



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0108313
(43) 공개일자 2009년10월15일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) *C12N 1/16* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0033676

(22) 출원일자 2008년04월11일

심사청구일자 2008년04월11일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

맹필재

대전 서구 갈마2동 398-5 대익빌라 402호

이용주

대전 서구 갈마2동 398-5 대익빌라 402호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 8 항

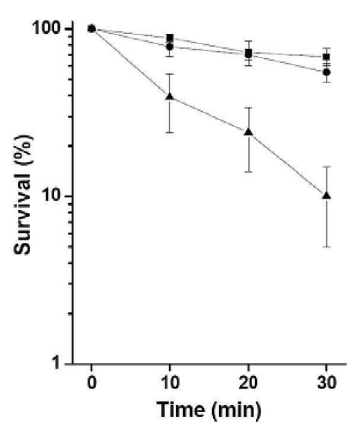
(54) GDH3 결손 효모를 이용한 아포토시스 조절물질의스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 *gdh3* 결손 효모를 이용하여 아포토시스 조절물질을 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 *gdh3* 결손 효모를 후보 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환하거나 *gdh3* 결손 효모에 시험물질을 처리하고 배양한 다음 열 스트레스 하에서 상기 효모의 아포토시스 활성을 측정함으로써 후보 단백질 또는 시험물질이 아포토시스 조절 활성이 있는지 여부를 판정하는 것을 특징으로 하는 아포토시스 조절물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명의 *gdh3* 결손 효모는 열에 의해 유도된 아포토시스에 대해 높은 민감성을 가지고 있으므로 상기 균주를 이용하여 아포토시스 조절물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

강홍용

대전 서구 괴정동 98-20

최수임

대전 유성구 어은동 한빛아파트 130동 1502호

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 글루타메이트 디하이드로지네이즈 3를 코딩하는 *gdh3* 가 결손된 효모를 시험물질과 배양하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 *gdh3* 결손 효모의 아폽토시스 활성을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 시험물질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는 아폽토시스 조절 물질의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 *gdh3* 결손 효모가 BY4741-YAL062W인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 *gdh3* 결손 효모에 열 스트레스를 가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 아폽토시스 활성 측정은 세포 내 ROS 측정, 핵 단편화, DNA 단편화 및 포스파티딜세린의 전좌로 이루어진 그룹 중에서 선택된 것을 측정함으로써 수행되는 것인 방법.

청구항 5

- (a) 미토콘드리아 사이트레이트 합성 효소를 코딩하는 *gdh37*가 결손된 효모를 후보 단백질을 발현하는 핵산으로 형질전환하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계의 형질전환된 *gdh3* 결손 효모의 아폽토시스 활성을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 후보 단백질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는 아폽토시스 조절 단백질의 스크리닝 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 *gdh3* 결손 효모가 BY4741-YAL062W인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 *gdh3* 결손 효모를 형질전환 한 다음 열 스트레스를 가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 아폽토시스 활성 측정은 세포 내 ROS 측정, 핵 단편화, DNA 단편화 및 포스파티딜세린의 전좌로 이루어진 그룹 중에서 선택된 것을 측정함으로써 수행되는 것인 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 열에 의해 유도된 아폽토시스에 대해 높은 민감성을 가지는 *gdh3* 결손 효모를 이용하여 아폽토시스 조절물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 진핵세포에서 아폽토시스는 잠재적으로 위협적인 또는 원치 않는 세포를 제거하기 위해 세포의 자기-분해(self-degrade)를 허용하는 세포 사멸의 고도로 조절된 프로세스이다. 따라서 이는 일반적인 방어 기작 및 발달에 있어서 중대한 일이다(Lam *et al.*, 1999, Curr. Opin. Plant Biol. 2, 502-507). 또한 이러한 세포 자살 프로세

스는 사카로마이세스 세레비지에 효모와 같은 원핵세포에도 존재한다(Madeo *et al.*, 1997, *J. Cell Biol.* 139, 729-734). 원핵세포가 가혹한 조건에 노출되게 되면, 아폽토시스는 생존을 촉진하기 위해 집단의 일부의 회생을 통해 세포 집단의 보존을 위한 방어 기작으로서 제공된다(Frohlich and Madeo, 2000, *FEBS Lett.* 473, 6-9).

