



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12Q 1/37 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년07월09일 10-0736743 2007년07월02일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2005-0088971 2005년09월23일 2005년12월29일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-2007-0034362 2007년03월28일
----------------------------------	---	------------------------	--------------------------------

(73) 특허권자 재단법인서울대학교산학협력재단
 서울특별시 관악구 봉천동 산 4-2

(72) 발명자 정진하
 서울 서초구 반포동 한신3차아파트 36동 503호

 방옥선
 경기 안양시 만안구 안양1동 주공 뜨란채 108동 902호

 강성환
 서울 관악구 봉천3동 대우푸르지오아파트 104동 1001호

(74) 대리인 김성호
 박경완

(56) 선행기술조사문헌 대한민국 공개특허 제1999-0049591호(1999.07.05.) J. Virol. Methods., 107(2), 245-255(2003)	대한민국 등록특허 제0217964호(1999.06.08.) J. Biol. Chem., 270(20), 12250-12256(1995)
---	--

심사관 : 허주형

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 에코틴-융합단백질을 기질로 사용한 특정 기질단백질의특이적 분해효소의 활성 측정방법

(57) 요약

본 발명은 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법에 관한 것이다.

본 발명은 (1) 특정 기질단백질의 특이적 분해효소에 의해 절단되는 부위를 포함하는 폴리펩티드의 카르복시 말단에는 에코틴을 융합시키고 아미노 말단에는 GST, GFP, MBP로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질을 융합시켜서 융합 단백질을 얻는 단계; (2) 상기 융합 단백질을 기질로 상기 특정 기질단백질 분해효소와 기질-효소 반응을 수행하는 단계; 및 (3) 상기 기질-효소 반응의 반응물을 가열한 후 원심분리하여 상층액을 분리하고, 상기 상층액의 트립신 활성 억제도를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법을 제공한다.

본 발명의 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법을 사용할 경우 트립신 활성의 억제 정도를 통해 형광 측정기상에서 빠르게 그리고 간단하고 효율적으로 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성을 측정할 수 있다.

대표도

도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

(1) 서열번호 8의 염기서열에 의해 코딩되는 UFM1, 서열번호 9의 염기서열에 의해 코딩되는 SUMO, 서열번호 10의 염기서열에 의해 코딩되는 NEDD8 및 서열번호 11의 염기서열에 의해 코딩되는 ISG15로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 유비퀴틴 유사 단백질 또는 서열번호 7의 염기서열에 의해 코딩되는 유비퀴틴의 카르복시 말단에 서열번호 12의 염기서열에 의해 코딩되는 에코틴을 융합시키고, 아미노 말단에는 서열번호 13의 염기서열에 의해 코딩되는 GST, 서열번호 15의 염기서열에 의해 코딩되는 GFP 및 서열번호 14의 염기서열에 의해 코딩되는 MBP로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질을 융합시켜서 융합 단백질을 얻는 단계;

(2) 상기 융합 단백질을 기질로 상기 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질 분해효소와 기질-효소 반응을 수행하는 단계; 및

(3) 상기 기질-효소 반응의 반응물을 가열한 후 원심분리하여 상층액을 분리하고, 상기 상층액의 트립신 활성 억제도를 측정하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 유비퀴틴 특이적 분해효소는 UBP69인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

삭제

청구항 5.

서열번호 8의 염기서열에 의해 코딩되는 UFM1, 서열번호 9의 염기서열에 의해 코딩되는 SUMO, 서열번호 10의 염기서열에 의해 코딩되는 NEDD8 및 서열번호 11의 염기서열에 의해 코딩되는 ISG15로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 유비퀴틴 유사 단백질 또는 서열번호 7의 염기서열에 의해 코딩되는 유비퀴틴의 카르복시 말단에 서열번호 12의 염기서열에 의해 코딩되는 에코틴을 융합시키고, 아미노 말단에는 서열번호 13의 염기서열에 의해 코딩되는 GST, 서열번호 15의 염기서열에 의해 코딩되는 GFP 및 서열번호 14의 염기서열에 의해 코딩되는 MBP로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질을 융합시켜서 얻어진 융합 단백질.

청구항 6.

삭제

청구항 7.

삭제

청구항 8.

삭제

청구항 9.

제5항의 융합 단백질을 코딩하는 유전자를 함유하는 재조합 벡터.

청구항 10.

제9항의 재조합 벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 정량적인 활성측정이 가능하고 신속, 간단하며 효율적인 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법에 관한 것이다.

유비퀴틴(Ubiquitin)은 76개의 아미노산으로 구성된 작은 단백질로서 모든 진핵세포에 존재하며, 일반적으로 세포의 성장과 분화과정뿐만 아니라, 각종 질병에서도 핵심적인 역할을 하고 있다(Sakamoto Km, 2002, Mol Genet Metab. 77, 44; Hammond AL, 2002, Prog Mol Subcell Biol. 29, 61).

또한 그와 더불어 유비퀴틴의 아미노산 서열과 약 30% 내외의 유사성을 가진 발생과정상 억제발현되는 신경 전구세포 유전자(NEDD8, neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8), 작은 유비퀴틴 유사 변형체(SUMO, small ubiquitin-like modifier), 인터페론 자극 유전자 15(ISG 15, interferon stimulated gene 15), 유비퀴틴 형태 변형체 1(UFM 1, ubiquitin fold modifier 1) 등의 유비퀴틴 유사 단백질들이 밝혀졌는데, 이들은 핵막을 통한 수송, 전사조절, 발암 등에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Yeh et al, 2000, Gene, 248, 1, review; Muller et al, 2001, Nat Rev Mol Cell Biol, 2, 202, review; Komatsu M et al, 2004, EMBO J, 23, 1997).

유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질은 각각 E1, E2, E3라고 하는 일련의 효소군들에 의해 세포내의 다양한 단백질에 부착되며, 일단 단백질에 부착된 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질 분자에는 또 다른 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질 분자가 각각 가지 형태로 이소펩티드 결합에 의해 계속 부착될 수 있다.

가지 형태의 유비퀴틴 중합체가 결합된 단백질 분자는 세포 내에서 프로테아좀이라는 ATP-의존성 단백질 분해효소 복합체에 의해 분해된다(Hershko A, Ciechanover A, 1998, Annu Rev Biochem, 67, 425, review). 이처럼 유비퀴틴이 결합된 후 분해되는 단백질들로는 세포주기를 조절하는 cyclin들, 유전자의 발현을 조절하는 Jun/Fos와 NF-kappaB 같은 전사인자들, 세포의 성장과 분화를 조절하는 EGF와 PDGF 등의 성장인자와 종양 억제 단백질로 알려진 p53 등이 있다(Hu et al, 2002, J Biol Chem, 277, 16528; Amir et al, 2002, J Biol Chem, 277, 23, 253; Baron V, Schwartz M, 2000, J Biol Chem, 275, 39318; Scheffner et al, 1995, Nature, 373, 81).

