(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0138584
(43) 공개일자 2024년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/4705 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0030490
(22) 출원일자 2023년03월08일
심사청구일자 2023년03월08일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
백승훈
서울특별시 송파구 위례성대로 176, 2동 307호 (오금동, 대림아파트)
당 티 타오
울산광역시 남구 대학로 93, 35동 801호 (무거동)
김미정
경상남도 진주시 하대로 142, 102동 805호 (하대동, 현대아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

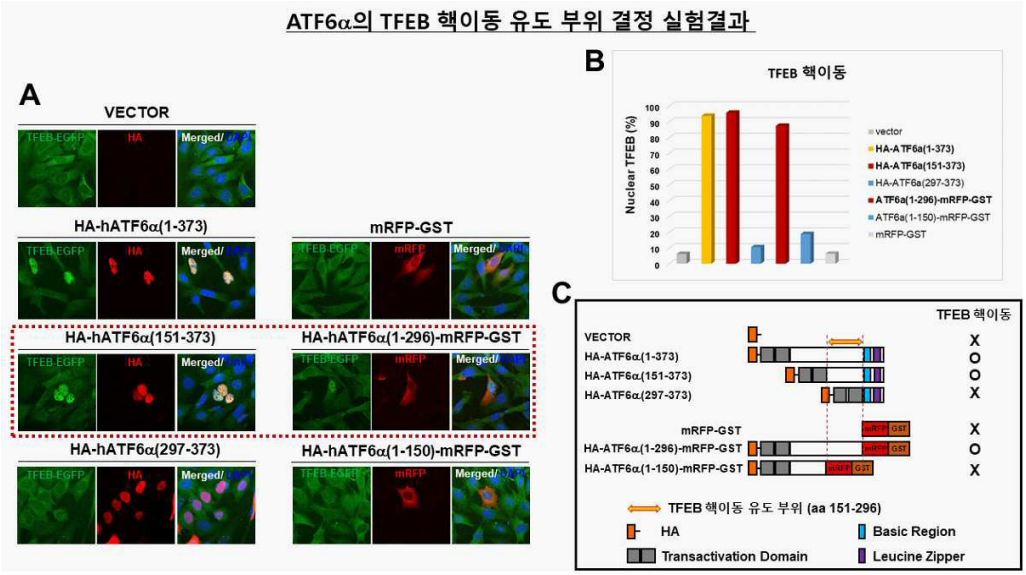
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **ATF6 α 유래 펩타이드 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 ATF6 α 유래 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, ATF6 α 단백질에서 유래된 특정 위치에 있는 펩타이드가 TFEB(Transcription factor EB) 또는 TFE3(Transcription factor E3)의 핵이동을 일으키고, 세포의 오토파지 활성을 유도시키는 것을 확인하여 비정상적인 단백질 축적에 의해 발병하는 질병의 치료제 및 건강기능식품 조성물등 다양하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
A61P 25/14 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345313990
과제번호 2017R1D1A1B03028229
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 eIF2α 인산화에 의한 오토파지 마스터 전사인자 TFEB와 TFE3의 세포 내 위치 조절에 관한 연구
기 여 율 40/100
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2020.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711143589
과제번호 2020R1F1A1066088
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 단백질 번역 조절에 의한 오토파지 마스터 전사인자 TFEB의 세포 내 위치 조절 기전에관한연구
기 여 율 40/100
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711156233
과제번호 2022R1A2C1010449
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 골격근 항상성 조절에서 ISR 역할 및 제어연구
기 여 율 10/100
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345347094
과제번호 2014R1A6A1030318
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 메타염증연구센터
기 여 율 10/100
과제수행기관명 울산대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 펩타이드는 ATF6(Activating transcription factor 6)α 단백질에서 유래된 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 펩타이드는 세포의 오토파지 활성을 유도시키는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 펩타이드는 TFEB(Transcription factor EB) 또는 TFE3(Transcription factor E3)의 핵이동을 일으키는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 5

ATF6(Activating transcription factor 6)α 단백질 또는 이로부터 유래한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

청구항 5에 있어서,

상기 단백질 축적 관련 질환은 샤르코마리투스병, 저섬유원혈증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 폼페병, 구척수마비 근위축증, α 1-항트립신 결핍증, 다발성 설파테이스 결핍증 및 다낭성 간질환으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 TFEB 또는 TFE3 핵이동 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 ATF6 α 유래 펩타이드 및 이의 용도를 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 단백질은 세포의 가장 풍부한 거대분자이고 실제로 모든 생리적 프로세스에 대단히 중요하다. 단백질의 생물학적 기능을 수행하기 위하여, 대부분의 단백질은 그것들의 자연 형태로 접혀지고 그것을 유지할 필요가 있다. 비록 단백질의 자연 형태가 그것의 아미노산 서열에 의해 결정되긴 하지만, 접힘 프로세스는 대단히 복잡하고 오류가 일어나기가 매우 쉬우며, 그것의 유용성은 유전자 돌연변이, 생물발생의 부정확성 및 번역후 손상의 상황에서 추가로 제한될 수 있다. 일탈된 형태를 채택한 단백질들 및 그것들에 의해 형성된 응집물들은 세포 생존 능력 및 기능에 끊임없는 위협이 된다. 이들 단백질을 제거하는 데 실패하는 것은 다양한 심신 쇠약 인간 질환의 발병과 밀접하게 관련된다.

