

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0068943 (43) 공개일자 2017년06월20일
	(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01) (52) CPC특허분류 C12Q 1/6897 (2013.01) C07K 14/43577 (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0176028 (22) 출원일자 2015년12월10일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산광역시 남구 대학로 93(무거동) (72) 발명자 강민지 서울특별시 송파구 법원로 55, A동 907호 류형돈 미국 10016 뉴욕 메디칼 사이언스 빌딩 550 퍼스트 트 에비뉴 6층 6102호(550 First Avenue Floor 6 Room 6102 Medical Science Building New York, NY 10016 U.S.A) (74) 대리인 위병갑

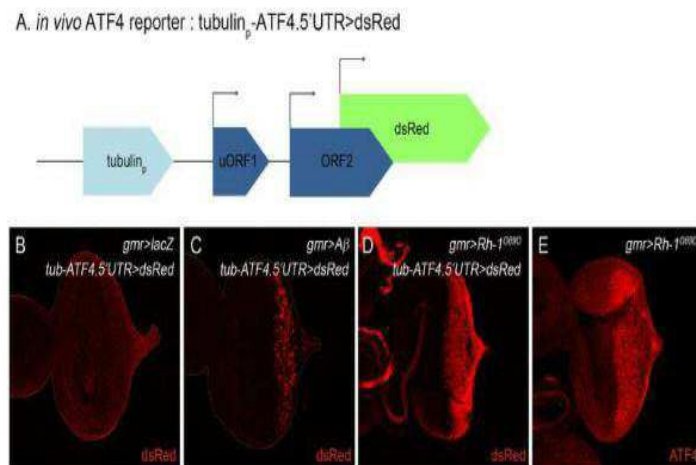
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 소포체 스트레스 조건 하에서 ATF 4의 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 드로소필라(Drosophila) 유래 dsRed 발현 특성을 이용한, 소포체 스트레스 하 ATF4 단백질 검출 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 드로소필라(Drosophila) ATF4 5'UTR 영역에 위치한 DsRed 유전자를 코딩하는 서열을 포함하는 리포터 구조체를 이용하여 소포체 스트레스(ER stress)에 대한 정보를 제공하는 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C07K 14/4705 (2013.01)

C12N 15/63 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1821010014

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 망막색소변성증에서의 ER stress를 조절하는 새로운 표적 단백질 발굴과 기전에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

ATF4 5'UTR 영역에 위치한 형광 유전자를 코딩하는 서열을 포함하는 리포터 구조체를 포함하는, 소포체 스트레스에 대한 정보 제공을 위한 ATF4 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 ATF4 5'UTR 영역은 드로소필라(Drosophila) 유래이며 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스에 대한 정보 제공을 위한 ATF4 검출용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 형광 유전자는 DsRed 유전자로서 DsRed 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스에 대한 정보 제공을 위한 ATF4 검출용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 리포터 구조체는 튜블린 프로모터를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스에 대한 정보 제공을 위한 ATF4 검출용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 리포터 구조체는 서로 반대되는 기능을 하는 uORF1 및 uORF2 개시 코돈을 포함하고, 상기 DsRed 유전자가 uORF2에 융합되어 있는 것을 특징으로 하는 ATF4 검출용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 ATF4 검출용 조성물을 이용하되,

DsRed 발현량이 증가하는 경우 세포 내 소포체 스트레스도 증가하는 것으로 판별하는 것을 특징으로 하는, 소포체 스트레스에 대한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 드로소필라(Drosophila) 유래 dsRed 발현 특성을 이용한, 소포체 스트레스 하에서 ATF4 단백질의 검출 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 드로소필라(Drosophila) ATF4 5'UTR 영역에 위치한 형광유전자인 DsRed 유전자를 코딩하는 서열을 포함하는 리포터 구조체를 이용하여 소포체 스트레스(ER stress)에 대한 정보를 제공하는 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

단백질의 발현에 있어서, 단백질의 구조를 결정하는 설계도인 유전자는 핵에 포함되어 있지만, 단백질의 발현 및 발현된 단백질이 정상적으로 기능을 수행할 수 있도록 단백질을 가공하는 핵심적인 역할을 수행하는 세포내 소기관은 소포체(Endoplasmic reticulum, ER)이다.

[0003]

상기 소포체는 단백질의 접힘, 당화, 수송 등을 담당하도록 조직화되어 있는데, 특히, 단백질의 접힘을 담당하

는 대표적인 화학결합인 이황화 결합(disulfide bond)이 형성되는데 적합한 산성화된 환경을 가지고 있고, 이러한 접힘을 돕는 단백질인 샤페론 단백질(chaperone protein)과 샤페론의 보조요소인 칼슘 이온이 매우 풍부하게 분포되어 있다. Messenger RNA에 내재된 유전정보가 리보솜 복합체의 도움을 받아 아미노산 체인으로 만들어지면 이들은 기본적으로 소포체로 수송되고, 위에 열거된 소포체 내의 요소들의 도움을 받아 3차 구조를 형성함으로써 제 기능을 할 수 있는 단백질로 생산된다. 만일, 정상적으로 단백질이 가공되지 않아, 접히지 않거나 잘못 접혀진 단백질과 같은 비정상적인 단백질이 생산되면, 이는 프로테아좀과 같은 세포 내의 유비퀴틴-단백질 분해 시스템 (ubiquitin proteasome system)에 의해 분해된다. 그러나, 상기 유비퀴틴-단백질 분해 시스템에 오류가 발생하면, 상기 비정상적인 단백질이 ER에 축적되어 ER 스트레스를 유도하게 된다.

[0004] 상기 ER 스트레스는 ER에서 단백질의 접힘과 당화를 저해하는 모든 환경 및 상기 환경으로 인해 발생하는 세포 수준의 반응을 통칭하는 용어로서, 대체로 세포 내외의 주변 환경에서 문제가 발생하고 그의 여파로서 ER 스트레스가 생성된다고 알려져 있다. 예를 들어, 세포내의 산화/환원시스템에 문제가 발생하면 이황화결합을 형성할 수 없고, 글루코스가 과도하게 결핍되면 단백질의 당화가 정상적으로 수행되지 않으며, 세포가 바이러스에 의해 감염되면 바이러스가 숙주를 이용하여 만들어내는 단백질과 숙주가 이에 대응하기 위해 만들어내는 단백질의 양이 일상적인 수준을 뛰어넘기 때문에 단백질의 양 자체가 스트레스로 작용하기도 한다.

[0005] 이러한 ER 스트레스는 새로운 질병을 유발시키거나 종래의 질병을 악화시킬 수 있다. 이러한 ER 스트레스와 관련된 구체적인 질환으로서 신경퇴행성 질환, 허혈성 질환, 당뇨병 등을 들 수 있다. 먼저, 신경퇴행성 질환의 환자에서는 ER 스트레스로 인하여 단백질의 응집현상이 발생하므로 이를 억제하는 방향으로 세포내 활성이 변화되는데, 예를 들어 알츠하이머병의 환자에서는 ER 스트레스를 억제하기 위하여 PERK(PKR Like ER Kianse)와 그 하부 기질인 eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α) 경로가 활성화되어 단백질의 합성을 차단하고, 파킨슨병의 환자에서는 E3 ligase 단백질인 Parkin의 발현이 증가되어 ER 스트레스에 의해 유발되는 세포사멸을 억제한다. 다음으로, 허혈성 질환의 환자에서는 대체로 산소의 공급량 감소에 따라 세포내의 산화 환원 조절기능이 붕괴되어 ER 스트레스가 발생되는데, 산소의 재공급시에는 질산화물의 급격한 증가를 수반하여 발생된 ER 스트레스를 가중시키는 것으로 알려져 있다. 끝으로, 인슐린을 생산하기 위하여 ER의 구조가 발달된 췌장의 베타 세포(beta cell)에서 ER 스트레스가 발생할 경우, 상기 베타 세포가 사멸되면서 인슐린의 공급이 감소하여 제1형 당뇨병을 발생시키거나 발생된 당뇨병을 악화시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 인슐린이 작용하는 표적세포에서 ER 스트레스가 발생할 경우, 인슐린에 의한 세포내 신호전달 경로가 붕괴되어 인슐린에 의한 반응성이 둔화됨으로써 제2형 당뇨병이 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 이러한 ER 스트레스가 발생하는 원인을 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이러한 연구의 결과로서 ATF/CREB (activating transcription factor/cyclic AMP response element binding 6 protein) 패밀리의 하나인 ATF4(activating transcription factor 4)가 규명되었다. 상기 ATF4는 대부분의 정상세포에서는 제대로 발현되지도 않고, 발현된 후에도 신속하게 분해되어, 정상세포에서는 제대로 검출되지 않는 것으로 알려져 있다.

[0007] 그러나, 아미노산, 당 또는 산소가 고갈되는 것과 같은 스트레스 환경요인이 증가하면, ATF4의 발현이 증가할 뿐만 아니라, 발현된 ATF4의 분해가 억제되어 세포내의 수준이 증가하는데, 이러한 ATF4의 분해억제와 관련해서는 eIF2 α 의 인산화가 관여하며, 상기 eIF2 α 의 인산화에는 PERK, GCN2, PKR, HRI 등의 인산화효소가 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0008] 이처럼 ATF4는 ER 스트레스가 발생한 경우에 세포내 수준이 증가하므로, 상기 ATF4의 수준을 억제하여 ER 스트레스를 감소시키려는 연구가 활발히 진행되고 있으나, 아직까지는 별다른 성과가 없는 실정이다.