유비퀴틴 유사 단백질들도 유비퀴틴과 아주 유사한 방식을 통해서 PML(백혈병 관련 단백질), RanGAP1(Ran-GTPase activating protein), p53(종양억제분자), 그리고 IkappaBalpha (NF-kappaB 억제분자) 등의 다양한 단백질들과 결합한다. 그러나 유비퀴틴 유사 단백질과 타겟 단백질의 결합은 유비퀴틴 중합체의 결합처럼 단백질의 분해를 유발하는 것이 아니라 타겟 단백질의 기능을 조절하는 역할을 수행한다(Tanaka et al, 1998, Mol Cell, 8, 503; Hochstrasser M, 2000, Nat Cell Biol, 2, E153-E157; Melchior F, 2000, Annu Rev Cell Dev Biol, 16, 591; Yeh et al, Gene, 2000, 248, 1; Muller et al, 2001, Nat Rev Mol Cell Biol, 2, 202).

이러한 유비퀴틴(Ubiquitin) 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15)은 그 카르복시 말단에 4~6개의 아미노산으로 구성된 펩티드 또는 특정 리보솜 단백질과 융합된 형태의 전구물질로 만들어진다. 특히 유비퀴틴은 단량체가 아니라 여러 개의 유비퀴틴 분자가 직렬로 연결된 유비퀴틴 중합체의 형태로 만들어지기도 한다.

그러므로 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질들이 활성을 나타내기 위해서는 전구체 형태로 만들어진 단백질의 카르복시 말단이 절단되어야 하며 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질의 카르복시 말단을 절단하는 단백질 분해효소의 활성은 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질의 단량체를 생성하여 생체 내에서 여러 기능을 수행할 수 있도록 하는데 필수적이다 (Hershko et al, 1998, 67, 425, review).

이러한 단백질 분해효소는 주요 조절 단백질과 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질 사이의 해리 과정을 수행하여 단백질의 인산화/탈인산화의 과정처럼 세포의 생리적 기능을 가역적으로 조절하는 기능을 수행한다.

이러한 기능을 수행하는 유비퀴틴 특이적 분해 효소인 탈유비퀴틴 효소(DUB, (DeUbiquitinating enzyme)는 시스테인(Cystein) 단백질 분해효소에 속하는 유비퀴틴 특이적 분해효소(UBP, ubiquitin-specific processing protease) 그룹과 유비퀴틴 카르복시 말단 가수분해효소(UCH, ubiquitin C-terminal hydrolase) 그룹으로 나뉜다(Tobias; Varshavsky, 1991, J Biol Chem 266, 12021; Pickart, Rose, 1985, J Biol Chem, 260, 7903).

유비퀴틴 유사 단백질 중의 하나인 SUMO의 경우에는 그 특이적 분해 효소로 효모의 유비퀴틴 유사 단백질 특이적 분해효소1(Ulp1, ubiquitin-like protein specific protease 1)과 유비퀴틴 유사 단백질 특이적 분해효소2(Ulp2, ubiquitin-like protein specific protease 2), 포유동물의 SUMO 특이적 분해효소1(SUSP1, SUMO-specific protease 1), 센트린 특이적 분해효소(SEN1, sentrin-specific protease 1), 스테롤 메틸트랜스퍼라제3(SMT3, sterol methyltransferase 3) 특이적 이소펩티다아제1(SMT3IP1, SMT3-specific isopeptidase 1), 그리고 스테롤 메틸트랜스퍼라제3(SMT3) 특이적 이소펩티다아제2(SMT3IP2, SMT3-specific isopeptidase 2) 등이 있으며 이들도 DUB 효소와 유사하게 SUMO와 결합 단백질 사이의 이소펩티드 결합을 절단하여 SUMO를 제거하는 것으로 보고되었다(Gong et al, 2000, J Biol Chem, 275, 3355; Nishida et al, 2000, Eur J Biochem, 267, 6423; Kadoya et al, 2002, Mol Cell Biol, 22, 3803).

유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질과 그 특이적 분해효소들은 여러 가지 인간 질병들에 직, 간접적으로 연관되어 있음이 계속 보고되고 있다. 그 예로, 알츠하이머병이나 헌팅턴병과 같은 신경퇴행성 질병에서는 유비퀴틴 중합체가 결합된 단백질의 축적이 하나의 증상으로 나타나고, 비정상적인 각막의 발생, 터너증후군, X-염색체와 연관된 난소암 등과 관련된 유전자들은 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질 분해효소의 특징으로 알려져 있는 보존된 시스테인/히스티딘 (Cystein/Histidin) 부위의 염기서열과 매우 유사한 서열을 가지고 있다(Sakamoto KM, 2002, Mol Genet Metab, 77, 44). 이와 같은 증거들은 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질 분해효소의 과다 발현 또는 결여에 의하여 상기 질병들이 유발될 수 있음을 강력히 시사한다.

예전부터 단백질 분해효소의 활성을 측정하는 방법으로는 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질에서 특이적 단백질 분해효소가 인지하는 부위를 포함한 단백질을 발현시키고 이와 동시에 시스(cis) 혹은 트랜스(trans)로 작용하도록 단백질 분해효소를 발현시킨 후 SDS-폴리아크릴아마이드 겔(SDS-polyacrylamide gel) 상에서 전개되는 패턴의 상이성을 관찰하여 활성 여부를 판단하는 방법이 있다.

이러한 활성측정 방법은 기존에 단백질 분해효소에 대한 연구에 좋은 정보를 주었으나 이를 위한 전기영동에 많은 시간과 노력이 소모되었고 또한 때에 따라서는 각 결과물들을 각각의 해당 단백질에 대한 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅 등을 행하여야 하는 단점을 가지고 있었다.

