(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0037271
(43) 공개일자 2013년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 15/62* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0101576
(22) 출원일자 2011년10월06일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
최수영
강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 706호 (후평동, 동아아파트)
음원식
강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더샵아파트 112동 802호 (후평동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강성혜

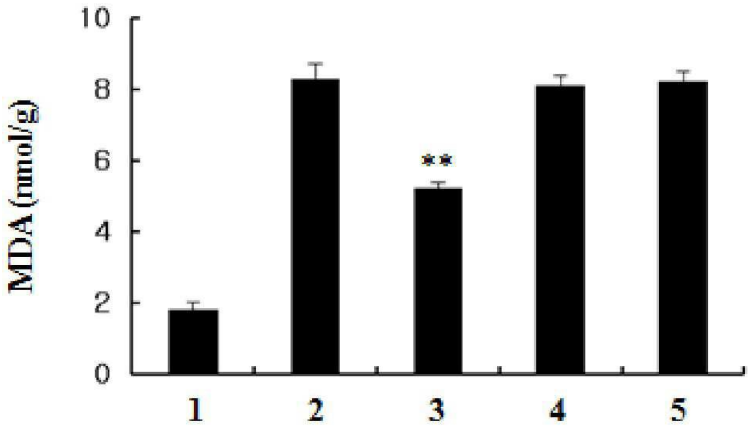
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **세포 투과성 ＤＪ-1 융합단백질**

(57) 요 약

본 발명은 세포 투과성 DJ-1 융합단백질에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 DJ-1 융합단백질이 세포 내로 효율적으로 투과하여 인비트로와 인비보에서 세포사멸을 보호하고, 뇌허혈에 대한 치료제로서의 효능을 밝혔다.

대 표 도 - 도7



(72) 발명자

김대원

강원도 춘천시 칠전서길 15-2, 203동 701호 (칠전동, 대우아파트)

박진서

강원도 춘천시 서부대성로 327, 105동 1404호 (후평동, 동아아파트)

김덕수

충청남도 천안시 동남구 다가6길 6, 그린빌 301호 (다가동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-0093812
부처명	교육과학기술부
연구사업명	대학중점연구소 지원사업
연구과제명	새로운 Biomolecule Delivery System을 이용한 질환 치료제 개발 : 질환치료용 생리활성 고분자 신소재 물질 탐색 및 개발
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.01 ~ 2012.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010K000808
부처명	교육과학기술부
연구사업명	뇌기능 활용 및 뇌질환 치료 기술개발연구사업
연구과제명	간질의 분자적 기전연구 및 새로운 치료제 개발
주관기관	한림대학교 산학협력단
연구기간	2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

HIV Tat 단백질 수송 도메인이 DJ-1의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성(cell-transducing) DJ-1 융합단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 세포 투과성 DJ-1 융합단백질은 서열번호 5, 서열번호 7 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 융합단백질은 DJ-1 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 단백질 수송 도메인이 공유결합된 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌허혈, 신경세포의 사멸(apoptosis) 또는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

DJ-1 단백질 cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 제1항 또는 제2항의 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 6

제5항에 있어서 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드.

청구항 7

세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 발현시키기 위하여 상기 제5항의 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 발현시키는 벡터.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포 투과성 ＤＪ-1 융합단백질에 관한 것으로서, 좀더 구체적으로는 ＤＪ-1 융합단백질이 세포 내로 효율적으로 투과하여 인비트로와 인비보에서 세포사멸을 보호하고, 뇌허혈에 대한 치료제로서의 효능을 밝혔다.

배 경 기 술

[0002] 뇌허혈은 뇌 혈액 공급의 차단으로 발생하며 신경기능 장애 및 신경세포 사멸의 원인이 된다. 활성산소종은 산소와의 상호작용을 포함하는 다양한 세포 프로세스에서 생성되는 자연적이고 불가피한 부산물이다. 활성산소종은 세포 구성요소들과 상호작용하여 그 구조와 기능단백질, 지질 및 DNA와 같은 거대분자에 손상을 입히며, 장기간 활성산소종에 노출되면 병리학적 과정이 현저히 진행되어 세포 사멸에 이르게 된다 [R.A. Floyd, FASEB J. 4 (1990) 2587-2597, B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford. 1999, A. Hald, J. Lotharius, Exp. Neurol. 193 (2005) 279-290]. 활성산소종이 뇌에 미치는 영향은 뇌로의 혈액 흐름 방해 및 재관류를 통하여 설명될 수 있는데, 이는 해마 CA1 부위에 활성산소종을 현저히 증대시켜 최종적으로 신경세포 사멸에 이르게 한다 [M.V. Frantseva et al., Free Radic. Biol. Med. 31 (2001) 1216-1227, P.S. Li et al., Free Radic. Biol. Med. 31 (2001) 1191-1197]. 그러므로, 활성산소종 생성의 조절은 뇌허혈 손상을 방어함에 있어서 매우 중요한 역할을 한다.

[0003] DJ-1 단백질은 PARK7으로도 불리는데, 암유전자로 알려져 있으며, 파킨슨병의 열성 상염색체 (autosomal recessive gene)로도 알려져 있다. DJ-1은 Thi/Pfp1 수퍼패밀리에 속하는 호모다이머(homodimer)이며, 인간에서 이.콜라이까지 매우 ㅈ잘 보존되어(highly conserved) 있으며, 세포질, 핵 및 미토콘드리아에 분포한다 (Bonifati et al., 2003; Gupta et al., 2008; Lee et al., 2003; Nagakubo et al., 1997; Wilson et al., 2004). DJ-1 단백질은 항산화 활성, 샤퍼론-유사 성질 및 전사 조절 등의 다양한 기능을 수행한다 (Menzies et al., 2005; Xu et al., 2005; Zhou et al., 2006). 산화 스트레스에 대한 DJ-1의 보호 기능은 파킨슨 병에서 잘 알려져 있다. 그러나, DJ-1과 뇌허혈의 관계는 명확하게 알려져 있지 않다.

[0004] 단백질 세포도입 기술 (Protein transduction technology)은 포유류 세포 내로 다양한 단백질을 수송하는데 성공적으로 이용되어 왔다. 외래 단백질을 세포 내로 수송하기 위하여 단백질 수송 도메인 (protein transduction domains; PTDs) 또는 세포 침투성 펩타이드 (cell penetrating peptides; CPPs)라 불리는 작은 단백질이 개발되었다 [J.S. Wadia, S.F. Dowdy, Curr. Opin. Biotechnol. 13 (2002) 52-56]. 단백질 수송 도메인과 융합된 융합단백질은 메카니즘은 명확히 밝혀지지 않았지만 인비트로와 인비보에서 치료용 단백질을 운반하는데 이용되어 왔다.

[0005] 그러나, 모든 단백질이 단백질 수송 도메인과 융합단백질을 이루어 세포 내로 투과될 수 있는 것은 아니다. 2001년, 2004년 그리고 2007년에는 Tat 형질도입부위와 결합시킨 단백질이 세포 내로 도입은 되었으나 활성을 나타내지 않는는 연구결과가 논문으로 발표된 사실이 있다 (Sengoku, T. et al. ***Experimental Neurology*** 188(2004) 161-170, Falnes P.O. et al. ***Biochemistry*** 2001 Apr 10;40(14):4349-4358, Daniele Peroni et al., ***Neuroscience letters*** 421(2007) 110-114 등). 즉, 상기 참고논문들을 통하여 세포도입이 용이하지 않은 단백질에 형질도입부위를 융합시킨다고 해서 융합된 모든 단백질이 세포 내로 도입된 후 원활한 활성을 나타내지는 못하고 있음을 알 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 DJ-1 단백질을 이용하여 투과성이 높고 효과가 우수한 뇌허혈 예방 및 치료용 약제학적 조성물을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 Tat-DJ-1 융합단백질을 제조하고 허혈 손상에 대한 보호 효과를 시험하였다. 그 결과 Tat-DJ-1 융합단백질은 인비보와 인비트로에서 세포 내로 원활히 도입되었고, 세포 사멸에 대해 보호작용을 나타내었다. 따라서, 본 발명의 Tat-DJ-1 융합단백질은 뇌허혈, 신경세포 사멸, 파킨슨 병과 같은 신경질환의 예방 및 치료제로서 이용 가능하다.

