



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년03월18일
(11) 등록번호 10-0814502
(24) 등록일자 2008년03월11일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *C12Q 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0015913

(22) 출원일자 2007년02월15일

심사청구일자 2007년02월15일

(56) 선행기술조사문헌

Microbiology, 144, 2255-2261(1998)

미국공개특허 제2003/0008272호(2003.01.09.)

일본공개특허 평15-270243호(2003.09.25.)

(73) 특허권자

서강대학교산학협력단

서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교

(72) 발명자

이정국

서울 마포구 염리동 삼성아파트 108-604

이해진

경기 남양주시 와부읍 덕소리 신암아파트 101-1202

김의진

서울 서대문구 홍제1동 158-19

(74) 대리인

백남훈, 이학수

전체 청구항 수 : 총 2 항

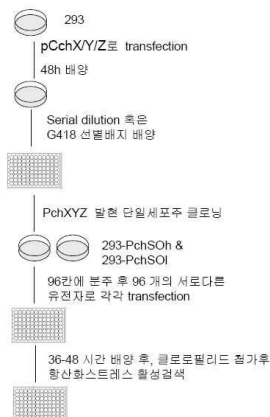
심사관 : 허주형

(54) 항활성산소 조절 유전자의 고속 탐색방법

(57) 요약

본 발명은 항활성산소 조절 유전자의 고속 탐색방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 산소 하에서 슈퍼옥시드 음이온을 생성하는 활성을 가진 다량체 단백질 유전자를 안정적 발현하도록 제작한 세포주를 이용하여, 슈퍼옥시드 활성산소의 생성을 직접 조절함으로써, 활성산소에 대한 활성조절이나 항산화스트레스의 조절 작용이 있는 유전자의 고속 탐색방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명에 따른 탐색방법은 세포내 특정 소기관에서의 슈퍼옥시드 활성산소의 생성을 직접 조절 가능하여 활성산소의 유해성을 조사하거나, 활성산소의 다양한 유해성으로부터 발생하는 다양한 질병의 발생이나 유해효과를 저해하는 유전자 및 생리활성물질을 직접 세포에서 검색하거나, 효과의 검증이 가능하다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

슈퍼옥시드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질을 코드화하는 유전자를 세포 내에서 발현시키도록 재조합 발현백터를 제조하는 단계;

상기 발현백터를 세포 내에 트랜스펙션(transfection)하여 상기 유전자 발현 단일세포주를 클로닝하는 단계; 및
항활성산소 후보 유전자를 발현하는 발현백터를 상기 세포주에 넣고 클로로필리드를 가한 후 활성산소에 의한 세포의 사멸을 측정하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는 항활성산소 조절 유전자의 고속 탐색방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 슈퍼옥시드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질을 코드화하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 bchX, 서열번호 2로 표시되는 bchY 및 서열번호 3으로 표시되는 bchZ를 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 항활성산소 조절 유전자의 고속 탐색방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 산소 하에서 슈퍼옥시드 음이온을 생성하는 활성을 가진 다량체 단백질 유전자를 안정적 발현하도록 제작한 세포주를 이용하여, 슈퍼옥시드 활성산소의 생성을 직접 조절함으로써, 활성산소에 대한 활성조절이나 항산화스트레스의 조절 작용이 있는 유전자의 고속 탐색방법에 관한 것이다.
- <8> 활성산소는 유기체가 에너지를 얻기 위해서는 필수불가결하게 부수적으로 동반되어 생성되는 매우 반응성이 큰 물질로서, 암, 파킨슨, 알츠하이머 등의 퇴행성 뇌질환, 동맥경화, 염증반응 등의 매우 다양한 질병의 발생과 조절에 관여하는 것으로 알려져 왔으나, 활성산소들에 대한 생체 내 분석의 어려움과, 짧은 반감기로 생체 내에서 활성산소에 대한 병리연구나 항활성산소제의 개발에 많은 제한이 있었다. 특히, 활성산소는 산화스트레스 유발뿐만 아니라, 생체 내에서 세포성장 등의 정상적인 신호전달과정에서의 신호전달물질로서 기능을 하기 때문에, 활성산소의 특정 부위에서의 정상적인 생성과 분해는 정상적인 생리기능에도 필요한 것으로 알려지기 시작하였고, 이것의 생성과 분해의 균형이 깨지게 되면, 직·간접적으로 다양한 질병을 유발하는 것으로 알려져 왔다. 따라서, 특정 부위에서, 과발생된 활성산소의 생성을 저해하거나, 분해를 촉진하여, 이의 부작용을 덜어 주는데 관여하는 유전자를 쉽게 탐색할 수 있는 효과적인 고속 탐색방법의 개발이 필요한 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <9> 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구 노력한 결과, 산소 하에서 슈퍼옥시드 음이온을 생성하면서 과산화수소는 생성하지 않는 다량체 단백질 유전자를 안정적으로 발현하는 세포주를 제작하여 항활성산소 조절 유전자를 고속 탐색뿐만 아니라, 다양한 특성을 갖는 분화된 세포를 이용하여 특정 세포내 소기관에 항활성산소 후보물질의 생체 내 효능도 빠르고 쉽게 검색하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- <10> 따라서, 본 발명은 산소 하에서 슈퍼옥시드 음이온을 생성하는 활성을 가진 다량체 단백질 유전자의 발현하는 유전자 조작 세포를 이용하여, 항산화 활성조절과 항산화스트레스의 조절 작용이 있는 유전자의 고속 탐색방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

