



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0096076
(43) 공개일자 2018년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 14/43581 (2013.01)
A61K 38/1767 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0022286

(22) 출원일자 2017년02월20일

심사청구일자 2018년01월25일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이혜미

대전광역시 서구 가장로 106, 116동 1501호 (가장동, 삼성 래미안아파트)

조은경

대전광역시 유성구 봉명로 48, 805동 702호 (원신홍동, 신안인스빌리베라)

(74) 대리인

김원준

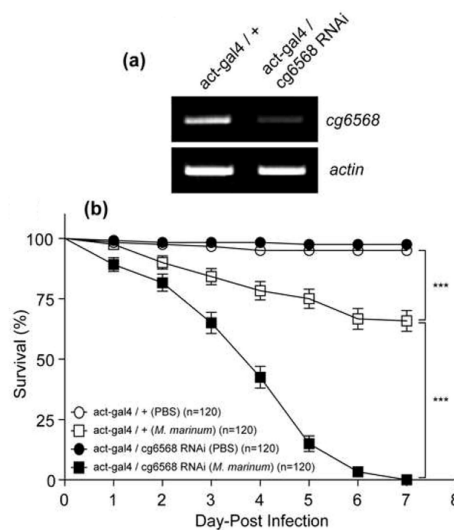
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 유전자 *cg6568*에 의해 코딩되는 항결핵 단백질 및 이를 유효성분으로 하는 결핵 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 항결핵 단백질 dCAMP 및 이를 코딩하는 유전자 *cg6568*에 관한 것으로, 보다 상세하게는 결핵균에 감염된 초파리에서 발현되어 결핵균에 대한 항균효과를 나타내는 항결핵 단백질 및 이를 유효성분으로 하는 항결핵 조성물, 상기 항결핵 단백질을 코딩하는 유전자 및 이를 포함하는 벡터를 유효성분으로 하는 항결핵 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

Y10S 514/924 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0395

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단

연구사업명 감염병위기대응기술개발

연구과제명 자가포식 기반 결핵 방어기전 규명 및 숙주표적 병합치료 후보물질 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 보건복지부

연구기간 2016.07.01 ~ 2017.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A2058116

부처명 교육부

연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단

연구사업명 리서치펠로우

연구과제명 비타민D에 의한 항결핵 방어능을 조절하는 microRNA 발굴 및 기능연구

기 여 율 1/2

주관기관 한국연구재단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 아미노산 서열과 90% 이상 상동성이 있고, 항결핵 특성을 나타내는 단백질.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

서열번호 1 아미노산 서열의 단백질.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 의한 단백질을 유효성분으로 하는 결핵 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 의한 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 하는 결핵 예방 및 치료용 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

서열번호 2의 유전자를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 하는 결핵 예방 및 치료용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항결핵 단백질 dCAMP 및 이를 코딩하는 유전자 cg6568에 관한 것으로, 보다 상세하게는 결핵균에 감염된 초파리에서 발견되어 결핵균에 대한 항균효과를 나타내는 항결핵 단백질 및 이를 유효성분으로 하는 항결핵 조성물, 상기 항결핵 단백질을 코딩하는 유전자 및 이를 포함하는 벡터를 유효성분으로 하는 항결핵 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)은 결핵(TB, tuberculosis)의 원인균이다. 전세계 인구의 3분의 1이 잠재적으로 결핵균에 감염되어 있고, 결핵으로 인해 매년 약 2백만명이 사망하는 것으로 알려져 있다. 여러 약물에 내성이 있는 약물 내성 균주의 출현이 결핵을 제어하기 어려운 원인이 되고 있다.

[0003] 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)는 파리목 초파리과에 속하는 곤충으로, 인간 질병 유발 유전자의 약 75%에 이르는 동족체를 가지고 있으며, 단백질의 50%는 포유류 동족체를 가지고 있다(Chien 등, Reiter 등). 따라서 발생 및 병의 원인 규명에 매우 유용한 모델로 사용된다. 비교적 단순한 조직과 기관은 복잡한 유전자와 세포 신호전달 체계에 대한 실험 재료로 사용하는데 여러 가지 장점을 가지기 때문에 초파리를 이용한 질병의 치료에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0004] 한편, 포유류에서 cathelicidin은 항결핵 활성을 나타내며 인간 대식세포에서 항결핵 자가포식과 리소솜 성숙(lysosomal maturation)의 유도에 결정적인 역할을 한다. 그러나 현재까지 노랑초파리에서 인간 cathelicidin와

동일 또는 유사한 기능을 하는 단백질에 대해서는 알려진 바 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Chien S, Reiter LT, Bier E, Gribskov M. Homophila: human disease gene cognates in Drosophila. Nucleic Acids Res 2002;30:149-51.

(비특허문헌 0002) Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster. Genome Res 2001;11:1114-25.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 약물 내성 결핵균을 제어하기 위한 새로운 단백질 및 이를 유효성분으로 하는 항결핵 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 서열번호 1 아미노산 서열과 90% 이상 상동성이 있고, 항결핵 특성을 나타내는 단백질을 제공한다. 이때 상기 단백질은 서열번호 1 아미노산 서열의 단백질일 수 있다.

[0008] 또한 본 발명은 상기 단백질을 유효성분으로 하는 결핵 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 또 다른 본 발명은 서열번호 1 또는 이와 아미노산 서열이 90% 이상 상동성이 있고, 항결핵 특성을 나타내는 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현백터를 유효성분으로 하는 결핵 예방 및 치료용 조성물을 제공한다. 이때 상기 유전자는 cg6568일 수 있다.

발명의 효과

[0010] 이상과 같이 본 발명에 의하면 서열번호 1의 단백질이 노랑초파리 결핵균 감염시에 생존에 필수적인 역할을 하며, 선천적인 면역 및 항균 작용을 나타냄을 확인하였다. 따라서 이러한 항결핵 단백질을 활용하면 새로운 종류의 결핵 예방 및 치료제가 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 야생형 초파리 발달과정에서 cg6568 발현 변화를 보여주는 도표.

