



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0127141
(43) 공개일자 2017년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/81* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/81 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0057352
(22) 출원일자 2016년05월11일
심사청구일자 2016년05월11일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이상열
경상남도 진주시 진주대로 829번길 21 삼환나우빌
101동 1801호
박정훈
대구광역시 동구 신암로16길 33 신천가람타운 10
4동 809호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

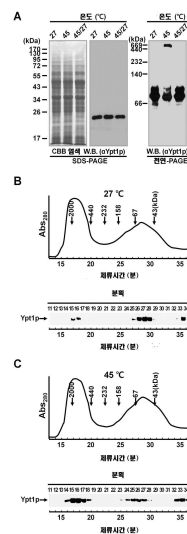
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 열 충격에 의해 기능 전환을 나타내는 효모 Ypt1p 단백질

(57) 요약

본 발명은 열 충격에 의해 기능 전환을 나타내는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 효모 Ypt1p 단백질에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 실온에서는 세포질 내에서 GDP를 GTP로 활성화시키는 GTPase로 작용하나 열 충격시 기질 보호를 위한 분자 샤페론으로 작용하는 효모 Ypt1p 단백질 및 효모 Ypt1p 단백질을 과발현시켜 열 스트레스 저항성을 증진시킨 형질 전환 생물체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

채호병

경상남도 진주시 서장대로 385번길 9

강창호

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-0749

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 식물 소포체스트레스 관련 인자의 탐색 및 기능연구

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-0987

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 시스템합성농생명공학사업단

연구사업명 우장춘 프로젝트

연구과제명 식물면역반응의 이해와 신호전달과정 연구

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.08 ~ 2015.11.07

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 Ypt1p 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 생물체 내의 Ypt1p 단백질은 외부 열 충격으로부터 생물체를 보호하기 위해 실온에서는 세포질 내에서 GDP를 GTP로 활성화시키는 GTPase로 작용하고 열 충격시 생물체 보호를 위한 분자 샤페론으로 작용함을 특징으로 하는 Ypt1p 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 Ypt1p 단백질은 실온 정상 조건 하에서는 분자량 147 kDa 이하의 주로 3량체인 저분자량 상태로 존재하나 열 충격 하에서는 분자량 600 kDa 이상의 고분자량의 7량체 복합체로 변환되어 분자 샤페론으로 작용함을 특징으로 하는 Ypt1p 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 Ypt1p 단백질의 열 충격 시 생물체 보호 기능은 기질 단백질의 열 충격에 의한 변성 기질 또는 응집물로의 전환을 방지함으로써 보호함을 특징으로 하는 Ypt1p 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 4

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 Ypt1p 단백질을 과발현하는 열 저항성이 증가된 형질 전환된 효모에 있어서, 상기 형질 전환된 효모는 55℃에서 1시간 노출 시 야생형에 비해 45% 이상의 생존율을 증가시킴을 특징으로 하는 열 저항성이 증가된 형질 전환 효모.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 열 충격에 의해 기능 전환을 나타내는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 효모 Ypt1p 단백질에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 실온에서는 세포질 내에서 GDP를 GTP로 활성화시키는 GTPase로 작용하나 열 충격 시 기질 보호를 위한 분자 샤페론으로 작용하는 효모 Ypt1p 단백질 및 효모 Ypt1p 단백질을 과발현시켜 열 스트레스 저항성을 증진시킨 형질 전환 생물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

생물체는 변화하는 영양 요구성, 삼투압 불균형, 온도 변화 및 독성 분자로 인해 지속적으로 그들의 환경에 적응해야만 한다. 화학적 또는 물리적 스트레스는 변성, 활성 감소 및 세포 단백질의 비-편재화를 유도한다. 또한 높은 온도는 막 유동성 및 삼투압을 변화시켜 막-투과에 부정적인 영향을 미친다. 열 충격을 포함한 다수의 스트레스는 세포 내의 활성산소종(ROS)의 생성을 증가시켜 예정된 세포 사멸을 포함한 다수의 유해 효과를 야기시킨다.

[0003]

세포는 유전자 발현의 재-프로그래밍을 통해 스트레스 환경 내에서 적응 및 생존한다. 예를 들어 생물체는 열 충격 응답(HSR)으로 불리우는 보호 전사 프로그램을 가동함으로써 최적 온도 이상에서도 성장이 가능하며 이는

방어 유전자, 탄수화물 유출 및 막 조성물 발현 수준의 변화를 통해 방어 신호 경로를 변화시키는 것이다. 다수의 외부적 스트레스 및 스트레스 조절 단백질 언폴딩 및 축적으로부터 그들 자신을 보호하기 위해 모든 유산소 생물체는 광범위한 항산화 단백질 및 다양한 분자 샤페론을 지닌다.

[0004] 최근 들어 다수의 단백질이 열 스트레스에 대항하여 분자 보호 기능과 관계가 있으며 이들 단백질의 열-유도 구조적 변화를 통해 새로운 기능을 획득하는 능력이 규명되고 있다. 예를 들어 효모의 2개의 세포질 페록시레독신(Prxs), 즉 cPrxI 와 cPrxII는 열 충격 및 활성산소 스트레스에 대항하여 저분자량(LMW) 형태에서 고분자량(HMW) 복합체로 전환됨이 밝혀졌다. 입체 구조의 변화는 페록시다아제로부터 분자 샤페론으로의 구조적 전환에 수반되는 것이다.

[0005] 결과적으로 효모 내에서의 cPrxI 및 cPrxII 변이가 열-충격 스트레스에 대하여 과민감성을 야기시킨다. 이러한 관찰들에 입각하여 본 발명자들은 유도된 HMW 단백질 복합체의 열-충격 처리된 효모 세포의 단백질 추출물을 스 크리닝하였으며 이를 통해 효모 단백질 Ypt1p, aRab 과 소형 GTPase 단백질이 열-충격 처리를 통하여 HMW 복합체를 생성하는 것을 발견하였다.

[0006] 따라서 본 발명자들은 분자 모델링 및 실험을 통해 효모 Ypt1p 단백질이 구조 및 기능을 가역적으로 변환시켜 저온에서는 GTPase로 작용하고 고온 열 충격 시 기질 보호를 위한 분자 샤페론으로 작용함으로써 생물체의 열 스트레스 저항성을 증진시킴을 확인한 것이다.

[0007] 또한 열 스트레스 저항성을 증진시키기 위해 효모 Ypt1p 유전자 컨스트럭트로 형질 전환시켜 효모 Ypt1p 단백질을 과발현하는 형질 전환 생물체를 제조함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 해결하려는 과제는 분자 모델링 및 실험을 통해 효모 Ypt1p 단백질이 구조 및 기능을 가역적으로 변환시켜 저온에서는 GTPase로 작용하고 고온 열 충격 시 기질 보호를 위한 분자 샤페론으로 작용함으로써 생물체의 열 스트레스 저항성을 증진시키는지 여부를 규명코자 한 것이다. 또한 열 스트레스 저항성을 증진시키기 위해 효모 Ypt1p 유전자 컨스트럭트로 형질 전환시켜 효모 Ypt1p 단백질을 과발현하는 형질 전환 생물체를 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 Ypt1p 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 생물체 내의 Ypt1p 단백질은 외부 열 충격으로부터 생물체를 보호하기 위해 실온에서는 세포질 내에서 GDP를 GTP로 활성화시키는 GTPase로 작용하고 열 충격시 생물체 보호를 위한 분자 샤페론으로 작용함을 특징으로 하는 Ypt1p 단백질을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한 상기 Ypt1p 단백질은 실온 정상 조건 하에서는 분자량 147 kDa 이하의 주로 3량체인 저분자량 상태로 존재하나 열 충격 하에서는 분자량 600 kDa 이상의 고분자량의 7량체 복합체로 변환되어 분자 샤페론으로 작용함을 특징으로 한다.

[0011] 한편 상기 Ypt1p 단백질의 열 충격 시 생물체 보호 기능은 기질 단백질의 열 충격에 의한 변성 기질 또는 응집

물로의 전환을 방지함으로써 보호함을 특징으로 한다.

- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 Ypt1p 단백질을 과발현하는 열 저항성이 증가된 형질 전환된 효모에 있어서, 상기 형질 전환된 효모는 55℃에서 1시간 노출 시 야생형에 비해 45% 이상의 생존율을 증가시키는 특징으로 하는 열 저항성이 증가된 형질 전환 효모를 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명의 효과는 분자 모델링 및 실험을 통해 효모 Ypt1p 단백질이 구조 및 기능을 가역적으로 변환시켜 저온에서는 GTPase로 작용하고 고온 열 충격 시 기질 보호를 위한 분자 샤페론으로 작용함으로써 생물체의 열 스트레스 저항성을 증진시키는 것을 규명한 것이다. 또한 열 스트레스 저항성을 증진시키기 위해 효모 Ypt1p 유전자 컨스트럭트로 형질 전환시켜 효모 Ypt1p 단백질을 과발현하는 형질 전환 생물체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 열 충격이 생체 내에서 Ytp1p 단백질의 구조 변화를 유도함을 나타낸 것이다.

A) YPD 배지(1×10^8 세포/ml)에서 성장시킨 효모 세포(W303)를 27℃ 또는 45℃에서 라벨링시켜 45분간 인큐베이션 시켰다. 열처리된 세포의 반을 100 mg/ml 시클로헥시마이드를 포함하는 신선한 YPD 배지에 동일한 부피만큼 이송하고 27℃에서 10시간 회복시켰다(45/27 라벨링됨). 총 단백질 추출물(50 mg)을 SDS-PAGE로 분석하고 단백질을 CBB 염색으로 시각화하였다(좌측). SDS-PAGE(중간) 및 천연-PAGE(우측)로 분별화시킨 후에 폴리클론 항-Ypt1p 항체를 이용하여 총 단백질 추출물(50mg)을 면역블로팅 기법으로 분석하였다.