[0009] 특히, 이와 관련된 연구를 위해 ATF4의 발현 특성을 확인해야 하는데, 상기 ATF4는 mRNA 수준에서는 검출이 어려운 반면 번역에 의한 산물로서만 확인이 가능하기 때문에, mRNA 수준을 측정할 수 있는 방법으로는 검출할 수 없는 문제점이 있다

[0010] 이에, 본 발명자들은 소포체 스트레스에 의한 ATF4의 수준을 특정 형광리포터 검출을 통해 쉽게 확인할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) 1. Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases. Cell death and differentiation.2006; 13(3):385-92. doi: 10.1038/sj.cdd.4401778 PMID: 16397584.

(비특허문헌 0002) 2. Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M, Bundo M, Kasahara T, Kusumi I, et al. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. Nature genetics. 2003; 35(2):171-5. doi: 10. 1038/ng1235 PMID: 12949534.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 주요 목적은 형광유전자를 이용하는 소포체 스트레스에 대한 정보 제공을 위한 ATF4 검출용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 드로소필라(Drosophila) ATF4 5'UTR 영역에 위치한 형광 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터 및 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 형질전환 미생물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 소포체 스트레스에 의한 ATF4 단백질의 세포 내 수준을 간편하고 빠르게 검출할 수 있는 시스템을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 ATF4 5'UTR 영역에 위치한 형광 유전자를 코딩하는 서열을 포함하는 리포터 구조체를 포함하는, 소포체 스트레스에 대한 정보 제공을 위한 ATF4 검출용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 ATF4 5'UTR 영역은 드로소필라(Drosophila) 유래이며 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형광 유전자는 DsRed 유전자로서 DsRed 유전자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 리포터 구조체는 튜블린 프로모터를 추가로 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 리포터 구조체는 서로 반대되는 기능을 하는 uORF1 및 uORF2 개시 코돈을 포함하고, 상기 DsRed 유전자가 uORF2에 융합되어 있는 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 ATF4 검출용 조성물을 이용하되, DsRed 발현량이 증가하는 경우 세포 내 소포체 스트레스도 증가하는 것으로 판별하는 것을 특징으로 하는, 소포체 스트레스에 대한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명은 종래 mRNA 수준에서는 검출이 어려웠던 ATF4의 수준을 용이하게 검출할 수 있는 방법에 관한 것으로서, 본 발명을 활용하여 소포체 스트레스 마커인 ATF4의 수준을 쉽게 측정할 수 있고, 소포체 스트레스 질환에 대한 신규 치료제를 효과적으로 스크리닝 할 수 있게 한다. 그러므로, ATF4와 관련된 인자, 소포체 스트레스 질환의 새로운 치료제를 발굴하는 용도로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 Drosophila ATF4-RA mRNA의 5' UTR 구조(A), 실험에 사용된 루시페라아제 리포터 구조체에 관한 모식도(B) 및 이에 의해 형질전환된 S2 세포의 RLU(relative light unit)값을 나타낸 것이다
- 도 2는 in vivo ATF4 리포터에 대한 모식도(A) 및 상기 리포터를 이용한 실험 결과들이다.
- 도 3은 다양한 기관에서의 ER 스트레스에 의존하는 ATF4.50UTR>dsRed 발현 양상에 관한 결과이다.
- 도 4는 영양 부족에 따른 tub-ATF4.50UTR>dsRed 발현 양상에 대한 결과이다.
- 도 5는 광수용체 세포에서 활성화된 in vivo ATF4 리포터의 발현 양상에 대한 결과이다.
- 도 6은 수컷 재생산성 기관에서의 tub-ATF4.50UTR>dsRed 발현 양상에 대한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명에서 사용되는 대표적인 용어에 대한 정의는 이하와 같다.
- [0024] "ER 스트레스"란, ER에서 단백질의 접힘과 당화를 저해하는 모든 환경 및 상기 환경으로 인해 발생하는 세포 수준의 반응을 통칭하여 의미하는데, 세포 내외의 주변 환경에서 발생하는 문제점에 의해 생성된다. 본 발명에 있어서, 상기 ER 스트레스는 ATF4의 발현증가를 유발하는 주요원인증상으로 간주될 수 있다.
- [0025] "ER 스트레스성 질환"이란, ER 스트레스에 의해 유발되거나 또는 악화되는 질환을 의미한다. 상기 ER 스트레스성 질환은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 악성종양, 신경퇴행성 질환, 허혈성 질환, 당뇨병, 폐섬유화증 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는, 유방암, 폐암, 섬유육종, 대장암 등의 악성종양; 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅틴병 등의 신경퇴행성 질환; 협심증, 심근경색 (myocardial infarction), 심부전(cardiac failure), 허혈성 대장염, 허혈성 급성 신부전증, 급성 허혈성 뇌졸중 등의 허혈성 질환; 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 등의 당뇨병, 폐섬유화증 등이 될 수 있다.
- [0026] "조직 또는 세포 샘플"은 대상 또는 환자의 조직으로부터 얻은 유사한 세포의 집합체를 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고정 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다. 조직 샘플은 또한 1차 또는 배양 세포 또는 세포주일 수 있다.
- [0027] "핵산"은 임의의 DNA 또는 RNA, 예를 들어, 조직 샘플에 존재하는 염색체, 미토콘드리아, 바이러스 및/또는 세균 핵산을 포함하는 의미이다. 이중가닥 핵산 분자의 하나 또는 두개 모두의 가닥을 포함하고, 무손상 핵산 분자의 임의의 단편 또는 일부를 포함한다. 본 발명에서 사용하는 핵산은 CpG 섬과 같은 CpG-함유 핵산인 것이 바람직하다.
- [0028] "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.
- [0029] "프라이머"는 상보성 RNA 또는 DNA 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하고 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응에서 발생하는 뉴클레오타이드트랜스퍼라제의 작용에 의해 모노뉴클레오타이드로부터 폴리뉴클레오타이드의 단계적 합성을 위한 출발점으로 기능하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 의미한다.
- [0030] "표지" 또는 "라벨"은 직접 또는 간접적으로 시약, 예를 들어 핵산 프로브 또는 항체에 컨쥬게이팅 되거나 융합되고 컨쥬게이팅 되거나 융합된 시약의 검출을 용이하게 하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체가 검출될 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매 할 수 있다.
- [0031] "대상체"는 인간을 포함한 모든 포유동물을 포함할 수 있다. "대상체"는 또한 애완동물 (예를 들어, 개, 고양이, 말)뿐만 아니라 다른 동물들 (예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소)도 포함할 수 있다. 본 발명에서는 인간이 바람직하다.
- [0032] "치료"는 임상적 결과를 포함한 유익하거나 바람직한 결과를 수득하기 위한 방법이다. 질환, 장애 또는 상태를 "치료하는" 또는 "완화하는"은 장애를 치료하지 않는 경우에 비해서 상태 또는 장애 또는 질병의 정도 또는 원치 않는 임상적 증상 또는 둘 다를 완화시키거나, 진행의 과정을 느리게 또는 연장시키는 것을 의미한다. 본 명세서에 기술된 방법의 목적에 따라서, 유용하거나 바람직한 임상적 결과에는 검출가능한 것이든 아니든 간에 하나 또는 그 이상의 증상의 경감 또는 개선, 장애 정도의 감소, 장애의 안정화된 (즉, 악화되지 않은) 상태, 장애 진행의 지연 또는 둔화, 장애의 개선 또는 완화, 및 관해 (부분적 또는 완전)가 포함되나, 이들로 제한되지는 않는다. 또한, 치료하는 것은 반드시 1회 용량의 투여에 의해서 일어나지는 않으며, 종종 일련의 용량을 투여한 후에 일어난다. 따라서, 치료학적 유효량, 완화시키기에 충분한 양, 또는 질환, 장애 또는 상태를 치료하기에 충분한 양을 1 회 또는 그 이상 투여로 투여할 수 있다. 본 발명에서는 섭식장애, 바람직하게는 신경성 식욕 부진증(Anorexia Nervosa, AN)의 치료를 의미한다.
- [0033] "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중

량 또는 길이를 의미한다.