도 2는 야생형 초파리에 결핵균 감염 후 시간경과에 따른 cg6568 발현 변화를 보여주는 도표.

도 3 및 도 4는 dCAMP가 초파리의 선천면역에 관여하여 결핵균에 대한 생존율 및 항균활성을 증가시키는 것을 보여주는 도표.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이하 첨부된 도면과 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면과 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0013] 전술하였듯이, 본 발명은 유전자 cg6568에 의해 코딩되는 항결핵 단백질 및 이를 유효성분으로 하는 항결핵 조성물에 관한 것이다.

[0014] 본 발명에 의한 상기 항결핵 단백질은, 서열번호 1 아미노산 서열과 90% 이상 상동성이 있고, 항결핵 특성을 나타내는 단백질이다. 나아가 본 발명은 서열번호 1의 단백질일 수 있다. 이때 서열번호 1의 단백질은 종래 핵산 서열만 알려져 있고 그 기능은 밝혀지지 않은 유전자 cg6568(서열번호 2)에 의해 코딩되는 단백질이다.

- [0015] 서열번호 1
- [0016] maltitkfrtsrgmvvavqptvvlspkipdsqdnckpfsksep gnatvrvnaggi vlnkipaiirpsmkraattkmtgataagattttsstgavgypvlkt
pkyvvqtspsgssghqlqmlarkdtqslgvainslpntiikat trpsqtapltpnsaavtpstpsssrntqstptvvpdarvssavr qavfikrelppq
rsmrnm tlg lveqapllhlgvapqhlsllkrhicrnanvthldcclt lrlklqnehfallaehfelsesdvedt fkr tliklaryl rplirwpdarhhner f
khtplnyranllhvrsliecvetdvpidlglsgsykf ilcintngi isyvssa fpgscddlqlfeasrfrdvi pnyltlcaepgkavrrarrsgfdphds
adedeaaaepkrs ltkfeaqrlsgqlasqqslsvvdgaltskrapaiqlptfnaqepacraqmrmdidylrefrml dnsaikqksllgyl demivvaaglc n
lkrqeles
- [0017] 서열번호 2
- [0018] atggcgttga caattacaaa atttcgaact tcgaggggga tgggtggtggc cgtacagccc
- [0019] acagtgggtgt tgagcccaaa aataccagat tcccaggata acgaaaagaa accgttttca
- [0020] aaatcggagc cgggaaatgc aactgtgaga gttaatgcag gtggtatagt tcttaacaaa
- [0021] ataccagcga ttataaggcc aagtatgaag agagcagcaa caacaagat gactggagcc
- [0022] acggctgcgg gagcaacaac aacaacatcg tcaacagggtg cagtgggata tcccgttctc
- [0023] aaaacaccca agtatgtggt tcagactagt ccgagtggat cctctggcca tcagctccag
- [0024] atgctggcga ggaaggacac tcaaagtctg ggagtggcca tcaattcact gccgccaac
- [0025] acaatcatca aagcaaccac aagacattca caaacagcgc ctttgacacc aaactcagcg
- [0026] gctgtcacgc caagcacgcc gagcagtagc aggaattcca ctcagtcac accaactgtg
- [0027] gtacctgatg cgagagt ttc ctccgccgtg cgccaagctg tgttcatcaa gagggagcta
- [0028] cccagccgc agaggagcat gcgaaatatg acacttggtt tgggtgaaca ggcgccactg
- [0029] cttcatttgg gtgttgcgcc acagcacctg tcactgctga aacgccatat ctgccgaat
- [0030] gctaattgca cccacttga ctgttgcttg actctaagga aactcaaaca aaacgagcac
- [0031] ttcgccctgt tggccgagca ctttgagctg agcgaatcag atgtcgagga cacatttaag
- [0032] cgcaccctta tcaagctggc ccgttacctc cgtccactga ttcgttggcc agatgcacgg
- [0033] catcacaacg agcgcttcaa acatacccca ctgaactacc gagccaacct gttgcatgta
- [0034] cgctcgttga tcgagtgtgt ggaaacggac gtgccgatag atctgggatt gggcagcggc
- [0035] agctataagt tcatattgtg catcaataca aatggcatca tcagctatgt gtctagcgcc
- [0036] tttcctggta gttagcatga tcttcaattg tttagggcca gcagatttcg ggatgtcatt
- [0037] cccaattacc taacactatg cgcggaacca ggcaaagcag tacgccgtgc tcgcaggtcg
- [0038] ggcttcggag atcctcacga ctcagcggat gaggatgagg cggcggcgga accaaagcga
- [0039] tcacttacca aattcgaggc acagcgtttg agtggccagc tagcaagcca gcaatcccta
- [0040] tccgtttag acggagcact gacttccaag cgggctccag cgattcaact acccacattc
- [0041] aacgcacaag aacccgcctg tagagcccaa atgagagata tgatagatta ttaaggga
- [0042] ttccgcatgc tggataattc ggctattaag caaaagtcac tgctgggtta tcttgatgaa
- [0043] atgatcgtgg tggctgcggg tctatgcaac cttaagcgcc aagagttgga atcttaa
- [0044] 상기 서열번호 1의 단백질의 기능은, 본 발명자들에 의해 처음 발견된 것으로서, 하기 실시예에서
증명되었듯이, 노랑초파리에서 결핵균 감염 동안 생존에 필수적인 역할을 하며, 선천적인 면역 및 항균 작용을
나타내면서 결핵균 생존을 억제하는 기능을 한다. 이에 본 발명자들은 이 단백질이 인체가 결핵균에 감염되었을
때 방어기작을 나타내는 cathelicidin와 동족체인 것으로 판단하고, 이를 노랑초파리의 cathelicidin 유사 항균

단백질(cathelicidin-like antimicrobial protein of *D. melanogaster*) 즉 dCAMP로 명명하였다. dCAMP는 518개의 아미노산으로 이루어진 56.7 kDa의 단백질로서 pI 9.67이다.

