

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0167539

(43) 공개일자 2024년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6897 (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)*C12Q 1/6809* (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6897 (2018.05)*C12N 15/1037* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0065061

(22) 출원일자 2023년05월19일

심사청구일자 2023년05월19일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이효진

대전광역시 유성구 노은서로250번길 69-9(지족동)

전홍진

대전광역시 서구 복수서로 50, 105동 301호(복수동, 삼익목화아파트)

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 8 항

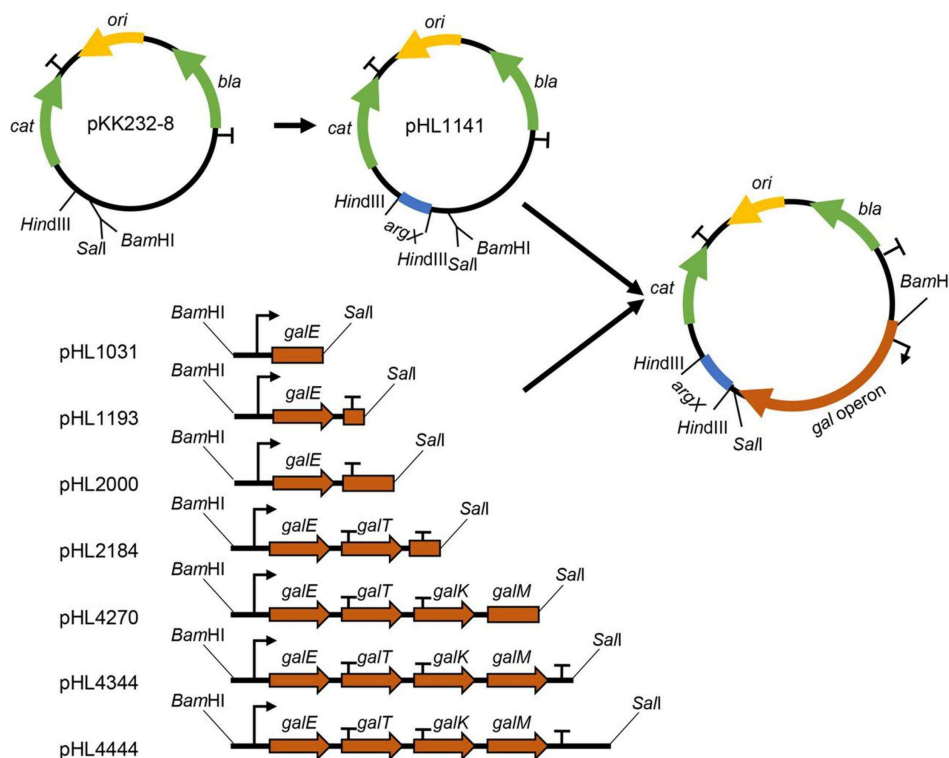
(54) 발명의 명칭 생체 내 Rho 의존적 종결 효율의 측정 방법

(57) 요약

본 발명은 생체 내에서 Rho 의존적 종결 효율을 계산하는 데 유용하게 사용될 수 있는 전사 종결 효율의 측정 방법과 이를 이용한 생체 내 Rho 의존적 종결 위치의 확인 방법을 제공하기 위한 것으로, 보다 상세하게는 n개의 전사종결 위치를 포함하는 오페론 서열에서, i번째 전사종결 위치인 전사종결_i (n은 양의 정수이고, i는 n 이하

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



인 양의 정수)에서의 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법에 있어서, (A) 실험 균주의 tRNA와 직교성을 갖는 tRNA 리포터 유전자를 준비하는 단계; (B) 상기 tRNA 리포터 유전자를 (상기 오페론의 프로모터의 업스트림~전사 종결_i의 업스트림) 서열의 유전자_{up} 또는 (상기 오페론의 프로모터의 업스트림~전사종결_i의 다운스트림) 서열의 유전자_{down}과 각각 전사적으로 융합시킨 플라스미드_{up}과 플라스미드_{down}을 제작하는 단계; (C) 상기 플라스미드_{up}과 플라스미드_{down}을 실험 균주에 각각 형질전환한 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}을 제작하는 단계; 및 (D) 상기 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}에서 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 각각 정량하는 단계;를 포함하는 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법과 이를 이용한 생체 내 Rho 의존적 종결 위치의 확인 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6809 (2018.05)

C12Q 2537/165 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711182622
과제번호	2017R1A5A2015385
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465036177
과제번호	HR20C0025040022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	연구중심병원 육성 R&D
연구과제명	암대사 리프로그래밍 · 유전자 · 면역 치료 플랫폼 구축
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교병원
연구기간	2020.07.16 ~ 2028.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711173147
과제번호	2022M3H4A1A03085355
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노소재기술개발
연구과제명	(2022M3H4A1A03076638) 중양 저산소증 표적 유전자 변형 박테리아 서플 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.04.21 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

n 개의 전사종결 위치를 포함하는 오페론 서열에서, i 번째 전사종결 위치인 전사종결 _{i} (n 은 양의 정수이고, i 는 n 이하인 양의 정수)에서의 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법에 있어서,

- (A) 실험 균주의 tRNA와 직교성을 갖는 tRNA 리포터 유전자를 준비하는 단계;
 - (B) 상기 tRNA 리포터 유전자를 (상기 오페론의 프로모터의 업스트림~전사종결 _{i} 의 업스트림) 서열의 유전자_{up} 또는 (상기 오페론의 프로모터의 업스트림~전사종결 _{i} 의 다운스트림) 서열의 유전자_{down}과 각각 전사적으로 융합시킨 플라스미드_{up}과 플라스미드_{down}을 제작하는 단계;
 - (C) 상기 플라스미드_{up}과 플라스미드_{down}을 실험 균주에 각각 형질전환한 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}을 제작하는 단계; 및
 - (D) 상기 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}에서 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 각각 정량하는 단계;
- 를 포함하는 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 전사종결 _{i} 에서의 전사 종결 효율은 다음 수식에 의해 계산되는 것을 특징으로 하는 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법.

$$\text{종결 효율}_i (\%) = 100 - \frac{\text{균주}_{\text{down}} \text{에서의 tRNA 발현량}}{\text{균주}_{\text{up}} \text{에서의 tRNA 발현량}} \times 100$$

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 전사종결 _{i} 는 Rho 의존적 전사종결 위치인 것을 특징으로 하는 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법.

청구항 4

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 tRNA의 정량은 qRT-PCR, 노던 블랏팅, β -갈락토시다아제 분석 또는 프라이머 확장 분석에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 각 재조합 균주에서 발현된 tRNA 리포터 유전자의 반감기를 추가로 분석하는 것을 특징으로 하는 생체 내

전사 종결 효율을 측정하는 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

Rho 기능이 결여된 돌연변이 균주를 이용하여 상기 (D) 단계 및 (E) 단계를 수행하여 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 추가로 측정하는 것을 특징으로 하는 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법.

