(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0107705
(43) 공개일자 2008년12월11일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/00 (2006.01) *C12Q 1/25* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0055826
(22) 출원일자 2007년06월08일
심사청구일자 2007년06월08일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
맹필재
대전 유성구 신성동 두레아파트 102동 606호
이용주
대전 서구 갈마동 398-5 대익빌라 402호
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 8 항

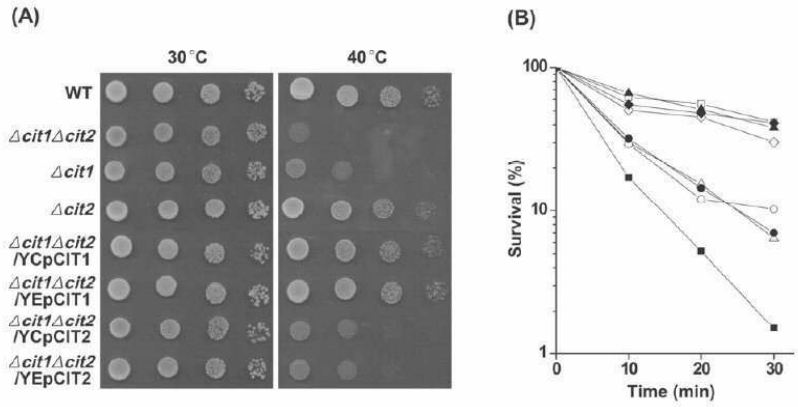
(54) C I T 1 결손 효모를 이용한 아폽토시스 조절물질의스크리닝 방법

(57) 요 약

본 발명은 *CIT1* 결손 효모를 이용한 아폽토시스 조절물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 *CIT1* 결손 효모를 후보 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환하거나 상기 *CIT1* 결손 효모에 시험물질을 처리하고 배양한 다음 열 또는 노화 스트레스 하에서 상기 효모의 아폽토시스 활성을 측정함으로써 후보 단백질 또는 시험물질이 아폽토시스 조절 활성이 있는지 여부를 판정하는 것을 특징으로 하는 아폽토시스 조절물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명의 *CIT1* 결손 효모는 열 또는 노화에 의해 유도된 아폽토시스에 대해 높은 민감성을 가지고 있으므로 이를 이용하여 아폽토시스 조절물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

(a) 미토콘드리아 사이트레이트 합성 효소를 코딩하는 *CIT1*이 결손된 효모를 시험물질과 배양하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 *CIT1* 결손 효모의 아폽토시스 활성을 측정하는 단계;

(c) 상기 시험물질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는 아폽토시스 조절 물질의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 *CIT1* 결손 효모가 사카로마이세스 세레비지애 Δ*cit1*(ATCC 4005376) 또는 사카로마이세스 세레비지애 Δ*cit1*Δ*cit2*(MCBY001)인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 *CIT1* 결손 효모에 열 또는 노화 스트레스를 가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

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

청구항 5

(a) 미토콘드리아 사이트레이트 합성 효소를 코딩하는 *CIT1*이 결손된 효모를 후보 단백질을 발현하는 핵산으로 형질전환하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계의 형질전환된 *CIT1* 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 *CIT1* 결손 효모가 사카로마이세스 세레비지애 Δ*cit1* (ATCC 4005376) 또는 사카로마이세스 세레비지애 Δ*cit1*Δ*cit2*(MCBY001)인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 *CIT1* 결손 효모를 형질전환 한 다음 열 또는 노화 스트레스를 가하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

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

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<18> 본 발명은 *CIT1* 결손 효모를 이용한 아폽토시스 조절물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 *CIT1* 결손 효모를 후보 단백질을 코딩하는 핵산으로 형질전환하거나 상기 *CIT1* 결손 효모에 시험물질을 처리하고 배양한 다음 열 또는 노화 스트레스 하에서 상기 효모의 아폽토시스 활성을 측정함으로써 후보 단백질 또는 시험물질이 아폽토시스 조절 활성이 있는지 여부를 판정하는 것을 특징으로 하는 아폽토시스 조절물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

<19> 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 프로세스는 사카로마이세스 세레비지애 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 희생을 통해 세포 집단의 보존을 위한 방어 기작으로서 제공된다(Frohlich and Madeo, 2000, FEBS Lett. *473*, 6-9). S. 세레비지애에서 아폽토시스는 포스파티딜세린의 플리핑(flipping), 멤브레인 브레빙(blebbing), 염색체 응축 및 이동(margination), DNA 절단과 같은 포유동물의 아폽토시스의 일반적인 특징을 나타낸다(Ligr *et al.*, 1998, FEBS Lett. *438*, 61-65).

<20> 미토콘드리아 사이트레이트 합성효소인 Cit1은 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae)에서 TCA 사이클(tricarboxylic acid cycle)의 초기 반응을 촉매하는 활성을 가지고 있다. 즉, TCA 사이클의 첫 번째 반응은 아세틸-CoA의 농축이며 옥살로아세테이트가 사이트레이트를 형성하고 S. 세레비지애 내의 주요 미토콘드리아 사이트레이트 합성효소 Cit1에 의해 촉매된다. 따라서 *Cit1*은 TCA 사이클의 속도제한효소(rate-limiting enzyme)로서 기능하며(Suissa *et al.*, 1984, EMBO J. *3*, 1773-1781), 퍼록시소말(peroxisomal) 사이트레이트 합성효소 Cit2는 글리콕실레이트 사이클과 관련이 있다(Kim *et al.*, 1986, Mol. Cell. Biol. *6*, 1936-1942; Lewin *et al.*, 1990, Mol. Cell. Biol. *10*, 1399-1405). 이전에 Cit1의 기능은 아세트산 이용 및 메타볼론(metabolon) 구성의 관점에서 주로 연구되어 왔다.

<21> 이에 본 발명자들은 Cit1의 기능에 대해 연구하던 중 효모세포에서 *CIT1*의 결손이 열 또는 노화에 의해 유도된 Yca1 의존적 아폽토시스에 대한 민감성을 증가시킴을 규명하고 이러한 *CIT1* 결손 효모의 특성을 이용하여 아폽토시스 조절물질을 스크리닝할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<22>

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<23> 따라서 본 발명의 목적은 *CIT1* 결손 효모를 이용한 아폽토시스 조절물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<24> 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *CIT1* 결손 효모를 이용한 아폽토시스 조절물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

<25> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<26> 본 발명은 미토콘드리아 사이트레이트 합성 효소(Mitochondrial Citrate Synthase)를 코딩하는 *CIT1*이 결손 된 효모 세포가 아폽토시스에 대한 민감성이 증가됨을 처음으로 규명하였다는 데에 특징이 있다.

<27>

<28> 본 발명의 일 실시예에서는 사이트레이트 합성효소와 아폽토시스의 관련성을 조사하기 위하여, CS(citrate synthase) 돌연변이체, 즉 Δ*cit1*, Δ*cit2* 및 Δ*cit1*Δ*cit2*의 온도 민감성을 이들의 야생형 균주(BY4741)와 비교하였다(실시예 4 참조). 그 결과, *CIT1* 결손 효모 세포의 경우 온도-민감성 생육 표현형을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 1의 A 및 B 참조).

<29> 또한, 본 발명의 다른 실시예에서는 *CIT1* 결손 균주의 열에 의해 유도된 세포사멸과 ROS의 관련성 확인하기 위해 열 스트레스에 노출시킨 효모 균주 내 ROS 축적 정도를 분석하였다(실시예 <5-1> 참조). 그 결과,

CIT1 결손은 열 스트레스 의존적 ROS의 축적을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 2의 A 및 B 참조).

<30> 또한, *CIT1* 결손을 가진 세포에서 관찰된 온도 민감성 표현형 및 열 스트레스 의존적 ROS 축적 사이의 직접적인 관련성의 존재를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 세포-투과성 ROS 스캐빈저의 존재 하에서 각 효모 균주의 온도 의존적 생존율을 분석하였다(실시예 <5-2> 참조). 그 결과, ROS 스캐빈저가 열의 의한 사멸로부터 돌연변이 세포를 보호할 수 있음을 알 수 있었다(도 2의 C 참조).

<31> 따라서 이러한 결과를 종합해 보면, *CIT1* 결손 돌연변이의 열에 의해 유도된 사멸은 ROS의 축적에 의해 매개됨을 알 수 있었다.

<32> 나아가, 본 발명자들은 열 스트레스에 노출된 *CIT1* 결손 세포의 아폽토시스 마커를 분석하였다(실시예 6 참조). 그 결과, 열 스트레스에 노출된 경우 전형적인 아폽토시스 특징, 즉 ROS 축적, 핵분열, DNA 파괴 및 포스파티딜세린 전좌(translocation)와 관련된 표현형을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 3 및 도 4 참조).

<33> 또한, 본 발명자들은 *CIT1* 결손 세포의 노화에 의해 유도된 세포사멸에 대한 민감성을 조사한 결과(실시예 7 참조), *cit1* null 균주의 장기간 배양시, 노화-유도된 아폽토시스 및 순응성 재생장(adaptive regrowth)에 대한 증가된 잠재력을 나타냄을 확인할 수 있었다(도 5 참조).

<34> *cit1* null 균주에서 열 또는 노화-유도된 아폽토시스 동안에 메타카스파제 Yca1의 활성화가 검출되었다. 따라서 *YCA1*의 결손은 *cit1* null 돌연변이에 의해 유도된 아폽토시스 표현형을 억제함을 알 수 있었다(실시예 8 참조).

<35> 나아가 *CIT1* 결손 세포는 야생형에 비해 GSH 고갈 및 ROS 축적이 높은 경향으로 나타났으며, 이는 외래성 GSH, 글루타메이트 또는 GSSG(glutathione disulfide)에 의해 회복되었다(실시예 10 및 실시예 11 참조). 이러한 결과는 *cit1* null 세포에서 GSH 결핍이 GSSG 내지 GSH의 감소에 요구되는 환원력의 고갈보다는 GSH의 생합성에 요구되는 글루타메이트의 불충분한 공급에 의해 유발되는 것임을 보여준다.

<36> 결론적으로, 본 발명자들은 *CIT1* 결손 효모 세포의 경우 열 또는 노화 스트레스에 대한 민감성이 증가하여 ROS 축적에 의한 아폽토시스가 유발되며, 이는 GSSH의 GSH로의 환원력의 문제라기보다는 GSH 자체 공급의 결손으로 인한 것임을 알 수 있었다.

<37> 따라서 이러한 *CIT1* 결손 효모의 특성을 이용하면 아폽토시스 조절물질을 효과적으로 스크리닝 할 수 있다.

