



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0105980
(43) 공개일자 2012년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/395 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01)

A61P 3/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0023765

(22) 출원일자 2011년03월17일

심사청구일자 2011년03월17일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

이상열

경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 삼환나우빌 101동 1801호 (주약동)

이균오

경상남도 진주시 내동로348번길 10, 가좌 주공그린빌아파트 109동 304호 (가좌동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동완

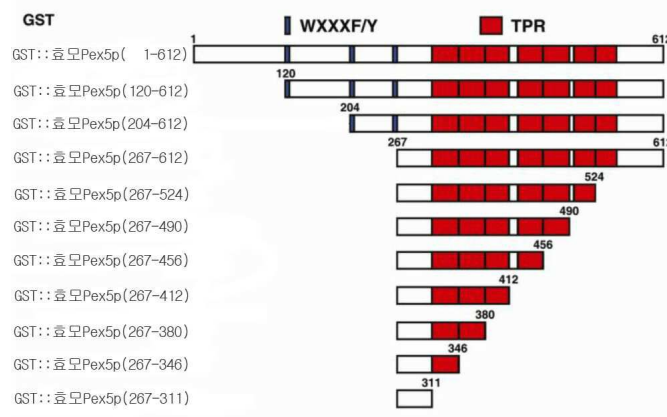
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **퍼옥시좀 목표 시그널 1-특이 분자 샤프론으로 작용하는 효모 Pex5p 단백질**

(57) 요약

본 발명은 퍼옥시좀 목표 시그널 1(PTS1)-특이 분자 샤프론으로 작용하는 효모 Pex5p 단백질에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 퍼옥시좀 목표 시그널 1(PTS1) 단백질의 유입 수용체 및 분자 샤프론으로 작용하는 다양한 분자량 형태를 지닌 효모 Pex5p 단백질에 관한 것이다. 또한 효모 Pex5p 단백질의 분자 샤프론 기능을 활용한 Zellweger 증후군, 신생상형 부신백질장애 및 영아형 레프슈병과 같은 대사 질환 치료용 의약 조성물을 제공하는 것이다.

대표도 - 도4a



(72) 발명자

김외연

경상남도 진주시 내동면 순환로 425-61, 남강휴먼 빌 106동 802호

정영준

경상남도 진주시 향교로109번길 6-2, 3층 (옥봉동)

이선용

경상남도 진주시 호탄길14번길 9, 이룸빌 102호 (호탄동)

채호병

경상남도 진주시 서장대로385번길 9 (인사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SSAC-2011

부처명 교육과학기술부, 농촌진흥청

연구사업명 국가핵심연구센터 사업, 시스템합성농생명공학사업

연구과제명 환경재내 내성 식물유전체 연구, 식물바이오소재생산 플랫폼 구축을 위한 시스템생물학 원천기술개발

주관기관 경상대학교

연구기간 2010.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호:1의 아미노산 서열을 지니는 효모 Pex5p 단백질에 있어서, 상기 효모 Pex5p 단백질은 3개의 WXXXF/Y 모티프(상기 모티프에서 W는 트립토판, F는 페닐알라닌, Y는 타이로신을 의미하며 X는 임의의 아미노산을 의미한다)와 7개의 TPR 도메인을 지니고 상기 효모 Pex5p 단백질의 분자 샤프론 활성은 아미노산 잔기 267 내지 412에 위치한 3개의 TPR 도메인을 통해 이루어짐을 특징으로 하는 효모 Pex5p 단백질

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 효모 Pex5p 단백질은 정상 조건에서 모노머, 테트라머 또는 헵타머의 올리고머 상태의 저분자량 상태로 존재하나, 열 충격하에서 고분자량의 콤플렉스로 변환되어 퍼옥시좀 목표 시그널 1 단백질에 특이적인 분자 샤프론으로 작용함을 특징으로 하는 효모 Pex5p 단백질

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 효모 Pex5p 단백질은 퍼옥시좀 목표 시그널 1-특이적 유입 수용체로 작용함을 특징으로 하는 효모 Pex5p 단백질

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 효모 Pex5p 단백질의 분자 샤프론 기능은 열 충격으로부터 퍼옥시좀 목표 시그널 1 단백질의 열 저항성을 부여함으로써 효모의 생존능을 증진시킴을 특징으로 하는 효모 Pex5p 단백질

청구항 5

제 1항의 효모 Pex5p 단백질의 분자 샤프론 기능을 활용한 젤웨거(Zellweger) 증후군, 신생상형 부신백질장애(neonatal adrenoleukodystrophy, (NALD)) 및 영아형 레프숨병(infantile Refsum disease, (IRD))과 같은 대사 질환 치료용 의약 조성물

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 퍼옥시좀 목표 시그널 1(PTS1)-특이 분자 샤프론으로 작용하는 효모 Pex5p 단백질에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 퍼옥시좀 목표 시그널 1(PTS1) 단백질의 유입 수용체 및 분자 샤프론으로 작용하는 다양한 분자량 형태를 지닌 효모 Pex5p 단백질에 관한 것이다.

[0002]

더욱 상세하게는 상기 효모 Pex5p 단백질은 정상 조건에서 모노머, 테트라머 또는 헵타머의 올리고머 저분자량 상태로 존재하나 열충격하에서 고분자량의 콤플렉스로 변환되어 퍼옥시좀 목표 시그널 1 단백질에 특이적인 분자 샤프론으로 작용하고 또한 상기 효모 Pex5p 단백질은 열 충격-처리된 세포가 정상 조건으로 되돌아올 때 효모 Pex5p의 고분자량 콤플렉스는 열충격 이전의 저분자량 수준으로 되돌아감으로써 효모 Pex5p의 샤프론 활성을 통해 효모의 열충격 저항성과 세포 생존능을 증진시킴을 특징으로 하는 효모 Pex5p 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 유기체는 성장에 대한 상한 임계치를 초과하는 온도와 다양한 화학물질의 자극과 같은 세포내 단백질의 자연적 입체형태(native conformation)를 파괴시키는 적대적 노출에 대한 보호의 메커니즘으로서 스트레스 대응 반응을 발달 진화시켜 왔다.
- [0004] 이러한 스트레스 대응 반응의 전형적 특징은 열 충격 단백질(HSPs)의 열 충격-유도 합성이다. 다수의 유기체에서 후천적 열-저항성이 세포내 HSPs의 이 급격한 증가와 직접적으로 관련이 있으며, 이 중 상당수는 분자 샤프론으로서의 역할을 하고 저분자량에서부터 고분자량 콤플렉스까지의 광범위한 분자량에 걸쳐서 존재한다. 펼쳐진 세포 중간체(unfolded cellular intermediates)와 분자 샤프론의 상호작용은 세포 활성화 과정에서 중요한 역할을 하며, 외인성 스트레스로부터 불안정한 요소의 보호, 단백질 폴딩 및 성숙, 세포내 소기관으로의 단백질 트랜스로케이션, DNA 복제 및 전사, 손상되거나 잘못 접힌(misfolded) 단백질의 분해 및 면역 반응을 포함한다.
- [0005] 최근 HSPs 외에 샤프론 서브-패밀리가 확인되었다. 이들은 티오레독신(Trx) , Trx 환원효소, HSP33, 단백질 디설파이드 환원효소 및 2-Cys 퍼옥시레독신(Prxs)과 같은 단백질을 포함한다. 효모에서 2-Cys Prxs와 아라비도시스 단백질 TDX는 열 충격과 라디칼 스트레스에 대응하여 저분자량에서부터 고분자량 콤플렉스까지의 구조적 변화를 나타낸다. 이 형태 이동(conformational shift)과 함께, 2-Cys Prxs는 과산화효소에서부터 분자 샤프론까지의 기능적 변화를 나타낸다.
- [0006] 상기와 같은 새로운 연구에 비추어 본 발명자들은 유사한 조절 메커니즘을 공유하는 효모 추출물 내의 추가적인 열 충격-유도 고분자량 단백질 콤플렉스에 관한 스크리닝을 행하였다. 또한 본 발명자들은 사카로마이세스 세레비지에 Pex5p(효모 Pex5p)가 열 충격 조건 하에서 고분자량 구조로 변화하는 매우 열-안정한 단백질이라는 것을 확인하였다.
- [0007] 효모 Pex5p는 퍼옥시좀 생합성 동안 퍼옥시좀 목표 시그널 1(PTS1)-타입 단백질에 관한 특이적 유입(import) 수용체이다. 효모 Pex5p는 단백질-단백질 상호작용 및 멀티-단백질 콤플렉스의 형성을 매개하는 테트라트리고펩티드 반복(tetratricopeptide repeat, TRP) 모티프, 구조적 모티프의 몇몇 카피를 포함하며, 이는 Hip, STI1, Cyp40, FKBP52 및 Tpr2 과 같은 분자 샤프론의 전형적인 특징이다. 샤프론 단백질은 미토콘드리아 막, 플라스미드 막 및 핵막, 소포체막을 포함하는 많은 세포내 막을 통해 단백질 수송에 중요한 역할을 한다.
- [0008] 분자 샤프론은 퍼옥시좀 매트릭스 단백질의 트랜스로케이션과 관련되어 있다. 이 가설은 두 개의 중요한 관찰에 의해 지지된다: 1) 열-처리된 호박 조직으로부터 분리된 퍼옥시좀은 증진된 퍼옥시좀 단백질 수송을 나타낸다; 및 2) 포유류 퍼옥시좀으로의 매트릭스 단백질의 트랜스로케이션은 시토졸 프랙션의 첨가에 의해 상승되었다.
- [0009] 본 발명자들은 본 발명의 실험을 통해 효모 Pex5p 단백질의 유전학 및 생화학 분석을 통해 PTS1-타입 단백질에 관한 유입 수용체로 알려진 효모 Pex5p 단백질은 열 충격-유도 변성으로부터 퍼옥시좀 매트릭스 단백질을 보호하기 위해 PTS1-특이적 분자 샤프론으로 작용한다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명은 효모 Pex5p 단백질의 이 새로운 분자 샤프론 기능과 열 충격 스트레스에 대한 저항성을 저분자량의 효모 Pex5p 상태에서 고분자량의 효모 Pex5p 상태로 변화시킴으로써 퍼옥시좀 매트릭스 단백질의 열충격 저항성을 증진시킴을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명이 해결하고자하는 과제는 효모 Pex5p 단백질의 유전학 및 생화학 분석을 통해 PTS1-타입 단백질에 관한 유입 수용체로 알려진 효모 Pex5p 단백질은 열 충격-유도 변성으로부터 퍼옥시좀 매트릭스 단백질을 보호하기 위해 PTS1-특이적 분자 샤프론으로 작용하는지 여부를 측정코자 한 것이다. 또한 효모 Pex5p 단백질의 이 새로운 분자 샤프론 기능과 열 충격 스트레스에 대한 저항성을 저분자량의 효모 Pex5p 상태에서 고분자량의 효모 Pex5p 상태로 변화시킴으로써 퍼옥시좀 매트릭스 단백질의 열충격 저항성을 증진시키는지 여부를 측정코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 목적은 서열번호:1의 아미노산 서열을 지니는 효모 Pex5p 단백질에 있어서, 상기 효모 Pex5p 단백질은 3개의 WXXX/Y 모티프(상기 모티프에서 W는 트립토판, F는 페닐알라닌, Y는 타이로신을 의미하며 X는 임의의 아미노산을 의미한다)와 7개의 TPR 도메인을 지니고 상기 효모 Pex5p 단백질의 분자 샤프론 활성은 아미노산 잔기 267 내지 412에 위치한 3개의 TPR 도메인을 통해 이루어짐을 특징으로 하는 효모 Pex5p 단백질을 제공하는 것이다.
- [0012] 이때 상기 효모 Pex5p 단백질은 정상 조건에서 모노머, 테트라머 또는 헵타머의 올리고머 상태의 저분자량 상태로 존재하나, 열 충격하에서 고분자량의 콤플렉스로 변환되어 퍼옥시좀 목표 시그널 1 단백질에 특이적인 분자 샤프론으로 작용함을 특징으로 한다.
- [0013] 또한 상기 효모 Pex5p 단백질은 퍼옥시좀 목표 시그널 1-특이적 유입 수용체로 작용함을 특징으로 한다.
- [0014] 한편 상기 효모 Pex5p 단백질의 분자 샤프론 기능은 열 충격으로부터 퍼옥시좀 목표 시그널 1 단백질의 열 저항성을 부여함으로써 효모의 생존능을 증진시킴을 특징으로 한다.
- [0015] 본 발명의 또다른 목적은 상기 효모 Pex5p 단백질의 분자 샤프론 기능을 활용한 Zellweger(Zellweger) 증후군, 신생상형 부신백질장애(neonatal adrenoleukodystrophy, (NALD)) 및 영아형 레프숨병(infantile Refsum disease, (IRD))과 같은 대사 질환 치료용 의약 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 효과는 효모 Pex5p 단백질의 유전학 및 생화학 분석을 통해 PTS1-타입 단백질에 관한 유입 수용체로 알려진 효모 Pex5p 단백질은 열 충격-유도 변성으로부터 퍼옥시좀 매트릭스 단백질을 보호하기 위해 PTS1-특이적 분자 샤프론으로 작용함을 제공하는 것이다. 또한 효모 Pex5p 단백질의 이 새로운 분자 샤프론 기능과 열 충격 스트레스에 대한 저항성을 저분자량의 효모 Pex5p 상태에서 고분자량의 효모 Pex5p 상태로 변화시킴으로써 퍼옥시좀 매트릭스 단백질의 열충격 저항성을 증진시킴을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 효모 Pex5p, 퍼옥시좀 유입 수용체 높은 효율의 분자 샤프론으로서 기능하는 것을 나타낸 것이다.
- 도 1a는 소수성은 EXPASY 프로그램을 사용하여 가상실험에서 분석되었으며 도 1b는 효모 Pex5p 장애의 정도는 IUPred 프로그램을 사용하여 예견되었다. 도 1c, 도 1d 및 도 1e에서 효모 Pex5p의 샤프론 활성을 모델 기질(CS, MDH 및 인슐린)을 사용하여 측정하였다. 도 1c는 CS 기질을 45℃에서 20분 동안 다양한 농도의 효모 Pex5p에서 처리하여 측정된 활성이며 도 1d는 MDH 기질을 45℃에서 20분 동안 다양한 농도의 효모 Pex5p에서 기질의 열 응집 효과를 측정하였으며 도 1e는 25℃에서 10 mM DTT에 의한 인슐린의 화학적 응집 효과를 측정