[0003] 한편, 자식작용이라고도 불리우는 오토파지(autophagy)는 세포질에서 리소좀(lysosome)으로 이동되는 과정을 포함하는 세포내 단백질 및 소기관을 분해하는 과정을 일컫는다. 자식작용은 세포의 생존, 분화, 발생 및 항상성 유지를 위해 필수적인 과정으로, 자식작용 조절의 이상은 암을 비롯한 퇴행성 신경질환, 간질환, 심장질환, 근질환, 감염성 질환, 노화 등에 관여하는 것으로 알려져 있다. 아울러, 오토파지는 단백질 형태이상질환 또는 tau 병증에 있어 미스폴딩, 응집, 섬유화 등을 야기하는 변형 단백질을 조절 및 제거하여 조직에의 축적을 억제하는 기능을 가진다고 보고되었으며, 오토파지의 효율적인 유도를 통해 다양한 단백질 형태이상 질환 또는 플라크 축적으로 인한 심혈관 질환의 증상이 개선될 수 있음이 제안되었다.

[0004] 이에, 효율적으로 오토파지를 유도하는 새로운 물질이 발굴된다면 이들 질환에 대한 효과적인 치료제로 적용될 수 있을 것으로 이에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) 1. Nature-inspired Computing for Web Intelligence, Volume 2022, Article ID 5299218 (2022.07.18 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 ATF6(Activating transcription factor 6)α 단백질 또는 이로부터 유래한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 청구항 1항 내지 청구항 4항 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 청구항 1항 내지 청구항 4항 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 TFEB 또는 TFE3 핵이동 조성물 을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 ATF6(Activating transcription factor 6)α 단백질 또는 이로부터 유래한 펩타이드를 유효성

분으로 포함하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 TFEB 또는 TFE3 핵이동 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 ATF6 α 유래 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, ATF6 α 단백질에서 유래된 특정 위치에 있는 펩타이드가 TFEB(Transcription factor EB) 또는 TFE3(Transcription factor E3)의 핵이동을 일으키고, 세포의 오토파지 활성을 유도시키는 것을 확인하여 비정상적인 단백질 축적에 의해 발병하는 질병의 치료제 및 건강기능식품 조성물등 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 ATF6 α 과발현이 TFEB의 핵이동을 유도함을 확인한 결과이다.

도 2는 ATF6 α 과발현이 자가 포식 유전자의 발현을 증가시킴을 확인한 결과이다.

도 3은 ATF6 α의 핵이동 유도 부위를 결정하는 실험 결과를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 제공한다.

[0019] 상기 펩타이드는 ATF6(Activating transcription factor 6)α 단백질에서 유래될 수 있다.

[0020] 상기 펩타이드는 세포의 오토파지 활성을 유도시킬 수 있다.

[0021] 상기 펩타이드는 TFEB(Transcription factor EB) 또는 TFE3(Transcription factor E3)의 핵이동을 일으킬 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 ATF6(Activating transcription factor 6)α 단백질 또는 이로부터 유래한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0025] 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0026] 상기 단백질 축적 관련 질환은 샤르코마리투스병, 저섬유원혈증, 파킨슨병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 폼페병, 구척수마비 근위축증, α 1-항트립신 결핍증, 다발성 설파테이스 결핍증 및 다낭성 간질환으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제,

보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 단백질 축적 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다. 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 TFEB 또는 TFE3 핵이동 조성물을 제공한다.

[0034] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0036] **<실험 예 1> 플라스미드 제작**

[0037] N-말단에 혈구응집소(Hemagglutinin, 이하 HA라 함.) 에피토프 태그가 있는 인간 ATF6α(1-373)의 N-말단 도메인을 암호화하는 pCGN-HA-ATF6α(1-373) 플라스미드를 제작하였다. pCGN-HA-ATF6α(1-373) 플라스미드는 CMV(cytomegalovirus) 프로모터에 의해 N-말단에 HA 에피토프 태그(MASSYPYDVPDYA)가 융합되어 있는 인간 ATF6α(1-373)의 N-말단 도메인을 가진 HA-ATF6α(1-373)단백질을 발현시킬 수 있는 cDNA 절편이 pCGN 플라스미스의 XbaI과 BamHI 사이에 삽입되어 있다.

[0038] pCGN-벡터를 생성하기 위해, pCGN-HA-ATF6α(1-373) 플라스미드를 XbaI 및 BamHI로 처리하여 ATF6α(1-373) 코딩 서열을 제거하고, 선형화된 빈 벡터를 자가 결찰시켰다.