B), C) 효모 세포를 YPD 배지에서 성장시키고 27℃(B) 또는 45℃(C)에서 45분간 인큐베이션 시켰다. 세포의 총 단백질 추출물에 SEC 분석을 사용하였다. SEC 내에서 용해된 단백질 피크의 경로와(상단부) SDS-PAGE 처리 이후 상응하는 분획에서 면역블로팅 검출을 확인하였다(하단부). 총 단백질(2.5mg)을 SEC 컬럼에 적용시키고 각 분획 30ml를 SDS-PAGE에 적용시켰다. Ypt1p 단백질을 다중클론 항-Ypt1p 항체로 검출하였다.

도 2는 시험관 내에서 Ypt1p 단백질의 열 충격-유도된 구조 변화를 나타낸 것이다.

A), B) 정제된 재조합 Ypt1p 단백질(3 mg/ml)을 25℃ 또는 45℃에서 30분간 인큐베이션시키고 천연-PAGE(A) 또는 SDS-PAGE(B)를 수행하였다. 아래는 은색으로 염색한 뒤의 겔 이미지이다.

C)(A)와(B)에서 묘사된 단백질 용액의 SEC 분석이다. Ypt1p 단백질의 HMW 및 LMW 분획을 SEC 분별법으로 수득하였다.

D) SEC로부터 수득한 Ypt1p 단백질의 LMW 및 HMW 분획 내 단백질 입자 구조를 음성 염색을 이용하여 TEM으로 검사하였다. 화살표: LMW 분획 내의 비정형 입자; 화살표 끝 : HMW 분획 내에서 관찰되는 고리형(a,b), 구형(c,d), 타원형(e) 원통형(실린더) 입자. Ypt1p 단백질 복합체의 다변적 통계 분석으로 얻어진 각각의 중합체 입자의 이미지를 HMW 분획의 필드 이미지로서 나타내었다. Ypt1p 단백질 3량체(a) 및 7량체 고리 말단 절단면의 클래스 평균을 표시하였다. 구형(c, d) 또는 타원형(e) Ypt1p 복합체를 고유벡터-고유값에 근거하여 형태적 유사성으로 그룹화시키고 클래스 평균을 나타내었다. 클래스 평균 하단에 나타낸 숫자는 HMW 분획의 40개 필드 이미지로부터 산출된 입자의 개수이다.

도 3은 Ypt1p 단백질 구조의 분자 모델링을 나타낸 것이다.

A) Ypt1p 단백질 단량체(모노머)(PBD ID: 1YZN)의 결정 구조.

B) 10 ns 분자 동역학 시뮬레이션으로 예측된 318K(45℃)에서의 Ypt1p 모노머 구조.(A) 및(B) 구조 모두 스위치 I(보라색), 스위치 II(녹색) 및 인터스위치(노랑색) 영역을 포함한다.

C) Ypt1p 단백질의 결정 구조(회색) 및 MD 구조(파랑색)의 중첩(성).

D) 실온에서 Ypt1p 트리머의 형성을 보이는 2개의 최고점 도킹 구조와 기본 결정 구조의 정렬

E) 분자 모델링으로 구성된 318K(45℃)에서의 Ypt1p 7량체 구조를 나타내었다.

F, G) 318K(45℃)에서 Ypt1p 모노머로 구성된 평면 7량체 고리 구조의 전면(F) 및 후면(G) 상의 전하 분포이다. H) MD 시뮬레이션으로 추정된 Ypt1p 14-머의 측면상 전하 분포이다. 시뮬레이션에서 14-머는 이중 층 구조 내에 2개의 Ypt1p 7량체 고리가 적층되어 있는 형태임을 나타내고 있다. 음성 표면, 양성 표면, 대전되지 않은 표면을 각각 붉은색, 파란색, 흰색으로 표시하였다.

도 4는 Ypt1p 단백질의 분자 샤페론 활성을 나타낸 것이다.

A) Ypt1p 단백질의 열 안정성을 나타내고 있다. Ypt1p 단백질 및 MDH(각 1 mg)을 각각 20℃, 35℃ 및 70℃에서 30분간 인큐베이션 시키고 단백질 샘플을 30분간 20,000g로 원심분리시켰다. 샘플의 상등액(S) 및 펠렛(P) 분획을 SDS-PAGE로 분석하고 은색으로 염색하였다.

B) Ypt1p 내의 소수성 도메인의 열 충격-유도된 노출을 프로빙하는 bis-ANS 결합 에세이의 결과를 나타내고 있다. bis-ANS의 형광 스펙트럼을 여기 380nm에서 측정하고 400-600nm에서 방출 스캐닝하였다. 사용된 샘플은 bis-ANS 10 μ M(a), Ypt1p 단백질 30 μ M(b) 및 bis-ANS 10 μ M에 25℃(c), 45℃(d) 또는 50℃(e)에서 20분간 인큐베이션 시킨 Ypt1p 단백질 30 μ M를 첨가한 것이다.

C), D) 샤페론 활성 에세이를 나타내고 있다. 15분 인큐베이션 시점 이후에 340nm에서 광산란을 모니터링하였다. C) 50 μ M HEPES(pH 7.0) 내의 1 μ M CS 단독(-○-) 또는 각각 2 μ M GST(-●-), 2 μ M cPrxI(-◆-) 및 2 μ M Ypt1p(-■-)를 포함하는 용액을 43℃의 스펙트로포토미터 용기 내에서 인큐베이션시켰다.

D) 50 μ M HEPES(pH 7.0) 내의 1.67 μ M MDH 단독(-○-) 또는 각각 1.67 μ M(-■-) 또는 3.34 μ M(-◆-) Ypt1p를 포함하는 용액을 45℃의 스펙트로포토미터 용기 내에서 인큐베이션시켰다. 8.35 μ M GST(-●-)를 대조군으로 사용하였다.

도 5는 Ypt1p 단백질의 중합도에 따라 그의 기능이 결정됨을 나타낸 것이다.

A) 분별되지 않은 전체량 Ypt1p, HMW Ypt1p 및 LMW Ypt1p(2 mg 단백질/에세이)의 GTPase 활성을 나타낸 것이다.

B) 표시된 분획의 GTPase 활성을 시간 함수에 따라 분석하였다.

C) 전체량, HMW 및 LMW Ypt1p 단백질의 샤페론 활성을 나타낸 것이다. 검출 용액은 1.67 μ M MDH 단독(-○-) 또는 3.34 μ M 전체(-■-), HMW(-▲-), 및 LMW(-■-) Ypt1p 분획을 포함하고 있다.

D) 전체량, HMW 및 LMW Ypt1p 단백질의 상대적 GTPase/샤페론 활성을 나타낸 것이다. 총 Ypt1p 단백질의 활성을 100%로 설정하였다.

도 6은 Ypt1p 단백질의 샤페론 기능을 통해 효모의 열 저항성이 증가됨을 나타낸 것이다.

A) pYES2-YPT1(YPT1) 또는 벡터를 포함하는 효모 스트레인(W303)을 2% 포도당(Glu) 또는 2% 갈락토오스(Gal)를 첨가시킨 YPD 배지 내에서 27℃로 3시간 인큐베이션 시켰다. 총 단백질 추출물(50 mg)을 SDS-PAGE로 분별화시키고 CBB 염색(좌측) 또는 항-Ypt1p 항체(중간) 또는 항-GAPDH 항체(우측)를 사용한 면역 블로팅 기법으로 분석하였다. 단한 화살표 끝: Ypt1p; 열린 화살표 끝: GAPDH. 중간 패널의 4번째 레인은 갈락토오스-유도로 증가된 Ypt1p 밴드를 표시하고 있으며 우측 패널의 모든 4개 레인은 대조군으로 사용된 GAPDH의 단백질 수준을 표시하고 있다.

B) 세포 생존성에 대한 열처리 효과를 나타낸다. 2% 포도당(Glu) 또는 2% 갈락토오스(Gal)을 첨가시킨 YPD 배지 내에서 성장시킨 YPT1 및 벡터 형질 전환체의 세포(5×10^7 세포/ml)를 27℃, 45℃, 50℃ 또는 55℃에서 1시간 인큐베이션 시켰다. 세포 생존(퍼센트)을 0초에서의 생존 카운트에서 생존 시간에서의 생존 카운트 비율 $\times 100$ 으로 계산하였다.

C) 열-충격 유도된 세포 사멸의 TB 배제 에세이를 나타낸 것이다.(B)에서와 같이 YPT1 및 벡터 형질 전환체의 효모 세포를 55℃에서 인큐베이션시키고 TB로 염색한 후에 형광 현미경으로 시각화하였다. TB-음성 및 TB-양성 세포에서의 TB-음성 세포 평균±표준편차를 이미지 하단에 나타내었다. 검정 화살표 및 흰색 화살표는 각각 TB-음성 및 양성 세포의 예를 나타낸다. 표 1을 통해 자세한 사항을 확인할 수 있다.

도 7은 열 충격에 의존적인 Ypt1p 단백질의 구조/기능적 변환을 나타내는 제안 모델을 나타낸 것이다.

LMW 및 HMW 중합 형태 사이의 Ypt1p 4차 구조 분포는 열 스트레스에 의해 가역적으로 조절된다(중간). Ypt1p의 LMW 형태는 GTPase 기능에 중요한 역할을 하며(좌측) 이와 비교하여 Ypt1p의 스트레스-유도된 HMW 형태는 분자 샤페론으로서 작용하고(우측) 세포 내 기질을 변성으로부터 효과적으로 보호할 수 있다.

도 8은 뉴클레오타이드 결합 상태와 관계없이 Ypt1p 단백질의 열 충격 유도에 따른 구조 및 기능의 변화를 나타낸 도면이다.

A) 본 발명자들은 다음과 같이 Ypt1p의 뉴클레오타이드 유리형을 준비하였다. 제조한 Ypt1p의 정제 후에 단백질을 10 mM EDTA를 포함하는 과량의 NBB 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 7.5 / 100 mM NaCl / 1 mM 디티오프레이톨 / 0.1% Triton X-100)으로 30℃에서 45분간 충분히 세척하고 단백질 내에 잔류된 뉴클레오타이드를 제거한다. 그리고 뉴클레오타이드-유리 Ypt1p을 10 mM MgCl₂ / 0.5 mM GDP를 포함하는 NBB 완충액으로 인큐베이션시키고 단백질의 GDP-결합 형태를 재구성하기 위해 한시간 동안 실온에서 회전시킨다. 뉴클레오타이드가 제거되고(Ypt1p-free) GDP-결합된(Ypt1p-GDP) Ypt1p(3 mg/ml)를 25℃ 또는 45℃에서 30분간 인큐베이션 시키고 천연-PAGE(상부 패널) 및 SDS-PAGE(하부 패널)에 놓이게 한다. 나타낸 이미지는 은 염색 이후 겔 상 이미지이다.

