



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월07일  
(11) 등록번호 10-1683002  
(24) 등록일자 2016년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/04 (2006.01) C12N 9/62 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/04 (2013.01)  
C12N 9/62 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2015-0095463  
(22) 출원일자 2015년07월03일  
심사청구일자 2015년07월03일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020120072096 A

(73) 특허권자  
배재대학교 산학협력단  
대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동)  
(72) 발명자  
채순기  
대전광역시 유성구 엑스포로 488, 208동 1304호  
(전민동, 엑스포아파트)  
친바야  
대전광역시 유성구 봉산로 22번길 36, 205호 (봉산동, 그린아트빌라)  
(74) 대리인  
특허법인이룸리온, 특허법인이름

전체 청구항 수 : 총 8 항

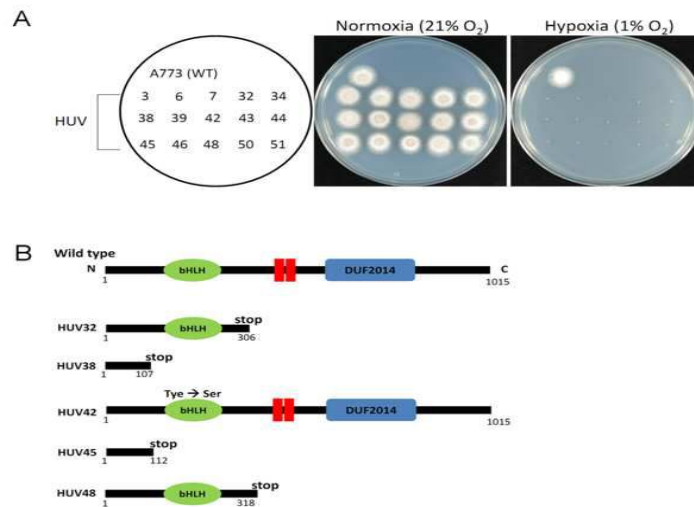
심사관 : 윤준호

(54) 발명의 명칭 국균증 또는 아스퍼질루스증 치료를 위한 유전자 sppA 및 단백질 SppA의 용도

(57) 요약

본 발명은 국균증 또는 아스퍼질루스증 치료를 위한 유전자 sppA 및 단백질 SppA의 용도에 관한 것으로서, 항진균제 또는 국균증 치료제를 스크리닝하는 방법 및 항진균 또는 국균증 치료 효과가 있는 약학조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**곽준용**

충청남도 천안시 서북구 직산읍 남산3길 121 (남산리)

**고선기**

인천광역시 남동구 호구포로 924, 112동 2001호 (만수동, 햇빛마을벽산아파트)

**정다운**

대전광역시 유성구 송강로 10, 202호 (송강동)

**전미향**

대전광역시 유성구 봉산로 39, 202동 1004호 (송강동, 송강마을아파트)

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

아스퍼질루스 니둘란스균에 대한 항균제 스크리닝 방법으로서,

- (a) 서열번호 1의 SppA 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 SppA 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 SppA 단백질의 양 또는 활성이 감소조절(down regulation)되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 항균제임 판별하는 단계

를 포함하는, 아스퍼질루스 니둘란스균에 대한 항균제 스크리닝 방법.

#### 청구항 2

아스퍼질루스 니둘란스균에 대한 항균제 스크리닝 방법으로서,

- (a) 서열번호 2의 *sppA* 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 *sppA* 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 *sppA* 유전자의 발현량이 감소조절(down regulation)되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 항균제임 판별하는 단계

를 포함하는, 아스퍼질루스 니둘란스균에 대한 항균제 스크리닝 방법.

#### 청구항 3

아스퍼질루스 니둘란스균에 대한 병용 투여용 항균제 스크리닝 방법으로서,

- (a) 서열번호 1의 SppA 단백질을 포함하는 세포에 항균제를 접촉시키고, 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 제 1 측정 단계;
- (b) 서열번호 1의 SppA 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료 및 상기 항균제를 접촉시키고, 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 제 2 측정 단계; 및
- (c) 제 1 및 제 2 측정 단계의 측정값을 비교하여, 제 2 측정 단계의 측정값이 제 1 측정 단계의 측정값보다 감소조절(down-regulation)될 때, 상기 시료가 병용 투여용 항균제임을 판별하는 단계

를 포함하는, 아스퍼질루스 니둘란스균에 대한 병용 투여용 항균제 스크리닝 방법

#### 청구항 4

아스퍼질루스 니둘란스균에 대한 병용 투여용 항균제 스크리닝 방법으로서,

- (a) 서열번호 2의 *sppA* 유전자를 포함하는 세포에 항균제를 접촉시키고, 상기 유전자의 발현량을 측정하는 제 1 측정 단계;
- (b) 서열번호 2의 *sppA* 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료 및 상기 항균제를 접촉시키고, 상기 유전자의 발현량을 측정하는 제 2 측정 단계; 및
- (c) 제 1 및 제 2 측정 단계의 측정값을 비교하여, 제 2 측정 단계의 측정값이 제 1 측정 단계의 측정값보다 감소조절(down-regulation)될 때, 상기 시료가 병용 투여용 항균제임을 판별하는 단계

를 포함하는, 아스퍼질루스 니둘란스균에 대한 병용 투여용 항균제 스크리닝 방법.

#### 청구항 5

아스퍼질루스 푸미가투스균에 대한 항균제 스크리닝 방법으로서,

- (a) 서열번호 3의 SppA 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 SppA 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 SppA 단백질의 양 또는 활성이 감소조절(down regulation)되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 항균제임 판별하는 단계

를 포함하는, 아스퍼질루스 푸미가투스균에 대한 항균제 스크리닝 방법.

**청구항 6**

아스퍼질루스 푸미가투스균에 대한 항균제 스크리닝 방법으로서,

- (a) 서열번호 4의 *sppA* 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 *sppA* 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 *sppA* 유전자의 발현량이 감소조절(down regulation)되는 것으로 측정될 때, 상기 시료가 항균제임 판별하는 단계

를 포함하는, 아스퍼질루스 푸미가투스균에 대한 항균제 스크리닝 방법.

**청구항 7**

아스퍼질루스 푸미가투스균에 대한 병용 투여용 항균제 스크리닝 방법으로서,

- (a) 서열번호 3의 SppA 단백질을 포함하는 세포에 항균제를 접촉시키고, 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 제 1 측정 단계;
- (b) 서열번호 3의 SppA 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료 및 상기 항균제를 접촉시키고, 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 제 2 측정 단계; 및
- (c) 제 1 및 제 2 측정 단계의 측정값을 비교하여, 제 2 측정 단계의 측정값이 제 1 측정 단계의 측정값보다 감소조절(down-regulation)될 때, 상기 시료가 병용 투여용 항균제임을 판별하는 단계

를 포함하는, 아스퍼질루스 푸미가투스균에 대한 병용 투여용 항균제 스크리닝 방법

**청구항 8**

아스퍼질루스 푸미가투스균에 대한 병용 투여용 항균제 스크리닝 방법으로서,

- (a) 서열번호 4의 *sppA* 유전자를 포함하는 세포에 항균제를 접촉시키고, 상기 유전자의 발현량을 측정하는 제 1 측정 단계;
- (b) 서열번호 4의 *sppA* 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료 및 상기 항균제를 접촉시키고, 상기 유전자의 발현량을 측정하는 제 2 측정 단계; 및
- (c) 제 1 및 제 2 측정 단계의 측정값을 비교하여, 제 2 측정 단계의 측정값이 제 1 측정 단계의 측정값보다 감소조절(down-regulation)될 때, 상기 시료가 병용 투여용 항균제임을 판별하는 단계

를 포함하는, 아스퍼질루스 푸미가투스균에 대한 병용 투여용 항균제 스크리닝 방법.

**청구항 9**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 국균증 또는 아스퍼질루스증 치료를 위한 유전자 *sppA* 및 SppA의 용도에 관한 것이다.

[0001]

**배경 기술**

- [0002] 아스퍼질러스속(*Aspergillus*)은 사람에게서 폐기도 국균증(*aspergillosis*), 천식, 국균종(*aspergilloma*) 및 면역성이 약화된 환자에서 침습성 질환을 일으키는 것으로 알려진 병원성 진균을 포함한다(Bardana, E. J. Jr. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 13:21, 1981). 특히 국균종은 사람에게서 2번째로 발생 빈도가 높은 진균 감염증으로, 만성 폐 질환을 앓고 있는 환자의 호흡기에서 유발되는 낭포성 섬유증(*cystic fibrosis*)이 생긴 부위에 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)가 많이 발견된다(Laufer, p., et al., J. Allergy Clin. Immunol. 73:44, 1984; Salavin, R. G. et al., J. Allergy Clin. Immunol., 81 :718, 1988).
- [0003] 아스퍼질러스 니들란스 (*Aspergillus nidulans*)는 유전학을 이용한 연구체계가 잘 정립된 사상성 균종으로서, 세포 주기, 발달, 2차 대사산물 생성 등과 같은 기초 진균학 연구에 널리 이용되어 왔다. 비록 *A. nidulans*로 인한 인체 감염 사례는 드물게 보고되지만, 이 균종은 인체 병원성 균종인 아스퍼질러스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*)와 유전학적으로 밀접한 연관성을 지닌다. 침습성 아스퍼질러스 감염 (*invasive aspergillosis, IA*)은 면역력이 저하된 환자들에게 치명적인 주요 진균 감염들 중 하나이고, 아스퍼질러스 푸미가투스 (*Aspergillus fumigatus*)는 90% 이상의 침습성 아스퍼질러스 감염 발생 건의 주요 원인균이다.
- [0004] 상기 아스퍼질러스 속(*genus*)에 속하는 종들은 부생성의 (*saprophytic*) 진균들로서, 주요 생태학적 서식지로는 토양 및 퇴비와 같은 부식성 유기물질들이 있는데 이러한 환경들은 대개 저산소 환경 (*hypoxia*) 이라고 알려져 있다. 저산소 환경은 인체 병원성 균종인 *Aspergillus fumigatus*가 숙주 내에서 접하게 되는 주요 환경들 중 하나이다. 따라서 *Aspergillus* 균종들은 진화를 통해 저산소 적응에 요구되는 복잡한 메카니즘을 개발시켜 왔다.
- [0005] 한편, 지질 제어요소 결합단백질 (SREBP)은 분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe*와 인체 병원성 균종인 *Cryptococcus neoformans*를 포함하여 진균의 저산소 적응에 필수적인 요소로 보고되어 왔다. 상기 SREBP 시퀀스에는 특징적으로 *arginine* 잔기가 *tyrosine*으로 전환되어 있는 *basic helix-loop-helix (bHLH)* 도메인이 포함되어 있다. 포유류에서 SREBP는 소포체 막에 존재하여 SREBP 절단 활성화 단백질 (SREBP cleavage activating protein, SCAP)의 도움으로 골지체로 이동하게 된다. 이후 SREBP들은 *site-1 (S1P)* 및 *site-2 (S2P)* 단백질 분해효소들 (프로티아제, *protease*)에 의해 절단되어 N-말단 시퀀스 형태로 골지체로부터 떨어져 나와 핵으로 이동한다.
- [0006] SREBP의 절단 과정은 포유류에서 뿐만 아니라 진균의 SREBP 활성화에도 필수적이다. 저산소 환경에서 *C. neoformans*와 *S. pombe*의 SREBP들은 서로 다른 메카니즘을 통해 절단된다. *C. neoformans*의 SREBP인 *Sre1*는 포유류의 S2P의 상동체인 *Stp1*에 의해 절단된다. 이와는 달리, *S. pombe*의 SREBP인 *Sre1*는 여러 *Dsc* 단백질로 구성되어 있는 *Dsc E3* 유비퀴틴 결합효소 복합체 (*ubiquitin ligase complex*)와 연관된 단백질 분해과정 (*proteolysis*)을 통해 절단된다. *Dsc1*은 발아효모인 *Saccharomyces cerevisiae*에서 골지에 존재하는 유비퀴틴 E3 결합효소인 *Tul1*의 상동체이고, *Dsc2*는 소포체 관련 분해과정 (*ER-associated degradation, ERAD*)에 중요한 *Der1* 단백질들과 유사하다. 이는 골지에 존재하는 *Dsc E3* 결합효소 복합체가 ERAD에 관여하는 소포체의 E3 결합효소 시스템과 유사함을 나타낸다. 주목할 만한 점은, 아스퍼질러스 균종들에서 SCAP 또는 S1P/S2P에 대한 상동 유전자들이 발견되지 않는다는 것이다. *A. fumigatus*의 SREBP인 *SrbA*는 저산소 이외에도 정상적인 산소 농도 하에서 지속적으로 절단되는 것으로 보이고, 이 절단과정에는 *S. pombe*에서처럼 *Dsc* 복합체의 역할이 필수적인 것으로 나타났다. SREBP의 절단 과정이 해당 단백질의 기능에 직결되어 있음에도 불구하고, 진균에서 어떻게 SREBP들이 절단되는가에 대한 연구는 미비한 실정이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0007] 이에 본 발명은 아스퍼질러스의 *SrbA*의 활성화에 기여하는 신규 유전자 *sppA*(*signal peptide peptidase*) 및 이의 단백질 *SppA*의 용도를 제공하여, 항진균제 또는 국균증 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 데 목적이 있다.
- [0008] 또한, 본 발명은 기존의 항진균제 또는 국균증 치료제와 병용투여시 상승효과를 가질 수 있는 항진균제 또는 국균증 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 데 목적이 있다.
- [0009] 또한, 본 발명은 신규한 *SppA* 단백질 및 이를 코딩하는 *sppA* 유전자를 억제하여 항진균 또는 국균증 치료 효과가 있는 약학조성물을 제공하는 데 목적이 있다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아스퍼질러스의 *SrbA*의 활성화에 기여하는 신규 유전자 *sppA*(signal peptide peptidase) 및 이의 단백질 SppA의 용도를 제공하여, 항진균제 또는 국균증 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현에로서, 상기 항진균제 또는 국균증 치료제는 기존의 항진균제 또는 국균증 치료제와 병용투여시 상승효과를 가질 수 있는 것으로 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 신규한 SppA 단백질 및 이를 코딩하는 *sppA* 유전자를 억제하여 항진균 또는 국균증 치료 효과가 있는 약학조성물을 제공한다.

