 돼지 흉막폐렴에 대한 형질전환 효모 백신 평가 기법 개발

2. 돼지 흉막폐렴균 항원 발현 효모 형질전환체 개발

- 가. 돼지 흉막폐렴균 Apx toxin 항원 단백질의 효모세포 내 발현하는 효모 개발
- 나. APXIIA 독소단백질의 효모 세포표면에 발현하는 효모 개발
- 다. 돼지 흉막폐렴균 독소 단백질의 점막면역계 targeting을 위한 리간드의 활용

3. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 체계 구축

- 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 시스템 구축 및 최적 조건 선정

4. ApxII 항원단백질 발현 효모를 이용한 실험동물 및 목적 동물에서의 경구면역 평가

- 가. 실험동물(마우스) 및 목적동물(돼지)에서 형질전환 효모의 경구면역 유도 평가
- 나. 돼지 흉막폐렴 예방효과 극대화를 위한 형질전환 효모 투여량의 최적화
- 다. 형질전환 효모의 ApxIIA 항원단백질 경구 제시 평가

5. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 공정 개발

- 가. 재조합 효모 대용량 배양 후 농축을 위한 최적 공정의 탐색
- 나. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 제품 제형 확립

6. 사료첨가제형 Apx 항원 단백질 발현 형질전환 효모의 야외 효능 평가

가. 형질전환 효모의 야외 농장 적용

나. 형질전환 효모의 경구 면역 유도능, 임상증상, 호흡기질병 발생 및 폐사개체 발생률 평가

제 2 장 연구 개발의 국내외 기술개발 현황

제 1 절 사료 첨가제로서의 Yeast 이용에 관한 연구

효모는 사료 첨가제로서 이미 여러 방면에 대해 연구가 진행되어왔고, 유용단백질을 생산하기 위한 발현 시스템으로도 다양한 분야에 이용되고 있다. 그 중에 사료 첨가제로서 사용된 경우를 살펴보면 유용 단백질 발현에 대한 연구가 많으며 주로 양계 산업에서 많은 시도가 있었다. 그러나 축산업에서 질병 원인체의 중요 항원을 발현 하여 이를 이용한 질병예방효과를 기대하기 위한 연구는 아직 미흡한 편이다.

연구수행 기관	연구 개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
충남대학교 (이봉덕, 2004)	고수준 Thr, Trp 함유 효모 사료 첨가제 개발에 관한 연구	연구 개발 완료
성균관대학교 (신형태, 1999)	가축 사료 효율 증진 및 대사장애 예방을 위한 Direct fed Microbial (DFM) 개발에 관한 연구	연구 개발 완료
강릉대, 수산진흥원 (이상민, 2000)	참전복 배합사료의 첨가제로서 <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Candida utilis</i> , 빵 효모 및 맥주 효모의 이용성에 관한 연구	연구 개발 완료
South Dakota state University, USA (Schigoetha, 2004)	하절기 산유소에서 효모 사료첨가제 (Fed-yeast)의 사료 효율성에 대한 연구	연구 개발 완료
Oscar large Aca. (T. Miskiewicz, 1996)	Baker's 효모 pilot 생산에서 실시간 사료 섭취률에 대한 연구	연구 개발 완료
Agricultural College and research Institute, India (Sudha, 2005)	양계의 대체 사료로서의 Distillery Teast Sludge (DYS)에 관한 연구	연구 개발 완료
Russel Research Center, USA (Line JE, 1998)	양계에서 효모가 첨가된 사료의 살모넬라와 캠필로 박터의 억제 효과에 대한 연구	연구 개발 완료

제 2 절 흉막폐렴균에 대한 점막 면역 유도에 관한 연구

돼지 호흡기 질병 중 중요한 부분을 차지하는 돼지 흉막폐렴에 대한 연구는 원인균 자체의 병원성인자 분석 및 질병예방을 위한 효율적인 백신 개발에 주로 초점이 맞추어져 왔다. 현재 까지 개발된 돼지 흉막폐렴의 백신은 주사를 통한 방법이 대부분이고, 최근 aerosol spray 법에 의한 방법들이 실험적으로 진행되고 있다. 돼지 흉막폐렴은 원인균이 주로 호흡기, 특히 점막을 통하여 감염되고, 폐 내에서 질병을 유발하기 때문에 이 질병의 효율적인 예방을 위해서는 점막 면역의 유도가 필수적이다. Spray 법의 경우는 백신물질을 aerosol 상태로서 spray 하기 위해서는 특수한 기구 및 접종을 위한 전문가가 필요하다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 흉막폐렴의 주요병원성 인자를 발현하는 Yeast를 이용한 사료 첨가제를 개발하고자 한다.

흉막폐렴균에 대한 예방은 그 동안 주사제를 통한 예방이 대부분이었으나 oral vaccine을 통한 점막 면역 유도에 관한 시도가 일부 진행되었다. 대부분 불활화 또는 세포 구성 분 일부를 분리하여 사용한 항원을 이용하여 비강이나 구강을 통해 면역을 유도하였다. 그러나 그 효능에 대하여는 아직까지 많은 의문점을 제기하고 있다.

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
전북대학교 (장용석, 2006)	ApxIIA를 발현하는 transgenic 담배잎을 이용하여 흉막폐렴에 대한 예방 효과에 대한 연구	연구 개발 완료
서울대학교 (유한상 2005)	ApxIIA 발현 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 을 마우스에 경구투여후 면역반응 및 방어능에 대한 연구	연구 개발 완료
Pig research Institute (Weng CN, 2003)	Co-spray drying process를 이용하여 microsphere로 변형시킨 불활화한 흉막폐렴 항원의 구강내 접종 및 항원성에 관한 연구	연구 개발 완료
CSIRO division of Animal Health (Prideaux CT, 1999)	ApxII 오페론의 변이를 이용한 조직 특이적인 흉막폐렴에 대한 백신 개발에 관한 연구	연구 개발 완료
University Vienna (Hensel A, 1996)	공기와 구강을 통한 흉막폐렴 후보 백신의 면역 유도에 대한 연구	연구 개발 완료
Kyoto Biken Laboratories (Okobe T. 1995)	흉막폐렴균의 cell-free antigen의 예방효과에 대한 연구	연구 개발 완료
University Vienna (Andres, 1995)	폐포와 전신 면역 유도를 위한 생 또는 불활화 흉막폐렴균의 구강내 접종법에 관한 연구	연구 개발 완료

흉막폐렴에 대한 연구 중에 효모에 항원을 발현하여 면역을 유도한 연구는 본 실험실 외에는 없으며, 실험실적으로 이미 그 효능이 입증되었다. 실험실적 접근을 통해 구강을 통해 점막 면역이 유도됨을 확인하였고, 사료 첨가제로서 적용 시에도 흉막폐렴에 예방 효과가 있음이 밝혀져, 이에 상용화 및 산업화를 계획, 추진 중이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 서론

국내 가축질병으로 인한 경제적 손실은 양돈 산업의 경우 6,953~11,840억 원에 달하는 것으로 알려졌으며 (한국농촌경제연구소, 2006), 돼지콜레라와 같은 심급성 질병이 예방접종 정책으로 전환되면서 발생이 급감하였으나, 실제적으로는 더 많은 경제적 피해를 주는 급·만성 전염병이 다발하는 경향을 나타내고 있다 (월간 양돈, 2003년 10월호).

농가 및 국가 손실, 전염성 과 국내 발생률에서 7대 돼지의 주요 질병인 돼지 흉막폐렴 (한국농촌경제연구소, 2006)은 급성으로 발생할 경우 돼지에서 이환율과 사망률이 매우 높으며, 출혈성, 괴사성 폐렴과 섬유소성 흉막염이 주 특징이며, 만성으로 진행되는 경우에는 폐에 작은 병변만을 나타내지만, 만성 감염된 돈군에는 중체율의 감소, 낮은 사료 효율성과 출하 지연 등으로 양돈 산업에 막대한 경제적인 피해를 주는 질병이다. 일령에 관계없이 감수성을 나타내나 특히 20~50kg의 육성돈에서 부터 출하기의 비육돈까지 발병하며, *A. pleuropneumoniae*가 생산하는 독소를 중화하는 항체를 가지고 있느냐에 따라서 감수성이 달라질 수 있는데, 이는 초유항체가 유지 여부가 6주에서 8주령 돼지에서 돼지 흉막폐렴의 진행에 영향을 미칠 수 있다 (Bosse and MacInnes, 2000; Chiers et al., 2002).

돼지 흉막폐렴의 주요 병원성 인자는 outer membrane proteins, capsular polysaccharide, lipopolysaccharides, adhesion factors 와 exotoxin (Apx toxin)이 있다 (Bosse and MacInnes, 2000; Dubreuil et al., 2000; Frey, 1995). 돼지 흉막폐렴의 병원성은 여러 인자들에 의해 복합적으로 결정되지만, 특히 Apx toxin의 생산과 깊이 관련되어 있으며, Apx toxin은 방어적 면역을 유도하는데 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다 (Anderson et al., 1991; Fuller et al., 2000; Prideaux et al., 1999; Reimer et al., 1995; Tascon et al., 1994).

가축의 세균성 질병의 치료 및 예방의 목적으로 지속적, 간헐적인 항생물질의 사용은 질병의 급성 발생에서 효과적일 수 있지만, 항생제 내성 균주의 발생을 유도하고 이들 항생제가 잔류 (미국 GAO 보고서) 할 수 있어 위생적인 사양관리와 함께 효과적인 백신 개발이 필요하다. 돼지 흉막폐렴 백신뿐만 아니라 그 외의 돼지 질병에 대한 백신들은 대부분 주사제 형태로 개발되어있으며, 이는 백신의 부작용과 백신 과정의 노동 집중적 영향 및 스트레스 유발 등 문제점들을 가지고 있다. 또한 병원체가 주로 구장, 비강, 폐, 결막 및 질에 이르는 점막을 통해 감염되므로, 질병의 효율적인 예방을 위해서 점막면역의 유도가 필수적이다 (Bosse and

MacInnes, 2000). systemic immune response (IgG)만 유도할 수 있었던 기존의 주사백신과 달리 점막 백신은 systemic immune response (IgG)뿐만 아니라 mucosal immune response(IgA) 또한 유도할 수 있는데, 호흡기 점막의 plasma cell에서 생성되어 분비된 specific IgA는 병원체 및 독소 생성물의 흡수를 막는 역할을 한다 (Silin and Lyubomska, 2002; Cox et al., 2002; Dietrich et al., 2003; Lauterslager et al., 2003). 산업 동물에서 주사접종의 문제점을 극복하기 위한 'Needle-free delivery'로서 사료에 첨가하는 형태의 경구백신은 접종의 수월성과 접종에 요구되는 전문 의료인력 투입의 불필요성에 따른 접종의 경제성과 장점막에 부착하여 지속적으로 면역반응을 유도할 수 있는 장점이 있다 (Thanavala et al., 2005; Thanavala et al., 1995; Wigdorovitz et al., 1999).

본 연구에서 형질 전환체 경구 백신의 대상으로 고려하는 효모(*Saccharomyces cerevisiae*) 자체에 안전한 미생물로서 GRAS(Generally Recognized As Safe) organism이며, 안정적이고, 장에서 비병원성, 비침습적인 특성 때문에 사료첨가제 형태로 적용되어져 왔다. 또한, 취급이 용이하고 저렴하게 백신을 생산 할 수 있는 장점이 있다 (Schreuder et al., 1996a; Schreuder et al., 1996b; Stubbs et al., 2001).

따라서, 본 연구에서는 효모의 발현 벡터를 이용해 돼지 흉막폐렴 독소 (Apx toxin)를 발현시키는 *S. cerevisiae* 대량 생산 및 일반 농장에서 실질적으로 사용할 수 있는 산업화 기반 시설 구축에 관한 연구 및 평가를 실시하고자 하며, 위에 언급된 효모의 장점과 흉막폐렴의 독소를 분비하는 효모를 사료 첨가제로 사용하여 준 백신 수준의 면역 유도체로서 질병 예방 효과를 얻고자 한다. 또한 기존의 발현 시스템을 개선하여 효모의 이러한 장점을 바탕으로 항원유전자를 점막면역계 targeting strategy를 부가하여 발현하며, 이를 통하여 효모에 면역 활성이 있는 단백질을 발현시켜 가축의 항병성 사료 첨가물로서 사용될 수 있는 경구제제용 새로운 효모제제를 개발하고자 한다.

본 연구진은 선행연구에서 ApxI 및 ApxII 독소 단백질을 효모 내에서 발현시킨 선행연구를 바탕으로 경구 백신으로서 장내에서 항원성의 효율을 높이기 위해 효모의 세포 표면에 항원을 발현하는 기술을 개발하였으며 (Tamaru et al., 2006), 또한 장내 M cell에 특이적으로 결합하는 ligand를 탐색하고 Apx toxin과 ligand의 fusion protein을 발현하는 재조합효모를 개발하여 장내 targeting하는 기술을 개발하였다 (Arakawa et al., 1997; Arakawa et al., 1998; Chikwamba et al., 2002). 새로 개발된 형질전환 효모를 실험동물, 목적동물(돼지)에서 경구 접종 후 국내 야외 분리 균주 *A. pleuropneumoniae*로 공격 접종을 실시하여 백신의 효능을 확인하였다 (Chien et al., 2009; Durrani et al., 1998; Gao et al., 2003; Haq et al., 1995; Jiang et al., 2008; Kapusta et al., 2001; Sandhu et al., 2000). 효모의 대량배양을 위한 발효 조건을 확립하고 동결건조에 따른 균주 안정성을 위해 동결 건조 보호제 및

부형제를 탐색하고, 효모의 시제품 제작 및 시제품의 안정성 평가를 수행하여 사료첨가제형 제품을 확립하였다. 형질전환 효모백신의 사료첨가제 시제품을 야외농장에서 경구 접종하여 면역 유도 및 임상증상, 호흡기 질병 발생률 저하를 확인할 수 있었다.

연구 개발된 형질전환 효모 개발 기술, 미생물 대량배양 및 사료첨가제형 확립 기술 그리고 돼지에 경구백신 적용 및 백신 효능 평가기법은 돼지 흉막폐렴 이외에도 다른 질병에 적용이 가능할 것으로 기대된다.

제 2 절 연구범위 및 연구수행 방법

1. 돼지 흉막폐렴 예방을 위한 효모 백신 개발의 기초연구

가. 돼지 흉막폐렴 원인균의 병원성 유전인자 분석

국내 가축 시료로부터 분리 동정된 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2와 5를 이용하여, *apxIA*, *apxB*, *apxIIA*, *apxIII*A 및 *apxIV*A에 대한 PCR을 실시하여 독소형을 분석하였다. 분석된 균주로부터 병원성 유전인자를 분이하여 후속 실험에 사용하였다.

나. 돼지 흉막폐렴 원인균의 항원단백질 및 다클론 항체 생산

대장균 시스템에서 재조합 Apx toxin을 발현, 정제하였고, 이를 토끼에 접종하여 Apx toxin에 대한 mono-specific polyclonal antibody를 제조하였다. 확보된 유전자, 항원 단백질 및 항체는 백신 개발 및 백신 효능 평가에 사용되었다.

다. 돼지 흉막폐렴에 대한 형질전환 효모 백신 평가 기법 개발

돼지 흉막폐렴 백신 효능 평가를 위해, 재조합 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA에 대한 ELISA 기법을 개발하였고, 이를 국내 야외돼지 혈청에 적용하여, 국내 야외 농장에서의 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA에 대한 sero-prevalance를 조사하였다.

2. 돼지 흉막폐렴균 항원 발현 효모 형질전환체 개발

가. 돼지 흉막폐렴균 Apx toxin 항원 단백질의 효모세포 내 발현하는 효모 개발

(1) ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA 유전자의 효모 세포내 발현을 위한 recombinant 벡터 제작

ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA 독소 단백질 발현량이 높은 재조합효모를 확보하기 위하여 recombinant vector를 rice *amy1A1* signal peptide의 융합으로 인하여 세포 밖으로의 분비를 유도하도록 recombinant 벡터 제작에 성공하였다.

(2) 효모의 형질전환 및 형질전환체 분석

S. cerevisiae Y2805 또는 A7 균주를 배양하여 LiAc를 처리한 후 형질전환을 위해 제작한 4 종류의 재조합 벡터들로 각각 형질전환 하였다. 형질전환체의 DNA를 분리하여 PCR

및 Back transformation 방법에 의해 형질전환 유무를 확인하였다.

(3) Apx 유전자의 효모 세포 내 발현 확인여부

형질전환체 내에서 target 유전자 및 target 단백질의 발현정도를 검정하기 위해서 Northern blot 및 Western blot을 이용하여 분석하였다.

(4) 재조합효모의 면역유도 특성 검정여부

발현량을 높이기 위해 새롭게 제작된 ApxIA, ApxIIA과 ApxIIIA 형질전환체 각각을 배양하여 경구접종용으로 준비한 후 공동연구진에 각각의 Apx 독소를 발현시킨 재조합 효모를 분양하였다. 사료에 준비된 재조합 효모를 기간 별로 경구투여한 후 경구 투여된 실험동물을 대상으로 minimal lethal dose 및 IgG의 수치가 공동연구진에 의해 검정되었다.

나. APXIIA 독소단백질의 효모 세포표면에 발현하는 효모 개발

(1) Apx 효모 세포표면 발현-재조합 효모 개발을 위한 recombinant vector 제작

표면발현에 필요한 anchoring 단백질은 α -agglutinin의 C-terminal domain의 유전자와 partial ApxIIA의 core epitope인 ApxIIA#5 (Apx5)의 유전자의 fused fragments를 제한효소로 절단한 후 효모의 episomal vector인 YEpGPD에 cloning 하였다.

(2) 효모의 형질전환 및 형질전환체 분석

(가) ApxIIA epitope (Apx5)의 효모 세포표면 형질전환체

S. cerevisiae Y2805 또는 A7 균주를 배양하여 LiAc를 처리한 후 형질전환을 위해 제작한 4 종류의 재조합 벡터들로 각각 형질전환 하였다.

(나) ApxIIA 독소단백질의 효모 세포표면 형질전환체

ApxIIA epitope (Apx5)의 세포 표면발현 이외에 ApxIIA full 유전자의 표면발현 또한 시도하여 효모 형질전환체를 확보하였다.

(3) ApxIIA의 효모 세포내 및 표면발현 확인여부

(가) ApxIIA epitope (Apx5)의 효모 세포내 및 표면발현 형질전환체 발현확인

형질전환체 내 및 효모 세포벽에서 target 유전자의 발현정도를 검정하기 위해서 재조합 효모로부터 단백질을 분리한 후 SDS-PAGE 및 Western blot analysis를 수행하였다. 또한, 재조합 효모에 immunostaining을 수행하여 준비된 시료를 confocal microscope에서

관찰하였다.

(나) ApxIIA의 효모 세포표면 형질전환체 발현확인

Western blot analysis와 immunostaining등의 실험과정을 통해 ApxIIA full 유전자의 효모 세포 표면발현에 성공을 확인하였다.

(4) 재조합효모의 면역유도 특성 검정여부

Apx 형질전환체를 배양하여 경구접종용으로 준비한 후 재조합 효모를 기간 별로 mouse에 경구 투여한 후 IgG의 수치를 조사하여 immunoassay를 수행하고, mouse 개체에 흉막폐렴균(*A. pleuropneumoniae*)을 감염시켜 challenge assay실험을 수행하여 방어적 면역유도능을 확인하였다.

다. 돼지흉막폐렴균 독소 단백질의 점막면역계 targeting을 위한 리간드의 활용

(1) M cell에 특이적으로 결합하는 ligand의 개발

본 연구에서는 사전 연구를 통해서 확인된 M-cell 특이적으로 binding affinity가 높은 두 종류의 12-mer peptide ligand를 Apx 독소 단백질의 N-terminal에 fusion 시켜 발현한 뒤 면역 유도의 효과를 검정하였다.

(2) M cell에 특이적으로 결합하는 ligand Co1과 Apx 독소의 융합 재조합효모 제작

M cell에 특이적으로 결합하는 ligand Co1과 ApxIIA#5의 N-terminal과 C-terminal 각각에 overlapping PCR을 이용하여 융합한 후 recombinant vector를 각각 제작하였다. *S. cerevisiae* Y2805 균주를 배양하여 LiAc를 처리한 후 형질전환을 위해 제작한 2 종류의 재조합 벡터들로 각각 형질전환 하였다.

(3) 재조합효모의 면역유도 특성 검정여부

M cell에 특이적으로 결합하는 ligand Co1과 Apx 독소의 융합 재조합효모 제작 후 경구 접종용으로 배양하여 공동연구진에 의해 활용되도록 제공되었으며, 사료에 준비된 재조합 효모를 기간 별로 경구투여한 후 경구 투여된 실험동물을 대상으로 minimal lethal dose 및 IgG의 수치가 공동연구진에 의해 검정 중이다.

3. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 체계 구축

가. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 시스템 구축 및 최적 조건 선정을 위한 플라스크 배양

Lab. scale에서 선행 연구된 조건에 대한 scale up 적용여부 평가를 실시하고, 기초적인 개발균주에 대한 실험실적 배양조건 및 pilot scale 배양조건의 상관관계 분석하였다.

나. 생물반응기를 이용한 재조합 효모의 대량 생산 시스템 구축 및 최적 조건 선정

원가절감을 위한 배지 성분 및 조성 평가하고, 고농도 배양 조건에 따른 생균수 변화 측정을 측정하여 대량 생산을 위한 최적 조건을 선정하였다.

다. 500 L 생물반응기를 이용한 재조합 효모의 대량 생산 시스템 구축

앞서 실시한 발효 결과를 바탕으로 재조합 효모의 대량 생산 시스템을 구축하기 위해 500 L 원통형 생물반응기(bioreactor)를 이용하여 발효 조건을 scale up 하였다.

4. ApxII 항원단백질 발현 효모를 이용한 실험동물에서의 경구면역

가. 실험동물(마우스)에서 형질전환 효모의 경구면역 유도 평가

(1) 마우스 모델에서 형질전환 효모에 대한 항체가 측정

실험동물(마우스)에서의 경구 면역을 위해 경구 면역군과 음성 대조군을 편성하고 면역계획에 따라 면역을 실시하였다. 확립된 ELISA 분석법에 기초하여, serum에서 ApxIIA에 대한 특이 IgG 및 IgA 항체가를 조사하여 분석하였다.

(2) 돼지 흉막폐렴 예방효과 극대화를 위한 형질전환 효모 투여량의 최적화

돼지 흉막폐렴 예방효과 극대화를 위한 형질전환 효모 투여량의 최적화 하기위하여, 실험동물(마우스)에서 형질전환 효모에 대하여 투여량을 여러 구간으로 선정하여 경구면역을 실시하였다. 채취한 serum, saliva 및 fecal sample 샘플에 대하여 ELISA를 시행하여 ApxIIA 특이 IgG와 IgA에 대하여 분석하였다.

나. 형질전환 효모의 ApxIIA 항원단백질 경구 제시

(1) 분변 내 yeast의 분리 및 동정

형질전환 효모가 경구 면역을 위한 사료첨가제용으로서 생존하여 장관까지 효과적으로

전달 될 수 있는지 확인하고자, 실험동물에서 형질전환 효모의 경구면역 실험에 적용되는 효모의 상태와 활성을 파악하였다. 경구 투여 후 형질전환 효모를 투여한 군의 분변에서 형질전환 효모 균주(*Saccharomyces cerevisiae*)를 분리 동정하였다.

(2) ApxIIA 항원 단백질 발현 형질전환 효모의 항원단백질 제시 분석

장 내에 전달된 형질전환 효모의 항원단백질 제시에 대해 분석하기 위하여 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)을 시행하였다. 실험동물에서 형질전환 효모를 경구 투여한 후 소장 부분을 고정한 후 동결절편을 만들었다. 제작한 동결 절편에 면역조직화학염색법을 수행하였고, 마우스 장 조직 내 ApxIIA 항원단백질에 대한 면역조직화학염색법의 조건을 확립하였다.

(3) ApxIIA 항원 단백질 발현 형질전환 효모의 효과적인 항원단백질 제시 방법 연구

백신의 장내 생존률을 높이고 효과적으로 면역 반응을 유도하도록 도와줄 수 있는 adjuvant의 사용에 대한 연구로서, adjuvant로서 널리 이용되는 chitosan을 이용하여 분석 기법을 확립하였다. 실험동물에서 FITC를 표지한 형질전환 효모 유래 ApxIIA가 소장에서 uptake되는 것을 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)으로 관찰하였다.

5. ApxII 항원단백질 발현 효모를 이용한 목적동물(돼지)에서의 흉막폐렴 모델의 확립

가. 돼지에서의 형질 전환 효모의 경구 접종

형질전환하여 확보한 효모, *S. cerevisiae* 을 동결건조한 후 파쇄하여 분말을 준비하고, 사료와 혼합하여 급여하였다. 효모 분말과 혼합된 사료를 3주령 자돈에 7일 간격으로 3회, 자유급식 형태로 2일간 급여하였다.

나. 형질전환 효모의 경구 면역 유도능 평가

(1) Swine alveolar macrophage에서 형질전환 효모에 대한 cytokine 측정

In vitro에서 형질전환 효모의 면역 유도능을 살펴보기 위하여, swine alveolar macrophage를 분리하고, 형질전환 효모를 자극하여 분비되는 cytokine을 측정하였다.

(2) Apx에 대한 specific IgG 및 IgA 항체가 측정

형질 전환 효모의 경구 투여로 유도된 Apx 특이 IgA, IgG 항체가 검사를 위해, 채취된 시료 내 Apx 특이 IgA, IgG 항체가는 앞에서 확립된 ApxIA, ApxIIA-ELISA 기법에 기초하여 측정하였다.

다. 돼지 흉막폐렴에 대한 방어능 평가

(1) 공격접종 및 공격접종에 따른 임상증상

A. pleuropneumoniae serotype 5를 기관 내(intrabronchial inoculation) 와 비강내(intranasal inoculation)로 주입하였다. 공격접종 후 10일 동안 3일 간격으로 백신 접종에 의한 방어능의 차이를 생존률, 임상증상, 운동성, 사료섭취, 직장온도 측정의 항목으로 군별로 비교 평가하였다.

(2) 공격접종에 따른 병리 해부학적 진단

공격접종 10일 후 전 두수에 대하여 부검을 실시하여, 부검 후 폐의 육안병변을 확인하고, 폐에 전반적인 병변 지수를 판정하여 scoring 하여 산출하였다.

(3) 실험돈 폐에서 공격접종 균의 colonization 실시

공격접종 후 실험돈의 폐에서 공격접종균의 clearance를 알아보고자, 부검실시 후 폐조직을 유제조직을 만들고 plating하여 공격접종 균의 colony수를 세어 산출하였다.

(4) 실험돈 폐의 병리, 조직학적 관찰

각 실험 개체로부터 채취한 폐 조직을 고정하고 조직 슬라이드를 제작하여 조직학적 관찰을 실시하여 score를 산출하였다.

6. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 공정 개발

가. 재조합 효모 대용량 배양 후 농축을 위한 최적 공정의 탐색

재조합 효모를 500 L 생물반응기로 고농도 배양 후 세포 농축 및 회수를 위한 최적 공정 탐색을 실시하였다. 세포의 농축 및 회수하는 방법으로는 대용량 원심분리기를 이용하여 고체-액체상을 분리하였고, 효모를 회수한 뒤 동결건조 과정을 실시하였다. 동결건조 과정 후 사균수와 생균수의 수율을 산출하여 분석하였다.

나. 돼지흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 제품 제형 확립

(1) 동결 보호제 탐색

동결건조 과정에서의 cell viability 증가를 위한 최적의 동결건조 보호제 탐색 및 평가를 실시하였고, 동결건조 후 제품제형 확립을 위한 적절한 부형제 탐색 및 부형제 종류에 따른 cell viability 평가하였다.

(2) 보관 온도에 따른 시제품 안정성 평가

시험 생산된 동결건조 재조합 효모의 안정성 평가를 위하여 1주일 간격으로 생균수 (viable cell; CFU/g)를 측정하여 안정성을 평가하였다.

(3) 부형제 종류에 따른 시제품 안정성 평가

돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료첨가제 제품 제형 확립을 위하여 시제품을 생산하였고, 시험 생산된 시제품에 부형제를 각각 혼합하여 실온 및 저온에서 안정성 평가를 실시하였다.

7. Apx 항원단백질 발현 효모 형질 전환체의 야외 효능 평가

가. 형질전환 효모의 야외 농장 적용

과거 돼지 흉막폐렴 및 돼지 호흡기 질병의 발생이 있고, 호흡기 백신투여를 하지 않은 농장을 선정하여, 농장의 3주령의 교접종 돼지 약 100두에 형질전환 효모의 사료첨가제 형태인 백신을 사료와 혼합하여 급여 프로그램에 따라 급여하였다.

나. 형질전환 효모의 경구 면역 유도능 및 방어능 평가

형질 전환 효모의 경구 투여로 유도된 Apx 특이 IgA, IgG 항체가 검사를 위해 serum 및 fecal swab에서 항체가를 측정하였다. 그리고 시험 기간 동안의 임상증상, 폐사돈 발생 및 호흡기 질병 발생률에 대하여 분석하였다.

제 3절 연구개발 결과

1. 돼지 흉막폐렴 예방을 위한 효모 백신 개발의 기초연구

가. 돼지 흉막폐렴 원인균의 병원성 유전인자 분석

국내 가축시료로부터 분리 동정된 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2와 5를 이용하여, *apxIA*, *apxB*, *apxIIA*, *apxIII*A 및 *apxIV*A에 대한 PCR (Table 1)을 실시하여 독소형을 분석하였다 (Rayamajhi et al., 2005). PCR 조건은 initial denaturation으로 94°C에 5분, 35cycle동안 94°C, 30초 동안 denaturation, 60°C, 30초 동안 annealing, 72°C, 3분 동안 extension하였고, Final extension을 72°C, 10분 동안 하였다. *A. pleuropneumoniae* serotype 2에서는 *ApxIB*, *ApxII*, *ApxIII* 와 *ApxIV*A의 독소형을 보였고, *A. pleuropneumoniae* serotype5에서는 *ApxIA*, *ApxIB*, *ApxII* 와 *ApxIV*A의 독소형을 보였다 (Figure 1). *ApxIA*는 *A. pleuropneumoniae* serotype 5에서 증폭하였으며, *ApxIIA* 와 *ApxIII*A는 *A. pleuropneumoniae* serotype 2에서 증폭하여 실험을 진행하였다.

Table 1. Oligonucleotide sequences of primers

<i>NAME</i>	<i>Sequences (5'-3')</i>	<i>Genbank accession no.</i>	<i>Region</i>
APXIAF	ATC GAA GTA CAT CGC TCG GA	X52899	275-998
APXIAR	CGC TAA TGC TAC GAC CGA AC	X52899	
APXIBF	TTA TCG CAC TAC CGG CAC TT	X68595	4102-4193
APXIBR	TGC AGT CAC CGA TTC CAC TA	X68595	
APXIIF	GAA GTA TGG CGA GAA GAA CG	AY736188	973-1938
APXIIR	CGT AAC ACC AGC AAC GAT TA	AY736188	
APXIIIF	GCA ATC AGT CCA TTG GCG TT	X80055	9558-9954
APXIIIR	GAC GAG CAT CAT AGC CAT TC	X80055	
APXIVAF	TGA CAA AAT TAA CTA TGC AAG A	AF021919	1-1500
APXIVAR	ACT TTT TAA CTT TTT AAC GGC GG	AF021919	

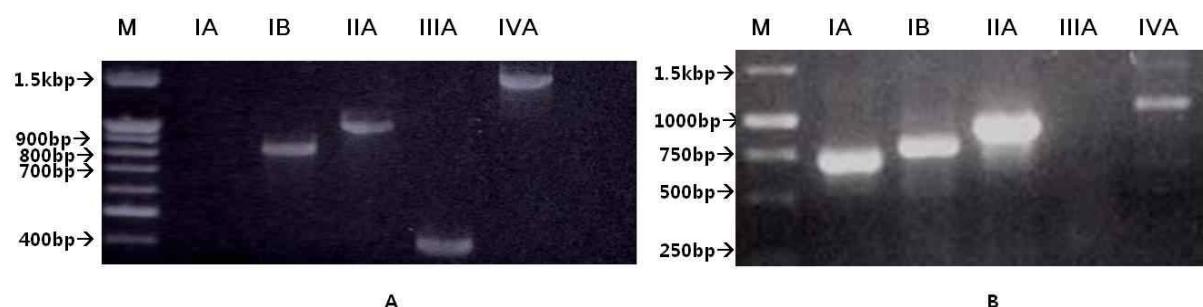


Figure 1. Toxigenic type analysis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2(A) and 5(B). Lane M: DNA size marker(100bp), IA: *apxA*(723bp), IB: *apxB*(811bp), IIA: *apxIIA*(965bp), IIIA: *apxIIIA*(396bp), IVA: *apxIVA*(1.5kbp), Ne: Negative control

나. 돼지 흉막폐렴 원인균의 항원단백질 제조

(1) ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA에 대한 재조합 단백질 제조

돼지 흉막폐렴 항원유전자를 발현하는 형질전환 효모 개발 및 백신 평가 실험을 수행하기 위해서 항원단백질 및 항체의 확보는 필수적이므로, 재조합 항원단백질 및 항체의 생산을 수행하였다. *apxIA*, *apxIIA* 및 *apxIIIA*에 대한 primer (Table 2)를 제작하여 증폭한 후 발현벡터인 pQE를 이용하여 대장균발현 시스템에서 재조합단백질을 발현하였다. *apxIA*, *apxIIA* 및 *apxIIIA*를 가진 것으로 확인된 clone들 중 단백질 발현량이 가장 많은 clone을 선택하였으며, Ni-NTA agarose column을 이용하여 정제 조건을 5가지로 선정하여 최적 정제조건을 위한 실험을 수행하였다 (Figure 2). 1번째 조건은 8M urea buffer의 pH차이에 의해서 정제하는 것이고, 2 ~ 4번째 조건은 8M urea가 첨가되지 않은 phosphate buffer에서 imidazole 농도차이에 의한 정제방법이며, 2 ~ 4번의 lysis buffer의 imidazole 농도를 20, 30 그리고 40mM 차이를 주었다. 5번은 8M urea buffer의 imidazole 농도의 차이에 의한 정제방법이었다. 재조합 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA 단백질이 8M urea가 첨가된 lysis buffer를 이용한 조건에서 정제를 할 수 있었으며, 이는 재조합 항원 단백질이 insoluble한 형태로 발현되는 것으로 생각되었다. 8M urea lysis buffer에서 40mM imidazole의 농도로 최적화하여 재조합 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA를 정제하여 SDS-PAGE 와 Western blot에서 확인하였다 (Figure 3). 그리고 순수 정제된 재조합 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA의 항원성 검증을 위하여, ApxI, ApxII, ApxIIIA 및 OMP를 포함한 subunit vaccine을 접종받은 양성돼지 혈청을 이용하여 Western blot으로 확인하였다 (Figure 4).

(2) 재조합 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA에 대한 mono-specific polyclonal antibody 생성

뉴질랜드 화이트 암컷, 체중 2kg (3~4개월령)에 정제된 재조합 ApxIA, ApxIIA 와 ApxIIIA를 2주 간격으로 4번 접종하였다. 첫 번째 투여에는 항원과 FCA(Freund Complete Adjuvant)의 비율을 1:1로 혼합하였고, 두 번째 투여부터는 항원과 FIC(freund Incomplete Adjuvant)의 비율이 1:1이 되도록 혼합하여 양쪽 뒷다리와 등쪽 피하에 나누어 접종하였다. 항원의 접종농도는 ApxIA, 500 μ g/ml; ApxIIA, 200 μ g/ml; 그리고 ApxIIIA, 500 μ g/ml를 투여하였다. 2주 간격으로 귀정맥에서 10ml씩 채혈한 후, 채혈한 혈액을 4°C에서 24시간 clotting한 후 원심분리(3000rpm, 10분)하여 혈청을 분리하였다. 혈청에서 항원에 대한 항체가 상승을 확인하여 면역원성을 확인하였다 (Figure 5). 마지막 접종 2주일 후 심장을 통한 전채혈을 실시하였고, 분리된 혈청을 Protein G column을 사용하여 rabbit IgG를 분리하였다 (Figure 6). 토끼에서 생성된 항혈청의 항체가 수준을 결정하기 위하여 재조합 ApxIA, ApxIIA 및

ApxIIIA 항원($1\mu\text{g}/\text{ml}$)을 이용하여 ELISA를 실시하여 P/N value가 3이상인 최고 혈청 희석 배수를 항체가로 결정하였다 (Figure 7).

Table 2. Primers used for cloning and expression of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA

		Primer sequences (5' -3')	PCR parameter*
Apx IA (2269–3069)	Forword	GGAGACGACGGTAATGATGTA	94, 57, 72 20s, 10s, 60s
	Reverse	TTAACAGATTGTGTTAAATAATTACT	
Apx IIA (1–2883)	Forword	GGATCCATGTCAAAAATCACTTTGTCA	94, 60, 72 20s,10s, 120s
	Reverse	GGATCCTTAAGCGGCTCTAGCTAATTG	
Apx IIIA (760–1374)	Forword	AGCTTACTTTCAGGAGTAAGTGCA	94, 56, 72 20s, 10s, 60s
	Reverse	AGCTTTATGACGAGCATCATAGC	

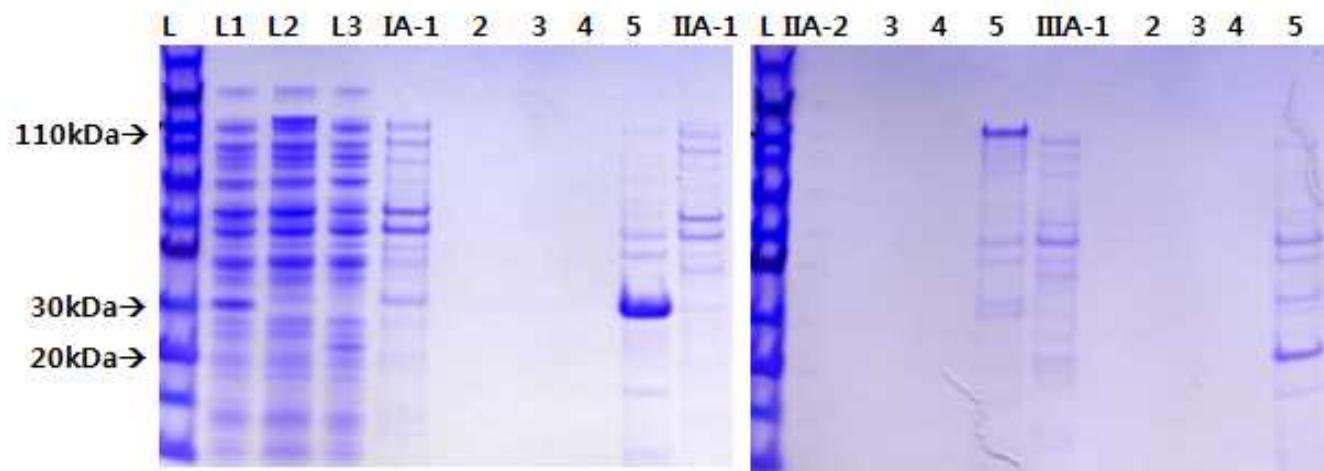


Figure 2. Optimization of recombinant ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa purification. L, prestained protein molecular mass marker (kDa); L1, ApxIA Induction; L2, ApxIIA Induction; L3, ApxIIIa Induction; ApxIA- 1 ~ 5, ApxIA Elution (condition 1 ~ 5); ApxIIA- 1 ~ 5, ApxIIA Elution (condition 1 ~ 5); and ApxIIIa- 1 ~ 5, ApxIIIa Elution (condition 1 ~ 5).