하였다. 상기 시험에서 기질 대 효모 Pex5p의 몰 비율은 1:0.025 (○-○), 1:0.05 (◇-◇), 1:0.075 (△-△) 및 1:0.1 (□-□)이었다. GST 단독 및 2-Cys Prx는 음성 및 양성 대조군으로 사용되었다. 기질 대 대조군 단백질의 몰 비율은 각각 1:1 (●-●) 및 1:0.5 (◆-◆)이었다. 기질 응집은 340 nm(A₃₄₀)에서 광 산란에 의해 모니터링되었다. 시험 데이터는 적어도 세 개의 독립적 실험의 평균을 나타낸다.

도 2는 효모 Pex5p의 샤프론 기능이 단백질 구조와 밀접하게 관련되어 있는 것을 나타낸 것이다.

도 2a는 거의-균질하게 정제된 효모 Pex5p를 Superdex 200-10/300 GL 컬럼에 적용하여 수득된 획분을 세 개의 그룹 F-I, F-II 및 F-III으로 분리하였다. 도 2b는 SEC에 의해 수득된 획분을 10% 음성-PAGE (상부 패널) 또는 12% SDS-PAGE (하부 패널)에 의해 분리되었다. 단백질은 쿠마시 블루 염색에 의해 시각화되었다. 도 2a에서 크로마토그램상과 도 2b에서 Y-축 상의 숫자와 화살표는 분자량 표준을 나타낸다. 도 2c는 도 2a에서 분리된 단백질 획분(F-I, F-II 및 F-III)을 농축시켜 상기에 기술된 것처럼 SEC에 의해 다시 분리시킨다. 도 2d는 각각의 획분으로부터 단백질의 등량(Equal amount) 및 전체 용출물(전체)은 특이적 샤프론 활성에 관해서 측정하였다. 샤프론 활성은 전체 단백질과 관련하여 발현되었으며, 이는 투과전자현미경(TEM)에 의해 분석되었다. 도 2e, 도 2f 및 도 2g는 2% 우라닐 아세테이트로 음성 염색한 후 획분 F-I, F-II 및 F-III의 TEM 사진이다. 효모 Pex5p 콤플렉스의 다변수 통계적으로 분석되었다. 도 2f는 획분 F-I은 고유벡터-고유치를 기초로 하는 구-형태의 캡시드-유사 구조의 두 개의 클래스 평균으로 구성되었고 이는 비슷한 특징을 기초로 하여 그룹화되었다. 도 2g는 획분 F-II에서 효모 Pex5p의 헵타머 및 테트라머 환형 구조의 사진이다. 사진의 비대칭 클래스 평균은 721 순환적으로 정렬된 입자로부터 유도되었다. 스케일 바는 100 nm (도 2e), 30 nm (도 2f) 및 8 nm (도 2g)를 나타낸다.

도 3은 효모 Pex5p의 구조 및 샤프론 활성의 온도-의존적 변화를 나타낸 것이다.

도 3a는 효모 Pex5p에 30분 동안 다양한 온도에서 열 충격을 가하고 이에 따라 도 2a에 관해 기술된 것처럼 SEC에 의해 분석하였다. 도 3b는 효모 Pex5p의 열 충격-매개된 입체형태 변화를 TEM에 의해 분석하였다. 스케일 바는 50 nm를 나타낸다. 도 3c는 열 충격 후 효모 Pex5p의 샤프론 활성이 측정되었다. 활성은 25℃에서 배양된 효모 Pex5p과 관련되어 발현되었으며, 이것은 100%로 고정되었다. 도 3d 내지 도 3f는 효모 Pex5p의 열 충격-유도된 구조 변화를 분광법에 의해 분석하였다. 도 3d는 효모 Pex5p의 열 충격-유도된 구조 변화를 원-자외선 CD 분광법에 의해 측정하였다. 도 3e는 자연적 온도(25℃)와 열-처리된(55℃) 효모 Pex5p의 고유한 형광을 나타낸다. 여기 파장은 295 nm로 고정되었으며 방출 스펙트럼은 300-400 nm에서 얻어졌다. 도 3f는 효모 Pex5p의 소수성 특징의 변화는 프로브로서 비스-ANS를 사용하여 측정되었다. 샘플은 10 mM 인산나트륨 완충용액(pH 7.4)으로 제조되었으며 그 후 25℃ 또는 55℃에서 30분 동안 배양되었다. 데이터는 적어도 3개의 독립적 실험의 평균을 나타낸다.

도 4는 효모 Pex5p 샤프론 활성의 기능적 도메인 매핑을 나타낸 것이다.

도 4a는 GST와 융합된 효모 Pex5p 및 ScPex5 절단 돌연변이의 도식적 다이어그램 및 아미노산 범위를 나타낸 것이다. 빨강 및 파랑 박스는 각각 7개의 TPR 도메인 및 WXXXF/Y 펜타펩티드 모티프의 3개의 반복을 나타낸다. 도 4b는 재조합 효모 Pex5p는 *E. coli*에서 발현되었으며, 실험 절차에 기술된 것처럼 정제되었다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE에 의해 분리되었으며, 그 다음에 쿠마시 블루 염색에 의해 시각화되었다. 도 4c는 효모 Pex5p 절단 돌연변이의 샤프론 활성을 나타낸 것이다. 활성은 전체-길이 효모 Pex5p와 관련하여 발현되었으며 이것은 100%로 고정되었다. 데이터는 적어도 3개의 독립적 실험의 평균을 나타낸다.

도 5는 WT 및 $\Delta Scpex5$ 효모에서 퍼옥시좀으로의 모델 PTS1 기질, GFP-SKL의 수송 효율에 있어서 효모 Pex5ps의 효과를 나타낸 것이다.

도 5a는 WT 및 $\Delta Scpex5$ 효모는 GAL1 프로모터의 대조군 및 pRS415, pRS415-효모 Pex5p(1-612) 또는 pRS415-효모 Pex5p (1-346) 중 하나에 대해 GFP-SKL에 관한 발현 플라스미드와 함께 형질전환시켰다. 이는 효모 Pex5p 프로모터의 대조군 하에서 발현되었다. 형질전환된 세포는 갈락토오스가 없는 민감한 배지 상에서 2.0의 Abs₆₀₀까지 성장되었으며, 그 다음에 갈락토오스-포함 배지로 이동되었다. 배양 후 12-16시간에 수득된 세포가 형광 현미경 검사에 의해 측정되었다. 도 5b는 형광 퍼옥시좀을 지닌 세포의 수를 측정하였고 WT와 관련하여 발현되었고 이것은 100%로 고정되었다.

도 6은 열 충격에 대한 증진된 저항성을 위해 효모 Pex5p의 샤프론 기능이 요구된다는 것을 나타낸 것이다.