[0045] 또한 본 발명은 서열번호 1 아미노산 서열과 90% 이상 상동성이 있고, 항결핵 특성을 나타내는 단백질 또는 서열번호 1의 단백질을 유효성분으로 하는 결핵 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0046] 또 다른 본 발명은, 서열번호 1 아미노산 서열과 90% 이상 상동성이 있고, 항결핵 특성을 나타내는 단백질 또는 서열번호 1의 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 유효성분으로 하는 결핵 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 여기서 상기 유전자는 서열번호 2의 핵산서열을 가지는 유전자일 수 있다.

[0047] 이때 서열번호 2의 유전자는, 종래 존재는 알려져 있었지만 그 구체적인 기능과 작용에 대해서는 밝혀지지 않았던 유전자 *cg6568*이다. 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, *cg6568*은 모든 발달 단계에서 다양한 수준으로 발현되었으며, 발현 수준은 결핵균 감염 시간경과에 따라 변화하였다. 또한 *cg6568* RNAi를 발현하는 초파리로 확인한 바, 결핵균 감염동안 초파리의 생존과 항균 효과의 발휘를 위해 *cg6568*의 발현이 필수적이었다.

[0048] 당업계의 기술수준으로 보아 단백질 dCAMP의 생산을 위해 유전자 *cg6568*을 적절한 벡터에 도입하여 발현벡터를 제작할 수 있을 것이다.

[0049] 이때 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등이 될 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 통상의 클로닝 벡터 또는 발현벡터일 수 있으며, 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서(촉진유전자) 같은 발현 조절 서열 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한 상기 벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 벡터인 경우 복제기원을 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명에서 상기 조성물은 상기 단백질 또는 유전자를 단독으로 함유하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명은 제형 자체에 관한 것이 아니므로 담체 등에 대한 상세한 설명을 생략하지만, 당업자는 상황에 맞추어 적절하게 담체의 종류, 함량 등을 선택할 수 있을 것이다.

[실시예]

1. 재료 및 방법

(1) 결핵균 배양

[0054] Middlebrook OADC (BD Bioscience, NJ, USA)와 0.2 % (v/v) Tween-80 (Sigma, MO, USA)이 보충된 Middlebrook 7H9 broth (Difco, NJ, USA) 배지에 *M. marinum* strain Aronson (ATCC # 927, 어류에서 분리됨)을 접종하고 29 °C 암실에서 교반없이 OD600가 0.6이 되도록 배양하였다. aliquot를 10 % (v/v) 글리세롤에서 -80°C로 동결시켰다. 결핵균 단일 세포 현탁액은 종래 방법에 따라 준비하였다. (Song CH, Lee JS, Lee SH, Lim K, Kim HJ, Park JK, et al. Role of mitogen-activated protein kinase pathways in the production of tumor necrosis factor- α , interleukin-10, and monocyte chemotactic protein-1 by Mycobacterium tuberculosis H37Rv-infected human monocytes. J Clin Immunol 2003;23:194-201)

(2) 초파리 유지 및 결핵균 감염

[0056] 초파리는 표준 이스트 옥수수 한천 배지의 12h/12h의 명암주기, 65 % 습도, 25 °C에서 배양/유지되었다. 모든 실험은 3-5 일된 수컷 성체를 대상으로 하였다.

[0057] 유전자형 w^{1118} , act-gal4/CyO (Act5C promoter의 조절하에 GAL4를 편재적 발현), cg-gal4 [hemocytes (또한 지방과 림프선)에서 GAL4를 발현함], 및 da-gal4 (GAL4의 편재적 발현)는 Bloomington Stock Center에서 입수했다. UAS-102 *cg6568* RNAi (v13348) 초파리는 오스트리아 비엔나 초파리 RNAi 센터 (VDRC)에서 얻었다.

[0058] 결핵균 감염은 이전에 기술된 대로 수행되었다. (Dionne MS, Ghorri N, Schneider DS. *Drosophila melanogaster* is a genetically tractable model host for Mycobacterium marinum. Infect Immun 2003;71:3540-50 : Kim JJ, Lee HM, Shin DM, Kim W, Yuk JM, Jin HS, et al. Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. Cell Host Microbe 2012;11:457-68.)