[0039] 잘린 ATF6α 클론 pCGN-HA-ATF6α(151-373) 및 pCGN-HA-ATF6α(297-373)를 생성하기 위해 ATF6α(151-373) 및 ATF6α(297-373)를 암호화하는 cDNA 단편은 다음 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 pCGN-ATF6α(1-373)로부터 증폭되었다: 5'-GGGAAATCTAGAGATAAGCCTGTCACTGGTTCTAG-3'(ATF6α(151-373), 정방향), 5'-

GGGAAACCTTCTAGAATGAGAAATGTCGGTTCAGATATTG-3'(ATF6α(297-373), 정방향) 및 프라이머 5'-GGGTCAGGATCCACTAGGGACTTTAAGCC-3'(역방향). XbaI 및 BamHI로 처리한 PCR 산물을 각각 ATF6α(1-373) 단편을 제거한 후 동일한 제한효소로 처리한 pCGN-HA-ATF6α(1-373)에 삽입하였다.

[0040] HA-ATF6α(1-373)을 발현시킬 수 있는 아데노바이러스(Ad-HA-ATF6α(1-373))를 제작하기 위하여 pShuttle-CMV-HA-ATF6α(1-373) 플라스미드를 제작하였다. pCGN-HA-ATF6α(1-373) 플라스미드를 BamH1, DNA polymerase I Klenow fragment 및 NdeI을 처리하여 확보한 CMV-HA-ATF6α(1-373) cDNA 절편을 Xho1, DNA polymerase I Klenow fragment 및 NdeI을 처리한 pShuttle-CMV(#240007, Agilent Technologies)에 삽입하여 pShuttle-CMV-HA-ATF6α(1-373) 플라스미드를 완성하였다. HA-ATF6α(1-373) 발현 아데노바이러스(Ad-HA-ATF6α(1-373))는 AdEasy vector system(#240009, Agilent Technologies)의 프로토콜에 따라 HEK-293A 세포(#240085, Agilent Technologies)에서 증폭하였다. 증폭한 Ad-HA-ATF6α(1-373) 바이러스는 CsCl(3032, Sigma-Aldrich)를 사용한 그라디언트 원심분리법으로 농축하였다. AdEasy Viral Titer Kit(#972500, Agilent Technologies)를 이용하여 농축된 Ad-HA-ATF6α(1-373) 바이러스의 농도를 측정하였다.

[0041] mRFP(단량체 적색 형광 단백질), EGFP(녹색 형광 단백질) 그리고 LC3B(미세소관 관련 단백질 1A/1B 경쇄 3B)가 순서대로 융합된 mRFP-EGFP-LC3B 단백질을 발현하는 pmRFP-EGFP-LC3B는 pEGFP-C1(6084-1, Clontech Laboratories)에 mRFP 및 LC3B 단편 모두를 삽입하여 제작하였다. mRFP를 암호화하는 cDNA 단편은 다음과 같은 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 pmRFP-LC3B(21075, Addgene)에서 증폭되었다: 5′ -GAGAGCTAGCGGCCACCATGGCCTCCTCCGAGGAC-3′ 및 5′ -GAGAACCGGTCCACCGGCGCCGGTGGAGTGGCG-3′

[0042] pmRFP-LC3B (21075, Addgene)를 BglII와 BamHI을 처리 하여 확보한 LC3B cDNA 절편을 동일한 제한효소로 처리한 pEGFP-C1에 삽입하여 pEGFP-LC3B 플라스미스를 확보하였다. 다음으로 NheI와 AgeI 처리한 mRFP PCR 산물을 동일한 제한효소로 자른 pEGFP-LC3B에 삽입하여 pmRFP-EGFP-LC3B 플라스미드를 완성하였다.

[0043] GST(Glutathione S-transferase)와 융합된 mRFP(단량체 적색 형광 단백질)를 발현하는 pmRFP-GST 플라스미드의 경우, mRFP 및 GST PCR 단편 모두를 pEGFP-N1(Clontech, 6085-1)에 삽입하였다. mRFP를 암호화하는 cDNA 단편은 다음과 같은 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 pmRFP-EGFP-LC3B로부터 증폭되었다.: 5'-TGTGTGAAGCTTATGGCCTCCTCCGAGGACG-3' 및 5'-TTTTTTGAATTCCAGGCGCCGGTGGAGTGGCGG-3'.

[0045] GST를 암호화하는 cDNA 단편은 다음과 같은 프라이머를 사용하여 PCR을 통해 pGEX-6P-1(27-4597-01, Addgene)에서 증폭되었다: 5-CTCTCTGAATTCTTCCCCTATACTAGGTTATTGG-3' 및 5'-CTCTCTGGATCCTCATTTTGGAGGATGGTCGCCAC-3'. HindIII와 EcoRI로 처리한 mRFP PCR 산물과 EcoRI와 BamHI로 처리한 GST PCR 산물을 HindIII와 BamHI로 처리한 pEGFP-N1에 삽입하였다.