B) 뉴클레오타이드-유리 Ypt1p을 10 mM MgCl₂ / 0.1 mM GTP/ 50 μCi [α-³²P]GTP를 포함하는 NBB 완충액에서 인큐베이션시킨다. 실온에서 한시간 동안 회전시키고 단백질 일부가 방사능 표지된[α-³²P] 단백질의 GTP 결합형을 재구성시킨다. 뉴클레오타이드 유리(Ypt1p-free)와 부분적으로 방사능 표지된 GTP 결합(Ypt1p-[α-³²P]GTP) Ypt1p(3 mg/ml)를 25℃ 또는 45℃에서 30분간 인큐베이션시키고 천연-PAGE(상부 패널) 및 SDS-PAGE(하부 패널)에 놓이게 한다. 나타낸 이미지는 은 염색 이후 겔 상 이미지이다.

C) 뉴클레오타이드-유리, GDP-결합 및 GTP γ S-결합 형의 Ypt1p 단백질의 샤페론 활성 비교.

1.67 μM MDH 단독(-○-), 3.34 μM GST(-●-), 또는 3.34 μM 뉴클레오타이드-유리(-□-), 45℃에서 30분간 인큐베이션 시킨 후 Ypt1p의 GDP-결합형(파란색 -■-) 및 GTP γ S-결합형(빨간색 -■-)을 시험 용액으로 사용한다.

도 9는 분자 샤페론으로 GTP아제 결핍 변이체 Ypt1p^{Q67L}의 구조 및 기능적 특성을 나타낸 도면이다.

A) Ypt1p, Ypt1pQ67L 및 GST(2 μg 단백질/에세이)의 GTP아제 활성.

B) 시험관 내에서 Ypt1p^{Q67L}의 열-충격 유도에 따른 구조 변화. 정제된 제조한 Ypt1p^{Q67L}(3 mg/ml)을 25℃ 또는 45℃에서 45분간 인큐베이션 시키고 천연-PAGE(상부 패널) 및 SDS-PAGE(하부 패널)에 놓이게 한다.

C) 생체 내에서 Ypt1p^{Q67L}의 열-충격 유도에 따른 구조 변화. 제조한 ypt1-Q67L 세포를 YPD 배지(1×10⁸ 세포/ml) 내에서 성장시키고 27℃ 또는 45℃에서 45분간 인큐베이션 시켰다. 열처리된 세포 1ml 반을 100 μg/ml 시클로헥사미드를 포함하는 균등한 양의 신선한 YPD 배지에 이송시키고 27℃(45/27℃)에서 10시간 회복시킨다. 총 단백질 추출물(50 μg)을 천연-PAGE(상부 패널) 및 SDS-PAGE(하부 패널)에 의해 분획화시킨 후 폴리클론 항-Ypt1p 항체를 사용하여 면역 블로팅으로 분석한다.

D) Ypt1p^{Q67L}의 샤페론 활성. 1.67 μM MDH 단독(-○-), 8.35 μM GST(-●-), 또는 8.35 μM의 Ypt1p^{Q67L}을 25℃(-■-) or 45 oC (-■-)에서 45분간 인큐베이션 한 것을 시험 용액으로 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

구아노신 트리포스페이트(GTPases)는 세포가 외부 자극에 대한 응답을 가능케 하도록 신호 변환 통로 내에서의 분자 스위치로서 기능한다. 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 사카로마이세스 세레비지에 효모 단백질(Ypt1p)은 단량체형 미소 GTPase로 소포체에서 골지체로 수송(trafficking)에 필수적이다.

[0016]

크기 배제 크로마토그래피(SEC), SDS-PAGE 및 천연-PAGE에 의한 본 발명의 항-Ypt1p 항체로 면역 블로팅 실험을 통해 효모 Ypt1p 단백질이 열 충격에 의해 저분자량(LMW) 형태로부터 고분자량(HMW) 복합체로 구조 및 기능의 변환을 나타내는 것을 확인하였다.

- [0017] 효모 Ypt1p 단백질은 GTPase와 분자 샤페론으로서 이중 기능을 나타냄을 확인하였다. 열 충격은 효모 Ypt1p 단백질을 GTPase에서 분자 샤페론으로 기능 전환시켜 LMW 형태에서 HMW 형태로 구조 변화를 유도함을 확인하였다.
- [0018] 또한 갈락토오스-유도 발현 시스템을 사용하여 효모 세포 내에서 YPT1의 조건적 과발현이 세포의 열 저항성을 증강시키며, 야생형 YPT1 수준 내에서 발현하는 대조군 세포와 비교하여 55℃에서 60%까지 생존율을 증가시킴을 확인하였다.
- [0019] 이는 효모 Ytp1p 단백질이 열 스트레스 조건 하에서 세포 보호 과정에 관여함을 나타낸다. 또한 이러한 발견은 미소 GTP-결합 분자 단백질의 생체 내 역할에 대한 새로운 이해를 제시하며 인간 질병에 대한 연구 및 조사에 영향을 기대할 수 있게 되었다.
- [0020] 이어 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0021] (1) 열 충격은 효모 세포 내에서 Ypt1p 단백질을 포함하는 큰 HMW 단백질 복합체의 형성을 유도한다.
- [0022] Rac1, Rac2 및 Cdc42와 같은 작은 GTP-결합 단백질이 모노머, 2량체 및 올리고머 형태로 GTP- 및 GDP-결합 상태에 따라 존재한다. Ypt1p 단백질은 효모 세포를 60℃에서 30분간 열 충격을 가한 후에 HMW 복합체의 생성에 의해 스크리닝되고 확인되었다. 효모 세포(W303)를 45℃에서 45분간 열 충격 가한 후에 열 충격 처리 세포의 반을 27℃에서 10시간 동안 단백질 합성 저해제, 시클로헥사나이드를 포함하는 신선한 성장 배지 내에서 회복시킨다. 총 단백질 추출물을 SDS-PAGE 및 천연 PAGE에 의해 분별화시키고 Ypt1p 단백질을 항-Ypt1p 항체와의 면역 블로팅 방법에 의해 검출한다(도 1A).
- [0023] Ypt1p 단백질의 모노머 크기에 상응하는 23.5kDa 분자량의 단일 단백질 밴드를 SDS-PAGE 겔 내에서 예측한 바와 같이 검출하였다(도 1A). 천연-PAGE 겔 상에서는 스트레스 받지 않은 효모 세포에서 추출된(27℃) 몇 개의 Ypt1p 밴드를 검출하였고 이는 단백질 복합체를 포함하는 LMW(<140 kDa) Ypt1p이 형성됨을 나타내는 것이다. Ypt1p 단백질은 열처리(45℃) 세포의 추출물 내에서도 HMW(>600 kDa) 복합체로 검출되었다. 그러나 오직 올리고머를 포함하는 LMW Ypt1p만이 대조군 세포 추출물과 유사하게 신선한 배지에서 27℃로 회복시킨 세포의 추출물 내에서 관찰되었다(도 1A). 이는 열-충격 처리가 생체 내에서 가역적으로 HMW 단백질 복합체의 형성을 유도함을 나타내는 것이다.
- [0024] Ypt1p 단백질을 포함하는 HMW 복합체의 열-유도 형성을 SEC로 확인하였다. 열처리 및 열처리 되지 않은 세포로부터 총 단백질 추출물을 SEC에 의해 분별화시켰다(도 1B, C, 상부 패널). 각각의 분획을 SDS-PAGE로 분석하고 Ypt1p 단백질 함량을 Western blot 분석으로 측정하였다(도 1B, C, 하부 패널). 스트레스가 없는 세포 내에서 Ypt1p 단백질을 LMW 단백질 분획(<140kDa)에서 주로 검출하였으며 오직 소량이 HMW 분획(>400kDa)에서 검출되었다. 열 처리 세포 내에서는 Ypt1p의 상당량이 HMW 및 LMW 분획 모두에서 검출되었다.
- [0025] (2) 열 충격은 시험관 내에서 Ypt1p 단백질의 HMW 호모-폴리머 형성을 유도한다.
- [0026] 본 발명자들은 열처리가 Ypt1p 단백질의 호모폴리머화를 유도한다는 가능성에 대해 조사하였다. 미소 GTPase로서 Ypt1p 단백질은 뉴클레오타이드 결합 상태라고 간주했을 경우에 3개의 다른(뉴클레오타이드가 없는, GDP-결합된 또는 GTP-결합된) 형태를 지닌다. 본 발명에서는 Ypt1p 단백질의 고유한 특성을 더 잘 발현시키는 것에 중점을 두기 위해 뉴클레오타이드가 없는 형태로 재조합 Ypt1p 단백질을 준비하였다. 정제된 재조합 Ypt1p 단백질 용액을 25℃ 또는 45℃로 30분간 인큐베이션 시키고 천연 PAGE 및 SDS-PAGE로 분석하였다(도 2A, B). 25℃로 인

큐베이션 시킨 용액 내에서는 대부분 LMW 올리고머가 관찰되었다(도 2A). SEC를 통해 용액을 분석한 결과로 1개의 마이너 단백질 피크가 17.08분에 검출되었고 메이저 단백질 피크는 33분에 검출되었다(도 2C, 상부 패널). SEC 상에서의 정체 시간은 분자량과 반비례하므로, 이러한 결과는 25℃에서 대부분의 Ypt1p 단백질은 LMW 형태로서 존재하고 미량의 HMW 형태가 존재함을 의미한다. 45℃로 인큐베이션시킨 용액에서는 천연 PAGE에 의해 검출된 Ypt1p 단백질 대부분이 HMW 올리고머였다(도 2A).