<3> 사카로마이세스 세레비지에에서, 세포자연사(apoptotic cell death)는 전형적인 아폽토시스 마커, 즉, 포스포티딜 세린의 노출, DNA 단편화, 및 복제가 허용되지 않은 온도에서 크로마틴 응축을 보이는 온도-민감성(temperature-sensitive: ts) cdc 48 돌연변이에서 처음 기술되었다(Madeo, F. *et al.* 1997, *J Cell Biol.* 139:729-34). 비록, *S. 세레비지*에의 지놈은 예를 들어, Bcl-2/Bax 패밀리를 단백질 또는 카스파제 패밀리와 같은 주요한 아폽토시스 기작 단백질의 명백한 동족체를 코딩하지 않는다 하여도, H₂O₂- 또는 노화-유도(Madeo, F. *et al.* 2002, *Mol Cell.* 9:911-7), 및 텔로미어-개시에 의한 아폽토시스 경로(Qi, H. *et al.* 2003, *J Biol Chem.* 278:15136-41)에 요구되는 Yca1 (yeast caspase-1)으로 불리는 메타카스파제가 개체에서 동정되었다. 효모 세포가 고염도에 노출되면 아폽토시스가 유도되는데, 이는 삼투압 불균형보다는 세포내 이온 불균형에 의해 유도된다(Huh, G.H. *et al.* 2002, *Plant J.* 29:649-59). 종양 억제유전자(tumor suppressor) 동족체를 코딩하는 *SRO7/SOP1* 결손된 효모 세포는 NaCl 스트레스에 대하여 증가된 민감성을 나타내고 $\Delta sro7$ 돌연변이체가 성장-억제 NaCl 농도에 노출되면 Yca1-의존적 아폽토시스로 인한 생존물의 빠른 감소를 보였다(Wadskog, I., C. *et al.* 2004, *Mol Biol Cell.* 15:1436-44). 배양 배지의 높은 포도당 또는 솔비톨 농도에 의해 유도되는 고삼투압의 스트레스는 *S. 세레비지*에 Yca1- 및 미토콘드리아-의존적 아폽토시스를 겪도록 자극한다(Silva, R.D. 2005, *Mol Microbiol.* 58:824-34). α -요소(α -factor)를 이용한 메이트(mate)에 실패한 효모 세포의 제거에 관련된 것으로 보이는 페르몬-유도 세포사멸은 동물 세포의 미토콘드리아-의존적 아폽토시스의 전형적인 특성을 보이는 것으로 보고되었다(Severin, F.F. 2002, *Curr Biol.* 12:R233-5). 또한, *ost1* 및 *wpb1-1*와 같은 헤트르-올리고메릭 막 복합체 올리고사카리-트랜스퍼라제가 결핍된 효모 엔-당화 돌연변이체는 표면적으로 *YCA1* 비의존적으로 일어나는 것으로 보이는 아폽토시스를 겪는 것으로 최근 보고되었다(Hauptmann, P. *et al.* 2006, *Mol Microbiol.* 59:765-78). 포유류 및 효모 세포 모두에서 미토콘드리아는, Bax가 미토콘드리아 외막을 침투하도록 활성화될 때, 카스파제 활성을 자극하고 세포 사멸을 강화하는, 사이토크롬 c 및 다른 요소의 방출을 초래하여 세포사멸의 원인이 된다(Pastorino, J.G. 1998, *J Biol Chem.* 273:7770-5). 미토콘드리아 분열 기구의 일원인 Dnm1, Mdv1/Net2 및 Fis1은 미토콘드리아 관련된 예정된 세포 사멸(programmed cell death)과 관련된 것으로 증명되었다(Fannjiang, Y. *et al.* 2004, *Genes Dev.* 18:2785-97).

<4> 후생동물 아폽토시스에스와 같이, 활성산소(reactive oxygen species: ROS)는 효모 아폽토시스에서 미토콘드리아 경로의 주된 조절자로 작용한다(Eisenberg, T. *et al.* *Apoptosis.* 12:1011-23). 이와 일치하게, 자연 노화된 효모 세포는 아폽토시스 마커를 나타내고 노화 유도 사멸의 원인이 되는 산소 라디칼이 축적되면서 사멸하는 것으로 증명되었다(Frohlich, K.U., and F. Madeo. 2000, *FEBS Lett.* 473:6-9). 이런 발견과 일치하게, 장기 생존에는 시토졸(cytosolic) 및 미토콘드리아의 슈퍼옥사이드 디스무타제(각각, *SOD1* 및 *SOD2*)가 요구되는 것으로 밝혀졌다(Longo, V.D. *et al.* 1996, *J Biol Chem.* 271:12275-80). 나아가, 자연노화(chronological aging) 동안에 $\Delta sod1$ 또는 $\Delta sod2$ 돌연변이체의 증가된 사멸은 포유류 Bcl-2 발현에 의해 복구될 수 있다(Longo, V.D. *et al.* 1997, *J Cell Biol.* 137:1581-8). 포유류 Bcl-XL 발현은 또한, 후기 정지기(late-stationary phase)에서 효모 세포의 생존률 감소를 중화시키고(Trancikova, A. *et al.* 2004, *FEMS Yeast Res.* 5:149-56), 이는 노화 동안에 미토콘드리아의 중심적인 역할을 다시 한번 확인시키는 것이다. 효모 *S. 세레비지*는 통성 혐기성균(facultative anaerobe)이고 미토콘드리아 DNA (ρ^0 strains)의 완전한 상실에도 내성을 가지는데, 이는 미토콘드리아-관련 아폽토시스의 연구에 특히 유용하다.

<5> *S. 세레비지*에서, 암모늄은 두개의 다른 이소폼(isoform)인 NADP-의존적 글루타메이트 디하이드로지네이즈(NADP-GDHs)인, Gdh1 및 Gdh3에 의해 촉매되는 반응을 통하여 글루타메이트(glutamate)로 동화된다(Bussey, H. *et al.* 1995, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:3809-13 Moye, W.S. *et al.* 1985, *J Biol Chem.* 260:8502-8). 반면, Gdh2는 글루타메이트의 암모늄과 α -케토글루타레이트로의 분해에 주로 작용하는 NAD-GDH이다(Miller, S.M., and B. Magasanik. 1990, *J Bacteriol.* 172:4927-35). Gdh1 및 Gdh3 이소엔자임(isoenzyme)은 유전학적 및 생화학적 수준에서 분화되었으며, 이런 이중 복제는 글루타메이트의 생합성 효율성을 증대시키기 위한 것이다.

