

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 11월 2일 (02.11.2017) WIPO | PCT

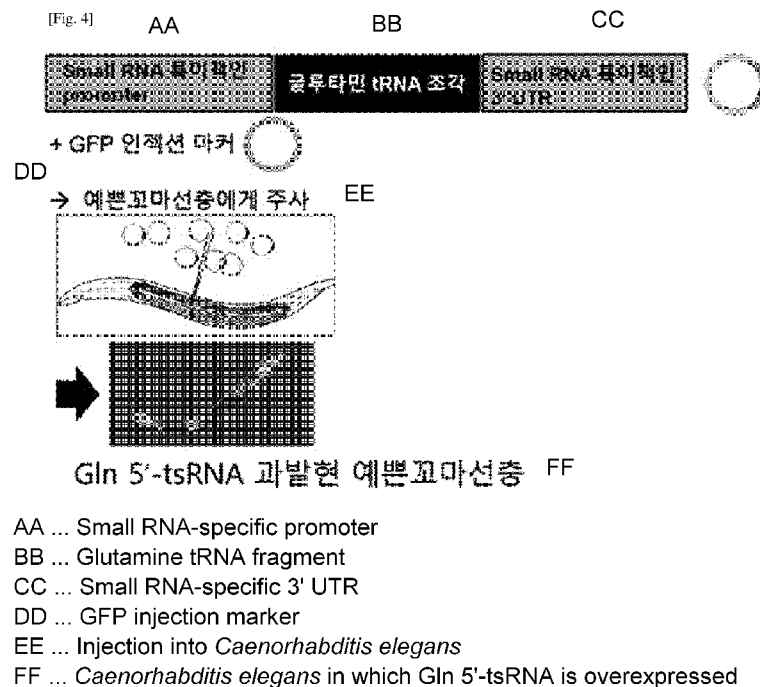


(10) 국제공개번호
WO 2017/188666 A1

- (51) 국제특허분류: A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01) 과학기술원 (DAEGU GYEONGBUK INSTITUTE OF SCIENCE) [KR/KR]; 42988 대구시 달성군 현풍면 테크노중앙대로 333, Daegu (KR).
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004280 (72) 발명자: 남홍길 (NAM, Hong Gil); 05501 서울시 송파구 올림픽로 99 126동 502호, Seoul (KR). 정규열 (JUNG, GYOO YEOL); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155 9동 2003호, Gyeongsangbuk-do (KR). 이승재 (LEE, Seung Jae); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155 4동 1202호, Gyeongsangbuk-do (KR). 황우선 (HWANG, Woo Seon); 37662 경상북도 포항시 남구 행복주택길 11 A동 43호 2층 202호, Gyeongsangbuk-do (KR). 신기원 (SHING, Gi Won); 01319 서울시 도봉구 도봉로180나길 20 103동 601호, Seoul (KR). 서미화 (SEO, Mi Hwa); 08730 서울시 관악구 관악로 40길, 60 121-1403, Seoul (KR).
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 21일 (21.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0049947 2016년 4월 25일 (25.04.2016) KR
- (71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR). 기초과학연구원 (INSTITUTE FOR BASIC SCIENCE) [KR/KR]; 34047 대전시 유성구 유성대로1689번길 70, Daejeon (KR). 재단법인대구경북
- (74) 대리인: 특허법인 아이시스 (ISIS IP LAW LLC); 06160 서울시 강남구 테헤란로63길 14, 8층, Seoul (KR).

(54) Title: ANTI-AGING TRANSGENIC *CAENORHABDITIS ELEGANS*

(54) 발명의 명칭: 항노화 형질전환 예쁜꼬마선충



(57) Abstract: The present invention relates to: a transgenic *Caenorhabditis elegans* in which a glutamine tRNA 5' terminus-derived fragment (Gln 5'-tsRNA) is overexpressed; a preparation method therefor; and a method for screening for aging-associated factors by using the transgenic *Caenorhabditis elegans*. A transgenic *Caenorhabditis elegans* model provided in the present invention is an animal model in which Gln 5'-tsRNA is overexpressed such that aging is inhibited. When the model of the present invention is used, anti-aging mechanisms can be easily investigated, thereby significantly contributing to various research fields such as that of developing new anti-aging drugs and screening for age-inducing materials.



(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은, 글루타민 tRNA 5' 말단 유래의 단편(Gln 5'-tsRNA)이 과발현된 형질전환 예쁜꼬마선충, 이의 제조방법, 및 상기 형질전환 예쁜꼬마선충을 이용한 노화 관련인자의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 형질전환 예쁜꼬마선충 모델은, 글루타민 tRNA 5' 말단 유래의 단편(Gln 5'-tsRNA)이 과발현되어 노화가 억제된 동물모델로서, 본 발명의 모델을 이용하면 항노화 메커니즘을 손쉽게 규명할 수 있고, 이를 통하여 항노화 신약 개발, 노화 유도 물질 스크리닝 등 다양한 연구 분야에서 크게 기여할 수 있을 것이다.

