

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 3월 5일 (05.03.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/030380 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/12 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/007101
- (22) 국제출원일: 2014년 8월 1일 (01.08.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0102331 2013년 8월 28일 (28.08.2013) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-713 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 윤봉준 (YOON, Bongjune); 411-734 경기도 고양시 일산서구 후곡로 9, 805 동 802 호 (일산동, 후곡마을 8단지아파트), Gyeonggi-do (KR). 나준호 (NA, Joonho); 134-822 서울시 강동구 천호대로 186 길 23-14, 302 호 (둔촌동, 대원아트빌), Seoul (KR).
- (74) 대리인: 한양특허법인 (HANYANG PATENT FIRM); 135-854 서울시 강남구 논현로 38 길 12 (한양빌딩), Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17 에 의한 선언서:

- 특허출원 및 특허를 받을 수 있는 출원인의 자격에 관한 선언 (규칙 4.17(ii))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: METHOD OF SCREENING INSECTICIDE SUBSTANCE

(54) 발명의 명칭 : 살충 물질을 스크리닝 하는 방법

AlstR-IRES-mCherry(AAV)+GIRK1,GIRK2

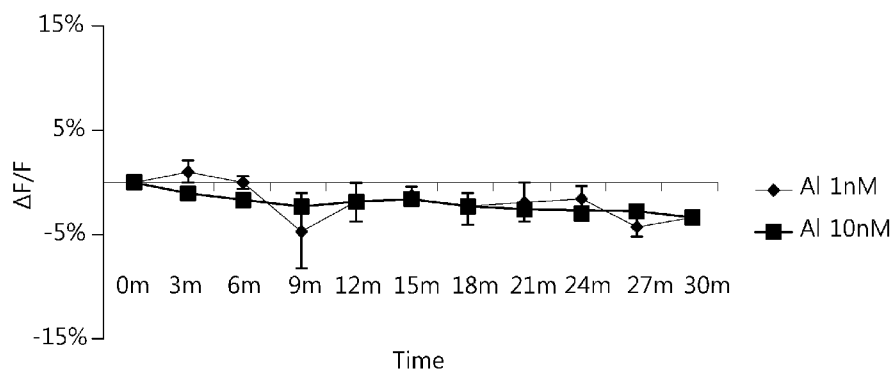


FIG. 4A

(57) Abstract: The present invention relates to a method of screening an insecticide substance. When the screening method of the present invention is used, a natural substance, similar to allatostatin which suppresses larval hormone synthesis expressed in insects, is discovered. Thus, the substance can be used as a pesticide for impeding the normal development of harmful insects. Since al-latostatin and receptor thereof specifically exist in the insect world, the substance is expected to have no effects on humans and other mammals and has the advantage of being suitable for the development of an environmentally-friendly pesticide.

(57) 요약서: 본 발명은 살충 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 스크리닝 방법을 이용하면 곤충에게서 발현되는 유충호르몬 합성을 억제하는 알라토스타틴과 유사한 천연 물질을 찾아냄으로써, 해충의 정상적 발달을 저해하는 농약으로 이용할 수 있는 장점이 있고, 알라토스타틴 및 그 수용체는 곤충계에 특이적으로 존재하므로 인간을 비롯한 포유 동물에 미치는 영향이 없을 것으로 기대되어 친환경적인 농약제재 개발에 적합한 장점이 있다.



WO 2015/030380 A1

명세서

발명의 명칭: 살충 물질을 스크리닝 하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 살충 물질을 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 농작물을 가해하는 병해충 및 잡초는 종류가 많고 가해하는 특성이 서로 다르기 때문에 다양한 종류의 농약이 있어야 하고, 같은 농약을 연용하면 병해충이 농약에 대한 저항성을 가지므로 한가지 병해충을 방제하기 위해서도 여러 종류의 농약이 필요하다. 또한, 농민들이 사용하기 편리하고 농작물의 생육 시기나 재배 방법에 적합한 형태의 약제가 필요한데, 농약의 종류가 너무 많아지는 것을 방지하기 위해 정부에서는 해충 방제 효과가 우수하고 안전한 농약만을 선정, 등록하고 있으며 효과가 감소하거나 위해성이 있는 농약에 대하여는 생산을 금지하고 있다.
- [3] 국내에 분포하는 병해충과 잡초의 수는 5,850종(병 2,771, 해충 2,618, 잡초 461)으로 이들 중 농작물을 가해하는 병해충 및 잡초의 종류는 4,010종이며 농산물의 수입 자유화 등으로 외국으로부터의 병해충의 유입이 증가해 그 종류는 더 많아질 것으로 예상되고 있다.
- [4] 한편, 한국 과학 기술평가원(KISTEP)은 10년 뒤 한국 경제를 이끌 10대 유망 기술에 친환경 천연물 농약 부분을 선정하였고, 21세기에 들어오면서 우리나라를 포함한 OECD 국가에서는 합성 농약과 합성 비료의 사용량을 줄이고자 하는 정책을 펼치고 있다. OECD 국가의 경우, 합성 농약의 생산량을 40% 가량 감축하는 규제 정책을 시행하고 있다.
- [5] 따라서, 미생물을 이용한 농약, 식물 등에서 추출한 천연 물질을 이용한 농약 등이 차세대 농약의 대안으로 대두되고 있는 실정이다.
- [6] 한편, 대한민국 공개특허 제 1990-0015871호에는 나비목 알라토스타틴 뉴로펩티드의 분리와 특성화에 관한 것으로 집합 해충 폴리펩티드로부터 유리된 LAS-유형 활성을 갖는 폴리펩티드에 관한 기술이 공개되어 있으나, 알라토스타틴 수용체(Allatostatin receptor: AlstR) 단백질을 이용하여 알라토스타틴과 동일 작용을 하는 어고니스트를 찾는 스크리닝 방법에 대한 기술은 기재되어 있지 않다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 친환경적인 살충 제제 개발을 통해 인체 및 환경에 미치는 유해 효과를 최소화 할 수 있는 차세대 농약의 개발을 위하여, 알라토스타틴 어고니스트를 이용하여 살충 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결 수단

- [8] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은,
- [9] a) 알라토스타틴 수용체(Allatostatin receptor:AlstR) 단백질, 형광 단백질 및 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 포함하는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조하는 단계;
- [10] b) 알라토스타틴 수용체 단백질을 포함하지 않고, 형광 단백질 및 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 포함하는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조하는 단계;
- [11] c) 상기 a) 및 b)단계에서 제조된 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터 각각을 바이러스로 패키징(packaging)하는 단계;
- [12] d) 상기 c)단계에서 제조된 바이러스 각각을 GIRK채널(G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)을 발현시킬 수 있는 동물 세포 군에서 선택되는 1종에 도입시키는 단계;
- [13] e) 상기 d)단계의 동물 세포에 도입시키기 위한 GIRK채널을 포함하는 플라스미드를 제작하고, 칼슘포스페이트 트랜스펙션(CaHPO₄ Transfection)방법을 이용해 GIRK채널을 포함하는 플라스미드를 각각의 세포에 도입시켜 GIRK 채널을 과발현시켜주는 단계; 및
- [14] f) 살충 후보 물질 및 전압 민감성 염료를 상기 e)단계에서 GIRK채널을 포함하는 바이러스가 도입된 동물 세포 각각에 첨가한 후, 세포 내 세포막 전위 차이에 따른 형광 변화를 모니터링하여, 알라토스타틴 수용체가 발현된 동물 세포와 알라토스타틴 수용체가 발현되지 않은 동물 세포의 형광 측정을 통해 살충 후보 물질 중 알라토스타틴 어고니스트로 작용하는 물질을 찾는 단계를 포함하는 살충 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [15] 본 발명의 알라토스타틴 어고니스트를 이용한 살충 물질의 스크리닝 방법을 이용하면 곤충에게서 발현되는 유충호르몬 합성을 억제하는 알라토스타틴과 유사한 천연 물질을 찾아냄으로써, 해충의 정상적 발달을 저해하는 농약으로 이용할 수 있는 장점이 있고, 알라토스타틴 및 그 수용체는 곤충계에 특이적으로 존재하므로 인간을 비롯한 포유 동물에 미치는 영향이 없을 것으로 기대되어 친환경적인 농약제제 개발에 적합하다. 또한, 알라토스타틴 시스템은 곤충계에 광범위하게 존재하므로, 다양한 해충에 작용하는 농약의 개발에 유용한 목표 물질이 된다.
- [16] 본 발명의 알라토스타틴 어고니스트를 이용한 살충 물질의 스크리닝 방법을 이용하여 다양한 화합물 라이브러리와 천연물 라이브러리를 신속하고 정확하게 스크리닝하여 살충 후보 물질을 탐색할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus: AAV) Helper-Free System 을 이용해서 원하는 유전자를 세포에 도입하는 AAV system vector를 나타낸

것으로, (a)는 AlstR-IRES-mCherry를 포함하는 벡터이고, (b)는 (a)에 대한 컨트롤로 IRES-mCherry를 포함하는 벡터를 나타낸 것이다.

[18] 도 2는 알라토스타틴 수용체가 발현되지 않은 세포를 이용하여 세포의 형광 변화를 측정한 것을 나타내는 그래프이다.

[19] 도 3(a)의 AlstR-IRES-mCherry 그래프는 세포에 AAV system을 통해 알라토스타틴 수용체가 발현된 세포에서 알라토스타틴 작용의 시간에 따른 형광 변화를 측정한 것을 나타내었고, (b)의 IRES-mCherry 그래프는 AlstR-IRES-mCherry의 control 세포로 알라토스타틴 수용체를 제외한 세포의 발현을 확인하기 위해 형광 변화를 측정한 것을 나타내었고, (c)의 (AlstR-IRES-mCherry)-(IRES-mCherry) 그래프는 알라토스타틴 수용체 단백질 유무에 따라 알라토스타틴이 발현된 세포와 발현되지 않은 세포간의 형광 변화의 편차를 비교해 세포 내에서 알라토스타틴의 작용을 확인한 것을 나타내었다.

[20] 도 4(a)의 AlstR-IRES-mCherry(AAV)+GIRK1,GIRK2 그래프는 세포에 AAV system을 통해 알라토스타틴 수용체가 발현된 세포에 GIRK1,GIRK2를 포함하는 플라스미드를 트랜스펙션해서 알라토스타틴 작용의 시간에 따른 형광 변화를 측정한 것을 나타내었고, (b)의 IRES-mCherry(AAV)+GIRK1,GIRK2 그래프는 AlstR-IRES-mCherry의 control 세포로 알라토스타틴 수용체를 제외한 세포의 발현을 확인하기 위해 GIRK1,GIRK2를 포함하는 플라스미드를 트랜스펙션해서 형광 변화를 측정한 것을 나타내었고, (c)의 (AlstR-IRES-mCherry)-(IRES-mCherry)+GIRK1,GIRK2 그래프는 GIRK1,GIRK2를 포함하는 플라스미드를 트랜스펙션함에 따른 알라토스타틴 수용체 단백질 유무에 따라 알라토스타틴이 발현된 세포와 발현되지 않은 세포간의 형광 변화의 편차를 비교해 세포 내에서 알라토스타틴의 작용을 확인한 것을 나타내었다.

[21] 도 5는 본 발명의 실시예에서 아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus) 벡터를 제조를 위한 근간이 되는 벡터를 나타낸 것으로, (A)는 pAAV-sh-mCherry 벡터이고, (B)는 pAlstR-IRES-GFP 벡터를 나타낸 것이다.