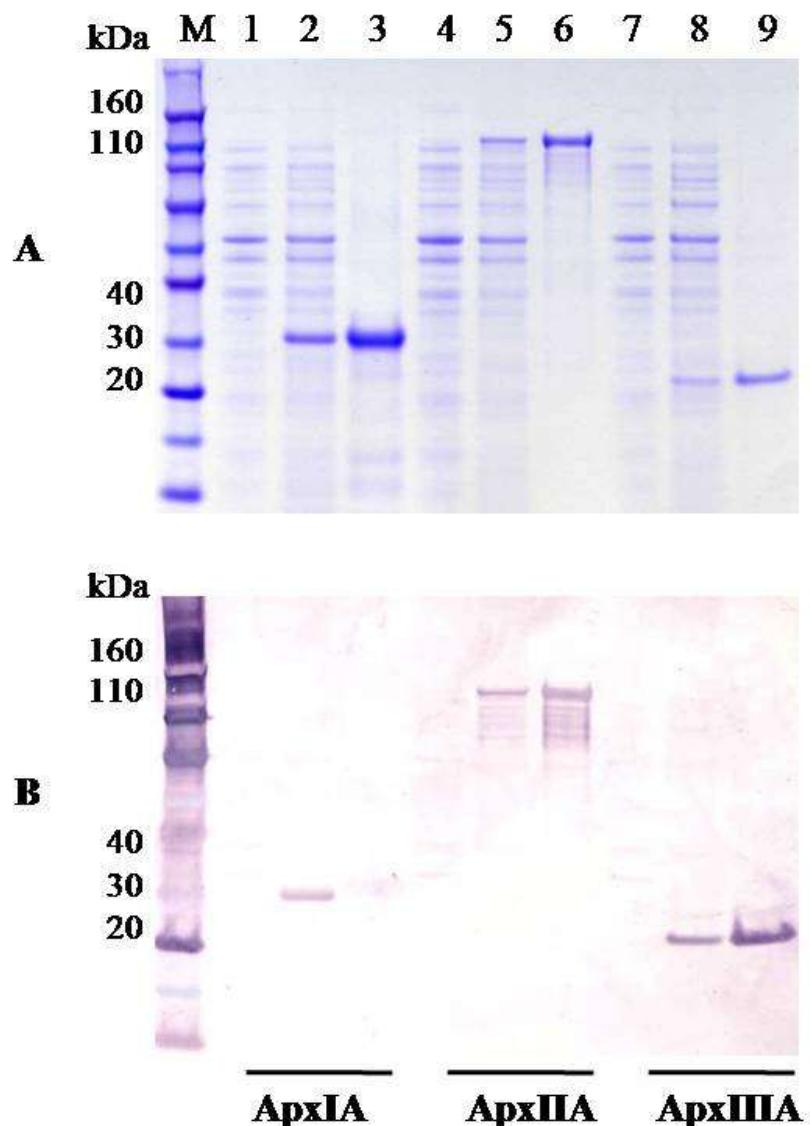


Figure 3. Purification of the recombinant ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa. The recombinant ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa were analyzed by SDS-PAGE (A) and Western blot (B) with an anti-Histidine antibody; lane M, prestained protein molecular mass marker (kDa); lane 1, 4 and 7, uninduced clone of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa; lane 2, 5 and 8, induced clone ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa; lane 3, 6 and 9, purified ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa, respectively

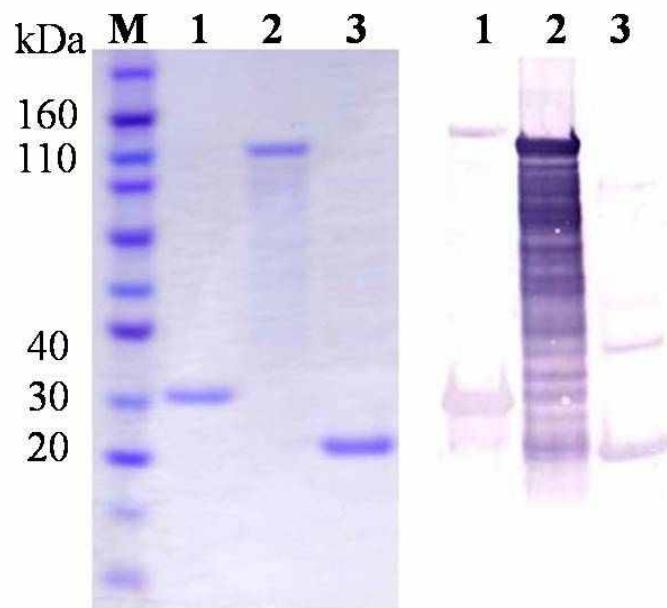


Figure 4. Immunoblots of purified the recombinant ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa for its antigenicity. The proteins were characterized by SDS-PAGE (a) and Western blot (b) using positive pig serum. Lane M, prestained protein molecular mass marker (kDa); lane1, recombinant ApxIA; lane 2, recombinant ApxIIA; lane3, recombinant ApxIIIa.

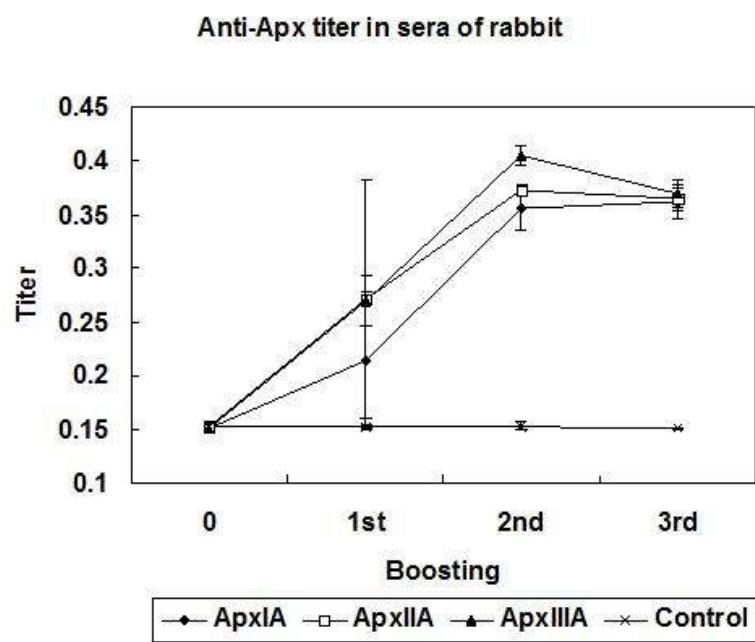


Figure 5. Anti-ApxA antibody titer in sera of rabbit.

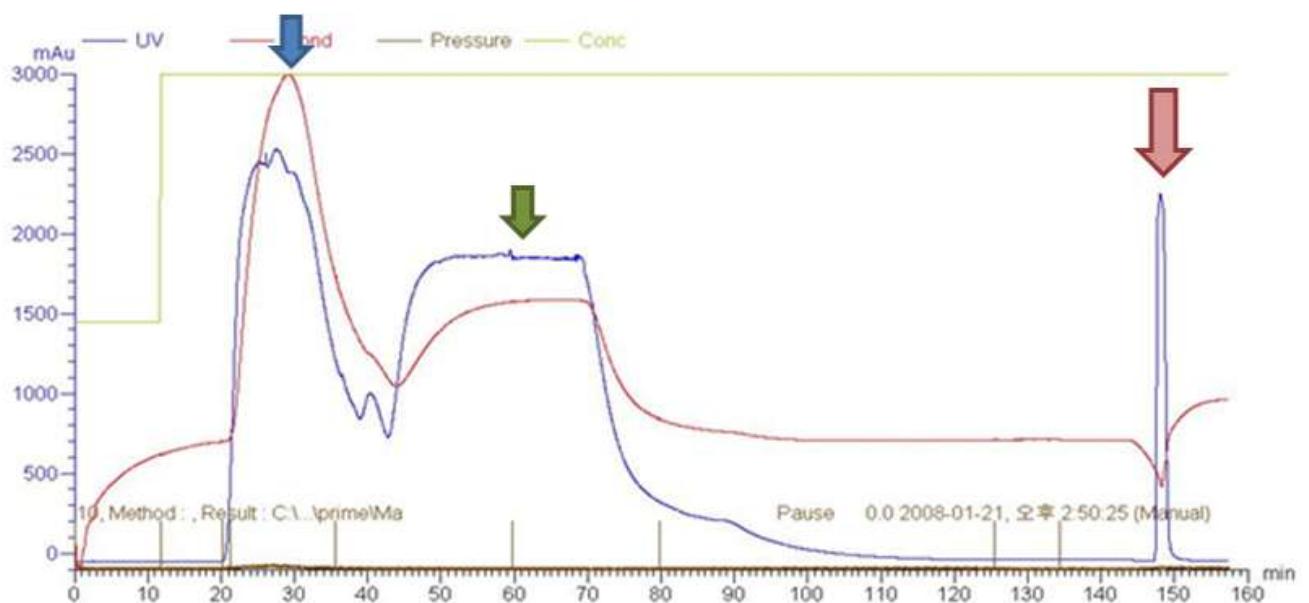


Figure 6. Purification of Rabbit IgG for ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa using AKTA prime. Serum binding(blue arrow), Washing step(green arrow) and Elution step(red arrow).

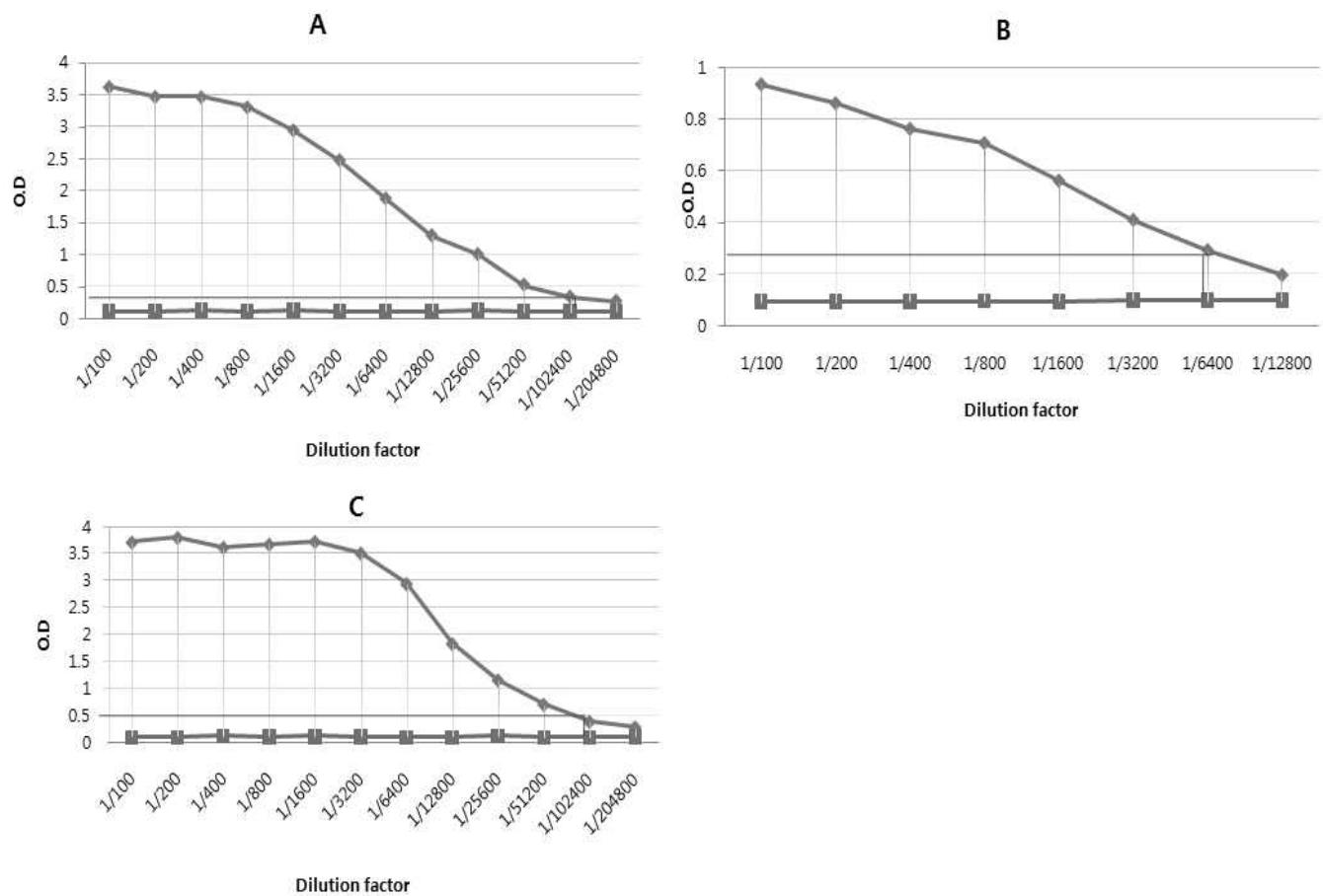


Figure 7. Determination of antibody titer against ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA. The antibody titers of anti-ApxA rabbit IgG were 1/102400, 1/6400 and 1/102400 against ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA, respectively.

다. 돼지 흉막폐렴에 대한 형질전환 효모 백신 평가 기법 개발

(1) 재조합 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIa에 대한 ELISA 기법

돼지 흉막폐렴에 대한 혈청진단기법 개발을 목적으로 ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa-ELISA (Enzyme-linked immune-sorbent assay)를 정제한 재조합 ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa 단백질을 이용하여 개발하였다. 재조합 단백질을 5000 ng/well에서 2.4 ng/well까지 2배씩 단계 희석하고, 양성과 음성 돼지혈청을 1:50부터 to 1:6400까지 2배씩 단계 희석하여, Checkerboard dilution을 하여 ELISA 조건을 최적화하였다 (Figure 8). 돼지혈청은 Positive/ Negative ratio를 구하여 높은 희석배수를 선택하였으며 (Figure 9), HRP-conjugated goat anti-pig IgG은 1:1000과 1:2000 희석배수 중 하나를 선택하였다. 40개의 양성 돼지 혈청과 25개의 음성 돼지혈청을 이용하여 재조합 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIa에 대한 ELISA 기법을 validation하고 (Table 3), 개발한 ELISA기법의 민감도와 특이도를 구하였다 (Table 4). 또한, ROC 분석을 통해 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIa-ELISA의 곡선 아래 면적(AUC)이 0.999, 0.989 그리고 0.992 (95% 신뢰 구간, 0.982~0.996; P<0.001)를 보였다 (Figure 10). 확립한 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIa-ELISA 기법을 살펴보면, 우선, Coating buffer (PBS : 0.15M NaCl, 0.01M Na₂HPO₄, NaN₃, pH 7.5) 100μl에 순수 정제된 재조합 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIa의 농도가 625, 9.8 and 156.3 ng/well이 되도록 희석한 후 ELISA plate에 100μl씩 분주한 후 4°C에서 overnight 보관하였다. Microplate를 PBST (0.15M NaCl, 0.01M Na₂HPO₄, 0.01% Triton X-100, NaN₃, pH 7.5)로 세 번 세척한 후 blocking 용액으로 PBST buffer에 10% Normal horse serum을 첨가하여 250μl씩 분주하고 37°C에서 2시간동안 blocking을 실시하였다. PBST로 세 번 세척한 후 일차항원으로 채취된 시료인 pig sera를 ApxIA에 대해서는 1:100, ApxIIA 와 ApxIIIa에 대해서는 1:200 의 비율이 되도록 5% normal horse serum이 함유된 antibody diluent에 희석한 뒤 각각 100μl씩 분주하고 37°C에서 2시간동안 반응시켰다. 다시 PBST로 세 번 세척한 후 이차항원으로 HRP-conjugated anti-pig IgG를 ApxIA에 대해서는 1:1000, ApxIIA 및 ApxIIIa에 대해서는 1:2000의 비율로 antibody diluent에 희석하여 100μl씩 분주하고 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. PBST로 세 번 세척한 후 ABT substrate solution을 이용하여 발색시키고, 실온에서 30분 동안 반응시킨 후, Microplate Reader (Molecular Device)를 이용하여 405nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 개발된 ELISA 기법은 돼지 흉막폐렴 예방 경구백신 평가하는데 사용되었다.

(2) 국내 야외 돼지혈청에서의 Apx I A, ApxIIA 및 ApxIII A에 대한 항체가 분포 조사

개발한 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIII A에 대한 ELISA 기법을 토대로 국내 사육돼지에서 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIII A에 대한 항체가 분포(IgG)를 조사 분석하였다. 야외 돼지 혈청을 포유자돈 (0~4주) 80두, 이유자돈 (4~10주) 80두, 육성돈 (10~20주) 80두, 모돈 80두로 랜덤 샘플링하여 실험을 수행하였다(Figure 11). ApxIA, ApxIIA 와 ApxIII A에 대한 sero-prevalence rate는 40.3, 58.4 and 32.8 %를 보였으며, 연령대에 따라 항체가 변화 경향성을 보였다 (Table 5). 모돈에서 높은 항체가 분포를 보였으며, 포유자돈에서 이유자돈으로 점점 낮은 항체가 분포를 보였다. 이는 모체이항항체가 전달되었고, 점점 항체가 소실되는 것으로 생각할 수 있었다. 또한 모돈과 포유자돈에서는 ApxIA와 ApxIII A에 비하여 ApxIIA의 항체가가 높게 분포되어 있음을 볼 수 있었다. 국내에서 주로 분리되는 혈청형은 *A. pleuropneumoniae* serotype 2형과 5형이며, ApxII가 이 혈청형들의 공통으로 분비되는 독소형이기 때문에 다른 독소형보다 ApxIIA에 대한 높은 항체가를 나타내는 것으로 판단되었다.

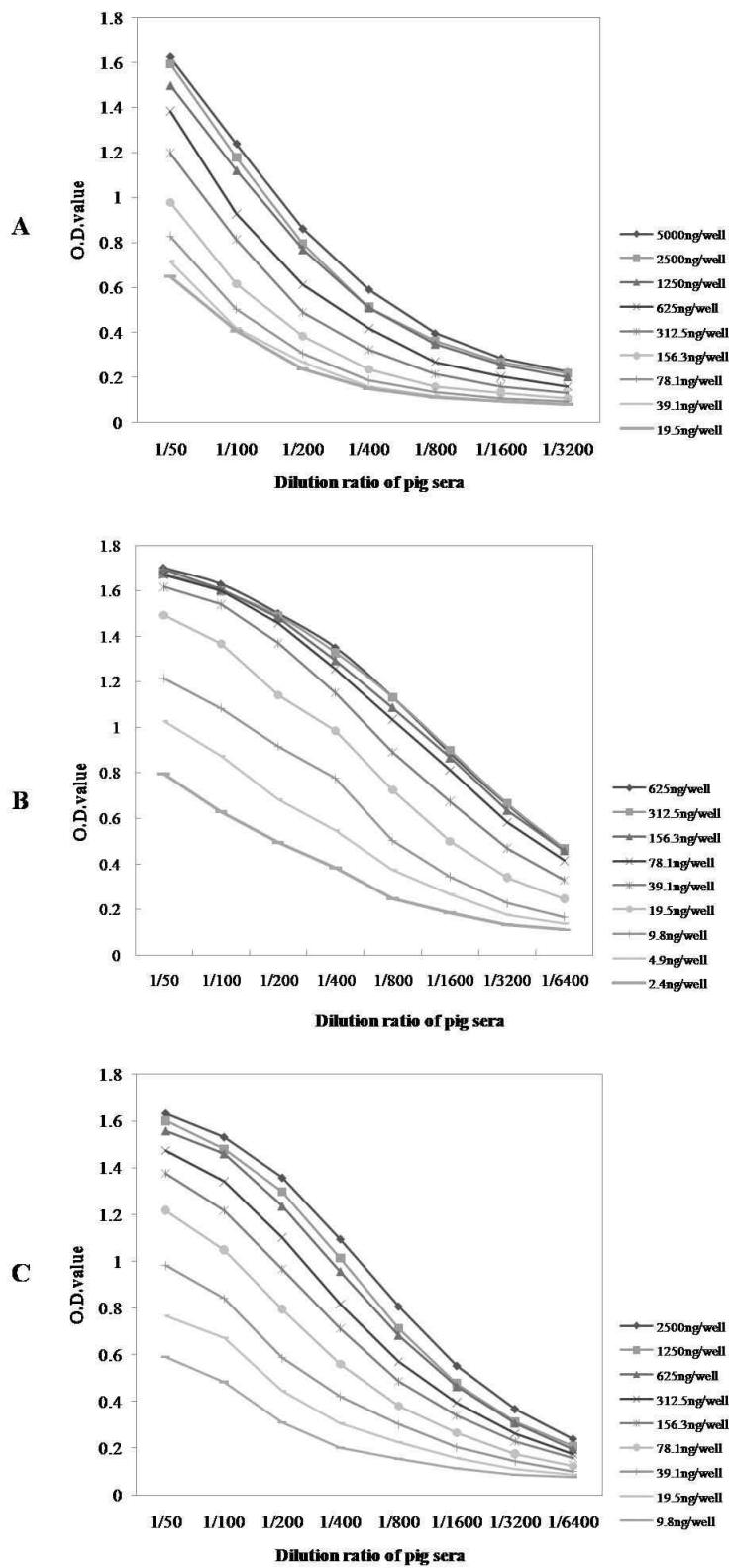


Figure 8. Determination of the optimal concentration of ApxIA(A), ApxIIA(B) and ApxIIIa(C). The most optimal and reliable concentration of the recombinant ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa as an antigen were determined to 625, 9.8 and 156.3 ng/well, respectively.

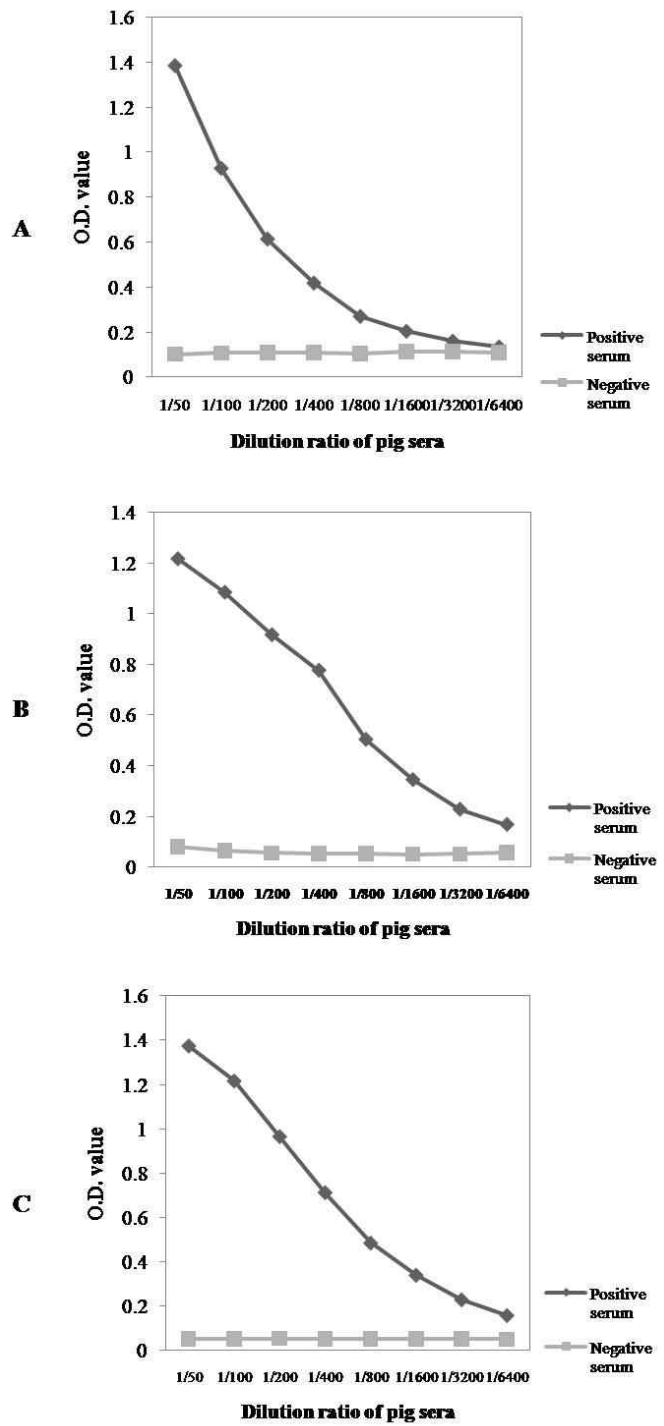


Figure 9. Determination of the optimal concentration of pig sera for ApxIA (A), ApxIIA (B) and ApxIIIA(C)-ELISA assays. Under the condition of 9.8, 156.3 and 625 ng/well of ApxIIA, ApxIIIA and ApxIA, via checkerboard titration, the optimal concentration of pig sera were determined to 1:100 dilution ratio for ApxIA and 1:200 for ApxIIA and ApxIIIA based on the positive/negative ratio.

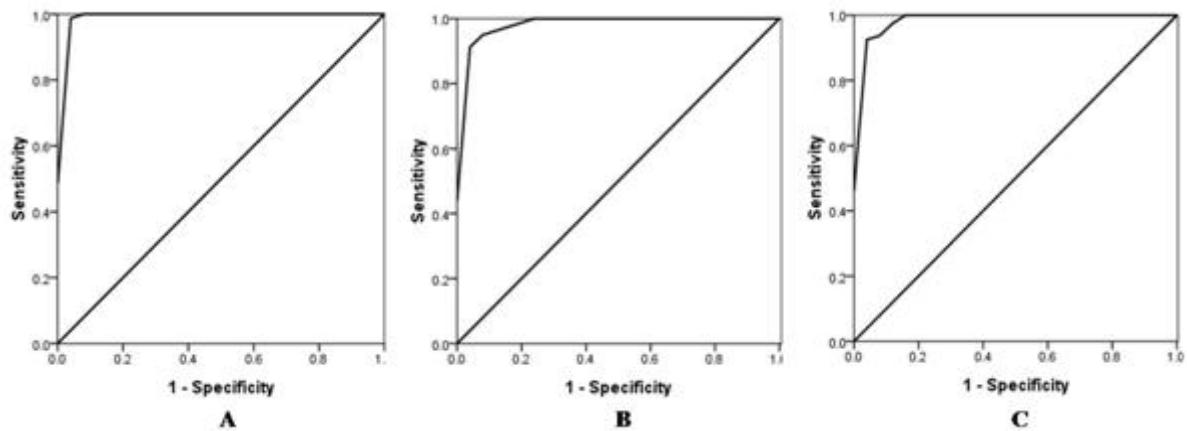


Figure 10. Receiver-operating characteristic (ROC) curves of ApxIA(A), ApxIIA(B) and ApxIIIa(C)-ELISA assays for the diagnosis of *A. pleuropneumoniae*. The area under the ROC (AUC) of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIa-ELISA assays was 0.999, 0.989, 0.992 (95% confidence interval; P<0.001). The horizontal line belongs to the test curve, and diagonal line shows a non-informative test curve.

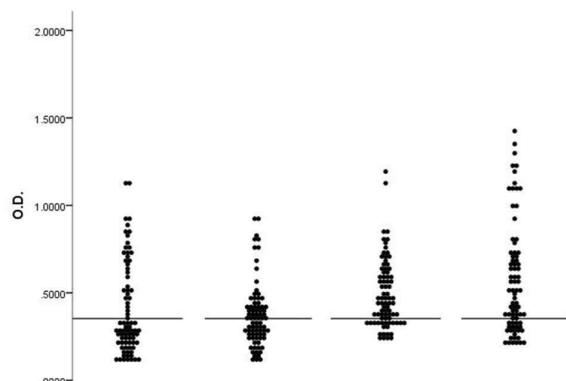
Table 3. The result of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA-ELISA assays in control pig sera at the each cut-off value. 40 positive pig sera and 25 negative pig sera were used to analyze the sensitivity and specificity of the ELISA.

	ApxIA		ApxIIA		ApxIIIA	
	Positive control	Negative control	Positive control	Negative control	Positive control	Negative control
ELISA positive	40 ^a	1 ^c	38 ^a	1 ^c	37 ^a	1 ^c
ELISA negative	0 ^b	24 ^d	2 ^b	24 ^d	3 ^b	24 ^d

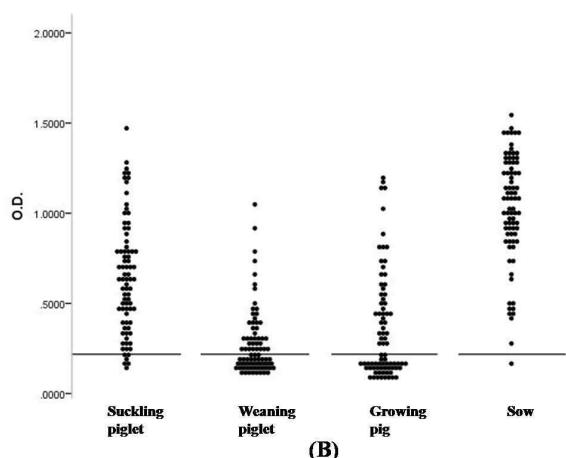
Table 4. The analysis of diagnostic accuracy of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA-ELISA assays.

	Sensitivity(Se)	Specificity(Sp)	Efficiency (%)	Youden's Index
ApxIA	1	0.96	98.5	0.96
ApxIIA	0.95	0.96	95.4	0.91
ApxIIIA	0.925	0.96	93.9	0.885

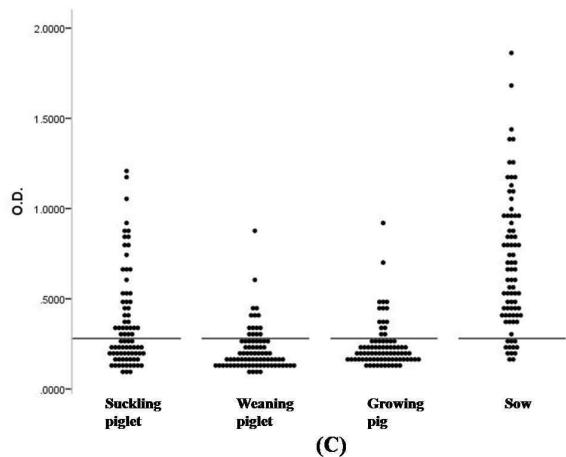
* Sensitivity = $a/(a+b)$; Specificity = $c/(c+d)$; Efficiency = $(a+d)/(a+b+c+d) \times 100$; Youden's Index = Se + Sp -1



(A)



(B)



(C)

Figure 11. Distribution of anti-ApxIA(A), ApxIIA(B) and ApxIIIA(C) antibodies in domestic pig. S_{OD405} values of cut-off were 0.353, 0.218 and 0.28 in ApxIA, ApxIIA, ApxIIIA-ELISA assays, based on following the formula; $S_{OD405} = S/P \text{ ratio} \times (P-N) + N$.

Table 5. The seroprevalence rate of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA-ELISA assays in pig field sera.

(%)	ApxIA	ApxIIA	ApxIIIA
Sucking piglet	40	92.5	46.25
Weaning piglet	46.25	50	18.75
Growing pig	71.25	51.25	17.5
Sow	72.5	98.75	86.25

2. 돼지 흉막폐렴균 항원 발현 효모 형질전환체 개발

가. 돼지흉막폐렴균 독소 단백질의 효모세포 내 발현하는 효모 개발

(1) ApxIA, ApxIIA, ApxIIIa 유전자의 효모 세포내 발현을 위한 recombinant 벡터 제작
본 연구진에서는 이미 ApxIA, ApxIIA, ApxIIIa 독소 단백질 재조합 효모를 확보하였으나 발현량이 낮은 관계로 발현량이 높은 재조합효모를 확보하기 위하여 recombinant vector를 Figure 12의 모식도에 의해 pYEPGPD 벡터에 재 작업하였다. 발현률을 높이기 위해서 rice *amy1A1* signal peptide의 융합으로 인하여 세포 밖으로의 분비를 유도하였다. ApxIA, ApxIIA와 ApxIIIa 재조합 효모의 필요에 의해 recombinant 벡터 제작에 성공하였다. 각 재조합 vector들을 형질전환에 이용하기 전에 restriction enzyme mapping과 염기서열을 분석하여 확인하였다.

(2) 효모의 형질전환 및 형질전환체 분석

S. cerevisiae Y2805 또는 A7 균주를 배양하여 LiAc를 처리한 후 형질전환을 위해 제작한 4 종류의 재조합 벡터들로 각각 형질전환하였다. 형질전환체의 형질전환 유무를 확인하고자 재조합 벡터당 무작위로 12–15개 형질전환체의 colony PCR을 수행한 결과 모두 형질전환되었음을 확인하였다 (Figure 13). 확인된 형질전환체 4개로부터 genomic DNA를 분리하여 *E. coli* Backtransformation을 하여 형질전환을 되었음을 재확인하였다 (결과미제시).

(3) Apx 유전자의 효모 세포 내 발현 확인여부

형질전환체 내에서 target 유전자의 발현정도를 검정하기 위해서 재조합효모로부터 RNA를 분리한 후 Northern blot analyses를 통해 ApxIA, ApxIIA 과 ApxIIIa의 transcripts 존재 여부를 확인하여 발현여부를 확인하였다 (Figure 14). 또한 ApxIIA 재조합효모로부터 단백질을 분리한 후 SDS-PAGE에 의해 크기별로 분리된 gel 상의 단백질을 nitrocellulose filter에 transfer한 후 ApxIIA#5 polyclonal antibody 또는 ApxIIA polyclonal 등을 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다. ApxIIA가 효모 내에서 잘 발현하는 것을 확인하였다 (Figure 15).

(4) 재조합효모의 면역유도 특성 검정여부

발현량을 높이기 위해 새롭게 제작된 ApxIA, ApxIIA과 ApxIIIa 형질전환체 각각을 배양하여 경구접종용으로 준비한 후 공동연구진에 의해 활용되도록 제공되었으며, 공동연구진에 각각

의 Apx 독소를 발현시킨 재조합 효모를 분양하였다. 사료에 준비된 재조합 효모를 기간 별로 경구투여한 후 경구 투여된 실험동물을 대상으로 minimal lethal dose 및 IgG의 수치가 공동 연구진에 의해 검정되었다.

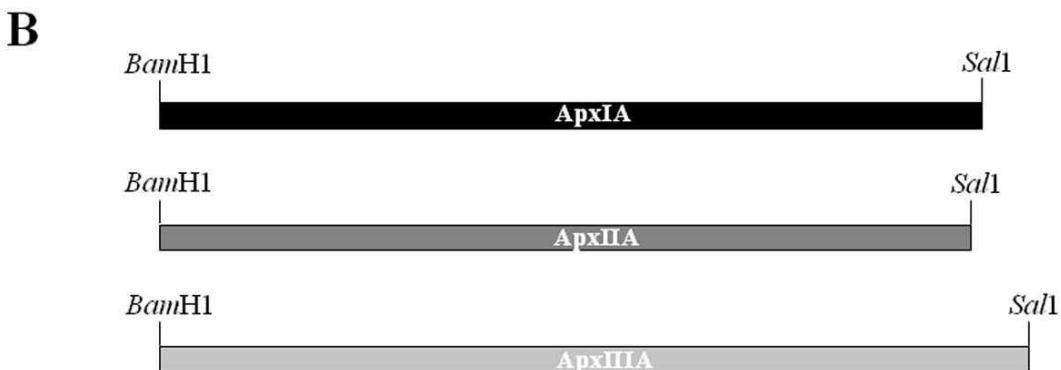
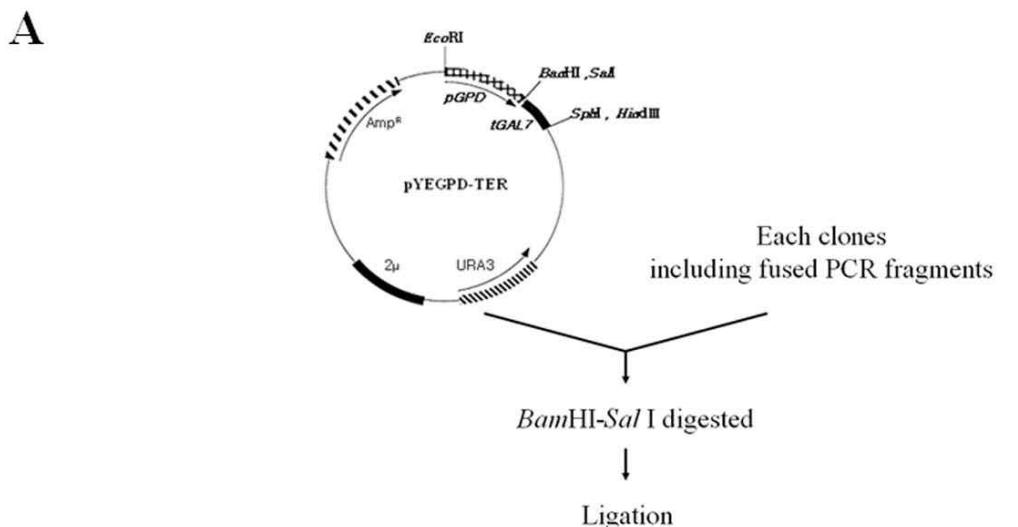


Figure 12. (A) Strategy of various expression vectors for a surface displayed expression of the *ApxIA*, *ApxIIA*, and *ApxIIIa*. (B) Schematic diagram of the fusion constructs cloned in the pYEGPD. The boxes represent genes or their corresponding functional domains. pGPD, promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ASP, Rice *AmylA* signal peptides; *ApxIA*, *ApxIIA*, and *ApxIIIa* toxin gene of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. AGA1, C-terminal half (320 amino acid residues from the C terminus) of yeast alpha-agglutinin anchoring protein. tGAL7, terminator of galactose-1-P uridyl transferase.

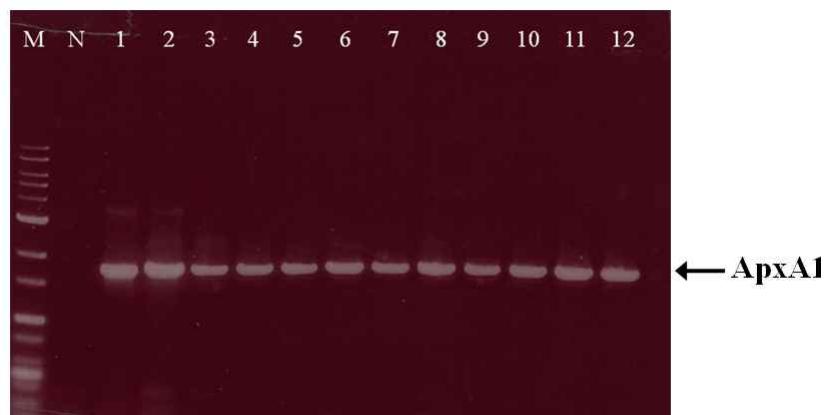
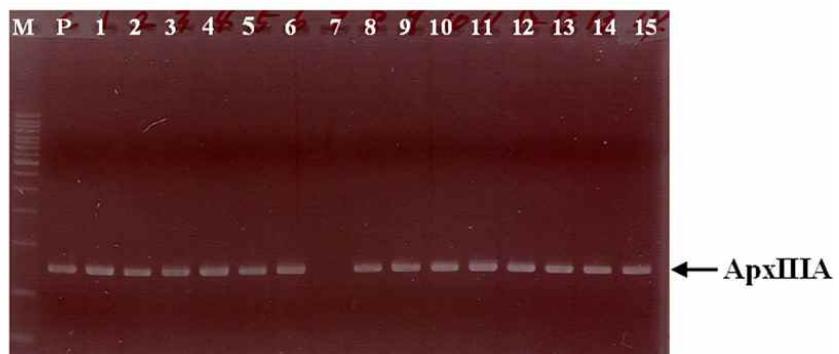
A**B****C**

Figure 13. PCR analysis of yeast transformsants by a yeast colony PCR. M, size marker; N, negative control, Y2805; P, posive control, ApxIA (A), ApxIIA fragment (B) or ApxIIIA fragment (C); lane 1–15, yeast transformsants.

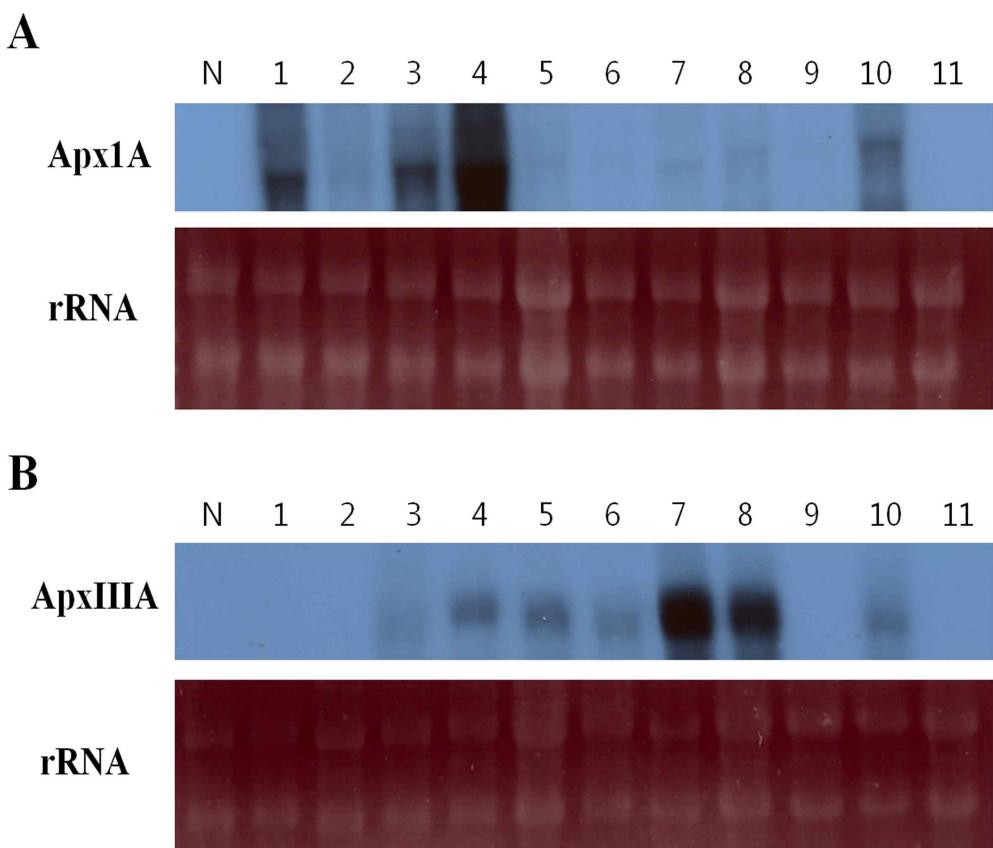


Figure 14. Northern blot analyses of ApxIA (A) and ApxIIIA (B) transformants (B) using the ApxIA and ApxIIIA specific probes. Equal loading of RNA samples is shown in the bottom panel as an internal control and in an ethidium bromide-stained gel (rRNA). Lane N, total RNA of the recipient strain (Y2805); lane 1–11, APXIA (A) and APXIIIA constructs (B).

