



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0107699
(43) 공개일자 2008년12월11일

(51) Int. Cl.

A61K 38/43 (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0055809

(22) 출원일자 2007년06월08일

심사청구일자 2007년06월08일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

윤대진

경남 사천시 용현면 선진리 517번지

(74) 대리인

김동완

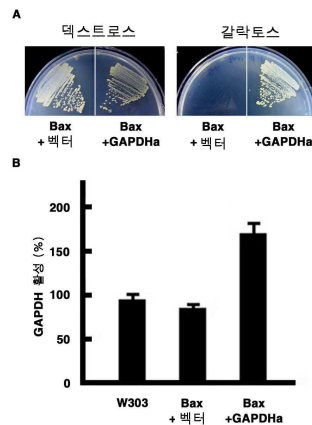
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제를주성분으로 하는 활성산소 억제제

(57) 요약

본 발명은 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제를 주성분으로 하는 활성산소 억제제에 관한 것이다. 또한 본 발명은 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제를 사용하여 H_2O_2 등의 활성산소 생성을 억제함으로써 H_2O_2 등의 활성산소로 야기되는 세포 사멸을 억제할 수 있는 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제의 활성산소 억제방법 및 이를 통한 세포 사멸 억제방법에 관한 것이다.

대표도



특허청구의 범위

청구항 1

글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제(EC 1.2.1.9)를 주성분으로 하는 활성산소 억제제

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 활성산소는 H₂O₂임을 특징으로 활성산소 억제제

청구항 3

글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제를 사용하여 활성산소 생성을 억제함으로써 활성산소로 야기되는 세포 사멸의 억제방법

청구항 4

글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제를 통해 Bax 단백질 또는 열 충격에 의해 유도된 세포 사멸의 억제방법

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <6> 본 발명은 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제(EC 1.2.1.9)를 주성분으로 하는 활성산소 억제제에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제를 사용하여 H₂O₂ 등의 활성산소 생성을 억제함으로써 H₂O₂ 등의 활성산소로 야기되는 세포 사멸을 억제할 수 있는 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제의 활성산소 억제방법 및 이를 통한 세포 사멸 억제방법에 관한 것이다.
- <7> 모든 유기체는 그들의 일생동안 증식, 분화 및 세포 사멸의 과정을 지니는 세포로 구성된다. 세포예정사(PCD)로 알려진 세포 사멸의 한 유형은 동물과 식물 모두에서 성장과 생리에서 필수적인 역할을 하는 유전적으로 조절된 과정이다(Dangl et al., 2000; Williams and Smith, 1993). PCD의 과정은 환경적인 인자와 질병에 반응하여 예정되지 않은 초과된, 감염된 또는 손상된 세포의 제거를 위해 중요하다(Wills et al., 2003; Steller, 1995). 동물체내에서 대부분의 공지된 세포 사멸 조절요소는 Bcl-2군이다. Bcl-2군의 조절자는 세포 생존과 세포 사멸 모두에서 중요한 조절인자이다(Gross et al., 1999). 일부 Bcl-2 단백질(항-아포토시스 인자 Bcl-2, Bcl-W, Bcl-X_L, Bfl-1, Mcl-1 및 A1과 같은)은 세포 생존을 촉진하는 반면에 다른 단백질들은(아포토시스 증진 인자인 Bax, Bak, Bcl-X_S, Bid, Bik, Hrk 및 Bok와 같은) 세포 사멸을 촉진한다.
- <8> 비록 식물체와 효모 게놈 내에서 Bcl-2군의 서열 상동성이 확인되지 않았지만, Bcl-2군의 세포사멸 증진 요소인 Bax는 효모와 식물체 내에서 세포 사멸을 유도한다(Hanada et al., 1995; Greenhalf et al., 1996; Lacomme and Santa Cruz, 1999). 또한 효모내에서 Bax-유도된 세포예정사는 Bcl-2, Bcl-X_L과 같은 Bcl-2군항-아포토시스 인자와의 공동발현에 의해 억제될 수 있다(Hanada et al., 1995; Greenhalf et al., 1996; Jurgensmeier et al., 1997). 효모와 생물체내에서 활성 산소(ROS)는 Bax-유도된 세포 사멸에 관련되어 있다(Moon et al., 2002; Kawai-Yamada et al., 2004). Bax에 의한 식물 세포 사멸의 표현 양태는 담배(Lacomme and Santa Cruz, 1999)와 아라비도시스(Baek et al., 2004; Kawai-Yamada et al., 2001)내에서 식물의 과민성 반응과 유사하다. 카르복실-말단 멤브레인 투과(TM) 부위는 미토콘드리아에서 Bax 단백질을 목표로 하고, Bax의 TM 부위의 결실은 치명적으로 단백질을 파괴한다(Baek et al., 2004; Lacomme and Santa Cruz, 1999; Kawai-Yamada et al., 2001). 그러므로 미토콘드리아에서 Bax의 타겟팅은 또한 식물체내에서 세포 사멸을 위해 중요하다.
- <9> 동물, 효모 및 식물체내에서 Bax-유도된 세포 사멸에 관한 관찰은 이 메커니즘의 일부 구성요소가 다양한 유기체의 사이에서 보존되어 있다는 것을 제시한다. 본 발명자들은 식물체내에서 Bax-유도된 세포 사멸의 억제물