<6> 분리된 Gdh1 및 Gdh3에 대한 생화학적 연구에 따르면, 두 효소는 다른 동역학적 및 알로스테릭한 조절을 가진다(DeLuna, A. *et al.* 2001, *J Biol Chem.* 276:43775-83). *GDH3* 발현은 포도당에서 작용하지 않고 NADP-GDH 활성은 Gdh1 모노머에 의해서만 유지된다는 것이 발견되었다. 특이한 알로스테릭 특성과 α -케토글루타레이트 이용

에 대한 차등률 때문에, 에탄올에서 야생형의 성장을 위해서는 Gdh3 및 Gdh1 두 유전자의 발현은 요구된다 (DeLuna, A. et al., 2001. *J Biol Chem.* 276:43775-83). 발효 조건하에서는 글루타메이트의 주된 공급자가 Gdh1p 라는 사실과 일치하게 *GDH1* 발현은 포도당에 의해 느슨하게 조절되고 α-케토글루타레이트의 이용은 해당 과정(glycolysis)을 통한 에너지 공급을 손상시키지 않는다(Riego, L. et al. 2002. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:79-85). 반면, 에탄올 하에서 *GDH1* 발현은, Gdh1 모노머의 과다를 조절하는, 미세조절기작(fine-tuning mechanism)에 의해 강력하게 조절받는다. 호흡 조건하에서, NADP-GDH 핵서머의 동역학적 특성이 구성하는 Gdh1 및 Gdh3 모노머의 비율에 의존하므로, 엄격한 조절은 필수적이다. *GDH1* 조절은 또한, 질소 또는 탄소 대사의 독점적인 전자활성인자로 여겨지는 전사 활성인자(Gln3 및 HAP complex)에 의해 결정된다 (Riego, L. et al. 2002. *Biochem Biophys Res Commun.* 293:79-85). 탄소 제한 조건하에만 *GDH3* 발현이 완전하게 유도된다는 사실은, TCA 사이클의 에너지 제공 역할을 손상시키지 않고 글루타메이트 생합성을 가능하게 하는데 매우 중요하다. 반대로, 포도당이 과다한 발효 조건에서는 Gdh1 핵서머가 글루타메이트 생합성의 주요 경로를 제공하고 Gdh3는 역할을 하지 않는다.

<7> 본 발명자들은 최근, 미토콘드리아 사이트레이트 합성효소인 *cit1*과 아포토시스의 기능적인 관련성을 확인하였다. *cit1* 결손된 효모 세포는 온도-민감성의 성장 표현형을 보였으며 그 결과, 열 스트레스에 노출된 경우 전형적인 아포토시스 특징, 즉 ROS 축적, 핵분열, DNA 파괴 및 포스포티딜세린 전좌(translocation)와 관련된 표현형을 나타냄을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명자들은 *cit1* null 세포에서 GSH 결핍이 GSSG 내지 GSH의 감소에 요구되는 환원력의 고갈보다는 GSH의 생합성에 요구되는 글루타메이트의 불충분한 공급에 의해 유발되는 것임을 확인하였다(Lee, Y.J. et al. 2007. *Mol Biol Cell.* 18:3556-67). 본 발명자들은 이러한 *cit1*결손 효모를 아포토시스 조절물질의 스크리닝에 사용할 수 있었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 효모 *Gdh1* 및 *Gdh3*은 세포내 질소 대사의 관점에서 주로 기술되었으나, GDH 기능과 아포토시스와의 관련성에 대해서는 알려진 바가 없다.

과제 해결수단

<9> 본 발명자는 *gdh3* 및 *gdh1* 결손 효모 돌연변이체에서 열 스트레스에 대한 아포토시스에 대한 민감성을 조사하였다.

<10> 본 발명에 의하면 효모 세포에서 *gdh3*의 결손은 동일 유전자형의 야생형 균주와 비교하여 열 스트레스에 대한 민감성 증가를 유발하며, 이런 열-유도 사멸은 ROS에 의해 매개되며, 열 스트레스에 노출된 경우 단편화, 포스포티딜세린의 외재화, 및 DNA 가닥 절단 등의 전형적인 아포토시스 특징과 관련된 표현형을 나타냄을 확인할 수 있었다. 본 발명은 *gdh3* 결손된 효모 세포가 열에 의해 유도된 아포토시스에 대한 민감성이 증가됨을 처음으로 규명한데 의의가 있고, 이런 *gdh3* 결손 효모를 아포토시스 조절물질의 스크리닝에 이용하고자 한다.

<11> 본 발명에서 용어, “아포토시스”란 세포 수축, 염색질 응축, 핵 분절화(fragmentation) 및 막의 수포성 구조형성(blebbing)과 같은 현상이 일어나는 유전적으로 프로그램 된 세포 사멸을 의미하며 (Kerr et al. *Br. J. Cancer*, 26:239-257, 1972; Wyllie et al., *Int. Rev. Cytol.*, 68:251-306, 1980), 발생 과정 및 불필요하게 된 세포(잉여 세포나 노화 세포 등)를 제거하여 항상성을 유지하거나 이상을 조래하여 생체에 해롭게 된 세포(암 세포, 바이러스 감염된 세포 등)를 제거하는 데 중요한 생물학적 의의가 있는 기작이다.

<12> 아포토시스 조절의 실패와 질환 발생은 높은 상관관계가 있다. 아포토시스가 제대로 발생하지 않으면 암, 전신성홍반성낭창(SLE: Systemic Lupus Erythematosus), 자가면역성 림프세포 증식 증후군(ALPS: Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome), 류머티즘성 관절염(Rheumatoid Arthritis) 같은 자가면역 질환, 바이러스 감염 질환 등이 발생하고 아포토시스가 과다하게 발생되면 알츠하이머(Alzheimer's Disease), 뇌허혈(Brain Ischemia), 간질(Seizures), 파킨슨 병(Parkinson's Disease), 근위축성측삭경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), 다발성 경화증(Multiple Sclerosis) 등이 발생한다.