**발명의 효과**

[0014] 본 발명은 본 발명은 국균증 또는 아스퍼질루스증 치료를 위한 유전자 *sppA* 및 단백질 SppA의 용도를 밝혀내어, 아스퍼질러스의 *SrbA*의 활성화에 기여하는 신규 유전자 *sppA*(signal peptide peptidase) 및 이의 단백질 SppA(signal peptide peptidase)의 용도를 제공하거나, 항진균제 또는 국균증 치료제를 스크리닝하는 방법 및 항진균 또는 국균증 치료 효과가 있는 약학조성물을 제공할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0015] 도 1은 UV 돌연변이 유도방식을 이용하여 생성된 저산소에 민감한 돌연변이들을 선별한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 *A. nidulans*의 *srbA*와 *dscA-D* 제거 돌연변이의 제작과정 및 검증 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 *A. nidulans*의 *sppA* 제거돌연변이의 제작과정 및 검증 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 *SrbA*와 *Dsc* 복합체가 *A. nidulans*의 저산소 적응에 필수적인지 여부를 실험한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 *sppA*가 *A. nidulans*의 저산소 적응에 필수적인지를 실험한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 SppA의 세포 내 분포를 살피기 위하여 SppA의 C-말단 시퀀스에 황색형광단백질을 결합시켜 실험한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7 및 도 8은 Dsc 복합체 또는 SppA와 손상과 *SrbA*의 세포내 분포 사이의 상관관계를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 9는 SppA가 *SrbA*와 세포 내에서 직접적으로 결합하는지의 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 Aspergillus 종들의 *SrbA* 단백질에 존재하는 transmembrane (TM) 도메인을 나타낸 것이다.
- 도 11은 Flag 항체를 이용한 immunoblot 분석을 통해 정상산소 농도와 저산소 농도에서의 *SrbA*의 절단을 실험한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 12는 3xFlag epitope을 가진 *SrbA* 단백질 발현 균주들의 제조과정 및 검증 결과를 나타낸 것이다.
- 도 13은 *SrbA*의 Dsc 복합체 관련 proteolysis 및 SppA에 의해 순차적 절단여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 14는 *dscA* 와 *sppA* 이중 제거 돌연변이에서 *SrbA* 단백질의 절단여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 15는 *A. nidulans*와 *A. fumigatus*에서 SppA 와 *SrbA* 상동유전자들이 유사한 생물학적 기능을 갖는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 16은 1% 산소조건에서 *A. fumigatus sppA* 제거돌연변이( $\Delta Af sppA$ )의 성장을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0016] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시료"는 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 양 또는 활성화에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다.

[0017] 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포

함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0019] 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RTPCR(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), 노던 블롯팅(Peter B. Kaufma et al., Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine, 102-108,CRCpress), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)) 또는 인 시투(in situ) 혼성화 반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))을 이용하여 실시할 수 있다.
- [0021] 단백질의 양의 변화는 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 Enzyme Immunoassay, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., Enzymelinked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, Using Antibodies:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C<sup>14</sup>, I<sup>125</sup>, P<sup>32</sup> 및 S<sup>35</sup>)로 표지된 단백질-특히 항체가 이용될 수 있다. 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 일차항체 및 상기 일차항체에 결합되는 이차항체를 이용하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β-갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시 퍼라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), TMB(3,3,5,5-tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 및 o-페닐렌디아민(OPD)과 같은 기질이 이용될 수 있다. 상기 ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시퍼라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약제학적 조성물은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 항진균용 의약 조성물 또는 항진균 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 항진균용 의약 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, MackPublishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁액, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물 을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에 있어서, 그 대상은 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명의 "항진균제"는 세균 및/또는 곰팡이류의 번식을 억제하는 것으로, 무기계 항균제, 유기계 천연물 추출계 항균제, 유기계 지방족 화합물 항균제 및 유기계 방향족 화합물 항균제를 포함한다. 또한, 이에 한정되지 않지만, 무기계 항균제로서는, 차아염소 나트륨으로 대표되는 염소 화합물 과산화 수소로 대표되는 과산화물 붕산, 붕산 나트륨으로 대표되는 붕산 화합물 황산동으로 대표되는 동화합물 황산 아연, 염화 아연으로 대표되는 아연 화합물 유황, 다황산 석회, 수화 유황으로 대표되는 유황계물 산화 칼슘으로 대표되는 칼슘 화합물 티오솔파이트 은착염, 질산은으로 대표되는 은화합물 그 밖에, 옥소(沃素), 실리코플루오리드 나트륨 등을 들 수 있고, 유기계 천연물 추출계 항균제로서는, 히노키티올, 맹종죽(孟宗竹) 추출액, 크레오스트유(油) 등을 들 수 있다.

[0030] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 실시예는 하기와 같은 조건 및 방법으로 수행되었다.

[0034] **균주 및 배양조건**

[0035] 본 연구에 사용된 균주들은 하기의 표 1, 표 2 및 표 3에 나타내었다. *A. nidulans* 및 *A. fumigatus*를 배양하는데 적절한 보충제를 갖춘 최소배지 (MM) 및 완전배지 (CM)를 사용하였고(PONTECORVO G, ROPER JA, HEMMONS LM, MACDONALD KD, BUFTON AW. Adv Genet. 1953;5:141), 필요한 경우 배지에 적절한 보충제 아테닌, 히스티딘, 류신, 우라실 및 라이신 염산염을 첨가하였다.

[0036] 달리 언급하지 않는 한 본 연구에서 사용한 *Aspergillus* 균주는 37°C에서 증식한 것이다. *A. nidulans alcA*의 프로모터에 의해 조절되는 유전자 발현을 유도하기 위하여, 0.1 % 글루코스, 1 % 글리세롤, 1 % 트레오닌을 함유하는 최소 배지에서 진균 균주들을 배양 하였다.

[0037] 저산소 조건의 경우, 42" 고분자 저산소 챔버를 사용하였고, 37°C에서 가스 혼합기로 제어된 1% O<sub>2</sub> 및 99 % N<sub>2</sub>의 조건을 유지하였다.  $\Delta AfspA$  성장은 동일한 챔버를 사용하여 저산소 조건 0.3 % 및 1 % O<sub>2</sub>에서 모두 확인하였다.

[0038] 면역 분석을 수행하기 위하여, 곰팡이 균주는 액체 최소배지에서 대기 (21% O<sub>2</sub>) 중에서 250 rpm으로 37°C, 18 시간 동안 배양하였다. 정상산소 그리고 저산소 샘플은 액체배양으로부터 균사체를 수확하여 고체 최소배지에 옮겨 추가로 10, 30 또는 60 분 동안 정상산소 또는 저산소 배양하였다. 면역 분석을 위해 단백질 추출에 사용된 균사체는 고체 최소배지로부터 직접 수집하였다.

**표 1**

[0039]

이름	유전정보	출처
<i>A. nidulans</i>		
<i>srbA</i> (1-n); $\Delta dscD$	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; $\Delta dscD::argB$ ; <i>chaA1</i> ; <i>niaA</i> (p) <i>srbA</i> (1-n) (n= amino acid locations at 339, 381, and 414)	본 연구
<i>srbA</i> (1-n); $\Delta sppA$	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; $\Delta sppA::argB$ ; <i>chaA1</i> ; <i>niaA</i> (p) <i>srbA</i> (1-n) (n = amino acid locations at 339, 381, and 414)	본 연구
SrbA <sub>390</sub> :Flag	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; $\Delta srbA::argB$ ; <i>srbA</i> <sub>390</sub> : 3xFlag; <i>chaA1</i>	본 연구
SrbA <sub>390</sub> :Flag; $\Delta dscA$	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>srbA</i> <sub>390</sub> :3xFlag; <i>chaA1</i> ; <i>dscA::argB</i>	본 연구
SrbA <sub>390</sub> :Flag; $\Delta sppA$	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; $\Delta sppA::argB$ ; <i>srbA</i> <sub>390</sub> :3xFlag	본 연구
$\Delta dscA$ ; $\Delta sppA$	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>sppA::argB</i> ; <i>srbA</i> <sub>260</sub> :3xFlag; <i>dscA::pyroA</i>	본 연구
SppA:YFP	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>chaA1</i> ; $\Delta sppA::argB$ ; <i>alcA</i> (p): <i>sppA</i> :3xyfp; <i>pyroA</i> ; <i>alcA</i> (p): <i>rfp</i> :H2A: <i>pabaA</i>	본 연구
YFP:SrbA; $\Delta srbA$	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>srbA</i> (p):4xyfp: <i>srbA</i> : <i>pyroA</i> ; <i>chaA1</i> ; <i>alcA</i> (p): <i>rfp</i> :H2A: <i>pabaA</i> ; $\Delta srbA::argB$	본 연구

YFP:SrbA; Δ <i>sppA</i>	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>srbA</i> (p):4xyfp: <i>srbA</i> : <i>pyroA</i> ; <i>chaA1</i> ; <i>alcA</i> (p): <i>rfp</i> : <i>H2A</i> : <i>pabaA</i> ; Δ <i>sppA</i> :: <i>argB</i>	본 연구
YFP:SrbA; Δ <i>dscB</i>	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>srbA</i> (p):4xyfp: <i>srbA</i> : <i>pyroA</i> ; <i>chaA1</i> ; Δ <i>dscB</i> :: <i>argB</i>	본 연구
YFP-N:SrbA + SppA:YFP-C	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; <i>alcA</i> (p): <i>yfp</i> -N: <i>srbA</i> : <i>argB</i> ; <i>chaA1</i> ; <i>alcA</i> (p): <i>rfp</i> : <i>H2A</i> : <i>pabaA</i> ; <i>alcA</i> (p): <i>sppA</i> : <i>yfp</i> -C: <i>pyroA</i>	본 연구
AfSrbA; Δ <i>srbA</i>	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>srbA</i> :: <i>argB</i> ; <i>chaA1</i> ; <i>AfsrbA</i> (p): <i>AfsrbA</i>	본 연구
AfSppA; Δ <i>sppA</i>	<i>pabaA1</i> ; <i>argB2</i> ; <i>pyroA4</i> ; Δ <i>sppA</i> :: <i>argB</i> ; <i>chaA1</i> ; <i>AfsppA</i> (p): <i>AfsppA</i>	본 연구

표 2

[0041]

이름	유전정보	출처
<i>A. fumigatus</i>		
Af293	<i>A. fumigatus</i> wild type	본 연구
A1137	Wild type, <i>pyrG89</i>	본 연구
Δ <i>AfsrbA</i>	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>AfsrbA</i> :: <i>A. fumigatus pyrG</i>	본 연구
Δ <i>AfsppA</i>	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>AfsppA</i> :: <i>A. fumigatus pyrG</i>	본 연구
<i>AfsppA</i> -com	<i>pyrG89</i> ; Δ <i>AfsppA</i> :: <i>pyrG</i> ; <i>AfsppA</i> (p): <i>AfsppA</i>	본 연구

표 3

[0043]

이름	유전정보	출처
<i>S. pombe</i>		
ED668	Wild type. h+/h+; <i>ade6</i> -M216/ <i>ade6</i> -M216; <i>ura4</i> -D18/ <i>ura4</i> -D18; <i>leu1</i> -32/ <i>leu1</i> -32	Bioneer.BG _000H8
Δ <i>sre1</i>	Δ <i>sre1</i> :: <i>kanMX4</i> ; h+; <i>ade6</i> -M216; <i>ura4</i> -D18; <i>leu1</i> -32	Sungshin University
Δ <i>dsc1</i>	Δ <i>dsc1</i> :: <i>kanMX4</i> ; h+; <i>ade6</i> -M216; <i>ura4</i> -D18; <i>leu1</i> -32	Bioneer.BG _H1834
Δ <i>spp1</i>	Δ <i>spp1</i> :: <i>kanMX4</i> ; h+; <i>ade6</i> -M216; <i>ura4</i> -D18; <i>leu1</i> -32	Bioneer.BG _H2363

[0045]

서던 블롯 및 노던 블롯

[0046]

서던 블롯을 위해 gDNA를 제한 효소로 18시간 동안 반응시킨 후 0.8% 아가로스 젤로 분리하였고 모세관 현상을 이용하여 아가로스 젤 상의 DNA를 8시간 동안 0.4N NaOH 용액과 함께 Hybond-N+ membrane (Amersham BioScience, USA)으로 이동시켰다. Membrane의 DNA는 UV stratalinker (stratagene Inc., USA)를 사용하여 cross-link 시켰다. Membrane은 Church buffer에서 Random Primer Labelling kit(version 2, Takara BIO Inc., Kyoto, Japan)를 사용하여 만들어진 [ $\alpha$ -32P]-dNTP 표지자(probe)와 함께 65°C에서 하루 동안 혼성화 반응을 시켰다. Membrane은 65°C에서 wash buffer1(0.2% SDS, 2 x SSC)와 wash buffer2(0.2% SDS, 0.1 x SSC)로 두 번 세척하였고 DNA에 부착된 RI 감지 신호는 -70°C에서 X-ray 필름에 노출 되었다.

[0047]

노던 블롯을 위하여 전체 RNA를 TRIzol (Invitrogen, USA) 시약을 사용하여 균사체로부터 분리하였다. mycelia는 회수 후 냉동시켜 액체질소를 이용해 파쇄한 후 TRIzol 1 ml과 혼합하였다. 상온에서 15분 반응시킨 후 샘플에 chloroform을 0.2 ml 더하여 30분 반응시켰다. RNA는 4°C에서 15분간 11,600 rpm으로 원심분리하여 분리하였고 isopropyl alcohol 0.5ml을 사용하여 침전시켰다.