명세서

발명의 명칭: 항노화 형질전환 예쁜꼬마선충

기술분야

- [1] 본 발명은, 글루타민 tRNA 5' 말단 유래의 단편(Gln 5'-tsRNA)이 과발현된 형질전환 예쁜꼬마선충, 이의 제조방법, 및 상기 형질전환 예쁜꼬마선충을 이용한 노화 관련인자의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 약 20-50bp 정도의 small non-coding RNA는 단백질로 발현되는 mRNA와 달리 RNA 그 자체로 기능을 하는 RNA로서, 최근 다양한 small RNA들이 생체 내에서 중요한 기능들을 한다는 것이 밝혀지고 있다. Small RNA에는 마이크로 RNA(miRNA), 짧은 간섭 RNA(siRNA), PIWI 결합 RNA(piRNA) 등이 있으며, 자신의 염기서열과 상보적인 염기서열을 가지는 RNA 타겟을 간섭 및 억제하는 기능을 한다.
- [3] tRNA 유래 단편(tRNA-derived small RNA; tsRNAs)은 다양한 개체에서 새롭게 발견된 small non-coding RNA의 한 종류이다. 사람을 비롯하여 쥐, 꼬마선충, 애기장대 등 다양한 종에서 발견이 되는 것으로 보아 진화적으로 보존된 기능을 할 것이라고 추측되고 있다. 또한, tsRNAs는 이미 만들어진 mature tRNA에서 특정 부분이 절단됨으로써 생성되며, 임의의 염기서열이 아닌 특정한 염기서열로만 발견이 되므로, 단순히 tRNA가 랜덤하게 분해되어 생긴 단편이 아닌 특이적인 기능을 하는 단편으로 여겨진다. 이때, mature tRNA에서 절단되는 부위에 따라 4가지 종류의 단편이 생성될 수 있는데, 예를 들면 5'-tsRNA, 3' CCA tsRNA, 3' U tsRNA, internal tsRNA 로 분류될 수 있다(도 1 참조).
- [4] tsRNAs는 암세포주, 바이러스 감염세포, 지방조직 유래 줄기세포, 마우스 혈청 등에서 발견된 바 있고, 스트레스 등 다양한 생리적 상황에서 단편들이 생성되며, small RNA와 유사한 조절기능이 보고된 바 있으나, 아직까지 항노화 작용과 관련된 기능은 밝혀진 바 없는 실정이다.
- [5] 특히, tRNA 유전자의 특성상 tsRNAs의 서열분석에는 어려움이 따르는데, 예를 들면 tRNA 유전자는 게놈 전체에 다중 카피로 존재하고 이들 중 일부는 동일하나 일부는 서열에 차이가 있기 때문에, tsRNA가 유래된 정확한 게놈 origin을 확인하는 것이 어렵다. 또한, mature tRNA는 변형이 심하기 때문에 mature form으로부터 생성된 tsRNA와 상응하는 게놈 서열을 정확히 매칭하기도 쉽지 않다.
- [6] 한편, 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)은 알에서 부화되어 L1, L2, L3, L4의 4단계의 유충단계를 거쳐 성충이 되는데 약 3일 정도만이 소요되고 수명도 약 3주 정도 되어 발달실험이나 수명실험에 적합한 모델동물이다. 또한, 유전자 조작이 매우 쉽고, 크기가 작아 동시에 많은 수를 비교적 저렴하게 키울 수 있고,

몸이 투명해 현미경 등으로 꼬마선충의 내부를 직접 관찰하거나 형광을 관찰하기도 아주 쉽다.

- [7] 또한, 예쁜꼬마선충은 사람의 질병에 관여하는 많은 유전자가 보존되어 있어 이를 이용한 유전자 발굴 및 분석, 이를 타겟으로 하는 신약 개발의 가능성이 타진되고 있다. 예를 들어, 포유류의 대사 및 노화 조절에 중요한 유전자들인 인슐린 신호전달 체계의 유전자들, 세포 사멸 조절 유전자들, 면역 조절에 중요한 MAP 인산화효소 신호전달체계 등이 예쁜꼬마선충에도 존재하며, 이들의 조절 기전 규명이 활발하게 연구되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 이에, 본 발명자들은, 예쁜꼬마선충이 유전자 조작이 용이하고 항노화 메커니즘 및 병리학적 역할을 밝히는데 좋은 동물모델이 될 수 있다는 전제하에, 또한 예쁜꼬마선충이 나이-의존적으로 특정 tsRNA의 레벨이 변화한다는 것을 발견하고, tsRNAs와 노화/수명과의 관련성에 주목하여, 특정의 tRNA 유래 단편(tsRNAs)을 과발현하는 예쁜꼬마선충 형질전환 동물을 완성하게 되었다.
- [9] 따라서, 본 발명의 목적은, 글루타민 tRNA 5' 말단 유래의 단편(Gln 5'-tsRNA)이 과발현된 형질전환 예쁜꼬마선충(*C. elegans*), 이의 제조방법, 및 상기 형질전환 예쁜꼬마선충을 이용하여 노화 관련 인자를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은, 글루타민 tRNA 5' 말단 유래의 단편(Gln 5'-tsRNA)이 과발현된, 형질전환 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 제공한다.
- [12] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 예쁜꼬마선충은 항노화 동물모델용인 것을 특징으로 한다.
- [13] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 Gln 5'-tsRNA는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [14] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 예쁜꼬마선충은 미토콘드리아 활성화에 의하여 항노화 효과를 보이는 것을 특징으로 한다.
- [15] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 예쁜꼬마선충은 DR(Dietary Restriction)/AMPK(AMP-dependent kinase) 경로에 의해 항노화 효과를 보이는 것을 특징으로 한다.
- [16] 또한, 본 발명은, (a) U6 프로모터와 Gln 5'-tsRNA DNA와 U6 3' UTR(untranslated region)을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 재조합 벡터를 예쁜꼬마선충에 주입하는 단계를 포함하는, 상기 형질전환 예쁜꼬마선충(

Caenorhabditis elegans)의 제조방법을 제공한다.