<13> 따라서 상기 아포토시스의 올바른 조절은 퇴행성 신경 질환, 바이러스 감염 질환, 자가면역 질환, 또는 암을 포함한 다양한 질환의 치료에서 매우 중요하다 (Wyllie et al. *Int. Rev. Cytol.*, 68:251-306, 1980; Thompson Science, 267:1456-1462, 1995; Sen 및 D'Incalci *FEBS Letters*, 307:122-127, 1992; McDonnell et. al.,

Seminars in Cancer and Biology, 6:53-60, 1995).

- <14> 따라서 아폽토시스 조절 물질을 스크리닝하는 것은 상술한 질환의 치료제를 개발하는데 있어서 매우 중요하다.
- <15> 따라서, 본 발명은 *gdh3* 결손 효모를 이용한 아폽토시스 조절물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- <16> 바람직하게는, (a) 글루타메이트 디하이드로지네이즈 3를 코딩하는 *gdh3*이 결손된 효모를 시험물질과 배양하는 단계;
- <17> (b) 상기 (a) 단계의 *gdh3* 결손 효모의 아폽토시스 활성을 측정하는 단계; 및
- <18> (c) 상기 시험물질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- <19> 상기 (a) 단계의 *gdh3* 결손 효모는 당업계에 공지된 방법 예를 들면, 약제, 자외선 조사, 자연변이에 의한 방법 또는 인위적으로 표적 유전자를 파괴시키는 방법에 의해 제조될 수 있다.
- <20> 구체적으로, *gdh3* 결손 효모는 BY4741-YAL062W 등을 사용할 수 있다.
- <21> 상기 (a) 단계의 “시험물질(test agent)”은 아폽토시스 억제제 및 촉진제를 모두 포함하며, 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실체물(entity) 또는 이들의 조합을 포함한다. 예컨대, 이에 제한되지는 않으나, 단백질, 폴리펩티드, 소유기 물질(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드, 지질 등을 포함한다. 또한 자연 산물(natural product), 합성 화합물 또는 화학 화합물 또는 2개 이상의 물질의 조합일 수도 있다. 다르게 지정되지 않는 한, 제제, 물질 및 화합물은 호환성 있게(interchangeably) 사용할 수 있다.
- <22> 본 발명의 방법으로 스크리닝되거나 동정될 수 있는 시험물질은 폴리펩티드, 베타-턴 미메틱(beta-turn mimetics), 다당류, 인지질, 호르몬, 프로스타글란딘, 스테로이드, 방향족 화합물, 헤테로사이클릭 화합물, 벤조디아제핀(benzodiazepines), 올리고머릭 N-치환 글리신(oligomeric N-substituted glycines), 올리고카르바메이트(oligocarbamates), 당류(saccharides), 지방산, 퓨린, 피리미딘 또는 이들의 유도체, 구조적 아날로그 또는 조합을 포함한다. 상기 시험물질은 합성 또는 자연 화합물의 라이브러리를 포함하는 광범위하고 다양한 출처로부터 얻어질 수 있다. 바람직하게는, 상기 시험물질은 펩타이드, 예컨대, 약 5-30개, 바람직하게는 약 5-20개, 보다 바람직하게는 약 7-15개의 아미노산을 가지는 펩타이드일 수 있다. 상기 펩타이드는 자연적으로 생성되는 단백질, 랜덤 펩티드 또는 “바이어스화(biased)” 랜덤 펩티드의 절단물일 수 있다.
- <23> 또한 상기 시험물질은 “핵산”일 수 있다. 핵산 시험물질은 자연적으로 생성되는 핵산, 랜덤 핵산, 또는 “바이어스화” 랜덤 핵산일 수 있다.
- <24> 또한 상기 시험물질은 소분자(예: 약 1,000 이하의 분자량을 갖는 분자)일 수 있다. 소분자의 조절 체제를 스크리닝하기 위한 방법에는 바람직하게는 고속 분석 어세이(high throughput assay)가 적용될 수 있다.
- <25> 시험물질은 유효량의 범위내에서 처리하도록 한다. “유효량”이란 반응을 유도하기에 충분한 양을 의미하는 것으로, 유효량 범위 이하에서는, 정확한 결과를 얻을 수 없으므로, 유효량 범위내에서 시험물질을 처리하여 아폽토시스 억제 또는 촉진을 조사하도록 한다.
- <26> 상기 (b) 단계에서 아폽토시스 활성 측정방법으로는 당업계에 공지된 방법에 따라 세포 내 ROS 측정, 핵 단편화, DNA 단편화 및 포스파티딜세린의 전좌로 이루어진 그룹 중에서 선택된 것을 측정함으로써 수행될 수 있다.
- <27> 예를 들면, 세포 내 ROS 측정 정도는 DCFH-DA를 이용한 염색법에 의해 측정할 수 있으며, 핵 단편화는 DAPI 염색법에 의해 측정할 수 있다. 또한, DNA 단편화는 TUNEL 어세이를 이용하여 측정할 수 있으며, 포스파티딜세린의 전좌는 FITC-Annexin V를 이용하여 측정할 수 있다.
- <28> 상기 (c) 단계는 상기 시험물질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계로서, 시험물질을 처리하여 배양한 효모의 아폽토시스 활성과 시험물질을 처리하지 않고 배양한 효모의 아폽토시스 활성을 비교함으로써 결정할 수 있다.
- <29> 또한, 본 발명의 방법은 상기 (a) 단계에서 *gdh3* 결손 효모를 형질전환한 다음 열 스트레스를 가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- <30> 상기 열 스트레스를 가하는 단계는 효모를 50℃ 이상의 온도에서 10 내지 30분 간 배양함으로써 수행될 수

있다.