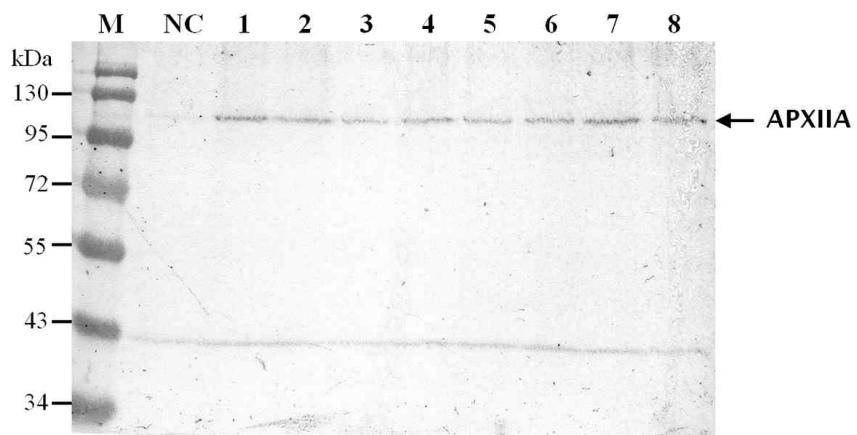


Figure 15. Western blot analysis of the APXIIA construct using the anti-APXIIA. Lane NC, cell wall extract of the recipient strain (Y2805); lane 1–8, APXIIA constructs.

나. APXIIA 독소단백질의 효모 세포표면에 발현하는 효모 개발

(1) Apx 효모 세포표면 발현-재조합 효모 개발을 위한 recombinant vector 제작

ApxI, ApxII과 ApxIII 독소 단백질을 효모 내에서 성공적으로 발현시켰으나, 장내에서 항원성의 효율을 더 높이기 위해 Korean 타입 중 가장 강한 병증을 유발하는 ApxIIA 독소 단백질을 대표적으로 효모의 세포표면에 발현을 시도하고자 하였다. 표면발현에 필요한 anchoring 단백질은 α -agglutinin의 C-terminal domain의 약 1 kb의 유전자를 specific primer pair PCR로 증폭하였고, Apx toxin은 ApxIIA의 full 유전자 2.9 kb와 표면효율을 높이기 위한 partial ApxIIA의 core epitope인 ApxIIA#5 (Apx5)의 1 kb 유전자를 각각 증폭하였다. PCR products를 주형으로 하여 overlap PCR을 Figure 16의 모식도에 따라 수행하였다. 확보한 4종류의 fused fragments를 제한효소로 절단한 후 효모의 episomal vector인 YEpGPD에 cloning 하였다 (Figure 17). 각 재조합 vector들을 형질전환에 이용하기 전에 restriction enzyme mapping과 염기서열을 분석하여 확인하였다.

(2) 효모의 형질전환 및 형질전환체 분석

(가) ApxIIA epitope (Apx5)의 효모 세포표면 형질전환체

S. cerevisiae Y2805 또는 A7 균주를 배양하여 LiAc를 처리한 후 형질전환을 위해 제작한 4 종류의 재조합 벡터들로 각각 형질전환 하였다. 형질전환체의 형질전환 유무를 확인하고자 재조합 벡터당 무작위로 6개의 형질전환체의 colony PCR을 수행한 결과 모두 형질전환 되었음을 확인하였다 (Figure 18). 확인된 형질전환체 4개로부터 genomic DNA를 분리하여 *E. coli* Backtransformation을 하여 형질전환을 되었음을 재확인하였다 (Figure 19).

(나) ApxIIA 독소단백질의 효모 세포표면 형질전환체

ApxIIA epitope (Apx5)의 세포 표면발현 이외에 ApxIIA full 유전자의 표면발현 또한 시도하였다. 본 연구진은 특정유전자의 효모에서의 발현 시 삽입유전자의 크기가 커지는 경우 유전자 조작이 어렵고 발현이 잘되지 않는 특징이 있으나 반복실험을 통해 효모형질전환체를 확보하였고 형질전환체의 형질전환 유무를 확인하고자 재조합 벡터당 무작위로 6개의 형질전환체의 colony PCR을 수행한 결과 대부분 형질전환 되었음을 확인하였다 (Figure 20B). 확인된 형질전환체 4개로부터 genomic DNA를 분리하여 *E. coli* Backtransformation을 하여 형질전환을 되었음을 재확인하였다 (결과미제시).

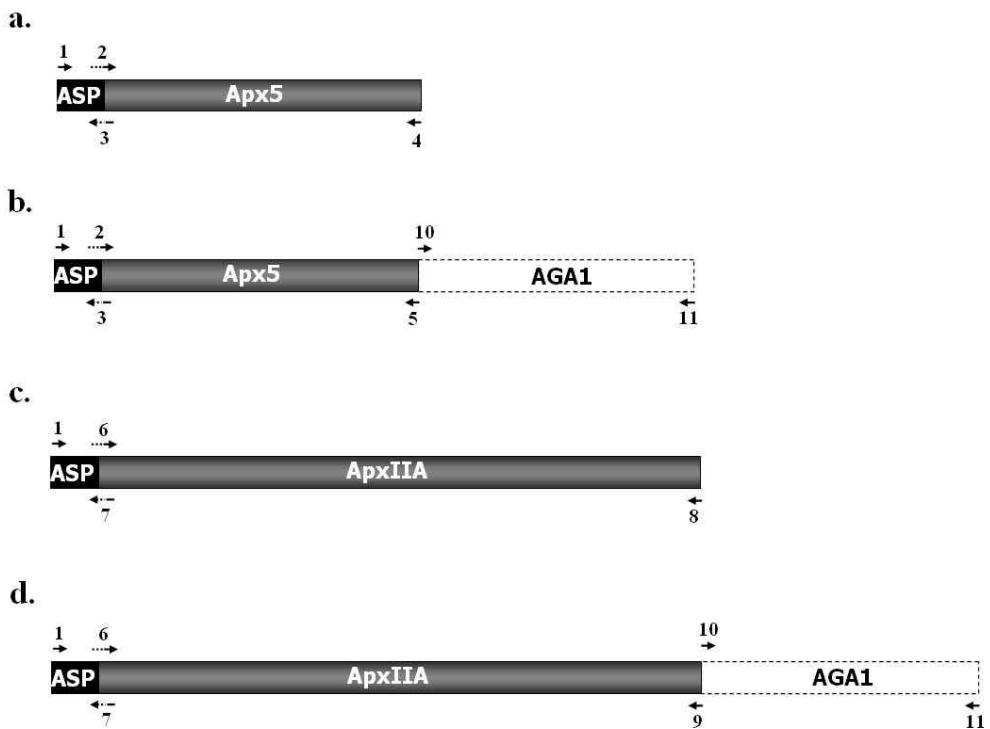


Figure 16. Schematic structure of the APX5 and APXIIA fusion constructs. The figure shows the location of oligonucleotide primers (Table 6) used for a fusion PCR of the ASP–Apx5 (a, b) and ASP–ApxIIA (c, d), and amplification of the AGA1.

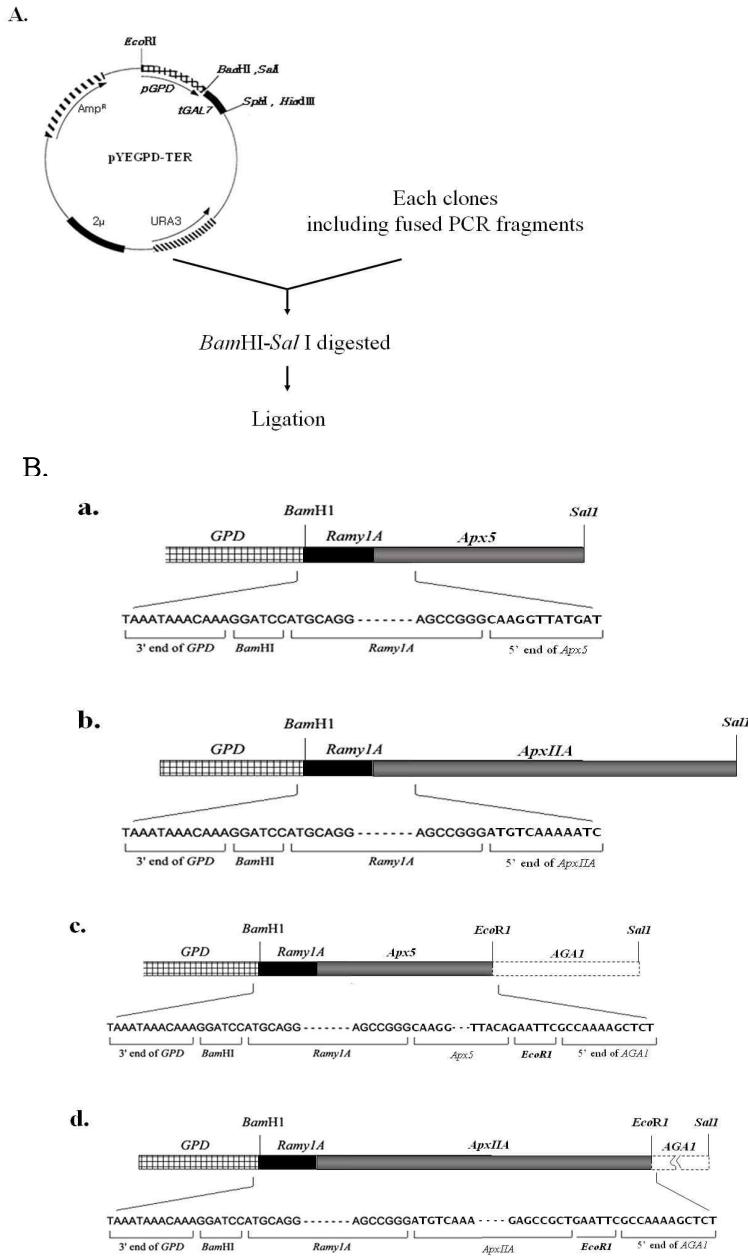


Figure 17. (A) Strategy of various expression vectors for a surface displayed expression of the Apx5 and ApxIIA. (B) Schematic diagram of the fusion constructs cloned in the pYEGPD. The boxes represent genes or their corresponding functional domains. pGPD, promoter of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; ASP, Rice *AmylA* signal peptides; *Apx5* and *ApxIIA*, a partial gene of *ApxII* toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *AGA1*, C-terminal half (320 amino acid residues from the C terminus) of yeast alpha-agglutinin anchoring protein. tGAL7, terminator of galactose-1-Puridyl transferase.

Table 6. Oligonucleotide PCR primers used in this study

Name	Sequence
Primer1	5'-GGA TCC GCA TCC AGG TGC TGA AC-3'
Primer2	5,-TCT AAC TTG ACA GCC GGG CAA GGT TAT GAT TCT CGT-3'
Primer3	5'- ACG AGA ATC ATA ACC TTG CCC GGC TGT CAA GTT AGA-3'
Primer4	5'-GGT CGA CTC ATG TAA TAG AAT CAT TTC C-3'
Primer5	5'- GGG AAT TCT GTA ATA GAA TCA TTT CCA-3'
Primer6	5'-TCT AAC TTG ACA GCC GGG ATG TCA AAA ATC ACT TTG-3'
Primer7	5'-CAA AGT GAT TTT TGA CAT CCC GGC TGT CAA GTT AGA-3'
Primer8	5'-GGG TCG ACT TAA GCG GCT CTA GCT AA-3'
Primer9	5'-GGG AAT TCA GCG GCT CTA GCT AAT TG-3'
Primer10	5'-GGG AAT TCG CCA AAA GCT CTT TTA TC-3'
Primer11	5'-GGT CGA CTT AGA ATA GCA GGT ACG ACA A-3'

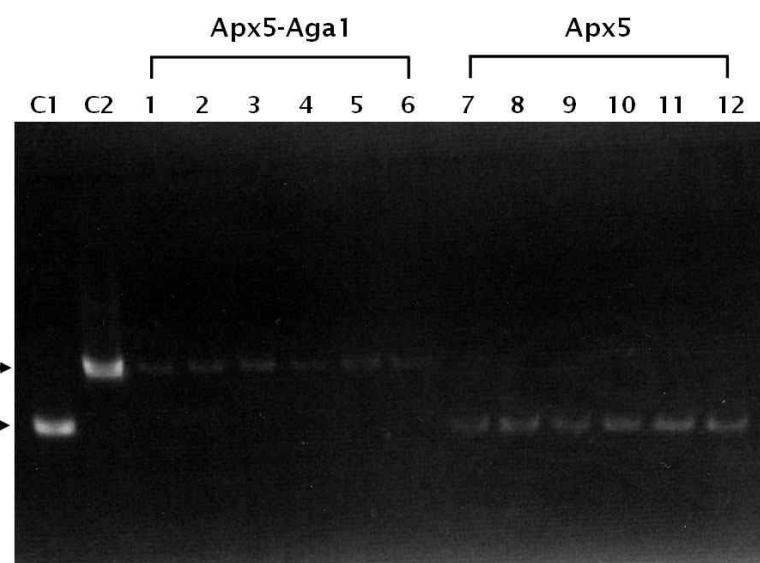


Figure 18. PCR analysis of yeast transformants by a yeast colony PCR. C1 lane, a 1 kb Aga1 fragment C2 lane, a 2 kb Apx5–Aga1 fused fragment.

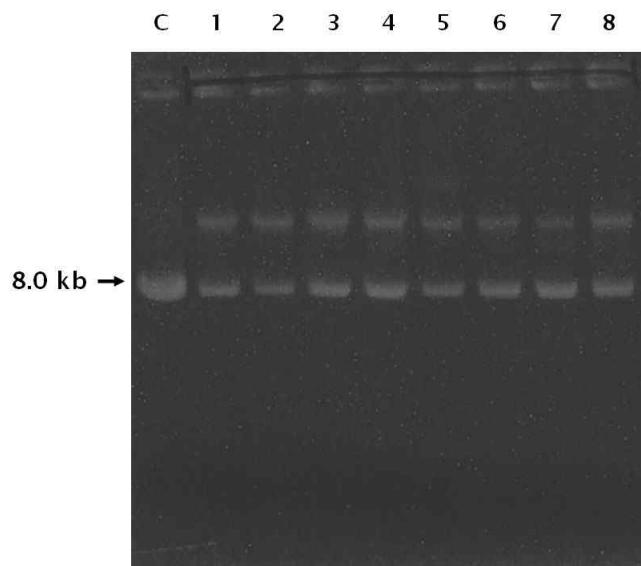


Figure 19. Confirmation of yeast transformants by *E. coli* back-transformation, using genomic DNA of each yeast transformants. All the lanes, each total DNA digested with restriction enzyme *SaII*. C lane, YEpRAPX5A included RSS-ApxIIA#5-Aga1 fusion construct.

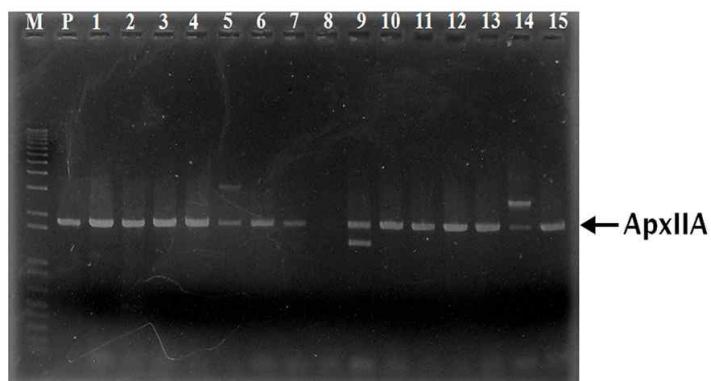
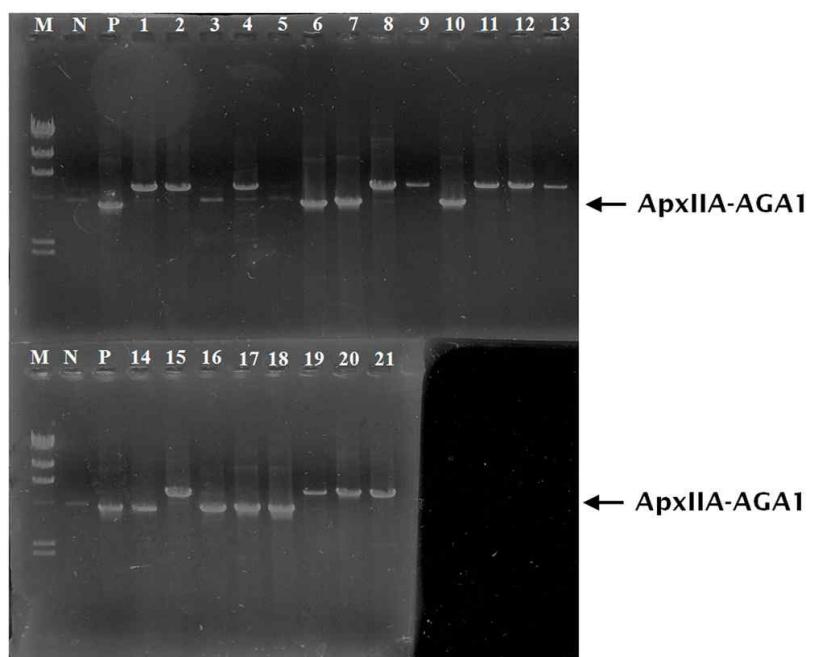
A**B**

Figure 20. PCR analysis of yeast transformants by a yeast colony PCR. M, size marker; N, negative control, Y2805; P, positive control, ApxIIA fragment (A) or ApxIIA-*Agal*; lane 1-15 (A) and lane 1-21 (B) yeast transformants.

(3) ApxIIA의 효모 세포내 및 표면발현 확인여부

(가) ApxIIA epitope (Apx5)의 효모 세포내 및 표면발현 형질전환체 발현확인

형질전환체 내에서 target 유전자의 발현정도를 검정하기 위해서 재조합효모로부터 단백질을 분리한 후 SDS-PAGE에 의해 크기별로 분리된 gel 상의 단백질을 nitrocellulose filter에 transfer한 후 ApxIIA#5 polyclonal antibody 또는 ApxIIA polyclonal 등을 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다. ApxIIA#5가 효모 내에서 잘 발현하는 것을 확인하였다 (Figure 21). 하지만 재조합단백질의 효모세포표면발현에 이용하고자 제작한 재조합효모의 세포내 단백질 (cell free extract)에서는 APX5-AGA1 단백질이 존재하지 않음을 확인하였다. Agglutinin이 세포내의 Apx fusion의 발현을 감소시키며 대부분 효모세포벽에 부착되어 존재하기 때문인 것으로 사료된다. 세포벽 단백질 (cell wall protein)을 분리한 후을 분리한 후Western blot analysis를 재수행하여 Apx5가 효모세포표면에서 발현됨을 확인하였다 (Figure 23).

또한, 재조합 효모를 배양한 후 효모세포에 일차적으로 ApxIIA#5 항체를 처리하고 이차적으로 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG를 처리한 후 immunostaining을 수행하여 준비된 시료를 confocal microscope에서 관찰하였다. 그 결과 Apx5 (ApxIIA#5) 단백질이 agglutinin의 도움으로 효모의 세포 표면에 성공적으로 display됨을 확인 하였다 (Figure 22).

(나) ApxIIA의 효모 세포표면 형질전환체 발현확인

재조합효모를 1배양한 후 효모세포에 일차적으로 ApxIIA 항체를 처리하고 이차적으로 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG를 처리하여 immunostaining을 수행한 후 준비된 시료를 confocal microscope에서 관찰하였다. 그 결과 ApxIIA full 단백질이 agglutinin의 도움으로 효모의 세포 표면에 성공적으로 display됨을 확인하였다 (Figure 24). Western blot analysis와 immunostaining등의 실험과정을 통해 ApxIIA full 유전자의 효모 세포 표면 발현에 성공하였다.

(4) 재조합효모의 면역유도 특성 검정여부

Apx 형질전환체를 배양하여 경구접종용으로 준비한 후 재조합 효모를 기간 별로 mouse에 경구 투여한 후 IgG의 수치를 조사하여 immunoassay한 결과 recipient strain과 mock 형질 전환체에 비해 Apx5 세포내 또는 표면 형질전환체가 강한 면역반응을 유도하였다. 또한 표면

발현 형질전환체에 의해 면역반응을 가장 효과적으로 유도하였으며 경구 투여한 세포수가 더 많을수록 더 효과적인 면역반응을 유도함을 확인하였다 (Figure 25). 추가적으로 면역반응을 유도하였던 각 mouse 개체에 흉막폐렴균(*A. pleuropneumoniae*).을 감염시켜 challenge assay실험을 수행한 결과 Apx5 표면발현 형질전환체로 면역반응을 유도 시켜준 mouse가 흉막폐렴균으로부터 안전함을 확인할 수 있었으며 효과적인 구강 백으로써의 가능성을 입증하였다 (Figure 26). 공동연구진에 의해 활용되도록 제공되었다.

A.



B.

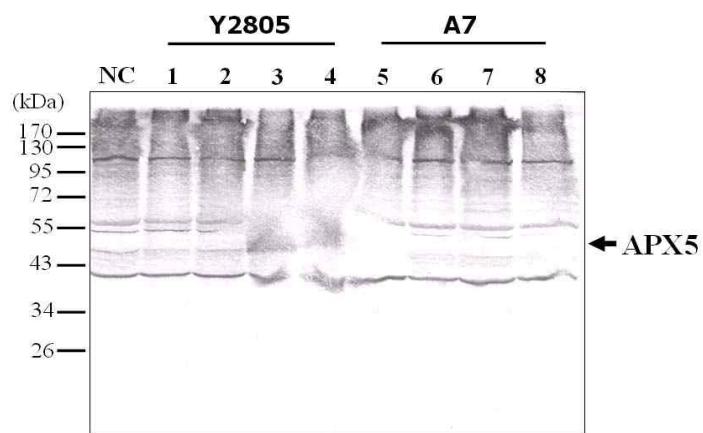


Figure 21. Western blot analysis of the APXIIA#5 fusion construct using the anti-APX (A) and the anti-APXIIA (B). Lane NC, cell wall extract of the recipient strain (Y2805); lane 1–8 show those of different transformants. Lane 1, 2, 5, and 6, APX5–AGA1 fusion construct. Lane 3, 4, 7, and 8, APX5 construct.

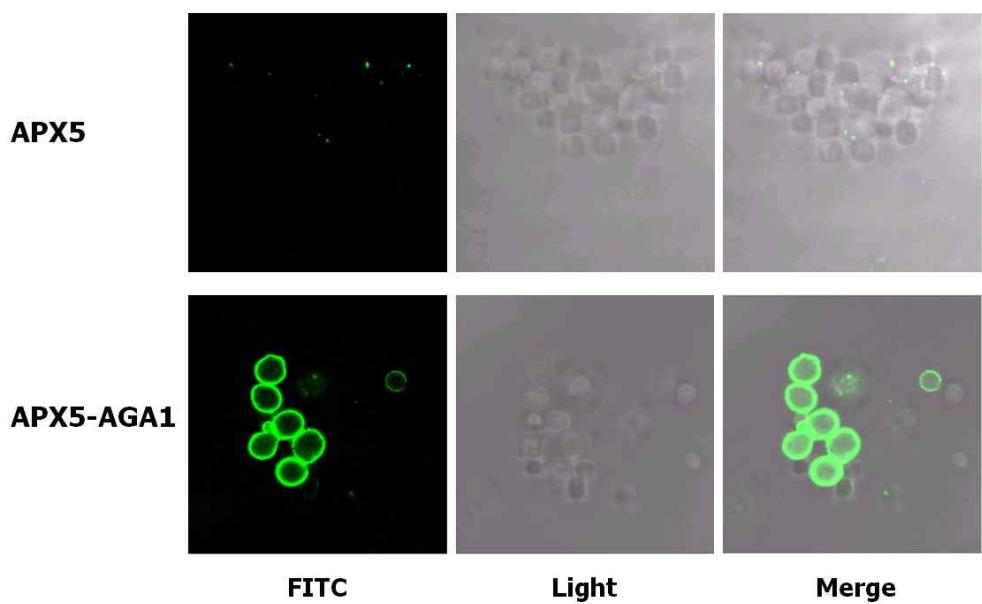


Figure 22. Confocal laser scanning microscopy of recombinant yeast cells. Light and FITC immunostained micrographs are shown. No immunofluorescence was observed from the APX5 transformed control cells and a clear immunofluorescence was observed from the APX5-AGA1 transformed cells with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG.

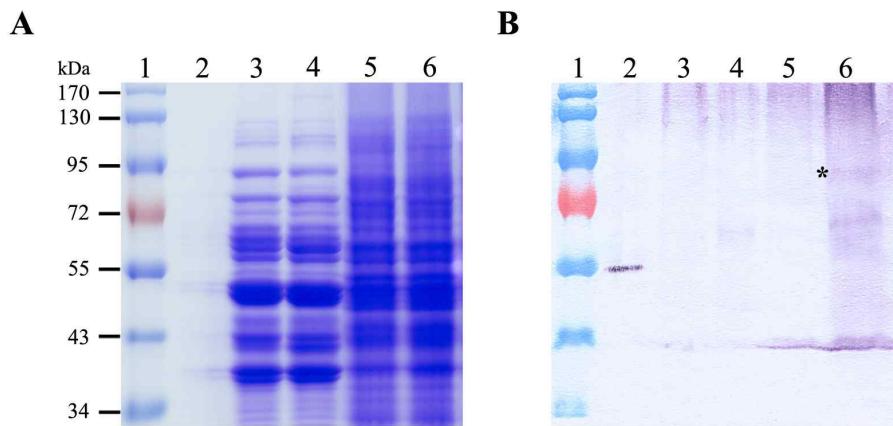


Figure 23. Western blot analysis of the ApxIIA–epitope (Apx5) fusion construct. A; Commasie blue stained SDS–PAGE of the cell wall protein (CWP). B; Antigen–antibody reaction of the corresponding gel of the CWP. Lanes 1 and 2 contain CWP of recipient and transformed strains, respectively. Lane 3 contains the soluble cytosolic proteins from transformed strain. Numbers on left refer to the estimated sizes in kDa and the arrowhead at the right indicates the ApxIIA–epitope fusion protein.

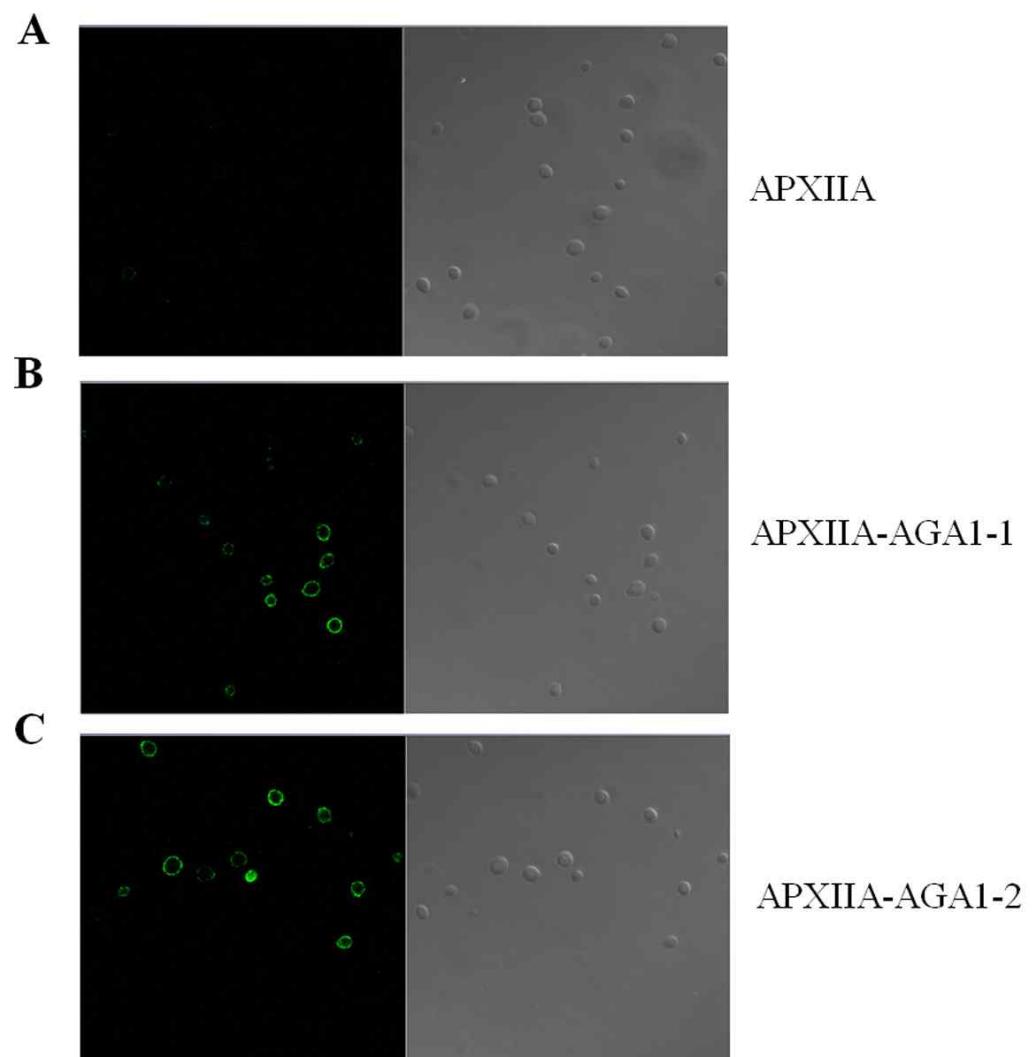


Figure 24. Immunofluorescent microscopy of recombinant yeast cells. Light (left) and matching fluorescent (right) micrographs are shown. Note the fluorescent micrograph showing FITC fluorescence as a ring around the cell surface (panel B, C). No fluorescence was observed in the control cells (panel A).

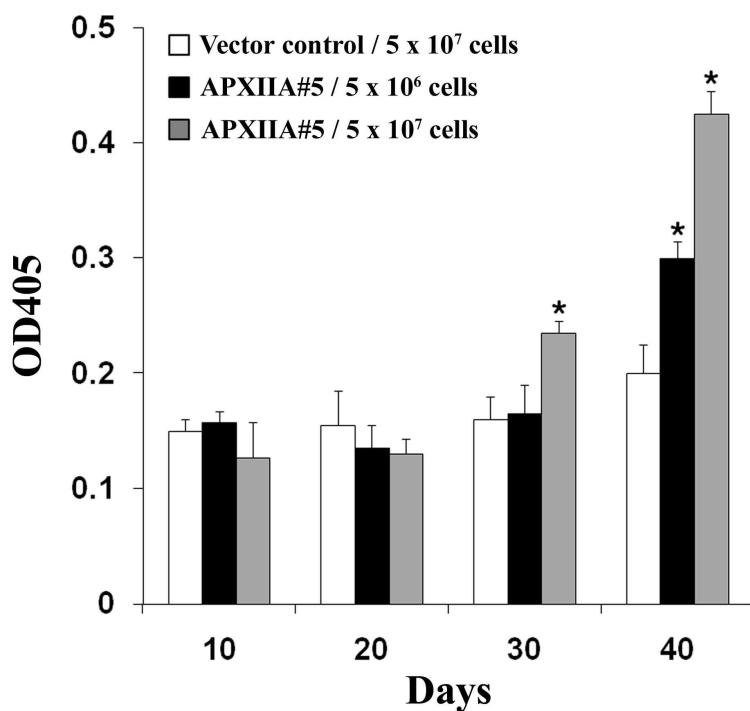


Figure 25. Immune response of specific IgG against ApxIIA#5 in sera of mice orally immunized using recombinant *S. cerevisiae* with 10 day intervals. Open, closed and shadowed boxes represent responses treated with 5×10^7 cells of vector-only transformant, 5×10^6 cells of ApxIIA#5 expressing transformants, and 5×10^7 cells of ApxIIA#5 expressing transformants, respectively. Five mice per group were orally immunized and significant differences between control and vaccinated groups were expressed as * $P < 0.05$.

Survival test

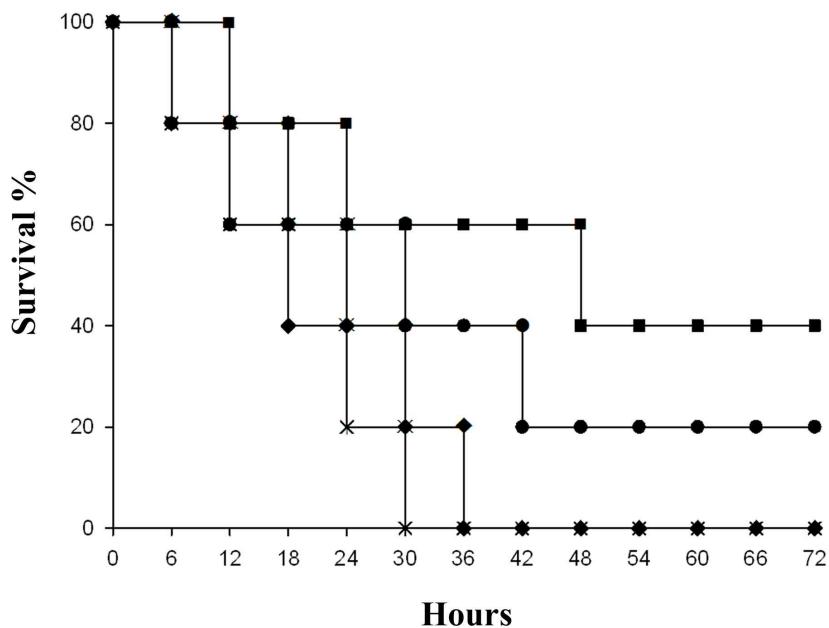


Figure 26. Survival rates of mice fed with *S. cerevisiae* after being challenged with minimal lethal dose of the *A. pleuropneumoniae* serotype 2 Korean isolate. (*, non-treated control; ◆, oral administration with 5×10^7 cells of vector-only transformants; ●, oral administration with 5×10^6 cells of ApxIIA#5 expressing transformants; ■, oral administration with 5×10^7 cells of ApxIIA#5 expressing transformants).

다. 돼지 흉막폐렴균 독소 단백질의 점막면역계 targeting을 위한 리간드의 활용

(1) M cell에 특이적으로 결합하는 ligand의 개발

M cell은 면역반응을 유도할 수 있는 세포들이 있는 주머니를 가지며 이는 여러 병원균에 의해 역으로 이용되어, 침투 경로로 이용되어질 수 있으며, 이는 또한 약물이나 백신의 흡수역시 높일 수 있는 통로일 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 점막의 M cell에 특이적으로 반응하는 ligand와 Apx 독소 단백질과의 fusion 단백질의 효모 내 발현을 연구하는 것이다. phage display library를 이용하여 점막 M cell에 특이적으로 반응하는 ligands들 중 Apx 독소 단백질과의 fusion에 이용될 ligands를 선택하였다.

본 연구진은 선행연구에서 배양된 M cell에 단백질 간의 상호작용을 이용하여 암이나 여러 질병의 대표물질을 찾는데 이용되는 phage display library panning을 통해서 다양한 ligand들을 확보하였다. 이들을 이용한 융합 항원단백질의 경구투여에 의한 면역반응 증진 효과를 확인하여 사용될 가장 효과적인 ligand를 확보하고자 하였다.

Phage display peptide library를 이용하여 얻은 ligand들 중 5개를 선택하였다 (Table 7). 이들 중 3개의 ligand (Co1, Co4, Co5) 만이 박테리아 배양 시스템에서 EGFP와 결합 재조합 단백질로 만들어졌다. 이러한 ligand-EGFP 재조합단백질은 M like cells과 mouse의 Peyer's patch에 잘 붙는 것을 확인하였으며, 이들 중 일부는 Peyer's patch 안으로 이동되어짐을 확인하였다 (Figure 27). 이러한 결과들을 바탕으로 실제 mouse 실험에 적용한 결과, ligand가 붙지않은 EGFP 단백질에 비해 높은 전신 면역반응과 점막 면역반응을 유도하였다 (Figure 28 과 29). 또한 흥미롭게도 ligand의 특성에 따라 점막 면역의 유도시간과 경향에 차이를 보였다. Co1 ligand가 전반적으로 다른 ligand들에 비해 높은 면역반응을 유도하였으며 앞으로 점막보조제로 백신 개발연구에 이용될 수 있을 것으로 판단되어 본 연구에 Co1 ligand를 이용하였다.

(2) M cell에 특이적으로 결합하는 ligand Co1과 Apx 독소의 융합 재조합효모 제작

M cell은 면역반응을 유도할 수 있는 세포들이 있는 주머니를 가지며 이는 여러 병원균에 의해 역으로 이용되어, 침투 경로로 이용되어질 수 있으며, 이는 또한 약물이나 백신의 흡수역시 높일 수 있는 통로일 것으로 보고되고 있다. 본연구진은 ligand와 Apx 독소 단백질과의 fusion 단백질의 효모 내 발현을 위하여 phage display library를 이용하여 점막 M cell에 특이적으로 반응하는 ligands들 중 Apx 독소 단백질과의 fusion에 이용될 ligand로써 다른

ligand들에 비해 높은 면역반응을 유도하였으며 앞으로 점막보조제로 백신 개발연구에 이용될 수 있을 것으로 사료되는 Co1을 선택하여 Figure 30의 모식도에 의해 ApxIIA#5의 N-terminal과 C-terminal 각각에 overlapping PCR을 이용하여 융합한 후 recombinant vector를 각각 제작하였다. 각 재조합 vector들을 형질전환에 이용하기 전에 restriction enzyme mapping과 염기서열을 분석하여 확인하였다. 추가적으로 C-terminal의 ligand 아미노산서열을 역으로 하여 fusion하였다.

S. cerevisiae Y2805 균주를 배양하여 LiAc를 처리한 후 형질전환을 위해 제작한 2 종류의 재조합 벡터들로 각각 형질전환 하였다. 형질전환체의 형질전환 유무를 확인하고자 재조합 벡터당 무작위로 10개 이상의 형질전환체의 colony PCR을 수행하여 real 형질전환체를 확보하였으며 (Figure 31, 32) *E. coli* backtransformation를 통해 다시한번 형질전환체임을 증명하였다. 또한 이 형질전환체들로부터 분리한 RNA와 단백질을 이용하여 각 fusion단백질의 발현여부를 확인하기 위하여 Northern blot analysis와 Western blot analyis를 수행한 결과 CO1-APX5, APX5-CO1A와 APX5-CO1B 융합 단백질이 효모 내에서 발현됨을 확인하였다 (Figure 33, 34, 35, 36).

(3) 재조합효모의 면역유도 특성 검정여부

M cell에 특이적으로 결합하는 ligand Co1과 Apx 독소의 융합 재조합효모 제작 후 경구접종용으로 배양하여 공동연구진에 의해 활용되도록 제공되었으며, 공동연구진에 재조합 효모를 분양하였다. 사료에 준비된 재조합 효모를 기간 별로 경구투여한 후 경구 투여된 실험동물을 대상으로 minimal lethal dose 및 IgG의 수치가 공동연구진에 의해 검정 중이다.

Table 7. Selected peptide of M like cell-targeting

Peptide													
Co 1	<u>S</u>	<u>F</u>	H	Q	<u>L</u>	P	<u>A</u>	R	<u>S</u>	P	<u>L</u>	P	
Co 2	K	<u>A</u>	H	<u>T</u>	P	V	T	F	G	L	<u>T</u>	H	
Co 3	<u>A</u>	H	R	<u>H</u>	P	<u>I</u>	S	F	L	S	T	L	
Co 4	<u>G</u>	<u>S</u>	T	Q	<u>A</u>	W	M	S	P	P	L	A	
Co 5	<u>L</u>	<u>L</u>	A	D	T	T	H	H	R	P	<u>W</u>	T	

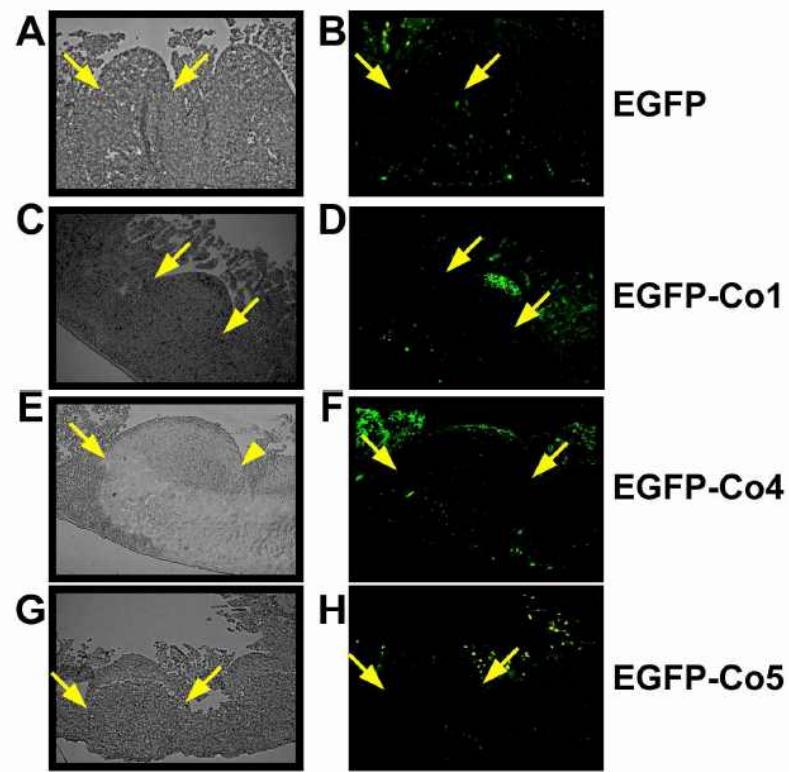


Figure 27. Transportation of ligand fusion protein into murine Peyer's patches. EGFP (A, B), EGFP-Co1 (C, D), EGFP-Co2 (E, F), and EGFP-Co3 (G, H) were incubated with murine small intestinal segment of mice. After washing, intestines were fixed, sectioned, and taken images under light (A, C, E, G) and fluorescence microscopy (B, D, F). A gap between the two yellow arrows indicated the FAE of peyer's patch.