청구항 7

Rho 의존적 종결 위치를 포함하는 오페론 서열에서 생체 내 Rho 의존적 종결위치를 확인하는 방법에 있어서,

(A) 실험 균주의 tRNA와 직교성을 갖는 tRNA 리포터 유전자를 준비하는 단계;

(B) 상기 오페론의 프로모터의 업스트림~상기 Rho 의존적 종결 위치의 예상 영역의 업스트림 내지 다운스트림의 임의 위치까지의 서열로 구성되는 유전자 라이브러리를 구성하는 단계;

(C) 상기 유전자 라이브러리 중의 각 유전자와 상기 tRNA 리포터 유전자가 전사적으로 융합된 플라스미드 라이브러리를 구성하는 단계;

(D) 상기 플라스미드 라이브러리 중의 각 플라스미드를 실험 균주에 형질전환한 재조합 균주의 라이브러리를 제작하는 단계; 및

(E) 상기 각 균주의 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 정량하는 단계;

를 포함하는 생체 내 Rho 의존적 종결 위치의 확인 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

Rho 기능이 결여된 돌연변이 균주를 이용하여 상기 (D) 단계 및 (E) 단계를 수행하여 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 추가로 측정하는 것을 특징으로 하는 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 내에서 Rho 의존적 종결 효율을 계산하는 데 유용하게 사용될 수 있는 전사 종결 효율의 측정 방법과 이를 이용한 생체 내 Rho 의존적 종결 위치의 확인 방법을 제공하기 위한 것이다.

배경 기술

[0002] 박테리아에서는 Rho 독립적 종결(RIT, Rho Independent Termination)과 Rho 의존적 종결(RDT, Rho Dependent Termination)로 불리는 두 가지 형태의 전사 종결 절차가 보고되어 있다. Rho 독립적 종결을 유도하는 Rho 독립적 종결자는 구아닌 및 사이토신이 풍부한 RNA 줄기 루프 구조와, U 트랙(tract)이라고 불리는 7-8 bp의 우리딘이 풍부한 다운스트림 서열의 두 가지 주요 모듈로 구성된다. U 트랙이 전사되면, 줄기-루프 형성이 가능할 만큼 충분히 오랫동안 RNA 중합효소(RNAP, RNA polymerase)를 정지시켜, 전사복합체를 방해하며, 그 결과 U 트랙에서 전사가 종결된다. Rho 독립적 종결자는 서열 특징이 잘 정의되어 있고 전사종결이 U-자 형상의 트랙에서 발생하기 때문에 생체 내에서 Rho 독립적 종결자의 위치를 결정하고, Rho 독립적 종결을 검출하는 것은 어렵지 않다.

[0003] Rho는 고리 모양의 동형육량체(homohexameric) 단백질로 RNA 의존적 ATPase 활성을 가지고 있다. Rho 단백질은 mRNA 전사체의 특정 서열에 결합하여 RNA 사슬을 따라 3'-말단으로 이동하며, 3'-말단에서 RNA 중합효소(RNAP, RNA polymerase)가 주형인 DNA 가닥에서 해리되도록 하여 전사가 종결되도록 한다. 대장균에서, 약 20~30%의

유전자가 Rho에 의해 종결되는 것으로 알려져 있다. 수십년간 많은 연구자들이 유전적, 생화학적 실험을 통해 Rho 의존적 종결에 대해 연구해 왔으나, 다음과 같은 이유로 아직까지 생체 내에서 Rho 의존적 종결을 예측 및/또는 검출하는 것에 어려움이 있다; (1) Rho 의존적 종결은 RNAP, 초기 RNA 전사체, Rho 단백질을 포함하는 다수의 구성요소를 포함하여 기작이 복잡하며, 이들 구성요소간의 상호작용은 Rho 의존적 종결 기작을 이해하는 것을 더욱 어렵게 만든다; (2) Rho는 특정 mRNA 서열에 특이적이지 않으며, 사이토신이 풍부한 Rho 활용 (*rut*) 부위를 포함하는 모든 RNA 서열과 결합할 수 있다; (3) Rho 의존적 종결자는 2차 구조가 결여된 사이토신이 풍부하고 구아닌은 부족한 Rho 결합 부위(C-풍부 영역)와 C-풍부 영역의 다운스트림에 있는 종결 영역의 두 가지 주요 모듈로 구성된다. mRNA의 3'-말단은 2차 구조 결여로 인해 구조적으로 불안정하며, Rho 의존적 종결 후 3'~5' 엑소뉴클레아제(exonuclease)에 의해 빠르게 분해된다.

[0004] 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR, quantitative real-time PCR)은 시료 중 유전자 발현의 지표로 사용될 수 있는 mRNA의 양을 결정하는 데 사용되는 기술로, 유전자 발현 프로파일링, 유전자 발현 어레이의 검증, 질병의 진단, 신약 개발, 법의학 분석 등 다양한 분야에서 활용되고 있다. Chhakchhuak과 Sen은 qRT-PCR을 이용하여 Rho 의존적 종결 위치를 확인하였다. 이를 위하여 다수의 프라이머 프로브를 설계하고, Rho-기능 결핍 균주에서 유전자의 발현을 야생형 균주와 비교하였을 때 유전자의 발현이 상향조절되었다면 해당 프로브 위치의 업스트림에 Rho 의존적 종결 위치가 있음을 시사하였다. Guenin S 등과 Minshall N 등은 qRT-PCR에서 역전사 및 PCR 증폭의 편향에 의해 두 개의 다른 전사체의 양을 직접적으로 비교할 수 없음을 보고한 바 있다. 따라서 상기 방법으로는 야생형 균주와 Rho-기능 결핍 균주 간 상대적인 유전자 발현의 차이를 확인할 수 있을 뿐, Rho 종결 위치의 업스트림과 다운스트림에서의 상대적인 전사의 양의 차이를 직접적으로 비교할 수 없다. Rho 의존적 종결 위치의 업스트림과 다운스트림에서의 전사 양을 비교할 수 있다면 전사 종료율 보다 직접적으로 확인할 수 있으며, 전사 종료 효율의 계산에 이용할 수 있어 유전자의 발현 조절에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Chhakchhuak PIR, Sen R. 2022. In vivo regulation of bacterial Rho-dependent transcription termination by the nascent RNA. J Biol Chem 298:102001.
- (비특허문헌 0002) Guenin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. 2009. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. J Exp Bot 60:487-493.
- (비특허문헌 0003) Minshall N, Git A. 2020. Enzyme- and gene-specific biases in reverse transcription of RNA raise concerns for evaluating gene expression. Sci Rep 10:8151.
- (비특허문헌 0004) Nadiras 등, 2018, A multivariate prediction model for Rho dependent termination of transcription. Nucleic Acids Res 46:8245-8260.
- (비특허문헌 0005) Di Salvo 등, 2019. RhoTermPredict: an algorithm for predicting Rho dependent transcription terminators based on Escherichia coli, Bacillus subtilis and Salmonella enterica databases. BMC Bioinformatics 20:117.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 종래 기술의 문제를 해결하여, 생체 내에서 Rho 의존적 종결에 의한 전사 효율을 직접적, 정량적으로 측정할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한 본 발명은 상기 방법을 응용하여 생체 내에서 Rho 의존적 종결위치를 확인하는 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0008] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 상기에 언급되어 있지 않더라도, 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[0009] 또한, 발명을 설명함에 있어서 발명과 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에 그 상세한 설명을 생략하기로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 진술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 실험 균주의 tRNA와 직교성을 갖는(orthogonal) tRNA 리포터 유전자를 이용하여 전사 종결 효율을 측정하는 것을 특징으로 한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 n개의 전사종결 위치를 포함하는 오페론 서열에서, i번째 전사종결 위치인 전사종결_i (n은 양의 정수이고, i는 n 이하인 양의 정수)에서의 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법에 있어서, (A) 실험 균주의 tRNA와 직교성을 갖는 tRNA 리포터 유전자를 준비하는 단계; (B) 상기 tRNA 리포터 유전자를 (상기 오페론의 프로모터의 업스트림~전사종결_i의 업스트림) 서열의 유전자_{up} 또는 (상기 오페론의 프로모터의 업스트림~전사종결_i의 다운스트림) 서열의 유전자_{down}과 각각 전사적으로 융합시킨 플라스미드_{up}과 플라스미드_{down}을 제작하는 단계; (C) 상기 플라스미드_{up}과 플라스미드_{down}을 실험 균주에 각각 형질전환한 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}을 제작하는 단계; 및 (D) 상기 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}에서 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 각각 정량하는 단계;를 포함하는 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명은 n개의 전사종결 위치를 포함하는 오페론 서열에서, i번째 전사종결 위치인 전사종결_i (n은 양의 정수이고, i는 n 이하인 양의 정수)에서의 생체 내 전사 종결 효율을 측정하는 방법에 관한 것이다. 오페론은 공통된 프로모터에 의해 전사되는 일련의 구조유전자로 구성된다. 본 발명은 전사종결_i를 포함하는 오페론 유전자 또는 전사종결_i를 포함하지 않는 오페론 유전자와 전사적으로 융합된 tRNA 리포터 유전자의 생체 내 발현을 측정하는 것에 전사 종결 효율을 측정하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 이하에서는 각 단계에 대해 보다 자세히 설명한다.