[0008] 본 발명에서는 먼저, Tat-DJ-1 융합단백질을 과대발현시키고 쉽게 정제할 수 있는 Tat-DJ-1 발현벡터를 개발하였다. 이 발현벡터는 인간 DJ-1 cDNA, HIV Tat 펩타이드 그리고 여섯 개의 히스티딘이 연속적으로 연결되어 있다. 이 발현벡터를 이용하여 Tat-DJ-1 융합단백질을 대장균에서 과대발현시켜 자연상태로 Ni^{2+}-친화 크로마토그래피 컬럼을 이용하여 정제하였다. Tat-DJ-1의 과대발현은 상당히 높게 나타났으며, 이런 결과로 정제된 단백질의 양도 높게 나타났다. 웨스턴 블랏으로 배양된 C6 성상세포종 세포에 정제된 Tat-DJ-1 융합단백질이 농도 및 시간 의존적으로 세포에 운반되는 것을 확인하였다. 세포 내로 투과된 Tat-DJ-1 융합단백질은 세포 내에서 최소 60시간 지속적으로 유지되었다. 또한, 세포 내로 투과된 Tat-1-DJ-1 융합단백질은 과산화수소로 유발시킨 신경세포 사멸을 저해하였다. 뿐만 아니라, 동물실험에서 세포 내로 투과된 Tat-DJ-1 융합단백질은 DNA 조각화에 대한 보호 효과도 나타내었으며, 뇌-혈관 장벽을 원활히 통과하였고, 일시적으로 유발한 전뇌 허혈 손상에 대해 보호 효과를 나타내었다.

[0009] 이러한 결과는 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내로 투과가 잘 일어나고, 세포 내에서 허혈 손상에 대한 보호 기능을 나타내고 있음을 의미한다. 따라서 이러한 Tat-DJ-1 융합단백질은 뇌허혈 등 신경 질환 예방 및 치료 분야에

다양하게 응용될 가능성을 제시해 준다.

[0010] 본 발명은 Tat 단백질 수송 도메인이 DJ-1 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성(cell-transducing) DJ-1 융합단백질을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 세포 투과성 DJ-1 융합단백질이 서열번호 5, 서열번호 7 또는 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 DJ-1의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 단백질 수송도메인이 공유결합된 것을 특징으로 하는 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 뇌허혈, 파킨슨병 또는 신경세포 사멸(apoptosis) 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 DJ-1 cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드가 서열번호 4, 서열번호 6 또는 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 융합단백질을 발현시키기 위하여 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 발현시키는 벡터를 제공한다.

[0017] Tat-DJ-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 주사형태 또는 도포제로 제형화할 수 있다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0018] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 비경구 방식 즉, 피하 투여, 근육 투여 또는 국소적용(topical application)할 수 있으며, 용량은 일일 투여량이 0.001㎍~1㎎/㎏의 양을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명의 융합단백질을 유효성분으로 하는 도포제는 통상적인 제조방법에 따라 어떤 형태로든 용이하게 제조할 수 있다. 일례로서 크림형 도포제를 제조함에 있어서는 일반적인 수중유형(O/W) 또는 유중수형(W/O)의 크림 베이스에 본 발명의 Tat-DJ-1 융합단백질을 함유시키고 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등을 필요에 따라 사용하는 한편, 물성개선을 목적으로 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 병용할 수 있다.

[0020] 본 발명자들은 Tat-DJ-1 융합단백질을 신경 세포 및 뇌에 침투실험한 결과 원활하게 침투하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, Tat-DJ-1 융합단백질을 약제 조성물의 주요성분으로 이용할 수 있음을 밝혔다.

[0021] 본 발명은 DJ-1를 세포 내로 효율적으로 전달하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 DJ-1 단백질 분자의 세포 내 전달은 DJ-1 단백질에 HIV-1 Tat 단백질 수송 도메인이 공유결합된 세포투과성 수송도메인이 공유결합된 형태의 융합단백질을 구성하여 수행된다. 본 발명의 상기 수송도메인의 일례로는 서열번호 3과 같은 아미노산 서열로 이루어진 Tat 펩타이드를 들 수 있다. 그러나, 본 발명의 단백질 수송 도메인이 서열번호 3의 Tat 펩타이드로만 한정되는 것은 아니고, Tat의 아미노산 서열 일부 치환이나 부가, 결여로 Tat 펩타이드와 유사한 기능을 하는 펩타이드를 제조하는 것이 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 당업자에게는 용이하므로, HIV-1 Tat 단백질 수송 도메인과 이로부터 아미노산 일부 치환으로 동일·유사한 단백질 수송기능을 수행하는 단백질 수송 도메인을 이용한 융합단백질도 본 발명의 범위에 속함은 자명하다고 할 것이다.

[0022] 구체적으로, 본 발명은 Tat-DJ-1 융합단백질, 이 융합단백질을 제조하기 위한 재조합 뉴클레오타이드와 벡터,

융합단백질을 포함하는 치료, 예방 목적의 약학 조성물, 피부 외용제 조성물 등에 관한 것이다.

[0023] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0024] "Tat-DJ-1 융합단백질"이란 단백질 수송 도메인과 DJ-1 단백질을 포함하며, 수송 도메인과 화물 분자(cargo molecule, 즉 본 발명에서는 DJ-1를 의미함)의 유전적 융합이나 화학 결합으로 형성된 공유결합 복합체를 의미한다. 본 명세서에서는 "Tat-DJ-1" 또는 "DJ-1 융합단백질"과 혼용하였다.

[0025] 또한, 상기 "유전적 융합"이란 단백질을 코딩하는 DNA 서열의 유전적 발현을 통해서 형성된 선형, 공유결합으로 이루어진 연결을 의미한다.

[0026] 또한, "표적 세포"란 수송 도메인에 의해 화물 분자가 전달되는 세포를 의미하는 것으로서 표적 세포는 체내 또는 체외의 세포를 말한다. 즉, 표적 세포는 체내 세포, 다시 말하여 살아있는 동물 또는 인간의 장기 또는 조직을 구성하는 세포 또는 살아있는 동물 또는 인간에서 발견되는 미생물을 포함하는 의미이다. 또한, 표적 세포는 체외 세포, 즉 배양된 동물 세포, 인체 세포 또는 미생물을 포함하는 의미이다.

[0027] 본 명세서의 "단백질 수송 도메인"은 펩타이드, 단백질과 공유결합을 이루어 별도의 수용체나 운반체, 에너지를 필요로 하지 않고 상기 펩타이드나 단백질을 세포 내로 도입시킬 수 있는 것을 말하며, 예를 들면 Tat 펩타이드(서열번호 3)를 말한다.

[0028] 본 명세서의 "목표 단백질"은 Tat 단백질 수송 도메인과 공유결합을 이루어 세포 내로 도입되어 활성을 나타내는 분자를 의미하며, 구체적으로는 DJ-1를 의미한다.

[0029] 또한, 본 명세서에서는 단백질 또는 펩타이드를 세포 내로 "도입"시키는 것에 대하여 "형질도입", "운반", "침투", "수송", "전달", "투과", "통과"한다는 표현들과 혼용하였다.