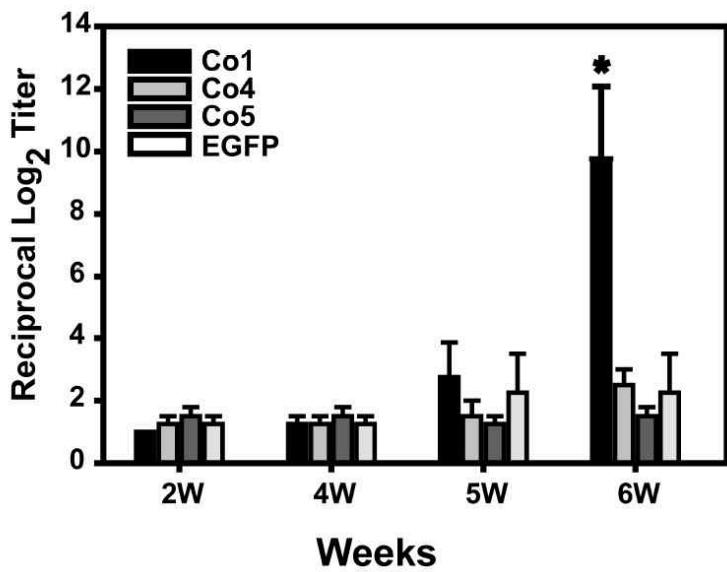


Figure 28. Induction of EGFP specific systemic immune response in mice fed with ligand–EGFP fusion protein. Shown are serum IgG antibody levels in mice fed with Co1–EGFP (black bar), Co4–EGFP (gray bar), Co5 EGFP (dark gray bar), and EGFP (white bar). Serum sample were obtained 6 days after oral administration with ligand fusion protein and analyzed for EGFP specific IgG level by ELISA.

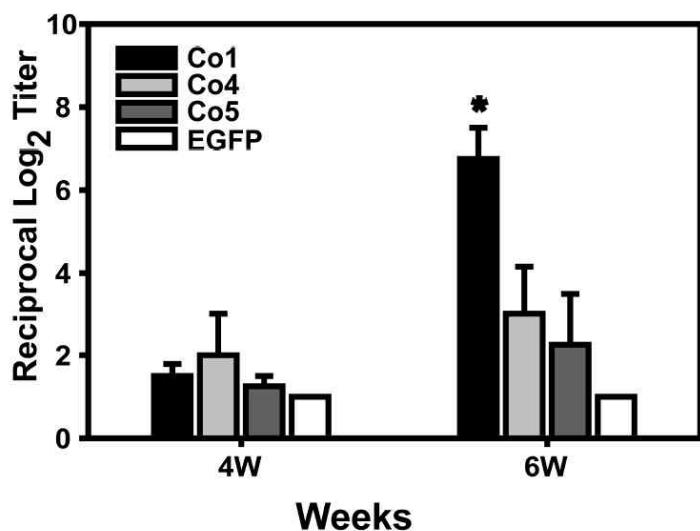


Figure 29. Characterization of EGFP specific IgG subclass, IgG1. Shown are serum IgG1 antibody levels in mice fed with Co1–EGFP (black bar), Co4–EGFP (gray bar), Co5 EGFP (dark gray bar), and EGFP (white bar) by ELISA.

A.



B.

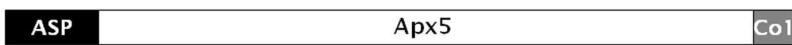


Figure 30. Schematic structure of the Co1-APX5 and APX5-Co1 fusion constructs by a overlapping PCR. ASP, rice AmylA1 signal peptide; Co1, peptide of M like cell-targeting.

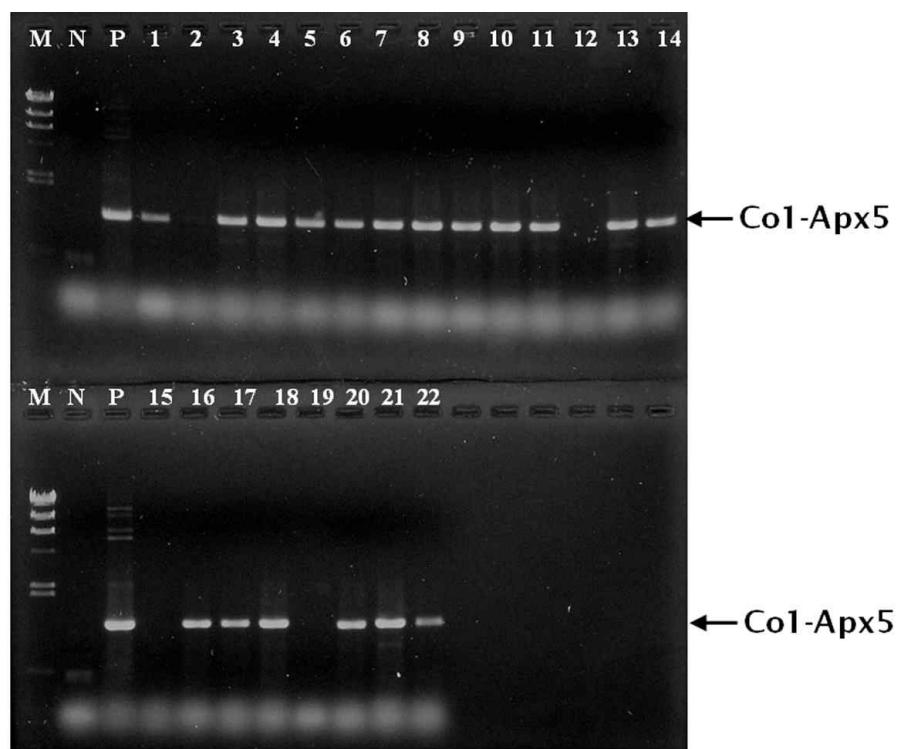


Figure 31. PCR analysis of yeast transformants by a yeast colony PCR. M, size marker; N, negative control, Y2805; P, positive control, Co1-Apx5 fragment; lane 1–22, yeast transformants.

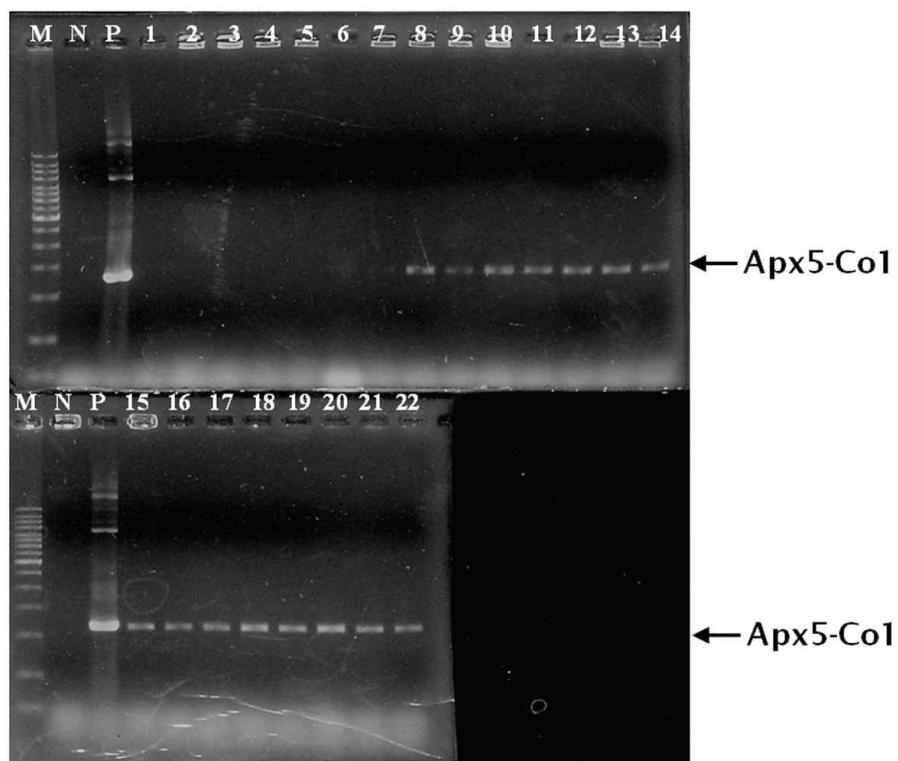
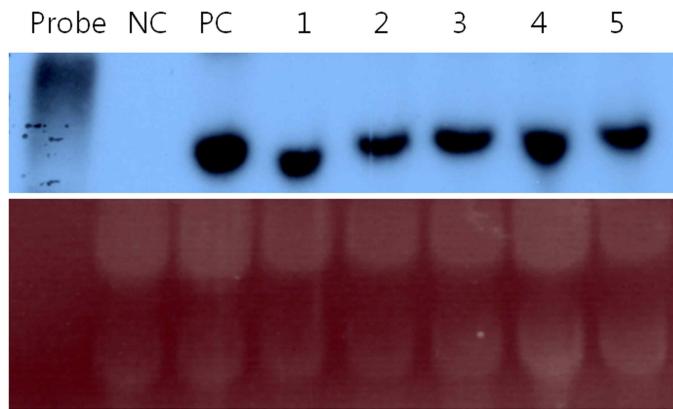


Figure 32. PCR analysis of yeast transformants by a yeast colony PCR. M, size marker; N, negative control, Y2805; P, positive control, Apx5-Co1 fragment; lane 1–22, yeast transformants.



NC: cell free extract of the Y2805 W.T strains.

PC: pYEGRamyIA-Apx5

1: pYEG ApxIIA 5 fragment

2: pYEG RamyIA co1A -Apx5

3: pYEG RamyIA -Apx5 co1A

4: pYEG RamyIA -Apx5 co1B #3

5: pYEG RamyIA -Apx5 co1B #8

Figure 33. Northern blot analyses of a various Co1 ligand and APXIIA#5 (APX5) fusion construct using the Apx5 specific probe. Equal loading of RNA samples is shown in the bottom panel as an internal control and in an ethidium bromide-stained gel (rRNA).

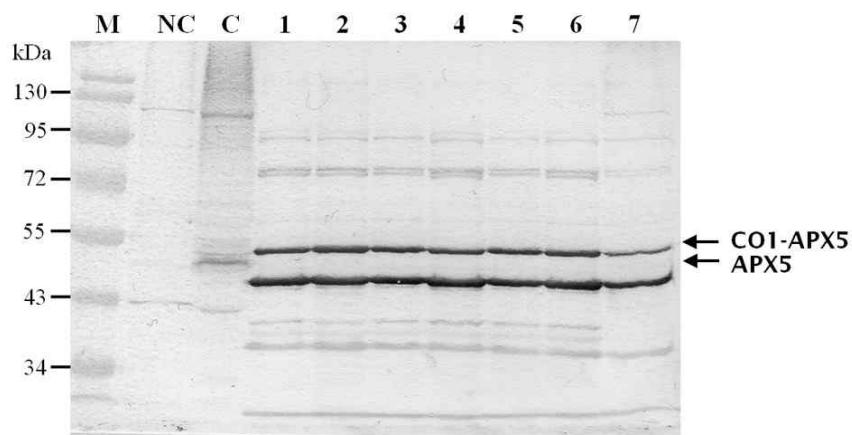


Figure 34. Western blot analysis of the Co1 ligand and APXIIA#5 (APX5) fusion construct using the anti-APX5. Lane NC, cell wall extract of the recipient strain (Y2805); lane C, APX5 construct; lane 1–7, CO1-APX5 fusion constructs.

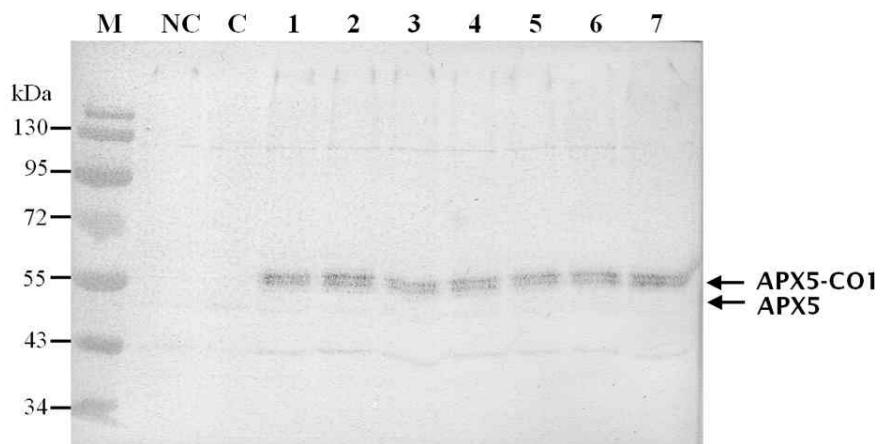


Figure 35. Western blot analysis of the APXIIA#5 (APX5) and Co1 ligand fusion construct using the anti-APX5. Lane NC, cell wall extract of the recipient strain (Y2805); lane C, APX5 construct; lane 1–7, APX5–CO1A fusion constructs.

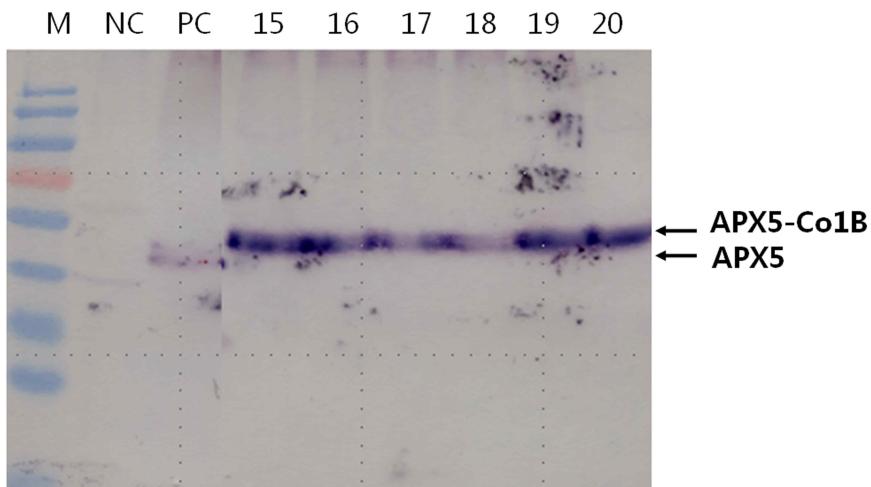


Figure 36. Western blot analysis of the APXIIA#5 (APX5) and Co1 ligand fusion construct using the anti-APX5. Lane NC, cell wall extract of the recipient strain (Y2805); lane PC, APX5 construct; lane 15–20, APX5–CO1B fusion constructs.

3. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 체계 구축

가. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 대량 생산 시스템 구축 및 최적 조건 선정을 위한 플라스크 배양

돼지 흉막폐렴 독소 단백질 APX IA, APX II A, Apx III A를 형질 전환시킨 효모 (*Saccharomyce cerevisiae* Y2805)의 배양 조건을 최적화하기 위하여 1 L Erlenmeyer 플라스크를 사용하였다. 최적 조건을 선정하기 전 효모의 배양성을 평가하기 위해 복합영양배지 YEPD(yeast extract peptone dextrose) 배지를 사용하여 효모의 성장성을 파악하였다. 상기 균주를 포도당 20.0 g/L를 포함하는 URA 결핍 배지에서 12시간 전배양 한 후, 다시 포도당 20.0 g/L, 효모추출액 10.0 g/L, bacto-peptone 20.0 g/L 를 포함하는 YEPD 기본 배지에 전배양 된 세포를 O.D₆₀₀ = 0.2로 접종하고 배양하였다. 배양조건은 pH 6.0, 온도 30°C, 교반속도 200 rpm으로 배양하였다. 효모의 세포농도는 흡광도 600 nm에서 double-beam spectrophotometer (Lambda 20, Perkin-Elmer; Norwalk, CT)를 사용하여 측정하였다. Figure 37과 같이 3종 균주 모두 12시간 이내에 20.0 g/L 의 포도당이 모두 고갈되었으며, 포도당이 고갈 된 이후에 24 ~40 시간에 균체량이 상당량 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한, 포도당이 고갈 된 후 배양액 중 생성된 에탄올을 사용하여 다시 성장하는 것을 알 수 있었다. 3종 균주의 균체 농도는 약 9.0 g/L로 비슷하였으며, 생균수는 약 3.0E+08 CFU/ml (colony forming unit)이었다 (Figure 38). 하지만 고농도의 균체를 얻기 위해서 배지성분 및 배양조건을 최적화해야 한다. 고농도 균체를 얻기 위한 최적배지 및 성장 조건을 구축하기 위하여, 포도당 20.0 g/L 와 효모추출액 20.0 g/L 를 포함하는 배지 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.4 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5.1 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.075 g)를 사용하였다. 세포의 배양은 200 ml의 배지를 포함하는 1 L Erlenmeyer 플라스크를 사용하여 온도 30°C, 교반속도 160 rpm으로 배양하였다. 효모 성장 최적 조건을 구축하기 위하여 Figure 40에 나타낸바와 같이 O.D₆₀₀가 약 40.0에 이르렀을 때, 포도당과 효모추출액 2 %, 2 %씩 각각 첨가하여 고농도 배양을 실시하였다. Figure 40-(a), (b)에서 알 수 있듯이 APX IA, APX II A 균주의 경우 trehalose를 첨가했을 때 약 90~100 O.D₆₀₀까지 성장하였다. 동일한 균주의 플라스크 배양과 비교하여 1.5배 높은 성장성을 보였다. 이것은 상기의 균주가 최적화된 배지를 사용함에 따라 고농도 배양이 가능함을 보여준다. 반면 Figure 40-(c)에 나타낸 바와 같이 Apx III A 균주의 경우 trehalose 첨가에 따른 효과가 없었고 포도당과 효모추출액 등이 포함된 배지에서 더 좋은 성장성을 나타내었다. 이것은 상기의 균주가 포도당을 연속적으로 공급함에 따라 고농도 배양이 가능함을 보여주는 것이다.

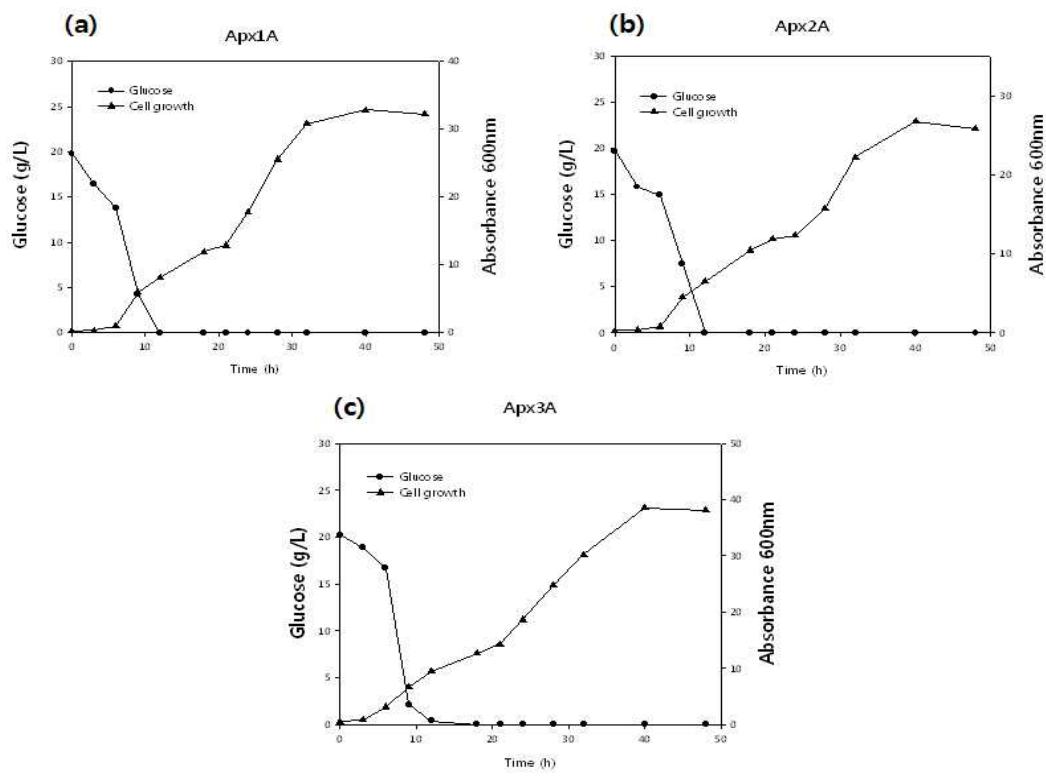


Figure 37. Shake flask culture time-course profiles of the recombinant *S. cerevisiae* Y2805 on cell growth, glucose consumption were indicated as (a), (b) and (c), respectively. Symbols: ●, glucose consumption, g/liter ; ▲, cell growth

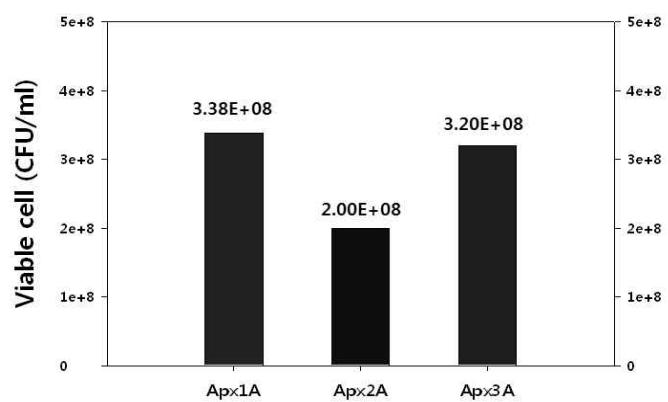


Figure 38. The number of viable cells of *S. cerevisiae* Y2805.

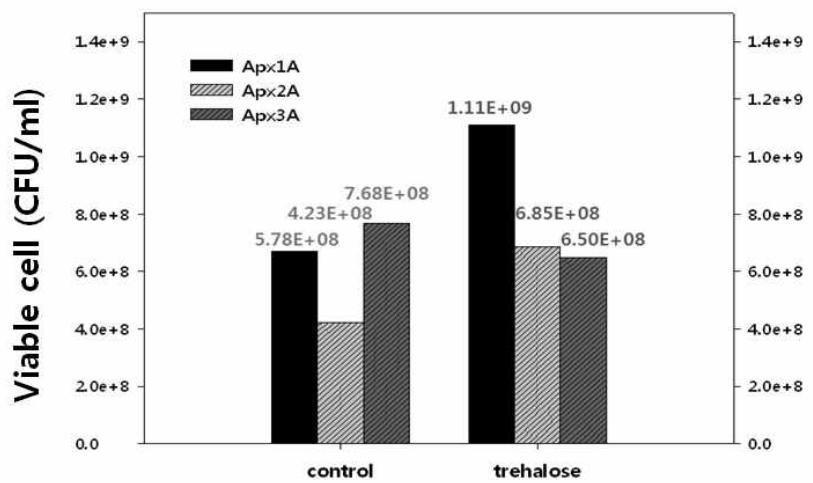


Figure 39. Trehalose effect on the number of viable cells of *S. cerevisiae* Y2805.
 Symbols: ■, Apx I A; ▨, Apx II A; ▨▨, Apx III A.

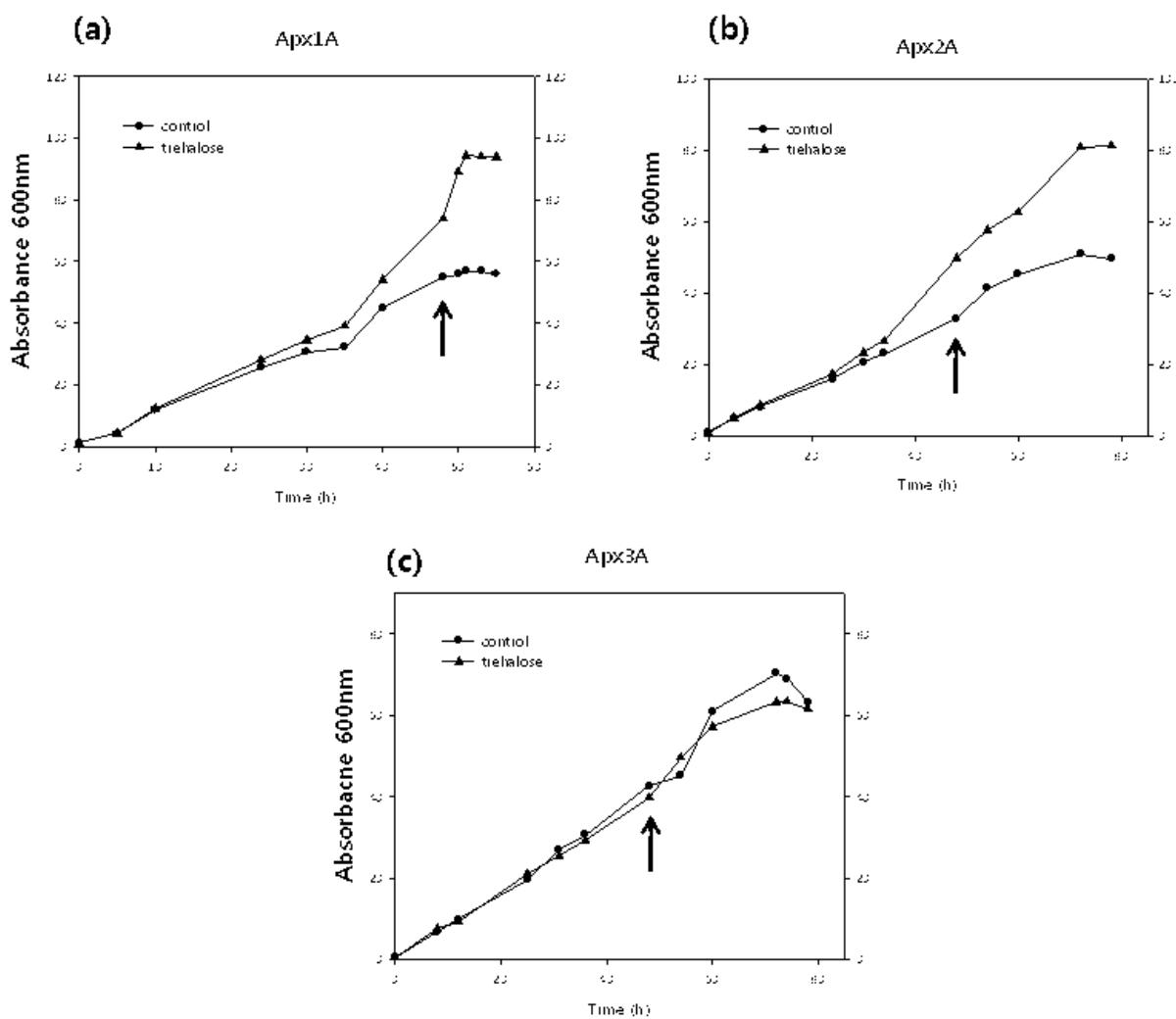


Figure 40. Trehalose effect on the cell growth was indicated as (a) Apx I A (b) Apx II A (c) ApxIII A respectively. Symbols: ●, control ; ▲, trehalose. Arrow indicates the time at which glucose and yeast extract were pulsed to the shake flask.

나. 생물반응기를 이용한 재조합 효모의 대량 생산 시스템 구축 및 최적 조건 선정

(1) 회분식 배양 (Batch culture)

돼지 흉막폐렴 독소 단백질 APX I A, APX II A, Apx III A를 형질 전환시킨 효모를 대량 배양하기 위하여 7 L 원통형 생물반응기(bioreactor)를 이용하여 발효 조건을 scale up 하였다. 재조합 효모를 7 L 원통형 생물반응기에 5 L 배양액을 사용하여 플라스크 배양에서 최적화한 배지로 고농도 배양을 실시하였다. 상기 균주를 포도당 20.0 g/L를 포함하는 URA 결핍 배지에서 12시간 전배양 한 후, 다시 포도당 20.0 g/L를 포함하는 YEPD 기본 배지에서 12시간 전배양 하였다. 이후 포도당과 효모추출액이 포함된 5L 배양액에 전배양 된 세포를 O.D₆₀₀ = 0.5로 접종하고 pH 6.0, 통기량 0.5 vvm, 온도 30°C, 교반속도 200 rpm으로 회분식 배양하였다. 회분식 배양은 적당량의 배지를 넣은 플라스크에 종균을 배양하여 주발효조로 옮긴 후 균의 증식에 최적인 발효 조건을 유지하면서 배양하는 것이다. 회분식 배양을 위한 배지의 조성은 포도당 20.0 g/L 와 효모추출액 20.0 g/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.4 g/L ; (NH₄)₂SO₄, 5.1 g/L ; MgSO₄ · 7H₂O, 0.075 g/L, trace element solution 1 ml/L (CaCl₂ · 2H₂O 11.0 mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 7.0 mg/L, MnSO₄ · 5H₂O 2.0 mg/L, ZnSO₄ · 7H₂O 2.0 mg/L, CuSO₄ · 5H₂O 0.4 mg/L, CoCl₂ · 6H₂O 0.4 mg/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.2 mg/L, H₃BO₄ 0.5 mg/L)이며, 배양액의 pH는 25 % NH₄OH 용액을 이용하여 pH 6.0 수준으로 유지시켜주었다. Figure 41과 같이 효모의 세포농도는 흡광도 600 nm에서 double-beam spectrophotometer (Lambda 20, Perkin-Elmer; Norwalk, CT)를 사용하여 측정하였다. 배지 중의 포도당 농도는 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI 2700; USA)를 사용하여 측정하였다.

Figure 41에 나타낸 바와 같이 상기의 3종의 배양성은 비슷한 결과를 나타내었으며, 포도당 20.0 g/L는 12시간 이내에 모두 고갈되었다. 균체의 농도는 10시간까지 정체기를 거친 후에는 다시 서서히 증가하기 시작하여 30 ~ 48 시간까지 약 9.0 g/L에 도달하였다. 초기에 넣어준 당을 이용하여 자라면서 에탄올 발효가 일어나고, 포도당이 고갈된 후 배양액 중에 생성된 에탄올을 소모하면서 다시 성장하는 것을 알 수 있었다. 그러나 고농도의 균체를 연기에는 회분식 배양의 효율성이 낮은 것으로 판단되었다.

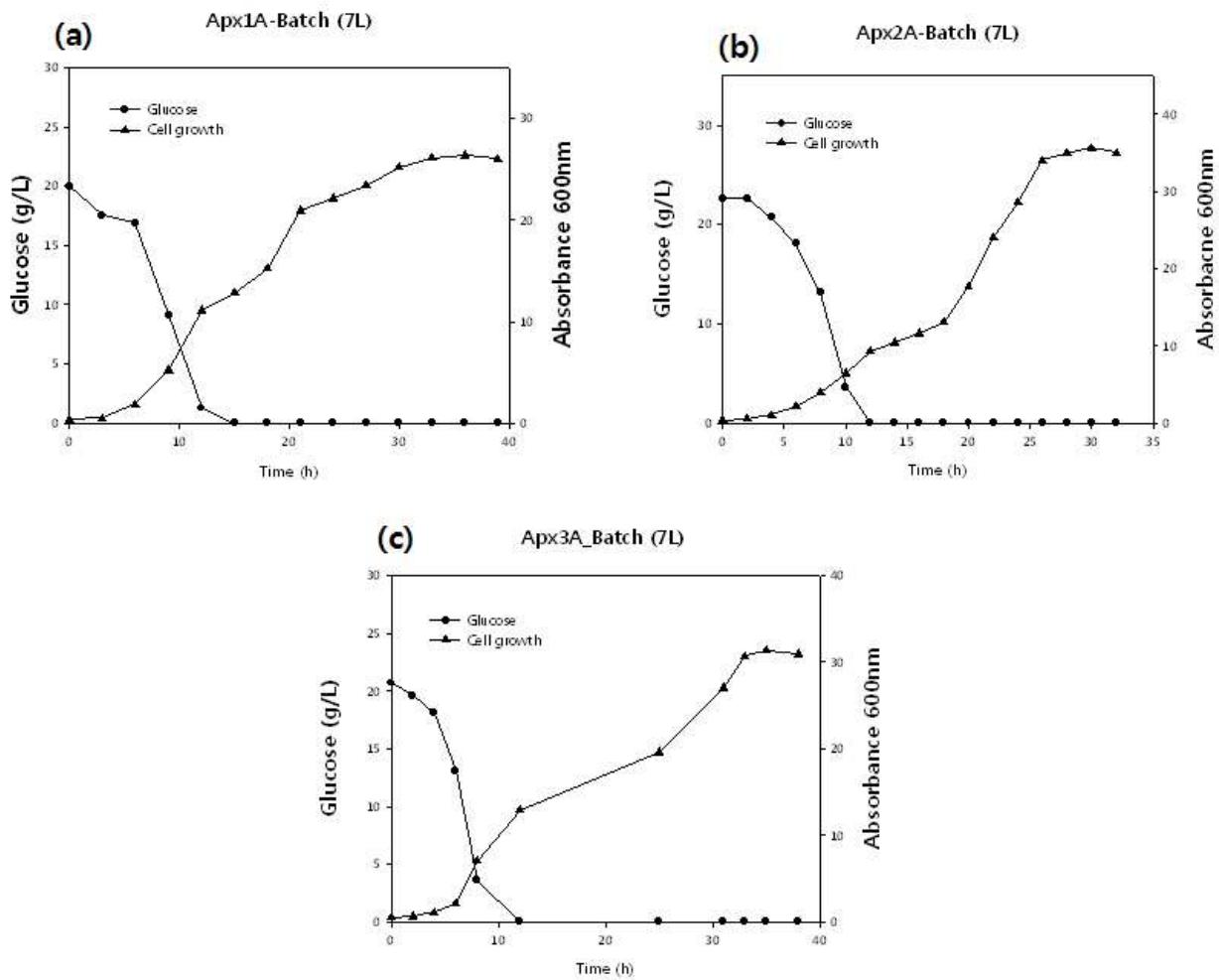


Figure 41. Time-course profiles of aerobic batch cultivation of the recombinant *S. cerevisiae* Y2805 on cell growth, glucose consumption were indicated as (a), (b) and (c), respectively. Batch fermentations were performed in a 7 liter bioreactor equipped with pH and temperature controllers. Symbols: ●, glucose consumption, g/liter ; ▲, cell growth

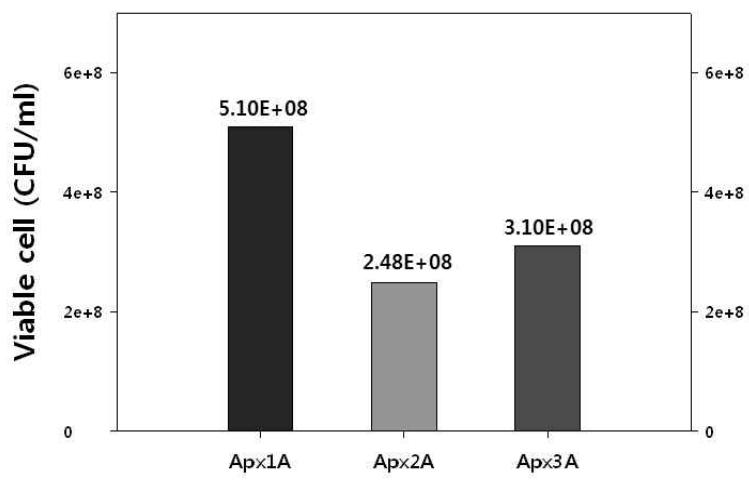


Figure 42. The number of viable cells of *S. cerevisiae* Y2805 under batch cultivation.

(2) 유가식 배양 (Fed-batch culture)

초기 포도당의 농도가 높을 경우 lag phase가 길어지기 때문에 초기 당 농도를 20.0 ~ 40.0 g/L로 하여 배양을 개시함으로서 lag time을 줄이고 균체 농도를 증가시키고자 유가식 배양을 실시하였다. 앞에서 실시한 회분식 배양은 발효가 일단 시작되면 배지를 추가하지도 제거하지도 않는다. 그러나 유가식 배양은 배지를 간헐적으로 추가하는 방법으로 배양액 중에 기질 농도를 임의로 조절할 수 있다. 그리고 기질은 적당한 속도로 첨가되며 유출이 없기 때문에 공급되는 기질의 양과 미생물에 의한 소비량 사이에 균형을 유지함으로써 기질을 자유롭게 제어할 수 있다.

재조합 효모를 7 L 원통형 생물반응기에 5 L 배양액을 사용하여 플라스크 배양에서 최적화한 배지로 고농도 배양을 실시하였다. 상기 균주를 포도당 20.0 g/L를 포함하는 URA 결핍 배지에서 12시간 전배양 한 후, 다시 포도당 20.0 g/L를 포함하는 YEPD 기본 배지에서 12시간 전배양 하였다. 이후 포도당과 효모추출액이 포함된 5L 배양액에 전배양 된 세포를 O.D₆₀₀ = 0.5로 접종하고 pH 6.0, 통기량 0.5 vvm, 온도 30°C, 교반속도 200 rpm으로 유가식 배양하였다. 유가식 배양을 위한 배지의 조성은 포도당 20.0 g/L 와 효모추출액 20.0 g/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.4 g/L ; (NH₄)₂SO₄, 5.1 g/L ; MgSO₄ · 7H₂O, 0.075 g/L, trace element solution 1 ml/L (CaCl₂ · 2H₂O 11.0 mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 7.0 mg/L, MnSO₄ · 5H₂O 2.0 mg/L, ZnSO₄ · 7H₂O 2.0 mg/L, CuSO₄ · 5H₂O 0.4 mg/L, CoCl₂ · 6H₂O 0.4 mg/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.2 mg/L, H₃BO₄ 0.5 mg/L)이며, 배양액의 pH는 25 % NH₄OH 용액을 이용하여 pH 6.0 수준으로 유지시켜주었다. 포도당 공급 속도는 0.2 ~ 2.0 g/L/hr 로 일정하게 유지시켜 주었다. Figure 43과 같이 효모의 세포농도는 흡광도 600 nm에서 double-beam spectrophotometer (Lambda 20, Perkin-Elmer; Norwalk, CT)를 사용하여 측정하였다. 배지 중의 포도당 농도는 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI 2700; USA)를 사용하여 측정하였다.

Figure 43에 나타낸 바와 같이 3종 균주마다 유가식 배양에 의한 배양성이 다름을 알 수 있었다. Apx I A 단백질을 형질전환 시킨 효모의 경우 30시간에 균체농도 약 20.0 g/L에 도달하였으며 48시간에는 45.0 g/L까지 도달하였다. 이 때 생균수는 2.0E+09 CFU/ml 이었으며 (Figure 43), 이것은 회분식 배양과 비교하여 약 5.8 배 증가된 결과이다. Apx II A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 30시간에 균체농도 15.0 g/L에 도달하였으며, 48시간에는 18.0 g/L로 크게 증가하지는 않았다. 유가식 배양에 의한 생균수는 5.0E+08 CFU/ml 으로 (Figure 44), 회분식 배양과 비교하여 약 2.0 배 증가되었다. Apx III A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 균체 농도 28.8 g/L까지 증가하였다. 이 때 생균수는 1.0E+09 CFU/ml 이었으며 (Figure 44), 이것은 회분식 배양과 비교하여 약 3.3 배 증가되었다. Apx I A, Apx III A 단백질을 형질전환

시킨 효모의 경우 순수산소의 공급과 포도당이 계속적으로 공급된다면 균체농도를 보다 증가 시킬 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 Apx II A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 Figure 45와 같이 현미경으로 균체의 모양을 관찰했을 때 다른 2종의 효모보다 균체 모양이나 크기가 불규칙하고 균체끼리 뭉치는 현상이 나타났다. 이러한 현상 때문에 유가식 배양을 했을 때도 균체 농도가 급격히 증가하지 않는 것으로 판단되어진다.