- [0034] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0035] 이하, 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0036] 본 발명은 소포체(ER) 스트레스 마커인 ATF4를 검출하는 것에 관한 것이다.
- [0037] 소포체스트레스의 첫 반응은 eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit)를 인산화시켜 mRNA에서 단백질로 번역(translation)이 되는 과정을 감소시키는 것이다.
- [0038] eIF2 α 는 번역 개시 복합체(translation initiation complex)의 구성인자로서 methionine (Met)을 리보솜의 개시자 코돈 AUG에 운반하는 역할을 한다. eIF2 α 가 인산화되어 불활성화되면 리보솜의 개시자 부위의 Met-tRNA의 결합이 차단되면서, AUG 개시코돈에 대한 인지빈도가 감소되어 mRNA로부터 단백질로 번역이 감소된다. 소포체 스트레스 발생 시 eIF2 α 의 인산화는 PERK에 의해 일어난다.
- [0039] PERK는 소포체 막에 위치한 type 1 transmembrane serine/threonine kinase로 스트레스가 없는 상태에서는 소포체 샤페론인 Bip와 결합하여 비활성화 상태로 존재한다. 그러나 소포체 강 내에 폴딩이 되지 않은 단백질이 증가하면 Bip는 PERK와 해리되어 폴딩이 되지 않은 단백질과 결합함으로써 이들이 정상적으로 폴딩이 되는 것을 돕는다. 여기서 해리된 PERK는 소중합체(oligomerize)를 형성한 후 자가인산화(trans-autophosphorylation)를 통해 활성화되고 eIF2 α 를 인산화시킨다. 결과적으로 소포체 스트레스에 의한 PERK의 활성화는 mRNA로부터 단백질이 합성되는 것을 감소시켜 소포체 내로 새로운 단백질이 유입되는 것을 억제한다.
- [0040] PERK의 활성화로 인해 eIF2 α 가 인산화되면 일반적으로 단백질 합성이 억제되지만 ATF4는 mRNA에서 단백질로의 번역이 오히려 증가한다. 이러한 반응은 세포가 소포체 스트레스로 유발된 번역이 감소된 상태(translation attenuation)로부터 회복하는 기전으로 작용한다. 즉 ATF4는 하부 신호전달체계에 해당하는 CHOP과 더불어 GADD34를 활성화하고 GADD34는 PP1 (protein phosphatase 1)과 함께 eIF2 α 를 탈인산화(dephosphorylation) 시킴으로써 새로운 번역개시 복합체를 형성할 수 있게 한다.
- [0041] 전사인자 ATF4의 전사는 eIF2 α 인산화에 의해 상향 조절되는데, 이는 위쪽 개방해독틀 우회 스캐닝 시스템(upstream open-reading frame bypass scanning system)으로 불리는 5'비번역부위에 안에 있는 작은 위쪽 개방해독틀(open-reading frame)때문이다. ATF4는 CREB/ATF계에 속한 전사인자이다. ATF4는 GADD34 유도과 PP1의 활성화를 통해 eIF2 α 의 탈인산화 과정을 유도한다. PP1c는 eIF2 α 의 탈인산화를 촉진한다. ER 스트레스 반응의 첫단계는 PERK에 BiP의 재결합과 eIF2 α 의 탈인산화에 의해 종결된다.
- [0042] 이러한 메커니즘에 기초하여, ER 스트레스에 대한 검출 지표로서 ATF4가 공지되어 있고, 본 발명은 상기 ATF4의 세포 내 수준을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0043] "ATF4(activating transcription factor 4)"란, ATF/CREB (activating transcription factor/cyclic AMP response element binding 6 protein) 패밀리에 속하고, ER 스트레스에 의해 발현이 증가되어 축적되는 스트레스 단백질로서 351개의 아미노산과, 약 39kDa의 분자량을 가지는 단백질을 의미한다.
- [0044] 상기 ATF4는 이량체의 형태로 DNA에 결합하는 전사인자로서 사용되는데, 상기 단백질을 코딩하는 유전자는 사람의 22번 염색체에 존재하며, 상기 유전자의 염기서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있는데, 그 예로서, GenBank Accession No. NC_000022.10, NC_018933.1, NT_011520.12 등 으로 표시되는 유전자가 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 특히, 상기 ATF4는 mRNA 수준에서는 검출이 어렵고, 번역(translation)에 의한 산물로서 확인이 가능하기 때문에, mRNA 수준을 측정할 수 있는 방법으로는 검출할 수 없는 문제점이 있었지만, 본 발명은 ATF4의 5'UTR 영역에 DsRed를 융합시킨 시스템을 이용하여 ATF4의 세포 내 수준을 형광 리포터 검출을 통해 쉽게 확인할 수 있게 하였다.
- [0046] 그러므로, 본 발명은 일 관점에서, 상기 드로소필라(Drosophila) ATF4 5'UTR 영역에 위치한 DsRed 유전자를 코딩하는 서열을 포함하는 리포터 구조체; 및 이를 포함하는 ATF4 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0047] 상기 구조체 및 조성물은 세포 내 ATF4 수준을 확인하여 소포체 스트레스에 대한 다양한 정보 제공을 위해 사용될 수 있다.

- [0048] 본 발명에서 ATF4 5'UTR 영역에는 서로 반대되는 기능을 하는 uORF1 및 uORF2 개시 코돈이 포함되어 있고, uORF2에 리포터 유전자, 예를 들어, 적색 형광단백질(DsRed) 유전자를 융합시킨 구조를 특징으로 하며, 본 발명에서 상기 ATF4 5'UTR 영역의 염기서열은 서열번호 1에 나타내었고, DsRed 유전자 서열은 서열번호 2에 나타내었다.
- [0049] 상기 ATF4 및 uORF 개시코돈 서열은 동물 유래, 바람직하게는 초파리(Drosophila) 공지 유전자 서열로부터 취득할 수 있을 것이다. 야생형(wild type)을 포함하여, 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 변이체를 포함한다.
- [0050] ATF4 단백질 등을 코딩하는 유전자는 당업계에서 공지된 염기서열을 참조하여 이의 말단 부분에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 작제한 후 이를 프라이머로 하고 특정한 세포의 지놈 DNA나 cDNA를 주형으로 하여 PCR을 수행함으로써 취득할 수 있다. 본 발명은 상기 단백질과 기능적 동등물인 경우를 모두 포함한다. '기능적 동등물'이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 원래 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. '실질적으로 동질의 생리활성'이란 ER 스트레스에 대응하여 과다 발현되는 경우 및 이러한 메커니즘에 관여하는 ATF4의 활성을 의미한다.
- [0051] 본 발명은 ATF4 단백질의 세포 내 수준을 검출하기 위해서 리포터 형광단백질을 융합시켜 발현시키는 것을 특징으로 한다.
- [0052] 리포터 형광 유전자는 그 업스트림(upstream)의 프로모터 활성화에 따라 유전자가 발현되어 세포 내에서 그 발현 여부를 확인할 수 있다. 리포터 유전자의 예로는 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(RFP), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광 단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP), 및 증강된 남색 형광 단백질(ECFP) 및 레닐라 루시페라제(Renilla luciferase), 적색 형광 단백질(DsRed) 등을 포함하나 상기 예에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 레닐라 루시페라제(Renilla luciferase), 적색 형광 단백질(DsRed)을, 가장 바람직하게는 적색 형광단백질(DsRed)을 리포터 단백질로서 사용한다.
- [0053] 상기 적색 형광단백질(DsRed)은 산호에서 유래된 적색 형광을 나타내는 것으로 기존에 알려진 형광단백질들과 비슷한 구조를 갖는다.
- [0054] 일반적으로 형광단백질은 접힌 β -sheet의 원통형 구조 내부에 형광 발색단이 있는 견고한 3차 구조를 갖는다. 그러나 적색 형광단백질(DsRed)의 경우 이러한 원통형 구조 4개가 모여 하나의 단백질로 조립되어 적색 형광을 나타낸다. 상기와 같은 특성 때문에 매우 안정적이며 다른 형광단백질에 비해 높은 파장의 여기와 방출 값을 지니므로 육안으로 쉽게 확인할 수 있다.
- [0055] 가시광선(visible wavelength) 영역 전체에 걸쳐 형광을 발현하는, 다시 말하면 대기 중의 빛에너지만으로 직접 눈으로 선별이 가능한 색을 띄게 하는 특징을 나타내는 DsRed 단백질은 558nm 에서 최적으로 들뜬 상태가 되고, 최고 583nm를 방출한다. 따라서 다른 형광단백질의 여기 파장이 주로 낮은 영역대의 자외선에 의존해 발생하는 문제, 즉 생체 내 주요 분자인 핵산이나 지방산, 또는 아미노산 잔기의 손상을 최소화할 수 있는 장점을 갖는다.
- [0056] 본 발명의 적색 형광단백질(DsRed)은 하기와 같은 변이체도 포함한다:

형광단백질	최대 여기파장(nm)	최대 방출파장(nm)	발현시간 (37℃)	형광 세기 (% of DsRed)	4차구조	광표백 시간(s)
DsRed	558	583	~ 10시간	100	4량체	
mRFP1	584	607	<1시간	21	단량체	6.2
mHoneydew	487/504	537/562		3		5.9
mBanana	540	553	1시간	7	단량체	1.4
mOrange	548	562	2.5시간	83	단량체	6.4
dTomato	554	581	1시간	80	이량체	64
tdTomato	554	581	1시간	160	단량체	70
mTangerine	568	585		19	단량체	5.1
mStrawberry	574	596	50분	44	단량체	11
mCherry	587	610	15분	27	단량체	68

[0057]

[0058] 본 발명의 일 구체예에서는 DsRed(Red Fluorescence Protein) 유전자를 드로소필라(Drosophila) ATF4의 다운스트림 영역에 융합시킨다.

