(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0011800
(43) 공개일자 2017년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 21/64* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5011 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0105090
(22) 출원일자 2015년07월24일
심사청구일자 2015년07월24일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
이현우
울산광역시 울주군 범서읍 울밀로 2879-8, 406동 1003호 (굴화 강변그린빌4단지)
강명균
제주특별자치도 제주시 은남2길 10, 301호 (연동, 세안주택)
(74) 대리인
유미특허법인

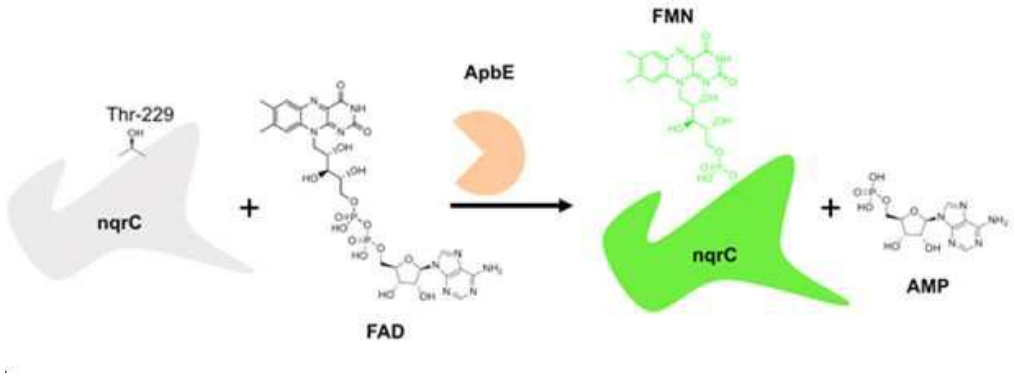
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **프로테아좀 억제제 스크리닝용 조성물 및 이를 이용한 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 NqrC 및 ApbE 단백질을 함유하는 세포를 포함하는 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 조성물, NqrC와 ApbE의 상호작용을 이용한 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포에 NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 발현시키는 발현단계; 상기 세포에 프로테아좀 억제제 후보물질을 접촉시키는 접촉단계; 및 상기 후보물질에 의해 프로테아좀의 활성이 억제되는지 여부를 측정하는 측정단계를 포함하는 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 21/64 (2013.01)
G01N 33/5044 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A1057597
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업-일반연구자지원사업-신진연구지원사업
연구과제명 효소화학반응을 이용한 살아있는 세포의 단백질체 레이블링 시스템
기 여 율 1/1
주관기관 울산과학기술대학교
연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

프로테아좀, 플라빈 모노뉴클레오티드(Flavin mononucleotide; FMN), 및 세포 내에서 발현된 NqrC (Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit C) 단백질 및 ApbE (putative thiamine-synthetic flavin transferase lipoprotein) 단백질을 함유하는 포유동물의 세포를 포함하는 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 NqrC 단백질은 소포체에 위치하고, 상기 ApbE 단백질은 세포질에 위치하는 것인, 스크리닝용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프로테아좀 억제제가 다발성 골수종(Multiple Myeloma)의 치료제인 것인, 스크리닝용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 포유동물의 세포는 포유동물에서 유래된 세포주인 (cell line), 스크리닝용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 포유동물은 인간, 침팬지, 및 쥐로 이루어진 군에서 선택된 1종이상인 것인, 스크리닝용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 조성물과, 플라빈 모노뉴클레오티드(Flavin mononucleotide; FMN)의 형광 측정기를 포함하는 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 키트.

청구항 7

프로테아좀 및 플라빈 모노뉴클레오티드(Flavin mononucleotide; FMN)을 함유하는 포유동물의 세포에, NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 도입하여 세포 내에 NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 발현시키는 단계;

상기 세포에 프로테아좀 억제제의 후보물질을 접촉시키는 접촉단계; 및

상기 후보물질에 의해 프로테아좀의 활성이 억제되는지 여부를 측정하는 측정단계;

를 포함하는 프로테아좀 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 NqrC 단백질은 소포체에 발현시키고, 상기 ApbE 단백질은 세포질에 발현시키는 것인, 스크리닝 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 측정단계는 플라빈 모노뉴클레오티드의 형광을 측정하여 수행되는 것인, 스크리닝 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 형광 측정은 형광신호(fluorescence signal) 측정, 형광세기 측정 또는 형광 이미지 측정으로 수행되는 것인, 스크리닝 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 세포는 인간, 침팬지, 및 쥐로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 스크리닝 방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 포유동물의 세포는 포유동물에서 유래된 세포주인 (cell line), 스크리닝 방법.

청구항 13

제7항에 있어서, 상기 포유동물의 세포는 포유동물의 암세포인, 스크리닝 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 암은 대장암, 폐암, 간암, 위암, 식도암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 자궁내막암, 융모암, 난소암, 유방암, 갑상선암, 뇌암, 두경부암, 악성흑색종, 림프종, 재생불량성 빈혈 및 혈액암로 이루어진 군에서 선택되는 암에서 유래된 암인 것인, 스크리닝 방법.

청구항 15

제7항에 있어서, 상기 프로테아좀 억제제가 다발성 골수종(Multiple Myeloma)의 치료제인 것인, 스크리닝용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 NqrC 및 ApbE 단백질을 함유하는 세포를 포함하는 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 조성물, NqrC와 ApbE의 상호작용을 이용한 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포에 NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 발현시키는 발현단계; 상기 세포에 프로테아좀 억제제 후보물질을 접촉시키는 접촉단계; 및 상기 후보물질에 의해 프로테아좀의 활성이 억제되는지 여부를 측정하는 측정단계를 포함하는 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 프로테아좀 억제제(Proteasome inhibitor)란 짧은 서열의 펩타이드 계열의 화합물로서 프로테아좀의 기질역할을 하는 단백질의 모방체이다. 이러한 프로테아좀 억제제는 현재 다발성 골수종(Multiple Myeloma)을 특이적으로 자가사멸(apoptosis)시켜 치료하는 치료제로 각광받고 있으며 FDA 승인을 받고 현재 시판되고 있는 Velcade 의 경우, 2013년도 한 해에 23억 달러의 매출을 올린 블록버스터 드러그 (blockbuster drug)가 되었다.

[0003] 이에 현재 수십만 내지 수백만 개의 유사형태의 화합물 라이브러리 중에서 어떤 물질이 정상세포가 아닌 암세포에만 효율적으로 프로테아좀 억제를 보이는지 고효율로 스크리닝하는 방법의 개발이 중요한 실정이며, 더욱 효과적인 항암효과를 보이는 프로테아좀 억제제를 발굴하기 위한 노력은 이어지고 있다.

