

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일  
2018년 5월 31일 (31.05.2018) **WIPO | PCT**

**WO 2018/097593 A2**

(51) 국제특허분류:

*G01N 33/58* (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)  
*G01N 33/68* (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)  
*G01N 33/84* (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)

LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/013340

(22) 국제출원일: 2017년 11월 22일 (22.11.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2016-0157967 2016년 11월 25일 (25.11.2016) KR  
10-2017-0154218 2017년 11월 17일 (17.11.2017) KR

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).

(72) 발명자: 박상기 (PARK, Sang Ki); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155 8동 1803호, Gyeongsangbuk-do (KR). 서영준 (SUH, Yeong Jun); 61115 광주광역시 북구 비엔날레로 55 301동 1505호, Gwangju (KR). 김승현 (KIM, Seung Hyun); 47775 부산시 동래구 명장로64번길 36, 118호, Busan (KR).

(74) 대리인: 특허법인 아이시스 (ISIS IP LAW LLC); 06160 서울시 강남구 테헤란로63길 14, 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,

(54) Title: MAM-SPECIFIC FLUORESCENCE CALCIUM SENSOR AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: MAM 특이적 형광 칼슘 센서 및 이의 용도

(57) Abstract: The present invention relates to a Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membrane (MAM)-specific fluorescence calcium sensor and the use thereof. The present invention can surmount the limitations of a conventional technique in that verification of calcium migration through MAM requires separate measurements of calcium ion concentrations within ER and mitochondria and situational explanations of the phenomena, and can directly measure concentrations in the paths through which calcium ions move to exclude influences on calcium ion changes through numerous different calcium ion channels existing in mitochondria, thereby providing a convenient and accurate MAM-specific calcium ion sensor.

(57) 요약서: 본 발명은, MAM(Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membrane) 특이적 형광 칼슘 센서 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, MAM을 통한 칼슘 이동을 증명하기 위하여 종래 ER과 미토콘드리아 내부의 칼슘 이온 농도를 각각 측정하여 정확하게 현상을 설명하여야 했던 기존 방식의 한계를 극복할 수 있고, 칼슘 이온이 이동하는 통로에서 직접 농도를 측정함으로써 미토콘드리아에 존재하는 무수한 다른 칼슘 이온 채널을 통한 칼슘 이온 변화에 대한 영향을 배제할 수 있기 때문에, 간편하고도 정확한 MAM 특이적 칼슘 이온 센서를 제공할 수 있다.



WO 2018/097593 A2

## 명세서

### 발명의 명칭: MAM 특이적 형광 칼슘 센서 및 이의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은, MAM(Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membrane) 특이적 형광 칼슘 센서 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 칼슘 이온은 세포 내에서 다양한 생리과정에 참여하는 중요 신호 전달 물질 중의 하나이다. 외부로부터의 작은 자극에도 민감하게 신호 체계를 작동시키기 위하여 세포는 세포질 내의 칼슘 이온 농도를 보통 100nM 내외의 낮은 농도로 유지하지만, 자극 시에는 1~2mM 수준으로 급격하게 증가시켜 신호를 전달하거나, 세포 내 특정 미세 구획에서 빠른 변화를 일으키는 등ダイナ믹하게 조절한다. 이를 위해 세포는 세포막, 세포소기관 등에 다양한 종류의 칼슘 이온 채널, 칼슘 이온 반응성 신호물질을 갖추고 있다.
- [3] 칼슘 이온은 특정 채널을 통해 세포로 유입된 후 신호 전달 체계를 작동시키고 즉시 ER, 미토콘드리아 등의 세포 소기관에 흡수된다. 이 과정에서 ER과 미토콘드리아가 세포 내 칼슘 이온 저장소의 역할은 물론 또 다른 칼슘 이온 신호전달 체계의 중추로서 중요한 역할을 담당하고 있음이 알려져 있다.
- [4] 한편, 세포 소기관의 역할에 대한 이해가 깊어짐에 따라 최근 ER과 미토콘드리아가 서로 근접거리에서 접합부를 형성하여 직접 칼슘 이온을 교환하는 MAM의 존재가 발견되었다. 현재 MAM이 칼슘 이온의 교환 외에도 지질(lipid) 교환, 신호 물질 전달 등의 기능을 가지고 있는 중요 기능성 구획이며, 실제로 IP3 수용체(inositol-1,4,5-trisphosphate receptors), ryanodine 수용체, 미토콘드리아 칼슘 수송체(mitochondrial calcium uniporter) 등 주요 칼슘 이온 채널 등이 MAM에 모여 있다는 것이 밝혀졌다(Biochim Biophys Acta, 2009. 1787(11): p. 1342-51). 이러한 연구결과는 ER과 미토콘드리아 두 세포 소기관이 보다 직접적인 상호작용을 통하여 주요 역할을 수행하고 있다는 것을 의미한다.
- [5] 이와 같이 MAM의 존재 및 기능이 일부 밝혀졌음에도 불구하고, ER과 미토콘드리아가 10~25nm 정도의 초근접 거리에 접근하는 미세 구획을 관찰할 수 있는 실험 기술은 아직까지 미비한 실정이다. 이는 막으로 명확하게 구분되는 미토콘드리아 ER 등의 세포 소기관과는 달리 경계가 명확하지 않으며 다이내믹하게 조절되는 MAM의 물리적 특성에 기인하는 것이다. 현재까지 MAM의 구조와 이를 통한 칼슘 이온 등 신호 물질의 전달을 조절하는 기작이나 이를 감지할 수 있는 센서 등에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

### 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [6] 이에, 본 발명자들은 ER과 미토콘드리아가 10nm~25nm 거리로 근접하여

형성되는 MAM의 물리적인 특성을 이용하여, MAM을 통한 칼슘 이온의 이동을 직접 형광으로 나타낼 수 있는 MAM 특이적 칼슘 이온 센서 물질을 개발하고자 하는 연구한 결과, 본 발명을 고안하게 되었다.

- [7] 따라서, 본 발명의 목적은, (a) ER(Endoplasmic Reticulum) 표적 단백질의 단편에 링커 펩티드와 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질의 단편이 차례로 결합된 제 1 형광 상보성 구조체, 및 (b) 미토콘드리아(Mitochondria) 표적 단백질의 단편에 링커 펩티드와 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질의 단편이 차례로 결합된 제 2 형광 상보성 구조체를 포함하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서를 제공하는 것이다.

[8]

- [9] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제 해결 수단

- [10] 본 발명은, 하기의 구조체를 포함하는, MAM(Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membrane) 특이적 형광 칼슘 센서를 제공한다.
- [11] (a) ER(Endoplasmic Reticulum) 표적 단백질의 단편에 링커 펩티드와 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질의 단편이 차례로 결합된 제 1 형광 상보성 구조체, 및
- [12] (b) 미토콘드리아(Mitochondria) 표적 단백질의 단편에 링커 펩티드와 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질의 단편이 차례로 결합된 제 2 형광 상보성 구조체.
- [13] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 ER 표적 단백질은 SAC1(suppressor of actin 1)인 것을 특징으로 한다.
- [14] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 SAC1 단백질의 단편은 SAC1 전장 단백질의 521번째 아미노산에서 587번째 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 미토콘드리아 표적 단백질은 AKAP1(A Kinase Anchoring Protein 1)인 것을 특징으로 한다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 AKAP1 단백질의 단편은 AKAP1 전장 단백질의 34번째 아미노산에서 63번째 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 미토콘드리아 표적 단백질은 MFN1(Mitofusin 1)인 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 SAC1 단백질의 단편은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 한다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 AKAP1 단백질의 단편은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 한다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 MFN1 단백질은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 한다.

- [21] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 링커 펩티드는 서열번호 4의 염기서열이 1 내지 8번 반복되어 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 한다.
- [22] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 링커 펩티드는 서열번호 4의 염기서열이 2 내지 4번 반복되어 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 한다.
- [23] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질은 분리형(split) GCaMP 단백질인 것을 특징으로 한다.
- [24] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 분리형(split) GCaMP 단백질은 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 한다.
- [25] 본 발명의 또 다른 구체예로서, 상기 분리형(split) GCaMP 단백질은 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 한다.
- [26] 또한, 본 발명은 상기 제 1 형광 상보성 구조체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터를 제공한다.
- [27] 또한, 본 발명은 상기 제 2 형광 상보성 구조체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터를 제공한다.
- [28] 또한, 본 발명은 상기 MAM(Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membrane) 특이적 형광 칼슘 센서를 이용한, MAM 특이적 칼슘 감지 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [29] 본 발명에 의하면, MAM을 통한 칼슘 이동을 증명하기 위하여 종래 ER과 미토콘드리아 내부의 칼슘 이온 농도를 각각 측정하여 정확하게 현상을 설명하여야 했던 기존 방식의 한계를 극복할 수 있고, 칼슘 이온이 이동하는 통로에서 직접 농도를 측정함으로써 미토콘드리아에 존재하는 무수한 다른 칼슘 이온 채널을 통한 칼슘 이온 변화에 대한 영향을 배제할 수 있기 때문에, 간편하고도 정확한 MAM 특이적 칼슘 이온 센서를 제공할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [30] 도 1a는 본 발명의 MAM 특이적 형광 칼슘 센서의 고안 과정에 대한 모식도이고, 도 1b는 본 발명의 MAM 특이적 형광 칼슘 센서의 작동원리를 나타낸 모식도이다.
- [31] 도 2는 본 발명의 MAM 특이적 형광 칼슘 센서와 기존 방식의 차이를 나타낸 모식도이다.
- [32] 도 3a는 실험적 확인을 위한 FOS/JUN 류신 지퍼 삽입 핵산 분자의 구조를, 도 3b는 본 발명의 분리형 GCaMP(split GCaMP)의 후보 유전자들의 분리기점을 나타낸 모식도이다.

- [33] 도 4는 본 발명의 분리형 GCaMP(split GCaMP)의 후보 유전자들에 의해 발현된 split GCaMP의 칼슘 이온 자극에 대한 형광 반응성을 나타낸 것이다.
- [34] 도 5는 본 발명의 분리형 GCaMP 후보군에서 가장 유효한 조합인 spGCaMP144/149의 칼슘 이온 자극 반응성을 time-lapse imaging 기법으로 촬영한 결과 및 이를 수치적으로 정량화한 결과이다.
- [35] 도 6a 및 도 6b는 본 발명의 MAM 특이적 형광 표지물질에 대한 재조합 발현벡터를 나타낸 것이다.
- [36] 도 7a는 본 발명의 MAM 특이적 형광 표지물질의 유효성을 확인하기 위해 세포내 형광 패턴을 관찰하여 기존의 ER/미토콘드리아 형광 표지 물질과 비교한 결과이고, 도 7b는 이의 co-localization coefficient(Mander's Coefficients)를 분석한 결과이고, 도 7c는 이의 형광 line analysis를 수행한 결과이다.
- [37] 도 8a 및 도 8b는 본 발명의 MAM 특이적 형광 칼슘 센서를 구성하는 각 형광 상보성 구조체들의 재조합 발현 벡터를 나타낸 것이다.
- [38] 도 9는 본 발명의 MAM 특이적 형광 칼슘 센서 단백질의 칼슘 반응성 확인을 위해 도 8의 재조합 발현벡터를 HEK293 세포에 트랜스펙션한 후 칼슘 이온 자극 반응성을 time-lapse imaging 기법으로 촬영한 결과 및 이를 수치적으로 정량화한 결과이다.

#### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [39] 본 발명은, (a) ER(Endoplasmic Reticulum) 표적 단백질의 단편에 링커 펩티드와 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질의 단편이 차례로 결합된 제 1 형광 상보성 구조체, 및 (b) 미토콘드리아(Mitochondria) 표적 단백질의 단편에 링커 펩티드와 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질의 단편이 차례로 결합된 제 2 형광 상보성 구조체를 포함하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서를 제공한다(도 1a 및 도 1b 참조).
- [40] 종래, 칼슘 이온의 농도를 측정할 수 있는 유전 물질들이 발견된 이래로 많은 연구그룹에서 세포 내 특정 세포 소기관에서의 칼슘 농도를 측정하기 위해, 다양한 유전학적 방법을 응용하여 ER, 미토콘드리아, 리소좀 등 막구조를 가진 세포 소기관을 대상으로 연구를 진행하고 있다.
- [41] 예를 들면, ER과 미토콘드리아 사이의 칼슘 이온 전달의 주요 통로로서 MAM을 통한 칼슘 이온의 이동 현상과 그에 따른 미토콘드리아 내 칼슘 이온 농도 상승을 측정하기 위하여, ER로 표적화된 형광 칼슘 이온 센서 단백질과 미토콘드리아로 표적화된 형광 칼슘 이온 센서 단백질을 이용하여 ER과 미토콘드리아의 칼슘 농도 변화를 각각 측정한 뒤 이를 종합하여 MAM을 통한 칼슘 이온 이동 현상을 유추해내는 방법이 있다(도 2 참조).
- [42] 그러나, 이러한 방법은 여러 단계에 걸쳐 실험을 진행해야 한다는 불편함이 있을 뿐만 아니라 정확하게는 미토콘드리아로의 칼슘 이온 유입만을 입증할 수 있을 뿐 무수히 많은 미토콘드리아 칼슘 이온 통로 중 특정하게 'MAM을 통하여'

ER의 칼슘 이온이 미토콘드리아로 전달되고 있음을 직접적으로 증명해낼 수 없었다. 즉, MAM 외에도 다양한 칼슘 이온 채널이 존재하는 ER과 미토콘드리아의 특성상 MAM 외의 다른 채널을 통한 칼슘 이온의 이동을 배제할 수 없기 때문에, MAM을 통과하는 칼슘 이온의 이동을 직접적으로 증명해낼 수 없다는 한계가 있다.

- [43] 본 발명에서, 이분자 형광 상보성(BiFC) 시스템은 단백질 절편의 상보작용(protein fragment complementation)을 형광 단백질에 적용시켜 형광 단백질을 N-말단 및 C-말단 절편으로 나눈 후 상호작용을 알아보고자 하는 두 단백질과 함께 각각 발현되게 한 다음, 두 단백질이 상호작용을 하기 위해 가까워질 경우 형광단백질의 두 절편이 합쳐져 온전한 형광단백질이 형성될 때 나타나는 형광을 분석하는 툴로서, 본 발명에서는 MAM 특이적 형광 칼슘 센싱을 위하여 이러한 BiFC 기법을 처음으로 도입하였다.
- [44] 본 발명에서, 제 1 형광 상보성 구조체를 구성하는 ER 표적 단백질은 ER에 특이적으로 표적화할 수 있는 것이면 특별한 제한은 없으며, 예를 들면 alnexin, IP3R(inositol 1,4,5-triphosphate receptor) 등을 이용할 수 있으나, 바람직하게는 SAC1(suppressor of actin 1)이다.
- [45] 이때, 상기 SAC1 단백질의 단편은 SAC1 전장 단백질의 521번째 아미노산에서 587번째 아미노산으로 이루어진 것일 수 있으며, 서열번호 1의 염기서열, 또는 이와 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상의 상동성을 갖는 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [46] 본 발명에서, 제 2 형광 상보성 구조체를 구성하는 미토콘드리아 표적 단백질은 미토콘드리아에 특이적으로 표적화할 수 있는 것이면 특별한 제한은 없으며, 예를 들면 TOM20(translocase of outer mitochondrial membrane 20), VDAC1(voltage dependent anion channel 1) 등을 이용할 수 있으나, 바람직하게는 AKAP1(A Kinase Anchoring Protein 1) 또는 MFN1(Mitofusin 1)이다.
- [47] 이때, 상기 AKAP1 단백질의 단편은 AKAP1 전장 단백질의 34번째 아미노산에서 63번째 아미노산으로 이루어진 것일 수 있으며, 서열번호 2의 염기서열, 또는 이와 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상의 상동성을 갖는 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다. 또한 상기 MFN1 단백질은 서열번호 3의 염기서열, 또는 이와 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상의 상동성을 갖는 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [48] 본 발명에서, 상기 링커 펩티드는 상기 표적 단백질을 상기 분리형(split) GCaMP에 연결할 수 있는 것이면 제한이 없으며, 예를 들면 서열번호 4의 염기서열, 또는 이와 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 이상의 상동성을 갖는 염기서열이 1 내지 8번, 바람직하게는 2 내지 4번 반복되어 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있다.
- [49] 이때, "서열 상동성 퍼센트"는 임의의 주어진 서열과 대상 서열 사이의

동일성의 정도를 의미한다.

- [50] 본 발명에서, 상기 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질은 세포에서 단백질-단백질 상호작용(interaction), 및 다이머화(dimerization) 또는 올리고머화(oligomerization)를 분석하기 위한 BiFC 분석법에 사용될 수 있는 형광 단백질로서, 칼슘 이온에 반응하여 형광을 측정할 수 있는 것이라면 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게는 상기 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질은 GCaMP, PerCaM, cameleon 등을 이용할 수 있으며, 단백질의 종류, 특성, 안정성, 형광 강도에 따라 다양한 크기로 디자인될 수 있다.
- [51] 더욱 바람직하게는, 상기 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질은 서열번호 5 또는 6의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 GCaMP(fluorescent calcium indicator) 단편이다. GCaMP는 칼슘 이온에 반응하여 구조가 변경되는 칼모듈린(Calmodulin)과 녹색형광단백질인 GFP(green fluorescent protein)를 융합시킨 형태의 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질이다.
- [52] 또한, 본 발명에서는 ER 또는 미토콘드리아 표적 단백질을 링커 펩티드를 통하여 형광 단백질과 융합 단백질 형태로 발현시키는 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [53] 본 발명에서 "벡터"는 숙주 세포 또는 피검체 내에서 핵산 분자를 전달하고 발현할 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 따라서, 벡터는 세포내로 도입되고 세포 유전체에 통합되는 PCR 생성물 또는 임의의 핵산 조각이 삽입될 수 있는, 레플리콘(replicon), 예컨대, 플라스미드, 파아지, 또는 코스미드일 수 있다. 일반적으로, 벡터는 적합한 조절 엘리먼트와 결합된 경우 복제될 수 있다. 본 발명에서 이용에 적합한 벡터 백본은, 포유동물의 세포에서 높은 발현 효율을 보이는 프로모터에 의해 발현되도록 제조될 수 있으며, 예를 들면 CMV 프로모터를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 도 6a 및 도 6b에 개시된 pEGFP-N1 및 pEGFP-C3 벡터를 백본으로 이용할 수 있다.
- [54] 본 발명에서 상기 벡터 백본에 원하는 유전자를 클로닝하여 융합 유전자를 제조하는 방법에 제한은 없으며, 예를 들면 라이게이션을 위한 평활-말단(blunt-ended termini) 또는 스테거-말단(stagger-ended termini), 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 절단, 필요에 따라 코헤시브 말단(cohesive ends)의 채움, 바람직하지 않은 결합을 회피하기 위한 알카라인 포스파타아제 처리, 및 효소 라이게이션을 이용할 수 있다.
- [55] 본 발명에서 상기 표적 단백질-링커 펩티드는 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질의 N 말단 영역 또는 C 말단 영역과 펩타이드 결합을 통하여 하나의 폴리펩타이드로 발현되는 융합 단백질 형태로 발현되며, 링커 펩티드는 형광 단백질의 C-말단 또는 N-말단 모두에 결합될 수 있으므로, (칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질 말단 영역)-링커 또는 링커-(칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질 말단 영역)의 형태로 발현될 수 있다.
- [56] 본 발명에서는, 본 발명의 재조합 발현 벡터를 세포에 형질전환하여 배양하여

단백질을 세포내에서 발현시키고 MAM 특이적 칼슘에 반응하는 형광을 측정함으로써, 세포내 특정 위치를 표적화 하고, 단백질-단백질 상호작용을 정확하게 분석가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 이때, 형광은 형광 현미경 또는 콘포컬 현미경 등을 이용하여 측정할 수 있다.

[57] 또한, 본 발명에 의하면 상기 MAM 특이적 형광 칼슘 센서를 이용함으로써, MAM 특이적 칼슘을 감지하여 MAM 특이적 칼슘 농도를 측정하는 방법을 제공할 수 있다.

[58]

[59] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[60]

[61] [실시예]

[62] 실시예 1. split GCaMP의 제작

[63] 1-1. 실험적 확인을 위한 류신 지퍼 서열(Leucine zipper sequence) 삽입

[64] ① Fos 류신 지퍼

[65] pEGFP-C3 벡터를 기반으로, mouse Fos 유전자(FBJ osteosarcoma oncogene, Mus musculus, Gene ID: 14281)의 류신 지퍼 서열(118번째~210번째 아미노산 서열에 해당하는 279 bp의 유전자 서열)을 증폭하여 이를 재조합 유전자의 Fos 류신 지퍼 서열(Leucine zipper sequence)로서 삽입하였다.

[66] 이를 위해 template로 mouse cDNA library를 사용하였고, 다음의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[67] Fos-(118aa-210aa) forward primer: 5'-CCG GGA ATT CTG GGC AGA GCG CAG AGC ATC G-3'

[68] Fos-(118aa-210aa) reverse primer: 5'-CGC GGA TCC TCA AAG GTC ATC GGG GAT CTT GCA G-3'

[69] 증폭된 DNA는 EcoRI, BamHI 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 EcoRI, BamHI 제한효소로 잘라낸 pEGFP-C3 벡터에 삽입하여 pEGFP-C3-Fos(118aa-210aa) vector를 제작하였다.