- <11> 본 발명은

- <12> 슈퍼옥시드 음이온 생성을 유도하는 다량체 단백질을 코드화하는 유전자를 세포 내에서 발현시키도록 재조합 발현백터를 제조하는 단계;
- <13> 상기 발현백터를 세포 내에 트랜스펙션(transfection)하여 상기 유전자 발현 단일세포주를 클로닝하는 단계; 및
- <14> 항활성산소 후보 유전자를 발현하는 발현백터를 상기 세포주에 넣고 클로로필리드를 가한 후 활성산소에 의한 세포의 사멸을 측정하는 단계
- <15> 를 포함하는 항활성산소 조절 유전자의 고속 탐색방법을 그 특징으로 한다.
- <16> 이와 같은 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- <17> 본 발명은 산소 하에서 슈퍼옥시드 음이온을 생성하는 활성을 가진 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 유래 다량체 단백질 유전자의 발현하는 유전자 조작 세포를 이용하여, 항산화 활성조절과 항산화 스트레스의 조절 작용이 있는 유전자의 고속 탐색방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 다량체 단백질을 코드화하는 유전자를 진핵세포에서 발현시키는 발현백터에 클로닝하고, 이 발현백터를 세포에 넣고(transfection), 이 유전자를 안정적으로 발현하는 단일 세포주를 클로닝하여, 이 유전자 조작된 세포를 클로로필리드가 첨가된 세포 배양액에서 키우면, 가한 클로로필리드의 양과 안정적으로 발현된 다량체 단백질의 양에 따라, 조절이 가능한 양의 활성산소를 생체 내에서 만들어 냄으로써 원하는 시기에 원하는 정도의 활성산소에 의한 산화스트레스를 직접 유도하여, 세포 내에서 발생된 산화스트레스에 대한 생체의 반응기작 연구에 적합한 세포모형을 제공할 뿐만 아니라, 이 세포에 산화스트레스의 조절작용에 관여할 수 있는 유전자를 발현하는 백터를 넣고, 이를 안정적으로 발현하는 세포주를 클로닝하여 제조하면, 세포 내에서, 항활성산소의 조절기능이나, 산화 스트레스의 조절작용이 있는가를 조사할 수 있는 유용한 탐색법을 제공해 준다.
- <18> 게다가, 다량체 단백질에 세포내 소기관에 타겟팅되도록 타겟팅 아미노산 서열, 예로서 팔미토일/미리스토일화(palmitoyl/myristoylation) 서열, ER 보존(retention) 서열, 마이토콘드리아 보존(retention) 서열, 핵 위치화(nuclear localization) 서열과 융합된 형태로 발현을 하게 되면, 각각 세포막, ER, 마이토콘드리아, 핵 등의 세포내 소기관에 선택적으로 발현 가능하므로, 슈퍼옥시드 음이온이, 세포내 소기관에 선택적으로 생성되게 조절할 수 있다.
- <19> 즉, 본 발명은 산소 하에서 슈퍼옥시드 음이온을 생성하는 활성을 가진 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 유래 다량체 단백질 유전자를 안정적으로 발현하는 세포주를 세포공학적인 방법으로 제작하여, 항산화 활성조절과 항산화스트레스의 조절 작용이 있는 유전자의 검색방법에 응용하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 슈퍼옥시드 음이온을 생성을 유도하는 다량체를 코드화하는 유전자를 세포내에 발현시키도록 변형시킨 발현백터를 제조하고, 이를 원하는 특성의 동물세포에 넣고(transfection), 이 유전자를 정해진 양만큼 안정적으로 발현하는 세포주들을 각각 클로닝한다. 이 유전자 조작된 세포주에 항산화활성을 검색하고자 하는 후보 유전자를 발현하는 유전자 발현백터를 집어넣고, 배양액에 클로로필리드를 첨가하면, 가한 클로로필리드의 양과 안정적으로 발현된 다량체 단백질의 양에 따라, 조절 가능한 양의 활성산소를 만들어, 활성산소에 의한 원하는 시기에 원하는 정도의 산화스트레스를 특정 세포내에 유도하여 실제 세포 내에서, 발현된 외부 유전자가 항활성산소 활성이나, 산화 스트레스의 조절작용이 있는가를 조사할 수 있는 탐색하는 과정으로 구성된다. 또한, 유전자 조작된 분화된 특정 세포주에 항활성산소에 대한 조절작용이나 항산화스트레스 조절 후보물질을 직접 가함으로써, 분화된 특정 세포주에서의 후보물질의 항산화스트레스 조절에 관여하는 생물학적 기능이나 효능을 검색하는 방법으로 구성된다. 본 발명에서는 산소 하에서 슈퍼옥시드 음이온을 생성하는 활성을 가진 로도박터 스페로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*) 유래 다량체 단백질 유전자로는 서열번호 1로 표시되는 bchX, 서열번호 2로 표시되는 bchY, 그리고 서열번호 3으로 표시되는 bchZ를 포함하는 유전자를 사용하였다.
- <20> 따라서, 본 발명은 세포 내에서 슈퍼옥시드 활성산소의 생성을 직접 조절할 수 있는 기술을 활용하여, 활성산소의 유해성을 조사하거나, 또는 이 유해효과를 저해하는 유전자 및 생리활성물질을 직접 세포에서 검색하거나, 유해성을 저해하는 효능을 검증 가능하게 함으로써, 활성산소의 유해성으로부터 발생하는 다양한 질병들, 예로서, 알츠하이머, 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌질환과 활성산소에 의한 순환기계 질환인 심장병과 동맥경화 등의 병인을 분자수준에서 규명함으로써 새로운 신약 타겟을 도출할 수 있을 뿐만 아니라, 이들 질병의 중요한 요인의 하나로 알려진 활성산소의 특정 뇌세포에서의 생성을 효과적으로 저해하는 치료제의 검색에도 매우 유용하리라 기대된다.
- <21> 이하, 다음 실시예를 들어 본 발명을 상세히 기술할 것이나 본 발명의 범위를 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<22> 실시예 1: 항활성산소 및 산화스트레스 조절 유전자 고속 탐색