[0004] 이를 위한 한 방법으로 시험관 내에서 펩타이드에 형광체와 형광 퀀처를 붙여놓고 프로테아좀에 의해서 형광체와 퀀처가 분리되면 형광이 증가하나, 프로테아좀 억제제를 넣어주었을 경우에는 프로테아좀에 의해서 형광체와 퀀처가 분리되지 않아 형광이 감소하지 않으므로, 프로테아좀 억제제 후보물질을 처리한 경우와 처리하지 않은 경우의 형광이 감소하는 정도를 비교하여 후보물질의 프로테아좀 활성억제의 유무와 정도를 측정할 수 있는 방법이 개발되고 있다.

[0005] 하지만, 기존의 방법들은 살아있는 세포 안에서 이루어지는 반응이 아니기 때문에 실제로 해당 물질이 세포 안으로 투과할 수 있는 정도나, 또는 실제로 살아있는 세포의 수많은 단백질들과 결합하지 않고 프로테아좀에 특이적으로 결합하여 억제할 수 있을지 여부는 불투명하다는 한계점을 갖고 있으며, 아직까지 박테리아 단백질간의 생화학반응을 사람의 세포에 적용하여 프로테아좀 억제제를 스크리닝하는 방법 개발에 응용한 경우도 전무하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 예는 프로테아좀, 플라빈 모노뉴클레오티드(Flavin mononucleotide; FMN), 및 세포 내에서 발현된 NqrC (Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit C) 단백질 및 ApbE (putative thiamine-synthetic flavin transferase lipoprotein) 단백질을 함유하는 포유동물의 세포를 포함하는 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명의 다른 예는 세포에 NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 발현시키는 발현단계; 상기 세포에 프로테아좀 억제제 후보물질을 접촉시키는 접촉단계; 및 상기 후보물질에 의해 프로테아좀의 활성이 억제되는지 여부를 측정하는 측정단계를 포함하는 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 플라빈모노뉴클레오티드(Flavin mononucleotide; FMN) 공유결합표식 (covalent labeling) 반응은 박테리아의 막단백질체의 일부인 NqrC와 ApbE 사이에 일어나는 특이적인 반응으로서, ApbE가 전이효소(transferase)의 역할을 하여 기질단백질에 해당하는 NqrC 단백질 표면의 229번 트레오닌에 FMN을 공유 결합시키는 반응이다.

[0009] 이에 본 발명자들은 박테리아 (예를 들어, 대장균, 비브리오, 살모넬라 등) 고유의 단백질들인 NqrC와 ApbE를 사람세포의 세포질이나 소포체 등에 발현시켰을 때에도 FMN 레이블링이 일어남을 확인하고, 특히 FMN이 녹색 형광을 지녔기 때문에 형광젤 스캐너를 통해서 사람세포에서도 FMN 레이블링 된 NqrC를 손쉽게 검출해낼 수 있다는 점을 확인하였다.

[0010] 또한, 박테리아의 막단백질들인 NqrC와 ApbE를 발현시키고, 잘 알려진 프로테아좀 억제제인 MG-132을 적용한 결과, MG-132의 농도에 비례하여 폴라빈모노뉴클레오티드 공유결합표식 반응에 의해 FMN-NqrC의 양이 증가하고 FMN의 형광도 역시 증가한다는 것을 확인하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 살아있는 세포의 소포체(Endoplasmic reticulum)에는 NqrC를 발현시키고 세포질에는 ApbE를 발현시키고, 일정 시간 후에 세포에 남아있는 NqrC 단백질 표면에 레이블링된 FMN의 형광 측정을 통해 NqrC의 양을 손쉽게 측정할 수 있게 된다.

[0012] 또한, 소포체의 NqrC는 프로테아좀에 의해서 분해되는바, 프로테아좀 억제제를 처리할 경우 NqrC의 분해가 저해되므로 세포에 남아있는 NqrC의 양이 많아지고, 따라서 FMN의 형광의 세기도 커지게 된다. 즉, 세포에 남아있는 NqrC-ER의 형광의 정도가 프로테아좀 억제제가 얼마나 프로테아좀의 활성을 잘 억제시키는지의 정도와 직결되기 때문에 이 형광의 세기를 통해 프로테아좀 억제제 후보물질의 억제활성을 바로 효율적으로 측정할 수 있다.

[0013] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0014] 본 발명은 하나의 양태로서 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 스크리닝용 조성물은 프로테아좀, 플라빈 모노뉴클레오티드(Flavin mononucleotide; FMN), 및 세포 내에서 발현된 NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 함유하는 포유동물의 세포를 포함할 수 있다.

[0016] 상기 조성물에 포함된 NqrC 단백질은 소포체에 위치하고, 상기 ApbE 단백질은 세포질에 위치할 수 있다.

[0017] 또한, 상기 프로테아좀 억제제는 다발성 골수종(Multiple Myeloma)의 치료제일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0018] 상기 포유동물의 세포는 포유동물에서 유래된 세포주(cell line) 있으며, 상기 포유동물은 인간, 원숭이, 침팬지, 쥐 등 일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0019] 본 발명의 또 하나의 양태로서 상기 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 조성물과 형광 측정기를 포함하는 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 키트를 제공한다.

[0020] 상기 형광 측정기는 플라빈 모노뉴클레오티드의 형광을 측정하는 것일 수 있으며, 상기 측정은 형광신호(fluorescence signal) 측정, 형광세기 측정 또는 형광 이미지 측정일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명은 또 하나의 양태로서 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0022] 상기 스크리닝 방법은

[0023] (a) 세포에 NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 발현시키는 발현단계;

[0024] (b) 상기 세포에 프로테아좀 억제제 후보물질을 접촉시키는 접촉단계; 및

[0025] (c) 상기 후보물질에 의해 프로테아좀의 활성이 억제되는지 여부를 측정하는 측정단계;

[0026] 를 포함할 수 있다.

[0027] 상기 발현단계는 프로테아좀 및 플라빈 모노뉴클레오티드(Flavin mononucleotide; FMN)을 함유하는 포유동물의 세포에, NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 도입하여 세포 내에 NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 발현시키는 단계일 수 있다.

[0028] 또한, 상기 발현단계에 있어서 NqrC 단백질은 소포체에 발현시키고 ApbE 단백질은 세포질에 발현시키는 것일 수 있다.

[0029] 상기 측정단계에 있어서, 측정은 형광 측정을 통하여 수행하는 것일 수 있으며, 상기 형광 측정은 형광신호(fluorescence signal) 측정, 형광세기 측정, 형광 이미지 측정 등을 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 상기 형광은 플라빈 모노뉴클레오티드(Flavin mononucleotide; FMN) 형광일 수 있으며, 예를 들어 박테리아의 막단백질인 NqrC와 ApbE 사이에 일어나는 특이적인 반응인 플라빈모노뉴클레오티드 공유결합표식(covalent labeling) 반응에 의하여 ApbE가 전이효소(transferase)의 역할을 하여 기질단백질에 해당하는 NqrC 단백질 표면의 229번 트레오닌에 FMN을 공유 결합시킨 형광 일 수 있다.