<38> 본 발명에서 용어, "아폽토시스"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 초래하여 생체에 해롭게 된 세포 (암 세포, 바이러스 감염된 세포 등)를 제거하는 데 중요한 생물학적 의의가 있는 기작이다.

<39> 아폽토시스 조절의 실패와 질환 발생은 높은 상관관계가 있다. 아폽토시스가 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 아폽토시스가 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.

<40> 따라서 상기 아폽토시스의 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; Thompon Science, 267:1456-

<41> 1462, 1995; Sen 및 D'Incalci FEBS Letters, 307:122-127, 1992; McDonnell et. al., Seminars in Cancer and Biology, 6:53-60, 1995).

<42> 따라서 아폽토시스 조절 물질을 스크리닝하는 것은 상술한 질환의 치료제를 개발하는데 있어서 매우 중요하다.

<43> 그러므로 본 발명은 *CIT1* 결손 효모를 이용한 아폽토시스 조절물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

<44> 바람직하게는, 본 발명의 스크리닝 방법은 (a) 미토콘드리아 사이트레이트 합성 효소를 코딩하는 *Cit1*이 결손 된 효모를 시험물질과 배양하는 단계;

<45> (b) 상기 (a) 단계의 *CIT1* 결손 효모의 아폽토시스 활성을 측정하는 단계;

<46> (c) 상기 시험물질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

<47> 상기 (a) 단계의 *CIT1* 결손 효모는 당업계에 공지된 방법 예를 들면, 약제, 자외선 조사, 자연변이에 의한 방법 또는 인위적으로 표적 유전자를 파괴시키는 방법에 의해 제조될 수 있다.

<48> 바람직하게는 본 발명에서 *CIT1* 결손 효모로는 Δ*cit1*의 유전형을 갖는 사카로마이세스 세레비지애 ATCC (4005376) 또는 본 발명의 실시예 3에서 제조한 Δ*cit1*Δ*cit2* 유전형을 갖는 사카로마이세스 세레비지애 Δ*cit1*Δ*cit2*(MCBY001)를 사용할 수 있다.

<49> 본 발명의 일 실시예에서는 Δ*cit1*Δ*cit2* 이중 돌연변이를 제조하기 위해, *cit1::URA3* 융합 컨스트럭트 PCR 증폭에 의해 제조하고 Δ*cit2* 돌연변이체(BY4741-YCR005C)를 상기 융합 컨스트럭트로 형질전환함으로써 Δ*cit1*Δ*cit2*(MCBY001) 균주를 수득하였다(실시예 3 참조).

<50>

<51> 상기 (a) 단계의 "시험물질(test agent)"은 임의의 물질(substance), 분자(molecule), 원소(element), 화합물(compound), 실재물(entity) 또는 이들의 조합을 포함한다. 예컨대, 이에 제한되지는 않으나, 단백질, 폴리펩티드, 소유기 물질(small organic molecule), 다당류(polysaccharide), 폴리뉴클레오티드 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.

<52> 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.

<53> 또한 상기 시험물질은 "핵산"일 수 있다. 핵산 시험물질은 자연적으로 생성되는 핵산, 랜덤 핵산, 또는 "바이어스화" 랜덤 핵산일 수 있다.

<54> 또한 상기 시험물질은 소분자(예: 약 1,000 이하의 분자량을 갖는 분자)일 수 있다. 소분자의 조절 제제를 스크리닝하기 위한 방법에는 바람직하게는 고속 분석 어세이(high throughput assay)가 적용될 수 있다.

<55> 상기 (b) 단계에서 아폽토시스 활성 측정방법으로는 당업계에 공지된 방법에 따라 세포 내 ROS 축적, 핵 단편화, DNA 단편화 및 포스파티딜세린의 전좌로 이루어진 그룹 중에서 선택된 것을 측정함으로써 수행될 수 있다.

<56> 예를 들면, 세포 내 ROS 축적 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.

<57> 상기 (c) 단계는 상기 시험물질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계로서, 시험물질과 함께 배양한 효모의 아폽토시스 활성과 시험물질을 처리하지 않고 배양한 효모의 아폽토시스 활성을 비교함으로써 결정할 수 있다.

<58> 또한, 본 발명의 방법은 상기 (a) 단계에서 *CIT1* 결손 효모를 형질전환한 다음 열 또는 노화 스트레스를 가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

<59> 상기 열 스트레스를 가하는 단계는 효모를 50℃ 이상의 온도에서 10~30분 간 배양함으로서 수행될 수 있다.

<60> 상기 노화 스트레스를 가하는 단계는 효모를 생육하기에 적합한 온도에서 장기간 배양함으로써 수행될 수 있다. 즉, 바람직하게는 28~30℃에서 8~15일 동안 배양함으로써 수행될 수 있다.

<61>

<62> 나아가, 상기 시험물질이 특정 단백질을 코딩하는 핵산의 경우에는 다음의 방법에 따라 아폽토시스 조절 물질을 스크리닝할 수 있다.

<63> (a) 미토콘드리아 사이트레이트 합성 효소를 코딩하는 *CIT1*이 결손 된 효모를 후보 단백질을 발현하는 핵산으로 형질전환하는 단계;

<64> (b) 상기 (a) 단계의 형질전환된 *CIT1* 결손 효모의 아폽토시스 활성을 측정하는 단계; 및

<65> (c) 상기 후보 단백질이 아폽토시스를 촉진 또는 억제하는지 여부를 결정하는 단계를 포함한다.

<66> 상기 (a) 단계에서 후보 단백질을 발현하는 핵산을 이용한 형질전환은 당업계에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다.

<67> 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) 및 PEG(Polyethylenglycol)에 의한 침전법을 사용할 수 있다. 일반적으로 재조합 벡터의 효모 세포로의 도입은 전기천공법이 주로 많이 사용된다.

<68> 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.

<69> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에 만 한정되는 것은 아니다.

<70> **<실시예 1>**

<71> **<u>본 발명에 사용한 효모 균주 및 배지 조성</u>**

<72> 본 발명에 사용된 S. 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주는 표 1에 기재된 바와 같다. 영양배지(rich medium)로는 1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 75μM 아데닌 설파이트 및 2% 포도당으로 이루어진 것을 사용하였으며(YPD), 합성 완전 배지로는 0.7% 효모 질소 베이스(Difco), 2mM 우라실 및 1mM 보충 아미노산(글루타메이트, 히스티딘, 루신 및 메티오닌과 같은) 및 2% 포도당으로 이루어져 있는 것을 사용하였다(SCD). 플레이트는 2% 아가(Difco)를 포함하도록 하였다.

표 1

<73> 본 발명에서 사용한 효모균주 및 플라스미드

균주 및 플라스미드	관련 유전형	참고문헌 또는 입수처
BY4741	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*	ATCC 201388
BY4741-YNR001C	*Δcit1::KanMX4 MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*	ATCC 4005376
BY4741-YCR005C	*Δcit2::KanMX4 MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*	ATCC 4003485
BY4741-YOR197W	*Δyca1::KanMX4 MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*	ATCC 4002453
MCBY001	*Δcit1::URA3 Δcit2::KanMX4 MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*	실시예 3
MCBY002	*Δcit1::URA3 Δyca1::KanMX4 MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*	실시예 3
YEpCit1	*CIT1 URA3*	Lee et al., 2006, *J. Biochem.140*, 121-133
YEpCit2	*CIT2 URA3*	Lee et al., 2006, *J. Biochem. 140*, 121-133
YCpCit1	*CIT1 LEU2*	실시예 2
YCpCit2	*CIT2 LEU2*	실시예 2

<74> <실시예 2>

<75> 플라스미드

<76> 본 발명에 사용된 플라스미드는 표 1에 기재된 바와 같다. YCpCit1의 제조를 위해 *CIT1* 유전자를 포함한 2.0-kb SacI-BamHI 단편을 YEpCit1으로부터 잘라내고(Lee *et al.*, 2006, *J. Biochem. (Tokyo) 140*, 121-133), *Sac*I-*Bam*HI-소화된 YCp111 플라스미드 (Invitrogen)에 삽입하였다. 유사하게, *CIT2* 유전자를 포함한 1.7-kb *Hin*dIII-*Sac*I 단편을 YEpCit2로 부터 잘라내어(Lee *et al.*, 2006, *J. Biochem. (Tokyo) 140*, 121-133), *Sac*I-*Bam*HI-소화된 YCp111 플라스미드에 라이게이션하여 YCpCit2를 수득하였다.

<77> <실시예 3>

<78> Δ*cit1*Δ*cit2* 이중 돌연변이 및 Δ*cit1*Δ*yca1* 이중 돌연변이의 제조

<79> Δ*cit1*Δ*cit2* 이중 돌연변이를 제조하기 위해, *cit1::URA3* 융합 컨스트럭트를 포함한 1.8-kb PCR 산물을 다음의 프라이머를 이용하여 효모 게놈 DNA으로부터 증폭하였다.

<80>

<81> 센스 프라이머(서열번호 1)

<82> 5'-TAAAAAGAAAATAAGGCAAAACATATAGCAATATAATACTATTTACGAAGatgcagctcagattctttgttt gaaaaattagcgctctcgcgttgc-3'

<83> 안티센스 프라이머(서열번호 2)

<84> 5'-AAATACGTGTTTGAATAGTCGCATACCCTGAATCAAAAATCAAATTTTCCtaattaaattgaagctctaat ttgtgagtttagtatacatgcattt-3'

<85> 상기에서 서열번호 1의 프라이머는 *CIT1*에 상응하고, 서열번호 2의 프라이머는 *URA3*에 상응하는 뉴클레오타이드이다. Δ*cit2* 돌연변이체(BY4741-YCR005C)를 상기 융합 컨스트럭트로 형질전환하여 Δ*cit1*Δ*cit2*(MCBY001) 균주를 수득하였다. 유사하게, Δ*cit1*Δ*yca1* 이중 돌연변이체(MCBY002)를 제조하기 위해, Δ*yca1* 돌연변이체(BY4741-YOR197W)를 1.8-kb *cit1::URA3* 융합 컨스트럭트로 형질전환하여 Δ*cit1*Δ*yca1*(MCBY002) 돌연변이 균주를 수득하였다. 효모 균주의 형질전환은 리튬 아세트산 방법에 의해 수행하였다(Ito *et al.*, 1983, *J. Bacteriol. 153*, 163-168).

<86>

<87> <실시예 4>

<88> 사이트레이트 합성효소 돌연변이 균주의 온도 민감성 조사

<89> CS(citrate synthase) 돌연변이체, 즉 Δ*cit1*, Δ*cit2* 및 Δ*cit1*Δ*cit2*의 온도 민감성을 이들의 야생형 균주(BY4741)와 비교하여 상승된 온도에서 생육 어세이 및 생존 테스트에 의해 평가하였다.