<23> 서열번호 1로 표시되는 bchX, 서열번호 2로 표시되는 bchY, 그리고 서열번호 3으로 표시되는 bchZ 각각을 pCDNA3.1의 AfIII/XbaI에 집어넣어, 진핵세포에 발현되는 발현벡터 pChX, pChY, pChZ를 각각 제조하였다[도 1 ~ 도 3 참조]. 이 세 가지 벡터를 293 세포에 집어넣고, 발현시킨 다음 48시간부터 1 mg/ml의 G418이 첨가된 F12/DMEM에서 배양한 후, 96웰(96well)에 희석하여 2주간 배양한 뒤 단일 클론으로부터 유래된 세포군 다량체가 고발현된 세포주와 저발현된 세포주의 클로닝을 위해 각각 4 ~ 10개의 세포주를 각각 큰 배양기로 점차 옮겨 배양한 뒤, 액체 질소에 각각의 세포주를 얼려 보관하였다. 배양된 단일 세포주를 티에스이 완충용액(10 mM Tris, 150 mM NaCl, 그리고 5 mM EDTA)으로 세포를 옮긴 뒤, 세포를 깨고, 세포질을 얻은 뒤 클로로필리드를 첨가한 뒤 슈퍼옥시드 생성에 의한 NBT(nitroblue tetrazolium)의 환원반응 정도로 슈퍼옥시드 발생 다량체 단백질의 발현정도를 확인하여, 고발현된 세포주(293-PchSOh)와 저발현된 세포주(293-PchSOl)로 명명하였다. 안정적인 발현이 확인된 단일 클론 세포주 중 293-PchSOh 세포주를 96칸 배양기에서 배양한 뒤 리포펙타민으로 pCDNA3.1의 AfIII/XbaI 위치에 adcA, sodB 유전자와 SY로 명명된 항산화 후보 유전자들을 삽입하여 진핵세포에서 발현하도록 변형시킨 항산화 조절효과가 알려진 유전자 발현벡터인 pCadcA, pCsodB, 그리고, 검색에 사용될 유전자 발현벡터인 pSY 계열의 발현벡터와 음성대조군으로는 녹색형광단백질이 발현되는 pEGFP 발현벡터를 세포내로 집어넣고, 48시간 뒤, 클로로필리드를 첨가한 뒤 2시간 후 슈퍼옥시드의 생성과 24시간 뒤, 활성산소의 유해효과에 의한 세포의 사멸에 주는 효과를 CCK-8(Dojindo)를 이용한 방법으로 세포의 사멸정도를 측정함으로써 활성산소의 유해효과를 저해시켜 주는 유전자를 탐색하였다(도 5 참조).

<24> 활성산소의 유해효과에 관련이 없는 녹색형광단백질의 경우(pEGFP)는 양성대조군과 거의 같은 10% 이하의 매우 낮은 세포생활성(cell viability), 즉 높은 세포사멸을 보여 주는 반면, 활성산소의 유해효과를 줄여주는 것으로 알려진 pCadcA, pCsodB의 경우, 각각 45%와 70%의 세포생활성을 보여주어 이 방법은 활성산소의 유해효과를 줄여 주는데 관여하는 유전자 검색에 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다. 또한, SY 계열의 후보유전자 중, SY1103과 SY1209는 상당한 활성산소의 유해효과를 감소시키는 활성을 보여주며, 도 6에서 나타난 바와 같이 과산화 지질의 발생도 억제해 주므로, 세포사멸에 의한 효과가 아니고, 항산화스트레스 억제 유전자인 것으로 사료된다. 이 방법은 세포사멸에 직접적으로 영향을 주는 유전자도 같이 검색되므로, 좀더 선별적이면서 예민한 항산화활성 조절 유전자의 탐색을 위해서는 직접 세포내에서 생성되는 활성산소를 루미놀(luminol)을 이용한 화학적 발광법으로 측정하여 활성산소의 생성이나 분해에 영향을 주는 유전자를 탐색할 수도 있으며, 다음 실시예 2의 (1)에 기술된 바와 같이 세포내에서 만들어진 활성산소에 의해 생성되는 과산화지질을 측정하여 활성산소의 생성이나 분해에 영향을 주는 유전자를 탐색할 수도 있다.

<25> 실시예 2: 항활성산소 조절 유전자 탐색

<26> (1) 세포막에서 과산화지질 생성 저해 효과 검색

<27> 세포막에서 과산화지질 생성을 저해하는 효과를 검색하기 위하여, 293 세포시료를 음성대조군(NCON)으로 사용하고, 293-PchSOh으로부터의 시료를 양성대조군(PCON)으로 사용하였다.

