

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0109089

(43) 공개일자

2006년10월19일

(21) 출원번호 10-2005-0031365

(22) 출원일자 2005년04월15일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자
김은기
서울특별시 강남구 대치동 316 은마아파트 8-212
정봉현
대전광역시 서구 월평동 누리아파트 113동 607호
한정선
서울 마포구 도화동 현대아파트 208-1604
신정현
인천 중구 신흥동3가 인하대학병원 피부과

(74) 대리인 이원희

심사청구 : 있음

(54) MITF 저해제 탐색용 단백질 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법

요약

본 발명은 MITF(microphthalmia-associated transcription factor) 저해제 탐색용 단백질 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법에 관한 것으로, 구체적으로는 색소 침착 관련 효소의 유전자 프로모터와 MITF 간의 결합을 억제하여 상기 효소의 발현을 억제하는 MITF 저해제 탐색용 생물학적 마이크로 단백질 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법에 관한 것이다. 본 발명의 단백질 칩 및 탐색방법은 미백관련 표적 분자를 발굴하여 화장품 신소재 및 피부질환 치료제를 개발하는데 이용될 수 있다.

대표도

도 1

색인어

MITF, 색소침착

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 에폭시(epoxy) 코팅된 유리 슬라이드에 β -CD(β -cyclodextran), MBP(maltose binding protein)-MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 융합 단백질, 이중가닥 DNA(E-box)가 차례로 결합하는 단백질 칩의 원리를 나타낸 개략도이고,

도 2의 A는 단백질 칩의 β -CD에 MBP-MITF 융합 단백질을 결합시키기 위하여 제조한 pETMBPek-MITF 발현벡터의 벡터맵이고,

도 2의 B는 상기 벡터를 PCR하여 MITF 유전자 삽입 여부를 확인하고 그 결과를 나타낸 젤(gel) 사진이고,

1. 100bp 래더(ladder) 2. 6HUb(*Nde I*/blunt) 3. MITF(blunt/*Sal I*)

4. 3과 동일 5. MITF(*EcoR I*/ *Sal I*) 6. 5와 동일

도 2의 C는 MBP-MITF 융합 단백질의 친화 컬럼 크로마토그래피(affinity column chromatography) 산물로 SDS-PAGE를 실시한 그림이고,

M, 단백질 마커

레인(lane) 1, 전체 분획(total fraction) 레인 2, 불용성(insoluble)

레인 3, 수용성(soluble) 레인 4 로딩 샘플(loading sample)

레인 5 세척 분획(washing fraction) 레인 6-7, 용리 분획(elution fraction)

레인 8, 한외여과(ultrafiltration) 후의 MBP-MITF

도 3은 친화 컬럼 크로마토그래피(affinity column chromatography)로 MBP-MITF 융합 단백질을 정제한 결과를 나타낸 크로마토그램이고,

도 4의 A는 형광 표지된 MBP-MITF 융합 단백질이 β -CD에 결합하는 반면 대조구인 BSA는 결합하지 않음을 나타낸 형광 스캐닝(scanning) 사진이고,

도 4의 B는 SPR(surface plasmon resonance) 시스템을 이용하여 β -CD와 MBP-MITF는 결합하고 β -CD와 BSA는 결합하지 않음을 확인한 결과를 나타낸 사진이고,

Ch1: BSA 처리 Ch2: MBP-MITF 처리

도 5의 A는 MBP-MITF 융합 단백질의 농도가 높을수록 MBP-MITF 융합 단백질이 β -CD에 더 많이 결합함을 나타낸 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 사진(왼쪽)과 SPRI 분석 그래프(오른쪽)이고,

도 5의 B는 β -CD에 결합된 MBP-MITF 융합 단백질의 농도가 높을수록 MBP-MITF 융합 단백질이 이중가닥 DNA(E-box)와 더 많이 결합함을 나타낸 SPRI 사진(왼쪽)과 SPRI 분석 그래프(오른쪽)이고,

도 6은 단백질 칩의 MBP-MITF 융합 단백질에 형광 표지된 이중가닥 DNA(E-box), 형광 표지된 돌연변이 이중가닥 DNA, 저해제 + 형광 표지된 이중가닥 DNA(E-box)를 첨가한 후 MBP-MITF와 이중가닥 DNA(E-box)의 결합정도를 나타낸 형광 스캐닝 사진이고,

도 7의 A는 각각 다른 농도로 MBP-MITF 융합 단백질이 결합된 단백질 칩에 형광 표지된 이중가닥 DNA(E-box)를 첨가한 후, MBP-MITF와 이중가닥 DNA(E-box)의 결합정도를 나타낸 형광 스캐닝 사진이고,

도 7의 B는 각각 다른 농도로 MBP-MITF 융합 단백질이 결합된 단백질 칩에 형광 표지된 이중가닥 DNA(E-box)와 형광 표지되지 않은 저해제를 첨가한 후, MBP-MITF와 이중가닥 DNA(E-box)의 결합정도를 나타낸 형광 스캐닝 사진이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 MITF(microphthalmia-associated transcription factor) transcription) 유도 저해제 탐색용 단백질 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 색소 침착 관련 효소의 유전자 프로모터와 MITF 간의 결합을 억제하여 상기 효소의 발현을 억제하는 MITF 저해제 탐색용 생물학적 마이크로 단백질 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법에 관한 것이다.

