

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 7월 29일 (29.07.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/085101 A2

- (51) 국제특허분류:
C12N 9/20 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/000396
- (22) 국제출원일: 2010년 1월 21일 (21.01.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0005749 2009년 1월 22일 (22.01.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **서울대학교 산학협력단 (SNU R & DB FOUNDATION)** [KR/KR]; 서울시 관악구 봉천동 산 4-2, 151-818 Seoul (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **조현선 (JO, Hyun Sun)** [KR/KR]; 서울특별시 관악구 낙성대동 서울대학교 관악사 가족생활동 932 동 404 호, 151-057 Seoul (KR). **심지원 (SHIM, Ji Won)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 정자동 한솔마을 청구아파트 115 동 1701 호, 463-010 Gyeonggi-do (KR). **김재범 (KIM, Jae Bum)** [KR/KR]; 서울특별시 서초구 서초동 1531-6 예림아파트 301 호, 137-070 Seoul (KR). **이준호 (LEE,**

Jun Ho) [KR/KR]; 서울특별시 강남구 도곡동 타워펠리스 G 동 1108 호, 135-270 Seoul (KR).

(74) 대리인: **윤여강 (YOON, Yuh-Gang)**; 서울시 관악구 낙성대동 856-5 디오슈페리움 1 단지 B 동 307 호, 151-848 Seoul (KR).

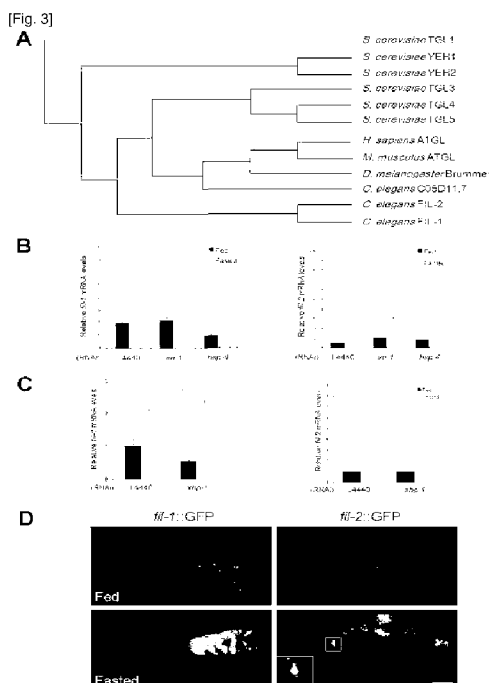
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (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, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL LIPASES INDUCED BY FASTING

(54) 발명의 명칭 : 금식에 의해 유도되는 신규한 리파아제



(57) Abstract: The present invention relates to novel lipases induced by fasting, genes encoding the same, and recombinant vectors comprising the novel lipases. The lipase according to the present invention can be useful in all industrial fields such as foods, detergents, precision chemistry, cosmetics, and environmental materials.

(57) 요약서: 본 발명은 금식(fasting)에 의해 유도되는 신규한 리파아제 및 이를 암호화하는 유전자, 그리고 상기 신규한 리파아제를 포함하고 있는 제조합벡터에 관한 것이다. 본 발명에 따른 리파아제는 식품, 세제, 정밀화학, 화장품 및 환경소재공업 등 산업 전반에 걸쳐서 이용될 수 있다.



BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, — 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))
SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를
별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 금식에 의해 유도되는 신규한 리파아제 기술분야

- [1] 본 발명은 금식(fasting)에 의해 유도되는 신규한 리파아제 및 이를 암호화하는 유전자, 그리고 상기 신규한 리파아제를 포함하고 있는 제조합백터에 관한 것이다.

배경기술

- [2] ER은 단백질의 프로세싱 뿐 아니라, 글리코젠, 지방, 및 다른 거대분자들의 생산 및 저장과 관련된 특수화된 세포소기관이다. 접히지 않은 단백질 반응(unfolded protein response, UPR)은 세포의 다양한 변화로부터 기인하는 잘 알려진 ER 내 반응이다. 단백질을 적절히 접히게 하는 세포 능력의 손상 또는 스트레스 환경으로 인해 잘못 접히거나 접히지 않은 단백질들이 축적되면 ER의 부담을 최소화하기 위해 UPR 반응이 일어난다(Ron and Walter, 2007). UPR 과정 동안, IRE1 ('이노시톨-요구 막관통 키나아제 및 엔도뉴클리에이즈 1(inositol-requiring transmembrane kinase and endonuclease 1)'이라고도 함.), PERK, 및 ATF6 의 3개의 주된 조절인자(regulator)들이 ER 샤페론, ERAD 구성물 및 번역감쇄(translational attenuation) 유도를 조절하기 위하여 활성화된다(Kaufman, 1999; Mori et al., 2000; Patil and Walter, 2001). 이들 조절인자들은 ER 스트레스가 없을 때 ER막 상에 존재하는 샤페론의 하나인 BiP와 결합하고, BiP와 해리함으로써 활성화 과정을 빠르게 진행하며, ER 스트레스 하에서 잘못 접힌 단백질들과 우선적으로 결합한다(Calfon et al., 2002; Tirasophon et al., 1998; Wang et al., 1998). 흥미롭게도, 최근의 연구들은 UPR 조절인자의 하나인 IRE1이 UPR 외에 다른 기능에도 관련이 있음을 시사한다. IRE1은, 막 및 분비 단백질들을 암호화하는 것들을 포함하여, 광범위한 분해 표적 mRNA들을 갖고 있다(Hollien and Weissman, 2006). IRE1은 그것의 표적유전자들을 조절하고, 채장 베타 세포들에서 BiP로부터 분리되지 않고 인슐린 생합성에 관여하기 위해 높은 글루코스 농도에서 활성화된다(Lipson et al., 2006).
- [3]
- [4] ER이 지질대사에 중요하다는 증거들 역시 계속해서 축적되고 있다(Gregor and Hotamisligil, 2007; Ron and Walter, 2007). 예를 들면, 고지방의 영양을 섭취한 마우스는 간 및 지방 조직에서 증가된 ER 스트레스를 보였다(Ozcan et al., 2004). 이는 ER이 그러한 식이요법에 의해 유발된 대사변화들을 매개하는데 있어 핵심적인 세포소기관임을 나타낸다. 추가로, 세포지질방울(cellular lipid droplet)들은 동력학적으로 세포질을 통해 이동하고, ER과 상호작용한다(Miyanari et al., 2007). 가장 최근에, IRE1-매개 UPR의 핵심적인 전사 조절인자인 XBP1은 간의 지방생성에 중요한 역할을 한다는 것이

보고되었다(Lee et al., 2008). 이러한 결과들은 ER 단백질들이 지질 대사와 관련있다는 사실을 시사한다. 하지만, 어떻게 ER이 영양변화에 대응해서 지질 항상성에 관여하는지는 대체로 알려진 바가 없다.

[5]

[6] *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) 는 지질대사를 포함한 몸 전체의 에너지 항상성을 연구하는데 훌륭한 유전적 모델로 알려져 왔다(McKay et al., 2003). 포유동물들은 지방 저장고로 아디포사이트(adipocytes)가 있지만, *C. elegans* 는 독점적인 조직이나 세포를 갖고 있지 않다. 대신에, *C. elegans* 는 지방을 장 세포에서 지방방울의 형태로 저장한다. *C. elegans* 는 투명한 몸체를 갖고 있으므로, 지방방울들은 수단 블랙(Sudan black) 또는 나일 레드(Nile red) 염료들로 염색함으로써 직접적으로 볼 수 있다(McKay et al., 2003; Van Gilst et al., 2005b). 이들 염료들은 살아있는 벌레들에서 지방방울들을 쉽게 볼 수 있게 함으로써, 지질 조절의 유전적 분석을 매우 용이하게 한다. 이러한 장점들을 이용하여, 유전체 수준의 접근법은 *C. elegans*에서 지질의 흡수, 운반, 보관 및 이용을 위한 핵심적인 조절네트워크를 성공적으로 밝혔다(Ashrafi et al., 2003). 하지만, *C. elegans* 또는 다른 모델생물을 사용한 연구들은 ER 및 영양상태 의존적 지질대사 간의 뚜렷한 상관관계를 보이지는 못하였다.

[7]

[8] 이에 본 발명자들은 *C. elegans* 를 모델시스템으로 하여, ER 및 그것과 관련된 단백질들이 영양의 변화에 따라 지질대사를 조절하는지 알아보았다. 주요한 UPR 경로의 유전자들과 지방대사 유전자들은 *C. elegans*에서 보존되어 있기 때문에(Harding et al., 1999; Liu et al., 2000; Sood et al., 2000; Van Gilst et al., 2005b), 지방대사와 같은 세포생리학의 기본적인 측면들을 조절하는 ER의 기능이 진화적으로 보존되어 있음을 알 수 있다. 이에 본 발명자들은 선충의 IRE1 및 BiP와 각각 상동성이 있는 IRE-1 및 HSP-4가 영양상태의 변화를 인식하고, *C. elegans*에서 운동성에 필요한 에너지 요구를 충족시키기 위하여, 유도성 리파아제 FIL-1 및 FIL-2의 발현을 자극한다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명은 금식(fasting)에 의해 유도되는 신규한 리파아제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[10] 본 발명은 금식에 의해 유도되는 신규한 리파아제를 암호화하는 유전자 서열을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[11] 본 발명은 상기 신규한 리파아제를 암호화하는 유전자가 포함된 재조합벡터를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명에 따른 신규한 리파아제는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 가진 신규한 리파아제이다.
- [13] 본 발명에 따른 신규한 리파아제 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자 서열이고, 보다 구체적으로 서열번호 3 또는 서열번호 4의 핵산 서열을 가지는 유전자이다.
- [14] 본 발명에 따른 재조합 벡터는 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자 서열을 포함하는 재조합벡터이고, 보다 구체적으로 서열번호 3 또는 서열번호 4의 핵산 서열을 가지는 재조합벡터이다.

발명의 효과

- [15] 본 발명에 따른 리파아제는 신규한 리파아제이고, 지방 과립구의 분해와 관련이 있어 비만 치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다. 또한 식품, 세제, 정밀화학, 화장품 및 환경소재공업등 산업 전반에 걸쳐서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 *C. elegans ire-1* 이 단기간의 금식에 의한 지방과립 분해를 매개한다는 것을 보여준다. (A) 단기간의 금식은 지방과립 분해를 유도한다. 왼쪽 패널은 각각 섭식(Fed)하거나 24시간 동안 금식한(24 h Fasted) 벌레들이다. 오른쪽 패널은 나일 레드 형광을 정량화한 것이다. 스케일바는 50 μm 를 나타낸다. (B) UPR 유전자들의 녹다운 후 금식-유도 지방과립 분해의 시간대별 형질 분석. 상단 패널은 먹이가 없는 12시간 동안의 장내 지방 함량을 나일 레드로 가시화하여 보여준다. 이미지들은 동일한 노출시간으로 찍었다. 스케일바는 50 μm 를 나타낸다. 하단은 OpenLab (Improvision Inc.) 소프트웨어로 측정된 나일 레드 염색의 상대적인 강도를 보여준다. 별표시(Asterisk)는 통계적 유의성($p < 0.01$)을 나타낸다. (C) 섭식 또는 8시간 금식한 WT 및 *ire-1 RNAi* 동물들 각각에서 트라이글리세라이드 양의 비교. 별표시(Asterisk)는 통계적 유의성($p < 0.01$)을 나타낸다. (D) 금식 8시간 후의 지방과립의 공초점 이미지(confocal image). 금식 8시간 후에 지방과립의 수 및 크기는 대조구 *RNAi* (상단 패널)에서는 급격히 감소하였으나, *ire-1 RNAi* (하단 패널)에서는 큰 변화가 관찰되지 않는다. 스케일바는 15 μm 를 나타낸다.
- [17]
- [18] 도 2는 *xbp-1*이 아니라 *hsp-4*가 금식-유도 지방과립 분해에 필수적임을 보여준다. (A) *hsp-4*의 녹다운 후 금식 12시간 동안의 금식-유도 지방과립 분해의 시간대별 형질 분석. 모든 이미지들은 동일한 노출조건으로 찍었다. 하단 패널은 상대적인 나일 레드 강도를 보여준다. 별표시는 $p < 0.01$ 를 나타낸다. (B) 금식 8시간 후의 *hsp-4 (gk514)* 돌연변이 동물의 나일 레드 염색. 좌측 패널은 나일 레드 형광의 현미경 사진이고, 우측 패널은 OpenLab 소프트웨어로 측정된 정량적 데이터이다. (C) *xbp-1* 녹다운 후, 금식 12시간 동안의 금식-유도 지방과립 분해의 시간대별 형질분석. (D) 금식은 *xbp-1* mRNA의 스플라이싱을 유도하지

않았다. 금식이 아니라 튜니카마이신(tunicamycin)에 의해 유발된 전형적인 ER 스트레스가 *xbp-1* 의 스플라이싱을 유도한다.