[0013] 상기 (A) 단계는 tRNA 리포터 유전자를 준비하는 단계이다.

[0014] 실험 균주 내에 인위적으로 도입된 tRNA 리포터 유전자에 의한 tRNA 리포터 유전자의 전사를 정확하게 측정하기 위해서는 실험 균주의 내인성 요인이 tRNA 리포터 유전자의 전사에 영향을 미치지 않아야 한다. 따라서 본 단계에서는 실험 균주의 tRNA와 직교성을 갖는(orthogonal) tRNA 리포터 유전자를 준비한다. 이로 인하여 균주 자체에서 해당 tRNA 리포터 유전자가 발현되지 않고, 발현된 tRNA 리포터 유전자가 실험 균주의 고유 분자와 반응하지 않기 때문에 이후 단계에서 도입된 플라스미드에 의해 전사된 tRNA 리포터 유전자의 수를 직접적으로 측정할 수 있다.

[0015] (B) 단계는 전사효율을 측정하고자 하는 전사종결_i를 포함하거나 포함하지 않는 오페론 유래 유전자와 상기 tRNA 리포터 유전자를 전사적으로 융합한 플라스미드를 제작하는 단계이다. 전사적 융합에 의해 tRNA 리포터 유전자의 전사는 상기 오페론 유래 유전자에 의해 조절된다. 이를 위하여 오페론 유래 유전자는 적어도 프로모터 영역을 포함하여야 한다. 선택적으로 프로모터의 업스트림에 있는 오페론의 조절유전자 영역까지를 포함할 수 있다. 따라서 상기 오페론 유래 유전자는 프로모터의 업스트림으로부터 시작하며, 오페론 유래 유전자 내 전사종결_i의 업스트림 또는 다운스트림까지의 서열을 포함한다. 유전자_{up}과 유전자_{down}에서 시작 위치인 오페론의 프로모터의 업스트림 위치는 동일한 것이 바람직하다. 상기 전사종결_i는 실시예와 같이 정확한 위치일 수도 있고, 혹은 종결위치가 있는 것으로 알려진 영역일 수도 있다. 이에, 상기 오페론 유전자 각각을 유전자_{up} 및 유전자_{down}으로 칭하며, 상기 각 유전자와 tRNA 리포터 유전자가 전사적으로 융합된 플라스미드를 플라스미드_{up} 및 플라스미드_{down}으로 칭한다.

[0016] 상기 플라스미드에서 tRNA 리포터 유전자의 전사는 상기 오페론 유전자에 포함된 프로모터에 의해 제어된다.

[0017] (C) 단계는 상기 (B) 단계에서 제작된 플라스미드_{up} 또는 플라스미드_{down}을 실험 균주에 형질전환하여 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}을 제작하는 단계이다. 플라스미드의 도입에 의해 재조합균주에서는 오페론의 구조유전자를 발현할 수 있다.

[0018] (D) 단계는 상기 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}에서 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 각각 정량하는 단계이

다.

[0019] 재조합균주_{up}은 전사종결_i를 포함하고 있지 않기 때문에 발현이 개시되면 전사종결_i에서 전사가 종결되지 않고 tRNA 리포터 유전자까지 이어진다. 반면, 재조합균주_{down}은 전사종결_i를 포함하므로 오페론 유전자의 발현이 개시되면 전사종결_i에서 일부는 전사가 종결되어 tRNA 리포터 유전자가 발현되지 않고, 일부는 전사가 계속되어 tRNA 리포터 유전자가 발현된다. 따라서 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}에서 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 각각 정량하여 비교하는 것에 의해 전사종결_i에서의 전사 종결 효율을 확인할 수 있다. 전사종결_i에서의 전사 종결 효율을 나타내는 종결 효율_i는 정성적으로 분석할 수도 있으나, 다음 수식에 의해 정량적으로 계산할 수 있다.

$$\text{종결 효율}_i (\%) = 100 - \frac{\text{균주}_{\text{down}} \text{에서의 tRNA 발현량}}{\text{균주}_{\text{up}} \text{에서의 tRNA 발현량}} \times 100$$

[0020]

[0021] 상기 tRNA의 정량은 qRT-PCR, 노던 블랏팅, β-갈락토시다아제 분석 또는 프라이머 확장 분석에 의해 이루어질 수 있다. 이 중에서도 qRT-PCR은 tRNA 리포터 유전자 발현 수준의 작은 변화를 감지할 수 있으며 빠르게 분석이 가능하고, 외인성 기질을 필요로 하지 않기 때문에 더욱 유리하다.

[0022] 특히 본 발명의 방법은 Rho 의존적 종결에 의해 전사가 종결되는 전사종결_i에서의 종결 효율 측정에 유용하게 사용될 수 있다. Rho 의존적 종결의 경우, 전사체가 빠르게 분해되기 때문에 전사체 분석에 의한 종결 효율의 측정이 불가능하여, 종래에는 단백질의 발현 강도를 측정하는 것에 의해 전사 종결 효율을 간접적으로 측정하였다. 그러나 번역 속도의 차이로 인하여, 전사량과 번역량과는 반드시 선형적인 관계를 나타내지는 않는다. 본 발명의 방법에 의하면, 전사된 전사체의 수를 나타내는 tRNA 리포터 유전자의 양에 의해 전사 효율을 직접적으로 측정하기 때문에 번역에 내재된 편향을 제외할 수 있다.