질을 확인하기 위해 효모 상보체를 강력한 유전적 도구로 사용하였다(Moon et al., 2002). 식물의 cDNA 라이브러리는 효모 세포 내로 Bax 유전자와 공동 형질전환되었고, Bax-유도된 세포 사멸을 억제할 수 있는 과발현된 유전자를 분리하였다. 본 발명자들은 이전에 2개의 Bax-억제 단백질, sAPX 및 AtNDPK2의 기능을 보고한바 있다. 본 발명에서 본 발명자들은 아라비도시스 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제 A 유형(GAPDH_A)의 세포 사멸 억제 기능을 상세하게 규명하였다. 본 발명자들은 아라비도시스 GAPDH_A가 효모와 식물 세포내에서 신규한 산화-환원 조절 기능을 지닌다는 증거를 제공한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<10> 본 발명에서 이루고자 하는 기술적 과제는 H₂O₂ 등의 활성산소 생성을 억제함으로써 세포 사멸을 억제하기 위한 단백질 효소를 주성분으로 하는 활성산소 억제제를 개발코자 한 것이다.

발명의 구성 및 작용

<11> 본 발명의 목적은 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제를 주성분으로 하는 활성산소 억제제를 제공하는 것이다. 이때 활성산소는 H₂O₂임을 특징으로 한다.

<12> 본 발명의 또다른 목적은 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제를 사용하여 활성산소 생성을 억제함으로써 활성산소로 야기되는 세포 사멸의 억제방법을 제공하는 것이다.

<13> 또한 본 발명의 또다른 목적은 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제를 통해 Bax 단백질 또는 열 충격에 의해 유도된 세포 사멸을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

<14> 이한 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<15> 전형적인 해당효모인 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제(GAPDH)는 세포의 에너지 생성에 관련되어 있고 중요한 하우스키핑 작용기를 가지고 있다. 본 발명에서 GAPDH_A인 아라비도시스로부터의 GAPDH가 효모와 아피비도시스 원형질체에서 H₂O₂-매개 세포 사멸에 관련된 신규한 작용기를 가지고 있다는 것을 제시한다. GAPDH_A는 효모내에서 Bax-유도 세포 사멸을 억제하는 다른 식물 유전자와 함께 클론 분리되었다. 디하이드로다민 123을 이용한 유체 세포측정법으로 효모 세포 내에서 Bax 발현에 의해 매개된 H₂O₂ 생성은 Bax가 GAPDH_A와 공동발현되었을 때 급격히 감소된다는 것을 발견하였다. 식물체내에서 GAPDH_A 전사 수준은 H₂O₂ 처리에 의해 매우 증가된다. 더욱이 아라비도시스 원형질체내로의 GAPDH_A의 전환은 열 충격-유도된 H₂O₂ 생성과 세포 사멸을 강하게 억제한다. 본 발명은 GAPDH는 Bax와 열 충격에 의해 H₂O₂의 생성을 조절한다는 것을 지시하고 이는 효모와 식물 세포내에서 세포 사멸을 억제한다.

<16> 효모내에서 Bax-유도된 세포 사멸의 억제물질로서 GAPDH_A의 확인

<17> 본 발명자들은 최근에 효모 내에서 Bax-유도된 세포 사멸을 억제하는 식물 유전자를 클로닝하기 위한 효모-기반 유전적 스크리닝 방법을 개발했다(Moon et al., 2002). 상기한 PBI1(아스코르브산 퍼옥시다아제)과 PBI2(뉴클레오타이드 디포스페이트 키나아제 2) 등의 다수의 PBI(식물 Bax 억제제)로부터 유전자를 분리하였다(Moon et al., 2002, 2003). 세 번째 유전자 PBI3은 아라비도시스 GAPDH_A(접근번호 At3g26650)로 확인되었다. GAPDH_A가 효모내에서 Bax-유도된 세포 사멸을 억제하는 것을 증명하기 위해 본 발명자들은 GAPDH_A cDNA를 갈락토오스-유도 Bax 내로 함께 형질전환시켰다. 갈락토오스를 함유하지 않은 배지 위에서 콜로니 형성이 관찰된다(도 1A).

<18> 포도당-기반 배지 위에서 Bax와 GAPDH_A(Bax + GAPDH_A) 모두를 도입시킨 형질전환 세포에 의해 형성된 콜로니는 (Bax + vector)를 포함한 대조 형질전환주와 거의 동일한 효율로 측정되었다. 그러나 외인성 유전자를 지니지 않은 벡터와 Bax를 발현시키는 형질전환주에 의한 콜로니 형성은 갈락토오스 배지 위에서 완벽히 저해되는 반면에 GAPDH_A 벡터와 Bax를 동시에 발현시키는 형질전환주에 의한 콜로니 형성은 갈락토오스 배지 위에서 저해되지 않는다. 외인성 유전자를 지니지 않은 벡터와 Bax를 포함하는 갈락토오스 배지 성장 형질전환주 또는 GAPDH_A와 Bax 유전자를 포함하는 갈락토오스 배지 성장 형질전환주로부터 Bax 단백질의 발현 수준은 단백질 샘플내에서 유사하게 측정되었다. 이는 GAPDH_A는 Bax 단백질의 발현에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다(자료는 나타나지 않음).