- [17] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 단계 (a)의 U6 프로모터는 small RNA 과발현에 특이적인 프로모터인 것을 특징으로 한다.
- [18] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 단계 (b)의 재조합 벡터를 예쁜꼬마선충에 주입하는 방법은 미세주입법(microinjection)인 것을 특징으로 한다.
- [19] 또한, 본 발명은, 상기 형질전환 예쁜꼬마선충을 이용한, 노화 유도 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [20] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 스크리닝 방법은, (a) 상기 형질전환 예쁜꼬마선충에 후보 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보 물질 처리 후 미토콘드리아 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 미토콘드리아 활성이 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [21] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 스크리닝 방법은, (a) 상기 형질전환 예쁜꼬마선충에 후보 물질을 처리하는 단계; (b) 상기 후보 물질 처리 후 AMPK(AMP-dependent kinase) 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 AMPK 활성이 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [22] 본 발명에서 제공하는 형질전환 예쁜꼬마선충 모델은, 글루타민 tRNA 5' 말단 유래의 단편(Gln 5'-tsRNA)이 과발현되어 노화가 억제된 동물모델로서, 본 발명의 모델을 이용하면 항노화 메커니즘을 손쉽게 규명할 수 있다.
- [23] 또한, 본 발명에서 제공하는 항노화 형질전환 예쁜꼬마선충의 제조방법은, 통상의 단백질이 아닌 tRNA 조각 RNA를 과발현시킨 것으로서 small RNA를 과발현하는 데에 특이적인 프로모터를 사용하였는바, 이와 같은 방법을 이용하면 다양한 small RNA를 과발현하는 예쁜꼬마선충의 제조도 용이하게 할 수 있을 것이다.
- [24] 또한, 본 발명에 의하면, tsRNAs의 항노화 기능을 규명함으로써, 항노화 신약 개발, 노화 유도 물질을 포함하는 다양한 인자의 스크리닝 등 많은 연구분야에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 mature tRNA에서 절단되는 부위에 따라 4가지 종류의 tsRNA가 생성됨을 나타내는 모식도이다.
- [26] 도 2는 예쁜꼬마선충의 small RNA 시퀀싱 데이터베이스 분석결과, 나이에 따라 Gln 5'-tsRNA가 증가한다는 것을 확인한 결과이다.
- [27] 도 3은 예쁜꼬마선충 샘플에서 나이에 따라 글루타민 5'-tsRNA의 mRNA가 증가하는 것을 확인한 노던 블랏(Northern blot) 결과이다.
- [28] 도 4는 small RNA 특이적인 U6 프로모터를 이용하여 Gln 5'-tsRNA를

- 과발현하는 형질전환 예쁜꼬마선충 모델의 제작과정을 보여주는 모식도이다.
- [29] 도 5는 노화작용에서 Gln 5'-tsRNA의 기능을 확인하기 위하여, Gln 5'-tsRNA를 과발현하는 형질전환 예쁜꼬마선충의 수명을 야생형과 비교 측정한 결과이다.
- [30] 도 6은 Gln 5'-tsRNA 과발현에 의해 유도된 mRNA 프로파일 변화를 확인한 결과이다.
- [31] 도 7은 Gln 5'-tsRNA의 과발현에 의해 미토콘드리아 유전자들의 mRNA 수준이 야생형에 비해 매우 증가되었음을 확인한 RNA sequencing 분석 결과이다.
- [32] 도 8은 Gln 5'-tsRNA 과발현 예쁜꼬마선충에서 미토콘드리아 유전자의 DNA 개수가 *aak-2*를 통해 증가됨을 확인한 qPCR 결과이다.
- [33] 도 9는 종래 알려진 수명조절 경로(DR, insulin/IGF-1 pathway 등)와 Gln 5'-tsRNA의 과발현 사이에 유전적인 상호작용을 확인하기 위하여, 도 9a는 *eat-2*(-), 도 9b는 *aak-2*(-), 도 9c는 *daf-16*(-), 도 9d는 *daf-16*(-); *daf-2*(-), 및 도 9e는 *hsf-1*(-) 돌연변이 background에서, Gln 5'-tsRNA 과발현 예쁜꼬마선충의 수명 변화를 측정한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [34] 본 발명은, 글루타민 tRNA 5' 말단 유래의 단편(Gln 5'-tsRNA)이 과발현된, 형질전환 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 제공한다.
- [35] 본 발명에서 '예쁜꼬마선충'은 학명으로는 *Caenorhabditis elegans* 이며 흙에서 박테리아를 먹고사는 선충류로서 유전학, 분자생물학, 세포생물학 실험에서 널리 사용된다.
- [36] 본 발명에서 '형질전환'은 외부에서 도입된 유전자를 재조합하여, 이를 개체에 인공적으로 삽입시킴으로써 그 형질의 일부가 변화된 것을 의미한다.
- [37] 본 발명에서 '형질전환 예쁜꼬마선충'은 Gln 5'-tsRNA가 과발현됨으로써 노화가 억제된, 즉 항노화 형질을 발현하는 예쁜꼬마선충을 의미한다. 따라서, 본 발명의 형질전환 예쁜꼬마선충은 항노화 동물모델용으로 이용될 수 있다.
- [38] 본 발명에서 'tRNA 유래 단편(tRNA-derived small RNAs; tsRNAs)'은 small non-coding RNA의 한 종류로서 mature tRNA에서 특정 부분이 절단됨으로써 생성된 특정 염기서열의 단편을 의미한다.
- [39] 본 발명에서 'Gln 5'-tsRNA'란 글루타민 tRNA의 5' 말단에서 유래된 단편으로서 특별한 제한은 없으나, 서열번호 1의 염기서열로 구성된 단편이거나, 이와 80% 이상의 상동성이 있는 것이 바람직하다. 이때 "상동성"은 공통된 조상 핵산 서열로부터 천연적으로 또는 인공적으로 유래된 것을 의미하며 임의의 천연 발생 핵산이 임의의 이용 가능한 돌연변이 유발에 의해 하나 이상의 선택자 코돈을 포함하도록 변형될 수 있다.
- [40] 본 발명에서 '~로부터 유래된'이라는 용어는 특정화된 분자 또는 유기체로부터 단리되거나, 그로부터의 정보를 이용하여 제조된 성분을 지칭한다.
- [41] 본 발명에서 항노화 동물모델용 예쁜꼬마선충은, 메커니즘의 종류에 상관없이