MITF(melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform)는 멜라닌 세포(melanocyte)에서 특이적으로 발현되는 단백질로 멜라닌(melanin) 생성에 중요한 조절인자이다. 멜라닌은 멜라닌 세포의 골지(Golgi)에서 티로시나제(tyrosinase), Tyrp1(tyrosinase related protein 1), Tyrp2(tyrosinase related protein 2), DCT(dopachrom tautomerase), DHICA(dihydroxyindole carboxylic acid) 산화효소 등과 같은 효소에 의해 산화되어 검은 색을 내는 유멜라닌(eumelanin)과 황색 또는 적색을 내는 페오멜라닌(pheomelanin)을 생성한다(T. Ellenberger et al. *Genes Dev.*, **8**, 970, 1994). 상기 효소들은 특이적으로 멜라닌 세포에서 발현되는데 MITF는 타이로시나제 등 상기 색소 형성 효소의 유전자 프로모터에 존재하는 E-box(CATGTG)에 결합하여 E-box에 N-말단 전사 활성 도메인(N-terminal transcription activation domain(TAD))(Sato S et al., *Oncogene* 14:3083-3092, 1997), C-말단 TAD(Takeda K et al. *Hum Mol Genet* 9:125-132, 2000)이 결합하는 것을 촉진함으로써(J. M. Jung et al., *Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004) 색소 침착 효소들의 발현을 유도하여 멜라닌 합성을 야기한다. 따라서 MITF와 E-box 결합은 색소형성에 관여하는 주요 효소의 발현을 조절하는데 중요한 부분이다.

또한 상기 결합의 저해제로 알려진 MITF-DN, PIAS3(protein inhibitor of activated STAT3)은 관련 효소의 발현을 저해한다고 보고된 바 있어(C. Levy et al. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1962, 1992) MITF와 E-box의 특이적 결합 저해제는 피부 색소 침착 병변 치료제 및 기능성 화장품의 미백 물질로 사용 가능할 것이라 여겨지고 있다.

지금까지 이러한 저해제의 탐색방법으로는 gel mobility-shift analysis(C. Jansen et al., *Biochem. J.* 246: 227-232, 1987; K. Ruscher et al., *J. Biotechnol.* 78: 163-170, 2000), Southwestern blotting(B. Bowen et al., *Nucleic Acids Res.* 8: 120, 1980; W.K. Miskimins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 6741-6744, 1985), ELISA(Y. Choo et al., *Nucleic Acids Res.* 21, 1993), reporter constructs in yeast assay(S.D. Hanes et al., *Science* 251: 426-430, 1991)가 수행되었으나 상기 방법들은 방사선 동위 원소의 사용, 제한된 실험 수행의 수와 시간, 복잡한 실험 방법 등의 문제점을 가지고 있었다.

이에 본 발명자들은 본 발명의 MITF(microphthalmia-associated transcription factor) 저해제 탐색용 단백질 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법은 말토오즈 결합 단백질(maltose binding protein)과 결합하는 β -CD를 칩 표면에 도입하여 MBP 표지된 단백질만을 특이적으로 결합시키도록 함으로써 기존 DNA 칩에서 특이적 결합을 위해 요구되는 바이오틴(biotin), 알데하이드(aldehyde), 아민(amine) 표지(Jane Linnell et al., *Nucleic Acids Research*, 32(4) e44, 2004)와 고순도의 단백질 분리, 정제과정을 생략할 수 있다. 또한 HTS(high throughput screening) 시스템을 적용하여 동시 다발적 실험 수행, 적은 농도 및 작은 분자량의 물질 탐색이 가능하여 미백 관련 표적 단백질인 MITF 저해제를 탐색할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 미백 관련 화장품 신소재 또는 피부 질환 치료제로 이용될 수 있는 MITF(microphthalmia-associated transcription factor) 저해제 탐색용 단백질 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해제 탐색용 단백질 칩(chip)을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 칩 및 MITF-특이적 DNA를 포함하는 저해제 탐색용 키트를 제공한다.

아울러, 본 발명은

- 1) 상기 단백질 칩에 MITF-특이적 DNA 및 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합을 저해하는 저해제 후보물질을 첨가하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 저해제 후보물질 첨가에 의한 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합저해 정도를 확인하는 단계를 포함하는, MITF 저해제 탐색방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해제 탐색용 단백질 칩(chip)을 제공한다.

MITF(melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform)는 멜라닌 세포(melanocyte)에서 발현되는 단백질인데, 색소형성 효소의 유전자 프로모터에 존재하는 E-box(CATGTG)에 결합하여 효소의 발현을 유도함으로써 멜라닌 생성에 중요한 역할을 한다. 따라서 MITF와 E-box 결합은 색소형성에 관여하는 효소의 발현을 조절하는데 중요한 부분이므로 상기 결합을 특이적으로 억제하는 결합 저해제는 색소 침착 병변 치료 및 미백 물질로 사용 가능할 것이라 여겨지고 있다.

본 발명자들은 상기와 같은 저해제 검색을 위한 탐색방법 구축을 목표로 MITF 저해제 검색용 단백질 칩을 제작하였다. 먼저, 유리 기판을 에폭시 실란화(epoxy silanization)한 후, β -CD(β -cyclodextrin) 용액 처리를 하여 기관 수식(modification)을 하였다. 여기에 β -CD에 MBP(maltose binding protein)가 결합하는 특성을 이용하여 MBP-MITF 융합 단백질을 제조한 후 MBP-MITF 융합 단백질을 기관에 고정하였다.

