



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월29일

(11) 등록번호 10-1524426

(24) 등록일자 2015년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/53 (2013.01)

G01N 33/5008 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0041232

(22) 출원일자 2015년03월25일

심사청구일자 2015년03월25일

(56) 선행기술조사문헌

Joungmok Kim et al., Cell, 2013.01, Vol.152, pp

Benyu Ma et al., Cell Research, 2014.07, Vol 24, pp

Jian-Oing Dal et al., PLOS ONE, 2013.04, vol. 8, No. 4, pp 1-16

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김정목

서울특별시 송파구 송파대로32길 8 6동1402호 (가락동, 가락우성아파트)

김정희

서울특별시 강남구 학동로 68길 20 중앙하이츠 102동 701호

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 16 항

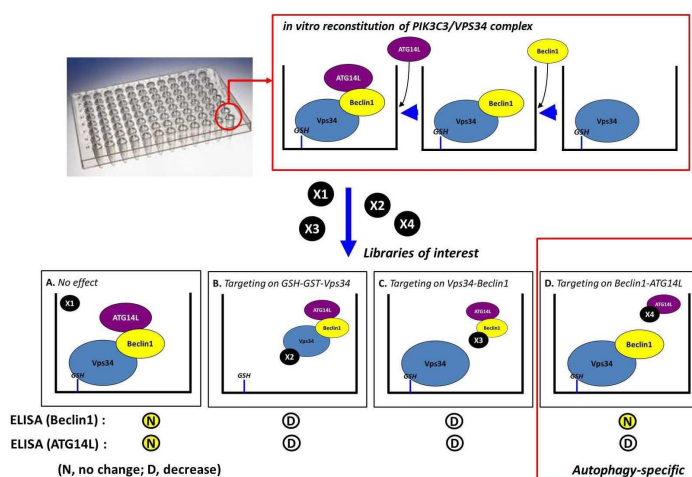
심사관 : 김승오

(54) 발명의 명칭 자가포식 특이적 억제제 발굴을 위한 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 자가포식을 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질 및 다양한 화합물, 펩타이드, 압타머등의 라이브러리를 처리하고, 이에 의하여 자가포식 현상의 초기단계에 중요한 역할을 하는 Vps34-Becn1-ATG14L 복합체의 형성의 저해 여부를 in vitro상에서 고처리량 검정에 적합하게 관별할 수 있는 자가포식 특이적 억제제의 스크리닝 방법, 상기 방법에 사용될 수 있는 키트 및 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제 스크리닝 방법을 이용하면, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 제제를 발굴할 수 있으므로, 자가포식의 억제를 통한 다양한 질환 치료용 조성물의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9C6049936

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 경희대학교 산학협력단

연구사업명 바이오 의료기술 연구개발사업

연구과제명 신경줄기세포의 성장/분화/사멸조절과정에서 세포 에너지 대사/성장 신호전달계 및 autophagy 역할 규명

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.10.01 ~ 2014.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1-ATG14L(autophagy related 14) 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 Vps34를 통해 Beclin1 및 ATG14L의 수준을 확인하는 단계를 포함하는, 자가포식 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1-ATG14L(autophagy related 14) 복합체는 담체에 고정된 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 측정된 Beclin1의 수준은 후보물질과의 반응이전의 Beclin1의 수준보다 감소되지 않고, 상기 (b) 단계에서 측정된 ATG14L의 수준이 후보물질과의 반응이전의 ATG14L의 수준보다 감소된 경우, 상기 후보물질이 자가포식 억제제인 것으로 판정하는 것인 방법.

청구항 4

- (a) Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질과 ATG14L(autophagy related 14)을 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 Vps34-Beclin1 복합체에 결합된 ATG14L의 수준을 확인하는 단계를 포함하는, 자가포식 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1 복합체는 담체에 고정된 것인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 측정된 ATG14L의 수준이, 상기 후보물질을 처리하지 않고 ATG14L 만을 가하여 반응시켜서 확인된 ATG14L의 수준에 비하여 감소된 경우, 상기 후보물질이 자가포식 억제제인 것으로 판정하는 것인 방법.

청구항 7

Vps34(vacuolar protein sorting 34)-Beclin1 복합체, ATG14L(autophagy related 14), Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 자가포식 억제제 스크리닝용 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 Vps34-Beclin1 복합체는 담체에 고정된 것인 키트.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제는 Beclin1에 특이적으로 결합할 수 있는 항체인 것인 키트.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제는 ATG14L에 특이적으로 결합할 수 있는 항체인 것인 키트.

청구항 11

제7항에 있어서,

Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체가 고정된 96웰 플레이트, Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것인 키트.

청구항 12

(a) Vps34(vacuolar protein sorting 34) 또는 상기 Vps34를 포함하는 복합체에 상기 Vps34 또는 복합체와의 결합력을 측정하고자 하는 목적 단백질을 농도별로 처리하여 각각의 결합체를 수득하는 단계; 및,

(b) 상기 목적 단백질의 처리 농도에 따른 결합체 농도를 측정하여, 상기 Vps34 또는 복합체에 대한 목적 단백질의 결합력을 측정하는 단계를 포함하는, Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 Vps34 또는 상기 Vps34를 포함하는 복합체는 담체에 고정된 것인 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 (a) 단계의 복합체는 Vps34-Beclin1 복합체인 것인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

상기 (a) 단계의 목적 단백질은 Beclin1 또는 ATG14L(autophagy related 14)인 것인 방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

상기 (b) 단계의 결합력 측정은, (a) 단계에서 처리된 목적 단백질의 농도와 (b) 단계에서 측정된 결합체의 농도를 이용하여 작성된 결합곡선(binding curve)을 이용하여 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자가포식 특이적 억제제 발굴을 위한 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 자가포식을 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질 및 다양한 화합물, 펩타이드, 압타머등의 라이브러리를 처리하고, 이에 의하여 자가포식 현상의 초기단계에 중요한 역할을 하는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체의 형성의 저해 여부를 in vitro상에서 고처리량 검정에 적합하게 판별할 수 있는 자가포식 특이적 억제제의 스크리닝 방법, 상기 방법에 사용될 수 있는 키트 및 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자가포식(autophagy) 현상은 기아상태생존, 감염성 세균으로부터의 보호 및 신경붕괴조절과 같은 세포 기능을 조절하는데 중요한 역할을 하는데, 이는 진화적으로 보존된 과정으로, 이스트에서 포유류에 이르기까지 모든 진핵세포에서 나타난다. 초기에는, 세포질 및 세포 내 기관들은 오토파고솜(autophagosome)이라는 이중-막-결합 구조로 퇴화하고, 상기 퇴화된 오토파고솜은 리소솜(lysosome)과 융합하여 오토리소솜(autolysosome)을 형성하며, 상기 오토리소솜에 의해 퇴화된 물질이 가수분해되어 재사용된다. 그러나, 이러한 과정에 내재한 분자적 작용기작은 아직 밝혀지지 않았기 때문에 이를 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 지금까지 알려진 바에 의하면, 효모, 초파리 등을 대상으로 수행된 다양한 유전학/생화학적 연구를 통하여 세포 내에서 자가포식(autophagy) 현상을 일으키는데 필요한 단백질들이 발굴되었고, 이들의 상관관계를 분석하기 위한 연구가 수행되고 있다. 지금까지 밝혀진 바에 의하면, 자가포식은 유도단계(induction/nucleation), 세포막 변형단계(membrane elongation/closure) 및 포식단계(vesicle trafficking/maturation/fusion/degradation)의 세 가지 단계로 크게 구분된다고 알려져 있다. 또한, 자가포식 경로는 Atg8PE(phosphatidylethanolamine) 또는 Atg12Atg5를 공유하는 두개의 독특한 유비퀴틴-유사 접합 시스템을 포함하는데, 상기 경로는 효모의 Vps34 동족체인 클래스 III PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)과 Beclin1(효모유래 Atg6의 오토로그)으로 구성된 복합체와 함께 오토파고솜 형성에 관련된다.

[0004] 많은 종류의 세포에서, 성장요소 및 사이토카인에 의한 class I PI3K/AKT 신호 경로의 자극은 자가포식을 억제하는 효과를 나타낸다. 상기 억제 효과는 아마도 오토파지를 하향 조절하는 라파마이신표적(target of rapamycin(TOR)) 키나아제의 class I PI3K/AKT-의존적 활성화 때문인 것으로 예상되고 있다. 예를 들어, PI 3-키나아제 억제제인 워트마닌(wortmannin) 및 3-메틸아데닌(3-MA)으로 처리한 세포에서는 오토파고솜 전구체가 발생하지 않는데, 이는 오토파지성 액포 형성 초기단계에서 PI3K-AKT-mTORC1 신호전달계의 활성화 억제의 중요성을 시사한다. 이러한 자가포식 현상의 억제 또는 활성화는 단순한 세포활성 뿐만 아니라, 상기 세포를 포함하는 생체내 생리학적 또는 병리학적 변화에 큰 영향을 미친다. 근래 다양한 동물모델 및 질병의 유전자 분석 연구를 통하여 자가포식과정의 당뇨, 고혈압등의 대사성 질환, 퇴행성 뇌질환, 감염성 질환, 그리고 암등의 매우 다양한 질환에서 중요한 역할을 하고 있음이 보고됨으로써 그 중요성이 부각되고 있다. 따라서 자가포식(autophagy)를 조절하는 물질 발굴은 새로운 작용점을 타겟으로 하는 질병치료제 개발에 매우 중요한 역할을 할

것으로 기대하고 있다.