[22] 도 6은 본 발명의 실시예에서 GIRK2-IRES-GIRK1 벡터(a)를 제조를 위한 근간이 되는 벡터를 나타낸 것으로, (b)는 GIRK2 openbiosystem 벡터, (c)는 GIRK1 openbiosystem 벡터를 나타내었다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[23] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[24] 본 발명은 아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus) 벡터를 제조하기 위해, 아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus: AAV) Helper-Free system을 이용한 것이다.

[25] 본 발명은,

- [26] a) 알라토스타틴 수용체(Allatostatin receptor:AlstR) 단백질, 형광 단백질 및 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 포함하는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조하는 단계;
- [27] b) 알라토스타틴 수용체 단백질을 포함하지 않고, 형광 단백질 및 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 포함하는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조하는 단계;
- [28] c) 상기 a) 및 b)단계에서 제조된 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터 각각을 바이러스로 패키징(packaging)하는 단계;
- [29] d) 상기 c)단계에서 제조된 바이러스 각각을 GIRK채널(G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)을 발현시킬 수 있는 동물 세포 군에서 선택되는 1종에 도입시키는 단계;
- [30] e) 상기 d)단계의 동물 세포에 도입시키기 위한 GIRK채널을 포함하는 플라스미드를 제작하고, 칼슘포스페이트 트랜스펙션(CaHPO₄ Transfection)방법을 이용해 GIRK채널을 포함하는 플라스미드를 각각의 세포에 도입시켜 GIRK 채널을 과발현시켜주는 단계; 및
- [31] f) 살충 후보 물질 및 전압 민감성 염료를 상기 e)단계에서 GIRK채널을 포함하는 바이러스가 도입된 동물 세포 각각에 첨가한 후, 세포 내 세포막 전위 차이에 따른 형광 변화를 모니터링하여, 알라토스타틴 수용체가 발현된 동물 세포와 알라토스타틴 수용체가 발현되지 않은 동물 세포의 형광 측정을 통해 살충 후보 물질 중 알라토스타틴 어고니스트로 작용하는 물질을 찾는 단계를 포함하는 살충 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [32] 알라토스타틴(allatostatin)이란, 곤충류 내분비 기관인 알라타체(corpora allata)로부터 생산되는 유충 호르몬(juvenile hormone)의 합성을 억제하는 기능을 가진 신경 펩티드로, 유충 호르몬은 널리 알려진 바와 같이 곤충의 여러 생리 작용을 직접적으로 조절하는 중요한 호르몬이며, 특히 상기 호르몬의 생성이 암컷에 있어서는 배란에 필수적인 역할을 하여 살충 또는 해충 개체 조절(pest control)에 있어서 주요한 타겟 분자로 여겨지고 있다. 따라서 이를 직접적으로 조절하는 것으로 잘 알려진 알라토스타틴 역시 매우 살충 가능성이 높은 타겟 분자로 제안되고 있다.
- [33] 아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus: AAV) Helper-Free system 이란 아데노-연관 바이러스를 이용하여 원하는 유전자를 세포에 주입시켜 발현하는 시스템으로 바이러스를 만드는 벡터에 원하는 형질의 유전자를 도입시켜 바이러스를 제작하고, 이 바이러스를 세포에 감염시켜주면 유전자가 발현해 원하는 단백질을 생성하게 하는 시스템이다.
- [34] 아데노-연관 바이러스는 replication-deficient parvovirus로 좋은 infection 효율을 위해서 helper adenovirus 또는 herpes virus와 동시에 infection되었다. 본 발명에서 사용되는 AAV Helper-Free system은 helper virus의 사용 없이 infection이 가능한 human adeno-associated virus-2(AAV-2)를 만드는 시스템이다.

- [35] AAV Helper-Free system에 의해 adenovirus 의 유전자가 세포에 트랜스펙션되어 발현된다. 시스템 하에서 대부분의 adenovirus 의 유전자는 플라스미드 pHelper와 human AAV-2 vector DNA 가 함께 세포에 트랜스펙션되어 감염성 AAV particle들을 생성한다. 이 때, 사용되는 세포는 HEK293 에서 유도된 세포로 AAV-293 세포를 이용한다.
- [36] 바이러스 생성시 human AAV-2 vector DNA의 중간에 삽입된 특정 유전자들은 바이러스가 숙주 세포에 감염될 때, 숙주 세포에서 발현되게 만든다.
- [37] 상기 아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus: AAV) Helper-Free system 은 아데노-연관 바이러스의 특징을 이용해 알라토스타틴 수용체의 발현을 높게 해주고, 바이러스의 감염이 신속하고 지속 가능하도록 사용 할 수 있는 장점이 있다. 또한, 알라토스타틴 수용체가 발현된 세포주(cell line)를 이용할 필요 없이 기본 세포주에 알라토스타틴 수용체를 간단한 방법으로 발현시킴으로써, 세포의 유지 및 이동을 최소화하는 장점이 있다.
- [38] 본 발명의 a)단계에서는 알라토스타틴 수용체(AlstR)를 상기 시스템에 1차로 발현시키고 알라토스타틴 수용체의 발현의 유무를 확인하기 위해 형광 단백질을 발현시켜 확인하였다. 다양한 형광 단백질 중 본 발명에서 사용하는 전압 민감성 염료(Voltage sensitive dye)와 형광 파장의 범위가 겹치지 않는 mCherry 형광 단백질을 발현시켰다. 또한, 알라토스타틴 수용체와 mCherry 두 단백질이 접합되어 발현 할 경우, 발생할 수 있는 간섭을 방지하기 위해 내부 리보솜 유입 부위(Internal Ribosome Entry Site: IRES)를 이용해 두 유전자를 벡터 내에서 각각 발현시켰다. 따라서, 알라토스타틴 수용체(Allostatin receptor:AlstR) 단백질, mCherry 단백질 및 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 포함하는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조하였다.
- [39] 본 발명의 b)단계에서는 알라토스타틴 수용체를 포함하지 않는 대조군으로 mCherry 단백질 및 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 포함하는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조하여 각각의 벡터를 발현시켰다. 상기 Negative control을 이용해 알라토스타틴 수용체를 포함하지 않는 테스트도 진행함으로써 이를 이용해 False positive를 판별해 알라토스타틴 수용체를 포함하는 positive control 만 있는 경우 보다 더 정확한 스크리닝이 가능하도록 하였다. 따라서, 상기의 알라토스타틴 수용체 포함 유무에 차이가 있는 바이러스 벡터가 발현된 세포들에서 형광의 변화를 비교해 원하는 살충 후보 물질의 스크리닝을 더욱 정확하게 하는 효과가 있다.
- [40] 도 1은 상기의 방법으로 제조된, 아데노-연관 바이러스 Helper-Free System 을 이용해서 원하는 유전자를 세포에 도입하는 AAV system vector를 나타낸 것으로, (a)는 AlstR-IRES-mCherry를 포함하는 벡터이고, (b)는 (a)에 대한 컨트롤로 IRES-mCherry를 포함하는 벡터를 나타내었다.
- [41] 본 발명의 c)단계는 상기 a) 및 b)단계에서 제조된 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터 각각을 바이러스로 패키징(packaging)하는

단계로, 상기 벡터 각각이 세포에 발현하면 아데노-연관 바이러스가 생성되어 HEK293T에 패키징 하게 되는 시스템이다. 본 패키징(packaging) 단계는 하기의 실시예에서 자세히 설명하도록 한다.

[42] 본 발명의 d)단계는 상기 c)단계에서 제조된 바이러스 각각을 GIRK채널(G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)을 발현하는 동물 세포 군에서 선택되는 1종에 도입시키는 단계로, 알라토스타틴 수용체(Allatostatin receptor:AlstR) 단백질 유무에 따른 세포 내 세포막 전위 차이를 나타나게 하는 것은 GIRK채널(G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)이다. 제조된 바이러스 각각을 GIRK 채널을 발현하는 동물 세포 군에서 선택되는 1종에 도입시켜 세포 내에서 알라토스타틴 수용체의 발현이 가능하게 제조하였다. 상기 동물 세포는 예를 들어, HEK 293T cell, HEK 293 cell, NIH3T3 cell 및 Neuro2a cell로 이루어진 군에서 선택되는 1종일 수 있으며, HEK 293T cell 인 것이 바람직하다.

[43] 더욱 상세하게는, 곤충에 특이적으로 존재하는 알라토스타틴 수용체(Allatostatin Receptor:AlstR)를 동물 세포에서 발현시켜서, 상기 수용체가 알라토스타틴과 반응하게 되면 GIRK채널이 작동하여 칼륨 이온(K^+)이 세포막 바깥으로 나가게 되고 이로 인해 막전위가 변화하여 과분극이 발생하게 된다. 도 2는 알라토스타틴 수용체가 발현되지 않은 세포를 이용하여 세포의 형광 변화를 측정한 그래프인 control test로, GIRK채널의 발현을 확인하기 위해 칼륨 이온(K^+)과 카르바콜(carbachol)을 이용하는데 고농도의 칼륨 이온에 의해 세포 내로 칼륨 이온(K^+)이 유입되고 막전위가 변화하며 탈분극이 일어나 형광이 강해지는 현상을 관찰할 수 있다. 카르바콜(carbachol)은 아세틸콜린(acetylcholine)의 유도체로써 아세틸콜린 수용체를 활성화시키고 이로 인해 세포의 Gi신호 전달이 작동하게 하는 역할을 하는데, 이는 GIRK채널을 활성화시켜 채널을 열어주고 세포 내의 칼륨 이온(K^+)을 세포 밖으로 나가게 함으로써, 세포 내 칼륨 이온(K^+)의 농도는 낮아지게 되고, 막전위의 과분극이 일어나며 형광이 감소하게 되는 현상을 관찰 할 수 있다.

[44] 본 발명의 e)단계는 상기 d)단계의 동물 세포에 도입시키기 위한 GIRK채널을 포함하는 플라스미드를 제작하고, 칼슘포스페이트 트랜스펙션($CaHPO_4$ Transfection)방법을 이용해 GIRK채널을 포함하는 플라스미드를 각각의 세포에 도입시켜 GIRK 채널을 과발현시켜주는 단계로, 보다 구체적으로, GIRK 채널을 갖는 세포에서 알라토스타틴 수용체를 반응시킬 경우 더욱 강력한 형광 변화 효과를 확인하기 위해서 GIRK채널을 세포에 도입시켜 과발현시키는 과정을 추가로 도입하였다. 이를 이용하여 더욱 증가된 칼륨 이온(K^+)의 농도 변화 관측이 가능하도록 하였다. GIRK 채널은 알라토스타틴 수용체가 알라토스타틴에 의해 반응할 때 세포 내 세포막 전위 차이가 변화하는 채널로, 상기 GIRK 채널은 GIRK1, GIRK2, GIRK3 및 GIRK4 의 4가지 종류가 있고, 이중 알라토스타틴 수용체(AlstR)가 영향을 미치는 채널은 GIRK1, GIRK2로 알려져

있다. 따라서, 상기 GIRK 채널은 GIRK1, GIRK2, GIRK3 및 GIRK4로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상 인 것이 바람직하고, GIRK1, GIRK2를 포함하는 것이 더욱 바람직하다. 또 인간, 마우스 등 다양한 동물에 존재하는 GIRK 채널 중 마우스의 GIRK 채널이 가장 특이적 반응을 수행하는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서는 바이러스에 의한 알라토스타틴의 효과를 강화시키기 위해서 GIRK1 및 GIRK2 채널을 과발현시켜 반응하는 단계를 추가로 도입하였다.