<19> 또한 본 발명자들은 GAPDH 효소 활성의 측정에 의해 효모 세포내에서의 GAPDH_A의 발현을 확인하였다(도 1B).

오직 (Bax + 벡터) Bax와 벡터를 포함하는 야생형 세포와 형질전환주는 GAPDH 효소 활성의 유사한 농도를 나타낸다. 그러나 Bax와 GAPDHa (Bax + GAPDHa)를 포함하는 효모 세포는 GAPDH의 높은 효소 활성을 나타낸다. 본 발명은 GAPDHa가 효모내에서 Bax-유도된 세포 사멸을 억제한다는 것을 제시한다.

<20> GAPDHa는 Bax에 기인한 ROS 발생 억제

<21> 본 발명자들이 확인한 이전의 2개의 PBI는 세포내에서 산화-환원 조절에 관련된 것이기 때문에 본 발명자들은 Bax에 의한 ROS 생성이 GAPDHa의 발현에 의해 변화될 수 있는지 조사했다. 디하이드로로다민 123 (Schulz et al., 1996)과 2,7-디클로로플루오레세인 디아세테이트(Hockenbery et al., 1993)을 이용하여 본 발명자들은 효모내에서 Bax-유도된 세포 사멸을 통한 ROS의 생성을 분석했다. 유체 세포측정법은 Bax를 발현하는 효모 세포가 많은 양의 활성 산소를 축적하는 것을 나타낸다; 이러한 축적은 GAPDHa(도 2A와 자료는 나타나지 않음)와 동시 발현에 의해 상당히 저해된다. 더욱이 세포의 산화-환원 수준은 GSH 함량의 측정에 의해 분석된다. (Bax + 벡터)를 포함하는 야생형과 형질전환주를 비교하면 Bax를 포함하는 것과 GAPDHa (Bax + GAPDHa)는 GSH의 높은 농도를 나타낸다(도 2B와 자료는 나타나지 않음). 본 발명은 GAPDHa가 Bax에 의해 생성된 세포내의 ROS의 과생성을 억제하는 것을 제시한다.

<22> GAPDHa의 식물 원형질체내에서의 ROS 발생 및 세포 사멸 억제

<23> 식물체내에서 GAPDHa의 생리적인 역할을 확인하기 위해 GAPDHa 전사 수준은 H₂O₂와 열 충격 조건 하에서 분석된다. GAPDHa 전사 수준은 H₂O₂ 또는 열 충격 처리로 증가되고 이는 GAPDHa의 생물학적 기능이 산화 스트레스에 관련되었다는 것을 나타낸다(도 3).

<24> 더욱이 본 발명자들은 개별 세포로서 아라비도시스 원형질체를 이용함으로써 식물체내에서 GAPDHa의 역할을 조사했다(Baek et al., 2004). 원형질체는 아라비도시스 식물 및 GFP 단독으로, pBip::GFP (BiP), 또는 pGAPDHa::GFP(GAPDHa)로 형질전환된 잎 조직으로부터 분리되었다. 형질전환을 시킨 후 12시간이 지난 후에 GFP 발현이 관찰되었고 세포 생존 능력을 DAPI 염색으로 측정하였다. 각각의 실험에서 원형질체의 50% 이상이 목적 단백질을 발현했고 단백질의 도입 발현은 48시간 이상 세포 생존 능력에 영향을 미치지 않았다(자료는 나타나지 않음). 형질전환된 원형질체는 식물체내에서 PCD의 유도인자와 같은 열 충격으로 처리된다(McCabe et al., 2000; Tian et al., 2000; Vacca et al., 2004). 열 충격(2시간 동안 44°C)에 노출된 세포는 GFP-와 BiP-형질전환된 세포의 98% 이상의 사멸을 초래한다(도 4A와 자료는 나타나지 않음). 아가로즈겔 전기영동으로 측정된 비-래더형 DNA 퇴화는 열 충격 처리된 세포 내에서 중요하다. 부가적으로 사멸 또는 사멸되는 세포는 형태학상의 변화, 액포를 포함하는, 분열, 크기의 수축 및 원형질 막 위에서 세포기관의 응축을 나타낸다(자료는 나타나지 않음). 이들 모든 형태학적 특징은 아포토시스의 과정을 지니는 원형질체 세포의 특징으로 간주된다(Baek et al., 2004). 그러나 GAPDHa의 발현은 열 충격-유도된 세포 사멸에 대항하여 원형질체 세포를 보호했다(도 4A). GAPDHa의 발현은 GAPDHa가 효모에서 뿐만 아니라 식물 원형질체 내에서 세포 사멸의 효과적인 억제물질이라는 것을 나타낸다(도 1).