<90> 각 균주(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*/YCpCit1, Δ*cit1*Δ*cit2*/YEpCit1, Δ*cit1*Δ*cit2*/YCpCit2, and Δ*cit1*Δ*cit2*/YEpCit2)의 생육을 분석하기 위하여, SCD에서 30℃로 1일간 배양한 효모 세포를 세척하고 1.0ㅅ 10^8 cell/ml의 농도가 되도록 PBS에 재현탁하였다. 세포 현탁액을 10 배씩 단계적으로 희석하고, 각 희석액 5㎕씩 SCD 플레이트에 떨어뜨린 다음, 상기 플레이트를 30℃ 또는 40℃에서 3일간 배양하였다.

<91> 생존 테스트를 위해, SCD 브로쓰에서 30℃로 1일간 배양한 효모 세포를 PBS에 1.0×10^8cell/ml가 되도록 현탁하였다. 샘플을 2ml 취하여 열처리를 수행한 다음 각 샘플 100㎕를 취하여 10배씩 단계적으로 희석하였다. 플레이트 어세이에 의한 생존력을 결정하기 위해, 각 희석액 100㎕를 SCD 플레이트에 도말하고 30℃에서 3일간 배양한 후 콜로니를 계수하였다.

<92> 실험 결과, 모든 효모 균주들은 SCD 플레이트에서 30℃로 3일간 배양한 후 정상 크기의 콜로니를 형성하였다(도 1의 A). 이는 2개의 CS 유전자가 완전 배지에서 효모의 생육에 필수적이지 않음을 나타낸다. 40℃에서 3일간 배양한 경우에는 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 뿐만 아니라 Δ*cit1*Δ*cit2*/YCpCit2 및 Δ*cit1*Δ

cit2/YEpCit2 세포도 SCD 플레이트에서 콜로니를 생성하지 못하였다. 반면, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*/YCpCit1 및 Δ*cit1*Δ*cit2*/YEpCit1 세포는 야생형과 마찬가지로 정상적으로 생육하였다(도 1의 A).

<93> 효모 균주의 생육 테스트 결과, Δ*cit1*, Δ*cit1*Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*/YCpCit2, 및 Δ*cit1*Δ*cit2*/YEpCit2 세포가 열 스트레스에 매우 민감한 것으로 나타났다(도 1의 B). 50℃의 열 스트레스에 30분간 노출시킨 야생형, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*/YCpCit1 및 Δ*cit1*Δ*cit2*/YEpCit1 세포의 생존율이 약 45%였고, 동일한 조건 하에서 생존한 Δ*cit1*, Δ*cit1*Δ*cit2*/YCpCit2, 및 Δ*cit1*Δ*cit2*/YEpCit2 세포는 초기 군락의 약 7% 정도였다. 또한, 50℃의 열 스트레스에 30분간의 노출에 의해 Δ*cit1*Δ*cit2* 돌연변이 세포의 약 99%가 사멸하였다. 이러한 결과는 Δ*cit1* 세포의 경우 온도 민감성의 표현형을 가지는 반면 Δ*cit2* 세포는 그렇지 않음을 의미한다. 또한, 비록 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 열-민감성이 Δ*cit1* 및 *CIT1*이 결핍된 형질전환체에 비해 더 높다할지라도 *CIT1* 결손에 의해 유도된 온도 민감성 표현형은 *CIT2*에 의해 억제되지 않음을 알 수 있었다.

<94> **<실시예 5>**

<95> <u>*CIT1* 결손 균주의 열에 의해 유도된 세포사멸과 ROS의 관련성 분석</u>

<96> **<5-1> 열 스트레스에 노출시킨 효모 균주 내 ROS 축적**

<97> 열 스트레스 조건 하에서 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 사멸율이 증가되는지 여부를 결정하기 위해, 본 발명자들은 돌연변이 세포에서 아폽토시스의 세포학적 및 생화학적 특징을 조사하였다. 본 발명자들은 세포 내 ROS 존재를 분석하였다. 이는 효모에서 아폽토시스를 유도하기 위해 필수적이다(Madeo *et al.*, 1999, *J. Cell Biol. 145*, 757-767).

<98> 각 효모 균주(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, 및 Δ*cit1*Δ*cit2*)를 SCD에서 30℃ 또는 50℃로 10분간 배양하였다. 상기 균주의 세포내 ROS(reactive oxygen species)의 수준을 모니터하기 위해, 과산화수소(H_2O_2)의 작용을 통해 형광발색단, DCF(2',7'-dichlorofluores cein)로 산화되는 DCFH-DA는 ROS의 검출을 위한 프로브로 사용하였다. 각 세포를 10㎍/ml DCFH-DA(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate)로 교반하면서 30℃에서 2시간 동안 염색하였다(Madeo *et al.*, 1999, *J. Cell Biol. 145*, 757-767). 형광 검경은 적합한 필터 세트(FITC)를 이용하여 디지털 카메라(DP11, Olympus)가 장착된 BX51 유니버설 리서치 현미경(Olympus)하에서 수행하였다. 형태학적 표현형의 빈도를 결정하기 위해, 3개의 독립적인 실험으로부터 적어도 300개의 세포를 평가하였다.

<99> 또한, DCFH-DA 양성 세포의 수를 계수하여 총 세포에 대해 백분율로 나타냄으로써 ROS 축적 세포의 백분율을 산출하였다.

<100>

<101> 실험 결과, 50℃의 열 스트레스에서 10분간 노출시킨 후 SCD 브로쓰에서 30℃로 2일간 전-배양된 Δ*cit1* (82%) 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포 (92%)의 다수가 형광을 나타냈다(도 2의 A 및 B). 반면, 이러한 조건 하에서 야생형 및 Δ*cit2* 세포는 DCF 형광을 나타내지 않았다. 이러한 결과는 *CIT1* 결손이 열 스트레스 의존적 ROS의 축적을 나타냄을 의미한다.

<102> **<5-2> 세포-투과성 ROS 스캐빈저의 영향**

<103> *CIT1* 결손을 가진 세포에서 관찰된 온도 민감성 표현형 및 열 스트레스 의존적 ROS 축적 사이의 직접적인 관련성의 존재를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 세포-투과성 ROS 스캐빈저인 티론(Tiron)의 존재 하에서 각 효모 균주의 온도 의존적 생존율을 분석하였다.

<104> SCD 브로쓰에서 30℃로 1일간 배양한 효모 세포를 PBS에 1.0×10^8 cell/ml가 되도록 현탁하였다. 샘플을 2ml 취하여 10mM 티론(Tiron)을 첨가 또는 무첨가한 배지에 접종하여 50℃에서 30분간 배양하였다. 각 샘플 100㎕를 취하여 10배씩 단계적으로 희석하고 CFU 어세이를 위해, 각 희석액 100㎕를 SCD 플레이트에 도말한 다음 30℃에서 3일간 배양한 후 콜로니를 계수하였다. 이는 독립적으로 3회 반복 실험하였다.

<105>

<106> 실험 결과, 10mM 티론의 존재하에서 50℃의 열 스트레스에 30분간 노출시킨 경우 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 생존율은 각각 약 33 및 26%로 나타났다(도 2의 C). 티론의 부재시 동일한 열처리 후 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 생존율이 각각 초기 집락의 약 7% 및 1% 이였다는 점을 고려해 보면, 티론이 열에 의한 사

멸로부터 돌연변이 세포를 보호한 것으로 보여진다.

<107> 따라서 이러한 결과를 종합해 보면, *CIT1* 결손 돌연변이의 열에 의해 유도된 사멸은 ROS의 축적에 의해 매개됨을 알 수 있었다.

<108> **<실시예 6>**

<109> **열 스트레스 조건 하의 *CIT1* 결손 세포에서 아폽토시스 마커의 분석**

<110> **<6-1> 핵 단편화(fragmentation)**

<111> 본 발명자들은 열 스트레스에 노출된 돌연변이 세포에서 아폽토시스의 세포학적 증거인 핵 단편화를 조사하였다. SCD에서 배양한 효모 균주(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, 및 Δ*cit1*Δ*cit2*)를 30℃ 또는 50℃로 10분간 배양하였다. 그 다음 상기 세포를 상기 세포를 3.7% 포름알데히드로 고정하고 0.5㎍/ml DAPI(Sigma)로 염색한 다음 형광 현미경으로 관찰하였다(Madeo *et al.*, 1997, *J. Cell Biol. 139*, 729-734). 형광 검경은 적합한 필터 세트(DAPI 필터)를 이용하여 디지털 카메라(DP11, Olympus)가 장착된 BX51 유니버셜 리서치 현미경(Olympus)을 이용하여 수행하였다.

<112> 실험 결과, 정상 조건(30℃, 10분)하에서 야생형 및 돌연변이 세포는 모두 정상적인 단일의 둥근형태의 핵을 가지고 있었다(도 3의 A 및 C). 한편, 50℃에서 10분간 노출시킨 경우에는 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 각각 약 57 및 68%가 불규칙적인 모양 및 분절된 핵을 나타냈다. 한편, 동일하게 처리한 야생형 및 Δ*cit2* 세포의 경우에는 약 10%만이 비정상적인 핵을 나타냈다.

<113> **<6-2> 핵 내 DNA 단편화**

<114> 본 발명자들은 TUNEL 어세이를 이용하여 또 다른 아폽토시스의 특징인 핵 내 DNA 단편화를 조사하였다. 상기 TUNEL 어세이에서 형광 뉴클레오타이드가 DNA 단편의 3'-OH 말단에 추가되어 형광 현미경에 의해 볼 수 있도록 한다.

<115> TUNEL 어세이(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling)를 이전에 공지된 방법에 따라 수행하였다(Madeo *et al.*, 1999, *J. Cell Biol. 145*, 757-767). 즉, SCD에서 배양한 효모 균주(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, 및 Δ*cit1*Δ*cit2*)를 30℃ 또는 50℃로 10분간 배양한 다음 상기 세포를 3.7% 포름알데히드로 고정하고 라이티카제(lyticase)(sigma)로 소화하였다. 이를 폴리라이신-코팅된 슬라이드에 놓고 0.3% H_2O_2로 처리하여 내재성 퍼옥시다아제를 차단시킨 후 0.1% 트립톤 X-100으로 투과성을 부여한 다음 10㎕ TUNEL 반응 혼합물(Roche)로 37℃에서 60분간 배양한 후 10㎕ 컨버터-POD(Roche)로 37℃에서 30분간 배양하였다. 그 다음 DAB-기질 용액(Roche)으로 10분간 염색하였다. 카이저 글리세롤 젤라틴(Kaiser's glycerol gelatin, Merck)을 떨어뜨려 커버슬립을 봉입하고 디지털 카메라(DP11; Olymus)가 장착된 BX51 유니버셜 리서치 현미경(Olympus)을 이용하여 세포의 브라이트-필드 이미지(bright-field image)를 획득하였다.