[0031] 상기 포유동물의 세포는 포유동물에서 유래된 세포주(cell line) 있으며, 상기 포유동물은 인간, 원숭이, 침팬지, 쥐 등 일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0032] 또한, 상기 세포는 암 세포일 수 있으며, 상기 암은 대장암, 폐암, 간암, 위암, 식도암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 자궁경부암, 자궁내막암, 융모암, 난소암, 유방암, 갑상선암, 뇌암, 두경부암, 악성흑색종, 림프종, 재생불량성 빈혈, 혈액암 등일 수 있으며, 예를 들어, 혈액암, 구체적으로 다발성 골수종(Multiple Myeloma)일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0033] 본 발명은 NqrC 및 ApbE 단백질을 함유하는 세포를 포함하는 프로테아좀 억제제의 스크리닝용 조성물, NqrC와 ApbE의 상호작용을 이용한 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 세포에 NqrC 단백질 및 ApbE 단백질을 발현시키는 발현단계; 상기 세포에 프로테아좀 억제제 후보물질을 접촉시키는 접촉단계; 및 상기 후보물질에 의해 프로테아좀의 활성이 억제되는지 여부를 측정하는 측정단계를 포함하는 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 생명공학기술, 질병진단, 프로테오믹스, 의약품 스크리닝, 단백질 제재 의약품 개발 등에 이용될 수 있으며, 특히 암 치료용 후보물질 스크리닝에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명에 따른 NqrC와 ApbE 단백질 간의 플라빈 전이효소 반응을 나타낸 그림이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 NqrC와 ApbE 단백질 간의 플라빈 전이효소 반응을 사람 세포의 세포질 공간에서 수행하여 플라빈 레이블링이 성공적으로 일어남을 측정한 결과를 보여주는 젤 스캐닝 사진이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 NqrC와 ApbE 단백질 간의 플라빈 전이효소 반응을 사람 세포의 세포질 공간에서 수행하여 발현 정도를 측정한 시험 결과를 보여주는 사진이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 소포체에 NqrC를 발현시키고, 세포질에 ApbE를 발현시킨 사람 세포에, MG-132 2uM을 처리한 후 젤 스캐닝하여 젤 상의 형광을 측정한 결과를 보여주는 사진이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 소포체에 NqrC를 발현시키고, 세포질에 ApbE를 발현시킨 사람 세포에, MG-132 2uM을 처리한 후 Anti-Flag 웨스턴 블롯으로 NqrC의 발현 정도를 측정한 결과를 보여주는 사진이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 소포체에 NqrC를 발현시키고, 세포질에 ApbE를 발현시킨 사람 세포에, MG-132 2uM을 처리한 후 Anti-V5 웨스턴 블롯으로 ApbE의 발현 정도를 측정한 결과를 보여주는 사진이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 소포체에 NqrC를 발현시키고, 세포질에 ApbE를 발현시킨 사람 세포에, MG-132를 농도별로 처리한 후 젤 스캐닝하여 젤 상의 형광을 측정한 결과를 보여주는 사진이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 소포체에 NqrC를 발현시키고, 세포질에 ApbE를 발현시킨 사람 세포에, MG-132를 농도별로 처리한 후 형광을 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 소포체에 NqrC를 발현시키고, 세포질에 ApbE를 발현시킨 사람 세포에, MG-132를 농도별로 처리한 후 Anti-Flag 웨스턴 블롯으로 NqrC의 발현 정도를 측정한 결과를 보여주는 사진이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 소포체에 NqrC를 발현시키고, 세포질에 ApbE를 발현시킨 사람 세포에, MG-132를 농도별로 처리한 후 Anti-Flag 웨스턴 블롯으로 NqrC의 발현 정도를 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1. 세포에서 단백질 발현**

[0038] **1-1. 재조합 벡터 제작**

[0039] NqrC 및/또는 ApbE를 세포질에 발현시키기 위해, NES (nuclear exclusion signal)의 염기서열(서열번호 1)을 Flag-NqrC(서열번호 3) 및/또는 V5-ApbE(서열번호 4)에 각각 프라이머 서열을 이용하여 결합하고 (서열번호 5 내지 8), NotI과 XhoI을 삽입한 프라이머로 증폭하여 pCDNA3(Invitrogen, 미국) 벡터에 클로닝하여 재조합 벡터를 제조하였다.

표 1

[0040]

서열번호	명명	서열목록 (5' -> 3')
5	NqrC primer_F (NotI & XhoI)	TAGTAGgcggccgccaccATGgactacaaggatgacgacgataagATGGGTGACCAGCAAAAAGCTAAC
6	NqrC primer_R (NotI & XhoI)	TAGTAGctcgagTCATTAGTCCAGGGTCAGGCGCTCCAGGGGGGGCAGCTGCAGGGATCCATTCAGACCTCCGTCACGAACTTTTGC
7	ApbE primer_F (NotI & XhoI)	TAGTAGgcggccgccaccATGGGCAAGCCCATCCCCAACCCCCTGCTGGGCCTGGACAGCACCATGGAAAAGCCCGCAGAGCAG
8	ApbE primer_R (NotI & XhoI)	TAGTAGctcgagTCATTAGTCCAGGGTCAGGCGCTCCAGGGGGGGCAGCTGCAGGGATCCCTTACTTAAAAACGGTTTAAAGCTGCTTG

[0041] NqrC 및/또는 ApbE를 소포체 내막에 발현시키기 위해, 소포체 타겟팅 단백질(KDEL; Lys-Asp-Glu-Leu)을 암호화하는 염기서열(서열번호 2)을 Flag-NqrC(서열번호 3) 및/또는 V5-ApbE(서열번호 4)에 각각 프라이머 서열을 이용하여, ApaI과 SalI을 삽입한 프라이머(서열번호 9 내지 12)로 증폭하여 pDisplay(Invitrogen, 미국) 벡터에 클로닝하여 재조합 벡터를 제조하였다.

표 2

[0042]

서열번호	명명	서열목록 (5' -> 3')
9	NqrC primer_F (ApaI & SalI)	TAGTAGGGGCCCAGCCGGCCAGATCTGGCGGCgactacaaggatgacgacgataagATGGGT
10	NqrC primer_R (ApaI & SalI)	TAGTAGGTCGACTTATCAcagctcgtccttGGCGCTATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGGGGCCAAGCTTCG
11	ApbE primer_F (ApaI & SalI)	TAGTAGGGGCCCAGCCGGCCAGATCTGGCGGCGGCAAGCCCATCCCCAACCCCCT
12	ApbE primer_R (ApaI & SalI)	TAGTAGCCGCGGTTATCAcagctcgtccttGTCGACGGCGCTATTCAGATCCTCTTC

[0043] 재조합 과정은 본 분야에 잘 알려진 통상의 방법에 따라 수행하였으며, 상기 NqrC 및/또는 ApbE를 발현시키기

위한 플라스미드의 구성 및 특징을 하기 표 3에 정리하여 나타내었다.