[19]

[20] 도 3은 *fil-1* 및 *fil-2* 가 그 발현이 *ire-1* 및 *hsp-4*에 의존적인 금식-유도 리파아제를 암호한다는 것을 보여준다. (A) FIL-1 및 FIL-2의 계통분석. FIL-1 및 FIL-2는 서로간에 가장 유사성이 높다. C05D11.7는 *C. elegans*에서 또다른 잠정적 ATGL 호모로그(homolog)이나, 본 발명의 실험에서 금식에 의해 유도되지 않았다(표 2). (B) *ire-1* 및 *hsp-4* RNAi 벌레들에서 금식 6시간 후의 *fil-1* 및 *fil-2* mRNA의 상대적 양. 정량적 실시간 PCR을 독립적으로 3번 실시하였다. (C) 금식-유도 *fil-1* 및 *fil-2* 발현은 *xbp-1*과는 독립적이다. *fil-1* 및 *fil-2*는 *xbp-1* (RNAi) 배경(background)의 존재하에서도 금식에 의해 상향조절(upregulation)되었다. (D) 금식 전후에 있어 FIL-1 및 FIL-2의 발현 양상. FIL-1 및 FIL-2는 장에서만 금식에 의해 유도되었다. 하단 우측 패널의 입구는 지방방울에서 FIL-2의 위치(localization)를 보여준다. 스케일바는 25 μ m를 나타낸다.

[21]

[22] 도 4는 *fil-1* 및 *fil-2* 가 지방과립 분해에 필요충분하다는 것을 보여준다. (A) 금식 6시간 후 *fil-1* 및/또는 *fil-2* RNAi 벌레들에서 지방과립의 공초점 이미지. 좌측 패널들은 섭식상태(Fed)이고; 우측 패널들은 금식상태(Fasted)이다. (B) *act-5* 프로모터의 조절 하에 FIL-1 및 FIL-2 발현은 WT, *hsp-4(gk514)* 돌연변이, 및 *ire-1*(RNAi) 동물들에서 지방과립 분해를 유도하기에 충분하다. 좌측패널은 WT 동물을 보여준다. 가운데 및 우측패널은 각각 *hsp-4(gk514)* 및 *ire-1*(RNAi) 동물들을 나타낸다. A 및 B의 하단 패널은 결과들의 정량화이다. 숫자들은 금식 후 나일 레드 형광의 감소 퍼센트(percentage)를 나타낸다. 스케일바는 25 μ m를 나타낸다.

[23]

[24] 도 5는 금식환경에서 IRE-1/HSP-4-의존적 지방과립 가수분해가 운동성에 미치는 영향을 보여준다. (A) 액체배지에서 굽힘 비율(bending rates)에 의해 측정된 벌레들의 운동성 측정. (B) 먹이 고갈 후의 산소소비율 측정. 그래프는 금식 전 및 금식 후 8시간 동안의 WT, *ire-1(v33)* 및 *hsp-4(gk514)* 동물들의 계산된 몸 전체의 산소 소비율을 나타낸다. 별표시는 $p < 0.01$ 을 나타낸다. (C) *ire-1* 및 *hsp-4* 돌연변이 동물들에서 5 mM 글루코스에 의한 굽힘 비율 회복의 정량화. 별표시는 $p < 0.05$ 의 통계적 유의성을, 이중 별표시는, $p < 0.1$ 을 나타낸다. (D) 5 mM 글루코스의 배지내 첨가에 의한 *ire-1(v33)* 및 *hsp-4(gk514)* 돌연변이들의 금식-유발 운동성 결함의 회복. 패널들은 다음 조건에서 30초간 이동한 WT, *ire-1* 및 *hsp-4* 벌레들의 스냅샷을 보여준다: 섭식(fed), 8시간 금식(fasted), 및 8시간 금식 후의 글루코스 보충(glucose). 별표시는 측정을 위해 벌레들을 처음 위치시켰던 곳을 나타낸다. *hsp-4(gk514)* 동물들에 대한 하단

패널의 화살표는 처음 위치가 화면범위에서 벗어났음을 나타낸다.

[25]

[26] 도 6은 섭식 또는 8시간 금식한 WT 및 *ire-1* RNAi 동물에서 자유 지방산들(A) 및 글리세롤(B)의 상대적인 양을 나타낸다. 별표시는 통계적 유의성($p < 0.05$)을 나타낸다.

[27]

[28] 도 7은 금식 전 및 금식 8시간 후의 *ire-1* (*v33*) 돌연변이들의 나일 레드 염색을 나타낸다. 금식 전에 알 수 없는 이유로 *ire-1* (*v33*) 돌연변이 동물들의 장내 루멘(lumen)에서 나일 레드 염색이 나타나기는 하지만, 금식 후에 장내 지방과립들은 실제로 변하지 않은 채로 남아 있다. 스케일바는 50 μ m를 나타낸다.

[29]

[30] 도 8은 지방 생합성과 관련 있는 유전자들의 실시간 PCR 분석이다. 대부분의 유전자들의 발현수준은 금식에 의해 많이 영향받지 않는 반면에, *fat-7*의 발현은 금식에 의해 억제되었다. 하지만, *fat-7*은 *fat-5* 및 *fat-6*와 중복적이므로, 이러한 억제는 전체적인 지방 함량에 영향을 미칠 것 같지 않다.

[31]

[32] 도 9는 마이크로어레이 실험에서 금식 동안 적어도 두배의 상향조절(upregulation)을 나타낸 지방대사와 관련된 유전자들의 실시간 PCR 분석이다. *fil-1* 및 *fil-2*의 결과들이 주요 도면에 나와 있다. *acs-2*, *cpt-3*, 및 *gei-7*은 금식에 의해 유도되나, 그들의 유도는 *ire-1*와는 독립적이다.

[33]

[34] 도 10은 FIL-1에 대한 시험관내(in vitro)리파아제 측정결과이다. While GST 단백질 단독으로는 어떠한 리파아제 활성화도 보이지 않았으나, GST-융합 FIL-1은 박테리아에서 상당한 리파아제 활성을 보였다.

[35]

[36] 도 11은 섭식 또는 8시간 금식한 L4440, *fil-1* 및 *fil-2* RNAi 동물들 각각에서 트라이글리세라이드(triglyceride)의 양을 나타낸다. 별표시는 통계적 유의성 ($p < 0.05$)을 나타낸다.

[37]

[38] 도 12는 WT, *ire-1*, 및 *hsp-4* 돌연변이 동물들간에 전체적인 외양의 차이를 보여준다. WT 동물들은 금식에 따른 지방과립의 소모로 인해 ‘투명한’ 반면, *ire-1* 및 *hsp-4* 돌연변이는 지방방울 가수분해의 결핍으로 인해 ‘어둡게’ 남아 있다.

[39]

[40] 도 13은 *ire-1* 및 *hsp-4* 돌연변이 동물들에서, 5 mM 글루코스, 5 mM 디옥시-글루코스, 및 5mM 소비톨(sorbitol)에 의한 굵힘 비율의 회복을 보여준다. WT 동물들을 음성 대조구로 사용하였다. 별표시는 통계적 유의성($p < 0.05$)을

나타낸다.

[41]

[42] 도 14는 *nhr-49*, *sbp-1*, *daf-16*, *cbp-1*, *crh-1*, *skn-1*, 및 *lpd-2* RNAi 동물들에서 8시간 금식 후에 *fil-1* (A) 및 *fil-2* (B) mRNA 의 상대적인 양을 나타낸다. 실시간 Q-PCR 을 독립적으로 3번 수행하였다. (C) 8시간 금식 후 *cbp-1* RNAi 동물의 나일 레드 염색. 금식한 *cbp-1* RNAi 동물은 장내에서 지방과립의 감소를 보이지 않았다.

[43]

[44] 도 15는 발현벡터 L4440의 개열지도를 보인다.

[45]

발명의 실시를 위한 형태

[46] 본 발명의 제 1 의 실현 형태는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 리파아제이다. 리파아제(lipase, glycerol ester hydrolases)란 다양한 범위의 수용성 혹은 비수용성 카르복실산 에스테르(carboxylic acid ester)나 아마이드(amide)의 가수분해 혹은 합성을 촉매하는 효소를 말하며 가수분해 (hydrolysis), 알콜분해(alcoholysis), 산 분해 (acidolysis), 에스테르화(esterification), 아미노분해(aminolysis) 등과 같이 다양한 생물 촉매 반응에 관여하고, 수용액 상태에서 뿐 아니라 유기 용매에서도 활성을 유지하고, 촉매반응 과정에 별도의 보조인자(cofactor)를 필요로 하지 않고, 다양한 기질에 대해 기질 특이성을 나타내고, 광학이성질체중 어느 한쪽에 대해서만 활성을 나타내는 이성질체 선택성을 가지고 있어 산업적 응용성이 높은 효소 중의 하나이다. 현재까지 많은 종류의 동물, 식물, 미생물이 리파아제를 생산하는 것으로 알려졌으며, 리파아제의 생화학적 특성에 대한 연구, 리파아제 유전자를 확보하기 위한 연구가 진행되고 있으며, 특히 식품, 세제, 정밀화학, 화장품 및 환경소재공업등 산업 전반에 걸쳐서 리파아제를 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[47] 의약품을 비롯한 부가가치가 높은 선도물질을 합성하는 정밀화학분야에서,

[48] 기존의 화학적인 방법으로 에스테르화합물을 합성하는 경우, 고온과 고압에서 합성

[49] 되기 때문에 에너지가 많이 소모되며 품질에 나쁜 영향을 주는 여러 가지 부반응이

[50] 일어날 뿐 아니라, 전환율 및 특정 광학이성체의 순도가 낮아서 고순도의 정밀화학

[51] 제품 생산에 어려움이 있어 왔다. 최근에는 이러한 문제점을 보완하기 위해서, 위

[52] 치특이성과 광학활성 특이성을 나타내는 리파아제를 생촉매로 사용하는 반응이 활발히 연구되고 있다.

[53] 또한, 리파아제는 지방 성분의 때를 물에 잘 녹는 지방산 또는 글리세롤로

가수분해시켜 계면활성제의 작용을 용이하게 해주는 기능이 있어 세제, 표백제의 첨가제로 연구되어져 왔지만, 현재까지 사용실적이 미미한 상태이다. 이는 낮은 세정 온도에서 리파아제의 활성이 떨어지는 단점으로 인해, 지방이나 유지성분이 불량하게 혹은 불완전하게 제거되기 때문이다. 본 발명에 따른 리파아제는 신규한 서열을 가진 리파아제로서 산업의 여러 분야에서 사용이 될 수 있다. 본 발명에 따라 제공되는 리파아제는 현재 당업자의 유전자 조작 기술에 의하여 아미노산 서열에 변형이 가능하다. 따라서 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2에 따른 리파아제를 기초로 하여서 실질적으로 리파아제의 활성을 가지면서 서열의 변화가 가능하다. 리파아제에 대한 연구를 통하여 리파아제의 활성에 직접인 영향을 주지 않는 부분에 대한 결실, 치환, 부가, 전좌 등이 가능하며 이와 같이 변형된 리파아제도 본 발명의 범주에 들어가는 것이다. 보다 구체적으로 서열번호 1 및 서열번호 2와 85% 이상 유사한 서열을 포함하는 리파아제, 보다 상세하게는 90% 이상 유사한 리파아제, 보다 더 상세하게는 95% 이상 유사한 리파아제, 보다 더욱 더 상세하게는 99% 이상 유사한 리파아제가 본 발명의 리파아제와 실질적으로 동일한 작용효과를 가지는 한 본 발명의 범주안에 포함된다. 이를 본 발명의 리파아제와 "기능적 동등물"이라고 부른다. 기능적 동등물은 효소 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 상기 효소 기능을 유지하는 것 모두를 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 리파아제 및 에스테라제 효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 다만 종래의 공지된 리파아제를 본 발명의 범주에 포함하려는 것은 아니다.

[54]

[55] 본 발명의 제 2의 실현 형태는 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 리파아제를 암호화하는 유전자 서열이다. 보다 구체적으로 서열번호 3 또는 서열번호 4의 핵산서열을 가지는 유전자 서열이다. 본 발명에 따라 제공되는 리파아제 핵산 서열은 코돈의 축퇴성에 의해 다양한 형태의 유전자 서열이 있을 수 있다. "코돈 축퇴성"이란 상기 자연 발생의 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 자연 발생의 리파아제와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 암호화하는 모든 핵산서열을 의미한다. 따라서 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 리파아제 또는 이의 기능적 동등물을 암호화 하는 유전자 서열은 본 발명의 범주에 속한다.

[56]

[57] 본 발명의 제 3의 실현 형태는 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 리파아제를 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터이다. 본 발명에서 사용되는 벡터라는 용어는 또다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를

의미한다. 본 발명의 재조합 벡터는 발현 벡터일 수 있으며, 발현벡터란 상기 벡터에 의해 운반되는 각 재조합형 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 합성시킬 수 있는 플라스미드, 코스미드 또는 파아지를 포함한다. 바람직한 벡터는 그것이 결합된 핵산을 자기 복제 및 발현시킬 수 있는 벡터일 수 있다.

[58]

[59] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 자세히 설명한다. 그러나 본 발명의 실시예는 본 발명의 권리범위를 한정하는 것이 아니며, 본 발명의 권리범위는 청구범위에 의하여 정하여진다.