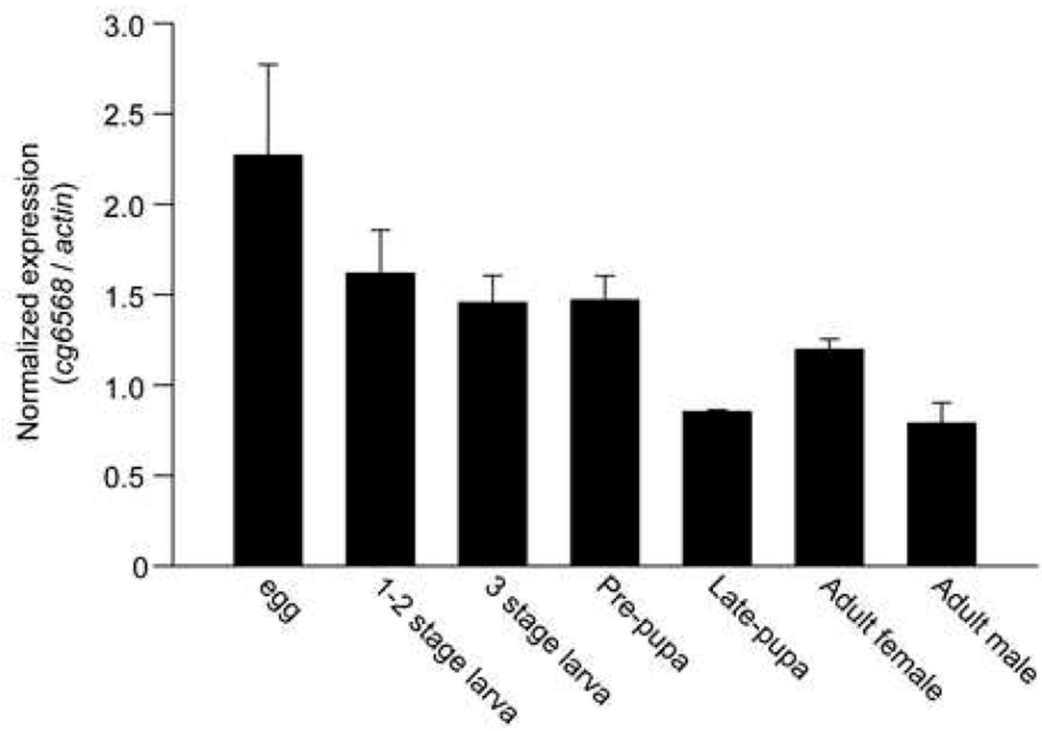
(3) 슈나이더 세포 (S2 cell) 배양 및 관련 시약

- [0060] Invitrogen (MA, USA)에서 구입한 S2 세포를 10 % (v/v) 열 불활화 FBS (Gibco)와 1 % (w/v) 페니실린-스트렙토마이신-암포테리신 B (Lonza, Basel, Switzerland)를 포함하는 Schneider 's 배지 (Gibco, MA, USA)에 접종하고 25℃, 5 % (v/v) CO₂ 하에서 배양하였다. 인산염-완충 식염수 (PBS)와 20-HE는 Sigma (MO, USA)에서 구입하였다.
- [0061] (4) 세균부하의 측정
- [0062] 콜로니 형성수(Colony-forming units; CFU)는 이전에 기술된 바와 같이 추정되었다.(Oh CT, Moon C, Choi TH, Kim BS, Jang J. Mycobacterium marinum infection in Drosophila melanogaster for antimycobacterial activity assessment. J Antimicrob Chemother 2013;68:601-9.)
- [0063] 개별 감염된 초파리를 CO₂로 마취시키고 얼음에 두었다. 표면 박테리아를 제거하기 위해 초파리를 70 % (v/v) 에탄올로 살균한 후, 100 μL의 멸균된 물에서 유봉으로 균질화시켰다. 균질화된 초파리를 연속 희석하고 10 % (w/v) OADC (BD Bioscience)가 첨가된 7H11 아가 플레이트 (Difco)에 도말하여 세균수를 세었다. 플레이트를 10-14 일 동안 배양하고 콜로니를 계수하였다.
- [0064] (5) RNA 추출과 준정량 RT-PCR
- [0065] 종래기술에 따라 TRIzol (Invitrogen)을 사용하여 초파리 또는 S2 세포에서 총 RNA를 추출하였다.(Yang CS, Lee JS, Jung SB, Oh JH, Song CH, Kim HJ, et al. Differential regulation of interleukin-12 and tumour necrosis factor-alpha by phosphatidylinositol 3-kinase and ERK 1/2 pathways during Mycobacterium tuberculosis infection. Clin Exp Immunol 2006;143:150-60.) 준정량(semi-quantitative) PCR은 Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems, MA, USA)를 사용하여 58℃에서 30 초간 어닐링 단계를 30 사이클 이상 수행되었다.
- [0066] cg6568 및 액틴에 대한 표적 특이성 프라이머 쌍은 각각 (서열번호 3, 서열번호 4) 및 (서열번호 5, 서열번호 6)을 사용하였다.
- [0067] 서열번호 3 : 5'-AGGATAACGAAAGAAACCGT-3'
- [0068] 서열번호 4 : 5'-AGAACGGGATATCCCACTGCA-3'
- [0069] 서열번호 5 : 5'-GATCACCATTGGCAACGA-3'
- [0070] 서열번호 6 : 5'-TCTTGATCTTGATGGTCG-3'
- [0071] RT-PCR 생성물을 1.5 w% 아가로오스 겔에서 분리하고, 에티듐브로마이드 (Sigma)를 사용하여 가시화하였다. 모든 겔을 사진(Bio-Rad, CA, USA)으로 찍었다.
- [0072] (6) 통계분석
- [0073] 독립적인 실험의 모든 데이터는 양측 스튜던트 t-검정을 사용하여 비교되었다. p 값 <0.05는 유의성을 반영하는 것으로 간주되었다. 초파리 생존 분석을 위해 GraphPad Prism 소프트웨어 (GraphPad Software, Inc., CA, USA)를 이용하였다. 95 % 신뢰구간은 양방향에서 표준 오차에 1.96을 곱하여 계산하였다. 통계적 유의성을 평가하기 위해 log-rank (Mantel-Cox) 테스트를 진행하였다.
- [0074] **2. 결과 및 고찰**
- [0075] (1) cg6568은 초파리 전체 발달과정에서 발현된다.
- [0076] BLAST 검색을 통해 초파리에서 인간 cathelicidin과 상동성을 나타내는 유전자를 검색한 결과 인간 cathelicidin 단백질과 35 %의 아미노산 동일성을 나타내는 단백질(서열번호 1)을 코딩하는 유전자 cg6568 (GenBank 수납 번호 NP_611204.2)을 도출하였다. 전술하였듯이 본 발명자들은 상기 서열번호 1의 단백질을 dCAMP라 명명하였다. dCAMP 518개의 아미노산으로 이루어진 56.7 kDa이고 pI 9.67인 단백질이다.
- [0077] 준정량적 RT-PCR을 사용하여 초파리의 발달단계별 [알 (24h 미만), 1-2 단계 유충 (24-48h), 3 단계 유충 (48-96h), 번데기 전기 (96-120h), 번데기 후기 (120-144h), 성체 (부화 후)] cg6568 발현을 평가한 바, 모든 단계에서 발현이 확인되었다(도 1). 특히, cg6568은 알에서 강하게 발현되었고, 그 다음에 유생과 번데기에서, 그리고 성체에서 발현이 감소되었다. 알의 발현은 성체의 약 2배 수준이었다.
- [0078] 따라서 cg6568이 초파리 발달에 중요한 역할을 할 것이라는 사실이 간접적으로 증명되었다.