기관에 고정할 MBP-MITF 융합 단백질을 제작하는 구체적인 방법은 먼저 GST(glutathion S-transferase)-MITF에서 MITF, pMAL-c2X 벡터에서 MBP를 PCR로 증폭하여 과발현 벡터인 pET 벡터에 삽입함으로써 MBPek-MITF 발현벡터를 제작한 후(도 2의 A 및 B 참조) 이를 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 형질도입하고 MBP-MITF 융합 단백질을 과발현시켜(도 2의 C 참조) 크로마토그래피로 분리하였다(도 3 참조). 분리한 MBP-MITF 융합 단백질을 β -CD가 코팅된 기관에 미세정렬기(microassayer)로 점적하여 칩(chip)상에 고정시켰다. 고정 후 확인한 결과, 대조군인 BSA(bovine serum albumin)와 달리 MBP-MITF 융합 단백질만 특이적으로 기관에 결합함을 확인하였다(도 4의 A 참조)

MITF에 특이적으로 결합하는 이중가닥 DNA인 E-box는 MC1R(melanocortin Receptor 1) 프로모터 서열 중 CATGTG 부분(서열번호 5)을 이용하였으며 형광물질인 Cy3로 표지하였다.

상기 DNA를 표지하는데 이용되는 형광물질은 FITC(fluorescein isothiocyanate), TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate), YFP(yellow fluorescent protein), RFP(red fluorescent protein), DAPI(diamidine-2-phenylindole), Cy2, Cy3, Cy5 등으로부터 선택될 수 있다.

이로써, 본 발명자들은 에폭시(epoxy) 코팅된 유리 슬라이드에 β -CD, MBP-MITF 융합 단백질, 형광 표지된 이중가닥 DNA(E-box)가 차례로 결합하는 단백질 칩을 제작하였다.

또한, 본 발명은 상기 단백질 칩 및 MITF-특이적 DNA를 포함하는 저해제 탐색용 키트를 제공한다.

상기 키트에 저해제 후보물질을 처리함으로써 MITF-특이적 DNA와 단백질 칩 상에 있는 MITF 간의 결합 저해 정도를 측정할 수 있다. 따라서 본 발명의 키트를 이용하면 MITF 저해제를 쉽게 찾아낼 수 있다.

아울러, 본 발명은

- 1) 상기 단백질 칩에 MITF-특이적 DNA 및 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합을 저해하는 저해제 후보물질을 첨가하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 저해제 후보물질 첨가에 의한 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합저해 정도를 확인하는 단계를 포함하는, MITF 저해제 탐색방법을 제공한다.

본 발명자들은 본 발명의 단백질 칩에 형광으로 표지되지 않은 저해제 1 pmol을 처리하여 MITF 단백질과 Cy3 표지 이중가닥 DNA(E-box)의 결합저해를 형광법으로 확인하였다. 저해제로는 이중가닥 DNA(E-box)의 CATGTG를 CTTGAG로 변형한 이중가닥 DNA를 처리하였고 그 결과, E-box만 처리하였을 때 보다 저해제를 처리하였을 때, MITF 단백질과 이중가닥 DNA(E-box)의 결합이 약 84% 결합이 저해되는 것을 확인하였다(도 6 및 7의 B 참조)

본 발명자들은 본 발명의 단백질 칩상의 결과를 관독하기 위하여 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템을 도입하였는데, 여기에는 Cy3, Cy5 등의 형광물질로 표지하여 특정 파장에서 결합정도를 확인하는 형광법, 형광물질의 표지없이 표면의 플라즈몬 공명(plasmon resonance) 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance), SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법이 포함되었다.

형광법은 형광 스캐너 프로그램을 이용하여 단백질 칩상의 MBP-MITF에 결합된 형광 이중가닥 DNA(E-box)의 모양과 강도를 확인하는 방법으로, 이 방법을 적용하여 MBP-MITF가 농도 의존적으로 이중가닥 DNA(E-box)와 결합함을 확인하였고(도 6 및 도 7의 A 참조) 저해제 처리시에는 결합이 억제됨을 확인하였다(도 7의 B 참조).

SPR 시스템은 형광법과는 달리 시료를 Cy3로 표지할 필요가 없고 단백질과 DNA 결합을 실시간으로 분석하는 것이 가능하나 동시다발적인 시료 분석이 불가능하다는 단점이 있었다(도 4의 B 참조). SPRI의 경우에는 미세정렬 방법을 이용하여 동시다발적인 시료 분석이 가능하지만 탐지 강도가 낮은 단점이 있었다(도 5 참조). 따라서 단백질 칩에 적용하기 위한 HTS(high throughput system)로는 형광법, SPR 및 SPRI 시스템이 모두 가능하나 형광법이 가장 바람직함을 확인하였다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> MBPek-MITF 발현벡터 제작

<1-1> 시약

3-글리시독실-트리메톡시실란(3-Glycidoxyl-trimethoxysilane), 11-머캅토-1-운데카놀(11-mercapto-1-undecanol), 2-(2-아미노에톡시)-에탄올(2-(2-aminoethoxy)-ethanol), 베타-사이클로덱스트린(beta-cyclodextrin), 에피클로로하이드린(epichlorohydrin), 테트라틸렌 글리콜(tetrathylene glycol), 덱스트란(dextran)은 Sigma사에서 구입하였으며 소 혈청 알부민(bovine serum albumine)은 Qbiogene사에서 구입하였다. 미세정렬기(microarrayer)는 프로테오진(CM-100, proteogene)을 사용하였으며 스캐너는 Genfix 4.1 프로그램을 이용하여 확인하였다. SPR은 Autolab사의 제품을 이용하였으며 SPRI는 한국생명공학연구원 바이오 나노 센터에서 사용하였다.