[0005] 특히, 암질환의 치료와 관련하여 자가포식 현상을 조절 할 수 있는 물질에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이는 상당수의 암세포가 암세포 발생의 초기단계에서는 자가포식 현상을 억제하여 암세포의 성장을 유도하고, 또한 암세포가 형성된 이후에 활성화하여 영양, 산소결핍 및 항암제에 대한 저항성을 나타냄이 보고된 바 있다. 따라서, 상기 자가포식 현상을 조절할 수 있는 물질은 암세포에서 항암효과를 나타낸다고 할 수 있으며, 이러한 자가포식 현상을 이용하여 암을 치료하는 방법을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제2011-0100435호에는 자가포식 관련 질환의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물 및 그의 스크리닝방법이 개시되어 있다.

[0006] 또한, 상기 자가포식 현상을 억제할 수 있는 물질은 자가포식 현상이 수반되는 염증성 창자병(inflammatory bowel disease), 제1형 당뇨병 등과 같은 질환의 치료에도 사용될 수 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제2012-0088059호에는 인터루킨-10을 유효성분으로 함유하는 대식세포의 자가포식 억제제 및 인터루킨-10과 IL-10 수용체의 결합 저해제 또는 PI3 kinase I의 활성화 저해제를 유효성분으로 포함하는 대식세포의 자가포식 촉진제가 개시되어 있다.

[0007] 그러나 현재까지 자가포식 과정만을 특이적으로 조절하는 물질의 부재로 자가포식을 억제하는 PI3K-AKT-mTORC1 신호전달계를 차단하는 물질을 이용하여 자가포식과정을 활성화하거나 자가포식의 최종분해 장소인 리소좀의 기능을 방해하는 물질을 이용하여 자가포식을 억제하는 방법이 이용되고 있다. 하지만 이들은 autophagy뿐만 아니라 다양한 세포내 생리활성을 조절함으로써 자가포식과정을 타겟으로 한 약물개발에 있어 많은 부작용이 예상된다.

[0008] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 자가포식과정만을 특이적으로 조절하는 물질을 효과적으로 발굴하기 위한 방법을 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 자가포식 현상에 특이적으로 관여하는 Vps34-Becclin1-ATG14L 복합체의 형성을 고처리량 검정법(High-throughput format) 확인할 수 있는 시스템을 고안하였고 이를 이용하여 다양한 물질을 대상으로 Vps34-Becclin1-ATG14L 복합체 형성을 저해하는 물질을 스크리닝하여 자가포식 특이적 억제제를 발굴할 수 있는 프로토콜을 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 Vps34-Becclin1-ATG14L 복합체를 이용한 자가포식 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 Vps34-Becclin1 복합체, ATG14L 및 이들의 수준을 측정할 수 있는 재제를 포함하는 자가포식 억제제 스크리닝용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 보다 효과적으로 제공할 수 있는 방법을 개발하기 위하여, 자가포식 현상을 유발시키는 세포내 인자를 표적으로 하여, 자가포식을 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질이 상기 표적의 작용을 억제할 경우 상기 후보물질을 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질로 간주할 수 있을 것으로 가정하고, 이에 기초하여 다양한 연구를 수행하던 중, 자가포식 현상을 유발하는 유도단계(induction/nucleation)에 주목하게 되었다. 상기 자가포식 현상은 유도단계(induction/nucleation), 세포막 변형단계(membrane elongation/closure) 및 포식단계(vesicle trafficking/maturation/fusion/degradation)로 구분될 수 있는데, 이 중에서 세포막 변형단계 및 포식단계에 관여하는 다양한 인자들은 자가포식 현상 이외에도 세포내 다양한 물질이동 작용(endosome trafficking, phagocytosis 등)에도 필수적으로 관여하기 때문에, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 발굴하

기 위한 표적으로는 적절하지 않기 때문이다.

- [0013] 한편, 상기 유도단계에 관여하는 것으로 알려진 대표적인 인자는 ULK1(ATG1) 단백질 인산화효소 복합체와 PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체인데, 이 중에서 ULK1(ATG1) 단백질 인산화효소 복합체는 세포내에 존재하는 다양한 단백질 인산화효소와의 상호작용을 모두 고려해야 하기 때문에, 상대적으로 고려해야할 세포내 상호작용의 수가 적은 PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체를 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 발굴하기 위한 표적으로 사용하고자 하였다. 그러나, 상기 복합체의 지질 인산화 활성은 자가포식 현상 이외에도 다양한 세포내 작용(phagocytosis, endosome trafficking/maturation 등)에 관여함이 알려져 있으므로, 상기 복합체의 지질 인산화 활성을 표적으로 사용하기 보다는 상기 복합체의 형성여부를 표적으로 사용하고자 하였다.
- [0014] PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체는 상기 복합체를 구성하는 구성요소에 따라 다양한 형태를 나타낼 수 있다. 이러한 다양한 형태의 PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체 중에서 ATG14L 단백질을 구성요소로 포함하는 복합체(Vps34-Bec1in1-ATG14L)는 자가포식 특이적 PIK3C3/VPS34 복합체(pro-autophagy complex)로 알려져 있고, 실제로 세포내에서 ATG14L 발현을 억제하면 PIK3C3/VPS34 복합체의 다양한 기능 중 자가포식 현상만이 특이적으로 억제되므로, 상기 복합체의 형성을 억제하는 물질은 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질로 사용될 수 있을 것으로 기대할 수 있다.
- [0015] 또한, 상기 ATG14L 단백질을 구성요소로 포함하는 복합체(Vps34-Bec1in1-ATG14L) 중에서 Vps34-Bec1in1은 다양한 PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체에서 공통적으로 발견되는 핵심부위이기 때문에, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 발굴하기 위하여, 상기 복합체(Vps34-Bec1in1-ATG14L)에서 ATG14L의 결합여부를 실질적인 표적으로 사용하였다. 즉, PIK3C3/VPS34 지질 인산화효소 복합체(Vps34-Bec1in1-ATG14L)를 형성함에 있어서, ATG14L의 결합을 억제하는 물질이 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질로 사용될 수 있으므로, Vps34 및 Bec1in1으로 구성된 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질과 ATG14L를 동시에 또는 순차적으로 가하여 상기 복합체(Vps34-Bec1in1-ATG14L)가 형성되는지의 여부를 확인함으로써, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 스크리닝 할 수 있다.
- [0016] 한편, 상술한 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 물질을 스크리닝하는 방법을 변형시켜서, Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석할 수 있는데, 상기 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질을 다양한 농도로 처리하고, 상기 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 목적 단백질이 결합된 결합체의 농도를 정량한 다음, 상기 처리된 목적 단백질의 농도와 정량된 결합체의 농도를 이용하여 작성한 결합곡선을 이용하여 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석할 수 있다.
- [0017] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 Vps34, Bec1in1 및 ATG14L를 이용하여 자가포식 억제제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제의 스크리닝 방법의 첫 번째 방법으로서, (a) Vps34-Bec1in1-ATG14L 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 Vps34를 통해 Bec1in1 및 ATG14L의 수준을 확인하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 후보물질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 화합물, 천연물의 추출물, 펩타이드, 앵타머 등이 될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 용어, "자가포식(autophagy or autophagocytosis)"이란, 리소좀을 사용하여 필요없거나 또는 이상기능을 나타내는 세포내 소기관의 분해에 관여하는 기본적인 이화작용기작을 의미하는데, 영양결핍과 같은 특수한 상황에서는 세포내 소기관을 파괴하여 세포내 에너지 수준을 유지함으로써 세포 생존성을 향상시키는 효과를 나타낼 수 있다. 실질적인 자가포식 현상은 세포질 및 세포 내 기관들은 오토파고좀(autophagosome)이라는 이중-막-결합 구조로 퇴화하고, 상기 퇴화된 오토파고좀은 리소좀과 융합하여 오토리소좀(autolysosome)을 형성하며, 상기 오토리소좀에 의해 퇴화된 물질이 가수분해되어 재사용되는 과정에 의해 수행되는 것으로 알려져 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 자가포식은 Vps34-Bec1in1-ATG14L 복합체의 형성에 의하여 유발되고, 상기 복합체에 포함된 ATG14L의 결합을 억제하는 물질에 의하여 억제될 수 있는 세포내 작용으로 해석될 수 있다.