[0027] 열처리 후의 SEC 분석을 통해 중심 단백질 피크가 17.03분에, 검출 가능한 수준의 피크가 33.28분에 나타났으며 이를 통해 대부분의 단백질이 HMW 형태로 구성됨을 확인하였다(도 2C, 하부 패널). 이러한 결과를 통해 열처리가 Ypt1p 단백질의 호모 폴리머화를 유도함을 확인하였다.

[0028] 시험관 내에서의 더욱 자세한 Ypt1p 단백질의 구조를 특성화하기 위해 본 발명자들은 SEC에 의해 정제된 재조합 Ypt1p 단백질의 분별화 용액으로부터 HMW(체류 시간 17.03분)와 LMW 분획(체류 시간 33.21분)을 수득하였다. HMW 분획을 열처리 후에 용액으로부터 분리하였으며 LMW 분획을 열처리 없는 용액으로부터 분리하였다. 음성 염색된 투과 전자 현미경(TEM)(도 2D)로 관찰했을 때 LMW 분획 내의 Ypt1p 단백질이 불규칙한 형상의 작은 입자로 나타나는 반면 HMW 분획은 3개의 서로 다른 형상 즉 고리형, 구형 및 타원상의 실린더 유사 입자로 나타났다(도 2D). 고리형 단백질 구조를 확인하기 위해 40개 필드 이미지로부터 수득된 HMW 분획 내의 잘 염색된 75개 절단 형상을 수평형 및 회전형으로 정렬시키고 다중 변수 통계 분석을 수행하였다.

[0029] 이미지 처리는 코너 수에 의존하는 2개의 기본 형상을 나타내었고 직사각형 4량체(A)의 일부 및 고리형 7량체(B) 구조의 말단 오리엔테이션 형상을 나타내었다. 구형 HMW 복합체를 회전 및 수평 정렬 하에 놓이게 하였을 때 이들은 고유벡터->고유값 데이터에 기반하여 몇 개의 그룹으로 분류될 수 있다. 이미지의 직경은 10-11.5nm 범위였다. 본 발명자들은 HMW 분획으로부터 91개의 타원형 실린더 입자의 이미지를 또한 보정하였다. 평균 이미지의 폭과 길이는 각각 10nm 및 15.5nm였다.

[0030] (3) 도킹 및 분자동역학 시뮬레이션으로 모델링된 Ypt1p 단백질 구조

[0031] 본 발명의 단백질 구조 모델링 연구를 위해 S.세레비지에 Ypt1p 단백질의 2.06Å² 결정 구조를 사용하였다(PBDID:1YZN; Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Ypt1p 단백질의 결정 구조가 GTP 결합 지점 내에 Gpp(NH)p를 지님으로 Ypt1p의 뉴클레오타이드가 없는 형태를 시뮬레이션하기 위하여 Gpp(NH)p를 제거하였으며 이는 본 발명에서 주로 사용되는 것이다.

[0032] 또한 열 충격에 노출되어 발생한 Ypt1p 단백질 구조의 변화 변성을 도킹 및 분자동역학 시뮬레이션 접근에 의해 모델링하였다(도 3A). 그 구조를 살펴보면, 뉴클레오타이드 결합 포켓 내에서 GTPase 활성화에 필수적인 I 및 II 영역(각각 잔기 31-45, 64-78)의 교환이 확인되었으며 이는 Ypt1p의 활성/비활성 구조에서 서로 다른 형태를 취한다. 분자동역학 시뮬레이션에 의해 예측된 Ypt1p 단백질 결정 구조 및 318K(45℃)에서의 구조가 오버랩핑되었을 때 엘레먼트가 교환된 영역에서 구조적 차이가 관찰되었다.

[0033] 실온에서 Ypt1p는 실리코 분석에 의해 예측되고 3량체로서 존재하였다(도 3D). 그러나 고온에서(45℃; 318K) 가장 빈번하게 나타나는 형태는 104 Å²의 직경 및 44 Å²의 두께를 지니는 7량체였다(도 3E). 도킹 시뮬레이션에 있어서, Ypt1p 단백질의 프론트-링 복합체(도 3F)의 7량체 표면상에 위치하는 음전하 잔기는 다음 7량체 고리(도 3G) 표면의 양전하와 정전기 상호작용을 일으켰다.

[0034]

[0035] 이러한 상보적인 정전기 상호 작용은 2-Cys Prx의 HMW 복합체와 유사하게 2중, 3중, 4중의(도 2D c-e)고리 형

태를 형성하게 한다. 이러한 도킹 모델은 SEC 및 천연-PAGE에 의한 Ypt1p 단백질의 HMW 열-유도된 폴리머 형태를 제시하는 본 발명의 실험적 데이터를 설명한다(도 1, 2).

[0036] (4) Ypt1p 단백질은 GTPase 뿐만 아니라 분자 샤페론으로서도 작용한다.

[0037] 정제된 재조합 단백질을 20℃, 35℃, 및 70℃에서 30분간 인큐베이션시켜 Ypt1p의 열 안정성을 측정하였다(도 4A). 20,000g에서 30분간 원심분리시킨 후에 열-처리된 단백질을 분획하여 상등액에 넣고 단백을 침전시킨 후 SDS-PAGE로 분석하였다.

[0038] 본 발명자들은 Ypt1p가 70℃에서도 상등액 분획 내에서 검출된다는 것을 확인하였다. 대조군으로 사용한 MDH의 절반 이상은 35℃에서 침전되었으며 이는 Ypt1p가 높은 열 안정성을 지닌다는 것을 의미한다. 추가적으로 열처리 이후 정제된 재조합 Ypt1p 단백질의 표면 소수성의 변화가 관찰되었으며 bis-ANS를 프로브로 사용하였다(도 4B).

[0039] Bis-ANS는 소수성 패치 상의 단백질에 결합하여 방출값 최대 470nm에서 형광을 나타낸다. bis-ANS가 Ypt1p와 함께 25℃, 45℃ 및 50℃에서 인큐베이션 될 때, 470nm에서 관찰되었던 형광 피크 또한 인큐베이션 온도에 따라 증가하였다. 이러한 결과로 Ypt1p가 온도 차이에 따라 각각 다른 형상을 지닌다고 볼 수 있으며 고온상에서의 Ypt1p 형태가 소수성 패치에 더 많이 노출됨을 의미한다.

[0040] 표면 소수성의 증가가 Ypt1p로 하여금 HMW 복합체 형태를 나타내도록 한다. 다수의 단백질 내에서의 구조적 변화가 기능의 변화를 야기하는 것으로 알려져 있으며, HMW 복합체 형태에서 소수성의 스트레스-의존적 증가는 분자 샤페론의 전형적인 특성이다.

[0041] 본 발명자들은 이러한 결과가 Ypt1p의 경우에도 또한 정확한지 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 샤페론 활성을 조사하기 위해 본 발명자들은 기질 단백질 CS 및 MDH의 열-유도된 변성을 방지하는 Ypt1p의 능력을 측정하였다. 변성된 CS 또는 MDH의 응집으로 용해되지 않는 단백질 구조를 340nm에서 빛의 산란을 측정하여 모니터링 하였다. Ypt1p의 샤페론 활성을 조사하였으며 CS 단백질의 열적 응집을 저해하는 특성을 평가하여 양성 대조군으로서 cPrxI를, 음성 대조군으로서 글루타티온 S 트랜스퍼라제(GST)를 사용하였다.

[0042] 또한 본 발명자들은 Ypt1p(2 μM) 및 cPrxI(2 μM) 모두가 43℃에서 CS의 응집을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였고 GST(2 μM)를 사용한 경우에는 CS 응집의 저해가 관찰되지 않음을 확인하였다(도 4C). 샤페론 에세이를 위해 다른 기질로서 MDH를 테스트하였다. MDH(1.67 μM) 가 스스로 또는 GST의 5배 몰 초과(8.35 μM)로 가열 되었을 때 빛의 산란이 급격하게 증가하였다(도 4D). MDH(1.67 μM) 를 Ypt1p(1-, 2-, 및 5배 몰 초과) 양을 증가시키면서 가열할 때 농도 의존적 방식으로 응집을 저해하며 이는 Ypt1p가 샤페론으로서 기능함을 의미한다.

[0043]

[0044] 5배 몰 초과(8.35 μM)에서 Ypt1p 단백질이 존재할 때 15분간 인큐베이션 시킴으로서 열-유도된 응집으로부터 약 90%의 MDH를 보호시킨다. 따라서 Ypt1p 단백질은 이미 알려진 GTPase로서의 활성 뿐만 아니라 분자 샤페론의 신규한 기능을 명백히 확인하였다.

[0045] (5) Ypt1p 단백질의 샤페론 및 GTPase 활성은 특정 올리고머 상태와 관련 있다.

[0046] 시험관 내에서 Ypt1p 단백질의 구조-기능 관계를 특징화하기 위해 본 발명자들은 SEC를 사용하여 Ypt1p를 분별

화시키고 그의 활성을 분석하였다(도 2C). GTPase 활성은 HMW 분획에서 무시할 만 하였고 분별되지 않은 총 Ypt1p 단백질에서는 중간 정도였으며 LMW 분획에서는 가장 높았다(도 5A, 5B, 5D). 한편 샤페론 활성은 HMW 분획에서 가장 높았으며 분별되지 않은 총 Ypt1p 단백질에서는 중간이었고 LMW 분획에서는 무시할 만 하였다(도 5C, 5D). 따라서 열 스트레스가 Ypt1p 단백질의 LMW 형태의 감소와 함께 HMW 복합체로의 중합화를 유도하였으며 이는 Ypt1p 단백질의 샤페론 활성이 증가하는 반면 GTPase 활성은 감소하는 것을 의미한다.

[0047] (6) Ypt1p 단백질의 과발현은 효모 균주의 열 저항성을 증가시킨다.