- [45] 본 발명의 f)단계에서는 알라토스타틴 어고니스트를 이용한 살충 물질의 스크리닝 방법에서 천연물 살충 후보 물질들의 어고니스트(agonist)로서의 가능성을 판단하는데 있어서 기준이 되는 척도는 막 전위 변화로, 상기 막 전위 변화는 전압 민감성 염료(Voltage sensitive dye)의 형광 발현으로 탐지 가능하다. 전압 민감성 염료로는 느린-반응 전압-민감성 탐침(slow-response potential-sensitive probe)의 특성을 갖는 비스-(1,3-디부틸바비투릭 에시드)트리메틴 옥소놀(Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol:DiBAC4(3)), 비스-(1,3- 디에틸티오바비투릭 에시드)트리메틴 옥소놀(Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid)trimethine oxonol:DiSBAC2(3)) 및 비스-(1,3-디부틸바비투릭 에시드)펜타메틴 옥소놀(Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)pentamethine oxonol:DiBAC4(5))로 이루어진 군에서 선택된 1종을 사용할 수 있고, 바람직하게는 비스-(1,3-디부틸바비투릭 에시드)트리메틴 옥소놀(Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol:DiBAC4(3))을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 전압 민감성 염료는 세포에 들어가 세포 내 단백질(intracellular protein), 세포막(membrane) 등에 결합하여 형광을 강화시키는 특징이 있다. 탈분극이 강화되면 세포 내로 상기 염료의 유입이 일어나며 형광이 증가하게 되고, 반면 과분극시에는 형광 감소가 나타나게 되는데, 이러한 특징들은 GIRK채널(G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)의 발현을 확인하는데 용이하게 사용될 수 있다.
- [46] 본 발명은 알라토스타틴 수용체 단백질 유무에 따른 세포 내 세포막 전위 차이를 모니터링을 위해 형광 영상화 플레이트 판독기(Fluorescence Imaging Plate Reader: FLIPR) 장치를 사용하는데, 상기 형광 영상화 플레이트 판독기란 Microplate Reader 또는 Plate Reader로 microwell plate에 샘플을 넣어 생물, 화학, 물리적 변화를 측정하는 장치로 형광의 변화를 측정 가능하게 한다. 본 발명의 실시예에서는 형광 변화를 측정하기 위하여 Zenyth 3100 (Microplate Multimode Detector)을 사용하고 microwell plate는 96 well plate를 사용하여 많은 종류의 물질을 테스트하도록 하였다.
- [47] 본 발명에서는 세포에 바이러스 벡터를 이용하여 알라토스타틴 수용체를 발현시킴으로써, 알라토스타틴 단백질을 처리해줄 때의 막 전위의 변화를 확인할 수 있다.
- [48] 본 발명의 도 3의 (a)AlstR-IRES-mCherry 그래프는 세포에 AAV system을 통해 알라토스타틴 수용체가 발현된 세포에서 알라토스타틴 작용의 시간에 따른

형광 변화를 측정하는 것을 나타내었고, (b)IRES-mCherry 그래프는 AlstR-IRES-mCherry 의 control 세포로 알라토스타틴 수용체를 제외한 세포의 발현을 확인하기 위해 형광 변화를 측정하는 것을 나타내었고, (c)(AlstR-IRES-mCherry)-(IRES-mCherry) 그래프는 알라토스타틴 수용체 단백질 유무에 따라 알라토스타틴이 발현된 세포와 발현되지 않은 세포간의 형광 변화의 편차를 비교해 세포 내에서 알라토스타틴의 작용을 확인한 것을 나타내었다.

- [49] 또한, 본 발명의 도 4의 (a)AlstR-IRES-mCherry(AAV)+GIRK1,GIRK2 그래프는 세포에 AAV system을 통해 알라토스타틴 수용체가 발현된 세포에 GIRK1,GIRK2를 포함하는 플라스미드를 트랜스펙션해서 알라토스타틴 작용의 시간에 따른 형광 변화를 측정하는 것을 나타내었고, (b)IRES-mCherry(AAV)+GIRK1,GIRK2 그래프는 AlstR-IRES-mCherry 의 control 세포로 알라토스타틴 수용체를 제외한 세포의 발현을 확인하기 위해 GIRK1,GIRK2를 포함하는 플라스미드를 트랜스펙션해서 형광 변화를 측정하는 것을 나타내었고, (c)(AlstR-IRES-mCherry)-(IRES-mCherry)+GIRK1,GIRK2 그래프는 GIRK1,GIRK2를 포함하는 플라스미드를 트랜스펙션함에 따른 알라토스타틴 수용체 단백질 유무에 따라 알라토스타틴이 발현된 세포와 발현되지 않은 세포간의 형광 변화의 편차를 비교해 세포 내에서 알라토스타틴의 작용을 확인한 것을 나타내었다.

- [50] 본 발명의 살충 물질을 스크리닝하는 방법을 이용하면 알라토스타틴 수용체가 포함되어서 발현된 세포의 형광 변화와 알라토스타틴 수용체를 포함하지 않아 이 단백질이 발현되지 않은 세포의 형광 변화의 차이를 비교하여 원하는 살충 후보 물질이 알라토스타틴과 유사한 작용을 하는지 확인할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [51] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- [52] (1) 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조
- [53] 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 하기의 방법으로 제조하였다.
- [54] 도 5는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조를 위한 근간이 되는 벡터를 나타낸 것으로, (A)는 pAAV-sh-mCherry 벡터이고, (B)는 pAlstR-IRES-GFP 벡터를 나타내었다. (A)에서 sh가 있는 부분을 제거해주고 (B)의 AlstR, IRES를 사용하였다.
- [55] pAAV-AlstR-IRES-mCherry 제조
- [56] A 는 vector, B의 AlstR-IRES는 insert부위를 나타낸다.
- [57] A(pAAV-sh-mCherry)의 제조 과정은 NEB buffer2 5ul, BSA buffer 5ul,

DNA(1ug/ul) 5ug, NheI enzyme (NEB, cat# R0131S) 5ul, Autoclaved DW(오토클레이브된 3차 증류수, ADW) 30ul를 넣어준 후, 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. 그 후, Klenow (NEB, cat# M0210S)를 처리해서 enzyme cut 부위를 blunt end로 바꾸어 주었다. 상기 혼합물에 2ul dNTP와 1ul의 Klenow를 처리하고 상온에서 1시간 처리 후 75°C에서 20분간 heat inactivation을 하였다. XbaI (NEB, cat# R0145S)을 5ul 추가로 넣어주고 37°C 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation 해주어 활성을 억제하였다. 다음으로, Vector의 self ligation을 억제하는 CIP(NEB, cat# M0290S) 2.5ul를 처리하고 37°C 1시간 동안 처리하였다.

[58] B(pAlstR-IRES-GFP)의 제조 과정은 NEB buffer2 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, NheI 5ul, ADW 30ul 를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. 그 후, SmaI (NEB, cat# R0141S) 5ul 추가해 넣어주고 37°C 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation 해주어 활성을 억제시켰다.

[59] A의 blunt end 부위와 B의 SmaI에 의해 생긴 blunt end 부위가 ligation되고, A의 XbaI 부위와 B의 NheI 부위가 ligation되었다. A, B를 gel extraction을 실시하였는데, 각각 A는 약 6Kb 사이즈의 DNA, B는 약 1.9Kb 사이즈의 DNA를 이용하였다. 그 후, A와 B의 농도와 분자 크기를 계산해 ligation하였다. 구체적으로는 Vector와 Insert DNA를 비율에 맞게 넣어주고 T4 DNA ligase (NEB cat# M0202S) 1ul 와 10Xligase buffer 2ul를 넣어주고 총 20ul가 되도록 하였다. 상온에서 16시간 이상 ligation을 하였다.

[60] pAAV-IRES-mCherry 제조

[61] A 는 vector, B의 IRES는 insert 부위를 나타낸다.

[62] A(pAAV-sh-mCherry)의 제조 과정은 NEB buffer4 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, XbaI enzyme 5ul, ADW 30ul를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. 그 후, Klenow를 처리해서 enzyme cut 부위를 blunt end로 바꾸어 주었다. 상기 혼합물에 2ul dNTP와 1ul의 Klenow를 처리하고 상온에서 1시간 처리 후 75°C에서 20분간 heat inactivation을 하였다. 그 다음으로, Phenol extraction과정을 통해 DNA만 추출한 후, NEB buffer2 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, NheI enzyme 5ul, ADW 30ul를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. Vector의 self ligation을 억제하는 CIP 2.5ul를 처리하고 37°C 1시간 처리하였다.

[63] B(pAlstR-IRES-GFP)의 제조 과정은, NEB buffer EcoRI 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, EcoRI (NEB cat# R0101S) 5ul, ADW 30ul를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을

억제하였다. 그 후, Klenow를 처리해서 enzyme cut 부위를 blunt end로 바꾸어 주었다. 상기 혼합물에 2ul dNTP와 1ul의 Klenow를 처리하고 상온에서 1시간 처리 후 75°C에서 20분간 heat inactivation하였다. 그 다음으로, Phenol extraction과정을 통해 DNA만 추출한 후, NEB buffer4 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, XbaI enzyme 5ul, ADW 30ul를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다.

[64] A의 blunt end 부위와 B의 blunt end 부위가 ligation되고, A의 NheI 부위와 B의 XbaI 부위가 ligation되었다. A, B를 gel extraction 을 실시하였는데, 각각 A는 약 6Kb 사이즈의 DNA, B는 약 0.6Kb 사이즈의 DNA를 이용하였다. 그 후, A와 B의 농도와 분자 크기를 계산해 ligation해주었다. Vector와 Insert DNA를 비율에 맞게 넣어주고 T4 DNA ligase 1ul 와 10Xligase buffer 2ul를 넣어주고 총 20ul가 되게 하였다. 상온에서 16시간 이상 ligation을 하였다.

[65] 바이러스가 정상적으로 제작되어 세포에 들어갔는지 확인하기 위해서 형광 단백질을 이용하는데, 본 실시예에서는 여러 종류의 형광 단백질 중 mCherry단백질을 이용하였다. 전압 민감성 염료로 사용된 비스-(1,3-디부틸바비투릭 에시드)트리메틴 옥소놀(Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol)(DiBAC₄(3))의 형광 여기(excitation) 파장은 490nm, 방출(emission) 파장은 516nm으로, 이들 파장에 대한 간섭을 최소화하기 위해 형광 단백질 중 mCherry(excitation 587nm, emission 610nm) 단백질을 이용하였다. 또한, 내부 리보솜 유입 부위(internal ribosome entry site: IRES)를 이용해 알라토스타틴 수용체와 mCherry단백질이 독립적으로 발현될 수 있도록 해주어 알라토스타틴 수용체에 미칠 수 있는 다른 영향을 최소화하도록 하였다.

[66] (2) 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 바이러스로 패키징(packaging)

[67] 하기의 벡터가 세포에 발현하면 아데노-연관 바이러스가 생성되어 HEK293T에 패키징 하는 시스템이다.