도 6a는 WT 및 $\Delta Scpex5$ 효모의 열 충격 저항성의 비교이다. 효모 Pex5p의 프로모터의 대조군과 함께 발현된

WT의 열저항성(1) pRS415-효모 Pex5p(1-612)의 열저항성(2) pRS415-효모 Pex5p(1-346)의 열저항성(3) 또는 pRS415의 열저항성(4)이 함께 형질전환된 스트레인 $\Delta Scpex5$ 으로 열 충격 저항성이 분석되었다. YPD 배지(5×10^7 세포/ml)에서 성장된 세포는 배양 기간 동안 45°C에서 배양되었다. 45°C에서 배양 전후에 생존 세포의 수는 생존율(%)을 계산하기 위해서 사용되었다. 도 6a에서 도면 내의 사진은 항-효모 Pex5p 항체를 사용한 전체 효모 추출의 면역 블롯 분석의 결과를 나타낸다. 도 6b는 효모에서 효모 Pex5p 올리고머 상태의 열 충격-의존적 가역 변화이다. 30°C에서 성장된 WT 효모(레인 1)는 30분 동안 45°C에서 열 충격을 받았다(레인 2). 열-처리 후, 세포는 최적 성장 온도로 복구되었으며, 1, 3, 6, 18 또는 24 시간 동안 배양되는 것이 허용되었다(레인 3-7). 열-처리된 세포로부터 시토졸 단백질($50\mu g$)이 자연-PAGE (상부 패널) 또는 SDS-PAGE (하부 패널) 후에 항-효모 Pex5p 항체를 사용하여 면역 블롯에 의해 분석되었다. 나타난 바와 같이, 세포는 시클로헥시미드, 단백질 번역의 억제제, 또는 MG132, 프로테아좀 억제제로 처리되었다.

도 7은 효모 Pex5p가 체내에서 PTS1 기질과 특이적으로 상호 작용한다는 것과 열 충격-유도된 변성으로부터 이들을 보호한다는 것을 나타낸다.

도 7a는 효모 Pex5p의 결합 특이성이 생체 내에서 BiFC를 사용하여 분석되었다. 효모는 N-YFP-CS-SKL, N-YFP-CS- Δ SKL, 또는 N-YFP-티올라아제와 함께 C-YFP-효모 Pex5p에 관한 발현 플라스미드와 함께 공동-형질전환되었으며, 연이어 세포는 30°C 또는 45°C에서 배양되었다. YFP의 C- 및 N-말단 부분의 상보성이 형광 현미경 검사에 의해 모니터링되었다. YFP 에피형광 및 상응하는 밝은 영역의 이미지는 각각 왼쪽 및 오른쪽 패널을 나타낸다. 도 7b 및 도 7c는 T7-태그-CS-SKL, -CS- Δ SKL 및 -티올라아제는 각각 pYES2-T7-태그-CS-SKL, pYES2-T7-태그-CS- Δ SKL 및 pYES2-T7-태그-티올라아제를 생성하기 위해서 pYES2 발현 벡터로 서브클론되었다. 나타난 바와 같이, *Scpex14* 및 *Scpex5*-결핍 효모 스트레인($\Delta Scpex14$ 및 $\Delta Scpex5$)은 T7-태그 기질에 관한 형질전환 벡터와 함께 형질전환되었다. 효모는 중기-지수증식기에서 성장되었으며, 그 다음에 두 부분으로 나뉘었다. 한 부분은 30분 동안 30°C에서 배양되었으며, 다른 부분은 30분 동안 45°C에서 열 충격을 받았다. 단백질의 동일한 양이 항-T7 항체를 사용하여 면역 블로팅에 의해 분석되었다. 면역 반응 밴드가 농도측정기(densitometry)에 의해 정량화되었으며, 용해성 단백질의 양은 전체 단백질과 관련하여 발현되었으며, 이것은 100%로 고정되었다. CS-SKL, 검은색 바; CS- Δ SKL, 회색 바; 티올라아제, 흰색 바.

도 8은 효모 Pex5p의 열 충격-의존적 구조 변화와 기능적 조절(functional regulation)을 나타내는 모식도이다. 이중-작용 PTS1-특이적 분자 샤프론 및 퍼옥시좀 매트릭스 단백질에 대한 유입 수용체의 모델을 나타낸 것이다.

정상 조건 하에서, 시토졸 효모 Pex5p는 모노머, 테트라머 및 헵타머로서 존재하며, 퍼옥시좀에 관한 PTS1-특이적 유입 수용체로서 대개 기능한다. 열 충격 조건 하에서, 효모 Pex5p는 저분자량 형태에서부터 고분자량 콤플렉스로 빠르게 변환되며 이는 PTS1-포함 기질의 변성을 예방하기 위해서 슈퍼-샤프론으로서 기능한다. 효모 Pex5p의 단백질 구조 및 기능적 변환은 가역적이다. 실선 및 점선은 각각 입증되거나 아직 가설적인 반응을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 퍼옥시좀 단백질은 기능적으로 후-번역된 완전히-폴드된(fully-folded) 상태에서 시토졸로부터 퍼옥시좀으로 유입된다. 퍼옥시좀 단백질 트랜스로케이션의 분자적 메커니즘은 잘 규명되어 있지 않다. 현재의 연구 결과는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) Pex5p(ScPex5p)는 저분자량 상태에서부터 고분자량의 콤플렉스 범위까지의 다양한 분자량 형태를 지니고 있다는 것과 분자 샤프론 뿐만 아니라 퍼옥시좀 목표 시그널 1(PTS1)-포함 단백질의 유입 수용체(import receptor)의 역할을 한다는 것이다.

[0019] 퍼옥시좀 목표 시그널 1(PTS1) 단백질은 특이적으로 퍼옥시좀으로 트랜스로케이션되며 효모 Pex5p에 의해 열 충격-유도 변성로부터 효과적으로 보호된다. 열 충격에 대응하여 형성된 고분자량 효모 Pex5p 콤플렉스는 효모 Pex5p의 저분자량류(species)와 비교해서 상당히 우수한 샤프론 활성을 지닌다. 열 충격-처리된 세포가 최적의 성장 조건으로 다시 되돌아 올 때, 효모 Pex5p의 고분자량 콤플렉스는 전-열 충격 이전의 저분자량 수준으로 되돌아가며 이는 효모 Pex5p 구조와 기능의 열 충격-유도된 변화는 생체 내에서 가역적으로 조절된다는 것을 의미한다. 효모 Pex5p의 샤프론 기능은 효모의 열 충격-저항성 및 세포 생존력을 현저하게 증진시켰다.

- [0020] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0021] 퍼옥시좀 생합성과 관련 있는 PTS1-특이적 유입 수용체인 효모 Pex5p는 분자 샤프론으로서 작용한다.
- [0022] 2-Cys Prxs에 대해 비슷한 형태로 조절되는 효모에서 단백질을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 열 충격에 대응하여 형성된 고분자량 단백질 콤플렉스에 관한 효모 추출물을 크기배제크로마토그래피(SEC) 및 매트릭스-관련 레이저 이탈 이온화 타임-오프-플라이트(MALDI-TOF)에 의해 스크리닝하였다. 분리된 단백질 중 하나는 퍼옥시좀 생합성 기능성 PTS1-특이적 유입 수용체인 고분자량 형태의 효모 Pex5p 이다. 효모 Pex5p는 두 개의 다른 도메인으로 구성되어 있으며, 이 중 하나는 7개의 TPR 모티프(TPR 도메인)를 포함하는 보존적 C-말단 도메인이고, 다른 하나는 3개의 펜타펩티드 반복(WXXXF/Y)을 포함하는 N-말단 도메인이다. TPR 도메인은 단백질-단백질 상호작용과 멀티-단백질 콤플렉스의 조립의 매개하는 중요한 역할을 하는 구조적 요소이며, 이 두 개의 특성은 분자 샤프론의 전형적인 특징이다. WXXXF/Y 모티프는 Pex13p과 Pex14p의 퍼옥시좀 막 단백질과 Pex5p의 상호작용을 매개하는 것을 나타낸다. 샤프론 단백질의 추가적 중요한 특징이 효모 Pex5p에서 확인되었다. 단백질은 별개의 소수성 및 친수성 도메인을 지니며 이는 부분적으로-변성된 기질의 용해성을 증가시킬 수 있고 단백질-단백질 상호작용 도메인으로서 작용한다.
- [0023] ProtScale 프로그램(<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>)을 사용하여 효모 Pex5p의 소수성 특성을 분석하였으며 아미노산 311과 550 사이에 위치한 효모 Pex5p의 TPR 도메인이 명백한 소수성 도메인인 것을 밝혀냈다(도 1a). 추정 에너지 함량을 기반으로 하는 가상실험(*in silico*)에서 무질서 또는 비구조화된 부분을 예측하는 IUPred를 사용한 단백질 서열의 분석은 효모 Pex5p의 임계적 특징이 분자 샤프론 후보임을 밝혀냈다(도 1b). 효모 Pex5p의 열-안정 특성 및 고분자량 콤플렉스로서 그의 축적에 따르는 결과는 효모 Pex5p가 분자 샤프론으로서 작용할 것이라는 것을 명백히 나타낸다.
- [0024] 효모 Pex5p가 샤프론 활성을 나타내는지 여부를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 열 충격 조건 하에서 효모 Pex5p의 존재 시 두 개의 모델 기질인 시트르산 합성효소(CS) 및 말산탈수소효소(MDH)의 열 응집(thermal aggregation)을 분석하였다(도 1c 및 도 1d).
- [0025] 효모 Pex5p는 45°C에서 효과적으로 CS 및 MDH의 열 응집을 억제하였다. 글루타치온 S-트랜스퍼라제(GST) 대조군을 효모 Pex5p 대신에 사용될 때 기질 응집이 억제되지 않는다. 기질 응집의 이러한 감소는 용량-의존적으로 발생할 수 있으며, 기질 응집이 효모 Pex5p 대 기질의 1:10 몰 비율에서 완전히 억제된다. 또한 효모 Pex5p는 디티오쓰레이톨(DTT)-유도 화학적 침전으로부터 인슐린 β-체인을 효과적으로 보호하였다(도 1e).
- [0026] 동일한 실험 조건 하에서 효모 Pex5p의 샤프론 활성은 효모에서 시토졸-타입 2-Cys Prx의 샤프론 활성보다 약 10배정도 높았으며, 이는 매우 효과적인 분자 샤프론으로 간주된다. 이 결과는 퍼옥시좀 PTS1 수용체로서 기능에 더하여, 효모 Pex5p가 분자 샤프론으로서도 작용할 수 있으며 외인성 스트레스 조건 하에서 변성으로부터 세포내 단백질을 보호할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0027] 효모 Pex5p의 샤프론 활성은 분자 크기 및 단백질 구조에 따라 다양하다.
- [0028] 대부분의 분자 샤프론은 불분명한 서브 유니트 수를 지닌 다이머, 트리머 및 높은 올리머 콤플렉스로서 용액 내에 존재한다. 재조합 효모 Pex5p는 균질하게 정제되며, 그의 분자 구조는 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 및 겔 전기영동에 의해 측정된다. 효모 Pex5p는 70 kDa?2,000 kDa의 질량 범위에 있는 많은 수의 상이한-크기의 단백질 콤플렉스를 형성하였다(도 2a). SEC에 의해 수득된 각의 획분에서 효모 Pex5p 콤플렉스의 크기는 자연 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)에 의해 확인되었다(도 2b, 상부 패널).