[0059] 그러므로, 본 발명은 ATF4 검출용 리포터 구조체로서, 드로소필라(Drosophila) ATF4 5'UTR 영역 다운스트림, 바람직하게는 uORF 개시코돈, 더욱 바람직하게는 uORF2에 적색 형광 단백질 DsRed 유전자 또는 이의 변이체를 포함하는 리포터 융합단백질을 제공한다. 본 발명의 명세서에서는 DsRed 또는 이를 포함하는 상기 융합단백질을 코딩하는 서열을 리포터 유전자, 리포터 구조체, 리포터 단백질 등의 용어를 혼용하여 표현한다.

[0060] 또한, 본 발명은 상기 리포터 유전자 및/또는 융합 단백질을 발현하는, 세포 스트레스에 대한 정보 제공을 위한 ATF4 검출용 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0061] 상기 벡터는 예를 들어, 드로소필라(Drosophila) ATF4 5'UTR, uORF, DsRed 유전자 각각을 포함할 수도 있고 이들이 융합된 상기 리포터 융합 단백질을 코딩하는 서열을 포함할 수도 있다.

[0062] "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 말한다.

[0063] 벡터는 플라스미드, 파지 입자 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면, 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 "플라스미드(plasmid)" 및 "벡터(vector)"는 때로 상호 교환적으로 사용된다. 플라스미드 벡터는 (a) 숙주세포당 수백 개의 플라스미드 벡터를 포함하도록 복제가 효율적으로 이루어지도록 하는 복제 개시점, (b) 플라스미드 벡터로 형질전환된 숙주 세포가 선발될 수 있도록 하는 항생제 내성 유전자 및 (c)외래 DNA 절편이 삽입될 수 있는 제한효소 절단부위를 포함하는 구조를 지니고 있다. 적절한 제한효소 절단부위가 존재하지 않을지라도, 통상의 방법에 따른 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 (oligonucleotide adaptor) 또는 링커 (linker)를 사용하면 벡터와 외래 DNA를 용이하게 라이게이션 (ligation)할 수 있다

[0064] "작동 가능하게 연결된"이란, 본 발명의 프로모터 서열의 다운스트림에 유전자가 연결될 때, 해당 유전자의 발현이 가능한 형태로 연결되는 것을 의미하며, 상기 목적을 달성하기 위하여 임의의 서열이 추가로 포함될 수 있다. 상기 임의의 서열을 예로 들면, 오퍼레이터(operator) 서열, 인프레임(in frame)을 위한 서열 등이 있으며, 또한 본 발명의 유전자 이외에 인핸서 (enhancer)와 같은 시스 요소 (cis element), 스플라이싱 시그널 (splicing signal), 폴리 A 추가 시그널 (poly A addition signal), 선택 마커 (selection marker), 라이보솜 결합 서열 (ribosome binding sequence, SD sequence) 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택 마커의 예로, 클로람페니콜 저항 유전자, 암피실린 저항 유전자, 디하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase), 네오마이신 저항 유전자 등이 사용될 수 있으나, 상기 예들에 의해 작동 가능하도록 연결되기 위한 추가적 구성요소가 제한되는 것은 아니다.

- [0065] 바람직하게 본 발명의 벡터는 튜블린 프로모터를 포함하며, 더욱 바람직하게 상기 벡터는 도 2 A의 개열지도로 나타낼 수 있지만(tub-ATF4.5'UTR>dsRed), 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 상기 튜블린 프로모터의 공지 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 프로모터는 공지된 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.
- [0067] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 리포터 구조체 또는 상기 벡터를 포함하는, 소포체 스트레스에 대한 정보 제공을 위한 ATF4 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0068] 이 때, 유전자 발현 수준 측정에 의해 tub-ATF4.5'UTR>dsRed에 의한 dsRed의 과발현 여부를 확인한다. 상기 '발현 수준 측정'이란, mRNA 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 것을 모두 포함한다.
- [0069] mRNA 발현수준 측정을 위한 분석 방법으로는 역전사중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0070] 이 때, 사용되는 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는, 각 마커 유전자 특이적인 프라이머로 7개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산이다. 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 상기 프라이머는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있고, 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자, 바이오틴 등이 있다.
- [0071] 단백질 발현수준 측정은 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 항체란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.
- [0072] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, 엘라이자(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 세포를 제공한다.
- [0074] 상기 형질 전환 방법은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 열 충격 방법(heat shock method), 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법(electroporation), 유전자 총(gene gun), 실리콘 탄화물 위스터(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 및 PEG (polyethyleneglycol)를 이용한 침전법, 자연 도입 방법 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 벡터를 도입하는 방법이 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 대상 세포를 형질 전환하는 단계; 및 상기 형질 전환체의 리포터 형광 단백질 양을 정량하는 단계를 포함하는 ATF4 수준을 확인함으로써 소포체 스트레스에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0076] ATF4 수준에 따라 발현되는 리포터 형광 단백질 dsRed양이 결정되는데, 세포 내 ATF4 수준이 높을수록 발현되는 리포터 형광 단백질 dsRed양이 많아지므로, 발현되는 dsRed 단백질 양을 정량하면 세포 내 ATF4 수준을 측정할 수 있고 이를 바탕으로 소포체(ER) 스트레스와 관련된 다양한 정보를 획득할 수 있는 것이다
- [0077] 본 발명의 일 구형에 있어서 형질감염(형질전환)에 이용되는 세포주는 바람직하게는 동물 세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포주인 것이 바람직하다. 상기 형질감염된 세포주의 배양에 이용되는 배지는 통상적으로 이용되는 동물세포용 배지에 혈청이 포함된 배지를 의미한다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지도 가능하며, 예를 들어, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지 (Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., J. Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12

(Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물 (Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Waymouth's MB752/1 (Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈 (Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978)) 등이 이용될 수 있다.

- [0078] 본 발명에서는, 상기 형질감염된 세포주에서 dsRed 단백질의 발현량을 이용하여 소포체 스트레스 관련 ATF4 수준을 확인할 수 있고 이를 비교 분석하여 상향조절(up-regulation)된 것으로 측정되면 소포체 스트레스가 많은 것으로 판별한다.
- [0079] 이와 관련하여 다음과 같은 정보를 획득할 수 있다:
- [0080] (i) ATF4 리포터 번역은 ER 스트레스에 반응하여 자극되는 메커니즘을 바탕으로 한다.
- [0081] 이 때, ATF4 5'UTR 내 2개의 uORFs는 번역에서 서로 반대되는 역할을 가지는데, Drosophila ATF4 발현은 이러한 uORF를 포함하는 메커니즘에 의해 조절된다.
- [0082] (ii) 본 발명의 리포터 구조체는 ER 스트레스 존재 하 활성화된다.
- [0083] 말피기관(malpighian tubule), 지방체, 중장(midgut), 전위, 침샘, 뇌를 포함하는 다양한 조직에서, 화합물(chemicals)이 야기하는 ER 스트레스 하 dsRed 발현이 증가된다. 특히, 침샘에서 tub-ATF4.50UTR>dsRed의 뚜렷한 유도가 있음을 일 실시예에서 확인하였다. 또한, 정상 발달 동안에도 ER 스트레스 존재 하 전위, 중장 및 지방체 등에서 tub-ATF4.50UTR>dsRed의 수준이 증가된다.
- [0084] 즉, ER 스트레스가 ATF4 리포터를 활성화시킴을 의미한다. 이를 통해, ATF4 리포터가 고유적 및 외생성 소스에 의해 일어나는 스트레스 모두 검출할 수 있고, 이러한 반응은 조직 의존적임을 나타낸다.
- [0085] (iii) 본 발명의 리포터 구조체는 ER 스트레스를 야기하는 영양 부족(nutritional deprivation)에 대응한다.
- [0086] 즉, 제한된 섭식에서 길러졌을 때 소장(intestine) 등에서 높은 수준으로 활성화되고, 이는 본 발명의 리포터가 에너지 대사에 대한 정보를 제공해 줄 수 있음을 시사한다. 그러나, xbp1의 mRNA 스플라이싱을 촉발하는, ER 스트레스 활성화된 RNase, IRE1에 의해 매개되는 경로에 대한 마커인 xbp1-EGFP는 영양부족에 대응하여 나타나지 않는다.
- [0087] (iv)ATF4 리포터는 Drosophila의 광수용체에서 활성적이다.
- [0088] 즉, 정상적 광수용체 발달 동안 ATF4 번역이 촉진되는 바, 이러한 광수용체 발달에 대한 정보도 제공해 줄 수 있다.
- [0089] (v) ATF4 리포터는 성인 수컷 재생산성 기관에서 높게 발현된다.
- [0090] 일 실시예에서 DsRed는 부속샘 및 사정관뿐만 아니라 고환 및 고환관(testicular duct)의 영역에서 관찰되었다. 즉, UPR 시그널링이 높은 단백질 분비 활성을 가지는 기관에서 활성 여부에 대한 정보를 제공할 수 있다.
- [0091] 이처럼, 본 발명은 ATF4 5'UTR 영역에 위치한 DsRed 유전자를 코딩하는 서열을 포함하는 리포터 구조체를 이용하여 ATF4 세포 내 수준을 확인함으로써, 소포체 스트레스에 대한 다양한 정보 제공을 제공하는 모든 용도를 포함한다.
- [0092] 즉, 소포체 스트레스에 의한 ATF4의 수준을 특정 형광리포터 검출을 통해 쉽게 확인할 수 있는 특징이 있어, 소포체 스트레스 정도를 진단할 수 있는 용도로 사용할 수 있고, 나아가 ATF4와 관련된 인자, 소포체 스트레스 질환의 새로운 치료제를 발굴하는 데 유용할 것이다.
- [0093] <실시예>
- [0094] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0095] 달리 지시되지 않는 한, 핵산은 좌측에서 우측으로 5'→3' 배향으로 기록된다. 명세서 내에서 열거된 수치 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함하고, 정의된 범위 내의 각각의 정수 또는 임의의 비-정수 분획을 포함한다.