표 3

[0044]

플라스미드	특징	Promoter/ Vector	세부사항
ApbE-NES	*Not I*-V5-ApbE-NES-Stop-*Xho I* 세포질 발현	CMV/pCDNA3	NES: LQLPPLERLTLD V5: GKPIPNPLLGLDST
NqrC-NES	*Not I*-Flag-NqrC-NES-Stop-*Xho I* 세포질 발현	CMV/pCDNA3	Flag: DYKDDDDK NES: LQLPPLERLTLD
ApbE-ER	*Apa I*-ss-*Bgl II*-V5-ApbE-KDEL-Stop-*Sal I* 소포체 내막 발현	CMV/pDisplay	KDEL: ER retention motif
NqrC-ER	*Apa I*-ss-*Bgl II*-Flag-NqrC-KDEL-Stop-*Sal I* 소포체 내막 발현	CMV/pDisplay	KDEL: ER retention motif

[0045] **2-2. 형질전환 및 단백질 발현**

[0046] 하기 표 4에 나타낸 바와 같이, Lane 1 및 Lane 5는 NqrC 및 ApbE를 모두 세포질에 발현시켰으며, 구체적으로, 실시예 1-1에서 제조한 재조합 벡터 ApbE-NES와 NqrC-NES를 배양된 HEK293T 세포 (한국세포주은행)에 트랜스펙션 리에이전트인 (transfection reagent) 리포펙타민 2000 (Lipofectamine 2000)을 사용하여 동시에 도입시키고 24시간 동안 단백질을 발현시켰다.

[0047] 다만, Lane 1 및 5의 단백질 발현의 경우, FAD 처리 여부에 따른 ApbE에 의한 NqrC의 FMN 레이블링 반응이 일어나는지 측정하고자, Lane 1의 단백질 발현 시에는 FAD 처리를 하지 않고, Lane 5의 단백질 발현 시에 FAD를 처리하였다.

[0048] 그 다음, 단백질이 발현된 세포를 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)로 파이펫팅하여 1.5ml 마이크로튜브에 옮긴 후, 1,500g에서 5분간 원심 분리하여 세포를 분리하였다.

[0049] Lane 2 및 Lane 3은 각각 NqrC와 ApbE를 단독으로 발현시켜 ApbE에 의한 NqrC의 FMN 레이블링 반응이 일어나는지 측정하고자, Lane 1의 실험방법과 동일한 방법으로 단백질 발현과정에서 FAD 처리를 하지 않고, 각각 NqrC-NES 또는 ApbE-NES를 HEK293T 세포에 형질전환하여 NqrC 또는 ApbE를 단독으로 발현시키고, 단백질이 발현된 세포를 DPBS로 1,500g에서 5분간 원심 분리하였다.

[0050] Lane 4는 상기 Lane 1의 단백질 발현과 동일한 방법으로 수행하였으며, 다만 NqrC 단백질의 플라빈이 달리는 위치인 229번째의 트레오닌을 알라닌으로 치환시킨 T229A 돌연변이가 들어간 NqrC 돌연변이를 단백질 발현과정에서 FAD 처리를 하지 않고 발현시킨 후, 단백질이 발현된 세포를 DPBS로 1,500g에서 5분간 원심분리하였다.

[0051] 하기 표 4에 각 Lane의 단백질의 발현위치 및 FAD 처리 여부를 정리하여 표시하였다.

표 4

[0052]

Lane	nqrC	ApbE	FAD 처리
1	NES	NES	무처리
2	NES	-	무처리
3	-	NES	무처리
4	NES(T229A)	NES	무처리
5	NES	NES	100uM
6	-	-	무처리

[0053] **실시예 2. 단백질 발현 확인**

[0054] **2-1. 젤 스캐닝을 통한 확인**

[0055] nqrC 및 ApbE 의 발현여부를 확인하고자, 실시예 1의 각 Lane에서 원심분리를 통해 분리된 세포 펠릿과 상층액은 버린 후, 프로테아좀 저해제 칵테일 (Protease inhibitor cocktail), PMSF(phenylmethylsulfonylfluoride), 및 퀸처 용액이 첨가된 RIPA 버퍼(Roche, 스위스)로 세포를 모두 용해시켰다. 그 후, 4℃의 온도에서 원심분리

기를 이용하여 20,000g로 10분간 원심분리하여 상층액을 수득하였다.

[0056] 그 다음, 수득한 상층액들 각각을 10ul씩 SDS-PAGE 젤에 로딩하고 150V에서 약 1시간동안 전기영동을 수행하고, SDS-PAGE 젤을 Fluorescence Gel Scanner (GE Typhoon)를 이용하여 젤 상의 단백질들의 형광시그널을 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었다. 형광시그널은 NqrC와 ApbE가 같은 위치에 발현되었을 때에만 겔 상에서 관찰할 수 있다.

[0057] 도 2에서 확인 할 수 있듯이, 박테리아 단백질인 NqrC와 ApbE는 사람세포의 세포질에서도 발현도 잘 되며(Lane 1 및 5), ApbE에 의한 NqrC의 FMN 레이블링이 매우 특이적으로 일어난다는 것을 확인할 수 있었으며, NqrC에 229번째의 위치에 아미노산을 다른 아미노산으로 바꾸었을 경우 NqrC가 제대로 작용하지 않는 것을 확인하였다.

[0058] 또한, 세포질 이외의 공간인 소포체 안 공간(endoplasmic reticulum lumen)에서 nqrC를 발현시켰을 때는 단백질의 발현 정도가 매우 약한 것을 통하여 소포체 내에서는 nqrC가 불안정하게 존재한다는 것을 확인하였다.

[0059] 또한, 이 반응의 기질로 사용되는 FAD를 배지에 처리한 비교예(Lane 5)와 처리하지 않은 실시예(Lane 1)의 단백질 발현 정도를 비교한 결과, FAD 처리에 의한 형광증가 효과가 미미한 것으로 볼 때 세포 내에는 반응을 일으킬 수 있는 FAD가 충분함을 확인하였다.