[0030] 본 발명은 단백질 수송 도메인이 DJ-1 단백질의 적어도 일측 말단에 공유결합된 세포 투과성(cell-transducing) DJ-1 융합단백질에 관한 것이다. 또한, 유전자의 침묵변이(silent change)에 따라 서열 내에서 하나 이상의 아미노산이 기능적으로 동등하게 작용하는 유사한 극성의 다른 아미노산(들)로 치환될 수 있다. 서열 내 아미노산 치환은 그 아미노산이 속하는 클래스의 다른 구성원들로부터 선택될 수 있다. 예컨대, 소수성 아미노산 분류는 알라닌, 발린, 류이신, 이소류이신, 페닐알라닌, 발린, 트립토판, 프롤린 및 메티오닌을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양성 염기성 아미노산은 아르기닌, 라이신 및 히스티딘을 포함한다. 음성전하를 띤 산성 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 또한, 본 발명의 융합단백질과 아미노산 서열간의 일정 범위의 상동성 예컨대 85-100% 범위 내의 동일 유사한 생물학적 활성을 갖는 절편 또는 이들의 유도체들도 본 발명의 권리범위에 포함된다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 세포 투과성 DJ-1 융합단백질이 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 단백질 수송도메인(protein transducing domain; "PTD")이 DJ-1 단백질의 카복시 말단과 아미노 말단의 일측 또는 양측에 공유결합된 것을 특징으로 한다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 세포 투과성 DJ-1 융합단백질을 유효성분으로 함유하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0034] 또한, 본 발명은 DJ-1 cDNA에 단백질 수송도메인 펩타이드 코딩 DNA 서열이 결합되어 상기 세포도입성 융합단백질을 코딩하는 서열번호 6번을 비롯한 재조합 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 본 발명의 범위는 서열번호 6번의 재조합 폴리뉴클레오타이드뿐만 아니라 유전암호의 축퇴(codon degeneracy)에 의한 서열을 갖는 핵산분자들에도 미친다.

[0035] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 융합단백질을 발현시키기 위하여 상기 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는, 세포 투과성 융합단백질을 발현시키는 벡터에 관한 것이다.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 DJ-1 융합단백질은 성상세포 내로 시간 의존적, 투여량 의존적으로 투과되었으며, 성상세포 내에서 활성산소종에 의한 세포사멸로부터 세포를 보호하였다. 또한, 본 발명의 DJ-1 융합단백질은 뇌-혈관 장벽을 원

활히 투과하여 뇌허혈 손상에 대한 보호효과를 나타내었다. 뿐만 아니라, 본 발명의 DJ-1 융합단백질은 해마에서 뇌허혈에 의해 발생하는 지질 과산화를 현저히 저해하였다.

[0037] 이러한 결과는 본 발명의 DJ-1 융합단백질이 뇌허혈 예방 및 치료제로서 유용함을 말해준다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 Tat-DJ-1 융합단백질의 모식도 (A)와 발현 및 정제된 융합단백질을 12% SDS-PAGE한 결과 (B) 및 항토끼 폴리히스티딘 항체로 웨스턴 블랏 분석한 결과 (C)이다.

레인 1: 유도되지 않은 Tat-DJ-1,

레인 2: 유도된 Tat-DJ-1,

레인 3: 정제된 Tat-DJ-1.

도 2는 Tat-DJ-1 융합단백질을 성상세포 내로 도입한 결과이다. Tat-DJ-1 융합단백질 (0.5-3 mM)과 대조군 DJ-1 단백질을 60 분간 배양배지에 가하였다 (A). 3 mM Tat-DJ-1 융합단백질과 대조군 DJ-1 단백질을 10 ~ 60 분간 배양배지에 가하였다 (B). 3 mM Tat-DJ-1 융합단백질을 침투시킨 세포를 1 ~ 72 시간 동안 배양하였다 (C). 이를 웨스턴 블랏팅으로 분석하였고, 세포 도입된 Tat-DJ-1 융합단백질의 분포는 형광현미경으로 관찰하였다 (D).

도 3은 세포 생존율과 활성산소종 생성에 미치는 세포 도입된 Tat-DJ-1 융합단백질의 영향을 나타낸다. 한 시간 동안 Tat-DJ-1 융합단백질 (1-3 mM)로 미리 처리한 성상세포에 0.7 mM 과산화수소를 가하여 세포생존율을 MTT를 이용한 발생 분석으로 평가하였다 (A). $^{*}P < 0.05$ 및 $^{**}P < 0.01$, 과산화수소 처리한 세포와 비교함. Tat-DJ-1 융합단백질 (3 mM)로 한 시간 처리한 성상세포에 과산화수소 (0.7 mM)를 가하였다. 세포내 활성산소종 수준을 DCFDA 염색으로 평가하였다 (B). 형광강도는 ELISA 판독기로 측정하였다 (C). $^{**}P < 0.01$, 과산화수소 처리한 세포와 비교함.

도 4는 Tat-DJ-1 융합단백질이 과산화수소에 의해 유도된 DNA 조각화 (fragmentation)를 보호함을 나타낸다. 3 mM Tat-DJ-1 융합단백질로 한 시간 처리한 세포를 H_2O_2 (0.7 mM)에 18시간 동안 노출시켰다. DNA 조각화는 TUNEL 염색으로 탐지하였다. 각 막대는 세 번의 실험에서 얻어진 평균 ± 표준편차이다.

도 5는 혈관-뇌 장벽을 가로질러 Tat-DJ-1 융합단백질을 세포도입한 결과이다. 저빌 뇌에서 세포도입된 Tat-DJ-1 융합단백질을 항-히스티딘 항체를 이용하여 면역조직화학 방법으로 분석하였다.

도 6은 CA1 부위의 허혈손상에 대한 Tat-DJ-1 융합단백질의 효과를 나타낸다. 뇌허혈 손상 4일 및 7일 후 저빌 뇌 해마의 CA1 부위에서 크레실 바이올렛 염색한 현미경 사진이다. 음성 대조군 (A, 정상); 양성 대조군 (B, 담체 주사군), 대조군 DJ-1 단백질 (C, D), Tat 펩타이드 (E, F) 및 Tat-DJ-1 융합단백질 (3 mg/kg)을 각각 저빌에 주사하였다 (G-H). 크기 막대는 50 ㎛이다. 값은 각각 대조군과 유의한 차이를 보이는 것이다. $^{**}P < 0.01$.

도 7은 세포도입된 Tat-DJ-1 융합단백질이 뇌 말론다이알데하이드 (malondiadehyde; MDA) 수준에 미치는 영향을 나타낸다. Tat-DJ-1 융합단백질을 뇌허혈 30분 전에 처리하였다. 뇌허혈 손상 후 3시간이 경과하면 해마를 절개하여 MDA를 측정하였다.

레인 1: 샴 수술군

레인 2: 뇌허혈 유도군

레인 3: Tat-DJ-1 융합단백질 처리 대조군,

레인 4: DJ-1 단백질 처리군,

레인 5: Tat 펩타이드 처리군,

뇌허혈 유도군과 비교하여 $^{**}P < 0.01$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 아래의 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것은 아니다. 특히, 아래 실시예에서는 DJ-1 융합단백질로서 Tat-DJ-1만을 예시하였으나, 단백질 수송 도메인이 DJ-1 단백질의 카복시 말단에 융합된 융합단백질 및 양 말단에 융합된 융합단백질 또한 Tat-DJ-1 융합단백질과 유사하게 C6 세포 내로 원활히 도입되며, 세포 내에서 세포사멸을 저하시키는 활성을 나타낸다 (데이터 미기재).

[0040] **세포 및 재료**

[0041] 성상세포는 한국 세포주 연구재단 (서울, 한국)에서 입수한 C6 랫트 성상세포종 (astrocytoma) 세포주를 이용하였다. 세포는 10% 우태혈청 및 항생제 (100 ㎍/㎖ 스트렙토마이신, 100 U/㎖ 페니실린)을 함유한 DMEM 배지에서 37 ℃, 95% 공기 및 5% CO_2 조건으로 배양하였다.

[0042] 플라스미드 pET-15b와 이.콜라이 BL21 (DE3)은 Novagen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. FBS와 항생제는 Gibco BRL (Franklin Lakes, NJ, USA)에서 구입하였다. 올리고뉴클레오타이드는 Gibco BRL custom primers에서 입수하였다. Ni^{2+}-니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우는 Qiagen (Valencia, CA, USA)에서 구입하였다. 합성 Tat 펩타이드는 PEPTRON (Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 기타 화학물질 및 제제는 최상급을 사용하였다.

[0043] **Tat-DJ-1 융합단백질 발현 및 정제**

[0044] HIV Tat 발현벡터는 본 발명자들의 방법에 따라 제조하였다 (Kwon et al., 2000). 인간 DJ-1 단백질의 cDNA 서열은 센스 프라이머 5'-CTCGAGGCTTCCAAAAGAGC-3' 및 안티센스 프라이머 5'-GGATCCCTAGTCTTTAAGAA-3'을 이용하여 PCR 방법으로 증폭하였다. 얻어진 PCR 산물은 TA 클로닝 벡터에 서브클론하고 pTat 발현 벡터와 연결하고 6 히스티딘 오픈 리딩 프레임도 함께 넣어 발현벡터를 제조하고 이. 콜라이 DH5α에 클론하였다.

