Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 34, No. 3, 273-277 (2006)

재조합 파스튜렐라 외막 단백질 H의 면역원성 검정

이정민*
성균관대학교 생명공학연구소

Immunogenicity of Recombinant Outer Membrane Protein H from *Pasteurella multocida*. Lee, Jeong-min*. *Institute of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, 300 Chunchundong, Changanku, Suwon 440-746, Korea* – To investigate the antigenicity and protective immunity of outer membrane protein H (OmpH) in *Pasteurella multocida* D:4, the recombinant OmpH protein was produced in *Escherichia coli*. The truncated and Trx-fused form of recombinant OmpH (53 kDa) was purified, and used as an antigen in the immunization and challenge experiment. The immunized mice with the recombinant OmpH produced a high-titer antibody, and had protective immunity against *P. multocida* as same level as the mice immunized with formalin-killed whole cell.

Key words: Outer membrane protein H, *Pasteurella multocida*, immunogenicity, subunit vaccine

서 론

*Pasteurella multocida*는 병원성 미생물로서 오래전부터 연구되어져 왔다. 이 병원균은 많은 종류의 동물에 대하여 병원균으로서 작용하는데, 소, buffalo 등에서 출혈성 패혈증(haemorrhagic septicaemia)을, 닭과 오리 등에서 가금 콜레라(fowl cholera)를, 돼지에서 위축성 비염(atrophic rhinitis)과 파스튜렐라 폐렴(pneumonia)을 일으키는 주요 병원균으로 알려져 있다[2, 6]. 사람의 경우에도 감염된 동물에게 물림으로서 병원균에 감염된 보고들이 있다. 이처럼 넓은 범위의 동물에 대한 감염성을 나타내는 *P. multocida*에 의한 피해를 줄이고자 하는 노력은 *P. multocida*에 대한 방제 노력과 치료제 및 항생제 개발, 감염을 막을 수 있는 백신의 개발 및 활용 등의 분야에 걸쳐 폭넓게 연구되어져 왔다[1, 7].

Pasteurellosis를 예방하기 위해서 이미 오래전부터 백신에 의한 예방법이 시행되어져 왔다. 그러나 일반적으로 널리 이용되는 불활화한 사균 백신의 경우에는 백신 제조에 사용된 특정 혈청형에 대해서만 백신으로서의 효과를 나타내므로 다양한 종류의 *P. multocida*에 대한 면역 방어를 부여하기에는 어려움이 있으며, attenuated strains을 이용한 생균 백신의 경우에는 서로 다른 종류의 균주에 대한 방어효과는 높일 수 있으나, 접종한 생균의 변이에 의한 병원성 획득이라는 위험성으로 인해 완벽한 백신 접종에 의한 예방에는 어려움이 있다[1, 7, 18].

*Corresponding author
Tel: 82-31-290-5269, Fax: 82-31-290-5270
E-mail: jlee@skku.edu

돼지 위축성 비염의 경우에는 주로 혈청형 D에 의하여 발생하는데, 이 병원균은 병원성에 중요하게 작용하는 요소로 dermonecrotic toxin인 *P. multocida* toxin (PMT)을 생산한다. 그러므로 이 PMT를 정제, 불활화하여 변성독소인 톡소이드(toxoid) 백신으로 사용하고 있으며, 근래에는 유전자 재조합 기술을 이용하여 재조합 독소 및 독소 유도체(toxin derivatives)를 생산하여 백신으로 활용하고 있는 추세이다[7, 10, 13-15].

Porin은 그람 음성의 박테리아에서 작은 친수성 분자들이 세포막을 통과하여 확산하는데 역할을 하거나 박테리오파아지 또는 박테리오신의 수용체(receptor) 역할을 하는 막 통과 단백질(transmembrane protein)이다. Porin의 막 통과 구조로 인하여 유전자 및 아미노산의 1차, 2차 구조가 종 내에서는 비교적 잘 보존되어 있으며 높은 상동성을 나타낸다. 그러므로 porin은 매우 효과적인 백신 후보로서, 다양한 종류의 그람 음성 박테리아 감염에 대한 저항성 면역을 부여할 수 있다[1, 3, 12]. *P. multocida*의 외막 단백질 H (outer membrane protein H; OmpH)는 porin의 일종으로서 여러 종류의 서로 다른 혈청형의 균주에서 발견되는데, 동종삼량체(homotrimer)로서 세포막에 존재하며, 일량체(monomer)의 분자량은 균주의 혈청형과 전기영동에 따라서 34 kDa부터 42 kDa까지 다양하게 나타난다[11, 19]. *P. multocida* 종 내에서 각 균주 간의 외막 단백질 H의 차이는 특이적인 항원기로 작용하는 loop 부위의 염기서열의 다양성 및 길이의 다양성에 기인하는 것으로 보여진다[12].