[68] 바이러스 제작 과정(패키징 과정)

[69] 플라스미드 및 세포는 AAV Helper-Free system(Agilent, cat#240071)에 존재하였다. AAV-293 세포를 100-mm tissue culture plate에서 배양하였는데, 이때, 세포는 plate 당 약 $5 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 씩 뿌려주고 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 약 2~3일 후, 세포가 70-80%의 confluency를 가지게 되면 플라스미드 트랜스펙션을 한다. pAAV 발현 플라스미드(제작된 벡터 pAAV-AlstR-IRES-mCherry 또는 pAAV-IRES-mCherry), pAAV-RC, pHelper 세 가지 플라스미드를 1ug/ul의 농도로 TE buffer, PH 7.5 에 준비하여 동시에 세포에 트랜스펙션 시켜주었다. 상기 세 종류의 플라스미드를 10ul씩 15ml 코니칼 튜브에 넣어주고, 1ml의 0.3M CaCl₂를 추가해 부드럽게 섞어주었다. 섞어준 용액을 2XHBS 1ml에 한방울 씩 떨어뜨려 준 후 부드럽게 섞어주었다. 상기 용액

2.03ml을 2~3일 동안 길러준 상기 세포에 방울 방울 떨어뜨려 트랜스펙션 시켜주고 37°C 인큐베이터에서 다시 넣어주었다. 6시간이 지난 후, 미디어를 새 미디어로 교체해 주었다. 그 후, 66 ~ 72시간 동안 37°C 인큐베이터에서 더 세포를 길러 바이러스가 생성되게 해주었다. 다음으로, 37°C water bath(워터 베스)와 dry ice-ethanol bath(드라이 아이스-에탄올 베스)를 준비하였고, 트랜스펙션시킨 세포의 미디어와 세포를 긁어 모아 15ml 코니칼 튜브에 넣어주어 잘 밀봉하였다. 상기 튜브를 드라이아이스-에탄올 베스에 10분간 넣어주어 내부의 세포와 미디어를 얼려주는데, 10분 이내로 얼지 않으면 완전히 얼 때까지 기다렸다. 그 후, 완전히 언 튜브를 워터 베스에 넣어주고 10분간 녹여주는데, 10분 이내로 녹지 않으면 완전히 녹을 때까지 기다리고, 완전히 녹은 튜브를 가볍게 볼텍싱 해주었다. 상기 과정을 총 4번 반복해 세포를 분해해서 내부의 바이러스를 추출하였고, 상기 과정 후 나오는 세포 잔여물들을 상온, 10,000g, 10분간 센트리 퓨즈를 돌려 가라앉히고, 위에 남은 용액들은 40% PEG(polyethylene glycol)액과 섞어 10% PEG용액을 만들어 주었는데, 즉, 40% PEG 1: 바이러스용액 3의 비율로 섞어 주었고, 섞어준 용액은 2일간 4°C에서 보관해 주었다. 2일 후 생성된 바이러스의 농축을 위하여 3,000rpm 30분 4°C로 센트리 퓨즈를 돌려주었고, 그 후 위의 용액은 제거해주고 아래 남은 잔여물들을 ice-DPBS에 1ml에 녹여준 후 29,000rpm 2시간 4°C에서 센트리 퓨즈를 돌려주었다. 그 후, 상층의 용액은 제거해주고 아래 남은 잔여물들을 ice-DPBS 100ul에 녹여주면 여기에 바이러스가 녹아 있게 되고, 이 바이러스를 HEK293T 세포에 인펙션 시켜주었다.

[70] (3) 팩키징(packaging)된 바이러스를 인간세포에 도입

[71] 인간의 신장세포인 HEK 293T cell을 96 black well plate(SPL, Cat#-SP30296)에 1*104개/well(각 well 100uL)씩 깔아주고 하루 동안 37°C의 5% CO₂incubator에서 배양하였다.

[72] 하루 동안 배양한 세포는 약 50% ~ 60%의 컨플루언트(confluent)를 가지는데 만약 충분하게 자라지 않으면 추가로 배양하였다. 충분히 자란 세포를 가진 well에서 미디어를 제거해 준 후, 아데노-연관 바이러스(Adeno-associated virus: AAV) Helper-Free system을 이용하여 제조한 알라토스타틴 수용체를 가진 바이러스를 미디어와 섞어 well에 각각 100ul씩 처리하였다. 이 때, 알라토스타틴 수용체를 포함하지 않는 control 바이러스도 동일하게 처리하였다. 바이러스를 처리하고 16~24시간 후, GIRK 채널을 포함하는 플라스미드의 트랜스펙션을 하기의 방법으로 실시하였다.

[73] (4) GIRK1, GIRK2 채널의 HEK cell 도입을 위한 플라스미드 제작

[74] GIRK2-IRES-GIRK1 제작

[75] GIRK2-IRES-GIRK1 플라스미드를 하기의 방법으로 제조하였다.

[76] 도 6은 GIRK2-IRES-GIRK1 벡터(a)를 제조를 위한 근간이 되는 벡터를 나타낸 것으로, (b)는 GIRK2 openbiosystem 벡터, (c)는 GIRK1 openbiosystem 벡터를

나타내었다. 도5(b)의 pAlstR-IRES-GFP 벡터에서 AlstR이 있는 부분을 제거해주고 도6(b)의 GIRK2 부분을, 도5(b)의 GFP 부분을 제거해주고, 도6(c)의 GIRK1 부분을 삽입하여, GIRK2-IRES-GIRK1 벡터(도6(a))를 완성하였다.

[77] 임의로 A는 pAlstR-IRES-GFP를 나타내고, B는 GIRK2 openbiosystem 벡터, C는 GIRK1 openbiosystem로 나타내었다. 즉, A는 vector로 B의 INSERT 부위를 먼저 클로닝해 주고, C의 INSERT 부위를 클로닝하여 완성하였다.

[78] A(pAlstR-IRES-GFP)의 제조 과정은 다음과 같다. NEB buffer3 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, MluI (NEB, cat# R0198S) 5ul, ADW 30ul를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 80°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. 그 후, SmaI (NEB, cat# R0141S) 5ul 추가로 넣어주고 37°C 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation 해주어 활성을 억제시켰다. 그 후 Klenow(NEB, cat# M0210S)를 처리해서 enzyme cut 부위를 blunt end로 바꾸어 주었다. 상기 혼합물에 2ul dNTP와 1ul의 Klenow(NEB, cat# M0210S)를 처리하고 상온에서 1시간 처리해 주었다. 이 후 DNA cleanup과정을 통해 DNA만 추출하였다. 추출한 DNA를 이용하여 NEB buffer2 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, NheI enzyme 5ul, ADW 30ul를 넣어준 후, 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. 그 후 Klenow(NEB, cat# M0210S)를 처리해서 enzyme cut 부위를 blunt end로 바꾸어 주었다. 상기 혼합물에 2ul dNTP와 1ul의 Klenow를 처리하고 상온에서 1시간 처리해 준 후, 75°C에서 20분간 heat inactivation 해주어 활성을 억제시켰다. Vector의 self ligation을 억제하는 CIP(NEB, cat# M0290S) 2.5ul를 처리하고 37°C 1시간 동안 처리하였다.

[79] B의 제조 과정은 NEB buffer4 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, SacII enzyme(NEB, cat# R0157S) 5ul, Autoclaved DW(오토클레이브된 3차 증류수, ADW) 30ul를 넣어준 후, 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. 그 후, Klenow(exo)(NEB, cat# M0212S)를 처리해서 enzyme cut 부위를 blunt end로 바꾸어 주었다. 상기 혼합물에 2ul dNTP와 1ul의 Klenow를 처리하고 상온에서 1시간 처리 한 후, 75°C에서 20분간 heat inactivation을 하였다. BlnI enzyme(NEB, cat# R0585S)을 5ul 추가로 넣어주고 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut을 해준 후, Klenow를 처리해서 enzyme cut 부위를 blunt end로 바꾸어 주었다. 상기 혼합물에 2ul dNTP와 1ul의 Klenow를 처리하고 상온에서 1시간 처리해 주었다.

[80] A의 blunt end 부위와 B의 blunt end 부위가 ligation되었다. A, B를 gel extraction을 실시하였는데, 각각 A는 약 6.7Kb 사이즈의 DNA, B는 약 1.6Kb 사이즈의 DNA를 이용하였다. 그 후, A와 B의 농도와 분자 크기를 계산해 ligation하였다. 구체적으로는 Vector와 Insert DNA를 비율에 맞게 넣어주고 T4 DNA ligase(NEB cat# M0202S) 1ul 와 10Xligase buffer 2ul를 넣어주고, 총 20ul가

- 되도록 하였다. 상온에서 16시간 이상 ligation을 하였다.
- [81] 상기 과정을 통해 1차적으로 GIRK2-IRES-GFP 벡터를 제작하였고, 여기서 GFP를 제거해 준 후, GIRK1 openbiosystem 벡터의 GIRK1 부위를 삽입해 주었다.
- [82] GIRK2-IRES-GFP의 DNA에서 벡터를 제작하는 과정은, NEB buffer4 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, XbaI(NEB, cat# R0145S) 5ul, ADW 30ul 를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. 이 후 DNA cleanup 과정을 통해 DNA만 추출해준다. 그 후, NEB buffer3 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, NotI (NEB, cat# R0189S) 5ul, ADW 30ul 를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. Vector의 self ligation을 억제하는 CIP(NEB, cat# M0290S) 2.5ul를 처리하고 37°C 1시간 동안 처리하였다.
- [83] C의 제조 과정은 NEB buffer4 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, XbaI(NEB, cat# R0145S) 5ul, ADW 30ul 를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다. 이 후 DNA cleanup 과정을 통해 DNA만 추출하였다. 그 후, NEB buffer3 5ul, BSA buffer 5ul, DNA(1ug/ul) 5ug, NotI(NEB, cat# R0189S) 5ul, ADW 30ul를 넣어준 후 37°C에서 1시간 30분 동안 enzyme cut 해준 후 65°C에서 20분간 heat inactivation시켜 활성을 억제하였다.
- [84] 각각의 XbaI enzyme cut 부위와 NotI enzyme cut 부위가 ligation되었다. A, B를 gel extraction을 실시하였는데, 각각 A는 약 7.6Kb 사이즈의 DNA, B는 약 1.7Kb 사이즈의 DNA를 이용하였다. 그 후, A와 B의 농도와 분자 크기를 계산해 ligation하였다. 구체적으로는 Vector와 Insert DNA를 비율에 맞게 넣어주고 T4 DNA ligase(NEB cat# MO202S)1ul와 10Xligase buffer 2ul를 넣어주고 총 20ul가 되도록 하였다. 상온에서 16시간 이상 ligation을 하였다.
- [85] (5) 칼슘포스페이트 트랜스펙션(CaHPO₄ Transfection)방법을 이용한 플라스미드의 트랜스펙션
- [86] 플라스미드 트랜스펙션은 칼슘포스페이트 트랜스펙션(CaHPO₄ Transfection)을 이용해서 진행하였다.
- [87] 0.3M CaCl₂와 2XHBS를 이용해 트랜스펙션한 후, 96well plate 의 1well당 기준으로 총 10ul중 0.3M CaCl₂는 8.7ul 트랜스펙션 할 DNA(GIRK2-IRES-GIRK1) 0.5ug나머지 DW로 용량을 맞춰주고 HBS(2X) 10ul 와 섞어준 후, 총 20ul를 well에 처리하였다.
- [88] 플라스미드를 처리하기 전에 well에 있던 미디어는 바이러스를 제거하기 위해, 새로운 미디어로 갈아준 후 20ul를 처리하였다.
- [89] 4 내지 8시간 후 트랜스펙션을 위해 처리해 준 용액의 영향을 나타내지 않기 위하여, 미디어를 제거하고 새로운 미디어로 갈아주고, 약 48시간 후 형광을 측정하였다.