<1-2> MBPek-MITF 발현벡터 제작

pMAL-c2X 벡터는 New England Biolabs사에서 구입하였으며 글루타치온-S-트랜스퍼라제(Glutathione-S-transferase, GST)-MITF 벡터는 헤브루 대학 하다싸 메디컬 스쿨 생화학부(department of biochemistry, hebrew university-hadassah, medical school)의 Ehud Razin 박사로부터 수득하였다. 본 실험에서는 상기 pMAL-c2X 벡터를 주형으로 서열번호 1, 2로 기재되는 프라이머를 사용하여 하기의 반응조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은, 표 1과 같이 DNA 중합효소(Unipfu, Takara 사)를 사용하여 상기에 기재된 프라이머 쌍과 주형을 94℃에서 5분 동안 변성시키고, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분 및 72℃에서 1분간 30회 반응시키고, 72℃에서 10분간 연장(extension)시켜 반응을 종결하여 MBPek(enterokinase cleavage site)를 수득하였다. MITF도 마찬가지로, 상기 GST-MITF 벡터로부터 MBP와 같은 조건으로 PCR을 실시하여 수득하였다. pET 벡터(Novagen)의 *EcoR* I, *Sa*/I 부위에 MBPek와 MITF를 삽입하여 pETMBPek-MITF 발현벡터를 제작하였다(도 2의 A 및 B).

[표 1]

● PCR composition		
조 성	V o l u m e (u l)	
Primer F-100 pM	1	
Primer R-100 pM	1	
dNTP mixture	3	
Unipfu	2	
Template	2	
10X Buffer	10	
DW	81	
Total	100 ul	

● PCR condition		
Step.	Temp.	Time (min)
Denaturation	95	1
Annealing	58	1
Extension	72	1

<실시예 2> MBP-MITF 재조합 융합 단백질 발현 및 분리

<2-1> 발현

pETMBPek-MITF 벡터는 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 형질도입하였다. 흡광도 600nm에서 O.D.가 0.6일 때 최종농도 1 mM로 IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 처리하여 단백질 발현을 유도하였다. 세포 배양액을 수거하여 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 수집하고 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0의 완충액을 이용하여 세포를 현탁하여 부유시킨 후 초음파를 이용하여 5초 간격으로 5분간 세포 파쇄를 수행하였다. 파쇄된 세포는 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.9의 완충용액을 이용하여 수용성 분획을 수집하고 SDS-PAGE로 확인하였다(도 2의 C).

<2-2> 분리

실시예<2-1>에서 수득한 수용성 분획은 MBP(maltose binding protein) 엑셀로오즈(excellose; Bioprogen)를 충전제로 하여 1.1 cm × 30 cm(Millipore) 컬럼을 이용하였으며 완충액은 20 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4로 하고 이에 10 mM 말토오즈를 포함한 것을 용출 완충액으로 이용하여 4 mL/min의 용출속도로 하여 분리하였다(도 3). 분리된 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다(도 2의 C).

<실시예 3> 이중가닥 DNA(E-box)의 제조

이중가닥 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)는 MC1R(melanocortin Receptor 1) 프로모터 서열 중 CATGTG 부분(서열번호 5)을 이용하였으며 Cy3로 표지 하였다. 저해제로는 CATGTG 부분을 변형시킨 CTTGAG(서열번호 6, Bioneer사 제작)를 사용하였다. Cy3의 표지는 Bioneer사에서 수행하였다(J. M. Jung et al., *Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004; M. L. Bulyk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 7158, 2001)

<실시예 4> 유리 및 골드 기판의 수식화(modification)

단백질 칩 제작을 위하여 유리 및 골드 기판위에 <실시예 2>에서 발현 정제한 MBP-MITF 융합 단백질을 고정화하기 위하여 기판 수식화(modification)를 하였다. 먼저 유리 기판을 에폭시 실란화(epoxy silanization) 하였다(baylor college of medicine microarray core facility-silanization protocol). 에폭시 실란화된 유리 기판은 0.1 M NaOH와 β-CD(β-

cyclodextrin) 70 mg/mL 용액 처리를 하여 40℃에서 20시간 후 1 M 2-(2-아미노에폭시)-에탄올로 37℃에서 3~4시간 처리하여 사용하였다. 골드 기관의 제조는 참고문헌의 방법을 이용하여 제조하였다(J. M. Jung et al., *Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004; H. Baek et al., *Biotechnol. Biopro. Eng.* 9(2): 143-146, 2004).

<실시예 5> 형광 방법을 이용한 미세정렬(microarray) 및 데이터 분석

<실시예 2>에서 수득한 MBP-MITF 융합 단백질과 완충액(50 mM Tris, 20%(v/v) 글리세롤 혹은 에틸렌 글리세롤 (ethylene glycerol, pH 8.0)을 혼합한 후 스틸스 핀(Stealth pin, Model SMP-10, TeleChem)이 장착된 미세정렬기 (Proteogen)를 이용하여 <실시예 4>에서 에폭시 실란과 β -CD로 코팅하여 제작한 기관에 지름 335 μ m으로 점적하였다 (S. H. Baek et al., *Biotechnol. Biopro. Eng.* 9(2): 143-146, 2004). 농도는 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 mg/mL로 5줄 5개씩 점적하였으며 마지막 6번째 줄은 BSA를 점적하였다. 이 때의 습도는 70~80%이며 상온에서 수행되었으며 약 30분 간 MBP-MITF를 결합반응시킨 후 세척 완충액(20 mM Tris-buffer, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4)과 증류수로 세척하였다. Cy3 표지 키트(Amarsham)로 Cy3로 형광표지된 MBP-MITF 단백질이 기관상에 고정되었는지 확인한 결과, MBP-MITF 이외에 BSA는 결합되지 않는 것을 확인하였다(도 4의 A).