[0023] 상기 (D) 단계에서 측정된 tRNA 리포터 유전자의 발현량은 해당 유전자의 합성 속도와 분해 속도에 의존한다. 따라서 상기 측정된 전사 효율이 합성 속도, 즉 전사량을 반영한 것인지 검정하기 위하여, 상기 각 재조합 균주에서 발현된 tRNA 리포터 유전자의 반감기를 추가로 분석할 수 있다. 재조합균주_{up}과 재조합균주_{down}에서 측정된 반감기가 오차범위 내에서 동일하다면, 상기 균주 간 tRNA 리포터 유전자의 발현량의 차이는 전사량의 차이에 전적으로 의존하며 따라서 측정된 전사 효율을 검정할 수 있다.

[0024] 또한, 추가로 상기 실험 균주에 대해 Rho 기능이 결여된 돌연변이 균주에 대해 상기 (D) 단계 및 (E) 단계를 수행하여 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 추가로 측정할 수 있다. 상기 측정에 의하면, 전사종결_i에서 전사 종결이 Rho에 의존적인 지 여부를 확인하고 측정된 종결 효율 값을 검정할 수 있다. Rho 독립적 종결에 의해 전사가 종결되는 경우, Rho 기능을 갖는 균주에서의 종결 효율_i와 Rho 기능이 결여된 돌연변이 균주에서의 종결 효율_i는 유사한 값을 나타낼 것이다. 반면 Rho 의존적 종결에 의해 전사가 종결된다면, 돌연변이 균주에서는 Rho가 기능을 하지 못하기 때문에 전사 종결을 유도할 수 없으므로 측정된 전사 종결 효율은 0과 오차범위 내에 있을 것이다.

[0025] 본 발명의 실시예에서는 *E. coli*를 실험 균주로 사용하고, tRNA 리포터 유전자로 *E. coli*의 tRNA와 직교성을 갖는 tRNA^{arg}를 사용하여 3개의 Rho 의존적 위치와 하나의 Rho 독립적 위치가 알려져 있는 *gal* 오페론의 각 종결 위치에 대해 종결 효율을 계산하여 본 발명의 유용성을 확인하였다. 그러나, 이는 구체적인 예로서 본 발명의 방법이 유효하게 적용될 수 있음을 확인하기 위한 것이므로, 본 발명의 실시예의 기재를 참작하여 당업자라면 임의의 오페론과 실험균주 및 tRNA 리포터 유전자를 확장하여 실험을 디자인하고 이를 통하여 전사 종결 효율을 측정하는 것은 용이할 것이다.

[0026] 본 발명의 다른 응용은, Rho 의존적 종결 위치를 포함하는 오페론 서열에서 생체 내 Rho 의존적 종결위치를 확인하는 방법에 관한 것이다. Nadira 등과 Di Salvo 등은 Rho 의존적 종결 위치를 예측하는 모델을 구축하였으나, Chhakchhuak 등은 실험을 통해 모델의 정확도를 개선할 필요가 있음을 확인하였다. 따라서 Rho 의존적 종결 위치를 확인할 수 있는 실험적 방법이 요구되고 있다. 그러나 Rho 의존적 종결위치를 생체 내에서 확인하는 데에는 아직까지 여러 문제가 산재해 있다.

[0027] 이에 상기 전사 종결 효율 측정 방법을 일부 변형하여 생체 내에서 Rho 의존적 종결위치를 확인할 수 있다. 상

기 방법은 상세하게는 (A) 실험 균주의 tRNA와 직교성을 갖는 tRNA 리포터 유전자를 준비하는 단계; (B) 상기 오페론의 프로모터~상기 Rho 의존적 종결 위치의 예상 영역의 업스트림 내지 다운스트림의 임의 위치까지의 서열로 구성되는 유전자 라이브러리를 구성하는 단계; (C) 상기 유전자 라이브러리 중의 각 유전자와 상기 tRNA 리포터 유전자가 전사적으로 융합된 플라스미드 라이브러리를 구성하는 단계; (D) 상기 플라스미드 라이브러리 중의 각 플라스미드를 실험 균주에 형질전환한 재조합 균주의 라이브러리를 제작하는 단계; 및 (E) 상기 각 균주의 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 정량하는 단계;를 포함한다.

[0028] 본 발명의 양태를 설명함에 있어, 각 단계의 상세한 설명은 전사 효율 측정 방법에 설명된 내용이 적용된다. 단, 전사 종결 효율 측정 방법에서는 특정 위치 또는 영역으로 전사종결_i를 알고 있는 것에 반해 본 방법에서는 전사종결_i의 예상 영역만을 알고 있을 뿐 정확한 위치를 모르는 것을 전제로 한다. 따라서 tRNA 리포터 유전자를 전사적으로 융합시킬 유전자 라이브러리를 구성하며, 이때 라이브러리를 구성하는 유전자는 각각 상기 오페론의 프로모터의 업스트림~상기 Rho 의존적 종결 위치의 예상 영역의 업스트림 내지 다운스트림의 임의 위치까지의 서열로 구성된다. tRNA 리포터 유전자를 상기 유전자 라이브러리를 구성하는 각 유전자와 전사적으로 융합시킨 후 이를 실험 균주에 형질전환하여 재조합 균주의 라이브러리를 제작하고, 각 균주에서 tRNA 리포터 유전자의 발현을 정량한다. 그 결과 (상기 오페론의 프로모터의 업스트림~상기 Rho 의존적 종결 위치의 예상 영역의 업스트림)까지의 유전자를 이용한 재조합 균주와 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현이 동일하다면, 해당 재조합 균주의 형질전환에 이용된 유전자는 전사종결_i를 포함하지 않는 것임을 확인할 수 있다. 반면 tRNA 리포터 유전자의 발현이 감소하였다면, 해당 재조합 균주의 형질전환에 이용된 유전자는 전사종결_i를 포함한다. 따라서 Rho 의존적 종결 위치를 tRNA 리포터 유전자의 발현량에 의해 확인할 수 있다.

[0029] 전사 종결 효율 확인 방법에서와 마찬가지로 Rho 기능이 결여된 돌연변이 균주를 이용하여 상기 (D) 단계 및 (E) 단계를 수행하여 생체 내 tRNA 리포터 유전자의 발현을 추가로 측정하는 것에 의해 해당 전사종결_i가 Rho 의존적 종결에 의한 것임을 확인할 수 있다.

발명의 효과

[0030] 이상과 같이 본 발명에 의하면 종래 기술의 문제를 해결하여, 생체 내에서 Rho 의존적 종결에 의한 전사체의 전사 효율을 직접적, 정량적으로 측정할 수 있어 유전자의 발현 조절에 유용하게 이용될 수 있다.

[0031] 또한 본 발명에 의하면 전사체가 불안정하여 정확한 종결위치의 확인이 어려웠던 종래 기술의 문제를 해소하여, 생체 내에서 Rho 의존적 종결위치를 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 방법에 의해 제조된 플라스미드의 구조를 보여주는 플라스미드의 개열지도이다.