- [0021] 본 발명의 용어, "Vps34(vacuolar protein sorting 34)"란, "PIK3C3(Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3)"라고도 호칭되고, 세포내 자가포식에 관여하는 단백질을 의미한다. 상기 Vps34는 진핵세포에서 발현되는 Class III PI 3-인산화효소의 일종으로 구분되고, 포스파티딜이노시톨을 인산화시켜서 포스파티딜이노시톨 (3)-인산을 형성하는 효소활성을 나타낸다. 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: NM_002647, NP_002638 등). 일례로서, 본 발명에서는 Vps34로서 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 사용하였다.
- [0022] 본 발명의 용어, "Beclin1"이란, BECN1 유전자에 의하여 발현된 단백질로서 효모에서 발현된 Atg 6(autophagy-related gene 6)의 상동체(ortholog) 단백질을 의미한다. 상기 Beclin1은 자가포식에 관여할 뿐만 아니라, 발달, 암발생 및 신경퇴화에 중요한 역할을 수행한다. 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: NM_003766, NP_003757 등). 일례로서, 본 발명에서는 Beclin1으로서 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 사용하였다.
- [0023] 본 발명의 용어, "ATG14L(autophagy related 14)"란, "Barkor(beclin 1-associated autophagy-related key regulator)"라고도 호칭되며, Beclin1과 결합하여 자가포식에 관여하는 단백질을 의미한다. 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 구체적인 염기서열 및 단백질 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: NM_014924.4, NP_055739.2 등). 일례로서, 본 발명에서는 ATG14L로서 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 사용하였다.
- [0024] 상기 방법은 자가포식 과정에서 특이적으로 형성되는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에서 ATG14L를 특이적으로 제거할 수 있는 제제를 스크리닝하기 위하여 수행될 수 있는데, 상기 제제가 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에서 ATG14L 만을 특이적으로 제거할 경우에만, 상기 제제를 자가포식 억제제로서 판정할 수 있다. 예를 들어, 상기 (b) 단계에서 측정된 Beclin1의 수준은 후보물질과의 반응이전의 Beclin1의 수준보다 감소되지 않고, 상기 (b) 단계에서 측정된 ATG14L의 수준이 후보물질과의 반응이전의 ATG14L의 수준보다 감소된 경우에만, 상기 후보물질이 자가포식 억제제인 것으로 판정하는 방법을 사용할 수 있다.
- [0025] 이때, 상기 Beclin1 또는 ATG14L의 수준을 측정하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서, FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer), 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트(rocket) 면역전기영동, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay) 등이 될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 용어 "항체"란, 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미하는데, 이러한 항체는, 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있을 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 상기 반응물에서 측정하고자 하는 Vps34, Beclin1 또는 ATG14L에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있고, 바람직하게는 상기 각 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 그의 일부가 될 수 있다.
- [0028] 아울러, 상기 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체는 특별히 고정되지 않은 상태로 사용될 수도 있고, 담체에 고정된 형태로 사용될 수도 있는데, 고정되지 않은 상태로 사용될 경우, FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) 등의 방법을 통하여 (b) 단계를 수행할 수 있고, 담체에 고정된 상태로 사용될 경우, ELISA(enzyme

linked immunosorbent assay) 등의 방법을 통하여 (b) 단계를 수행할 수 있다.

- [0029] 상기 복합체가 담체에 고정된 형태로 사용될 경우, 상기 담체는 특별히 이에 제한되지 않으나 일례로서, 니트로셀룰로오스, 폴리비닐 수지, 폴리스티렌 수지, 유리 등의 재질로 구성되는 담체가 될 수 있고, 다른 예로서, 막, 96웰 플레이트, 비드, 슬라이드 글라스 등의 형태를 갖는 담체가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 니트로셀룰로오스, 폴리비닐 수지, 폴리스티렌 수지 또는 유리재질의 막, 96웰 플레이트, 비드 또는 슬라이드 글라스 등이 될 수 있다. 특히, 상기 담체가 96웰 플레이트의 형태를 갖는 경우, 다수의 후보물질을 대상으로 동시에 스크리닝 방법을 수행할 수 있다.
- [0030] 한편, 상기 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체가 담체에 고정된 경우 상기 (b) 단계에서, 담체에 고정된 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에 포함된 Beclin1 및 ATG14L의 수준을 정확하게 측정하기 위하여, (a) 단계가 종료된 후, 상기 담체를 세척하여, 상기 담체에 고정되지 않은 Beclin1 및 ATG14L을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제의 스크리닝 방법의 두 번째 방법으로서, (a) Vps34-Beclin1 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질과 ATG14L을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 Vps34-Beclin1 복합체에 결합된 ATG14L의 수준을 확인하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 Vps34-Beclin1 복합체 역시 담체에 고정된 형태가 될 수 있는데, 이 경우, 담체에 대하여는 상술한 바와 동일하고, (b) 단계에서, 담체에 고정된 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에 포함된 ATG14L의 수준을 정확하게 측정하기 위하여, (a) 단계가 종료된 후, 상기 담체를 세척하여, 상기 담체에 고정되지 않은 ATG14L을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 아울러, 상기 방법에 개시된 후보물질, Vps34, Beclin1, ATG14L, ATG14L의 수준을 확인하는 방법 등은 상술한 바와 동일하다.
- [0032] 상기 두 번째 방법은 첫 번째로 제공한 방법과는 다른 특성을 지닌 자가포식 억제제를 스크리닝할 수 있다. 구체적으로, 첫 번째로 제공한 방법은 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에서 ATG14L를 특이적으로 제거할 수 있는 물질을 자가포식 억제제로서 스크리닝 하는 방법임에 반하여, 두 번째로 제공하는 방법은 Vps34-Beclin1 복합체에 ATG14L이 결합하는 것을 억제할 수 있는 물질을 자가포식 억제제로서 스크리닝 하는 방법이므로, 결과적으로는 다른 특성을 갖는 자가포식 억제제를 각각 스크리닝할 수 있다.
- [0033] 따라서, 상기 두 번째 방법은 자가포식 과정에서 특이적으로 형성되는 Vps34-Beclin1 복합체에 ATG14L의 결합을 특이적으로 억제할 수 있는 제제를 스크리닝하기 위하여 수행될 수 있는데, 상기 제제가 Vps34-Beclin1 복합체에 대한 ATG14L의 결합을 억제할 경우에, 상기 제제를 자가포식 억제제로서 판정할 수 있다. 예를 들어, 상기 (b) 단계에서 측정된 ATG14L의 수준이, 상기 후보물질을 처리하지 않고 ATG14L 만을 가하여 반응시켜서 확인된 ATG14L의 수준에 비하여 감소된 경우, 상기 후보물질이 자가포식 억제제인 것으로 판정하는 방법을 사용할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제의 스크리닝 방법을 도면을 통해 설명하면 다음과 같다.
- [0035] 일례로서, 도 1에 개시된 자가포식 특이적 억제제 발굴법이 될 수 있다.
- [0036] GST-Vps34 단백질은 GSH 코팅된 마이크로웰 플레이트에 일정한 방향으로 고정된다. 상기 플레이트에 Beclin1과 ATG14L 단백질을 순차적으로 가하여, 필수적인 자가포식 촉진용 PIK3C3/VPS34 복합체인 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 재구성하였다. 각 단백질의 결합은 각 단백질에 대한 ELISA 반응으로 확인하였다. 자가포식 특이적 억제제를 스크리닝하기 위하여, 화합물, 펩타이드, 앵타머 라이브러리나 같은 목적물질의 라이브러리를 상기 제작된 분석용 플레이트에 가한 다음, 상기 플레이트에 잔류하는 Beclin1과 ATG14L의 수준을 측정하여, 가하여진 물질이 억제효과를 나타내는지의 여부를 확인하였다. 예를 들어, 상기 물질이 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체에 영향을 주지 않는다면 Beclin1 및 ATG14L 단백질에 대한 ELISA 검출결과가 변화지 않을 것이다(A). 만일, 상기 물질이 플레이트로부터 GST-Vps34 단백질의 방출원인이 되거나(B) 또는 Vps34-Beclin1 반응을 저해한다면(C), Beclin1 및 ATG14L 단백질에 대한 ELISA 검출신호가 감소될 것이다. Vps34-Beclin1 반응을 억제하는(C) 물질은 자가포식 특이적 억제제가 될 수 있는데, 이는 Vps34-Beclin1 반응이 비자가포식적 PIK3C3/VPS34 복합체에서도 관찰되기 때문이다. 이에 비하여, 상기 물질이 Vps34-Beclin1 복합체에 대한 ATG14L의 결합을 억제한다면, Beclin1이 아닌 ATG14L에 대한 ELISA 검출신호가 감소될 것이다