또한 유비퀴틴 뒤에 MHISPPPESEEEEEHYC의 서열을 갖는 펩타이드(이하 PEST)를 융합시켜 Ub-PEST를 만든 후 PEST 서열 내의 타이로신(Tyrosine)기에 요오드-비드(iodo-bead)를 이용하여 방사성 물질인 ^{125}I 를 표지한 기질을 사용하는 방법이 있다. 방사선이 표지된 Ub-PEST ^{125}I 를 DUB 효소와 반응시키면 ^{125}I 가 표지되어 있는 PEST 펩타이드는 유비퀴틴(Ubiquitin)으로부터 떨어져 나오게 된다. 이 반응물에 강산인 트리클로로 아세트산(TCA, trichloro acetic acid)를 처리하면 유비퀴틴 부분은 변성되어 침전되고 DUB 효소에 의해 떨어져 나온 PEST 펩타이드 부분은 상층액에 녹아 있는 상태가 된다. 이 상층액의 방사능을 방사능 측정기를 이용하여 측정하면 DUB 효소의 활성을 측정할 수 있다(Lee et al, 1998, Biol. Proced. Online 1, 92).

그러나 상기 방법은 인체에 유해한 방사능 물질을 사용해야하는 위험성과 방사능 실험 장비와 시설이 갖추어진 곳에서만 실험을 해야 하는 번거로움을 지닌 단점이 있었다.

또한 유비퀴틴의 C 말단의 네 개의 아미노산과 동일한 서열을 가진 펩타이드와 형광물질인 7-아미도-4-메틸쿠마린(AMC, 7-amido-4-methylcoumarin)를 이용해 N-벤질옥시카르보닐-루신-아르기닌-글리신-글리신-7-아미도-4-메틸쿠마린(Z-LRGG-AMC, N-benzyloxycarbonyl-Leu-Arg-Gly-Gly-7-amido-4-methylcoumarin)을 만들거나 유비퀴틴의 카르복시 말단에 형광 물질인 AMC를 결합시킨 Ub-AMC를 이용하는 활성 측정방법이 있다. 만들어진 Z-LRGG-AMC 또는 Ub-AMC와 유비퀴틴 특이적 단백질 분해효소를 반응시킨 후 이 반응물에서 나오는 형광의 양을 형광측정기를 통해 측정하면 AMC는 아미노산에 결합되어 있을 때와 결합되어있지 않을 때 나오는 파장이 다르므로 특정 파장에서의 형광 변화를 통해 유비퀴틴 특이적 분해효소의 활성을 측정할 수 있다.

이 방법은 한 번 정제한 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질에 값비싼 형광물질을 표지하는 반응을 수행해야 하고 이 반응물로부터 다시 원하는 단백질을 정제해 내야하는 등 실험 수행을 위한 과정이 복잡한 단점이 있었다(Stein et al, 1995, Biochemistry, 34, 12616; Dang et al, 1998, Biochemistry, 37, 1868).

앞에서 언급한 바와 같이 종래 사용되던 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질에 대한 특이적 분해효소의 활성측정 방법들은 위험성, 비경제성, 번거로움 등의 단점을 지니고 있었다. 반면 최근에 보고되고 있는 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질 또는 이들에 대한 특이적 분해효소가 여러 생명 현상 및 질병과 연관되어 있다는 연구결과들은 좀 더 효율적이고 신속하며 경제적인 효소 활성 측정법의 개발이 필요함을 보여준다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

상기 문제점을 해결하기 위하여 본 발명은 정량적인 활성측정이 가능하고 신속, 간단하며 효율적인, 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

특히, 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질의 특이적 분해효소의 새로운 활성 측정 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

- (1) 특정 기질단백질의 특이적 분해효소에 의해 절단되는 부위를 포함하는 폴리펩티드의 카르복시 말단에는 에코틴을 융합시키고 아미노 말단에는 GST, GFP, MBP로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질을 융합시켜서 융합 단백질을 얻는 단계;
- (2) 상기 융합 단백질을 기질로 상기 특정 기질단백질 분해효소와 기질-효소 반응을 수행하는 단계; 및
- (3) 상기 기질-효소 반응의 반응물을 가열한 후 원심분리하여 상층액을 분리하고, 상기 상층액의 트립신 활성 억제도를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법을 제공한다.

본 발명의 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법은 GST, GFP, MBP로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질의 분자량이 20,000 내지 50,000달톤일 수 있다.

본 발명의 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법은 특정 기질단백질이 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질일 수 있다.

본 발명의 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법은 유비퀴틴 유사 단백질이 UFM1, SUMO, NEDD8 및 ISG15로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

또한 본 발명은 특정 기질단백질의 특이적 분해효소에 의해 절단되는 부위를 포함하는 폴리펩티드의 카르복시 말단에는 에코틴을 융합시키고 아미노 말단에는 GST, GFP, MBP로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질을 융합시켜서 얻어진 융합 단백질을 제공한다.

본 발명의 융합 단백질은 GST, GFP, MBP로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 단백질의 분자량이 20,000 내지 50,000 달톤일 수 있다.

본 발명의 융합 단백질은 특정 기질단백질이 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질일 수 있다.

본 발명의 융합 단백질은 유비퀴틴 유사 단백질이 UFM1, SUMO, NEDD8 및 ISG15로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

또한 본 발명은 전술한 융합 단백질을 발현시키는 벡터를 제공한다.

또한 본 발명은 전술한 벡터에 의해 형질 전환된 것을 특징으로 하는 형질전환체를 제공한다.

이하 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

본 발명은 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법을 제공하는데 상기 특정 기질단백질로서, 유비퀴틴(Ubiquitin) 또는 발생과정상 억제발현되는 신경 전구세포 유전자(NEDD8, neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 8), 작은 유비퀴틴 유사 변형체(SUMO, small ubiquitin-like modifier), 인터페론 자극 유전자 15(ISG15, interferon stimulated gene 15), 유비퀴틴 형태 변형체 1(UFM 1, ubiquitin fold modifier 1) 등의 유비퀴틴 유사 단백질을 대표적인 예로 들어 설명한다.

본 발명에서 효소-기질 반응의 기질로 사용되는 융합 단백질은 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질의 절단 부위의 카르복시 말단에는 트립신 활성 억제 단백질인 에코틴 단백질을 융합시키고, 아미노 말단에는 글루타티온 S-전달효소(GST, glutathione S-transferase), 녹색형광단백질(GFP, green fluorescent protein), 맥아당결합단백질(MBP, maltose-binding protein) 등을 예로 들 수 있는 25,000 내지 50,000 달톤의 분자량을 가지는 단백질을 함유한다.

본 발명에서는 상기 융합 단백질을 기질로 사용하여 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 분해효소와 효소-기질 반응을 시켜 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 분해효소의 활성을 측정하는 것이다.