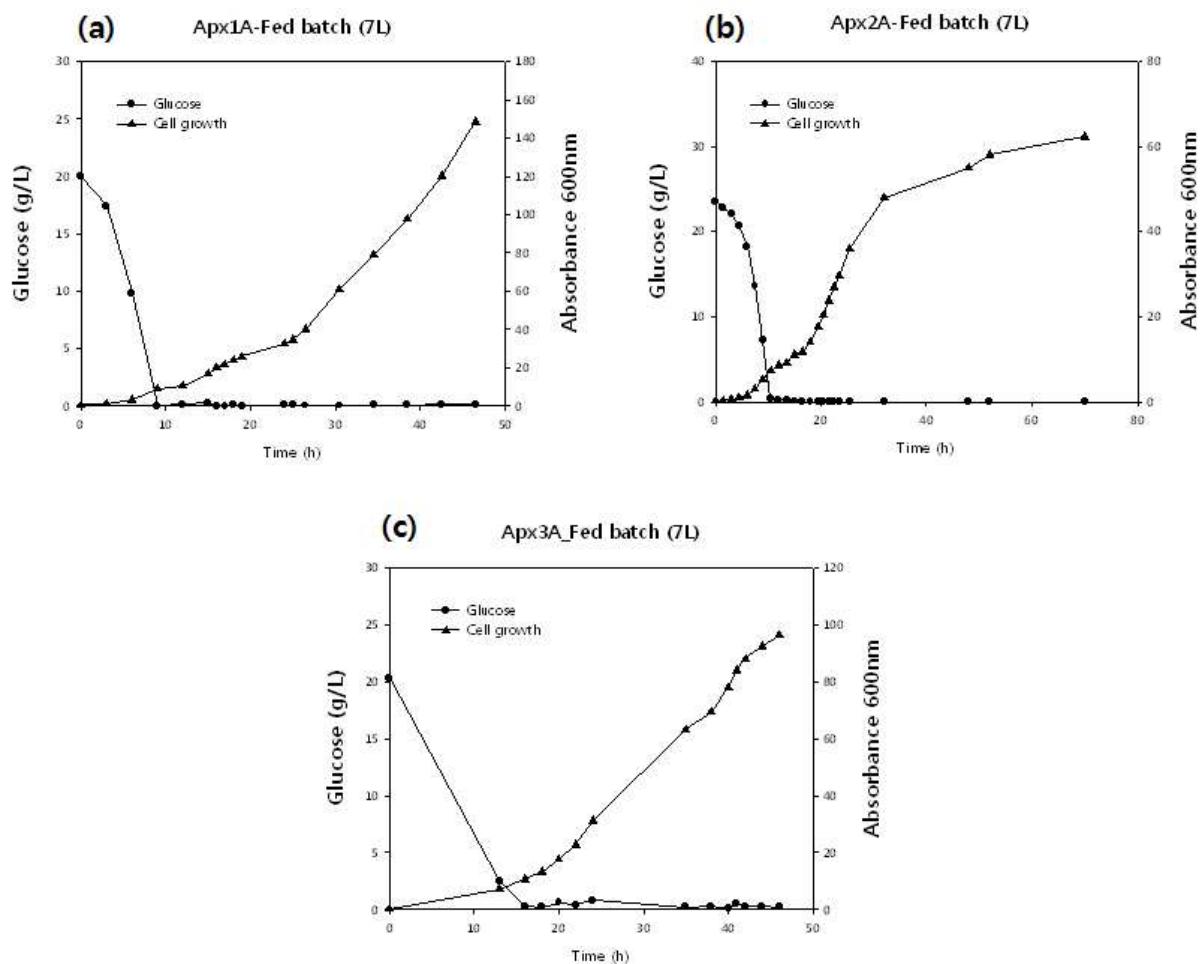


Figure 43. Time-course profiles of aerobic fed-batch cultivation of the recombinant *S. cerevisiae* Y2805 on cell growth, glucose consumption were indicated as (a), (b) and (c), respectively. Fed-batch fermentations were performed in a 7 liter bioreactor equipped with pH and temperature controllers. Symbols: ●, glucose consumption, g/liter ; ▲, cell growth

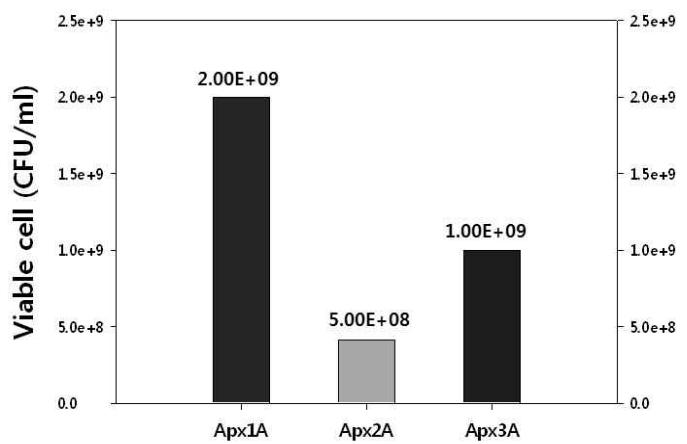


Figure 44. The number of viable cells of *S. cerevisiae* Y2805 under fed-batch cultivation.

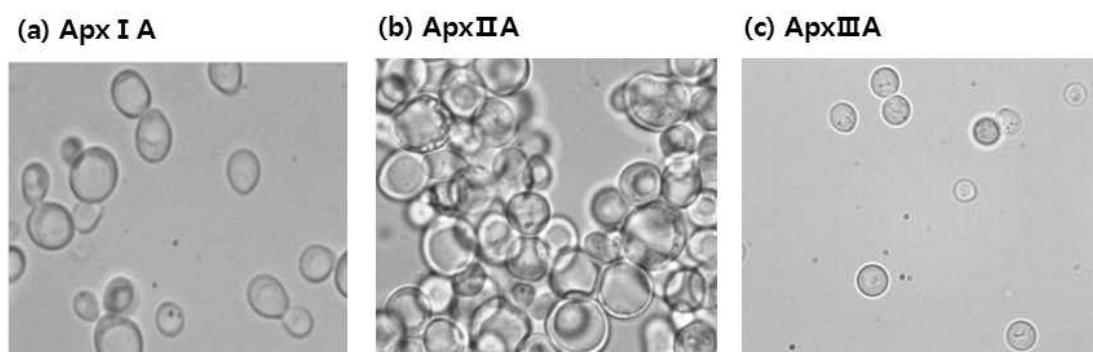


Figure 45. Micrograph of *S. cerevisiae* Y2805.

다. 500 L 생물반응기를 이용한 재조합 효모의 대량 생산 시스템 구축

앞서 실시한 발효 결과를 바탕으로 재조합 효모의 대량 생산 시스템을 구축하기 위해 500 L 원통형 생물반응기(bioreactor)를 이용하여 발효 조건을 scale up 하였다.

재조합 효모를 500 L 원통형 생물반응기에 300 L 배양액을 사용하여 플라스크 배양에서 최적화한 배지에서 고농도 배양 및 scale up을 실시하였다. 3종의 재조합 효모를 포도당 20.0 g/L를 포함하는 URA 결핍 배지에서 12시간 전배양 한 후, 다시 포도당 20.0 g/L를 포함하는 YEPD 기본 배지에서 12시간 전배양 하였다. 이후 포도당과 효모추출액이 포함된 300L 배양액에 전배양 된 세포를 O.D₆₀₀ = 0.3으로 접종하고 pH 6.0, 통기량 0.5 vvm, 온도 30°C, 교반속도 200 rpm으로 유가식 배양을 실시하였다. 유가식 배양을 위한 배지의 조성은 포도당 20.0 g/L 와 효모 추출액 20.0 g/L, Na₂HPO₄ · 12H₂O, 2.4 g/L ; (NH₄)₂SO₄, 5.1 g/L ; MgSO₄ · 7H₂O, 0.075 g/L, trace element solution 1 ml/L (CaCl₂ · 2H₂O 11.0 mg/L, FeSO₄ · 7H₂O 7.0 mg/L, MnSO₄ · 5H₂O 2.0 mg/L, ZnSO₄ · 7H₂O 2.0 mg/L, CuSO₄ · 5H₂O 0.4 mg/L, CoCl₂ · 6H₂O 0.4 mg/L, Na₂MoO₄ · 2H₂O 0.2 mg/L, H₃BO₄ 0.5 mg/L)이며, 배양액의 pH는 25 % NH₄OH 용액을 이용하여 pH 6.0 수준으로 유지시켜주었다. 포도당 공급 속도는 0.2 ~2.0 g/L/hr 로 일정하게 유지시켜 주었다. Figure 46와 같이 효모의 세포농도는 흡광도 600 nm에서 double-beam spectrophotometer (Lamda 20, Perkin-Elmer; Norwalk, CT)를 사용하여 측정하였다. 배지 중의 포도당 농도는 SELECT Biochemistry Analyzer (YSI 2700; USA)를 사용하여 측정하였다.

Figure 46에 나타낸 바와 같이 500 L로 발효 조건을 scale up 했을 때, 7 L 생물반응기에서 실시했던 결과와 비슷한 세포 성장 및 균체 농도를 얻을 수 있었다. 이것은 실시한 발효 결과를 바탕으로 재조합 효모의 대량 생산 시스템을 구축하는데 성공하였음을 의미한다. 그러나, Apx II A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 유가식 배양을 하여도 고농도 균체를 얻지 못하였으므로 향후 보완 실험이 더 필요할 것으로 판단된다.

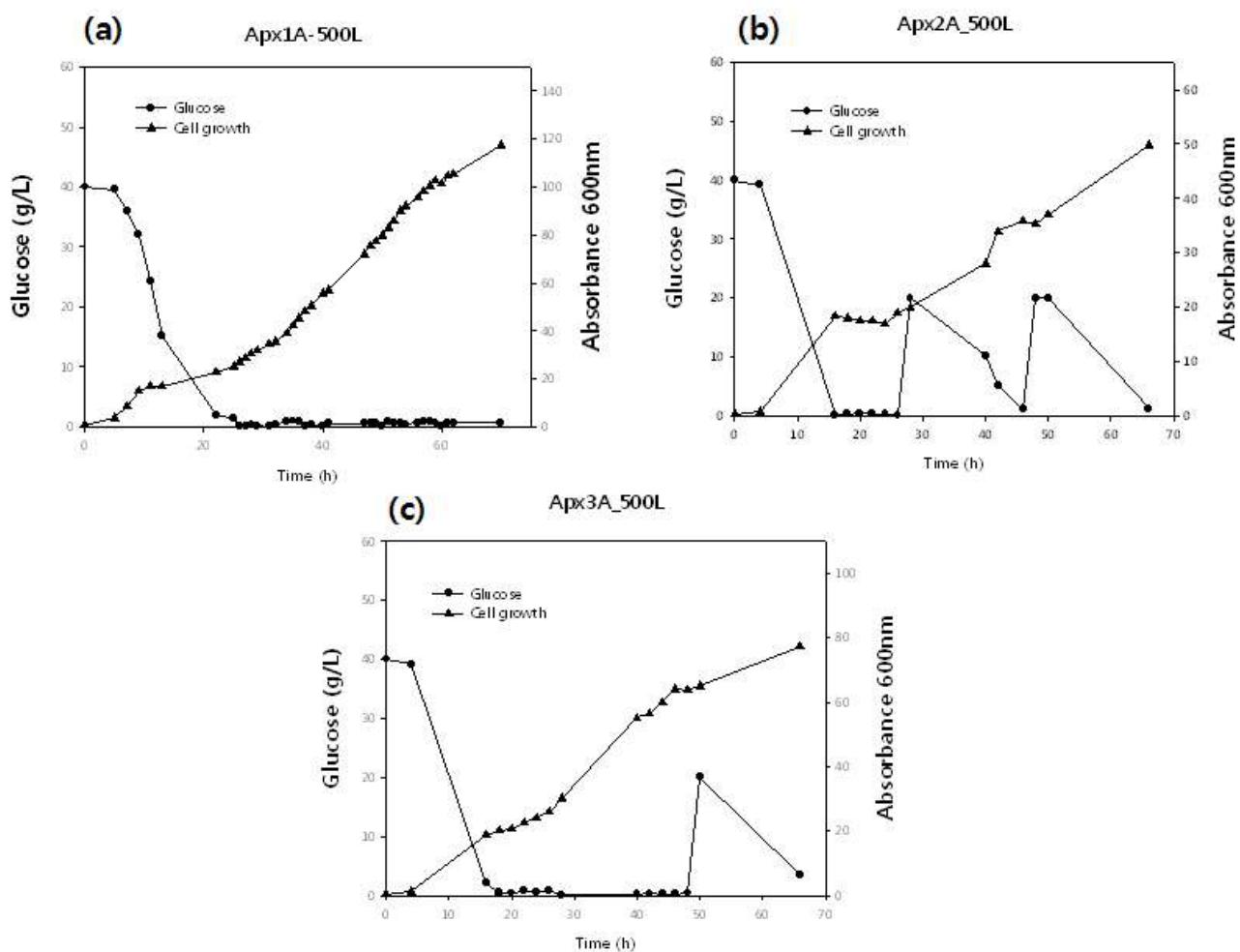


Figure 46. Time-course profiles of aerobic fed-batch cultivation of the recombinant *S. cerevisiae* Y2805 on cell growth, glucose consumption were indicated as (a), (b) and (c), respectively. Fed-batch fermentations were performed in a 500 liter bioreactor equipped with pH and temperature controllers. Symbols: ●, glucose consumption, g/liter ; ▲, cell growth

4. ApxII 항원단백질 발현 효모를 이용한 실험동물에서의 경구면역

가. 실험동물(마우스)에서 형질전환 효모의 경구면역 유도 평가

(1) 마우스 모델에서 형질전환 효모에 대한 항체가 측정

실험동물(마우스)에서의 경구 면역을 위해 경구 면역군으로 3개 실험군, 음성 대조군 1개 실험군을 편성하고 면역계획에 따라 면역을 실시하였다 (Table 8, Figure 47). 효과적인 형질 전환 효모의 면역능을 평가하기 위하여 경구면역 실험군에 3가지 형질전환 효모를 편성하였다. ApxIIA의 neutralizing epitope인 ApxIIA#5의 분비형 발현균주(Secreted ApxIIA-#5), 세포표면 발현균주(Surfaced ApxIIA-#5) 그리고 ApxIIA full 유전자의 발현균주(ApxIIA-Full)에 대한 효능을 평가하였다. 양성대조군으로서 ApxIIA full 유전자의 발현균주(ApxIIA-Full)는 선행연구에서 경구면역 유도능과 방어능을 입증한 바 있다. 형질전환 효모의 ApxIIA 항원 단백질 발현 형질전환 효모를 대량 생산하여 동결 건조하여 분말로 만들었다. 이를 PBS 200 μ l에 부유시켜 경구 투여하였다. 선행연구 결과를 바탕으로 경구 면역시 oral tolerance를 극복하기위해서 면역 시기별로 투여량을 증가시키면서 경구투여를 실시하였다. 효모를 2주 간격으로 30, 50, 70 그리고 90mg으로 점차 양을 증가시켜 4번 투여하였다. 형질전환 효모의 경구 투여로 유도된 ApxIIA 특이 IgG 및 IgA의 항체가 분석을 위해 ELISA 분석법에 기초하여, 재조합 ApxIIA를 1 μ g/well의 농도로 PBS에 희석하여 coating하였고, blocking으로 1% bovine serum albumin을 함유한 PBST를 분주하여 37°C에서 1시간동안 실시하였다. 1차 항체로는 mouse serum(1:50)을 37°C에서 1시간 반 동안, 2차 항체로 anti-mouse IgG(H+L)-Ap conjugate(1:1000)를 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. Alkaline-phosphatase substrate 100 μ l로 발색시키고 Microplate reader에서 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료는 serum을 채취하였고 sampling 시기는 투여시기와 마찬가지로 2 주 간격으로 시행하였다. 확립된 ELISA 기법을 이용하여 serum에서 ApxIIA에 대한 특이 IgG 및 IgA 항체가를 조사하여 분석하였다. 형질전환 효모 백신 마지막 접종 후에서 ApxIIA 특이 IgG의 상승을 확인할 수 있었다 (Figure 48). Surfaced ApxIIA#5에서 ApxIIA 특이 IgA가 상승한 것을 확인 할 수 있었다.

Table 8. Experimental groups of mice orally vaccinated with *Saccharomyces cerevisiae* expressing *A. pleuropneumoniae* ApxIIA

	Group	투여 항원
1군	Negative control (vector control)	vector만을 함유한 균주 경구 투여
2군	Secreted ApxIIA#5	ApxIIA#5 분비 균주 경구 투여
3군	Surfaced ApxIIA#5	ApxIIA#5 표면 발현균주 경구 투여
4군	ApxIIA-Full	ApxIIA-Full 발현균주 경구 투여

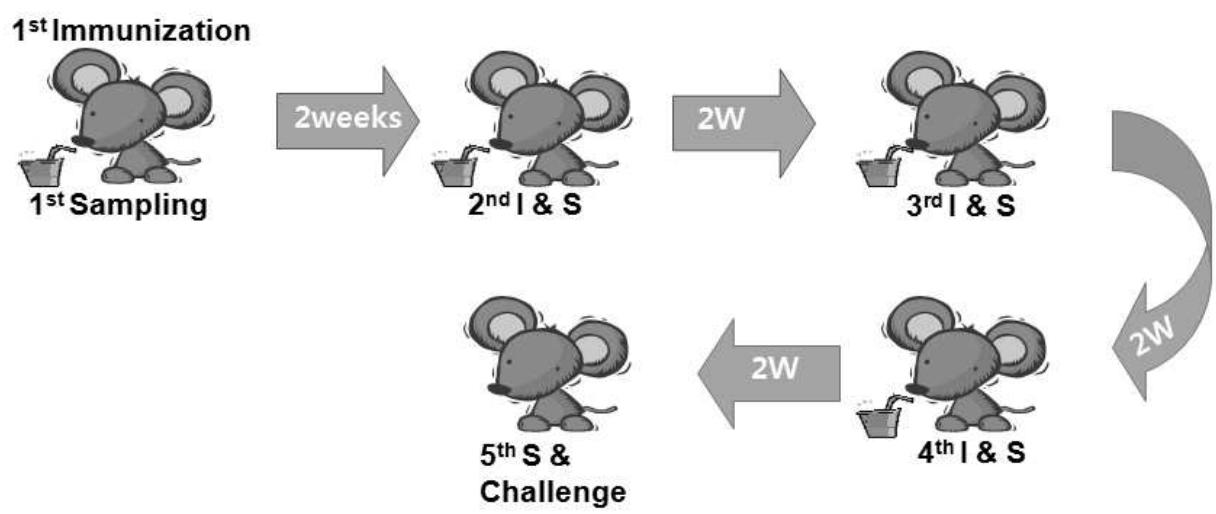


Figure 47. Strategy of oral vaccination and sampling schedules in mouse.

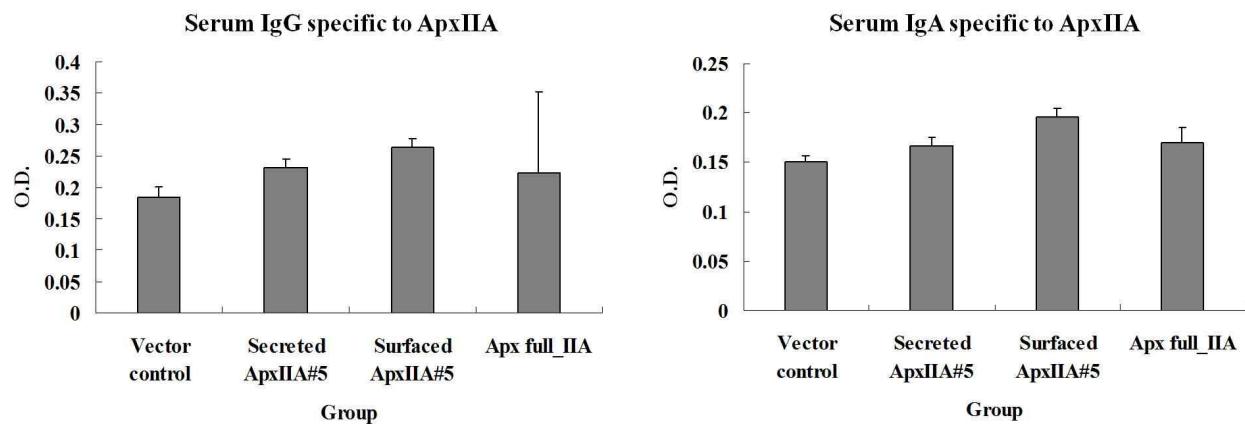


Figure 48. Titration of ApxIIA specific antibody in two weeks after last oral boosting in mouse serum.

(2) 돼지 흉막폐렴 예방효과 극대화를 위한 형질전환 효모 투여량의 최적화

돼지 흉막폐렴 예방효과 극대화를 위한 형질전환 효모 투여량의 최적화 하기위하여, 실험동물(마우스)에서 세포표면 발현균주(Surfaced ApxIIA-#5)에 대하여 투여량을 여러 구간으로 선정하여 경구면역을 실시하였다. 효모의 생균수에 따라서 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^8 그리고 1×10^9 (C.F.U./ml) 4개의 면역군과 음성 대조군 1개 실험군을 편성하였다. 4개의 면역군은 첫 번째 백신투여 시기에 군에 따라 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^8 그리고 1×10^9 (C.F.U./ml)를 투여하고, 두 번째, 세 번째 시기에 1×10^9 , 1×10^9 , 1×10^9 그리고 2×10^9 (C.F.U./ml)를 투여하였다. 면역군은 2주일 간격으로 총 3회 투여하였고, 동일한 시기에 serum, saliva 및 fecal sample을 채취하였다. 채취한 샘플에 대하여 ELSIA를 시행하여 ApxIIA 특이 IgG와 IgA에 대하여 분석하였다 (Figure 49). 첫 번째 백신 투여량 1×10^5 , 1×10^6 (C.F.U./ml) 투여 군에서 효모백신 마지막 투여 한달 후 시기에 유의적인 ApxIIA 특이 IgG 항체가 상승을 확인할 수 있었다. 이는 초기 면역 이후 첫 번째 백신 투여량의 10^4 , 10^3 배의 효모를 투여하였기 때문으로 생각된다. serum, saliva 및 fecal sample에서 ApxIIA 특이 IgA가 상승한 것을 볼 수 있었다.

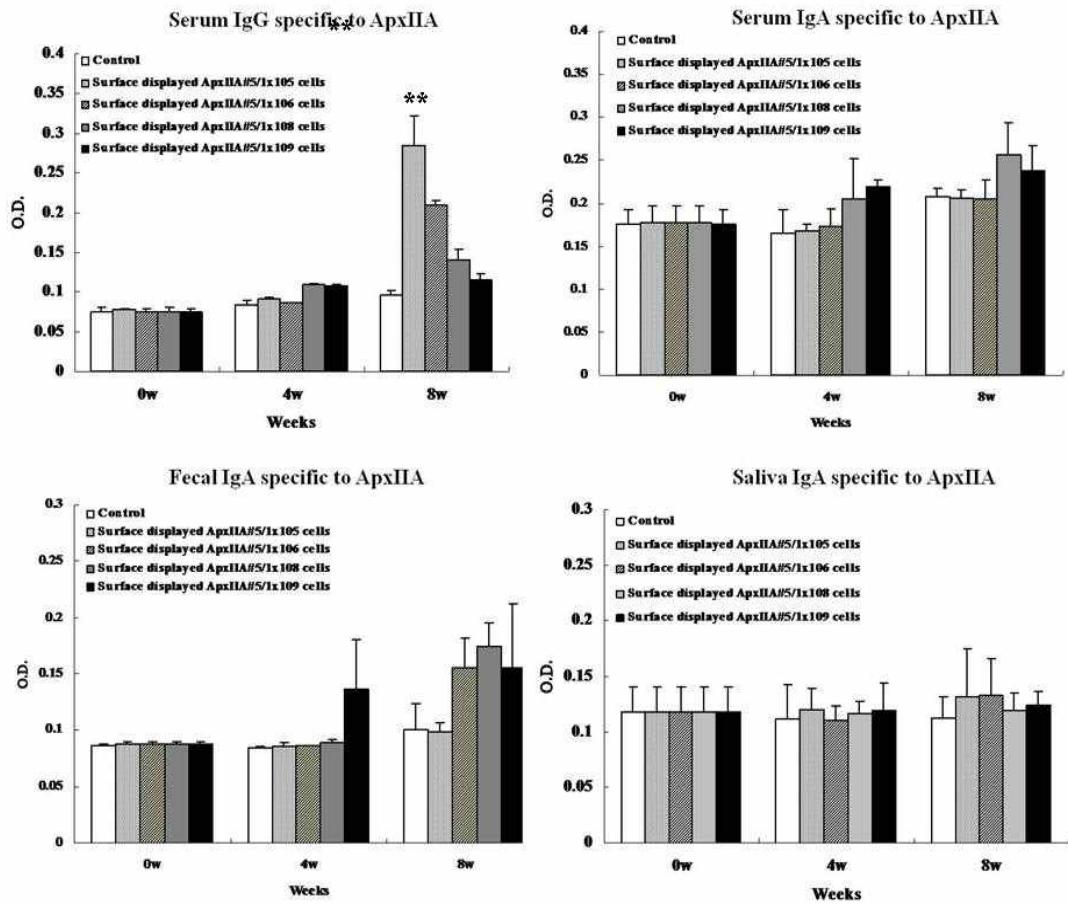


Figure 49. Titration of ApxIIA specific antibody in mouse.

나. 형질전환 효모의 ApxIIA 항원단백질 경구 제시 평가

(1) 분변 내 yeast의 분리 및 동정

형질전환 효모가 경구 면역을 위한 사료첨가제용으로서 생존하여 장관까지 효과적으로 전달될 수 있는지 확인하고자 본 실험을 수행하였다. 실험동물에서 형질전환 효모의 경구면역 실험에 적용되는 효모의 상태와 활성을 파악하고자하였다. 형질전환 효모를 선택배지인 -URA broth에 30℃에서 3일 동안 배양하였다. 배양액을 희석하여 2×10^8 cells/ml를 마우스에 투여하였다. 실험한 마우스로부터 fecal sample을 투여 4시간 후부터 3시간 간격으로 3번 채취하고 그 이후로는 24시간 간격으로 3일 동안 채취하였다. 채취한 fecal sample은 PBS에 부유시키고, 이를 Saboraud Dextrose agar(SDA)와 선택배지인 -URA agar에 plating하여 30℃에서 2일 동안 배양하였다. 균의 동정을 위해 single colony를 분리하여 순수 배양하였다. 형질전환 효모를 투여하지 않은 control군과 형질전환 효모를 투여한 군에서 각각 순수 분리된 균의 colony 성상과 발효냄새를 비교하였다. 형질전환 효모를 투여한 군에서 형질전환 효모 균주(*Saccharomyces cerevisiae*)의 특이적인 성상과 냄새를 확인 할 수 있었다 (Figure 50). 그리고 VITKEK 2(bioMerieux) system를 이용하여 형질전환 효모의 균주를 확인하였다. 투여 4시간 후부터 투여 후 2일째까지의 채취한 시료에서 효모를 확인하였다 (Table 9).



Control

S. cerevisiae

Figure 50. Isolation of *S. cerevisiae* from fecal samples.

Table 9. Isolation of *S. cerevisiae* from fecal samples of mice.

Group	No.	after administration (Hours)					
		4	7	10	24	48	72
대 조 군	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-
경 구 투 여 군	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+

(2) ApxIIA 항원 단백질 발현 형질전환 효모의 항원단백질 제시 분석

장 내에 전달된 형질전환 효모의 항원단백질 제시에 대해 분석하기 위하여 면역조직화학염색법(Immunohistochemistry)을 시행하였다. 형질전환 효모를 배양하여 5.12×10^8 cells/ml의 균을 마우스에 마리당 1ml씩 투여하였다. 경구 투여 48시간, 72시간 후에 실험 개체로부터 장의 소장 부분을 sampling하여 10% 중성포르말린을 이용하여 고정한 후 동결절편을 만들었다. 제작한 동결 절편에 면역조직화학염색법을 수행하였고, 마우스 장 조직 내 ApxIIA 항원단백질에 대한 면역조직화학염색법의 조건을 확립하였다. 우선, 조직 슬라이드에 Proteinase K(100 ng/ml)용액을 분주하여 37°C에 5분 동안 반응시켜 antigen retrieve하였다. 멸균증류수로 10분 동안 세척한 후 상온에서 30분 동안 0.5% H₂O₂를 분주하여 Endogenous peroxidase를 제거하였다. 멸균증류수로 10분, 0.01M PBS로 10분 동안 세척한 후 blocking 용액으로 0.01M PBS에 10% skim milk를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 blocking을 실시하였다. 과제 1차년도에 제작하였던 mono specific-ApxIIA polyclonal antibody (Anti-ApxIIA rabbit IgG)를 일차항체로 1:500의 비율이 되도록 2% skim milk에 희석한 뒤 한조직 마다 100μl씩 분주하여 4°C에서 overnight 보관하였다. 0.01M PBS로 10분씩 3번 세척한 후 이차항체로 Biotinylated anti-Rabbit IgG(H+L)을 2% skim milk에 1:200으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 0.01M PBS로 10분씩 3번 세척한 후 ABC kit(Vector)를 사용법에 따라 제조하여 37°C에 30분 동안 반응시키고, 0.01M PBS로 10분씩 3번 세척한 후 DAB(3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride hydrate)를 이용하여 상온에서 10분 동안 발색시켰다. 0.01M PBS로 10분, 멸균증류수로 10분씩 3번 세척한 후 Hematoxylin으로 counterstaining하였다. Dehydration과정을 거친 후 mounting하고 충분히 건조를 하고 현미경으로 관찰하였다 (Figure 51). 현미경 배율은 200배에서 관찰하였으며, 형질전환 효모를 투여하지 않은 control군과 비교해 볼 때 형질전환 효모를 투여한 군의 intestinal villi에서 DAB발색으로 인한 brown spots(화살표)이 다수 관찰되었다.

(3) ApxIIA 항원 단백질 발현 형질전환 효모의 효과적인 항원단백질 제시 방법 연구

형질전환 효모 경구백신의 위장관 통과 및 사료첨가제 제작 시 효모의 활성 감소 와 oral tolerance 등의 문제점을 극복하기 위해서 백신의 장내 생존률을 높이고 효과적으로 면역 반응을 유도하도록 도와줄 수 있는 adjuvant의 사용에 대한 연구가 필요하였다. 개발된 형질전환 효모 경구백신에 대한 adjuvant를 사용하기 전에 그 기능과 효과를 분석하기 위하여 adjuvant 효능 분석 기법을 확립하였다. Adjuvant로 다루기 쉽고 가격이 저렴하며 널리 이용

되는 chitosan을 이용하여 분석 기법을 확립하였다. Chitosan은 adjuvant로서 안전성과 효과가 입증되었으며 생체친화성(biocompatibility), 생분해(biodegradable)와 낮은 독성으로 의약 계통에서 널리 쓰이고 있다. 또한 mucoadhesive 특성을 가지고 있어 흉막폐렴 경구 점막면역백신에 대한 adjuvant로서 가능성을 연구하였다. 형질전환 효모를 배양하고, 배양한 균을 glass bead(SIGMA)를 사용하여 lysis하였다. Lysate를 20,000rpm에 1hr동안 ultracentrifuge를 실시하였다. 4% 중성포르말린을 상층액에 0.05% 비율로 넣고 37°C shaking incubator에서 3일 동안 detoxification 과정을 수행하였다. 20,000rpm에 1hr동안 ultracentrifuge를 실시한 후 상층액을 $0.45\mu\text{m}$ filter에 여과하였다. 여과액의 농도를 측정하여 농도를 $2\text{mg}/\text{ml}$ 이 되도록 PBS로 희석하고 FITC를 표지하였다. sample에 FITC를 표지하고, FITC가 표지된 sample만 선별하는 과정으로 FITC Antibody Labeling Kit(Pierce)를 사용법에 따라 사용하였다. FITC 표지된 2개의 sample중 하나에는 chitosan을 담지 하였다. chitosan $150\text{mg}/\text{ml}$ 을 넣고 37°C shaking incubator에서 overnight 보관하고, 3000rpm에 15분 동안 centrifuge하여 상층액을 취하였다. 그리하여 yeast 유래 항원단백질에 FITC 표지된 sample인 FITC-ApxIIA군과 FITC 표지된 sample에 chitosan을 담지한 FITC-ApxIIA-CMs군으로 편성하여 실험을 진행하였다. 마우스(ICR, 5주령, 암컷)에 각 군의 sample 1ml 을 투여하였다. 투여 두시간 후 마우스 장을 채취하여 10% 중성포르말린에 고정하고 냉동절편을 제작하였다. 제작된 조직 슬라이드에 PBS(0.1% Triton-X)를 분주하여 상온에서 20분 동안 반응시킨 후 Wheat germ agglutinin, Alexa Fluor[®] 594 conjugate(Invitrogen)로 counterstaining하였다. PBS로 세척한 후 mounting하였다. 잘 건조된 슬라이드를 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM)으로 배율은 200배로 관찰하였다 (Figure 52). Negative control에는 counterstaining에 의한 붉은색의 장점막만 관찰되며, FITC-ApxIIA군에서 장조직 내부로 uptake된 FITC 표지된 물질(회색 원)이 관찰되었다. Chitosan을 담지한 FITC-ApxIIA-CMs군에서도 장조직 내부로 uptake된 FITC 표지된 물질(회색 화살표, 원)이 관찰되었으며 FITC-ApxIIA군과 비교해 볼 때 더 많은 영역에서 관찰되었음을 알 수 있었다. ApxIIA 항원 단백질 발현 형질전환 효모의 장내 항원단백질 제시에 있어서 adjuvant 사용에 대한 결과가 유의적이었으며, adjuvant로서 chitosan이 가능성성이 있음을 확인하였다.

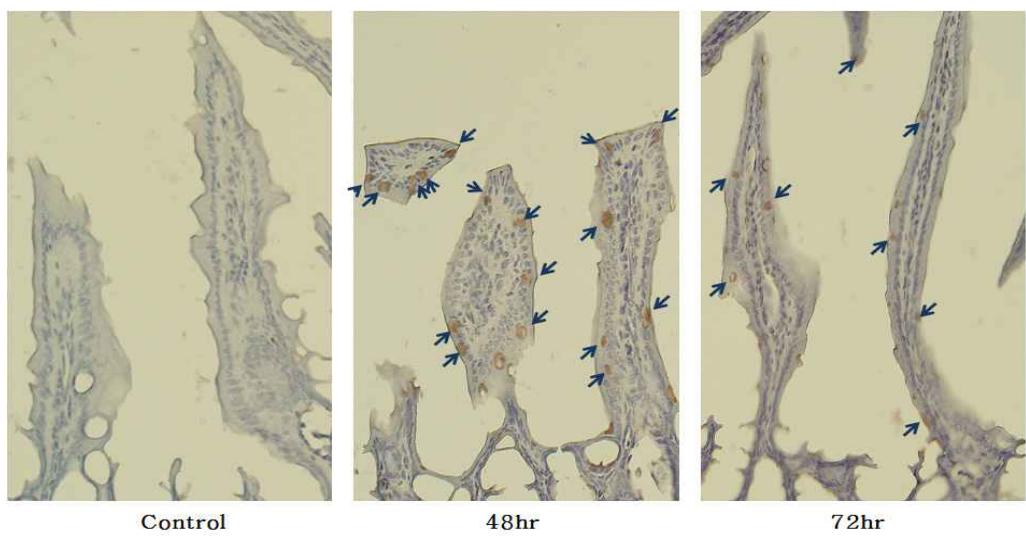


Figure 51. Immunohistochemical analysis for ApxIIA derived yeast in the intestine of mice. x200.

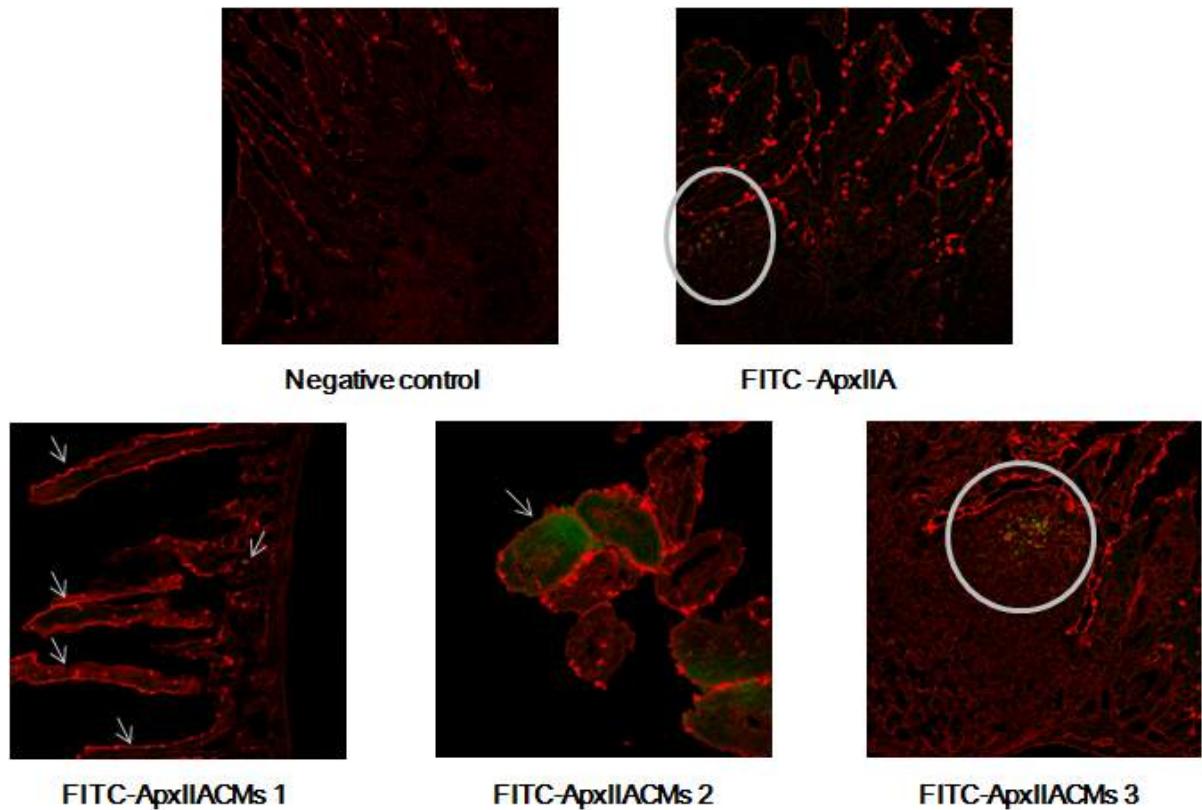


Figure 52. Uptake of FITC-ApxIIA and FITC-ApxIIA loaded chitosan microparticles in the intestine of mice. CLSM(x200)

5. ApxII 항원단백질 발현 효모를 이용한 목적동물 (돼지)에서의 흉막폐렴 모델의 확립

가. 돼지에서의 형질 전환 효모의 경구 접종 모델

(1) 실험 장소 및 돼지 사육 조건

과거 돼지 흉막폐렴 및 돼지 호흡기 질병의 발생이 없었고, 호흡기 백신투여를 하지 않은 농장을 선정하여, 선정된 농장에서 사육된 3주령의 교잡종 돼지를 사용하였다. 실험 장소는 서울대학교 수의과대학 동물사육장에서 실시하였다. 선정된 돼지는 가능한 국내 사육 환경에 맞게 사육하였으며 사료는 연령대에 맞추어 급여하였다.

(2) 형질전환 효모의 경구 접종

형질전환 효모 경구 백신은 *A. pleuropneumoniae* 의 주요병원성 인자인 ApxIA와 ApxIIA neutralizing epitope-#5 항원 유전자를 형질전환하여 확보한 효모, *S. cerevisiae* 을 동결건조한 후 파쇄하여 분말을 준비하고, 사료와 혼합하여 급여하였다. 효모 분말과 혼합된 사료를 3주령 자돈에 자유급식형태로 2일간 급여하였다. 실험 자돈은 ApxIIA neutralizing epitope-#5 항원 유전자를 표면 제시한 효모 백신 처리군, 동일 항원 유전자를 분비하는 효모 백신 처리군, vector control 처리군 그리고 non-treat 대조군으로 나누었고, 각 그룹에 5두씩 총 20두를 배치하였다 (Table 10). 백신 처리군에 대하여 7일 간격으로 3회 형질전환 효모를 사료에 혼합하여 경구투여 하였고, 전 두수에 대하여 Apx 특이 IgA 및 IgG 항체가를 검사하기 위한 시료를 채취하였다 (Figure 53). 실험 돼지 체중 1kg 당, 동결 건조된 형질전환 효모 백신 6.25×10^7 (C.F.U./g) 접종을 기준으로 하였고, 구강으로 투여된 백신에 대한 immune-tolerance를 고려하여 매 접종 시기마다 투여량을 전 투여량의 2배가 되도록 증가시켰다 (Table 11). 돼지에서의 형질전환 효모의 경구 면역 모델에 따라 형질전환 효모의 경구 면역 유도능과 돼지 흉막폐렴에 대한 방어능을 평가하였다.

Table 10. Experimental grouping for oral vaccination of *S. cerevisiae* expressing ApxIA and ApxIIA neutralizing epitope-#5.

Groups	투여 항원	투여 방법	개체수 (두)
Control group	No Treatment	전혀 투여 하지 않은 시험군	5
Vector control group	<i>S. cerevisiae</i> with GPD vector	항원을 발현하지 않는 효모 투여	5
Vaccinated group-1	<i>S. cerevisiae</i> expressing ApxIA and ApxIIA and surfaced-displayed ApxIIA	ApxIA 발현균주와 ApxIIA 표면제시 균주를 돼지 체중 당 1g씩 경구투여한 군	5
Vaccinated group-2	<i>S. cerevisiae</i> expressing ApxIA and secreting ApxIIA	ApxIA발현균주와 ApxIIA 분비 효모 균주를 체중 당 1g씩 경구투여한 군	5

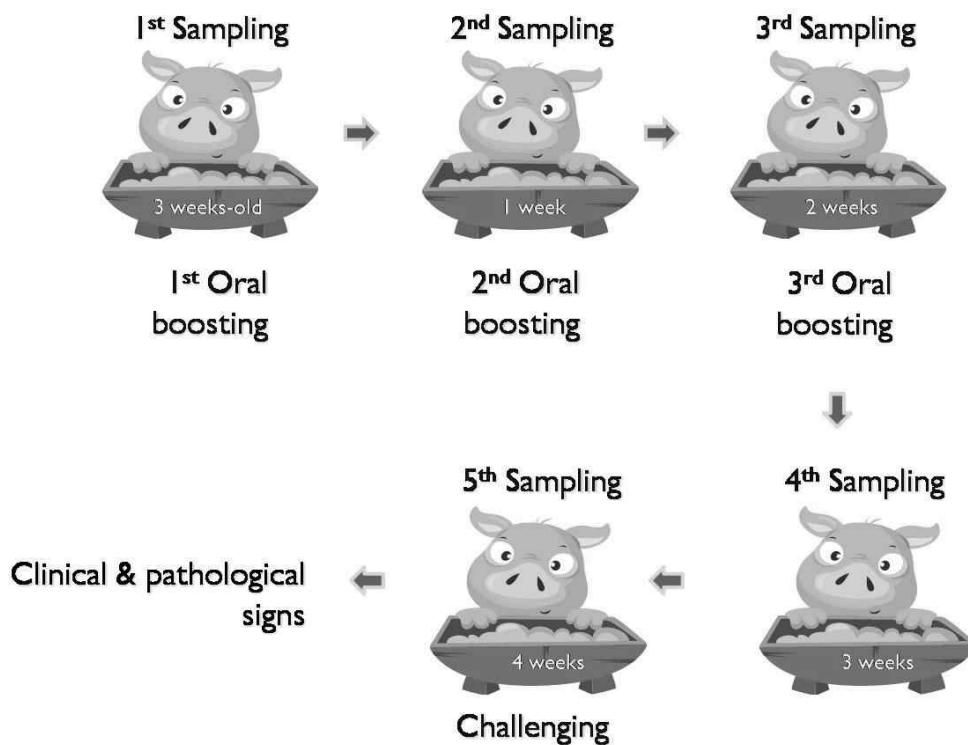


Figure 53. Strategy of oral vaccination and sampling schedules in Pig.