[70]

[71] ② Jun 류신 지퍼

[72] 상기 Fos 류신 지퍼 서열에 상호작용할 수 있는 Jun 류신 지퍼 서열 벡터를 제작하기 위하여 pEGFP-C3 벡터를 기반으로, mouse Jun 유전자(jun protooncogene, Mus musculus, Gene ID: 16476)의 류신 지퍼 서열(257번째~318번째 아미노산 서열에 해당하는 186 bp의 유전자 서열)을 증폭하여 이를 재조합 유전자의 Jun 류신 지퍼 서열(Leucine zipper sequence)로서 삽입하였다.

[73] 이를 위해 template로 mouse cDNA library를 사용하였고, 다음의 프라이머를

사용하여 PCR을 수행하였다.

[74] Jun-(257aa-318aa) forward primer: 5'-CCG GAA TTC TGA AGG CAG AGA GGA AGC GCA TG-3'

[75] Jun-(257aa-318aa) reverse primer: 5'-CGC GGA TCC TCA GTG GTT CAT GAC TTT CTG-3'

[76] 증폭된 DNA는 EcoRI, BamHI 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 EcoRI, BamHI 제한효소로 잘라낸 pEGFP-C3 벡터에 삽입하여 pEGFP-C3-Jun(257aa-318aa) vector를 제작하였다.

[77]

[78] **1-2. split GCaMP 후보군 유전자의 제작**

[79] 공지의 GCaMP6s의 서열과 enhanced GFP(EGFP) 구조를 기반으로, GCaMP의 형광 및 칼슘 이온 반응성 특성을 나타내는 분리형 GCaMP 유전자의 최적 조합을 도출하기 위하여, 7개의 분리형 GCaMP 유전자에 대하여 하기 4종의 조합 벡터를 제작하였다.

[80] 각각의 조합에서 GCaMP의 단백질 서열 기준 아미노 말단(N-terminus)에 해당하는 유전자는 pEGFP-C3-Fos(118aa-210aa) vector, 카르복시 말단(C-terminus)에 해당하는 유전자는 pEGFP-C3-Jun(257aa-318aa) vector의 EGFP 유전자와 교체되었다(도 3a 및 3b 참조).

[81] **조합 1 (balanced pair)**

[82] **(spGC149)-Fos(118aa-210aa) vector**

[83] spGC-N-terminus forward primer:

[84] 5'-gggaccggtgccaccatgggttctcatcatcatcatcatg-3'

[85] spGC149 reverse primer:

[86] 5'-ggaagatctgacttgtagctcgctccatgcc-3'

[87]

[88] (spGC144)-Jun(257aa-318aa) vector

[89] spGC144 forward primer:

[90] 5'-gggaccggtgccaccatgggtgagcaagggcgag-3'

[91] spGC-C-terminus reverse primer:

[92] 5'-ggaagatctgacttcgctgtcatcattgtacaaac-3'

[93]

[94] **조합 2 (unbalanced pair #1)**

[95] **(spGC100)-Fos(118aa-210aa) vector**

[96] spGC-N-terminus forward primer:

[97] 5'-gggaccggtgccaccatgggttctcatcatcatcatcatg-3'

[98] spGC100 reverse primer:

[99] 5'-ggaagatctgagaagaagatgggtgcgctcctg-3'

[100]

- [101] (spGC105)-Jun(257aa-318aa) vector
- [102] spGC105 forward primer:
- [103]
- [104] \*5'-gggaccggtgccaccatgtacaagacccgcgccgag-3'
- [105] spGC-C-terminus reverse primer:
- [106] 5'-ggaagatctgacttcgctgtcatcattgtacaaac-3'
- [107]
- [108] **조합 3 (unbalanced pair #2-1)**
- [109] **(spGC188)-Fos(118aa-210aa) vector**
- [110] spGC-N-terminus forward primer:
- [111] 5'-gggaccggtgccaccatgggttctcatcatcatcatcatg-3'
- [112] spGC188 reverse primer:
- [113] 5'-ggaagatctgagatgggggtgttctgctgg-3'
- [114]
- [115] (spGC172)-Jun(257aa-318aa) vector
- [116] spGC172 forward primer:
- [117] 5'-gggaccggtgccaccatggacggcggtgcagc-3'
- [118] spGC-C-terminus reverse primer:
- [119] 5'-ggaagatctgacttcgctgtcatcattgtacaaac-3'
- [120]
- [121] **조합 4 (unbalanced pair #2-2)**
- [122] **(spGC188)-Fos(118aa-210aa) vector**
- [123] spGC-N-terminus forward primer:
- [124] 5'-gggaccggtgccaccatgggttctcatcatcatcatcatg-3'
- [125] spGC188 reverse primer:
- [126] 5'-ggaagatctgagatgggggtgttctgctgg-3'
- [127]
- [128] (spGC199)-Jun(257aa-318aa) vector
- [129] spGC199 forward primer:
- [130] 5'-gggaccggtgccaccatgcactacgtgagcgtgcagtcc-3'
- [131] spGC-C-terminus reverse primer:
- [132] 5'-ggaagatctgacttcgctgtcatcattgtacaaac-3'
- [133] GCaMP6s의 유전자를 template로 하여 각 조합의 해당 primer로 AgeI, BglII 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 AgeI, BglII 제한효소로 EGFP 유전자 부분을 잘라낸 pEGFP-C3-Fos(118aa-210aa) vector, pEGFP-C3-Jun(257aa-318aa) vector에 각각 삽입하였다.
- [134]
- [135] **실시예 2. split GCaMP의 칼슘 반응성 확인**

[136] **2-1. 재조합 벡터의 transfection**

[137] glass-bottomed dish 위에서 12시간 동안 배양된 HEK293 세포에 상기 실시예 1에서 제작한 4종의 유전자 조합을 lipofectamine 2000 reagent를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 각각 트랜스펙션(transfection)하였다.

[138]

[139] **2-2. 형광현미경을 이용한 실시간 관찰**

[140] 트랜스펙션 이후 10% FBS(Fetal Bovine Serum)를 포함하는 DMEM 배양액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 배양 조건으로 24시간 배양한 HEK293 세포에 대하여, 배양액을 calcium-free imaging buffer(145 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM HEPES pH 7.4, 1 mM MgCl<sub>2</sub>)로 교체한 뒤 형광 현미경을 이용하여 1초 간격으로 timelapse imaging 실험을 수행하였다.

[141] 칼슘 반응을 위한 자극원으로는 ionomycin(Sigma-aldrich)과 CaCl<sub>2</sub> 수용액을 각각 final working concentration 10 µM, 1 mM이 되도록 처리하였다.

[142] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 4종의 이분자형 split GCaMP 조합 중에서 spGCaMP144와 spGCaMP149의 조합이 기존의 GCaMP와 같은 방식으로 칼슘 이온에 반응하여 녹색형광을 나타내는 최적의 조합임을 확인하였다.

[143] 또한, 실시간 형광 현미경 분석 방법(time-lapse fluorescent microscopy)을 이용하여 (spGC149)-Fos(118aa-210aa) vector와 (spGC144)-Jun(257aa-318aa) vector를 transfection한 세포에서의 칼슘 이온 반응성을 조사하였다. 이때, 실시간 형광 현미경 분석은 10초 단위로 총 150초가량의 실시간 형광변화를 관찰하였다. 여기서 사용된 split GCaMP와 BiFC는 모두 핵(nucleus)으로 표적화하기 위해 상기 실시예 1의 Fos(118aa-210aa), Jun(257aa-318aa) 서열이 사용되었고, 단일 분자로 사용된 GCaMP의 경우 NLS 서열을 3회 반복하여 연결하여 핵 특이적으로 표적화하였으며, GCaMP-NLS 서열은 서열번호 7에 나타낸 바와 같다.

[144] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 기존에 널리 사용되는 GCaMP6와 비슷한 수준의 반응성을 가지면서 spGCaMP144와 spGCaMP149의 조합이 서로 근접거리(proximity)에 접근했을 때에만 칼슘 이온에 반응해 형광을 만들어낼 수 있는 이분자형(bimolecular) 형광 칼슘 센서로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[145]

[146] **실시예 3. MAM 특이적 재조합 핵산 분자 제작**

[147] **3-1. AKAP1을 이용한 미토콘드리아 표적화 재조합 핵산 분자 제작**

[148] **① 미토콘드리아 표적화 서열의 삽입**

[149] pEGFP-N1 벡터를 기반으로, mouse Akap1 유전자(A kinase (PRKA) anchor protein 1, Mus musculus, Gene ID: 11640)의 미토콘드리아 표적화 서열(34번째~63번째 아미노산 서열에 해당하는 90 base pair의 유전자 서열)을 증폭하여 미토콘드리아 표적화 vector를 제작하였다.

[150] 이를 위해 template로 mouse cDNA library를 사용하여 다음과 같은 서열의

프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[151] AKAP1-(34aa-63aa) forward primer:

[152] 5'-ctagctagccaccatggcaatccagttgcgttcg-3'

[153] AKAP1-(34aa-63aa) reverse primer:

[154] 5'-ccgctcgagttttttacgagagaaaaaccaccaccagcc-3'

[155] 증폭된 DNA는 NheI, XhoI 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 NheI, XhoI 제한효소로 잘라낸 pEGFP-N1 벡터에 삽입하여 pEGFP-N1-AKAP1(34aa-63aa) vector를 제작하였다.

[156]

[157] ② 형광단백질 유전자의 교체

[158] Venus 유전자를 template로 다음의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[159] Venus155-N1 forward primer:

[160] 5'-cgcgatcccaccatgaagcagaagaacggcatcaag-3'

[161] Venus155-N1 reverse primer:

[162] 5'-aaatatgcgccgctttactgtacagctcgtccatgc-3'

[163] BamHI, NotI 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 BamHI, NotI 제한효소로 EGFP 유전자 부분을 잘라낸 pEGFP-N1-AKAP1(34aa-63aa) vector에 삽입하여, EGFP 유전자가 BiFC 유전자로 치환된 pVenus(155-C)-N1-AKAP1(34aa-63aa) vector를 제작하였다.

[164]

[165] ③ 링커 서열의 삽입

[166] 다음과 같이 60bp 길이의 링커 서열을 단독으로, 혹은 필요에 따라 반복하여 사용하였다.

[167] linker sequence:

[168] 5'-gacccaaccaggtcagcgaattctggagcaggagcaggagcaggagcaatactctcccg-3'

[169] 구체적으로, 다음 서열의 링커 서열을 합성한 후, 합성된 올리고 DNA는 XhoI, SalI 제한효소로 처리한 후, T4 ligase를 이용하여 XhoI 제한효소를 처리한 pVenus(155-C)-N1-AKAP1(34aa-63aa) vector에 삽입하여 pVenus(155-C)-linker-AKAP1(34aa-63aa) vector를 제작하였다(도 6a 참조).