[0048] 상기의 데이터는 Ypt1p 단백질이 열 충격 하에서 구조 변화에 의해 분자 샤페론으로서 새로운 기능을 획득하는 것을 나타낸다. 이러한 정보는 본 발명자들에게 Ypt1p 단백질의 열 충격 하에 생체 내 기능을 조사하도록 하였다. 효모 내의 YPT1 단백질 녹아옴은 치명적이기 때문에 본 발명자들은 스트레스 저항성에 대한 효모 세포 내의 YPT1 단백질 과발현 효과를 측정하였으며 이는 분자 샤페론의 과발현이 살아있는 생물체에 대해 열 저항성을 부여할 수 있다는 보고서에 근거한 것이다.

[0049] 본 실험에서 본 발명자들은 단백질의 조건적 과발현을 위해 GAL1 프로모터 하에서 YPT1 유전자를 포함하는 플라스미드를 구축하였으며 이를 pYES2-YPT1으로 명명하였다. 이에 따라 본 발명자들은 pYES2-YPT1을 형질 전환시키고 벡터(pYES2)를 단독으로 W303 세포에 각각 형질 전환시켰다. 형질 전환체를 27°C에서 3시간 2% 포도당과 2% 갈락토오스를 보충시킨 YPD 배지에서 인큐베이션시켰다. 총 단백질 추출물(50 µg)을 SDS-PAGE로 분별화시키고 Coomassie Brilliant Blue(CBB) 염색시키고 항-Ypt1 항체 또는 항-GAPDH 항체로 면역블로팅시켜 분석하였다(도 6A).

[0050] 2개 스트레인 모두를 2% 포도당으로 성장시키고 벡터 형질 전환체를 유사한 Ypt1p 수준에서 2% 갈락토오스로 성장시켰다. 대조적으로 2% 갈락토오스로 성장시킨 YPT1 형질전환체가 기대한 대로 더 높은 단백질 수준을 나타냈다. 그러나 모든 4가지 케이스에서의 GAPDH 단백질 수준은 일정하였다. 형질 전환체의 열 저항성을 측정하기 위해 본 발명자들은 동일한 세포를 27°C, 45°C, 50°C, 또는 55°C에서 1시간 노출시키고 이들의 생존성을 평가하였다(도 6B). 본 발명자들은 55°C에서 1시간 노출시킨 경우에 2% 포도당으로 성장시킨 스트레인과 2% 갈락토오스로 성장시킨 벡터 형질 전환체 모두에서 30% 생존율을 확인하였다. 대조적으로 2% 갈락토오스에서 성장시킨 YPT1 형질 전환체에서는 47.6±3.217%의 생존율을 확인하였고 이를 통해 Ypt1p 단백질의 과발현이 야생형 수준에서의 YPT1 발현 대조군과 비교하여 효모 세포에서 60%의 열 저항성 증가를 나타냄을 확인하였다.

[0051] YPT1 형질 전환체의 열 저항성은 포도당에서 성장시켰을 때와 비교하여 갈락토오스에서 성장시켰을 때 현저하게 증가하였으며 t-테스트에 의해 45°C, 50°C, 55°C에서 각각 0.0271, 0.002 및 0.0024의 p-수치를 나타내었다. 이러한 결과는 세포를 55°C에서 1시간 열처리한 후 트리판 블루(TB) 배제 에세이를 사용하여 재확인할 수 있었다. 2% 포도당으로 성장시킨 스트레인과 2% 갈락토오스로 성장시킨 벡터 형질 전환체의 세포 대다수가 사멸 TB-양성이었으며 YPT1 형질 전환체의 갈락토오스-성장 배양액 내의 생 TB 음성 세포는 다른 배양액과 비교하여 더 많았다(도 6C, 표 1). 이를 종합하면 본 발명의 결과는 효모 세포 내의 YPT1 단백질 과발현이 특정 세포의 열 저항성을 현격하게 증가시킬 수 있음을 지속적으로 보여준다고 할 수 있다.

[0052] 표 1은 200 µm×200 µm 정사각형 필드 내에서 카운트된 TB-음성, TB-양성 및 불명료한 세포의 수를 나타낸 것이다.

표 1

[0053]

라운드 번호	벡터/Glu			벡터/Gal			YPT1/Glu			YPT1/Gal		
	첫번째 째	두 번째 째	세 번째 째	첫번째 째	두 번째 째	세 번째 째	첫번째 째	두 번째 째	세 번째 째	첫번째 째	두 번째 째	세 번째 째

TB-음성	43	41	39	44	48	41	38	49	40	56	69	65
TB-양성	102	83	96	100	108	114	86	89	103	56	82	61
불명료	8	6	9	9	13	7	9	11	13	9	13	11
총계	153	130	144	153	169	162	133	149	156	121	164	137

[0054] 본 발명의 관찰을 근거로 하여 본 발명자들은 Ypt1p 기능의 워킹 모델을 제시하였다(도 7). 본 실험의 결과 및 모델링은 LMW에서 HMW 구조로 변화하는 Ypt1p 의 열-유도된 중합반응이 이러한 단백질의 고유한 특성임을 나타낸다(도 1, 2). HMW와 LMW 구조 사이에서의 Ypt1p의 분포는 생체 내 열 스트레스 수준에 따라 나타나며 스트레스 받지 않은 및 열-처리된 세포의 단백질 추출물을 SEC 및 천연 PAGE 기법을 사용하여 확인할 수 있다(도 1).

[0055] 모델에 근거하여 살펴보면 Ypt1p 단백질은 실온에서 대부분 LMW 단백질 형태로 존재한다(예, 스트레스 부재 시; 도 1, 2). 평상시 Ypt1p 단백질은 GTPase처럼 작용하여 신호 변환 및 발생 분비 단백질의 소포체 수송을 조절하고 LMW 형태로 존재하나 샤페론으로 작용하지는 않는다(도 5). 생체 및 시험관 내에서 열 충격은 Ypt1p의 중합 과정을 가역적으로 유도하여 HMW 형태를 형성하게 한다. 이는 GTPase의 활성은 없애지만 단백질이 분자 샤페론으로서 활성화하도록 한다. 세포가 열 스트레스로부터 회복하게 되면 Ypt1p 단백질은 생체 내에서 LMW 형태로 되돌아가게 된다(도 1A).

[0056] 평상시에 미소 G 단백질은 뉴클레오타이드-결합 상태로 간주했을 때 3개의 다른 형태로 존재할 수 있으며 이는 뉴클레오타이드가 없는 형태, GDP-결합 형태 및 GTP-결합 형태이다. 본 발명의 결과는(도 8 및 도 9) Ypt1p가 뉴클레오타이드-결합 상태와는 상관 없이 열-유도된 구조 변경의 특성으로서 유지됨을 나타낸다.

[0057] 흥미롭게도 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP-적가 Ytp1p 단백질 구조 변화의 결과에 근거하여(도 8B) 본 발명자들은 본 발명자들은 고온에서 뉴클레오타이드가 단백질로부터 제거되며 그로 인해 Ypt1p 단백질의 HMW 형태는 뉴클레오타이드가-없는 상태가 됨을 관찰하였다. 또한 뉴클레오타이드가 없는, GDP-결합된, GTPyS 결합된 Ypt1p 단백질 모두는 고온에서 인큐베이션 시킨 뒤에 양호한 샤페론을 수득하였다(도 8C). 이러한 데이터들은 Ypt1p 단백질이 뉴클레오타이드-결합 상태와는 상관없이 분자 샤페론으로 열-유도 변환하는 구조적 및 기능적 특성을 지님을 나타내고 있다.

[0058]

[0059] HMW Ypt1p 복합체의 GTP-가수 분해 활성은 유의미하지 않으며(도 5A-5C), 이는 HMW 형태에서 Ypt1p 단백질의 샤페론 활성이 고온상에서 Ypt1p 단백질의 고유한 GTPase 기능과는 독립적임을 나타낸다. 이것을 더욱 확인하기 위하여 본 발명자들은 단백질의 가수분해 활성을 저해하는 것으로 알려진 Ypt1p 단백질의 Q67L 변이체를 사용하였다. 이전의 보고서에 따르면 Ypt1p^{Q67L}의 정제된 제조합 단백질은 고유한 GTPase 활성이 결여되어 있다(도 9A).

[0060] 그러나 이 단백질은 시험관 내에서 고온에 노출되었을 때 LMW 형태에서 HMW 형태로 구조 변화를 일으켰다(도 9C). 또한 외부 온도에 의존하는 변이 단백질의 가역적 구조 변화가 ypt1-Q67L 변이 세포에서 확인되었다(도 9C). 정제된 제조합 변이 단백질은 양호한 샤페론 기능을 지니며, 고온에서 이러한 단백질을 인큐베이션 시킬 때 활성이 증가하였다(도 9D). 따라서 ypt1-Q67L 변이 세포 내에 상응하는 변이 단백질은 여전히 분자 샤페론의 구조 및 기능적 특성을 지닌다고 결론지을 수 있으며 이로서 Ypt1p 단백질의 샤페론 기능이 단백질의 고유한 GTPase의 기능과는 독립적임을 제시하고 있다.