본 발명의 상기 융합 단백질은 유비퀴틴(Ubiquitin) 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15) 특이적 분해효소의 기질 단백질의 카르복시 말단에 트립신의 억제제로 작용하는 에코틴 단백질을 함유하게 되는데, 구체적으로 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질의 종류에 따라 이는 Ub-Ecotin, SUMO-Ecotin, ISG15-Ecotin 또는 UFM1-Ecotin 등으로 명명된다.

상기 본 발명의 융합 단백질은 GST, GFP, MBP 등의 단백질, 유비퀴틴(Ubiquitin) 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15) 특이적 분해효소의 기질 단백질의 절단부위에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드, 그리고 에코틴 단백질을 코딩하는 유전자 또는 올리고 뉴클레오티드를 유전자 재조합 기술을 사용하여 결합시키고, 이를 발현시킴으로써 제조될 수 있다.

상기 본 발명의 융합 단백질을 기질로 이용하여, 단백질 분해효소 특히, 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 특이적 분해효소와 효소-기질 반응을 수행하고 그에 따른 산출물을 이용하여 트립신에 대한 저해도를 측정함으로써 유비퀴틴(Ubiquitin) 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 특이적 분해효소의 활성을 측정할 수 있다.

즉, 상기 본 발명의 융합 단백질로 된 기질에 단백질 분해효소를 첨가하여 기질의 절단 부위의 카르복시 말단에 융합되었던 에코틴이 본래의 기질로부터 떨어져 나간 후 이 반응물을 100℃에서 5분간 가열하고 13,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하면 본 발명의 기질 단백질의 절단 부위의 아미노 부위에 있는 GST, GFP 또는 MBP 등과 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질이 융합되어 있는 부분은 GST, GFP 또는 MBP 등의 변성에 의해 침전되고, 상층액에는 열에 안정한 에코틴 단백질만 남아 있게 되는데 이 상층액에 존재하는 에코틴 단백질의 트립신의 활성 저해도를 측정하면 그 저해도에 따라 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 특이적 분해효소의 활성 정도를 측정할 수 있다.

본 발명의 기질 단백질의 절단 부위의 아미노 부위에 있는 GST, GFP 또는 MBP 등은 예시에 불과하며, 상기 에코틴 단백질보다 열에 대한 안정성이 떨어지는 단백질이어서 에코틴 단백질의 변성이 일어나지 않는 온도에서도 열에 의한 변성이

일어나 그 온도범위에서 가열할 경우 에코틴 단백질은 침전이 일어나지 않는 반면에 쉽게 변성되어 침전 가능하며 동시에 단백질 정제에 응용할 수 있는 단백질이라면 본 발명의 기질 단백질의 절단 부위의 아미노 부위에 융합되는 단백질로 사용 가능하다.

또한 본 발명의 융합 단백질을 기질로 사용하여 단백질 분해효소와 효소-기질 반응을 시킴에 있어서, 활성 조절 후보 물질을 첨가시키면 저해제 또는 저해제 후보물질의 저해활성을 빠르고 쉽게 측정할 수 있다. 이러한 방법은 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 특이적 분해효소의 활성 조절 물질을 개발하기 위하여 많은 후보 물질들의 일차검색(primary screening)에 유용하게 사용할 수 있다. 즉, 상기 본 발명의 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 특이적 분해 효소의 활성을 측정하는 방법은 이들 효소의 활성을 조절하는 물질을 찾아내는데 응용될 수 있다. 이는 상기의 기질-효소 반응을 해당 물질이 얼마나 변화시키는가를 해당 물질이 없을 경우의 효소의 활성도와 저해제가 있을 경우의 단백질 분해효소의 활성도를 비교함으로써 측정할 수 있다.

이상에서 단백질 분해효소의 활성을 측정하는 방법을 유비퀴틴(Ubiquitin) 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 특이적 분해효소의 활성을 측정하는 방법을 중심으로 기술하였으나 이는 하나의 예시에 불과하며, 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 특이적 분해효소와 같이 기질의 특정 서열 부위를 절단하는 활성을 가지는 단백질 분해효소의 활성을 측정하는데 광범위하게 적용할 수 있다. 즉, 본 발명의 융합 단백질에서 유비퀴틴 또는 유비퀴틴 유사 단백질(UFM1, SUMO, NEDD8, ISG15 등) 특이적 분해효소에 의하여 절단되는 부위를 포함하는 폴리펩타이드 대신에 해당 단백질 분해효소의 기질 중 그 단백질 분해효소에 의하여 절단되는 부위를 포함하는 폴리펩타이드를 이용하여 융합 단백질을 구성하고, 그 융합 단백질을 기질로 사용하여 해당 단백질 분해효소와 기질-효소 반응을 시키는 과정에서 본 발명의 방법을 적용함으로써 해당 단백질 분해효소의 활성을 측정할 수 있다.

이하에서는 본 발명을 구체적인 실시예에 의하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기의 실시예가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

하기 참조예는 재조합 단백질의 발현을 위하여 요구되는 통상적인 조작을 기술하였으며, 실시예는 본 발명의 융합 단백질의 발현 및 단백질 분해효소의 활성측정에 대하여 기술하였다.

<참조예 1> 제한효소를 이용한 DNA의 절단 및 절편 회수

사용된 제한효소와 완충용액은 다카라(Takara)사로부터 구입하였으며 멸균된 1.5ml 에펜도르프 튜브에서 보통 반응부피가 20μl 내지 30μl 이 되도록 하여 37℃의 반응온도에서 2내지 3시간 동안 반응시켰다. 제한효소 반응에 사용한 10배 완충용액의 조성은 다음과 같다.

- 1) 10배 TAKARA 완충용액 K : 200mM 트리스-HCl, 100mM MgCl₂, 10mM 디치오프레이톨, 1M KCl, pH 8.5
- 2) 10배 TAKARA 완충용액 M : 100mM 트리스-HCl, 100mM MgCl₂, 10mM 디치오프레이톨, 500mM NaCl, pH 7.5

DNA 절편의 회수는 전기영동된 아가로즈 겔을 에티듐브로마이드로 염색하여 원하는 절편을 절단한 후 JBI사의 젤 엑스트랙트(Gel Extract) 키트를 사용하여 분리해내었다.

<참조예 2> 접합반응(ligatin reaction)

접합반응에는 접합효소를 리가제(Gibco-BRL사)와 10배 접합 완충용액(660μM 트리스-HCl, pH7.5, 50μM MgCl₂, 10mM 디치오에리스티톨, 10mM ATP)을 사용하여 보통 20μl의 부피에서 10단위 연결효소를 사용하였다. 반응조건은 보통 16℃에서 적어도 5시간 이상 반응시켰다.