- [0029] 첫 번째 획분(F-I)에서 효모 Pex5p 콤플렉스가 10% 자연 폴리아크릴아미드 겔에서 이동될 수는 없었으며, 겔의 맨 위에 유지되었다. 첫 번째 획분(F-III)은 약 70 kDa의 단백질 콤플렉스를 포함하였다. SDS-PAGE에 의해 분석될 때, 모든 단백질 획분은 70 kDa의 분자량에서 이동한 단일 단백질 밴드를 포함하였으며(도 2b 하부 패널), 이는 효모 Pex5p가 다양한 단량체로 이루어진 호모-폴리머 콤플렉스로 존재한다는 것을 시사하였다. 인간 Pex5p의 고분자량 콤플렉스의 존재는 Harper 등에 의해 보고되었으며, 이는 인간 Pex5p가 S-300 겔 여과 컬럼의 공극으로부터 용출을 통해 테트라머 및 고분자량 콤플렉스의 혼합물로 존재한다는 것을 나타내었다. 그러나 이 고분자량 Pex5p의 형성의 기능적 역할은 연구되지 않았다.
- [0030] 효모 Pex5p 콤플렉스 분자량의 변화가 어떤 기능적 중요성이 있는지 여부를 조사하기 위하여, 본 발명자들은 SEC에 의해 얻어진 각각의 획분의 특이적 분자 샤프론 활성을 측정하였다(도 2c). 각각의 SEC 획분에서 효모 Pex5p 콤플렉스의 분자 구조는 시험관 내 생화학적 분석에 대해 충분히 안정하였다. F-I는 고분자량 효모 Pex5p 단백질 콤플렉스를 포함하며 가장 높은 샤프론 활성을 나타내었다. F-II는 총 용출액(total pooled eluate) 보다 약간 더 높은 샤프론 활성을 지니는 반면에 마지막 획분(F-III)은 아주 낮은 샤프론 활성을 나타내었다(도 2d). 이 결과는 효모 Pex5p의 샤프론 활성이 단백질 구조와 밀접하게 관련이 있다는 것과 활성이 멀티복합화(multimerization)에 의해 상당히 증진된다는 것을 시사한다.
- [0031] SEC에 의해 얻어진 효모 Pex5p의 상이한 분자량 구조는 투과전자현미경(TEM)에 의해 분석되었다. 음성적으로-염색된 효모 Pex5p 콤플렉스의 분석은 캡시드-유사 고분자량 구조, 환형 구조 및 작은 입자를 포함하는 획분에 의존하는 많은 상이한 구조적 배열을 밝혔다(도 2e). F-I 콤플렉스의 회전 및 병진 정렬은 38?44 nm의 범위에 있는 직경을 지니는 구-형태의 캡시드 구조라는 것이 밝혀졌다(도 2f). 유사한 구조가 트리콘 캡시드 단백질에서 보고되었다. 병진 및 회전 정렬 및 721 잘 염색된 F-II 입자의 다변수 통계적 분석은 두 개의 상이한 배열, 헵타머 및 테트라머를 지니는 환형 구조를 밝혔다(도 2g). F-I 및 F-II와 달리, 마지막 획분(도 2E, F-III)의 단백질은 TEM에 의해 관찰된 바와 같이 규칙적인 구조를 형성하지는 않으며, 아마 이들의 작은 크기 때문일 것이다.
- [0032] 열 충격-의존적 효모 Pex5p의 구조 및 활성의 변화
- [0033] 샤프론의 분자 구조는 열 충격에 의해 일반적으로 조절되기 때문에, 본 발명자들은 열-충격 의존적 효모 Pex5p의 구조 및 기능의 변화를 SEC 및 TEM에 의해 측정하였다. 배양 온도 증가 때문에 저분자량 단백질 콤플렉스의 점차적인 감소와 더불어 30분 이내에 저분자량 단백질 획분에서부터 고분자량 단백질 콤플렉스까지의 SEC에 얻어진 용출 프로파일의 이동이 있었다(도 3a). 용출 프로파일의 이동은 효모 Pex5p 콤플렉스 구조에서도 상응하는 변화에 의해 동반되며, TEM 분석을 기초로 하였다(도 3B). 환형 테트라머 및 헵타머는 25?45℃의 증가된 온도로서 명백해졌으며, 이들은 50℃에서 중공 튜브-유사 구조로 중합되었다. 55℃에서 관상구조는 캡시드-유사 고분자량 콤플렉스를 형성하기 위해 헤드-투-테일 배열에 연결되었다. 이 구조적 변화와 함께, 30분 동안 55℃에서 배양 후 효모 Pex5p의 샤프론 활성은 실온과 비교시 약 4.8배정도로 증가하였다(도 3c).
- [0034] 효모 Pex5p 샤프론 활성의 열 충격-매개된 증가는 이차 구조의 변화와 매우 연관성이 있으며, 원편광 이색성(CD) 분광법 및 트립토판 형광에 의해 측정되었다. 실온에서 효모 Pex5p의 원자외선 CD 스펙트럼은 높은 β -시트 함량을 나타내었으며, 상대적으로 낮은 α -나선구조를 나타내었다. 반면에 열-처리된 효모 Pex5p는 더 낮은 β -시트 및 증가된 α -나선구조 함량을 나타내었다(도 3d). 또한 이차 구조의 열 충격-유도된 변화는 트립토판 형광 세기 분석에 의해 관찰되었다(도 3e). 형광 화합물 비스-ANS[1,1'-bi (4-아닐리노) 나프탈렌-5,5'-디술포산]은 아미노아실 잔기의 소수성 클러스터와 결합하며, 단백질의 소수성 특징을 모니터링하기 위해서 사용될 수 있다. 효모 Pex5p의 비스-ANS 형광은 열 충격에 의해 증가되며(도 3f), 이는 효모 Pex5p의 이차 및/또는 삼차 구조가 열 스트레스에 의해 상당히 변화됨을 시사하였다.

- [0035] 효모 Pex5p의 샤프론 기능의 도메인 매핑
- [0036] 효모 Pex5p는 각각의 단백질의 N- 및 C-말단 부분에서 3개의 WXXF/Y 모티프와 7개의 TPR 도메인을 포함한다(도 4a). 샤프론 기능을 담당하는 단백질 도메인을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 전체-길이 효모 Pex5p의 GST-융합 단백질 및 일련의 효모 Pex5p 결실 돌연변이(deletion mutant)를 생성하였다(도 4a). 재조합 단백질은 *E. coli*에서 발현되었으며, 글루타치온-아گار로스 친화성 크로마토그래피에 의해 정제되었다(도 4b). GST 단독으로 샤프론 활성을 나타내지는 않는다(도 4c). 최근에 Pex14p에 관한 도킹 자리로 밝혀진 N-말단 WXXF/Y 모티프가 효모 Pex5p의 샤프론 활성에 대해 필요로 하는 것으로 보이지는 않는다.
- [0037] 3개의 TPR 도메인 자리를 포함하는 GST::효모 Pex5p(267-412)가 전체-길이 효모 Pex5p와 같이 거의 동일한 정도의 샤프론 활성을 나타내었다. 그러나 추가 1 또는 2 TPR 도메인[즉 GST::효모 Pex5p(267-380)]의 결실은 샤프론 활성의 상당한 손실을 초래하였다. 이 결과는 효모 Pex5p의 최초 3개의 도메인이 샤프론 활성에 중요한 역할을 한다는 것을 나타내었다. 효모 Pex5p의 추정 샤프론 도메인은 이전에 유입 수용체로 확인된 PTS1 기질-결합 부분에 인접하였다.
- [0038] 효모 Pex5p의 샤프론 기능은 효모 퍼옥시좀으로의 이송 활성과 관련이 있다.
- [0039] 시토솔에서 합성된 단백질의 적절한 세포 구획으로 정확한 목표는 유통 과정 중에 기질 단백질의 응집을 방지하기 위해서 분자 샤프론을 요구로 한다. 미토콘드리아 및 엽록체와 같은 다른 소기관과는 대조적으로 퍼옥시좀 매트릭스로 단백질의 트랜스로케이션과 직접적으로 관련이 있는 샤프론의 확인은 아직 보고되지는 않았다. 효모 Pex5p는 시험관 내에서 두 종류의 기능성 활성을 나타내었으며, PTS1 단백질 수용체 및 분자 샤프론으로서의 기능을 한다(도 1). 다음에 본 발명자들은 C-말단에서(GFP-SKL) 트리펩티드 퍼옥시좀 목표 신호, SKL을 포함하는 모델 PTS1 기질, 녹색형광단백질(GFP)의 목표 효율을 조사하였다. 퍼옥시좀 매트릭스로의 GFP-SKL의 트랜스로케이션은 *Scpex5*-결합 효모($\Delta Scpex5$) 및 효모 Pex5p의 다양한 불완전한 형태를 발현시키는 동질유전자 유도체로 평가되었다(도 4a).
- [0040] WT 효모와는 대조적으로 GFP-SKL은 스트레인 $\Delta Scpex5$ 에서 퍼옥시좀으로 트랜스로케이션되지는 않았으며 세포 질에 걸쳐 광범위하게 분산된 상태로 남아 있었다(도 5a). GFP-SKL의 목표 효율은 전체-길이 효모 Pex5p cDNA로 형질전환시킨(아미노산 1-612를 코드화시킴) 스트레인 $\Delta Scpex5$ 에서 상당히 증가되었다. 이와는 대조적으로 효모 Pex5p의 C-말단의 결실 형질전환시킨(아미노산 1-346을 코드화시킴) 스트레인은 전체-길이 효모 Pex5p의 트랜스로케이션 활성의 약 20%만을 나타내었다(도 5b). 이 특정 결실 형질전환체는 시험관 내에서 약한 샤프론 활성을 유지하였다(도 4c 참고). 이 결과는 주로 샤프론 기능을 담당하는 효모 Pex5p의 TPR 도메인이 PTS1 단백질의 퍼옥시좀 타겟팅에서 중요한 역할을 한다는 것을 나타내었다. 따라서 효모 Pex5p의 PTS1 이송 활성은 그것의 샤프론 기능과 밀접하게 상호관련되어 있다.
- [0041] 효모 Pex5p의 샤프론 기능은 효모에 열 충격 저항성을 부여한다.
- [0042] 본 발명자들은 열 충격 조건 하의 효모에서 효모 Pex5p의 샤프론 기능의 생리학적 중요성을 연구하였다. $\Delta Scpex5$ 효모는 시험관 내에서 상이한 샤프론 활성을 나타내는 효모 Pex5p의 다양한 형태를 발현시키도록 엔지니어링 되었다(도 4). cDNAs는 자연적 효모 Pex5p 프로모터 지배하의 pRS415 벡터로 서브 클론되었으며, 각각의 효모 Pex5p 컨스트럭트의 발현은 항-효모 Pex5p 항체를 사용하여 면역 블로팅에 의해 확인되었다. 효모 Pex5p 변형 단백질의 수준은 WT 효모에서 전체-길이 효모 Pex5p의 수준과 비슷하였다(도 6a, 인셋). 형질전환 세포는 증식기에서 성장되었으며, 그 다음에 열 충격 조건 하에서의 생존율이 조사되었다. 세포는 다른 기간의 시간 동안 45°C에서 배양되었으며, 그 다음에 콜로니-형성 능력을 측정하기 위해서 YPD-한천 플레이트 위로 도말되었다. WT 효모 및 전체-길이 효모 Pex5p를 발현하는 $\Delta Scpex5$ 는 열 충격의 부재시 WT 효모와 비교하

여 각각 66% 및 71% 생존율을 나타내었다(도 6a). $\Delta Scpex5$ 와 효모 Pex5p(1-346)를 발현시키는 동질 유전자 라인의 생존율은 30분 이내에 각각 8% 및 22%로 크게 감소하였다. 각각의 재조합 효모 Pex5p 단백질의 샤프론 활성을 감안할 때(도 4), 이 결과는 효모 Pex5p의 샤프론 기능이 효모에서 열 충격 저항성에 중요한 역할을 한다는 것을 제안한다.