- 항노화 형질을 발현하는 것이면 족하고 특별한 제한은 없으나, 미토콘드리아 활성화에 의하거나, AMPK(AMP-dependent kinase) 활성화에 의한 것일 수 있다.
- [42] 이때, 미토콘드리아는 생체 내 에너지를 생성하는 세포 소기관으로서 각종 유전병/성인병 등에 중요한 역할을 하며, 미토콘드리아가 에너지를 잘 만들어 에너지 대사가 원활히 진행되도록 돕는 경우, 즉 미토콘드리아가 활성화되어 있을 경우 노화가 억제된다고 보고된 바 있다. 또한, AMPK는 체내 에너지 항상성을 조절하는 주요 효소로서 대부분의 동물 조직에서 발현되는 진화적으로 잘 보존된 효소이다. AMPK는 노화에도 연관되어 있는데 노화는 여러 장기들의 정상적인 기능 하락이 수반되는 증상으로 제2형 당뇨병, 신경 퇴행성질환, 암, 심혈관 질환과 같은 여러 질환들의 발생과 이로 인한 사망을 유도하고 있으므로, AMPK의 활성도를 증강시키거나 감소시키는 물질을 이용한 신약개발의 가능성은 매우 크고 다양하게 활용될 수 있다.
- [43] 또한, 본 발명은, (a) U6 프로모터와 Gln 5'-tsRNA DNA와 U6 3' UTR(untranslated region)을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 재조합 벡터를 예쁜꼬마선충에 주입하는 단계를 포함하는, 상기 형질전환 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)의 제조방법을 제공한다.
- [44] 본 발명에 있어서, "재조합 벡터"란 유전공학에 이용되는 벡터로서, 플라스미드 벡터가 바람직하나 이에 한정되지 않고, 예를 들면 바이러스 벡터, 코스미드 벡터, 세균 인공 염색체(BAC), 효모 인공 염색체(YAC) 및 다른 비플라스미드 벡터도 이용될 수 있다.
- [45] 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 형질전환을 확인할 수 있는 표지 유전자를 더 포함할 수 있으며, 이때 표지 유전자에 특별한 제한은 없으나 녹색 형광단백질(GFP), 적색 형광단백질(RFP) 등과 같은 형광단백질 유전자인 것이 바람직하다.
- [46] 본 발명에서 "프로모터"란 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미하며, 발현용으로 사용되는 것이라면 특별히 한정되지 않으나, small RNA의 발현에 적합한 U6 프로모터인 것이 바람직하다. 또한, 상기 "작동 가능하게 연결(operably linked)"이란 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다.
- [47] 아울러, 본 발명의 재조합 벡터에는 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [48] 상기 재조합 벡터에 도입된 Gln 5'-tsRNA의 DNA는 각각 프로모터의 활성화에 의한 상기 각 유전자의 발현을 효과적으로 유도할 수 있도록 벡터상에 존재하는 프로모터의 전사 방향과 일치하도록 배열하는 것일 수 있다.
- [49] 본 발명에서 재조합 벡터를 예쁜꼬마선충에 주입하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 마이크로피펫을 이용한

미세주입법(microinjection)인 것이 바람직하다.

[50] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 예쁜꼬마선충을 이용한, 노화 유도 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[51] 본 발명에서 노화 유도 후보물질의 스크리닝 방법에 제한은 없으나, 상기 형질전환 예쁜꼬마선충에 후보 물질을 처리한 후, 미토콘드리아 활성 또는 AMPK 활성을 측정하여, 이들의 활성이 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 후보 물질을 선별함으로써 행하는 것이 바람직하다.

[52] 본 발명의 스크리닝 방법에 의하면, 노화와 관련된 인자(유전자나 약물 등)에 대한 탐색을 빠르고 쉽게 수행할 수 있는바, 노화와 관련된 많은 질환을 연구하거나 신약을 개발하는 데 크게 기여할 수 있을 것이다.

[53]

[54] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[55]

[56] 실시예 1: 예쁜꼬마선충의 배양

[57] 예쁜꼬마선충은, 표준 야생형인 Bristol strain N2를 구입한 후, *E.coli* (OP50)으로 씨딩된 NGM(Nematode Growth Medium) agar 플레이트상에서 20°C로 배양하였다.

[58]

[59] 실시예 2: 예쁜꼬마선충의 나이에 따른 tsRNA의 레벨 변화 확인

[60] 예쁜꼬마선충의 나이에 따른 small RNA 시퀀싱 결과를 이용하여, 나이에 따라 tsRNA의 레벨이 어떻게 변화하는지 분석하였다.

[61] 구체적으로, modENCODE (<http://data.modencode.org/?Organism=C.elegans>) 데이터베이스를 이용하여, 시퀀싱에서 얻은 RNA read를 tRNA 데이터베이스의 각 tRNA 염기서열에 매칭시켜 특정 tRNA에서 어떠한 부분의 리드만이 확인이 되는지 분석하였다.

[62] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 글루타민 tRNA 유래의 단편(Gln tsRNA), 특히 5' 말단 부분의 리드가 나이-의존적으로 증가됨을 확인하였다. 이후, 이 단편을 공지된 방법으로 시퀀싱한 결과, 하기 서열번호 1의 염기서열로 구성됨을 확인하였다.

[63] [서열번호 1]

[64] 5'-GGTTCCATGGTGTAGCGGTTAGCACTCAGGACT-3'

[65]

[66] 실시예 3: 예쁜꼬마선충에서 Gln 5'-tsRNA가 나이-의존적으로 증가함을 재확인

[67] 데이터 베이스를 이용한 실시예 1의 결과를 재확인하기 위하여, 실제 예쁜꼬마선충 샘플에서도 노화될수록 글루타민 tRNA 유래의 단편이 증가하는지를 노던블랏을 통하여 검증하였다.