[0048]

상온에서 5시간 배양 후 샘플은 원심분리기로 분리하고 pellet(침전물)은 500  $\mu$ l DEPC (diethylpyrocarbonate) 처리된 증류수와 25:24:1로 혼합된 phenol:chloroform: isoamyl alcohol 혼합액으로 섞어 주었다. 원심분리 후, 상층액은 새 마이크로원심분리 튜브(microcentrifuge tube)로 옮겨 담고 RNA는 차가운 에탄올로 침전시켰다. 침전물은 원심분리를 통해 모은 후 건조시키고 DEPC 처리된 증류수로 추출하였다. 총 RNA는 65도에 서 10분간 반응시킨 후 0.8% formaldehyde가 든 젤에서 분리하였다. RNA는 20X SSC 버퍼를 이용하여 Hybond-N+

멤브레인으로 밤새 (overnight) 이동시켰다. 서던 분석 (southern analysis)은 혼성화(hybridization), 탐침자 (probe) 준비, 표식(labeling), 세척(washing), 그리고 신호 검출 과정을 통해 이뤄졌다.

[0050] **이트라코나졸(itraconazole) 항진균제 검사**

[0051] 최소배지(MM)에서 배양된 균주의 포자는 수확하여 혈구 계산기 (hemocytometer)를 이용하여 수를 확인한 후 5,000개의 포자가 포함된 5  $\mu$ l의 현탁액을 DMSO (Sigma사 제품번호 #154938)와 0.01  $\mu$ g/ml의 이트라코나졸 (itraconazole, Sigma사 제품번호 #19957)이 든 최소배지에 떨어트렸다. 균주들은 37도에서 3일간 배양하여 이트라코나졸(itraconazole) 민감성을 확인하였다.

[0053] **면역블롯 분석**

[0054] 총 단백질은 동결 후 분쇄하여 프로테아제 억제 혼합물 (protease inhibitor cocktail, Thermo Scientific사, USA)과 2 mM PMSF (Thermo Scientific사, USA)가 포함된 TNE 버퍼 (50mM Tris-HCl(pH7.4), 0.5 M NaCl, 1% Triton-X 100, 그리고 1 mM EDTA)를 사용하여 분리하였다.

[0055] 분리된 단백질은 Pierce 600 nm 단백질 분석 키트를 이용하여 정량하였고, 이 중 30  $\mu$ g의 단백질을 SDS-PAGE 겔에 로딩 (loading) 하였다. 블롯(blot)은 나이트로셀룰로오스(nitrocellulose) 혹은 피브이디에프 멤브레인 (PVDF, Whatman, GE Healthcare Biosciences 사, USA)으로 옮긴 후 TTBS 버퍼(20mM Tris, 150mM NaCl, 0.05% Tween-20, 0.02% Na<sub>3</sub>)에 5% 스킴밀크(Skim milk)가 든 현탁액으로 고정하였다.

[0056] 블롯은 쥐에서 추출된 Flag M2 단일클론 항체 (Sigma-Aldrich사, 제품번호 #F3165, USA)와 토끼에서 분리된 HRP 결합 다클론성 항체 (Abcam사, 제품번호 # Ab6728, USA)를 사용하여 검출하였다. 화학루미네센스 (Chemiluminescence)는 super signal west pico chemiluminescence substrate (Thermo Scientific 사, USA)로 처리 후 Fuji medical 엑스레이 필름에 검출하였다.

[0058] **실시예 1. Forward genetics를 이용한 저산소 민감 돌연변이들의 선별**

[0059] *A. nidulans*에서 저산소 적응에 필요한 유전자들을 선별하기 위해 자외선을 이용하여 돌연변이들을 만드는 forward genetics 방법을 도입하였다.

[0060] *A. nidulans* A773(FGSC strain)의 약 100개 분생포자를 K-나트륨 완충액 5 ml에 녹여서  $1.8 \text{ W (cm}^2 \times 100)^{-1}$  UV를 2분 동안 조사하였다. 현탁액은 Na-deoxycholate가 포함된 완전배지에 퍼주어 정상산소에서 2 일 동안 배양하였다.

[0061] 상기 배양으로 얻어진 콜로니들을 replica를 이용하여 복제하였고, 이를 저산소 조건에서 배양하였다. 저산소에서 성장하지 않은 균주들은 추가 실험을 위해 선별되었다. 저산소에서 자라지 못하는 균주의 돌연변이 부위를 결정하기 위하여, *A. nidulans*의 gDNA 라이브러리를 이용해 돌연변이들의 저산소 성장 보환을 검사하였다.

[0062] 플라스미드에 포함된 gDNA 단편은 유니버설 프라이머 PUCH 및 PUCR로 배열 순서를 밝혔다. gDNA를 단편으로부터 드러난 ORF는 UV 돌연변이에 클로닝한 후 염기 서열 분석에 의해 돌연변이 부위를 결정하여 도 1에 나타내었다.

[0063] 도 1에 나타난 바와 같이, *A. nidulans*의 A773를 대상으로 저산소 민감 돌연변이들 (HUV)이 자외선 돌연변이 유도방식(UV-mutagenesis)에 의해 생성되었으며. 정상적인 산소 농도 (21% 산소)에서는 정상적으로 성장하나 저산소 (1% 산소 및 99% 질소)에서는 성장하지 못하는 15개의 돌연변이들이 선별되었다.

[0064] 저산소 민감성을 나타내는 것으로 선별된 5개의 돌연변이들은 *A. fumigatus*의 *srbA* 상동유전자인 ANID\_07661의 ORF 시퀀스에 point mutation을 포함하고 있었다. 상기 5개 중 4개의 균주들은 108, 113, 307, 319번째 아미노산에 nonsense mutation을, 나머지 한 개는 bHLH 도메인 상의 172번째 아미노산에 missense mutation을 나타냈다. BLASTp 검색 결과 ANID\_07661은 *A. fumigatus*의 *SrbA* 시퀀스와 68%의 일치성 및 79% 유사성을 가진 것으로 나타났다. 이에 ANID\_07661은 *A. nidulans*의 *SrbA*로 명명하였다.

[0065] 미국 브로드 연구소 데이터 베이스(Broad Institute Database)에 따르면 *A. nidulans* *srbA* 의 게놈 DNA (gDNA)는 3,048개의 염기서열로 구성되어 있고, 263에서 346번째 뉴클레오타이드에 하나의 intron을 가지고 있으며 그 결과 987개의 아미노산으로 구성된 단백질을 번역한다. 그러나 *A. nidulans*의 야생주 (wild type)인 A4 균주를 이용하여 실시한 cDNA 분석에 따르면 *SrbA*는 intron을 가지고 있지 않고 1,015개의 아미노산으로 구성되어 있다. 이는 기존에 GenBank에 보고된 시퀀스와도 일치하는 것이다. *SrbA*는 또한 일반적인 bHLH 전사인자와 SREBP를 차별화하는 bHLH 도메인 상의 arginine --> tyrosine 로의 특징적인 변환을 포함한다

[0066] 표 1에 나타낸 6개의 저산소 민감 돌연변이들은 ANID\_01075, ANID\_12299, ANID\_10241, ANID\_10363, 그리고 ANID\_00770의 ORF 시퀀스 상에 point mutation들을 나타냈고, BLAST 검색을 통해 이러한 유전자들이 *A. fumigatus*의 dscA-E와 분열효모인 *Schizosaccharomyces pombe* 에서 Dsc E3 결합효소 복합체 (ligase complex) 를 구성하는 dsc1-5의 상동유전자임을 알아냈다. 따라서 이러한 유전자들을 *A. nidulans*의 dscA-E라고 명명하였다. 나머지 4개의 돌연변이들은 ANID\_08681의 ORF sequence에 point mutation을 가지고 있었고, ANID\_08681의 기능에 대한 연구는 *Aspergillus* 균종들에서 보고된 바가 없다.

[0068] **실시예 2. 분자적 클로닝을 통한 제거 돌연변이들의 생성**

[0069] *A. nidulans*에서 SrbA와 Dsc 복합체의 저산소 적응 관련 기능을 알아보기 위해 *srbA*와 *dscA-D*의 제거 돌연변이들 ( $\Delta srbA$ 와  $\Delta dscA-D$ )을 생성하였다.

[0070] 분자적 클로닝에 사용되는 플라스미드는 하기의 표 4에 나타내었다. 제거 돌연변이의 생성은 목표 유전자의 ORF를 *A. nidulans* *argB* 또는 *pyroA*로 대체하여 이루어졌다. *A. fumigatus*의 제거 돌연변이를 생성하기 위해 표적 유전자를 *A. fumigatus* *pyrG*로 대체하였다. 삭제 구조체는 double joint PCR 방법을 사용하여 생성하고, 야생주 또는 적합한 균주에 형질 전환하였다. 형질전환체는 보조제로서 아르기닌, 피리독신 또는 우라실/유리딘이 없는 최소배지에서 선별하고, 올바른 대립 유전자 교환은 PCR 및 Southern 분석에 의해 확인하였다.

[0071]  $\Delta srbA$ ,  $\Delta dscA-D$  및  $\Delta sppA$ 에 대한 재구성 균주 생성은 목표 유전자를 플라스미드 pNQ-pyroA에서 아질산환원효소를 인코딩하는 *A. nidulans* *niaA*의 프로모터를 사용하여 제거 돌연변이에서 발현시켰다. *niaA* 프로모터에 의해 제어되는 유전자 발현은 배지에 0.06% NaNO<sub>3</sub>의 첨가로 유도 및 0.02% 주석산 암모니아의 첨가로 억제된다. *AfsppA* 재구성 균주는  $\Delta AfsppA$ 에서 네이티브 프로모터 및 전사종결신호로 *AfsppA*의 발현에 의해 생성되었다.

[0072] SrbA에 3xFlag epitope를 결합시키기 위하여 *A.nidulans* 야생주의 gDNA로부터 *srbA* DNA를 부분적으로 증폭하였다. 증폭된 3개의 PCR product 들은(*srbA* ORF로부터 앞쪽의 900bp, 3xFlag, *srbA* ORF 뒤쪽으로 900bp를 포함한 나머지) double-joint PCR에 의해 연결되어졌다. 최종 PCR 산물은  $\Delta srbA$  균주에 형질전환 하였고, 저산소 조건에서  $\Delta srbA$ 의 성장 결핍을 보완하는 형질 전환체들을 선별하였다(1% O<sub>2</sub>, 99% N<sub>2</sub>).

[0073] SppA의 세포 내 위치 연구를 위해 3개의 반복된 YFP를 SppA의 C-말단 부위에 결합시켰다. SppA-YFP 혼합 단백질은 SppA 고유의 promoter를 통해 발현되었다. SppA와 SrbA의 상호결합은 BiFC 기술을 통해 확인하였다. *A. nidulans*의 *SrbA* ORF와, YFP의 N-말단쪽 단편의 반은 PCR을 통해 *A. nidulans*의 gDNA와 플라스미드 pDV7로부터 증폭되었다. 이 두 PCR 생성물들은 플라스미드 pQa-argB에 삽입되었다. YFP fusion Protein에 상호 결합하는 partner를 제작하기 위하여 *alcA* promoter(*alcA*(p))와 *sppA* ORF, YFP의 C-말단쪽 단편의 반은 PCR을 통해 *A. nidulans*의 gDNA와 플라스미드 pDV8로부터 증폭되었다. 이 두 PCR 생성물들은 플라스미드 pQa-pyroA에 삽입되었다. 핵 위치 지표로서 *A. nidulans*의 히스톤 H2A(AN3468) 단백질을 사용하였고 N-말단 부위에 RFP를 결합시켰다. H2A와 RFP DNA 단편은 *A. nidulans*의 gDNA와 플라스미드 pMT-mRFP로부터 PCR로 각각 증폭되었다. 만들어진 RFP:H2A fusion 단백질은 앞에 설명한 바와 같이 *alcA*(p)를 사용하여 발현되었다.

[0074] 도 2 및 도 3에서 나타낸 바와 같이, 해당 유전자들은 *A. nidulans*의 *argB* 유전자로 대체되었고, 유전자의 제거는 Southern 분석을 통해 검증하였다.

[0075] 도 2A에서 나타낸 바와 같이, 서던 분석을 통해 *srbA*가 제거됨을 알 수 있었고, 절단된 DNA는 1% 아가로즈 겔에서 분리되었으며(서던 이미지의 왼쪽), 각 균주는 예상되는 크기의 밴드를 나타내었다. 또한, 도 2B에서 나타낸 바와 같이, 서던 분석을 통해 *dscA-D*가 제거됨을 알 수 있었고, 각 균주는 예상되는 크기의 밴드를 나타내었다.

[0076] 한편, 서던 분석을 위해 사용된 제한효소와 예상되는 밴드의 크기들은 표에 요약하였고, 서던 분석의 probe로 유전자의 ATG로부터 앞쪽에 약 1Kb의 비번역 부위(UTR) 서열을 사용하였다.

[0077] 도 3에서 나타낸 바와 같이, 서던 분석을 통해 *sppA*가 제거됨을 알 수 있었고, 각 균주는 예상되는 크기의 밴드를 나타내었다.