[0046] pCMV-HA-hATF6α(1-150)-mRFP-GST 및 pCMV-HA-hATF6α(1-296)-mRFP-GST를 생성하기 위해 HA-ATF6α(1-150) 및 HA-ATF6α(1-296)을 다음 프라이머로 PCR을 통해 pCGN-HA-ATF6α(1-373)로부터 증폭시켰다: 5'-GGGAAAGCTAGCATGGCTTCTAGCTATCCTTTATG-3'(ATF6α(1-150), 정방향) 및 5'-GGGAAAAAGCTTTTCCTTCAGTGGCTCCGGTG-3'(ATF6α(1-150), 역방향), 및 5'-GGGAAAAAGCTTGGTACTTTGTAGGACAGGTTTAG-3'(ATF6α(1-296), 역방향). NheI 및 HindIII로 처리한 PCR 산물을 각각 동일한 제한효소로 처리한 pmRFP-GST에 삽입하였다.

[0048] **<실험 예 2> 세포주 및 세포 배양**

[0049] TFEB-EGFP 발현 A/A^{MEF} 안정 세포주(*A/A-TFEB-EGFP*)는 pLUB-hTFEB-EGFP-IRES-Bla 플라스미드를 가진 렌티바이러스를 A/A^{MEF} 세포주에 감염시킨 후 5μg/mL blasticidin S HCl(Invitrogen)을 포함한 배양액, 10% 태아 소 혈청(FBS)(WelGENE), 1% 페니실린-스트렙토마이신(WelGENE) 및 1% 비필수 아미노산(WelGENE)이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 10일 동안 키워 자라난 세포군들 중에 TFEB-EGFP를 가장 잘 발현하는 세포주를 항-GFP 항체와 항-TFEB 항체를 이용한 웨스턴블럿을 통하여 선택하였다. 세포를 5μg/mL blasticidin S HCl, 10% 태아 소 혈청(FBS)(WelGENE), 1% 페니실린-스트렙토마이신(WelGENE) 및 1% 비필수 아미노산(WelGENE)이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 37℃, 5% CO_2 조건하에 배양하였다.

[0050] 인간 TFEB와 EGFP(녹색 형광 단백질)이 융합된 TFEB-EGFP 단백질을 발현하는 pLUB-hTFEB-EGFP-IRES-Bla 플라스미드는 pLVX-IRES-Bla의 CMV 프로모터를 ubiquitin C 프로모터로 바꾼 pLUB-IRES-Bla 플라스미드에 TFEB-EGFP

cDNA 절편을 삽입하여 제작하였다. ubiquitin C 프로모터 DNA 절편은 pUB-EGFP(11155, Addgene)를 Ssp1과 EcoRI으로 잘라 확보하고 pLVX-IRES-Bla를 ClaI, DNA polymerase I Klenow fragment 그리고 EcoRI을 처리한 플라스미드에 삽입하여 pLUB-IRES-Bla을 제작하였다. 이어서 pEGFP-N1-TFEB (38119, Addgene)을 SmaI과 EcoR1을 처리하여 TFEB-EGFP cDNA 절편을 확보하고, BamH1, DNA polymerase I Klenow fragment 그리고 EcoR1을 처리한 pLUB-IRES-Bla 플라스미드에 삽입하여 pLUB-hTFEB-EGFP-IRES-Bla를 제작하였다.

[0052] **<실험 예 3> 면역형광 염색 및 공초점 현미경**

[0053] 세포를 6-웰 디쉬의 콜라겐 코팅된 유리 커버슬립에 웰당 1.2 x 10^5 세포의 밀도로 플레이팅하고 밤새 배양하였다. 다음날, 표시된 플라스미드 pCGN-벡터, pCGN-HA-ATF6α(1-373), pCGN-HA-ATF6α(151-373), pCGN-HA-ATF6α(297-373), pmRFP-GST, pCMV-HA-hATF6α(1-296)-mRFP-GST 또는 pCMV-HA-hATF6α(1-150)-mRFP-GST를 약 40시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 2회 헹구고, PBS에 희석된 3.5% 파라포름알데히드로 15분 동안 고정하고, PBS에 희석된 0.1% Triton X-100으로 5분 동안 투과시켰다. 세포를 PBS에 희석된 3% BSA(A7030, Sigma-Aldrich)로 1시간 동안 차단하였다. 이들 세포를 일차 항체 HA(sc-7392, Santa Cruz Biotechnology)와 함께 4℃에서 밤새 배양한 다음 Alexa Fluor 594-접합 AffiniPure F(ab')2 단편 염소 항-마우스 IgG(H + L)(115-586-003, Jackson Immuno Research Laboratories) 실온에서 1시간 동안. 핵은 DAPI(D1306, Invitrogen)로 염색하였다. 마지막으로 ProLong Gold 장착 매체(P36930, Invitrogen)를 사용하여 커버슬립을 장착했습니다. FV1200-OSR 공초점 현미경(Olympus)을 사용하여 공초점 레이저 현미경으로 세포를 이미지화했다. 이후 HA 양성 세포 중에서 핵 TFEB-EGFP를 가진 세포의 비율을 세었다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험(조건당 최소 150개 세포)의 평균 ± SEM으로 표시되었다.