[60]

[61] (실시예 1)

[62] 벌레 균주 및 배양

[63] 본 발명에 사용된 야생형 *C. elegans* 는 Bristol strain N2 (Brenner, 1974)이다. N2 및 돌연변이들은 NGM 플레이트에서 20°C 로 키웠다. *ire-1(v33)* 및 *hsp-4(gk514)* 돌연변이 균주들은 CGC (Minneapolis, MN)로부터 얻었다.

[64]

[65] 형질전환 균주의 제조

[66] *fil-1* 및 *fil-2* 를 장내에서 일정하게 발현시키기 위하여, *fil-1* 및 *fil-2* cDNA를 *act-5* 유전자의 상위(upstream) 2kb 프로모터와 융합시키고, pPD95.77 벡터에 서브클론하였다. *fil-1* cDNA, *fil-2* cDNA 및 *act-5* 프로모터 단편들은 각각 *fil-1* cDNA-1(서열번호 5), *fil-1* cDNA-2 프라이머(서열번호 6), *fil-2* cDNA-1(서열번호 7), *fil-2* cDNA-2 프라이머(서열번호 8), 및 *act-5* pro-1(서열번호 9), *act-5* pro-2 프라이머(서열번호 10)를 사용하여 증폭시켰다(서열번호 11 내지 14는 벡터상에서 *fil-1* 및 *fil-2*를 증폭시키기 위한 서열이다). 발현 연구를 위해 *fil-1* 및 *fil-2*의 프로모터 및 ORF를 각각 *fil-1* geno-1(서열번호 15), *fil-1* geno-2(서열번호 16) 및 *fil-2* geno-1(서열번호 17), *fil-2* geno-2 프라이머(서열번호 18)로 GFP리포터 플라스미드에 클로닝하였다.

[67]

[68] RNAi 섭취 실험 방법

[69] *fil-1* 및 *fil-2* 를 암호화하는 cDNA를 각각 *fil-1* RNAi-1(서열번호 19), *fil-1* RNAi-2 프라이머(서열번호 20) 및 *fil-2* RNAi-1(서열번호 21), *fil-2* RNAi-2 프라이머(서열번호 22)를 사용하여 cDNA 라이브러리로부터 PCR로 증폭하였다. 증폭된 cDNA를 박테리아 발현벡터 L4440(pPD129.36; 서열번호 25)에 클로닝하였다(도 15). 이중 RNAi 구축물을 만들기 위해, *fil-2* cDNA를 이미 *fil-1* cDNA를 갖고 있는 벡터 L4440(pPD129.36)에 융합시켰다. *ire-1*, *atf-6*, *xbp-1*, *hsp-4* 및 *pek-1* RNAi 를 위해, MRC (Cambridge, UK)로부터 구입한 RNAi 라이브러리를 사용하였다. 애벌레를 얻기 위해 벌레들을 포백하였다. L4 기에 이를 때까지 동기의(synchronized) 벌레들을 RNAi 플레이트에서 배양하였다. RNAi의 효율은 적절한 PCR 프라이머들을 사용하여 실시간 Q-PCR로

확인하였다.

[70]

[71] 나일 레드 염색 및 형광 밀도 정량

[72] 나일 레드 파우더(Nile red powder) (N3013, Sigma) 를 아세톤에 500 $\mu\text{g/ml}$ 로 녹였다. 나일 레드 스톡(stock) 용액을 기술했던 바와 같이 1X PBS에서 최종농도 0.05 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석시켰다(Ashrafi et al., 2003). 벌레들을 고정시키기 전에, 희석한 나일 레드 용액을 이미 OP50 또는 RNAi 박테리아를 도입한 NGM 플레이트의 상부에 첨가하였다. 동기의 애벌레들이 분화하였고, 그들의 염색 표현형질을 L4 기에서 조사하였다. 나일 레드 형광은 AxioPlan II (Zeiss) 현미경 및 Confocal LSM510 system (Zeiss) 을 사용하여 관찰하였다. 이미지들은 로다민(rhodamine) 필터(emission 560 ~ 590 nm)가 있는 AxioCam 카메라를 사용하여 얻었다. 모든 이미지들은 동일한 세팅 및 노출시간을 사용하여 얻었다. 나일 레드의 형광 강도를 정량화하기 위해 Open lab software (Improvision Inc.) 를 이용하였다. 벌레 몸체의 동일한 부분들을 선별하고, 그 부분에서 염색방울들의 강도를 벌레마다 3번씩 측정하였다. 10개 이상의 벌레들의 형광 강도의 평균을 계산하였다.

[73]

[74] 금식(Fasting) 분석

[75] 종래 알려진 방법으로 표백된 벌레들을 준비하였다(Van Gilst et al., 2005a). OP50 박테리아(bacteria)를 포함한 NGM 플레이트 또는 HT115 박테리아를 포함하는 RNAi 플레이트의 어느 하나에서 동기의 벌레들을 L4 기까지 키웠다. 벌레들을 얻은 후, M9 버퍼로 강하게 씻고 OP50이 없는 NGM 또는 HT115가 없는 RNAi 플레이트에 12시간 동안 두었다(Van Gilst et al., 2005a). 나일 레드 염색 및 RNA 시료의 준비를 위해 4시간마다 벌레들을 수집하였다.

[76]

[77] 산소 소비율 분석

[78] 분당 산소소비량을 측정하기 위해, 동기의 N2, *ire-1(v33)* 및 *hsp-4(gk514)* 벌레들을 NGM Lite 배지에서 L4 기까지 배양하였다. 금식 샘플을 만들기 위해 절반의 벌레들을 빈 NGM Lite 배지에서 8시간 동안 획득 및 배양시켰다. 벌레들을 측정 직전에 획득하고, 산소-포화 M9 버퍼에서 배양시킨 후, 산소 수준을 종래 알려진 방법으로 각 샘플마다 5회 이상 측정하였다(Braeckman et al., 2002). 산소소비율을 Clark 타입 전극센서, YSI 5300A oxygen monitor (YSI Corporation)로 모니터하였다. 단백질 함량은 BCA 방법으로 측정하고, 산소소비율을 평균화하는데 이용하였으며, 이것은 단백질 mg당 시간당 상대적인 $\text{O}_2 \mu\text{mol}$ 로 계산되었다.

[79]

[80] 금식 동안의 이동성 시험 및 글루코스 회복 분석

[81] Bristol N2, *ire-1(v33)* 및 *hsp-4(gk514)* 벌레들은 종래 보고된 바와 같이 싱크로나이즈시켰고(Van Gilst et al., 2005a) NGM Lite 플레이트에서 번식했다.

L4 기에 이른 후, 벌레들을 S-basal 로 획득하고 OP50 박테리아를 제거하기 위해 강하게 씻었다. 각각의 군주는 20 ml S-basal 버퍼와 함께 50 ml 플라스크에 옮기고, 셰이킹 인큐베이터에서 20°C로 배양하였다. 굶힘정도(bending rate)를 측정하기 위해 매 2시간마다 벌레가 있는 1 ml 의 배양액을 24-웰 조직배양디시(tissue culture dish)의 웰에 피펫팅하였다. 금식 동물의 운동성을 측정하기 위해, 액체 배지에서 벌레들의 분당 몸 굶힘을 세었다(Janiesch et al., 2007). 금식 벌레들의 에너지 수준을 회복하기 위하여, D-글루코스 파우더(G7021, Sigma)를 S-basal 에 100 mM로 녹였다. 글루코스를 8시간 금식한 벌레들을 포함한 S-basal 에 최종농도 5 mM로 녹였다(Schulz et al., 2007). 8시간 금식 벌레들에 대해 5mM 글루코스를 2 ~ 3 시간 동안 다시 섭식시켰다. 사진은 동일한 세팅의 Sony 디지털카메라로 찍었으며 동작파일들은 Dimis-M optical system (Siwon Optical technology, Korea)을 이용하여 캡처하였다.

[82]

[83] 전체 트리아실글리세롤 정량 분석

[84] L1-기 동물들의 동기(synchronous) 개체군을 얻기 위하여, 알(Egg)들을 상술한대로 준비하고 M9 버퍼에서 밤새 부화하도록 하였다. 그 후 선충들을 *E. coli* OP50으로 덮힌 NGM 플레이트에 옮겨 L4기까지 키웠고, 금식검정(starvation assay)을 수행하였다. 선충을 액체 질소에서 신선하게 얼리고, 더 처리될 때까지 -80°C에서 보관하였다. 약 30 mg 선충들의 무게를 재고, 질소-냉각 막자사발에서 250 μ l 의 냉각 포스페이트 버퍼와 함께 갈았다. 용해물을 깨끗하게 하기 위해 추출물들을 12,000 x g 로 7분간 원심분리하였다. 지방 함량은 종래 보고된 바와 같이 상용화된 트라이글리세라이드(triglyceride) 측정키트(Biovision Inc.)로 측정하였고(Ristow et al., 2000), 동물들의 그람 무게단위로 평균화하였다. 각각의 처리조건 및 정해진 시간마다, 적어도 3개의 독립적으로 생성된 생물학적 시료들을 얻었고, 각각의 시료마다 중복된 용해물들을 준비하고 준비된 각 용해물마다 중복측정을 하였다.

[85]

[86] 마이크로 어레이 및 정량적 실시간 PCR 분석

[87] 동기의(synchronized) L4 벌레들은 상술한 금식검정 프로토콜을 사용하여 잘 섭식한 것과 6 시간 금식 시료로 나누어진다. RNA는 Trizol 시약(Invitrogen) 을 이용한 냉동법(freeze-thaw method)으로 추출하고 RNeasy 미니 키트 (Qiagen)를 사용하여 정제하였다. 모든 마이크로어레이 실험에 *C. elegans* Affymetrix 칩을 사용하였다(www.affymetrix.com). 마이크로어레이 데이터를 확인하기 위하여, 정량적 실시간 PCR 실험을 수행하였다. 생산자의 프로토콜에 따라 트리졸 시약(Invitrogen)으로 총 RNA를 추출하였다. cDNA는 랜덤 헥사머(random hexamer)를 사용하여 RevertAid M-MuLV 역전사효소(Fermentas, Canada)로 합성하였고, 유전자 특이적 프라이머들 및 MyIQ real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories)에 의한 SYBR Green I (BioWhittaker Molecular Applications) 을

사용하여 PCR 증폭시켰다. 상대적인 mRNA 양을 *C. elegans act-1/3* mRNA에 대해 표준화시킨 후 계산하였다.

[88]

[89] 전체 자유 지방산 및 글리세롤 정량 분석

[90] L1-기의 동기 개체군 동물들을 얻기 위해 알들을 준비하고 M9 버퍼에서 밤새 부화시켰다. 그 후 선충을 *E. coli* OP50으로 덮힌 NGM 플레이트에 옮긴 후, L4 기까지 키우고, 금식검정을 하였다. 선충들은 액체 질소에서 신선하게 얼리고 더 처리할 때까지 -80°C에 저장하였다. 약 30 mg의 선충의 무게를 재고, 질소-냉각 막자사발에서 250 µl의 냉각 포스페이트 버퍼와 함께 갈았다. 용해물을 깨끗하게 하기 위해 추출물들을 12,000 x g로 7분간 원심분리하였다. 자유지방산(Roche), 및 글리세롤(Sigma) 함량은 종래 보고된 바와 같이 상용화된 측정키트(Biovision Inc.)로 측정하였고(Ristow et al., 2000), BCA법으로 측정된 단백질 함량에 대해 평균화하였다. 각각의 처리조건 및 정해진 시간마다, 적어도 2개의 독립적으로 생성된 생물학적 시료들을 얻었고, 각각의 시료마다 중복된 용해물들을 준비하고 준비된 각 용해물마다 중복측정을 하였다.

[91]

[92] **FIL-1 리파아제 활성 분석**

[93] Furukawa et al. (Furukawa et al., 1982)에 기술된 방법에 기초하여 실험하였다. 반응들은 사용자 매뉴얼을 따랐다. 반응들은 다양한 양의 *E. coli* 재조합 단백질의 첨가에 따라 37 °C에서 수행되었다. 20분의 배양 후에, 반응은 2 ml 아세톤의 첨가로 중지시켰고, 흡광도를 412 nm에서 Tecan 분광광도계 (USA)를 이용하여 측정하였다. 지방분해 활성을 계산하기 위하여 반응 부피의 차이를 고려하였다. 지방분해 활성을 나타내는 1 단위(unit)는 실험조건 하에서 분당가수분해된 1 mmol의 기질을 의미한다.

[94]

[95] ***C. elegans xbp-1* 전사체의 스플라이스된 형태의 측정**

[96] 생산자의 프로토콜에 따라 트리졸 시약 (Invitrogen)으로 총 RNA를 추출하였다. cDNA는 랜덤 헥사머(random hexamer)를 사용하여 RevertAid M-MuLV 역전사효소(Fermentas, Canada)로 합성하였고, 유전자 특이적 프라이머들 및 MyIQ real-time PCR detection system (Bio-Rad Laboratories)에 의한 SYBR Green I (BioWhittaker Molecular Applications)을 사용하여 PCR 증폭시켰다. 상대적인 mRNA 양을 *C. elegans act-1/3* mRNA에 대해 표준화시킨 후 계산하였다.