[0045] 재조합 Tat-DJ-1 플라스미드를 이. 콜라이 BL21에 도입하여 형질전환하고 0.5 mM IPTG (isopropyl-β-D-thio-galactoside; Duchefa, Haarlem, Netherlands)로 37℃에서 3-4 시간 동안 발현을 유도하였다. 수확한 세포는 초음파 분해로 용균하여 Tat-DJ-1 융합단백질을 Ni^{2+}-니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우 친화 크로마토그래피 컬럼 및 PD-10 컬럼 크로마토그래피 (Amersham, Brauncschweig, Germany)로 정제하였다. 단백질 농도는 브래드포드 방법으로 우혈청 알부민을 표준물질로 하여 평가하였다 (Bradford, 1976).

[0046] **성상세포 내로 Tat-DJ-1 융합단백질 도입**

[0047] Tat-DJ-1 융합단백질의 세포내 도입을 위해 세포를 다양한 농도의 Tat-DJ-1 융합단백질로 한 시간 동안 처리하였다. 그 후 세포를 트립신-EDTA로 처리하고 PBS로 세척하였다. 세포를 수확한 후 웨스턴 블랏을 위해 세포 추출물을 제조하였다.

[0048] **웨스턴 블랏 분석**

[0049] 세포 용균액 내의 단백질을 12% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질들은 나이트로셀룰로스 막에 전기이동시킨 다음 5% 탈지유를 포함하는 PBS로 블로킹시 켰다. 막은 토끼 항히스티딘 폴리클론 항체 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 탐지한 다음 염소 항토끼 면역글로불린 (1:10,000 희석함; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)과 함께 배양하였다. 결합된 항체는 강화된 화학발광으로 시각화하였다 (Amersham, Franklin Lakes, NJ, USA).

[0050] **형광현미경 분석**

[0051] 커버슬립 상의 성상세포를 3mM Tat-DJ-1 융합단백질로 처리하였다. 한 시간 동안 37℃로 배양한 다음 세포를 PBS로 두 번 씻고 4% 파라포름알데하이드로 실온에서 5분간 고정시켰다. 세포를 30 분간 3% 우혈청 알부민, 0.1% Triton X-100을 포함하는 PBS (PBS-BT)로 삼투 가능하도록 하고 블로킹시키고 PBS-BT로 씻어주었다.

1:2000으로 희석된 1차 항체 (His-probe, Santa Cruz Biotechnology)로 90 분 동안 실온에서 배양하였다. 1:15000으로 희석된 2차 항체 (Alexa fluor 488; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 어두운 곳에서 실온으로 45 분간 배양하였다. 핵은 1 ㎍/㎖의 4'6-다이아미디노-2-페닐인돌 (4'6-diamidino-2-phenylindole; DAPI; Roche, Basel, Switzerland)로 5 분간 염색하였다. 형광 분포는 Eclipse 80i 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

[0052] **MTT 분석**

[0053] 과산화수소로 처리한 성상세포의 생존율을 결정하기 위해 MTT {3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide} 분석을 이용하였다. Tat-DJ-1 융합단백질 (1-3 mM)로 한 시간 동안 미리 처리한 성상세포 배양배지에 H_2O_2 (0.7 mM)를 24 시간 동안 처리하였다. 540 nm 흡광도는 Multiskan MCC/340 ELISA 판독기 (Labsystems, Oy, Helsinki, Finland)로 측정하였고, 세포 생존율은 미처리 대조군 세포의 백분율로 정의하였다.

[0054] **세포내 활성산소종 수준 측정**

[0055] 활성산소종에 의해 형광물질인 DCF (dichlorofluorescein)로 변환되는 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 이용하여 세포내 활성산소종 수준을 측정하였다. 성상세포는 Tat-DJ-1 융합단백질 (3 mM)이 있는 상태 또는 없는 상태로 한 시간 동안 배양하고 그 후 0.7 mM 과산화수소로 30 분간 처리하였다. 세포는 PBS로 두 번 세척한 후 15 μM DCF-DA를 넣어 15 분간 배양하였다. 세포 형광강도 정량은 여기 485 nm, 방출 538 nm에서 Fluoroskan ELISA 판독기 (Labsystems Oy, Helsinki, Finland)로 측정하였다.

[0056] **TUNEL 분석**

[0057] 성상세포를 Tat-DJ-1 융합단백질 (3 mM)이 있는 상태 또는 없는 상태로 한 시간 동안 배양한 후 0.7 mM 과산화수소로 18 시간 동안 처리하였다. TUNEL {TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase)-mediated biotinylated UTP nick end labeling} 염색은 세포 사멸 탐지 킷트 (Cell Death Detection kit; Roche Applied Science)를 이용하여 수행하였다. 영상은 Eclipse 80i 형광현미경 (Nikon)을 이용하여 얻었다.

[0058] **실험동물 및 대뇌 전뇌 허혈 (cerebral forebrain ischemia)**

[0059] 몽고 저빌 (*Meriones unguiculatus*, 65-75g)은 한림대 실험동물센터에서 입수하였다. 동물은 일정한 온도 (23℃)와 상대습도 (60%)로 12시간 밝음: 12시간 어두움 상태로 사육하였으며, 물과 사료는 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 모든 동물 및 사육은 국립수의과학검역원의 실험동물 사육과 이용에 관한 안내규정에 적합함을 한림대학교 의과대학 동물 사육 및 이용 위원회가 승인한다.

[0060] 대뇌 전뇌 허혈 (cerebral forebrain ischemia) 모델은 종래 방법으로 제조하였다 [J.S. Wadia, S.F. Dowdy, Curr. Opin. Biotechnol. 13 (2002) 52-56]. 세포도입된 Tat-DJ-1 융합단백질이 허혈 손상을 보호하는지를 알아보기 위하여 총경동맥 폐색 전 저빌에 Tat-DJ-1 융합단백질 (3 mg/kg)을 30 분간 피하주사하였다. 총경동맥은 분리되어 신경섬유가 없는 상태에서 비트라우마성 동맥류 클립 (non-traumatic aneurysm clips)으로 폐색시켰다. 검안경으로 안구의 중앙동맥을 관찰하여 완전한 혈류 차단을 확인하였다. 폐색 5분 후 동맥류 클립을 제거하였다. 검안경에서 혈류 복원 (재관류)이 직접 관찰되었다.

[0061] 허혈-재관류 4일 및 7일 후 PBS (pH 7.4)로 심장을 관통하여 관류하고 4% 파라포름알데하이드를 함유한 0.1 M PBS (pH 7.4)로 고정하여 뇌조직 시료를 얻었고 이를 샴 (수술)군, 담체 처리군, Tat 펩타이드 처리군, DJ-1 단백질 처리 대조군 및 Tat-DJ-1 융합단백질 처리군 (각 3 mg/kg)에 이용하였다. 각 뇌 조직은 밤새 30% 수크로즈를 침투시켜 동결 방지처리하였다. 조직은 저온유지장치로 동결시키고 50 ㎛ 절편화하였고 연속 절편은 PBS 함유 6웰 플레이트에 수집하였다. 크레실 바이올렛 염색을 수행하였다 [I.K. Hwang et al., Free Radic. Biol. Med. 39 (2005) 392-402].

[0062] **정량분석**

[0063] 신경세포 수와 면역반응성의 강도는 영상분석시스템을 이용하여 계산하였다. 면역반응구조의 염색 강도는 상대 흡광도로 평가하였고, 대조군에 대한 백분율을 그래프에 나타내었다. 데이타는 일방 ANOVA를 이용하여 통계학적 유의성을 분석하였다.