<28> 슈퍼옥시드 음이온을 생성하는 다량체 단백질 pChX/Y/Z을 안정적으로 과량 발현시키는 293-PchSOh에 항산화스트레스 조절 후보유전자인 SY1002, SY1103, 그리고 SY1209를 발현하는 발현벡터를 각각 집어넣은 세포군과, 슈퍼옥시드 활성저해 효과가 알려진 Pch212를 1mM 처리한 세포, 슈퍼옥시드 활성저해에 관련된 것으로 알려진 유전자, adcA와 sodB, 그리고 녹색형광 단백질을 발현하는 pCadcA, pCsodB, 그리고 pEGFP, 발현벡터를 집어넣은 세포군에 48시간 후에 클로로필리드를 가하고, 티에스이 완충용액(10 mM Tris, 150 mM NaCl, 그리고 5 mM EDTA)에서 세포를 옮긴 뒤 세포를 고주파로 갠 다음 0.5ml의 35% 트리클로로아세트산과 0.5 ml 트리스 완충용액을 가하고, 잘 섞은 뒤, 10분 후, 0.75% 티오바비트릭산을 1 ml 가하였다. 45분간 끓인 후, 식히고, 1000 X g에서 10분간, 원심분리하였다. 생성된 과산화지질의 양을 티오바비트릭산과 반응하는 총 물질의 양을 분광광도계를 사용하여 측정하였다.

<29> 도 6에서 나타난 바와 같이, 활성산소의 유해효과에 관련이 없는 녹색형광단백질의 경우(pEGFP)는 양성대조군과 거의 같은 수준의 과산화지질이 검출된 반면, 활성산소의 유해효과를 줄여주는 것으로 알려진 Pch212를 1mM 처리하거나, pCsodB 발현 세포군에서는 경우에는 음성대조군과 유사한 수준의 강력한 저해 효과를 보여 주었으며, 항산화효과가 상대적으로 약한 pCadcA발현 세포군에서는 20% 정도 감소된 과산화지질 발생하여, 과산화지질의 발생이 활성산소의 생성이나 분해에 관여하는 유전자의 발현에 따라 변화됨을 확인하였다.

<30> 따라서, 이 방법은 활성산소의 유해효과를 줄여 주는데 관여하는 유전자의 항산화스트레스 활성검증이나, 활성

검색에 사용될 수 있다.

<31> (2) 도파민 뉴론에서 활성산소 보호 효과

<32> 항활성산소 및 산화스트레스 조절 유전자 고속 탐색법을 이용하여 파킨슨병의 원인이 되는 활성산소에 의한 도파민성 뉴론의 사멸을 억제 해주는 유전자의 탐색에 사용한 예를 기술하였다.

<33> PC12 도파민성 뉴론 유래의 세포주에 슈퍼옥시드 발생 다량체 발현벡터 pChX/Y/Z를 전기포레이터로 집어넣고, 발현시키고, G418을 사용하여 안정적으로 과량 발현된 세포주(PC-PchSOh)을 선별하여 클로닝하였다. PC12-PchSOh 세포주에 항산화스트레스 조절 후보유전자 SY1002, SY1103, 그리고 SY1209의 발현하도록 트랜스펙션한 세포군, Pch212를 1mM 처리한 세포군과 adcA와 sodB를 발현하도록 트랜스펙션한 세포군을 무혈청배지로 교환하고, 36시간 배양한 후, 클로로필리드를 첨가한 뒤 2시간 후 슈퍼옥시드의 생성과 48 시간 뒤 세포의 사멸을 CCK-8을 사용하여 450 nm에서의 흡광도 증가감소로 확인하여, 항활성산소의 유해 효과를 저해시켜 주는 유전자를 탐색하였다.

<34> 도 5에서 나타낸 바와 같이, 활성산소의 유해효과에 관련이 없는 녹색형광단백질의 경우(pEGFP)는 양성대조군과 거의 같은 수준의 세포생활성을 보여주는 반면, 활성산소의 유해효과를 줄여주는 것으로 알려진 Pch212를 1mM 처리하거나, pCsodB 발현시킨 세포군에서는 경우에는 높은 세포생활성을 보여 주었다. 세포생활성이 차이가 활성산소의 생성이나 분해에 관여하는 유전자의 발현에 따라 차이가 있음을 확인하였다.