<116> 실험 결과, 정상적인 조건(30℃, 10분)하에서는 야생형 또는 돌연변이 세포 모두 TUNEL-양성 핵을 나타내지 않았다(도 3의 B 및 C). 50℃에서 10분간 노출시킨 경우, Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 각각 약 68 및 75%가 강하게 염색된 핵을 나타냈다. 이는 DNA 가닥이 파손되었음을 나타낸다. 한편, 야생형 및 Δ*cit2* 세포의 핵은 동일한 처리 후 염색되지 않거나 단지 약하게 염색된 것으로 나타났다.

<117> **<6-3> 포스파티딜세린의 전좌**

<118> 포유동물 세포와 같이 효모 세포 내에서, 정상 조건 하에서 주로 플라스마 멤브레인의 내부 편(leaflet)에 위치해 있는 포스타티딜세린의 외부 편으로의 전좌는 아폽토시스의 초기 단계의 민감한 마커로서 제공된다(Martin *et al.*, 1995, *EMBO J. 14*, 5191-5200). 세포질막의 외부면에 존재하는 포스파티딜세린을 검출하기 위해, 야생형 및 돌연변이 균주의 열 스트레스 받은 세포(SCD에서 30℃ 또는 50℃로 10분간 배양한 야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, 및 Δ*cit1*Δ*cit2*)를 소화용 버퍼에 현탁하여 형성된 스페로플라스트(spheroplasts)를 FITC-Annexin V(Clontech, CA) 및 프로피디움 아이오다이드(PI, 500㎍/ml)로 염색하고 형광 현미경으로 분석하였다 (Madeo *et al.*, 1997, *J. Cell Biol. 139*, 729-734). 형광 검경은 적합한 필터 세트를 이용하여 디지털 카메라(DP11, Olympus)가 장착된 BX51 유니버셜 리서치 현미경(Olympus)하에서 수행하였다. FITC-아넥신 V: FITC 필터, PI 염색: 로다민 필터.

<119> 열 스트레스(50℃, 10분)에 노출시킨 경우, Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포는 FITC-Annexin V로만 염색되었으며 이는 이들이 아폽토시스의 초기 단계를 겪고 있음을 나타낸다(도 4). 또한, 열 스트레스를 받은 세포

중 일부는 FITC-Annexin V 및 PI로 모두 염색되었다. 이는 아폽토시스의 말기 과정 또는 괴사를 겪는 세포가 존재함을 나타낸다. 반면, 동일하게 처리한 야생형 및 Δ*cit2* 세포의 극히 일부만이 FITC-Annexin V로만 염색되었다.

<120> 이러한 실험결과로부터 동질 유전자형의 야생형 균주와 비교하여 *cit1* 결손을 가진 돌연변이 균주가 보다 더 열 스트레스 유도된 세포 사멸에 민감함을 알 수 있었다.

<121> <실시예 7>

<122> *CIT1* 결손 세포의 노화에 의해 유도된 세포사멸에 대한 민감성

<123> <7-1> 세포 생존율

<124> 노화된 효모는 산소 라디칼의 축적 및 카스파제 활성화와 같은 아폽토시스의 일반적인 마커를 나타내며 사멸한다 (Laun *et al.*, 2001, *Mol. Microbiol. 39*, 1166-1173; Herker *et al.*, 2004, *J. Cell Biol. 164*, 501-507). *Cit1* 유전자의 결손이 노화된 효모의 배양에 있어서 세포 생존율에 영향을 주는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 SCD에서 야생형 및 돌연변이 균주를 13일간 배양하고 CFU 어세이에 의해 살아있는 세포를 모니터하였다. CFU 어세이는 실시예 <5-2>와 동일한 방법으로 수행하였다.

<125>

<126> 실험 결과, 9일간 배양 후 야생형 및 Δ*cit2* 세포의 약 1/2가 살아있는 반면, Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포는 단지 약 1%만이 생존한 것으로 나타났다(도 5의 A). 이러한 결과로부터 *CIT1* 결손 세포가 그들의 동종 야생형 균락에 비해 더 빨리 더 심한 노화 과정을 겪음을 알 수 있었다.

<127> 한편, Δ*cit1 및* Δ*cit1*Δ*cit2* 세포를 9일간 배양한 후, 99%가 사멸할 때 배양액 내에 생존한 세포의 수는 증가되기 시작하여 2일 후 초기 균락의 15-20%에 도달하였다(도 5의 A). 따라서 이러한 결과는 *CIT1* 결손 돌연변이체가 야생형 균주에 비해 장기간 배양시 가속화된 노화 의존적 세포 사멸 후 순응성 재생장 (adaptive regrowth) 대한 더 높은 잠재능을 가지고 있음을 알 수 있었다.

<128> <7-2> 아폽토시스의 세포학적 및 생화학적 특징

<129> 상기 실시예 <7-1>의 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 가속화된 노화 의존적 사멸이 프로그램화된 것인지 여부를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 아폽토시스의 세포학적 및 생화학적 특징을 관찰하였다. 이를 위해 상기 실시예 <7-1>의 세포를 각각 DCFH-DA 또는 DAPI로 염색하고 형광 현미경으로 관찰하였다. DCFH-DA 염색은 세포 내 ROS의 수준을 모니터하기 위해 수행하였으며 상기 세포에 10㎍/ml의 DCFH-DA를 첨가하여 교반하면서 30℃에서 2시간 동안 염색하였다. 핵의 분절(nuclear fragmentation)을 분석하기 위해, 세포를 3.7% 포름알데히드로 고정하고 0.5㎍/ml DAPI(Sigma)로 염색하였다. 또한, TUNEL 어세이를 통해 핵 내 DNA 분절을 관찰하였다. 상기 TUNEL 어세이는 실시예 <6-2>와 동일한 방법으로 수행하였다.

<130> 실험 결과, DCFH-DA로 염색한 경우 Δ*cit1* (74%) 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포 (82%)의 7일된 군락의 대다수가 형광을 나타냈으며 동일한 시기의 야생형(32%) 및 Δ*cit2* 세포 (27%)의 경우에는 소수만이 검출될 만한 수준의 DCF 형광을 나타냈다(도 5의 B). 이러한 결과로부터 *cit1l* null 세포의 가속화된 노화는 ROS의 축적을 동반함을 알 수 있었다.

<131> 또한, Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 DAPI를 이용한 크로마틴(Chromatin) 염색 결과, 주요 사망 단계 (major mortality phase) 동안 군락의 55% 이상에 있어서 비정상적인 핵 형태가 나타남을 알 수 있었다(도 5의 B). 반면, 7일된 야생형 및 Δ*cit2* 돌연변이의 경우에는 약 80%가 어린 세포의 것과 유사한 정상적인 핵 형태를 유지하였다.

<132> TUNEL 분석에서, Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 균주의 7일된 군락의 반 이상이 짙게 염색된 핵을 나타냈으며, 이는 세포에 함유된 DNA 가닥의 대부분이 파괴되었음을 보여준다(도 5의 B). 반면, 야생형(65%) 및 Δ*cit2* 세포 (73%)의 대부분의 핵은 7일 배양 후 염색되지 않거나 약하게 염색되었다.

<133> 종합해 보면, 이러한 결과는 *CIT1* 결손 돌연변이가 야생형 세포에 비해 ROS 축적, 핵 분절 및 DNA 가닥 파괴를 포함한 아폽토시스의 일반적인 특징을 동반하며 노화에 의해 유도된 세포 사멸에 대해 보다 더 민감함을 보여준다.

<134> <실시예 8>

<135> *YCA1* 유전자와의 관련성

<136> 효모 *YCA1* 유전자는 포유동물 카스파제에 의해 나타나는 것과 유사하게 단백질-컷팅 활성을 통해 아폽토시스를 조절하는 메타카스파제를 코딩한다(Madeo *et al.*, 2002, Mol. Cell *9*, 911-917). *cit1* 결손 세포의 열에 의해 유도된 세포 사멸에 대한 증가된 민감성에 있어서 메타카스파제 *Yca1*의 역할을 규명하기 위하여, 본 발명자들은 Δ*cit1*Δ*yca1* 돌연변이를 제조하고(실시예 3 참조), 이의 표현형을 Δ*cit1* 돌연변이와 비교하였다.

<137> <8-1> *YCA1* 결손이 *CIT1* 결손에 의해 유도된 온도 민감성 표현형에 미치는 영향

<138> SCD에서 배양된 효모 균주(야생형, Δ*yca1*, Δ*cit1*, 및 Δ*cit1*Δ*yca1*)를 50℃에서 10분간 배양한 다음 각 샘플을 회수하고 CFU 어세이에 의해 살아있는 세포수를 측정하였다.

<139> 실험 결과, 50℃에서 10분간 열처리한 후 생존한 Δ*cit1* 세포는 초기 군락의 약 25% 정도였으나 동일한 열 스트레스에 노출 된 후 Δ*cit1*Δ*yca1* 세포의 생존율은 72%였다(도 6의 A). 이러한 결과로부터 *YCA1* 결손이 *cit1* null 세포의 증가된 온도 민감성을 억제함을 알 수 있었다.

<140> <8-2> *YCA1* 결손이 *CIT1* 결손에 의해 유도된 가속화된 노화에 미치는 영향

<141> 또한 본 발명자들은 *CIT1* 결손 효모 세포의 가속화된 노화 표현형에 있어서 Yca1-매개 아폽토시스의 관련성을 규명하였다. 각 효모 균주(야생형, Δ*yca1*, Δ*cit1*, 및 Δ*cit1*Δ*yca1*)를 SCD에서 7일간 배양한 후 CFU 어세이에 의해 살아있는 세포를 측정하였다.

<142> 실험 결과, Δ*cit1* 세포의 경우 SCD 브로쓰에서 7일간 배양시 생존율이 약 15%를 나타낸 반면, 동일한 조건 하에서 Δ*cit1*Δ*yca1* 세포의 경우에는 40% 이상이 생존한 것으로 나타났다(도 6의 B). 이러한 결과로부터 *YCA1* 결손이 *cit1* null 세포의 가속화된 노화 표현형을 억제함을 알 수 있었다.