[170] linker oligo DNA:

[171] 5'-ccgctcgag

[172] (gacccaaccaggtcagcgaattctggagcaggagcaggagcaggagcaatactctcccg)n gtcgac-3'

[173]

[174] **3-2. MFN1을 이용한 미토콘드리아 표적화 재조합 핵산 분자 제작**

[175] ① 미토콘드리아 표적화 서열의 삽입

[176] pEGFP-C3 벡터를 기반으로, mouse Mfn1 유전자(mitofusin 1, Mus musculus, Gene ID: 67414)를 증폭하여 미토콘드리아 표적화 vector를 제작하였다.

[177] 이를 위해 template로 mouse cDNA library를 사용하여 다음과 같은 서열의

프라이머로 PCR을 수행하였다.

[178] MFN1 forward primer: 5'-ccggaattctggcagaaacggtatctccactgaag-3'

[179] MFN1 reverse primer: 5'-cgcggtatccttaggattctccactgctcggg-3'

[180] 증폭된 DNA는 EcoRI, BamHI 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 EcoRI, BamHI 제한효소로 잘라낸 pEGFP-C3 벡터에 삽입하여 pEGFP-C3-MFN1 vector를 제작하였다.

[181]

[182] ② 형광단백질 유전자의 교체

[183] Venus 유전자를 template로 다음의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[184] Venus N172-C3 forward primer:

[185] 5'-gggaccggtgccaccatggtgagcaagggcgag-3'

[186] Venus N172-C3 reverse primer:

[187] 5'-ggaagatctgactcgatgttggtggcggatc-3'

[188] 증폭된 DNA는 AgeI, BglII 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 AgeI, BglII 제한효소로 EGFP 유전자 부분을 잘라낸 pEGFP-C3-MFN1 vector에 삽입하여, EGFP 유전자가 BiFC 유전자로 치환된 pVenus(N-172)-C3-MFN1 vector를 제작하였다.

[189]

[190] ③ 링커 서열의 삽입

[191] 실시예 3-1에서와 마찬가지로 60 bp 길이의 링커 서열이 단독으로, 혹은 필요에 따라 반복되어 사용되었으며, 실시예 3-1에서와 동일한 방법으로 합성된 올리고 DNA는 XhoI, SalI 제한효소로 처리한 후, T4 ligase를 이용하여 XhoI 제한효소를 처리한 pVenus(N-172)-C3-MFN1 vector에 삽입하여 pVenus(N-172)-linker-MFN1 vector를 제작하였다(도 6b 참조).

[192] linker oligo DNA:

[193] 5'-ccgctcgag

[194] (gacccaaccaggtcagcgaattctggagcaggagcaggagcaggagcaatactctcccgt)n gtcgac-3'

[195]

[196] 3-3. SAC1을 이용한 ER 표적화 재조합 핵산 분자 제작

[197] ① ER 표적화 서열의 삽입

[198] pEGFP-C3 벡터를 기반으로, mouse Sac1 유전자(SAC1; suppressor of actin mutations 1-like (yeast), *Mus musculus*, Gene ID: 83493)의 ER 표적화 서열(521번째~587번째 아미노산 서열에 해당하는 204 base pair의 유전자 서열)을 증폭하여 이를 재조합 유전자의 ER 표적화 서열(ER targeting sequence)로서 삽입하였다.

[199] 이를 위해 template로 mouse cDNA library를 사용하였고, 다음과 같은 서열의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.

[200] SAC1-(521aa-587aa) forward primer:

- [201] 5'-cggggtaccgttcctggcggtgcctatcatc-3'
- [202] SAC1-(521aa-587aa) reverse primer:
- [203] 5'-cgcggtacccctcagtcctatcttttctttctggaccag-3'
- [204] 증폭된 DNA는 KpnI, BamHI 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 KpnI, BamHI 제한효소로 잘라낸 pEGFP-C3 벡터에 삽입하여 pEGFP-C3-SAC1(521aa-587aa) vector를 제작하였다.
- [205]
- [206] ② 형광단백질 유전자의 교체
- [207] Venus 유전자를 template로 다음의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.
- [208] Venus149C-C3 forward primer:
- [209] 5'-gggaccgggtgccaccatgaacgtctatatcaccgccgac-3'
- [210] Venus149C-C3 reverse primer:
- [211] 5'-ggaagatctgacttgtagcagctcgccatgcc-3'
- [212] 증폭된 DNA는 AgeI, BglII 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여 AgeI, BglII 제한효소로 EGFP 유전자 부분을 잘라낸 pEGFP-C3-SAC1(521aa-587aa) vector에 삽입하여, EGFP 유전자가 BiFC 유전자로 치환된 pVenus(149-C)-C3-SAC1(521aa-587aa) vector를 제작하였다.
- [213]
- [214] ③ 링커 서열의 삽입
- [215] 실시예 3-1에서와 마찬가지로 60 bp 길이의 링커 서열이 단독으로, 혹은 필요에 따라 반복되어 사용되었으며, 실시예 3-1에서와 동일한 방법으로 합성된 올리고 DNA는 XhoI, SalI 제한효소로 처리한 후, T4 ligase를 이용하여 XhoI 제한효소를 처리한 pVenus(149-C)-C3-SAC1(521aa-587aa) vector에 삽입하여 pVenus(149-C)-linker-SAC1(521aa-587aa) vector를 제작하였다(도 6b 참조).
- [216]
- [217] **3-4. MAM 표적화 검증**
- [218] ① 현미경 샘플의 제작 및 관찰
- [219] 본 발명에서 제작된 이분자형 MAM 특이적 형광 표지 물질의 MAM 표적화를 검증하기 위하여, 상기 제작된 pVenus(N-172)-linker-MFN1 vector, pVenus(149-C)-linker-SAC1(521aa-587aa) vector를 미토콘드리아 형광 표지 유전자 vector, ER 형광 표지 유전자 vector와 함께 HEK293 세포에 transfection한 뒤 현미경 샘플을 제작하였다.
- [220] 이후, 형광 현미경을 이용하여 세포내 형광 패턴을 관찰한 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이, 세포 내에서 이들 표적화 서열을 이용한 MAM 특이적 이분자 형광 표지 물질이 ER과 미토콘드리아의 접합부(MAM)를 선택적으로 표지하고 있음을 확인하였다.
- [221]
- [222] ② MAM 표적화 분석

- [223] 본 발명에서 제작된 이분자형 MAM 특이적 형광 표지 물질의 MAM 표적화 수준을 분석하기 위하여, 상기 제작한 현미경 샘플을 이용하여 촬영한 형광 사진들을 NIH에서 배포한 범용 이미지 분석 프로그램 Image J를 이용하여 분석하였다.
- [224] 먼저, 기존의 MAM 연구에서 사용된 방법대로 각각 ER의 기질과 미토콘드리아 기질을 표지하는 ER 표지 형광 물질, 미토콘드리아 표지 형광 물질의 형광이 겹쳐지는 부분을 추출하여, 이분자형 MAM 특이적 형광 표지 물질의 형광 패턴과의 co-localization coefficient(Mander's Coefficients)를 분석하였다.
- [225] 그 결과, 도 7b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 이분자형 MAM 특이적 형광 표지 물질의 경우, 조사된 모든 세포에서 미토콘드리아, ER 각자의 형광 표지보다 미토콘드리아와 ER의 형광이 겹쳐지는 부분(overlapped)에 더 높은 수준으로 겹쳐지고 있음을 확인하였다.
- [226] 또한, MAM 특이적 형광 표지 신호가 나타나는 구간에서 MAM 특이적 형광 표지 물질과 ER 형광 표지 물질, 미토콘드리아 형광 표지 물질의 패턴을 분석하기 위해 line analysis를 수행하였다.
- [227] 그 결과, 도 7c에 나타낸 바와 같이, 미토콘드리아(파란색 형광)와 ER(붉은색 형광)의 경계(그래프의 실선이 교차하는 부분, 화살표로 표시)에 존재하는 MAM을 본 발명의 MAM 특이적 이분자 형광 표지 물질이 매우 정확하게 표지하고 있음을 확인하였다.
- [228]
- [229] **실시예 4. MAM 특이적 칼슘 이온 센서 재조합 발현 벡터 제작**
- [230] 실시예 3에서 제작된 pVenus(155-C)-linker-AKAP1(34aa-63aa) vector를 기반으로, GCaMP6s 유전자를 template로 실시예 1-2의 조합 1에서 사용된 하기의 primer를 이용하여 PCR 증폭하였다.
- [231] spGC144 forward primer:
- [232] 5'-gggaccggtgccaccatggtgagcaagggcgag-3'
- [233] spGC-C-terminus reverse primer:
- [234] 5'-ggaagatctgacttcgctgtcatcattgtacaaac-3'
- [235] 이후, 이 PCR 산물을 BamHI, NotI 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여, BamHI, NotI 제한효소로 Venus(155-C) 유전자 부분을 잘라낸 pVenus(155-C)-linker-AKAP1(34aa-63aa) vector에 삽입함으로써 AKAP1(34aa-63aa)-linker-spGC144 vector를 제작하였다(도 8a 참조).
- [236] 마찬가지로, 상기 실시예 3에서 제작된 pVenus(N-172)-linker-MFN1 vector를 기반으로, GCaMP6s 유전자를 template로 실시예 1-2의 조합 1에서 사용된 하기의 primer를 이용하여 PCR 증폭하였다.
- [237] spGC144 forward primer:
- [238] 5'-gggaccggtgccaccatggtgagcaagggcgag-3'

- [239] spGC-C-terminus reverse primer:
- [240] 5'-ggaagatctgacttcgctgtcatcattgtacaaac-3'
- [241] 이후, 이 PCR 산물을 AgeI, BglIII 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여, AgeI, BglIII 제한효소로 Venus(N-172) 유전자 부분을 잘라낸 pVenus(N-172)-linker-MFN1 vector에 삽입하여 spGC144-linker-MFN1 vector를 제작하였다.
- [242] 또한, 실시예 3에서 제작된 pVenus(149-C)-linker-SAC1(521aa-587aa) vector를 기반으로, GCaMP6s 유전자를 template로 실시예 1-2의 조합 1에서 사용된 하기의 primer를 이용하여 PCR 증폭하였다.
- [243] spGC-N-terminus forward primer:
- [244] 5'-gggaccgggtgccaccatgggttctcatcatcatcatcatg-3'
- [245] spGC149 reverse primer:
- [246] 5'-ggaagatctgacttgtagctcgtccatgcc-3'
- [247] 이후, 이 PCR 산물을 AgeI, BglIII 제한효소로 처리한 후 T4 ligase를 이용하여, AgeI, BglIII 제한효소로 Venus(149-C) 유전자 부분을 잘라낸 pVenus(149-C)-linker-SAC1(521aa-587aa) vector에 삽입함으로써 spGC149-linker-SAC1(521aa-587aa) vector를 제작하였다.
- [248]
- [249] 실시예 5. MAM 특이적 칼슘 이온 센서 단백질의 칼슘 반응성 확인
- [250] **5-1. 재조합 유전자 벡터의 transfection**
- [251] 실시예 4에서 제작된 재조합 발현 벡터인 AKAP1(34aa-63aa)-linker-spGC144 vector 및 spGC149-linker-SAC1(521aa-587aa) vector를 각각 glass-bottomed dish 위에 12시간 배양된 HEK293 세포에 lipofectamine 2000 reagent를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 트랜스펙션(transfection)하였다.
- [252]
- [253] **5-2. 형광현미경을 이용한 실시간 관찰**
- [254] 트랜스펙션 이후 10% FBS(Fetal Bovine Serum)를 포함하는 DMEM 배양액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 배양 조건으로 24시간 배양한 HEK293 세포에 대하여, 배양액을 calcium-free imaging buffer (145mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM glucose, 10mM HEPES pH 7.4, 1mM MgCl<sub>2</sub>)로 교체한 뒤 형광 현미경을 이용하여 1초 간격으로 timelapse imaging 실험을 수행하였다.
- [255] MAM 특이적 칼슘 반응을 위한 자극원으로는 ionomycin(Sigmaaldrich)과 IP3(inositol-1,4,5-trisphosphate)를 각각 final working concentration 10μM이 되도록, 또는 CaCl<sub>2</sub>를 final working concentration 1 mM이 되도록 처리하였다.
- [256] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이 상기 HEK293 세포에 발현시킨 MAM 특이적 칼슘 이온 센서 단백질(MAM-spGCaMP)의 경우, IP3 또는 CaCl<sub>2</sub>를 처리하였을 때 형광이 증가하는 것을 통해 실제로 칼슘 변화를 감지할 수 있음을 확인하였다.
- [257]

- [258]     상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 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.