<25> 증가된 증거가 ROS가 동물과 식물체 내에서 PCD의 효과물질이라는 것(Jabs, 1999)과 GAPDHa가 효모 내에서 ROS 발생을 억제하는 것(도 2)을 제시하기 때문에 식물체내에서 ROS 축적을 감소시키는 GAPDHa의 역할을 조사했다. GFP 단독으로 또는 BiP::GFP를 발현하는 원형질체는 강한 플루오레세인을 나타내고 디하이드로로다민 123과 배양했을 때 ROS 축적을 나타내었다. 대조적으로 GAPDHa::GFP를 발현하는 원형질체는 유의미한 플루오레세인을 나타내지 않았다(도 4B). 하나로 합쳐서 생각해 보았을 때, 본 결과는 GAPDHa가 열 충격에 의해 ROS의 발생을 억제한다는 것과 식물 세포 내에서 열 충격-유도된 세포 사멸을 억제하는 것을 제시한다.

<26> GAPDH(EC1.2.1.13)은 해당과정에 관련된 하우스키핑 효소로 간주되며 1,3-디포스포글리세르산으로의 글리세르알데히드-3-포스페이트의 NAD-의존적 전환을 촉매화한다. 그러나 많은 연구는 GAPDH가 동물에서 수많은 세포 이하의 과정에 관련된 다기능 단백질이라는 것을 제시한다(Sirover, 1999, 2005; Chuang et al., 2005). GAPDH는 유전자 전사, DNA 교정, nuclear RNA export, 엔도시토시스, 마이크로튜블 번들링, 포스포트랜스퍼라아제 및 종양 형성의 역할을 한다(Sirover, 2005). 본 보고서에서 본 발명자들은 GAPDHa가 세포내에서 산화-환원 조절에 관련된 또 다른 신규한 기능을 가진다는 것을 밝혀냈다. 본 결론은 본 발명자들의 관찰에 기반한 것이다. (1) H₂O₂는 GAPDHa의 전사 발현을 유도한다, (2) GAPDHa는 효모 내에서 ROS 발생 억제에 의해 Bax-유도된 세포 사멸을 억제한다, (3) 식물체내에서 GAPDH의 발현은 감소된 구조성의 ROS 수준과 증가된 열 충격-유도된 세포 사멸 내성을 유도한다.

<27> ROS와 세포 내의 산화-환원 수준은 분열, 분화 및 아포토시스와 같은 세포 내의 많은 과정의 중요한 매개물질이

다. 보통의 물질대사 과정의 부산물과 같은, 높은 ROS 수준은 지질, 탄수화물, DNA 및 단백질의 손상을 야기한다(Byczkowski, and Gessner, 1988; Kannan and Jain, 2000). 그러나 낮은 ROS 수준은 동물과 식물 내에서 프로그래밍된 세포 사멸(PCD)의 신호를 보내는 중요한 역할을 한다(Jabs, 1999). 따라서 N-아세틸시스테인과 같은 과산화물을 제거하는 티올-환원제와 같고 수퍼옥사이드 디스무타제(MNSOD) 과발현을 관리하는 항산화제는 아포토시스를 방해하거나 지연시킨다(Hockenbery et al., 1993; Jacobson and Raff, 1995). 본 결과에 일치하여 본 발명자들은 효모와 식물 원형질체 내에서 Bax-유도된 세포 사멸이 ROS 발생과 관련되어 있다는 것을 밝혀냈고, 세포 사멸이 N-아세틸-L-시스테인의 외인성 어플리케이션 또는 효소(sAPX)를 제거하는 ROS의 외인성 과발현 또는 산화-환원 조절인자(AtNDPK2)에 의해 매우 억제된다는 것을 관찰하였다(Moon et al., 2002, 2003; Baek et al., 2004). 더욱이 본 연구는 이전의 관찰을 확인하였고, ROS는 동물, 식물, 효소, 기본적인 부분으로서 기능을 갖는, 진화적으로 메카니즘을 보존하는 생물체 내에서 PCD의 일반적인 요소라는 것을 제시한다.

<28> 효모 세포 내에서 GAPDH의 과발현이 전반적으로 세포내에서 항산화 능력을 증가시키는 결과를 초래하기 때문에 (도 2b) GAPDH가 직접적으로 ROS 활성을 제거하는 것이 가능하다. 그러나 ROS 신호를 전달하여 아포토시스의 매개물질로서 GAPDH의 역할은 효모와 식물 세포 내에서 무시될 수 없다. 동물에서 GAPDH는 산화 스트레스 받는 동안 핵으로 전위되고 Bcl-2의 과발현은 GAPDH의 핵으로의 전위와 아포토시스를 방지한다(Dastoor and Dreyer, 2001). 또한 GAPDH는 성숙한 세포내의 뉴런에서 노화-유도된 아포토시스에 관련된 것이고(Ishitani et al., 1996; Hara et al., 2006), 포스포리파아제 D2 활성을 조절한다(Kim et al., 2003). H₂O₂에 의해 유도된 산화 스트레스는 GAPDH의 촉매 활성부위에서 시스테인 잔기의 변성을 유도한다. 이러한 변성은 GAPDH 효소를 불활성화시키고 또한 GAPDH의 구조 변화를 야기시킨다. 이를 통해 H₂O₂와 포스포리파아제 간의 신호를 매개하는 단백질-단백질 상호작용을 허용케하는 것이다. 비록 H₂O₂에 의한 GAPDH의 구조/활성의 변성 메카니즘은 식물체내에서 정확히 규명되지 않았지만 몇 가지 연구는 GAPDH의 기능이 ROS 신호 전달에 관련되어 있다고 간주하고 있다. 아포토시스에서 GAPDH 활성은 H₂O₂에 의해 저해되고 이 저해는 환원 글루타치온의 외인성 적용을 통해 저지된다(Hancock et al., 2005). 더욱이 발현 연구는 GAPDH 전사 수준이 H₂O₂ 또는 열 충격에 의해 증가됨을 나타낸다(도 3). 탈수 및 ABA와 같은 이미 공지된 요인에 의해서도 식물체 내에서 ROS 생성을 증가시킨다(Velasco et al., 1994). 그러므로 동물체에서와 같이 식물 GAPDH는 다중기능을 지니고 있고 그 중 하나가 세포 내의 H₂O₂ 신호 전달을 조절하는 것이다.