<35> 따라서, 이 방법은 활성산소의 유해효과를 줄여 주는데 관여하는 유전자의 항산화스트레스 활성검색을 CCK-8을 사용하여 노란색의 흡광도를 대량으로 측정 가능한 96나 384칸 세포 스캐너나 엘리자리더(elisa reader)를 사용하여 대량의 시료를 고속으로 탐색하는데 사용할 수 있다.

발명의 효과

<36> 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명은 세포 내에서 슈퍼옥시드 활성산소의 생성을 직접 조절할 수 있는 기술을 활용하여, 활성산소의 유해성을 조사하거나, 활성산소의 다양한 유해성으로부터 발생하는 다양한 질병의 발생이나 유해효과를 저해하는 유전자 및 생리활성물질을 직접 세포에서 검색하거나, 효과를 검증 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 재조합 발현벡터 pChX의 개열지도를 나타낸 것이다.

<2> 도 2는 재조합 발현벡터 pChY의 개열지도를 나타낸 것이다.

<3> 도 3은 재조합 발현벡터 pChZ의 개열지도를 나타낸 것이다.

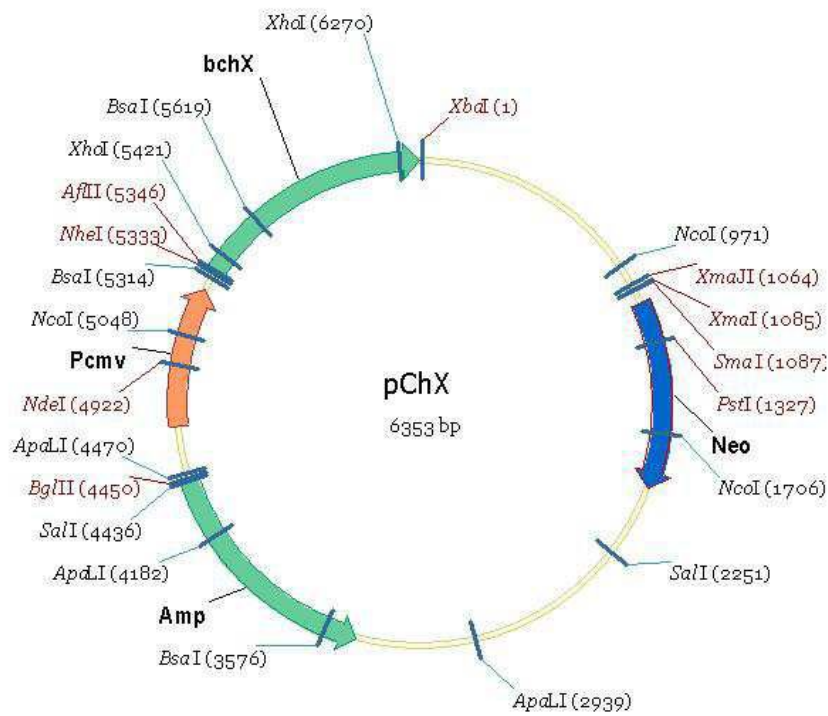
<4> 도 4는 항활성산소 조절 유전자의 고속 탐색방법을 간략히 나타낸 것이다.

<5> 도 5은 293-PchSOh 세포주에서 항산화스트레스 조절 유전자와 Pch212에 의한 과산화 지질 형성에의 영향을 살펴본 결과이다.