- [0037] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 Vps34-Beclin1 복합체, ATG14L, Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 자가포식 억제제 스크리닝용 키트를 제공한다.
- [0038] 상술한 바와 같이, Vps34-Beclin1 복합체에 ATG14L을 처리하여, Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 형성한 다음, 상기 형성된 복합체에 자가포식을 특이적으로 억제할 수 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리하거나 또는 Vps34-Beclin1 복합체에 ATG14L과 상기 후보물질을 동시에 처리할 경우, 상기 후보물질이 자가포식 억제제로 판정할 수 있는지의 여부를 확인할 수 있으므로, 상기 Vps34-Beclin1 복합체가 고정된 담체, ATG14L, Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 키트는 자가포식 억제제 스크리닝을 위하여 사용될 수 있다. 이때, 상기 Vps34-Beclin1 복합체는 특별히 고정되지 않은 상태로 포함될 수도 있고, 담체에 고정된 상태로 포함될 수도 있는데, 상기 담체에 대하여는 상술한 바와 동일하다.
- [0039] 본 발명의 용어 "Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제"란, 본 발명에서 제공하는 스크리닝 방법을 수행함에 있어서, 담체에 결합된 복합체로부터 Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 수단을 의미하는데, 일례로서, Beclin1에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있으며, 상기 항체는 상기에서 정의한 바와 동일하다.
- [0040] 본 발명의 용어 "ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제"란, 본 발명에서 제공하는 스크리닝 방법을 수행함에 있어서, 담체에 결합된 복합체로부터 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 수단을 의미하는데, 일례로서, ATG14L에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있으며, 상기 항체는 상기에서 정의한 바와 동일하다.
- [0041] 한편, 본 발명에서 제공하는 키트는 상술한 구성요소(Vps34-Beclin1 복합체가 고정된 담체, ATG14L, Beclin1의 수준을 측정할 수 있는 제제 및 ATG14L의 수준을 측정할 수 있는 제제) 이외에도 상기 스크리닝 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다.
- [0042] 일례로서, 본 발명의 키트는 Vps34-Beclin1 복합체가 고정된 담체, ATG14L, Beclin1에 특이적으로 결합할 수 있는 항체, ATG14L에 특이적으로 결합할 수 있는 항체, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체 및 발색 기질을 포함하는 자가포식 억제제 스크리닝용 키트가 될 수 있다. 이때, 상기 발색효소는 특별히 이에 제한되지 않으나 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있고, 상기 형광물질은 특별히 이에 제한되지 않으나 FITC(Fluorescein isothiocyanate), RITC(Rhodamine B-isothiocyanate) 등이 될 수 있으며, 발색 기질액은 특별히 이에 제한되지 않으나 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)), OPD(o-phenylenediamine), TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) 등이 될 수 있다.
- [0043] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 (a) Vps34 또는 상기 Vps34를 포함하는 복합체에 상기 Vps34 또는 복합체와의 결합력을 측정하고자 하는 목적 단백질을 농도별로 처리하여 각각의 결합체를 수득하는 단계; 및, (b) 상기 목적 단백질의 처리 농도에 따른 결합체 농도를 측정하여, 상기 Vps34 또는 복합체에 대한 목적 단백질의 결합력을 측정하는 단계를 포함하는, Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법을 제공한다. 이때, 상기 Vps34 또는 상기 Vps34를 포함하는 복합체는 담체에 고정된 형태가 될 수 있고, 이때 사용된 담체는 상술한 바와 동일하며, 상기 (b) 단계에서, 담체에 고정된 결합체의 수준을 정확하게 측정하기 위하여, (a) 단계가 종료된 후, 상기 담체를 세척하여, 상기 담체에 고정되지 않은 목적 단백질을 제거하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 제공하는 Vps34 또는 이를 포함하는 복합체에 결합할 수 있는 목적 단백질의 결합력을 분석하는 방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 복합체는 Vps34를 포함하는 복합체(Vps34-Beclin1 복합체)가 될 수 있고; 상기 (a) 단계의 목적 단백질은 Beclin1 또는 ATG14L가 될 수 있다.

[0045]

또한, (b) 단계의 결합력 측정은, (a) 단계에서 처리된 목적 단백질의 농도와 (b) 단계에서 측정된 결합체의 농도를 이용하여 작성된 결합곡선(binding curve)을 이용하여 수행할 수 있는데, 상기 결합체의 농도를 측정하는 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일례로서, FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer), 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역 전기영동, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay) 등이 될 수 있다.

발명의 효과

[0046]

본 발명에서 제공하는 자가포식 억제제 스크리닝 방법을 이용하면, 자가포식 현상을 특이적으로 억제할 수 있는 제제를 발굴할 수 있으므로, 자가포식의 억제를 통한 다양한 질환 치료용 조성물의 개발에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0047]

도 1은 Vps34-Becn1-ATG14L 복합체를 이용하여, 자가포식 특이적인 억제제를 스크리닝하는 방법의 개요를 나타내는 개략도이다.

도 2는 Vps34-Becn1-ATG14L 복합체를 형성할 수 있는 각 단백질을 발현 및 정제하고, 이를 전기영동한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3a는 마이크로웰 플레이트와 Vps34 단백질의 결합에 있어서, GST와 GSH의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3b는 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 GST-Vps34 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다.

도 3c는 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 GST-Vps34 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 4a는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트와 Becn1 단백질의 결합에 있어서, Vps34의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-Becn1 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다.

도 4c는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 Flag-Becn1 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 5a는 Vps34-Becn1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트와 ATG14L 단백질의 결합에 있어서, Becn1의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5b는 Vps34-Becn1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-ATG14L 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다.

도 5c는 Vps34-Becn1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 Flag-ATG14L 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다.

도 6은 Vps34-Becn1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트와 ATG14L 단백질의 결합에 있어서, UVRAG의 경쟁 억제 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예 1: 자가포식 촉진용 복합체를 구성하는 단백질의 제조**

[0050] 먼저, Vps34의 N-말단에 GST 잔기가 결합된 형태의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, Beclin1의 N-말단에 Flag 잔기가 결합된 형태의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 ATG14L의 N-말단에 Flag 잔기가 결합된 형태의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 각각 제작하고, 이들을 포유동물세포 발현벡터에 도입하여 각각의 융합단백질을 발현시킬 수 있는 발현벡터를 제작하였다.

[0051] 이어, 상기 각 발현벡터를 글루코스(25 mM), 10% FBS 및 50 / 페니실린/스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지에서 배양된 HEK293 세포에 각각 도입하여 각각의 융합단백질을 발현시킬 수 있는 형질전환체를 제작하였다.

[0052] 이어, 상기 각 형질전환체를 배양한 다음, 이들 각각을 차가운 세포용해 완충액(10 mM Tris, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM NaF, 1 mM Na3VO4 및 단백질분해효소 억제제, pH7.5)에서 용해시켜서 세포파쇄물을 수득하고, 상기 세포파쇄물을 원심분리(14,000 rpm 및 10분)하여 상층액을 수득하였다. 상기 상층액을 상기 세포용해 완충액으로 평형화시킨 GSH-세파로스 비드(GST-Vps34) 또는 Flag-M2 아가로스 비드(Flag-Beclin1 또는 Flag-ATG14L)에 가하고, 회전배양기를 사용하여 4 에서 2시간 동안 반응시켰다. 상기 반응물을 원심분리(1,000 rpm 및 2분)하여 침전된 비드를 회수한 다음, 고농도의 NaCl(0.5 내지 1M)을 포함하는 세포용해 완충액으로 세척하였다. 상기 세척된 비드를 세포용해 완충액으로 최종 세척한 다음, GSH 용출완충액(20 mM GSH 및 50 mM Tris, pH8.0) 또는 3XFlag 용출완충액(200 ng/ 3XFlag 펩타이드를 포함하는 세포용해 완충액)을 사용하여 상기 비드로부터 단백질을 회수하였다. 상기 회수된 단백질을 투석액(10% glycerol 및 20 mM Tris, pH8.0)으로 4에서 하룻밤 동안 투석하여 목적하는 각각의 융합단백질을 제조하였다(도 2).

[0053] 도 2는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 형성할 수 있는 각 단백질을 발현 및 정제하고, 이를 전기영동한 결과를 나타내는 사진이다. 도 2에서 보듯이, 자가포식을 촉진할 수 있는 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체를 구성하는 각 단백질이 융합단백질(GST-Vps34, Flag-Beclin1 또는 Flag-ATG14L)의 형태로 제조됨을 확인하였다.

[0054] **실시예 2: GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트의 제작**

[0055] 상기 실시예 1에서 제조된 융합단백질 중에서 GST-Vps34가 결합될 수 있는 마이크로웰 플레이트를 제작하였다.

[0056] 구체적으로, 96웰 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 100 mM GSH (pH8.0)를 포함하는 PBS를 가하고, 4에서 하룻밤 동안 반응시키거나 또는 60에서 하룻밤동안 완전히 건조시켰다. 이어, 상기 마이크로웰 플레이트를 TBST 완충액(150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 및 10 mM Tris, pH8.0)으로 세척하여 결합되지 않은 GSH를 제거하고 5% 탈지분유를 포함하는 PBS를 처리하여 블로킹하여, 표면에서 비특이적 결합이 유발되지 않고, GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트를 제작하였다.

[0057] **실시예 3: GST-Vps34 융합단백질과 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트의 결합활성 분석**

[0058] **실시예 3-1: ELISA 분석**

[0059] 상기 실시예 1에서 제조된 GST-Vps34 융합단백질을 TBST 완충액에 용해시킨 용액을 수득하고, 상기 용액을 상기 실시예 2에서 제작된 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 분주하였으며, 천천히 흔들면서 4에서 하룻밤 동안 반응시키고, 이와 비교하기 위하여, GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트 대신에 GSH가 결합되지 않은 마이크로웰 플레이트를 사용하여 반응시키거나 또는 GST-Vps34 융합단백질 대신에 Vps34 단백질을 사용하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 상기 각 마이크로웰 플레이트의 각 웰을 0.5% NP-40를 포함하는 TBST 완충액(TBST-P5 완충액)으로 세척하고, TBST 완충액에 희석된(1:500) Vps34에 대한 일차항체를 각 웰에 50 씩 분주하였으며, 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 상기 각 웰을 TBST 완충액으로 세척하고, HRP가 결합된 2차 항체를 가한 다음 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 기질로서 TMB 용액을 사용하여 발색반응을 유도하고, 발색수준은 450 nm에서 측정함으로써, 각 마이크로웰 플레이트에 결합된 Vps34 단백질의 수준을 정량

분석하였다(도 3a).