본 연구에서는 돼지의 위축성 비염에 대하여 효과적으로 방제할 수 있는 백신을 개발하고자, 위축성 비염에 감염된 돼지에서 분리한 *P. multocida*의 야외주가 가지는 외막 단백질 H의 백신 사용 가능성에 대한 기초 연구로서, 이전의 연

구를 통하여 얻어진 이 유전자의 대장균 내에서 과발현을 유도하였으며, 재조합 외막 단백질 H를 정제하여 이의 항원성과 저항 면역성을 검정하여 단위 백신으로서의 활용성을 탐색하고자 하였다.

재료 및 방법

공시 재료 및 균주 배양 조건

연구에 사용할 *P. multocida* D:4 균주는 서울대학교 수의과대학 면역학교실로부터 분양 받아 계대 배양하여 사용하였다. 균주의 배양은 Bacto brain-heart infusion (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, MI) agar plate, 또는 5% calf serum이 첨가된 blood agar plate에서 37°C에서 배양하였으며, genomic DNA의 추출을 위하여 균주를 Brain-heart infusion 액체 배지에 접종한 후 37°C에서 12시간 동안 현탁 배양 하였다.

외막 단백질 H 유전자의 발현

*P. multocida*의 외막 단백질 H 유전자는 본 연구진이 분리한 유전자(GenBank Accession number AY603962)를 사용하였다[9]. 외막단백질 H 유전자는 안정적인 유전자의 발현을 위하여 signal sequence를 제거한 부위를 대장균 발현 벡터인 pET32에 삽입하였다(Fig. 1). 이 재조합 유전자 발현 벡터를 대장균 BL21 (DE3)에 도입하고 Isopropyl-β-D-thiogalacto-pyranoside (IPTG)를 통하여 유전자의 발현을 유도하였다. 먼저 5 ml의 LB 배지에 하룻밤 동안 배양한 재조합 균주 세포를 접종한 다음 OD_{600}값이 0.5가 될 때까지 37°C에서 현탁 배양 하였다. 최종농도가 0.8 mM이 되도록 IPTG를 첨가하고 다시 37°C에서 12시간동안 현탁 배양 하여 유전자의 발현을 유도하였다. 원심분리로 세포를 수거하고 전체 단백질을 추출하여 12.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel 상에서 전기영동을 하여 확인하였다[9].

재조합 외막 단백질 H의 정제

재조합 발현 벡터를 50 μg/ml ampicillin이 포함된 5 ml의 LB broth에서 하룻밤 동안 배양한 후, 이를 다시 50 μg/ml ampicillin을 함유한 500 ml LB broth에 접종하여 37°C에서 OD_{590} 값이 0.7될 때까지 현탁 배양 했다. 최종농도가 0.8 mM이 되도록 IPTG를 첨가하고, 이를 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양한 세포를 원심분리(5,000×g, 20분, 4°C)하여 수거한 뒤, pellet을 다시 lysis buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, 8 M urea, pH 8.0)에 현탁시키고 상온에서 1시간 동안 용해 시켰다. 이를 다시 원심분리(10,000×g, 20분, 4°C) 한 후 상층액을 취하여 재조합 균주로부터 전체 단백질을 분리하였으며, 이를 시료로 하여 NTA Ni-affinity column chromatography (QIAGEN, Germany)를 수행하였다. 시료 10 ml를 2 ml 부피의 Ni-resin column에 적하한 후, 20 ml의 wash buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, 8 M urea, pH 6.4)로 세 번 반복하여 세척하였다. Elution은 10 ml의 elution buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris, 8 M urea, pH 4.5)로 2번 반복하여 수행하였다. 이상과 같이하여 분리한 단백질의 농도는 Bradford method를 이용하여 측정하고 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다[8, 9].