미세정렬 후 기관 상에 결합된 MBP-MITF에 CoverWell Perfusion Chamber(Sigma)를 이용하여 <실시예 4>에서 제조한 Cy3 표지 이중가닥 DNA(E-box)와의 결합 반응을 유도하였다. 이를 위하여 상기 coverwell perfusion chamber에 6 mM HEPES, pH 7.8, 40 mM KCl, 0.5 mM EGTG, 6% 글리세롤, 0.25 mg/mL poly-dI-dC, 2% 밀크(milk)와 1 pmol의 Cy3 표지 이중가닥 DNA(E-box)를 혼합하여 처리하였다. 결합시간은 1시간으로 4℃에서 수행하였으며 결합 후 PBS와 PBST(1% Tween-20), PBS/Triton X-100을 이용하여 2번씩 수세하였다. 또한 형광으로 표지되지 않은 저해제 1 pmol를 처리하여 MBP-MITF 융합 단백질과 Cy3 표지 이중가닥 DNA(E-box)의 결합 저해를 확인하였다.

건조된 칩을 형광 스캐너 Genfix4.1 프로그램을 이용하여 점적된 MBP-MITF에 결합된 형광 이중가닥 DNA(E-box)의 모양과 강도를 확인하였다. 그 결과, MBP-MITF 농도 의존적으로 이중가닥 DNA(E-box)와 결합함을 확인하였다(도 6 및 도 7의 A).

또한 저해제를 대신하여 E-box의 CATGTG를 CTTGAG로 변형하여 결합 실험을 수행한 결과 E-box만 처리하였을 때 보다 약 84% 저해되는 것을 확인하였다(도 6 및 7의 B)

<실시예 6> 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance, SPR) 데이터 분석

SPR(Autolab Esprit, ecochemie, Netherlands) 기기에 β -CD로 표면 처리된 골드 기관(SPR이나 SPRI를 사용할 때는 유리 기관은 사용할 수 없음)을 올린 프리즘을 장치하고, 10분 동안 1M NaOH를 흘려주어 안정화시킨 후 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20)을 흘려주어 세척하였다(S. H. Baek et al., *Biotechnol. Biopro. Eng.* 9(2): 143-146, 2004). 채널 1, 2에 각각 MBP-MITF 0.3mg/ml와 BSA 10mg/ml를 1시간 동안 흘려준 후 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20)을 흘려주어 세척하였다. 1 pmol의 이중가닥 DNA(E-box)를 단백질-DNA 결합 완충용액(6 mM HEPES, pH 7.8, 40 mM KCl, 0.5 mM EGTG, 6% glycerol, 0.25 mg/mL poly-dI-dC, 2% milk)과 혼합하여 1 시간 동안 흘려준 후 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20)을 흘려주어 세척하여 확인하였다. 그 결과, 형광방법을 이용한 실험 결과와 상응하게 SPR 시스템에서도 MBP-MITF가 이중가닥 DNA(E-box)와 특이적으로 결합함을 확인하였다(도 4).

본 SPR 시스템은 형광방법과는 달리 시료를 Cy3로 표지할 필요가 없고 단백질과 DNA 결합을 실시간으로 분석이 가능하나 동시다발적인 시료 분석이 불가능하다는 단점이 있다.

<실시예 7> 표면 플라즈몬 공명 이미지(Surface plasmon resonance image, SPRI) 데이터 분석

150-W 석영 텅스텐-할로겐 램프(quartz tungsten-halogen lamp, Schott, Germany), 협대역 간섭 필터(narrow interference filter, 647.1 nm, $\Delta\lambda=1$ nm; Oriel Instruments)가 장착된 SPRI 시스템 내의 프리즘 위에 실험이 완성된 골드 기관을 놓은 후, 1/2 인치 전하 결합 소자(Charge Coupled Device, CCD) 카메라(Sony, Japan)에 의해 반사된 이미지를 확인하였다. 측정 시료 수와 저해제 탐색 방법이 제한적인 SPR의 단점을 보완하고자 SPR에서의 결합을 이미지로 얻을 수 있는 SPRI 방법을 이용하여 확인한 결과, MBP-MITF와 이중가닥 DNA(E-box)가 결합함을 확인하였다. 6 줄 5개씩 점적을 하였으며 농도를 형광 방법과 동일하게 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 mg/mL로 하여 실험하였다. 6번 줄에 BSA 10mg/ml을 처리 하여 결합여부를 확인한 결과, MBP-MITF의 결합 여부는 0.3mg/ml 이상의 농도에서만 측정이 가능하