<29> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<30> (실시예 1) 배지, 균주 및 플라스미드

<31> 사카로마이세스 세레비지에 균주 W303-1a(MATa ura3-1, leu2-3, 112 his3-11, 15 ade2-1, trp1-1, can1-110)를 최소배지(0.67% 효모 질소원, 2% 포도당, 10×아미노산 희석 용액)에서 배양하였다. 효모 균주 W303-1a는 pGilda-Bax 플라스미드와 이미 전술한 바와 같이 리튬아세테이트 방법으로 아라비도시스 cDNA 라이브러리와 함께 동시 형질전환시켰다. GAPDH의 cDNA는 합성 프라이머를 이용하여 PCR 증폭시켰다. 프라이머는 전방 프라이머(5' -TCAGATCCACTTCTGCAATGGGAAGCAGT-3' : 서열번호: 1)과 역방 프라이머(5' -GGCCTCGAGCTTCCAGTTGTTGGCAACAAT-3' : 서열번호: 2)를 사용하여 증폭시켰으며 pADGal4-2.1 벡터 프레임을 통해 클로닝시켰다.

<32> (실시예 2) 스크리닝 및 효소 에세이

<33> Bax-유도 세포 사멸을 억제하는 cDNA를 지닌 아라비도시스 Bax 저해제를 함유하는 콜로니가 공지의 방법으로 선별되었다.

<34> 정제된 GAPDH 단백질의 효소 활성은 25℃에서 NADPH 산화로부터 야기되는 340 nm에서 흡광도의 변화를 통해 측정하였다. 반응 혼합물은 100 mM 트리스-Cl 완충액, 10 mM MgCl₂, 10 mM GSH, 5 mM ATP, 0.2 mM NADPH, 3-포스포그리세릭포스포키나아제 2 유닛, 2 mM 3-포스포그리세르산을 포함하고 pH 8.0이었다.

<35> (실시예 3) 유체 세포측정법

<36> 형질전환 벡터 pGilda-Bax/pADGal4-2.1 (Bax + 벡터)로 형질전환된 효모 세포 W303a 또는 형질전환 벡터 pGilda-Bax/pADGal4-2.1-GAPDH (Bax + GAPDH)로 형질전환된 효모 세포 W303a는 포도당을 함유하는 최소배지에서 성장시킨다. Bax 단백질에 의해 세포 사멸을 유도하기 위해 공지의 방법으로 효모 세포를 증식시켰다.

효모 세포간 ROS를 측정하기 위해 효모 세포는 50 μ M 디하이드로로다민 123(분자 프로브)과 50 μ M 2,7-디클로로플루오레세인 디아세테이트(분자 프로브)과 함께 15분간 인큐베이션시켰으며 Becton-Dickinson 유체 세포측정기를 사용하여 분석하였다.

<37> (실시예 4) GSH 레벨의 결정

<38> 형질전환 벡터 pGilda-Bax/pADGal4-2.1 (Bax + 벡터)로 형질전환된 효모 세포 W303a 또는 형질전환 벡터 pGilda-Bax/pADGal4-2.1-GAPDH (Bax + GAPDH)로 형질전환된 효모 세포 W303a는 1×10^7 세포/ml 농도가 되도록 증식시키고 인산 완충 식염수(PBS)를 사용하여 2차례 세척시켰다. 세포는 아이스-콜드 추출 완충액(8 mM HCl, 1.3% 5-술폰 살리실산) 속에 재현탁시킨다. 유리 티올의 양을 측정하기 위해 세포는 초음파로 절단시키고 12,000 rpm에서 15분간 원심분리시켰다. 수득된 펠렛을 2 M 인산나트륨 완충액(pH 7.5)에 재현탁시킨다. GSH 레벨을 결정하기 위해 GSH와 DTNB(5,5-디티오 비스-2-니트로벤조산) 반응 혼합물 내의 유리 GSH 양을 412 nm에서 스펙트로포토메타를 사용하여 측정하였다. GSH의 함량은 완충액과 세포 현탁액의 블랭크 함량을 감산하여 계산된다.