- [68] 구체적으로, 0, 5, 8, 10일 나이의 예쁜꼬마선충 샘플 각각을 60 mm 플레이트 10장 분량을 모아서 total RNA를 추출한 후, 글루타민 tRNA의 5' 말단과 3' 말단에 특이적인 각 프로브를 이용하여 노던 블랏팅을 수행하였다. 이때 사용한 각 프로브 정보는 아래와 같다.
- [69] 글루타민 tRNA 5' 말단 프로브 :
5'-CCTGAGTGCTAACCGCTACACCATGGAACC-3'(서열번호 2)
- [70] 글루타민 tRNA 3' 말단 프로브 :
5'-TGGAGGTTCCACCGAGATTTGAACTCGGGT-3'(서열번호 3)
- [71]
- [72] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 실시예 1의 결과와 마찬가지로 나이에 따라 글루타민 tRNA 유래의 단편 중에서도 5' 말단 부분의 단편이 증가함을 확인할 수 있었다.
- [73]
- [74] 실시예 4: Gln 5'-tsRNA 과발현 예쁜꼬마선충의 제작
- [75] 실시예 3의 결과를 바탕으로, *in vivo* 에서 Gln 5'-tsRNA와 노화와의 관계를 규명하기 위하여, Gln 5'-tsRNA를 과발현하는 형질전환 예쁜꼬마선충 모델을 제작하였다.
- [76] 이를 위해 우선, 도 4에 나타낸 바와 같이, 예쁜꼬마선충의 small RNA 과발현에 특이적인 U6 프로모터와 Gln 5'-tsRNA와 U6 3' UTR(untranslated region)을 포함하는 재조합 벡터를 제조하였다. 구체적으로는, U6 프로모터-Gln 5'-tsRNA와, Gln 5'-tsRNA-U6 3' UTR을 함께 PCR 증폭시키고, PCR fusion을 이용하여 U6 프로모터-Gln 5'-tsRNA-U6 3' UTR construct를 제조한 후, 이를 EcoRI과 HindIII 제한효소를 이용하여 pUC57 벡터에 클로닝하였다. 이때 PCR에 사용한 각각의 프라이머 정보는 아래와 같다.
- [77] **Forward U6p :**
- [78] 5'-CGGGAATTCCTCCAAGAACTCGTACAAAAATGCTCT-3'(서열번호 4)
- [79] **Reverse U6p-Gln tsRNA :**
- [80] 5'-AGTCCTGAGTGCTAACCGCTACACCATGGAACCAAACATTTAGATTTGCAATTCAATTATATAGG-3' (서열번호 5)
- [81] **Forward Gln tsRNA-U6UTR :**
- [82] 5'-GGTTCATGGTGTAGCGGTTAGCACTCAGGACTCAATAATATTCTAGATATCCCTTTTG-3' (서열번호 6)
- [83] **Reverse U6UTR :**
- [84] 5'-CGGAAGCTTCACAGCCGACTATGTTTGGCGT-3'(서열번호 7)
- [85]
- [86] 이후, 이 재조합 벡터를 GFP(Green Fluorescence Protein) 형광 마커와 함께 예쁜꼬마선충의 생식기관에 미세주입하여 과발현시킨 후, 형광현미경으로 녹색형광을 관찰하여 DNA 함유 여부를 확인하였다.

- [87] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 예쁜꼬마선충에서 녹색형광이 밝게 나타남을 확인하였다.
- [88]
- [89] 실시예 5: Gln 5'-tsRNA 과발현 예쁜꼬마선충의 수명 측정
- [90] 실시예 4에서 제작된 Gln 5'-tsRNA 과발현 예쁜꼬마선충을 이용하여, 실제 Gln 5'-tsRNA가 노화에 있어 어떤 기능을 하는지 예쁜꼬마선충의 수명을 측정함으로써 평가하였다.
- [91] 구체적으로, *E.coli* OP50를 streptomycin이 포함된 액체 LB에서 12-16 시간 동안 37°C에서 배양한 후 NGM 배지에 분주했다. 약 12-16 시간 후에 꺼내 FUDR (5-Fluoro-2'-deoxyuridine) 5μM 농도로 처리 후 Gln 5'-tsRNA 과발현 예쁜꼬마선충 (Young-adult stage) 및 대조군(야생형)을 각각 하나의 플레이트에 30마리씩 총 4개에 플레이팅하였다. 이후 2-3일에 한번씩 살아있는 선충의 마릿수를 세는 방식으로 예쁜꼬마선충의 수명을 측정하였다.
- [92] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 글루타민 tRNA 5' 말단 유래의 단편(Gln 5'-tsRNA)이 과발현된(형질전환된) 예쁜꼬마선충 라인 3종 모두 대조군(야생형 WT)에 비하여 수명이 증가함을 확인하였다.
- [93] 이러한 결과는, 특정 tsRNA의 과발현이 예쁜꼬마선충의 수명을 연장할 수 있음을 보여주는 것이기 때문에, 이 tsRNA가 단지 노화의 수동적인 부산물이 아니라 노화/수명을 능동적으로 조절하는 물질임을 의미하는 것이다.
- [94] 또한, 본 실시예 5의 결과를 실시예 2 및 3의 데이터와 연관지어 보면, Gln 5'-tsRNA는 노화를 지연시켜 수명을 연장하기 위한 보상 메커니즘으로서 예쁜꼬마선충에서 나이-의존적으로 증가됨을 알 수 있다.
- [95]
- [96] 실시예 6: Gln 5'-tsRNA의 항노화 메커니즘 규명
- [97] 6-1. 유전자 스크리닝
- [98] 실시예 4에서 제작된 Gln 5'-tsRNA 과발현 예쁜꼬마선충을 이용하여, 실제 Gln 5'-tsRNA의 과발현에 의해 어떠한 유전자에 변화가 있는지 확인함으로써, 항노화 메커니즘을 규명하고자 하였다.
- [99] 우선, tsRNAs는 mRNA 전사를 조절한다는 것이 알려져 있기 때문에, RNA sequencing 분석을 통하여 Gln 5'-tsRNA 과발현에 의해 유도된 mRNA 프로파일 변화를 관찰하였다.
- [100] 구체적으로, day 1 adult 스테이지의 야생형 꼬마선충(대조군)과 Gln 5'-tsRNA 과발현 꼬마선충을 대량으로 배양하여 3개의 독립적인 세트의 샘플을 준비하고, trizol base 방법으로 total RNA를 추출한 후, RNA 전기영동 및 qRT-PCR을 이용해 각 샘플들의 퀄리티를 확인하였다. 이후, RNA sequencing을 수행하여 얻는 raw data는 Cufflinks pipeline을 이용하여 분석하였다.
- [101] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, 야생형 예쁜꼬마선충에 비하여 1261종의 유전자가 상향조절되었고, 425종의 유전자가 하향조절되었음을 확인하였다.