[0055] **<실시 예 1> ATF6 α의 TFEB 핵이동 여부 확인**

[0056] 세포를 6-웰 디쉬의 콜라겐 코팅된 유리 커버슬립에 웰당 1.2 x 10^5 세포의 밀도로 플레이팅하고 밤새 배양하였다. 다음날, Ad-HA-ATF6α(1-373) 바이러스를 약 48시간 동안 처리하였다. 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)로 2회 헹구고, PBS에 희석된 3.5% 파라포름알데히드로 15분 동안 고정하고, PBS에 희석된 0.1% Triton X-100으로 5분 동안 투과시켰다. 세포를 PBS에 희석된 3% BSA(A7030, Sigma-Aldrich)로 1시간 동안 차단하였다. 이들 세포에 일차 항체 HA(sc-7392, Santa Cruz Biotechnology)와 TFEB(A303-673A, Bethyl Laboratories)를 동시에 4℃에서 밤새 배양한 다음 항-HA 항체를 위해서는 Alexa Fluor 594-접합 AffiniPure F(ab')2 단편 염소 항-마우스 IgG(H + L)(115-586-003, Jackson Immuno Research Laboratories)를, 항-TFEB 항체를 위해서는 Alexa Fluor 488-접합 AffiniPure 염소 항-레빗(A-11034, Invitrogen)을 실온에서 1시간 동안 염색하였다. 마지막으로 ProLong Gold 장착 매체(P36930, Invitrogen)를 사용하여 커버슬립을 장착했다. FV1200-OSR 공초점 현미경(Olympus)을 사용하여 공초점 레이저 현미경으로 세포를 이미지화했다. 이후 HA 양성 세포 중에서 핵 TFEB를 가진 세포의 비율을 세었다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험(조건당 최소 150개 세포)의 평균 ± SEM으로 표시되었다.

[0057] 그 결과, 도 1에 따르면, ATF6 α(1-373)가 과발현된 세포에서 핵 내의 TFEB 및 TFE3가 증가함을 확인하여 활성화된 ATF6 α가 TFEB 및 TFE3의 핵이동을 유도함을 알 수 있었다.

[0059] **<실시 예 2> ATF6 α의 자가 포식 관련 유전자 발현 증가 확인**

[0060] 세포를 100mm 디쉬에 0.6 x 10^6 세포의 밀도로 플레이팅하고 밤새 배양하였다. 다음날, Ad-HA-ATF6α(1-373) 바이러스를 약 24시간 동안 처리한 후 소포체 스트레스 유도제인 튜니카마이신(Tunicamycin, 이하 Tm라 함.)을 1 ㎍/ml 농도로 24시간 처리하였다. Tm을 처리한 세포와 처리하지 않은 세포를 QIAzol Lysis reagent(QI-79306, QIAGEN)를 이용하여 total RNA를 뽑았다. 확보한 total RNA로부터 High-Capacity cDNA RT Kit(ABS-4368814, Applied Biosystems)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 Luna Universal qPCR Master Mix(New England BioLabs, M3003X)와 StepOnePlus Real Time System(Applied Biosystems)를 이용하여 양적 PCR을 수행하여 자가포식 관련 유전자들(Lc3b, P62, Ctsb, Ctsl, Lamp1, Lamp2a, Lamp2b, Lamp2c, Tpp1, Glb1 Mcolin-1, Atp6v1h, Tfe3 및 Tfeb)의 발현 변화를 확인하였다. 타깃 유전자들의 mRNA 양은 액틱 베타 mRNA 양으로 표준화

하였다.

[0061] 그 결과, 도 2에 따르면, ATF6 α가 과발현된 세포에서 자가 포식 관련 유전자들(Lc3b, P62, Ctsb, Ctsl, Lamp1, Lamp2a, Lamp2b, Lamp2c, Tpp1, Glb1 Mcolin-1, Atp6v1h, Tfe3 및 Tfeb)의 발현이 증가함을 확인하여, ATF6 α가 자가 포식을 일으킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0063] **<실시 예 3> ATF6 α의 핵이동 유도 부위 확인**

[0064] ATF6 α의 어떤 아미노산 서열이 TFEB 및 TFE3의 핵이동 및 자가 포식을 일으키는지 확인하기 위해 ATF6 α를 여러 부위에서 잘라 TFEB 및 TFE3의 핵이동이 일어나는지 확인하였다.