[0061] 본 발명의 결론은 이전에 보고된 cPrxI, AtTRX h3 및 AtPP5와 같은 분자 샤페론의 기능이 그들의 원래 알려진 기능과는 독립적이라는 것을 나타내고 있다. 그러나 본 발명자들은 Ypt1p 단백질의 샤페론 기능이 GTPase와 같이 작용하는 단백질의 알려진 상호작용적 기능에 의해 조절될 수 있다는 가능성을 배제할 수는 없다,

- [0062] TEM 분석법에 의해, 본 발명자들은 SEC로 분별화시킨 Ypt1p 단백질의 HMW 분획 내에서 3량체 직사각형 입자 및 7량체 고리형 입자를 관찰하였으며, 7량체 고리는 end-on view(절단면에 평행한 방향)에서 주로 관찰되고 평균 직경은 10nm 였다(도 2). 이와 유사한 결과를 본 발명의 분자 모델링 실험에서 얻을 수 있었다; 열-충격 조건 하에서 Ypt1p 단백질 올리고머는 대부분 직경 104 Å와 두께 44 Å의 7량체 고리 구조로 존재하였다(도 3). HMW 분획 내의 구형 및 타원형 입자는 기본적인 사각형 및 고리형 올리고머의 다수 조합을 통해 유의미하게 재 생성되었다.
- [0063] GTPase의 소포체 수송 기능은 다수의 신경 퇴행성 인간 질병 및 소포체 스트레스에서의 분자 샤페론 기능과 밀접하게 연관되어 있다고 알려져 있다. 그러나 기능적 변환을 수반하는 스트레스-유도 단백질 중합반응은 다수의 다른 단백질의 예에도 불구하고 Rab 단백질에서는 보고된 바가 없다. 열 및 산화 스트레스에 대하여 효모 페록시레독신 및 아라비도시스 티오레독신-유사 단백질은 기능적 스위칭을 통해 중합반응을 이룬다.
- [0064] 다수의 열-충격 단백질을 암호화하는 유전자의 전사 작용이 열 스트레스에 대한 초기 반응임에도 불구하고, 갑작스럽고 위험한 열 충격의 발생은 Ypt1p 단백질에서 관찰된 바와 같이 스트레스-유도된 구조적 및 기능적 변화를 수반하는 전사후 단백질 변형에 의해 더 빠르고 효과적으로 관리될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 데이터에 의하면(도 1A) Ypt1p 단백질의 구조 변화는 생체 내에서 가역적이다. 또한 정제된 Ypt1p 단백질은 45°C에서 효과적으로 올리고머화된다. 그러나 본 발명에서는 HMW Ypt1p 단백질이 시험관 내에서 27°C로 유지되었음에도 불구하고 LMW 형태로 되돌아가지 않았다(도 2A). 이와 유사하게 cPrxI, AtTDX, 및 NTRC와 같이 이전에 보고된 분자 샤페론의 구조 변화는 생체 내에서는 가역적으로 구조 변화를 일으켰음에도 불구하고 시험관 내에서는 자체적으로 가역 반응하지 않았다. 특별히 SrxI는 HMW cPrxI의 중합 분해 반응을 조절하였다. 따라서 HMW Ypt1p 단백질은 체내에서 분해될 때 특정 컴포넌트의 조절을 필요로 한다고 여겨진다.
- [0066] 적절하게 폴딩된 단백질에서 소수성 영역은 통상적으로 구조체 내부에 숨겨져 있다. 그러나 이러한 영역은 열 충격과 같은 처치에 의해 외부로 노출될 수 있으며 이는 분자 샤페론에 의해 인식될 수 있다. 따라서 다수의 변형된 단백질은 분자 샤페론의 표적이 된다. 또한 스트레스 조건 하의 세포 보호에 있어 샤페론은 단백질 폴딩, 결합, 안정화, 분류, 신호 변환, 유전자 발현과 같은 다수의 중요한 역할을 수행한다. 본 발명자들은 Ypt1p 단백질이 분자 샤페론의 이러한 기본 프로세스와 관련되었을 가능성을 배제할 수 없다. 특히, Ypt1p 단백질의 샤페론 기능은 소포체 수송에 필수적일 가능성이 있다. 소포체 수송에 있어 Ypt1p 단백질의 샤페론 기능에 대한 역할을 조사하는 것은 흥미로운 결과를 도출할 것이다.
- [0067] 최근의 보고서에서는 인간의 질병에 미소 G 단백질이 관련된다는 증거를 제공하고 있다. 다수의 Rab 단백질 및 분자 샤페론은 진핵 세포 내의 중앙 방어 신호 체계와 관련되어 있다. 따라서 Ypt1p 단백질의 GTPase 기능 및 샤페론 기능 사이의 연결점을 심도 깊게 이해함으로써 새로운 발견을 이뤄낼 수 있다.
- [0068] 또한 본 발명자들은 Rab 단백질이 단순히 GTPase로서만 여겨질 것이 아니라 이러한 단백질의 오작동으로 인해 발생하는 다수의 심각한 문제에 비추어 볼 때 다양한 기능을 지니는 단백질로 인식되어야 한다고 판단된다.
- [0069] 따라서 본 발명의 결과는 다수의 인간 질병 및 식물 스트레스 저항 메커니즘의 병리학적 과정과 관련된 다른 미소 GTP-결합 단백질의 기능을 이해하는 것이 중요함을 시사하고 있다.

- [0070] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0071] (실시예 1) 효모 세포로부터의 HMW 열-안정 단백질의 분리
- [0072] 사카로마이세스 세레비지에 W303(SVL82; MaTa, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, 및 can1)를 1% 효모 추출물, 2% 펩톤 및 2% 덱스트로스를 포함하고 있는 효모 펩톤 덱스트로스(YPD) 배지에서 성장시켰다. 증식 단계 배양액을 30분간 60℃로 열처리하고 세포질 추출물 제제를 수득하였다. 100 μ M NaCl 및 프로타아제 저해 각테일(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)을 포함하는 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진 에탄 술폰산(HEPES; pH 8.0) 완충액 50 μ M을 사용하여 세포를 글래스 비드와 함께 용해시키고 4℃에서 15분간 134,600g로 초원심분리시켰다(TLS-55 rotor; Beckman Coulter, Brea, 미국 캘리포니아). 상등액(예를 들어 세포질 분획)을 Superdex 200 HR 10/W30 칼럼(Amersham Biosciences, Uppsala, 스웨덴) 상에서 크기-배제 크로마토그래피(SEC)하였다. 공극용적 내에서 용출된 HMW 복합체를 채취하였으며 2D-PAGE(폴리아크릴아미드 겔 전기영동)를 통해 분석하고 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 시간-of-비행(MALDI-TOF) 질량 분석기를 통하여 확인하였다.
- [0073] (실시예 2) 발현 플라스미드의 구축
- [0074] YPT1의 ORF(시스템 명칭, YFL038C)를 ScYPT1-F(5'-CGGGATCCATGAATAGCGAGTACGATTAC-3')(서열번호: 2) 및 ScYPT1-R(5'-GCAAGCTTTCAACAGCAGCCCCACCGGT-3')(서열번호: 3) 프라이머 세트와 함께 S. 세레비지에 W303 cDNA 라이브러리로부터 PCR로 증폭시켰다. PCR 생성물은 pGEM-T^{easy} 벡터(Promega, Madison, 미국 위스콘신) 내에서 서브클로닝되고, BamHI 및 HindIII 효소로 플라스미드 pGEM-T^{easy}-YPT1를 분해시켜 분비시키고 pGEX-2T 벡터에 상응하는 위치 사이에 삽입시켜 pGEX-YPT1을 생성시킨다. YPT1을 과-발현하는 효모 세포의 표현형을 관찰하기 위해 본 발명자들은 pYES 벡터(Life Technologies-Invitrogen, Carlsbad, 미국 캘리포니아)를 사용하였다. pGEM-T^{easy}-YPT1을 BamHI 및 SpeI로 분해시켜 분비된 유전자 단편을 pYES2 벡터에 삽입시키고 BamHI 및 XbaI로 절단시켜 pYES2-YPT1을 생성시켰다. Ytp1p에서의 GTPase 및 샤페론 기능의 무관함을 확인하기 위해 변이주 ypt1-Q67L(YCL263 MaTa his4 ura3 lys 및 ypt1-Q67L)을 사용하였으며 Q67L 변이를 위해 Q67L-F(5'-ACTGCAGTCTAGAACGTTTC-3')(서열번호: 4) 및 Q67L-R(5'-GAAACGTTCTAGACCTGCAGT-3')(서열번호: 5)의 프라이머 세트를 사용하였다. 모든 컨스트럭트는 서열 분석으로 확인되었다.
- [0075] (실시예 3) 재조합 단백질의 발현 및 폴리클론 항체의 생성
- [0076] pGEX-YPT1로 Escherichia coli BL21(DE3) pLysS를 형질전환시켰다. 세포를 앰피실린(50 μ g/ml)을 첨가한 Luria-Bertani 배지에서 37℃로 배양시켰다. 0.5-0.6의 Abs₆₀₀에서, 이소프로필-b-D-티오갈락토-피라노시드 0.2 μ M의 첨가를 통해 단백질 발현이 유도되었다. 30℃에서 4시간 동안 추가로 배양한 후에, 세포를 15분간 6000g로 원심분리하여 수득하였다. 펠렛을 PBS 완충용액 [140 μ M NaCl, 2.7 μ M KCl, 10 μ M Na₂HPO₄, 1.8 μ M KH₂PO₄(pH 7.6) 및 1 μ M PMSF]에 재현탁시키고 -70℃에서 보관시켰다. GSH 아가로스 레진을 사용하여 GST-융합-Ytp1p 단백질을 세포로부터 정제시키고 상기한 트롬빈 절단법으로 GST-태그를 제거시켰다. Ytp1p 단백질을 TSK 헤파린-5PW HPLC 칼럼(7.5375 μ m; Sigma-Aldrich)으로 더욱 정제시켰다.
- [0077] GSH-칼럼 상에서 함께 정제할 수 있는 오염물인 DnaK를 제조자 지침(Amersham Biosciences)에 따라 ATP-아가로스 칼럼을 사용하여 제거시켰다. 단백질 상의 뉴클레오타이드 잔기를 제거하기 위하여, 정제된 Ytp1p를 10 μ M의 EDTA를 포함하는 과량의 난블로킹 완충용액 [20 μ M Tris-HCl(pH 7.5), 100 μ M NaCl, 1 μ M DTT, 및 0.1% Triton X-100]을 사용하여 30℃에서 45분간 세척하고 Ytp1p 내의 뉴클레오타이드가 제거된 형태를 제조하였다. 순수한 Ytp1p를 사용 전에 20 μ M HEPES(pH 8.0)로 투석시켰다. 토끼의 면역화를 위해 정제된 Ytp1p를 사용하고

폴리클론 항체를 획득하였다. SDS-PAGE 겔 상에서 모노머 Ypt1p의 크기에 상응하는 분자량 23.5kDa의 단일 단백질 밴드의 특이적 증가를 확인함으로써 항체의 특이성을 검증하였다. 본 발명의 실험에서 사용한 총 단백질은 포도당 대신 YPD 배지 내에 갈락토오스를 보충시켜 pYES2-YPT1를 포함하는 효모로부터 추출한 것이다.