**표 4**

플라스미드	설명	출처
pNQ-pyroA	<i>f1 ori</i> , <i>ColE1 ori</i> , <i>amp<sup>r</sup></i> , <i>niaA</i> (p), <i>pyroA</i> , <i>pyroA</i> (p), <i>N. crassa qa-4</i> (t)	본 연구
pRG3-AMA1	<i>amp<sup>r</sup></i> , <i>ama1</i> , <i>pyrG</i> , <i>adh</i> (p), pUC19	Osherov and May, 2000

pDV-7	the N-terminal half of YFP	본 연구
pDV-8	the C-terminal half of YFP	본 연구
pQa-argB	<i>alcA(p)</i> , <i>qa-4 (t)</i> , <i>A. nidulans argB</i>	본 연구
pQa-pyroA	<i>alcA(p)</i> , <i>qa-4(t)</i> , <i>A. nidulans pyroA</i>	본 연구
pBS-3xYFP	3xYFP, <i>A. nidulans pyroA</i>	본 연구
pMT-mRFP1	<i>bla</i> , <i>alcA(p)</i> , mRFP, <i>argB</i>	FGSC

**[0082] 실시예 3. *SrbA*와 *Dsc* 복합체가 *A. nidulans*의 저산소 적응에 필수적인지 여부의 확인**

[0083] 각 균주의 5,000개의 포자를 최소배지에 접종하였고, 정상적인 산소농도 (normoxia, 21% 산소) 또는 저산소 (1% 산소, 99% 질소) 환경, 섭씨 37도에서 4일 동안 배양하였다. 또한, 각 균주로부터 5,000개의 포자를 DMSO를 포함한 최소 배지 (대조군) 또는 항진균제인 itraconazole (최종 농도 0.01 µg/ml) 을 포함한 최소배지에 접종하였고, 37도씨에서 3일간 배양하여 도 4에 나타내었다.

[0084] 도 4에 나타난 바와 같이, Δ*srbA*는 야생주 및 complemented 균주와 비교하여 저산소에서 성장하지 못하였고(도 4A), itraconazole에 대하여 증가된 민감성을 나타내었으며(도 4B), *erg11A(cyp51A)*와 *erg25A*에서의 전사량이 감소하였다(도 4C). 또한, Δ*dscA-D*균주들은 저산소 환경에서 자라지 못하였다.

**[0086] 실시예 4. *SppA*가 *A. nidulans*의 저산소 적응에 필수적인지 여부의 확인**

[0087] 균주의 5,000개의 포자가 최소배지에 접종되었고 정상적인 산소 농도 또는 저산소 환경, 37도씨에서 4일간 배양하였다. 또한, 5,000개의 포자를 DMSO를 포함한 대조군 혹은 itraconazole을 포함한 배지에 (최종 농도 0.01 µg/ml)에 접종되고 37도씨에서 3일간 배양하여 도 5에 나타내었다.

[0088] 도 5A에 나타난 바와 같이, *A. nidulans* ANID\_08681 (*sppA*라고 명명)은 presenilin 유사 도메인 (회색 상자로 표현, 81에서 463번째 아미노산 포함)과 'YD', 'GLGD', 그리고 'PALL' 모티프들을 포함한다. 검은 상자들은 예측된 막관통 도메인 (transmembrane, TM) 들을 나타낸다 (총 9개의 TM이 존재). UV-mutagenesis에 의해 획득한 4개의 저산소 민감 돌연변이들 (HUV3, HUV43, HUV44, 그리고 HUV46)은 *SppA*의 ORF 시퀀스에 돌연변이들을 나타내고, 각 균주에서 돌연변이의 위치를 표시하였다.

[0089] 도 5B는 여러 생물 종들에서의 SPP 시퀀스를 ClustalW2 프로그램을 이용하여 계통 분류한 결과를 나타낸 것이다. 계통 분석 결과는 TreeDyn 198.3 프로그램을 이용하여 나타내었으며, 스케일은 각 site당 변환된 수에 대해 비례하는 branch 길이를 뜻한다.

[0090] 도 5C 및 5D 에서 나타난 바와 같이, *sppA* 제거 돌연변이 (Δ*sppA*)는 Δ*srbA* 및 Δ*dscA-D* 균주들과 유사하게 저산소 환경에서 성장하지 못하였고, 항진균제인 itraconazole에 대해서도 증가된 민감도를 나타내었다.

**[0092] 실시예 5. *SppA*의 세포 내 분포의 확인**

[0093] *SppA*의 세포 내 분포를 살펴보기 위해 *SppA*의 C-말단 시퀀스에 황색형광단백질 (yellow fluorescence protein, YFP)를 결합시켰다. *SppA*:YFP 결합 단백질(fusion protein)은 야생주 (wild type)에서 *sppA* 프로모터를 이용해 발현시켰다. 또한, *SppA*:YFP 결합 단백질을 히스톤 H2A 단백질 (histone H2A)에 적색형광단백질을 결합시킨 단백질 (RFP:H2A)과 한 균주에서 동시에 발현시켰으며, 이를 도 6에 나타내었다.

[0094] 도 6에 나타난 바와 같이, YFP 시그널들은 핵 주변부에서 관찰되었고, 이는 *SppA*가 소포체에 분포함을 나타낸다.

**[0096] 실시예 6. *Dsc* 복합체 또는 *SppA*와 *SrbA*의 세포내 분포 사이의 상관관계 확인**

[0097] *srbA*, *sppA*, 그리고 *dscB*의 제거 돌연변이들에서 YFP:*SrbA*의 결합 단백질의 세포내 분포를 조사하였다. *SrbA*의 N-말단에 황색형광단백질을 결합시킴으로써 *SrbA*의 전구체 (precursor)와 활성화된 핵 단백질 형태 (mature nuclear form) 모두가 관찰될 수 있도록 하여 도 7 및 도 8에 나타내었다. 해당 단백질의 핵 분포를 증명하기 위해 YFP:*SrbA*와 핵 위치 지표인 RFP:H2A를 한 균주에서 발현시켰다.

[0098] 도 7에서 나타난 바와 같이, 저산소 환경에서는 Δ*srbA*에서 발현된 YFP:*SrbA* 시그널은 핵의 위치를 나타내는 RFP:H2A 시그널과 겹친 위치에서 관찰되었으나, Δ*sppA*나 Δ*dscB*에서의 황색형광 시그널은 세포 전반에 걸쳐 불특정한 점들의 형태로 나타났다.

- [0099] 한편, 도 8에서 나타난 바와 같이,  $\Delta srbA$ 에 YFP:SrbA 결합 단백질을 발현시켰을 때에 *srbA*의 저산소 성장 능력이 회복되었으며, 이를 통하여 YFP:SrbA가 정상적인 SrbA로 기능함을 알 수 있었다.
- [0101] **실시예 7. SppA가 SrbA와 세포 내에서 직접적으로 결합하는지의 여부의 확인**
- [0102] SppA가 SrbA의 절단과정에 관여하기 위해 직접적으로 SrbA와 결합하는지의 여부를 분리된 황색형광 단백질 (YFP)을 이용한 이분자 형광상보 시험 (bimolecular fluorescence complementation assay)을 통해 조사하였다. SrbA를 YFP의 N-말단 반쪽 시퀀스(YFP-N)에, SppA를 YFP의 나머지 C-말단 반쪽 시퀀스(SppA:YFP-C)에 결합시킨 후, 두 결합 단백질을 하나의 야생주에서 발현시켜 도 9에 나타내었다.
- [0103] SrbA:YFP-N 또는 SppA:YFP-C가 단독으로 발현된 균주들에서는 황색형광 시그널이 관찰되지 않았다. 하지만, 도 9에 나타난 바와 같이, 두 결합 단백질들이 동시에 발현된 균주에서 황색형광 시그널은 소포체에서 관찰되었고, 이는 SppA가 소포체에서 SrbA와 물리적으로 결합함을 의미한다.
- [0105] **실시예 8. SrbA의 절단 과정 및 저산소에서 촉진여부 확인**
- [0106] 먼저, TM 도메인 검색 결과 SrbA는 415에서 437번째 아미노산에 걸쳐 하나의 TM을 포함하는 것으로 나타났다. 다른 *Aspergillus* 속(genus)에 속하는 균종들에서 SrbA 상동 유전자들은 시퀀스 상으로 매우 유사함에도 불구하고 그들이 가진 TM 도메인의 수는 다르고 이를 도 10에 나타내었다.
- [0107] 예를 들어 *A. nidulans*와 *Neosartorya fischeri*는 하나의 TM 도메인을 가지고 있는 반면, *A. fumigatus*, *A. oryzae*, *A. flavus* 그리고 *A. niger* 균종들은 두 개의 TM 도메인을 가지고 있다. 지금까지 알려진 전형적인 SREBP 구조들은 N-말단과 C-말단이 cytosol을 향해 있는 2개의 TM 도메인을 포함한 형태를 지닌다. 이뿐 아니라 *Aspergillus* 균종들에서 SrbA 상동 단백질들의 시퀀스 비교배열 결과는 *A. nidulans*의 SrbA가 시퀀스 예측 프로그램에서 밝혀진 하나의 TM 도메인 이외에도 382에서 403번째 아미노산 시퀀스에 걸쳐 또 다른 하나의 TM 도메인을 포함하고 있음을 시사한다.
- [0108] *A. nidulans*에서 SREBP의 절단 과정을 조사하기 위해 SrbA의 N-말단과 260번째 아미노산 (bHLH 도메인과 첫 번째 TM 사이에 위치)에 3x Flag epitope를 결합시켜 이를 도 11A에 나타내었다. 그 결과로 생성된 균주들을 각각 N-Flag:SrbA와 SrbA260:Flag로 명명하였으며, 돌연변이 생성을 위한 각 construct들을  $\Delta srbA$ 에 발현시켜 저산소에서 성장할 수 있는 능력을 기준으로 균주들을 선별하였다.
- [0109] N-Flag:SrbA와 SrbA260:Flag 균주들을 이용한 immunoblot 분석. 균주들은 액체 최소배지, 37도씨, 250rpm에서 18시간동안 배양되었고, 배양액에서 수집된 균사체들은 고체 최소배지로 옮겨져 정상적인 산소농도 (normoxia, N) 또는 저산소 (hypoxia, H)에서 10, 30, 그리고 60분간 추가적으로 배양하였다.
- [0110] 정상적인 산소 농도 (normoxia) 또는 저산소 환경 (hypoxia)에서 배양된 3xFlag SrbA를 발현시킨 균주들을 이용하여 면역블롯 (immunoblot) 분석을 실시하여 이를 도 11B 및 11C에 나타내었다. Flag와 결합된 단백질을 발현시키지 않는 야생주에서는 밴드가 검출되지 않았고, 이는 immunoblot에 이용된 Flag 항체가 Flag와 결합된 단백질에 특정적으로 반응함을 검증한다.
- [0111] 도 11B에 나타난 바와 같이, SrbA의 N-말단에 Flag를 결합시킨 균주에서 SrbA 단백질은 약 130kDa 크기의 전체 길이 형태(Full length, SrbA-F)와 약 60kDa 크기의 활성화된 핵분포 형태(SrbA-N)로 관찰되었다.
- [0112] 이와는 다르게 SrbA260:Flag 균주에 관한 결과를 나타낸 도 11C에서는 SrbA-F와 SrbA-N 이외에도 두 개의 다른 형태들이 검출되었다. 하나는 SrbA-F 밴드보다 크기가 약 10 kDa 작은 폴리펩티드이고 (SrbA-F1이라 명명), 나머지 하나는 약 40 kDa 크기의 폴리펩티드였다 (SrbA-N1이라 명명). 이 두 폴리펩티드 형태들이 N-Flag:SrbA 균주에서는 관찰되지 않음을 감안할 때, SrbA의 N-말단에서 가까운 위치에서 또 다른 SrbA의 절단이 일어나는 것으로 보인다. 정상적인 산소 농도와 비교하여 절단된 형태인 SrbA-N과 SrbA-N1의 발현량은 저산소 환경에서 증가하였다. 이는 저산소 환경이 SrbA의 절단과정을 촉진시키기 때문에 일어나는 현상으로 해석된다.
- [0114] **실시예 9. 3xFlag epitope을 가진 SrbA 단백질 발현 확인**
- [0115] 발현된 SrbA:3xFlag가 SrbA의 원래 위치에 존재하는지의 여부는 중합효소반응 (PCR)과 서던 분석을 통해 검증하여 도 12에 나타내었다. PCR에 사용된 프라이머들과 증폭생성물의 크기는 표에 나타내었다. 또한, 야생주, *srbA*, N-Flag: SrbA ('N'), 그리고 SrbA260:Flag ('260') 균주의 genomic DNA는 제한효소 SalI으로 처리하였고, 혼성화에 사용된 DNA 단편은 표에 기술하였다.
- [0116] 도 12에 나타난 바와 같이, 3xFlag와 결합된 SrbA를 포함한 모든 균주들은 저산소 환경에서 정상적으로 성장하

였고, 이는 3xFlag와 결합된 SrbA가 정상적으로 기능하는 단백질임을 나타내는 것이다.

[0118] **실시예 10. SrbA의 Dsc 복합체 관련 proteolysis 및 SppA에 의해 순차적 절단 여부의 확인**

[0119] Dsc 복합체와 SppA가 SrbA의 절단에 관여하는지를 연구하기 위해 SrbA260:Flag를 발현시킨  $\Delta dscA$  및  $\Delta sppA$  균주에서 Flag 항체를 이용, immunoblot 분석을 실시하여 도 13A에 나타내었고, *A. nidulans*의 *srbA*, *sppA*, 그리고 *dscA-D* 제거 돌연변이들 ( $\Delta$ 라고 표기)과 complemented 균주들은 정상적인 산소 농도 또는 저산소 환경, 37도씨에서 2일 동안 배양하여 도 13B에 나타내었으며, 390번째 아미노산에 Flag를 결합시킨 SrbA (SrbA390:Flag)를 발현시킨 야생주,  $\Delta sppA$ ,  $\Delta dscA$ 를 이용하여 immunoblot 분석을 실시하여 도 13C에 나타내었다.