- [102] 이후, 상기 유전자들(DEG: differentially expressed genes)을 다른 알려진 longevity mutant 예쁜꼬마선충에서와 비교한 결과, 활성화형 AMP-dependent kinase(AMPK) 과발현에 의해 상향조절된 유전자들, 그리고 *daf-2(-)* /insulin/insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor mutations에 의해 상향조절된 유전자들과 상당히 오버랩됨을 알 수 있었다. 이러한 분석결과, Gln 5'-tsRNA가 AMPK 또는 insulin/IGF-1 signaling pathway와 함께 작용할 가능성이 있음을 의미하는 것이다.
- [103] 또한, RNA sequencing 분석 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, Gln 5'-tsRNA의 과발현에 의해 미토콘드리아 유전자들의 mRNA 수준이 야생형에 비해 매우 증가되었음을 확인하였다.
- [104] 더욱이, qPCR(quantitative PCR)을 수행한 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 미토콘드리아 DNA의 카피수에 있어서도 증가가 관찰되었다. Gln 5'-tsRNA 과발현에 의한 미토콘드리아 DNA 카피수 증가 효과가 *aak-2* 돌연변이에 의해 사라짐을 통하여 Gln 5'-tsRNA 과발현이 AMPK를 통하여 미토콘드리아 DNA 카피수를 증가시킴을 알 수 있다.
- [105] DR은 다양한 종에서 미토콘드리아의 기능을 활성화시키는 것으로 알려져 있기 때문에, 이러한 결과는 Gln 5'-tsRNA와 DR이 함께 작용함으로써 미토콘드리아의 기능을 촉진시켜 수명을 연장시키는 것을 이해된다.
- [106]
- [107] **6-2. 항노화 메커니즘 규명**
- [108] 종래 알려진 수명조절 경로(DR, insulin/IGF-1 pathway 등)와 Gln 5'-tsRNA의 과발현 사이에 어떠한 유전적인 상호작용이 있는지 확인하기 위하여, DR mimetic *eat-2(-)*, insulin/IGF-1 receptor mutant인 *daf-2(-)*, catalytic alpha subunit of AMPK mutant인 *aak-2(-)*, forkhead box O(FOXO) transcription factor mutant인 *daf-16(-)*, heat-shock transcription factor 1(HSF-1) mutant인 *hsf-1(-)* backgrounds에서, Gln 5'-tsRNA 과발현 예쁜꼬마선충의 수명 변화를 확인하였다.
- [109] 구체적으로, 장수 꼬마선충 성체 5마리씩을 NGM 배지에 올리고 16시간 동안 synchronize한 뒤, 알들이 자라서 young-adult 스테이지가 되었을 때 5 uM의 FUdR이 처리된 NGM 배지로 이를 간격으로 두 번 옮긴다. 마지막 옮기는 과정에서 각 조건당 120마리로 마릿수를 맞춘 후 각 선충들이 모두 죽을때까지 2-3일 간격으로 살아있는 선충의 마릿수를 세어 수명 변화를 관찰하였다.
- [110] 그 결과, 도 9a에 나타난 바와 같이, Gln 5'-tsRNA이 과발현된다고 하여 *eat-2(-)*의 장수(항노화) 효과를 더 증폭시키지는 않았다.
- [111] 또한, 도 9b에 나타난 바와 같이, Gln 5'-tsRNA의 과발현에 의해 연장된 수명은, *aak-2*이 변이됨으로써 완전히 억제됨을 알 수 있었으며, 상기 *aak-2*는 DR-매개 수명조절에 필요한 유전자로 알려져 있다.
- [112] 이와 반대로, 도 9c 내지 9e에 나타난 바와 같이, Gln 5'-tsRNA이 과발현되면 *daf-16* 또는 *hsf-1* 변이를 갖는 예쁜꼬마선충의 수명을 독립적으로 증가시킨다는

것을 알 수 있었으며, 상기 *daf-16*와 *hsf-1*는 일반적으로 DR-매개 수명조절에 필요한 유전자는 아닌 것으로 알려져 있다.

[113] 따라서, 상기의 실험결과들을 종합해 보면, Gln 5'-tsRNA에 의한 항노화 효과는 DR/AMPK pathway를 통하여 작용한다는 것을 알 수 있다.