[0061] **2-2. 웨스턴 블랏을 통한 확인**

[0062] 실시예 2-1을 수행한 후에 얻어진 SDS-PAGE 젤에서, 젤에 존재하는 단백질 샘플은 니트로셀룰로스막(Nitrocellulose membrane)으로 옮긴 후, ponceau 염색을 통해 전체 단백질 양을 확인하였다. TBST용액으로 ponceau를 제거하고, 2%의 dialysis된 BSA 용액으로 1시간 동안 상온에서 교반하였다. 2%의 투석(dialysis)된 BSA 용액에 anti-Flag 항체를 10000:1로 희석하여 1시간동안 상온에서 교반하였다. 1번당 5분씩 총 4회 TBST(mixture of Tris-Buffered Saline and Tween 20)로 막을 세척하였다. 현상액으로 현상 한 후 이미징하여 Flag-NqrC 단백질을 관찰 및 기록하였다. Anti-Flag 웨스턴 블랏으로 NqrC의 발현 정도를 측정하고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0063] 도 3에서 확인할 수 있듯이, nqrC는 세포질에서 안정적으로 발현한다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 젤 스캐닝 결과 (도2) 와 비교할 때, Lane1 및 5에서는 발현된 NqrC가 동시에 형질전환된 ApbE에 의해서 FMN 레이블링 되므로 젤 스캐닝에서도 밴드가 나타남을 볼 수 있다. 반면 Lane 2의 경우는 NqrC만 발현시킨 경우로, ApbE가 없기 때문에 형광 레이블링이 일어나지 않아서 젤 스캐닝에서 형광 밴드가 나타나지 않았다. 이 결과가 의미하는 바는 포유동물 세포에는 ApbE의 역할을 하는 단백질이 존재하지 않는다는 것을 알 수 있다. 또한, Lane 4의 경우는 NqrC에 FMN이 레이블링되는 사이트인 229번째 자리가 트레오닌에서 알라닌으로 돌연변이되었기 때문에 ApbE와 동시에 형질전환시켰음에도 젤 스캐닝에서 형광밴드가 나타나지 않았다. 이런 일련의 Negative control 결과를 종합해볼 때, ApbE와 NqrC의 반응은 서로 매우 특이적으로 일어난다는 것을 알 수 있으며, 사람세포를 비롯한 포유동물 세포질에는 이와 유사한 단백질이 존재하지 않음을 알 수 있다.

[0065] **실시예 3. 프로테아좀 억제제 스크리닝**

[0066] NqrC과 ApbE를 서로 다른 세포소기관에 발현시켜 ApbE에 의한 NqrC의 FMN 레이블링 반응이 일어나는지 측정하였다.

[0067] 구체적으로, 실시예 1과 동일한 방법으로 NqrC와 ApbE를 각각 하기 표 3에 나타낸 바와 같이 단백질의 발현위치를 달리하여 발현시키고, 상층액을 수득하였다. 다만, Lane 2, 4, 및 6에 대해서는 MG132 stock 2uM을 처리하였다.

[0068] NqrC과 ApbE의 발현여부를 확인하고자, 실시예 2의 젤 스캐닝을 실시하여 그 결과를 도 4에 나타내었으며, 웨스턴 블랏 실험을 수행하여 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

표 5

[0069]

Lane	Flag-nqrC 위치	V5-ApbE 위치	MG132 stock
1	ER	-	-
2	ER	-	2uM
3	-	NES	-

4	-	NES	2uM
5	ER	NES	-
6	ER	NES	2uM
7	-	-	-

[0070] 도 5 및 6의 웨스턴 블랏 결과에서 확인할 수 있듯이, 프로테아좀 억제제인 MG132 처리 여부와 관계없이 Lane 5번과 6번은 동일한 위치에서 단백질을 발현하나, 도 4의 형광 이미지에서 확인할 수 있듯이, 프로테아좀 억제제를 처리하지 않은 Lane 5번은 형광을 관찰할 수 없으며, 프로테아좀 억제제를 처리한 Lane 6번에서 형광을 관찰할 수 있었다.

[0072] **실시예 4. 프로테아좀 억제제의 농도에 따른 형광 세기 관찰**

[0073] 실시예 1과 동일한 방법으로 NqrC를 소포체에 발현시키고 ApbE를 세포질에 발현시킨 후에, 하기 표 6에 나타낸 바와 같이 프로테아좀 억제제인 MG-132를 다양한 농도(100nM, 1uM, 2uM, 5uM)로 배지에 처리한 후 12시간 동안 반응하였다. 그 후, 실시예 2와 실질적으로 동일한 방법으로 젤 스캐닝한 결과를 도 7 및 8에 나타내었으며, 웨스턴 블롯 실험을 수행한 결과를 도 9 및 10에 나타내었다.

표 6

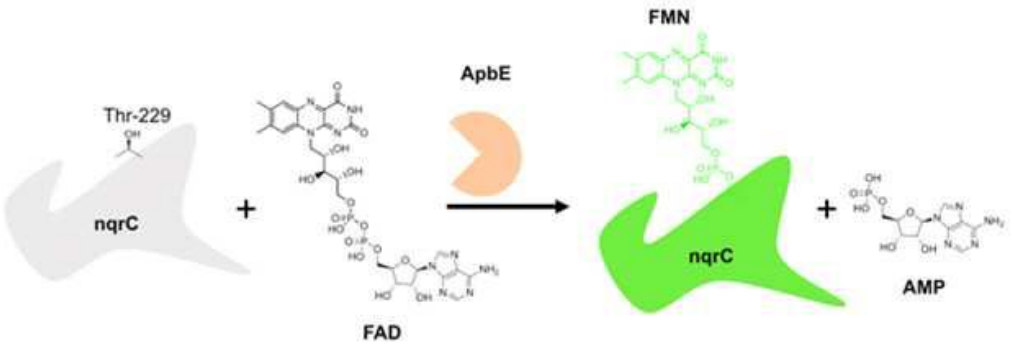
[0074]

Lane	Flag-nqrC 위치	V5-ApbE 위치	MG132 stock
1	ER	NES	-
2	ER	NES	(DMSO 1ul)
3	ER	NES	100nM
4	ER	NES	1uM
5	ER	NES	2uM
6	ER	NES	5uM
7	-	-	-