[0078] (실시예 4) 크기 배제 크로마토그래피(SEC)

[0079] 0.5 ml/분(AKTAFPLC; Amersham Biosciences)의 유속으로 100 μ M NaCl을 포함하는 50 μ M HEPES(pH 8.0) 완충 용액으로 평형화시킨 Superdex 200 HR 10/30 칼럼 상에서 SEC를 수행하였다. 단백질 피크는 Centricon YM-30(Millipore, Billerica, 미국 메사추세츠)을 이용하여 수집 농축되었다.

[0080] (실시예 5) GTPase 활성의 에세이

[0081] GTPase 활성을 측정하기 위하여 박막 크로마토그래피(TLC) 기술을 일부 변형시켰다. 0.1 μ M α [³²P]GTP 및 2 μ g Ypt1p를 포함하는 HEDL 완충용액 [20 μ M Tri-HCl(pH7.5), 2 μ M EDTA, 및 10 μ M DTT] 200 μ l 내에서 30°C로 GTPase 반응을 진행하였다. 적절한 시간 간격으로 10 μ l 반응 생성물을 10 μ l 0.5 M EDTA(pH 8.0)에 용출시켜 반응을 중단시키고 2 μ l의 혼합액을 폴리에틸렌이민-셀룰로오스 TLC 플레이트 상에 스포팅시켰다. 플레이트를 0.5M KH₂PO₄(pH 3.4) 내에서 전개시키고, 건조 및 X-레이 필름에 노출시켰다.

[0082] (실시예 6) 샤페론 활성의 에세이

[0083] 구연산신타아제(CS) 및 말르산탈수소효소(MDH; Sigma-Aldrich Chemical)를 기질로 사용하여 샤페론 활성을 측정하였다. 기질의 응집에 의해 야기된 혼탁도를 온도조절 세포 홀더를 장착한 DU800 스펙트로포토미터(Beckman Coulter)로 모니터링하였다.

[0084] (실시예 7) 전자 현미경 관찰 및 영상 처리

[0085] Ypt1p의 SEC 단편을 글로(glow) 방전 탄소-코팅 구리 그리드(Harrick Plasma, Ithaca, NY, USA)에 적용시켰다. 공기 중에서 1-2분간 단백질 흡수 후, 그리드를 1% 우라닐 아세테이트로 음성 염색시켰다. 그리드는 80kV에서 작동되는 Philips CM120 전자 현미경(FEI, Hillsboro, OR, USA)으로 검사하였다. 영상을 2K32K, F224HK 스캐닝 CCD 카메라(TVIPS, Gauting, 독일)로 365,000배(0.37 nm/픽셀)로 기록하였다. 단일 입자 영상 처리를 SPIDER를 통해 수행하였다.

[0086] (실시예 8) 컴퓨터 도킹 및 분자 동역학 시뮬레이션

[0087] 분자 모델링을 위해, S. 세레비지에 Ypt1p의 2.06Å 결정 구조를 Protein Data Bank(PDB ID 1YZN)를 통해 획득하였다. Ypt1p의 결정 구조가 GTP 결합 지점 내에 Gpp(NH)p를 포함하므로, Ypt1p 내에서 뉴클레오타이드가 제거된 형태를 시뮬레이션하기 위해 Gpp(NH)p를 제거하였으며 이는 본 연구의 핵심 포인트이다. 적정 온도(300K) 및 고온(318K)에서 Ypt1p 구조의 모노머-모노머 상호 작용을 조사하기 위해 Daughter of Turnip(DOT) 2.0 소프트웨어를 사용하였다. 분자 역학(MD) 시뮬레이션을 GROMOS96 force field와 함께 GROMACS 4.0.5 소프트웨어(<http://www.gromacs.org/>)를 사용하여 수행하였다.

[0088] 초기 물질을 orthorhombic water box(1 nm 두께) 에 넣고 5 Na^+ 대음이온을 첨가시켜 전체 전하를 중화시켰다. Particle Mesh Ewald 법으로 광범위의 정전기를 조절하였다. 전체 시스템을 약 24,000개의 원자로 구축하였으며 이는 7500개의 물 분자와 단백질 내의 1760개 원자로 구성되어있다. 초기 시스템의 에너지 최소화는 허용 수치가 200kJ/mol에 도달할 때까지 초기 물질로부터의 비정상적인 접촉을 제거하기 위해 급경사 알고리즘을 사용하여 수행하였다. 시스템은 100 ps에 대한 표준 기압 상수(1 bar) 와 300K 또는 318K에서 평형 상태에 도달하였다. 마침내 본 발명자들은NPT 앙상블과 함께 주기적 경계 조건 하에서 2개의 생성 작용을 수행하였다.

[0089] (실시예 9) 열 쇼크에 대항하는 세포 열 저항성 에세이

[0090] 액체 배양 에세이를 위해, 효모 균주를 27℃의 YPD 배지 내에서 성장시켰다. YPD 내에서 대수기 배양을 YPD의 흡광도(600)가 0.4가 되도록 조절하였고 27℃에서 성장시켰다. 성장 확인을 위해 DU800 스펙트로포토메터(Beckman Coulter, 미국)를 사용하여 흡광도(600)를 측정하였다. 생존 카운트 에세이를 위해 효모 세포를 27℃ YPD 배지에서 하룻밤 성장시켰고 신선한 YPD 배지 내에 5×10^7 세포/ml 농도로 한 시간 동안 다양한 온도에서 인큐베이션 시켰다. 생존하는 세포 또는 콜로니 형성 유닛(CFU)의 수를 YPD 한천 플레이트 위에 적절한 희석을 통해 결정하였고 27℃에서 2일간 인큐베이션 후에 생성되는 콜로니의 수를 카운팅하였다.

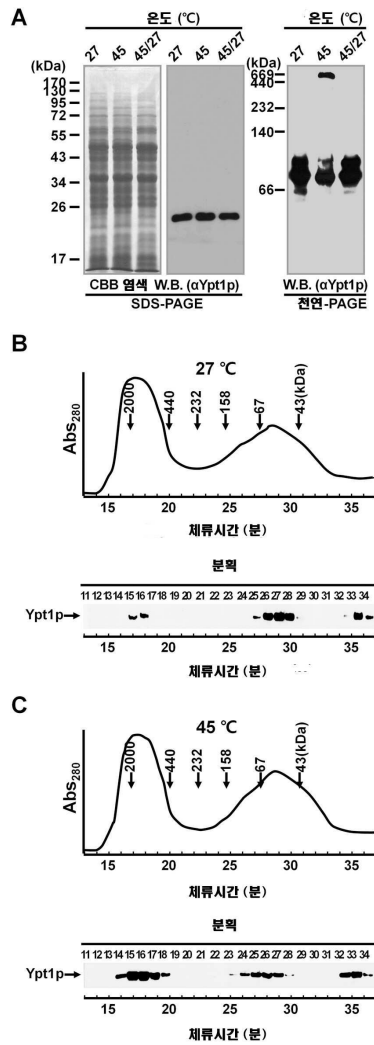
[0091] 생존 에세이에 사용되는 효모 시료는 55℃에서 다음과 같은 트리판블루(TB) 염색을 행하였다. 1ml의 세포를 원심분리 후 채집하였으며 세척 및 PBS 내에 재현탁시키고 0.4% TB로 5-10분간 염색시켰다. 세포를 형광 현미경(Olympus OpticalCo., 일본 도쿄) 하에서 조사하고 그 결과를 소프트웨어를 사용하여 기록하였다. $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ 정사각형 필드 내에 TB-음성, 양성, 모호한 및 총 세포 수를 적어도 세 번 독립적인 실험을 통해 카운팅하였으며 TB-음성 및 양성 세포 내의 TB-음성 세포의 비율을 측정하였다.

[0092] (실시예 10) bis-ANS 형광의 측정

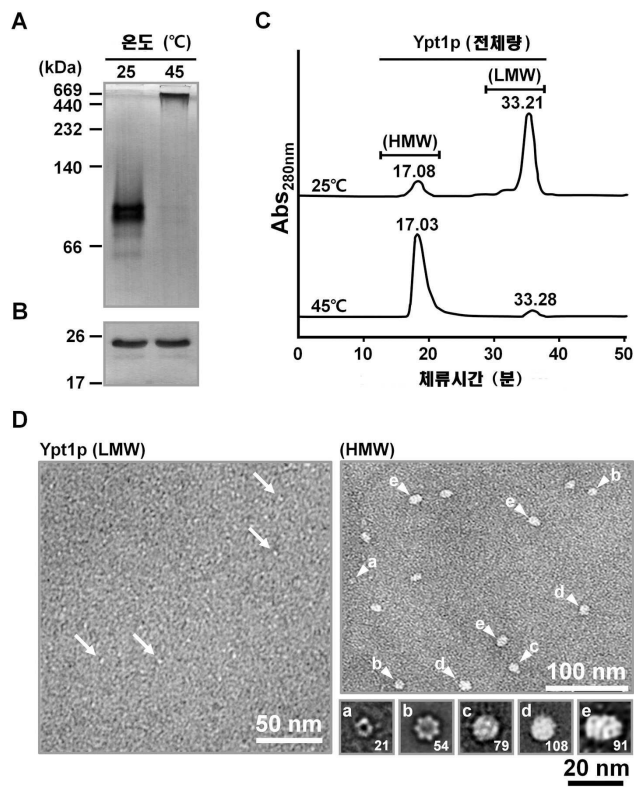
[0093] 단백질(30 mg/ml in 20 μM HEPES, pH8.0) 과 1, 1'-bi(4-아닐리노)나프탈렌술폰산(bis-ANS; 10 μM ; Sigma-Aldrich, MO, 미국)을 포함하는 반응 혼합물을 25℃, 45℃ 및 50℃에서 20분간 인큐베이션시키고 형광 스펙트럼 400 및 600nm에서 여기 파장 380nm로 하여 SFM25 스펙트로플루오로메터(Kontron Instruments SpA, 이탈리아 밀라노) 를 사용하여 스캐닝하였다.