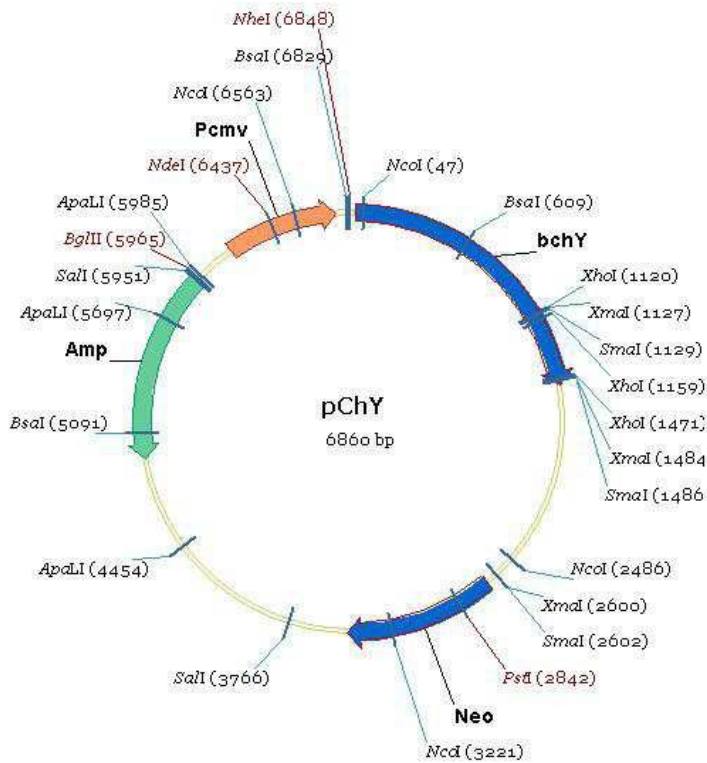
<6> 도 6은 PC12-PchSOh 도파민성 뉴론세포 모델에서의 항산화스트레스 조절 유전자와 Pch212에 의한 항활성산소 활성을 살펴본 결과이다.