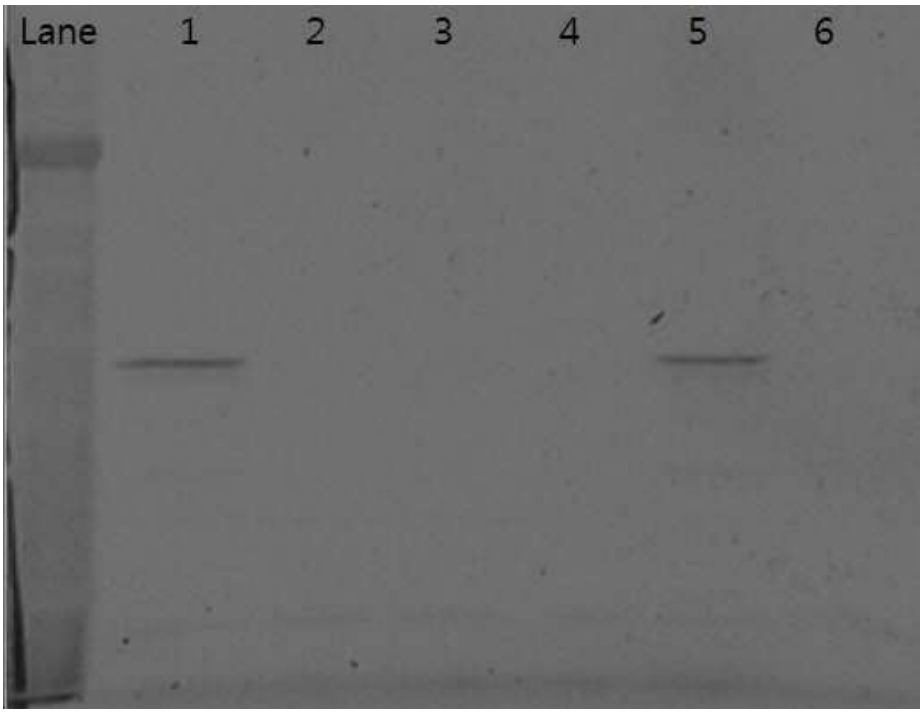
[0075] 도 7 내지 10에서 확인할 수 있듯이, NqrC를 소포체에 발현시키고 ApbE를 세포질에 발현시키는 경우, NqrC의 발현 정도가 굉장히 낮은 것을 확인할 수 있다. 이는 NqrC가 pH가 낮은 ER에서는 온전한 구조를 갖지 못한 비접철된 구조(unfolded structure)를 갖고 세포질로 수송되어서 프로테아좀에 의해서 분해되는 단백질 열림 반응(Unfolded Protein Response; UPR)을 따르기 때문이라고 추정된다. 이에 프로테아좀 억제제인 MG-132를 농도별로 넣어주었을 때, NqrC의 분해 정도가 확연히 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 ApbE에 의한 형광 레이블링 정도도 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 7 및 8). 이러한 결과는 NqrC/ApbE 시스템이 프로테아좀 억제제 스크리닝 방법으로 유용하게 쓰일 수 있다는 것을 보여주는 좋은 예이다.