항원성 검정

대장균에서 발현, 정제한 재조합 외막 단백질 H의 항원성과 저항 면역성을 알아보기 위하여 실험동물(생쥐)를 이용한 면역 접종 실험을 수행하였다. 음성 대조구로 Phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM sodium chloride, 10 mM phosphate, 2.7 mM potassium chloride, pH 7.4)를 사용하였으며(그룹 1), 양성 대조구은 상업적으로 사용되고 있는 호흡기 질병 혼합 백신(*Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida,* 그리고 *Haemophilus pleuropneumoniae*의 불활화 사균 백신; Daesung microbiological lab. Co., LTD, Korea)을 그룹 2로, 연구에 사용한 *P. multocida* D:4의 formalin-killed whole cell (inactivated bacterin)을 그룹 3으로 사용하였다. 실험구는 정제한 재조합 외막 단백질 H를 PBS에 희석하여 사용하였다. 먼저 각 실험군의 생쥐에서 혈액을 채취한 후 면역 전 혈청으로 사용하였다. 첫 번째 면역을 수행한 후 2주 간격으로 3회 더 면역을 하였으며, 각 면역 후 7일-10일째 되는 날에 실험동물로부터 혈액을 채혈하였다. 채혈한 혈액은 4°C에서 하룻밤 동안 응고를 시킨 후, 원심분리(2000×g, 20 min, 4°C)하여 혈청을 수거하고, 항체의 역가를 측정하기 위하여 ELISA를 실시하였다. 먼저 재조합 외막 단백질 H를 10 μg/ml가 되도록 carbonate buffer로 희석 후 96-well plate에 50 μl/well로 분주하고 4°C에서 하루 동안 보관하여 항원 coating을 실시하였다. 0.05% Tween 20가 포함된 PBS (PBS-T)로 3번 세척한 후, 3% BSA가 첨가된 PBS-T를 200 μl씩 분주하여 실온에서 3시간 동안 blocking을 실시하였다. 다시 3번 세척한 후 각 항혈청을 100배 희석하여 1차 항체로 사용하여 100 μl씩 분주한 후 37°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 3번 세척한 후 2차 항체로 anti-mouse IgG peroxidase conjugated (Sigma A8924)를 3% BSA가 첨가된 PBS-T로 1500배 희석하여 100 μl씩 분주한 후 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 3번 세척 후 반응 기질로 dimethyl sulfoxideo-phenylenediamine (DMSO)에 녹아있는 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)을 phosphate-citrate buffer와 1:10의 비율로 혼합한 뒤, 각 well 당 10 μl씩 분주하여 2차 항체의 peroxidase에 의한 발색을 유도하였다. ELISA 측정기로 650 nm에서 흡광도를 측정하여 발색정도를 정량화 하였다[8].

방어적 면역성 검정

4차의 면역과 혈액채혈이 끝난 후, 실험 동물의 방어적 면역성(protective immunity)을 알아보기 위하여, 본 연구에서 사용한 위축성 비염 병원균인 *P. multocida* D:4를 복강 내 접종(3.42×10^3 CFU)한 후 72시간동안 실험동물의 생존을 측정하여 재조합 외막 단백질 H의 백신으로서의 효과, 즉 저항성 면역을 확인하였다.

결과 및 고찰

재조합 외막 단백질 H의 발현 및 재조합 단백질의 정제

외막 단백질 H 유전자는 본 연구에서 사용된 D:4형의 균주 외에 병원성을 나타내는 서로 다른 혈청형의 균주에서도 90% 이상의 매우 높은 상동성을 나타내며, 또한 다른 종 간에서도 비교적 높은 상동성을 나타낸다[9]. 비교적 상동성이 낮은 부위는 아미노산 83-107, 그리고 228-249 부위로서, 이들 부위는 *P. multocida*의 각 균주들이 서로 다른 항원성을 나타내는데 있어서 작용하는 epitope 부분으로 추정된다[7, 9]. 아미노산 서열을 바탕으로 한 구조 분석 결과를 고려할 때, *P. multocida*의 외막 단백질 H는 porin으로서의 특징적인 구조를 가지고 있으며, 종 간, 종 내에서 비교적 상동성이 높은 구조를 가지고 있으므로, 서로 다른 혈청형의 균주에 대한 교차 면역 저항성(cross-protective immunity)을 유발할 수 있는 좋은 백신의 후보로 추정된다. 본 연구에서는 이러한 외막 단백질 H의 항원성을 검정하기 위하여, 대장균 재조합 벡터를 구성하고 유전자의 대량 발현 및 정제를 수행하였다.