도 2는 *galE-galT* 시스템 접합부에서 Rho 의존적 종결의 효율을 보여주는 그래프이다.

도 3은 *galT-galK* 시스템 접합부에서 Rho 의존적 종결의 효율을 보여주는 그래프이다.

도 4는 *gal* 오페론 말단에서 RIT 및 RDT의 효율을 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0034] [실시예]

[0035] I. 재료 및 방법

[0036] 1) 균주의 배양

[0037] 하기 실시예에서는 *E. coli* MG1655, HME60(*rho-15*) 및 MG1655 Δ *spf* 균주를 사용하였다. *E. coli* MG1655의 염색체 결실 균주는 Datsenko KA와 Wanner BL의 방법에 따라 파지 램다 레드-매개 재조합을 사용하여 생성하였다 (Proc Natl Acad Sci U S A 2000 97:6640-6645). 플라스미드 구성에는 DH5 α 균주를 사용하였으며, 본 발명에

사용한 프라이머는 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

프라이머	프라이머 서열(5'→3')	서열번호	용도
<i>rrsB</i> -F	CAGAATGCCACGGTGAATACGTT	서열번호 1	qRT-PCR
<i>rrsB</i> -R	CAACCCAACTCCCATGGTGTGA	서열번호 2	
tRNA ^{arg} -F	GCTCAGTTGGATAGAGTACA	서열번호 3	tRNA ^{arg} 검출을 위한 qRT-PCR
tRNA ^{arg} -R	TGGTGCGCCCGGCGGGGA	서열번호 4	
<i>gal</i> +70-F	CTATAGGGCGGATCCAATTCTTGTGTA	서열번호 5	qRT-PCR을 위한 tRNA ^{arg} 플라스미드 의 구축
<i>gal</i> +1031-R	ACGCGTCGACTCCCTGTGGATGGCGTGACT	서열번호 6	
<i>gal</i> +1193-R	GCAATCTGGATCGTGCAGGTAAC	서열번호 7	
<i>gal</i> +2000-R	GTCTCTGCCAGGTCGACATAACCAACCA	서열번호 8	
<i>gal</i> +2184-R	CCAATCAAATTGTCGACGCCAGGCGCCT	서열번호 9	
<i>gal</i> +4270-R	ACATTACTCAGGTCGACACTGATATTCC	서열번호 10	
<i>gal</i> +4344-R	TGAGTTGCAAAGTCGACGGTGTGTTGCTG	서열번호 11	
<i>gal</i> +4444-R	TGATAATAATTGTCGACATATTGCCGCG	서열번호 12	

[0038]

[0039]

모든 세포는 0.5%(w/v) 갈락토스와 클로람페니콜(15 μ g/ml) 또는 암피실린 (100 μ g/ml)을 첨가한 Lysogeny Broth 내, 37°C에서 600 nm에서의 광학밀도(OD₆₀₀)가 0.6인 지수 성장 단계에 도달할 때까지 배양하였다. 이후 RNA 분리를 수행하였다.

[0040]

2) 플라스미드의 설계 및 구축

[0041]

*B. albidum*으로부터 tRNA^{arg}에 해당하는 araX 서열을 표 1에 기재된 tRNA^{arg}-F 및 tRNA^{arg}-R 프라이머 쌍을 사용하여 PCR로 증폭하였다. 증폭된 PCR 단편을 Hind III로 절단하고, pBR322 유래의 중간 카피 수 플라스미드인 pKK232-8(GE Healthcare, USA)의 프로모터가 없는 클로람페니콜 내성 유전자(*cat*)의 업스트림에 삽입하여 pHL1141 플라스미드를 제작하였다. Rho 의존적 종결을 분석하기 위하여, *gal* 오페론 DNA 서열을 pHL1141에서 *argX*의 업스트림에 위치한 *Bam*HI 및 *Sal*I 제한효소 위치 사이에 클로닝하였다.

[0042]

구체적으로 플라스미드 pHL1031, pHL1193, pHL2000, pHL2184, pHL4270, pHL4344 및 pHL4444를 생성하기 위하여 *gal*+70-F(서열번호 5) 및 서열번호 6~12의 프라이머 쌍을 각각 사용하여 PCR 증폭을 통해 *gal* 좌표 -73~1,031, -73~1,193, -73~2,000, -73~2,184, -73~4,270, -73~4,333 및 -73~4,444의 *gal* 오페론 DNA 서열을 얻었다. 생성된 PCR 단편은 *Bam*HI 및 *Sal*I로 절단된 pHL1141에 라이게이션하였다. DNA 시퀀싱에 의해 플라스미드의 구조를 확인하였다.

[0043]

도 1은 플라스미드의 개열지도에 의해 본 방법으로 제조된 플라스미드의 구조를 보여준다. 도 1을 참조하여 각 플라스미드를 다시 한번 설명한다. 도 1에서 노란색의 *ori*는 플라스미드 복제 기원을 나타내며, 초록색으로 나타낸 *cat*와 *bla*는 각각 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyltransferase)와 β -락타마제(lactamase) 항생제 내성 유전자를 나타낸다. *rrnBT1/T2* 전사 종결자는 "T"로 표시하였으며, 제한효소 *Hind*III, *Sal*I 및 *Bam*HI를 나타내었다. 플라스미드 pKK232-8의 *cat* 유전자 업스트림에 tRNA^{arg}(파란색)을 삽입하여 pHL1141을 생성하였다. pHL1141의 tRNA^{arg} 유전자 앞에 *gal* 오페론의 DNA 단편을 클로닝하여 pHL1031, pHL1193, pHL2000, pHL2184, pHL4270, pHL4344 및 pHL4444를 제작하였다. *gal* DNA 단편의 Rho 의존적 종결 위치는 *gal* 시스템(cistron)의 말단에 T로 표시하였다.

[0044]

3) RNA 준비 및 역전사 정량적 PCR(qRT-PCR)

[0045]

Direct-zol RNA MiniPrep 키트(Zymo Research, 미국)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라, 정제된 세포 용해물 (2×10^8 세포)로부터 총 RNA를 정제하였다. 1 μ g의 총 RNA를 Turbo DNase I(Thermo Fisher Scientific, 미국) 반응하여 게놈 또는 플라스미드 DNA를 제거한 후, J Bacteriol 2014 196:2598-2606에 기재된 방법에 따라 20

μ 의 반응량으로 역전사하였다. 각 시료의 결과는 16S rRNA를 인코딩하는 내부 대조군 *rrsB*를 사용하여 정규화하였다. *rrsB*는 표 1의 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머쌍을 사용하여 증폭하였다. qRT-PCR 반응은 세 번 반복하여 실시하였으며, 평균 Ct 값을 사용하여 세 가지 독립적인 실험을 추가로 분석하였다. 각 시료에서의 발현은 평균 $\pm$ SD으로 표시하였다. 본페로니(Bonferroni) 테스트를 사용하여 $\Delta \Delta$ CT 값에 대한 일원분산분석(ANOVA)을 실시하였다. 단방향 분산분석(ANOVA)과 그래프 작성에는 GraphPad Prism 9.0을 사용하였다.