도면

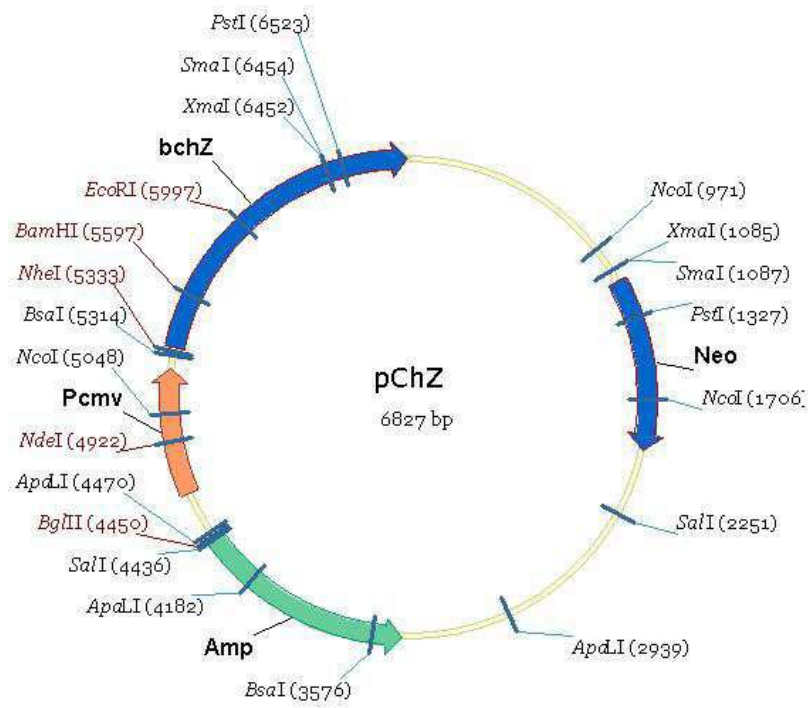
도면1



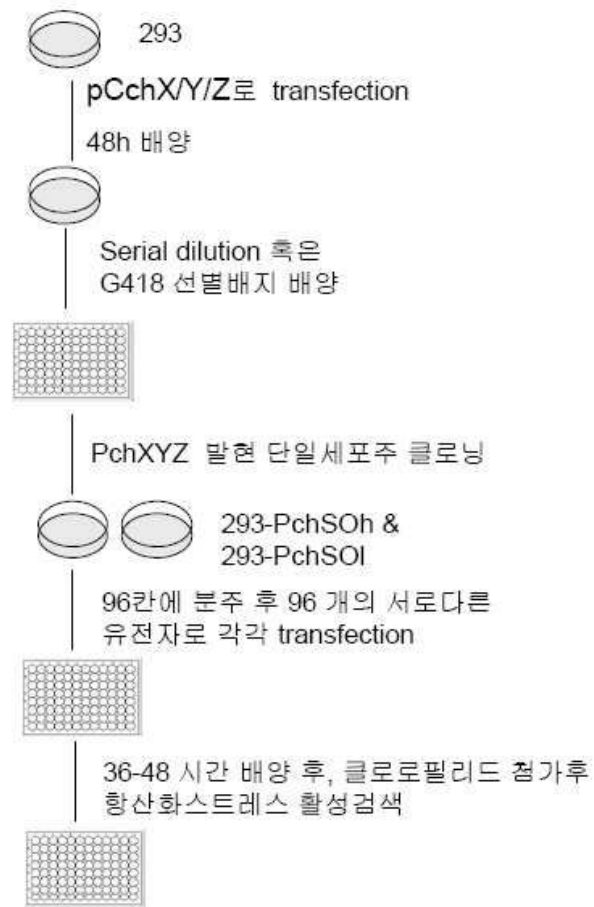
도면2



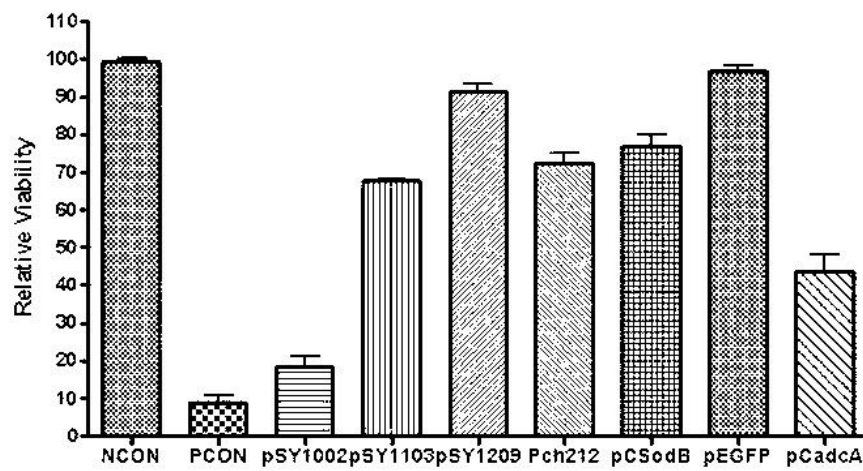