[0064] **결과 1: Tat-DJ-1 융합단백질 발현 및 정제**

[0065] 인간 DJ-1 cDNA 서열, Tat 단백질 수송 도메인 (Tat 49-57) 및 N 말단에 6개의 히스티딘 잔기가 연이어 있는 세포 침투성 Tat-DJ-1 융합단백질 발현 벡터 (pTat-DJ-1)를 구축하였다. 또한, HIV-1 Tat 단백질 수송 도메인이 없는 DJ-1 단백질 발현 벡터도 같은 방법으로 구축하였다 (도 1의 A).

[0066] 발현 유도 후 Tat-DJ-1 융합단백질은 Ni^{2+}-니트릴로삼초산 세파로즈 수퍼플로우 친화 크로마토그래피 컬럼 및 PD-10 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 정제된 Tat-DJ-1 융합단백질에 대해 SDS-PAGE 및 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 도 1의 B와 같이, 발현 및 정제된 Tat-DJ-1 융합단백질은 분자량이 약 28 kDa인 것으로 측정되었다. 단백질은 항토끼 폴리히스티딘 항체를 이용한 웨스턴 블랏 분석으로 확인하였다 (도 1의 C).

[0067] **결과 2: 성상세포 내로 Tat-DJ-1 융합단백질 도입**

[0068] 3 mM Tat-DJ-1 융합단백질을 성상세포 배양배지에 시간을 달리 하여 10 ~ 60 분간 처리한 후 웨스턴 블랏팅하여 세포도입을 분석하였다. 세포 내로 도입된 Tat-DJ-1 융합단백질의 세포내 농도는 60 분까지 점차 증가하였다. Tat-DJ-1 융합단백질의 투여량 증가에 따른 변화를 분석하기 위해 다양한 농도 (0.5 ~ 3 mM)의 Tat-DJ-1 융합단백질을 성상세포에 60 분간 처리하였고 세포도입된 단백질 수준을 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다. 성상세포 내로 단백질 도입은 농도 의존적이었다. 도 2의 A와 B에서 나타난 바와 같이, Tat-DJ-1 융합단백질은 시간 의존적 및 농도 의존적으로 성상세포 내로 효과적으로 도입되었다. 그러나, 대조군 DJ-1 단백질은 세포 내로 도입되지 않았다. 성상세포 내로 도입된 Tat-DJ-1 융합단백질의 세포내 안정성은 도 2의 C와 같다. 3 mM Tat-DJ-1 융합단백질을 세포 배양배지에 가한 다음 시간 경과에 따른 단백질 수준을 웨스턴 블랏팅으로 분석하였다. 도입된 Tat-DJ-1 융합단백질의 세포내 수준은 한 시간 이후부터 탐지되었다. 비록 단백질 수준은 점차 감소하긴 하였으나 60 시간 동안 세포 내에 도입된 Tat-DJ-1 융합단백질이 관찰되었다.

[0069] 세포도입된 단백질이 세포 내 위치를 확인하기 위하여 세포를 핵 특이적 마커인 DAPI (diamidino-2-phenylindole)로 이중염색하였다. 도 2의 D와 같이, Tat-DJ-1 융합단백질은 핵과 세포질에서 탐지되었다. 이와 같은 결과는 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내로 원활히 도입되었음을 말해준다.

[0070] **결과 3: 산화 스트레스 하에서 세포 생존율에 미치는 세포도입 Tat-DJ-1 융합단백질의 영향**

[0071] 세포도입된 Tat-DJ-1 융합단백질이 산화 스트레스로부터 세포를 보호하는지를 알아보기 위하여 과산화수소 처리 후 MTT 분석으로 세포 생존율을 평가하였다. 세포를 0.7 mM H_2O_2에 노출시킨 후 45%의 세포만이 생존하였다. 도 3a와 같이, Tat-DJ-1 융합단백질로 선처리한 세포에서는 과산화수소에 노출된 세포의 생존율이 최대 68%까지 현저히 증가하였다. 그러나, 대조군 DJ-1 단백질은 같은 조건에서 보호 효과를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 도입된 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내에서 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포 사멸에 대해 방어 역할을 수행함을 가리킨다.

[0072] 또, 본 발명자들은 Tat-DJ-1 융합단백질이 과산화수소에 의한 세포 내 활성산소종 생성을 억제하는지를 시험하였다. 활성산소종 생성은 DCFHDA 형광 염색약의 세포내 산화를 이용하여 측정하였다. 세포를 0.7 mM 과산화수소에 30 분간 노출시켰다. 과산화수소는 DCF 신호를 현저히 증가시켰다. 그러나, Tat-DJ-1 융합단백질 존재 하에서 과산화수소에 의한 활성산소종 생성은 감소하였다 (도 3b). 활성산소종 생성은 Fluoroskan ELISA 판독기로 측정하였다. 도 3c와 같이, 세포 도입된 Tat-DJ-1 융합단백질은 대조군 DJ-1 단백질과 비교할 때 성상세포 내에서 과산화수소에 의한 활성산소종 생성을 현저히 억제하였다.

[0073] DNA 조각화에 대한 세포도입된 Tat-DJ-1 융합단백질의 보호 효과를 TUNEL 염색으로 결정하였다. 도 4와 같이, 과산화수소 처리한 세포는 대조군 세포에 비하여 염색된 세포가 현저히 증가하였고, 반면, Tat-DJ-1 융합단백질

로 처리한 세포는 염색된 세포 비율이 현저히 감소하였다. 이와 같은 결과는 세포 도입된 Tat-DJ-1 융합단백질이 세포 내에서 과산화수소에 의해 유도되는 활성산소종 생성 및 DNA 조각화를 효과적으로 억제함을 나타내는 것이다.

[0074] **결과 5: 세포도입된 Tat-DJ-1 융합단백질은 허혈 손상을 보호한다.**

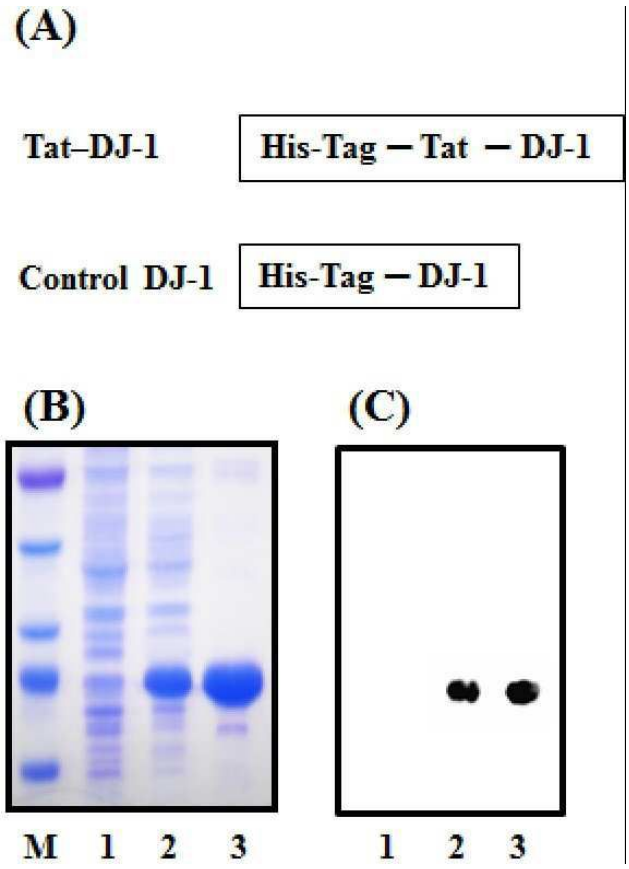
[0075] 본 발명자들은 Tat-DJ-1 융합단백질이 뇌-혈관 장벽을 가로지르는지를 면역조직화학 방법으로 시험하였다. 도 5와 같이, 샴 대조군 동물에서 DJ-1 단백질은 탐지되지 않았다. 반면, Tat-DJ-1 융합단백질 처리 동물의 뇌에서는 전체적으로 DJ-1 단백질 수준이 현저히 증가하였다. 따라서, 이러한 결과는 Tat-DJ-1 융합단백질이 저빌의 뇌-혈관 장벽을 가로질러 효과적으로 도입됨을 말해준다.