4) RNA 안정성 분석

각 플라스미드를 보유한 야생형(WT) MG1655 세포를 사용하여 *galE*, tRNA^{arg}, 16S rRNA, *cat* mRNA의 감쇄율(decay rate)을 조사하였다. RNA 안정성을 확인하기 위하여 전사 억제제인 리팜피신 100 μ g/mL를 OD₆₀₀ 값이 0.6인 LB 배양 세포에 추가하였다. 리팜피신 첨가 후 0, 2, 4, 8분에 시료를 채취한 후 qRT-PCR 분석을 위해 총 RNA를 추출하였다. 결과를 표준화하기 위해 16S rRNA를 사용하였다. 상대적 발현은 $2^{-\Delta \Delta$ CT 방법을 사용하여 세 개의 독립적인 실험에서 세 개의 복제본의 배율 변화를 평균하여 계산하였다.

II. 결과

1) 생체 내 Rho 의존적 종결 검출 시스템의 구축

*B. albidum*의 tRNA^{arg}를 코딩하는 77 bp 유전자 *argX*를 포함하는 pBR322-유래 플라스미드를 사용하여 qRT-PCR에 의해 *gal* 오페론에서 Rho 의존적 종결을 분석하였다. *gal* 오페론은 *galE-galT-galK-galM*의 구조유전자를 포함하며, *galE-galT*와 *galT-galK* 시스트론 접합부와 *galM* 다운스트림의 Rho 의존적 종결위치가 알려져 있다. *B. albidum* 유래의 tRNA^{arg} 리포터는 *E. coli*에서 tRNA와 직교(orthogonal)하며 상당히 안정하여 qRT-PCR 분석에 의해 검출될 수 있음이 알려져 있다.

먼저, tRNA^{arg}의 직교성을 검정한 결과, *argX* 유전자를 포함하지 않는 MG1655-pKK232에서는 tRNA^{arg}가 검출되지 않아 tRNA^{arg}는 *E. coli*에서 tRNA에 직교함을 확인할 수 있었다(데이터 미도시). 이후, MG-1655-pHL1141 균주에서 tRNA^{arg}의 반감기를 qRT-PCR로 측정하였다. 기대와 달리 tRNA^{arg}는 강한 안정성을 나타내지 않았으며, 그 대신 표 2에 기재한 바와 같이 *gal* mRNA와 유사한 반감기를 나타내었다. *cat*는 약 1.5분의 반감기를 나타냈으며, 16S rRNA는 분해가 관찰되지 않고 매우 안정하였다.

표 2

RNA	반감기(분)
tRNA ^{arg}	1.2 $\pm$ 0.09
<i>galE</i>	1.1 $\pm$ 0.17
<i>cat</i>	1.5 $\pm$ 0.14
16S rRNA	>4,000

다양한 *gal* 오페론의 서열을 융합한 7가지 플라스미드(도 1)를 각각 *E. coli* MG1655 균주에 형질전환하고, 형질전환된 균주에서 발현된 tRNA^{arg}의 반감기를 측정하였다. 표 3에서 확인할 수 있듯이, tRNA^{arg}의 반감기는 1.0~1.3분으로 유사하였다. qRT-PCR에 의해 정량된 RNA의 양은 RNA 합성 속도와 RNA 분해 속도에 의존한다. 상기 플라스미드들에서 tRNA^{arg}가 유사한 속도로 분해되는 것을 확인하였으므로, 상기 형질전환 균주들에서 tRNA^{arg}의 양은 추정 Rho 의존적 종결 위치의 전 후의 *gal* 프로모터로부터 개시된 *gal* 전사체의 양을 나타낼 것으로 볼 수 있다.

표 3

RNA	플라스미드 형태	반감기(분)
tRNA ^{arg}	pHL1031	1.2±0.10
	pHL1193	1.0±0.08
	pHL2000	1.3±0.11
	pHL2184	1.3±0.09
	pHL4270	1.3±0.17
	pHL4344	1.2±0.12
	pHL4444	1.3±0.08

[0054]

[0055]

2) galE-galT 시스트론 접합부에서의 Rho 의존적 종결

[0056]

생체 내에서 1,183 위치의 Rho 의존적 종결(RDT)의 전 후에서 *gal* tRNA의 양을 측정하여 Rho 의존적 종결 효율을 평가하였다. RDT 이전의 전사를 측정하기 위한 *gal* 오페론 부위는 -73~1,031이고, RDT 이후의 전사를 측정하기 위한 *gal* 오페론 부위는 -73~1,193로, 해당 플라스미드는 각각 pHL1031과 pHL1193이다. *gal*의 해당 영역은 *gal* 발현에 필수적인 모든 시스작용요소(cis-acting elements)를 포함한다. pHL1031 및 pHL1193 유래의 tRNA^{arg}의 양은 1,183의 RDT 전 후의 *gal* 프로모터로부터 개시된 *gal* 전사체의 양을 나타낸다. pHL1031과 pHL1193 플라스미드를 각각 보유하는 두 가지 균주에서 tRNA^{arg}의 발현을 qRT-PCR로 측정하고 그 결과를 도 2에 도시하였다. 도 2의 A에서 MG1655-pHL1031 균주에서의 tRNA^{arg} 발현에 대한 MG1655-pHL1193 균주에서 tRNA^{arg}의 발현은 64±19%였다(0.001<p<0.01). 이는 MG1655의 1,183 위치에서 Rho로 인한 전사 종결이 약 36% 발생함을 시사한다. 반면 도 2의 B에 도시된 바와 같이 Rho가 기능하지 않는 HME60(*rho*::Amp^R) 세포에서 tRNA^{arg}의 발현은 MG1655-pHL1031에서와 유의적인 차이가 없어(p>0.05), *galIE-galT* 접합부에서 tRNA^{arg}의 발현량이 Rho 의존적 종결을 반영함을 확인할 수 있었다. 표 4는 각 위치에서의 전사 종결 효율을 나타낸다.

표 4

	종결 효율(%)
E-T 접합부 RDT	36%
T-K 접합부 RDT	26%
<i>gaM</i> 말단 RIT	33%
<i>galM</i> 말단 RDT	63%

[0057]

[0058]

3) galT-galK 시스트론 접합부에서의 Rho 의존적 종결

[0059]

pHL2000과 pHL2184 플라스미드로 각각 형질전환된 균주를 사용하여 2,121~2,125 위치에서 *galET-short*를 생성하는 것으로 알려진 RDT의 효율을 측정하였다. 무세포분석(cell-free assay)에서 Rho는 2,184에서 전사를 종결시키는 것으로 입증되었으므로, MG1655-pHL2184에서의 tRNA^{arg}의 발현은 MG1655-pHL2000에서보다 적을 것임을 예상할 수 있다. 실제로 도 3의 A에서 MG1655-pHL2184에서의 tRNA^{arg}의 발현은 MG1655-pHL2000에서의 tRNA^{arg}의 발현의 74±19%로 해당 RDT 위치에서 Rho에 의해 26% 전사를 종결시킴을 나타내었다.