[97] *xbp-1* 스플라이싱에 대한 프라이머는 다음과 같다;

[98] F 프라이머: GCCTTTGAATCAGCAGTGGGAACAG (서열번호 23) 및

[99] R 프라이머: TTCACGCGTTTCTGAAGATG (서열번호 24)

[100]

[101] **결과**[102] 단기간 금식 동안에 *C. elegans ire-1*에 의한 지방 과립 분해 중재

[103] 포유동물과 마찬가지로, *C. elegans* 도 금식동안에 활발하게 저장된 지방과립을 소비한다(McKay et al., 2003; Van Gilst et al., 2005b). 본 발명자들은 동기화(synchronized) L4 동물들에서 (24시간 내의) 단기의 금식은 저장된 장내 지방방울들의 양을 매우 감소시킨다는 사실을 일관되게 관찰하였다(도 1A). 이에 나아가 특히 UPR과 관련된 ER 단백질들이 지방과립 이동과 관련된 것인지 알아보기 위하여, 본 발명자들은 3개의 핵심적인 UPR 인식(sensing) 구성성분인 *ire-1*, *atf-6* 및 *pek-1*의 녹다운이 금식의존적 지방과립 분해에 미치는 영향을 조사하였다(Shen et al., 2001, Harding et al., 1999). 본 발명자들은, 대조구 RNAi 박테리아를 공급한, 금식한 야생형(WT) 벌레들은 금식동안 그것들의 저장된 지방과립을 이용한다는 것을 발견하였다. 하지만, *ire-1* RNAi 를 처리한 금식 벌레들에서는 지방과립의 수준이 감소되지 않았다(도 1B). 전체 트라이글리세라이드(TG)의 수준은 야생형 동물들에서 약 50% 감소한 반면에, *ire-1* 녹다운 동물들에서는 같은 조건하에서 약 10% 감소하였다(도 1C). 추가로, 야생형 동물들에서는 금식에 의해 자유 지방산(free fatty acid) 및 글리세롤의 총량이 증가한 반면, *ire-1* RNAi 동물들에서는 그렇지 않았다(도 6). WT 동물들과는 달리, *ire-1* 녹다운 동물들에서는 금식동안에 지방과립의 수 및 크기 모두 대체로 변하지 않았다(도 1D). 게다가, 유전자 내 약 0.9kb의 결실부위를 갖는 *ire-1* (v33) 돌연변이(Shen et al., 2001)를 포함하는 동물들은 금식 12시간 후에도 비슷한 수준의 저장된 지방과립을 유지하기도 하였다(도 7). 반면에, *pek-1* 또는 *atf-6* 녹다운 동물들에서는 금식동안에 지방과립 수준이 근소하게 감소하였으며(도 1B), 이는 금식에 의한 지방과립의 분해가 *atf-6* 또는 *pek-1* 이 아닌 *ire-1* 에 의존적임을 시사한다.

[104]

[105] 금식 동안에 금식-유도 지방 과립구의 분해에 *xbp-1* 이 아닌 *hsp-4* 가 필수적이다.

[106] ER에서, IRE-1 은 ER-존재 분자 샤페론의 하나인, BiP에 의해 조절된다(Bertolotti et al., 2000; Kimata et al., 2004). 본 발명자들은 *C. elegans*에서 BiP의 상동유전자의 하나인 HSP-4가 금식에 따른 *ire-1*-매개 조절 지방과립 가수분해에 미치는 영향을 평가하였다. *ire-1* 녹다운 벌레들과 유사하게, *hsp-4* RNAi 동물들 및 *hsp-4(gk514)* 돌연변이 동물들 모두 금식-유도 지방과립 분해를 막았으며(도 2A 및 2B), 이는 금식에 따른 지방대사의 조절에 있어 *hsp-4* 가 *ire-1* 과 유사한 기능이 있음을 암시한다. XBP-1 은 UPR에 있어 잘 알려진 IRE-1의 하위 (downstream) 전사인자(transcription factor)이므로, 본 발명자들은 금식-의존적 지방방울 가수분해에 *xbp-1* 이 필요한지 시험하였다. 도 2C에 도시된 바와 같이, *ire-1* 및 *hsp-4* RNAi 와 달리, *xbp-1* RNAi 는 지방방울의 감소를 방해하지 않았다. 추가로, UPR의 전형적 산물인, *xbp-1* mRNA의 스플라이싱(splicing)은 금식 조건에서 일어나지 않았다(도 2D). 이들을 고려하면, PEK-1 또는 ATF-6가 아니라, IRE-1 및 HSP-4가 *C.elegans*에서

금식-유도 지방과립 가수분해에 결정적인 ER 단백질들이며, 이 역할은 XBP-1과는 무관하다는 것을 알 수 있다.

[107]

[108] ***ire-1* 및 *hsp-4*의 발현에 의존적인 금식-유도 *fil-1* 및 *fil-2* 리파아제의 동정**

[109] *xbp-1*은 *ire-1* 및 *hsp-4*의존적 금식-유도 지방과립 이동과 관련이 없으므로, *ire-1*은 전형적인 UPR 경로와는 다르게 작용할 수 있다. *C. elegans* *ire-1* 및 *hsp-4*가 어떻게 지방과립 가수분해를 조절하는지 알아보기 위하여, 본 발명자들은 WT 금식 동물들에 대해 유전체 수준에서 마이크로어레이(microarray) 분석을 수행하였다. 마이크로어레이 및 Q-PCR로 측정된 결과, 본 발명자들은, *fat-7*을 제외하고(Van Gilst et al., 2005b), 지방생성과 관련된 대부분의 유전자들이 금식으로 인해 mRNA 수준에서 상당한 감소(>2배)를 보이지 않는다는 것을 관찰하였다(표 1, 도 8). *fat-7*은 지방 합성에 대해 *fat-5* 및 *fat-6*와 중복적이다; 따라서, *fat-7*의 단독적인 감소는 전체적인 지질 구성에 영향을 미치지 않을 것으로 보인다(Brock et al., 2006, 2007). 이러한 결과들은 *C. elegans*에서 지방생성 유전자들의 전체적인 발현이 단기의 금식으로 상당히 영향받지는 않음을 시사한다. 그 후 본 발명자들은 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR)로 더 검증하기 위해 금식동안에 적어도 2배의 변화를 보인, 다른 유형의 지질대사(Ashrafi et al., 2003; Van Gilst et al., 2005b)에 관련되어 있는 것으로 추정되는 유전자들을 선별하였다(표 2, 도 9). 흥미롭게도, 본 발명자들은 트라이글리세라이드 가수분해효소(triglyceride hydrolases)로 추정되는, T01C3.4 및 K12B6.3 ("금식-유도 리파아제-1 및 -2" 각각에 대해 *fil-1* 및 *fil-2*로 명명)를 암호화하는 2개의 유전자들이 금식에 대해 *ire-1*-의존적 방식으로 그들의 mRNA 발현수준을 증가시킨다는 것을 발견했다(도 3). FIL-1 및 FIL-2 단백질들 모두 포유동물의 ATGL(Zimmermann et al., 2004), 초파리의 Brummer (Gronke et al., 2005), 및 효모 TGL3 (Athenstaedt and Daum, 2003), TGL4 (Kurat et al., 2006), TGL5 (Athenstaedt and Daum, 2005)와 같은 리파아제 카테고리에 속한다(도 3A). 박테리아에서 발현된 재조합 FIL-1 단백질들을 이용한 생화학적 검정(assay)은 FIL-1이 리파아제 활성을 보인다는 것을 명확히 보여주었다(도 10). 금식-유도 *fil-1* 및 *fil-2* 상향조절(upregulation)이 *ire-1* 또는 *hsp-4*의 억하에 의해 상당히 저해된다는 것은(도 3B) *ire-1* 및 *hsp-4* 모두 금식-유도 *fil-1* 및 *fil-2* 유전자 발현에 필요한 상위 요소(upstream factor)들이라는 것을 나타낸다. 반대로, *xbp-1* RNAi는 금식-유도 *fil-1* 및 *fil-2* 유전자 발현에 영향을 미치지 않았으며(도 3C), 이는 다시 XBP-1이 금식 조건에서 *fil-1* 및 *fil-2*를 통한 지방과립 조절에 관련되어 있지 않다는 것을 나타낸다. 추가로, 본 발명자들은 FIL-1 및 FIL-2 단백질들이 금식에 의해 주로 장내에서 유도된다는 것을 관찰하였다(도 3D).

[110]

[111] **FIL-1 및 FIL-2가 금식-유도 지방과립 가수분해에 필요적이고 충분적이다.**

[112] *fil-1* 및 *fil-2*가 실제로 금식-의존적 지방방울 가수분해에 작용하는지 알아보기

위하여, 본 발명자들은 *fil-1* 또는 *fil-2* 의 어느 하나 또는 두 개 모두를 RNAi 처리한 금식동물에서 저장된 지방과립 수준을 조사하였다. 도 4A 및 도 11에 도시된 바와 같이, 금식-유도 지방방울 가수분해는 전체적이진 않았지만 부분적으로 *fil-1* 또는 *fil-2* 를 억제함으로써 저해되었다. 또한, *fil-1* 및 *fil-2* 유전자 모두 억제함으로써 지방과립의 이용이 거의 완전히 저해되었다. 이것은 *fil-1* 및 *fil-2* 가 금식동안에 지방과립 가수분해에 필요하다는 것을 암시한다. 추가로 *fil-1* 및 *fil-2* 가 기능적인 금식-유도 리파아제임을 확인하기 위하여, *fil-1* 및 *fil-2* 를 *act-5* 프로모터의 조절 하에 장내에서 과발현시켰다(MacQueen et al., 2005). *fil-1* 또는 *fil-2* 리파아제의 장-특이적 과발현은 심지어 먹이의 존재하에서도 WT 벌레들에서 일정한 지방과립 가수분해를 자극하였다(도 4B). 추가로, 본 발명자들은 *fil-1* 및 *fil-2* 의 과발현이 *hsp-4 (gk514)* 돌연변이 및 *ire-1(RNAi)* 동물들의 장내에서 지방과립의 양을 명백히 감소시킴을 관찰하였다(도 4B). 이는 *fil-1* 및 *fil-2* 유전자들이 금식-유도 지방과립 가수분해에 있어서 *ire-1* 및 *hsp-4* 의 하위(downstream)에서 작용함을 암시한다. 따라서, 이러한 결과들은 *fil-1* 및 *fil-2* 가 실제로 그것의 발현이 금식조건 하에서 *ire-1* 및 *hsp-4* 를 통해 자극받는 기능적인 리파아제를 암호화한다는 것을 나타낸다.

[113]

[114] **IRE-1/HSP-4-의존 지방 과립구의 가수분해는 금식동안에 에너지원을 제공한다.**

[115] *ire-1* 및 *hsp-4* 에 의해 조절되는 지방과립 가수분해가 금식중인 벌레에서 몸 전체의 에너지 항상성과 관련이 있는지 알아보기 위하여, 본 발명자들은 WT, *ire-1(v33)*, 및 *hsp-4 (gk514)* 동물들에서 금식이 그들의 형태와 운동성에 미치는 영향을 주의깊게 조사하였다. 벌레들에게 박테리아를 먹였을때, *ire-1(v33)* 및 *hsp-4 (gk514)* 동물들에서 펌핑(pumping) 비율이 WT에 비하여 약간 감소하였지만 통계적으로 유의적인 수준은 아니었다. 금식 동안에, WT 동물들은 거대한 지방과립의 분해로 투명하고 깨끗한 장을 보였으나, *ire-1(v33)* 및 *hsp-4 (gk514)* 동물들은 여전히 많은 양의 지방과립을 장내에 갖고 있었다(도 12). 게다가, *ire-1(v33)* 및 *hsp-4(gk514)* 돌연변이 동물들은 금식에 대해 사실상 무기력한 모습을 보였으며, 이것은 *ire-1 (v33)* 돌연변이에서 더 심각하였다. 운동성 측면에서, WT 동물들은 금식 동안에 다른 흠을 보이지 않았으나, *ire-1* 및 *hsp-4* 돌연변이 동물들은 운동성이 상당히 감소하였다(도 5A). 이러한 결과들은 저장된 지방과립으로부터의 금식-유도 지방연소 및 이용이 WT 동물들의 운동성을 위한 충분한 에너지원이 될 수 있음을 암시한다. 반면에, *ire-1(v33)* 및 *hsp-4(gk514)* 돌연변이 동물들은 *fil-1* 및 *fil-2* 와 같은 금식-유도 장내 리파아제의 불완전한 자극 때문에, 그들의 저장된 지방과립으로부터 에너지를 추출 및/또는 이용하지 못하였다.

[116] 금식한 WT 과 *ire-1* 또는 *hsp-4* 돌연변이 동물들간에 저장 지방과립으로부터 운동성을 위한 에너지를 생성하는 능력에 차이가 있는지 알아보기 위하여, 섭식

및 금식 조건에서 에너지 생성을 위한 미토콘드리아 활성화의 지표인 산소소비율을 측정하였다. 이전의 보고(Bishop and Guarente, 2007)와 일치하여, 산소소비율은 WT 동물들에서 금식에 의해 증가하였다(도 5B). 반면에, *ire-1* 및 *hsp-4* 돌연변이 동물들에서는 상당히 감소하였다(도 5B). 이것은 금식 동안에 운동을 위한 에너지 생성은 *ire-1* 및 *hsp-4*에 의존적임을 암시한다. 반대로, 섭식상태에서 WT, *ire-1*, 및 *hsp-4* 돌연변이 동물들은 유사한 산소소비율을 보였으며(도 5B), 금식 상태에서보다 훨씬 낮았다. 이것은 *ire-1* 및 *hsp-4* 돌연변이 동물들이 섭식상태에서는, 아마도 탄수화물과 같은 다른 에너지를 이용함으로써, WT 동물들과 유사한 정도로 에너지를 생성할 수 있음을 보여준다.