[0060] 도 3a는 마이크로웰 플레이트와 Vps34 단백질의 결합에 있어서, GST와 GSH의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3a에서 보듯이, GST-Vps34 융합단백질을 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합시킬 경우, 가장 효과적으로 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트를 제작할 수 있음을 확인하였다.

[0061] **실시예 3-2: 결합포화곡선 분석**

[0062] GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 GST-Vps34 융합단백질의 결합포화곡선을 제작하기 위하여, 다양한 농도의 GST-Vps34 융합단백질을 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가하고, 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 발색수준을 측정한 다음, 이를 이용하여 결합포화곡선을 제작하였다(도 3b).

[0063] 도 3b는 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 GST-Vps34 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다. 도 3b에서 보듯이, GST-Vps34 융합단백질을 150 내지 200nM 수준으로 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가할 경우, 이들의 결합수준이 포화되어 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다.

[0064] **실시예 3-3: 면역블롯 분석**

[0065] 면역블롯 분석을 수행하여, GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 GST-Vps34 융합단백질의 처리농도별 결합 활성을 비교하였다. 즉, GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 다양한 농도(42.5, 85, 170 또는 340nM)의 GST-Vps34 융합단백질을 가하여 결합시키고, 상기 웰을 세척한 다음, SDS-PAGE 시료용 완충액을 가하여, 상기 각 웰에 결합된 GST-Vps34 융합단백질을 추출하였다. 상기 추출된 GST-Vps34 융합단백질을 10% SDS-PAGE에 적용하고, 항-Vps34 항체를 사용한 웨스턴블롯 분석을 수행하였다(도 3c).

[0066] 도 3c는 GSH가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 GST-Vps34 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다. 도 3c에서 보듯이, 170nM 이상의 농도로 GST-Vps34 융합단백질을 가한 경우에는 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 GST-Vps34 융합단백질의 수준이 더 이상 증가하지 않으며, 이는 상기 도 3b의 결과를 검증하는 것임을 알 수 있었다.

[0067] **실시예 4: Flag-Becn1 융합단백질과 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트의 결합활성 분석**

[0068] **실시예 4-1: ELISA 분석**

[0069] 상기 실시예 1에서 제조된 Flag-Becn1 융합단백질을 TBST 완충액에 용해시킨 용액을 수득하고, 상기 용액을 상기 실시예 3-1에서 제작된 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 분주하였으며, 실온에서 2시간 동안 반응시키고, 이와 비교하기 위하여, Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트 대신에 아무것도 결합되지 않은 마이크로웰 플레이트를 사용하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, TBST 완충액에 희석된(1:100) Becn1에 대한 일차항체를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 3-1의 방법을 수행하여, Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 Becn1 단백질의 수준을 정량분석하였다(도 4a).

[0070] 도 4a는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트와 Becn1 단백질의 결합에 있어서, Vps34의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4a에서 보듯이, Flag-Becn1 융합단백질을 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합시킬 경우, 가장 효과적으로 Vps34-Becn1이 결합된 마이크로웰 플레이트를 제작할 수 있음을 확인하였다.

[0071] **실시예 4-2: 결합포화곡선 분석**

[0072] Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-Beclin1 융합단백질의 결합포화곡선을 제작하기 위하여, 다양한 농도의 Flag-Beclin1 융합단백질을 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가하고, 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 발색수준을 측정한 다음, 이를 이용하여 결합포화곡선을 제작하였다(도 4b).

[0073] 도 4b는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-Beclin1 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다. 도 4b에서 보듯이, Flag-Beclin1 융합단백질을 1.5 M 이상의 수준으로 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가할 경우, 이들의 결합수준이 포화되어 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다.

[0074] 실시예 4-3: 면역블롯 분석

[0075] 면역블롯 분석을 수행하여, Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-Beclin1 융합단백질의 처리농도별 결합 활성을 비교하였다. 즉, Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 다양한 농도(40.18, 0.36, 0.73 또는 1.46 M)의 Flag-Beclin1 융합단백질을 가하여 결합시키고, 상기 웰을 세척한 다음, SDS-PAGE 시료용 완충액을 가하여, 상기 각 웰에 결합된 Flag-Beclin1 융합단백질을 추출하였다. 상기 추출된 Flag-Beclin1 융합단백질을 10% SDS-PAGE에 적용하고, 항-Beclin1항체를 사용한 웨스턴블롯 분석을 수행하였다(도 4c).

[0076] 도 4c는 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 Flag-Beclin1 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다. 도 4c에서 보듯이, 1.46M 이상의 농도로 Flag-Beclin1 융합단백질을 가한 경우에는 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 Vps34-Beclin1 복합체의 수준이 더 이상 증가하지 않으며, 이는 상기 도 4b의 결과를 검증하는 것임을 알 수 있었다.

[0077] 실시예 5: Flag-ATG14L 융합단백질과 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트의 결합활성 분석

[0078] 실시예 5-1: ELISA 분석

[0079] 상기 실시예 1에서 제조된 Flag-ATG14L 융합단백질을 TBST 완충액에 용해시킨 용액을 수득하고, 상기 용액을 상기 실시예 4-1에서 제작된 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 분주하였으며, 실온에서 2시간 동안 반응시키고, 이와 비교하기 위하여, Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트 대신에 Vps34가 결합된 마이크로웰 플레이트를 사용하여 반응시켰다. 반응이 종료된 후, TBST 완충액에 희석된 (1:500) ATG14L에 대한 일차항체를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 3-1의 방법을 수행하여, Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 TG14L 단백질의 수준을 정량분석하였다(도 5a).

[0080] 도 5a는 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트와 ATG14L 단백질의 결합에 있어서, Beclin1의 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 5a에서 보듯이, Flag-ATG14L 융합단백질을 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합시킬 경우, 가장 효과적으로 Vps34-Beclin1-ATG14L 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트를 제작할 수 있음을 확인하였다.

[0081] 실시예 5-2: 결합포화곡선 분석

[0082] Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-ATG14L 융합단백질의 결합포화곡선을 제작하기 위하여, 다양한 농도의 Flag-ATG14L 융합단백질을 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가하고, 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 발색수준을 측정한 다음, 이를 이용하여 결합포화곡선을 제작하였다(도 5b).

[0083] 도 5b는 Vps34-Beclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-ATG14L 융합단백질의 결합포화곡선을 나타낸다. 도 5b에서 보듯이, Flag-ATG14L 융합단백질을 12 nM 이상의 수준으로 Vps34-Beclin1복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 가할 경우, 이들의 결합수준이 포화되어 더 이상 증가하지 않음을 확인하였다.

[0084] **실시예 5-3: 면역블롯 분석**

[0085] 면역블롯 분석을 수행하여, Vps34-Becclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 대한 Flag-ATG14L 융합단백질의 처리농도별 결합활성을 비교하였다. 즉, Vps34-Becclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 다양한 농도(0.78, 1.56, 3.12, 6.25 또는 12.5 nM)의 Flag-ATG14L 융합단백질을 가하여 결합시키고, 상기 웰을 세척한 다음, SDS-PAGE 시료용 완충액을 가하여, 상기 각 웰에 결합된 Flag-ATG14L 융합단백질을 추출하였다. 상기 추출된 Flag-ATG14L 융합단백질을 10% SDS-PAGE에 적용하고, 항-ATG14L 항체를 사용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다(도 5c).

[0086] 도 5c는 Vps34-Becclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 다양한 농도의 Flag-ATG14L 융합단백질을 대상으로 웨스턴블롯 분석을 수행한 결과를 나타내는 사진이다. 도 5c에서 보듯이, 12.5 nM 이상의 농도로 Flag-ATG14L 융합단백질을 가한 경우에는 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 Vps34-Becclin1-ATG14L 복합체의 수준이 더 이상 증가하지 않으며, 이는 상기 도 5b의 결과를 검증하는 것임을 알 수 있었다.

[0087] **실시예 6: Vps34-Becclin1-ATG14L 복합체를 이용한 자가포식 특이적 억제제 스크리닝 방법의 유용성 검증**

[0088] 상기 실시예 5-1에서 제작된 Vps34-Becclin1-ATG14L 복합체에서 Becclin1과 ATG14L의 결합을 억제하는 물질은 자가포식 특이적 억제제로 간주할 수 있으므로, Becclin1에 대한 결합에 있어서 ATG14L과 경쟁할 수 있는 단백질로 알려진 UVRAG를 사용하여 상기 복합체의 유용성을 검증하고자 하였다.

[0089] 먼저, UVRAG의 N-말단에 Flag 잔기가 결합된 형태의 융합단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1의 방법을 수행하여 Flag-UVRAG 융합단백질을 제조하였다.