<143> <8-3> *YCA1* 억제가 *Cit1* 결손에 의해 유도된 온도 민감성 표현형에 미치는 영향

<144> SCD에서 배양한 Δ*cit1* 균주를 메타카스파제 억제제인 0-20μM zVAD-fmk 존재 하에서 50℃로 10분간 배양한 다음 살아있는 세포를 CFU 어세이에 의해 분석하였다.

<145> 실험 결과, 열 스트레스에 노출된 Δ*cit1* 세포의 생존율은 zVAD-fmk의 농도가 0에서 20μM로 증가됨에 따라 25에서 69%까지 증가하였다(도 6의 C). 이러한 결과로부터 YCA1 활성 억제가 Δ*cit1* 세포의 온도 민감성 표현형을 억제함을 알 수 있었다.

<146> <8-4> *CIT1* 결손 세포의 열 스트레스에 의한 세포 사멸 동안 Yca1 활성화 측정

<147> SCD에서 배양한 효모 균주(야생형 Δ*yca1*, Δ*cit1*, 및 Δ*cit1*Δ*yca1*)를 50℃에서 배양하고 샘플을 10분 및 30분 간격으로 회수한 다음 활성화된 메타카스파제를 이전에 공지된 방법에 따라 FITC-VAD-fmk를 이용하여 검출하였다 (Madeo *et al.*, 2002, Mol. Cell *9*, 911-917). 보다 구체적으로, 효모 세포 (5×10^6 cells)를 수확하고, 1ml PBS로 세척한 다음 50μM FITC-VAD-fmk를 함유한 200㎕ 염색용액에 재현탁하였다. 30℃에서 20분간 배양한 후 세포를 세척하고 200㎕ PBS에 재현탁하였다. 유세포 분석을 위해, 상기 염색된 세포를 FACSC Calibur(BD Biosciences, San Jose, CA) 및 CellQuest 분석용 소프트웨어(BD Biosciences)를 이용하여 488nm에서 여기 및 525nm에서 방출 조건으로 계수하였다.

<148> 실험 결과, Δ*cit1* 세포에서, 활성화된 메카카스파제를 가진 세포의 비율은 10분 내에 65-77%로 급격하게 증가하였고, 그 다음에는 천천히 증가하거나 정체되었다(도 7). 반면, 50℃에서 10분간 열 스트레스에 노출시킨 후 야생형 세포는 YCA1 활성에 대한 어떠한 징후도 보이지 않았으며 *CIT1* 결손 세포에 비해 더 느린 Yca1 활성화를 나타내 세포의 55%가 50℃에서 30분간 열 스트레스에 노출된 후 Yca1 활성을 나타냈다. Δ*yca1* 및 Δ*cit1*Δ*yca1* 세포는 50℃에서 30분간 열 스트레스에 노출시킨 후에도 Yca1 활성을 나타내지 않았다.

<149> 종합해 보면, 이러한 실험결과는 *CIT1* 결손 돌연변이의 온도 민감성 및 가속화된 노화 표현형은 메타카스파제 Yca1의 작용에 의해 매개되는 아폽토시스에 의해 유발됨을 나타내는 것이다.

<150> <실시예 9>

<151> *CIT1* 결손 세포의 ROS-생성 유발 화학물질에 대한 민감성

<152> 상술한 바와 같이, *CIT1* 결손 효모 세포는 열 스트레스 또는 노화와 같은 조건 하에서 ROS 축적에 의해

매개되는 아폽토시스 세포 사멸에 대해 증가된 민감성을 나타낸다. ROS-생성 화학물질들은 아폽토시스를 유도하여 *cit1* null 세포의 생존에 영향을 줄 수 있을 것으로 추정할 수 있다. 따라서 본 발명자들은 항생제, 로테논, H_2O_2 및 아세트산과 같은 ROS-생성 화학물질의 존재 하에서 효모 균주의 생존 테스트를 수행하였다.

<153> 생존 테스트를 위해, SCD 브로쓰에서 30℃로 1일간 배양한 효모 세포(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*)를 PBS에 1.0×10^8 cell/ml가 되도록 현탁하였다. 샘플을 2ml 취하여 항생제(100μM), 로테논(100μM), H_2O_2(10mM) 및 아세트산(20mM)을 각각 1시간 동안 처리하였다. 각 샘플 100 ㎕를 취하여 10배씩 단계적으로 희석하였다. CFU 어세이를 위해, 각 희석액 100㎕를 SCD 플레이트에 도말하고 30℃에서 3일간 배양한 후 콜로니를 계수하였다.

<154> 또한, ROS-생성 화학물질의 존재 하에서 *CIT1* 결손이 ROS의 세포 내 수준에 미치는 영향을 조사하기 위해 효모 균주를 ROS-생성 화학물질로 처리한 다음 실시예 <7-2>와 동일한 방법으로 DCFH-DA로 염색한 후 형광 현미경으로 검경하였다. DCFH-DA 양성 세포를 형광 이미지에서 결정하고 총 세포를 상응하는 DIC 이미지에서 결정하였다.

<155> 실험 결과, 상기 화학물질에 1시간 노출시킨 후 야생형 및 Δ*cit2* 세포의 생존율이 60 내지 80%인 반면, 동일한 처리 후 생존한 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포는 15% 미만이었다(도 8의 A). ROS-생성 화학물질에 1시간 노출시킨 후 DCFH-DA 염색하고 형광 현미경으로 관찰한 결과, Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 초기 군락의 65-90%가 ROS 축적을 나타냈다(도 8의 B). 반면, 야생형 및 Δ*cit2* 세포의 경우에는 8-37%만이 ROS가 축적됨을 나타냈다.

<156> 이러한 실험 결과로부터 *CIT1* 결손 돌연변이가 ROS-생성 화학물질에 대해 더 높은 민감성을 가지고 있음을 알 수 있었으며, 나아가 *CIT1* 결손 세포의 스트레스-유도된 아폽토시스의 증가율은 야생형 세포에 비해 이들의 ROS 축적 정도가 더 높은 것과 관련이 있음을 알 수 있었다.

<157> **<실시예 10>**

<158> **GSH와의 관련성**

<159> **<10-1> *CIT1* 결손 세포에서 GSH의 세포 내 수준 측정**

<160> 스트레스 조건에 노출된 *CIT1* 결손 세포에서 GSH의 결손에 의해 ROS의 축적이 촉진되는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 돌연변이 및 야생형 세포에서 GSH의 수준을 분석하였다. GSH는 다수의 퍼옥시다아제를 H2O2 및 유기 하이드로퍼옥사이드로 환원시키는데 사용된다(Grant 2001, Mol. Microbiol. *39*, 533-541).

<161> GSH의 세포내 수준은 GSH 리사이클링 시스템(Anderson, 1985, Methods Enzymol. *113*, 548-555) 내에서 5,5'-디티오비스-(2-니트로벤존산)(DTNB; Sigma)으로부터 2-니트로-5-티오벤존산 형성 정도를 측정함으로써 결정하였다. 각 세포 용해물 5㎕를 0.6mM DTNB, 5mM EDTA, 0.2mM NADPH 및 1U/ml GR(Sigma)를 함유한 100mM 포스페이스 버퍼(pH 7.5) 1ml에 첨가하고 A_{412}에서 증가율을 모니터하였다. 실험은 3회 독립적으로 반복 수행한 후 결과를 평균±표준편차로 나타내었다.

<162> 실험 결과, SCD에서 1일간 배양한 후 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포에서 GSH의 수준은 각각 야생형에 대해 약 48 및 27%로 나타났다(표 2). 반면, 세포를 10mM GSH가 첨가된 SCD에서 배양한 경우 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 돌연변이의 GSH 수준은 야생형과 유사한 수준 즉, 각각 약 78 및 88%로 나타났다.

표 2

<163> 각 효모 균주에서 GSH 및 글루타메이트의 세포 내 수준

균주	GSH(nmol/mg protein)[a]			글루타메이트(nmol/mg protein)[b]		
	SCD에 첨가			SCD에 첨가		
	글루타메이트 (1mM)	글루타메이트 (10mM)	GSH(10mM)	글루타메이트 (1mM)	글루타메이트 (10mM)	GSH(10mM)
야생형	117.8±10.5	114.8±12.7	127.7±20.2	12.2±2.6	20.1±2.2	14.9±1.5
Δ*cit1*Δ*cit2*	32.1±5.7	88.5±15.2	99.2±10.9	1.2±0.5	15.1±5.2	9.6±2.9
Δ*cit1*	56.4±9.8	99.9±5.7	112.4±11.1	3.5±1.8	14.2±3.3	10.0±1.8
Δ*cit2*	105.4±17.4	112.2±10.3	124.5±15.0	11.4±2.5	22.2±4.7	15.4±2.6

<164> a DTNB 방법에 의해 분석한 GSH의 세포내 수준

<165> b 색차계 글루타메이트 분석 키트를 이용하여 분석된 글루타메이트의 세포 내 수준

<166> **<10-2> *cit1* 결손 세포의 온도 민감성 표현형에 대한 외래성 GSH의 영향**

<167> 본 발명자들은 또한 효모 균주의 온도 의존적 생존에 대한 외래성 GSH의 효과를 조사하였다. 효모 균주(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*)를 10mM GSH 첨가 또는 무첨가 SCD 브로쓰에서 배양하고 50℃에서 10분간 열 스트레스를 주었다. 샘플을 회수하고 살아있는 세포를 CFU 분석에 의해 조사하였다.

<168> 실험 결과, GSH가 첨가된 SCD 배지에서 배양된 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포는 야생형 및 Δ*cit2* 세포와 거의 동일한 온도-의존적 생존율을 보였다(도 9의 A).

<169> **<10-3> *cit1* 결손 세포의 ROS 축적에 대한 외래성 GSH의 영향**

<170> 효모 균주(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*)를 10mM GSH 첨가 또는 무첨가 SCD에서 배양하고 50℃에서 10분간 열 스트레스에 노출시켰다. 상기 세포를 DCFH-DA로 염색하고 형광 현미경으로 검경하였다. DCFH-DA 양성 세포의 수는 형광 이미지에서 결정하였고, 총 세포의 수는 상응하는 DIC 이미지에서 결정하였다.

<171> 실험 결과, Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포는 열 스트레스 조건 하에서 DCF 형광을 나타내지 않았다. 이는 열에 의해 ROS가 축적되지 않음을 나타낸다(도 9의 B).

<172> 상기 실험 결과를 종합해 보면, *Cit1*의 결손은 세포내 GSH의 고갈을 유발하며 이는 스트레스 조건 하에서 ROS의 축적을 유도하고 아폽토시스 세포 사멸을 동반함을 알 수 있었다.