[0120] 도 13A 에서 나타낸 바와 같이, SrbA-N과 SrbA-N1 밴드들은  $\Delta dscA$ 에서 관찰되지 않았으나  $\Delta sppA$ 에서는 관찰되었다. 이는  $\Delta sppA$ 에서 SrbA의 절단이 비정상적으로 일어났음을 뜻하며,  $\Delta dscA$  및  $\Delta sppA$ 에서는 SrbA 전구체의 단백질 분자량은 야생주와 비교하여 차이를 보이지 않았다.

[0121] 도 13B 에서 나타낸 바와 같이,  $\Delta srbA$ 에서 발현된 모든 부분 시퀀스들은  $\Delta srbA$ 의 저산소 성장 능력을 회복시켰으며,  $\Delta dscA-D$ 에서는 SrbA 전체 시퀀스를 제외한 모든 SrbA 부분 시퀀스들의 발현이 해당 균주들의 저산소 성장 능력을 회복시켰다. 또한,  $\Delta dscA-D$ 에서 저산소 성장능력을 회복시킬 수 있었던 SrbA(1-414) 시퀀스가  $\Delta sppA$ 에서 발현되었을 때에는, *sppA*의 저산소 성장 능력을 회복시키지는 않았다. 다만, 저산소 환경에서  $\Delta sppA$ 의 생장은 SrbA(1-339)와 SrbA(1-381)의 발현에 의해 복구되었음을 알 수 있었다.

[0122] 한편, 도 13C는 Dsc 복합체와 SppA가 SrbA의 절단에 관여하는지를 보다 잘 이해하기 위해 추가적인 immunoblot 분석을 실시한 결과이며, 야생주와  $\Delta dscA$ 에서 SrbA-N/N1 밴드들은 관찰되지 않았으나  $\Delta sppA$ 에서는 상기 SrbA-N/N1 밴드들이 관찰되었다.

[0123] 나아가, *dscA* 와 *sppA* 이중 제거 돌연변이에서 SrbA 단백질의 절단여부를 도 14에 나타내었다. SrbA260:Flag 이 발현되는  $\Delta sppA$  내 *dscA*를 *A. nidulans* pyroA로 대체하여 *dscA*;  $\Delta sppA$  이중 제거 돌연변이체를 제작하였다. Immunoblot 분석실험은 야생주와 *dscA*; *sppA* 균주를 대상으로 flag 항체를 이용하여 수행하였다.

[0124] 도 14에 나타낸 바와 같이, 획득한  $\Delta dscA$ ;  $\Delta sppA$  균주에서 SrbA의 절단된 형태들 (SrbA-N 및 SrbA-N1)은 관찰되지 않았고 이는  $\Delta dscA$ 에서와 일치하는 결과이다.

[0125] 실시예 10을 통하여, SrbA가 절단될 때에 SppA에 의한 절단 과정에 앞서 Dsc 복합체와 연관된 proteolysis에 의해 먼저 절단됨을 알 수 있다.

[0127] **실시예 11. *A. nidulans*와 *A. fumigatus*에서 SppA 와 SrbA 상동유전자들이 유사한 생물학적 기능을 갖는지 여부의 확인**

[0128] *srbA*와 *sppA* 상동 유전자가 *A. fumigatus*의 저산소 적응에 필요한지를 연구하기 위해, *A. fumigatus* *srbA*(Afu2g01260, AfsrbA)와 *sppA*(Aru6g02150, Af*sppA*)의 제거 돌연변이들을 제작하였다. 현재 밝혀진 Af*sppA* 염기서열은 다른 *Aspergillus* 종들의 *sppA* 상동 유전자들보다 많이 짧다.

[0129] Broad Institute *Aspergillus* comparative genome 데이터베이스에서 Af*sppA*는 1,297bp의 염기와 314개의 아미노산을 가지는 반면, *A. nidulans* *sppA*는 1,893bp의 염기와 630개의 아미노산으로 이뤄져있다. 다른 *Aspergillus* 종들의 *sppA* 상동 유전자들은 *A. nidulans* *sppA*와 유사한 염기서열 크기를 가진다. 본 실시예에서는 *A. fumigatus* *sppA*와 *A. nidulans* *sppA* 사이의 염기서열을 비교하였고, Af*sppA*가 *A. nidulans* *sppA*에서는 발견되지 않았던 두 개의 intron을 가지고 있는 것을 확인하였다.

[0130] 또한, 현재 알려진 Af*sppA* 유전자의 개시코돈으로부터 대략 600개 아래에 존재하는 비해독 서열이 *A. nidulans* *sppA* ORF의 C-말단 염기서열과 유사함을 확인할 수 있었다. 서열 비교분석을 통해 우리는 Af*sppA*의 개시코돈으로 유력한 부분을 발견하였고 이러한 분석에 따라 Af*sppA*는 1,881bp의 염기서열을 지니는 것으로 예상된다.

[0131]  $\Delta AfsrbA$ 는 정상적인 산소조건에서는 야생주와 동일한 성장을 보이는 반면, 저산소 조건에서는 성장 하지 못했다. 야생주 및 complemented 균주와 비교하여  $\Delta AfsppA$ 는 1% 산소조건에서 성장이 저해되었으며 0.3% 산소조건에서는 완전하게 성장이 억제되었으며, 이를 도 15A 및 도 16에 나타내었다. 도 15A에 나타낸 바와 같이, *A. fumigatus* *sppA* (Af*sppA*)와 *srbA*(AfsrbA)의 제거 돌연변이 균주들은 0.3% 산소 환경에서 자라지 않았다.

[0132] 한편, AfSrbA 단백질의 절단연구는 N-말단에 3xFlag epitope을 가진 세포내 AfSrbA가 발현된 균주를 사용하여 immunoblot 분석을 실시하였고, 이를 도 15B에 나타내었다. 도 15B에 나타낸 바와 같이, AfSrbA는 정상적인 산소 농도에서 전구체 (AfSrbA-F)와 핵에 분포하는 절단된 형태 (AfSrbA-N)로 존재하며, SrbA의 두 형태 모두  $\Delta$

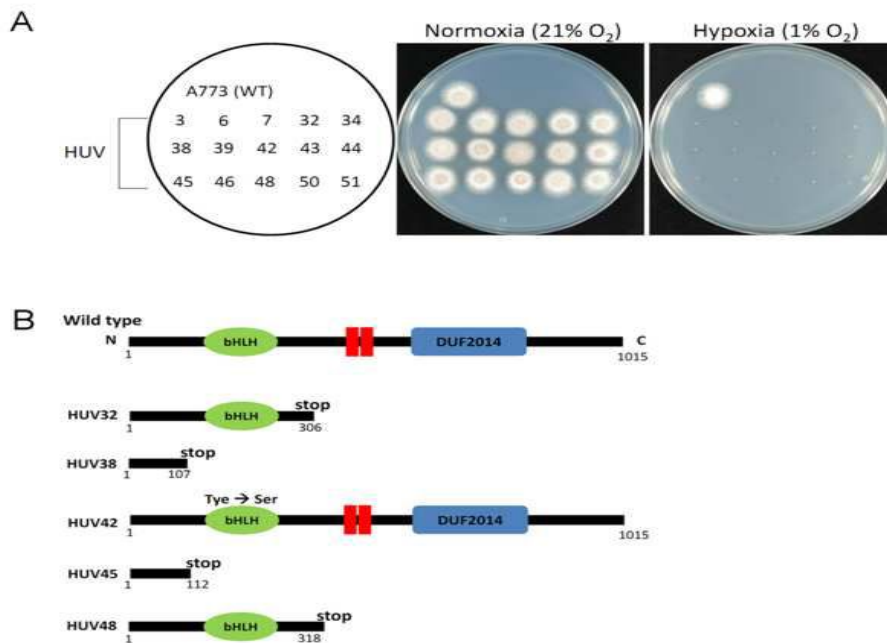
*AfsppA*에서 발견되나, AfSrbA-N 는 증가한 단백질 분자량을 나타내었다.

[0133] 또한, SrbA와 SppA가 *A. nidulans*와 *A. fumigatus* 사이에서 생물학적 기능이 잘 보존되어 있는지를 확인하고자 우리는 종간 회복 분석 (cross-species complementation assay)을 수행하였다. *Afsrba*와 *AfsppA* DNA 단편을 *A. fumigatus* 야생주인 Af293의 genomic DNA에서 PCR을 이용하여 증폭하였고, *Afsrba*와 *AfsppA*의 프로모터와 터미네이터를 이용하여 *A. nidulans*  $\Delta$ *srbA*와  $\Delta$ *sppA*에서 발현시켰으며, 해당 균주들을 최소배지에 접종하여 37도에 서 정상적인 산소 조건 또는 저산소 조건시 성장을 확인하여 도 15C에 나타내었다.

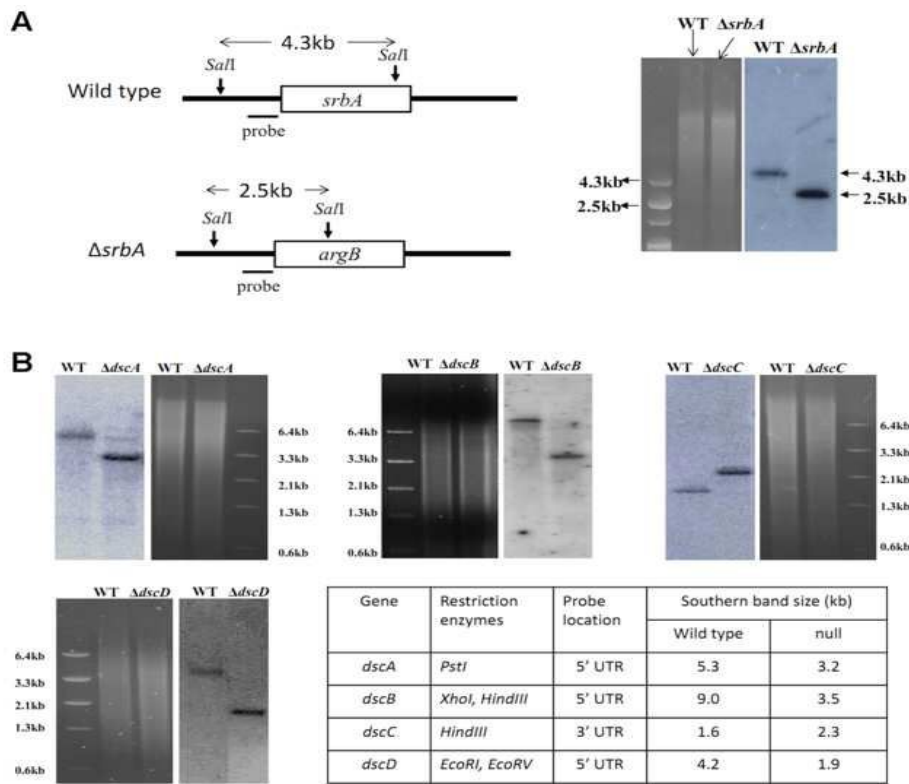
[0134] 도 15C에 나타낸 바와 같이, *Afsrba*와 *AfsppA*가 *A. nidulans*의  $\Delta$ *srbA*와  $\Delta$ *sppA*에 각각 발현되었으며( $\Delta$ *srbA* + *Afsrba*,  $\Delta$ *sppA* + *AfsppA*로 각각 표기), *A. fumigatus*의 상동유전자들의 발현은 해당 *A. nidulans*의 제거 돌연변이들의 저산소 성장 능력을 회복됨을 관찰함으로써, 두 *Aspergillus* 균종들이 저산소 적응에 있어 공통된 SrbA와 SppA의 생물학적 기능을 공유하고 있음을 나타내었다.