[0076] 본 발명자들은 또한, 저빌 동물모델에 일시적 전뇌 허혈을 유발한 이후 신경세포 생존율에 미치는 Tat-DJ-1 융합단백질의 영향을 시험하였다. 뇌허혈 손상 4일 및 7일 후 샴 대조군, 담체 처리 대조군, Tat 펩타이드 처리군, DJ-1 단백질 처리 대조군 및 Tat-DJ-1 융합단백질 처리군 동물들을 희생시켜 크레실 바이올렛 염색하였다. Tat-DJ-1 융합단백질의 보호효과는 크레실 바이올렛 조직화학으로 평가하였다 (도 6). 담체 처리군에서 탐지된 양성 뉴런의 백분율은 샴 수술군의 12%였다. Tat-DJ-1 융합단백질 처리군 (4일 후 및 7일 후)에서 양성 뉴런은 샴 수술군의 각각 64% 및 53%였다.

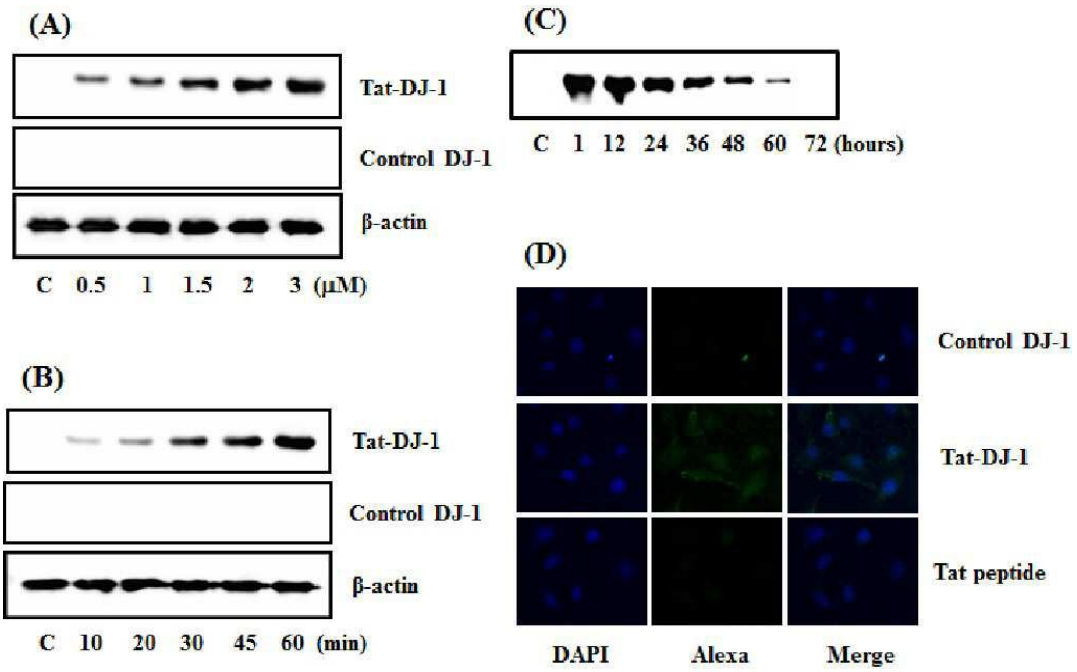
[0077] 본 발명자들은 Tat-DJ-1 융합단백질이 허혈에 의해 유도되는 지질 과산화를 억제하는지를 해마의 말론다이알데하이드 (MDA) 수준을 측정하여 시험하였다. 도 7과 같이, 담체 처리군에서는 샴 대조군과 비교하여 MDA 수준이 현저히 증가하였다. Tat-DJ-1 융합단백질 처리군에서는 해마 MDA 수준이 허혈손상군과 비교하여 현저히 감소하였다. 동일한 실험 조건 하에서 Tat 펩타이드 처리군 및 DJ-1 단백질 처리 대조군은 허혈 손상군과 유사한 패턴을 나타내었다. 이러한 결과는 Tat-DJ-1 융합단백질이 저빌 뇌-혈관 장벽을 효과적으로 투과하여 허혈 손상에 의해 유발된 신경세포 손상을 효과적으로 보호함을 말해준다.

도면

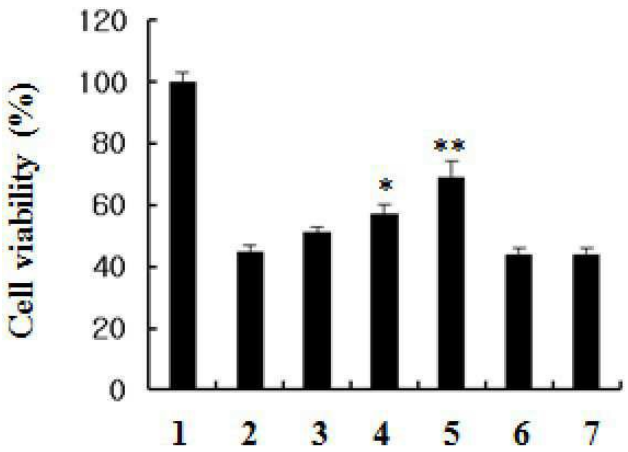
도면1



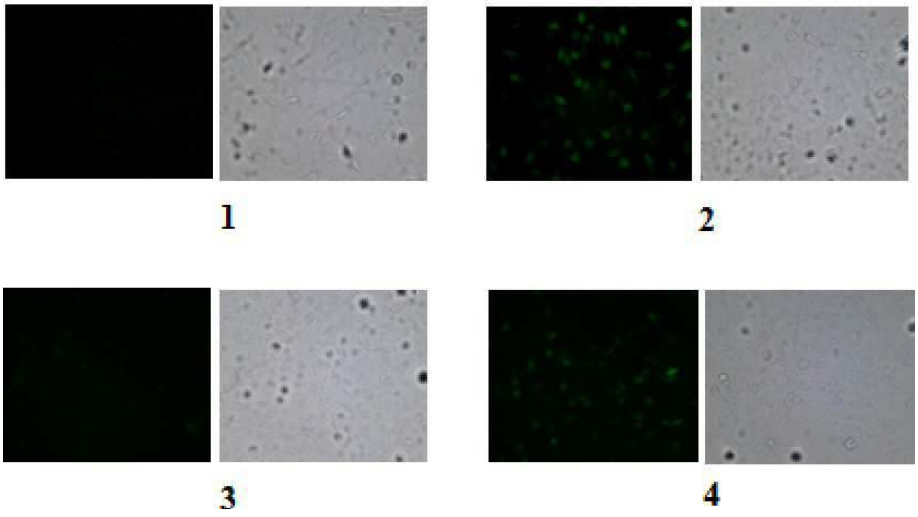
도면2


(A)
Tat-DJ-1
Control DJ-1
β-actin
C 0.5 1 1.5 2 3 (μM)
(B)
Tat-DJ-1
Control DJ-1
β-actin
C 10 20 30 45 60 (min)
(C)
C 1 12 24 36 48 60 72 (hours)
(D)
Control DJ-1
Tat-DJ-1
Tat peptide
DAPI
Alexa
Merge