[117]

[118] 보충적인 글루코스는 *ire-1* 및 *Hsp-4* 돌연변이에 의한 지방 과립구 가수분해의 에너지 결핍을 회복시킨다.

[119] *ire-1* 및 *hsp-4* 돌연변이 동물들이 저장된 지방과립으로부터 에너지를 이용하지 못하는지를 명확히 알아보기 위하여, 다른 에너지원인 글루코스를 보충함으로써 금식한 *ire-1* 및 *hsp-4* 동물들의 운동성이 감소되는 것을 막을 수 있는지 조사하였다. WT 동물들에서, 글루코스의 보충은 섭식 또는 금식 조건 모두에서 운동성을 많이 변화시키지 않았다(도 5C 및 5D). 하지만, 글루코스를 *ire-1(v33)* 및 *hsp-4(gk514)* 돌연변이 모두에 처리한 경우 운동성의 마비 및 감소를 상당히 완화시켰다(도 5C 및 5D; Supplementary video clips 1-9). 삼투변화에 대한 대조구로서 디옥시-글루코스(deoxy-glucose), 사용할 수 없는 글루코스 유사체(non-usable glucose analog), 및 소비톨(sorbitol)의 존재 하에 시험해 본 결과, 글루코스 존재하에서와 달리 *ire-1* 및 *hsp-4* 돌연변이들 모두 운동성을 회복하지 못했다(도 13). 따라서, 이러한 결과들은 돌연변이들 모두 저장된 지방과립들이 아니라 글루코스로부터 운동을 위한 에너지를 효과적으로 얻을 수 있다는 강력한 증거가 되며, 이것은 아마도 *fil-1* 및 *fil-2*와 같은 금식-유도 리파아제를 자극하지 못하기 때문일 것이다.

산업상 이용가능성

[120] 본 발명에 따른 리파아제는 신규한 서열을 가진 리파아제로서 산업의 여러 분야에서 사용이 될 수 있다. 리파아제(lipase, glycerol ester hydrolases)는 가수분해(hydrolysis), 알콜분해(alcoholysis), 산 분해(acidolysis), 에스테르화(esterification), 아미노분해(aminolysis) 등과 같이 다양한 생물 촉매 반응에 관여하고, 수용액 상태에서 뿐만 아니라 유기 용매에서도 활성을 유지하고, 촉매반응 과정에 별도의 보조인자(cofactor)를 필요로 하지 않고, 다양한 기질에 대해 기질 특이성을 나타내고, 광학이성질체중 어느 한쪽에 대해서만 활성을 나타내는 이성질체 선택성을 가지고 있어 산업적 응용성이 높은 효소 중의 하나이다. 특히 식품, 세제, 정밀화학, 화장품 및 환경소재공업등 산업 전반에

걸쳐서 리파아제가 이용되고 있다.

[121] 참고문헌

- [122] Anderson, R.G. (2003). Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends in cell biology* 13, 534-539.
- [123] Ashrafi, K., Chang, F.Y., Watts, J.L., Fraser, A.G., Kamath, R.S., Ahringer, J., and Ruvkun, G. (2003). Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421, 268-272.
- [124] Athenstaedt, K., and Daum, G. (2003). YMR313c/TGL3 encodes a novel triacylglycerol lipase located in lipid particles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278, 23317-23323.
- [125] Athenstaedt, K., and Daum, G. (2005). Tgl4p and Tgl5p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *J Biol Chem* 280, 37301-37309.
- [126] Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L.M., Harding, H.P., and Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2, 326-332.
- [127] Bishop, N.A., and Guarente, L. (2007). Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* 447, 545-549.
- [128] Braeckman, B.P., Houthoofd, K., De Vreese, A., and Vanfleteren, J.R. (2002). Assaying metabolic activity in ageing *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* 123, 105-119.
- [129] Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- [130] Brock, T.J., Browse, J., and Watts, J.L. (2006). Genetic regulation of unsaturated fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS genetics* 2, e108.
- [131] Brock, T.J., Browse, J., and Watts, J.L. (2007). Fatty acid desaturation and the regulation of adiposity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 176, 865-875.
- [132] Calton, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., and Ron, D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92-96.
- [133] Eizirik, D.L., Cardozo, A.K., and Cnop, M. (2008). The Role for Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetes Mellitus. *Endocr Rev*.
- [134] Gregor, M.F., and Hotamisligil, G.S. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 48, 1905-1914.
- [135] Gronke, S., Mildner, A., Fellert, S., Tennagels, N., Petry, S., Muller, G., Jackle, H., and Kuhnlein, R.P. (2005). Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab* 1, 323-330.

- [136] Gruninger, T.R., Gualberto, D.G., and Garcia, L.R. (2008). Sensory perception of food and insulin-like signals influence seizure susceptibility. *PLoS genetics* 4, e1000117.
- [137] Harding, H.P., Zhang, Y., and Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 397, 271-274.
- [138] Hollien, J., and Weissman, J.S. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* 313, 104-107.
- [139] Janiesch, P.C., Kim, J., Mouysset, J., Barikbin, R., Lochmuller, H., Cassata, G., Krause, S., and Hoppe, T. (2007). The ubiquitin-selective chaperone CDC-48/p97 links myosin assembly to human myopathy. *Nat Cell Biol* 9, 379-390.
- [140] Kaufman, R.J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 13, 1211-1233.
- [141] Kimata, Y., Oikawa, D., Shimizu, Y., Ishiwata-Kimata, Y., and Kohno, K. (2004). A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. *J Cell Biol* 167, 445-456.
- [142] Kurat, C.F., Natter, K., Petschnigg, J., Wolinski, H., Scheuringer, K., Scholz, H., Zimmermann, R., Leber, R., Zechner, R., and Kohlwein, S.D. (2006). Obese yeast: triglyceride lipolysis is functionally conserved from mammals to yeast. *J Biol Chem* 281, 491-500.
- [143] Lee, A.H., Scapa, E.F., Cohen, D.E., and Glimcher, L.H. (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science* 320, 1492-1496.
- [144] Lipson, K.L., Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Nguyen, L.X., Foss, E., Bortell, R., Rossini, A.A., and Urano, F. (2006). Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab* 4, 245-254.
- [145] Liu, C.Y., Schroder, M., and Kaufman, R.J. (2000). Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275, 24881-24885.
- [146] MacQueen, A.J., Baggett, J.J., Perumov, N., Bauer, R.A., Januszewski, T., Schriefer, L., and Waddle, J.A. (2005). ACT-5 is an essential *Caenorhabditis elegans* actin required for intestinal microvilli formation. *Mol Biol Cell* 16, 3247-3259.
- [147] McKay, R.M., McKay, J.P., Avery, L., and Graff, J.M. (2003). *C elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Dev Cell* 4, 131-142.
- [148] Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., and Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 9, 1089-1097.

- [149] Mori, K., Ogawa, N., Kawahara, T., Yanagi, H., and Yura, T. (2000). mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4660-4665.
- [150] Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., and Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 445-450.
- [151] Ozcan, U., Cao, Q., Yilmaz, E., Lee, A.H., Iwakoshi, N.N., Ozdelen, E., Tuncman, G., Gorgun, C., Glimcher, L.H., and Hotamisligil, G.S. (2004). Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* 306, 457-461.
- [152] Ozcan, U., Yilmaz, E., Ozcan, L., Furuhashi, M., Vaillancourt, E., Smith, R.O., Gorgun, C.Z., and Hotamisligil, G.S. (2006). Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 313, 1137-1140.
- [153] Patil, C., and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr Opin Cell Biol* 13, 349-355.
- [154] Ristow, M., Pfister, M.F., Yee, A.J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C.Y., Ueki, K., Michael, M.D., 2nd, Lowell, B.B., and Kahn, C.R. (2000). Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 12239-12243.
- [155] Ron, D., and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 519-529.
- [156] Schulz, T.J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., and Ristow, M. (2007). Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6, 280-293.
- [157] Shen, X., Ellis, R.E., Lee, K., Liu, C.Y., Yang, K., Solomon, A., Yoshida, H., Morimoto, R., Kurnit, D.M., Mori, K., and Kaufman, R.J. (2001). Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for *C. elegans* development. *Cell* 107, 893-903.
- [158] Sood, R., Porter, A.C., Ma, K., Quilliam, L.A., and Wek, R.C. (2000). Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 α kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J* 346 Pt 2, 281-293.
- [159] Tirasophon, W., Welihinda, A.A., and Kaufman, R.J. (1998). A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev* 12, 1812-1824.

- [160] Van Gilst, M.R., Hadjivassiliou, H., Jolly, A., and Yamamoto, K.R. (2005a). Nuclear hormone receptor NHR-49 controls fat consumption and fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS Biol* 3, e53.
- [161] Van Gilst, M.R., Hadjivassiliou, H., and Yamamoto, K.R. (2005b). A *Caenorhabditis elegans* nutrient response system partially dependent on nuclear receptor NHR-49. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13496-13501.
- [162] Wang, X.Z., Harding, H.P., Zhang, Y., Jolicoeur, E.M., Kuroda, M., and Ron, D. (1998). Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J* 17, 5708-5717.
- [163] Zimmermann, R., Strauss, J.G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A., and Zechner, R. (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.
- [164] Furukawa, I., Kurooka, S., Arisue, K., Kohda, K., and Hayashi, C. (1982). Assays of serum lipase by the "BALB-DTNB method" mechanized for use with discrete and continuous-flow analyzers. *Clin Chem* 28, 110-113.
- [165] Ristow, M., Pfister, M.F., Yee, A.J., Schubert, M., Michael, L., Zhang, C.Y., Ueki, K., Michael, M.D., 2nd, Lowell, B.B., and Kahn, C.R. (2000).
- [166] Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12239-12243.

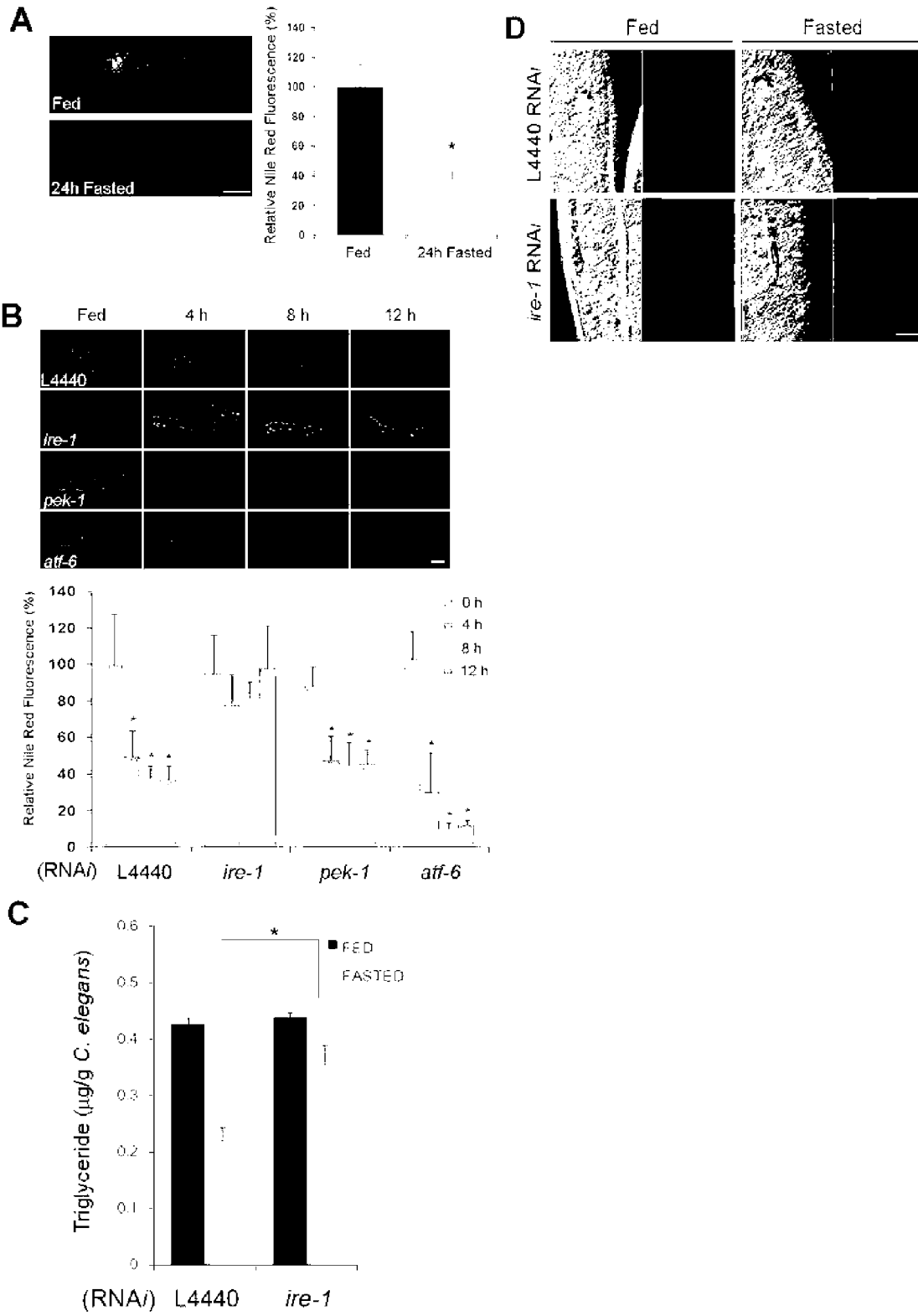
서열목록 Free Text

- [167] 금식에 의해 유도되는 신규한 리파아제에 대한 서열을 포함하고 있다.