<39> (실시예 5) 노던 블롯 분석

<40> 도 3에 나타난 시간에 4 mM H_2O_2 로 처리시켜 2 주령의 아라비도시스 모종으로부터 총 RNA를 정제하였다. 열 처리된 아라비도시스 모종으로부터 총 RNA를 정제하기 위해 식물체는 44°C에서 2시간 열 스트레스를 가하였고 그 후 22°C에서 나타난 시간 동안 회복시켰다. 샘플(레인당 10 μ g)은 1.2% 포름알데히드 아가로스겔 상에서 전기영동시켜 분석하였으며 Immobilion-Ny+ 전사막(Millipore)으로 이전시켰다. 막은 유전자-특이 프로브를 통해 Church 완충액(1% BSA, 1 mM EDTA, 0.25 M $NaHPO_4$, pH 7.2, 7% SDS)으로 65°C에서 자외선 가교결합 및 혼성화시켰다. 유전자-특이 프로브와 함께 인큐베이션 시킨 후 막은 $2 \times SSC/0.1\%$ SDS로 10분간 2회 세척시켰으며 $0.1 \times SSC/0.1\%$ SDS로 65°C에서 10분간 재세척시켰다.

<41> (실시예 6) 원형질체내 에세이

<42> 아라비도시스 GAPDH cDNA는 플라스미드 pADGal4-2.1-GAPDH에서 합성 프라이머를 사용하여 분리되었다. 상기 프라이머는 전방 프라이머 (5' -TCTAGACCACTACAATGGATGATG-3' : 서열번호: 3)와 역방 프라이머 (5' -GGATCCGAGATGGTGCACGAT-3' : 서열번호: 4)이며 원형질 내의 발현을 위해 GFP 융합 단백질과 함께 p326-smGFP 벡터에 클로닝시켰다. GFP 융합 단백질 유전자는 pUC 플라스미드 내의 CaMV35S 프로모터와 NOS3 터미네이터 사이에 배치시킨다. ER의 타겟팅 마커 단백질인 Bip는 p326-smGFP 벡터 내에서 구축되었다. 원형질체는 3 주령의 아라비도시스 잎 조직에서 분리되었으며 폴리에틸렌 글리콜을 이용하여 플라스미드 DNA와 함께 형질전환시켰다. 세포질간의 ROS 레벨을 측정하기 위해 형질전환된 원형질체($\sim 2 \times 10^5$ /ml)를 20 μ M 디하이드로로다민 123(분자 프로브)와 함께 15분간 인큐베이션시켰다. Zeiss Axioplan 형광 현미경(Carl Zeiss)을 통해 이미지를 모니터링하였다. 사용된 필터 세트는 GFP 용으로 XF116(여진기, 474AF20; 2색, 500DRLP; 발광체 및 605DF50)이 사용되었고 로다민 123 용으로 XF33/E(여진기, 535DF35; 2색, 570DRLP; 발광체 및 605DF50, 오메가사)이 각각 사용되었다. 열 스트레스로 사멸된 세포의 백분율을 계산하기 위해 원형질체는 4,6-디아미노-2-페닐인돌디하이드로클로라이드(DAPI, 분자 프로브)로 5분간 염색하였으며 자외선 흡광(여기 364 nm, 방사 454 nm)을 이용하여 형광 현미경 하에서 관찰하였다.

발명의 효과

<43> 본 발명의 효과는 H_2O_2 등의 활성산소 생성을 억제함으로써 세포 사멸을 억제하기 위한 단백질 효소를 주성분으로 하는 활성산소 억제제를 제공하는 것이다.

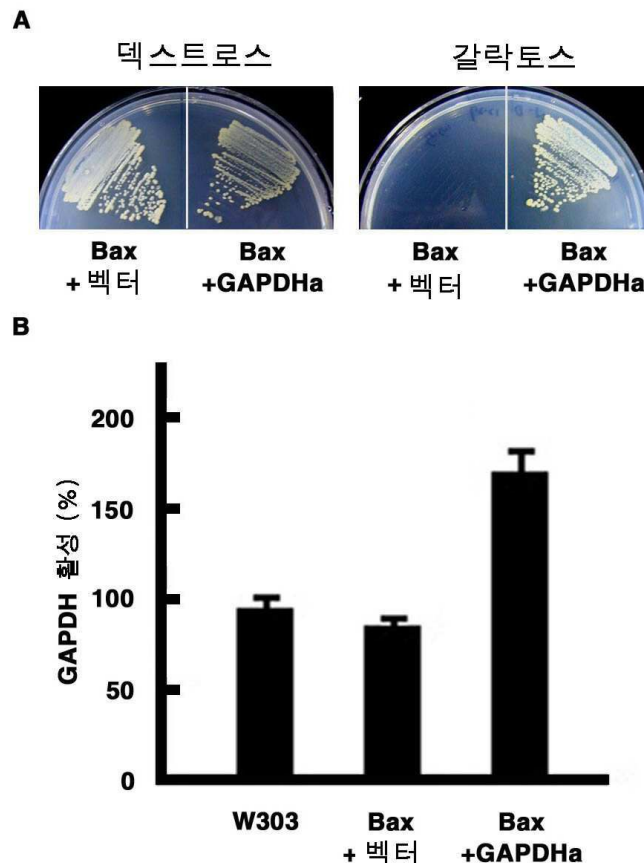
도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명의 글리세르알데히드-3-포스페이트 디하이드로게나제(GAPDH)의 효모 세포 내에서 Bax-유도된 세포 사멸을 억제함을 나타내는 도면이다. 도 1(A)는 GAPDH는 치명적인 Bax에 대한 증진된 저항성을 나타내는 것으로, pGilda-Bax/pADGal4-2.1 (Bax + 벡터)로 형질전환시킨 효모 균주 W303-1a(왼쪽)와 pGilda-Bax/pADGal4-2.1-GAPDH (Bax + GAPDH)로 형질전환시킨 효모 균주 W303-1a(오른쪽)을 SD-글루코오스(텍스트로 우즈) 또는 SD-갈락토오스(갈락토오스)를 함유하는 플레이트 내에 스트리킹시킨 후, 30°C에서 2일간 배양 후 촬영한 사진이다.