[90] (6) 형광의 측정

- [91] 알라토스타틴 수용체(Allatostatin receptor:AlstR) 단백질 유무에 따른 세포 내 세포막 전위 차이를 모니터링하여, 알라토스타틴 수용체가 발현된 세포와 알라토스타틴 수용체가 발현되지 않은 세포의 형광 차이를 확인하였다. 세포 내 세포막 전위 차이 변화에 따라 형광이 변화하고, 상기와 같은 형광의 변화를 형광 영상화 플레이트 판독기(Fluorescence Imaging Plate Reader: FLIPR)인 Zenyth 3100(microplate Multimode Detector)을 이용하여 하기의 방법으로 측정하였다.
- [92] 상기 실시예의 결과, 패키징(packaging)된 바이러스를 인간세포에 도입하여 배양한지 48 시간 후에 충분히 바이러스가 발현되면 형광을 측정하기 위한 준비로, 먼저 well에 세포 잔여물이 존재하면 형광 측정에 방해가 될 수 있으므로, 세포 잔여물을 제거하기 위해 DiBAC₄(3)를 녹이지 않은 타이로드 용액(Tyrod's solution)을 이용해 세척하였다. 각 well에 미디어를 제거해 주고 타이로드 용액 100ul를 넣어 주고 다시 제거하는 작업을 2회 반복하였다. 그 후, 타이로드 용액에 미리 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide:DMSO)에 녹여준 DiBAC₄(3)을 녹여서 5uM DiBAC용액을 제조하여 well당 180uL 씩 처리한 후 한 시간 동안 37°C에서 5% CO₂incubator에서 배양하였다.
- [93] 한 시간 후 측정하고자 하는 물질을 5uM DiBAC solution에 녹여주고 각 well 당 20uL씩 추가로 첨가하면서, 시간에 따른 형광의 변화를 Zenyth 3100을 이용해 측정하였다. 형광은 3분 간격으로 측정하였고, 초기에는 아무것도 처리하지 않고 형광을 측정해서 상기 장비와 well이 측정을 위해 최적화 되었는지 확인하기 위해, control well의 형광 값 변화를 기준으로 삼고 다른 물질들의 측정 값과 차이를 비교하였다. 더욱 자세하게는, control well을 0을 기준으로 하여, 다른 물질을 넣어준 well을 control과 비교해 형광의 증가 감소를 측정하였다.
- [94] 그 후, 측정 물질을 20ul씩 추가하면서, 형광의 세기를 측정하였다. 이 때 형광의 차이 비교는 측정 물질을 처리해 준 값과 이후의 변화 값 간의 차이를 비교하였다. 이는 well에 완충액(buffer)의 양이 늘어나게 되면, 형광의 절대값도 변화하기 때문이다.
- [95] 알라토스타틴 수용체가 포함되어서 발현된 세포의 형광 변화와 알라토스타틴 수용체를 포함하지 않아 이 단백질이 발현되지 않은 세포의 형광 변화의 차이를 비교하여 원하는 타겟 물질이 알라토스타틴과 유사한 작용을 했는지 확인하였다. 구체적으로는, 타겟 물질과 알라토스타틴을 동시에 테스트할 때, 동일하게 작용하는 경우를 기준으로 하였다. 알라토스타틴을 처리하고 10분 이상의 시간이 지난 후 변화를 보면 도 3의 (a), (b), (c)의 그래프에서 알라토스타틴을 적용 시켜준 결과, 알라토스타틴 수용체의 유무에 따라 모두 증가하거나 감소하는 결과를 나타내었으나, 이로 인한 확실한 효과를 증명하기 어려웠다.
- [96] 반면 GIRK채널을 도입시켜준 도 4의 (a), (b), (c)의 그래프는 도 3과는 다른 양상을 나타내었다. 즉, AlstR-IRES-mCherry 를 이용한 세포의 실험에서는

알라토스타틴이 약 -5 내지 -2% 정도의 변화를 일으켰고, IRES-mCherry 를 이용한 세포의 실험은 알라토스타틴이 0 ~ +3% 변화를 일으키는 결과를 나타내었다. 따라서, 상기 두 실험 간의 형광 변화의 차이는 AlstR-IRES-mCherry의 경우에 -8 내지 -2% 정도의 형광 변화의 차이를 일으키는 결과를 나타내었다.

청구범위

[청구항 1]

a) 알라토스타틴 수용체(Allatostatin receptor:AlstR) 단백질, 형광 단백질 및 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 포함하는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조하는 단계;
 b) 알라토스타틴 수용체 단백질을 포함하지 않고, 형광 단백질 및 내부 리보솜 유입 부위(IRES)를 포함하는 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터를 제조하는 단계;
 c) 상기 a) 및 b)단계에서 제조된 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus) 벡터 각각을 바이러스로 패키징(packaging)하는 단계;
 d) 상기 c)단계에서 제조된 바이러스 각각을 GIRK채널(G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel)을 발현시킬 수 있는 동물 세포 군에서 선택되는 1종에 도입시키는 단계;
 e) 상기 d)단계의 동물 세포에 도입시키기 위한 GIRK채널을 포함하는 플라스미드를 제작하고, 칼슘포스페이트 트랜스펙션(CaHPO₄ Transfection)방법을 이용해 GIRK채널을 포함하는 플라스미드를 각각의 세포에 도입시켜 GIRK 채널을 과발현시켜주는 단계; 및
 f) 살충 후보 물질 및 전압 민감성 염료를 상기 e)단계에서 GIRK채널을 포함하는 바이러스가 도입된 동물 세포 각각에 첨가한 후, 세포 내 세포막 전위 차이에 따른 형광 변화를 모니터링하여, 알라토스타틴 수용체가 발현된 동물 세포와 알라토스타틴 수용체가 발현되지 않은 동물 세포의 형광 측정을 통해 살충 후보 물질 중 알라토스타틴 어고니스트로 작용하는 물질을 찾는 단계를 포함하는 살충 물질을 스크리닝하는 방법.

[청구항 2]

청구항 1에 있어서, 상기 형광 단백질은 mCherry 단백질인 것을 특징으로 하는, 살충 물질을 스크리닝하는 방법.

[청구항 3]

청구항 1에 있어서, 상기 GIRK 채널을 발현하는 동물 세포는 HEK 293T cell, HEK 293 cell, NIH3T3 cell 및 Neuro2a cell로 이루어진 군에서 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는, 살충 물질을 스크리닝하는 방법.

[청구항 4]

청구항 1에 있어서, 상기 GIRK 채널은 GIRK1, GIRK2, GIRK3 및 GIRK4로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 살충 물질을 스크리닝하는 방법.

[청구항 5]

청구항 1에 있어서, 상기 전압 민감성 염료는 비스-(1,3-디부틸바비투릭 에시드)트리메틴 옥소놀(Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine

Oxonol:DiBAC4(3)), 비스-(1,3-디에틸티오바비튜릭 에시드) 트리메틴 옥소놀(Bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid)trimethine oxonol:DiSBAC2(3)) 및 비스-(1,3-디부틸바비튜릭 에시드)펜타메틴 옥소놀(Bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)pentamethine oxonol:DiBAC4(5))로 이루어진 군에서 선택되는 1종인 것을 특징으로 하는, 살충 물질을 스크리닝하는 방법.

[Fig. 1a]

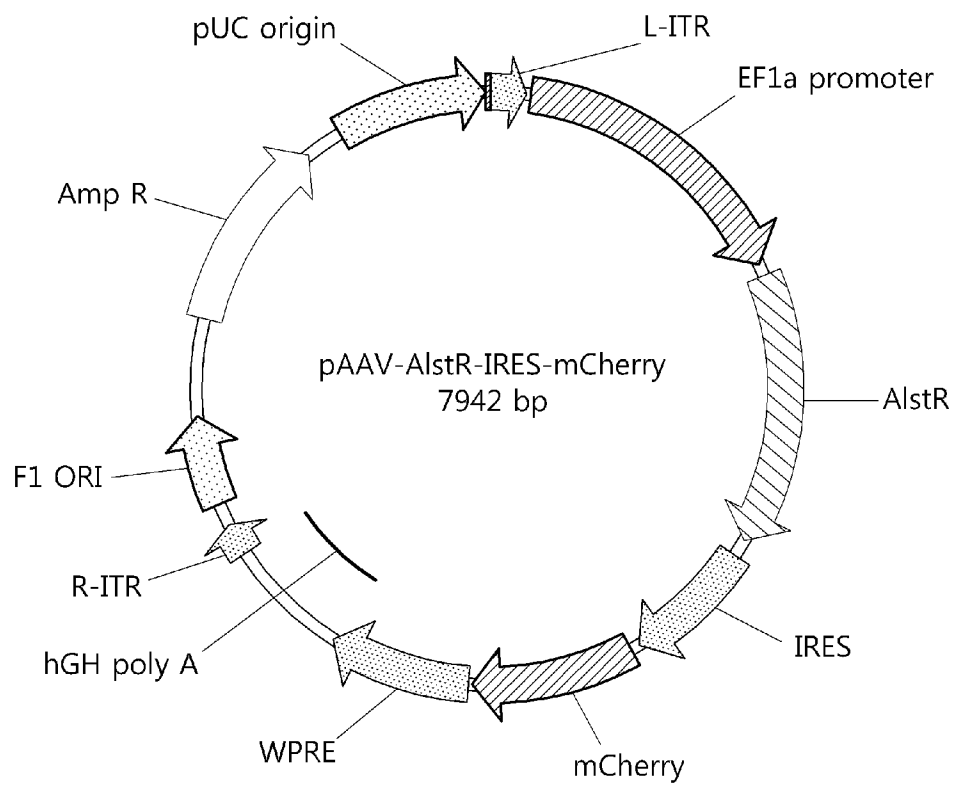


FIG. 1A

[Fig. 1b]

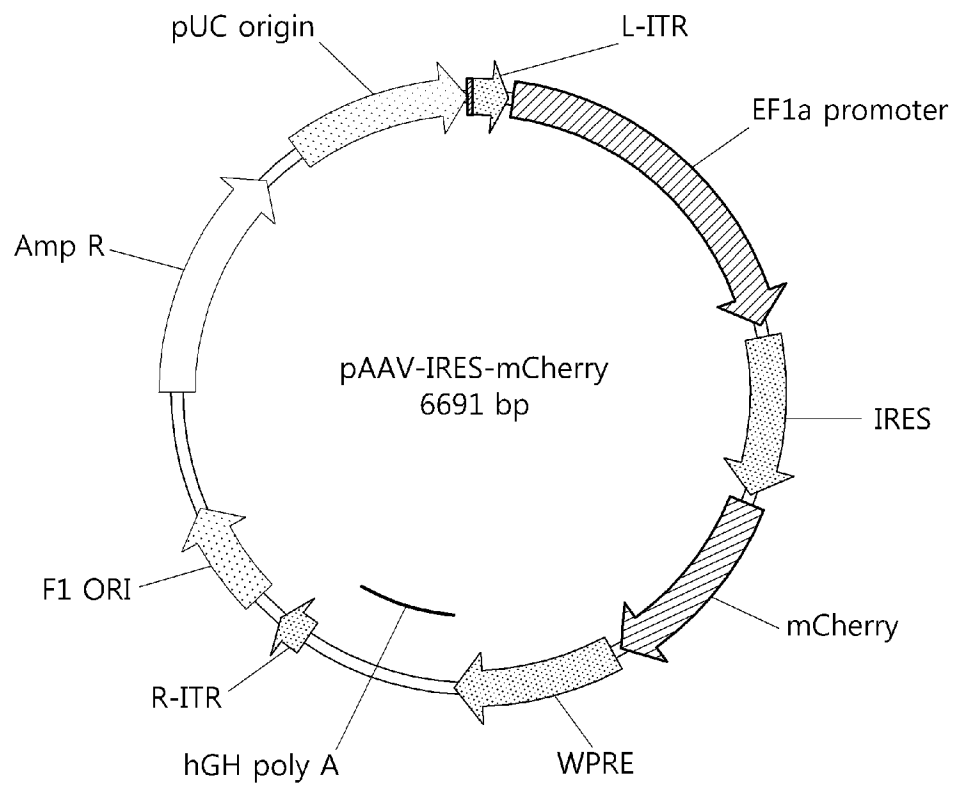


FIG. 1B

[Fig. 2]