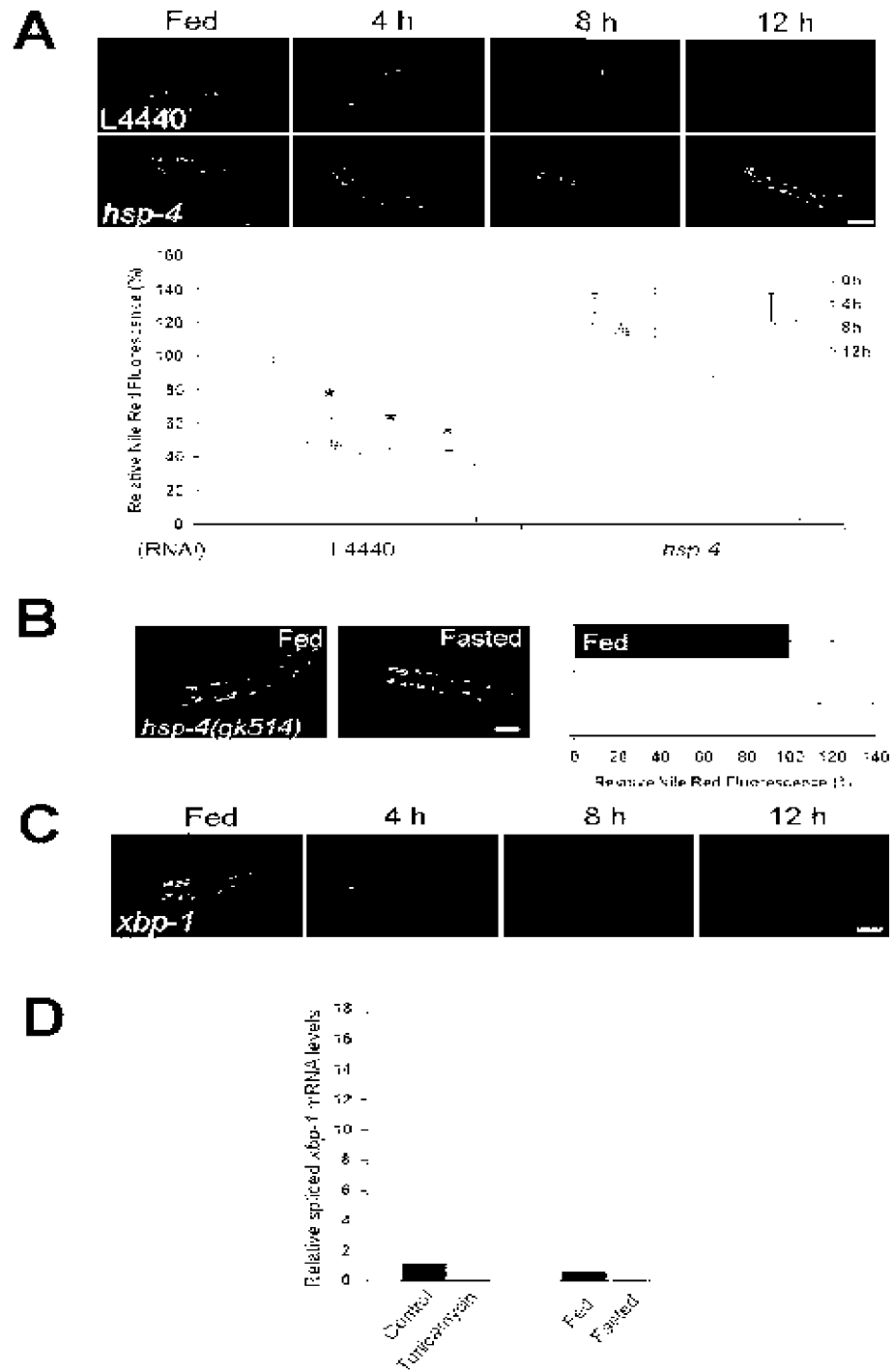
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 리파아제.
- [청구항 2] 서열번호 2의 리파아제.
- [청구항 3] 제 1 항의 리파아제를 암호화하는 리파아제 유전자.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서 상기 유전자는 서열번호 3인 것을 특징으로 하는 리파아제 유전자.
- [청구항 5] 제 2 항의 리파아제를 암호화하는 리파아제 유전자.
- [청구항 6] 제 5 항에 있어서 상기 유전자는 서열번호 4인 것을 특징으로 하는 리파아제 유전자.
- [청구항 7] 제 3 항 또는 제 4 항중 어느 한 항에 따른 리파아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 8] 제 5 항 또는 제 6 항중 어느 한 항에 따른 리파아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

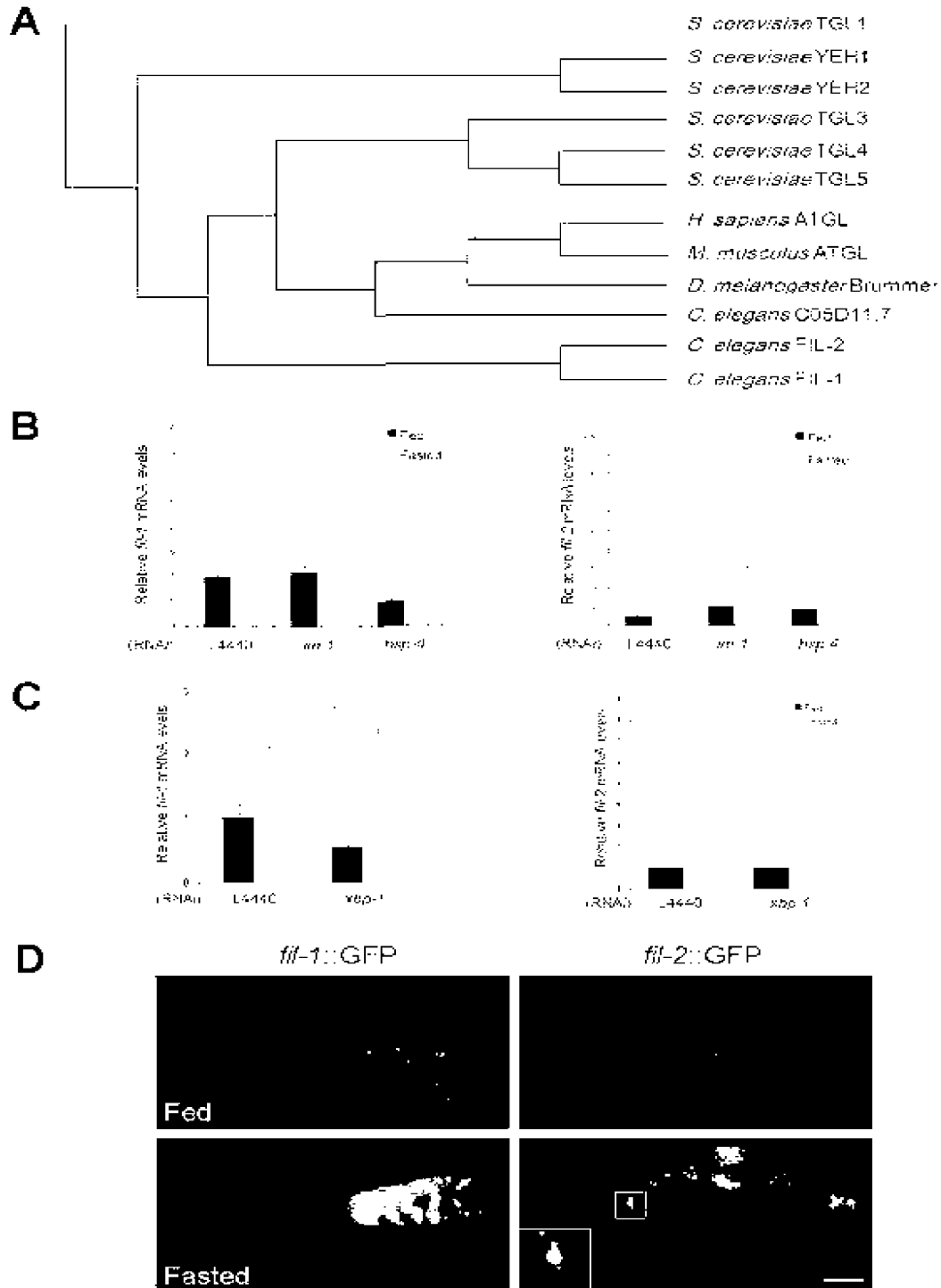
[Fig. 1]



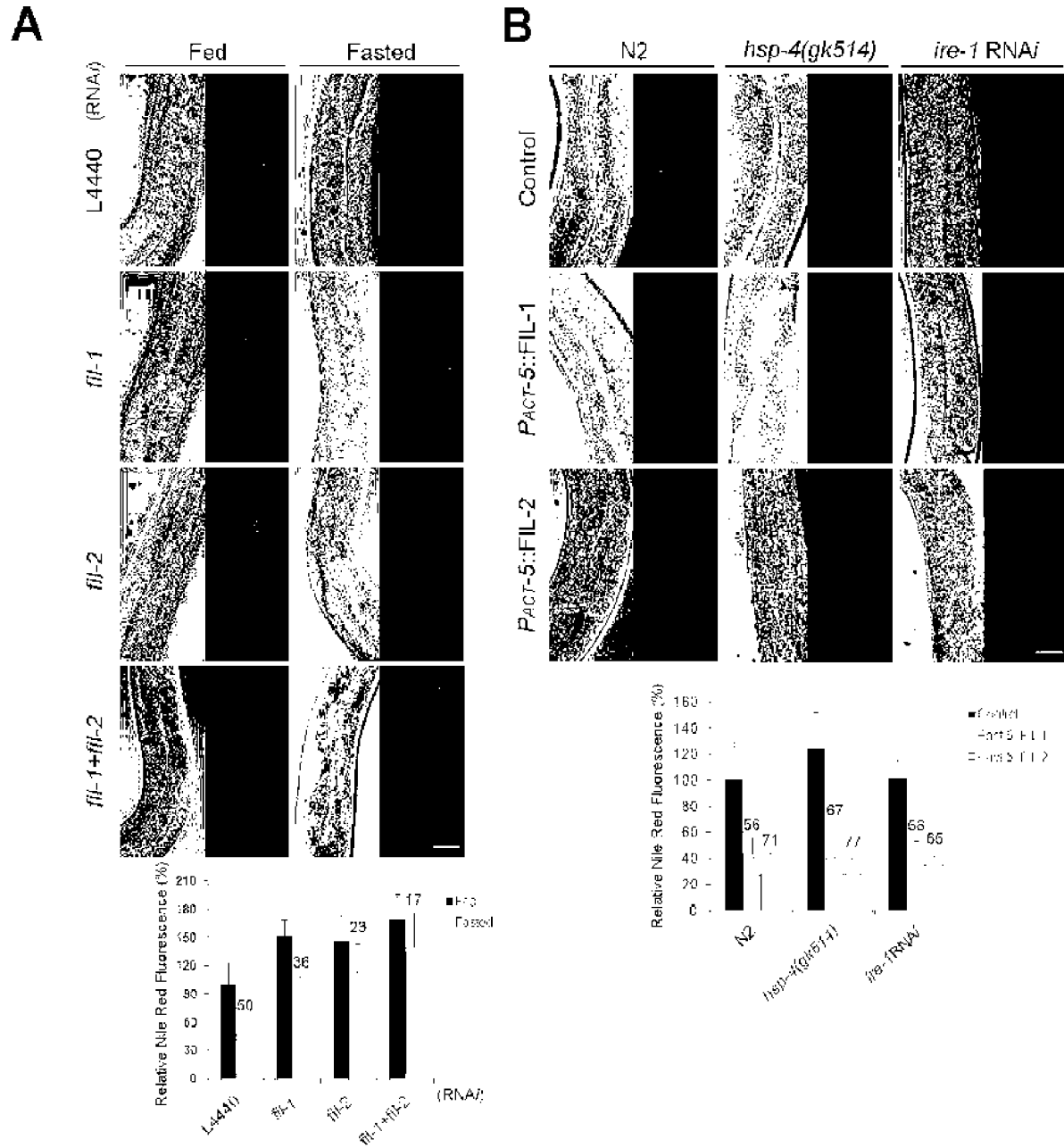
[Fig. 2]