Table 11. Vaccination strategy of *S. cerevisiae* expressing ApxIIA.

	Days	기준 투여량 (C.F.U./g)	예상 체중	총 투여량 (C.F.U./마리 당)
1 st Oral vaccination	0	6.25 X10 ⁷	5kg (21일령)	3.13X10 ⁸
	1			3.13X10 ⁸
2 nd Oral vaccination	7	1.25 X10 ⁸	8kg	1X10 ⁹
	8			1X10 ⁹
3 rd Oral vaccination	14	2.5 X10 ⁸	13kg	3.25X10 ⁹
	15			3.25X10 ⁹

나. 형질전환 효모의 경구 면역 유도능 평가

(1) Swine alveolar macrophage에서 형질전환 효모에 대한 cytokine 측정

In vitro에서 형질전환 효모의 면역 유도능을 살펴보기 위하여, swine alveolar macrophage에 형질전환 효모를 자극하여 분비되는 cytokine을 측정하였다. 돼지 1마리의 lung에 대하여 Hank's balanced salt solution (HBSS) 100ml을 투입하여 lung lavage를 채취하였다. 채취한 lung lavage를 mesh에 거른 후 Ficoll-Hypaque(S.G. 1.070)을 이용하여 mononuclear cell fraction을 분리하였다. RPMI-FCS (2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 2.5 mg/ml amphotericin B)배지에 1×10^6 cells/ml의 cell을 분주하여 37 ° C, 5% CO₂에서 3시간 보관한 후 배지와 the non-attached cells을 제거하였다. non-treat 음성 대조군, vector control 처리 음성 대조군, LPS처리 양성 대조군 그리고 형질전환 효모(Surfaced ApxIIA netralizing epitope-#5 yeast, Secreted ApxIIA netralizing epitope-#5 yeast, ApxIIA netralizing epitope-#5 yeast, full ApxIIA yeast)를 처리한 군으로 나누어 실험하였다. 형질전환 효모군에는 각 4×10^5 cells/ml의 효모를 접종하였고, LPS 처리군에는 1 μ g/ml의 농도로 접종한 후 6, 12, 24시간 간격으로 상충액을 수거하였다. swine alveolar macrophage의 상충액 분석 결과 iNos에 대해서는 양성대조군을 비롯하여 음성대조군과 형질전환 효모 처리군에서 측정되지 않았다 (data not shown). 이는 돼지의 macrophage에서 iNos가 측정되지 않는다는 문헌의 결과가 있었으며, 보고서에 제시하지 않았다. TNF-a의 결과를 보면 Full ApxIIA 발현 효모에서 양성대조군과 비슷한 결과를 보였으며, vector control 군에 비하여 ApxIIA netralizing epitope-#5발현 효모들에서 높은 TNF-a 분비량을 측정할 수 있었다. 반면 형질전환 효모들에 대한 IL-6 분비량에 대해서는 vector control 군에 비해서 ApxIIA 발현 효모 군에서 12h 이후부터 분비량이 증가되는 것을 볼 수 있었다. 특히 Full ApxIIA 발현 효모군에서 현저한 증가 경향을 나타내었다. (Figure 54). IL-6는 자극 후 분비되는 시기가 TNF-a보다 늦게 나타나며, 12h 이후부터 증가하는 경향을 볼 수 있었으므로, 추후 실험에서는 48h, 72h의 구간을 설정하여 실험을 실시해야 할 것으로 생각된다.

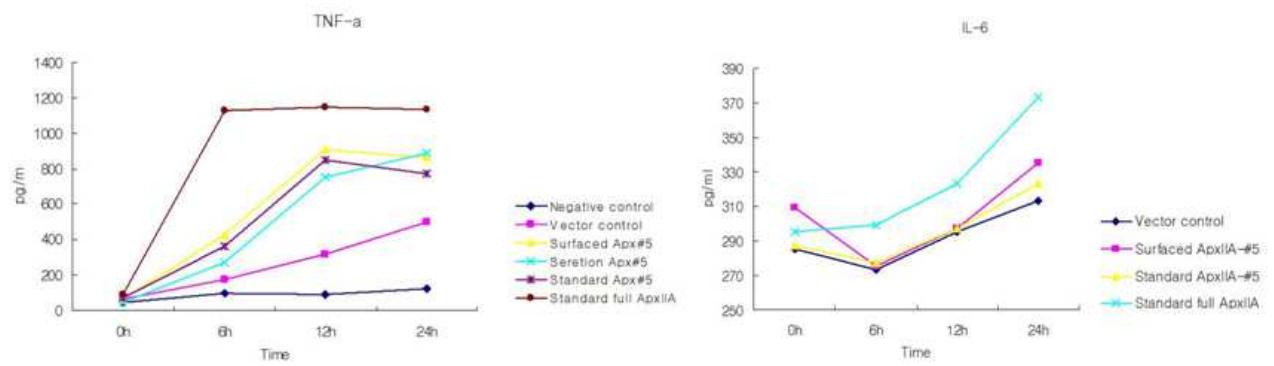


Figure 54. Expression pattern of cytokine in swine alveolar macrophage.

(2) Apx에 대한 specific IgG 및 IgA 항체가 측정

형질 전환 효모의 경구 투여로 유도된 Apx 특이 IgA, IgG 항체가 검사를 위해 serum, nasal wash 및 fecal swab 시료를 채취하였다 (Figure 55). Serum은 21G 10ml syringe를 이용하여 돼지의 jugular vein으로부터 채취하고, 4°C에서 24시간 clotting한 후 원심분리 (3000rpm, 10분)하여 상층액을 취하였다. Nasal wash는 PBS 5ml를 돼지 머리를 뒤로 젖힌 상태에서 비강을 통해 투여한 후, 수 초간 유지하고 다시 멸균된 specimen cup을 이용해 채취하였다. Fecal sample은 fecal swab으로 돼지 직장을 swab하여 0.05% sodium azide PBS 1ml에 풀고 4°C에서 원심분리 (13,000rpm, 5분)하여 상층액을 사용하였다. 또한 공격 접종 10일 후 장 또는 폐의 용액을 추출하기 위해 폐 기관 및 장에 PBS를 넣고 수초간 유지한 후 washing하 washing액을 준비하고, 폐 및 장을 유제하여 원심분리로 고형분을 제거한 뒤 homogenization을 수행하였다. 형질 전환 효모의 경구 vaccine의 면역유도 효과를 검정하기 위하여, 채취된 시료 내 Apx 특이 IgA, IgG 항체가는 앞에서 확립된 ApxIA, ApxIIA-ELISA 기법에 기초하여 측정하였다 (Figure 56). 효모 백신 마지막 투여 2주일 후 시기이 ApxIIA에 대한 IgG 항체가의 상승을 확인할 수 있었다. 통계적 유의성을 찾을 수는 없었지만 serum IgA, fecal IgA 와 nasal IgA에서 대조군에 비교하여 항체가가 상승한 것을 확인할 수 있었다. 채취된 폐 및 장의 washing 샘플 및 유제액에 대한 Apx 특이 IgA 항체가는 앞에서 확립된 ApxIA, ApxIIA-ELISA 기법에 기초하여 측정하였으며, lung washing 샘플에서 대조군에 비교하여 유의적인 ApxIA 및 ApxIIA에 대한 특이 IgA 항체가를 확인 할 수 있었다 (Figure 57, 58).



Figure 55. Sampling from pig

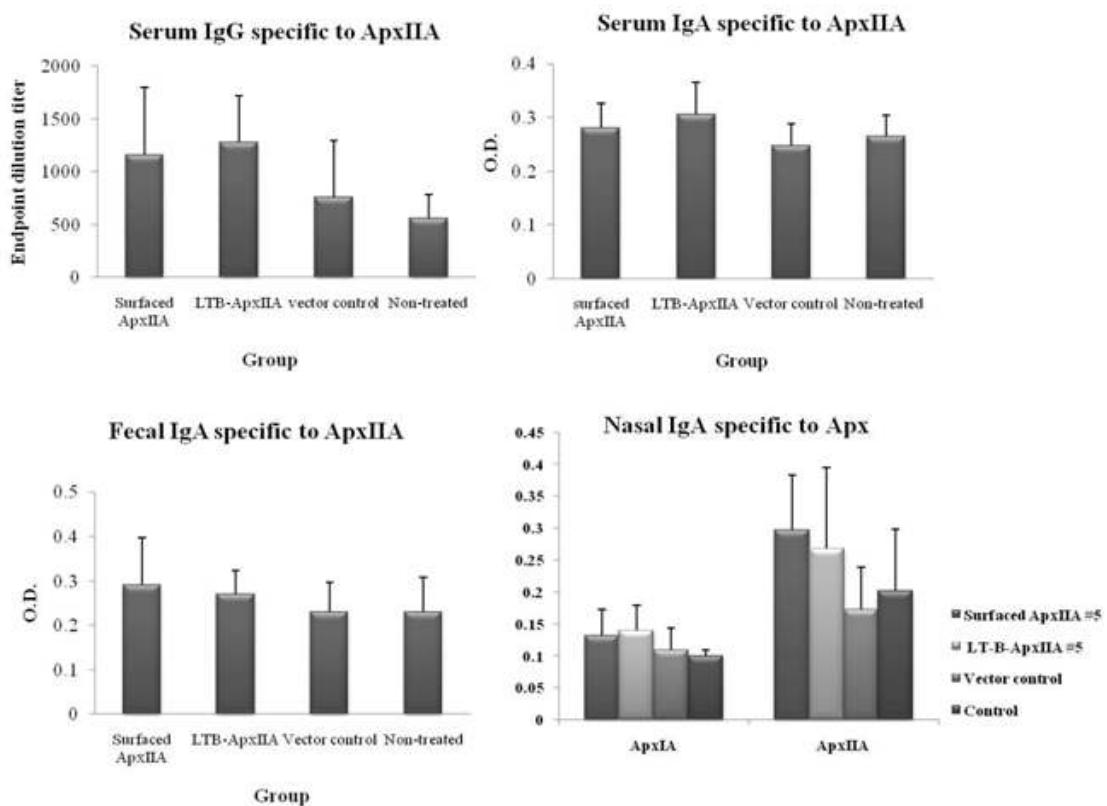


Figure 56. Anti-ApxIIA IgG and IgA levels in serum, fecal and nasal sample in two weeks after final oral vaccination.

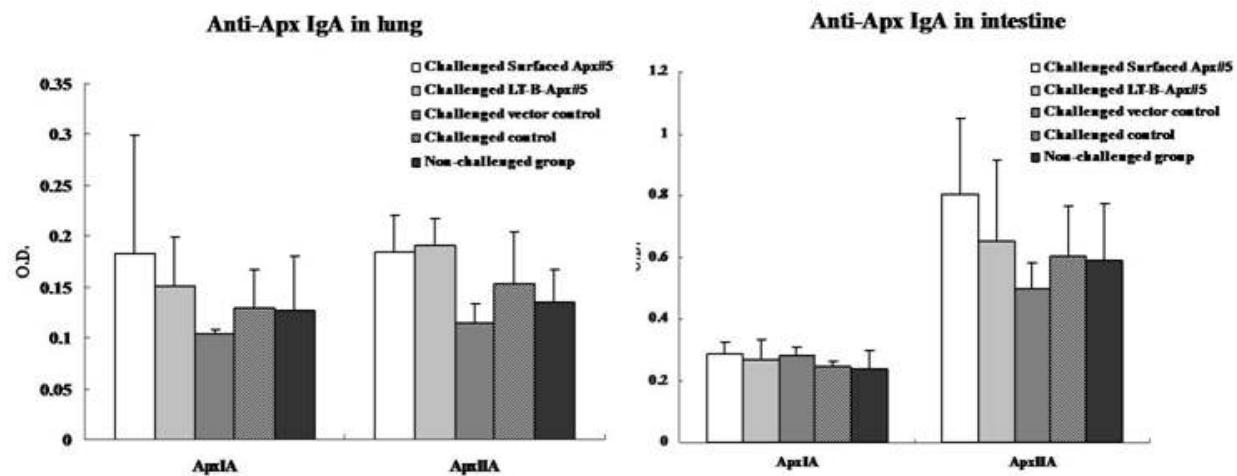


Figure 57. Titration of ApxA specific antibody in lung and intestine homogenates after challenge with *A. pleuropneumoniae*.

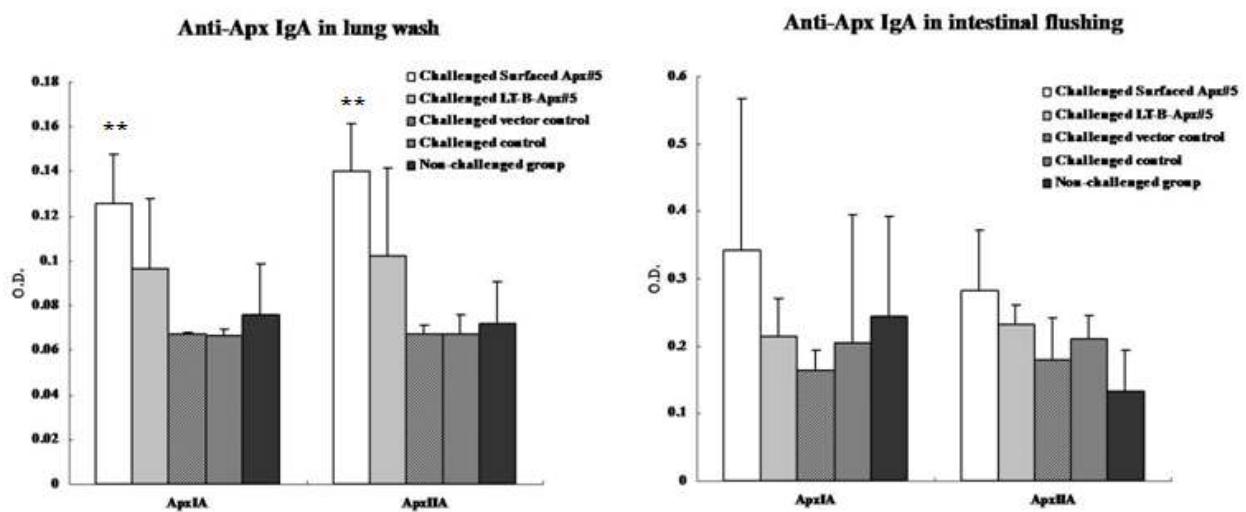


Figure 58. Titration of ApxA specific antibody in lung washing and intestinal flushing after challenge with *A. pleuropneumoniae*.

다. 돼지 흉막폐렴에 대한 방어능 평가

(1) 공격접종 및 공격접종에 따른 임상증상

TSB (0.1% NAD 포함)에 24시간 배양한 균주 *A. pleuropneumoniae* serotype 5를 MLD (1.45×10^8 CFU/ml) 농도로 배양하였고, chocolate agar 접종하여 37°C, 5% CO₂ 분압에서 overnight 배양하고 PCR로 확인 동정하였다. 마지막 백신 접종 10일 후, 돼지를 후배위 상태로 고정하고 21G needle syringe를 이용하여 기관 내(intrabronchial inoculation) 와 비강내(intranasal inoculation)로 배양된 균주 5ml을 주입하였다. 각 군마다 3마리씩 총 12마리에 공격접종을 실시하였다. 공격접종 후 10일 동안 3일 간격으로 백신 접종에 의한 방어능의 차이를 생존률, 임상증상, 운동성, 사료섭취, 직장온도 측정의 항목으로 군별로 비교 평가하였다 (Table 12, 13). *A. pleuropneumoniae* 감염에 의한 돼지 흉막폐렴의 임상증상에서 심급성형은 고열, 무감각, 식욕부진을 동반하며 매우 심하게 앓게 된다. 이 경우 뚜렷한 호흡기 증상 없이 바닥에 드러눕게 되며, 심혈관계 장애가 나타난다. 코, 귀, 다리 등에 청색증이 관찰되며 나중에는 몸 전체로 진행된다. 개구호흡을 동반한 심한 호흡곤란이 있으며, 견좌 자세를 취하고 직장 내 온도가 급격히 낮아지며, 1~3일 이내에 폐사하게 된다. 실험접종에 의한 심한 경우에는 감염 후 3시간 정도 지나서 폐사되는 경우도 있다. 대조군에서 공격접종 48시간 내에 절반의 실험돈이 폐사하였으며, 남은 실험돈은 만성적인 병의 진행과정을 나타내는 것으로 보였다. 백신처리 군에서는 식욕부진, 발열, 재채기 등의 임상증상을 나타내었으나 폐사 개체가 발생하지 않았다 (Figure 62). 공격접종 후 실험돈의 직장 내 온도를 측정하여 감염 진행 정도를 파악하였다 (Figure 59). 돼지 정상 직장 온도는 38.7~39.8도 (평균 39.2)이며, 공격접종 후 5일에는 백신군도 고열로 정상온도 범위를 벗어났지만, 대조군은 접종 후 2일부터 높은 온도가 유지되었다. 공격접종 후 임상증상 표에 따라서 10일 동안 관찰한 후 (Figure 60, 61) 전 두수에 대하여 부검을 실시하였다. 부검 후 폐의 육안병변을 확인하고 조직 슬라이드를 제작하여 관찰하였다.

Table 12. Scoring chart of clinical symptoms after challenge with *A. pleuropneumoniae*.

Grade 0/1/2/3/	공격접종 일 후											
clinical symptom	B-1	B-2	B-5	O-3	O-4	O-5	Y-1	Y-2	Y-3	Y-7	Y-8	Y-9
Off feed												
Sneezing												
Coughing												
lethargy / Depressed												
Severe coughing or Dyspnea												
Down, Unable to rise												
Death												
총 합												
병리해부학적 소견												
폐의 전반에 걸친 섬유소성 막형성												
폐의 국소적인 출혈												
폐의 국소적인 출혈 및 종대												
폐의 경화												
총 합												

Table 13. Measurment of rectal temperature after challenge with *A. pleuropneumoniae*.

Group	No.	공격접종 일 후	
		체온	특이 사항
Non-challenge	B-3		
	B-4		
	O-1		
	O-2		
	Y-4		
	Y-5		
	Y-6		
	Y-10		
Challenge	B-1		
	B-2		
	B-5		
	O-3		
	O-4		
	O-5		
	Y-1		
	Y-2		
	Y-3		
	Y-7		
	Y-8		
	Y-9		

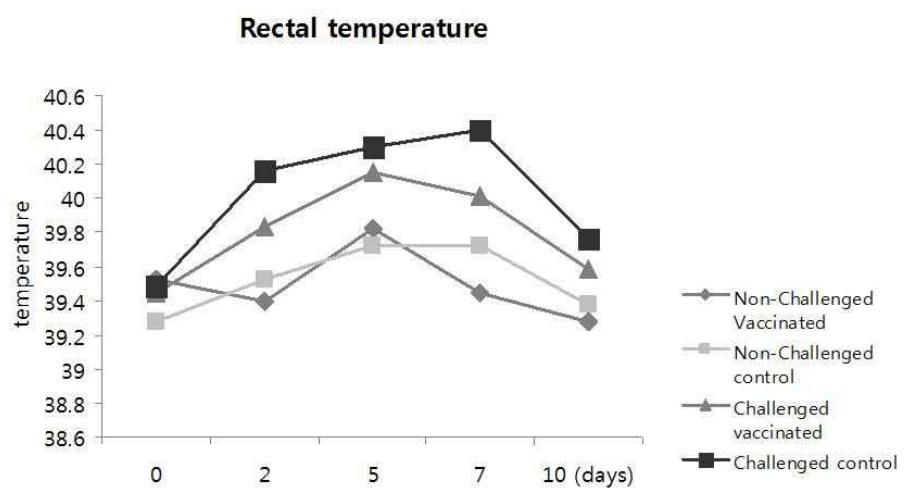


Figure 59. Pig rectal temperature after challenge with *A. pleuropneumoniae*.



Figure 60. Clinical symptoms followed by challenge with *A. pleuropneumoniae*.

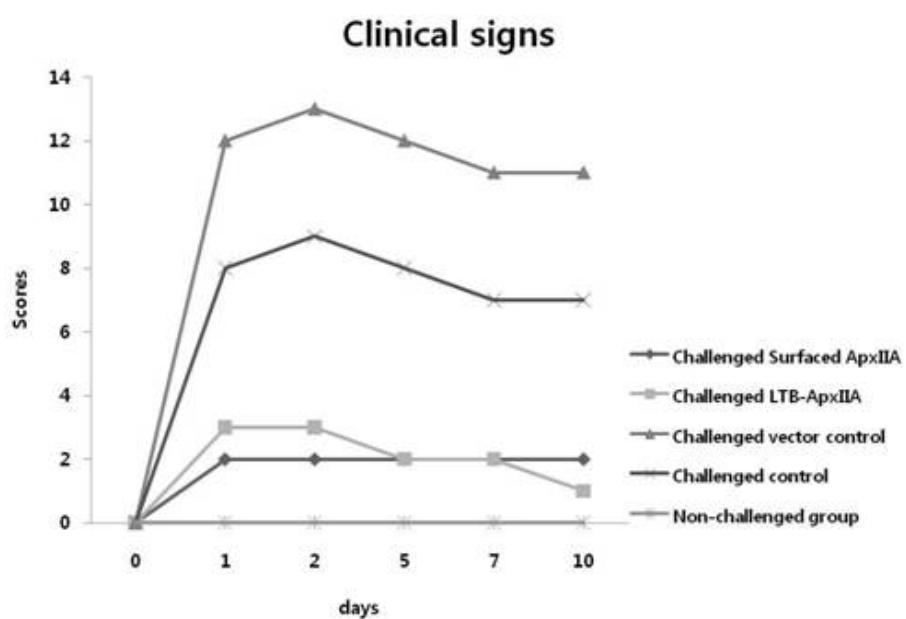


Figure 61. Scoring of clinical symptoms followed by challenge with *A. pleuropneumoniae*

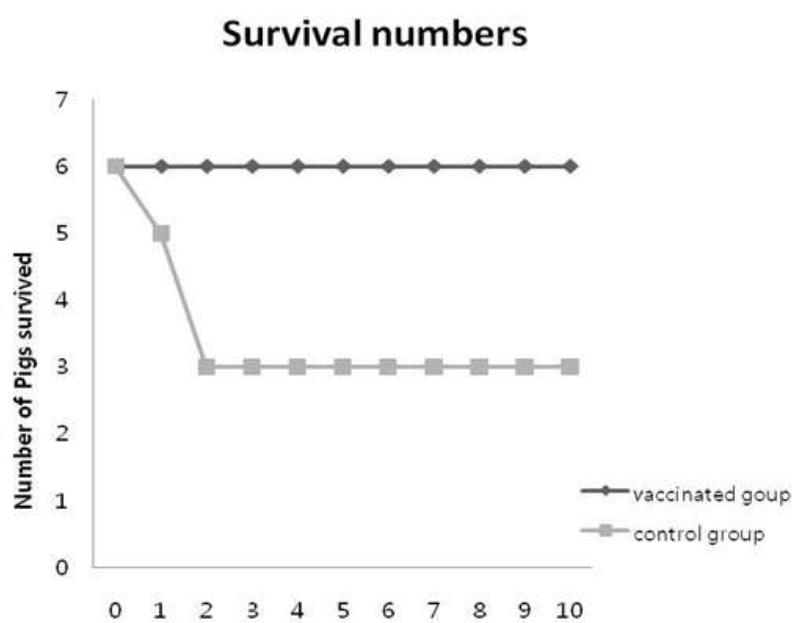


Figure 62. Number of pigs survived after challenged with *A. pleuropneumoniae*.

(2) 공격접종에 따른 병리 해부학적 진단

공격접종 후 각 그룹별로 돼지를 부검하여 폐 부위에서 병리 해부학적인 병변을 비교하였다. 부검 후 폐의 육안 병변은 폐에 전반적인 충혈 및 종대, 폐의 경화, 폐의 화농 병변 및 폐 전반에 걸친 섬유소성 막 형성 등에 대한 병변 지수를 판정하여 scoring 하였고, 전체 grid에 대한 병변 부위 grid의 수를 퍼센트로 표시하고 (Figure 64), 병변 grid수에 병변 지수 곱하여 산출하여 병리해부학적 분석을 하였다 (Figure 65). 공격접종한 대조군의 폐에서는 국소적인 울혈, 출혈 및 폐 전반에 걸친 섬유소성 막 형성 등, 돼지 흉막폐렴 감염 특이의 병변을 보였다 (Figure 63).

(3) 실험돈 폐에서 공격접종 군의 colonization 실시

공격접종 후 실험돈의 폐에서 공격접종군의 clearance를 알아보고자, 부검실시 후 병변과 정상부위가 1:1이 되도록 병변 주변부위 샘플을 채취하였다. 폐조직 5g을 갈아서 유제조직을 만들고 이를 1, 1/10, 1/100 그리고 1/1000의 희석비율로 chocolate agar에 plating하였다 (Figure 66). 37도에서 24시간 이후 자란 *A. pleuropneumoniae* colony 수를 세어 산출하였다. 백신 처리군에서 대조군에 비교하여 현저히 낮은 colony 수를 보였다 (Figure 67).

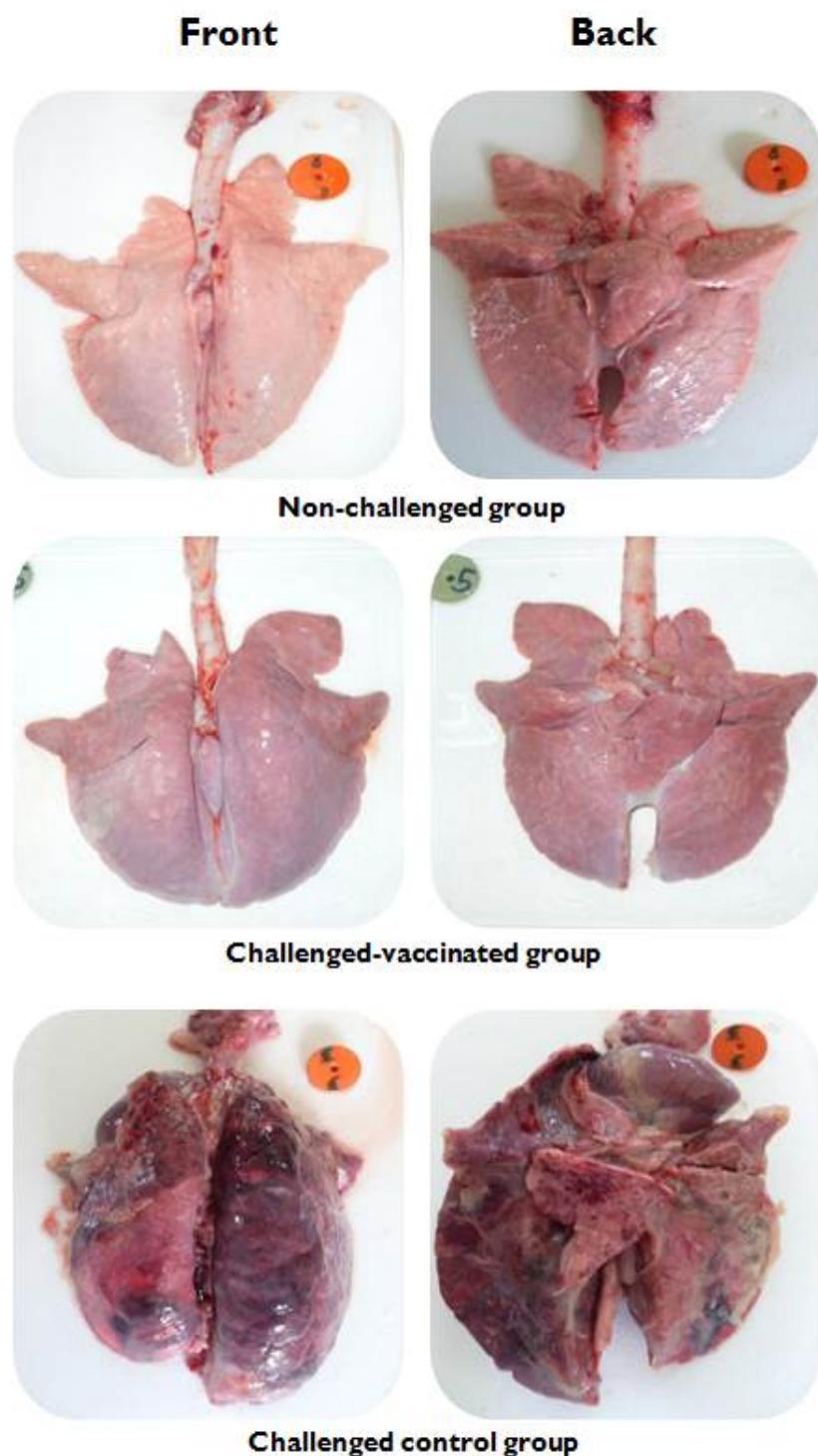


Figure 63. Pathological observation of pig lungs after challenged with *A. pleuropneumoniae*.

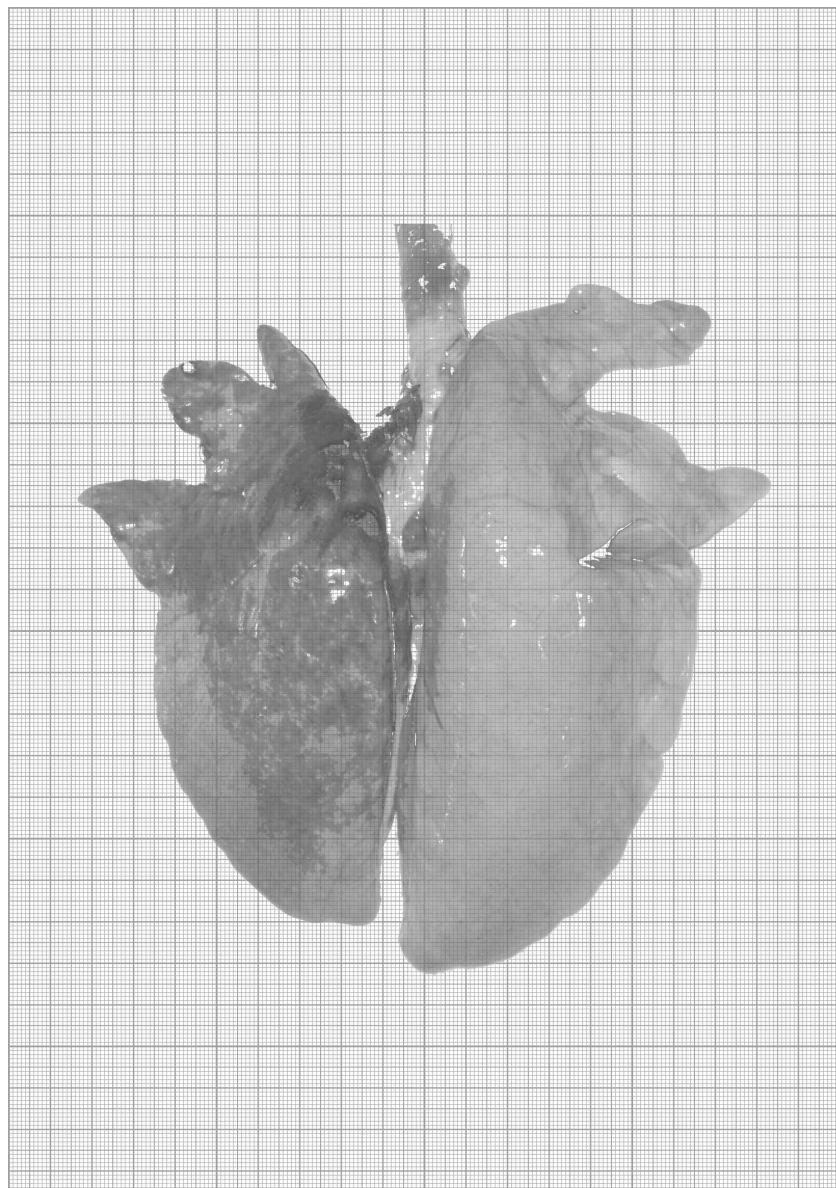


Figure 64. Pathological scoring of pig lungs after challenge with *A. pleuropneumoniae* counting grids.

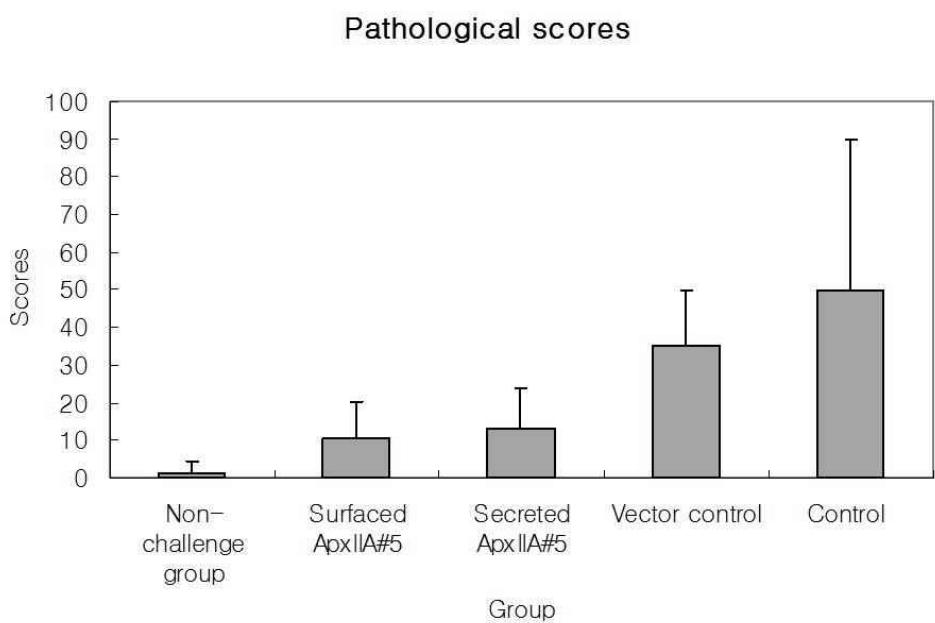


Figure 65. Results of pathological scores of pig lung after challenge with *A. pleuropneumoniae*.



Figure 66. Colonization of pig lungs after challenged with *A. pleuropneumoniae*. A, challenged *A. pleuropneumoniae* strain culture; B, vaccinated group colonization; C, control group colonization.

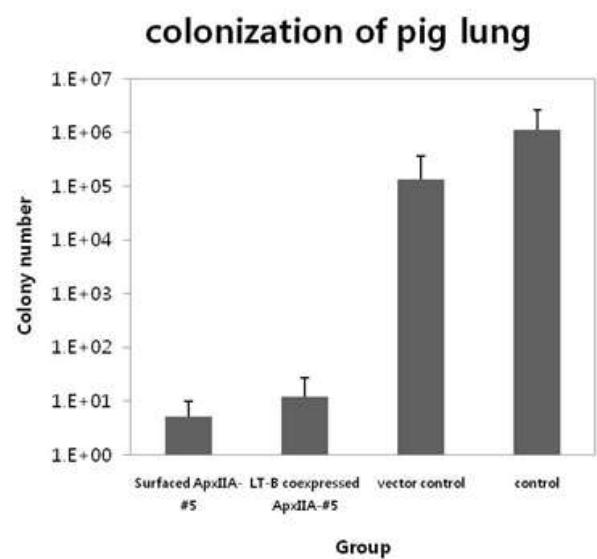


Figure 67. Colony numbers of colonized pig lung after challenge with *A. pleuropneumoniae*.

(4) 실험돈 폐의 병리, 조직학적 관찰

각 실험 개체로부터 채취한 폐 조직을 10% 중성 포르말린을 이용하여 고정하였다. 각각 2시간씩 series alcohol 처리하여 탈수하고, xylene에서 투명화 하였다. 투명화 이후, 액체 파라핀에서 12시간 동안 침투를 하고 포매기에서 포매를 실시하였다. 준비된 블록을 마이크로톰을 이용하여 $4\mu\text{m}$ 두께로 조직 슬라이드를 준비하였다. 조직학적 관찰을 위해 모든 조직 절편을 H&E 염색 (Haematoxylin & Eosin 염색)을 실시하였고, 각 실험돈마다 다른 부위의 폐조직 슬라이드 3장을 준비하고, 한 장의 슬라이드에서 3부분 이상 구간을 정하여 조직학적 관찰을 실시하여 score를 평균내어 산출한다. 혈관충혈 (congestion), 염증세포침윤 (neutrophils infiltration), 염증 삼출물 (inflammatory exudation), 조직경화 (consolidation), 섬유소 및 혈소판 침윤, 폐포벽 증대 등의 항목으로 ‘0’부터 ‘5’까지 scoring 하였다 (Figure 69). 백신처리군의 폐 조직에서는 폐혈관이나 폐포 내에 약간의 충혈이 일어났으며, 폐포벽의 약간의 종대를 보이는 영역도 있었으나 전체적으로 정상 폐에 가까운 양상을 보였다. 이와 대조적으로 백신처리군의 폐 조직에서는 폐포 내 호중구, 섬유소, 혈소판 등의 염증삼출물이 다수 침윤하여 폐포의 윤곽이 소실된 것을 볼 수 있었으며, 폐포벽의 증대에 따른 경화 (consolidation) 양상을 나타내 흉막폐렴군 감염에 따른 전형적인 조직병변을 보이고 있다 (Figure 68).

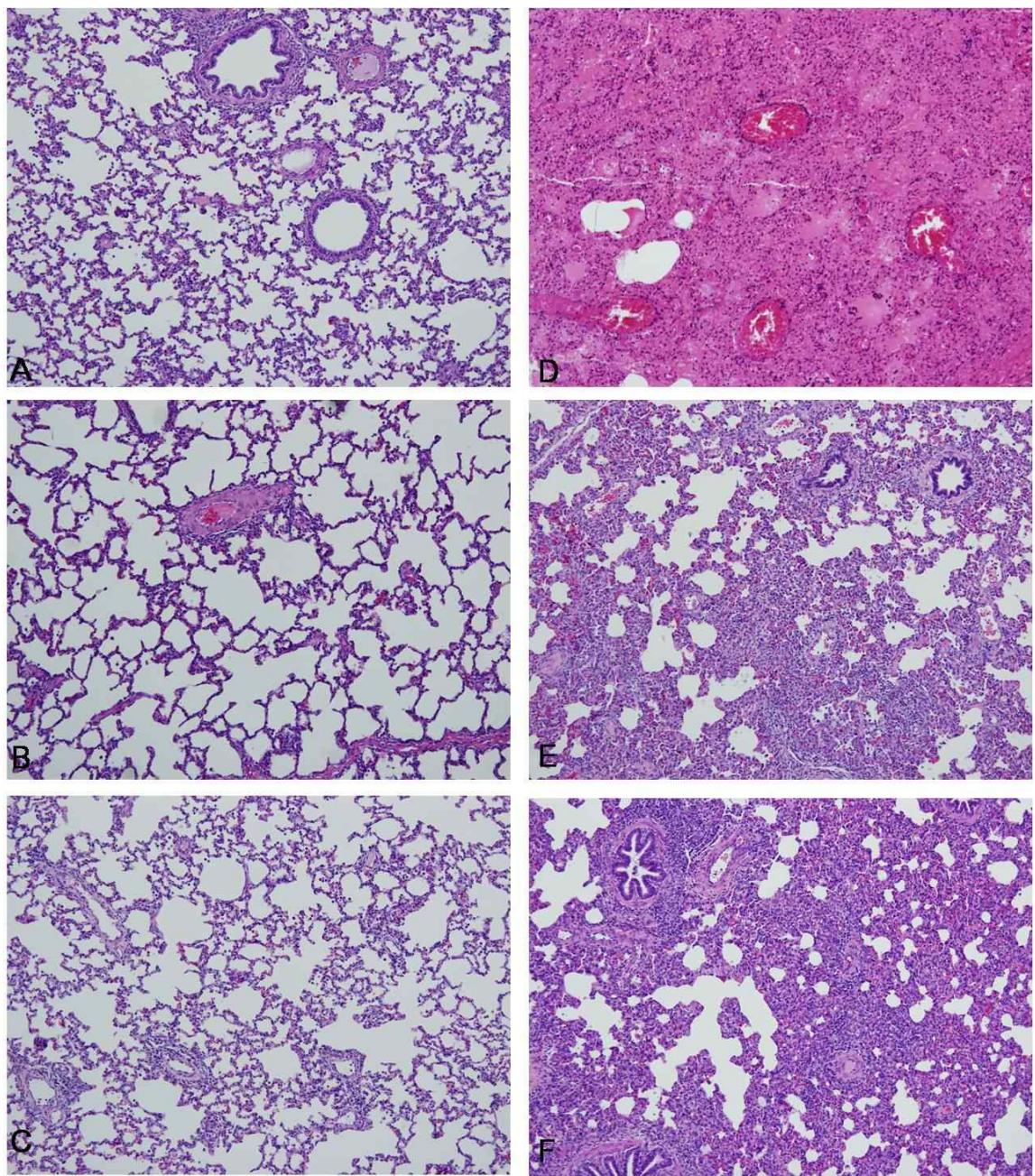


Figure 68. Histopathological observation of pig lung before and after challenge with *A. pleuropneumoniae*. A, B and C, vaccinated group; D, E and F, control group.