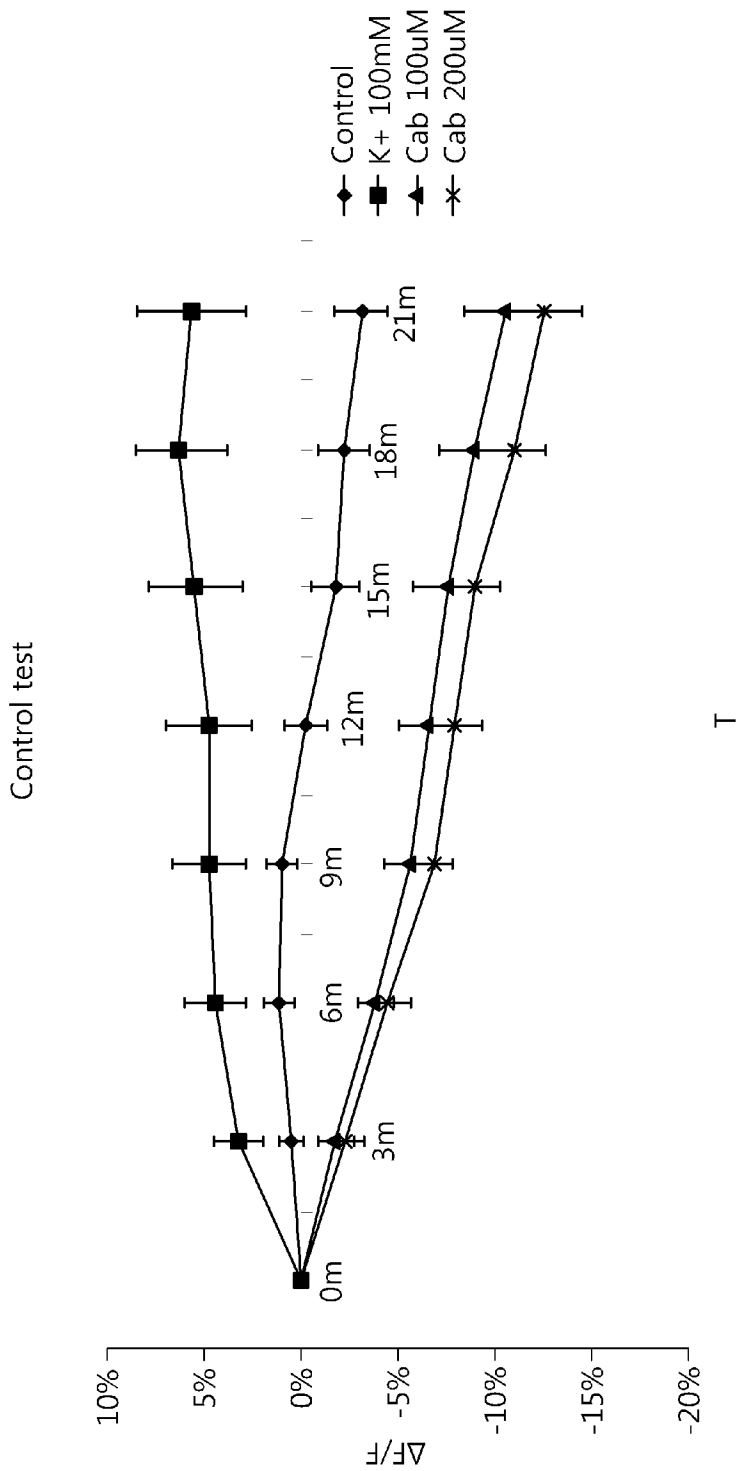


FIG. 2

[Fig. 3a]

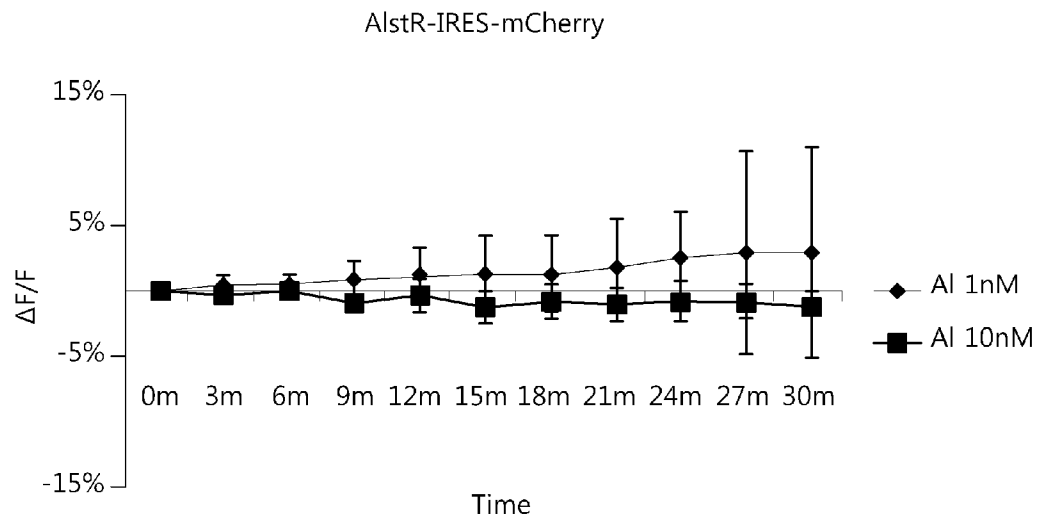


FIG. 3A

[Fig. 3b]

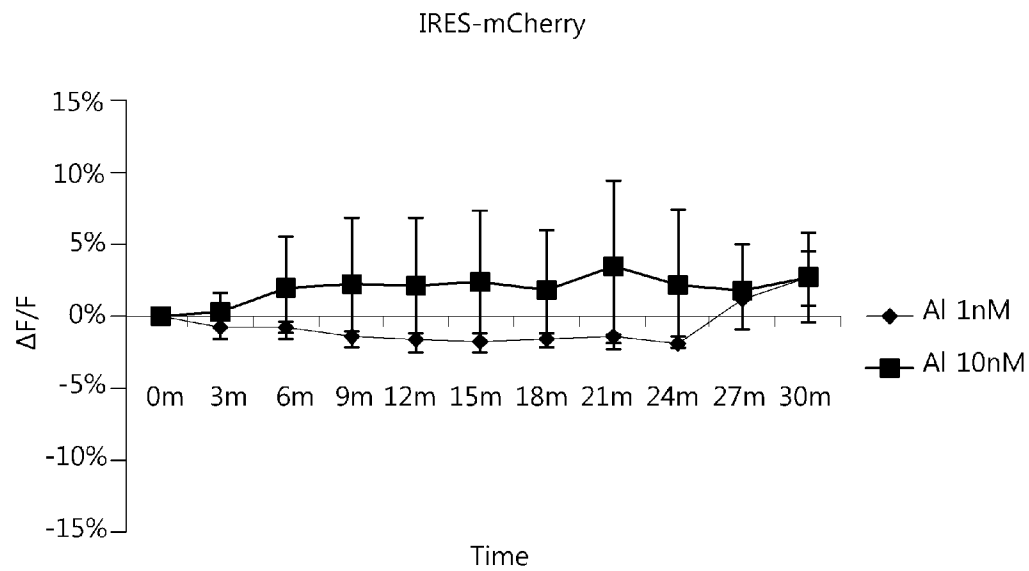


FIG. 3B

[Fig. 3c]

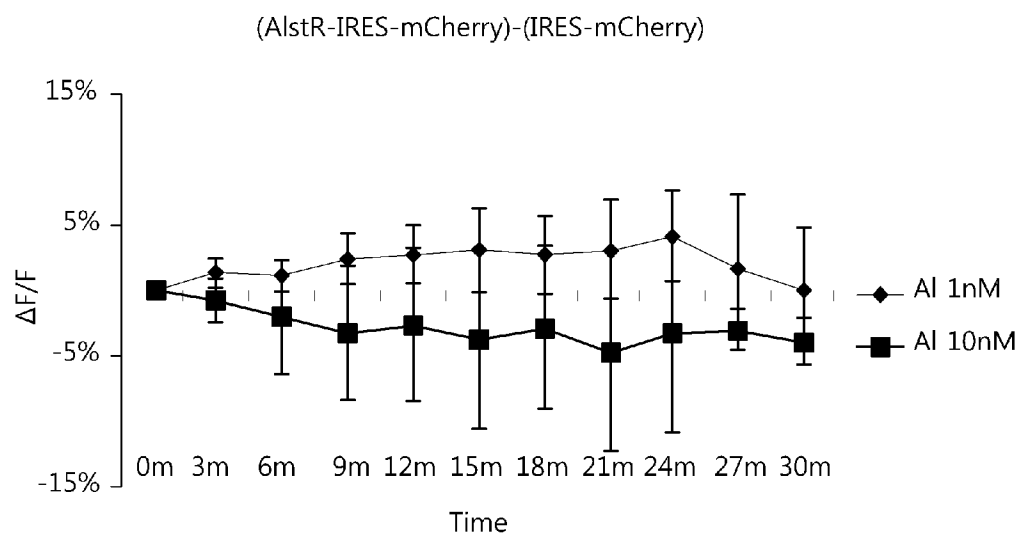


FIG. 3C

[Fig. 4a]

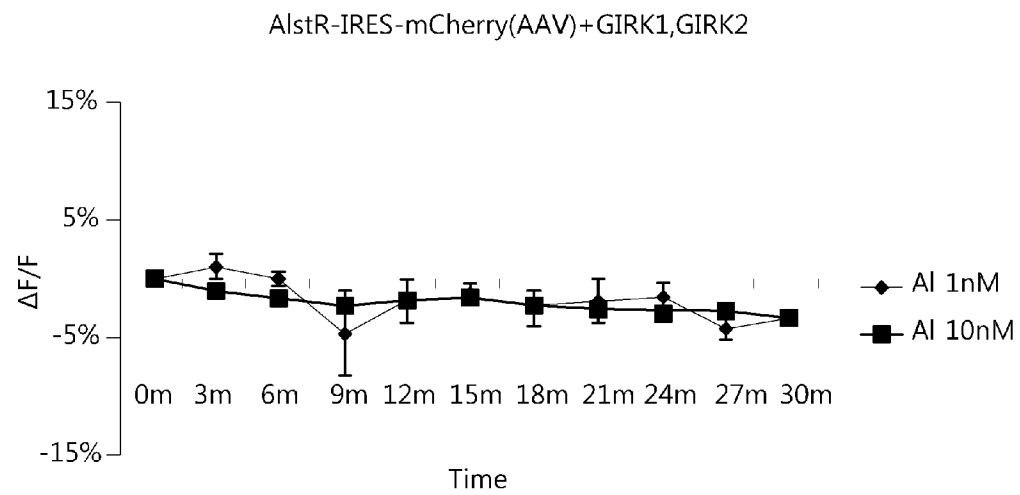


FIG. 4A

[Fig. 4b]