- [0096] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.
- [0097] **재료 및 방법**
- [0098] 구조물
- [0099] 모든 초파리(Drosophila) 리포터들은 pCasper4 벡터 내로 서브클로닝하였다. 리포터들을 발현시키기 위하여, 튜블린 프로모터 및 SV40 3'UTR을 각각 NotI/KpnI 및 PstI 부위 내로 서브클로닝시켰다. Drosophila ATF4-RA의 5'UTR 서열을 y, w larvae로부터 RT-PCR에 의해 수득하고, dsRed. T4 서열을 pPelican 플라스미드로부터 PCR 증폭시켰다. 상기 dsRed.T4은 dsRed(RFP) (half-time<43 min)와 비교하여 훨씬 짧은 성숙 시간을 가지고, 현저한 녹색 방출이 없고 용해도(solubility)를 개선시켰다.
- [0100] dsRed ORF을 3개 뉴클레오타이드(ACC)의 후 ATF4 5'UTR의 3'에 융합시키고(앞으로는 dsRed.T4를 dsRed로서 지칭함), dsRed AUG 코돈을 ATF4 개시 코돈의 원래 위치와 매칭시켰다. 처음으로 이 서열을 pBluescript-SK(-) 내로 서브클로닝하고, 이어서 pCasper4 벡터로 옮겼다.
- [0101] 5'RACE
- [0102] 전체 RNA를 TRIzol 시약 (Ambion, USA)으로 프로토콜에 따라 추출하였다. 5'RACE를 Invitrogen's kit 설명서 (Invitrogen, USA)에 따라 수행하였다. 간략히 말하면, 제1 스탠드 프라이머(GSP1)를 5'ATF4-luc의 mRNA에 어닐링하고, mRNA를 SUPERSRIPTII RT로 cDNA 내로 카피하였다.
- [0103] dCTP 및 TdT로 정제된 cDNA를 라벨링한 후, dC-라벨링된 cDNA를 AAP(abridged anchor primer) 및 GSP2 프라이머를 이용하여 증폭하고, 일차 PCR 산물을 AUAP(abridged universal amplification primer) 및 GSP3 프라이머를 이용하여 다시 증폭하였다. 이차 PCR 산물을 1% 아가로오스 겔을 이용하여 전기영동에 의해 분석하고 High Pure PCR Product 정제 키트(Roche)을 이용하여 추출하였다. 상기 추출된 PCR 산물을 pLPS-B Blunt topo 벡터 (ELPis biotech, Korea)를 이용하여 클로닝하고 시퀀싱하였다. 전사적 개시 부위를, mRNA 전사물의 5'에 라이게이션된 어댑터 서열에 대한 3'제1뉴클레오타이드로서 결정하였다. 사용된 프라이머들은 다음과 같다: GSP1 프라이머 5'ATTATAAATGTCGTCG-3', GSP2 프라이머 5'CTGCAACTCCGATAAATAAC-3', GSP3 프라이머 5'GCATACGACGATTCTGTGAT-3'.
- [0104] 파리 유전학(Fly genetics)
- [0105] 유전자들은 초파리에서 표준 Gal4/UAS 시스템을 통해 발현된다. 다음의 파리들은 종래 알려져있다: *gmr-gal4*, *uas-Rh-1G69D/Cyo*, *tub-gal4*, *uasxbp1-EGFP/Cyo*, *uas-Aβ*, *uas-MJD-tr-Q78*. UAS-lacZ 주는 블루밍스톤 스톱 센터로부터 수득하였다.
- [0106] 면역조직화학 분석
- [0107] 모든 형광 이미지를 $\times 20$ 또는 $\times 40$ 대물 렌즈를 이용하여 Zeiss LSM710 공초점 현미경으로 수득하였다. 다음의 항체들을 사용하였다: 래빗 항-dsRed 항체(1:50 from Clontech or 1:500 from Dr. S.W. Kang), 래빗 항-GFP (1:2000, Molecular Probes, catalogue no. A6455), 마우스 항-아마딜로 (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank, N2 7A1, University of Iowa, USA), 모노클로날 항-로돕신1 (1:500; Developmental Studies Hybridoma Bank, 4C5, University of Iowa, USA), 액틴-팔로이딘(1:200; Molecular Probes).
- [0108] 기니피그 항-ATF4 항체를 생성하기 위해, ATF4 코딩 서열의 전체 길이를 pET14b (Novagen) 내 XhoI 및 NotI 부위로 서브클로닝하였다. 결과로 수득한 ~50 kDa His-태그된 재조합 단백질을 정제하여 폴리클로날 항체를 생성하였다. 이어서 항혈청을 동일 에피토프에 대하여 친화-정제하였다 (affinity purified).
- [0109] 영양 제한(Nutrient restriction)
- [0110] 부화된 유충(Hatched larvae)을 활성 효모 페이스트와 함께 25° C 하 사과 주스 플레이트에서 길렀다. 유충을 Egg Laying (AEL) 후 47~49 시간 제 수집하여, 18 h 동안 25° C 하 표준 콘밀 푸드 (5.9% w/v Glucose, 6.6% Cornmeal, 1.2% Baker's Yeast, 0.7% Agar in water) 또는 영양 제한(NR) 배지(5% Sucrose, 1% Agar in PBS)로. 옮겼다
- [0111] 섭식 분석(Feeding assay)

- [0112] 유충을 47~49 h AEL 쯤 수집하였다. 유충을 4시간 동안 굶기고 그 후 10 μ g/mL 튜니카마이신, 1 μ M 탭시가르긴 및 5 mM DTT로 Schneider's Drosophila medium (Gibco)에서 5시간 동안 25° C 하 섭식시켰다. 모든 화합물은 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.
- [0113] RT-PCR
- [0114] cDNA 합성을 위해, 1 μ g RNA를 SuperScript First-Strand 합성 키트(Invitrogen, USA)를 이용하여 전사하였다. PCR 증폭을 taq 폴리머라아제(Roche)를 이용하여 25 사이클 동안 수행하였다.
- [0115] 사용한 프라이머들은 다음과 같다: 루시페라아제 정방향 프라이머; 5'CTCGCATGCCAGAGATCCTA-3', 루시페라아제 역방향 프라이머; 5'AAGGCTCCT CAGAAACAGCT-3', rp49 정방향 프라이머; 5' AGATCGTGAAGAAGCGCACCAAG-3', rp49 역방향 프라이머; 5' CACCAGGAACCTCTTGAATCCGG-3' Rp49는 각 샘플 사이의 cDNA의 양을 정상화하기 위해 하우스 키팅 대조군으로 사용되었다. 결과들을 대조군 샘플에서 검출되는 mRNA 상대적 발현으로 표시하였다.
- [0116] 루시페라아제 분석
- [0117] Drosophila ATF4-RA의 5'UTR DNA를 y, w larvae로부터 RT-PCR을 통해 수득하고, pGL3-기본 벡터(Promega, USA) 내로 서브 클로닝하고 5'ATF4-luc로 라벨링하였다.
- [0118] 돌연변이 구조물(5'ATF4.uORF1AUA-luc, 5'ATF4.uORF2AUA-luc, 및 5'ATF4.uORF1^{AUA}uORF2^{AUA}-luc)을 QuickChange 부위-규정된 돌연변이화 키트(mutagenesis kit)(Stratagene)를 이용하여 생성하였다.
- [0119] 돌연변이 DNA 서열을 DNA 시퀀싱에 의해 다양화하였다. 초파리 S2 세포들을 일시적으로(transiently) 와일드 타입 또는 돌연변이 리포터 플라스미드 플러스 pRL (Renilla luc)로 Effectene (Qiagen)을 이용하여 공-감염시켰다. 96 시간 후, 루시페라아제 활성을 DUAL-GIO 루시페라아제 분석 시스템(Promega, USA)을 이용하여 측정하였다. 반딧불이 루시페라아제 활성을 레닐라(Renilla) 루시페라아제 활성으로 정상화시켰다.
- [0120] 실시예 1 : Drosophila ATF4 발현 조절 메커니즘 확인
- [0121] 이전 연구에서, Drosophila ATF4 단백질 수준이 돌연변이 Rhosopsin-1의 오발현(misexpression)에 의해 야기되는 ER 스트레스에 반응하여 증가함을 보여주었으므로, 본 실험에서 ER 스트레스에 의존하는 ATF4 유도 메커니즘이 Drosophila에서 보존되는지 여부를 확인코자 하였다.
- [0122] 포유동물에서, ATF4 발현은 5'UTR에서 2개의 uORFs(upstream open reading frames)를 포함하는 메커니즘에 의해 eIF2 α 인산화에 반응하여 조절된다.
- [0123] 도 1 A에 나타낸 바와 같이, Drosophila ATF4-RA도 또한 5'UTR에서 2개의 uORFs를 가짐을 알 수 있었다.
- [0124] ATF4 발현 조절에서 이러한 2개의 uORFs의 역할을 알아보기 위해, 루시페라아제 코딩 서열에 융합된 ATF4 5'UTR을 포함하는 키메릭 전사의 발현을 유도하는 튜블린 알파1 프로모터로 리포터 구조물을 제작하였다. 상기 구조물을 루시페라아제 리포터 코딩 서열의 번역 상에서 5'UTR의 효과를 결정할 수 있도록 디자인하였다
- [0125] uORFs의 역할을 평가하기 위하여, AUA로 돌연변이되는 uORF 개시 코돈을 가지는 추가적 구조물을 제작하였다. 리포터의 전사적 개시 사이트를 5'RACE 및 시퀀싱에 의해 분석하였다.
- [0126] 상기 루시페라아제 리포터는 5'UTR 내 2개의 uORFs를 가진다. 이러한 플라스미드를 배양된 S2 세포 내로 형질 감염시키고, 야생형 5'UTR, 또는 uORF1^{AUA}를, 또는 uORF2^{AUA} 돌연변이된 5'UTR를가지는 이들에 의해 유도되는 루시페라아제 활성을 측정하였다(도 1B).
- [0127] DTT 처리는 야생형 루시페라아제 리포터(5'ATF4-luc)로 형질감염된 세포에서 반딧불이 루시페라아제 활성을 증가시켰고, 이는 ATF4 리포터 번역이 ER 스트레스에 반응하여 자극됨을 의미한다.
- [0128] uORF1 (5'ATF4.uORF1^{AUA}-luc)에서의 돌연변이는 S2 세포에서 루시페라아제 활성에서 심각한 감소를 야기한다. 그러나, uORF2가 돌연변이되면, 루시페라아제 활성에서의 증가가 있고, 이는 ER 스트레스와 독립적이었다 (도 1C).
- [0129] 추가로, uORF1 및 uORF2이 모두 돌연변이 되면, uORFs의 효과는 없어졌다. 리포터로부터 mRNA의 수준은 모든 조건에서 유사하였다.
- [0130] 이러한 결과들은 uORF1 및 uORF2가 주요 ORF의 번역에서 반대되는 역할을 가지는 생각과 일치하고, ATF4의 번역