#### **산업상 이용가능성**

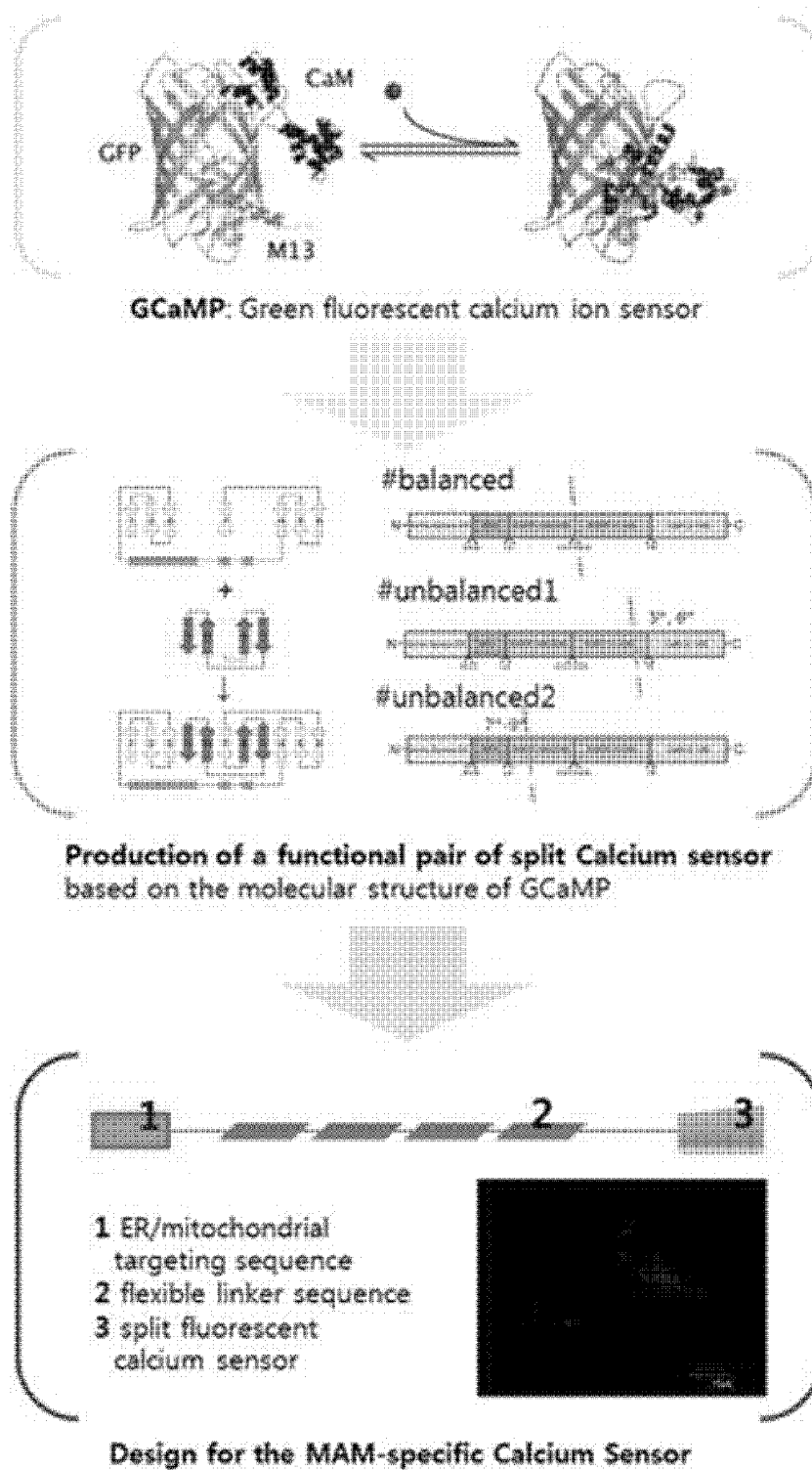
- [259]     본 발명에 따른 MAM 특이적 칼슘 이온 센서는 종래의 한계점을 극복하여 칼슘 이온이 이동하는 통로에서 직접 칼슘 농도를 측정함으로써 간편하고 정확하게 칼슘 이온의 변화를 확인할 수 있는바, 생체 내 칼슘 이온 변화 감지를 통한 다양한 기초 및 임상 연구에서 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

## 청구범위

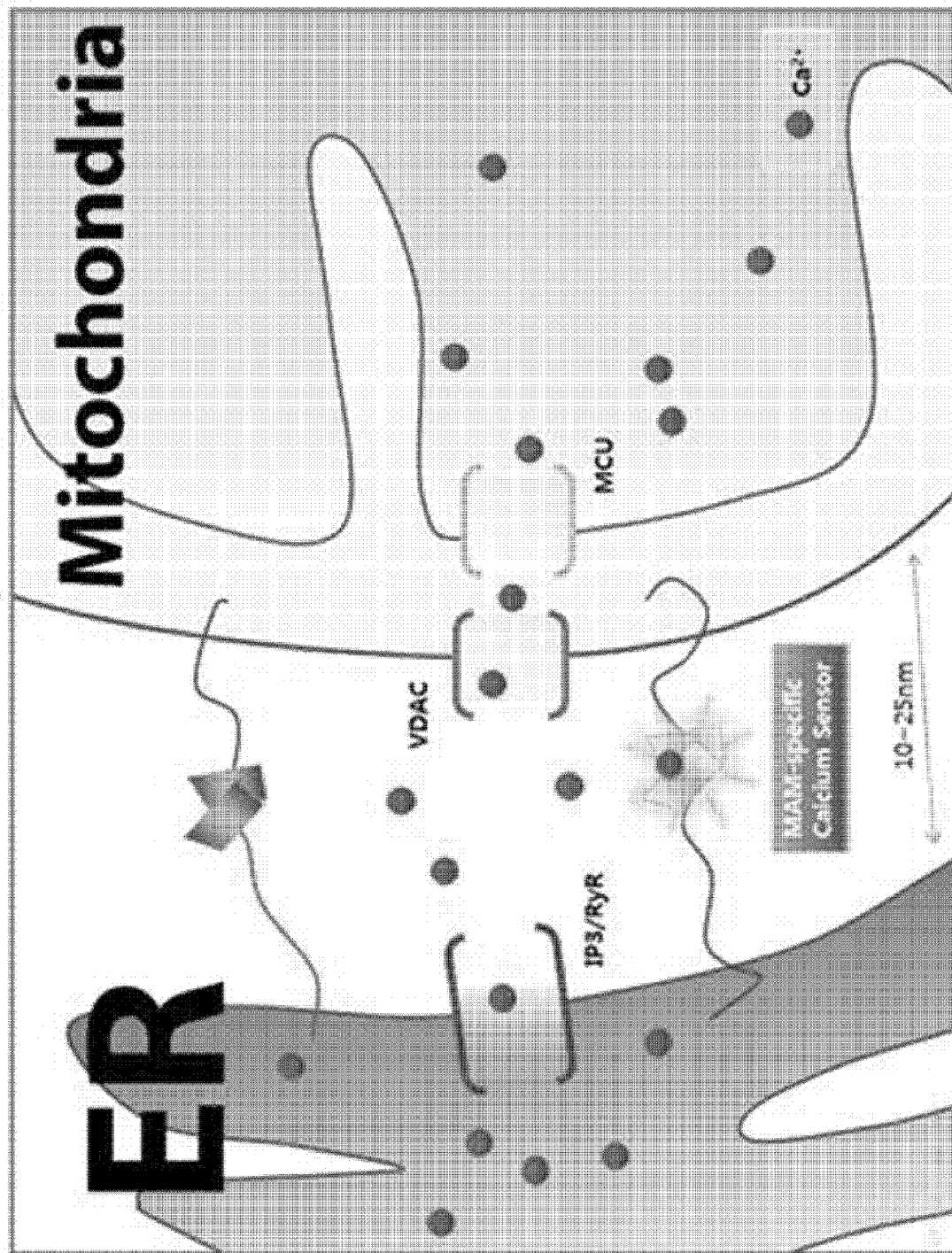
- [청구항 1] 하기의 구조체를 포함하는, MAM(Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membrane) 특이적 형광 칼슘 센서:  
 (a) ER(Endoplasmic Reticulum) 표적 단백질의 단편에 링커 펩티드와 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질의 단편이 차례로 결합된 제 1 형광 상보성 구조체, 및  
 (b) 미토콘드리아(Mitochondria) 표적 단백질의 단편에 링커 펩티드와 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질의 단편이 차례로 결합된 제 2 형광 상보성 구조체.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 ER 표적 단백질은 SAC1(suppressor of actin 1)인 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서, 상기 SAC1 단백질의 단편은 SAC1 전장 단백질의 521번째 아미노산에서 587번째 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 미토콘드리아 표적 단백질은 AKAP1(A Kinase Anchoring Protein 1)인 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서, 상기 AKAP1 단백질의 단편은 AKAP1 전장 단백질의 34번째 아미노산에서 63번째 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 미토콘드리아 표적 단백질은 MFN1(Mitofusin 1)인 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 7] 제 3 항에 있어서, 상기 SAC1 단백질의 단편은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 8] 제 5 항에 있어서, 상기 AKAP1 단백질의 단편은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 9] 제 6 항에 있어서, 상기 MFN1 단백질은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서, 상기 링커 펩티드는 서열번호 4의 염기서열이 1 내지 8번 반복되어 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 링커 펩티드는 서열번호 4의 염기서열이 2 내지 4번 반복되어 있는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을

- 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 12] 제 1 항에 있어서, 상기 칼슘 이온 반응성 형광 센서 단백질은 분리형(split) GCaMP 단백질인 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 13] 제 12 항에 있어서, 상기 분리형(split) GCaMP 단백질은 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 14] 제 12 항에 있어서, 상기 분리형(split) GCaMP 단백질은 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것을 특징으로 하는, MAM 특이적 형광 칼슘 센서.
- [청구항 15] 제 1 항의 제 1 형광 상보성 구조체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.
- [청구항 16] 제 1 항의 제 2 형광 상보성 구조체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 발현 벡터.
- [청구항 17] 제 1 항의 센서를 이용한, MAM(Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membrane) 특이적 칼슘 감지 방법.