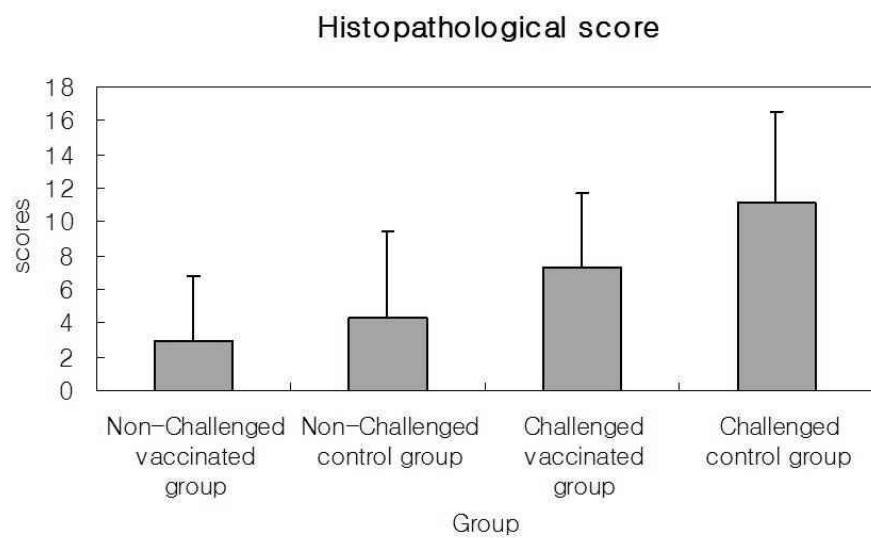


Figure 69. Scores of Histo-pathological changes followed by challenge with *A. pleuropneumoniae*.

6. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 공정 개발

가. 재조합 효모 대용량 배양 후 농축을 위한 최적 공정의 탐색

상기 재조합 효모를 500 L 생물반응기로 고농도 배양 후 세포 농축 및 회수를 위한 최적 공정 탐색을 실시하였다. 세포의 농축 및 회수하는 방법으로는 대용량 원심분리기를 이용하여 고체-액체상을 분리하게 된다. 원심분리는 고체와 고체를 둘러싼 액체 간의 밀도차를 이용한다. 부유물이 있는 혼탁액을 가만히 두면 밀집한 고체는 중력의 영향으로 서서히 가라앉게 되는데 이러한 과정이 침전(sedimentation)이다. 서서히 침전되는 것을 원심력을 이용하여 가속하는 과정을 원심분리(centrifugation)라 한다. 원심분리는 공정을 계속적으로 반복할 수 있고, 많은 양을 짧은 시간 안에 처리할 수 있으며, 멸균상태에서 조업이 용이하다. 이러한 이유 때문에 산업적으로 생물적 분리의 첫 번째 단계로 많이 사용되고 있다. 본 연구에서도 원심분리기를 이용하여 효모와 배양액을 분리하였다. Table 14에서 나타낸 바와 같이 90 % 이상의 높은 회수율을 나타내었다.

원심분리공정이 끝난 후 효모를 회수한 뒤 동결건조 과정을 실시하였다. 동결건조 (Freeze dry)는 수용액이나 다향의 수분을 함유한 재료를 동결시키고 감압함으로써 얼음을 승화시켜 수분을 제거하여 건조물을 얻는 방법이다. 조작이 저온에서 이루어지므로 열에 약한 물질의 건조법으로 유용하다. 또한, 저온에서 건조시켜 분말로 하면 상온에서 장기간 보존할 수 있는 제품을 얻을 수 있다.

Table 15에 나타낸 바와 같이 Apx I A 단백질을 형질전환 시킨 효모의 경우 동결건조 후 생균수 수율은 1.7 % 였으며, 생균수와 사균수를 포함하는 총균수 기준 수율은 33.3 % 였다. Apx II A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 동결건조 후 생균수 수율은 2.3 % 였으며, 생균수와 사균수를 포함하는 총균수 기준 수율은 96.3 % 였고, Apx III A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 생균수 수율은 6.6 % 였으며, 생균수와 사균수를 포함하는 총균수 기준 수율은 91.5 % 였다. 이와 같이 동결건조 후 생균수가 급격히 줄어들었는데, 이것은 효모 생존율(viability) 높이기 위해 적절한 동결건조 보호제가 필요함을 의미한다.

Table 14. Microbial recovery by centrifugal process.

		Viable cell (CFU/ml or CFU/g)	Total cell (CFU)	Yield (%)
Apx I A	배양액	1.12E+09	3.92E+14	100.0
	농축	1.06E+10	3.75E+14	95.7
Apx II A	배양액	2.43E+08	7.78E+13	100.0
	농축	2.80E+09	9.80E+13	126.0
Apx III A	배양액	6.20E+08	2.17E+14	100.0
	농축	8.00E+09	2.04E+14	94.0

Table 15. Microbial recovery by freeze dry process.

(a) *S. cerevisiae* expressing Apx I A

Apx I A	Viable cell (CFU/ml or CFU/g)	Total cell (CFU)	Yield (%)	viable cell + dead cell (CFU/ml or CFU/g)	Total cell (CFU)	Yield (%)
배양액	1.12E+09	3.92E+14	100. 0	2.42E+09	8.47E+14	100. 0
농축	1.06E+10	3.75E+14	95.7	1.66E+10	5.73E+14	67.6
동결건조 전	5.38E+09	3.66E+14	93.3	5.72E+09	3.89E+14	45.9
동결건조 후	3.40E+08	6.65E+12	1.7	1.44E+10	2.82E+14	33.3

(b) *S. cerevisiae* expressing Apx II A

Apx II A	Viable cell (CFU/ml or CFU/g)	Total cell (CFU)	Yield (%)	viable cell + dead cell (CFU/ml or CFU/g)	Total cell (CFU)	Yield (%)
배양액	2.43E+08	7.78E+13	100. 0	4.58E+08	1.47E+14	100. 0
농축	2.80E+09	9.80E+13	126. 0	4.40E+09	1.54E+14	105. 1
동결건조 전	1.28E+09	7.04E+13	90.5	2.63E+09	1.45E+14	98.7
동결건조 후	9.20E+07	1.77E+12	2.3	7.35E+09	1.41E+14	96.3

(c) *S. cerevisiae* expressing Apx IIIA

Apx IIIA	Viable cell (CFU/ml or CFU/g)	Total cell (CFU)	Yield (%)	viable cell + dead cell (CFU/ml or CFU/g)	Total cell (CFU)	Yield (%)
배양액	6.20E+08	2.17E+14	100. 0	1.16E+09	4.06E+14	100. 0
농축	8.00E+09	2.04E+14	94.0	1.52E+10	3.88E+14	95.5
동결건조 전	5.48E+09	2.08E+14	96.0	9.58E+09	3.64E+14	89.7
동결건조 후	8.85E+08	1.44E+13	6.6	2.28E+10	3.72E+14	91.5

나. 돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료 첨가제 제품 제형 확립

(1) 동결 보호제 탐색

사료 첨가용 효모를 이용한 효율적인 돼지 흉막폐렴 예방 기술 개발을 위해 동결건조기를 사용하여 제품제형을 확립하고자 하였다. 세포는 동결과정에서 발생하는 얼음결정체의 형성으로 손상을 입고 기능을 상실하거나 파괴된다. 동결 보호제란 동결과정에서 빙점을 강하시키거나 유리전이온도를 변화시켜 동결과정 및 얼음결정체의 형태변화와 비동결수양을 변화시킴으로서 동결과정에서 발생하는 세포의 손상을 감소시키는 물질을 말한다. 그러므로 동결건조 과정을 거치면서 생균수가 유지되는 방안이 확보되어야 한다. 따라서, 본 연구에서 사용되는 효모의 동결건조에 적절한 보호제 탐색을 실시하였다. 동결건조 보호제로는 탈지분유 (skim milk), saccharose, 말토덱스트린, trehalose 등이 있다. 일반적으로 효모의 동결건조 보호제로 알려진 탈지분유의 경우 동결보호 효과가 우수한 것으로 알려져 있으며, saccharose는 빙점온도를 낮추고 저온에서 세포막 안정화에 기여한다. 당은 동결보호제로 알려져 있는데 당 성분들은 그들의 subunit간 결합과 물의 활성을 낮게 하는 분자구조상의 특징으로 단백질 주위의 수분과 결합함으로써 동결보호제로 작용한다. Trehalose는 비환원성 이당류로서 주로 영양분의 고갈, 고온, 산소 결핍, 삼투압 등 다양한 종류의 물리 화학적 외부 충격에서 비롯되는 영향으로부터 세포를 보호하는 역할을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 상기의 동결건조 보호제를 사용하여 효모의 생존율을 평가하였다. 그 결과, 탈지분유 20 % 와 trehalose 20 %를 사용했을 때 가장 높은 생존율을 나타냈다 (Table 16). 보호제를 단독으로 사용하는 것 보다 보호제 혼합에 따라 생존율의 상승효과가 나타나며 또한 농도를 높였을 경우 생존율이 더 높게 나타났다. 하지만, 동결건조 보호제의 최적 농도를 넘어서 과량 사용했을 경우에는 더 이상 상승 효과를 나타내지 않았다.

본 실험에서 나타난 탈지분유와 trehalose에서의 최고 생존율 5.0 %의 결과는 유산균 (*Lactobacillus sp.*)을 대상으로 했을 때 나타난 생존율 (25.0 ~ 50.0 %)과 비교 시 매우 낮은 것으로서, 이러한 동결보호제가 세균에 비하여 효모의 동결건조에 대한 저항성을 높여주지 못함을 보여주었다. 이는 세균에 비하여 효모 세포가 크기 때문에 동결건조 과정 중 세포가 받는 손상 정도가 크게 나타나는 것에 기인하며, 이러한 이유로 효모의 경우 동결건조 보호제를 사용해도 높은 생존율을 얻을 수 없는 것으로 추정된다.

Table 16. Cryoprotective effect of freeze-drying protectants on the viability of recombinant *S.cerevisiae* Y2805.

보호제 종류	동결건조 전 (CFU)	동결건조 후 (CFU)	생존률 (%)
skim milk 10 %	3.00E+12	4.30E+10	1.43
trehalose 5 %	5.00E+12	6.80E+09	0.14
maltodextrin 5 %	3.70E+12	1.60E+10	0.43
skim milk 10 % + trehalose 5 %	4.30E+12	6.40E+10	1.49
skim mik 20% + trehalose 20%	8.80E+13	4.40E+12	5.00
skim mik 20% + sucrose 20%	1.33E+14	1.22E+12	0.92

(2) 보관 온도에 따른 시제품 안정성 평가

시험 생산된 동결건조 재조합 효모의 안정성 평가를 위하여 1주일 간격으로 생균수 (viable cell; CFU/g)를 측정하였다. Figure 70에 나타낸 바와 같이 Apx I A 단백질을 형질전환 시킨 효모의 경우 5주 뒤 생존율은 약 40 % 유지되었다. Apx II A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 1~3주 사이에 급격히 생존율이 감소하였으며 5주 후 생존율은 약 7 %로 떨어졌다. Apx III A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 1주 후에 생존율이 40 %로 떨어졌고 1~3주 사이에는 생존율이 비교적 안정적이었으나, 5주 후에는 약 13 %로 떨어졌다. 이와 같이 동결건조 후 생균수가 급격히 줄어들었는데, 특히 Apx II A와 Apx III A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 불안정하였다. 하지만 저온에 보관하였을 경우 Apx II A와 Apx III A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 5주가 지난 후에도 생존율 30 %를 유지하였다 (Figure 71).

(3) 부형제 종류에 따른 시제품 안정성 평가

돼지흉막폐렴 예방용 효모의 사료첨가제 제품 제형 확립을 위하여 시제품을 생산하였다. 시험 생산된 시제품에 4가지 종류의 부형제 (소맥전분, 옥수수전분-대상, 옥수수전분-플라워A, 옥수수전분-F5)를 각각 혼합하여 실온 및 저온에서 안정성 평가를 실시하였다. Figure 72에 나타낸 바와 같이 부형제를 혼합한 뒤 실온에서 보관했을 때, 1주일이 지난 후 생균수가 급격하게 줄어들었다. Apx I A 단백질을 형질전환 시킨 효모의 경우 1주차 생존율이 소맥전분 10 % > 옥수수전분-대상 7 % > 옥수수전분-F5 3.7 % > 옥수수전분-플라워A 3 % 순서로 소맥전분을 첨가했을 때 생존율이 높게 유지되었다. Apx II A 단백질을 형질전환 시킨 효모의 경우 1주차 생존율이 소맥전분 2.2 % > 옥수수전분-대상 1.2 % > 옥수수전분-F5 0.5 % > 옥수수전분-플라워A 0.4 % 순서로 Apx I A 단백질을 형질전환 시킨 효모와 비슷한 결과를 나타냈다. 본 실험을 바탕으로 실온 보관 시 동결건조 된 효모의 생존율을 높이기 위해서는 적절한 부형제 탐색이 더 필요할 것으로 판단되어진다.

부형제를 혼합한 뒤 시제품을 저온에 보관했을 경우 Figure 73과 같은 결과를 나타냈다. Apx I A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 3주차에도 30 % 이상 높은 생존율을 유지하였으며, 옥수수전분-F5 49 % > 소맥전분 36.5 % > 옥수수전분-플라워A 35 % > 옥수수전분-대상 26.7 % 순서로 생존율이 높게 나타났다. Apx II A 단백질을 형질전환 시킨 효모의 경우 3주차 생존율이 옥수수전분-대상 31.5 % > 소맥전분 24.7 % > 옥수수전분-F5 22.1 % > 옥수수전분-플라워A 18.5 % 순서로 생존율이 높았다. Apx III A 단백질을 형질전환 시킨 효모는 옥수수전

분-플라워A 41.7 % > 소맥전분 37.6 % > 옥수수전분-대상 32.9 % > 옥수수전분-F5 32.7 % 순서로 생존율이 높았다. 본 실험을 바탕으로 저온 보관 시 동결건조 된 효모의 생존율이 실온보관보다 더 안정적으로 유지되는 것을 알 수 있었다.

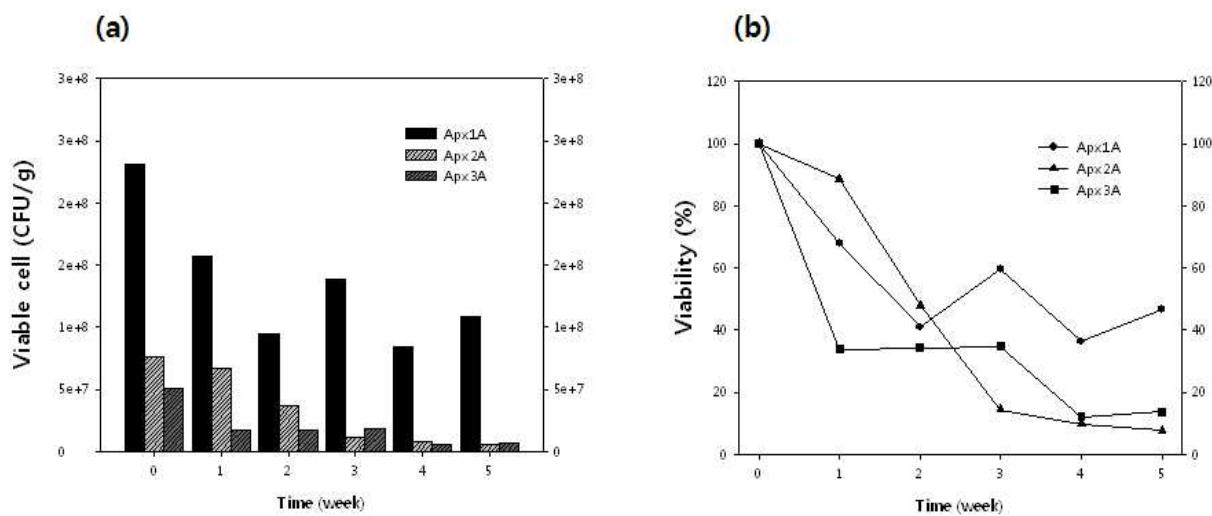


Figure 70. Stability profiles at room temperature of recombinant *S. cerevisiae* Y2805 after freeze-drying. Symbols: (left) ■, Apx I A; ▨, Apx II A; ▨, Apx III A (right) ●, Apx I A; ▲, Apx II A; □, Apx III A.

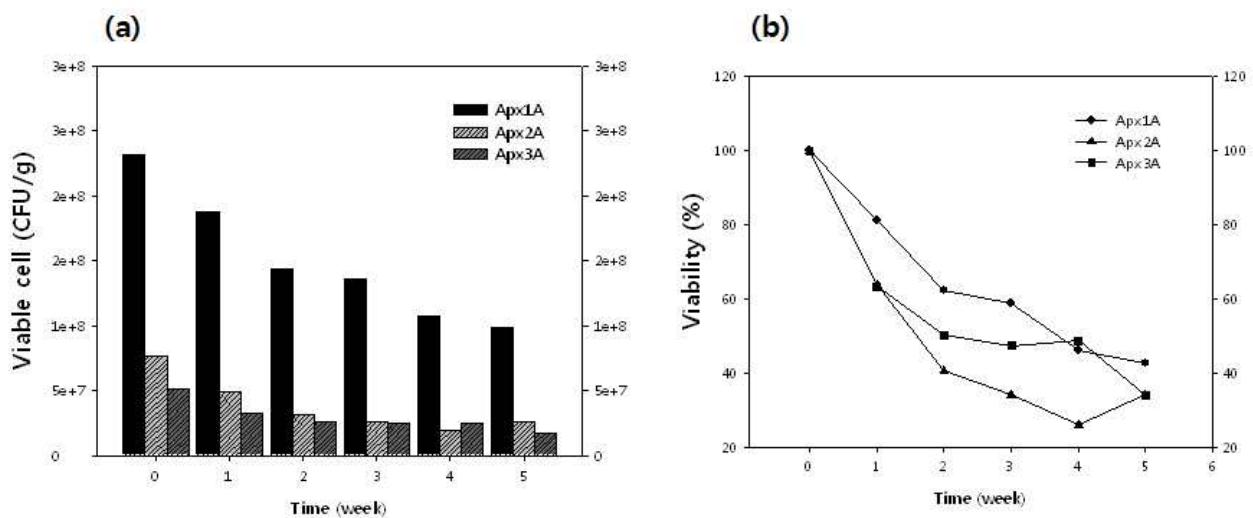


Figure 71. Stability profiles at low temperature of recombinant *S. cerevisiae* Y2805 after freeze-drying. Symbols: (left) ■, Apx I A; □, Apx II A; ▨, Apx III A (right) ●, Apx I A; ▲, Apx II A; ▨, Apx III A.

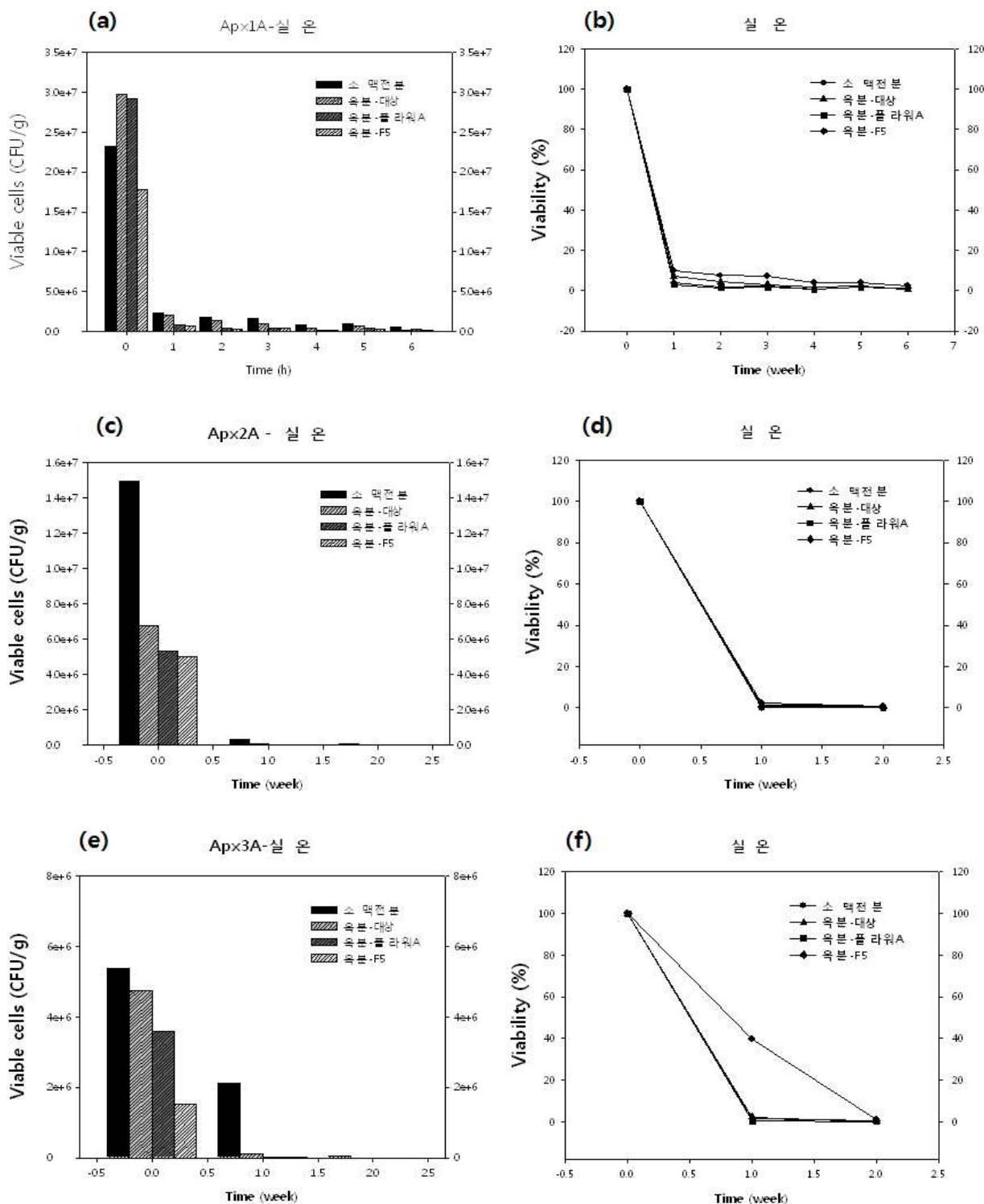


Figure 72. Stability profiles at room temperature of recombinant *S. cerevisiae* Y2805 after added excipients; (a)–(b) Apx I A, (c)–(d) Apx II A, (e)–(f) ApxIII A. Symbols: (left) ■, 소맥전분; ▨, 옥수수전분-대상; ▨, 옥수수전분-플라워A; ▨, 옥수수전분-F5 (right) ●, 소맥전분; ▲, 옥수수전분-대상; □, 옥수수전분-플라워A; ◆, 옥수수전분-F5.

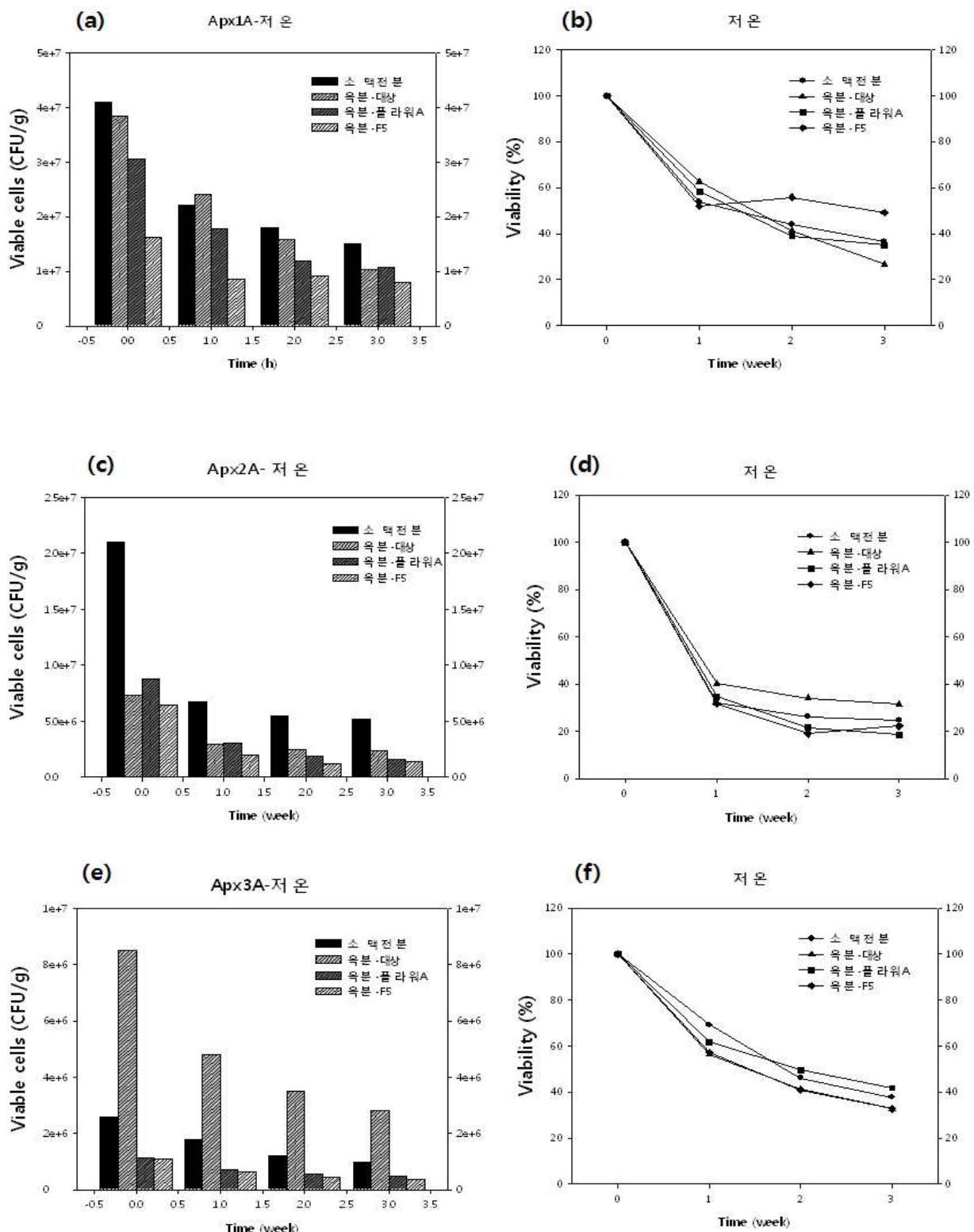


Figure 73. Stability profiles at low temperature of recombinant *S. cerevisiae* Y2805 after added excipients; (a) – (b) Apx I A, (c) – (d) Apx II A, (e) – (f) Apx III A. Symbols: (left) ■, 소맥전분; ▨, 옥수수전분-대상; ▨▨, 옥수수전분-플라워A; ▨▨▨, 옥수수전분-F5 (right) ●, 소맥전분; ▲, 옥수수전분-대상; ■, 옥수수전분-플라워A; ◆, 옥수수전분-F5.

7. Apx 항원단백질 발현 효모 형질 전환체의 야외 효능 평가

가. 형질전환 효모의 야외 농장 적용

(1) 실험 장소 및 돼지 사육 조건

과거 돼지 흉막폐렴 및 돼지 호흡기 질병의 발생이 있고, 호흡기 백신투여를 하지 않은 농장을 선정하여, 선정된 농장에서 사육된 3주령의 교접종 돼지를 사용하였다. 실험 장소는 경기도 소재의 농장에서 실시하였다 (Figure 74). 사료는 농장의 급여 사료에 맞추어 사용하였다.

(2) 형질전환 효모의 경구 접종

형질전환 효모 경구 백신은 *A. pleuropneumoniae* 의 주요병원성 인자인 ApxIA, ApxIIA neutralizing epitope-#5 및 ApxIIIa 항원 유전자를 형질전환하여 확보한 효모, *S. cerevisiae* 을 동결 건조한 샘플과 소맥전분이 혼합된 사료첨가제 형태인 백신을 사료와 사료 혼합기에 섞어 급여하였다. 효모 분말과 혼합된 사료를 3주령 자돈에 자유급식형태로 급여하였다. 실험군은 ApxIA, ApxIIA neutralizing epitope-#5 및 ApxIIIa 발현 효모를 섞은 백신 처리군, vector control 처리군으로 나누었다 (Table 17). 백신 처리군에 대하여 10일 간격으로 4회 형질전환 효모를 사료에 혼합하여 경구투여 하였고, 전 두수에 대하여 Apx 특이 IgA 및 IgG 항체가를 검사하기 위한 시료를 채취하였다 (Figure 75). 실험 돼지 체중 1kg 당, 동결 건조된 형질전환 효모 백신 2.5×10^9 (C.F.U./g) 접종을 기준으로 하였고, 구강으로 투여된 백신에 대한 oral-tolerance를 고려하여 매 접종 시기마다 투여량을 전 투여량의 2배 가 되도록 증가시켰으며, 투여 사료량 대비 백신 투여량을 산출하였다 (Table 18). 후반부로 갈수록 사료대비 투여 백신의 양이 많으므로 백신의 농축을 필요로 하였으며, 효모 백신의 풍미가 나쁘지 않아 사료대비 백신의 양이 많음에도 사료섭취 효율은 떨어지지 않았다. 돼지에서의 형질전환 효모의 경구 면역 모델에 따라 형질전환 효모의 경구 면역 유도능과 호흡기 질병에 대한 임상증상, 발생률 및 폐사율을 평가하였다.

나. 형질전환 효모의 경구 면역 유도능 및 방어능 평가

형질 전환 효모의 경구 투여로 유도된 Apx 특이 IgA, IgG 항체가 검사를 위해 serum 및 fecal swab 시료를 채취하였다. ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIa-ELISA 기법에 기초하여, 항체

가를 측정하였다. 마지막 경구투여 2주일 후, ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA에 대한 IgG 및 IgA가 대조군에 비교하여 상승한 것을 볼 수 있었다 (Figure 76). 또한, 임상증상 및 호흡기 질병 발병 모니터링 결과, 대조군이 백신군에 비하여 다소의 성장이 더디며 폐사율이 증가하였다 (Figure 77). 시제품 평가를 위해 형질전환 효모의 야외적용 실험을 경기도 소재의 한 농장에서 실행하였으며, 야외적용 실험에 대한 평가를 위하여 농장을 더 선정하고, 더 많은 샘플 및 평가 항목을 계획하였으나, 야외적용 실험 기간 중 전국적으로 구제역이 발생하여 실험의 축소가 불가피하였다. 과제 종료 후에도 사료첨가제형 형질전환 효모의 야외적용 평가가 더 필요하다고 판단되어, 야외 농장을 선정하여 실험을 진행할 것이며, 돼지 흉막폐렴 경구 백신 모델에 따라 경구 투여, 면역 유도능 및 방어능을 평가할 예정이다.



Figure 74. Field application for transgenic yeast oral vaccine. A, trial product of yeast vaccine; B, pig farm; C, D; three-week-aged piglet.



Figure 75. Strategy of oral vaccination and sampling schedules in field pig application.

Table 17. Experimental grouping for oral vaccination of *S. cerevisiae* expressing ApxIA, ApxIIA netralizing epitope-#5 and ApxIIIA in field application.

군	투여	투여 방법	개체수 (두)
대조군	형질전환 하지 않은 효모	형질전환 하지 않은 효모 급여	56
백신군	ApxIA, IIA 및 IIIA 발현 형질전환 효모	ApxIA, IIA 및 IIIA 발현 형질전환 효모 섞어서 급여	53

Table 18. Vaccination strategy of *S. cerevisiae* expressing ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA in field application.

군	투여	총 투여량(kg)	사료 급여량(kg)	사료대비 백신량(%)
대조군	1번째	GPD vector control 0.25	20	1.25
	2번째	GPD vector control 1.0	25	4
	3번째	GPD vector control 3.0	25	12
	4번째	GPD vector control 7.6	25	30.4
백신군	1번째	<i>S. cerevisiae</i> expressing ApxIA 1.68 + ApxIIA 0.25 + ApxIIIA 1.68	20	18.05
	2번째	<i>S. cerevisiae</i> expressing ApxIA 3.35 + ApxIIA 1.0 + ApxIIIA 3.35	25	30.8
	3번째	<i>S. cerevisiae</i> expressing ApxIA 5.0 + ApxIIA 3.0 + ApxIIIA 5.0	50 (두번으로 나눠 급여)	26
	4번째	<i>S. cerevisiae</i> expressing ApxIA 6.5 + ApxIIA 7.6 + ApxIIIA 6.5	50 (두번으로 나눠 급여)	41.2

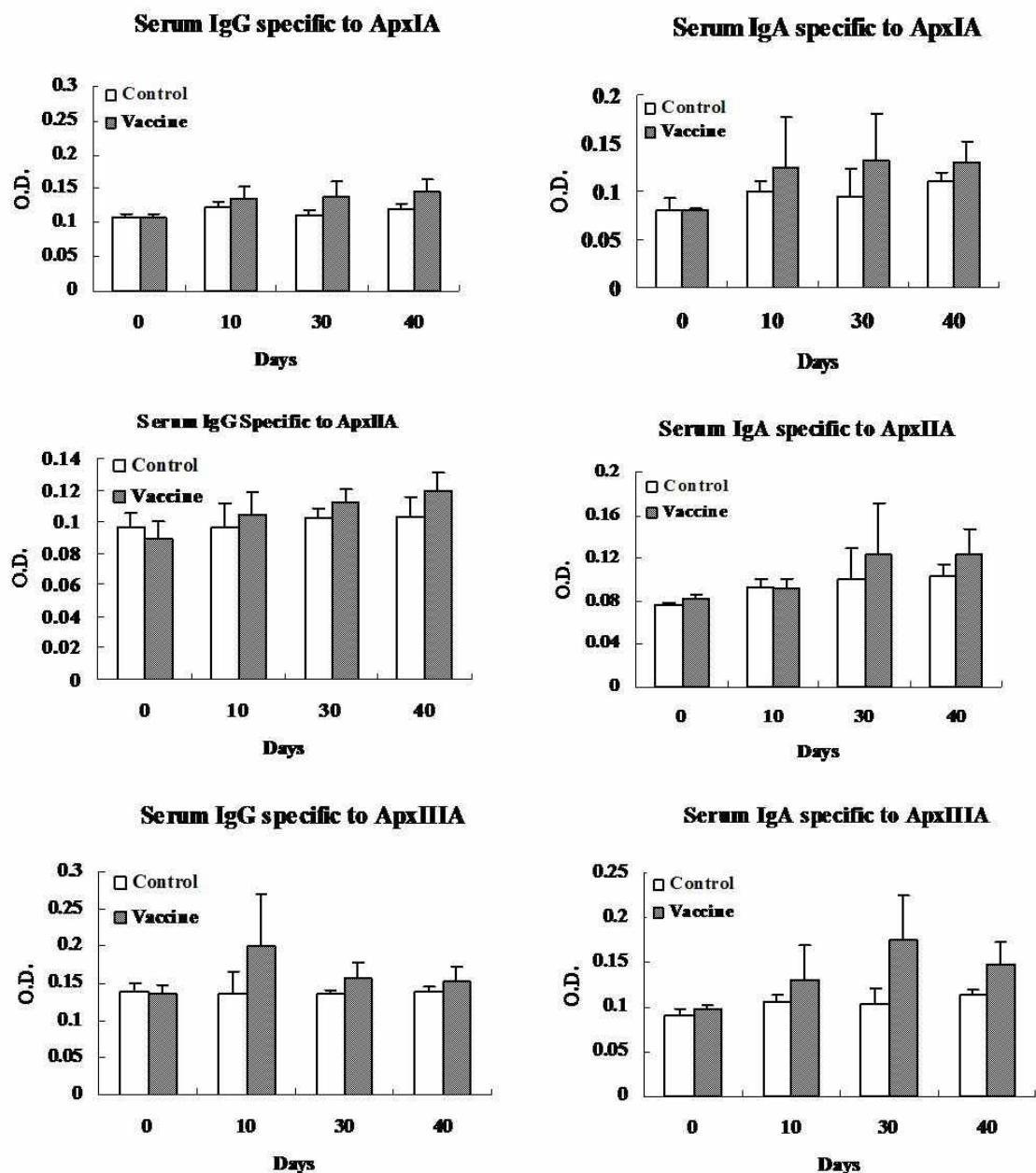


Figure 76. Titration of ApxIA, ApxIIA and ApxIIIA specific antibody in field pig.

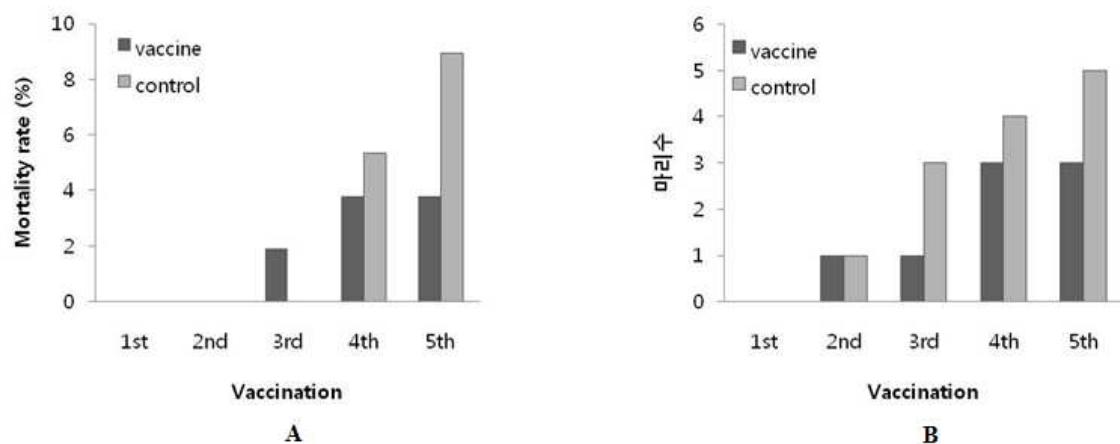


Figure 77. (A) Mortality rate in field application, (B)Outbreak of respiratory disease in field pig.

제 4 절 고찰

돼지 흉막폐렴 (Porcine Pleuropneumonia)은 Gram 음성 단간균인 *Actinobacillus pleuropneumoniae*에 의하여 유발되며, 돼지 급성 열성 호흡기 질병으로 전염성이 매우 강하고, 이환율과 치사율이 매우 높아 양돈 산업에 막대한 경제적인 피해를 주는 질병이다. 이 질병은 돈군의 면역상태에 따라서 만성, 급성 및 심급성의 다양한 질병의 경과를 나타낸다. 이 질병은 양돈을 하는 모든 나라에서 발생하고 있으며 주요 임상증상은 발열, 기침, 개구호흡 등 심한 호흡기증상을 나타내며, 급성으로 폐사하는 경우가 대부분이며, 만성으로 진행되는 경우에는 돼지의 성장을 지연시켜서 위축돈이되고 또한 carrier로 작용할 수 있어서 이 질병 전파의 주요 전염원으로 작용한다 (Bosse and MacInnes, 2000; Chiers et al., 2002). 돼지 흉막폐렴의 주요 병리학적 특성은 괴사성, 섬유소성 흉막폐렴이다. *A. pleuropneumoniae*는 협막 (capsular polysaccharide)에 따라서 15가지의 혈청형이 밝혀져 있으나, 그 이후로 혈청형을 동정할 수 없는 새로운 변이형들이 나타나고 있다 (Blackall et al., 2002; Komal and Mittal, 1990; Schaller et al., 1999). 돼지 흉막폐렴균의 혈청형의 분포는 지역에 따라서 다양하게 나타난다. 현재까지 국내에서는 혈청형 2, 5형이 가장 많은 것으로 알려져 있으나 최근 새로운 혈청형들이 나타나고 있어서 이에 대한 새로운 대책의 수립이 요구된다 (Min and Chae, 1999). 북미에서는 혈청형 5, 1, 7형이, 유럽은 2, 9형이, 중국은 2, 3 형이 그리고 일본은 2형이 많은 분포를 나타내며, 이상에서처럼 전세계적으로 2형과 5형이 많이 분포되어 있고, 또한 질병유발로 인한 문제가 되는 것을 볼 수 있다 (Nielsen, 1988; Mittal et al., 1983; Kume et al., 1986).

돼지 흉막폐렴균의 협막, 외독소 (exotoxin) 등 다양한 병원성 인자 (virulence factor)들을 가지고 있으나, 이들 중 가장 중요한 병원성인자는 RTX (Repeats in Toxins)에 속하는 외독소인 Apx toxin으로 이 Apx toxin은 구조 단백질 (ApxA) 및 기타 단백질 (ApxC, ApxB and D)들로 구성되어 있으며, ApxA에 따라서 ApxI, ApxII, ApxIII와 ApxIV로 구분되며, 이들 외독소는 돼지 흉막폐렴균의 혈청형에 따라 다양하게 생성된다 (Anderson et al., 1991; Frey, 1995). ApxI은 강한 용혈작용을 나타내는 반면 ApxII는 상대적으로 낮은 용혈작용을 나타내나 두 독소가 강한 세포 독성을 보이며, ApxIII는 용혈작용은 없으나 강한 세포 독성을 보이는 것으로 알려졌다. 최근에 밝혀진 ApxIV는 약한 용혈 작용을 나타내나 세포 독성에 관한 것은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않으며, ApxI, ApxII 및 ApxIII와 달리 모든 혈청형에서 생성되고, in vivo상에서만 발현되는 특징을 가지고 있다 (Dreyfus et al., 2004; Frey, 1995; Schaller et al., 1999). *apx*의 유전자는 *apxC*, *apxA*, *apxB* 와 *apxD*의 4개의 cluster로 이루어져 있으며, *apxC*는 비활성화되어 있는 structural gene인 *apxA*를 활성화시키

는 gene이며, *apxB* 와 *apxD*는 분비와 관련된 gene이다 (Bosse and MacInnes, 2000; Frey, 1995; Seah et al., 2002). 활성화된 Apx 독소는 효모 형질전환체에 대해서도 독성을 나타낼 수 있어, structural preprotein인 ApxA를 백신 개발에 이용하였다.