- [0079] (2) 결핵 감염 1일 후부터 내인성 cg6568의 발현이 증가된다.
- [0080] 종래 계능 분석 결과 cg6568 발현은 그람 양성균이나 음성균에 의한 감염에 영향을 받지 않는 것으로 알려져 있다.(De Gregorio E, Spellman PT, Rubin GM, Lemaitre B. Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:12590-5.)
- [0081] 그러나 본 발명자들은 이러한 종래 논문의 견해에 의문을 가지고, cg6568의 발현이 결핵균에 의해 촉진 또는 억제되는지에 대해 분석하였다.
- [0082] 결핵 감염이 cg6568 발현을 유도하는지를 탐색하기 위해, 준정량적 PCR (도 2의 (a)) 및 정량적 농도 측정 분석 (도 2의 (b))을 통해 cg6568 전사 수준을 측정 하였다.
- [0083] 초파리 w^{1118} 에 치사량으로 알려진 결핵균 500 CFU씩 주사하고 25℃에서 1, 3, 5, 7일간 유지하였다. 대조군 [UI]으로는 PBS만 주사하였다. 감염 직후에는 cg6568 전사가 급감했다가 1일 후에 전사가 상승되어 5일 동안 유지되었다(도 2). 감염 7일 후, cg6568 유전자의 전사는 감염 직후의 수준으로 감소하였다.
- [0084] 따라서, cg6568은 결핵균 감염에 대한 면역방어에 관여함을 알 수 있다.
- [0085] (3) 결핵 감염시 dCAMP는 항생제 역할을 한다.
- [0086] dCAMP가 결핵균 감염 동안 성체 초파리의 생존율을 향상시키는지 여부를 조사하였다.
- [0087] dCAMP 기능을 평가하기 위해 UDR-cg6568 RNAi (VDR에서 얻음)를 발현하는 형질전환 초파리를 사용했다. GAL4/UAS 바이너리 조절 시스템을 사용하여 cg6568 RNAi를 발현시켰다; UAS-cg6568 RNAi 계통을 몇 개의 GAL4 계통과 교배시켰다. 준정량적 PCR은 act-gal4/+ 대조군에 비해 act-gal4/UAS-cg6568 RNAi 초파리에서 내인성 cg6568의 발현이 유의하게 감소함을 보였다(도 3의 (a)). 이것은 UAS-cg6568 RNAi 구조가 cg6568을 효과적으로 녹다운시킨다는 것을 의미한다.
- [0088] 결핵균 감염 동안 초파리 생존을 측정했다. 3~5 일 된 act-gal4/UAS-cg6568 RNAi 및 act-gal4/+ 발현 수컷 초파리에 500 CFU의 결핵균을 주사하였다. PBS를 음성 대조군으로 사용하였다. 실험구마다 개체는 120마리로 하였고, 24시간 간격으로 사망 개체수를 세었다. 그 결과, UAS-cg6568 RNAi를 발현하는 형질전환 초파리의 생존율은 대조군 초파리보다 현저히 낮았다(도 3의 (b)).
- [0089] 또한, 다른 드라이버 (cg-gal4 및 da-gal4)를 사용하여 도입 유전자가 유도된 UAS-cg6568 발현 RNAi 초파리 군의 생존율과 이 군주에서의 결핵균 수를 측정하였다.
- [0090] 초파리에 결핵균 500 CFU를 주사하고 감염 후 3 일까지 생존 및 박테리아 부담 측면에서 모니터링하였다. 실험구 개체수는 30마리로 하였고, 24시간 간격으로 사망 개체수를 세었다. 도 4의 (a) 및 (b)에 나타난 바와 같이, 결과는 act-gal4/UAS-cg6568 RNAi를 사용했을 때 얻은 결과와 유사하였다. cg-gal4/UAS-cg6568 RNAi 또는 da-gal4/UAS-cg6568 RNAi를 발현하는 감염된 초파리는 감염 7 일 이내에 높은 사망률을 나타냈다(도 4의 (a) 및 (b)).
- [0091] 결핵균은 대조군 cg-gal4- 및 da-gal4- 감염 초파리에서는 중간정도의 치사율을 보여, 감염 후 7 일까지 약 20%가 사망하였다. cg6568 RNAi (cg-gal4/UAS-cg6568 RNAi, da-gal4/UAS-cg6568 RNAi)를 발현하는 초파리는 대조군 (cg-gal4/+ 및 da-gal4/+ 초파리)보다 훨씬 높은 세균 부하를 보였다(도 4의 (c) 및 (d)). 도 4의 (c) 및 (d)에서 각 실험구의 개체수는 10마리로 하였다.
- [0092] 이상을 종합하면, dCAMP가 초파리의 선천면역에 관여하여 결핵균에 대한 생존율 및 항균활성이 증가함을 알 수 있다.
- [0093] 결론적으로, 본 발명에 의해, 기능이 불명했던 유전자 cg6568의 발현물인 단백질 dCAMP는 결핵균에 의해 유도된 초파리의 숙주 병원체 방어기전에서 결정적인 항균 역할을 함이 밝혀졌다..
- [0094] 따라서 단백질 dCAMP 또는 이와 상동성이 있는 단백질을 결핵 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 활용할 수 있음이 확인된 것이다. 나아가 당연히 단백질 dCAMP 또는 이와 상동성이 있는 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 활용하여 결핵 예방 및 치료용 조성물을 제공할 수 있게 된다.