[0065] 그 결과 도 3에 따르면, TFEB-EGFP 발현 세포주에 HA-ATF6α(1-137) 단백질 과발현시 TFEB-EGFP가 핵으로 이동됨을 확인하였다. 이러한 HA-ATF6α(1-137) 단백질의 N-말단 부위를 150번째 아미노산까지 자른 HA-ATF6α(151-137) 단백질은 TFEB를 핵으로 이동시킬 수 있으나, N-말단 부위를 296번째 아미노산까지 자른 HA-ATF6α(296-137) 단백질은 TFEB를 핵으로 이동시키지 못하였다. 또한 이러한 HA-ATF6α(1-137) 단백질의 C-말단 부위를 297에서 373번째 아미노산까지 자른 HA-ATF6α(1-296) 단백질은 TFEB를 핵으로 이동시킬 수 있으나, C-말단 부위를 151에서 373번째 아미노산까지 자른 HA-ATF6α(1-150) 단백질은 TFEB를 핵으로 이동시키지 못하였다.

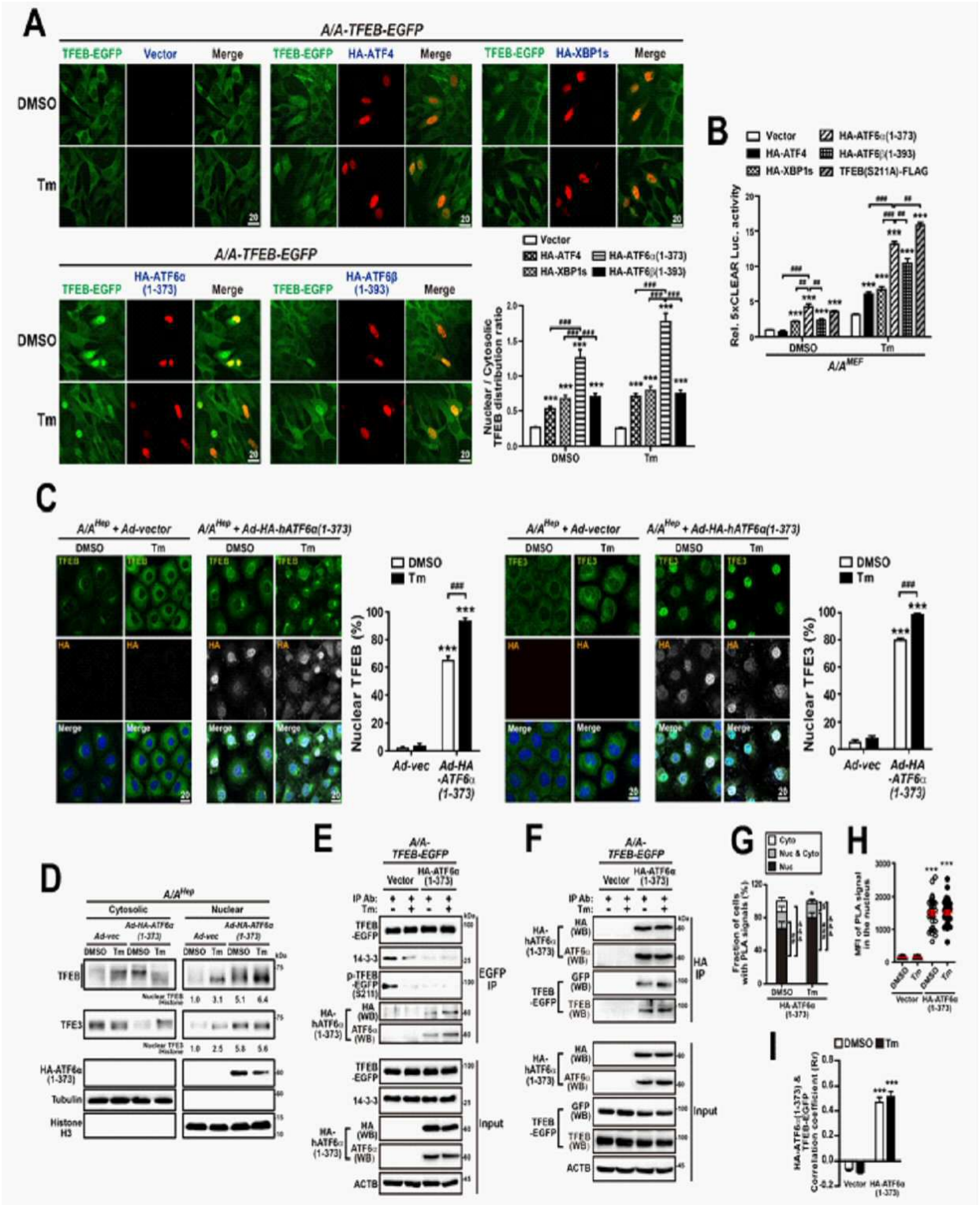
[0066] 이와 같이, ATF6 α 단백질 아미노산 N-말단 151 내지 296(서열번호 1)의 부위가 TFEB 핵이동에 결정적인 역할을 하는 것으로 파악하였다.