도면

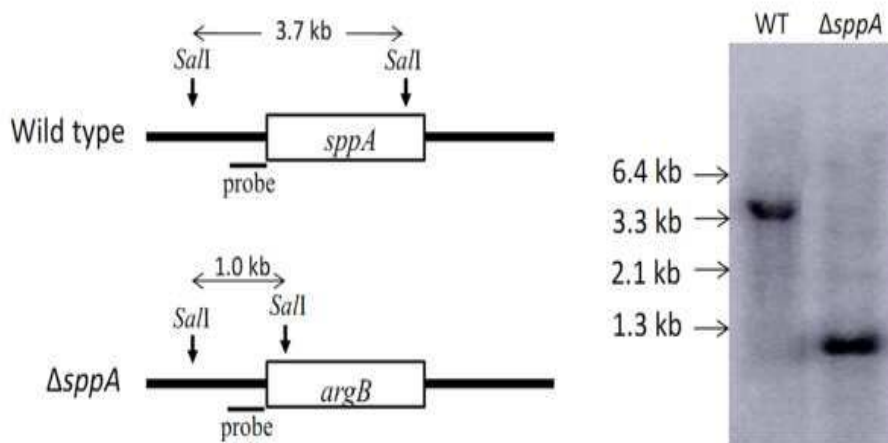
도면1



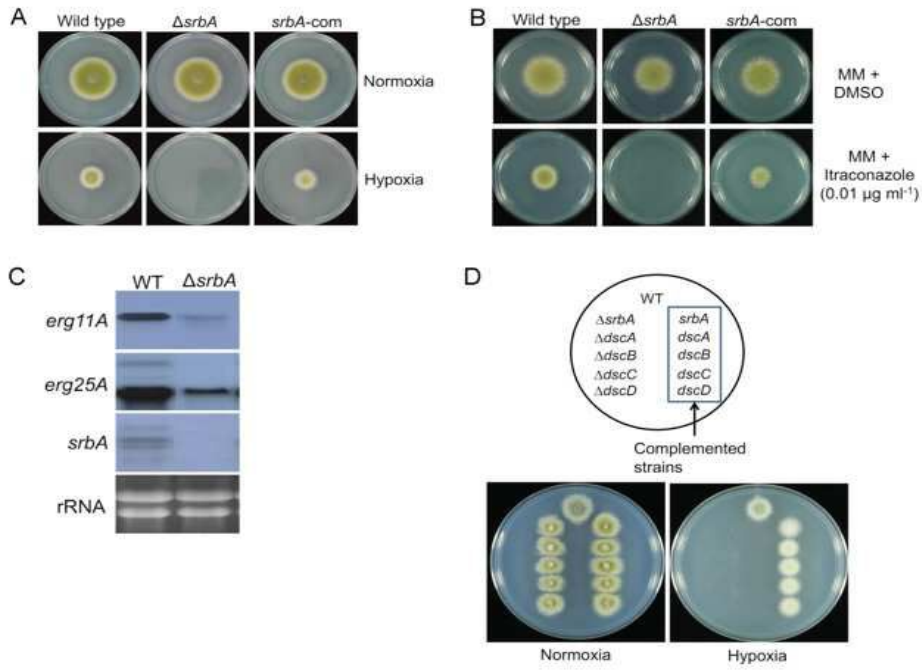
도면2



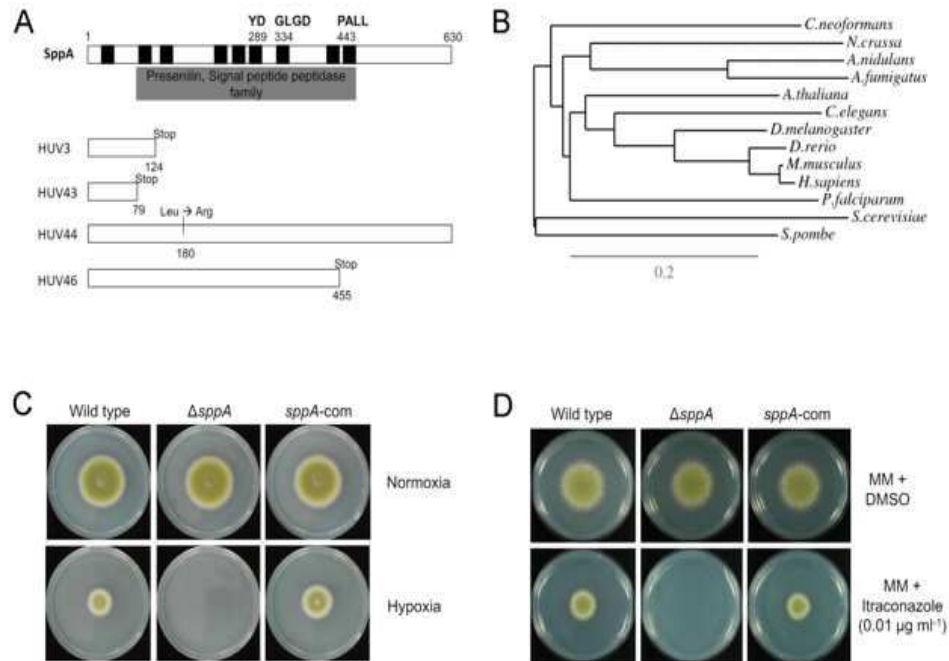
도면3



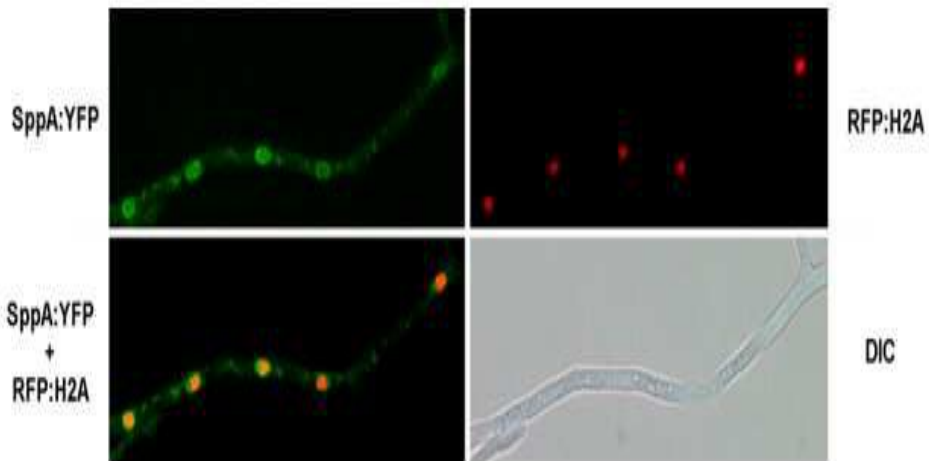
도면4



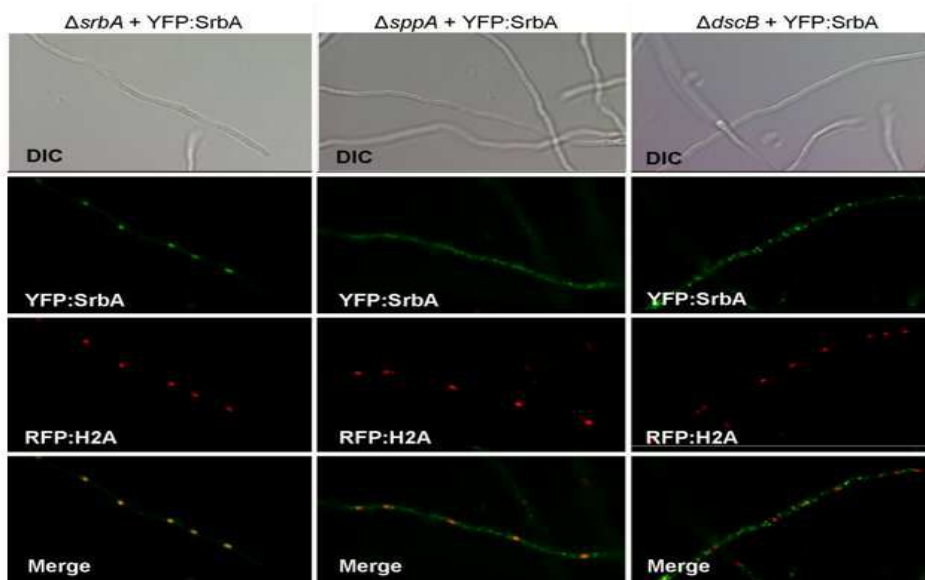
도면5



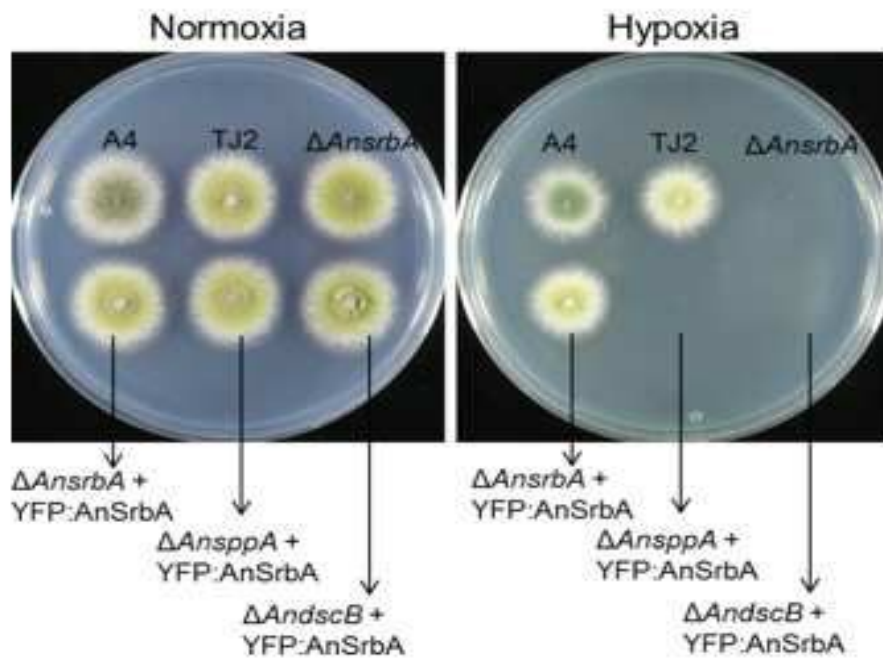
도면6



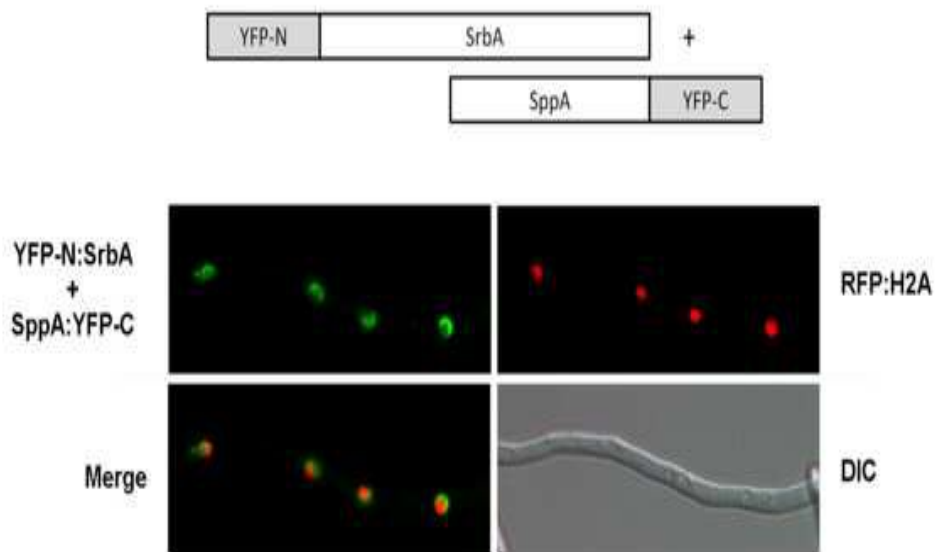
도면7



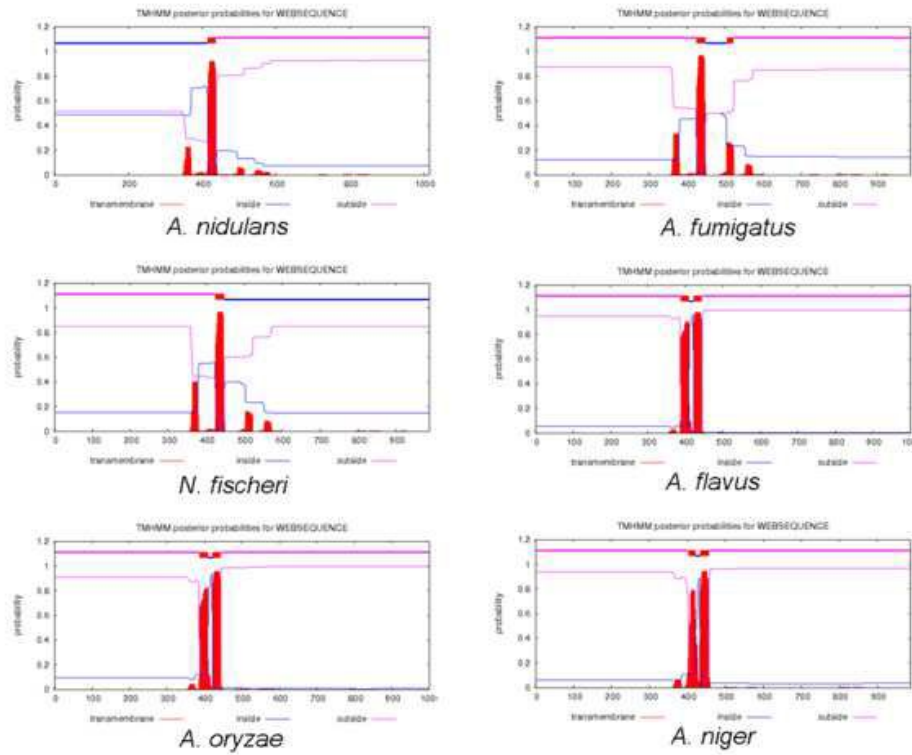
도면8



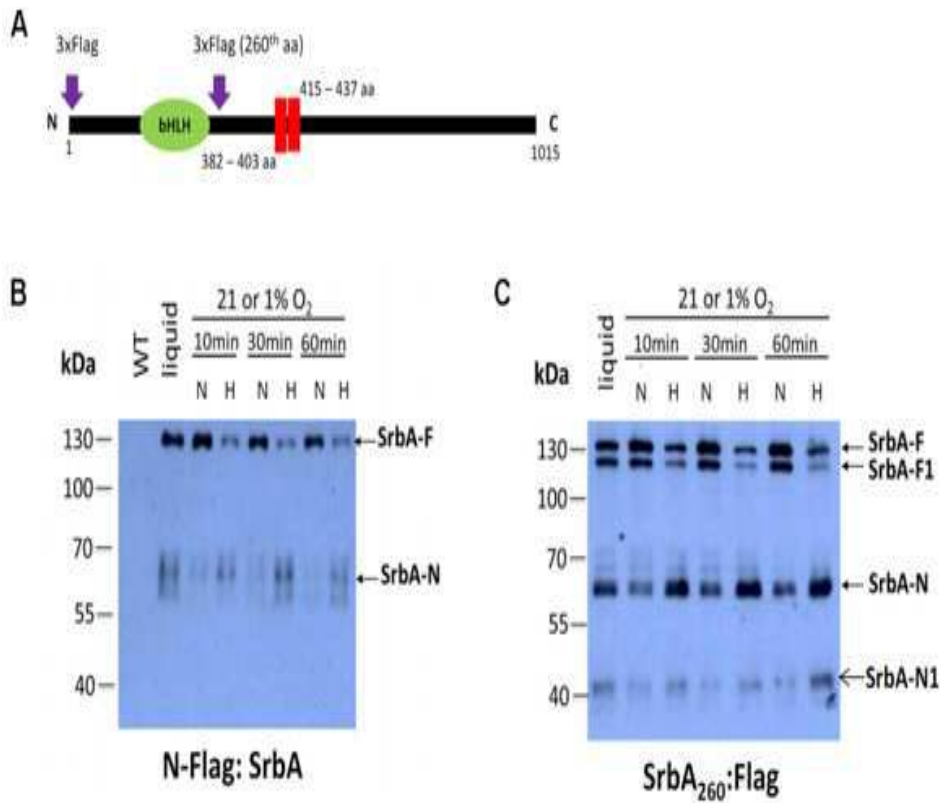
도면9



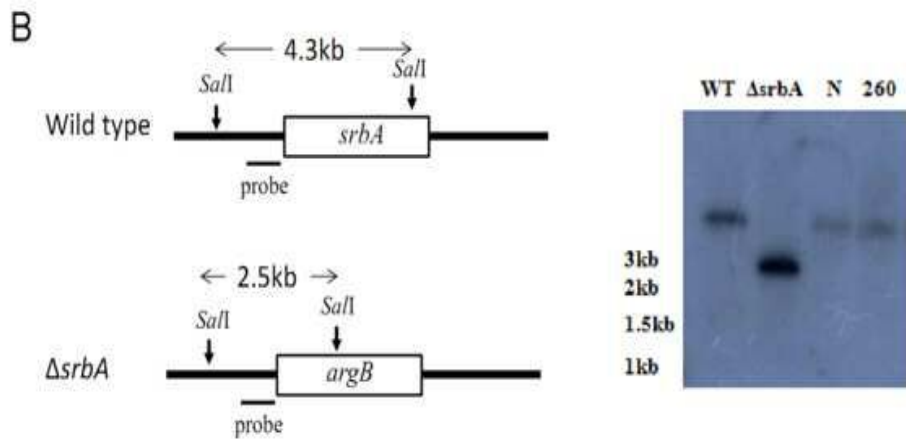
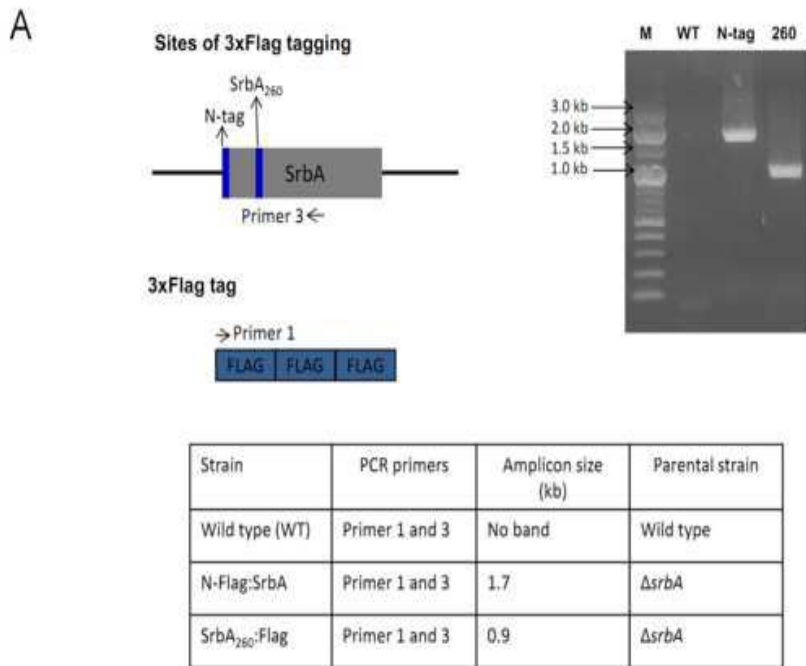
도면10



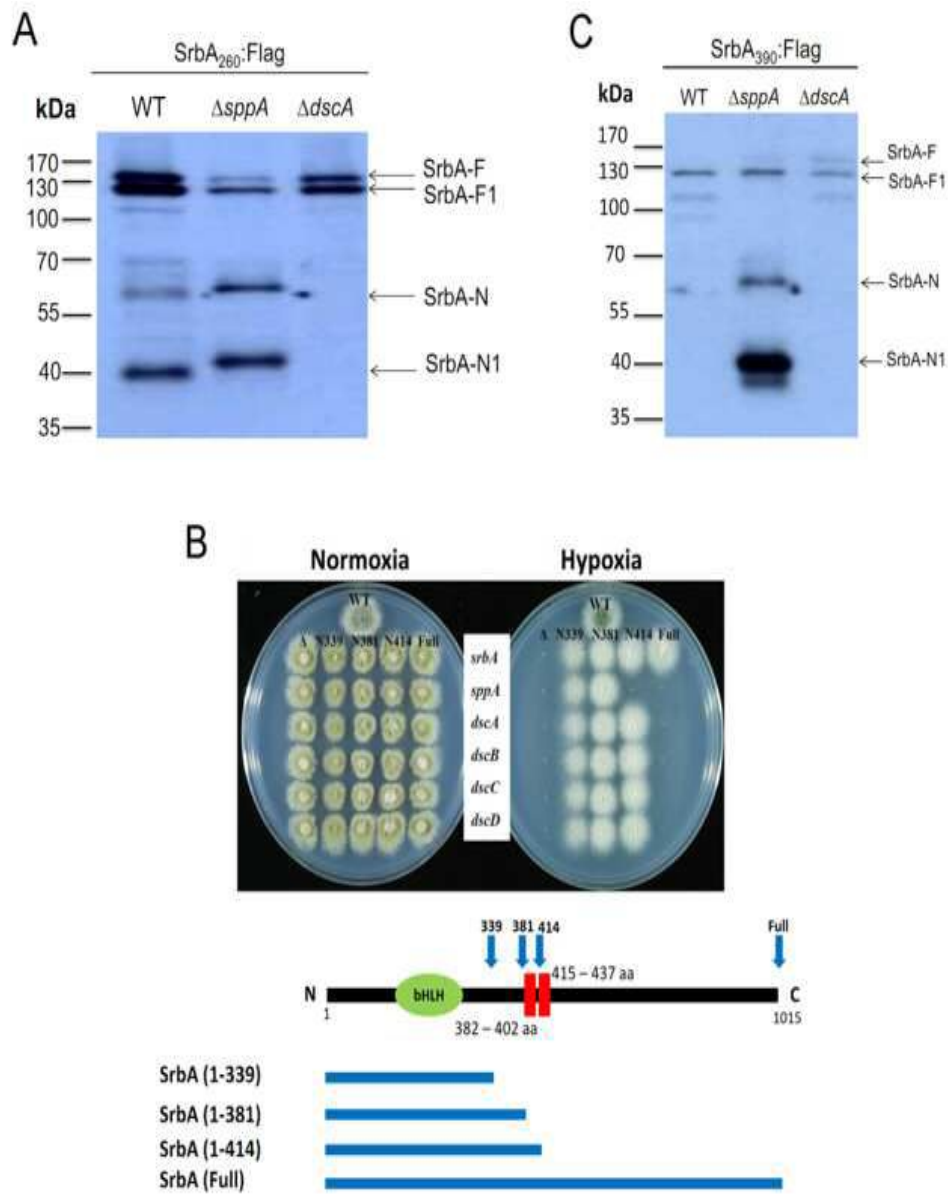
도면11



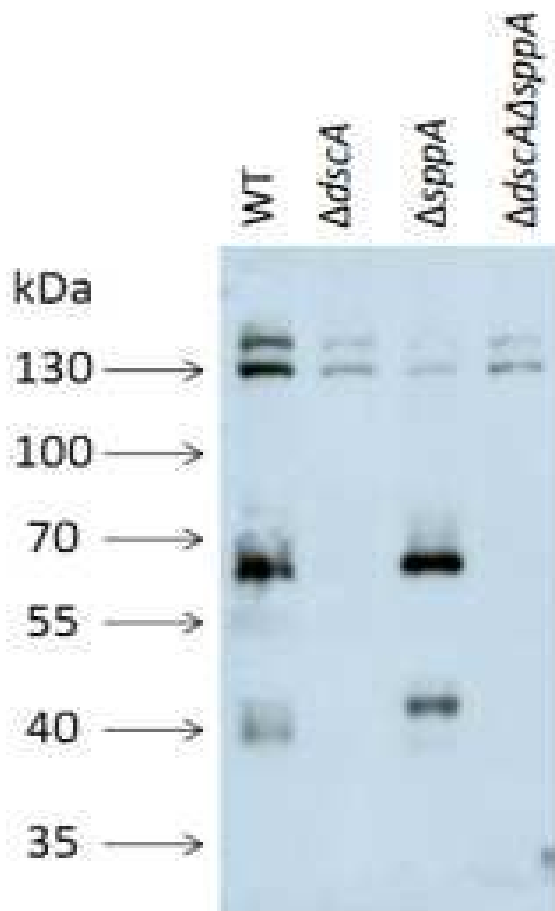
도면12



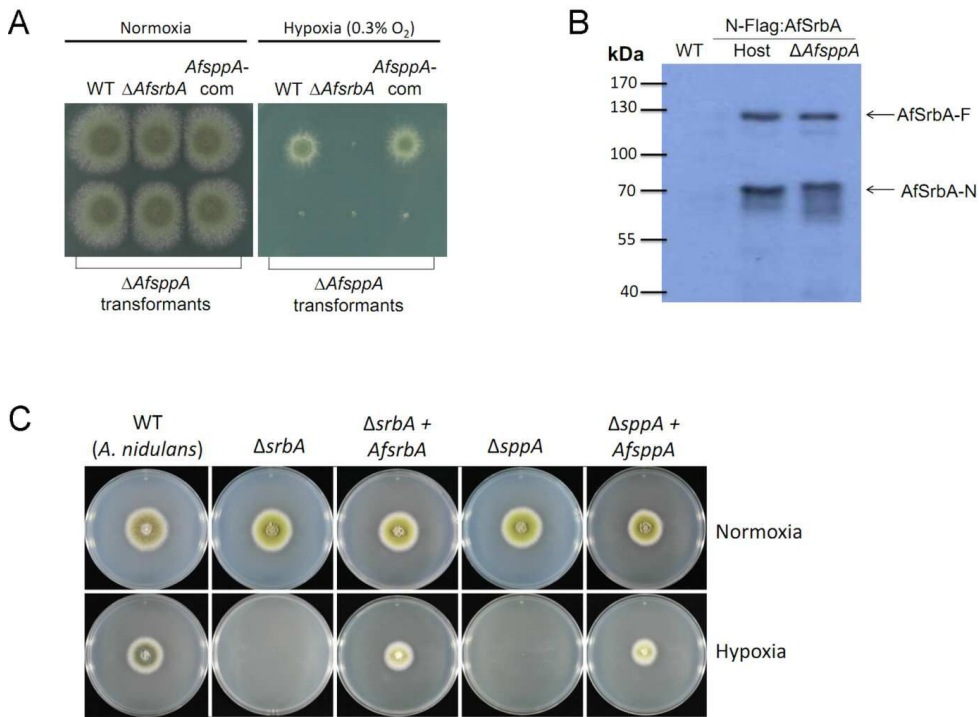
도면13



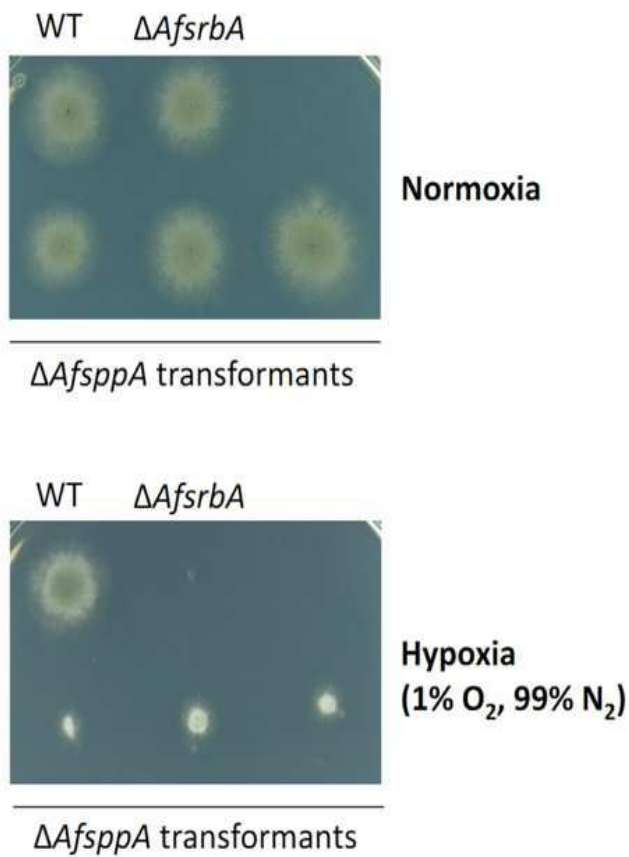
도면14



도면15



도면16



서열목록

- <110> PAICHAJ UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC
- <120> USE OF sppA GENE AND SppA PROTEIN FOR TREATMENT OF ASPERGILLOSIS
- <130> PB15-12747
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 630
- <212> PRT
- <213> ASPERGILLUS NIDULANS SPPA PROTEIN
- <400> 1

Met Ala Glu Val Ser Pro Leu Ala Glu Leu Leu Gly Gln Ala Leu Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Phe Thr Leu Val Lys Pro Leu Leu Pro Thr Tyr Gly His Val Ile  
                   20                    25                    30  
  
 Leu Ser Ala Leu Phe Pro Leu Tyr Ile Gly Ala His Ala Ser Leu Ser  
                   35                    40                    45  
 Arg Pro Ser Ser Ala Ala Lys Pro Pro Lys His Thr Asp Asn Asp Ala  
                   50                    55                    60  
 Ile Glu Ser Glu Tyr Asp Glu Asp Glu Glu His Trp Asn Asn Asp Gln  
                   65                    70                    75                    80  
 Lys Met Glu Gly Leu Ala Pro Ser Asp Ala Leu Val Phe Pro Leu Thr  
                   85                    90                    95  
 Ala Gly Ala Thr Leu Gly Gly Leu Tyr Leu Val Ile Lys Tyr Ala Gly  
  