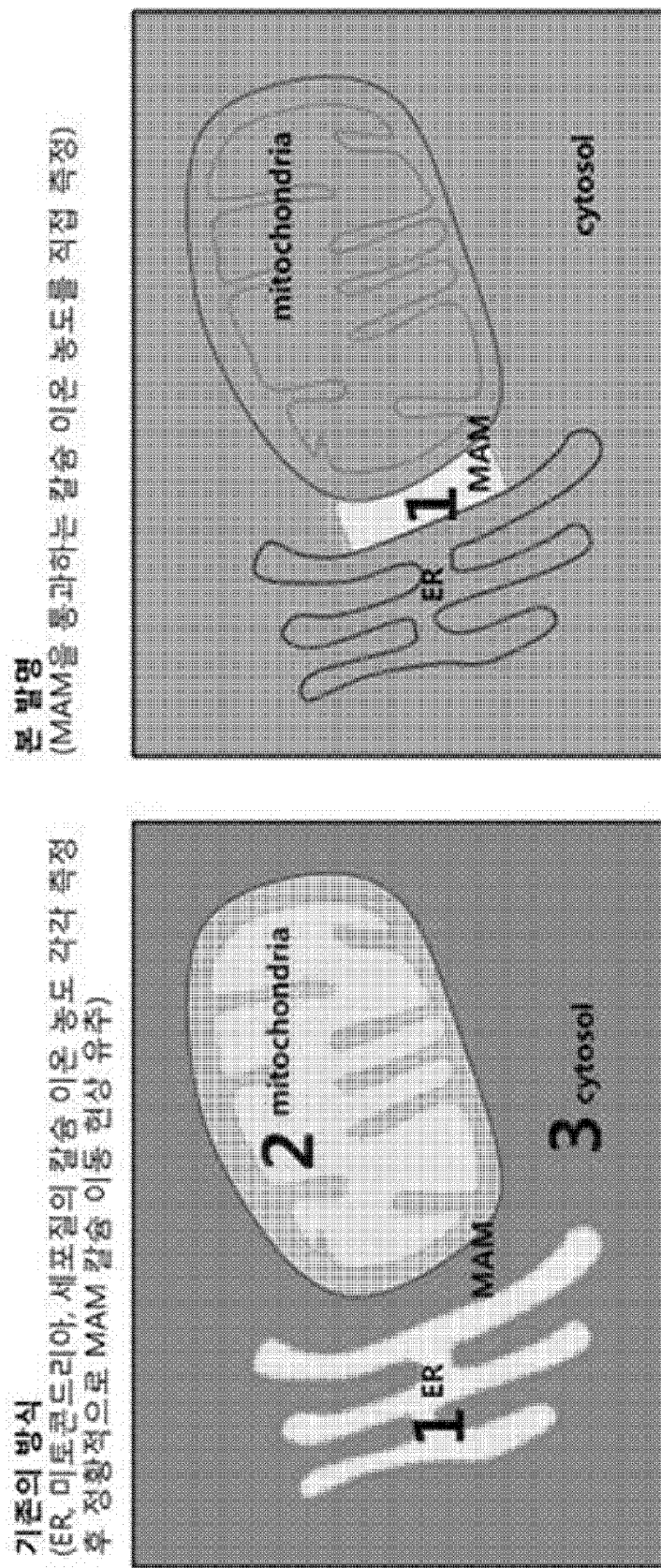
[Fig. 1a]



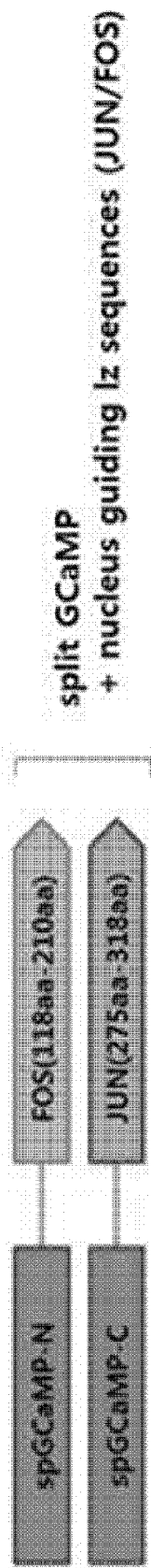
[Fig. 1b]



[Fig. 2]

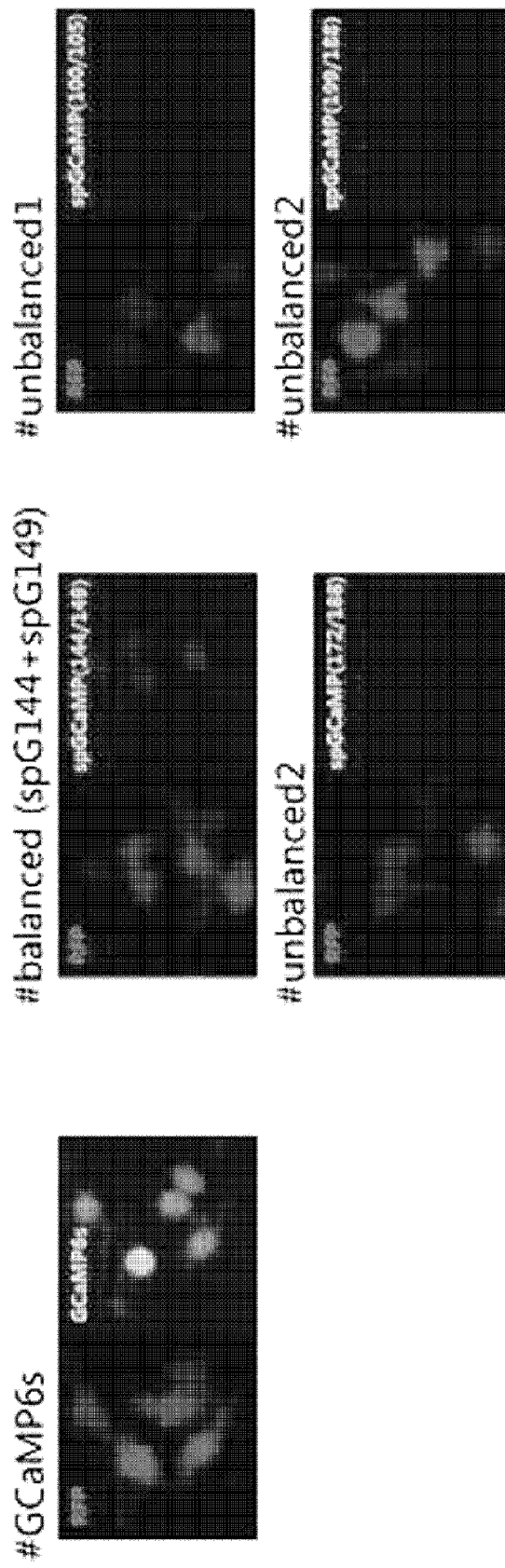


[Fig. 3a]

