



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0014783
(43) 공개일자 2013년02월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0076443

(22) 출원일자 2011년08월01일
심사청구일자 2011년08월01일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 연세대길 1

(72) 발명자
정광환
경기도 성남시 분당구 양현로 192, 삼성아파트
1025동 503호 (이매동)

장영주
서울특별시 강남구 선릉로 221, 도곡텍셀 204동
203호 (도곡동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인
양부현

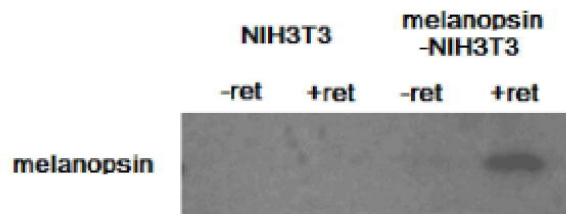
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **인간 멜라놉신을 발현하는 형질전환 세포주 및 이를 이용한 일주기 리듬 관련 생체 분자의 스크리닝 방법**

(57) 요약

본 발명은 인간 멜라놉신을 발현하는 형질전환 세포주, 이를 이용한 일주기 리듬 관련 생체 분자 및 일주기 리듬에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명은 인간 멜라놉신-코딩 뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 형질전환시켜 인간 멜라놉신 단백질을 효과적으로 발현하는 동물세포주를 제공하며, 이를 이용한 하위 일주기 리듬 관련 생체분자의 효율적인 스크리닝 방법을 제공한다. 이를 통해 일주기 리듬에 따라 발현이 조절되는 표적 시계 유전자를 탐색함으로써, 급격한 생체 리듬의 변화로 초래되는 각종 질환의 조기 진단에 유용하게 적용할 수 있다. 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 세포주를 이용하여 일주기 리듬에 영향을 주는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하여, 생체 리듬 관련 각종 질환의 예방 및 치료에 적용할 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

김소영

서울특별시 마포구 월드컵로7길 49, 현진아트빌라
401호 (합정동)

조윤희

서울특별시 송파구 마천2동 41-7

장영수

인천광역시 연수구 경원대로119번길 21, 풍림2차A
105동 102호 (동춘동)

배기호

강원도 원주시 늘품로 199, 반곡아이파크아파트
115동 101호 (반곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110002749

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자 지원사업

연구과제명 멜라놉신 및 일주기 광 신호전달기전을 활용한 암세포 증식주기의 조절

주관기관 연세대학교 (원주) 산학협력단

연구기간 2009.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

인간 멜라놉신 단백질을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터로 형질전환 되어 상기 인간 멜라놉신 단백질을 발현하는 형질전환 동물세포주.

청구항 2

다음의 단계를 포함하는 일주기 리듬 관련 생체 분자의 스크리닝 방법:

- (a) 인간 멜라놉신 단백질을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터로 동물세포주를 형질전환시켜 인간 멜라놉신 단백질을 발현하는 형질전환 동물세포주를 제조하는 단계;
- (b) 상기 형질전환된 동물세포주에서 상기 멜라놉신 단백질을 활성화시키는 단계; 및
- (c) 상기 형질전환된 동물세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자의 발현을 분석하는 단계.

청구항 3

다음의 단계를 포함하는 일주기 리듬에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법:

- (a) 인간 멜라놉신 단백질을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터로 동물세포주를 형질전환시켜 인간 멜라놉신 단백질을 발현하는 형질전환 동물세포주를 제조하는 단계;
- (b) 상기 형질전환 동물세포주의 멜라놉신 단백질을 활성화시키는 단계;
- (c) 상기 형질전환 동물세포주 시료를 처리하는 단계; 및
- (d) 상기 형질전환 동물세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자의 발현을 분석하는 단계.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 멜라놉신 단백질의 활성화는 혈청 쇼크, 레티날 처리 또는 광 조사인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 유전자 발현 분석은 PCR(polymerase chain reaction), RT(reverse transcription)-PCR, 실시간-PCR 또는 마이크로어레이 분석에 따라 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 멜라놉신을 발현하는 형질전환 세포주, 이를 이용한 일주기 리듬 관련 생체 분자 및 이에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 체내 시계(Circadian clock)는 생명체가 진화과정에서 구비한 대표적인 적응방식으로 생물의 행동과 환경을 동

조화한다. 지구상의 거의 모든 생물체는 지구의 자전, 공전에 의한 밤낮, 계절의 변화에 적응해온 체내 시계를 갖고 있는데 신경-내분비계의 활동, 체온 조절, 에너지 대사, 수면-각성주기, 운동 등 대부분의 생체활동이 일주기 리듬에 따라 진행되고 있다(Hastings et al., 2007; Reppert and Weaver, 2002). 한편, 단일 배양 세포에서도 약 24시간 주기로 반복되는 단백질이나 mRNA의 분자 리듬이 존재함이 확인되었다(Balsalobre et al., 2000).

[0003] 포유동물 생체시계의 핵심 조절중추는 뇌 속 시상하부에 위치한 시교차상핵(Suprachiasmatic Nucleus; SCN)으로 약 20,000여개의 뉴런으로 구성된다(Rusak and Zucker, 1979). 빛에 민감하게 반응하여 시교차상핵은 체내 시계를 재설정시키는 중추시계(central clock)로써 간, 신장, 심장 등 말단 개별 조직의 시계(peripheral tissue clock) 리듬 재조정에 관여하며 생물체 전체의 운동성(locomotor activity)을 표현한다(Balsalobre et al., 2000; Fahrenkrug et al., 2008; Son et al., 2008). 포유동물에서 분자유전학적 연구로 밝혀진 Clock, Bmal1, Period (Per) 및 Cryptochrome(Cry) 등의 중추 시계 유전자 발현은 전사/번역 음성 피드백(transcription/translation negative feedback)방식에 의해 상호 조절된다(Bunger et al., 2000; Bae et al., 2001; Reppert and Weaver, 2002; DeBruyne et al., 2007). 이들 유전자들은 또한 많은 다른 유전자들의 주기적 발현에도 영향을 준다. 최근 DNA 마이크로어레이 및 단백질 칩을 이용한 연구에 의하면, 세포내 전체 유전자의 대략 10%정도가 약 24시간 주기의 발현 리듬을 반복하는데, 이들은 세포 주기(Cell cycle), 세포 분화, 물질대사, 스트레스 반응, 신호 전달, 이온 채널, 수용체, 전사 인자, 면역 등 실로 다양한 기능을 수행하는 유전자들을 포함하고 있다(Reddy et al., 2006; Brooke et al., 2007).

[0004] 인간을 비롯한 포유동물의 세포는 약 24시간 주기로 분열하며, 이를 세포 주기(Cell cycle or Cell division cycle)라고 한다. 세포 주기 및 체내 시계는 얼핏 보면 그 작용기전에서 서로 관련이 없는 것처럼 보이지만 사실 여러 측면에서 공통점이 있다(Gery and Koeffler, 2007; Levi et al., 2007). 예를 들어, 체내 시계 돌연변이 마우스에서 여러 세포 주기인자들의 발현 이상(up 또는 down-regulation)이 관찰되며 이들 마우스의 경우 암 발생빈도가 정상 대조군에 비해 높다. 또한, 일부 암세포주에서 체내 시계 유전자들의 발현 이상이 존재한다(Antoch et al., 2008; Yang and Stockwell, 2008). 또한, 체내 시계와 DNA 손상 반응과의 상호 관련성이 있으며(Fu et al., 2002; Collins and Boulton, 2007; Oklejewicz et al., 2008), 세포 분화 및 증식, 또는 세포 사멸 등의 기전도 생체 주기 모드로 발현되는 유전자들에 의해 조절됨이 알려졌다(Granda et al., 2005). 정상적인 세포분열을 조절하는 인자들이 체내 시계와 연관되어 있다는 사실 이외에, 최근 종양 억제제이며, 자외선(UV) 또는 감마(gamma)선에 의해 디옥시리보핵산(DNA) 손상이 발생하였을 때 활성화되는 p53도 체내 시계 인자 중에 하나인 PER2에 의해 발현이 조절되는 것으로 밝혀져 체내 시계 기전이 종양 발생 및 진전에 관여하고 있음을 알 수 있다(Fu et al., 2002).