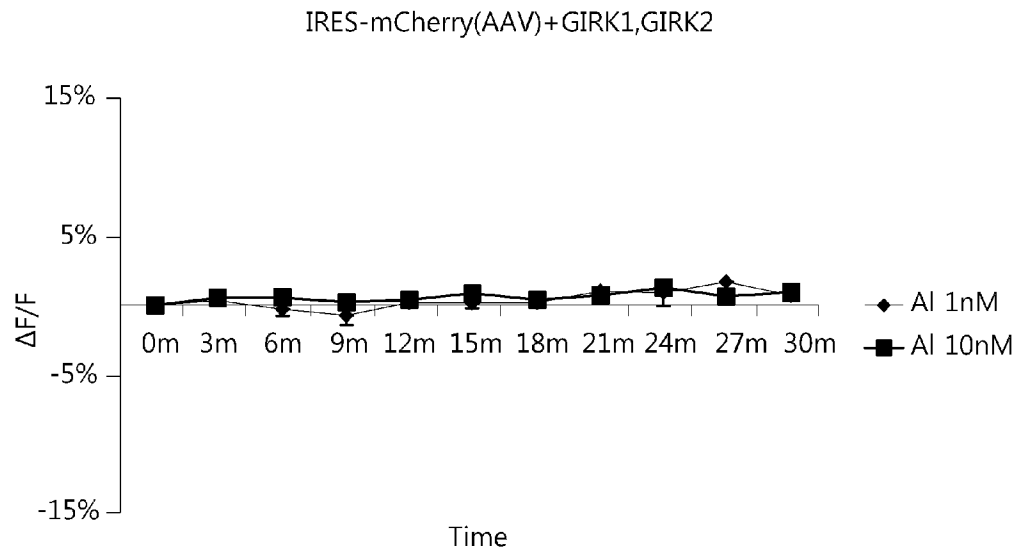


FIG. 4B

[Fig. 4c]

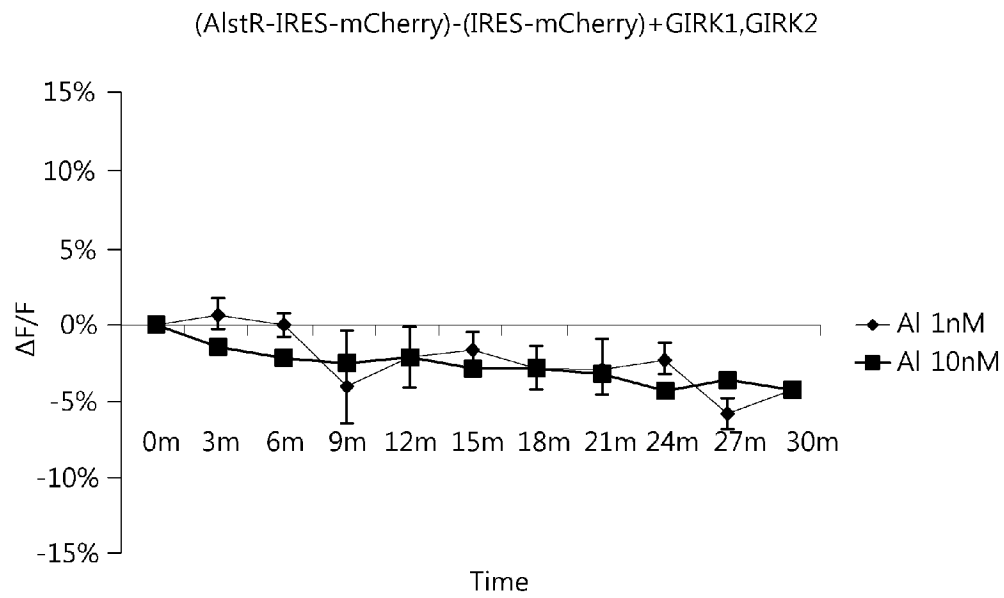


FIG. 4C

[Fig. 5a]

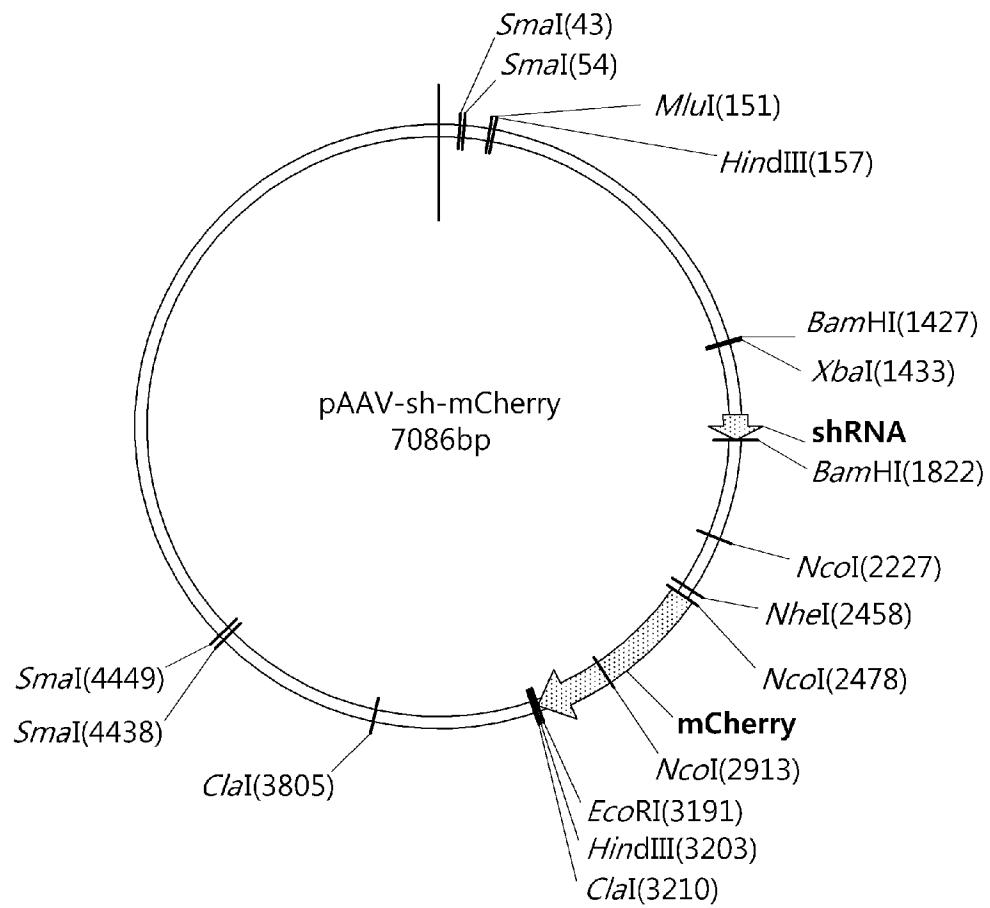


FIG. 5A

[Fig. 5b]

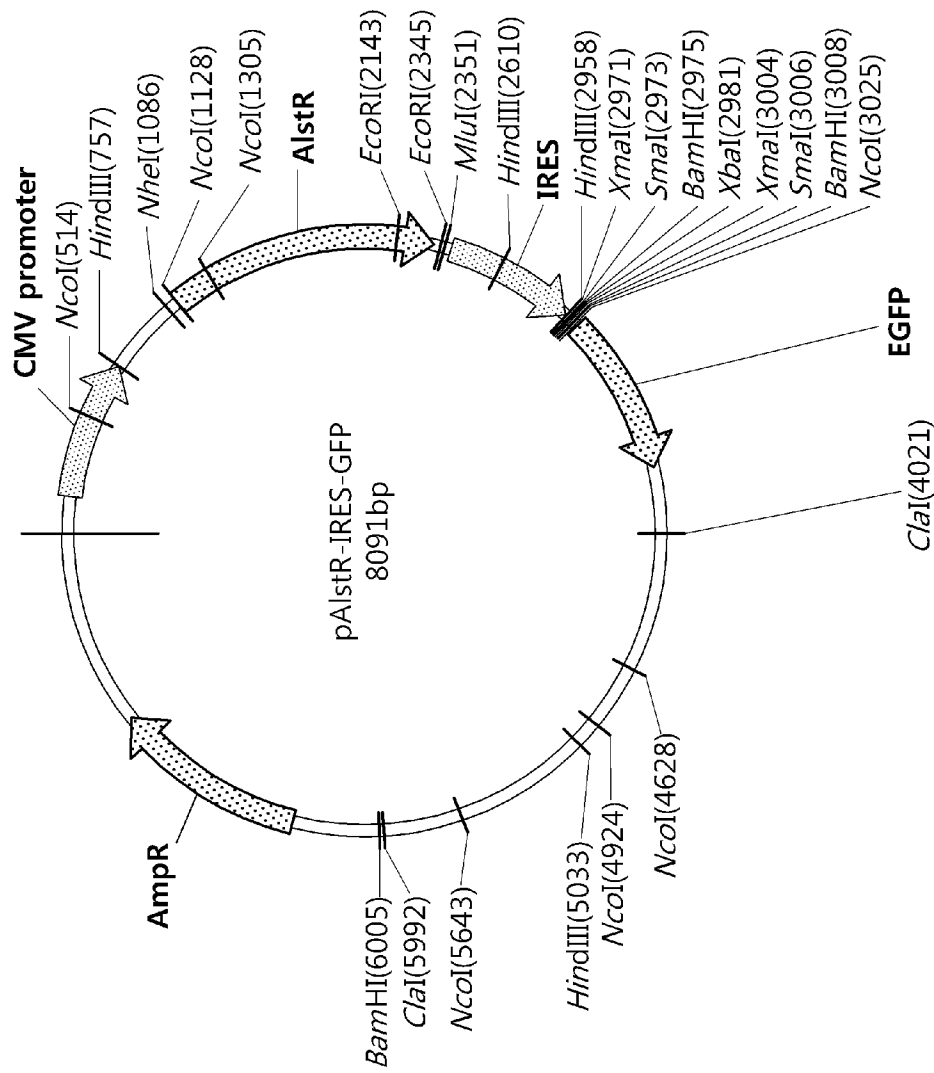


FIG. 5B

[Fig. 6a]

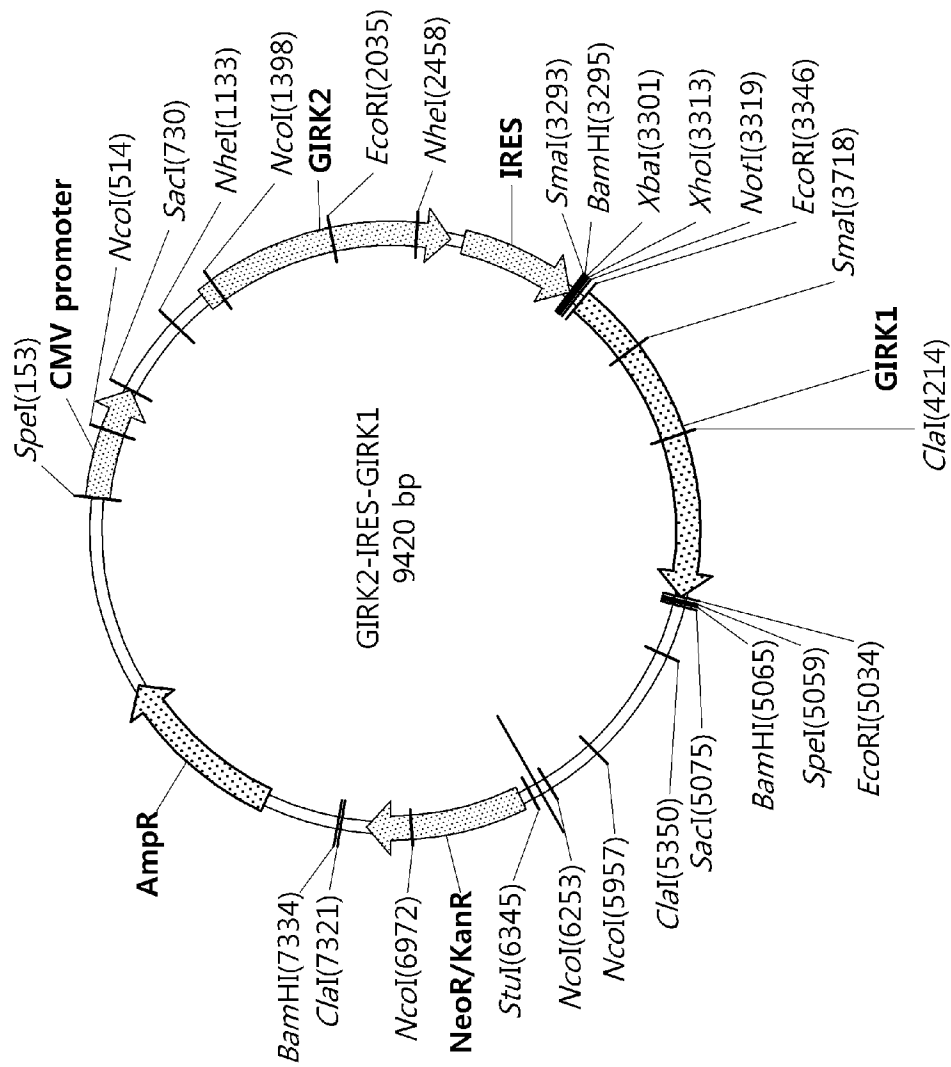


FIG. 6A

[Fig. 6b]