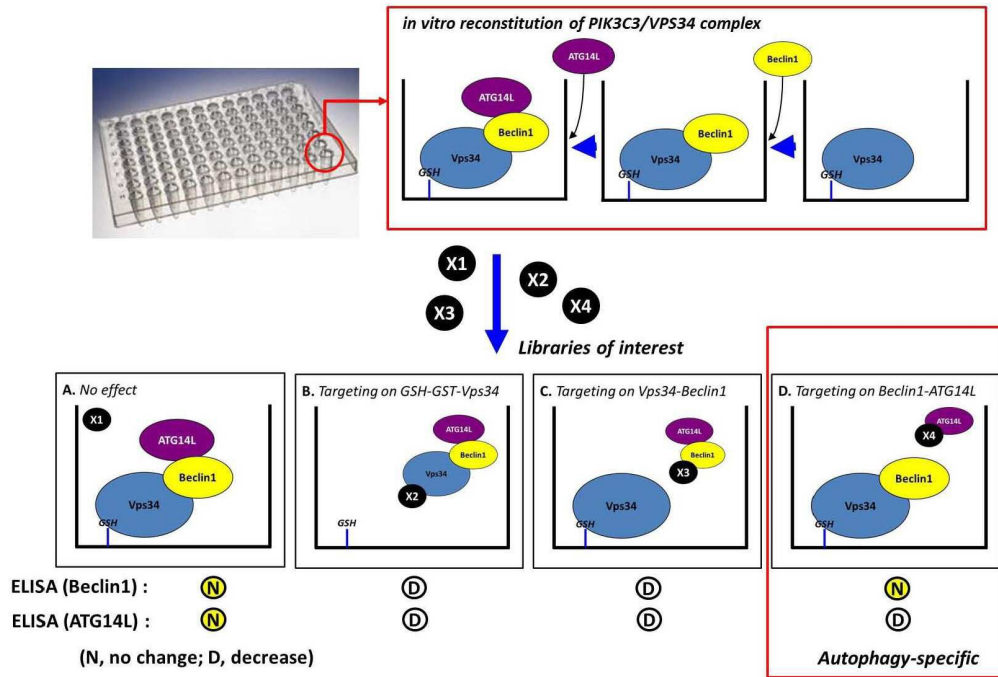
[0090] 다음으로, 상기 실시예 1에서 제조된 Flag-ATG14L 융합단백질 또는 상기 제조된 Flag-UVRAG 융합단백질을 TBST 완충액에 다양한 농도로 용해시킨 각각의 용액을 동시에 상기 실시예 4-1에서 제작된 Vps34-Becclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 분주하였으며, 실온에서 2시간 동안 반응시킨 다음, TBST 완충액에 희석된(1:500) ATG14L 또는 UVRAG에 대한 각각의 일차항체를 사용하는 것을 제외하고는 상기 실시예 3-1의 방법을 수행하여, Vps34-Becclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트에 결합된 ATG14L 단백질의 수준을 정량분석하였다(도 6).

[0091] 도 6은 Vps34-Becclin1 복합체가 결합된 마이크로웰 플레이트와 ATG14L 단백질의 결합에 있어서, UVRAG의 경쟁억제 효과를 검증한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 6에서 보듯이, UVRAG이 처리되지 않은 경우에는, 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 ATG14L 단백질이 높은 수준으로 검출되었으나, UVRAG의 처리수준이 증가할 수록 상기 마이크로웰 플레이트에 결합된 ATG14L 단백질의 수준이 감소함을 확인하였다.

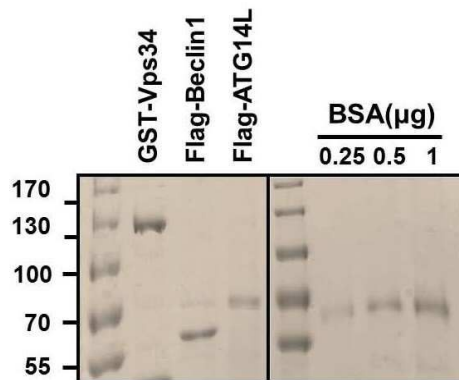
[0092] 따라서, 자가포식을 특이적으로 억제할 것으로 예상되는 Becclin1과 ATG14L의 결합을 억제하는 물질은 상기 Vps34-Becclin1-ATG14L 복합체를 통해 스크리닝 할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