조절 메커니즘이 *Drosophila* 및 포유동물 사이에 보존되어 있음을 보여주었다. 즉, *Drosophila* ATF4 발현은 uORF를 포함하는 메커니즘에 의해 조절된다.

[0131] **실시예 2 : in vivo ATF4 번역 활성 리포터의 발달**

[0132] ATF4 발현이 ER 스트레스에서만 뿐만 아니라 정상적 발달 동안 어떻게 조절되는지 알아보기 위하여, ATF4 루시퍼라아제 리포터로부터 변형된 in vivo ATF4 리포터를 개발하였다. ATF4 5'UTR의 조절 하 dsRed 유전자를 위치시켰다 (도 2A).

[0133] in vivo ATF4 리포터가 ER 스트레스에 대응하는지 여부를 결정하기 위해, *gmr-gal4* 드라이버를 통해 유충 눈 성충 디스크(larval eye imaginal discs)에서 돌연변이 Rhodopsin-1(Rh-1G69D)를 오발현시켰다(misexpressed).

[0134] 이러한 조건 하에서, Rh-1G69D를 발현하는 유충 눈 디스크에서 dsRed 리포터 유도를 관찰하였다(도 2D). 비록 ATF4 항체 염색이 정상적으로 발달된 조직에서 내생성 ATF4 발현을 검출할 정도로 민감하지는 않지만, Rh-1G69D 오발현에 의해 내생성 ATF4 단백질 유도를 검출할 수 있었고 (도 2E), dsRed 리포터 유도의 패턴과 거의 동일하였다.

[0135] 다음으로, 다른 응집 경향 단백질(aggregation prone proteins)이 ATF4 번역 리포터를 활성화할 수 있는지 테스트하였다.

[0136] 이 중 MJD-tr-Q78 및 Aβ를 테스트하였다. 유충 눈 성충 디스크 내 *gmr-gal4* 드라이버를 통한 MJDtr-Q78 발현은 심각한 눈 삭마 표현형(eye ablation phenotype)을 일으키지만, ATF4 리포터의 검출가능한 수준으로 활성화시키지 않았다(도시 않음). 대조적으로, 알츠하이머 질병을 이루는 펩타이드인 Aβ와 함께 ATF4 리포터를 공동-발현시켰을 때, 비록 감소된 수준에서지만 dsRed 유도가 관찰되었다(도 2C).

[0137] 이러한 결과는 in vivo 일부 스트레스-도입 단백질들에 대응되는, 새롭게 발달된 in vivo ATF4 리포터를 시사한다.

[0138] **실시예 3 : ER 스트레스와 in vivo ATF4 발현 리포터의 관계**

[0139] *tub-ATF4.5'UTR>dsRed*이 스트레스 없는 유충 눈 디스크에서 불활성화(inactive)를 유지하는 반면, 정상 섭식 동안 말피기관(malpighian tubule), 지방체, 중장(midgut), 전위, 침샘, 뇌를 포함하는 다양한 조직에서, 정상 발달 동안 시사되는 고유의 스트레스인 이러한 리포터 활성이 검출되었다(도 3A, 3E, 3I, 3M and 3Q).

[0140] in vivo ER 스트레스 대응에 있어서 ATF4 번역 프로파일을 독립적으로 특정화하기 위해, 화합물(chemicals)이 야기하는 ER 스트레스로 두번째 애벌레를 키웠다. 10 μg/mL 튜니카마이신, 1 μM 탭시가르긴(thapsigargin) 및 5 mM DTT로 5 h동안 섭식시킨 후, 유충을 해부하여 anti-dsRed 항체로 염색하였다.

[0141] 이러한 조건 하에서, *tub-ATF4.5'UTR>dsRed*의 발현은 넓게 증가하였다. 특히 침샘에서 *tub-ATF4.50UTR>dsRed*의 뚜렷한 유도가 있었다(도 3E-H).

[0142] 추가로, 유충이 양육되면서 *tub-ATF4.50UTR>dsRed*의 증가된 수준이 ER 스트레스로 전위, 중장 및 지방체에서 관찰되었다(도 3I-3P). 그러나, 유충 뇌 및 말피기관에서 dsRed 발현의 눈에 띄는 변화는 없었다(도 3A-D 및 3Q-T).

[0143] 추가로 in vivo ATF4 리포터를 *Drosophila* S2 세포에서 확인하였다. 이 리포터 또한 *Drosophila* S2 세포에서 화합물, DTT, 튜니카마이신, 탭시가르긴을 야기하는 ER 스트레스에 대응하였다.

[0144] 이러한 결과들은 ER 스트레스가 in vivo ATF4 발현 리포터를 활성화시킴을 의미한다. 즉, ATF4 리포터가 고유적 및 외생성 소스에 의해 일어나는 스트레스 모두 검출할 수 있고, 이러한 반응은 조직 의존적임을 나타낸다.

[0145] **실시예 4 : 영양 부족과 in vivo ATF4 발현 리포터의 관계**

[0146] ATF4 번역은 아미노산 부족을 포함하는 다른 스트레스 조건의 수에 대응하여 활성화된다. in vivo ATF4 리포터가 영양 부족에 대응하여 활성화되는지 여부를 테스트하기 위해, 두번째 애벌레를 표준 섭식 또는 영양적으로 제한된 조건(아미노산 결여)으로 18시간 동안 길렀다.

[0147] 표준 섭식에서 시엽(optic lobe) 및 뇌간(brain stem)에서 dsRed 발현의 재생가능한 패턴이 발견되었다.

[0148] ATF4 리포터로 공동-위치하지 않는 anti-repo (신경교 마커) 항체로 이중 표지를 수행하였다(도 4A). 비록 *tub-ATF4.5'UTR>dsRed* 리포터가 뇌에서 활성화하였지만, 표준 섭식 및 제한된 섭식 사이에서 dsRed의 유도의 현저한

변화는 없었다(도 4A 및 4B).

[0149] 그러나, tub-ATF4.5'UTR>dsRed 리포터가 유충이, 표준 섭식과 비교해서 제한된 섭식에서 길러졌을 때 소장(intestine)에서 높은 수준으로 활성화되었다(도 4C 및 4D). 또한, 유충에서, dsRed 발현은 전위, 지방체 및 말피기관에서 현저하게 유도되었다(도 4E-J).

[0150] ATF4는 UPR를 매개하는 3개 전사 인자의 하나이므로, 본 발명자들은 다른 UPR 경로 또한 영양 부족과 대응하는지 여부를 검토하고자 하였다. 전사 인자, xbp1의 mRNA 스플라이싱을 촉발하는, ER 스트레스 활성화된 RNase, IRE1에 의해 매개되는 경로를 특히 테스트하였다. 이 경로의 활성화는, 오직 ER-스트레스가 xbp1 mRNA의 스플라이싱을 촉발하는 프레임에서 EGFP가 발현되는, xbp1-EGFP 리포터를 통해 검출될 수 있다. EGFP 발현은 영양 제한에 의존해서 두드러지게 변하지 않았다.