[0005] 위와 같이 세포의 분열과정이 진행됨에 따라 다양한 세포 인자들도 그들의 발현양이나 단백질의 활성 정도가 세포 주기에 맞추어 주기성을 띠는 것으로 확인된다. 세포분열주기는 생물학적 주기의 발진기(Circadian oscillator)에 의해 조절되고 있다는 보고가 있고 특히 많은 세포주기성 인자들(예컨대, Myc(G0-G1 transition 과정에 관여), 사이클린(Cyclin)D1 (G1-S transition), 및 Wee1 (G2-M transition))의 발현과 활성이 체내 시계와 연관되고 있다(Canaple et al., 2003; Ishida, 2007). 따라서 세포분열주기 진행의 업스트림(upstream) 조절인자로서 체내 시계의 역할에 대한 새로운 관심이 높아지고 있다.

[0006] 생물체의 빛에 대한 반응은 복합 광수용체들의 조직적인 반응(coordinated action)으로 빛은 체내 시계에 영향을 주는 가장 강한 환경요인으로 알려져 있다. 일례로 각 광수용체(photoreceptor)들은 망막에서 생물학적 주기의 발진기로 보고되었다(Yu et al., 2007). 광수용체 중 하나인 로돕신(Rhodopsin)의 경우 유전자가 밝혀진 후 수 십년간의 연구를 통해서 광수용체뿐만 아니라 세포내 광 신호전달에 대해서도 자세히 알려져 있다(Spudich et al., 2000). 그러나 청색광 수용체인 크립토크롬(Cryptochrome)의 경우 1993년에야 비로서 유전자를 알게 되었고 멜라놉신(Melanopsin)의 경우 2002년도부터 연구가 시작되었기 때문에 현재 인 비보(in vivo) 기능과 광수용체 자체의 특성만이 다소 알려져 있으며(Melyan et al., 2005; Panda et al., 2005; Jasser et al., 2006), 단백질 멜라놉신(Melanopsin)을 코딩하는 유전자 Opn4가 빛을 포획하고 일간 변화리듬(circadian rhythm)이라는 하루 주기로 신체를 움직이게 하는데 핵심유전자라는 것은 보고된 바 있으나(Panda, et al., 2002) 세포내 광 신호전달에 대해서는 상대적으로 잘 연구되어 있지 않다. 멜라놉신의 세포내 광 신호전달과정의 다운스트림(downstream) 인자들을 찾고자 시도한 마이크로어레이(microarray) 분석에 의해 망막의 갱글리온(ganglion) 세포(intrinsically photosensitive retinal ganglion cells, ipRGCs)에서 멜라놉신과 함께 발현되는 8가지 후보유전자를 확인하고 이들 중 단백질 카이나제 C 제타(Protein kinase C zeta)의 작용이 제시되었지만 아직 불명확해 보인다(Peirson et al., 2007). 이처럼 비-가시적 광반응(Non-visual photoresponse)에

관여하는 생체 주기의 광변환(Circadian phototransduction)은 로돕신/포토티신(Photopsin)이 매개하는 시각계(visual system) 보다는 덜 민감하여 비교적 낮은 정도의 빛에 반응하며, 내분비계의 호르몬 분비 조절과 병적 상태를 유발하는 생체 주기 조절 과정과 밀접한 연관성이 여럿 제시되고 있음에도 그 정확한 기전은 밝혀진 바 없다. 일례로, 생물학적 리듬 주기에 따라 진행도가 변화하는 유방암의 임상 또는 기전연구에 대한 관심이 높다. 정상인이 밤 동안 빛에 노출되는 정도에 따라 유방암 발생률이 증가하며(Davis et al., 2001; Schernhammer et al., 2001), 생체 주기의 광변환을 신호하는 한 매개물질인 멜라놉신이 유방암 세포의 증식을 직접적으로 저해함이 보고되었다(Blask et al., 2002; Stevens et al., 2005). 이들 결과에 의하면, 세포에 노출되는 빛의 양과 노출 시간 및 빈도가 세포의 생리적인 변화를 유발하는데 큰 영향이 있음을 알 수 있다.

[0007] 현재까지 일주기 시간 진행 시스템(Circadian timing system)과 세포 주기 조절에 관련하여, 특히 광 신호를 매개하는 멜라놉신에 의한 생체 주기의 광변환 기전을 광수용체 및 그 전달경로 측면에서 연구하고, 이에 의해 유도되는 다운스트림 표적 단백질의 발현과 리듬이 어떻게 암세포에서의 세포 주기에 영향을 줄 것인지, 이를 제어할 표적이 무엇인지에 대한 연구는 진행되어 있지 않다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 일주기 리듬 조절과 관련된 것으로 알려진 광수용체인 멜라놉신이 발현되도록 하는 재조합 유전체를 제조, 이를 포함하는 세포주를 제조하고, 일주기 리듬 관련 유전자의 발현 조절 여부를 스크리닝함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 일주기 리듬 관련 생체 분자의 스크리닝 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 인간 멜라놉신을 지속적으로 발현하는 동물세포주를 성공적으로 구축하고, 이를 이용하여 세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자 및 이에 영향을 주는 물질을 효과적으로 스크리닝하는 방법을 개발함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 인간 멜라놉신 단백질을 발현하는 형질전환 동물세포주를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 동물세포주를 이용한 일주기 리듬 관련 생체 분자의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 동물세포주를 이용한 일주기 리듬에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 인간 멜라놉신 단백질을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터로 형질전환 되어 상기 인간 멜라놉신 단백질을 발현하는 형질전환 동물세포주를 제공한다.

[0016] 본 발명자들은 일주기 리듬 관련 생체 분자의 스크리닝 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 인간 멜라놉신을 지속적으로 발현하는 동물세포주를 성공적으로 구축하고, 이를 이용하여 세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자 및 이에 영향을 주는 물질을 효과적으로 스크리닝하는 방법을 개발하였다.