본 연구에서는 국내 야외에서 분리된 *Actinobacillus pleuropneumoniae* 혈청형 2형과 5형으로부터 *apxA*, *apxIIA* 및 *apxIIIa*의 유전자를 확보하였고, 크기는 각각 3069, 2971, 및 3159 bps를 나타내었다. 돼지 흉막폐렴의 예방을 위해서 돼지의 혈액 내에 이들 외독소에 대한 항체가 어느 수준으로 존재하는냐가 가장 중요한 요소 중 하나이다. 이에 본 연구에서는 우선적으로 이러한 항체를 검출할 수 있는 면역학적 진단기법을 확립하기 위하여 ApxIA, ApxIIA, ApxIIIa에 대한 재조합 단백질 및 이에 대한 mono-specific polyclonal antibody를 생성하여 ELISA system 을 개발하였다. 이를 위해 ApxIIA는 full-apxIIA gene, ApxIA 및 ApxIIIa는 ApxIA의 C-terminal 부분 (801 bps)과 ApxIIIa의 center 부분 (615 bps)으로 cloning하였고, 대장균 발현 시스템을 이용하여 재조합 단백질을 발현하였고, 이를 정제하였다. 정제한 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIa 재조합 단백질을 이용하여 토끼에서 다클론 항체를 제작하였고, 이를 ELISA system 개발 및 추후 다른 세부과제들에 제공하여 형질전환 효모체 개발 및 대량 생산공정에 사용하였다.

재조합 ApxA 단백질을 이용하여 돼지 흉막폐렴의 외독소에 대한 항체가 측정 및 본 연구에서 개발한 경구백신에 대한 효능평가를 위한 ELISA기법을 확립하였다. 이를 바탕으로 국내 야외돼지에서 각 ApxA 항원에 대한 seroprevalence를 조사하였고, 돼지 흉막폐렴의 감수성이 있는 시기인 이유자돈-육성돈 시기에 모체이행항체의 소실을 관찰할 수 있었다. 이 기초연구를 토대로 Apx toxin에 대한 백신의 필요성 및 투여 시기 등에 대한 연구의 기초 자료로 사용하였다.

경구 백신 전달 매체로는 *Salmonella Typhimurium*, 식물체, *Lactobacillus* spp., *Saccharomyces cerevisiae* 등의 다양한 방법을 이용하고 있다. 이를 전달매체들 모두 각각의 장, 단점을 가지고 있다 (Brennan et al., 1999; Carrillo et al., 1998; Cox et al., 2002; Daniell et al., 2002; Dus Santos and Wigdorovitz, 2005; Hein et al., 1996; Marquet-Blouin et al., 2003; Mason et al., 1992; Rice et al., 2005; Streatfield et al., 2001; Tamaru et al., 2006; Venkatesan and Vyas, 2000; Xia et al., 2007). 특히 이 들 중 *Saccharomyces cerevisiae*는 낮은 가격으로 생산된 단백질의 분비 효율이 월등하여 많은 경우에 생산된 단백질의 순수 분리, 정제를 용이하며, 효모 자체를 사용하는 경우에도 고도의 정제의 과정이 필요하지 않고 그 자체로 adjuvant 없이 사용이 가능한 다양한 장점을 가지고 있어서 이를 이용한 경구백신의 전달 매체로 많이 사용되고 있다 (Bathurst, 1994; Schreuder et al., 1996a; Schreuder et al., 1996b; Stubbs et al., 2001; Beier and

Gebert, 1998).

경구 백신을 개발하는 경우에 항원을 효율적으로 전달하기 위한 다양한 방법들이 개발되고 있으나, 본 연구에서는 장내에서 항원의 면역세포로의 전달 효율을 높이기 위해 효모의 세포 표면에 돼지 흉막폐렴 항원 단백질을 발현하는 표면 발현 시스템을 개발하였고, 항원성의 최대 효율을 위해 국내 분리 균주로 부터 가장 강한 병증을 유발하는 ApxIIA 독소 단백질을 대표적으로 선택하였으며 (Tascon et al., 1994; Wang et al., 2007), 성공적으로 효모의 세포 표면에 발현을 시도하였다. 추가적으로 효모에서 특정유전자의 발현 시 삽입유전자의 크기가 커지는 경우 유전자 조작이 어렵고 발현이 잘되지 않는 문제점을 보완하기 위하여 선행연구에 의해 조사된, 주된 target 항원인 ApxII의 epitope부분 또한 본 연구의 형질전환 효모 제조에 사용되었다. 세포 표면에 발현된 효모 형질전환체중 이들의 표적 유전자의 발현양상은 mRNA 발현에 대하여는 Northern blot으로, 단백질 발현은 Western blot으로 확인하여 항원 단백질의 발현량이 우수한 형질전환체를 선별하여 실험동물 및 목적동물 (돼지)에서의 항원 유도능 및 방어능에 대하여 분석 하였다. 또한 M cell에 특이적으로 결합하는 효과적인 ligand를 탐색 하였고, 그 결과 Col ligand가 다른 ligand에 비해 효과적인 것을 볼 수 있었다. 항원 단백질과 Col ligand의 융합단백질을 발현하는 형질전환 효모를 개발하여 장내 특이적 targeting 기술을 개발하였다. 형질전환 된 효모가 발현하는 항원 단백질 및 β -glucan과 같은 효모 유래 부속물에 의해 항원 단백질에 의한 특이적 면역뿐만 아니라 비특이적 면역 또한 증강시킬 수 있을 것으로 기대된다 (Bathurst, 1994; Stubbs et al., 2001).

돼지 흉막폐렴 독소단백질 ApxIA, ApxIIA 및 ApxIIIA를 형질 전환시킨 효모의 고농도의 균체를 얻기 위해서 배지성분 및 배양조건을 최적화하였으며, 비교 방법 중 상기의 균주가 포도당을 연속적으로 공급함에 따라 고농도 배양이 가능함을 보여주었다. 형질 전환시킨 효모를 대량 배양하기 위하여 발효 조건을 scale up 하였으며, 적당량의 배지를 넣은 플라스크에 종균을 배양하여 주발효조로 옮긴 후 균의 증식에 최적인 발효 조건을 유지하면서 배양하는 회분식 배양과 배지를 간헐적으로 추가하는 방법으로 배양하는 유가식 배양을 실시하여 비교하였다. 형질전환 효모의 경우 순수 산소와 포도당을 계속적으로 공급하는 유가식 배양으로 균체 농도를 보다 증가하는 것을 시킬 수 있는 것을 볼 수 있었다. 대량 생산 시스템을 구축하기 위하여 500 L로 발효 조건을 scale up 했을 때, 7 L 생물반응기에서 실시했던 결과와 비슷한 세포 성장 및 균체 농도를 얻을 수 있었으며, 실시한 발효 결과를 바탕으로 재조합 효모의 대량 생산 시스템을 구축하는데 성공하였다.

고농도 배양 후 세포 농축 및 회수를 위한 최적 공정 탐색을 실시하였으며, 세포의 농축 및 회수하는 방법으로 공정을 계속적으로 반복할 수 있고, 많은 양을 짧은 시간 안에 처리할 수 있으며, 멸균상태에서 조업이 용이한 대용량 원심분리기를 이용한 공정을 확립하였다.

동결건조 후 효모 생존율(viability) 을 높이기 위해 적절한 동결건조 보호제 탐색을 실시하였다. 동결건조 보호제로는 탈지분유 (skim milk), saccharose, 말토덱스트린, trehalose 등이 있는데, 보호제를 단독으로 사용하는 것 보다 보호제 혼합에 따라 생존율의 상승효과가 나타났으며, 농도를 높였을 경우 생존율이 더 높게 나타내는 것을 확인 할 수 있었다. 탈지분유 20 % 와 trehalose 20 %를 사용했을 때 가장 높은 생존율을 나타내었다.

돼지 흉막폐렴 예방용 효모의 사료첨가제 제품 제형 확립을 위하여 시제품을 생산하였으며, 시험 생산된 시제품에 4가지 종류의 부형제 (소맥전분, 옥수수전분-대상, 옥수수전분-플라워A, 옥수수전분-F5)를 각각 혼합하여 실온 및 저온에서 안정성 평가를 실시하였다. 본 실험을 바탕으로 저온 보관 시 동결건조 된 효모의 생존율이 실온보관보다 더 안정적으로 유지되는 것을 알 수 있었다.

돼지 흉막폐렴 독소단백질 ApxIIA 발현 형질 전환 효모를 실험동물 (마우스)에서 경구 투여 후, *A. pleuropneumoniae*로 공격 접종을 실시하여, ApxIIA에 특이적인 IgG의 항체가를 확인 하였으며 survival rate를 통하여 돼지 흉막폐렴에 대한 방어능을 확인할 수 있었다 (Shin et al., 2005a; Shin et al., 2005b; Shin et al., 2007; Lee et al., 2006; Lee et al., 2001; Xia et al., 2007). 또한, 돼지 흉막폐렴 예방효과 극대화를 위한 형질전환 효모 투여량을 최적화 하기위하여, 실험동물(마우스)에서 세포표면 발현균주(Surfaced ApxIIA-#5)에 대하여 투여량을 여러 구간으로 선정하여 경구면역을 실시한 결과, 첫 번째 투여시기에 형질전환 효모 1×10^5 (C.F.U./ml)를 투여한 후 두 번째 투여 시기에 첫 번째 투여량의 10^4 배를 투여한 군에서 유의적인 ApxIIA 특이 IgG 항체가 상승을 확인할 수 있었다. 이는 경구 면역관용을 극복하기 위한 하나의 전략으로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

형질전환 효모의 사료첨가제형 시제품을 목적동물(돼지) 및 야외 농장 돼지에 경구 접종하고 (Sjolund et al., 2009; Tuboly et al., 2000), 국내 야외 분리균주 *A. pleuropneumoniae*로 공격 접종을 실시하여 항원 단백질인 ApxA에 특이적인 IgA와 IgG의 항체가를 확인하였으며, 특히 공격접종 후 채취한 Lung lavage 샘플에서 대조군에 비해 백신군에서 ApxA 특이 IgA가 유의적으로 상승한 것을 확인 할 수 있었다. 이를 통하여, 점막면역 시스템에서 경구 면역을 통해 inductive site (경구)로부터 멀리 떨어진 effective site (폐)에서 방어적 면역이 유도된 것을 확인 할 수 있었으며, 또한 sIgA의 유도로 질병에 대한 방어적 면역 구축할 수 있었다 (Bowersock et al., 1994; Dietrich et al., 2003; Ogra et al., 2001; Silin and Lyubomska, 2002). 임상증상, 육안병변, 조직병리학적 관찰 및 폐사 개체발생 등에 대한 항목을 평가하여 돼지 흉막폐렴에 대한 방어능을 확인하였다. 본 연구에서는 사료대비 백신 투여량의 비율이 높았으며, 이는 형질전환 효모의 경구 백신으로서의 효능을 평가하기 위해 실험적으로 고농도를 투여한 것이다. 그러므로, 현재 단계에서 효모 백신의 단가가 높게 평가될 수밖

에 없으나, 야외 농장을 선정하여 효율적인 백신 투여 프로그램을 설정하고, 효과적이면서 경제적인 효모 대량생산 조건을 확립하는 추가적 실험을 통하여 이를 보완 하고자 한다. 또한 ApxA 발현 형질전환 효모와 *A. pleuropneumoniae* 의 outer membrane protein과 같은 다른 면역원성 인자도 함께 합체하여 투여하는 전략 또한 경구백신 효능 향상으로 이러한 방법을 통하여 본 연구결과 얻은 경구 면역방법에 대한 경제적인 효과를 극대화 할 수 있다고 생각된다 (Silin and Lyubomska, 2002; Van Overbeke et al., 2001).

이러한 결과를 바탕으로, 개발된 ApxA 발현 형질전환 효모 백신은 경구 투여로 돼지 흉막폐렴의 예방을 유도 할 수 있음은 물론이고, 접종의 어려움으로 인한 부가적인 손실을 줄이고, 사료 첨가제의 형태로 상용화하여 양돈 농가의 생산성 증대를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나, 본 연구결과 얻은 형질 전환 효모체를 야외 농장에서 돼지 흉막폐렴 예방을 위해 실질적으로 사용하기 위해서 현재 국내 양돈장에서 사용할 수 있는 급여 프로그램, 급여 시기, 급여량 등에 대한 효율적인 적용 프로그램의 개발에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것으로 생각한다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	관련분야의 기술발전에의 기여
1차 연도 (2007)	제 1세부: 형질전환효모의 효능평가 및 야외적용 시험	형질전환 yeast의 특성 조사 분석	100	<ul style="list-style-type: none"> 형질전환 yeast의 배양조건 확립 및 단백질 발현 분석
		돼지흉막폐렴의 예 방 효과 평가 기법 확립	100	<ul style="list-style-type: none"> Apx I A, II A 및 III A에 대한 항체 확 보 확보된 재조합 단백질에 대한 항체 확 보 정제된 재조합 단백질 및 항체를 이용 한 항체가 평가 기법 확립 국내 야외돼지 흉막폐렴 진단 기법 확 립
		돼지흉막폐렴균 독 소 단백질의 효모 세포 내 발현하는 효모 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 세포내 발현을 위한 APXIA, APXIIA 및 APXIIIA 유전자의 효모발현벡터 제 작여부
			100	<ul style="list-style-type: none"> 효모 형질전환 수행여부
			100	<ul style="list-style-type: none"> PCR, Northern blot analysis, Western blot analysis등의 기법으로 형 질전환체 확보여부
			100	<ul style="list-style-type: none"> 재조합 효모의 면역유도 특성 검정여부
	제 3세부: 돼지흉막폐렴 예방용 사료첨가제 대량생산 기술개발	Pilot scale 발효 조건 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> 배지 최적화
		대량배양을 위한 발효 조건 탐색	100	<ul style="list-style-type: none"> 공정 최적화
		발효조건에 따른 단백질량 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> 공정 상 분석법 확립
		동결건조에 따른 균주안정성 확인	100	<ul style="list-style-type: none"> 동결 보호제 평가
2차 연도 (2008)	제 1세부: 형질전환 효모의 효능평가 및 야외 적용 시험	돼지흉막폐렴 예방 효과를 극대화를 위한 사료첨가제 투여량의 최적화	100	<ul style="list-style-type: none"> 효모 첨가사료의 급여시기, 급여량 등 에 따른 면역 반응 유도 효과 분석 최적화 사료 급여 프로그램에 따른 흉 막폐렴 방어 효과 분석
	제 2세부: 돼지흉막폐렴균 항원발현 효모 형질전환체	APXIIA 독소단백 질의 효모 세포표 면에 발현하는 효 모 개발	100	<ul style="list-style-type: none"> 세포표면 발현을 위한 agglutinin 유전 자(AGA1)가 fusion된 APXIIA 유전자 의 효모발현벡터 제작여부
			100	<ul style="list-style-type: none"> 효모 형질전환 수행여부

개발	돼지흉막폐렴균 독소 단백질의 점막 면역계 targeting을 위한 리간드의 활용	100	• PCR, Northern blot analysis, Western blot analysis등의 기법으로 형질전환체 확보여부	
		100	• Immunostaining 후 형광현미경 관찰로 APXIIA-AGA fusion 단백질 발현량 조사여부	
		100	• 재조합 효모의 면역유도 특성 검정여부	
		100	• M cell에 결합력 높은 ligand 개발여부	
		100	• M cell 결합 ligand의 Apx 독소 단백질과의 fusion 단백질구성여부	
		100	• Ligand fusion 단백질의 효모 내 발현 조사 후 형질전환체 확보여부	
		100	• PCR, Northern blot analysis, Western blot analysis등의 기법으로 형질전환체 확보여부	
		50	• 재조합 효모의 면역유도 특성 검정여부	
	제 3세부: 돼지흉막폐렴 예방용 사료첨가제 대량생산 기술개발	배양조건 scale up 확립	100	• 배양최적화 및 원가절감 모색
		배양후 후공정개발 조건 탐색	100	• 후속 생산 공정 최적화 탐색
		공정조건에 따른 시제품 제작조건 탐색	100	• 부형제 탐색 및 안정성 평가
		동물 사양 조건 탐색	100	• 시제품 동물 사양 실험 조건 탐색
3차 연도 (2009)	제 1세부: 형질전환효모의 효능평가 및 야외적용 시험	사료 첨가용 Yeast의 야외 효능	90	• 야외에서 사료 급여프로그램에 따른 급여후 면역 반응 분석
			90	• 야외 질병 발생 양상 및 질병 발생 감소 효과 분석
	제 2세부: 돼지흉막폐렴균 항원발현 효모 형질전환체 개발	재조합효모의 산업화를 위한 GMM 규제 극복 기술개발	90	• 재조합 효모의 생산 최적화
	제 3세부: 돼지흉막폐렴 예방용 사료첨가제 대량생산 기술개발	사양 평가 및 시제품 안정성 평가	100	• 사양 평가 및 제품제형의 안정 및 경제성 탐색
		상업용 제품 생산 공정 확립	100	• 생산 공정 시스템 효율성 확립
		상업용 제품제형 확립	80	• 상품화 및 지속적 제형 탐색

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 성과

1. 국내외 논문 발표

- Surface Displayed Expression of a neutralizing epitope of ApxIIA exotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Saccharomyces cerevisiae*. Jung-Mi Kim, Dea-Im Jung, Yoo Jeong Eom, Seung-Moon Park, Han-Sang Yoo, Yong-Suk Jang, Moon-Sik Yang, and Dae-Hyuk Kim.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 2010 Jul 23;74(7):1362–7. Epub 2010 Jul 7.

- Development of an ELISA assay for recombinant Apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Min-Kyoung Shin, Mi Lan Kang, Seung Bin Cha, Won-Jung Lee, Ji Hyun Sung and Han Sang Yoo.

2010. 투고 중

- Genetic and molecular analysis of *apxIVA* of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Korean isolate. Min-Kyoung Shin, Seung-Bin Cha, Won-Jung Lee, Yu-Mi Roh, Myung Hwan Jung and Han-Sang Yoo

2010. 투고 준비 중

- Efficacy of Protective Immune Response for Surface expressed *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIA in *Saccharomyces cerevisiae* in pig. Min-Kyoung Shin, Myung Hwan Jung, Seung-Bin Cha, Won-Jung Lee, Yu-Mi Roh, Jung-Mi Kim, Ji-Eun Cho, Dae-Gun Choi, Dae-Hyuk Kim and Han-Sang Yoo

2010. 투고 준비 중

2. 국내외 학술 발표

- Development of an immuno-enzyme assay to detect antibody against *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA, IIA and IIIA. MK Shin, ML Kang, JS Chun, SG Kang, SB Cha, WJ Lee, SI Lee, N, Rayamajhi, HS Yoo

2007 학회 공동 추계 학술발표대회 및 수의, 축산분야의 FTA대비 전략 심포지움

2007. 11. 15-16, Gangwon-do, Korea, 포스터

- Development of a Sero-Diagnostic Method using Recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA, IIA and IIIA. MK Shin, ML Kang, SG Kang, SB Cha, WJ Lee, JH Sung, HS Yoo.

2008 대한수의학회 춘계국제공동심포지움

2008. 4. 25-26, Seoul, Korea, 포스터

- Expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* toxins fused with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin in yeast. JA Kim, JG Lim, JM Kim, SM Park, MS Yang, DH Kim.

2008 한국생물공학회 춘계학술대회

2008. 4. Jeonju, Korea, 포스터

- Surfaced Displayed Expression of ApxIIA Toxin epitope of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Saccharomyces cerevesiae*. JM Kim, JA Kim, JA Park, YS Jang, MS Yang, DH Kim

2008 한국생물공학회 추계학술대회 발표 및 국제심포지움

2008. 10. 6-7, Jeju, Korea, 포스터

- Development of the ApxA-ELISA using recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA, IIA and IIIA. MK Shin, ML Kang, SG Kang, SB Cha, WJ Lee, JH Sung, HS Yoo

The 15th congress of FAVA-OIE Joint symposium on Emerging Disease

2008. 10. 27-30, Bangkok, Thailand, 포스터

- Induction of Protective Immune Responses by Orally Administration of

Actinobacillus pleuropneumoniae ApxIIA in *Saccharomyces cerevisiae*. MK Shin, ML Kang, MH Jung, SB Cha, WJ Lee, JH Sung, YM Roh, JM Kim, JE Cho, DG Choi, DH Kim, HS Yoo

2009 대한수의학회 추계국제학술대회

2009. 10. 15-17, Jeju, Korea, 포스터

- Induction of immune response by surface expressed *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIA in *Saccharomyces cerevisiae*. MK Shin, ML Kang, N, Rayamahji, SB Cha, WJ Lee, JH Sung, YM Roh, HS Yoo

The 4th Congress of Asian Pig Veterinary Society

2009. 10. 26-28, Tsukuba, Japan, 포스터 (BestPosterAward 수상)

- Surface Displayed Expression of a Neutralizing Epitope of ApxIIA Exotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in *Saccharomyces cerevisiae* and its Oral Vaccination. JM KIM, DI JUNG, JE JUNG, YS JANG and DH KIM.

2010 한국생물공학회 춘계추계학술대회 발표

2010. 4. 15-16, Sungnam, Korea, 포스터

- Expression of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Toxins fused with B subunit of *Escherichia coli* Heat-labile Enterotoxin in *Saccharomyces cerevisiae*.

MH YI, JA KIM, JA PARK, JG LEE, JM KIM and DH KIM.

2010 한국생물공학회 춘계추계학술대회 발표

2010. 4. 15-16, Sungnam, Korea, 포스터

- Efficacy of Protective Immune Response for Surface expressed *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIA in *Saccharomyces cerevisiae* in pig. MK Shin, ML Kang, MH Jung, SB Cha, WJ Lee, JH Sung, YM Roh, JM Kim, JE Cho, DG Choi, DH Kim, HS Yoo

21th International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress

2010. 7. 18-21, Vancouver, Canada, 포스터

3. 특허 출원

- 효모 세포 표면에 디스플레이되는 ApxIIA 단백질의 제조방법 및 사료첨가제로서의 이의 용도

출원번호 10-2008-0138479

출원일자 2008. 12. 31.

4. 실용화·산업화

돼지 흉막폐렴 예방 형질전환 효모 백신에 대한 야외적용 실험을 추가 실험을 수행한 후, 본 연구 결과를 바탕으로 (주)씨티씨바이오와 산업화를 추진할 예정.

5. 기타 (유용유전자, 형질전환체)

- 가. ApxIA 항원 유전자, 다클론 항체 및 형질전환 효모
- 나. ApxIIA 항원 유전자, 다클론 항체 및 형질전환 효모, 총 7종
(Surface displayed ApxIIA#5 및 ApxIIA, intracellular expression ApxIIA#5 및 ApxIIA, CO1-APXIIA#5, APXIIA#5-CO1A와 APXIIA#5-CO1B)
- 다. ApxIIIa 항원 유전자, 다클론 항체 및 형질전환 효모

제 2 절 성과활용 계획

1. 핵심 연구성과 활용 계획

- 가. 목적동물(돼지) 및 야외에서의 돼지 흉막폐렴 예방 경구 백신에 대한 평가 기법 확립
돼지 및 야외에서의 경구백신에 대한 vaccination strategy를 확립하였고, 경구 백신에 대한 평가를 면역유도평가, 임상적, 병리조직학적 평가 기준 및 기법을 개발하여, 돼지 흉막폐렴에 대한 경구백신 개발에 활용될 수 있을 것으로 판단됨.

나. 돼지 흉막폐렴 예방 백신 개발을 위한 항원단백질의 제조합효모 제작 기술

돼지 흉막폐렴균의 항원 중 방어 면역반응을 효과적으로 유도 할 수 있는 독소 단백질을 효

모의 세포내 또는 표면에 발현 시킨 본 연구진의 형질전환 효모 개발기술은 항원 단백질의 발현 효율 증가, 면역 효능을 증가시키기 위한 세포 표면 발현, 백신 점막 면역계 targeting 효과 증진을 위한 새로운 ligand 활용이 가능한 획기적 기술이므로 돼지 흉막폐렴 이외의 다른 질병의 예방 백신 개발에 크게 활용 가능하며 예방 백신 기술을 한 단계 발전시킬 것으로 판단됨.

다. 돼지흉막폐렴 병원성 인자를 발현하는 효모의 대량 생산 시스템

호흡기 질병 중의 하나인 돼지흉막폐렴 원인균 중 중요한 병원성 인자를 발현하는 효모를 개발하고 사료첨가제로 사용할 수 있는 대량생산 체계 구축하였으며, 사료첨가제로 산업화에 성공할 경우 접종의 경제성과 장점막에 부착하여 증식하면서 지속적으로 항원을 생산하여 면역 반응을 유도할 것으로 기대됨.

2. 연구종료 후 예상연구 성과

- 국내외 논문발표 : 본 연구에 대한 결과를 바탕으로 투고중이거나 투고 준비중인 논문이 있으므로, 연구종료 2년 후에는 국내외 논문 발표 총 4 건 예상.
- 실용화 및 산업화 : 돼지 흉막폐렴 예방 형질전환 효모 백신에 대한 야외적용 실험을 추가 실험을 수행한 후, 본 연구 결과를 바탕으로 (주)씨티씨바이오와 산업화를 추진할 예정.
- 추후 개발한 형질전환 효모 균주에 대해서 특허 출원 및 논문(SCI) 투고 예정

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 돼지 흉막폐렴에 대한 신 병원성 인자 분석

돼지 흉막폐렴의 직접적인 증상과 관련되었으며 흉막폐렴의 중요 병원성인자로 밝혀진 Apx toxin 네가지 중 가장 늦게 밝혀진 ApxIV는 다른 Apx toxin과 달리 in vivo에서만 발현되며 모든 혈청형에서 분비된다. ApxIV는 in vivo에서만 발현된다는 점에서 자연감염과 백신처리군을 구분하여 진단할 수 있어 진단 기법을 개발할 수 있다고 보고하였다 (Dreyfus et al., 2004; Schaller et al., 1999).

제 2 절 돼지 흉막폐렴에 대한 경구백신의 oral tolerance 극복

돼지 흉막폐렴 사균백신을 경구로 접종하여 oral tolerance를 극복하기 위한 방안으로 여러 strategy를 보고하였다. Mucosal immune system을 대표하는 IgA는 경구 투여 3번째 이후부터 유도되는 것을 확인하였고, Triamcinolone과 같은 일시적 면역억제제를 함께 투여하는 방안과 투여량의 점진적인 증가 또한 oral tolerance를 극복할 수 있었다 (Silin, D.S., Lyubomska, V., 2002).

제 3 절 형질전환 효모의 활성 유지 기술

살아있는 *Saccharomyces cerevisiae*의 cell 표면에 silicon dioxide로 만들어진 synthetic shell을 코팅하는 기술이 개발되었다. 합성된 shell은 unfavorable external conditions에서 cell을 보호하는 효과를 보였다고 보고하였다. 위장관을 통과하여야 하는 경구 접종의 harsh conditions에서 cell viability를 유지할 수 있는 기술이라고 생각되었다 (Yang et al., 2009).

제 7 장 참고문헌

- Anderson, C., Potter, A.A., Gerlach, G.F., 1991, Isolation and molecular characterization of spontaneously occurring cytolysin-negative mutants of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7. *Infect Immun*59,4110–4116.
- Arakawa, T., Chong, D.K., Merritt, J.L., Langridge, W.H., 1997, Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res*6,403–413.
- Arakawa, T., Yu, J., Chong, D.K., Hough, J., Engen, P.C., Langridge, W.H., 1998, A plant-based cholera toxin B subunit–insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nat Biotechnol*16,934–938.
- Bathurst, I.C., 1994, Protein expression in yeast as an approach to production of recombinant malaria antigens. *Am J Trop Med Hyg*50,20–26.
- Beier, R., Gebert, A., 1998, Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am J Physiol*275,G130–137.
- Blackall, P.J., Klaasen, H.L., van den Bosch, H., Kuhnert, P., Frey, J., 2002, Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15. *Vet Microbiol*84,47–52.
- Bosse, J.T., MacInnes, J.I., 2000, Urease activity may contribute to the ability of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to establish infection. *Can J Vet Res*64,145–150.
- Bowersock, T.L., Shalaby, W.S., Levy, M., Samuels, M.L., Lallone, R., White, M.R., Borie, D.L., Lehmeyer, J., Park, K., 1994, Evaluation of an orally administered vaccine, using hydrogels containing bacterial exotoxins of *Pasteurella haemolytica*, in cattle. *Am J Vet Res*55,502–509.
- Brennan, F.R., Jones, T.D., Gilleland, L.B., Bellaby, T., Xu, F., North, P.C., Thompson, A., Staczek, J., Lin, T., Johnson, J.E., Hamilton, W.D., Gilleland, H.E., Jr., 1999, *Pseudomonas aeruginosa* outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiology*145(Pt1),211–220.
- Carrillo, C., Wigdorovitz, A., Oliveros, J.C., Zamorano, P.I., Sadir, A.M., Gomez, N.,

- Salinas, J., Escribano, J.M., Borca, M.V., 1998, Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J Virol*72,1688–1690.
- Chien, M.S., Chan, Y.Y., Chen, Z.W., Wu, C.M., Liao, J.W., Chen, T.H., Lee, W.C., Yeh, K.S., Hsuan, S.L., 2009, *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages. *Vet Microbiol*135,327–333.
- Chiers, K., Donne, E., Van Overbeke, I., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2002, *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profiles. *Vet Microbiol*85,343–352.
- Chikwamba, R., Cunnick, J., Hathaway, D., McMurray, J., Mason, H., Wang, K., 2002, A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Transgenic Res*11,479–493.
- Cox, E., Van der Stede, Y., Verdonck, F., Snoeck, V., Van den Broeck, W., Goddeeris, B., 2002, Oral immunisation of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic *E. coli*: an interesting model to study mucosal immune mechanisms. *Vet Immunol Immunopathol*87,287–290.
- Daniell, H., Khan, M.S., Allison, L., 2002, Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends Plant Sci*7,84–91.
- Dietrich, G., Griot-Wenk, M., Metcalfe, I.C., Lang, A.B., Viret, J.F., 2003, Experience with registered mucosal vaccines. *Vaccine*21,678–683.
- Dreyfus, A., Schaller, A., Nivollet, S., Segers, R.P., Kobisch, M., Mieli, L., Soerensen, V., Hussy, D., Miserez, R., Zimmermann, W., Inderbitzin, F., Frey, J., 2004, Use of recombinant ApxIV in serodiagnosis of *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections, development and prevalidation of the ApxIV ELISA. *Vet Microbiol*99,227–238.
- Dubreuil, J.D., Jacques, M., Mittal, K.R., Gottschalk, M., 2000, *Actinobacillus pleuropneumoniae* surface polysaccharides: their role in diagnosis and immunogenicity. *Anim Health Res Rev*1,73–93.
- Durrani, Z., McInerney, T.L., McLain, L., Jones, T., Bellaby, T., Brennan, F.R., Dimmock, N.J., 1998, Intranasal immunization with a plant virus expressing a

- peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J Immunol Methods* 220, 93–103.
- Dus Santos, M.J., Wigdorovitz, A., 2005, Transgenic plants for the production of veterinary vaccines. *Immunol Cell Biol* 83, 229–238.
- Frey, J., 1995, Virulence in *Actinobacillus pleuropneumoniae* and RTX toxins. *Trends Microbiol* 3, 257–261.
- Fuller, T.E., Martin, S., Teel, J.F., Alaniz, G.R., Kennedy, M.J., Lowery, D.E., 2000, Identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* virulence genes using signature-tagged mutagenesis in a swine infection model. *Microb Pathog* 29, 39–51.
- Gao, Y., Ma, Y., Li, M., Cheng, T., Li, S.W., Zhang, J., Xia, N.S., 2003, Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo expressing HBsAg. *World J Gastroenterol* 9, 996–1002.
- Haq, T.A., Mason, H.S., Clements, J.D., Arntzen, C.J., 1995, Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268, 714–716.
- Hein, M.B., Yeo, T.C., Wang, F., Sturtevant, A., 1996, Expression of cholera toxin subunits in plants. *Ann N Y Acad Sci* 792, 50–56.
- Jiang, H.L., Kang, M.L., Quan, J.S., Kang, S.G., Akaike, T., Yoo, H.S., Cho, C.S., 2008, The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization. *Biomaterials* 29, 1931–1939.
- Kapusta, J., Modelska, A., Pniewski, T., Figlerowicz, M., Jankowski, K., Lisowa, O., Plucienniczak, A., Koprowski, H., Legocki, A.B., 2001, Oral immunization of human with transgenic lettuce expressing hepatitis B surface antigen. *Adv Exp Med Biol* 495, 299–303.
- Komal, J.P., Mittal, K.R., 1990, Grouping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains of serotypes 1 through 12 on the basis of their virulence in mice. *Vet Microbiol* 25, 229–240.
- Lauterslager, T.G., Stok, W., Hilgers, L.A., 2003, Improvement of the systemic prime/oral boost strategy for systemic and local responses.

- Vaccine21,1391–1399.
- Lee, K.Y., Kim, D.H., Kang, T.J., Kim, J., Chung, G.H., Yoo, H.S., Arntzen, C.J., Yang, M.S., Jang, Y.S., 2006, Induction of protective immune responses against the challenge of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by the oral administration of transgenic tobacco plant expressing ApxIIA toxin from the bacteria. FEMS Immunol Med Microbiol48,381–389.
- Lee, R.W., Strommer, J., Hodgins, D., Shewen, P.E., Niu, Y., Lo, R.Y., 2001, Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a *Mannheimia haemolytica* A1 leukotoxin 50 fusion protein. Infect Immun69,5786–5793.
- Marquet-Blouin, E., Bouche, F.B., Steinmetz, A., Muller, C.P., 2003, Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota L.*)–derived measles virus hemagglutinin. Plant Mol Biol51,459–469.
- Mason, H.S., Lam, D.M., Arntzen, C.J., 1992, Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. Proc Natl Acad Sci U S A89,11745–11749.
- Min, K., Chae, C., 1999, Serotype and apx genotype profiles of *Actinobacillus pleuropneumoniae* field isolates in Korea. Vet Rec145,251–254.
- Nielsen, R., 1988, Seroepidemiology of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can Vet J29,580–582.
- Ogra, P.L., Faden, H., Welliver, R.C., 2001, Vaccination strategies for mucosal immune responses. Clin Microbiol Rev14,430–445.
- Prideaux, C.T., Lenghaus, C., Krywult, J., Hodgson, A.L., 1999, Vaccination and protection of pigs against pleuropneumonia with a vaccine strain of *Actinobacillus pleuropneumoniae* produced by site-specific mutagenesis of the ApxII operon. Infect Immun67,1962–1966.
- Rayamajhi, N., Shin, S.J., Kang, S.G., Lee, D.Y., Ahn, J.M., Yoo, H.S., 2005, Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates. J Vet Diagn Invest17,359–362.
- Reimer, D., Frey, J., Jansen, R., Veit, H.P., Inzana, T.J., 1995, Molecular investigation of the role of ApxI and ApxII in the virulence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5. Microb Pathog18,197–209.

- Rice, J., Ainley, W.M., Shewen, P., 2005, Plant-made vaccines: biotechnology and immunology in animal health. *Anim Health Res Rev*6,199–209.
- Sandhu, J.S., Krasnyanski, S.F., Domier, L.L., Korban, S.S., Osadjan, M.D., Buetow, D.E., 2000, Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res*9,127–135.
- Schaller, A., Kuhn, R., Kuhnert, P., Nicolet, J., Anderson, T.J., MacInnes, J.I., Segers, R.P., Frey, J., 1999, Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbiology*145(Pt 8),2105–2116.
- Schreuder, M.P., Deen, C., Boersma, W.J., Pouwels, P.H., Klis, F.M., 1996a, Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine*14,383–388.
- Schreuder, M.P., Mooren, A.T., Toschka, H.Y., Verrips, C.T., Klis, F.M., 1996b, Immobilizing proteins on the surface of yeast cells. *Trends Biotechnol*14,115–120.
- Seah, J.N., Frey, J., Kwang, J., 2002, The N-terminal domain of RTX toxin ApxI of *Actinobacillus pleuropneumoniae* elicits protective immunity in mice. *Infect Immun*70,6464–6467.
- Shin, S.J., Bae, J.L., Cho, Y.W., Lee, D.Y., Kim, D.H., Yang, M.S., Jang, Y.S., Yoo, H.S., 2005a, Induction of antigen-specific immune responses by oral vaccination with *Saccharomyces cerevisiae* expressing *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIIA. *FEMS Immunol Med Microbiol*43,155–164.
- Shin, S.J., Shin, S.W., Choi, E.J., Lee, D.Y., Ahn, J.M., Yang, M.S., Jang, Y.S., Yoo, H.S., 2005b, A predictive model for the level of sIgA based on IgG levels following the oral administration of antigens expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vet Sci*6,305–309.
- Shin, S.J., Shin, S.W., Kang, M.L., Lee, D.Y., Yang, M.S., Jang, Y.S., Yoo, H.S., 2007, Enhancement of protective immune responses by oral vaccination with *Saccharomyces cerevisiae* expressing recombinant *Actinobacillus pleuropneumoniae* ApxIA or ApxIIA in mice. *J Vet Sci*8,383–392.
- Silin, D.S., Lyubomska, V., 2002, Overcoming immune tolerance during oral vaccination against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Vet Med B Infect Dis Vet*

- Public Health49,169–175.
- Sjolund, M., de la Fuente, A.J., Fossum, C., Wallgren, P., 2009, Responses of pigs to a re-challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* after being treated with different antimicrobials following their initial exposure. Vet Rec164,550–555.
- Streatfield, S.J., Jilka, J.M., Hood, E.E., Turner, D.D., Bailey, M.R., Mayor, J.M., Woodard, S.L., Beifuss, K.K., Horn, M.E., Delaney, D.E., Tizard, I.R., Howard, J.A., 2001, Plant-based vaccines: unique advantages. Vaccine19,2742–2748.
- Stubbs, A.C., Martin, K.S., Coeshott, C., Skaates, S.V., Kuritzkes, D.R., Bellgrau, D., Franzusoff, A., Duke, R.C., Wilson, C.C., 2001, Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. Nat Med7,625–629.
- Tamaru, Y., Ohtsuka, M., Kato, K., Manabe, S., Kuroda, K., Sanada, M., Ueda, M., 2006, Application of the arming system for the expression of the 380R antigen from red sea bream iridovirus (RSIV) on the surface of yeast cells: a first step for the development of an oral vaccine. Biotechnol Prog22,949–953.
- Tascon, R.I., Vazquez-Boland, J.A., Gutierrez-Martin, C.B., Rodriguez-Barbosa, I., Rodriguez-Ferri, E.F., 1994, The RTX haemolysins ApxI and ApxII are major virulence factors of the swine pathogen *Actinobacillus pleuropneumoniae*: evidence from mutational analysis. Mol Microbiol14,207–216.
- Thanavala, Y., Mahoney, M., Pal, S., Scott, A., Richter, L., Natarajan, N., Goodwin, P., Arntzen, C.J., Mason, H.S., 2005, Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B. Proc Natl Acad Sci U S A102,3378–3382.
- Thanavala, Y., Yang, Y.F., Lyons, P., Mason, H.S., Arntzen, C., 1995, Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. Proc Natl Acad Sci U S A92,3358–3361.
- Tuboly, T., Yu, W., Bailey, A., Degrandis, S., Du, S., Erickson, L., Nagy, E., 2000, Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. Vaccine18,2023–2028.
- Van Overbeke, I., Chiers, K., Ducatelle, R., Haesebrouck, F., 2001, Effect of endobronchial challenge with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 of pigs vaccinated with a vaccine containing Apx toxins and transferrin-binding proteins. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health48,15–20.

- Venkatesan, N., Vyas, S.P., 2000, Polysaccharide coated liposomes for oral immunization--development and characterization. *Int J Pharm*203,169–177.
- Wang, C., Liu, S., Peng, Y., Shao, M., Wang, Y., Gong, Q., Chang, Y., Liu, J., Liu, H., Liu, D., Kong, X., 2007, Renaturation and purification of ApxII toxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Protein Expr Purif*52,441–445.
- Wigdorovitz, A., Carrillo, C., Dus Santos, M.J., Trono, K., Peralta, A., Gomez, M.C., Rios, R.D., Franzone, P.M., Sadir, A.M., Escribano, J.M., Borca, M.V., 1999, Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*255,347–353.
- Xia, M., Farkas, T., Jiang, X., 2007, Norovirus capsid protein expressed in yeast forms virus-like particles and stimulates systemic and mucosal immunity in mice following an oral administration of raw yeast extracts. *J Med Virol*79,74–83.
- Yang, S.H., Lee, K.B., Kong, B., Kim, J.H., Kim, H.S., Choi, I.S., 2009, Biomimetic encapsulation of individual cells with silica. *Angew Chem Int Ed Engl*48,9160–9163.
- Yusibov, V., Hooper, D.C., Spitsin, S.V., Fleysh, N., Kean, R.B., Mikheeva, T., Deka, D., Karasev, A., Cox, S., Randall, J., Koprowski, H., 2002, Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine*20,3155–3164.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여 서는 아니됩니다.