본 연구에서는 외막 단백질 H 유전자가 숙주 내에 안정적으로 높은 발현을 나타낼 수 있도록 하기 위하여, 20번째 아미노산까지의 signal sequence 부위에 해당하는 염기서열을 제거한 절단된 형태의 외막 단백질 H 유전자를 pET32a 벡터에 도입하였다. 이 절단된 형태의 외막 단백질 H 유전자는 ORF가 966개의 뉴클레오티드로 322개의 아미노산을 암호화한다. pET32a 벡터는 유전자 삽입 부위 앞에 약 13 kDa의 thioredoix (Trx) 유전자가 있으므로, 유전자 발현시 도입된 유전자와 함께 융합 단백질을 생산함으로서 안정적으로 재조합 단백질 유전자를 발현시킬 수 있다(Fig. 1). pET32a 벡터에 절단된 형태의 외막 단백질 H 유전자를 삽입하여 발현시킨 결과, 안정적으로 비교적 높은 정도의 발현율로 재조합 외막 단백질 H를 생산하는 대장균 균주를 얻을 수 있었다.

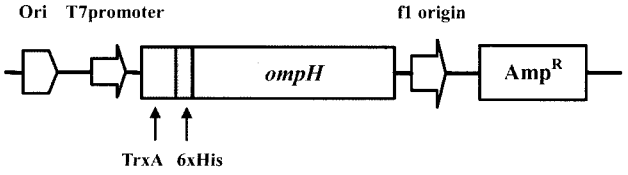

Fig. 1. Physical map of *Pasteurella multocida* outer membrane H (*OmpH*) gene and expression vector. The truncated form of OmpH having no signal sequence was ligated into pET32 expression vectors.

재조합 외막 단백질 H만을 순수하게 분리하기 위해서 N-말단에 있는 6×His에 결합하는 Ni-NTA affinity column을 이용했다. 유전자가 발현된 세포의 파쇄 후, 상층액에는 여러 가지 가용성의 단백질들이 포함되는데 외막 단백질 H는 porin이라는 특성으로 인해 세포막과 함께 pellet으로 떨어지거나 불용성 단백질의 상태로 pellet에 남게 된다. 상층액이 제거된 후, 남아있는 pellet은 denaturing lysis buffer (100 mM NaH_2PO_4, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea, pH 8)에 상온에서 3시간 동안 현탁한 후 원심분리(10000×g, 30 min, 4°C)하여 재조합 외막 단백질 H가 포함된 상층액을 얻었다. 이를 시료로 하여 Ni-NTA column chromatography를 수행하여 재조합 외막 단백질 H를 분리할 수 있었다. 분리한 재조합 외막 단백질 H의 분자량은 12.5% SDS-PAGE 상에서 53 kDa 정도의 분자량을 나타내었다. 이는 36 kDa의 절단된 형태의 외막 단백질 H와 17 kDa의 Trx 및 벡터에서 제공되는 부위가 융합된 형태인 것으로 여겨진다(Fig. 2).

항원성 검정

대장균에서 발현, 정제된 재조합 외막 단백질 H의 항원성을 알아보기 위하여 실험동물(생쥐)를 이용한 면역 실험을 수행하였다. 음성 대조구로 PBS를 사용하였으며, 양성 대조구로는 일반적으로 사용되고 있는 호흡기 질병 혼합 백신(불활화된 사균 백신)과 본 연구에 이용된 *P. multocida* D:4의 불활화된 사균 백신인 formalin-killed whole cell을 사용하였다. 실험구로는 정제한 재조합 외막 단백질 H를 PBS에