- [0017] 본 발명에서 이용되는 벡터는 인간 멜라놉신 단백질을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 컨스트럭트를 포함한다. 상기 발현 컨스트럭트는 “동물세포에서 작동하는 프로모터-인간 멜라놉신 코딩 뉴클레오타이드 서열-폴리아데닐화 서열”를 포함한다.
- [0018] 상기 동물세포에서 작동하는 프로모터는 인간 멜라놉신 코딩 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결(operatively linked to)되어 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서 프로모터는 동물세포에서 발현하기에 적합한 프로모터가 선택된다. 바람직하게는, CMV(Cytomegalovirus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40(Simian Virus 40) 프로모터, SV40E1 프로모터, HSV(Herpes simplex virus)의 *tk* 프로모터, RSV(Respiratory syncytial virus) 프로모터, EF1(elongation factor-1 alpha) 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2(interleukin-2) 유전자의 프로모터, 인간 IFN(interferon) 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF(Granulocyte macrophage colony-stimulating factor) 유전자의 프로모터이고, 보다 바람직하게는 CMV 프로모터이다.
- [0020] 본 발명에 있어서 벡터는 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 포함하며, 소성장 호르몬 터미네이터, HSV(Herpes simplex virus) 유래 TK(Thymidine kinase) 또는 SV40(Simian virus 40) 유래 폴리 아데닐화 서열이 바람직하다.
- [0021] 본 발명에서 이용되는 벡터는 선택마커로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 동물세포에 작용하는 항생제 내성 유전자를 포함하며 바람직하게는 네오마이신, 제네티신(G418) 및 카나마이신에 대한 내성 유전자이다. 보다 바람직하게는 네오마이신이다.
- [0022] 본 발명에서 이용되는 인간 멜라놉신-코딩 뉴클레오타이드를 포함하는 벡터는 동물세포에 형질전환되어 작동한다. 본 발명에 이용되는 동물세포는 바람직하게는 포유류, 설치류, 조류 및 곤충세포이며, 보다 바람직하게는 NIH3T3, CHO(Chinese hamster ovary), VERO, HeLa 세포, WI38, BHK(Baby hamster kidney), COS 세포 및 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney) 세포를 포함하고, 보다 더 바람직하게는 NIH3T3 세포이다.
- [0023] 본 발명의 발현 벡터를 세포에 도입하여 형질전환 동물세포를 제조하는 경우, 다양한 방법으로 벡터를 세포에 도입시킬 수 있다. 예를 들어, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990))이며, 바람직하게는 칼슘 포스페이트 침전법이다.
- [0024] 형질전환된 동물세포의 배양은 동물세포의 배양에 통상적으로 이용되는 어떠한 배지에서도 가능하며 예를 들어, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium), α -MEM, Iscove's MEM, CMRL 1066, RPMI 1640, F12, F10, DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium), Way-mouth's MB752/1, McCoy's 5A 및 MCDB 시리즈 등이 이용될 수 있다. 가장 바람직하게는 DMEM이다.
- [0025] 본 발명의 형질전환 동물세포주는 지속적/안정적으로 인간 멜라놉신 단백질을 발현한다. 본 발명의 가장 바람직한 형질전환 동물세포주는 mela-3T3(KCLRF-BP-00268)이다.
- [0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 일주기 리듬 관련 생체 분자의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0027] (a) 인간 멜라놉신 단백질을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터로 동물세포주를 형질전환시켜 인간 멜라놉신 단백질을 발현하는 형질전환 동물세포주를 제조하는 단계;
- [0028] (b) 상기 형질전환된 동물세포주에서 상기 멜라놉신 단백질을 활성화시키는 단계; 및
- [0029] (c) 상기 형질전환된 동물세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자의 발현을 분석하는 단계.
- [0030] 본 발명의 방법은 상술한 발현벡터를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.

- [0031] 본 발명을 각각의 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0032] 단계 (a): 인간 멜라놉신 단백질 발현 벡터의 형질전환에 의한 동물세포주의 제조
- [0033] 본 발명에 있어서, 상술한 본 발명의 발현 벡터는 동물세포에 형질전환되어 작동한다. 동물세포는 포유류, 설치류, 조류 및 곤충세포를 포함하며, 바람직하게는 NIH3T3, CHO(Chinese hamster ovary), VERO, HeLa 세포, WI38, BHK(Baby hamster kidney), COS 세포 및 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney) 세포이고, 보다 바람직하게는 NIH3T3 세포이다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상술한 본 발명의 발현 벡터를 동물세포에 도입하기 위한 이용 가능한 방법으로는 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법 및 유전자 밤바드먼트를 포함하고, 바람직하게는 칼슘 포스페이트 침전법이다.
- [0035] 본 발명의 형질전환된 동물세포를 배양하는 경우에 이용 가능한 배지로는 Eagles's MEM, α -MEM, Iscove's MEM, CMRL 1066, RPMI 1640, F12, F10, DMEM, Way-mouth's MB752/1, McCoy's 5A 및 MCDB 시리즈를 포함하고, 가장 바람직하게는 DMEM이다.
- [0036] 단계 (b): 형질전환된 동물세포주 내의 멜라놉신 단백질의 활성화
- [0037] 형질전환 동물세포주를 제조한 다음, 멜라놉신 단백질을 활성화시킨다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 멜라놉신 단백질을 활성화는 혈청 쇼크(serum shock), 레티날(retinal) 처리 및 광 조사에 의해 실시된다.
- [0039] 멜라놉신 활성화 방법에서 혈청 쇼크는 세포 주기에 독립적으로 생물학적 주기의 발진기(circadian oscillation) 관련 단백질 발현을 효과적으로 유도(induction)한다. 혈청 쇼크에 이용 가능한 혈청으로는 말, 토끼, 돼지, 쥐 및 소 유래의 혈청이 바람직하며, 보다 바람직하게는 말 혈청이다. 조직(組織) 플라스미노겐 활성화 물질인 TPA (tissue plasminogen activator) 및 섬유아세포증식인자인 FGF (fibroblast growth factor)도 이와같은 작용을 하는 것으로 보고된 바 있다(Balsalobre et al. 1998).
- [0040] 형질전환된 세포주 내의 멜라놉신 활성화 방법에서 레티날 처리의 레티날은 비타민A(레티놀)의 활성 본체인 레티노인산의 대사중간체이다. 광수용체 세포의 디스크 부분인 광색소(photopigment)는 막단백질 분자인 옵신(opsin)과 이에 결합되어 있는 비타민 A유도체인 레티날로 이루어져 있다. 레티날 분자는 빛에 대해 반응하는데 암흑 속에서는 옵신분자와 결합되어 있는 형태인 11-cis 레티날로 존재하고, 11-cis 레티날이 빛을 받게 되면 광화학반응을 통해 all-trans 레티날로 변화하면서 옵신과 분리된다. 이러한 작용이 막 단백질인 옵신의 효소활성을 촉진하여 광수용체의 수용기 전위가 형성된다. 본 발명에서 이용하는 레티날은 all-trans 레티날이 바람직하다.
- [0041] 단계 (c): 형질전환된 동물세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자의 발현 분석
- [0042] 멜라놉신 단백질의 활성화 후, 형질전환된 동물세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자의 발현을 분석한다.
- [0043] 활성화된 동물세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자는 약 24시간을 한 순환으로 해서 되풀이되는 대사리듬 혹은 행동의 리듬에 관여하는 유전자이다.
- [0044] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 유전자 발현 분석은 당업계에서 통상적으로 이용되는 유전자 발현 분석 방법이 가능하며, 예를 들어 PCR(polymerase chain reaction), RT(reverse transcription)-PCR, 실시간-PCR 또는 마이크로어레이 분석이 바람직하다.
- [0045] 유전자 발현 분석 방법 중 PCR은 DNA 중합효소를 이용하여 DNA의 양을 증폭시키는 기술이며 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, 역전사 효소(reverse transcriptase)를 이용해서 RNA를 직접 증폭시키는 RT-PCR이 대표적이며, 이외에도 형광 물질을 붙여서 PCR을 진행하며 관측되는 정량적인 변화를 이용하여 원래 DNA나 RNA의 양을 정확히 측정하는 정량적 PCR 또는 실시간 PCR, 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE),

멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다.