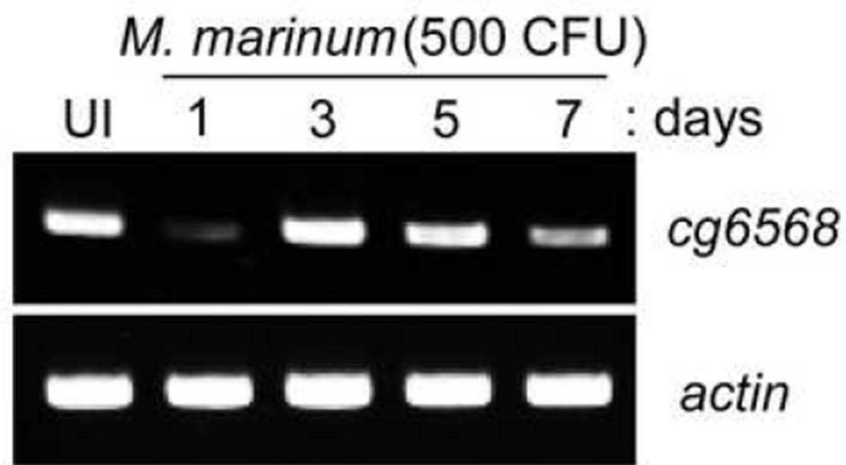
도면

도면1

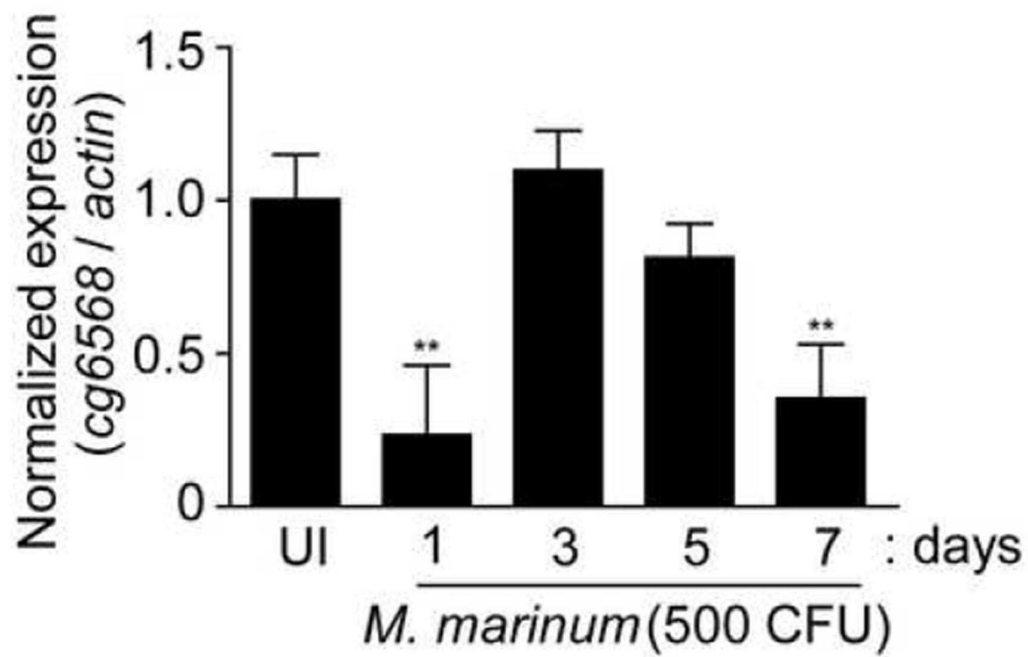


도면2

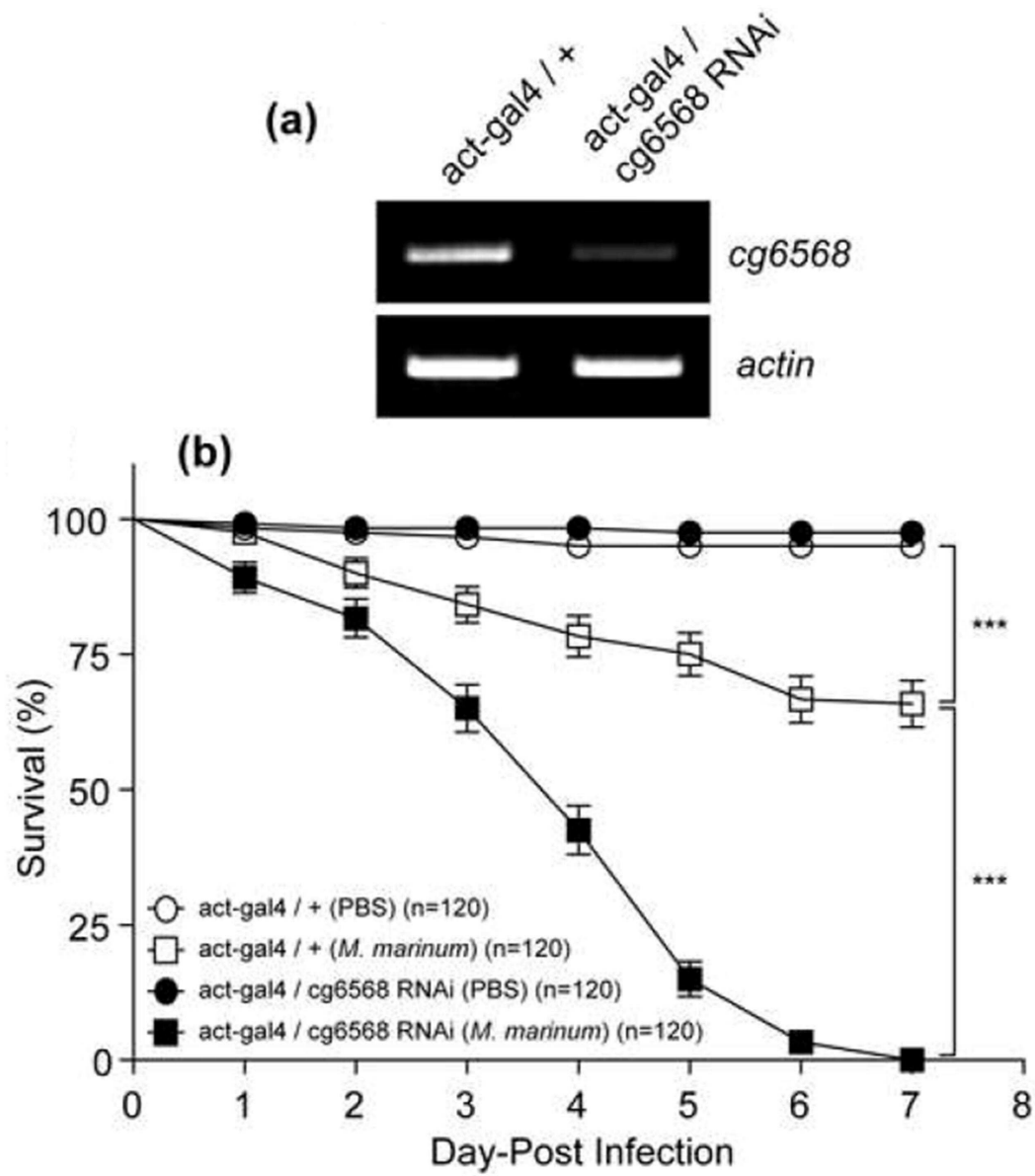
(a)