<참조예 3> 대장균 형질전환

대장균 숙주세포로는 E.coli XL1blue 를 사용하였다. 숙주세포를 500ml의 액체배지(1%박토-트립톤, 5% 효모 추출물, 1% NaCl)에 접종한 후 600nm에서의 흡광도 값이 0.5 내지 1.0이 될 때까지 37℃에서 진탕배양하였다. 그 후 원심분리를 통해 세포를 수확한 후 차가운 증류수 500ml로 두 번 씻어 주었다. 그리고 차가운 10% 글리세롤 용액을 4ml 가하여 세포들을 균일하게 분산시켰다. 상기에서 수득한 세포 현탁액 중 50μl을 취하여 접합반응 혼합물 2ul을 가하고 0℃에서 2분간

정치시켰다. 이후 바이오-래드(Bio-rad)사의 일렉트로포레이터(electroporator)를 사용하여 2.5kV의 전기충격을 가한 후 1ml의 LB용액(Luria-Bertani Medium)을 넣어주고 1시간 동안 37℃에서 배양하였다. 배양이 끝난 후 배양액을 50 μ g/ml의 엠퍼실린을 함유하는 고체 배지에 넣고 도포하고, 37℃에서 밤새 배양하여 콜로니가 형성되도록 하였다.

<참조에 4> 올리고 뉴클레오타이드(중합효소 연쇄반응에 사용하는 프라이머)의 합성

바이오니어(Bioneer)사의 올리고 뉴클레오타이드 합성 서비스를 이용하였다.

<참조에 5> 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)

주형 100ng, 5 μ l의 10배 완충용액(10mM 트리스-HCl, pH8.8, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% 트리톤 X-100), 2 μ l의 dNTP혼합용액(dATP, dGTP, dCTP, dTTP가 각각 2.5mM), 프라이머 50ng씩, 0.5 μ l의 taq 폴리머레이즈를 넣은 후 증류수를 가하여 총 부피를 50 μ l로 하였다. 온도순환기(GeneAmp PCR system 2700, Applied Biosystems사)를 이용하여 순환프로그램은 95℃, 30초; 55℃, 30초; 72℃, 30초 순환을 30회 반복하였다. 반응 후 반응 산물은 아가로스 젤을 이용해 전기 영동을 한 후 에티뮴브로마이드로 염색하여 원하는 절편을 절단한 후 JBI사의 젤 익스TRACT(Gel Extract) 키트를 사용하여 분리해 내었다. 상기 DNA는 다음 실험에 적당량 사용하였다.

<실시에 1> 재조합 단백질을 발현하는 플라스미드 pQE30-GST-Ub-Ecotin의 제조

(단계1) 에코틴을 지닌 플라스미드의 제조

에코틴을 갖는 플라스미드를 만들기 위해 서열번호 1의 프라이머 Ecotin-F(Kpn I) 및 서열번호 2의 프라이머 Ecotin-R(HindIII)를 합성하였다. 상기 프라이머를 이용하여 에코틴 전체 유전자가 들어있는 플라스미드 pBS-Ecotin으로부터 에코틴 부분만을 중합효소 연쇄반응을 통해서 얻었다. 얻어진 에코틴 유전자를 Takara 완충용액 M에서 제한효소 Kpn I 과 HindIII로 절단한 후 아가로스 젤 상에서 분리해 내었다. 접합반응에서 사용될 벡터 pQE30(Qiagen)을 Takara 완충용액 M에서 제한효소 Kpn I 과 HindIII로 절단한 후 아가로스 젤 상에서 분리해내었다. 상기에서 얻어진 에코틴 유전자 10 μ l 와 절단한 벡터 pQE30 4 μ l에 리가제 10단위체를 가하고 총부피가 20 μ l가 되도록 증류수를 가한 다음 16℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이어서 대장균 E.coli XL1blue를 형질전환시켜 원하는 재조합 플라스미드를 찾아 pQE30-Ecotin 이라 명명하였다.

(단계2) 유비퀴틴-에코틴 융합 유전자가 들어있는 플라스미드의 제조

에코틴과 유비퀴틴을 융합시키기 위해 서열번호 3의 프라이머 Ub-F(BamH I) 및 서열번호 4의 프라이머 Ub-R(Kpn I)을 합성하였다. 상기 프라이머를 이용하여 유비퀴틴 전체 유전자가 들어있는 pET-Ub로부터 유비퀴틴 부분만을 중합효소 연쇄반응을 통해 얻었다. 얻어진 유비퀴틴 유전자를 Takara 완충용액 K에서 제한효소 BamH I 과 Kpn I 으로 절단한 후 아가로스 젤 상에서 분리해 내었다. 접합반응에서 사용될 벡터 pQE30-Ecotin을 Takara 완충용액 K에서 제한효소 BamH I 과 Kpn I 으로 절단한 후 아가로스 젤 상에서 분리해 내었다. 상기에서 얻어진 유비퀴틴 유전자 10 μ l와 절단한 벡터 pQE30-Ecotin 4 μ l에 리가제 10단위체를 가하고 총부피가 20 μ l가 되도록 증류수를 가한 다음 16℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이어서 대장균 E.coli XL1blue에 형질전환시켜 원하는 재조합 플라스미드를 찾아 pQE30-Ub-Ecotin 이라 명명하였다.

(단계3) GST-유비퀴틴-에코틴 융합 단백질을 발현하는 플라스미드의 제조

pQE30-Ub-Ecotin에 GST 유전자를 집어넣기 위해 서열번호 5의 프라이머 GST-F(BamH I) 및 서열번호 6의 프라이머 GST-R(BamH I)를 합성하였다. 상기 프라이머를 이용하여 GST 유전자가 들어있는 플라스미드 pGEX5T-1 (Pharmacia)으로부터 GST부분만을 중합효소 연쇄반응을 통해 얻었다. 얻어진 GST 유전자를 Takara 완충용액 K에서 제한효소 BamH I 으로 절단한 후 아가로스 젤 상에서 분리해내었다. 접합 반응에 사용될 벡터 pQE30-Ub-Ecotin을 Takara 완충용액 K에서 제한효소 BamH I 으로 절단하고 Takara 탈인산화효소 CIAP를 처리한 후 아가로스 젤 상에서 분리해내었다. 상기에서 얻어진 GST 유전자 10 μ l와 절단한 벡터 pQE30-Ub-Ecotin 4 μ l에 리가제 10단위체를 가하고 총부피가 20 μ l이 되도록 증류수를 가한 다음 16℃에서 12시간 동안 반응시켰다. 이어서 대장균 E.coli XL1blue로 형질전환시켜 원하는 재조합 플라스미드를 찾아 pQE30-GST-Ub-Ecotin이라 명명하였다.