- [0046] 본 발명의 이용 가능한 유전자 발현 분석 방법으로 마이크로 어레이는 기체(substrate) 상에 서로 다른 DNA를 고도로 정렬된 배열로 집적시켜 유전자들이 어떻게 상호 작용을 하는지를 밝히는 연구방법으로 보통 유전자 발현을 알아보기 위해 이용한다. 마이크로어레이에서 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예를 들어 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 기체(substrate) 상에 고정화되는 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 가능하다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 예폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다. 한편, 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 또한, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 당업계에 공지된 방법으로 다양하게 실시될 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-BI-포스페이트(naphthol-AS-BI-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 일주기 리듬에 영향을 주는 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0048] (a) 인간 멜라놉신 단백질을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터로 동물세포주를 형질전환시켜 인간 멜라놉신 단백질을 발현하는 형질전환 동물세포주를 제조하는 단계;
- [0049] (b) 상기 형질전환 동물세포주의 멜라놉신 단백질을 활성화시키는 단계;
- [0050] (c) 상기 형질전환 동물세포주 시료를 처리하는 단계; 및
- [0051] (d) 상기 형질전환 동물세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자의 발현을 분석하는 단계.
- [0052] 본 발명을 각각의 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0053] 단계 (a) 인간 멜라놉신 단백질 발현 벡터의 형질전환에 의한 동물세포주의 제조
- [0054] 본 발명에 있어서, 상술한 본 발명의 발현 벡터는 동물세포에 형질전환되어 작동한다. 본 발명의 이용 가능한 동물세포는 바람직하게는 NIH3T3, CHO(Chinese hamster ovary), VERO, HeLa 세포, WI38, BHK(Baby hamster kidney), COS 세포 및 MDCK(Madin-Darby Canine Kidney) 세포이고, 보다 바람직하게는 NIH3T3 세포이다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상술한 본 발명의 발현 벡터를 동물세포에 도입하기 적합한 방법으로는 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트가 바람직하고, 보다 바람직하게는 칼슘 포스페이트 침전법이다.
- [0056] 본 발명의 형질전환된 동물세포를 배양하는 경우에 배지로는 Eagles's MEM, α-MEM, Iscove's MEM, CMRL 1066, RPMI 1640, F12, F10, DMEM, Way-mouth's MB752/1, McCoy's 5A 및 MCDB 시리즈가 바람직하고, 가장 바람직하게는 DMEM이다.

- [0057] 단계 (b) 형질전환된 동물세포주 내의 멜라놉신 단백질의 활성화
- [0058] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상술한 본 발명의 벡터로 형질전환된 동물세포주 내의 멜라놉신 단백질을 활성화하는 방법에는 혈청 쇼크(serum shock), 레티날(retinal) 처리 및 광 조사가 바람직하다.
- [0059] 혈청 쇼크는 세포 주기에 독립적으로 생물학적 주기의 발진기(circadian oscillation) 및 생체시계 관련 단백질 발현을 효과적으로 유도(induction)한다. 혈청 쇼크에 이용 가능한 혈청으로는 말, 토끼, 돼지, 쥐 및 소 유래의 혈청을 포함하며, 바람직하게는 말 혈청이다.
- [0060] 상술한 본 발명의 벡터가 형질전환된 세포주의 활성화 방법 중 레티날 처리에서 레티날은 비타민A(레티놀)의 활성 본체인 레티노인산의 대사중간체로서 레티날 분자는 빛에 대해 반응하는데 암흑 속에서는 옹신분자와 결합되어 있는 형태인 11-cis 레티날로 존재한다. 11-cis 레티날이 빛을 받게 되면 광화학반응을 통해 all-trans 레티날로 변화하면서 옹신과 분리되는데 이러한 작용이 막 단백질인 옹신의 효소활성을 촉진하여 광수용체의 수용기 전위가 형성된다. 본 발명에서 이용하는 레티날은 all-trans 레티날이 바람직하다.
- [0061] 단계 (c) 형질전환된 동물세포주에 대한 시료의 처리
- [0062] 본 발명의 일주기 리듬에 영향을 주는 물질의 스크리닝은 본 발명의 활성화된 동물세포주의 하위 일주기 리듬 유전자의 발현에 영향을 미치는 시료를 탐색함으로써 가능하다.
- [0063] 본 발명에 있어서 시료는 본 발명의 활성화된 세포주의 하위 일주기 리듬 유전자의 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 이용 가능한 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA), miRNA, 펩타이드, 단백질, 항체 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시료는 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)을 포함한다. 시료는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- [0065] 단계 (d) 형질전환된 동물세포 내의 하위 일주기 리듬 유전자의 발현 분석
- [0066] 바람직한 구현예에 따르면, 유전자 발현 분석은 당업계에서 통상적으로 이용되는 유전자 발현 분석 방법이 가능하며, 예를 들어 PCR(polymerase chain reaction), RT(reverse transcription)-PCR, 실시간-PCR 또는 마이크로어레이 분석이 바람직하다.
- [0067] 본 발명의 바람직한 유전자 발현 분석 방법 중 PCR은 DNA 증합효소를 이용하여 DNA의 양을 증폭시키는 기술이며 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, 역전사 효소(reverse transcriptase)를 이용해서 RNA를 직접 증폭시키는 RT-PCR이 대표적이며, 이외에도 형광 물질을 붙여서 PCR을 진행하며 관측되는 정량적인 변화를 이용하여 원래 DNA나 RNA의 양을 정확히 측정하는 정량적 PCR 또는 실시간 PCR이 있다.
- [0068] 본 발명의 이용 가능한 유전자 발현 분석 방법 중 마이크로어레이는 기체(substrate) 상에 서로 다른 DNA를 고

도로 정렬된 배열로 집적시켜 유전자들이 어떻게 상호 작용을 하는지를 밝히는 연구방법으로 보통 유전자 발현을 알아보기 위해 이용한다. 마이크로어레이 과정 중 고정화 방법, 혼성화 방법, 혼성화 검출 및 분석 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법 중 실험 목적과 조건에 따라 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0069] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0070] (a) 본 발명은 인간 멜라놉신-코딩 뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 형질전환시켜 인간 멜라놉신 단백질을 효과적으로 발현하는 동물세포주를 제공한다.
- [0071] (b) 본 발명은 상기 형질전환된 세포주를 이용한 하위 일주기 리듬 관련 생체분자의 효율적인 스크리닝 방법을 제공한다. 이를 이용하여 일주기 리듬에 따라 발현이 조절되는 표적 시계 유전자를 탐색함으로써, 급격한 생체 리듬의 변화로 초래되는 각종 질환의 조기 진단에 유용하게 적용할 수 있다.
- [0072] (c) 본 발명은 상기 형질전환된 세포주를 이용하여 일주기 리듬에 영향을 주는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공하여, 생체 리듬 관련 각종 질환의 예방 및 치료에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0073] 도 1은 본 발명의 지속적으로 인간 멜라놉신 단백질을 발현하도록 재조합한 발현벡터를 나타낸다. 발현 여부의 확인을 위해 인간 멜라놉신 단백질의 아미노산 서열 N-말단에 Flag 펩티드를 융합하였다.
- 도 2는 상기 발현벡터를 형질전환한 NIH3T3 세포주에서 인간 멜라놉신 단백질이 지속적으로 발현된다는 것을 웨스턴 블로팅 방법으로 확인한 결과이다.
- 도 3은 상기 형질전환 세포주를 배양할 때 all-trans 형의 레티날을 첨가하면 인간 멜라놉신 단백질의 발현양이 현저히 증가한다는 것을 웨스턴 블로팅 방법으로 확인한 결과이다.
- 도 4는 상기 형질전환 세포주를 이용하여 일주기 리듬 관련 유전자의 발현 양상의 변화를 웨스턴 블로팅 방법으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0075] 실시예