[0151] 이러한 결과들은 in vivo ATF4 리포터는 영양 부족(nutritional deprivation)에 대응함을 보여준다. 즉, ATF4 이 영양 제한에 의해 구체적으로 활성화되는 것을 의미하고, 이는 에너지 대사에서 필수적인 역할을 할 수 있음을 시사한다.

[0152] 실시예 5 : in vivo ATF4 발현 리포터의 광수용체에서의 활성

[0153] 이전 연구에서 UPR 센서 xbp1-EGFP가 번데기 발달 후반 동안 광수용체에서 활성적임을 보여주었다. 시그널링의 ATF4 분지가 광수용체 세포에서 유사하게 활성화되는지를 알아보기 위해, 번데기 및 성충 단계동안 ATF4 수용체 활성을 조사하였다.

[0154] 번데기 초기에는(번데기 형성 후 37 h: APF), 광수용체 세포에서 ATF4 리포터 활성을 검출할 수 있었다(도 5A). 이 리포터 활성은 48시간 APF에서 유지되었지만, 발현의 패턴은 변경되었다(도 5B). 번데기(puparium) 96 시간 켜, dsRed은 여전히 광수용체 세포에서 발현되었다. 성체 망막에서, dsRed 리포터가 발현됨을 발견하였지만, 광수용체 내는 아니었고(도 5D), Homothorax-양성 격자 세포와 오버랩되는, 보고된 xbp1-EGFP 패턴과 유사하였다.

[0155] 이러한 결과는 정상적 광수용체 발달 동안 ATF4 번역이 촉진됨을 의미한다. 즉, in vivo ATF4 리포터는 Drosophila의 광수용체에서 활성적이다.

[0156] 실시예 6 : ATF4 리포터의 고발현 영역

[0157] Drosophila에서 xbp1-EGFP 및 xbp1p>dsRed, xbp1 수용체 상에서의 이전 연구들은 UPR의 xbp1 경로가 암컷이 아닌 성인 수컷 재생산 기관 내에서 활성적임을 보여주었다.

[0158] 구체적으로, xbp1-EGFP 리포터가 고환의 제한된 영역 및 부속샘에서 검출되었다. 반면, xbp1p>dsRed는 고환 자체가 아닌, 사정관 및 부속샘에서 발현되었다.

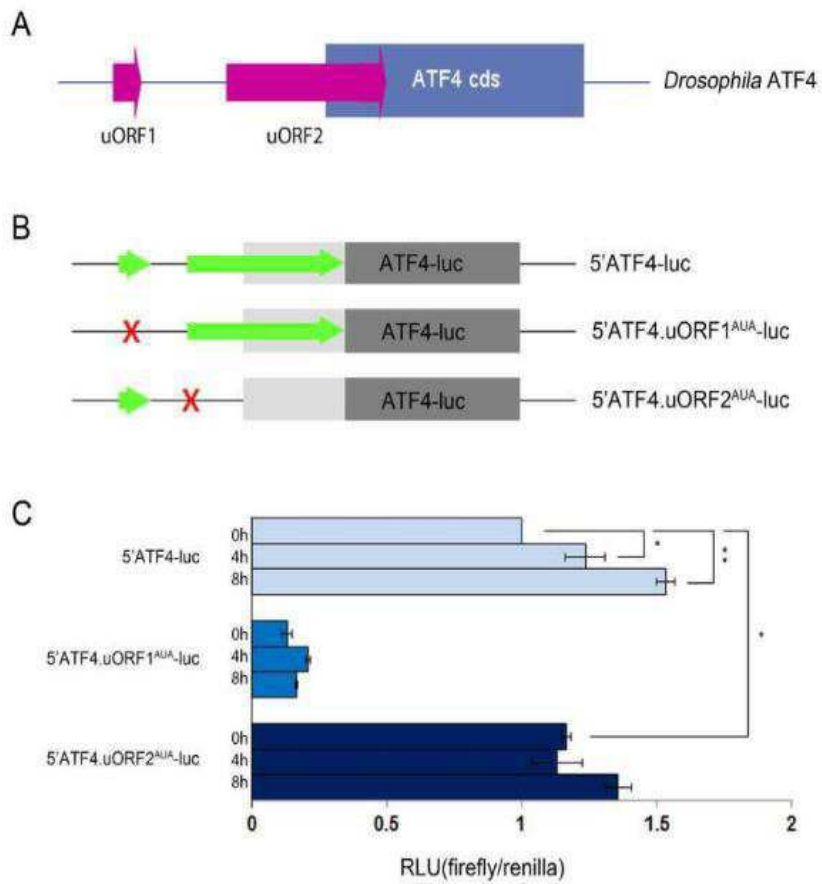
[0159] ATF4 리포터가 수컷 재생산성 기관에서 활성적인지를 테스트하기 위해, 성인 재생산성 기관을 해부하여 항-dsRed 항체로 염색하였다.

[0160] 그 결과, 도 6으로부터 알 수 있는 바와 같이, DsRed가 부속샘 및 사정관뿐만 아니라 고환 및 고환관(testicular duct)의 제한된 영역에서 관찰되었다. 즉, ATF4 리포터는 성인 수컷 재생산성 기관에서 높게 발현되었다.

[0161] 이러한 결과는 UPR 시그널링이 높은 단백질 분비 활성을 가지는 기관에서 활성적이라는 것과 일치하였다.