<실시에 2> his-GST-Ub-Ecotin 기질 단백질의 발현 및 정제

(단계1) GST-유비퀴틴-에코틴 융합 단백질의 유도실험(induction test)

융합단백질을 발현할 수 있는 플라스미드(pQE30-GST-Ub-Ecotin)를 대장균 M15[pREP4]에 형질전환시켜 37℃의 고체 배지에서 하루동안 배양하였다. 다음 날 형성된 콜로니를 60μg/ml 농도의 엠펜실린과 카나마이신을 함유하는 3ml의 LB 액체배지(Luria-Bertani Medium)에 접종하고 37℃에서 약 3시간 배양하였다. 여기에 IPTG (Isopropylthiogalactoside)를 최종 농도가 1μM이 되게 첨가하고 다시 37℃에서 3시간 더 배양하였다. 배양이 끝난 후 1ml의 배양액을 취하여 원심분리기를 통해 세포만을 얻었다. 이 세포들을 100μl의 1× 시료 로딩 완충용액(sample loading buffer)를 첨가하여 잘 섞어주었다. 상기에서 얻어진 혼합물을 5분간 끓인 후 상온에서 식히고 나서 10μl을 취하여 12% SDS-PAGE를 수행 후 쿠마지(Coomassie brilliant blue) 염색을 통해 융합단백질의 발현 여부를 관찰하였다.

(단계2) 수용성 융합단백질의 발현 및 정제

상기 단계 1에서 형질전환된 대장균 세포를 엠펜실린과 카나마이신이 50μg/ml첨가된 LB 배지에서 37℃에서 밤새 배양한 후 그 배양액 10ml을 1리터의 LB 배지에 넣어주고 계속 배양하였다. 37℃에서 진탕배양하여 박테리아의 흡광도가 650nm의 파장에서 약 0.4 정도가 될 때 최종농도 0.4mM가 되도록 IPTG(Isopropylthiogalactoside)를 첨가하였다. IPTG를 첨가한지 약 4시간 후에 배양을 멈추고 원심분리기(Sorvall RC5C plus, SS-34 rotor)를 이용하여 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 박테리아 세포 침전물을 수거하였다. 정제에 앞서 세포

를 -20℃에서 얼려 세포의 파괴가 쉽게 일어나도록 하였다. 1리터 배양에서 얻어진 재조합 대장균 세포 침전물에 약 100ml의 완충용액(25mM 트리스, pH 8.0, 1mM EDTA, 0.2N NaCl)을 가하여 현탁시킨 후 얼음 중탕 안에서 초음파 분쇄기(Sonics; Vibra Cell, USA)로 50%의 출력과 50%의 효율 싸이클(duty-cycle)에서 약 3분간 초음파 처리하여 세포를 파괴시켰다. 2분간 얼음 중탕안에서 방치한 후 상기와 같은 파쇄과정을 2회 반복하여 완전히 세포가 파쇄되도록 하였다. 이렇게 하여 얻은 세포 균질액을 고속원심분리기(Sorvall RC5C plus, SS-34 rotor)로 13,000rpm에서 30분간 원심분리하여 가용성 단백질이 녹아 있는 상층액을 얻었다.

한편으로는 GST가 융합된 단백질을 분리하기 위하여 글루타치온 세파로스 4B 칼럼(Glutathione Sepharose 4B column)을 준비하였다. 이 칼럼을 미리 완충용액 2(0.1M 트리스-HCl, pH8.5, 0.5M NaCl)로 5배정도 베드 볼륨으로 씻어주었다. 이어서 완충용액3(0.1M 나트륨 아세테이트, pH7.5, 0.5M NaCl)로 5배 정도 베드 볼륨으로 다시 씻어주었다. 이 과정을 3회 반복하여 칼럼을 충분히 세척한 후 마지막으로 인산염 완충용액(0.14M NaCl, 27mM KCl, 1.5mM KH₂PO₄, 8.1mM Na₂HPO₄, pH7.4) 10 베드 볼륨으로 세척하여 최종준비를 마쳤다.

이 평활화한 글루타치온 세파로스 4B 칼럼(Pharmacia Biotech AB, Sweden)에 상기에서 얻은 가용성 단백질이 녹아 있는 상층액을 분당 2ml의 속도로 통과시켰다. 이어서 30베드 볼륨 이상의 인산염 완충용액을 칼럼에 흘려 수지에 흡착되지 않은 단백질을 제거하였다. 그 다음 글루타치온 용출 완충용액(50mM 트리스-HCl, pH7.5, 10mM 환원된 글루타치온)을 가하여 수지에 흡착되어 있던 단백질들을 분당 2ml의 속도로 용출시켜 흡착되어 있던 단백질들을 수집하였다. 수집된 단백질을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 하여 정제된 단백질의 대략적인 분자량과 순도를 확인하였다. 순도는 95%이상이었으며 대략적인 분자량은 52,000달톤 정도로 나타났다. 이를 도 3에 나타내었다. 도 3의 제1열 C는 정제된 his-GST-Ub-Ecotin을, 제2열 M은 유비퀴틴의 76번째 아미노산 글라이신(Glycine)을 알라닌(Alanine)으로 변형시킨 정제된 his-GST-Ub (G76A)-Ecotin을 나타낸 것이다.

이 단백질 시료를 희석막(Dialysis membrane)을 이용하여 글루타치온이 제거된 단백질만을 얻었다. 이 때 사용된 방법은 제조자의 지시에 따라 하였으며, 사용된 완충용액은 50mM 트리스-HCl, pH7.5였다. 또한 이 단백질은 pQE30 플라스미드에서 발현시켰기 때문에 GST의 아미노말단에 6개의 히스티딘(histidine) 아미노산이 결합되어 있다.