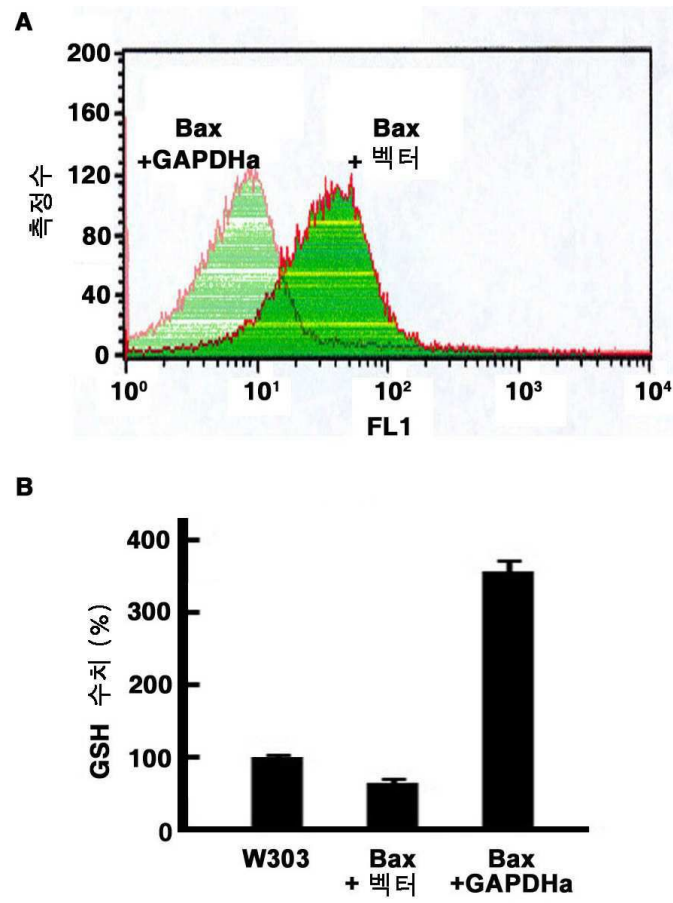
- <2> 도 1(B)는 효모내에서 GAPDHa의 효소 활성을 나타내는 것으로, GAPDHa의 효소 활성은 340 nm 표준 조건에서 스펙트로포토메터를 사용하여 측정하였다. NADH/NADPH 산화량은 단백질의 $\mu\text{moles/min}/\mu\text{g}$ 으로 계산하였다.
- <3> 도 2는 Bax에 의해 유도된 ROS의 GAPDHa에 의한 생성 억제를 나타내는 그래프이다. 도 2(A)는 유체 세포측정법을 통해 pGilda-Bax/pADGal4-2.1 (Bax + 벡터)로 형질전환시킨 효모 균주 W303-1a와 pGilda-Bax/pADGal4-2.1-GAPDHa (Bax + GAPDHa)로 형질전환시킨 효모 균주 W303-1a를 갈락토오스 배지 하에서 12시간 증식시킨 후, 유체 세포측정을 위해 50 μM 디하이드로로다민 123과 함께 15분간 더 인큐베이션시킨 후 측정된 그래프이다. 도 2(B)는 효모내 GSH 레벨의 분석을 나타낸 것으로, 효모 세포는 12시간 동안 갈락토오스 배지에서 배양한 후 측정하였다.
- <4> 도 3은 본 발명의 열 충격 및 산화 스트레스에 대해 GAPDHa의 집중적인 전사를 나타낸 도면이다. 도 3(A)는 4 mM H_2O_2 를 지시된 기간동안 처리한 2 주령의 아라비돕시스 모종으로부터 총 RNA를 추출하였다. 도 3(B)는 44°C에서 2시간 동안 열 충격 후 22°C에서 0, 3, 6, 12, 18 또는 24시간 회복시킨 후 총 RNA를 추출하였다. 일정량의 총 RNA(10 μg)이 각각의 레인에 로딩하였다. 각각의 레인에 동일량의 로딩은 rRNA의 시각화를 위한 에티디움브로마이드로 전-염색된 겔에 의해 확인하였다. RNA 블롯은 ^{32}P 표지된 GAPDHa cDNA로 검출하였다.
- <5> 도 4는 본 발명의 GAPDHa는 아라비돕시스 원형질체내의 ROS 유도 세포 사멸을 억제함을 나타낸 그래프이다. 도 4(A)는 GAPDHa에 의한 열 충격 유도 세포 사멸의 억제를 나타낸 것으로, 원형질체는 pBiP::GFP (BiP) 또는 GAPDHa::GFP (GAPDHa) 레포터 유전자 융합 컨스트럭트로 형질전환된 3 주령의 모종으로부터 분리되었다. 형질전환 5시간 후 원형질체는 44°C에서 2시간 처리되었고 22°C에서 24시간 회복시켰다. 원형질체 세포는 25 $\mu\text{g/ml}$ 의 4,6-디아미디노-2-페닐인돌 디아세테이트(DAPI)에 5분간 처리하고 생존하는 세포의 수를 백분율로 측정하였다($n = 250\sim 300$). 도 4(B)는 GAPDHa에 의한 열 충격 유도 ROS 세포 사멸의 억제를 나타낸 것으로, 원형질체는 상기한 바와 같이 열 충격후에 회복시키고 20 μM 디하이드로로다민 123으로 15분간 인큐베이션시켰다. 그 후 현미경으로 관찰하였다. 각각의 원형질체의 이미지를 묘사하였다.