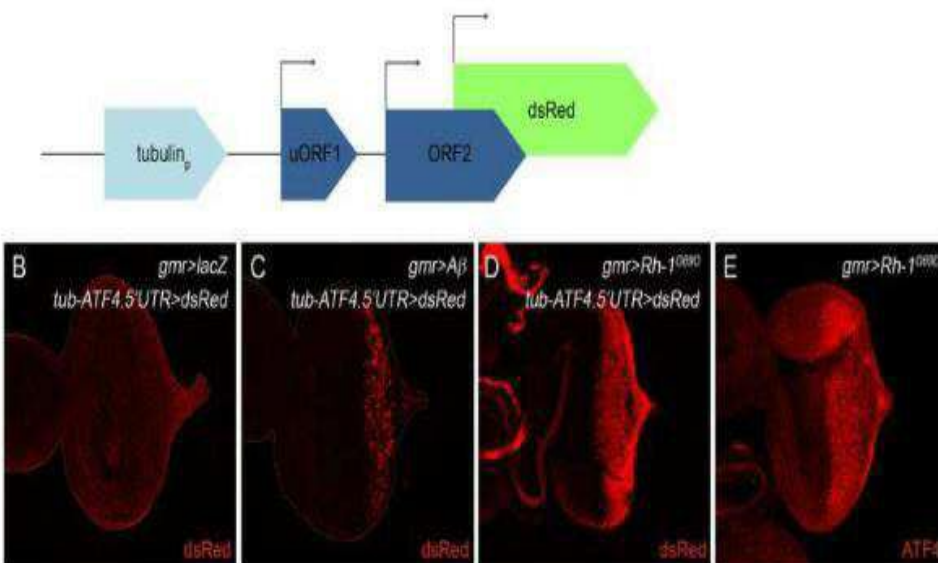
도면

도면1

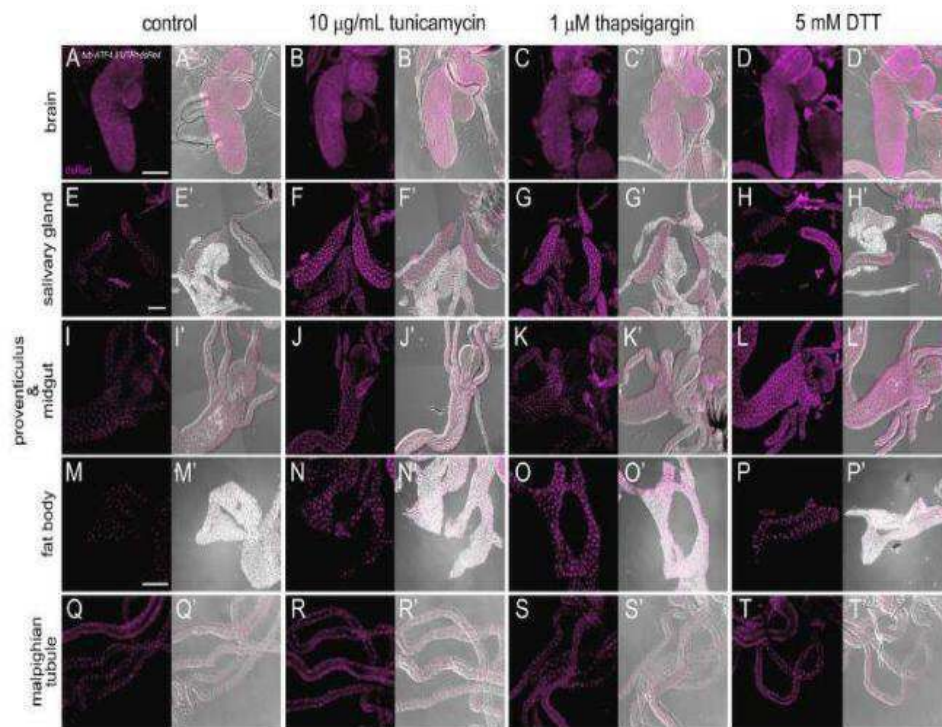


도면2

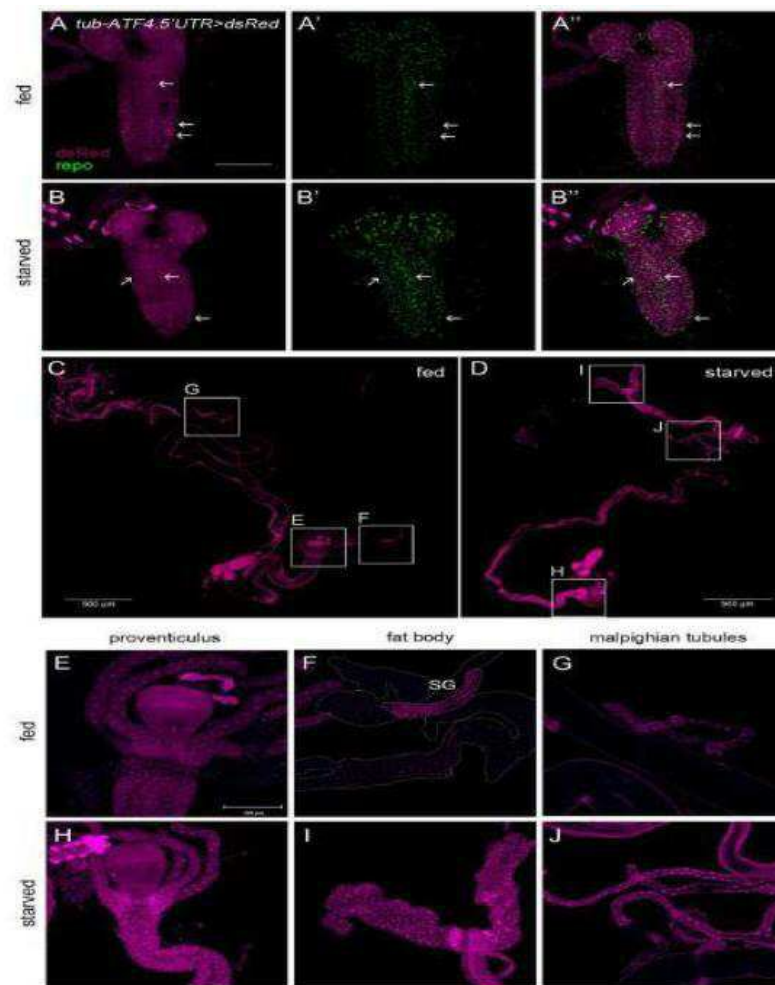
A. *in vivo* ATF4 reporter : tubulin_p-ATF4.5'UTR>dsRed



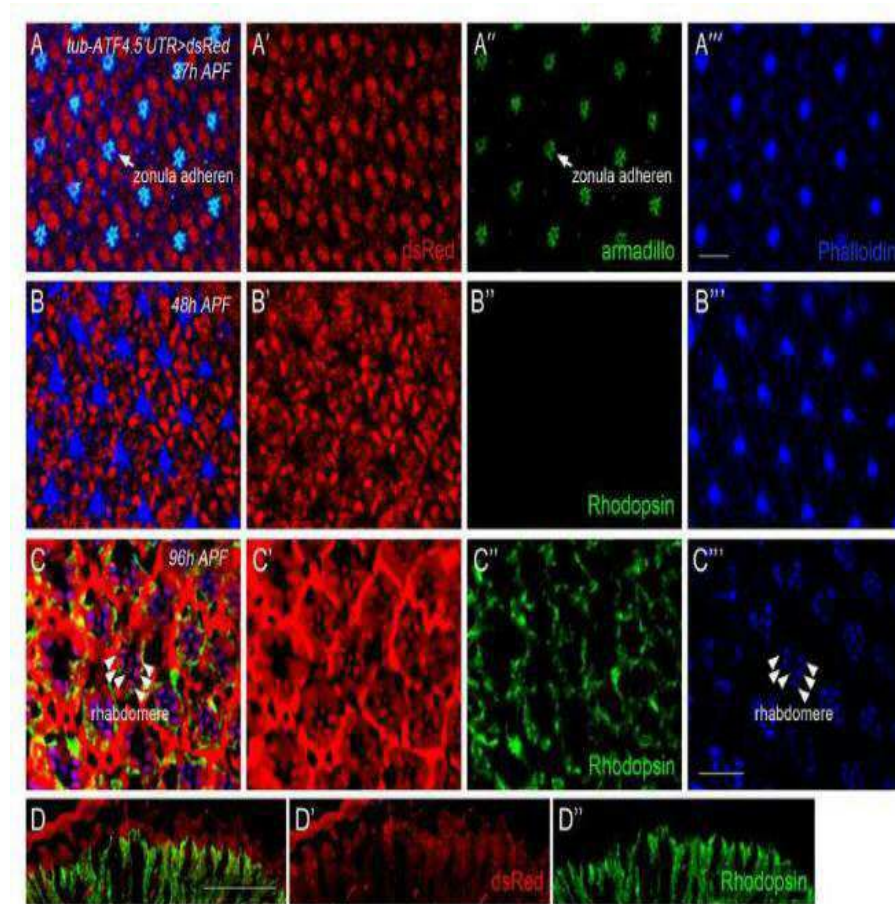
도면3



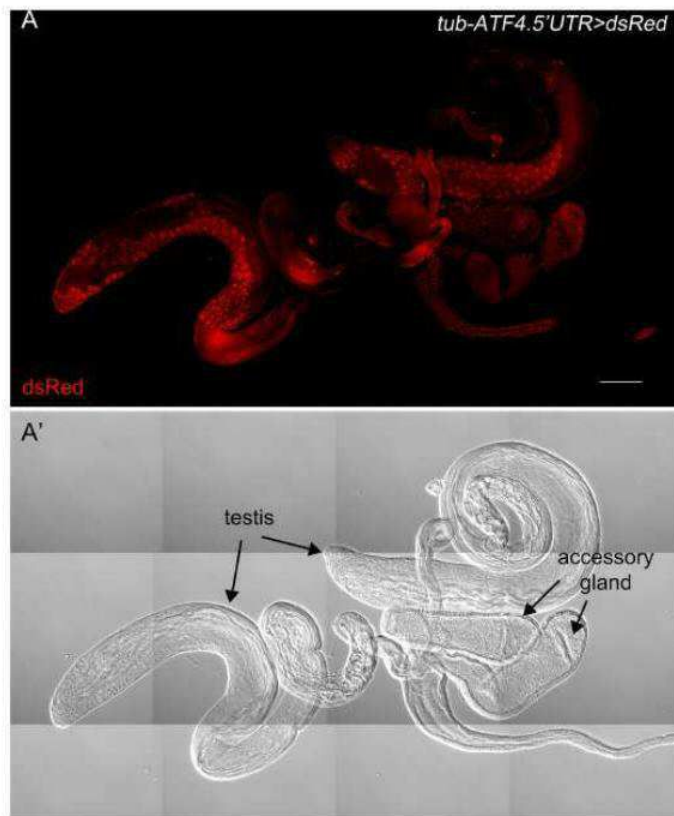
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Ulsan University
- <120> Method for Detecting ATF4 under Endoplasmic reticulum Stress
- <130> PN1507-199
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 304
- <212> DNA
- <213> ATF4 5'UTR gene sequence
- <400> 1

actgattcca acatcatta ccgttccaaa tgaaacgcaa aaaggttcaa ttgttat	60
ctctcagcat ttcggcattt atattaacct aaagatggct ctatagtttg cgcgcaagca	120
aaaacaagca gcacctaggt gcccaaacac aacaaaatga aaacgtataa aaatcaaaac	180
gccatcatgg cattttcaca acaacaaaac acaccgcgaa aacaaccatt ctcatcttc	240
ggaccggatt tcatactctc aaaacaaaac atatctttga cccctgattt gaactctgga	300
tacc	304

<210> 2

<211> 678

<212> DNA

<213> DsRed gene sequence

<400> 2

atggcctcct ccgaggacgt catcaaggag ttcatgcgt tcaaggtgcg catggagggc	60
tccgtgaacg gccacgagtt cgagatcgag ggcgagggcg agggccgccc ctacgagggc	120
accagaccg ccaagctgaa ggtgaccaag ggcggccccc tgccttcgc ctgggacatc	180
ctgtccccc agttccagta cggctccaag gtgtacgtga agcaccccg cgcacatcccc	240
gactacaaga agctgtcctt ccccgagggc ttcaagtggg agcgcgatgat gaacttcgag	300
gacggcgggc tggtagaccgt gaccaggac tcctccctgc aggacggctc cttcatctac	360
aaggtgaagt tcatcggcgt gaacttcccc tccgacggcc ccgtaatgca gaagaagact	420
atgggctggg aggcctccac cgagcgctg taccgccg acggcgtgct gaaggcgag	480
atccacaagg cctgaagct gaaggacggc ggccactacc tggtagagtt caagtccatc	540
tacatggcca agaagccgt gcagctgccc ggctactact acgtggactc caagctggac	600
atcacctccc acaacgagga ctacaccatc gtggagcagt acgagcgcg cgagggccgc	660
caccacctgt tctgtag	678