<실시예 3> 단백질 분해효소와 his-GST-Ub-Ecotin 기질단백질을 이용한 단백질 분해효소 활성 측정방법

단백질 분해효소의 활성측정방법을 확립하기 위하여 먼저 본 발명자들의 선행 특허출원(출원번호 제10-2003-0021548)인 쥐의 유비퀴틴 특이적 분해효소 UBP69를 정제하였다. 이 정제된 단백질 분해효소의 분해 활성도를 상기 실시예 2의 단계 2에서 정제된 his-GST-Ub-Ecotin 기질 단백질을 사용하여 확인하였다. his-GST-Ub-Ecotin 기질 단백질은 도 1에서 보는 바와 같이, 유비퀴틴의 아미노 말단에 GST 단백질이 붙어 있으며, 카르복시 말단에는 에코틴 단백질이 붙어 있어 기질이 단백질 분해효소에 의해 특이적으로 분해되면 카르복시 말단의 에코틴이 본래의 기질 단백질로부터 떨어져 나가게 된다.

적합한 활성도를 측정하기 위해 100mM 트리스, 1mM 1,4-디티오-DL-트레이톨(DTT, 1,4-dithio-DL-threitol), 1mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid), 5% 글리세롤을 포함하는 pH7.8의 완충용액에서 기질인 his-GST-Ub-Ecotin 1 μ g과 적당한 양의 유비퀴틴 특이적 분해효소 UBP69를 포함하는 50 μ l의 용액을 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때 일어나는 반응을 도 3에서 SDS-PAGE 결과를 통해 확인할 수 있다. 앞의 반응물의 반응을 종료시키기 위하여 150 μ l의 0.1% 보빈 세럼 알부민(BSA, Bovine serum albumin)를 첨가하고 100℃에서 10분간 가열하였다. 이 시료를 4℃ 13,000rpm에서 10분간 고속원심 분리를 하고 열에 강한 가용성 에코틴이 녹아 있는 상층액을 취하였다. 상층액 10 μ l을 취하여 2ng의 트립신, 50 μ l의 완충용액(200mM 트리스, 40mM 염화칼슘, pH 8.0)을 섞고 증류수를 이용하여 총 부피 90 μ l로 맞추고 상온에서 10분간 배양하였다. 이 시료에 트립신의 활성을 측정하는 형광 기질인 N-벤조일-아르기닌-7-아미도-4-메틸쿠마린(Bz-R-AMC, N-benzoyl-Arg-7-amido-4-methylcoumarin)을 1mM 농도의 것을 10 μ l 첨가하여 전체 부피가 100 μ l가 되게 하였다. 이 시료를 형광측정기(FLUOSTAR optima)를 이용해 트립신의 활성을 7-아미도-4-메틸쿠마린(AMC, 7-amido-4-methylcoumarin)의 형광을 통하여 측정하였다. (활성파장 : 355nm, 방출파장 : 460nm)

도 4는 이 결과를 나타낸 것이다. 유비퀴틴 특이적 분해효소인 UBP69의 양이 늘어날수록 기질 단백질에서 에코틴이 떨어져 나와 트립신의 활성을 더 많이 억제하는 것을 도 4에서 확인할 수 있다.

이상, 본 발명을 실시예를 들어 설명하였으나 본 발명은 이에 제한되지 않는다.

즉, 본 발명의 기술적 구성은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자가 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해되어야 한다.

발명의 효과

이상에서 살펴 본 바와 같이, 본 발명의 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 측정 방법을 사용할 경우 트립신 활성의 억제 정도를 통해 형광 측정기상에서 빠르게 그리고 간단하고 효율적으로 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성을 측정할 수 있다.

또한 본 발명은 특정 기질단백질의 특이적 분해효소의 활성 조절 후보 물질의 일차검색에 유용하게 사용할 수 있다.

또한 본 발명의 융합 단백질을 기질로 사용하여 단백질 분해효소와 효소-기질 반응을 시킴에 있어서, 활성 조절 물질을 첨가시키면 조절활성을 빠르게 그리고 간단하고 효율적으로 측정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 실시예 1의 과정을 통해 만들어진 GST, 유비퀴틴, 에코틴 융합 단백질을 발현하는 플라스미드의 구조를 나타낸 도면이다.

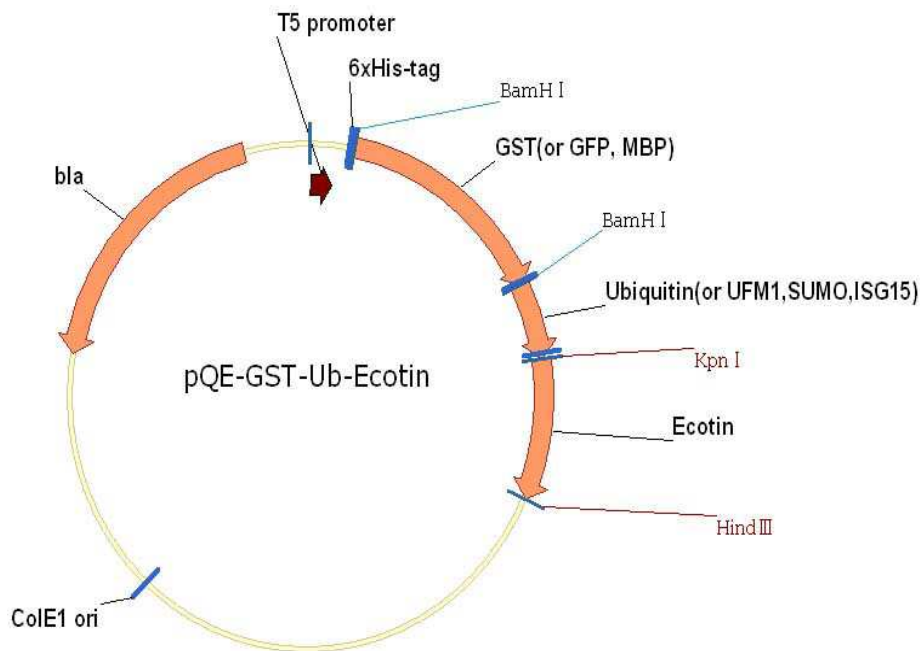
도 2는 실시예 3에서 시행한 활성측정 방법의 개요도이다.

도 3은 실시예 3에서 시행한 반응 과정에서 본 발명의 융합단백질과 다양한 양의 유비퀴틴 특이적 분해효소 69의 중간 반응물의 전기 영동 사진이다.