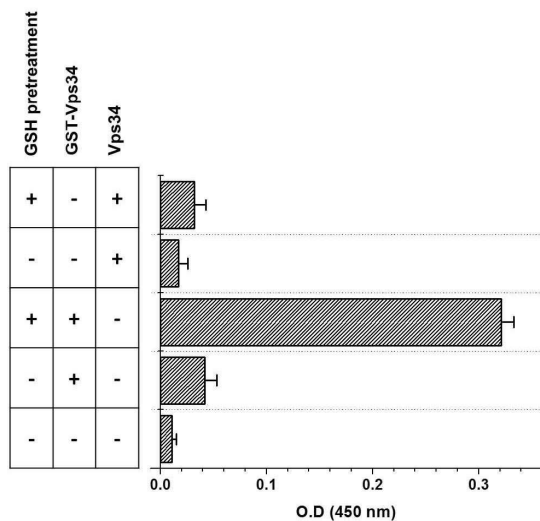
도면1



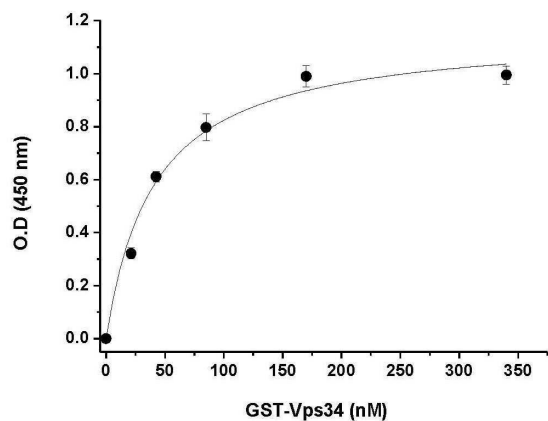
도면2



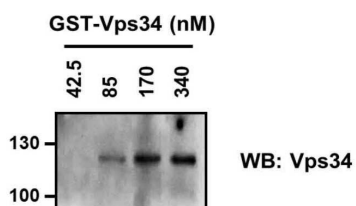
도면3a



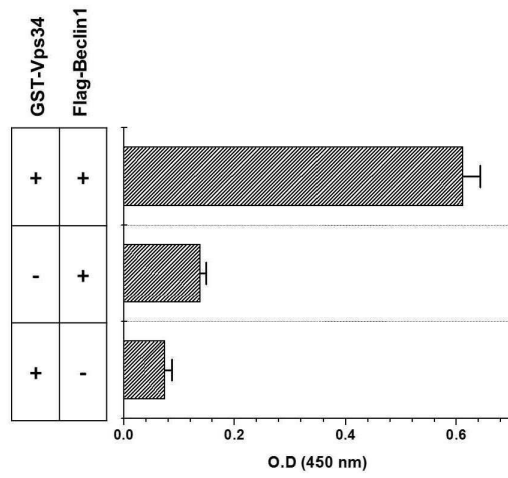
도면3b



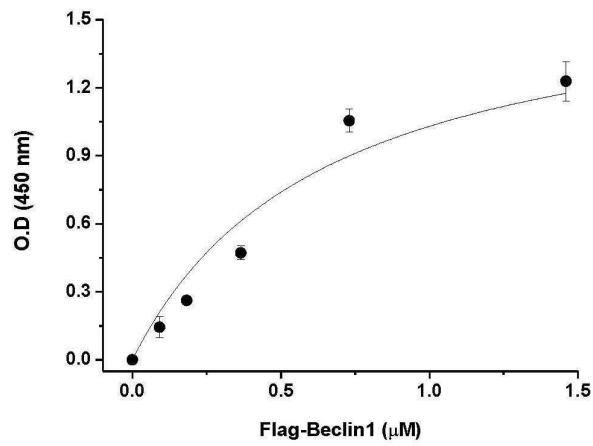
도면3c



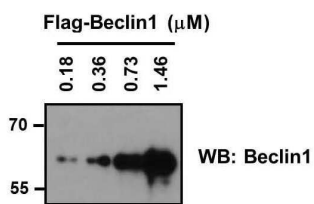
도면4a



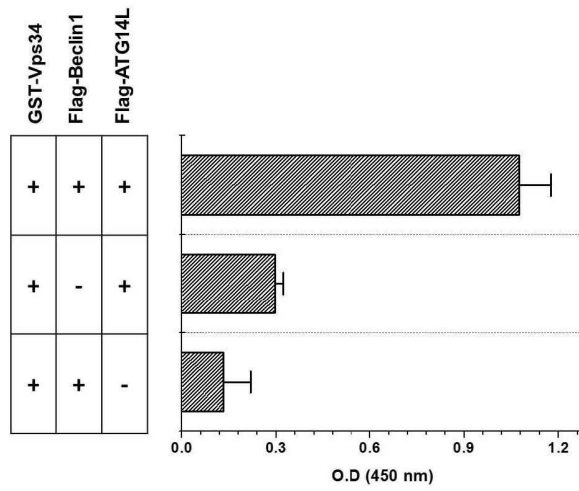
도면4b



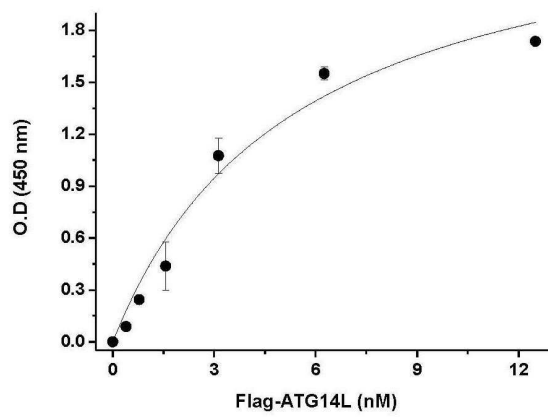
도면4c



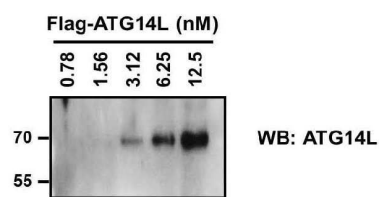
도면5a



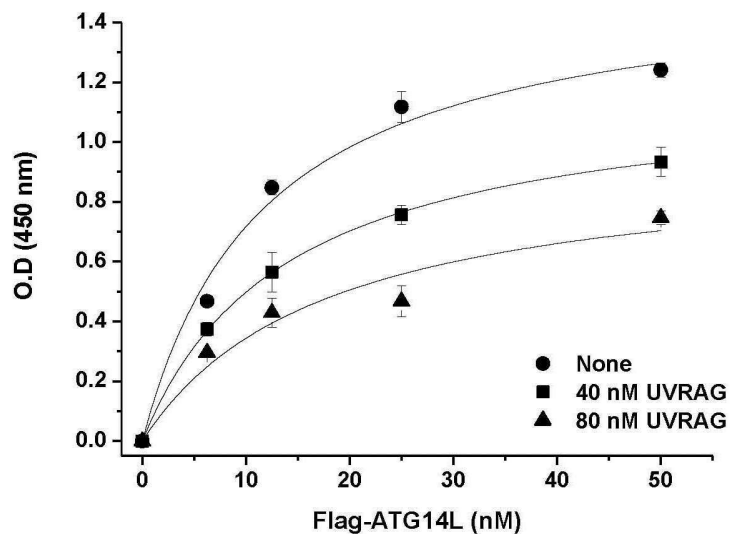
도면5b



도면5c



도면6



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Assay method for autophagy-specific inhibitor screening

<130> KPA141262-KR

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 887

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant Vps34

<400> 1

Met Gly Glu Ala Glu Lys Phe His Tyr Ile Tyr Ser Cys Asp Leu Asp

1 5 10 15

Ile Asn Val Gln Leu Lys Ile Gly Ser Leu Glu Gly Lys Arg Glu Gln

20 25 30

Lys Ser Tyr Lys Ala Val Leu Glu Asp Pro Met Leu Lys Phe Ser Gly

35 40 45

Leu Tyr Gln Glu Thr Cys Ser Asp Leu Tyr Val Thr Cys Gln Val Phe

50 55 60

Ala Glu Gly Lys Pro Leu Ala Leu Pro Val Arg Thr Ser Tyr Lys Ala

65 70 75 80

Phe Ser Thr Arg Trp Asn Trp Asn Glu Trp Leu Lys Leu Pro Val Lys
85 90 95

Tyr Pro Asp Leu Pro Arg Asn Ala Gln Val Ala Leu Thr Ile Trp Asp
100 105 110

Val Tyr Gly Pro Gly Lys Ala Val Pro Val Gly Gly Thr Thr Val Ser
115 120 125

Leu Phe Gly Lys Tyr Gly Met Phe Arg Gln Gly Met His Asp Leu Lys
130 135 140

Val Trp Pro Asn Val Glu Ala Asp Gly Ser Glu Pro Thr Lys Thr Pro
145 150 155 160

Gly Arg Thr Ser Ser Thr Leu Ser Glu Asp Gln Met Ser Arg Leu Ala

165 170 175
Lys Leu Thr Lys Ala His Arg Gln Gly His Met Val Lys Val Asp Trp
180 185 190

Leu Asp Arg Leu Thr Phe Arg Glu Ile Glu Met Ile Asn Glu Ser Glu
195 200 205

Lys Arg Ser Ser Asn Phe Met Tyr Leu Met Val Glu Phe Arg Cys Val
210 215 220

Lys Cys Asp Asp Lys Glu Tyr Gly Ile Val Tyr Tyr Glu Lys Asp Gly
225 230 235 240

Asp Glu Ser Ser Pro Ile Leu Thr Ser Phe Glu Leu Val Lys Val Pro
245 250 255

Asp Pro Gln Met Ser Met Glu Asn Leu Val Glu Ser Lys His His Lys
260 265 270

Leu Ala Arg Ser Leu Arg Ser Gly Pro Ser Asp His Asp Leu Lys Pro
275 280 285

Asn Ala Ala Thr Arg Asp Gln Leu Asn Ile Ile Val Ser Tyr Pro Pro
290 295 300

Thr Lys Gln Leu Thr Tyr Glu Glu Gln Asp Leu Val Trp Lys Phe Arg

305 310 315 320

Tyr Tyr Leu Thr Asn Gln Glu Lys Ala Leu Thr Lys Phe Leu Lys Cys

325	330	335	
Val Asn Trp Asp Leu Pro Gln Glu Ala Lys Gln Ala Leu Glu Leu Leu			
340	345	350	
Gly Lys Trp Lys Pro Met Asp Val Glu Asp Ser Leu Glu Leu Leu Ser			
355	360	365	
Ser His Tyr Thr Asn Pro Thr Val Arg Arg Tyr Ala Val Ala Arg Leu			
370	375	380	
Arg Gln Ala Asp Asp Glu Asp Leu Leu Met Tyr Leu Leu Gln Leu Val			
385	390	395	400
Gln Ala Leu Lys Tyr Glu Asn Phe Asp Asp Ile Lys Asn Gly Leu Glu			
405	410	415	
Pro Thr Lys Lys Asp Ser Gln Ser Ser Val Ser Glu Asn Val Ser Asn			
420	425	430	
Ser Gly Ile Asn Ser Ala Glu Ile Asp Ser Ser Gln Ile Ile Thr Ser			
435	440	445	
Pro Leu Pro Ser Val Ser Ser Pro Pro Pro Ala Ser Lys Thr Lys Glu			
450	455	460	
Val Pro Asp Gly Glu Asn Leu Glu Gln Asp Leu Cys Thr Phe Leu Ile			
465	470	475	480
Ser Arg Ala Cys Lys Asn Ser Thr Leu Ala Asn Tyr Leu Tyr Trp Tyr			
485	490	495	
Val Ile Val Glu Cys Glu Asp Gln Asp Thr Gln Gln Arg Asp Pro Lys			
500	505	510	
Thr His Glu Met Tyr Leu Asn Val Met Arg Arg Phe Ser Gln Ala Leu			
515	520	525	
Leu Lys Gly Asp Lys Ser Val Arg Val Met Arg Ser Leu Leu Ala Ala			
530	535	540	
Gln Gln Thr Phe Val Asp Arg Leu Val His Leu Met Lys Ala Val Gln			
545	550	555	560
Arg Glu Ser Gly Asn Arg Lys Lys Lys Asn Glu Arg Leu Gln Ala Leu			
565	570	575	
Leu Gly Asp Asn Glu Lys Met Asn Leu Ser Asp Val Glu Leu Ile Pro			

580 585 590
Leu Pro Leu Glu Pro Gln Val Lys Ile Arg Gly Ile Ile Pro Glu Thr

595 600 605
Ala Thr Leu Phe Lys Ser Ala Leu Met Pro Ala Gln Leu Phe Phe Lys

610 615 620
Thr Glu Asp Gly Gly Lys Tyr Pro Val Ile Phe Lys His Gly Asp Asp

625 630 635 640
Leu Arg Gln Asp Gln Leu Ile Leu Gln Ile Ile Ser Leu Met Asp Lys

645 650 655
Leu Leu Arg Lys Glu Asn Leu Asp Leu Lys Leu Thr Pro Tyr Lys Val
660 665 670