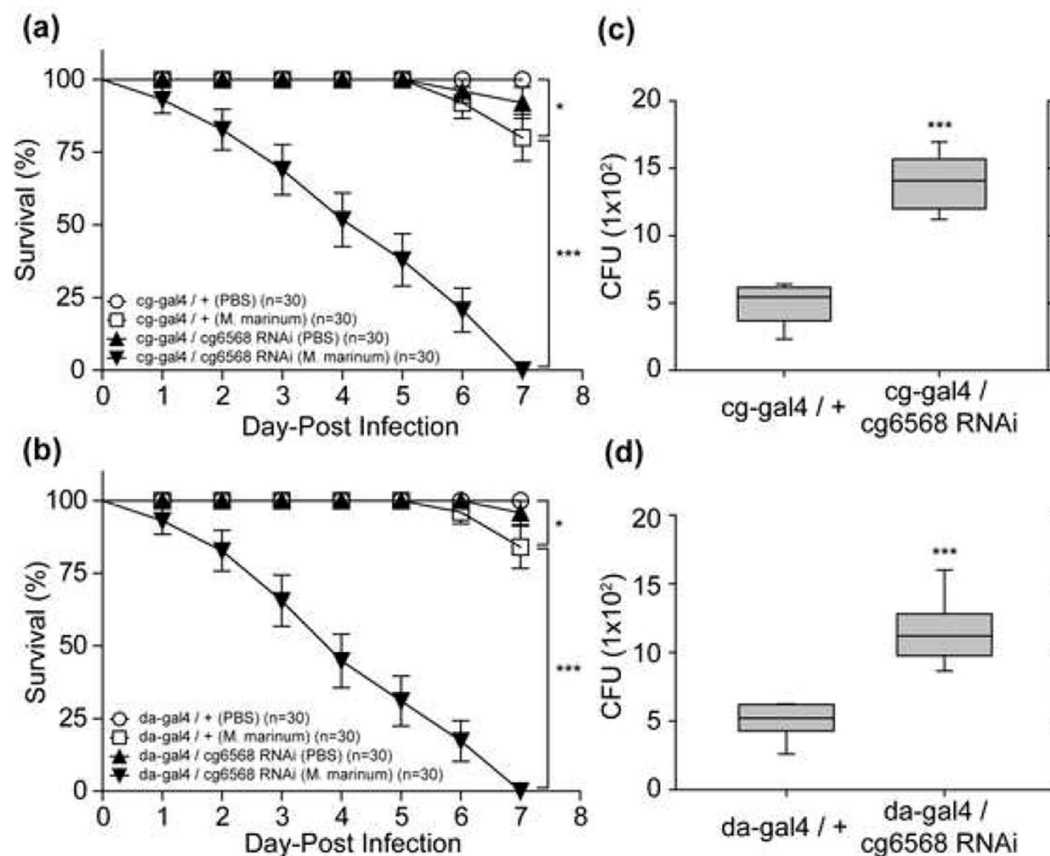
(b)



도면3



도면4



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Anti-Tuberculosis Protein dCAMP Encoded by Gene cg6568

<130> P0217-118

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 518

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 1

Met Ala Leu Thr Ile Thr Lys Phe Arg Thr Ser Arg Gly Met Val Val

1 5 10 15

Ala Val Gln Pro Thr Val Val Leu Ser Pro Lys Ile Pro Asp Ser Gln

20 25 30

Asp Asn Glu Lys Lys Pro Phe Ser Lys Ser Glu Pro Gly Asn Ala Thr

35 40 45
 Val Arg Val Asn Ala Gly Gly Ile Val Leu Asn Lys Ile Pro Ala Ile
 50 55 60
 Ile Arg Pro Ser Met Lys Arg Ala Ala Thr Thr Lys Met Thr Gly Ala
 65 70 75 80
 Thr Ala Ala Gly Ala Thr Thr Thr Thr Ser Ser Thr Gly Ala Val Gly
 85 90 95
 Tyr Pro Val Leu Lys Thr Pro Lys Tyr Val Val Gln Thr Ser Pro Ser

 100 105 110
 Gly Ser Ser Gly His Gln Leu Gln Met Leu Ala Arg Lys Asp Thr Gln
 115 120 125
 Ser Leu Gly Val Ala Ile Asn Ser Leu Pro Pro Asn Thr Ile Ile Lys
 130 135 140
 Ala Thr Thr Arg Pro Ser Gln Thr Ala Pro Leu Thr Pro Asn Ser Ala
 145 150 155 160
 Ala Val Thr Pro Ser Thr Pro Ser Ser Ser Arg Asn Ser Thr Gln Ser
 165 170 175