도면

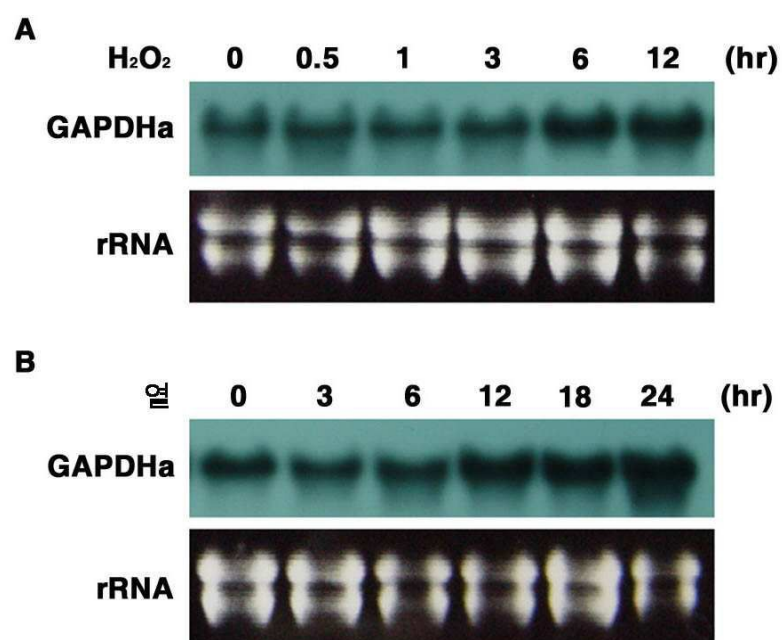
도면1



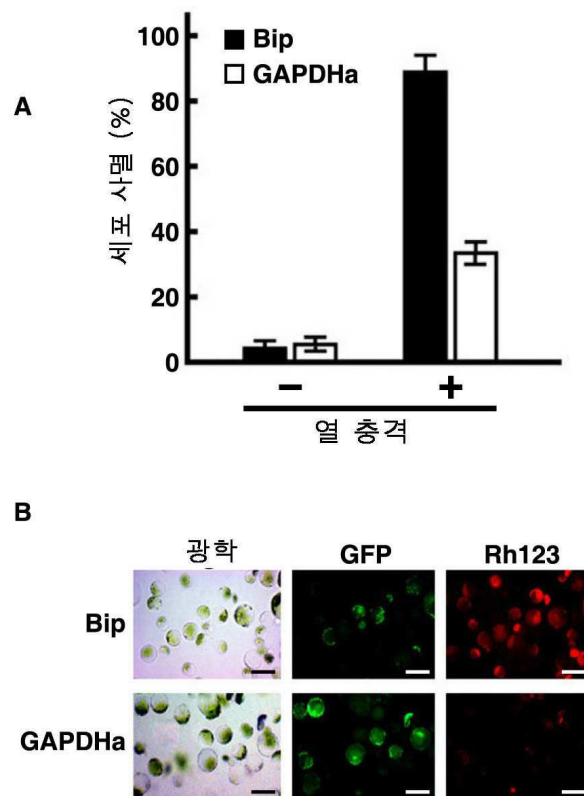
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> Reactive oxygen species suppressing agent having active ingredient of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Forward primer

<400> 1

tcaggatcca cttctgcaat gggaagcagt

30

<210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer

<400> 2
 ggccctcgagc ttccagttgt tggcaacaat 30

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Forward primer

<400> 3
 tctagaccac tacaatggat gatg 24

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Reverse primer

<400> 4
 ggatccgaga tgggtgcacga t 21