였고 BSA는 결합하지 못하는 것을 확인하였다. 또한 DNA 크기가 단백질에 비해 매우 작아 결합 여부를 확인하기 불가능하여 DNA를 Cy3로 표지하여 탐지 강도를 높임으로써 농도 의존적인 이중가닥 DNA의 결합을 확인하였다(도 5). 이와 같이 SPRI 시스템은 미세정렬 방법을 이용하여 동시다발적인 시료 분석이 가능하지만 탐지 강도가 낮은 단점이 있었다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, MITF 저해제 탐색용 단백질 칩은 기존의 골드 기판이 아닌 유리 기판을 이용하여 경제적으로 보급할 수 있으며, 국내에서 주로 개발되는 DNA 칩이 아닌 단백질 칩으로서 EMSA(electrophoretic mobility shift assay) 분석에도 이용할 수 있다. 또한 베타 사이클로덱스트란(beta-cyclodextran)이 MBP(maltose binding protein)의 융합된 단백질과 특이적으로 결합하므로 항체 사용시와 같은 고순도 단백질 정제가 필요치 않고 유리 기판에서 동시 다발적인 실험을 수행할 수 있으며 적은 농도의 저해제 뿐 아니라 작은 분자량의 저해제 역시 형광법으로 민감하게 측정하여 스크리닝할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 발명의 MITF 저해제 탐색용 단백질 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법은 색소 침착 효소의 발현을 유도하는 MITF의 저해제를 발굴하여 미백관련 표적 분자 및 유효 신소재 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

MITF(microphthalmia-associated transcription factor)와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해제 탐색용 단백질 칩(chip).

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 칩은 베타 사이클로덱스트린(β -cyclodextrin, β -CD)으로 코팅(coating)된 기판 및 MBP(maltose binding protein)와 MITF를 융합시킨 MBP-MITF를 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

청구항 3.

제 1항의 단백질 칩 및 MITF-특이적 DNA를 포함하는 저해제 탐색용 키트.

청구항 4.

제 3항에 있어서, DNA는 형광물질로 표지된 것을 특징으로 하는 저해제 탐색용 키트.

청구항 5.

제 4항에 있어서, 형광물질은 FITC(fluorescein isothiocyanate), TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate), YFP(yellow fluorescent protein), RFP(red fluorescent protein), DAPI(diamidine-2-phenylindole), Cy2, Cy3, Cy5로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 저해제 탐색용 키트.

청구항 6.

제 3항에 있어서, MITF-특이적 DNA는 E-box(CATGTG)임을 특징으로 하는 저해제 탐색용 키트.

청구항 7.

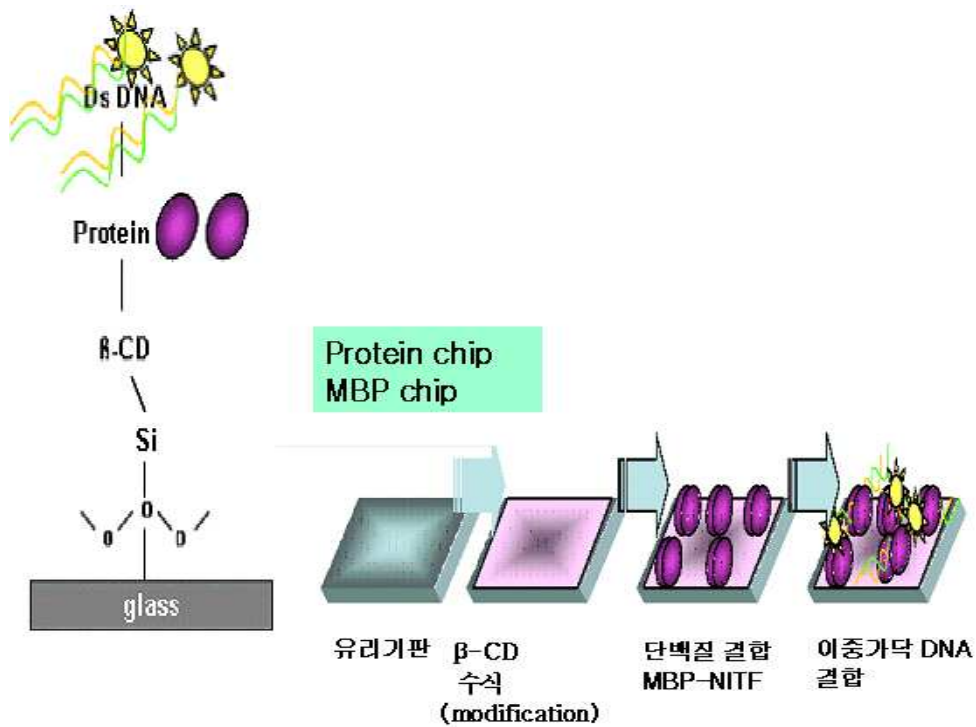
- 1) 제 1항의 단백질 칩에 MITF-특이적 DNA 및 상기 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합을 저해하는 저해제 후보물질을 첨가하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 저해제 후보물질 첨가에 의한 상기 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합저해 정도를 확인하는 단계를 포함하는, MITF 저해제 탐색방법.

청구항 8.