- <31> 나아가, 상기 시험물질이 특정 단백질을 코딩하는 핵산의 경우에는 다음의 방법에 따라 아폽토시스 조절 물질을 스크리닝할 수 있다.
- <32> (a) 미토콘드리아 사이트레이트 합성 효소를 코딩하는 *gdh3*이 결손된 효모를 후보 단백질을 발현하는 핵산으로 형질전환하는 단계;
- <33> (b) 상기 (a) 단계의 형질전환된 *gdh3* 결손 효모의 아폽토시스 활성을 측정하는 단계; 및
- <34> (c) 상기 후보 단백질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다.
- <35> 상기 (a) 단계에서 후보 단백질을 발현하는 핵산을 이용한 형질전환은 당업계에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다.
- <36> 즉, 후보 단백질을 발현하는 핵산은 적합한 발현 벡터 내로 삽입되어 효모 세포를 형질전환 할 수 있다. 상기 재조합 벡터의 효모 세포로의 도입은 당분야에 공지된 방법 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 입자 총 충격법 (particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation), PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법 및 리튬 아세테이트 방법을 사용할 수 있다. 바람직하게는 리튬 아세테이트 방법을 이용하는 것이다.
- <37> 상기 (c) 단계는 상기 후보 단백질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계로서, 후보 단백질을 코딩하는 유전자로 형질전환되지 않은 효모의 아폽토시스 활성과 후보 단백질을 코딩하는 유전자로 형질전환된 효모의 아폽토시스 활성을 비교함으로써 결정할 수 있다.

효 과

- <38> *gdh3* 결손 효모에서 전형적인 아폽토시스 특징이 나타나면서 열 스트레스에 대한 민감성이 증가하고 이러한, 열-유도 사멸은 ROS에 의해 매개되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 상기 *gdh3* 결손 효모의 특성을 이용하여 아폽토시스 조절물질을 용이하게 스크리닝할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <39> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.
- <40> **실시예 1: 재료 및 방법**
- <41> 1-1: 효모 균주, 배지 및 형질전환
- <42> 본 발명에 사용된 사카로미세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주는 표 1에 기재된 바와 같다. 영양 배지(rich medium)는 1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 75 μ M 아데닌 설파이트 및 2% 포도당으로 이루어진 것을 사용하였으며(YPD), 합성 완전 배지(synthetic complete medium)는 0.7% 효모 질소 베이스(Difco, Detroit, MI), 2mM 우라실 및 1mM 보충 아미노산(글루타메이트, 히스티딘, 루신 및 메티오닌과 같은) 및 2% 포도당으로 이루어졌다(SCD). 플레이트는 2% 아가(Difco)를 포함한다. 효모 균주의 형질전환은 리튬 아세테이트 방법(Ito, H. et al., 1983., *J Bacteriol.* 153:163-8)으로 수행하였다.

표 1

본 발명에서 사용한 효모 균주

균주 및 플라스미드	관련 유전형	참고문헌 또는 입수처
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	ATCC
BY4741-YOR375C	<i>Δgdh1::KanMX4 MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	ATCC
BY4741-YAL062W	<i>Δgdh3::KanMX4 MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	ATCC

<43>

<44> 1-2: 생존 테스트

<45> 세포 생존 분석을 위하여, SCD 브로쓰(broth)에서 30℃로 1일간 배양한 효모 세포를 PBS에 1.0×10^8 cells ml⁻¹가 되도록 현탁하였다. 샘플을 2ml 취하여, 열, H₂O₂, 아세트산, 안티마이신(antimycin), 로테논(rotenone)및 티론(tiron)에서 선택되는 1이상의 물리적 및 화학적 처리를 하였다. 각 샘플 100 μl를 취하여 10배씩 단계적으로 희석하였다. 플레이트 어세이로 생존률을 측정하고자, 각 희석액의 5 μl를 SCD 플레이트로 스팟하고 30℃에서 3일간 배양하였다. CFU 어세이를 위하여, 각 희석액 100μl를 SCD 플레이트에 도말하고 30℃에서 3일간 배양한 후 콜로니를 계수하였다.

<46> 1-3: 아포토시스 마커 분석

<47> TUNEL 어세이(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling assay)를 공지된 방법에 따라 (Madeo, F. et al. 1999. *J Cell Biol.* 145:757-67) 수행하였다. 간략하게, 세포를 3.7% 포름알데히드로 고정하고 라이티카제(lyticase)(Sigma, St. Louis, MO)로 분해하고 이를 폴리라이신-코팅된 슬라이드에 놓고 0.3% H₂O₂로 처리하여 내재성 퍼옥시다아제를 차단시킨 후, 0.1% 트립톤 X-100으로 투과성을 부여한 다음, 10μl TUNEL 반응 혼합물(Roche, Mannheim, Germany)로 37℃에서 60분간 배양한 후, 10μl 컨버터-POD(Roche)로 37℃에서 30분간 배양한 다음 DAB-기질 용액(Roche)으로 10분간 염색하였다. 카이저 글리세롤 젤라틴(Kaiser's glycerol gelatin)(Merck, Darmstadt, Germany)을 떨어뜨려 커버슬립을 봉입하고 디지털 카메라(DP11; Olympus)가 장착된 BX51 유니버설 리서치 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 세포의 브라이트-필드 이미지(bright-field image)를 획득하였다.