[114]

[115] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

산업상 이용가능성

[116] 본 발명에 따른 동물모델을 이용하면 항노화 메커니즘을 손쉽게 규명할 수 있을 뿐만 아니라, tsRNAs의 항노화 기능을 규명함으로써, 항노화 신약 개발, 노화 유도 물질을 포함하는 다양한 인자의 스크리닝 등 많은 연구분야에도 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

서열목록 Free Text

- [117] <210> 1
- [118] <211> 33
- [119] <212> DNA
- [120] <213> *Caenorhabditis elegans*
- [121] <400> 1
- [122] ggttccatgg tgtagcgggtt agcactcagg act
- [123]
- [124] <210> 2
- [125] <211> 30
- [126] <212> DNA
- [127] <213> Artificial Sequence
- [128] <220>
- [129] <223> Glutamine tRNA 5' terminal probe
- [130] <400> 2
- [131] cctgagtget aaccgctaca ccatggaacc
- [132]
- [133] <210> 3
- [134] <211> 30
- [135] <212> DNA
- [136] <213> Artificial Sequence
- [137] <220>

- [138] <223> Glutamine tRNA 3' terminal probe
[139] <400> 3
[140] tggaggttcc accgagattt gaactcgggt
[141]
[142] <210> 4
[143] <211> 36
[144] <212> DNA
[145] <213> Artificial Sequence
[146] <220>
[147] <223> Forward U6p
[148] <400> 4
[149] cgggaattcc tccaagaact cgtacaaaaa tgctct
[150]
[151] <210> 5
[152] <211> 65
[153] <212> DNA
[154] <213> Artificial Sequence
[155] <220>
[156] <223> Reverse U6p-Gln tsRNA
[157] <400> 5
[158] agtcctgagt gctaaccgct acaccatgga accaaacatt tagatttgca attcaattat atagg
[159]
[160] <210> 6
[161] <211> 60
[162] <212> DNA
[163] <213> Artificial Sequence
[164] <220>
[165] <223> Forward Gln tsRNA-U6UTR
[166] <400> 6
[167] ggttccatgg tgtagcgggt agcactcagg actcaataat attctagata tccctttttg
[168]
[169] <210> 7
[170] <211> 31
[171] <212> DNA
[172] <213> Artificial Sequence
[173] <220>
[174] <223> Reverse U6UTR
[175] <400> 7

[176] cggaagcttc acagccgact atgtttggcg t

청구범위

- [청구항 1] 글루타민 tRNA 5' 말단 유래의 단편(Gln 5'-tsRNA)이 과발현된, 형질전환 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*).
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 예쁜꼬마선충은 항노화 동물모델용인 것을 특징으로 하는, 형질전환 예쁜꼬마선충.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 Gln 5'-tsRNA는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 형질전환 예쁜꼬마선충.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 예쁜꼬마선충은 미토콘드리아 활성화에 의하여 항노화 효과를 보이는 것을 특징으로 하는, 형질전환 예쁜꼬마선충.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 예쁜꼬마선충은 DR(Dietary Restriction)/AMPK(AMP-dependent kinase) 경로에 의해 항노화 효과를 보이는 것을 특징으로 하는, 형질전환 예쁜꼬마선충.
- [청구항 6] 하기의 단계를 포함하는, 제 1 항의 형질전환 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*) 제조방법:
(a) U6 프로모터와 Gln 5'-tsRNA DNA와 U6 3' UTR(untranslated region)을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및
(b) 상기 재조합 벡터를 예쁜꼬마선충에 주입하는 단계.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 단계 (a)의 U6 프로모터는 small RNA 과발현에 특이적인 프로모터인 것을 특징으로 하는, 제조방법.
- [청구항 8] 제 6 항에 있어서,
상기 단계 (b)의 재조합 벡터를 예쁜꼬마선충에 주입하는 방법은 미세주입법(microinjection)인 것을 특징으로 하는, 제조방법.
- [청구항 9] 제 1 항의 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)을 이용한, 노화 유도 후보물질의 스크리닝 방법.
- [청구항 10] 제 9 항에 있어서,
상기 스크리닝 방법은
(a) 제 1 항의 예쁜꼬마선충에 후보 물질을 처리하는 단계;
(b) 상기 후보 물질 처리 후 미토콘드리아 활성을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 미토콘드리아 활성이 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

[청구항 11]