[0068] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

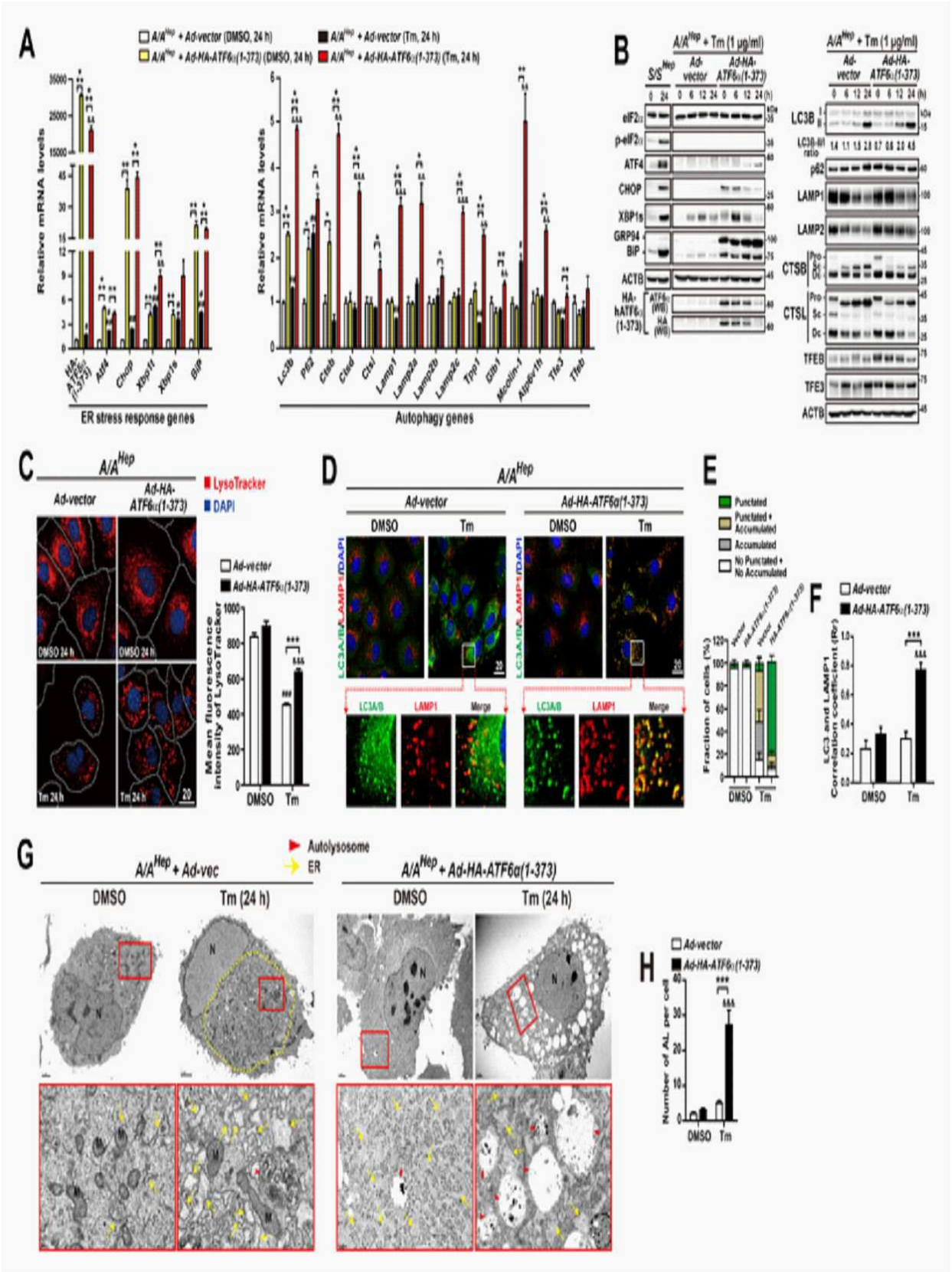
[0069] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