[0060]

109개 뉴클레오타이드 길이의 비암호화 sRNA인 Spot42는 *galT-galK* 시스트론 접합부에서 다중 시스트론 mRNA의 중간에 결합하여 RDT를 향상시키는 것으로 알려져 있다. 도 3의 B에 도시된 바와 같이 Spot42를 암호화하는 유전

자가 결실된 Δspf -pHL2184 균주에서의 $tRNA^{arg}$ 발현은 Δspf -pHL2000에서의 $92 \pm 10\%$ 로, Spot42가 없는 경우 RDT 위치가 존재한다고 하더라도 Rho가 전사를 종결시키지 못함을 보여준다. 이는 Spot42가 *galET* mRNA를 생성하는 RDT를 유발하는 중요한 인자임을 의미한다. 또한 도 3의 C는 HME60-pHL2184와 HME60-2000에서의 $tRNA^{arg}$ 발현이 거의 동일함을 보여주어, 도 2의 B에서와 마찬가지로 MG1655-pHL2000 및 MG1655-pHL2184에서의 $tRNA^{arg}$ 의 발현이 Rho 의존적 종결을 반영함을 나타내었다.

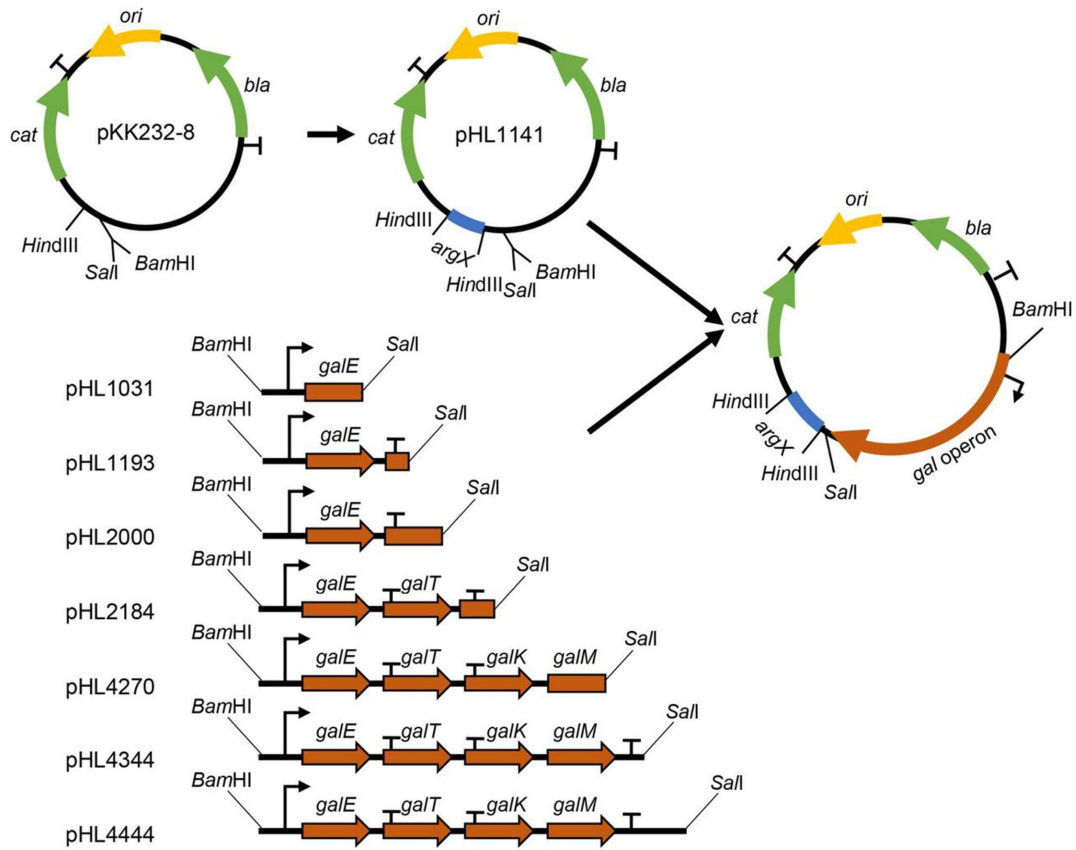
[0061] 4) 오페론 말단의 RDT 및 RIT

[0062] *gal* 오페론의 말단에서 전사는 업스트림의 RIT와 다운스트림의 RDT에 의해 종결된다. 4,409에서 전사는 Rho에 의해 종결되며, 이후 엑소뉴클레아제에 의해 빠르게 분해된다. 알려진 RIT 및 RDT 위치는 각각 4,315 및 4,409로, pHL4270(RIT-RDT 이전), pHL4344(RIT 이후-RDT 이전), pHL4444(RIT-RDT 이후) 플라스미드로 각각 형질전환된 MG1655 균주에서 $tRNA^{arg}$ 발현을 qRT-PCR로 측정하여 종결효율을 평가하였다. 표 3에 기재된 것처럼 각 균주에서 $tRNA$ 의 반감기는 거의 유사하여, 각 균주에서 $tRNA^{arg}$ 발현량을 측정하는 것에 의해 전사 종결 효율을 평가할 수 있다.