 Thr Pro Thr Val Val Pro Asp Ala Arg Val Ser Ser Ala Val Arg Gln
 180 185 190
 Ala Val Phe Ile Lys Arg Glu Leu Pro Gln Pro Gln Arg Ser Met Arg
 195 200 205
 Asn Met Thr Leu Gly Leu Val Glu Gln Ala Pro Leu Leu His Leu Gly
 210 215 220
 Val Ala Pro Gln His Leu Ser Leu Leu Lys Arg His Ile Cys Arg Asn
 225 230 235 240
 Ala Asn Val Thr His Leu Asp Cys Cys Leu Thr Leu Arg Lys Leu Lys

 245 250 255
 Gln Asn Glu His Phe Ala Leu Leu Ala Glu His Phe Glu Leu Ser Glu
 260 265 270
 Ser Asp Val Glu Asp Thr Phe Lys Arg Thr Leu Ile Lys Leu Ala Arg
 275 280 285
 Tyr Leu Arg Pro Leu Ile Arg Trp Pro Asp Ala Arg His His Asn Glu

290 295 300
 Arg Phe Lys His Thr Pro Leu Asn Tyr Arg Ala Asn Leu Leu His Val
 305 310 315 320

 Arg Ser Leu Ile Glu Cys Val Glu Thr Asp Val Pro Ile Asp Leu Gly
 325 330 335
 Leu Gly Ser Gly Ser Tyr Lys Phe Ile Leu Cys Ile Asn Thr Asn Gly
 340 345 350
 Ile Ile Ser Tyr Val Ser Ser Ala Phe Pro Gly Ser Cys Asp Asp Leu
 355 360 365
 Gln Leu Phe Glu Ala Ser Arg Phe Arg Asp Val Ile Pro Asn Tyr Leu
 370 375 380
 Thr Leu Cys Ala Glu Pro Gly Lys Ala Val Arg Arg Ala Arg Arg Ser

 385 390 395 400
 Gly Phe Gly Asp Pro His Asp Ser Ala Asp Glu Asp Glu Ala Ala Ala
 405 410 415
 Glu Pro Lys Arg Ser Leu Thr Lys Phe Glu Ala Gln Arg Leu Ser Gly
 420 425 430
 Gln Leu Ala Ser Gln Gln Ser Leu Ser Val Val Asp Gly Ala Leu Thr
 435 440 445
 Ser Lys Arg Ala Pro Ala Ile Gln Leu Pro Thr Phe Asn Ala Gln Glu
 450 455 460

 Pro Ala Cys Arg Ala Gln Met Arg Asp Met Ile Asp Tyr Leu Arg Glu
 465 470 475 480
 Phe Arg Met Leu Asp Asn Ser Ala Ile Lys Gln Lys Ser Leu Leu Gly
 485 490 495
 Tyr Leu Asp Glu Met Ile Val Val Ala Ala Gly Leu Cys Asn Leu Lys
 500 505 510
 Arg Gln Glu Leu Glu Ser
 515
 <210> 2
 <211> 1557
 <212> DNA

<213> Drosophila melanogaster

<400> 2

atggcgttga caattacaaa atttcgaact tcgaggggga tgggtggtggc cgtacagccc	60
acagtgggtgt tgagccccaa aataccagat tcccaggata acgaaaagaa accgttttca	120
aaatcgagc cgggaaatgc aactgtgaga gttaatgcag gtggtatagt tcttaacaaa	180
ataccagcga ttataaggcc aagtatgaag agagcagcaa caacaaagat gactggagcc	240
acggctgcgg gagcaacaac aacaacatcg tcaacaggtg cagtgggata tcccgttctc	300
aaaacaccca agtatgtggt tcagactagt ccgagtggat cctctggcca tcagctccag	360
atgctggcga ggaaggacac tcaaagtctg ggagtggcca tcaattcact gccgccaac	420
acaatcatca aagcaaccac aagaccttca caaacagcgc ctttgacacc aaactcagcg	480
gtgttcacgc caagcacgcc gagcagtagc aggaattcca ctacgtccac accaactgtg	540
gtacctgatg cgagagtttc ctccgccgtg cgccaagctg tgttcatcaa gagggagcta	600
ccccagccgc agaggagcat gcgaaatatg acacttgggt tgggtggaaca ggcgccactg	660
cttcatttgg gtgttgcgcc acagcacctg tcaactgtga aacgccatat ctgccgaat	720
gctaattgta cccacttggc ctgttgcctg actctaagga aactcaaaca aaacgagcac	780
ttcgccctgt tggccgagca ctttgagctg agcgaatcag atgtcgagga cacatttaag	840
cgcacccctta tcaagctggc ccgttiacct cgtccactga ttcgttggcc agatgcacgg	900
catcacaacg agcgcttcaa acatacccca ctgaactacc gagccaacct gttgcatgta	960
cgctcgttga tcgagtgtgt ggaaacggac gtgccgatag atctgggatt gggcagcggc	1020
agctataagt tcatattgtg catcaataca aatggcatca tcagctatgt gtctagcggc	1080
tttcttggtg gttgcgatga tcttcaattg tttgaggcca gcagatttcg ggatgtcatt	1140
cccaattacc taacactatg cgcggaacca ggcaaagcag tacgccgtgc tcgcaggteg	1200
ggcttcggag atcctcacga ctacgcggat gaggatgagg cggcggcgga accaaagcga	1260
tcacttacca aattcgaggc acagcgtttg agtggccagc tagcaagcca gcaatcccta	1320
tccgtttagt acggagcact gacttccaag cgggctccag cgattcaact acccacattc	1380
aacgcacaag aacccgcctg tagagcccaa atgagagata tgatagatta ttttaaggga	1440
ttccgatgc tggataatc ggctattaag caaaatcat tgctgggtta tcttgatgaa	1500
atgatcgtgg tggctgcggg tctatgcaac ctttaagcgc aagagttgga atcttaa	1557

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

aggataacga aagaaaccgt

20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

agaacgggat atcccactgc a

21

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gatcaccatt ggcaacga

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

tcttgatctt gatggtcg

18