[0043] 생체내 효모에서 대다수의 효모 Pex5p는 열 충격의 부재시 저분자량 콤플렉스의 형태로 존재하였으며, 이 저분자량 콤플렉스는 열 충격에 대응하여 고분자량 콤플렉스로 전환되었다(도 6b의 레인 2, 상부 패널). 대조적으로 SDS-PAGE에 의한 측정된 바와 같이 모든 조건 하에서 효모 Pex5p의 단백질 수준은 거의 변화되지 않았다(도 6b, 하부 패널). 생체내에서 효모 Pex5p의 고분자량 콤플렉스의 열 충격-의존 형성은 가역적이었으며, 세포가 열 충격에 의해 방출된 후 18시간 이내에 고분자량 콤플렉스는 원래 상태로 복구되었다(도 6b). 효모 Pex5p 구조의 열 충격-의존 변화는 시클로헥시미드의 처리에 의해 영향을 받지 않았으며, 이는 단백질 번역 또는 MG132, 프로테아좀 억제제를 억제한다. 이 결과는 고분자량 효모 Pex5p 콤플렉스의 해리가 새로운 단백질 합성 또는 프로테아좀 분해의 결과가 아니라는 것을 제안한다.

[0044] 효모 Pex5p는 특이적으로 체내에서 PTS1 기질과 상호작용하며 열 스트레스로부터 이를 보호한다.

[0045] 분자 샤프론은 부분적으로 변성된 기질과 물리적으로 결합하며, 스트레스 조건 하에서 비생산적 응집을 방지한다. 본 발명자들은 모델 PTS1 기질, CS를 사용하여 C-말단 SKL 신호 서열(CS-SKL 및 CS Δ SKL 각각) 및 PTS2 기질, 티올라아제의 유무에 따른 체내에서 효모 Pex5p 특이성 및 결합 특징을 분석하였다. 이 실험에 관하여, 본 발명자들은 살아있는 세포에 이분자 형광 상보(BiFC) 기술을 조정하였다. 본 발명자들은 효모 Pex5p의 C- 및 N-말단 황색 형광 단백질(YFP) 융합 단백질(C-YFP-ScPex5 및 N-YFP-ScPex5) 및 PTS1 기질의 N-말단 YFP 융합 단백질(N-YFP-CS-SKL 및 N-YFP-CS Δ SKL) 및 PTS2 기질의 N-말단 YFP 융합 단백질(N-YFP-티올라아제)을 생성하였다. 융합 단백질 단독 또는 C-YFP-효모 Pex5p 및 N-YFP-CS Δ SKL 또는 N-YFP-티올라아제의 조합 중 어느 하나를 발현시키는 세포에서 형광은 검출되지 않았다(도 7a). 그러나 YFP 형광은 정상 및 열 충격 조건 하에서 C-YFP-효모 Pex5p 및 N-YFP-효모 Pex5p 또는 N-YFP-CS-SKL을 공동-발현시키는 세포에서 명확하게 검출되었다.

[0046] 이 결과는 효모 Pex5p가 체내에서 PTS1-포함 단백질과 특이적으로 상호작용하나 PTS2-포함 단백질과는 상호작용 하지 않는 것을 시사하였다. 효모 Pex5p 및 PTS1 기질을 공동-발현시키는 세포의 형광 강도는 정상 조건보다 열 충격 조건 하에서 약간 높아졌다는 점을 주목해야 한다. 이 결과는 정상 조건 하에서 효모에서 PTS1 기질과 효모 Pex5p의 수용체-매개된 결합이 효모 Pex5p의 샤프론 기능과 열 충격 조건 하에서 변성으로부터 PTS1 단백질의 보호에 중요하다는 것을 시사하였다.

[0047] 이 결과를 기초로 하여, 본 발명자들은 열 충격 조건의 체내에서 효모 Pex5p 및 PTS1 기질의 특이적 결합의 생리학적 중요성을 조사하였다. ScPex14p- 및 효모 Pex5p-결합 효모 스트레인($\Delta Scpex14$ 및 $\Delta Scpex5$, 각각)은 T7-tagged-CS-SKL, T7-tagged-CS Δ SKL 또는 T7-tagged-티올라아제에 대해 발현 컨스트럭트와 함께 형질전환되었으며, 그 다음에 열 충격 조건 하에서 단백질 침전은 항-T7 항체를 사용하여 면역 블로팅에 의해 측정되었다(도 7b).

[0048] 30°C의 $\Delta Scpex14$ 및 $\Delta Scpex5$ 에서 전체 또는 용해성 CS-SKL, CS Δ SKL 또는 티올라아제의 수준의 차이는 없었다(도 7b). 대조적으로, 대다수의 CS Δ SKL은 $\Delta Scpex14$ 및 $\Delta Scpex5$ 세포에서 열 충격에 의해 침전되었으며, CS-SKL의 열 충격-유도된 침전은 스트레인 $\Delta Scpex14p$ 에서 상당히 약화되었다. 이 결과는 효모 Pex5p가 PTS1-포함 기질과 특이적으로 결합한다는 것(즉 CS-SKL)과 효모에서 열 충격 하에서 변성으로부터 이들을 보호한다는 것을 강하게 시사하였다. PTS2 기질 티올라아제는 돌연변이 스트레인의 열 충격에 대응하여 응집으로부터 보호되며, 이는 PTS2 기질이 이들 세포에서 아마도 PTS2-특이적 분자 샤프론에 의해 열 스트레스로부터 보호된다는 것을 나타낸다. 이 추정 PTS2-특이적 샤프론의 강도는 측정돼야만 한다.

- [0049] 미토콘드리아, 소포체 및 엽록체로의 세포 내 단백질 트랜스로케이션의 다양한 메커니즘이 확인되었지만, 퍼옥시좀 단백질 트랜스로케이션의 근본적인 분자 디테일은 상대적으로 잘 규명되지 않았다. 퍼옥시좀 단백질의 트랜스로케이션은 다른 구획의 트랜스로케이션과는 상이하고 퍼옥시좀 단백질은 시토플라스마 내에서 완전히 조립되었으며 안정하게-폴딩되고 올리고머 상태에서 소기관으로 트랜스로케이션된다.
- [0050] 세포질의 폴리리보솜 상에서 합성되는 퍼옥시좀 PTS1- 및 PTS2-포함 단백질이 인식되었으며 동족(cognate) 수용체 Pex5p 및 Pex7p 각각에 의해 퍼옥시좀 매트릭스로 트랜스로케이션되었다. 이 이송 시스템을 사용하여 50 종 이상의 상이한 효소는 퍼옥시좀으로 후-번역적으로 트랜스로케이션되는 것으로 나타났다. 모바일 수용체 Pex5p는 다수의 TPR 모티프를 구성하는 상호작용 도메인을 통하여 세포질에서 PTS1-포함 카고 단백질의 기질 C-말단과 결합한다. 카고는 퍼옥시좀 막을 가로질러 트랜스로케이션되며, 포인트 Pex5p가 퍼옥시좀 매트릭스 내부로 이들의 기질을 방출하며, 그 다음에 세포질로 다시 이동된다. Pex5p의 유비퀴틴화 상태는 카고 트랜스로케이션의 최종 단계를 조절하는 것으로 나타났다. Pex4p/Pex12p에 의해 de-유비퀴틴화되는 Pex5p는 새로운 트랜스로케이션에 관해서 재-사용될 수 있으며, 반면에 Ubc4/RING-페록신에 의해 폴리유비퀴틴화되는 Pex5p는 품질 관리 시스템처럼 프로테아좀에 의해 분해된다. 또한 Pex13p, Pex14p 및 Pex10p를 포함하는 몇몇 다른 페록신은 퍼옥시좀의 유입 과정에서 중요한 역할을 한다.
- [0051] 다양한 샤프론 단백질이 그들의 타겟 소기관으로 세포내 단백질 이송에 중요한 역할을 한다는 것이 지금까지 보고되어 왔지만 단 하나의 퍼옥시좀 단백질, Pex19p만이 퍼옥시좀 막 단백질(PMPs)의 이송 및 퍼옥시좀 막 생합성에 관련된 추정 분자 샤프론으로서 확인되었다.
- [0052] Pex19p는 PMP 카고에 대해 분자 샤프론 및 용해성 유입 수용체로서 기능하는 것으로 나타났다. 하지만 Pex5p-결핍 세포는 PTS1 트랜스로케이션에서 온도-민감성 결점을 나타낸다. 더욱이 mRNA 수준에서 Pex5의 발현은 열 충격에 의해 증가된다. 이 결과는 퍼옥시좀 매트릭스 단백질의 트랜스로케이션에서 또 다른 시토플라스마 샤프론, HSP 또는 시토플라스마 인자의 다른 타입의 개입을 나타낸다.
- [0053] 현재의 연구에서, 효모 추출물로부터 높은 열-안정 고분자량 단백질 구조의 스크리닝은 효모 Pex5p의 분리 및 효모 Pex5p의 새로운 분자 샤프론 기능의 확인을 야기 시켰다. 이 결과는 효모 Pex5p가 스트레스-의존적 구조 및 기능 변화를 겪고 PTS1 수용체 및 분자 샤프론으로 기능할 수 있다는 것을 명확하게 나타냈다.
- [0054] 본 발명자들은 진핵생물에서 효모 Pex5p의 기능적 중요성을 설명하기 위해서 다음의 종합적 모델(도 8)을 제안한다. 효모 Pex5p는 저분자량류에서부터 올리고머 고분자량 콤플렉스까지 생체에서 열 충격에 의해 유도되는 단백질 구조의 가역적 변화를 겪는다.
- [0055] 이 구조적 변화는 PTS1-특이적 유입 수용체에서부터 분자 슈퍼-샤프론까지 효모 Pex5p의 기능적 스위칭에 의해 동반된다. 효모 Pex5p는 노출된 소수성 부분의 일시적 차폐에 의해 열 충격-유도된 미스폴딩 또는 응집으로부터 PTS1 단백질을 보호할 수 있다(도 3 및 7).
- [0056] 열 충격 조건 하에서 PTS1의 변성을 특이적으로 방지하는 효모 Pex5p의 능력은 정상 조건 하에서 PTS1-포함 기질과 효모 Pex5p의 특이적 결합을 요구로 한다. 또한 이 모델은 열 충격 받은 호박 조직으로부터 분리된 식물 퍼옥시좀은 퍼옥시좀 단백질의 증가된 유입 효율성을 나타낸다는 이전의 관찰을 반영한다.
- [0057] 더욱이 맥아 항-HSP70 및 *E. coli* 항-HSP90 항체는 퍼옥시좀 루멘 단백질의 이송을 특이적으로 억제할 수 있으며, 식물에서 퍼옥시좀 단백질의 이송이 HSPs에 의해 증가될 수 있으며 이들 대부분은 분자 샤프론으로서

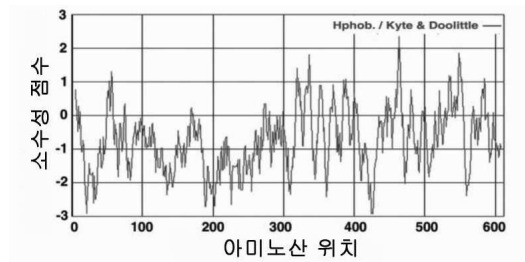
역할을 한다는 것을 제안한다.