[0076] 실험 방법

[0077] 재조합 유전체 컨스트럭트의 제작

- [0078] 인간 멜라놉신 유전자의 전체 염기서열을 cDNA 클론을 주형으로 하는 PCR 방법을 이용하여 수득하였다. 이때, 서열목록 제2서열로 기재되는 정방향 프라이머(primer) melF 5'-GCA CTC GGA TCC ATG AAC CCT CCT TCG GGG CC-3'(코스모진텍, Korea)와 서열목록 제3서열로 기재되는 역방향 프라이머 melR 5'-GCA CTC AAG CTT CAT CCT GGG GTC CTG GCT GGG GAT CAG CCC CTT GGT CTT CCC TGG AGT CTC TGC TTC G-3'(코스모진텍, Korea)를 사용하였고, 각 프라이머에는 벡터(vector)에 재조합을 용이하게 하기 위한 제한효소 인식 서열을 첨가하였다. PCR은 *Pfu* 폴리머라아제(비바젠, 한국)를 사용하여 95℃에서 1분, 55℃에서 2분 및 72℃에서 3분으로 35 사이클을 수행하였다. PCR 산물을 정제 분리한 후 BamH I 및 HindIII로 절단하고, pCMV-Tag 2B 벡터(Stratagene)에 FLAG-tag 펩티드 서열과 연결되도록 도입하였다(도 1).

[0079] 형질전환 세포주의 제조

- [0080] *섬유아세포주(NIH3T3)의 배양*
- [0081] 쥐의 섬유아세포주인 NIH3T3를 10% FBS(Fetal bovine serum)을 포함한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, 미국)을 배양액으로 37℃, 5% CO₂가 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다. 사흘에 한 번씩 세포를 분주하였고, 분주할 때에는 0.25% 트립신(trypsin)-EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)를 넣고 배양접시에서 떼어낸 후 5개로 나누었다.
- [0082] *멜라놉신 단백질을 지속적으로 발현하는 형질전환 세포주의 제조*
- [0083] 상기 기술된 배양법대로 배양된 쥐의 섬유아세포주에 상기 실시예 1에서 제작된 제조합 벡터 30 µg을 CalPhosTM 포유류 트랜스펙션 키트(클론테크, 미국)를 이용하여 형질감염시켰다.
- [0084] 이때, pCMV-Tag 2B 벡터는 형질전환 세포주의 선별을 용이하게 하기 위하여 네오마이신 저항성 유전자(neomycin resistant gene)를 포함한다. 37℃, 5% CO₂ 조건하에 48시간 동안 배양한 후 500 µg/ml의 G418(neomycin, Duchefa, 네덜란드)을 처리하여 재조합 유전자로 형질감염되지 않은 세포를 제거하였다.
- [0085] 단일 세포가 만든 세포군을 얻어 24 웰 플레이트(well plate)로 옮겨 증식시킨 후 세포수가 증가하면 각 세포군을 수득(harvest)하여 웨스턴 블로팅 방법을 이용하여 유전자가 세포 내로 들어가 기능을 발휘하는 세포군만을 선별하였다. 2 종류의 서로 다른 세포주에서 지속적으로 멜라놉신 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있다(도 2).
- [0086] 지속적으로 멜라놉신을 발현하는 세포주를 "mela-3T3"라 명명하고, 기탁기관 한국세포주 연구재단에 2011년 6월 3일자로 기탁하고, 기탁번호 KCLRF-BP-00268을 부여받았다.
- [0087] 또한, 도 3은 상기 형질전환 세포주를 배양할 때 all-trans 형의 레티날을 첨가하면 인간 멜라놉신 단백질의 발현양이 현저히 증가한다는 것을 웨스턴 블로팅 방법으로 확인한 결과이다. 형질 전환하지 않은 세포를 control로 하여, 비교해 본 결과, 도 1의 발현 벡터를 형질전환한 세포주의 경우 멜라놉신 단백질이 발현되는 것을 확인하였고, 이는 발색단으로 작용하는 all-trans 형의 레티날을 첨가하였을 때 현저한 증가를 보였다.
- [0088] 본 실험의 웨스턴 블로팅 방법은 다음과 같다. 수득한 각 세포군에서 단백질을 추출 후, Mini-PROTEAN II, III Electrophoresis Cell (Bio-Rad, 미국)장치를 이용하여 전기영동을 하였다. 8%의 분리용 젤 [아크릴아마이드 (29.6%)/비스아크릴아마이드 (0.4%) stock, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), 10% (w/v) SDS, N,N,N,N-tetramethylethylenediamine (TEMED, Sigma, USA), 25% (w/v) ammonium persulfate (APS, Qbiogene)]과 스테킹 젤 [아크릴아마이드 (29.2%)/비스아크릴아마이드 (0.8%) stock, 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8), 10% (w/v) SDS, 25% (w/v) APS, TEMED]을 사용하여 전기영동을 실행하였다. 전기영동이 끝난 뒤 1 x Blot transfer buffer (0.05 M Tris, 0.04 M glycine)에 미리 수화시켜둔 Trans-Blot Transfer Medium (니트로셀룰로오즈 막, 0.45 µm, Bio-Rad, 미국)를 Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, 미국)에 올려놓고 그 위에 젤을 올린 뒤 24 V로 20분간 이동 시켰다. 5% Blocking 용액 (Dry milk [Blotting grade blocker non fat dry milk, Bio-Rad, 미국], 1 x TBST)로 막에 30분 동안 반응 시킨 다음 Anti-FLAG antibody (Sigma, USA)를 1:5,000 비율로 주입하여 10시간 동안 반응 시켰다. 반응 후 1 x TBST으로 5분씩 6번 씻어주었으며, Blocking 용액에 Anti-mouse-HRP (Santacruz, 미국)를 주입하여 1시간 반응시키고 다시 1 x TBST로 같은 방법으로 씻어주었다. 이 후, 암실에서 ECL reagent (Amersham Pharmacia, Little Chalfont, Buckinghamshire, 영국) 용액 1, 용액 2를 1:1로 섞어서 막에 3 분간 반응시키고 Hyper film 카세트에 넣고 암 상태에서 막위에 X-ray 필름을 올려놓고 5분, 10분간 반응시킨 다음 필름 현상기를 이용하여 현상하였다.
- [0089] *일주기 리듬 관련 유전자의 스크리닝*
- [0090] 상기 배양법과 동일한 조건으로 형질전환 세포주를 이틀 이상 배양하였다. 이들 세포를 FBS가 안 들어있는 배지 (serum-free 배지)로 옮긴 다음 두 시간 배양한 후 배지에 50% 말 혈청(GIBCO, 미국)을 첨가하였다. 혈청 쇼크(Serum shock) 두 시간 경과 후 배양액을 FBS가 들어간 정상배지로 교체하고 세포를 한 시간정도 더 키운 다음, 매 4시간 간격으로 6회 세포를 수득하였다. 이렇게 수거한 세포에 트라이졸 시약(Sigma, 미국)을 첨가하여 표준방법으로 이들의 총 RNA를 분리 정제하였다. 프라임스크립트 1st strand cDNA 합성 키트(다카라바이오, 중국)를 사용하여 총 RNA 1 µg을 cDNA로 변환하였다. 이들을 주형으로 StepOnePlus

system(Applied Biosystems, 미국)을 이용한 실시간 PCR(95℃ 15초, 60℃ 30초, 72℃ 30초의 조건으로 연속된 순환 반응을 40회 반복)을 수행하여 일주기리듬 유전자를 확인하였다.