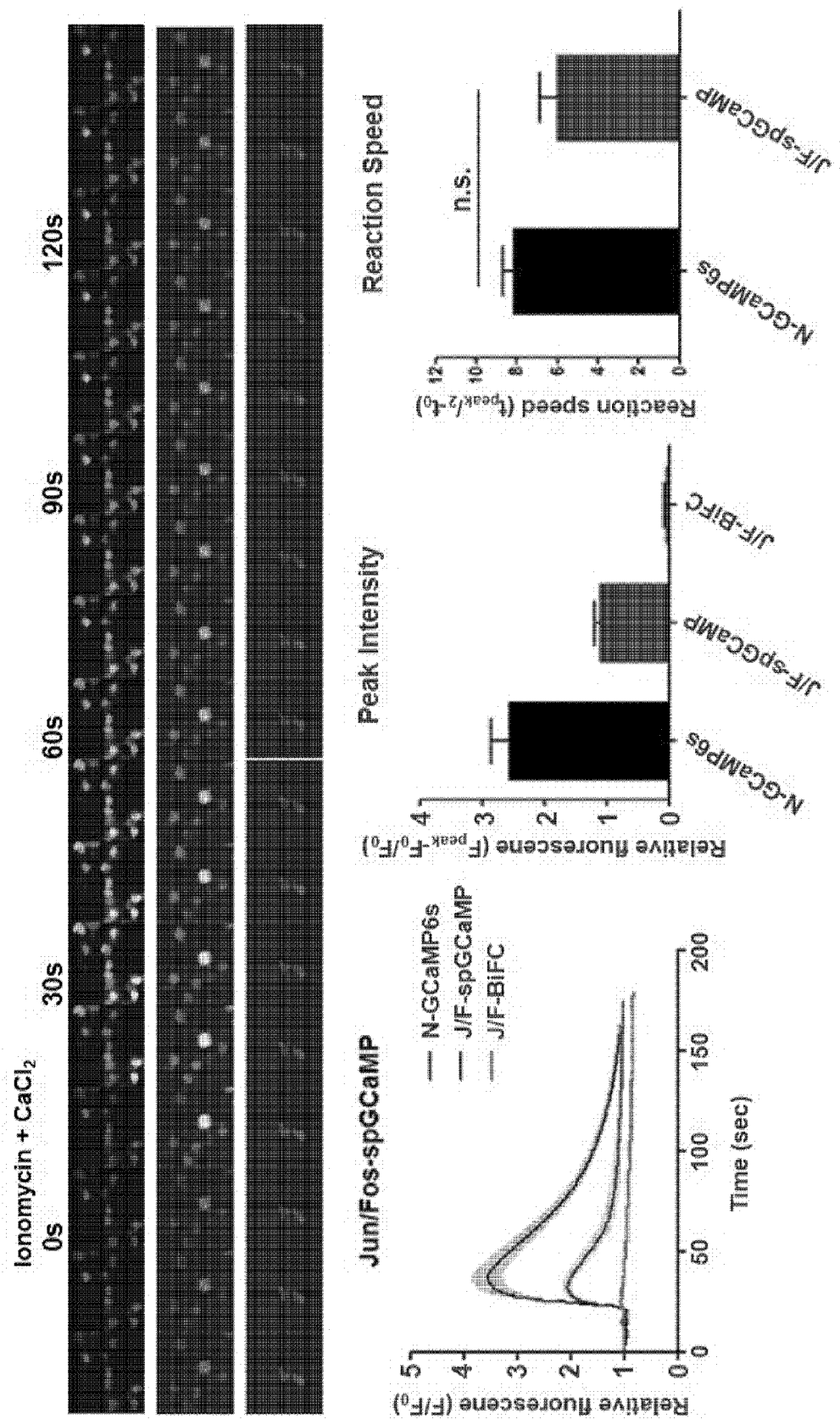




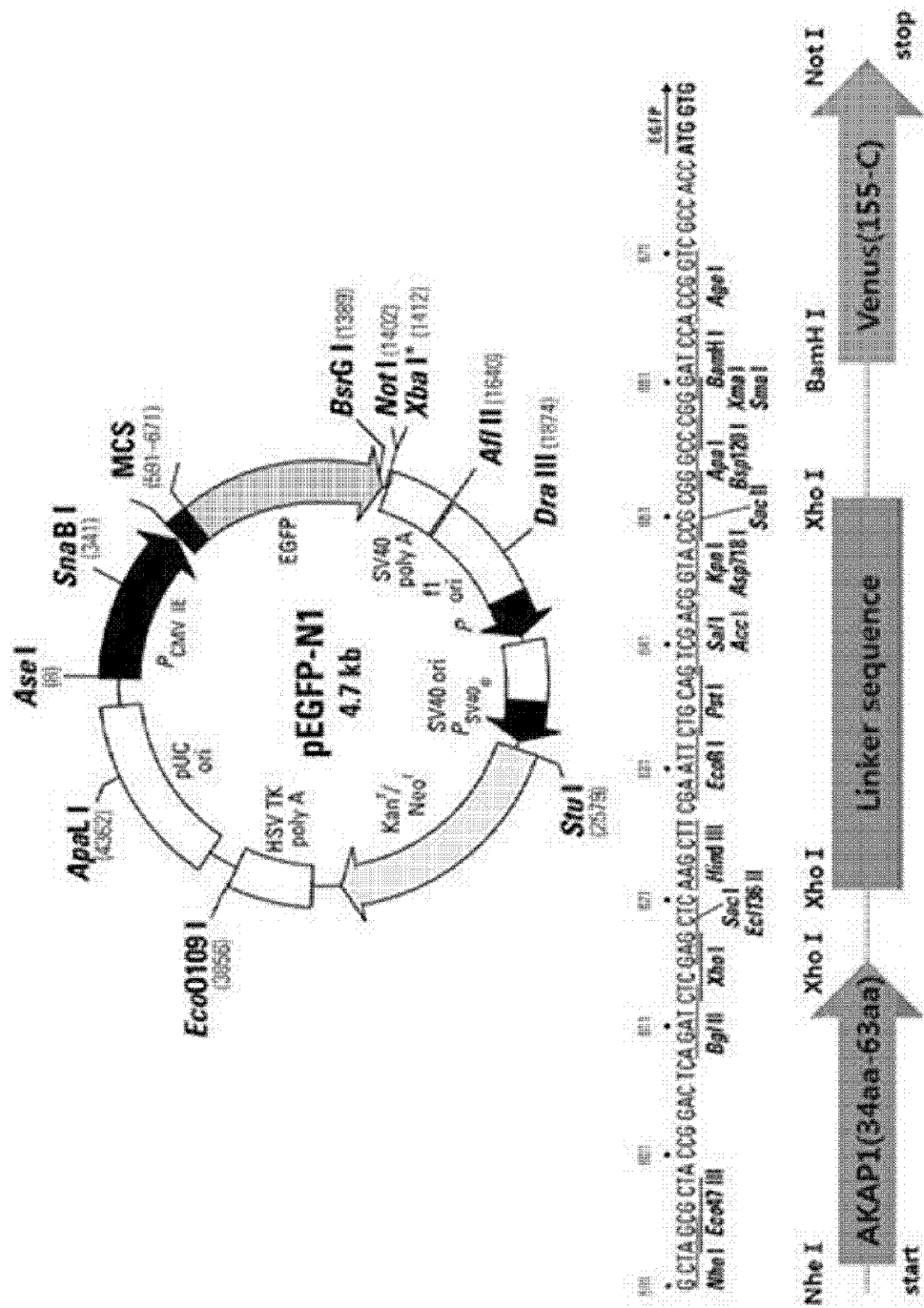
[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6a]



pEGFP-N1 vector (4.7kb) → pVenus(155-C)-linker-AKAP1(34aa-63aa) vector (4.4kb)

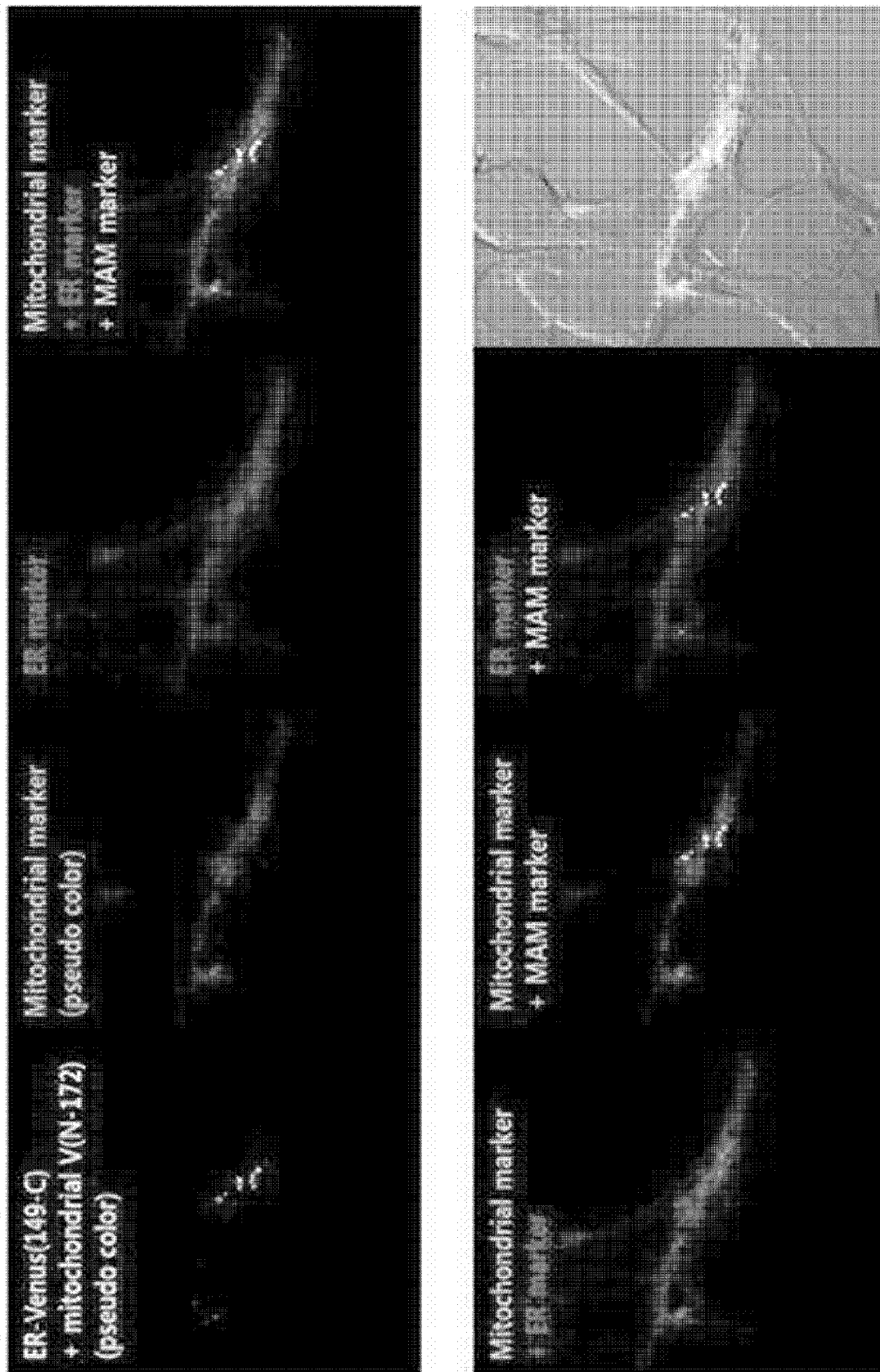
The diagram illustrates the pEGFP-C3 vector and its cloning strategy. The circular map shows the 4.7 kb pEGFP-C3 vector with features: EGFP, MCS (1325-1413), SV40 ori, SV40 ori, Kan<sup>r</sup>, Neo<sup>r</sup>, pUC ori, HSV TK, and poly A. Restriction sites include Ase I (69), SnaB I (341), Nhe I (590), Eco47 III (597), Age I (601), BspG I (1323), Mlu I (1638), Dra III (1968), Stu I (2573), Eco0109 I (3850), and Hsu I (3850). The linear map shows the cloning strategy: Venus(N-172) (Age I, Bgl II, Xho I) is inserted into the pEGFP-C3 vector (BamH I, EcoR I) to create a pVenus(N-172)-linker-MFN1 vector (6.8 kb). The linear map also shows the cloning strategy for the pVenus(N-172)-linker-MFN1 vector (6.8 kb) using Age I, Bgl II, Xho I, and Kpn I sites.

pEGFP-C3 vector (0.47kb) → pVenus(N-172)-linker-MFN1 vector (0.68kb)

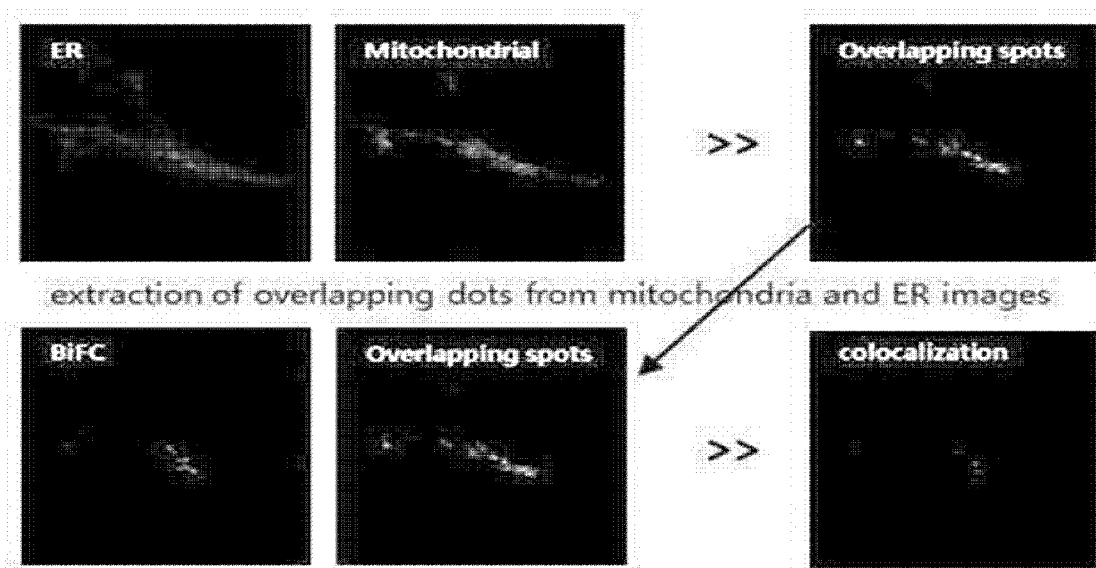


pEGFP-C3 vector (약 4.7kb) → pVenus(N-172)-linker-SAC1(521aa-587aa) vector (약 4.5kb)  
pEGFP-C3 vector (약 4.7kb) → pVenus(149-C)-linker-SAC1(521aa-587aa) vector (약 4.6kb)