<173> **<실시예 11>**

<174> **<u>글루타메이트와의 관련성</u>**

<175> **<11-1> GSH 합성 전구체가 열 스트레스 조건 하에서 *cit1* 결손 세포의 생육에 미치는 영향**

<176> 세포내 GSH 수준은 생합성 및 환원(reduction)의 비율이 균형을 이루는 복합적인 일련의 반응에 의해 유지된다(Ohtake and Yabuuchi, 1991, Yeast *7*, 953-961; Grant *et al.*, 1996a, Mol. Microbiol. *21*, 171-179; Inoue *et al.*, 1998, Biochim. Biophys. Acta *1395*, 315-320). *cit1* 결손 돌연변이에서 GSH의 생합성 과정의 결함이 있는지 확인하기 위하여, 본 발명자들은 글루타메이트, 글리신 및 시스테인과 같은 GSH 합성을 위한 전구체로서 사용되는 몇몇의 아미노산이 열 스트레스 조건 하에서 효모 세포의 생존에 미치는 효과를 조사하였다.

<177> 효모 세포(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*)를 10mM GSH, 10mM 글루타메이트, 10mM 시스테인이 각각 첨가된 SCD에서 배양한 다음 50℃의 열 스트레스에 노출시켰다. 살아있는 세포를 측정하기 위해 샘플을 일정 시간 간격으로 회수하여 단계적으로 희석한 다음 SCD 아가 플레이트에 도말하고 30℃에서 3일간 배양하였다.

<178> 실험 결과, 10mM 글루타메이트가 첨가된 SCD에서 배양된 돌연변이 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포는 50℃의 열 스트레스에 노출된 후 야생형 및 Δ*cit2* 세포와 유사한 생존율을 보였다(도 10). 반면, 10mM 시스테인 또는 10mM 글리신을 첨가한 경우에는 Δ*cit1* 또는 Δ*cit1*Δ*cit2* 돌연변이 모두의 온도 민감성 표현형이 야생형과 같은 수준으로 회복되지 않았다(결과 미도시).

<179> 이러한 실험 결과로부터 열 스트레스에 노출된 *CIT1* 결손 세포에서 나타나는 GSH의 고갈이 글루타메이트의 결핍을 유발하나 시스테인이나 글리신의 결핍은 유발하지 않음을 알 수 있었다.

<180> **<11-2> *cit1* 결손 세포의 글루타메이트의 세포 내 수준**

<181> 효모 세포(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*)를 1mM 글루타메이트, 10mM 글루타메이트 및 10mM GSH가 함유된 SCD에서 각각 배양한 다음 글루타메이트의 세포 내 수준을 분석하였다. 글루타메이트의 세포내 수준은 제조자의 지시에 따라 색도 글루타메이트 분석 키트(colorimetric glutamate analysis kit, R-Biopharm, Darmstadt, Germany)를 이용하여 결정하였다.

<182> 실험 결과, 1mM 글루타메이트를 함유한 SCD에서 1일간 배양한 경우, Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포에서

글루타메이트의 수준은 야생형 세포의 약 29 및 10% 정도였으며 돌연변이 세포 내의 GSH 수준은 각각 48 및 27%였다(표 2).

<183> Δ*cit1*Δ*cit2* 세포에서 글루타메이트 및 GSH의 낮은 수준은 정상 생육 조건 하에서 이중 돌연변이(double mutant)가 글루타메이트 영양요구성(auxotrophy)을 보인다는 이전의 연구와 일관된 것이다(Kim *et al.*, 1986, Mol. Cell. Biol. *6*, 1936-1942; Lee *et al.*, 2000, J. Biochem. (Tokyo) *128*, 1059-1072). 또한, Δ*cit1* 세포에서 검출된 글루타메이트의 수준이 글루타메이트 결핍 최소 배지에서 그들의 생육을 유지할 수는 있으나 열 및 노화 스트레스에 대해 정상적인 수준의 내성을 유지하기위해 요구되는 최소 수준에 도달할 수는 없다. 기대한 바와 같이, 10mM 글루타메이트가 첨가된 SCD에서 1일간 배양한 경우 Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포 내 글루타메이트 및 GSH의 수준은 야생형 및 Δ*cit2* 돌연변이 세포에서 발견된 수준의 대략 70-87%에 도달하였다(표 2). 이로부터 *CIT1* 결손에 의해 유발된 온도 민감성 표현형을 배지에 10mM 글루타메이트를 첨가함으로써 억제할 수 있음을 알 수 있었다(도 10).

<184> **<11-3> GSSG의 첨가가 미치는 영향**

<185> *CIT1* 결손 돌연변이에서 글루타티온 디설파이드(GSSG)가 GSH로 환원되는 과정의 결함의 결과로 GSH가 고갈되는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 배지에 GSSG의 첨가가 열 스트레스 하에서 효모 세포의 생존에 미치는 영향을 조사하였다.

<186> 효모 세포(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*)를 10mM GSSG가 첨가된 SCD에서 배양한 다음 50℃의 열 스트레스에 노출시켰다. 살아있는 세포를 측정하기 위해 샘플을 일정 시간 간격으로 회수하여 단계적으로 희석한 다음 SCD 아가 플레이트에 도말하고 30℃에서 3일간 배양하였다.

<187> 실험 결과, Δ*cit1* 및 Δ*cit1*Δ*cit2* 세포의 온도 민감성 표현형은 배지에 함유된 10mM GSSG에 의해 현저하게 억제되었다(도 10). 이러한 결과로부터 NADPH에 의해 제공된 환원력을 이용한 GSH 환원효소(GR)에 의해 촉진된 GSSG에서 GSH로의 환원이 *cit1* 결손 돌연변이에서 기능하고 있음을 알 수 있었다.

발명의 효과

<188> 상술한 바와 같이, 본 발명의 *CIT1* 결손 효모는 열 또는 노화에 의해 유도된 아폽토시스에 대해 높은 민감성을 가지고 있으므로 이를 이용하여 아폽토시스 조절물질을 효과적으로 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 *CIT1* 결손 효모 균주의 30℃ 또는 40℃에서의 생육 정도를 분석한 결과(A) 및 치사온도(50℃)에서 생존율을 분석한 결과(B) 이다.

<2> □: 야생형, △: Δ*cit1*, ▲: Δ*cit2*, ■: Δ*cit1*Δ*cit2*

<3> ◇: Δ*cit1*Δ*cit2*/YCpcit1, ◆: Δ*cit1*Δ*cit2*/YEpcit1

<4> ○: Δ*cit1*Δ*cit2*/YCpcit2, ●: Δ*cit1*Δ*cit2*/YEpcit2

<5> 도 2는 열 스트레스에 노출시킨 각 균주에서 ROS의 축적 정도를 분석하기 위해 DCFH-DA로 염색하고 검경한 결과(A), ROS 축적 세포의 백분율(B) 및 각 균주의 온도 의존적 생존율에 대한 티론(Tiron)의 영향(C)을 조사한 결과이다.

<6> 스케일 바는 10㎛

<7> 도 3은 열 스트레스에 노출시킨 각 균주 내 핵 단편화(A) 및 DNA 단편화(B)를 형광 현미경으로 관찰한 결과와 열 스트레스 노출 시킨 후 핵 또는 DNA 단편화를 나타내는 세포의 백분율을 나타낸 그래프이다.

<8> 스케일 바: 10㎛.

<9> 도 4는 열 스트레스에 노출시킨 각 균주의 포스파티딜세린 전좌를 형광 현미경으로 관찰한 결과이다.

<10> 스케일 바: 10㎛.

<11> 도 5는 *CIT1* 결손 효모 균주를 SCD에서 13일간 배양하면서 노화율을 CFU 어세이에 의해 분석한 결과(A), ROS-축적 세포의 비율을 측정하기 위한 효모 세포의 DCFH-DA 염색 결과, 핵 단편화를 관찰하기 위한 DAPI 염색 결과 및 DNA 단편화를 관찰하기 위한 TUNEL 염색 결과(B)이다.

<12> ■: 야생형, ▲: Δ*cit1*, △: Δ*cit2*, □: Δ*cit1*Δ*cit2*

<13> 도 6은 *YCA1* 결손이 *CIT1* 결손에 의해 유도된 온도 민감성 표현형에 미치는 영향(A), 가속화된 노화에 미치는 영향(B) 및 *YCA1* 활성 억제가 *CIT1* 결손에 의해 유도된 온도 민감성 표현형에 미치는 영향을 나타낸 결과이다.

<14> 도 7은 SCD에서 배양한 효모 균주 (야생형 Δ*yca1*, Δ*cit1*, and Δ*cit1*Δ*yca1*)를 50℃에서 배양하고 샘플을 10분 및 30분 간격으로 회수한 다음 메타카스파제 활성을 FITC-VAD-fmk 염색 후 유세포 분석기로 분석한 결과이다.

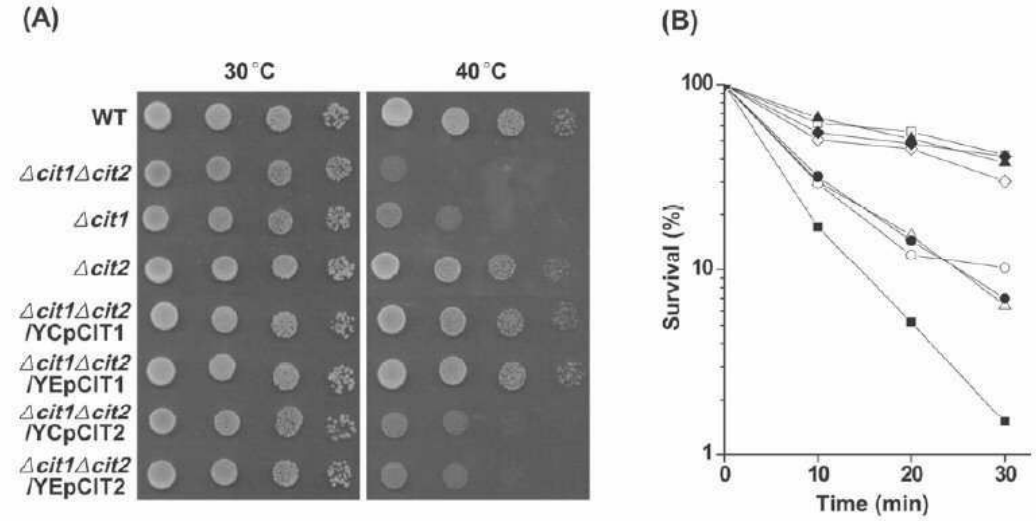
<15> 도 8은 ROS-생성 화학물질 존재 하에서 *CIT1* 결손이 효모 세포의 생존에 미치는 영향을 CFU 어세이에 의해 분석한 결과(A) 및 ROS의 세포 내 수준에 미치는 영향을 DCFH-DA 염색에 의해 확인한 결과(B)이다.