[0091] 그 결과, 상기 형질전환 세포주를 배양하여 all-trans 형의 레티날 유무시 세포주기에 관련된 다양한 유전자의 단백질 발현정도를 웨스턴 블로팅 방법으로 확인한 결과이다(도 4).

[0092] PCR에 사용한 프라이머쌍의 염기서열은 다음과 같다(F:Forward, R:Reverse):

[0093] β -Actin(F) 5' '-TTT TCC AGC CTT CCT TCT TGG G-3'

[0094] β -Actin(R) 5' '- TGT GTT GGC ATA GAG GTC TTT ACG G-3'

[0095] mPer1(F) 5' -GGA CAG CAT CCT CAG GTA TTT-3'

[0096] mPer1(R) 5' -GCC CTC TGC TTG TCA TCA TC-3'

[0097] mPer2(F) 5' -CAA AGG CAC CTC CAA CAT G-3'

[0098] mPer2(R) 5' -AAA GTA TTT GCT GGT GTG ACT TG-3'

[0099] mBmal1(F) 5' -ATT CCA GGG GGA ACC AGA G-3'

[0100] mBmal1(R) 5' -CCC TCC ATT TAG AAT CTT CTT GC-3'

[0101] mCry1(F) 5' -CTG GCG TGG AAG TCA TCG T-3'

[0102] mCry1(R) 5' -CTG TCC GCC ATT GAG TTC TAT G-3'

[0103] mRev-erba(F) 5' -TGC AGG CTG ATT CTT CAC AC-3'

[0104] mRev-erba(R) 5' -AGC CCT CCA GAA GGG TAG GA-3'

[0105] mDbp(F) 5' -ACC GTG GAG GTG CTA ATG AC-3'

[0106] mDbp(R) 5' -AAG TCT CAT GGC CTG GAA TG-3'

[0107] 참고문헌

[0108] 1. Hastings, M.H., O'Neill, J.S., and Maywood, E.S. (2007) Circadian clocks: regulators of endocrine and metabolic rhythms. *J. Endocrinol.* 195, 187-198.

[0109] 2. Reppert, S.M. and Weaver, D.R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 418, 935-941.

[0110] 3. Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, L., Tronche, F., Kellendonk, C., Reichardt, H.M., Schutz, G., and Schibler, U. (2000) Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289, 2344-2347.

[0111] 4. Rusak, B. and I. Zucker. (1979) Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol. Rev.* 59, 449-526.

[0112] 5. Fahrenkrug, J., Hannibal, J., and Georg, B. (2008) Diurnal rhythmicity of the canonical clock genes Per1, Per2 and Bmal1 in the rat adrenal gland is unaltered after hypophysectomy. *J. Neuroendocrinol.* 20, 323-329.

[0113] 6. Son, G.H., Chung, S., Choe, H.K., Kim, H-D., Baik, S-M., Lee, H., Lee, H-W., Choi, S., Sun, W., Kim, H., Cho., S., Lee, K.H., and Kim, K. (2008). Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 20970-20975.

[0114] 7. Bunger, M.K., Wilsbacher, L.D., Moran, S.M., Clendenin, C., Radcliffe, L.A., Hogenesch, J.B., Simon, M.C., Takahashi, J.S., and Bradfield, C.A. (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* 103, 1009-1017.

[0115] 8. Bae, K., Jin, X., Maywood, E.S., Hastings, M.H., Reppert, S.M., and Weaver, D.R. (2001)

Differential functions of mPer1, mPer2 and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron* 30, 525-536.

- [0116] 9. DeBruyne, J.P., Weaver, D.R., and Reppert, S.M. (2007) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nat. Neurosci.* 10, 543-545.
- [0117] 10. Reddy, A.B., Karp, N.A., Maywood, E.S., Sage, E.A., Deery, M., O' Neill, J.S., Wong, G.K., Chesham, J., Odell, M., Lilley, K.S., Kyriacou, C.P., and Hastings, M.H. (2006) Circadian orchestration of the hepatic proteome. *Curr. Biol.* 16, 1107-1115.
- [0118] 11. Brooke, H.M., Erin, L., McDearmon, Satchidananda, P., Kevin, R.H., Jie, Zhang, Jessica, L.A., Marina P.A., John R.W., Karyn, A.E. John, B.H., and Joseph, S., Takahashi. (2007) Circadian and CLOCK-controlled regulation of the mouse transcriptome and cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3324-3347.
- [0119] 12. Canaple, L., Kakizawa, T., and Laudet, V. (2003) The days and nights of cancer cells. *Cancer Res.* 63, 7545-7552.
- [0120] 13. Ishida, N. (2007) Circadian clock, cancer and lipid metabolism. *Neurosci. Res.* 57, 483-490.
- [0121] 14. Gery, S. and Koeffler, H.P. (2007) The role of circadian regulation in cancer. *CSH Symp. Quant. Biol.* 72, 459-464.
- [0122] 15. Levi, F., Filipski, E., Iurisci, I., Li, X.M., and Innominato, P. (2007) Cross-talks between circadian timing system and cell division cycle determine cancer biology and therapeutics. *CSH Symp. Quant. Biol.* 72, 465-475.
- [0123] 16. Antoch, M.P., Gorbacheva, V.Y., Vykhovanets, O., Toshkov, I.A., Kondratov, R.V., Kondratova, A.A., Lee, C., and Nikitin, A.Y. (2008) Disruption of the circadian clock due to the Clock mutation has discrete effects on aging and carcinogenesis. *Cell Cycle* 7, 1197-1204.
- [0124] 17. Yang, W.S. and Stockwell, B.R. (2008) Inhibition of casein kinase I-epsilon induces cancer-cell-selective, PERIOD2-dependent growth arrest. *Genome Biol.* 9, R92.1-13.
- [0125] 18. Fu, L., Pelicano, H., Liu, J., Huang, P., and Lee, C. (2002) The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell* 111, 41-50.
- [0126] 19. Collis, S.J. and Boulton, S.J. (2007) Emerging links between the biological clock and the DNA damage response. *Chromosoma* 116, 331-339.
- [0127] 20. Oklejewicz, M., Destici, E., Tamanini, F., Hut, R.A., Janssens, R., and van der Horst, G.T.J. (2008) Phase resetting of the mammalian circadian clock by DNA damage. *Curr. Biol.* 18, 286-291.
- [0128] 21. Granda, T.G., Liu, X.H., Smaaland, R., Cermakian, N., Filipski, E., Sassone-Corsi, P., and Levi, F. (2005) Circadian regulation of cell cycle and apoptosis proteins in mouse bone marrow and tumor. *FASEB J.* 19, 304-306.
- [0129] 22. Yu, C.J., Gao, y., Li, P., and Li, L., (2007) Synchronizing multiphasic circadian rhythms of rhodopsin promoter expression in rod photoreceptor cells. *JEB.* 210, 676-684
- [0130] 23. Spudich, J.L., Yang, C.S., Jung, K.H., and Spudich, E.N. (2000) Retinylidene proteins: Structures and functions from Archaea to humans. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16, 365-392.
- [0131] 24. Melyan, Z., Tarttelin, E.E., Bellingham, J., Lucas, R.J., and Hankins, M.W. (2005) Addition of human melanopsin renders mammalian cells photoresponsive. *Nature* 433, 741-745.
- [0132] 25. Panda, S., Nayak, S.K., Campo, B., Walker, J.R., Hogenesch, J.B., and Jegla, T. (2005) Illumination of the melanopsin signaling pathway. *Science* 307, 600-604.
- [0133] 26. Jasser, S.A., Blask, D.E., and Brainard, G.C. (2006) Light during darkness and cancer: relationships in circadian photoreception and tumor biology. *Cancer Causes Control* 17, 515-523.
- [0134] 27. Panda, S., Sato, T.K., Castrucci, A.M., Rollag, M.D., DeGrip, W.J., Hogenesch, J.B., Provencio,