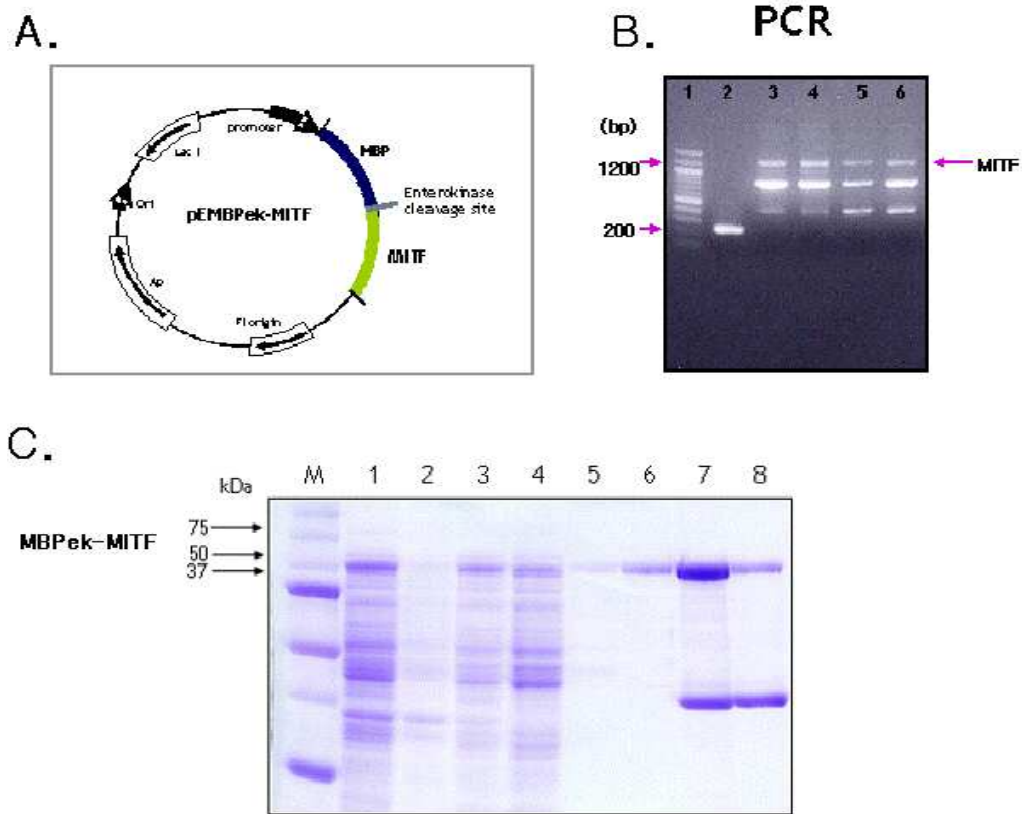
제 7항에 있어서, 단계 2)의 결합저해 정도를 확인하는 단계는 SPR(surface plasmon resonance), SPRI(surface plasmon resonance imaging), 형광 스캐닝(scanning)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 분석방법에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