- [0058] 이전의 연구는 Pex5p의 분자 구조가 역동적이며 상이한 pH 값 PTS1 기질의 존재 또는 부재시 DTT의 농도에서 배양시 모노머에서부터 폴리머까지의 범위에 있다는 것을 보고하였다. 시토줄 인간, Leishmania 및 한세놀라 Pex5p는 PTS1의 부재시 호모폴리머를 형성한다. 래트의 간으로부터의 시토줄 Pex5p는 모노머로서 행동하지만 퍼옥시좀 막과 관련하여 테트라머를 형성한다. 이 결과는 Pex5p가 분자 샤프론에 대해 중요한 표준을 만족시킨다는 것을 나타내며, 더욱이 PTS1 유입 수용체로서 기능하는 효모 Pex5p가 또한 PTS1-포함 퍼옥시좀 매트릭스 단백질의 이송 동안 분자 샤프론으로 기능할 수 있다는 본 발명의 새로운 발견을 지지한다.
- [0059]
- [0060] 인간에서 Pex5p의 돌연변이는 켈웨거(Zellweger) 증후군, 신생상형 부신백질장애(neonatal adrenoleukodystrophy, (NALD)) 및 영아형 레프숨병(infantile Refsum disease, (IRD))과 같은 심각한 대사 질병을 야기시키며, 이는 신경의 배열, 간 및 신장 결함, 기관 기능이상 및 영아 사망물에 의해 특성화된다. 분자 샤프론으로서 효모 Pex5p의 새로운 기능의 확인은 이들 질병의 치료에 관한 중요한 새로운 길을 연다. 이들 장애는 내부 함량이 결핍된 종종 퍼옥시좀 막 고스트의 모양에 의해 특성화되기 때문에, 이들은 퍼옥시좀 매트릭스 단백질의 미스로케이션에 기인한다. 효모 Pex5p 및 이들의 생리학적 중요성의 두 가지 기능을 조절하는 분자 메커니즘의 설명은 앞으로의 연구의 중요한 주제이다.
- [0061] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다. 그러나 본 발명의 범위를 이러한 실시예로 한정하는 것은 아니다.
- [0062] 효모 스트레인, 배지 및 물질
- [0063] YPD(1% 효모 추출물, 2% 펩톤 및 2% 글루코오스) 배지에서 성장된 사카로마이세스 세레비지에(WT: MAT, ura3-52, leu2-1, trp1-63, his3-200) 및 Scpex5-결핍 돌연변이 스트레인(Δ Scpex5: MAT, ura3-52, leu2-1, trp1-63, his3-200, ScPex5::LEU2)은 유전자 클로닝, 파괴 및 상보성 분석을 위해 사용된다. PAGE에 관해 사용된 분자량 마커는 iNtRON(한국)으로부터 구입되었다. CS, 인슐린, MDH 및 우 혈청 알부민(BSA)은 Sigma로부터 얻었다. 비스-ANS는 Molecular Probes으로부터 구입하였으며, Superdex 200-10/300 GL 컬럼은 Amersham Bioscience(스웨덴)으로부터 구입하였다.
- [0064] (실시예 1) *E. coli*에서 효모 Pex5p 유전자 클로닝 및 발현
- [0065] 효모 Pex5p를 인코딩하는 유전자는 PCR에 의해 효모 게놈 DNA로부터 복제되었다. 전체-길이 효모 Pex5p 및 효모 Pex5p의 N- 및 C-말단 절단 돌연변이는 *E. coli* BL21에서 pGEX 발현 플라스미드로부터 발현된다. 자연적 효모 Pex5p는 트롬빈과 함께 정제된 GST-효모 Pex5ps의 분할에 의해 수득되었다.
- [0066] (실시예 2) 샤프론 활성의 측정
- [0067] 효모 Pex5p의 샤프론 활성은 이전에 기술된 바와 같이 모델 기질 CS, MDH 및 인슐린을 사용하여 측정되었다. 기질 응집으로 인한 혼탁도는 자동온도 조절 세포 홀더가 설치된 DU800 분광 광도계(Beckmann, USA)를 사용하여 모니터링되었다. GFP-SKL은 샤프론 기능에 관한 체내 기질로서 사용되었다.
- [0068] (실시예 3) 모델 PTS1 기질 GFP-SKL을 사용한 효모에서 퍼옥시좀 목표 분석

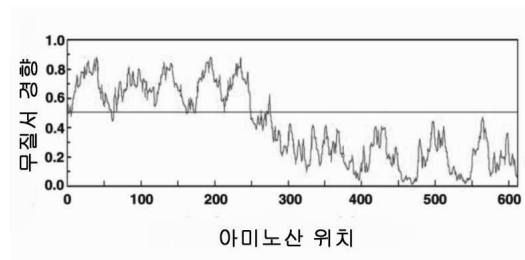
- [0069] WT 또는 Δ ScPex5 세포는 리튬 아세테이트 방법을 사용하여 pYES2-GFP-SKL 및 pRS415, pRS415-ScPex5 또는 pRS415-ScPex5 (204-346)과 함께 공동-형질전환되었다. 갈락토오스를 포함하는 배지상에서 성장된 세포에서 GFP-SKL의 발현이 XF116 필터 세트가 설치된 Zeiss Axioplan 형광 현미경을 사용하여 모니터링되었다.
- [0070] (실시예 4) 컬럼크로마토그래피
- [0071] SEC는 Superdex 200-10/300 GL 컬럼을 사용하여 25°C, 0.5 ml/min의 유속에서 FPLC 시스템 상에서 수행되었다. 컬럼은 150 mM NaCl을 포함하며 100 mM Hepes, pH 7.0에서 평형상태가 되었다. 단백질은 Centricon YM-30 필터를 사용하여 여과에 의해 농축되었다. 분자량의 보정을 위해 사용된 단백질 표준은 블루 텍스트란(2000 kDa), 페리틴(440 kDa), 카탈라아제(232 kDa), 알돌라아제(158 kDa) 및 BSA (67 kDa)으로 구성되었다.
- [0072] (실시예 5) 투과전자현미경 및 영상 처리
- [0073] SEC에 의해 수득된 효모 Pex5p 핵분이 글로-방전 탄소-코팅된 구리 그리드에 적용되었다. 단백질 흡수되는 기간 후, 그리드는 탈이온수로 세정되었고, 2% (w/v) 우라닐 아세테이트로 염색되었다. 샘플은 적은-복용량을 사용하여 120 kV의 가속전압에서 FEI Technai-12 현미경으로 실험되었다. 영상 처리를 위해, 이전에 기술된 바와 같이 SEMPER 및 EM 소프트웨어 프로그램이 사용되었다.
- [0074] (실시예 6) 단백질 구조 및 소수성의 분광광도 분석
- [0075] 소수성 도메인의 노출은 SFM25 분광형광계(Kontron, 독일)를 사용하여 비스-ANS 형광에 의해 분석되었다. 여기 파장은 380 nm로 고정되었고, 방출 스펙트럼은 400-600 nm에서 수집되었다. 효모 Pex5p의 고유한 트립토판 형광의 분석을 위해, 여기 파장은 295 nm로 고정되었고 스펙트럼은 300-400 nm에서 수집되었다. 이차 구조적 변화의 분석을 위해, 효모 Pex5p의 스펙트럼 특징은 200-250 nm 및 250-350 nm 각각에서 원- 및 근-UV CD-분광편광계(Jasco 815, 미국)에 의해 분석되었다. 효모 Pex5p는 30분 동안 25°C 또는 55°C에서 배양되었다; 자료는 8개 스캔의 평균을 나타낸다.
- [0076] (실시예 7) BiFC 에세이
- [0077] 체내에서 효모 Pex5p 및 PTS1-포함 단백질 사이의 상호작용은 이전에 기술된 바와 같이 BiFC 기술을 사용하여 분석되었다. YFP cDNA는 두 개의 조각, N-말단 및 C-말단 YFP 조각으로 나누어졌다. N-말단 YFP 조각은 PTS1 또는 PTS2와 융합되었으며, C-말단 YFP 조각은 효모 Pex5p와 융합되었다. 단백질은 pYES2 및 pTS911의 GAL1 프로모터의 대조군 하에서 효모에서 발현되었다. 형광 신호는 XF116 필터 세트를 사용하여 형광 현미경 검사(Zeiss, Axioplan)에 의해 분석되었다.