I., Kay, S.A. (2002) Melanopsin (Opn4) Requirement for Normal Light-Induced Circadian Phase Shifting. Science 298 (5601): 2213-2216

- [0135] 28. Peirson, S.N., Oster, H., Jones, S.L., Leitges, M., Hankins, M.W., and Foster, R.G. (2007) Microarray analysis and functional genomics identify novel components of melanopsin signaling. Curr. Biol. 17, 1363-1372.
- [0136] 29. Davis, S., Mirick, D.K., and Stevens, R.G. (2001) Night shift work, light at night, and risk of breast cancer. J. Natl. Cancer Inst. 93, 1557-1562.
- [0137] 30. Schernhammer, E.S., Laden, F., Speizer, F.E., Willett, W.C., Hunter, D.J., Kawachi, I., and Colditz, G.A. (2001) Rotating night shifts and risk of breast cancer in women participating in the nurses' health study. J. Natl Cancer Inst. 93, 1563-1568.
- [0138] 31. Blask, D.E., Sauer, L.A., and Dauchy, R.T. (2002) Melatonin as a chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical, and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. Curr. Top. Med. Chem. 2, 113-132.
- [0139] 32. Stevens, R.G. (2005) Circadian disruption and breast cancer: from melatonin to clock genes. Epidemiology 16, 254-258.

수탁번호

[0140]

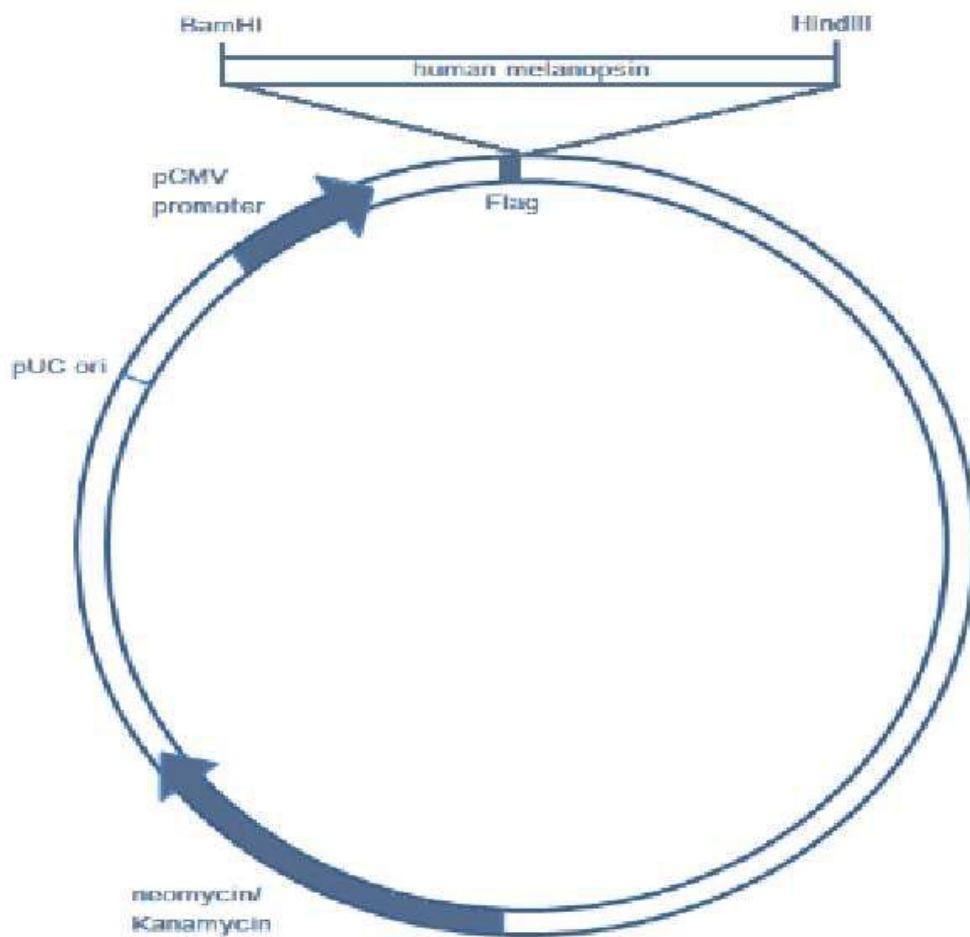
기탁기관명 : 한국세포주연구재단

수탁번호 : KCLRFBP00268BP

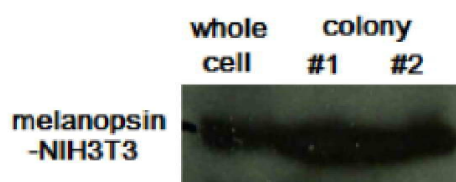
수탁일자 : 20110603

도면

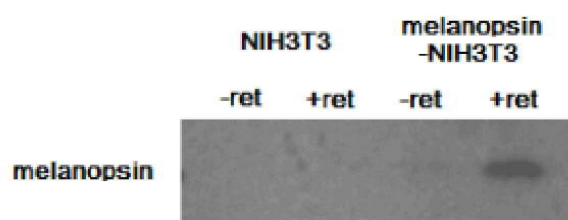
도면1



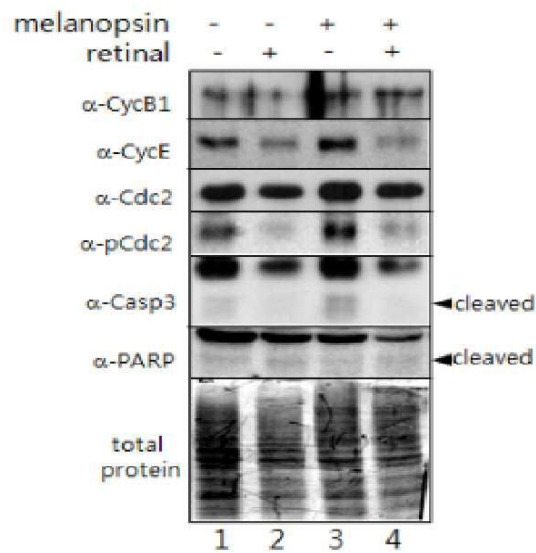
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Sogang University
- <120> Transformed Cell Lines Expressing Human Melanopsin and Methods for Screening Circadian Rhythm-Related Biomolecules Using the Same
- <130> PN110200
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1470
- <212> DNA
- <213> Human
- <220><221> CDS
- <222> (1)..(1467)
- <400> 1

atg aac cct cct tcg ggg cca aga gtc ccg ccc agc cca acc caa gag 48
Met Asn Pro Pro Ser Gly Pro Arg Val Pro Pro Ser Pro Thr Gln Glu