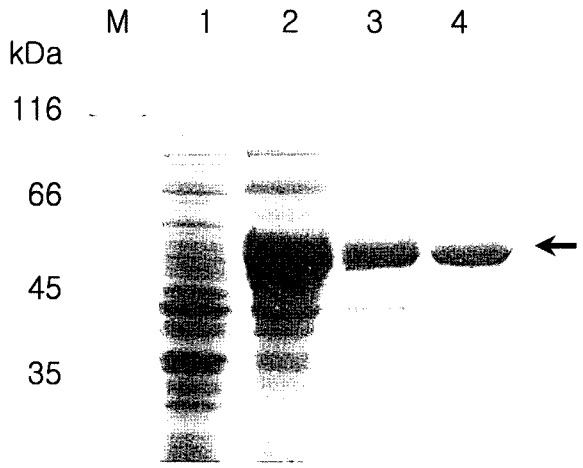

Fig. 2. Expression and purification of the recombinant OmpH. The samples were loaded on 12.5 % polyacrylamide gel. M, protein molecular weight standard marker; lane 1, total protein extract from *E. coli* BL21 (DE3) host with pET32 vector; lane 2, crude extracts from the cell lysate of the host harboring pET32 with *OmpH*; lane 3, total protein extraction using denaturing buffer condition; lane 4, purification of the recombinant OmpH using Ni-NTA column.

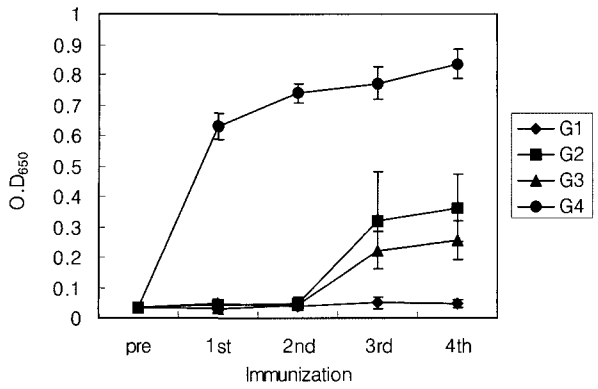

Fig. 3. Antibody titeration in antisera of mice. PBS (G1), commercial vaccine (G2), formalin-killed whole cells (G3), and the recombinant OmpH (G4) were immunized in mice. The titer of antibodies were measured by ELISA.

희석하여 사용하였다. 4차에 걸친 면역화를 수행한 후, 얻어진 혈액에서 혈청을 분리하고, 재조합 외막 단백질 H를 항원으로 한 ELISA를 수행하여 항원성을 확인하였다. Fig. 3의 결과와 같이, 재조합 외막 단백질 H를 항원으로 면역한 할혈청의 경우 가장 높은 역가를 나타내었으며, 호흡기 질병 혼합 백신과 불활화한 *P. multocida* D:4의 경우에는 상대적으로 낮은 항체 역가를 나타내었다. 음성 대조구인 PBS의 경우에는 매우 낮게 역가가 측정되었다. 이는 재조합 외막 단백질 H를 면역한 경우에는 단일 항원 단백질에 의한 항체의 유도이며, ELISA 수행시 항원으로 외막 단백질 H를 사용했기 때문에 항체의 역가가 높게 나타난 것으로 설명될 수 있다. 또한 이 외막 단백질 H는 구조적으로 매우 잘 보존되어 있으므로, 다른 외막 단백질과의 높은 상동성으로 인해 호흡기 질병 혼합 백신과 불활화한 *P. multocida* D:4의 면역 항혈청에서도 역가가 검출된 것으로 사료된다[4, 7]. 이상의 결과를 볼 때, 재조합 외막 단백질 H는 항원으로서 작용하며, 실제 사용되고 있는 상업용 백신이나 불활화한 파스튜렐라에서도 자연 상태의 외막 단백질 H가 항원으로서 작용함을 알 수 있다. 즉, 재조합 외막 단백질 H는 항원성을 가짐을 확인할 수 있다.

방어적 면역성 검정

재조합 외막 단백질 H의 항원성 검정 후, 이 재조합 단백질에 의해 유도된 항체에 의하여 방어적 면역성이 생성되는지 확인하기 위하여, 위에서 면역화한 실험동물을 대상으로 하여, 위축성 비염 병원균인 *P. multocida* D:4를 복강 내 접종(intraperitoneal injection)한 후, 72시간동안 실험동물의 생존을 측정하였다. 그 결과를 요약하면 Table 1과 같다.