도면3



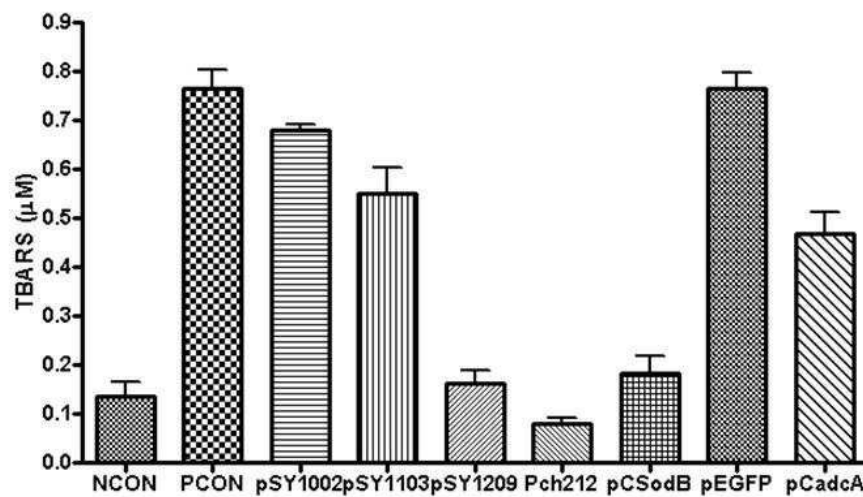
도면4



도면5



도면6



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)