1 5 10 15
ccc agc tgc atg gcc acc cca gca cca ccc agc tgg tgg gac agc tcc 96
Pro Ser Cys Met Ala Thr Pro Ala Pro Pro Ser Trp Trp Asp Ser Ser

20 25 30
cag agc agc atc tcc agc ctg ggc cgg ctt cca tcc atc agt ccc aca 144

Gln Ser Ser Ile Ser Ser Leu Gly Arg Leu Pro Ser Ile Ser Pro Thr	
35 40 45	
gca cct ggg act tgg gct gct gcc tgg gtc ccc ctc ccc acg gtt gat	192
Ala Pro Gly Thr Trp Ala Ala Ala Trp Val Pro Leu Pro Thr Val Asp	
50 55 60	
gtt cca gac cat gcc cac tat acc ctg ggc aca gtg atc ttg ctg gtg	240
Val Pro Asp His Ala His Tyr Thr Leu Gly Thr Val Ile Leu Leu Val	
65 70 75 80	
gga ctc acg ggg atg ctg ggc aac ctg acg gtc atc tat acc ttc tgc	288
Gly Leu Thr Gly Met Leu Gly Asn Leu Thr Val Ile Tyr Thr Phe Cys	
85 90 95	
aga gct gtg ctt cgt gga gtc act gtg atg atg cag agc aga agc ctc	336
Arg Ala Val Leu Arg Gly Val Thr Val Met Met Gln Ser Arg Ser Leu	
100 105 110	
cgg aca cct gcc aac atg ttc att atc aac ctc gcg gtc agc gac ttc	384
Arg Thr Pro Ala Asn Met Phe Ile Ile Asn Leu Ala Val Ser Asp Phe	
115 120 125	
ctc atg tcc ttc acc cag gcc cct gtc ttc ttc acc agt agc ctc tat	432
Leu Met Ser Phe Thr Gln Ala Pro Val Phe Phe Thr Ser Ser Leu Tyr	
130 135 140	
aag cag tgg ctc ttt ggg gag aca ggc tgc gag ttc tat gcc ttc tgt	480
Lys Gln Trp Leu Phe Gly Glu Thr Gly Cys Glu Phe Tyr Ala Phe Cys	
145 150 155 160	
gga gct ctc ttt ggc att tcc tcc atg atc acc ctg acg gcc atc gcc	528
Gly Ala Leu Phe Gly Ile Ser Ser Met Ile Thr Leu Thr Ala Ile Ala	
165 170 175	
ctg gac cgc tac ctg gta atc aca cgc ccg ctg gcc acc ttt ggt gtg	576
Leu Asp Arg Tyr Leu Val Ile Thr Arg Pro Leu Ala Thr Phe Gly Val	
180 185 190	
gcg tcc aag agg cgt gcg gca ttt gtc ctg ctg ggc gtt tgg ctc tat	624
Ala Ser Lys Arg Arg Ala Ala Phe Val Leu Leu Gly Val Trp Leu Tyr	

195	200	205	
gcc ctg gcc tgg agt ctg cca ccc ttc ttc ggc tgg agc gcc tac gtg			672
Ala Leu Ala Trp Ser Leu Pro Pro Phe Phe Gly Trp Ser Ala Tyr Val			
210	215	220	
ccc gag ggg ttg ctg aca tcc tgc tcc tgg gac tac atg agc ttc acg			720
Pro Glu Gly Leu Leu Thr Ser Cys Ser Trp Asp Tyr Met Ser Phe Thr			
225	230	235	240
ccg gcc gtg cgt gcc tac acc atg ctt ctc tgc tgc ttc gtg ttc ttc			768
Pro Ala Val Arg Ala Tyr Thr Met Leu Leu Cys Cys Phe Val Phe Phe			
245	250	255	
ctc cct ctg ctt atc atc atc tac tgc tac atc ttc atc ttc agg gcc			816
Leu Pro Leu Leu Ile Ile Ile Tyr Cys Tyr Ile Phe Ile Phe Arg Ala			
260	265	270	
atc cgg gag aca gga cgg gct ctc cag acc ttc ggg gcc tgc aag ggc			864
Ile Arg Glu Thr Gly Arg Ala Leu Gln Thr Phe Gly Ala Cys Lys Gly			
275	280	285	
aat ggc gag tcc ctg tgg cag cgg cag cgg ctg cag agc gag tgc aag			912
Asn Gly Glu Ser Leu Trp Gln Arg Gln Arg Leu Gln Ser Glu Cys Lys			
290	295	300	
atg gcc aag atc atg ctg ctg gtc atc ctc ctc ttc gtg ctc tcc tgg			960
Met Ala Lys Ile Met Leu Leu Val Ile Leu Leu Phe Val Leu Ser Trp			
305	310	315	320
gct ccc tat tcc gct gtg gcc ctg gtg gcc ttt gct ggg tac gca cac			1008
Ala Pro Tyr Ser Ala Val Ala Leu Val Ala Phe Ala Gly Tyr Ala His			
325	330	335	
gtc ctg aca ccc tac atg agc tcg gtg cca gcc gtc atc gcc aag gcc			1056
Val Leu Thr Pro Tyr Met Ser Ser Val Pro Ala Val Ile Ala Lys Ala			
340	345	350	
tct gca atc cac aac ccc atc att tac gcc atc acc cac ccc aag tac			1104
Ser Ala Ile His Asn Pro Ile Ile Tyr Ala Ile Thr His Pro Lys Tyr			
355	360	365	

agg gtg gcc att gcc cag cac ctg ccc tgc ctg ggg gtg ctg ctg ggt 1152

Arg Val Ala Ile Ala Gln His Leu Pro Cys Leu Gly Val Leu Leu Gly

370 375 380

gta tca cgc cgg cac agt cgc ccc tac ccc agc tac cgc tcc acc cac 1200

Val Ser Arg Arg His Ser Arg Pro Tyr Pro Ser Tyr Arg Ser Thr His

385 390 395 400

cgc tcc acg ctg acc agc cac acc tcc aac ctc agc tgg atc tcc ata 1248

Arg Ser Thr Leu Thr Ser His Thr Ser Asn Leu Ser Trp Ile Ser Ile

405 410 415

cgg agg cgc cag gag tcc ctg ggc tcg gag agt gag gtg ggc tgg aca 1296

Arg Arg Arg Gln Glu Ser Leu Gly Ser Glu Ser Glu Val Gly Trp Thr

420 425 430

cac atg gag gca gca gct gtg tgg gga gct gcc cag caa gca aat ggg 1344

His Met Glu Ala Ala Ala Val Trp Gly Ala Ala Gln Gln Ala Asn Gly

435 440 445

cgg tcc ctc tac ggt cag ggt ctg gag gac ttg gaa gcc aag gca ccc 1392

Arg Ser Leu Tyr Gly Gln Gly Leu Glu Asp Leu Glu Ala Lys Ala Pro

450 455 460

ccc aga ccc cag gga cac gaa gca gag act cca ggg aag acc aag ggg 1440

Pro Arg Pro Gln Gly His Glu Ala Glu Thr Pro Gly Lys Thr Lys Gly

465 470 475 480

ctg atc ccc agc cag gac ccc agg atg tag 1470

Leu Ile Pro Ser Gln Asp Pro Arg Met

485

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> meIF

<400> 2

gcactcggat ccatgaaccc tccttcgggg cc 32

<210> 3

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> meIR

<400> 3

gcactcaagc ttcatacctgg ggtcctggct ggggatcagc cccttggctc tccctggagt 60

ctctgcttcg 70