도면

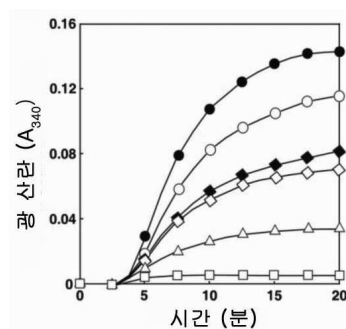
도면1a



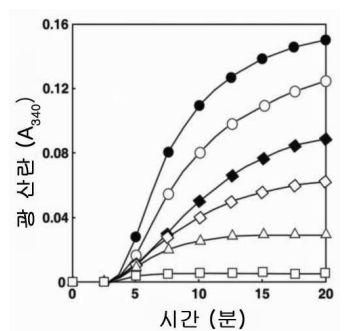
도면1b



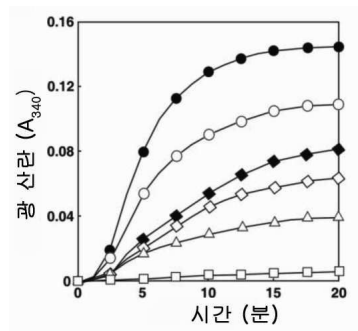
도면1c



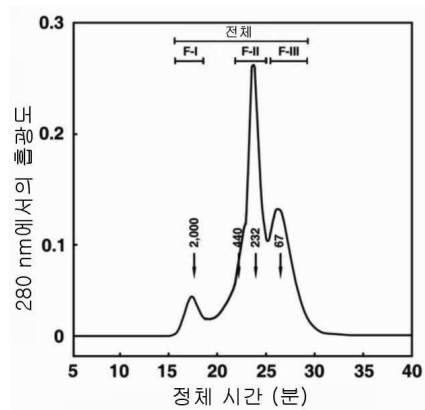
도면1d



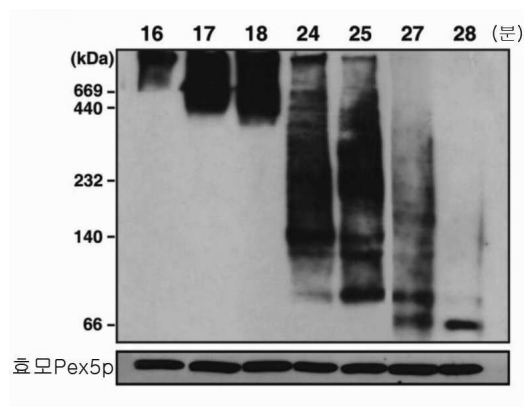
도면1e



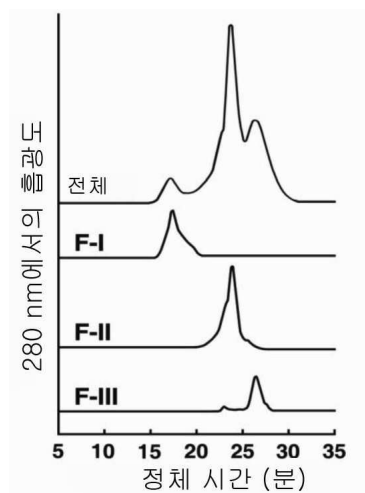
도면2a



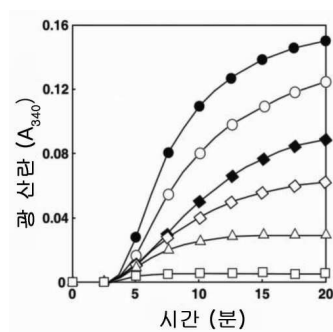
도면2b



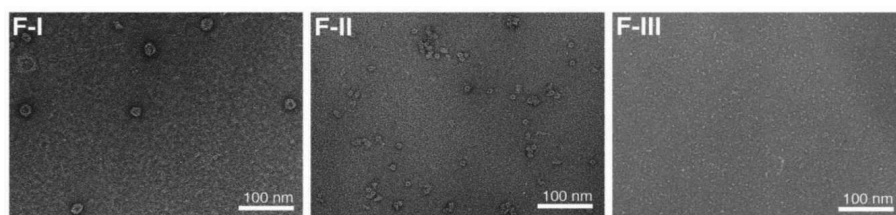
도면2c



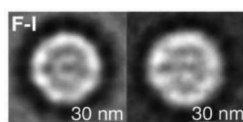
도면2d



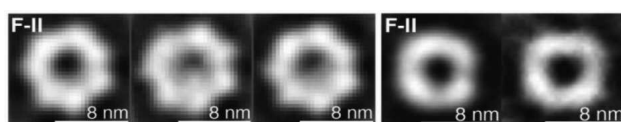
도면2e



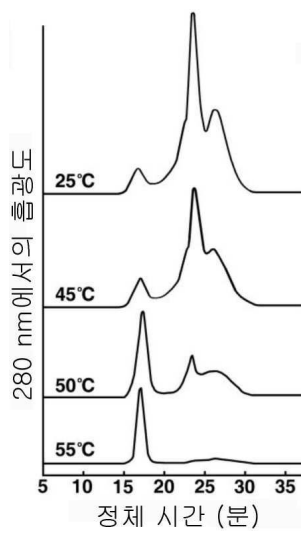
도면2f



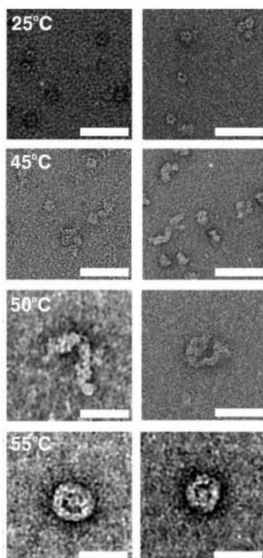
도면2g



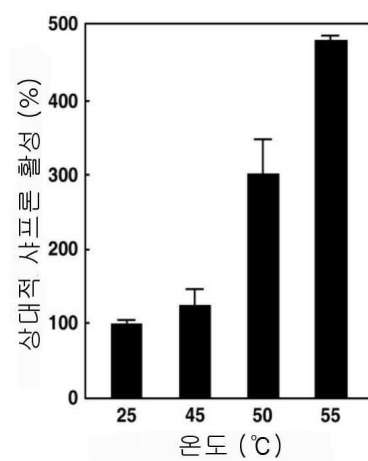
도면3a



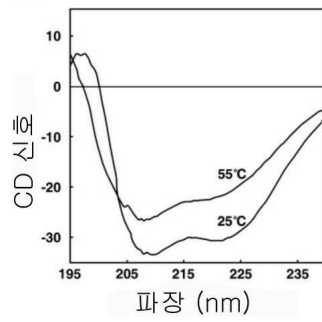
도면3b



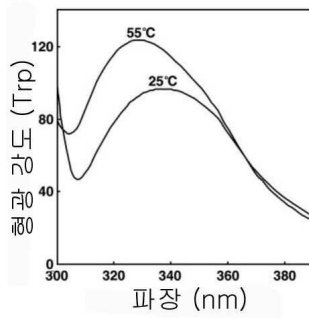
도면3c



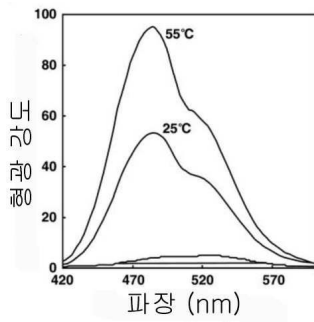
도면3d



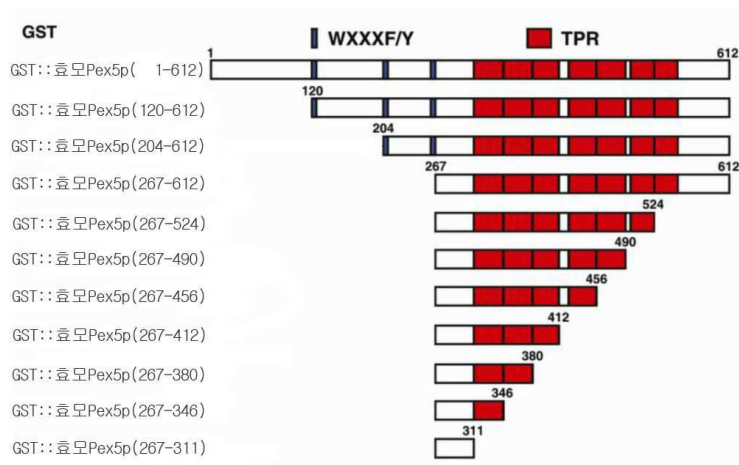
도면3e



도면3f



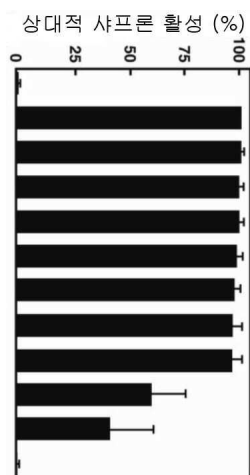
도면4a



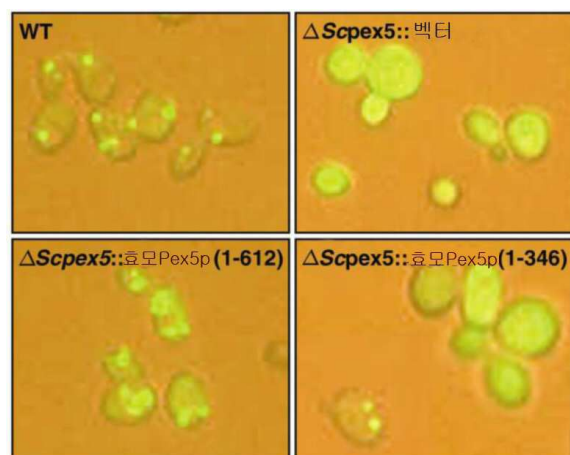
도면4b



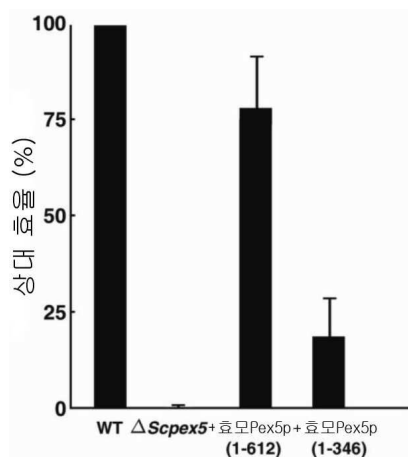
도면4c



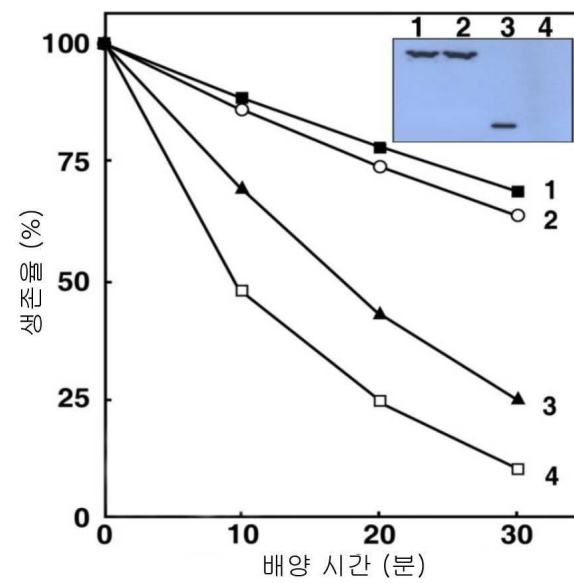
도면5a



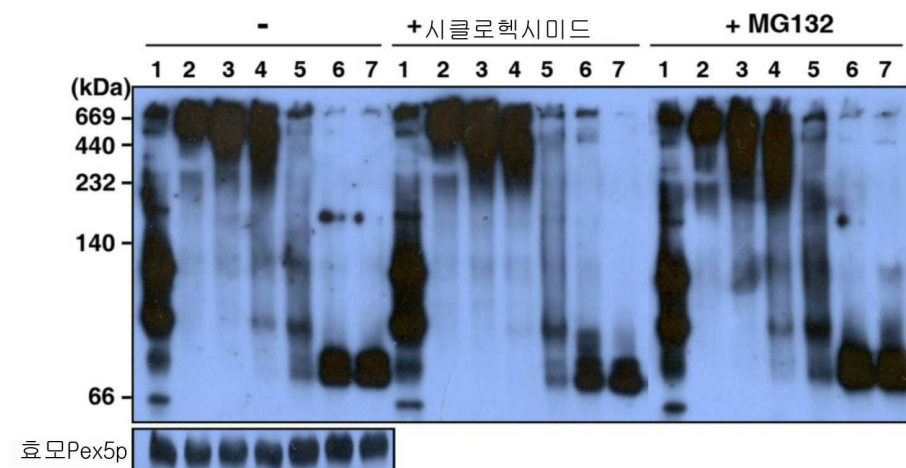
도면5b



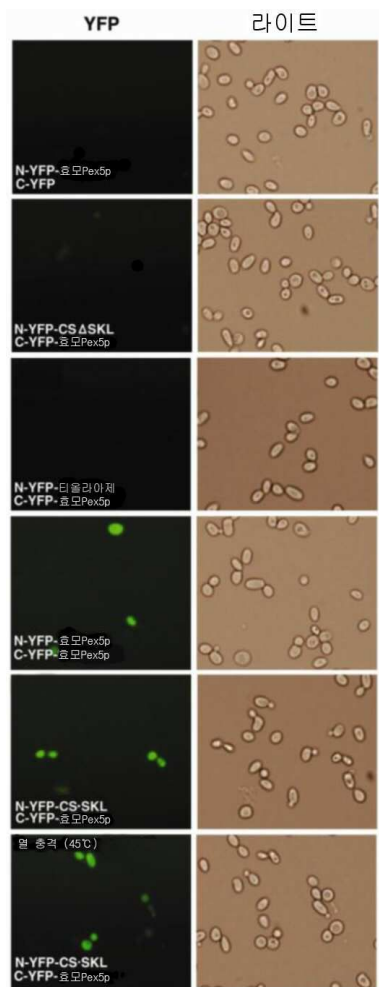
도면6a



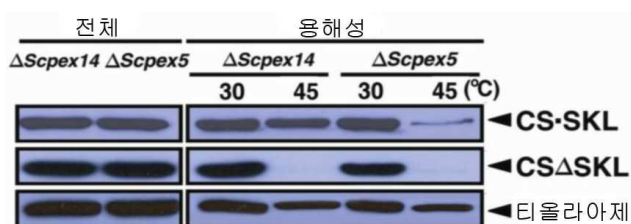
도면6b



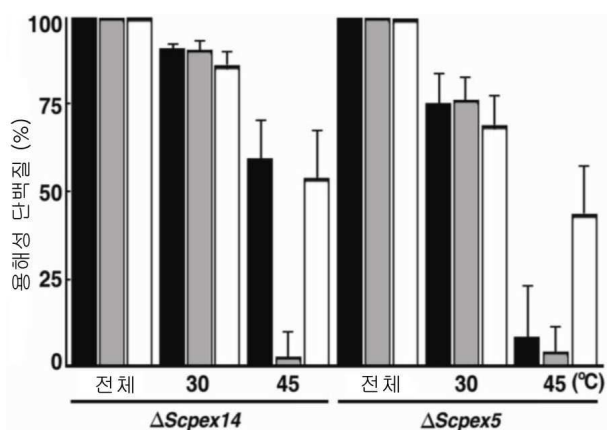
도면7a



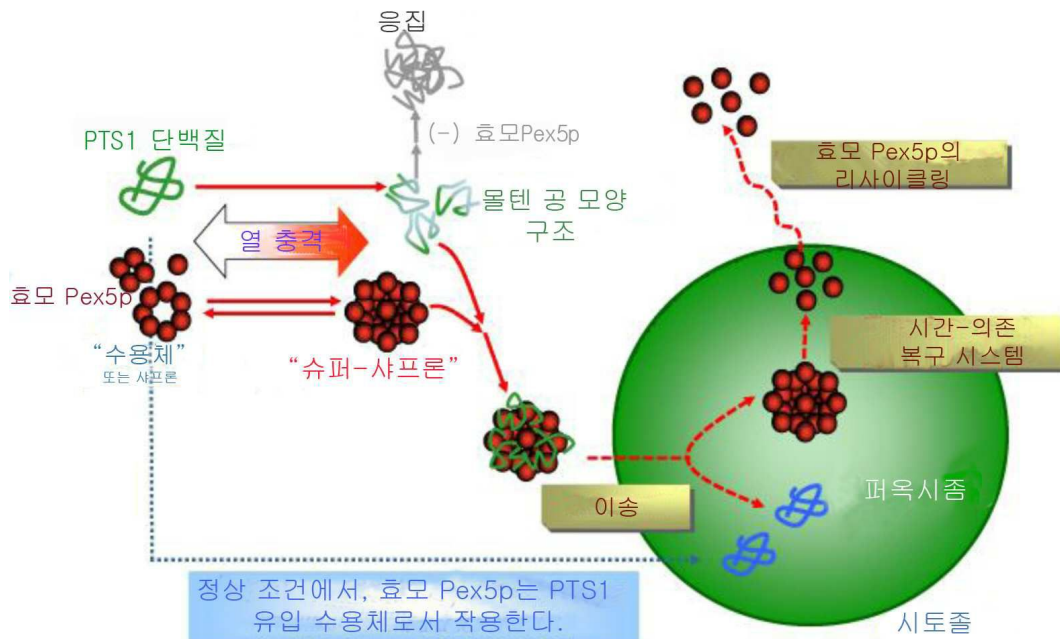
도면7b



도면7c



도면8



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Yeast Pex5p protein functioned as peroxisomal targeting signal

1-specific molecular chaperone

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 612

<212> PRT

<213> Saccharomyces cerevisiae

<400> 1

Met Asp Val Gly Ser Cys Ser Val Gly Asn Asn Pro Leu Ala Gln Leu

1 5 10 15

His Lys His Thr Gln Gln Asn Lys Ser Leu Gln Phe Asn Gln Lys Asn

20 25 30

Asn Gly Arg Leu Asn Glu Ser Pro Leu Gln Gly Thr Asn Lys Pro Gly

35 40 45

Ile Ser Glu Ala Phe Ile Ser Asn Val Asn Ala Ile Ser Gln Glu Asn

50 55 60

Met Ala Asn Met Gln Arg Phe Ile Asn Gly Glu Pro Leu Ile Asp Asp

65						70						75					80
Lys	Arg	Arg	Met	Glu	Ile	Gly	Pro	Ser	Ser	Gly	Arg	Leu	Pro	Pro	Phe		
				85						90					95		
Ser	Asn	Val	His	Ser	Leu	Gln	Thr	Ser	Ala	Asn	Pro	Thr	Gln	Ile	Lys		
			100					105					110				
Gly	Val	Asn	Asp	Ile	Ser	His	Trp	Ser	Gln	Glu	Phe	Gln	Gly	Ser	Asn		
		115					120					125					
Ser	Ile	Gln	Asn	Arg	Asn	Ala	Asp	Thr	Gly	Asn	Ser	Glu	Lys	Ala	Trp		
	130					135					140						
Gln	Arg	Gly	Ser	Thr	Thr	Ala	Ser	Ser	Arg	Phe	Gln	Tyr	Pro	Asn	Thr		
145					150					155					160		