PBS만을 면역화한 음성 대조구의 경우에는 모든 실험동물이 사망하여 생존율이 0이었으며, 상업적으로 이용되는 호흡기 질병 혼합 백신을 사용한 경우에는 5마리의 실험동물이 사망하여 생존율이 50%, 불활화한 *P. multocida* D:4를 면역화한 경우에는 2마리가 사망하여 생존율 80%를 나타냈다. 재조합 외막 단백질 H을 단독 면역화한 실험동물은 2마리가 사망하여 생존율 80%를 나타냈다. 결과적으로 재조합 외막 단백질 H를 백신으로 사용한 경우, 불활화한 병원균을 사용한 것과 동일한 백신효과를 볼 수 있었다. 오히려 상업용 호흡기 질병 혼합백신의 경우는 항체의 역가는 불활화한 *P. multocida* D:4보다 높게 나타났으나, 여러 항원의 간섭현상으로 인해 *P. multocida* D:4에 대한 방어적 면역성은 오히려 다소 떨어지는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합하면 재조합 외막 단백질 H는 *P. multocida* D:4에 대한 저항을 나타내는 항원으로서 효과적인 백신 소재가 될 수 있다고 사료된다[5, 20].

*P. multocida*의 외막 단백질 H는 일반적으로 널리 존재하는 주요 외막 단백질 중의 하나이며, 그 구조가 매우 높은 상동성을 가진다. 많은 미생물의 외막 단백질 및 그에 연결된 다당류들이 미생물에 대한 숙주의 항원성(antigenicity)을 나타내는 것으로 알려져 있으므로, 백신으로서의 가치 및 중요성은 매우 크다고 할 수 있다. 실제로 *Haemophilus influenzae* 등 다른 미생물에서 외막 단백질을 순수 분리하여 백신으로 사용한 경우, 실험 동물 면역에서 80% 이상의 저항성 면역을 확인한 예도 있다[1, 16]. 또한 *P. multocida*의 많은 혈청형에서 공통적으로 나타나는 외막 단백질 H를 백신 소재로 이용함으로서, 서로 다른 혈청형의 병원균에 대한 교차 방어 면역(cross protective immunity)을 얻을 수 있는 백신을 개발할 수 있다. 따라서 *P. multocida*의 백신 개발에 있어서, 주요한 외막 단백질인 외막 단백질 H 유전자를 이용한 재조합 단백질의 생산, 항원성 검정 및 방어 면역성 확인 실험은 이 단백질을 *P. multocida*에 대한 백신으로의 개발 가능성을 타진해 보는데 기초자료를 제공하는 중요한 연구라 할 수 있다.

Table 1. Evaluation of protective immunity of the recombinant OmpH vaccinated mice against *P. multocida* challenge. The mice were challenged with intraperitoneal injection of live virulent *P. multocida* D:4 (3.42×10^3 CFU) on the tenth day after the 4th immunization, and monitored for 72 hrs. Antibody responses were measured by ELISA as described in this paper.

Immunization group	Antibody response (OD_{650}) to OmpH on day 52	Number of dead / total challenged	Survival rate (%)
PBS	0.0466±0.0138	10 / 10	0
Commercial vaccine	0.3615±0.10936	5 / 10	50
Formalin-killed whole cell	0.2545±0.06328	2 / 10	80
Recombinant OmpH	0.8353±0.04931	2 / 10	80

요 약

본 연구에서는 병원성 *Pasteurella multocida* D:4의 외막 단백질 H의 방어적 면역성과 백신으로서의 가능성을 검정하고자, 외막 단백질 H 유전자를 대장균에서 발현, Trx와 융합된 형태의 재조합 외막 단백질 H를 분리하여 면역화와 백신 실험에 항원으로 사용하였다. 면역 실험에서 재조합 외막 단백질 H는 높은 역가의 항체를 유도하였으며, 불활화한 사균 백신과 유사한 수준의 백신 효과를 나타내었다.