<48> 세포내 활성산소(ROS)의 수준을 모니터링하고자, 세포를 10μg ml⁻¹ DCFH-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)로 30℃에서 교반하면서 2시간 동안 염색하였다(Madeo, F. et al. 1999. *J Cell Biol.* 145:757-67). 핵 단편화(nuclear fragmentation)를 분석하기 위해, 세포를 3.7% 포름알데히드로 고정하고 0.5μg ml⁻¹ DAPI(Sigma)로 염색하였다 (Madeo, F. et al. 1997. *J Cell Biol.* 139:729-34). 포스파티딜세린의 외재화(externalization)는 공지된 방법에 따라 FITC-Annexin V(BD Biosciences, San Diego, CA)를 이용하여 분석하였다(Madeo, F. et al. 1997. *J Cell Biol.* 139:729-34). 세포를 소화 버퍼(digestion buffer)에서 현탁시키고 세포벽을 소화시켰다. 스페로플라스트(spheroplasts)를 FITC-Annexin V 및 프로피디움 아이오다이드(PI; BD Biosciences 500μg ml⁻¹)로 염색하였다.

<49> 형광 현미경은 디지털 카메라(DP11; Olympus)가 장착된 BX51 유니버설 리서치 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)하에서 적절한 필터 세트를 이용하여 수행하였다. DCFH-DA 및 FITC-Annexin V에는 FITC 필터, DAPI에는 DAPI 필터, PI 염색에는 로다민(rhodamine) 필터를 사용하였다.

<50> 형태학적 표현형의 빈도를 결정하기 위해 (TUNEL, DCFH-DA, DAPI, FITC-Annexin V, 및 PI), 3개의 독립적인 실험으로부터 적어도 300개의 세포를 평가하였다.

<51> 1-4: GSH 및 글루타메이트 분석

- <52> GSH의 세포내 수준은 GSH 리사이클링 시스템 내에서 5,5'-디티오비스-(2-니트로벤존산)(DTNB; Sigma)으로부터 2-니트로-5-티오벤존산 형성 비율을 측정함으로써 결정하였다(Anderson, M.E. 1985. *Methods Enzymol.* 113:548-55). 각 세포 라이세이트(cell lysate) 5 μ l를 0.6 mM DTNB, 5 mM EDTA, 0.2 mM NADPH 및 1 U/ml GR (Sigma)를 포함하는 100 mM 포스페이트 버퍼(pH 7.5)의 1 ml에 첨가하고 A₄₁₂의 비를 모니터하였다.
- <53> 글루타메이트의 세포내 수준은 제조사의 사용설명서에 따라 색도 글루타메이트 분석 키트(colorimetric glutamate analysis kit: R-Biopharm, Darmstadt, Germany)를 이용하여 측정하였다.
- <54> **실시예 2: GDH3 결손은 온도 민감성 표현형을 증대시킴**
- <55> 효모 균주의 생존 실험은 야생형, $\Delta gdh1$, 및 $\Delta gdh3$ 세포가 열 스트레스에 매우 민감하다는 것을 증명하였다(도 1). 50°C에서 30분간 열 스트레스에 노출된 후에 야생형과 $\Delta gdh1$ 세포의 생존비는 55-68% 정도였으나, 동일한 처리를 한 $\Delta gdh3$ 세포는 처음 개체의 10%만이 생존하였다. 이런 결과는 야생형 및 $\Delta gdh1$ 세포는 아니지만, $\Delta gdh3$ 세포는 온도 민감성 표현형(ts phenotype)을 가지는 것을 의미한다.
- <56> **실시예 3: gdh3 결손된 세포의 열-유도 세포사멸은 ROS에 의해 매개됨**
- <57> 열 스트레스 조건하에서 증대된 $\Delta gdh3$ 세포 사멸이 돌연변이 개체의 스트레스-유도된 아포토시스에 대한 높은 경향에 의해 유도되는지를 확인하고자, 돌연변이 세포에서 아포토시스의 세포학적 및 생화학적 특징을 조사하였다. 우선, 효모에서 아포토시스를 유도하기 위해 필요하고 충분한 것으로 증명된 ROS의 존재를 세포에서 분석하였다(Madeo, F. et al. 1999. *J Cell Biol.* 145:757-67).
- <58> 과산화수소(H₂O₂)의 작용을 통해 형광발색단, DCF(2', 7' -dichlorofluorescein)로 산화되는 DCFH-DA를 ROS의 검출을 위한 프로브로 사용하였다. 형광 현미경에서 나타나는 바와 같이(도 2 A 및 B), SCD 프로브에서 30°C에서 2일간 사전 배양된 대부분의 $\Delta gdh3$ (68%)에서 50°C의 열 스트레스에 10분 노출한 후에 형광이 나타났다. 반면, 야생형과 $\Delta gdh1$ 세포는 동일 조건에서 검출 수준의 DCF 형광을 보이지 않았다. 이런 결과는 GDH3의 결손이 ROS의 열 스트레스-의존적인 축적을 유발한다는 것을 의미한다.
- <59>
- <60> **실시예 4: gdh3 결손된 세포는 열 스트레스 조건에서 아포토시스 마커를 나타냄**
- <61> ROS의 발생이 증가하는 것으로 확립된 열-스트레스 $\Delta gdh3$ 돌연변이주에서, 열 스트레스를 받은 돌연변이 세포에 대하여, 잘 확립된 세포학적 아포토시스 홀마크인 핵 단편화(nuclear fragmentation)를 관찰하였다. 정상 조건(30°C, 10분)에서는 야생형 및 돌연변이 세포 각각에서 정상적인 단일의 둥근형태의 핵이 관찰되었다(도 3). 반면, 50°C에서 10분간 노출시킨 경우에는 $\Delta gdh3$ 세포의 약 68%가 불규칙적인 모양의 분절된 핵을 나타내었다. 반대로, 동일하게 처리한 야생형 및 $\Delta gdh1$ 세포의 약 10%만이 비정상적인 핵을 나타내었다.
- <62> 또한, 또 다른 잘 알려진 아포토시스의 특징인 핵 내 DNA 단편화를 형광 뉴클레오타이드가 DNA 단편의 3'-OH 말단에 추가되어 현상을 형광 현미경에 의해 볼 수 있도록 한, TUNEL 어세이를 이용하여 조사하였다.
- <63> 포유동물 세포에서처럼 효모 세포에서도, 포스타티딜세린의 전좌, 즉 정상 조건 하에서 주로 플라스마 막의 내부 편(inner leaflet)에 위치해 있는 포스타티딜세린의 외부 편(outer leaflet)으로의 이동은 아포토시스의 초기 단계의 민감한 마커로서 제공된다(Martin, S.J. et al. *Embo J.* 14:5191-200). 세포질막의 외부면에서 포스파티딜세린을 검출하기 위하여, 야생형 및 돌연변이 균주의 열 스트레스 받은 세포에서 형성된 스페로플라스트(spheroplasts)를 FITC-Annexin V 및 PI로 염색하고 형광 현미경으로 분석하였다.
- <64> 열 스트레스에 노출되었을 때(50°C, 10분), $\Delta gdh3$ 세포의 일부만 FITC-Annexin V로 염색되었으며, 이는 이들이 아포토시스의 초기 단계를 겪고 있음을 나타낸다. 또한, 열 스트레스를 받은 세포의 일부는 FITC-Annexin V 및 PI로 모두 염색되었고, 이는 아포토시스의 말기 과정 또는 네크로시스를 겪는 세포가 존재함을 나타낸다. 이와 반대로, 동일하게 처리한 야생형 및 $\Delta gdh1$ 세포의 극히 일부만이, 아포토시스로 여겨지는, FITC-Annexin V로만 염색되었다. (데이터 미도시)
- <65> 요약하면, 이러한 결과로부터 동일 유전자형의 야생형 균주와 비교하여 $gdh3$ 결손된 돌연변이 균주는 ROS 축적, 핵 단편화, 포스파티딜세린의 외재화, 및 DNA 가닥 절단 등의 아포토시스의 구조적 특징을 가지는 열 스트레스 유도된 세포사에 더 민감하다는 결론을 내릴 수 있다.
- <66> **실시예 5: gdh3 결손된 세포는 글루타메이트 저장에 의해 유발된 GSH 고갈을 보이고, 이는 열-유도된 세포사에**