Met	Met	Asn	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Ser	Met	Asn	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser		
					165					170					175		
Arg	Leu	Gln	Ser	Pro	Ala	Phe	Met	Asn	Gln	Gln	Gln	Ser	Gly	Arg	Ser		
		180						185					190				
Lys	Glu	Gly	Val	Asn	Glu	Gln	Glu	Gln	Gln	Pro	Trp	Thr	Asp	Gln	Phe		
	195						200					205					
Glu	Lys	Leu	Glu	Lys	Glu	Val	Ser	Glu	Asn	Leu	Asp	Ile	Asn	Asp	Glu		
	210					215					220						
Ile	Glu	Lys	Glu	Glu	Asn	Val	Ser	Glu	Val	Glu	Gln	Asn	Lys	Pro	Glu		
225					230					235					240		
Thr	Val	Glu	Lys	Glu	Glu	Gly	Val	Tyr	Gly	Asp	Gln	Tyr	Gln	Ser	Asp		
			245						250					255			
Phe	Gln	Glu	Val	Trp	Asp	Ser	Ile	His	Lys	Asp	Ala	Glu	Glu	Val	Leu		
		260						265				270					
Pro	Ser	Glu	Leu	Val	Asn	Asp	Asp	Leu	Asn	Leu	Gly	Glu	Asp	Tyr	Leu		
	275						280					285					
Lys	Tyr	Leu	Gly	Gly	Arg	Val	Asn	Gly	Asn	Ile	Glu	Tyr	Ala	Phe	Gln		
	290					295					300						
Ser	Asn	Asn	Glu	Tyr	Phe	Asn	Asn	Pro	Asn	Ala	Tyr	Lys	Ile	Gly	Cys		
305					310						315				320		

Leu Leu Met Glu Asn Gly Ala Lys Leu Ser Glu Ala Ala Leu Ala Phe
 325 330 335
 Glu Ala Ala Val Lys Glu Lys Pro Asp His Val Asp Ala Trp Leu Arg
 340 345 350
 Leu Gly Leu Val Gln Thr Gln Asn Glu Lys Glu Leu Asn Gly Ile Ser
 355 360 365
 Ala Leu Glu Glu Cys Leu Lys Leu Asp Pro Lys Asn Leu Glu Ala Met
 370 375 380

 Lys Thr Leu Ala Ile Ser Tyr Ile Asn Glu Gly Tyr Asp Met Ser Ala
 385 390 395 400
 Phe Thr Met Leu Asp Lys Trp Ala Glu Thr Lys Tyr Pro Glu Ile Trp
 405 410 415
 Ser Arg Ile Lys Gln Gln Asp Asp Lys Phe Gln Lys Glu Lys Gly Phe
 420 425 430
 Thr His Ile Asp Met Asn Ala His Ile Thr Lys Gln Phe Leu Gln Leu
 435 440 445
 Ala Asn Asn Leu Ser Thr Ile Asp Pro Glu Ile Gln Leu Cys Leu Gly

 450 455 460
 Leu Leu Phe Tyr Thr Lys Asp Asp Phe Asp Lys Thr Ile Asp Cys Phe
 465 470 475 480
 Glu Ser Ala Leu Arg Val Asn Pro Asn Asp Glu Leu Met Trp Asn Arg
 485 490 495
 Leu Gly Ala Ser Leu Ala Asn Ser Asn Arg Ser Glu Glu Ala Ile Gln
 500 505 510
 Ala Tyr His Arg Ala Leu Gln Leu Lys Pro Ser Phe Val Arg Ala Arg
 515 520 525

 Tyr Asn Leu Ala Val Ser Ser Met Asn Ile Gly Cys Phe Lys Glu Ala
 530 535 540
 Ala Gly Tyr Leu Leu Ser Val Leu Ser Met His Glu Val Asn Thr Asn
 545 550 555 560
 Asn Lys Lys Gly Asp Val Gly Ser Leu Leu Asn Thr Tyr Asn Asp Thr
 565 570 575

Val Ile Glu Thr Leu Lys Arg Val Phe Ile Ala Met Asn Arg Asp Asp

580

585

590

Leu Leu Gln Glu Val Lys Pro Gly Met Asp Leu Lys Arg Phe Lys Gly

595

600

605

Glu Phe Ser Phe

610