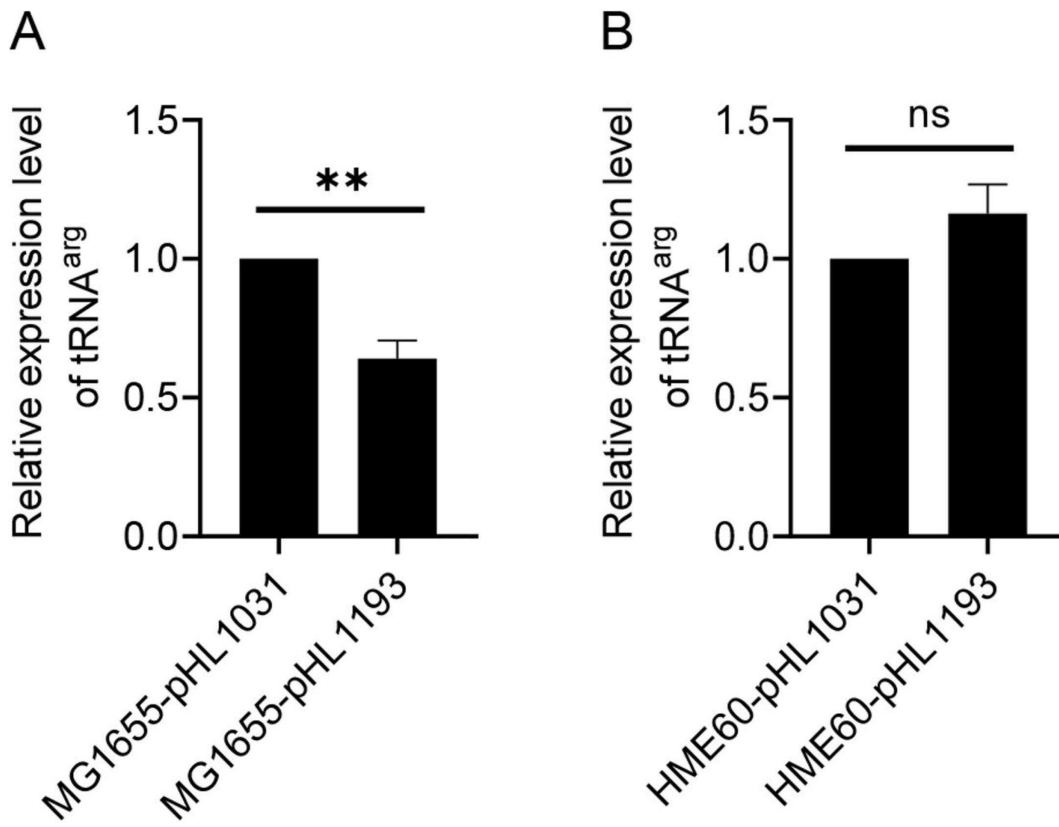
[0063] 도 4는 그 결과를 보여주는 그래프로, 도 4의 A에서 MG1655-pHL4270에 대한 MG1655-pHL4344의 $tRNA^{arg}$ 발현량은 $67 \pm 2\%$ 로 RIT 효율이 33%임을 보여준다. MG1655-pHL4270에 대한 MG1655-pHL4444에서의 $tRNA^{arg}$ 발현량은 $25 \pm 8\%$ 으로 오페론의 말단에서 RIT와 RDT에 의해 종결된 전사의 총 효율은 75%이고, RDT 효율은 63%임을 계산할 수 있다. 이에 대한 결과는 표 4에 함께 기재하였다. 도 4의 B는 HME60(*rho::Amp^R*) 세포에서의 RIT 및 RDT 효율을 보여준다. 구체적으로 HME60-pHL4270에 대한 HME60-pHL4344에서의 $tRNA^{arg}$ 발현량은 $68 \pm 2\%$ 로, 따라서 RIT 효율은 32%이다. 이는 MG1655에서 측정된 RIT 효율과 거의 동일한 값으로 Rho의 기능 유무에 의해 거의 영향을 받지 않았음을 확인할 수 있다. HME60-pHL4270에 대한 HME60-pHL4444에서의 $tRNA^{arg}$ 발현량은 $90 \pm 14\%$ 로 오페론의 말단에서 RIT와 RDT에 의해 종결된 전사의 총 효율은 10%로 떨어졌으나, HME60-pHL4270 대비 유의적이지 않았다. 이는 오페론 말단에서의 종결 효율이 RDT 효율에 해당함을 시사한다.

도면

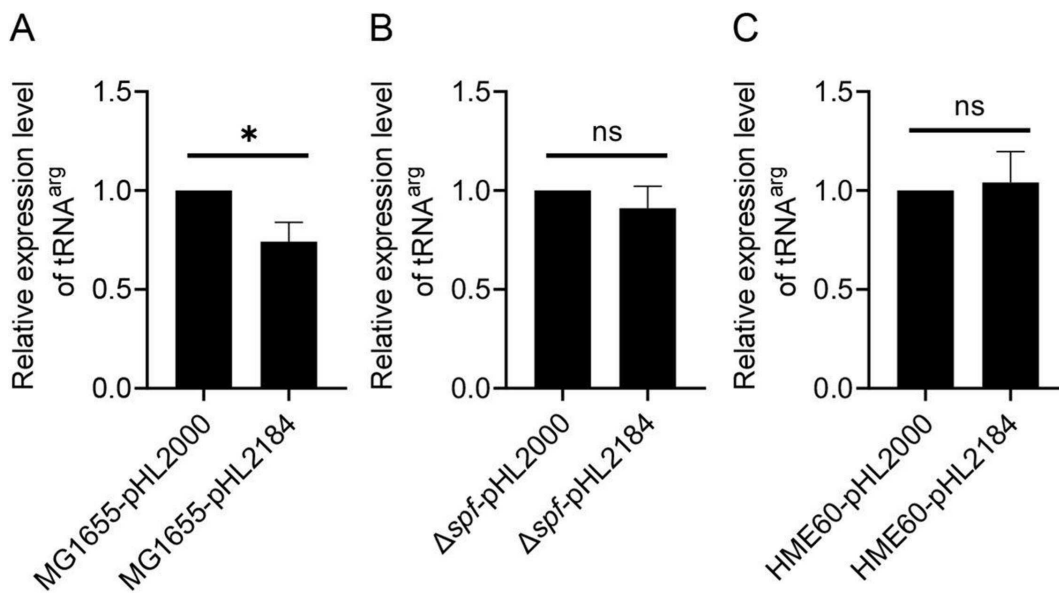
도면1



도면2

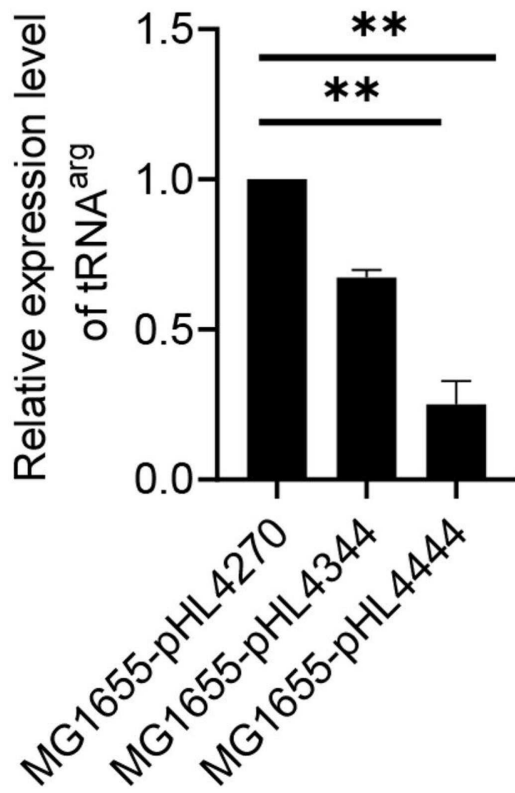


도면3

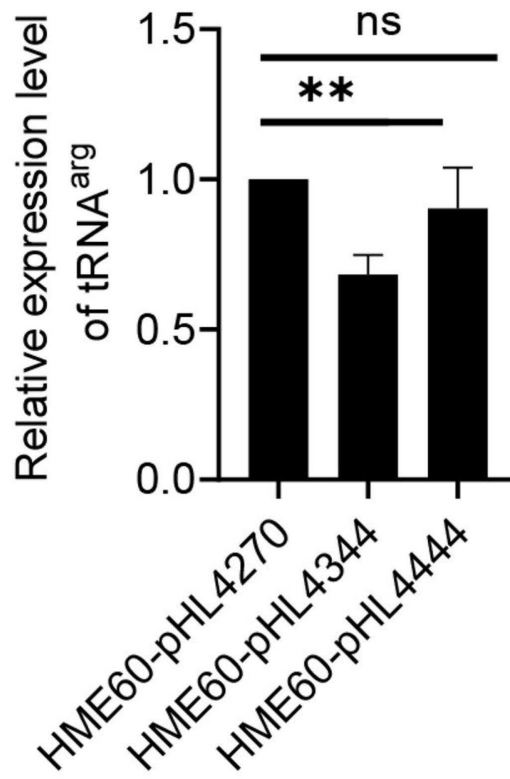


도면4

A



B



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.