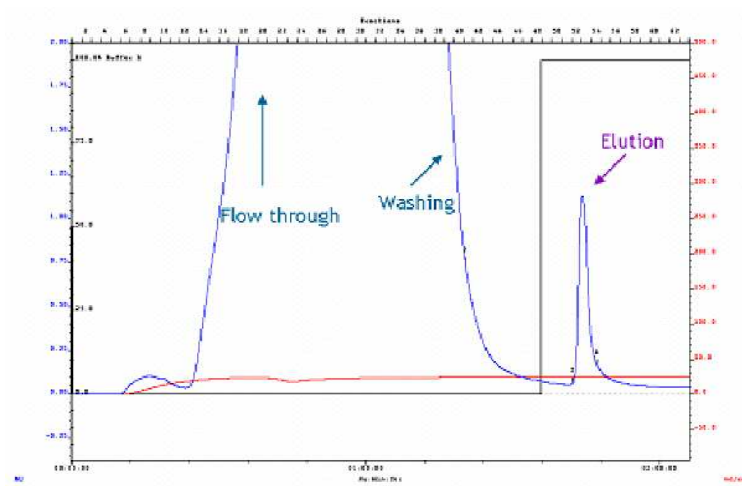
도면1



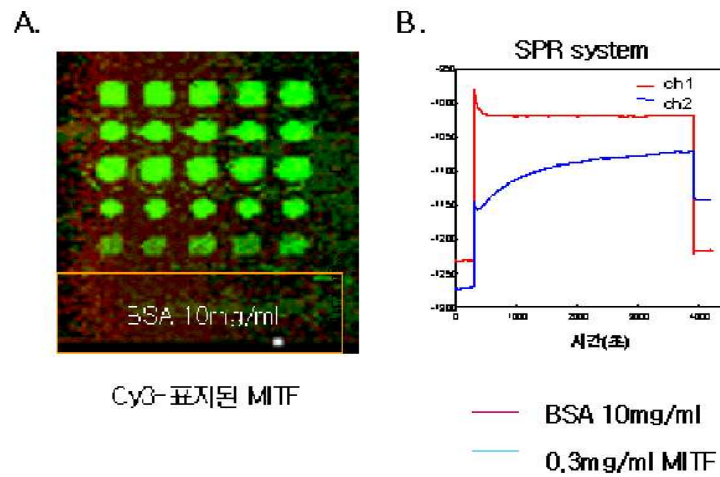
도면2



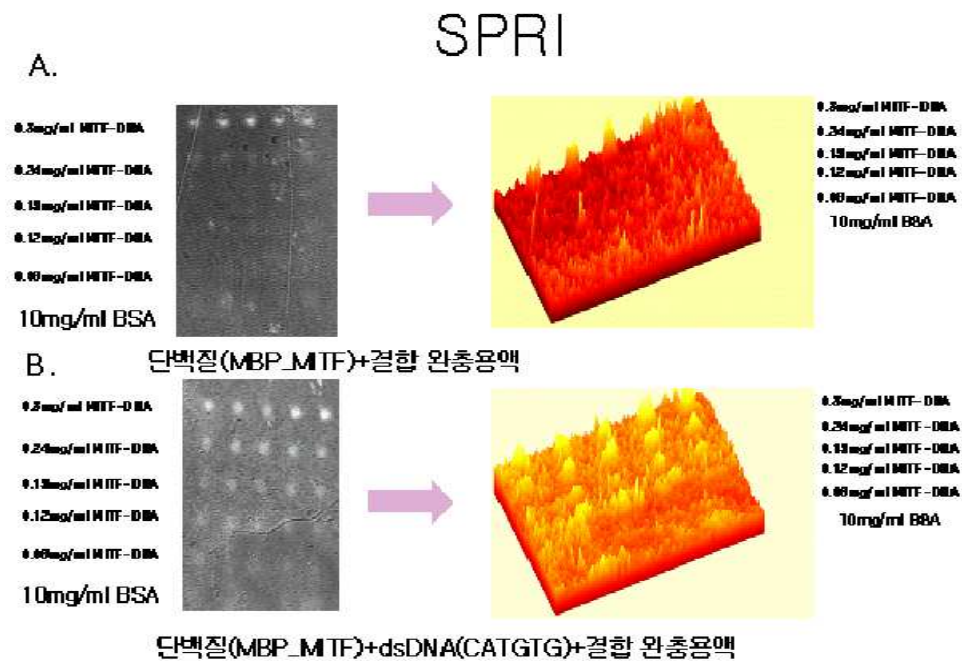
도면3



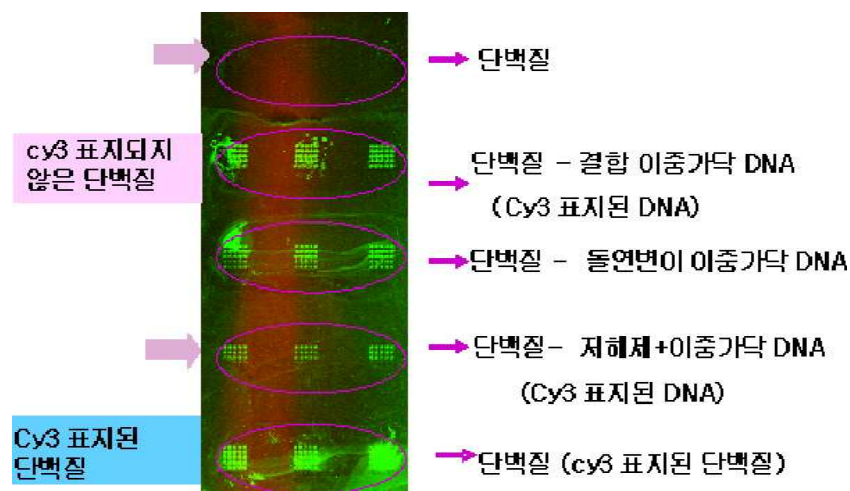
도면4



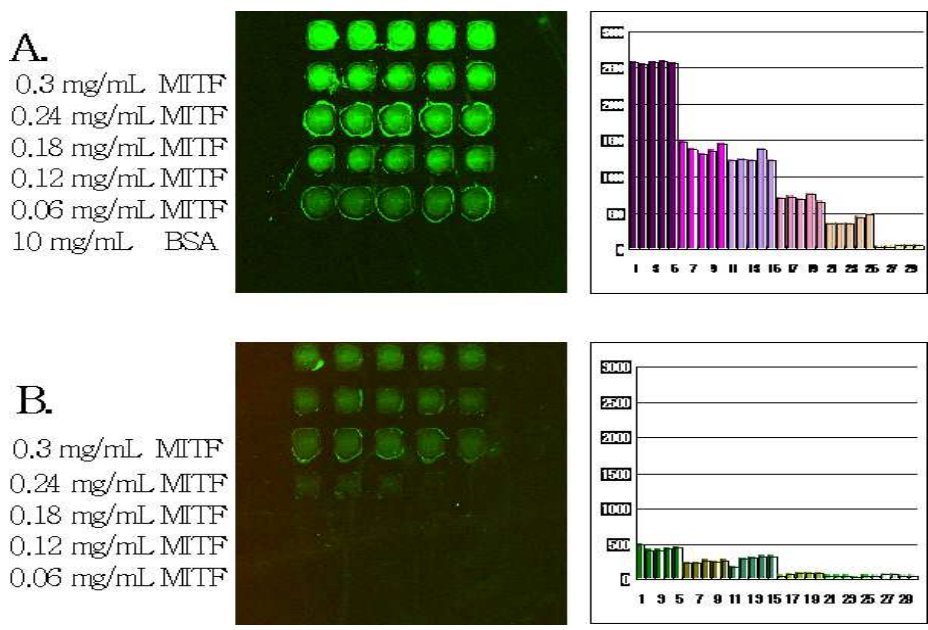
도면5



도면6



도면7



서열목록

<110>	inha univ	
<120>	The method for screening microphthalmia-associated transcription factor and the protein chip for screening competitors of it	
<160>	6	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	NMBP-nde I primer	
<400>	1	
	caaaaacata tgaaaatcga aggtaaactg gta	33
<210>	2	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	CMBP-Sma I primer	
<400>	2	
	gtgcacgaat tcagtctgcg cgtcttttcag ggctt	35
<210>	3	
<211>	34	
<212>	DNA	

<213>	MITF-EcoRI primer	
<400>	3	
	ggcgaattca tgctggaaat gctagagtac agtc	34
<210>	4	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	MITF-Sal I primer	
<400>	4	
	ggcgtcgacc taacatgcat gctccgtttc tg	32
<210>	5	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	E-box	
<400>	5	
	ctcacgcccc cgcatgtgg ccgccc	26
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	competitor	
<400>	6	
	ctcacgcccc cggttgagg cc	22