                   100                    105                    110  
 Ala Asp Leu Leu Asn Lys Ile Leu Gly Phe Tyr Phe Ser Gln Met Gly  
                   115                    120                    125  
 Ile Phe Phe Ala Leu Thr Phe Val Lys Asp Ala Leu Ser Val Leu Arg  
                   130                    135                    140  
 Ser Phe Ile Phe Pro Arg Lys Tyr Ser Arg Gly Gly Arg Thr Trp Lys  
                   145                    150                    155                    160  
 Pro Ser Arg Ser Glu Pro Val Phe Ser Val Val Thr Thr Ser Glu Pro



Phe Thr Ala Ser Ile Val Gly Tyr Thr Ile Gly Met Val Thr Thr Leu  
 420 425 430  
 Ala Val Met Gln Ile Phe Asp His Pro Gln Pro Ala Leu Leu Tyr Leu  
 435 440 445  
 Val Pro Gly Val Leu Ile Ser Leu Trp Gly Thr Ala Leu Ala Lys Cys  
 450 455 460  
  
 Gln Val His Glu Met Trp Asp Phe Ser Asp Ala Glu Gly Asp Glu Asp  
 465 470 475 480  
 Gln Asn Arg Val Asp Gly Glu Asn Asp Glu Lys Asp Arg Thr Pro Ser  
 485 490 495  
 Ser Glu Arg Ser Arg Gly Leu Phe Ala Arg Ile Phe Ser Arg Ser Asp  
 500 505 510  
 Glu Asp Glu Gly Ser His Lys Ala Gly Lys Val Ser Asp Gly Lys Asn  
 515 520 525  
 Gln Arg Leu Ser Ser Leu Glu Asn Thr Gly His Lys Ser Glu Val Lys  
  
 530 535 540  
 Asn Leu Glu Asn Ser Asn Asp Lys Thr Gln Leu Gly Gly Glu Asn Glu  
 545 550 555 560  
 Cys Ser Lys His Leu Asp Leu Phe Ser Ile Ser Ile Tyr Met Pro Arg  
 565 570 575  
 Lys Ala Gly Leu Glu Lys Thr Arg Pro Val Gly Gln Gly Glu Val Ser  
 580 585 590  
 Asp Ser Ala His Gly Lys Glu Asn Trp Ser Tyr Val Pro Asp Ser Lys  
 595 600 605  
  
 Glu Asp Asn Glu Pro Pro Thr Lys Arg Arg Arg Arg Ser Pro Arg His  
 610 615 620  
 Ala Thr Ala Thr Ser Glu  
 625 630  
 <210> 2  
 <211> 1893  
 <212> DNA  
 <213> ASPERGILLUS NIDULANS SPPA DNA

<400> 2

atggctgagg tcagtccact tgcggagctc ttggggcagg cgctgtatca gttcacactt 60  
 gtcaagccac tattgccaac atatgggcat gtgattctat cagctctatt tccgctttac 120  
 attggagcgc atgctgctact ttcaaggcca agttccgctg ccaaaccacc caaacacact 180  
 gacaacgatg ccatcgagtc agagtatgac gaagacgaag aacattggaa taatgaccaa 240

aagatggagg gtctcgcccc tagcgatgct ttggtgtttc ctttgaccgc tgggtgccacc 300  
 cttggtggcc tgiacttggg gatcaagtat gcgggggccc acctattgaa taagatactt 360  
 ggtttctatt tctcacaat gggatatctt tttgccctga cattttgtgaa agatgcctc 420  
 tcagtcttga ggicttttat ctttccgctg aagtattccc gcggtgggcg gacctggaag 480  
 ccatcacgat ctgagcccgt cttctccgtt gtgactactt cagagccagc tgatatacgc 540  
 caatctctc taccggggat ttttggttcg atcccatgac ctaaacttgc tgtgagagcg 600  
 ctctgggctc ttcgtgaggc tctgtactgg cgagcgaagc ttcgtgtcca catacacctg 660

gtgattcatt tggagtgtc actcagcgcg ctggatatcc tgagtggcgt attggcacta 720  
 ccggcggtag cctactttac attcgtctcg aaacctggg ggtaaccaa cttccttggg 780  
 ttctcattct gctatggtag tctgcagttg atgtcgccat ccactttcgt cactggctca 840  
 cttattcttg gttcgtgtt cttttacgat atttactttg tttactttac tcctttgatg 900  
 gtgactgttg caaagaaact agacgtcccg atcaaaactct tatttctcgc cccgcccggc 960  
 cctagcagg ctcttggtac agtctccctg gctatgttgg ggcttgggta cattatcatc 1020  
 cccggaatga tggttggctt tgcctcttca tttgacctgt acctatacta caagacaaag 1080

ggcatgatta aggcacgatac agaaaataaa gggctgggat tcgtcaagcc actctatcaa 1140  
 ccagcgacag gaggatgggg tgagcgtttc tgggcacat ccgctcgacc taacgaaccg 1200  
 gagctagtgc ccccatatcg tgacgctcgc tcattcecca agacatattt cacagccagc 1260  
 attgttggct acacaatcgg catggttacg acccttgctg tcatgcaaat tttcgaccac 1320  
 ccacagcctg cctctttata ctttgttctt ggggttctaa tatactatg gggaactgcc 1380  
 ttggctaaat gtcaagttca cgagatgtgg gatttctccg atgccgaagg tgatgaagat 1440  
 caaacaggg ttgacggcga aaacgatgag aaagaccga caccttcgtc agagaggagc 1500

cgcgcccttt ttgctcgcat cttttccaga tcagatgaag acgaagggtc tcataaggct 1560  
 ggcaaagtat ccgatggaaa gaatcaacgt ctgtcttctt tggagaatac cggtcacaag 1620  
 agtgaagtga agaacctcga gaacagcaat gataagacgc aactagcgg cgagaatgaa 1680  
 tgctcaaaac acttggatct gttctcaatt tcaatctaca tgcccagaaa ggccgggattg 1740  
 gagaagacc ggctgtagg tcaaggggaa gtcagcgatt cggctcacgg taaggagaat 1800

tggtcgtatg taccagattc taaagaggat aatgaacctc ctaccaaaag gcggcggcgg 1860  
 agtccgaggc atgctactgc gacatccgag tag 1893

<210> 3  
 <211> 626  
 <212> PRT  
 <213> ASPERGILLUS FUMIGATUS SPPA PROTEIN  
 <400> 3

Met Asp Glu Val Ser Pro Leu Ala Glu Leu Leu Gly Gln Ala Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 Gln Tyr Thr Lys Ile Lys Pro Phe Leu Pro Thr Tyr Gly His Leu Leu  
 20 25 30  
 Val Ser Ala Leu Phe Pro Ile Tyr Ile Gly Ala His Ala Ser Leu Ser  
 35 40 45  
 Arg Pro Ser Ser Ala Ala Lys Pro Pro Lys Lys Asp Thr Asn Asn Ile  
 50 55 60  
 Glu Thr Asp Asn Glu Glu Glu Asp Glu Glu Gly Leu Ser Pro Val Gln  
 65 70 75 80  
 Lys Met Glu Gly Leu Glu Pro Ser Asp Ala Leu Met Phe Pro Leu Thr  
 85 90 95  
 Ala Gly Leu Thr Leu Gly Gly Leu Tyr Leu Ile Ile Lys Trp Leu Asp  
 100 105 110  
 Asp Pro Ala Ile Leu Asn Lys Val Leu Ser Phe Tyr Phe Ser Gln Met  
 115 120 125  
 Gly Leu Phe Phe Ala Val Ala Phe Leu Lys Asp Cys Leu Leu Val Phe  
 130 135 140  
 Arg Ser Phe Leu Phe Pro Arg Arg Tyr Arg Phe Ala Gly Arg Ile Trp  
 145 150 155 160  
 Arg Ala Lys Gln Ser Glu Arg Val Phe Lys Ala Asp Gln Gln Asp Ser  
 165 170 175  
 Thr Gln Gly Ser Ala Gln Phe Arg His Thr Pro Leu Pro Gly Ile Phe  
 180 185 190

Gly Ser Ile Pro Leu Pro Ala Ala Leu Val Ala Gly Leu Trp Ala Cys  
 195 200 205  
 Arg Asn Val Ala Tyr Gln Arg Leu Lys Leu Arg Ala His Val Arg Gly  
 210 215 220  
 Val Phe Thr Gly Glu Cys Leu Val Gly Leu Leu Asp Val Ile Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Leu Leu Ala Leu Ser Thr Val Gly Tyr Phe Ala Phe Val Ala Lys Pro  
 245 250 255  
 Trp Trp Leu Thr Asn Phe Leu Gly Phe Ser Phe Cys Tyr Gly Ala Leu  
 260 265 270  
  
 Gln Phe Met Ser Pro Ser Thr Phe Lys Thr Gly Ser Leu Ile Leu Gly  
 275 280 285  
 Ser Leu Phe Leu Tyr Asp Ile Tyr Phe Val Phe Tyr Thr Pro Leu Met  
 290 295 300  
 Val Thr Val Ala Thr Lys Leu Asp Val Pro Ile Lys Leu Leu Phe Pro  
 305 310 315 320  
 Arg Pro Pro Ala Pro Gly Glu Ala Pro Asp Val Val Ser Leu Ala Met  
 325 330 335  
 Leu Gly Leu Gly Asp Ile Val Ile Pro Gly Met Met Val Gly Leu Ala  
  
 340 345 350  
 Leu Arg Phe Asp Leu Phe Leu Tyr Tyr Arg Lys Lys Gly Ile Glu Lys  
 355 360 365  
 Ala Arg Leu Glu Ser Lys Gly Gln Asp Ile Ile Lys Pro Gln Tyr Gln  
 370 375 380  
 Cys Ala Thr Gly Gly Trp Gly Glu Arg Phe Trp Ala Trp Pro Val Ala  
 385 390 395 400  
 Pro Arg Gly His Glu Leu Glu Pro Pro Tyr Arg Asp Ala Lys Ser Phe  
 405 410 415  
  
 Pro Lys Pro Tyr Phe Lys Ala Ser Leu Phe Gly Tyr Ile Val Gly Met  
 420 425 430  
 Ile Ser Thr Leu Ala Ala Met Gln Tyr Ser Asn His Ala Gln Pro Ala



attggcgccc atgcatcctt ttcgagacc tcgtctgctg ccaaacctcc caagaaagac 180  
 acgaataaca tcgaaacaga caatgaggaa gaagacgagg aaggactgag ccccgctcag 240  
 aagatggagg gtcttgagcc cagtgatgcg ctaatgttcc cgttgactgc cggctctact 300  
 ctcggtggtc tctatttgat catcaaatgg ttggatgata cagccatatt gaacaaggtc 360  
  
 ctgagctttt acttttctca gatgggactc tttttcgag tcgcattcct gaaggactgt 420  
 cttttggctt ttcgatcctt tcttttccct cgccgatata gattcgctgg caggatttgg 480  
 agggcgaaac agtcggaacg agtttttaa gccgatcagc aggactcgac gcaggggtcg 540  
 gcccaattcc gccatactcc ccttcgggga atctttggtt cgattccatt accggtctgc 600  
 ttggtcgag gcctttgggc gtgtcgcaac gtcgcgtatc agagactgaa gctgagggtc 660  
 cacgtgcgcg gtgtcttcac cggcgaatgt ctggtgggcc tgctggacgt aatcagtgcg 720  
 ctgctagctc tgtctactgt tgggtatttc gcatttgttg cgaaacctg gtggctgaca 780  
  
 aactttctgg gtttcagctt ctgttacggc gcgctgcagt tcatgtcacc atcaacgttc 840  
 aaaactgggt cacttattct gggctcgttg tttctctatg atatctactt tgtttttat 900  
 accccgtaa tgggtgacagt cgctacaaaa ctgatgtac caatcaagct tttgtttccc 960  
 cggccacctg ctcttggtga agccccgat gttgtttcct tggcgatgct gggcctgggg 1020  
 gacattgtca ttcccggat gatggtggga ctggcgtcc gatttgatct gtttctctac 1080  
 tacagaaaga aggttatcga aaaagcgcgg ctgcaatcca aggggcagga tatcatcaag 1140  
 cccaataacc agtgtgcaac cggcggctgg ggtgaacgtt tctgggcttg gcccgaggca 1200  
  
 cctcgtggac atgagctaga gccgccgat agggatgcaa agtcctttcc caaaccttat 1260  
 ttcaaggcca gcttgtttgg gtacattgtc ggaatgatat cgacccttgc ggccatgcaa 1320  
 tactccaacc atgctcaacc cgctcttctt tatctagtcc cggagtctt tcttttctg 1380  
 tggggaactg cgctcctcag aggagaactc cgtgagatgt gggagtctc tgatgccgag 1440  
 gaaagcgacg aggagggat gaatgagaag gaggaaaaga agggagatga agctcaagct 1500  
 aagaacacaa agagtctctt tatgcgaatc ctgtcgggcg atatcaaagc agtatactct 1560  
 gaagagccag aaggtgccac ggagaaaaag gaggagagga aatccgaaag tatggagacc 1620  
  
 aaggattcag cgcaagctga tggaggatca gatgacaaat cacaaggtgc agacgagggg 1680  
 aaggaattgg acttggtttc aatatccatc tcgctgcca ggaaaggcaa gaccagatca 1740  
 ggtaaaacc agactaacag gtttgattt cccacaagca agaagagctt gtctgtccc 1800  
 agtgcagcga atcgtgatga cgagccaccg gccaaagac agcgaagaag tctagaatc 1860  
 gccgaagcca gtgcctctta g 1881