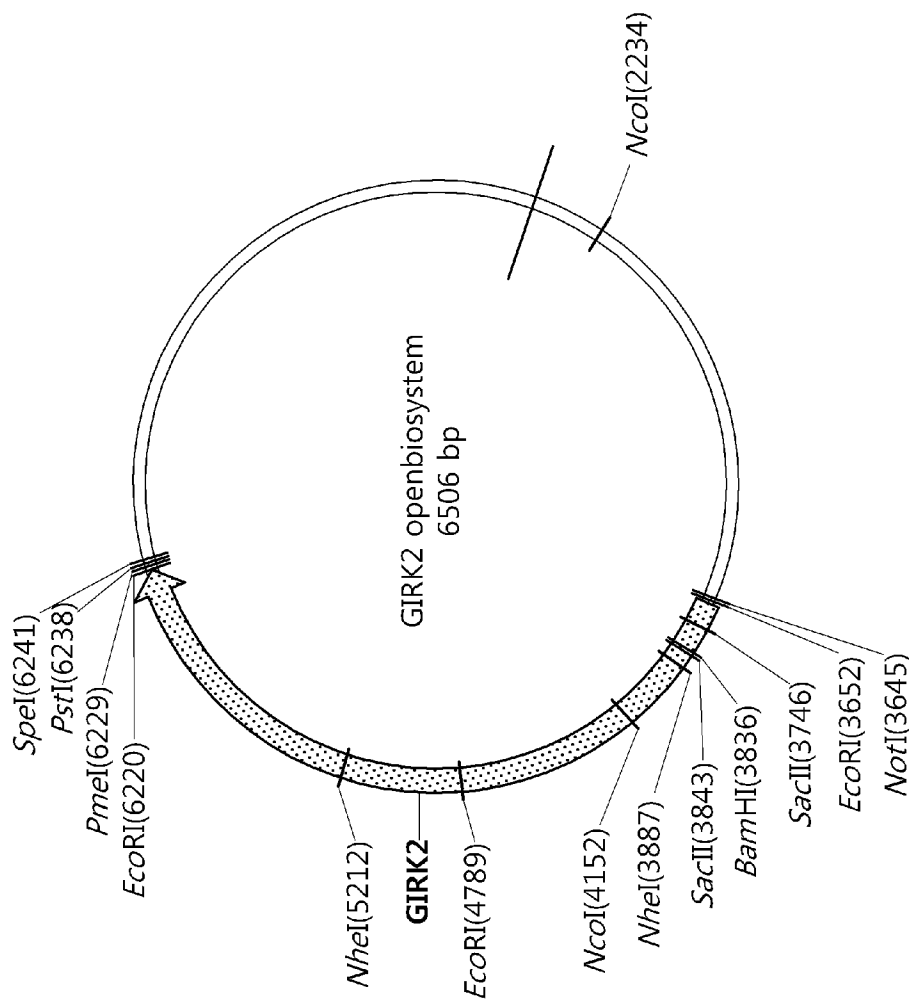


FIG. 6B

[Fig. 6c]

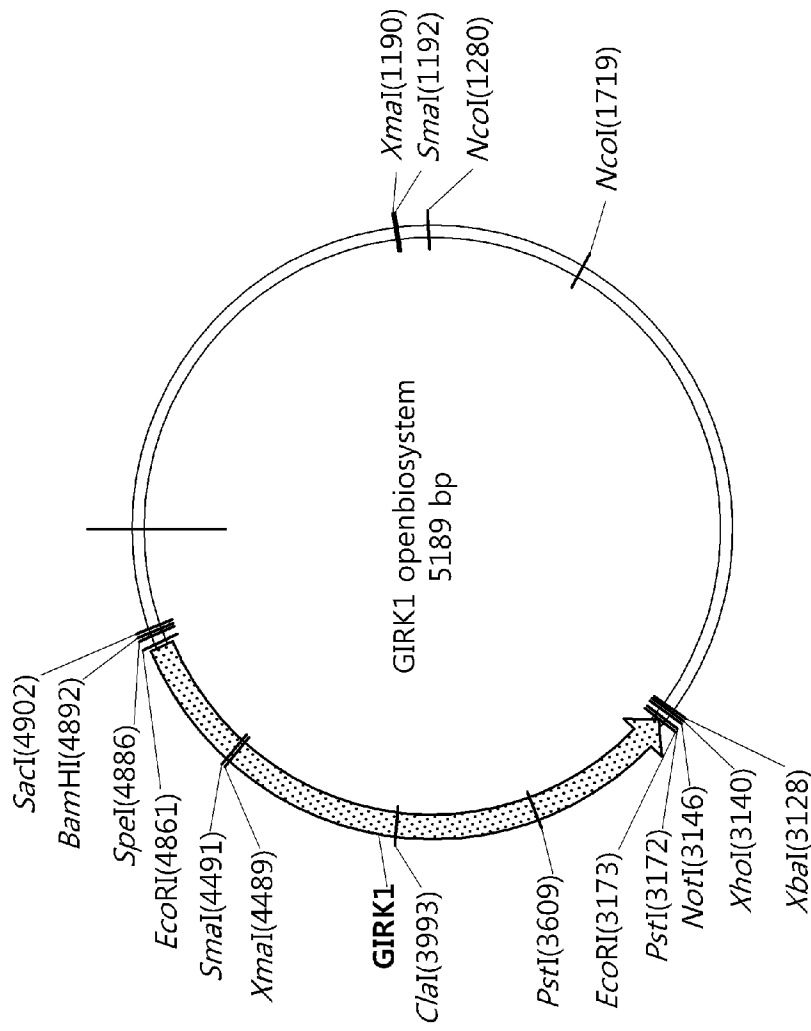


FIG. 6C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/007101**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/12(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/12; A01N 63/00; C07K 14/435; C12N 15/10; C12N 15/09; C12N 15/63; A01N 63/02; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Allatostatin receptor, fluorescent protein, internal ribosome entry site, adeno-associated virus, G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel, pesticidal materials, screening**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WOODS D. et al. Receptor-Based Discovery Strategies for Insecticides and Parasiticides: A Review. Adv Exp Med Biol. 2010, vol. 692, pp. 1-9 See the entire document.	1-5
A	WO 2011-036536 A2 (ARTERRA BIOSCIENCE S.R.L.) 31 March 2011 See the entire document.	1-5
A	KR 10-2006-0003326 A (PHARMACIA & UPJOHN COMPANY LLC) 10 January 2006 See the entire document.	1-5
A	KAI, Zhen-peng. et al. A potential insect growth regulator: Synthesis and bioactivity of an allatostatin mimic. Peptides. 2009, vol. 30, pp. 1249-1253. See the entire document.	1-5
A	GADE, G. and GOLDSWORTHY, G. J. Review: Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. Pest Manag Sci. 2003, vol. 59, pp. 1063-1075. See the entire document.	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 OCTOBER 2014 (29.10.2014)

Date of mailing of the international search report

05 NOVEMBER 2014 (05.11.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/007101

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2011-036536 A2	31/03/2011	EP 2480089 A2	01/08/2012
		IT MI20091649 A1	26/03/2011
		US 2013-0011372 A1	10/01/2013
		WO 2011-036536 A3	14/07/2011
KR 10-2006-0003326 A	10/01/2006	AU 2001-12186 A1	08/05/2001
		AU 2001-12186 B2	22/09/2005
		AU 2003-258069 A1	23/02/2004
		CA 2388599 A1	03/05/2001
		CA 2494311 A1	12/02/2004
		CN 1703625 C0	30/11/2005
		EP 1222273 A2	17/07/2002
		EP 1546726 A2	29/06/2005
		JP 2003-512838 A	08/04/2003
		JP 2005-537465 A	08/12/2005
		US 2003-0162223 A1	28/08/2003
		US 2003-0180297 A1	25/09/2003
		US 2004-0121956 A1	24/06/2004
		US 2006-0198841 A1	07/09/2006
		US 2008-0241961 A1	02/10/2008
		US 6835546 B1	28/12/2004
		US 7354724 B2	08/04/2008
		US 7364866 B2	29/04/2008
		WO 01-31005 A2	03/05/2001
		WO 01-31005 A3	22/10/1999
		WO 2004-013306 A2	12/02/2004
		WO 2004-013306 A3	03/06/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/12(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i, A01N 63/02(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/12; A01N 63/00; C07K 14/435; C12N 15/10; C12N 15/09; C12N 15/63; A01N 63/02; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Allatostatin receptor, 형광 단백질, 내부 리보솜 유입 부위, adeno-associated virus, G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel, 살충 물질, screening

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WOODS D. et al. Receptor-Based Discovery Strategies for Insecticides and Parasitocides: A Review. Adv Exp Med Biol. 2010, Vol. 692, pp.1-9. 전문참조.	1-5
A	WO 2011-036536 A2 (ARTERRA BIOSCIENCE S.R.L.) 2011.03.31. 전문참조.	1-5
A	KR 10-2006-0003326 A (파마시아 앤드 업존 캄파니 엘엘씨) 2006.01.10. 전문참조.	1-5
A	KAI, Zhen-peng. et al. A potential insect growth regulator: Synthesis and bioactivity of an allatostatin mimic. Peptides. 2009, Vol. 30, pp.1249-1253. 전문참조.	1-5
A	GADE, G. and GOLDSWORTHY, G. J. Review: Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. Pest Manag Sci. 2003, Vol. 59, pp.1063-1075. 전문참조.	1-5



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 10월 29일 (29.10.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 11월 05일 (05.11.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

이미옥

전화번호 +82-42-481-5549



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2011-036536 A2	2011/03/31	EP 2480089 A2 IT MI20091649 A1 US 2013-0011372 A1 WO 2011-036536 A3	2012/08/01 2011/03/26 2013/01/10 2011/07/14
KR 10-2006-0003326 A	2006/01/10	AU 2001-12186 A1 AU 2001-12186 B2 AU 2003-258069 A1 CA 2388599 A1 CA 2494311 A1 CN 1703625 C0 EP 1222273 A2 EP 1546726 A2 JP 2003-512838 A JP 2005-537465 A US 2003-0162223 A1 US 2003-0180297 A1 US 2004-0121956 A1 US 2006-0198841 A1 US 2008-0241961 A1 US 6835546 B1 US 7354724 B2 US 7364866 B2 WO 01-31005 A2 WO 01-31005 A3 WO 2004-013306 A2 WO 2004-013306 A3	2001/05/08 2005/09/22 2004/02/23 2001/05/03 2004/02/12 2005/11/30 2002/07/17 2005/06/29 2003/04/08 2005/12/08 2003/08/28 2003/09/25 2004/06/24 2006/09/07 2008/10/02 2004/12/28 2008/04/08 2008/04/29 2001/05/03 1999/10/22 2004/02/12 2004/06/03