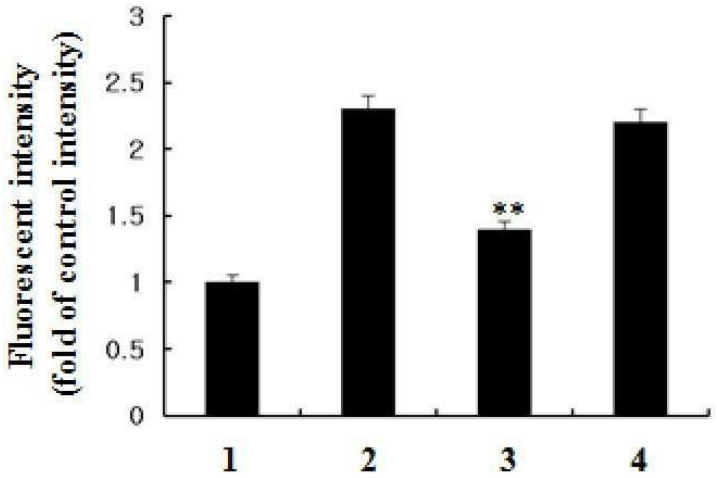
도면3a


Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
**
1 2 3 4 5 6 7

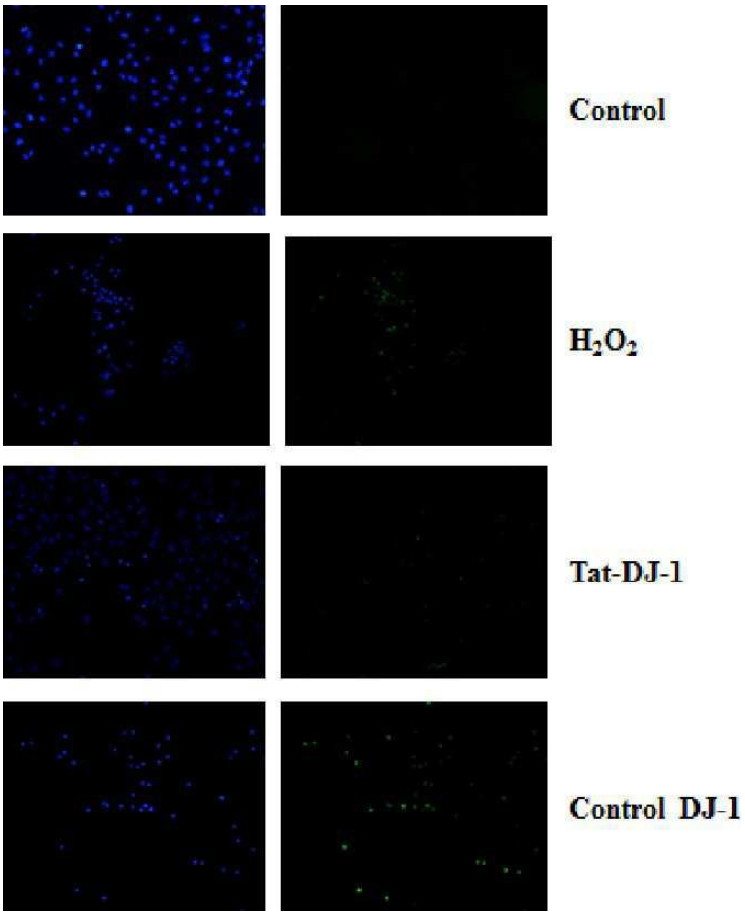
도면3b


1
2
3
4

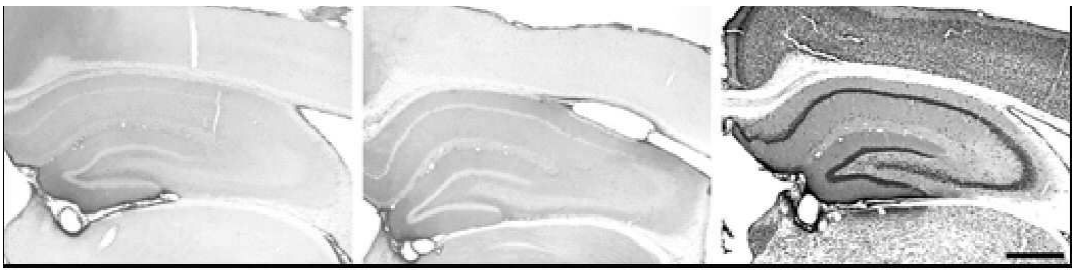
도면3c


Fluorescent intensity
(fold of control intensity)
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
1
2
3
4

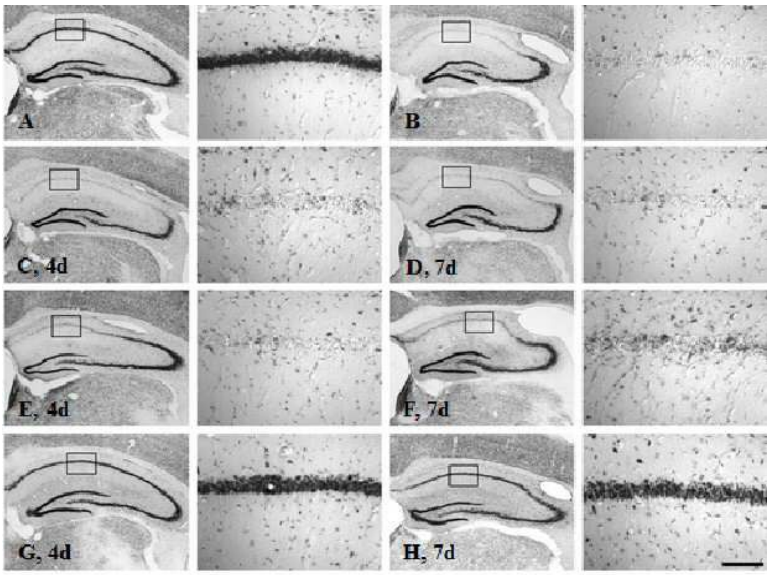
도면4

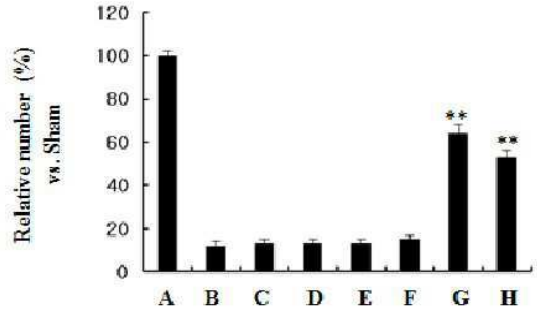


도면5

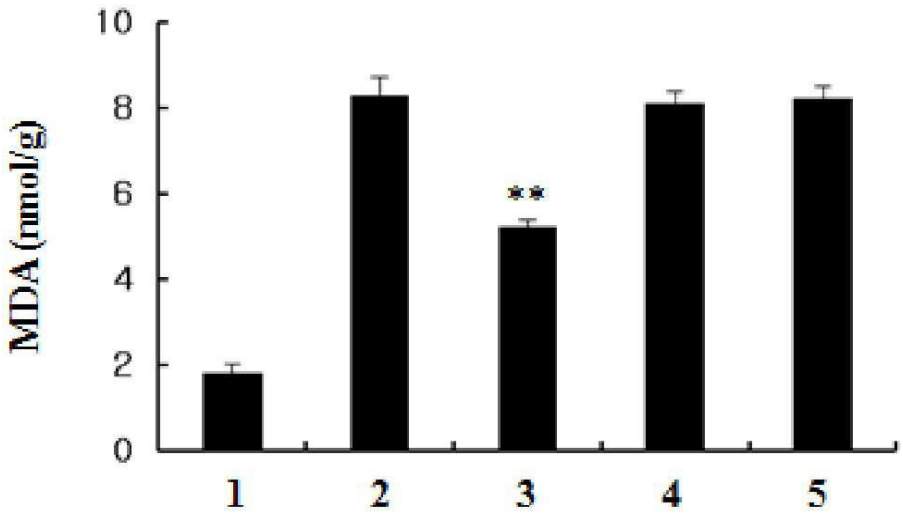


도면6





도면7



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Cell-transducing DJ-1 fusion protein

<130> hallym-sychoi-DJ-1

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of human DJ-1 protein

<400> 1

ctcgaggctt ccaaaagagc 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of human DJ-1 protein

<400> 2

ggatccctag tctttaagaa 20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> HIV

<400> 3

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

1 5

<210> 4

<211> 651

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide encoding Tat-DJ-1 fusioin protein