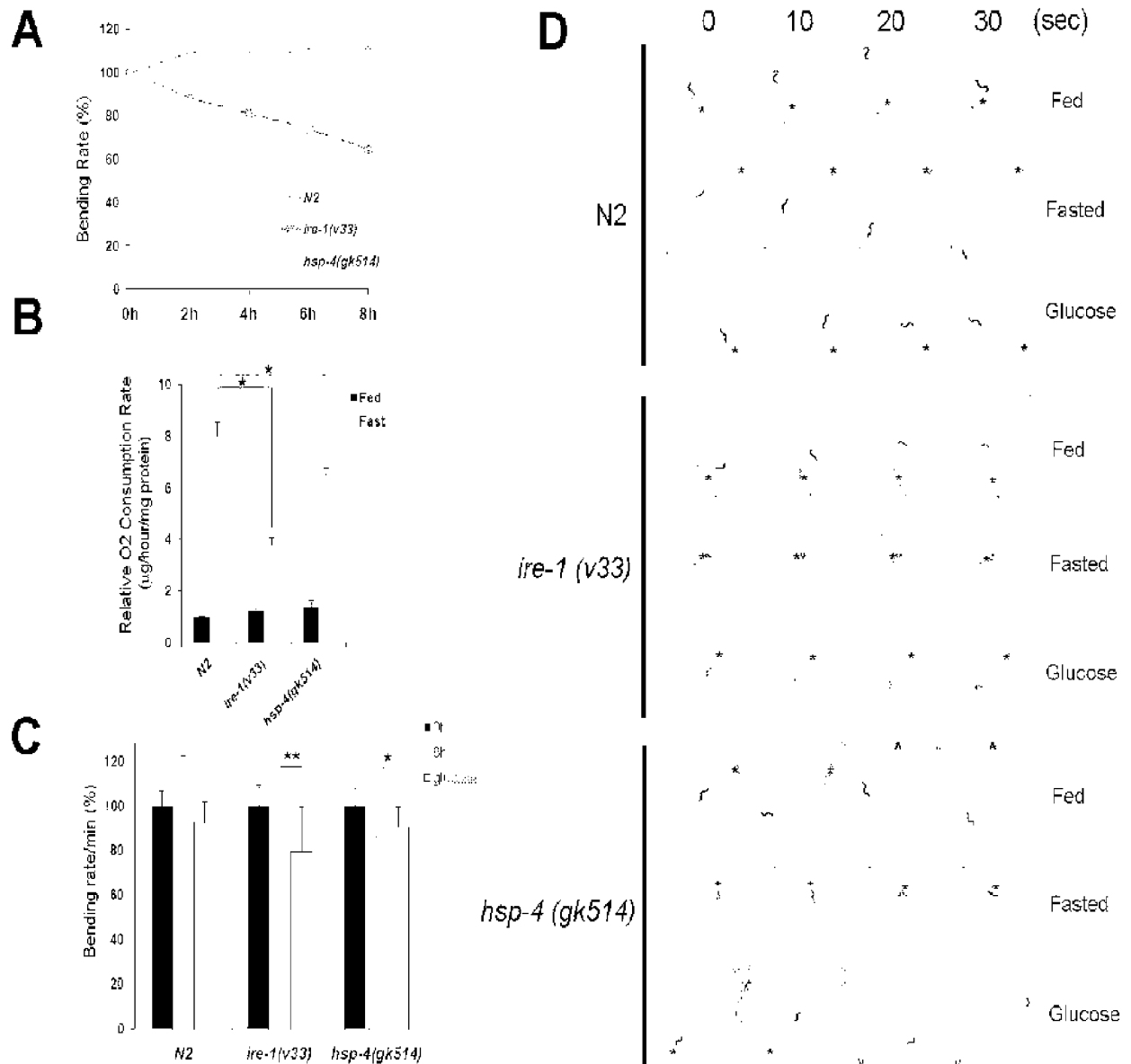
[Fig. 3]



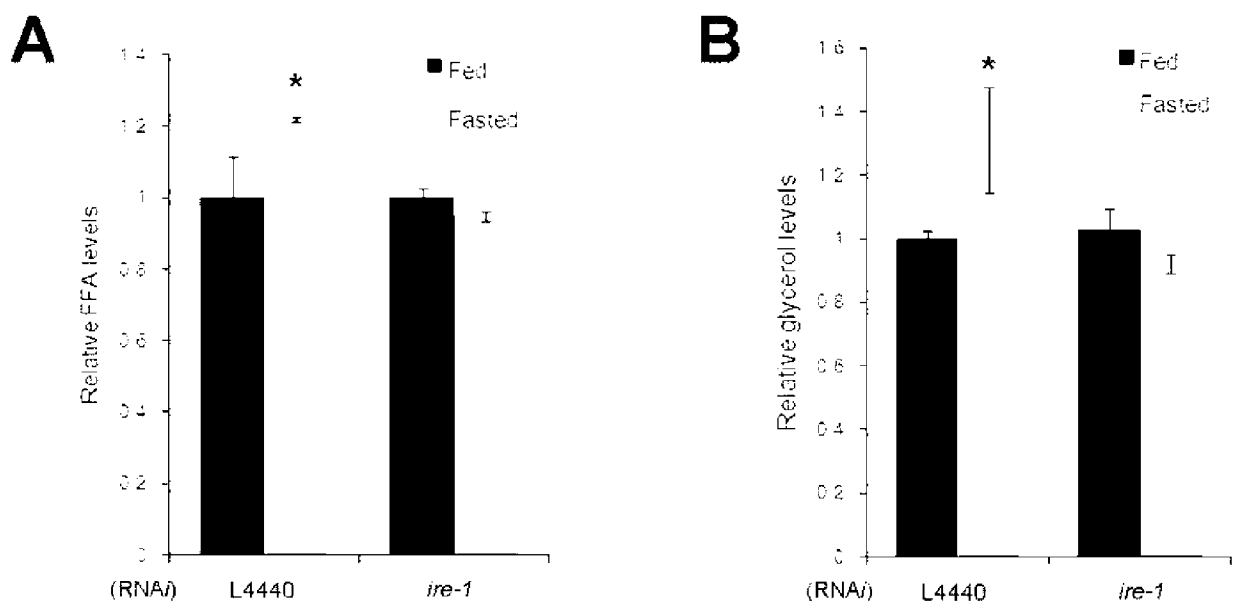
[Fig. 4]



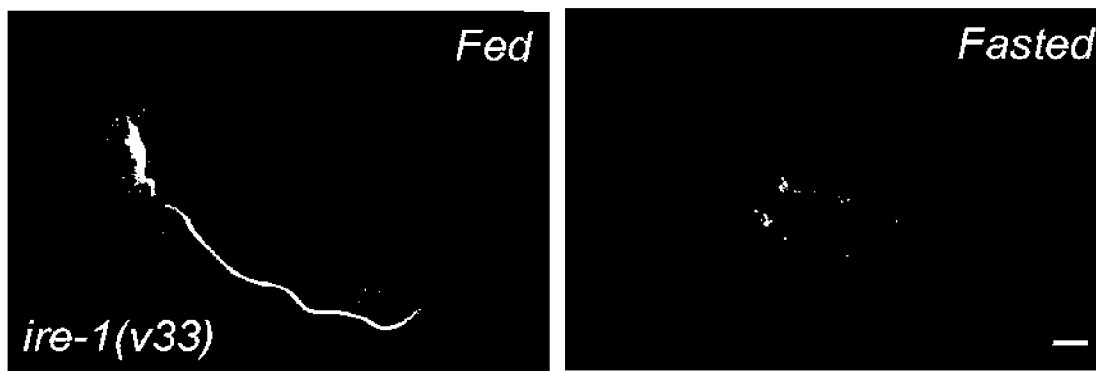
[Fig. 5]



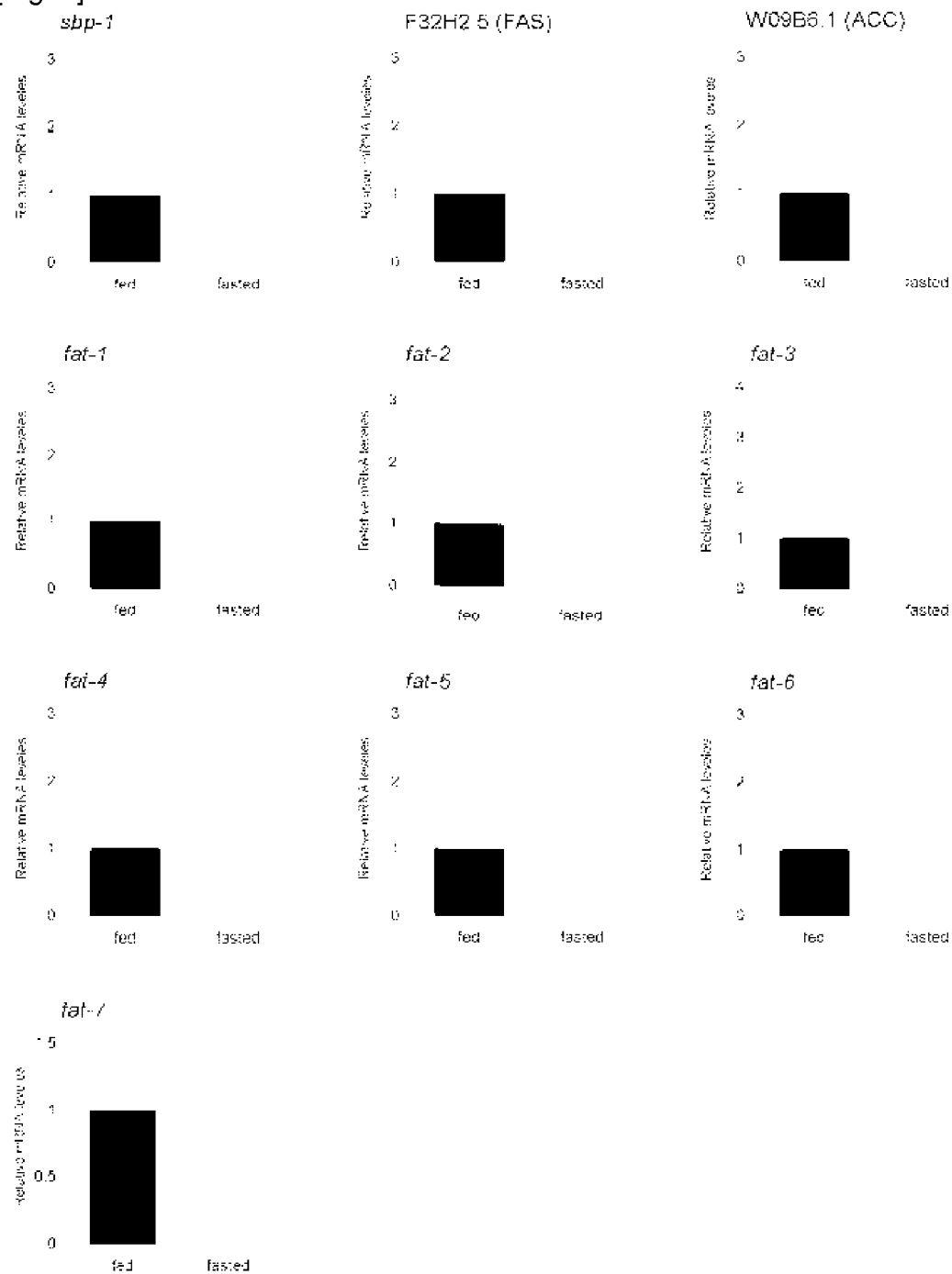
[Fig. 6]