REFERENCES

1. Adler, B., D. Bulach, J. Chung, S. Doughty, M. Hunt, K. Rajakumar, M. Serrano, A. van Zanden, Y. Zhang, and C. Ruffolo. 1999. Candidate vaccine antigens and genes in *Pasteurella multocida*. *J. Biotechnol.* **73**: 83-90.
2. Carter, G. R. 1967. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica*. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **11**: 321-379.
3. Christodoulides, M., B. T. McGuinness, and J. E. Heckels. 1993. Immunization with synthetic peptides containing epitopes of the class 1 outer-membrane protein of *Neisseria meningitidis*: production of bactericidal antibodies on immunization with a cyclic peptide. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1729-1738.
4. Gatto, N. A., S. M. Dabo, R. E. Hancock, and A. W. Confer. 2002 Characterization of, and immune responses of mice to, the purified OmpA equivalent outer membrane protein of *Pasteurella multocida* serotype A:3 (Omp28). *Vet. Microbiol.* **87**: 221-235.
5. Haesebrouck, F., F. Pasmans, K. Chiers, D. Maes, R. Ducatelle, and A. Decostere. 2004. Efficacy vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol.* **100**: 255-268.
6. Heddleston, K. H., J. E. Gallagher, and P. A. Rebers. 1972. Fowl cholera: gel diffusion precipitin test for serotyping *Pasteurella multocida* from avian species. *Avian Dis.* **16**: 925-936.
7. Hunt, M. L., B. Adler, and K. M. Townsend. 2000. The molecular biology of *Pasteurella multocida*. *Vet. Microbiol.* **72**: 3-25.
8. Kim, H., H. Hwang, S. Lee, E. S. Park, S. D. Yoo, J. Lee, J. S. Yang, and M. Kwon. 2005. Molecular cloning and expression of a gene for outer membrane protein H in *Pasteurella multocida* (A:3): production of antisera against the OmpH. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **33**: 274-280.
9. Lee, J., S. Kang, S. I. Park, H. J. Woo, and M. Kwon. 2004. Molecular cloning and characterization of the gene for outer memebrane protein H in a *Pasteurella multocida* (D:4) isolate from pigs with atrophic rhinitis symptomes in Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 1343-1349.
10. Liao, C. M., C. Huangb, S. L. Hsuan, Z. W. Chenb, W. C. Lee, C. I. Liu, J. R. Winton, and M. S. Chien. 2006. Immunogenicity and efficacy of three recombinant subunit *Pasteurella multocida* toxin vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Vaccine* **24**: 27-35.
11. Luo, Y., J. R. Glisson, M. W. Jackwood, R. E. Hancock, M. Bains, I. H. Cheng, and C. Wang. 1997. Cloning and characterization of the major outer membrane protein gene (*ompH*) of *Pasteurella multocida* X-73. *J. Bacteriol.* **179**: 7856-7864.
12. Luo, Y., Q. Zeng, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, I. H. Cheng, and C. Wang. 1999. Sequence analysis of *Pasteurella multocida* major outer membrane protein (OmpH) and application of synthetic peptides in vaccination of chickens against homologous strain challenge. *Vaccine* **17**: 821-831.
13. Nielsen, J. P., N. T. Foged, V. Sorensen, K. Barfod, A. Bording, and S. K. Petersen. 1991. Vaccination against progressive atrophic rhinitis with a recombinant *Pasteurella multocida* toxin derivative. *Can. J. Vet. Res.* **55**: 128-138.
14. Petersen, S. K. 1990. The complete nucleotide sequence of the *Pasteurella multocida* toxin gene and evidence for a transcriptional repressor, TxaR. *Mol. Microbiol.* **4**: 821-830.
15. Petersen, S. K., N. T. Foged, A. Bording, J. P. Nielsen, H. K. Riemann, and P. L. Frandsen. 1991. Recombinant derivatives of *Pasteurella multocida* toxin: candidates for a vaccine against progressive atrophic rhinitis. *Infect. Immun.* **59**: 1387-1393.
16. Poolman, J. T., L. Bakaletz, A. Cripps, P. A. Denoel, A. Forsgren, J. Kyd, and Y. Lobet. 2000. Developing a nontypeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) vaccine. *Vaccine* **19**: S108.
17. Rhoades, K. R. and R. B. Rimler RB. 1987. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts. *Avian Dis.* **31**: 895-898.
18. To, H., S. Someno, and S. Nagai. 2005. Development of a genetically modified nontoxigenic *Pasteurella multocida* toxin as a candidate for use in vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. *Am. J. Vet. Res.* **66**: 113-120.
19. Vasfi Marandi, M. and K. R. Mittal. 1997. Role of outer membrane protein H (OmpH)- and OmpA-specific monoclonal antibodies from hybridoma tumors in protection of mice against *Pasteurella multocida*. *Infect. Immun.* **65**: 4502-4508.
20. Yagupsky, P. and A. Slonim. 2005. Characterization and immunogenicity of *Kingella kingae* outer-membrane proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**: 45-50.

(Received July 8, 2006/Accepted Sep. 7, 2006)