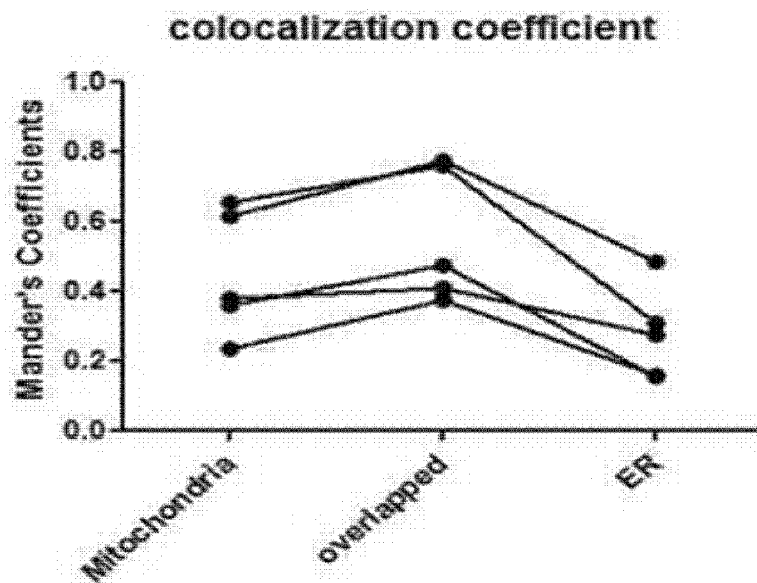
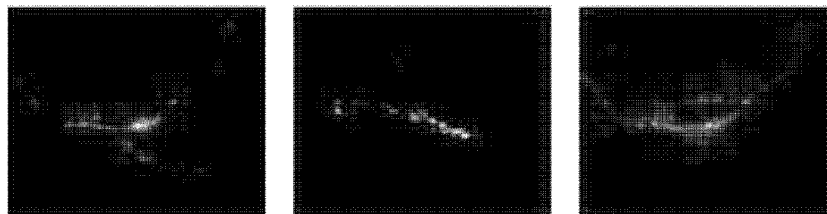
[Fig. 7a]



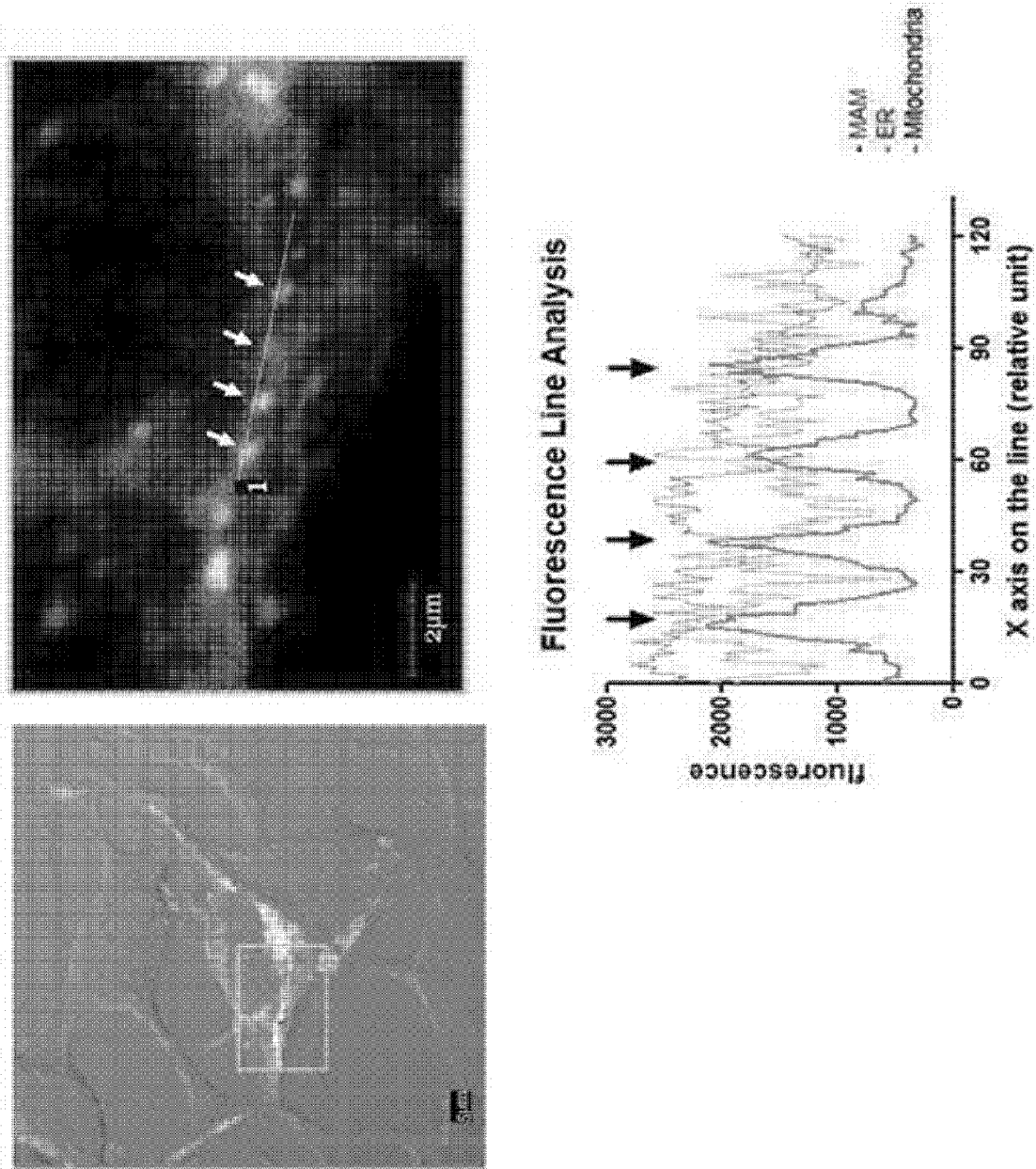
[Fig. 7b]



Colocalization analysis with its BiFC image



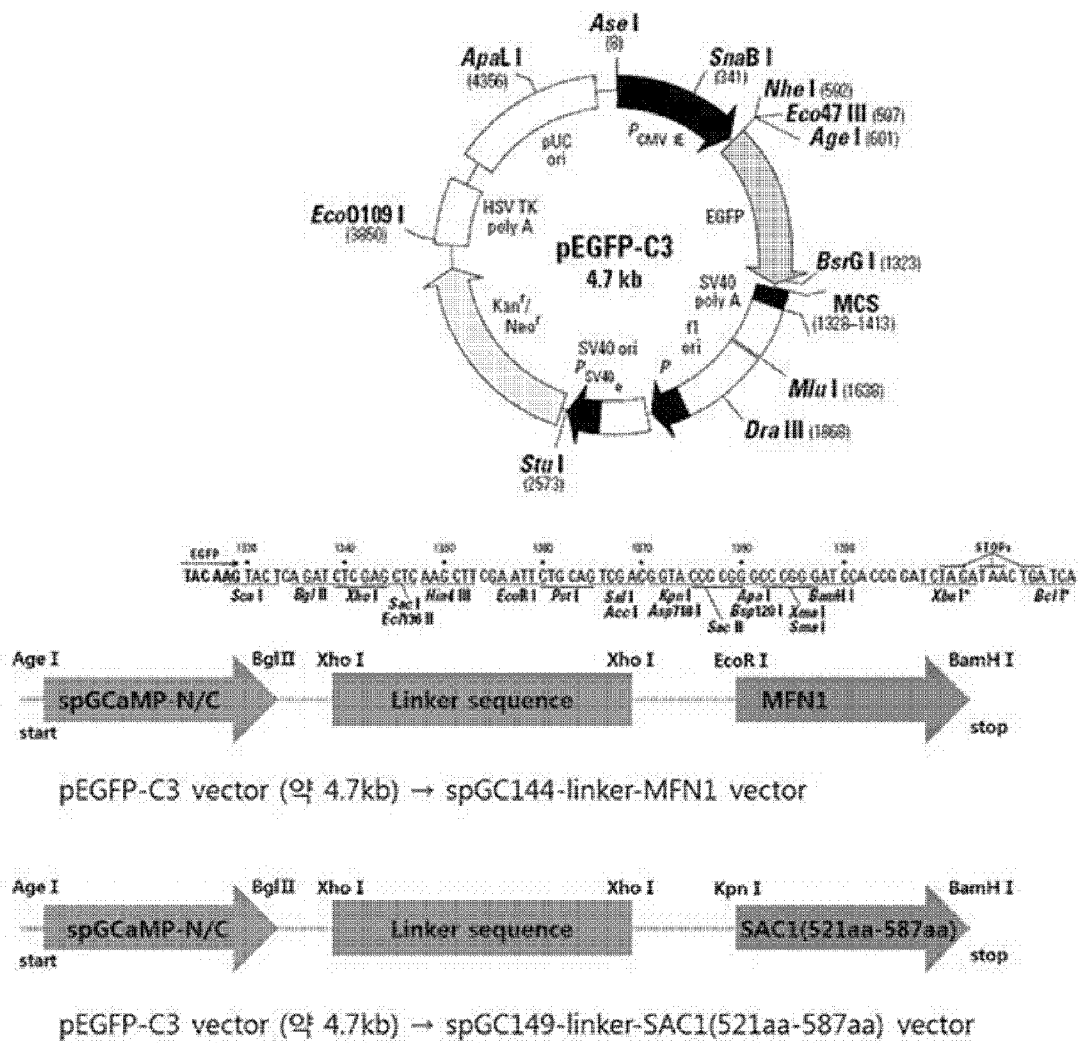
[Fig. 7c]



[illegible]

pEGFP-N1 vector (약 4.7kb) → AKAP1(34aa-63aa)-linker-spGC144- vector

[Fig. 8b]



[Fig. 9]