도면

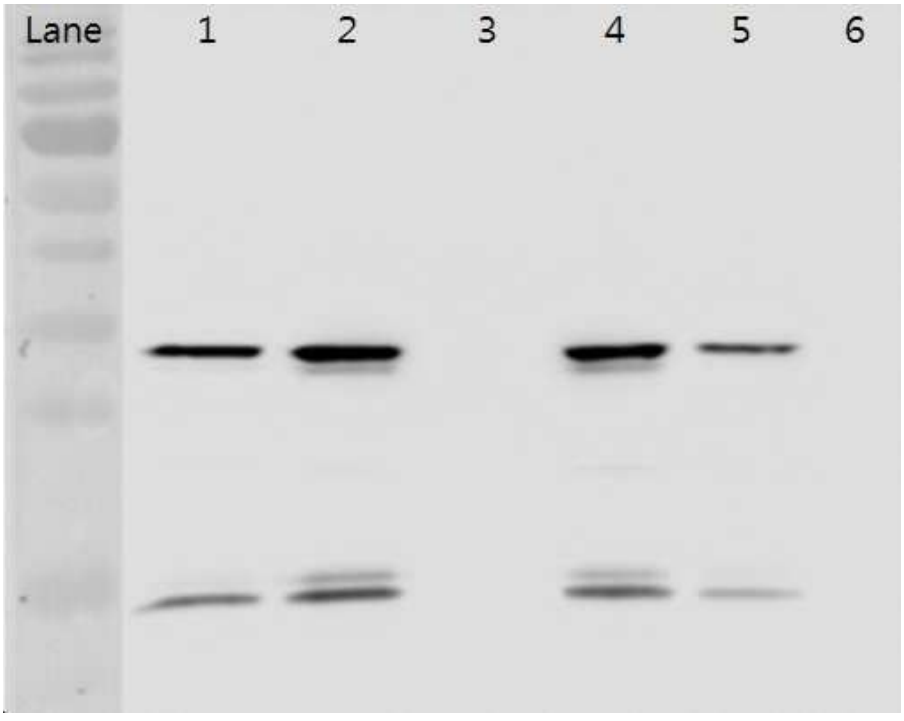
도면1



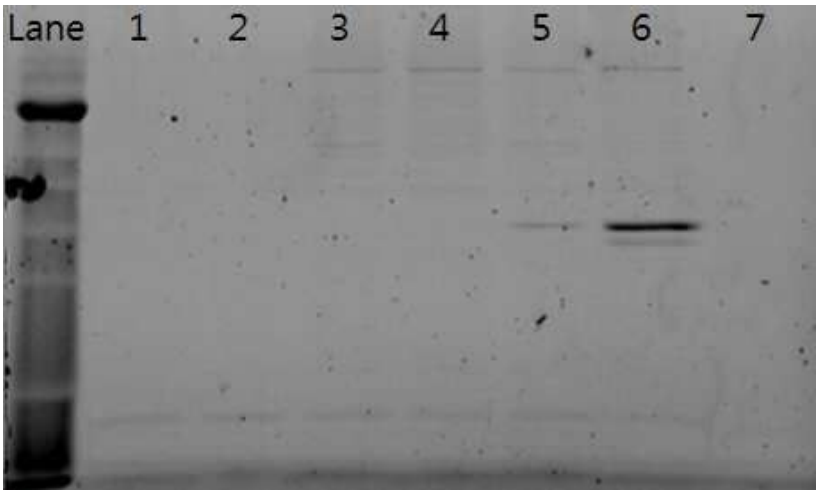
도면2



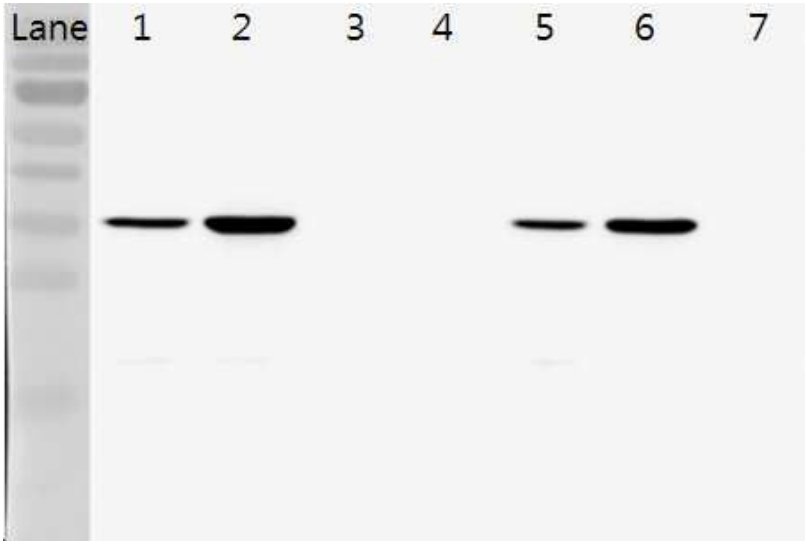
도면3



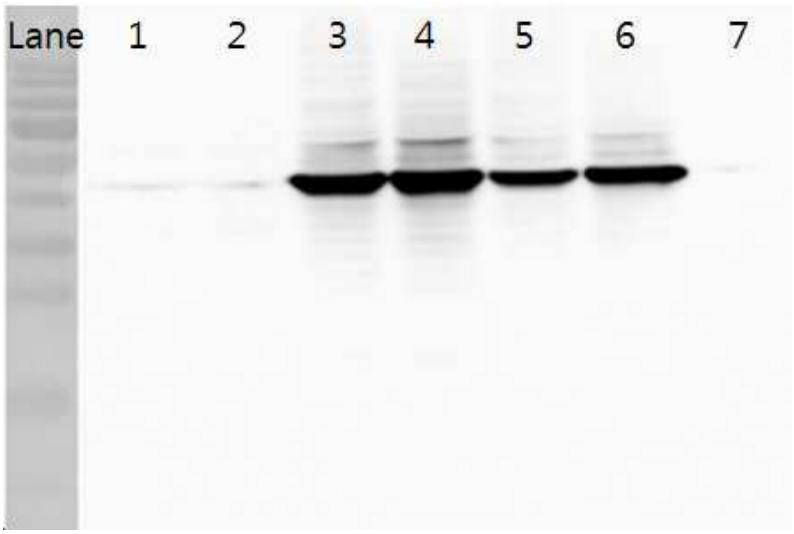
도면4



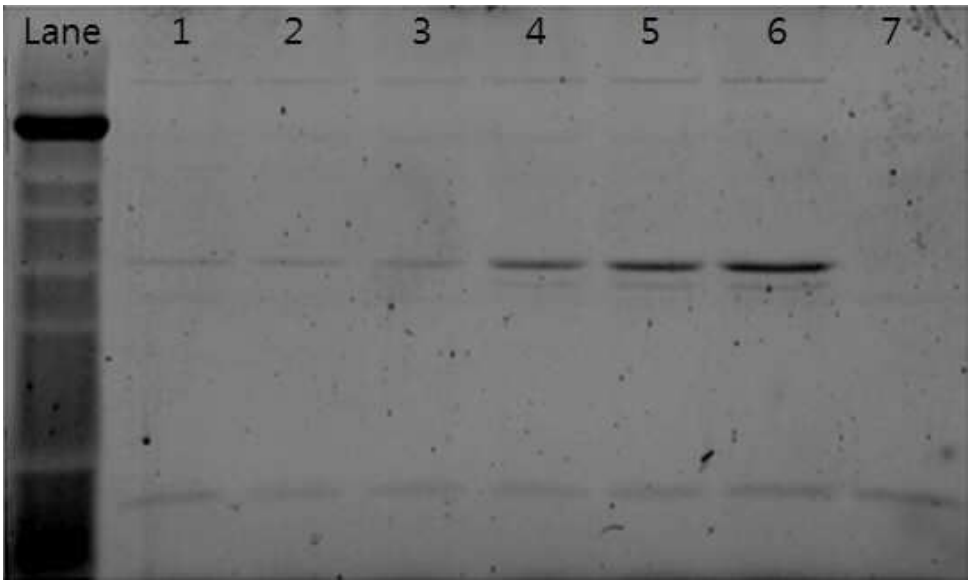
도면5



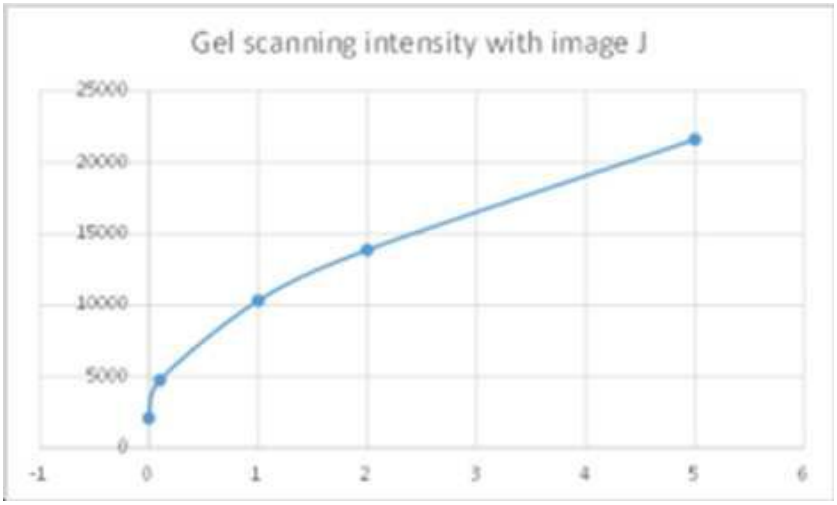
도면6



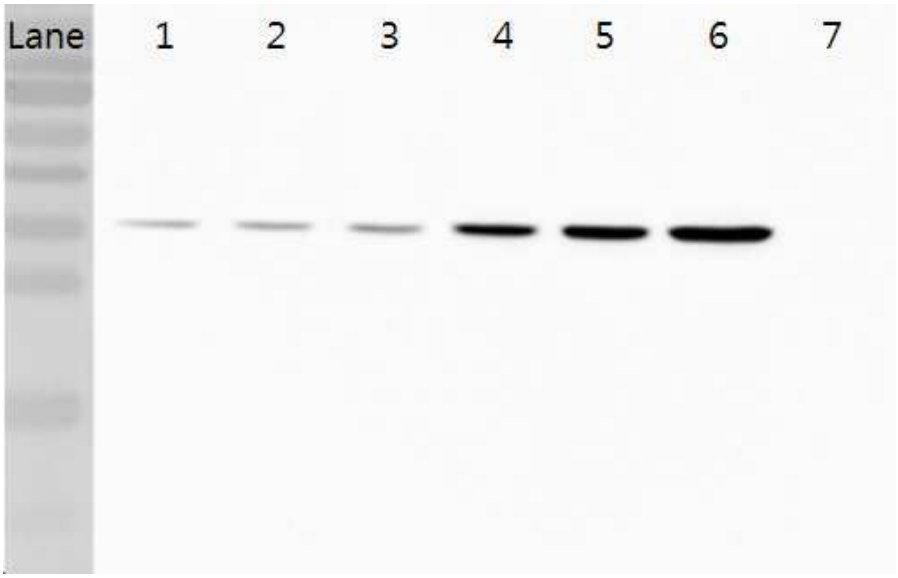
도면7


Lane
1
2
3
4
5
6
7

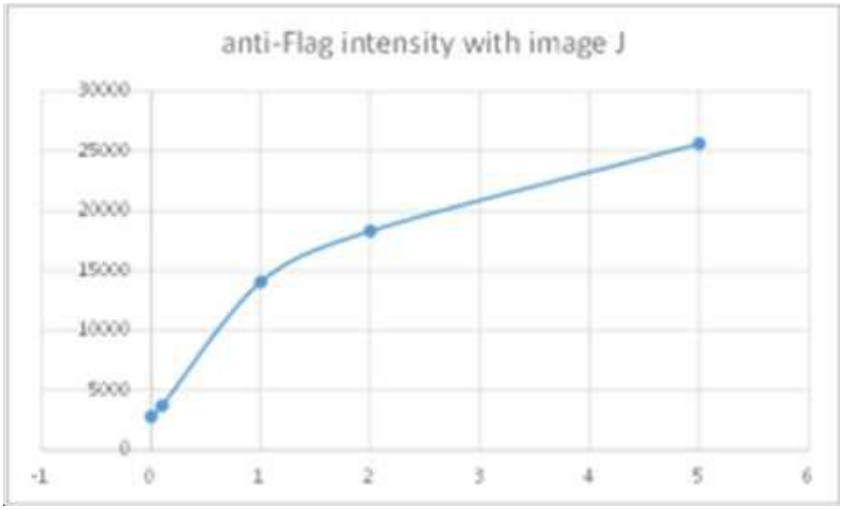
도면8


Gel scanning intensity with image J
25000
20000
15000
10000
5000
0
-1
0
1
2
3
4
5
6

도면9



도면10



서 열 목 록

<110> UNIST ACADEMY-INDUSTRY RESEARCH CORPORATION

<120> composition for screening of proteasome inhibitor and method for screening of proteasome inhibitor using the same

<130> DPP20146248KR

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NES

<400> 1

ctgcagctgc ccccctgga gcgcctgacc ctggac 36

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> KDEL

<400> 2

aaggacgagc tg 12

<210> 3

<211> 711

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Flag-NqrC

<400> 3

gactacaagg atgacgacga taagatgggt gaccagcaaa aagctaacgc tgtactagat 60

aagcaatcta agatcatcga agttgcgggt atcgacgctg aaggtaagaa agttcctgag 120

ctatttgctg agtacatcga acctcgtcta gttgacttca aaactggtga ttttgtagag 180

aaagctgaag acggctctac agcagctaac tacgaccaac gtaaagcagc taaagatcct 240

gctgagtcta tcaagctaac ggctgatgaa gacaaagcta agatcctacg tcgtgctaac 300

acaggtatcg tttacctagt gaaaagtggt gatgacattt ctaaagttat catcccagtt 360

cacggtaacg gtctatggtc tatgatgtac gcattcgttg cggttgaaac tgacggtaac 420

actgtgtctg gtattactta ctacgagcaa ggtgaaactc ctggacttgg tggtgaagta 480

gaaaacccag catggcgtgc tcaattcgtt ggtaagaaac tattcgacga gaaccacaaa 540

ccagcaatca agattgttaa aggtggtgct ccagaaggtt ctgaacacgg cgttgatggc 600

ctatctggtg cgacactaac tggtaacggt gttcaaggta catttgactt ctggttaggt 660

gacatgggct ttggtccttt cctagcaaaa gttcgtgacg gaggtctgaa t 711

<210> 4

<211> 996

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> V5-ApbE

<400> 4

ggcaagccca tccccaaccc cctgctgggc ctggacagca ccatggaaaa gcccgcagag 60

caggtacatc tcagtggccc aactatggga accacttaca acatcaaata cattcaacag 120

ccgggaattg cggattcgaa aacactgcaa accgagattg atcgactcct tgaagaagtg 180

aacgatcaaa tgtcgactta ccgtaaagac tctgagctca gccgttttaa ccagcatacc 240

agtagcgaac cttttgccgt ttctacacaa acgttaaccg tggtgaaaga ggcgattcgt 300