<16> 도 9는 *CIT1* 결손 세포의 온도 민감성 표현형(A) 및 ROS 축적(B)에 대한 외래성 GSH의 영향을 나타낸 결과이다.

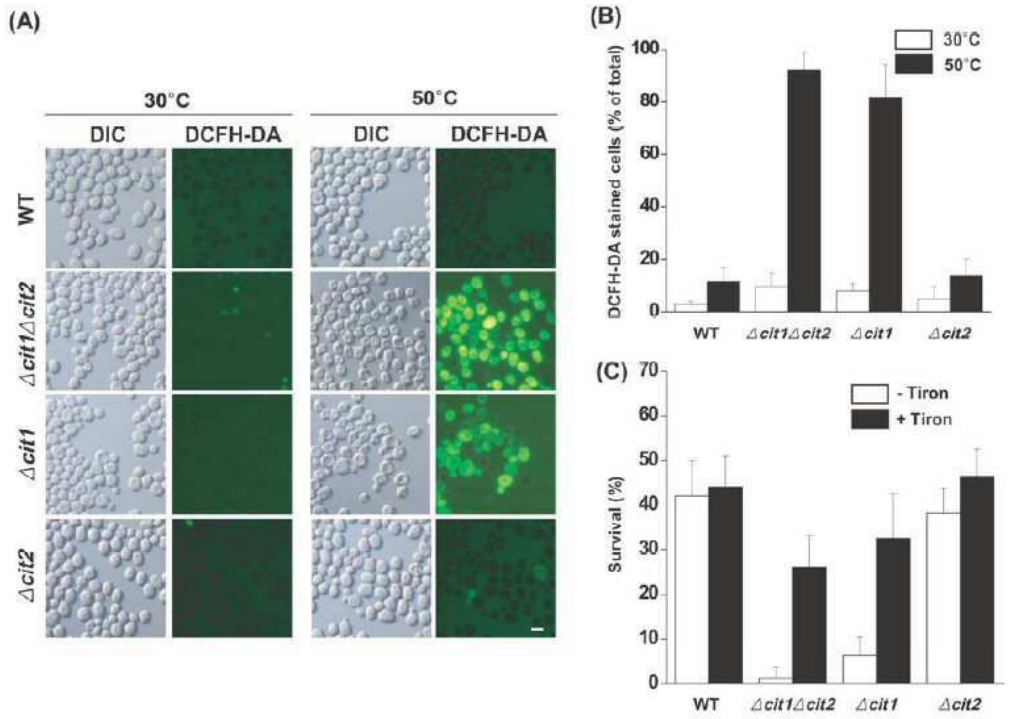
<17> 도 10은 효모 세포(야생형, Δ*cit1*, Δ*cit2*, Δ*cit1*Δ*cit2*)를 GSH, 글루타메이트, 시스테인 또는 GSSG가 첨가된 SCD에서 배양한 다음 50℃의 열 스트레스에 노출시킨 후 살아있는 세포의 수를 측정한 결과이다.

도면

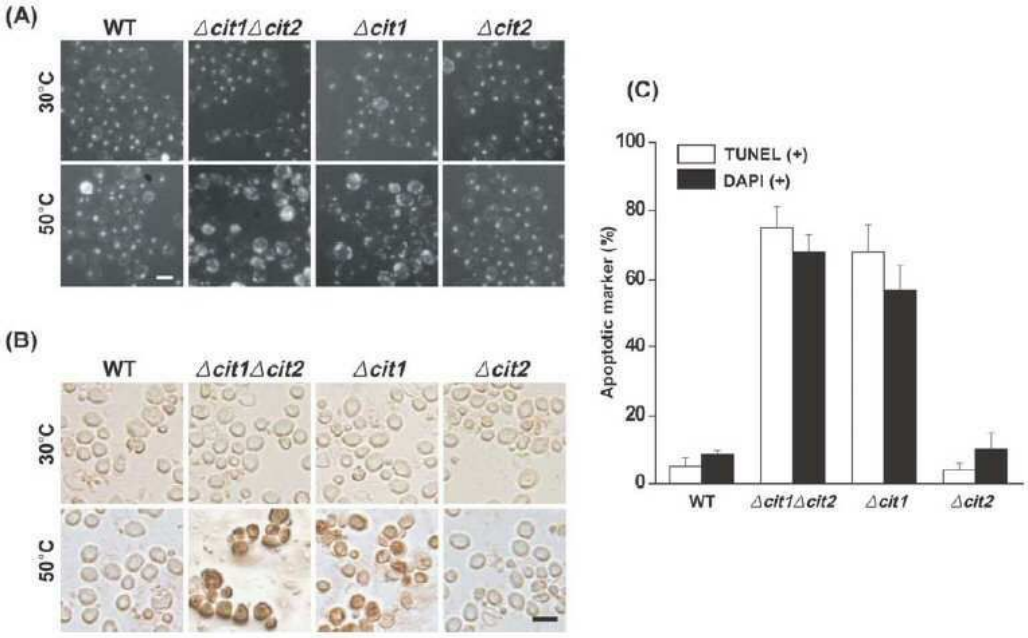
도면1



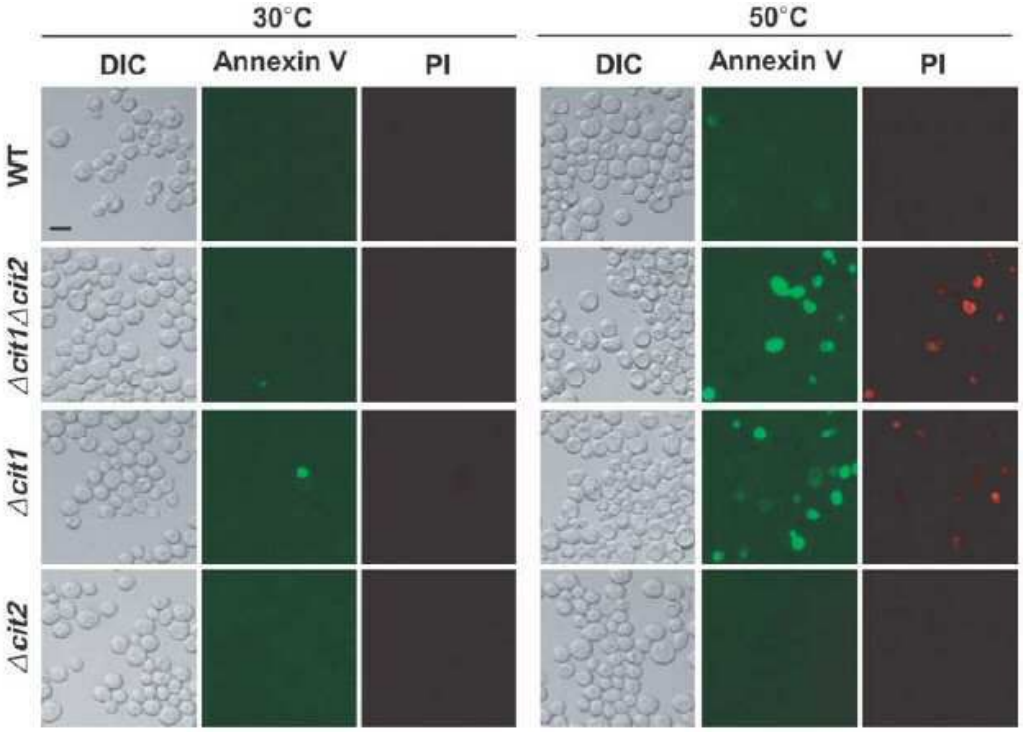
도면2


(A)
30°C
50°C
DIC
DCFH-DA
DIC
DCFH-DA
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2
(B)
30°C
50°C
DCFH-DA stained cells (% of total)
100
80
60
40
20
0
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2
(C)
- Tiron
+ Tiron
Survival (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2

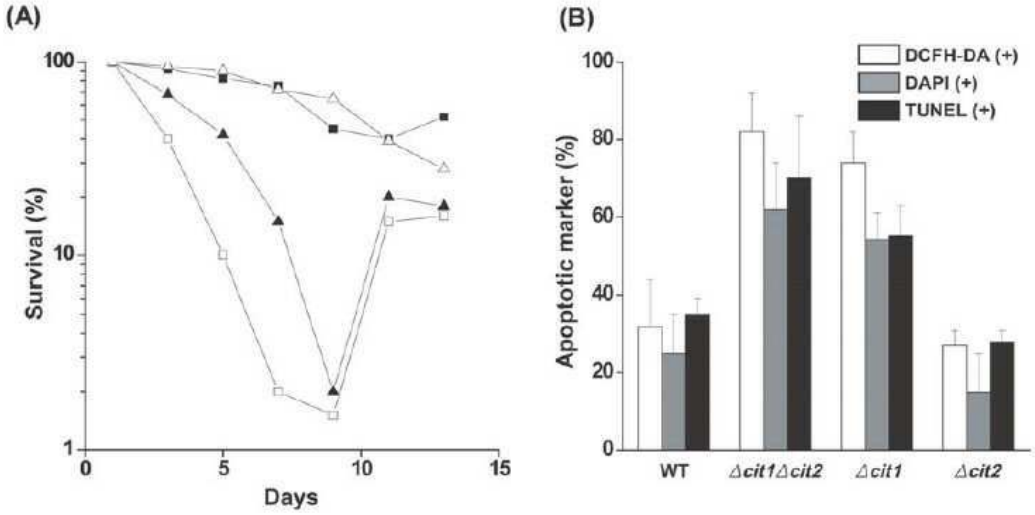
도면3


(A)
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2
30°C
50°C
(B)
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2
30°C
50°C
(C)
TUNEL (+)
DAPI (+)
Apoptotic marker (%)
100
80
60
40
20
0
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2