증대된 민감성을 초래함

- <67> 스트레스 조건에 노출된 *gdh3* 결손된 세포에서 ROS의 축적이, 퍼옥시다아제에 의해 H₂O₂ 및 유기 하이드로퍼옥사이드를 환원시키는데 사용되는 GSH (Grant, C.M. et al. 2001. *Mol Microbiol.* 39:533-41)의 고갈에 의해 촉진되는지를 측정하기 위하여, 돌연변이 및 야생형 세포에서 GSH의 수준을 조사하였다. 효모 균주의 온도-의존적 생존에 미치는 외래성 GSH의 효과를 조사하였다. 세포내 GSH 수준의 회복과 일치하도록, GSH-공급된 SCD 배지에서 성장한 Δ *gdh3* 세포는 야생형 및 Δ *gdh1* 세포와 거의 동일한 온도-의존적인 생존을 보여주었다(도 4).
- <68> 세포내 GSH 수준은 생합성 및 환원의 비율이 균형을 이루는 복잡한 일련의 반응에 의해 유지된다 (Grant, C.M. et al. 1996. *Mol Microbiol.* 21:171-9; Inoue, Y. et al. *Biochim Biophys Acta.* 1395:315-20 Ohtake, Y., and S. Yabuuchi. 1991. *Yeast.* 7:953-61). *gdh3* 결손 돌연변이에서 GSH의 생합성 과정에 결함이 있는지를 확인하기 위하여, GSH 합성을 위한 전구체로서 사용되는 글루타메이트, 글리신 및 시스테인과 같은 몇몇의 아미노산이 열 스트레스 조건 하에서 효모 세포의 생존에 미치는 효과를 조사하였다. 10mM 글루타메이트 첨가한 SCD 에서 성장한 돌연변이 Δ *gdh3* 세포는 50℃의 열 스트레스에 노출된 후에 야생형 및 Δ *gdh1* 세포와 유사한 생존율을 보여주었다(도 4).

산업이용 가능성

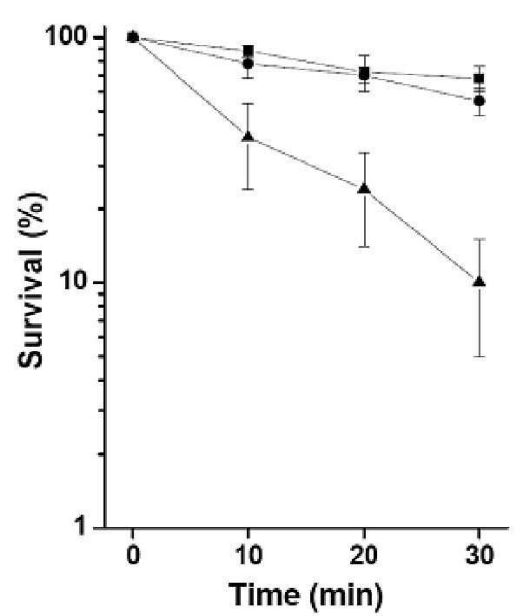
- <69> 상술한 바와 같이, 본 발명의 *gdh3* 결손 효모는 열에 의해 유도된 아포토시스에 대해 높은 민감성을 가지고 있으므로, 상기 *gdh3* 결손 효모를 이용하여 아포토시스 조절 물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