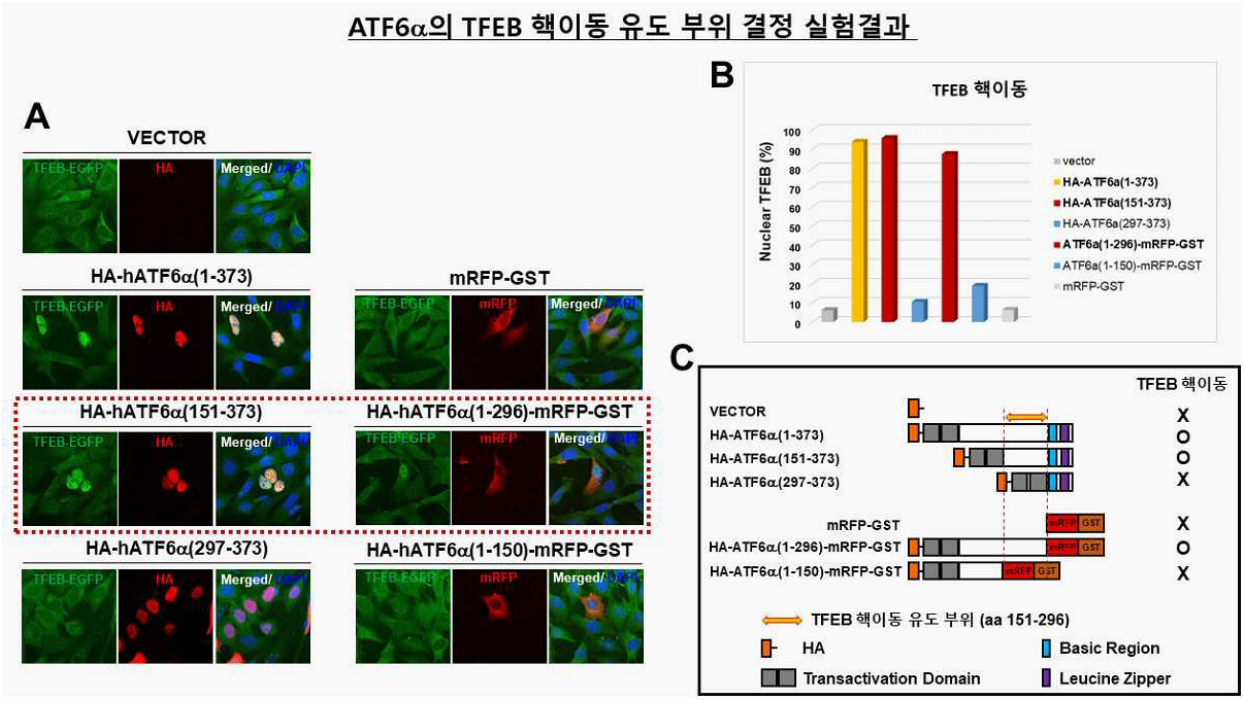
도면1


A
A/A-TFEB-EGFP
TFEB-EGFP
Vector
Merge
HA-ATF4
HA-XBP1s
DMSO
Tm
HA-ATF6α (1-373)
HA-ATF6β (1-393)
Nuclear / Cytosolic TFEB distribution ratio
B
Vector
HA-ATF4
HA-XBP1s
HA-ATF6α(1-373)
HA-ATF6β(1-393)
TFEB(S211A)-FLAG
Rel. 5xCLEAR Luc. activity
A/A^MEF
C
A/A^Hep + Ad-vector
A/A^Hep + Ad-HA-hATF6α(1-373)
Nuclear TFEB (%)
Nuclear TFE3 (%)
Ad-vec
Ad-HA -ATF6α (1-373)
D
A/A^Hep
Cytosolic
Nuclear
TFEB
TFE3
HA-ATF6α (1-373)
Tubulin
Histone H3
E
A/A-TFEB-EGFP
Vector
HA-ATF6α (1-373)
IP Ab:
Tm:
TFEB -EGFP
14-3-3
p-TFEB -EGFP (S211)
EGFP IP
HA-hATF6α (1-373)
HA (WB)
ATF6α (WB)
Input
ACTB
F
HA IP
GFP (WB)
TFEB (WB)
G
Cyto
Nuc & Cyto
Nuc
Fraction of cells with PLA signals (%)
H
MFI of PLA signal in the nucleus
I
HA-ATF6α(1-373) & TFEB-EGFP Correlation coefficient (Rr)

도면2


A
B
C
D
E
F
G
H
ER stress response genes
Autophagy genes
Ad-vector
Ad-HA-ATF6α(1-373)
DMSO
Tm
LysoTracker
DAPI
Autolysosome
ER

도면3


ATF6α의 TFEB 핵이동 유도 부위 결정 실험결과
A
VECTOR
TFEB-EGFP
HA
Merged/
HA-hATF6α(1-373)
mRFP-GST
mRFP
HA-hATF6α(151-373)
HA-hATF6α(1-296)-mRFP-GST
HA-hATF6α(297-373)
HA-hATF6α(1-150)-mRFP-GST
B
TFEB 핵이동
Nuclear TFEB (%)
vector
HA-ATF6a(1-373)
HA-ATF6a(151-373)
HA-ATF6a(297-373)
ATF6a(1-296)-mRFP-GST
ATF6a(1-150)-mRFP-GST
mRFP-GST
C
TFEB 핵이동
VECTOR
HA-ATF6α(1-373)
HA-ATF6α(151-373)
HA-ATF6α(297-373)
mRFP-GST
HA-ATF6α(1-296)-mRFP-GST
HA-ATF6α(1-150)-mRFP-GST
TFEB 핵이동 유도 부위 (aa 151-296)
HA
Basic Region
Transactivation Domain
Leucine Zipper

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.