ttgaacggtc ttactgaagg tgctttagat gtgaccgtcg gacctttggt taatctgtgg 360

ggatttggcc ctgaagcccg tcctgatgtg gtaccaaccg atgaagagct gaatgcgcgt 420

cgtgctatta ctggcattga gcatctgacg attgaaggga atacgctgag taaagatatt 480

cctgaactgt atgtcgactt gtctacgatt gccaaaggtt ggggagtaga tgtggtcgcc 540

gattaccttc aatctcaagg tatcgaaaac tacatggtag aaattggcgg agaaatccgt 600

ttgaaaggac tgaaccgtga tggtgttccc tggcgtattg cgatagaaaa gccaagtgtt 660

gatcagcgta gtgtacaaga gatcatcgaa ccgggtgatt atgcgatcgc aacctccggt 720

gattaccgta actactttga gcaagatggc gttcgttact cgcatatcat cgatccaact 780

accggacgcc caatcaataa ccgcgtggtc tccgtgacgg tactggataa gtcttgtatg 840

acggcggatg gcttagcgac aggcttgatg gtcatgggcg aagagcgtgg tatggctgtc 900

gcagaagcca accagatccc ggttttaatg attgtgaaaa cggatgatgg ctttaaagag 960

tacgcatcaa gcagctttaa accgttttta agtaag 996

<210> 5

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NqrC primer_F(NotI & XhoI)

<400

> 5

tagtaggcgg ccgccaccat ggactacaag gatgacgacg ataagatggg tgaccagcaa 60

aaagctaac 69

<210> 6

<211> 87

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NqrC primer_R(NotI & XhoI)

<400> 6

tagtagctcg agtcattagt ccagggtcag gcgctccagg gggggcagct gcagggatcc 60

attcagacct ccgtcacgaa cttttgc 87

<210> 7

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApbE primer_F(NotI & XhoI)

<400> 7

tagtaggcgg ccgccaccat gggcaagccc atccccaacc ccctgctggg cctggacagc 60

accatggaaa agcccgcaga gcag 84

<210> 8

<211> 89

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApbE primer_R(NotI & XhoI)

<400> 8

tagtagctcg agtcattagt ccagggtcag gcgctccagg gggggcagct gcagggatcc 60

cttacttaaa aacggtttaa agctgcttg 89

<210> 9

<211> 62

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NqrC primer_F(ApaI & SalI)

<400> 9

tagtaggggc ccagccggcc agatctggcg gcgactacaa ggatgacgac gataagatgg 60

gt 62

<210> 10

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NqrC primer_R(ApaI & SalI)

<400> 10

tagtaggtcg acttatcaca gctcgtcctt ggcgctattc agatcctctt ctgagatgag 60

tttttgttcg gggccaagct tcg 83

<210> 11

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApbE primer_F(ApaI & SalI)

<400> 11

tagtaggggc ccagccggcc agatctggcg gcggcaagcc catccccaac cccct 55

<210> 12

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ApbE primer_R(ApaI & SalI)

<400> 12

tagtagccgc ggttatcaca gctcgtcctt gtcgacggcg ctattcagat cctcttc 57