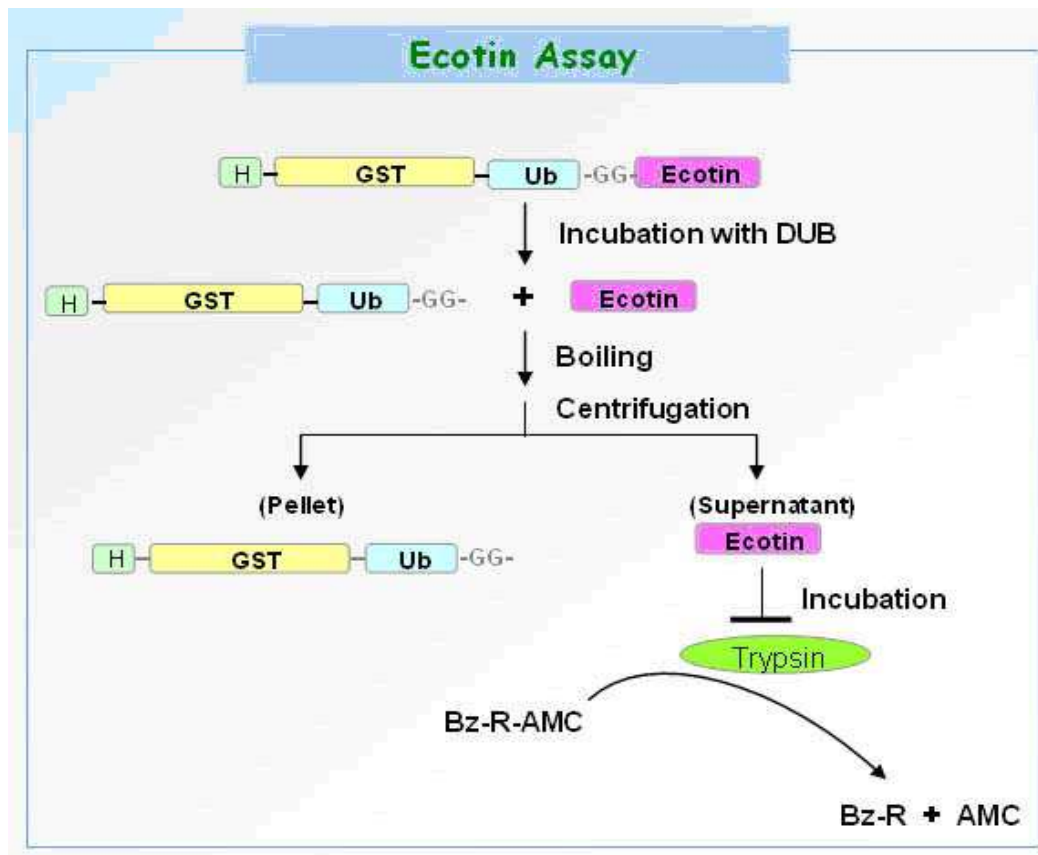
도 4는 실시예 3을 시행하여 나온 트립신 활성 억제 결과를 나타낸 도면이다.

도면

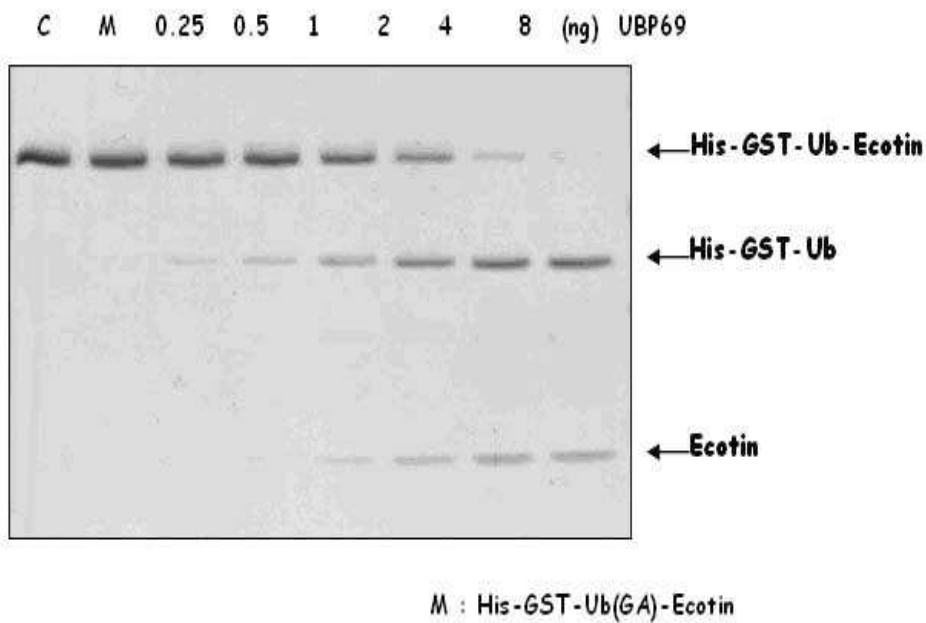
도면1



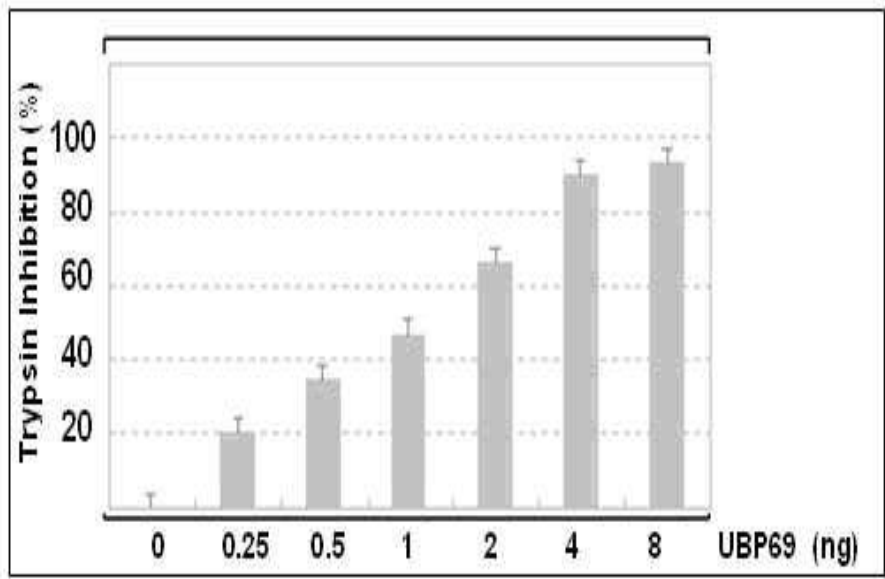
도면2



도면3



도면4



서열목록

서열목록 전자파일 첨부