Leu Ala Thr Ser Thr Lys His Gly Phe Met Gln Phe Ile Gln Ser Val
675 680 685

Pro Val Ala Glu Val Leu Asp Thr Glu Gly Ser Ile Gln Asn Phe Phe
690 695 700

Arg Lys Tyr Ala Pro Ser Glu Asn Gly Pro Asn Gly Ile Ser Ala Glu
705 710 715 720

Val Met Asp Thr Tyr Val Lys Ser Cys Ala Gly Tyr Cys Val Ile Thr
725 730 735

Tyr Ile Leu Gly Val Gly Asp Arg His Leu Asp Asn Leu Leu Leu Thr

740 745 750
Lys Thr Gly Lys Leu Phe His Ile Asp Phe Gly Tyr Ile Leu Gly Arg

755 760 765
Asp Pro Lys Pro Leu Pro Pro Pro Met Lys Leu Asn Lys Glu Met Val

770 775 780
Glu Gly Met Gly Gly Thr Gln Ser Glu Gln Tyr Gln Glu Phe Arg Lys

785 790 795 800
Gln Cys Tyr Thr Ala Phe Leu His Leu Arg Arg Tyr Ser Asn Leu Ile

805 810 815

Leu Asn Leu Phe Ser Leu Met Val Asp Ala Asn Ile Pro Asp Ile Ala
820 825 830

Leu Glu Pro Asp Lys Thr Val Lys Lys Val Gln Asp Lys Phe Arg Leu
835 840 845
Asp Leu Ser Asp Glu Glu Ala Val His Tyr Met Gln Ser Leu Ile Asp
850 855 860
Glu Ser Val His Ala Leu Phe Ala Ala Val Val Glu Gln Ile His Lys
865 870 875 880
Phe Ala Gln Tyr Trp Arg Lys

885

<210> 2
<211> 450
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> recombinant Beclin1
<400> 2

Met Glu Gly Ser Lys Thr Ser Asn Asn Ser Thr Met Gln Val Ser Phe
1 5 10 15
Val Cys Gln Arg Cys Ser Gln Pro Leu Lys Leu Asp Thr Ser Phe Lys
20 25 30
Ile Leu Asp Arg Val Thr Ile Gln Glu Leu Thr Ala Pro Leu Leu Thr
35 40 45

Thr Ala Gln Ala Lys Pro Gly Glu Thr Gln Glu Glu Glu Thr Asn Ser
50 55 60
Gly Glu Glu Pro Phe Ile Glu Thr Pro Arg Gln Asp Gly Val Ser Arg
65 70 75 80
Arg Phe Ile Pro Pro Ala Arg Met Met Ser Thr Glu Ser Ala Asn Ser
85 90 95
Phe Thr Leu Ile Gly Glu Ala Ser Asp Gly Gly Thr Met Glu Asn Leu
100 105 110
Ser Arg Arg Leu Lys Val Thr Gly Asp Leu Phe Asp Ile Met Ser Gly

115 120 125
Gln Thr Asp Val Asp His Pro Leu Cys Glu Glu Cys Thr Asp Thr Leu
130 135 140

Leu Asp Gln Leu Asp Thr Gln Leu Asn Val Thr Glu Asn Glu Cys Gln
 145 150 155 160
 Asn Tyr Lys Arg Cys Leu Glu Ile Leu Glu Gln Met Asn Glu Asp Asp
 165 170 175
 Ser Glu Gln Leu Gln Met Glu Leu Lys Glu Leu Ala Leu Glu Glu Glu
 180 185 190

 Arg Leu Ile Gln Glu Leu Glu Asp Val Glu Lys Asn Arg Lys Ile Val
 195 200 205
 Ala Glu Asn Leu Glu Lys Val Gln Ala Glu Ala Glu Arg Leu Asp Gln
 210 215 220
 Glu Glu Ala Gln Tyr Gln Arg Glu Tyr Ser Glu Phe Lys Arg Gln Gln
 225 230 235 240
 Leu Glu Leu Asp Asp Glu Leu Lys Ser Val Glu Asn Gln Met Arg Tyr
 245 250 255
 Ala Gln Thr Gln Leu Asp Lys Leu Lys Lys Thr Asn Val Phe Asn Ala

 260 265 270
 Thr Phe His Ile Trp His Ser Gly Gln Phe Gly Thr Ile Asn Asn Phe
 275 280 285
 Arg Leu Gly Arg Leu Pro Ser Val Pro Val Glu Trp Asn Glu Ile Asn
 290 295 300
 Ala Ala Trp Gly Gln Thr Val Leu Leu Leu His Ala Leu Ala Asn Lys
 305 310 315 320
 Met Gly Leu Lys Phe Gln Arg Tyr Arg Leu Val Pro Tyr Gly Asn His
 325 330 335

 Ser Tyr Leu Glu Ser Leu Thr Asp Lys Ser Lys Glu Leu Pro Leu Tyr
 340 345 350
 Cys Ser Gly Gly Leu Arg Phe Phe Trp Asp Asn Lys Phe Asp His Ala
 355 360 365
 Met Val Ala Phe Leu Asp Cys Val Gln Gln Phe Lys Glu Glu Val Glu
 370 375 380
 Lys Gly Glu Thr Arg Phe Cys Leu Pro Tyr Arg Met Asp Val Glu Lys
 385 390 395 400

Gly Lys Ile Glu Asp Thr Gly Gly Ser Gly Gly Ser Tyr Ser Ile Lys

405 410 415
 Thr Gln Phe Asn Ser Glu Glu Gln Trp Thr Lys Ala Leu Lys Phe Met
 420 425 430
 Leu Thr Asn Leu Lys Trp Gly Leu Ala Trp Val Ser Ser Gln Phe Tyr
 435 440 445

Asn Lys

450

<210> 3

<211> 492

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant ATG14L

<400> 3

Met Ala Ser Pro Ser Gly Lys Gly Ala Arg Ala Leu Glu Ala Pro Gly

1 5 10 15
 Cys Gly Pro Arg Pro Leu Ala Arg Asp Leu Val Asp Ser Val Asp Asp
 20 25 30
 Ala Glu Gly Leu Tyr Val Ala Val Glu Arg Cys Pro Leu Cys Asn Thr
 35 40 45
 Thr Arg Arg Arg Leu Thr Cys Ala Lys Cys Val Gln Ser Gly Asp Phe
 50 55 60
 Val Tyr Phe Asp Gly Arg Asp Arg Glu Arg Phe Ile Asp Lys Lys Glu
 65 70 75 80

Arg Leu Ser Arg Leu Lys Ser Lys Gln Glu Glu Phe Gln Lys Glu Val
 85 90 95
 Leu Lys Ala Met Glu Gly Lys Trp Ile Thr Asp Gln Leu Arg Trp Lys
 100 105 110
 Ile Met Ser Cys Lys Met Arg Ile Glu Gln Leu Lys Gln Thr Ile Cys
 115 120 125
 Lys Gly Asn Glu Glu Met Glu Lys Asn Ser Glu Gly Leu Leu Lys Thr
 130 135 140

Lys Glu Lys Asn Gln Lys Leu Tyr Ser Arg Ala Gln Arg His Gln Glu

145 150 155 160

Lys Lys Glu Lys Ile Gln Arg His Asn Arg Lys Leu Gly Asp Leu Val

165 170 175

Glu Lys Lys Thr Ile Asp Leu Arg Ser His Tyr Glu Arg Leu Ala Asn

180 185 190

Leu Arg Arg Ser His Ile Leu Glu Leu Thr Ser Val Ile Phe Pro Ile

195 200 205

Glu Glu Val Lys Thr Gly Val Arg Asp Pro Ala Asp Val Ser Ser Glu

210 215 220

Ser Asp Ser Ala Met Thr Ser Ser Thr Val Ser Lys Leu Ala Glu Ala

225 230 235 240

Arg Arg Thr Thr Tyr Leu Ser Gly Arg Trp Val Cys Asp Asp His Asn

245 250 255

Gly Asp Thr Ser Ile Ser Ile Thr Gly Pro Trp Ile Ser Leu Pro Asn

260 265 270

Asn Gly Asp Tyr Ser Ala Tyr Tyr Ser Trp Val Glu Glu Lys Lys Thr

275 280 285

Thr Gln Gly Pro Asp Met Glu Gln Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Ile Ser

290 295 300

Ala Ala Leu Cys Tyr Ala Thr Gln Leu Val Asn Ile Leu Ser His Ile

305 310 315 320

Leu Asp Val Asn Leu Pro Lys Lys Leu Cys Asn Ser Glu Phe Cys Gly

325 330 335

Glu Asn Leu Ser Lys Gln Lys Phe Thr Arg Ala Val Lys Lys Leu Asn

340 345 350

Ala Asn Ile Leu Tyr Leu Cys Phe Ser Gln His Val Asn Leu Asp Gln

355 360 365

Leu Gln Pro Leu His Thr Leu Arg Asn Leu Met Tyr Leu Val Ser Pro

370 375 380

Ser Ser Glu His Leu Gly Arg Ser Gly Pro Phe Glu Val Arg Ala Asp

385 390 395 400
 Leu Glu Glu Ser Met Glu Phe Val Asp Pro Gly Val Ala Gly Glu Ser
 405 410 415
 Asp Glu Ser Gly Asp Glu Arg Val Ser Asp Glu Glu Thr Asp Leu Gly
 420 425 430
 Thr Asp Trp Glu Asn Leu Pro Ser Pro Arg Phe Cys Asp Ile Pro Ser

 435 440 445
 Gln Ser Val Glu Val Ser Gln Ser Gln Ser Thr Gln Ala Ser Pro Pro
 450 455 460
 Ile Ala Ser Ser Ser Ala Gly Gly Met Ile Ser Ser Ala Ala Ala Ser
 465 470 475 480
 Val Thr Ser Trp Phe Lys Ala Tyr Thr Gly His Arg
 485 490