도면

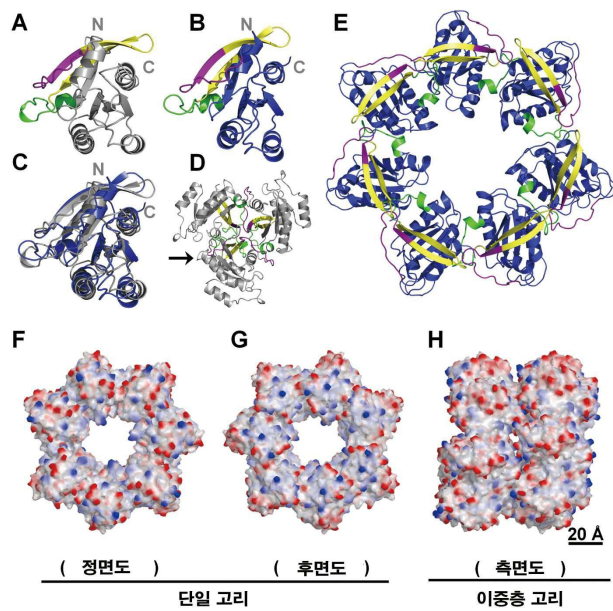
도면1



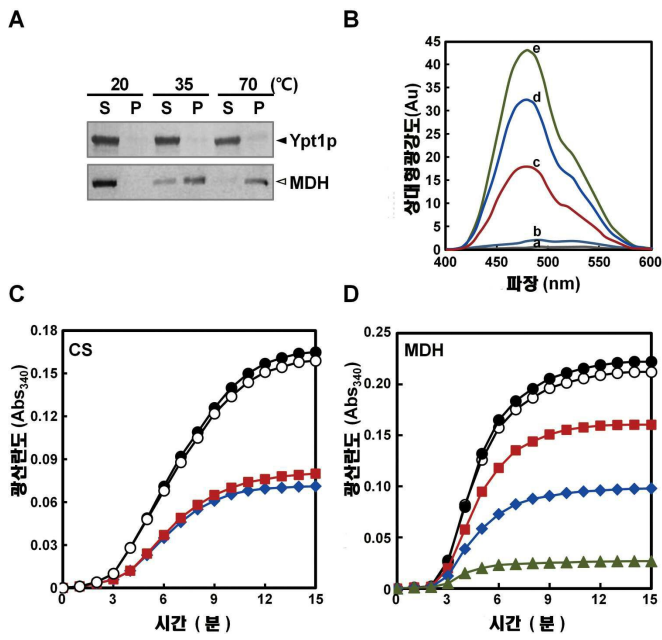
도면2



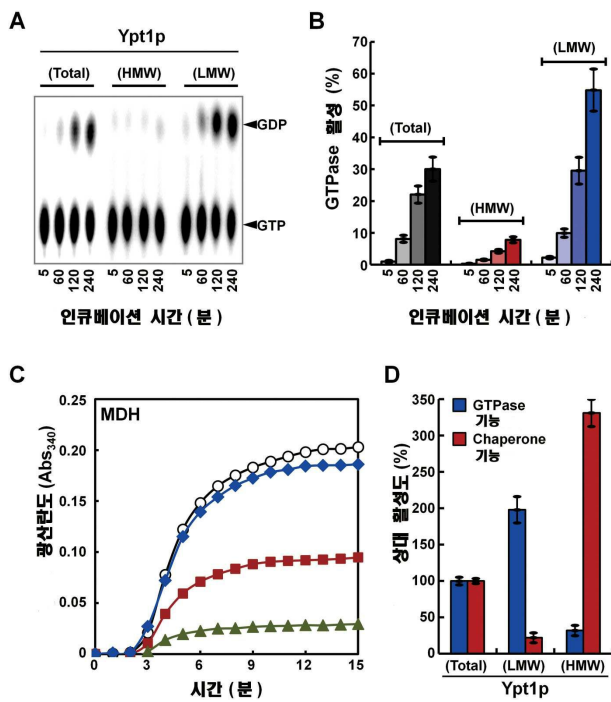
도면3



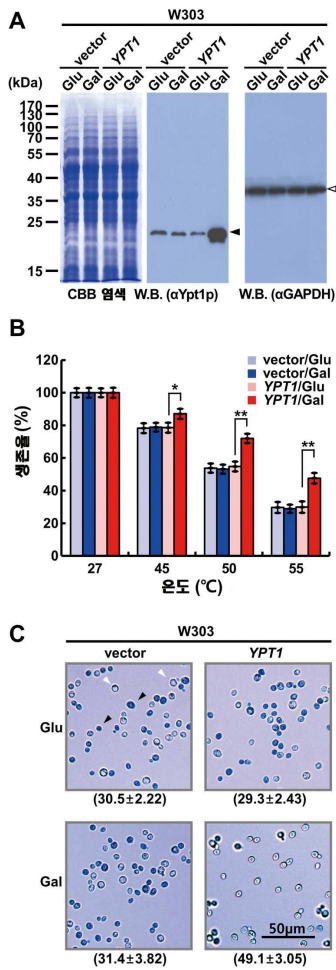
도면4



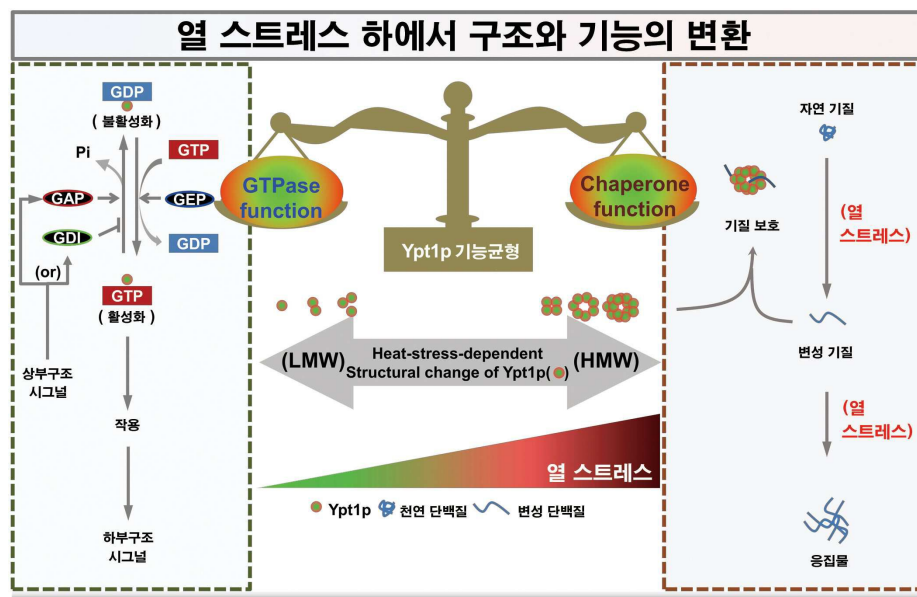
도면5



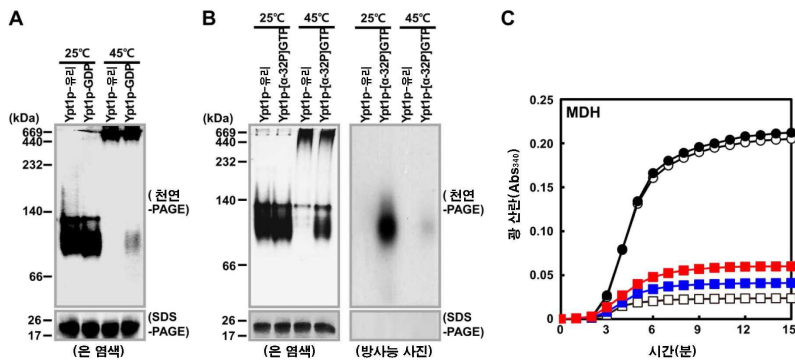
도면6



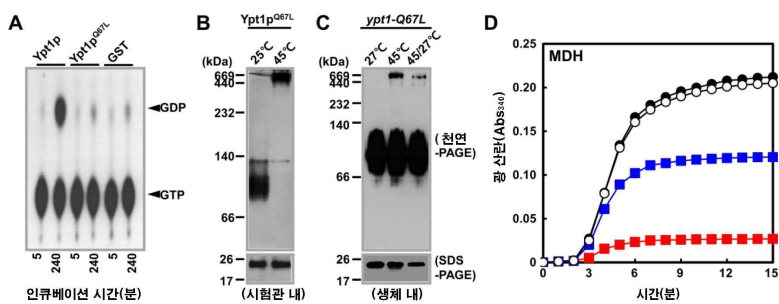
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Yeast Ypt1p protein transforming the functions by heat shock
- <130> KP-984
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 206
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis thaliana
- <400> 1

Met Asn Ser Glu Tyr Asp Tyr Leu Phe Lys Leu Leu Ile Gly Asn

1 5 10 15

Ser Gly Val Gly Lys Ser Cys Leu Leu Arg Phe Ser Asp Asp Thr

20 25 30

Tyr Thr Asn Asp Tyr Ile Ser Thr Ile Gly Val Asp Phe Lys Ile Lys

35 40 45

Thr Val Glu Leu Asp Gly Lys Thr Val Lys Leu Gln Ile Trp Asp Thr

50 55 60
 Ala Gly Gln Glu Arg Phe Arg Thr Ile Thr Ser Ser Tyr Tyr Arg Gly
 65 70 75 80
 Ser His Gly Ile Ile Ile Val Tyr Asp Val Thr Asp Gln Glu Ser Phe
 85 90 95
 Asn Gly Val Lys Met Trp Leu Gln Glu Ile Asp Arg Tyr Ala Thr Ser

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

Asn Leu Asn Glu Thr Thr Gln Lys Lys Glu Asp Lys Gly Asn Val Asn
 180 185 190
 Leu Lys Gly Gln Ser Leu Thr Asn Thr Gly Gly Gly Cys Cys
 195 200 205

<210> 2
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer

<400> 2

cgggatccat gaatagcgag tacgattac

29

<210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer

<400> 3

gcaagctttc aacagcagcc cccaccggt	29
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 4	
actgcaggtc tagaacgttt c	21
<210> 5	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 5	
gaaacgttct agacctgcag t	21