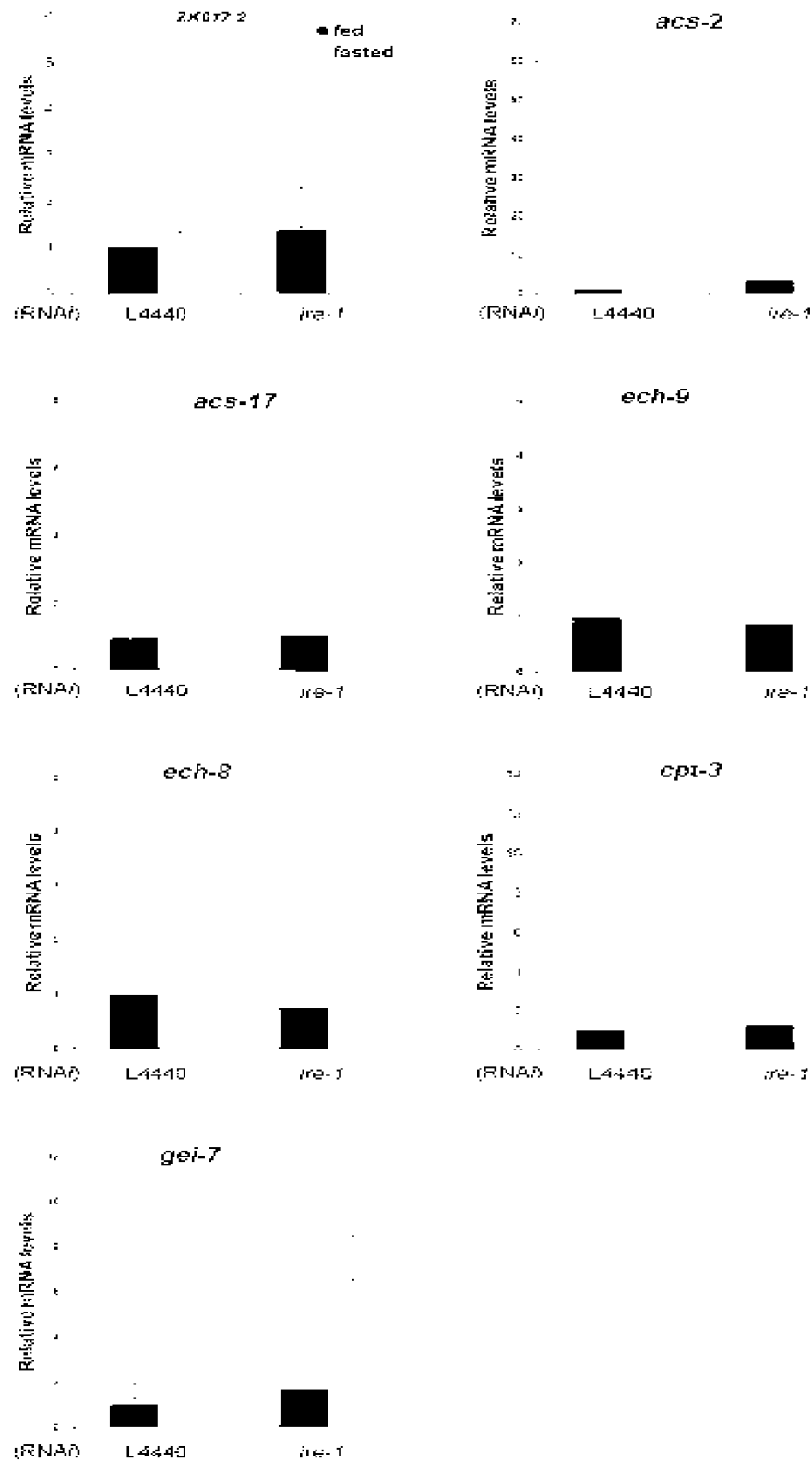
[Fig. 7]



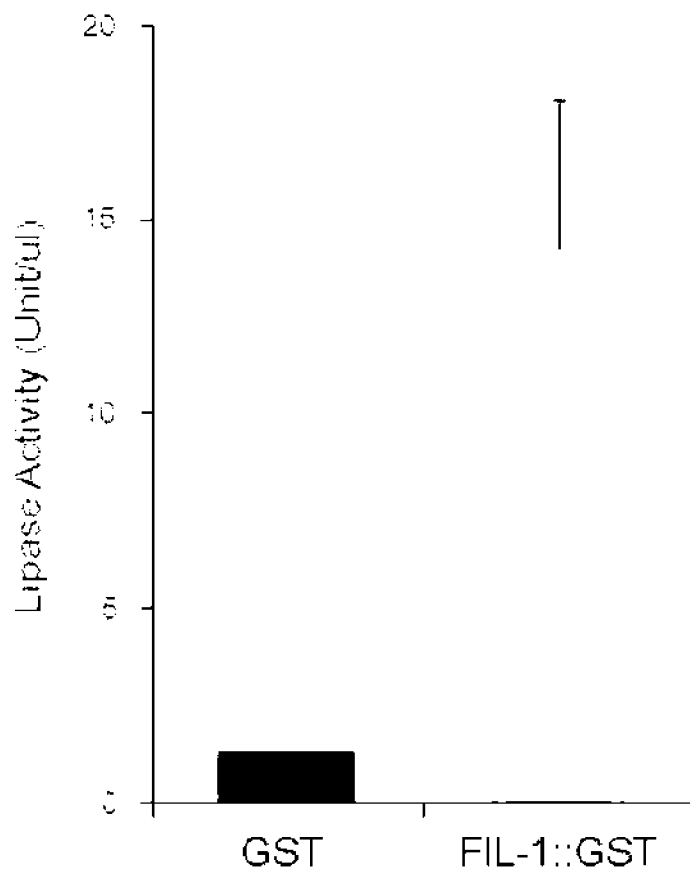
[Fig. 8]



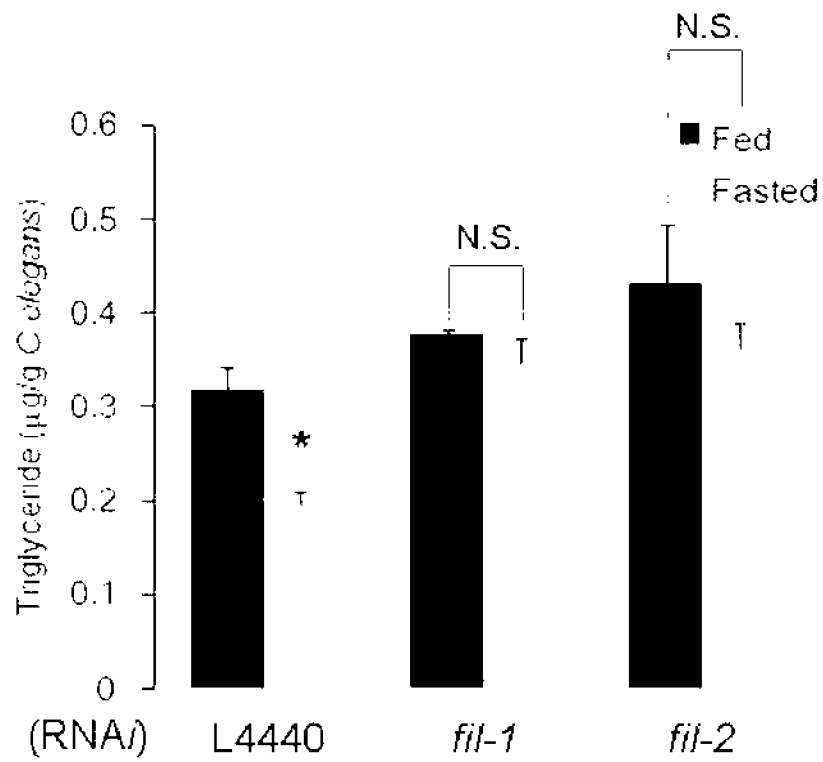
[Fig. 9]



[Fig. 10]



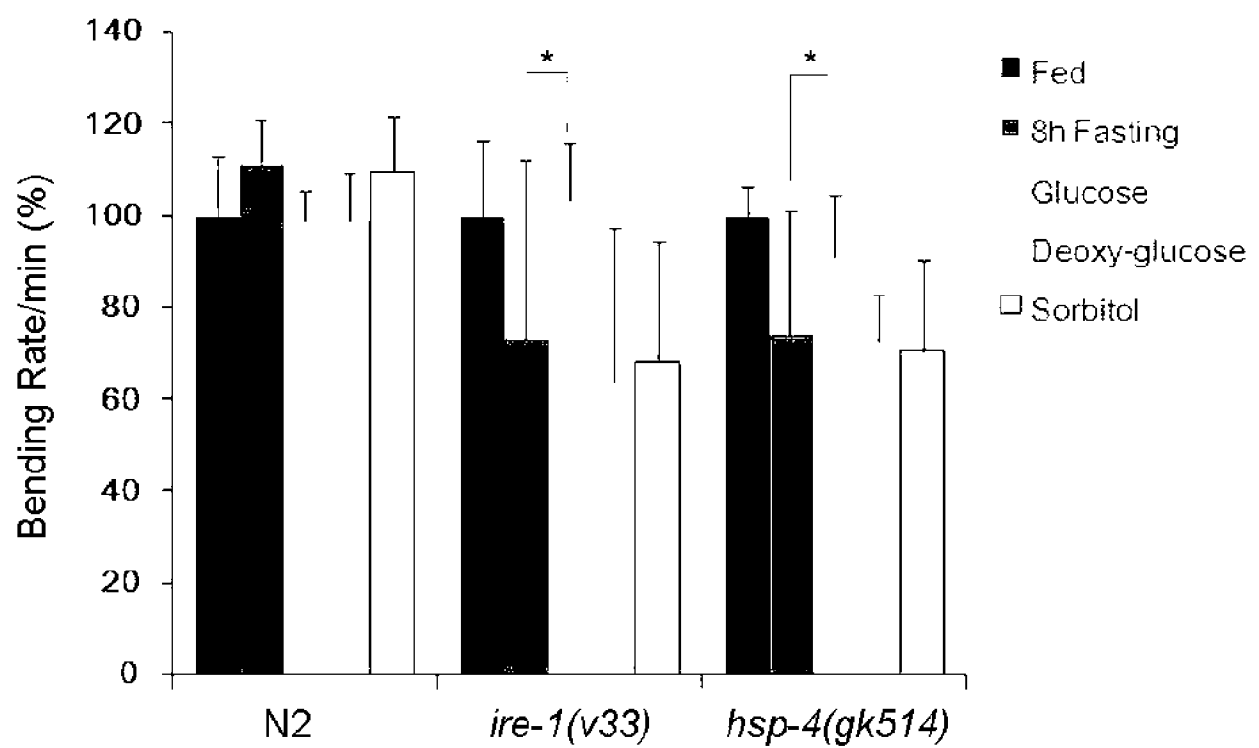
[Fig. 11]



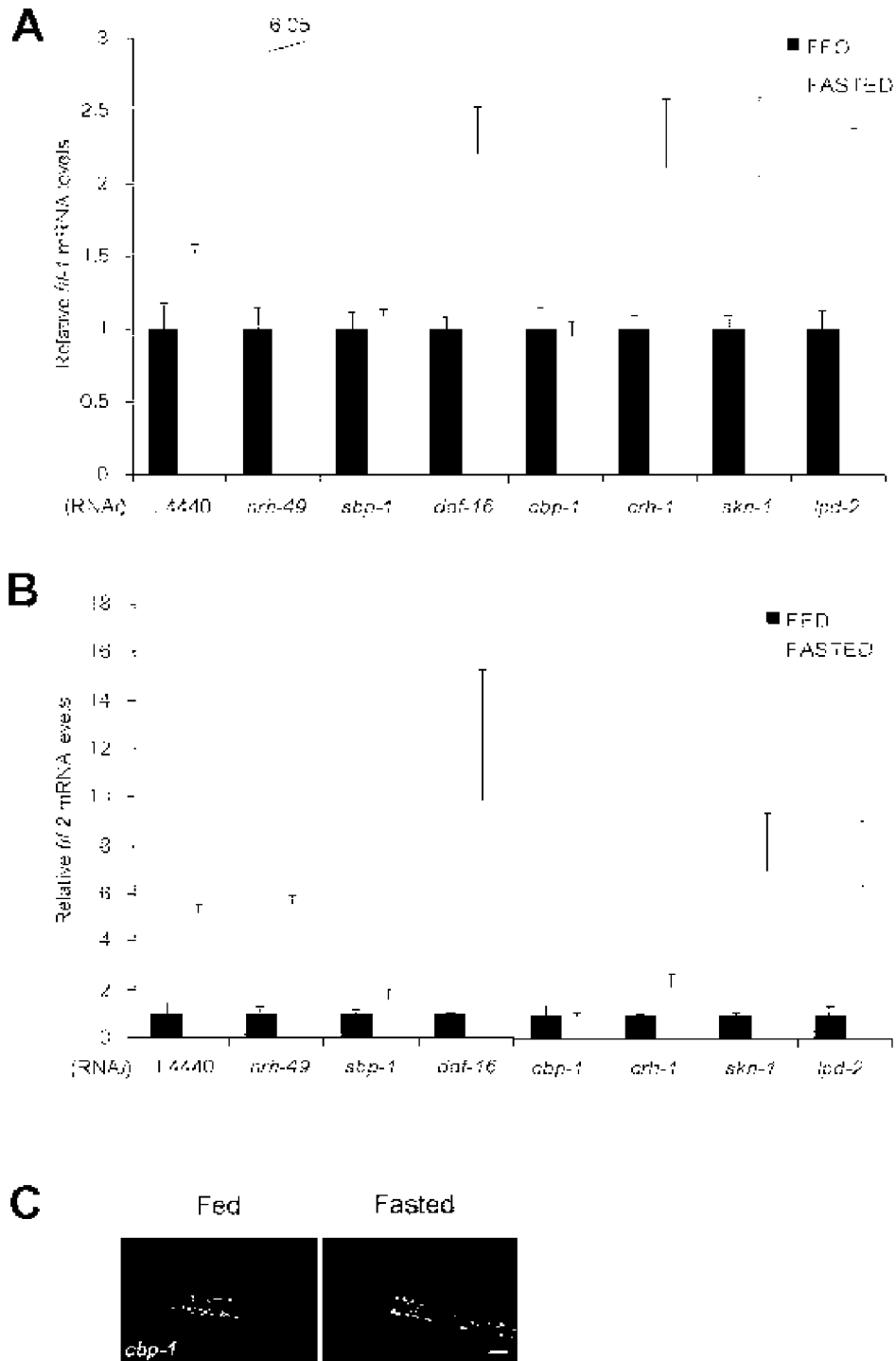
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]