<400> 4

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccatag gaagaagcgg 60

agacagcgac gaagactcga gatggcttcc aaaagagctc tggtcatcct ggctaaagga 120

gcagaggaaa tggagacggt catccctgta gatgtcatga ggcgagctgg gattaaggtc 180

accgttgcag gcctggctgg aaaagaccca gtacagtgta gccgtgatgt ggtcatttgt 240

cctgatgcca gccttgaaga tgcaaaaaaa gagggaccat atgatgtggt ggttctacca 300

ggaggtaatc tgggcgcaca gaatttatct gagtctgctg ctgtgaagga gatactgaag 360

gagcaggaaa accggaaggg cctgatagcc gccatctgtg caggtcctac tgctctgttg 420

gctcatgaaa taggctgtgg aagtaaagtt acaacacacc ctcttgctaa agacaaaatg 480

atgaatggag gtcattacac ctactctgag aatcgtgtgg aaaaagacgg cctgattctt 540

acaagccggg ggcctgggac cagcttcgag tttgcgcttg caattgttga agccctgaat 600

ggcaaggagg tggcggctca agtgaaggct ccacttgttc ttaaagacta g 651

<210> 5

<211> 200

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-DJ-1 fusioin protein

<400> 5

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Ser Lys Arg
1 5 10 15

Ala Leu Val Ile Leu Ala Lys Gly Ala Glu Glu Met Glu Thr Val Ile
20 25 30

Pro Val Asp Val Met Arg Arg Ala Gly Ile Lys Val Thr Val Ala Gly
35 40 45

Leu Ala Gly Lys Asp Pro Val Gln Cys Ser Arg Asp Val Val Ile Cys
50 55 60

Pro Asp Ala Ser Leu Glu Asp Ala Lys Lys Glu Gly Pro Tyr Asp Val
65 70 75 80

Val Val Leu Pro Gly Gly Asn Leu Gly Ala Gln Asn Leu Ser Glu Ser
85 90 95

Ala Ala Val Lys Glu Ile Leu Lys Glu Gln Glu Asn Arg Lys Gly Leu

100 105 110

Ile Ala Ala Ile Cys Ala Gly Pro Thr Ala Leu Leu Ala His Glu Ile
115 120 125

Gly Cys Gly Ser Lys Val Thr Thr His Pro Leu Ala Lys Asp Lys Met
130 135 140

Met Asn Gly Gly His Tyr Thr Tyr Ser Glu Asn Arg Val Glu Lys Asp

145 150 155 160

Gly Leu Ile Leu Thr Ser Arg Gly Pro Gly Thr Ser Phe Glu Phe Ala

165 170 175

Leu Ala Ile Val Glu Ala Leu Asn Gly Lys Glu Val Ala Ala Gln Val

180 185 190

Lys Ala Pro Leu Val Leu Lys Asp

195 200

<210> 6

<211> 653

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide encoding DJ-1-Tat fusioin protein

<400> 6

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccggcgg cagccactcg agatggcttc 60

caaaagagct ctggtcatcc tggctaaagg agcagaggaa atggagacgg tcatccctgt 120

agatgtcatg aggcgagctg ggattaaggt caccgttgca ggcctggctg gaaaagaccc 180

agtacagtgt agccgtgatg tggtcatttg tcctgatgcc agccttgaag atgcaaaaaa 240

agagggacca tatgatgtgg tggttctacc aggaggtaat ctgggcgcac agaatttatc 300

tgagtctgct gctgtgaagg agatactgaa ggagcaggaa aaccggaagg gcctgatagc 360

cgccatctgt gcaggtccta ctgctctgtt ggctcatgaa ataggctgtg gaagtaaagt 420

tacaacacac cctcttgcta aagacaaaat gatgaatgga ggtcattaca cctactctga 480

gaatcgtgtg gaaaaagacg gcctgattct tacaagccgg gggcctggga ccagcttcga 540

gtttgcgctt gcaattgttg aagccctgaa tggcaaggag gtggcggctc aagtgaaggc 600

tccacttgtt cttaaagacg gatcctagga agaagcggag acagcgacga aga 653

<210> 7

<211> 210

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DJ-1-Tat fusioin protein

<400> 7

Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser His Leu Glu Met Ala Ser Lys

1 5 10 15

Arg Ala Leu Val Ile Leu Ala Lys Gly Ala Glu Glu Met Glu Thr Val

20 25 30

Ile Pro Val Asp Val Met Arg Arg Ala Gly Ile Lys Val Thr Val Ala

35 40 45

Gly Leu Ala Gly Lys Asp Pro Val Gln Cys Ser Arg Asp Val Val Ile

50 55 60

Cys Pro Asp Ala Ser Leu Glu Asp Ala Lys Lys Glu Gly Pro Tyr Asp

65 70 75 80

Val Val Val Leu Pro Gly Gly Asn Leu Gly Ala Gln Asn Leu Ser Glu

85 90 95

Ser Ala Ala Val Lys Glu Ile Leu Lys Glu Gln Glu Asn Arg Lys Gly

100 105 110

Leu Ile Ala Ala Ile Cys Ala Gly Pro Thr Ala Leu Leu Ala His Glu

115 120 125

Ile Gly Cys Gly Ser Lys Val Thr Thr His Pro Leu Ala Lys Asp Lys

130 135 140

Met Met Asn Gly Gly His Tyr Thr Tyr Ser Glu Asn Arg Val Glu Lys

145 150 155 160

Asp Gly Leu Ile Leu Thr Ser Arg Gly Pro Gly Thr Ser Phe Glu Phe

165 170 175

Ala Leu Ala Ile Val Glu Ala Leu Asn Gly Lys Glu Val Ala Ala Gln

180 185 190

Val Lys Ala Pro Leu Val Leu Lys Asp Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg

195 200 205

Arg Arg

210

<210> 8

<211> 682

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide encoding Tat-DJ-1-Tat fusioin protein

<400> 8

catcatcatc atcatcacag cagcggcctg gtgccgcgcg gcagccatag gaagaagcgg 60

agacagcgac gaagactcga gatggcttcc aaaagagctc tggtcatcct ggctaaagga 120

gcagaggaaa tggagacggt catccctgta gatgtcatga ggcgagctgg gattaaggtc 180

accgttgcag gcctggctgg aaaagaccca gtacagtgta gccgtgatgt ggtcatttgt 240

cctgatgcca gccttgaaga tgcaaaaaaa gagggaccat atgatgtggt ggttctacca 300

ggaggtaatc tgggcgcaca gaatttatct gagtctgctg ctgtgaagga gatactgaag 360

gagcaggaaa accggaaggg cctgatagcc gccatctgtg caggtcctac tgctctgttg 420

gctcatgaaa taggctgtgg aagtaaagtt acaacacacc ctcttgctaa agacaaaatg 480

atgaatggag gtcattacac ctactctgag aatcgtgtgg aaaaagacgg cctgattctt 540

acaagccggg ggcctgggac cagcttcgag tttgcgcttg caattgttga agccctgaat 600

ggcaaggagg tggcggctca agtgaaggct ccacttgttc ttaaagacgg atcctaggaa 660

gaagcggaga cagcgacgaa ga 682

<210> 9

<211> 211

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tat-DJ-1-Tat fusioin protein

<400> 9

Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Glu Met Ala Ser Lys Arg
1 5 10 15

Ala Leu Val Ile Leu Ala Lys Gly Ala Glu Glu Met Glu Thr Val Ile
20 25 30

Pro Val Asp Val Met Arg Arg Ala Gly Ile Lys Val Thr Val Ala Gly
35 40 45

Leu Ala Gly Lys Asp Pro Val Gln Cys Ser Arg Asp Val Val Ile Cys
50 55 60

Pro Asp Ala Ser Leu Glu Asp Ala Lys Lys Glu Gly Pro Tyr Asp Val
65 70 75 80

Val Val Leu Pro Gly Gly Asn Leu Gly Ala Gln Asn Leu Ser Glu Ser
85 90 95

Ala Ala Val Lys Glu Ile Leu Lys Glu Gln Glu Asn Arg Lys Gly Leu

100 105 110

Ile Ala Ala Ile Cys Ala Gly Pro Thr Ala Leu Leu Ala His Glu Ile

115 120 125

Gly Cys Gly Ser Lys Val Thr Thr His Pro Leu Ala Lys Asp Lys Met

130 135 140

Met Asn Gly Gly His Tyr Thr Tyr Ser Glu Asn Arg Val Glu Lys Asp

145 150 155 160

Gly Leu Ile Leu Thr Ser Arg Gly Pro Gly Thr Ser Phe Glu Phe Ala

165 170 175

Leu Ala Ile Val Glu Ala Leu Asn Gly Lys Glu Val Ala Ala Gln Val

180 185 190

Lys Ala Pro Leu Val Leu Lys Asp Gly Ser Arg Lys Lys Arg Arg Gln

195 200 205

Arg Arg Arg

210