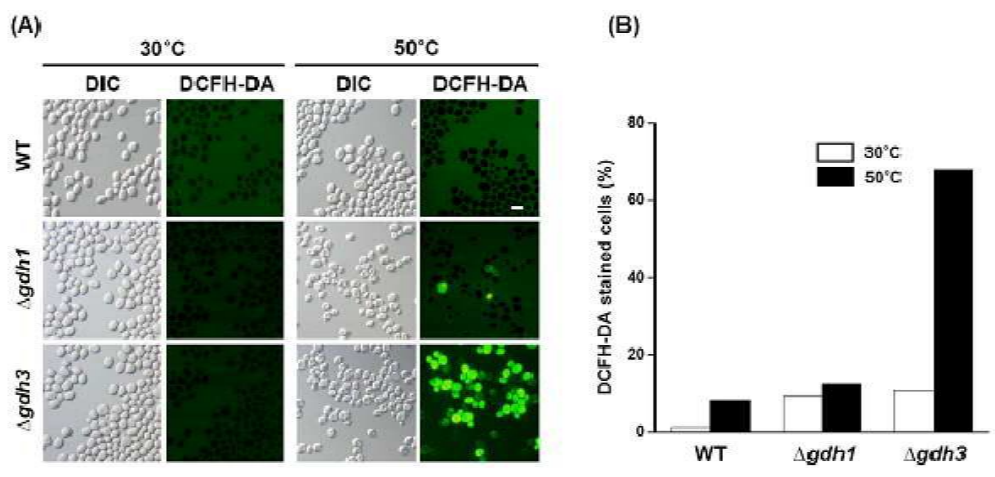
- <70> 도 1는 *gdh3*의 결손은 열 스트레스에 대한 증가된 민감성을 유발함을 보여주는 결과이다. 치사 온도에서 효모 균주의 생존율을 분석한 결과로, SCD에서 배양한 효모 균주 (야생형, Δ *gdh1*, 및 Δ *gdh3*)를 50℃로 옮기고, 샘플의 앨리쿼트(aliquot)를 시간 간격으로 회수하였다. 생존 세포는 세 번 수행한 CFU 어세이로 계산하였다 (■ wild-type, ● *gdh1*, ▲ *gdh3*).
- <71> 도 2는 *gdh3* null 세포의 열-유도 사멸이 ROS에 의해 매개됨을 보여주는 결과이다. (A) 열 스트레스에 노출된 세포에서 ROS의 축적 관찰한 결과이다. SCD에서 성장한 효모균주(wild-type, *gdh1*, 및 *gdh3*)를 30 또는 50℃에서 10 분간 배양하였다. 다음, 세포를 DCFH-DA로 염색하고 형광 현미경으로 관찰하였다. 스케일 바는 10μm (B) 열 스트레스에 노출된 후에 ROS-축적된 세포의 백분율을 나타낸다. 형광 이미지에서 DCFH-DA 양성 세포를 계수하고 상응하는 DIC 이미지에서 총 세포를 결정하였다.
- <72> 도 3은 *gdh3* 결손된 세포는 열 스트레스 조건하에서 핵 단편화를 나타냄을 보여주는 결과이다. SCD에서 성장한 효모균주(wild-type, Δ *gdh1*, 및 Δ *gdh3*)를 10분간 30 또는 50℃에서 배양하였다. 세포를 DAPI로 염색하고 형광 현미경으로 관찰하였다. 스케일 바는 10μm.
- <73> 도 4는 *gdh3* 결손된 세포는 GSH와 글루타메이트의 고갈을 나타내고, 이는 열-유도 및 ROS-매개된 아포토시스에 대한 민감성을 증가시키는 것을 보여주는 결과이다. *GDH3* 결손에 의해 유도된 ts 표현형에 미치는 외인성 GSH 및 글루타메이트의 효과를 관찰하였다. 10 mM GSH 및 글루타메이트를 첨가 또는 무첨가한 SCD 브로쓰에서 배양한 효모 균주(wild-type, Δ *dh1*, 및 Δ *gdh3*)를 10분간 50℃에서 배양하였다. 샘플의 앨리쿼트를 취하여, 생존한 세포를 세 번 수행한 CFU 어세이로 계산하였다.

도면

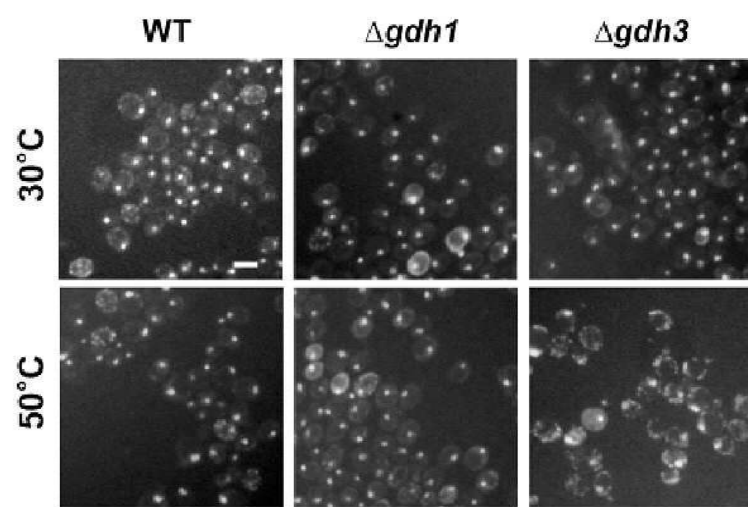
도면1



도면2



도면3



도면4