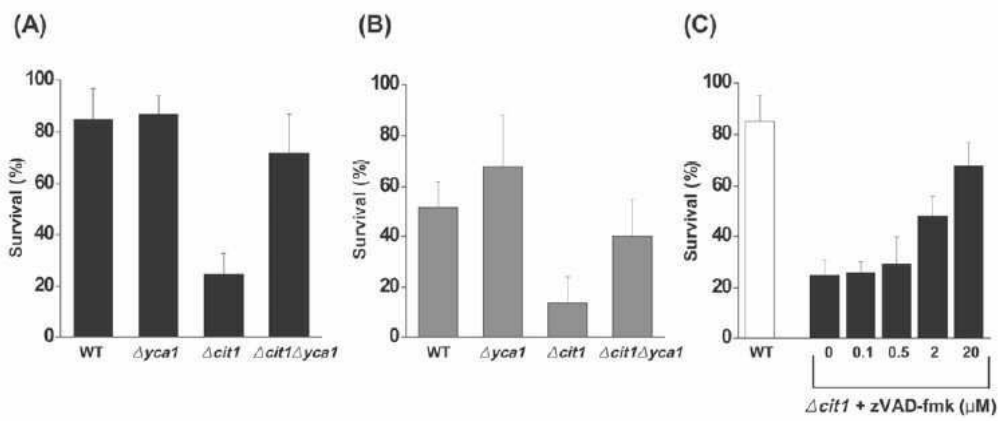
도면4


30°C
50°C
DIC
Annexin V
PI
DIC
Annexin V
PI
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2

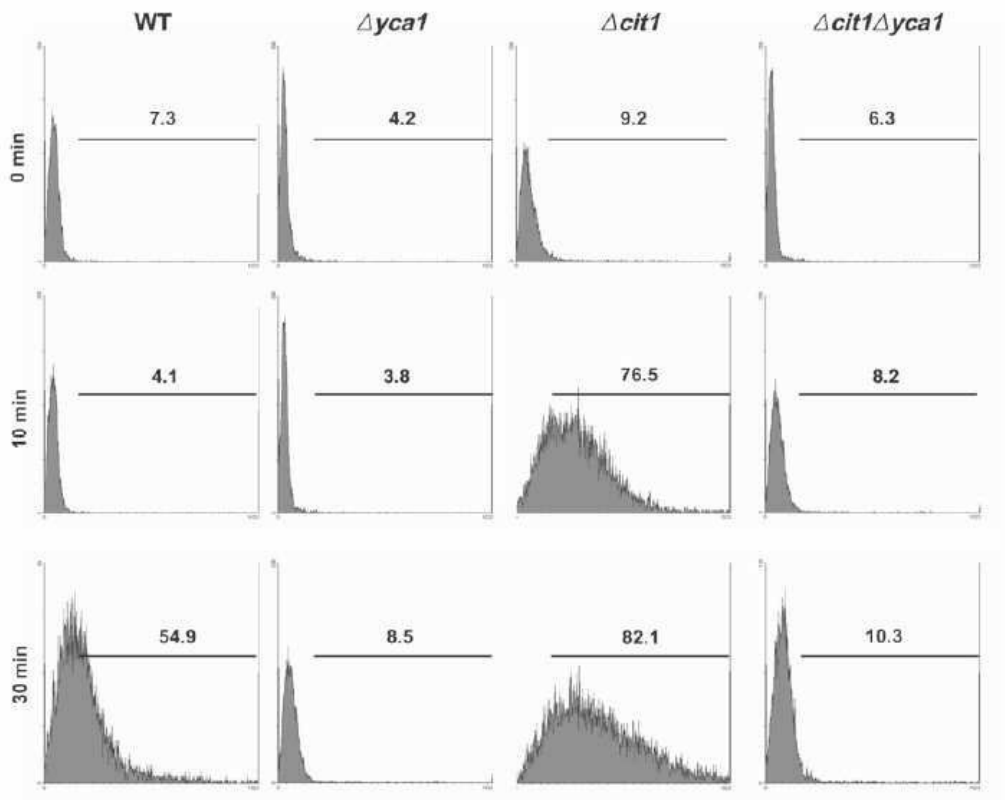
도면5


(A)
Survival (%)
100
10
1
0
5
10
15
Days
(B)
Apoptotic marker (%)
100
80
60
40
20
0
DCFH-DA (+)
DAPI (+)
TUNEL (+)
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2

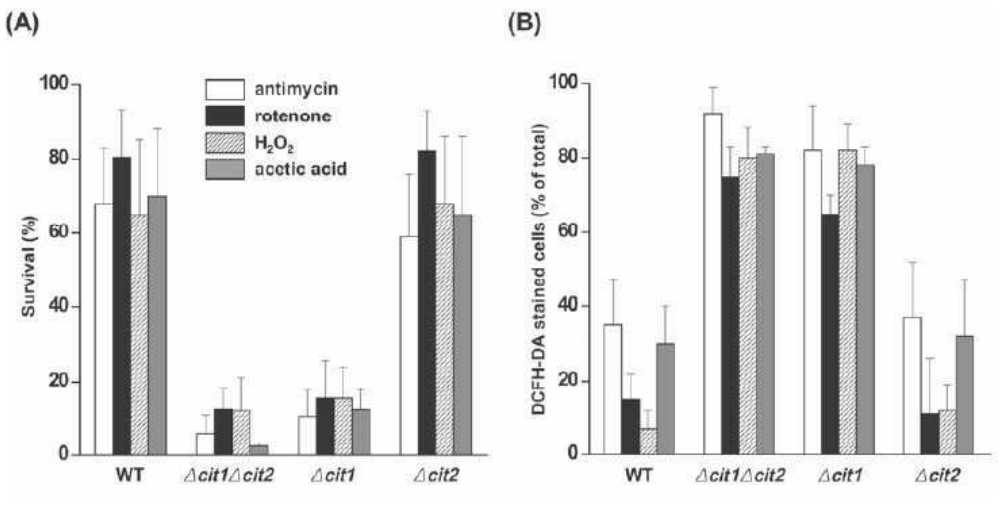
도면6


(A)
(B)
(C)
Survival (%)
100
80
60
40
20
0
WT
Δyca1
Δcit1
Δcit1Δyca1
0
0.1
0.5
2
20
Δcit1 + zVAD-fmk (μM)

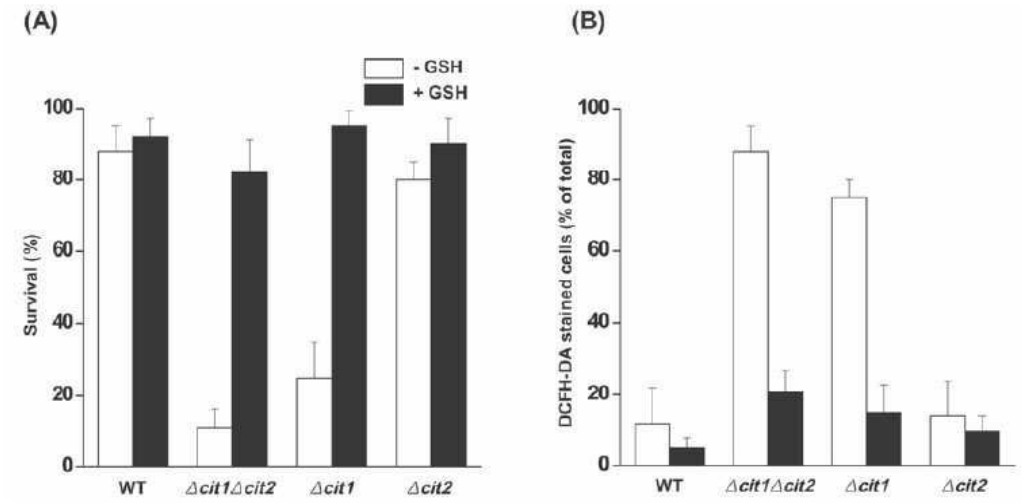
도면7


WT
Δyca1
Δcit1
Δcit1Δyca1
0 min
10 min
30 min
7.3
4.2
9.2
6.3
4.1
3.8
76.5
8.2
54.9
8.5
82.1
10.3

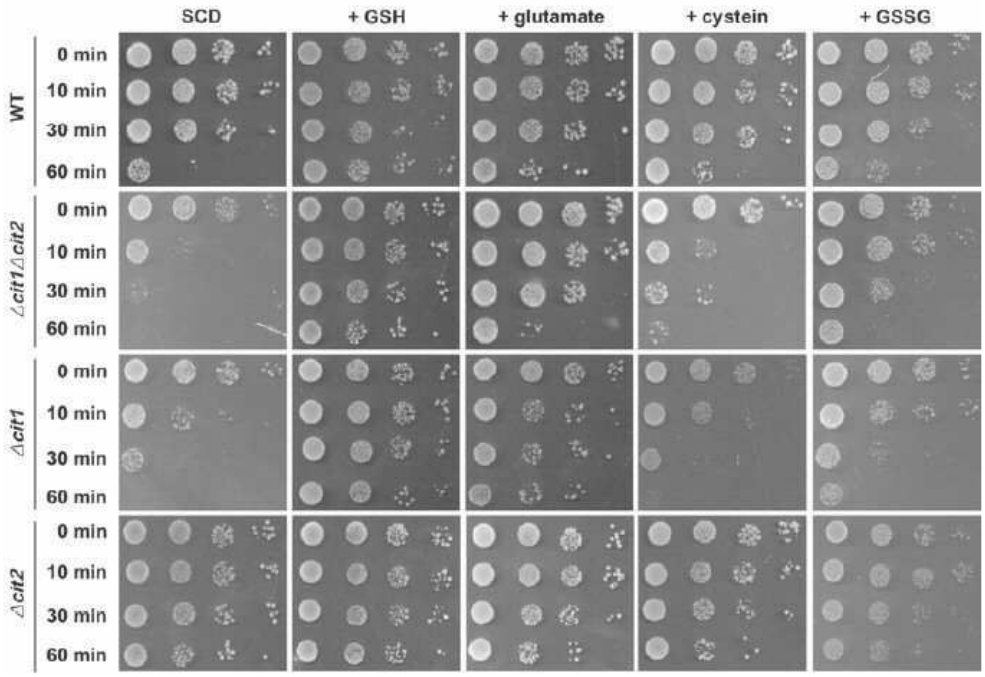
도면8


(A)
(B)
antimycin
rotenone
H_2O_2
acetic acid
Survival (%)
DCFH-DA stained cells (% of total)
100
80
60
40
20
0
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2

도면9


(A)
(B)
- GSH
+ GSH
Survival (%)
DCFH-DA stained cells (% of total)
100
80
60
40
20
0
WT
Δcit1Δcit2
Δcit1
Δcit2

도면10



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University
<120> Screening method of apoptosis controlling agent using yeat lacking CIT1

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sense primer

<400> 1
taaaaagaaa ataaggcaaa acatatagca atataatact atttacgaag atgcagctca 60

gattctttgt ttgaaaaatt agcgctctcg cgttgc 96

<210> 2
<211> 96
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense primer

<400> 2
aaatacgtgt ttgaatagtc gcataccctg aatcaaaaat caaattttcc taattaaatt 60

gaagctctaa tttgtgagtt tagtatacat gcattt 96