제 9 항에 있어서,

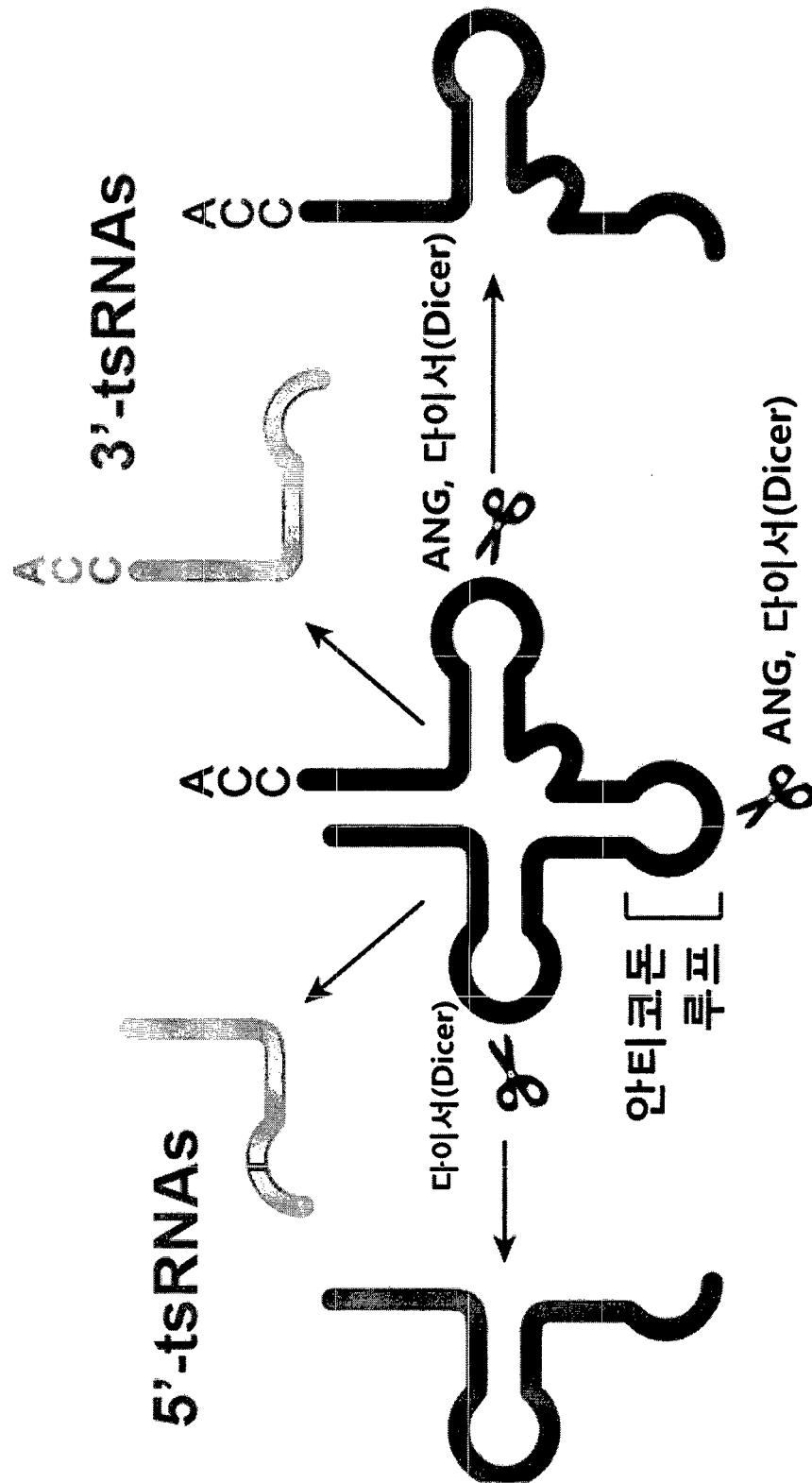
상기 스크리닝 방법은

(a) 제 1 항의 예쁜꼬마선충에 후보 물질을 처리하는 단계;

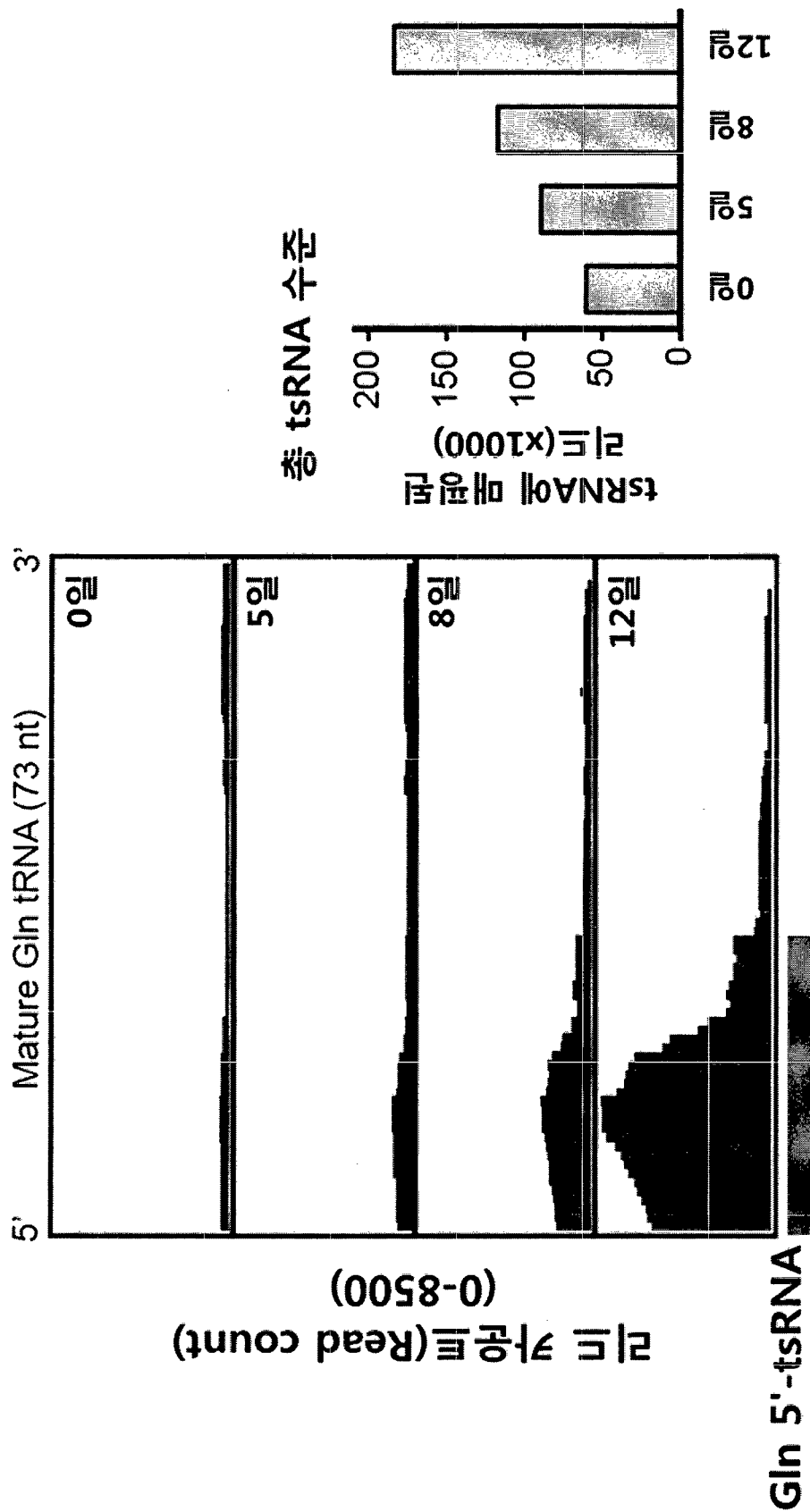
(b) 상기 후보 물질 처리 후 AMPK(AMP-dependent kinase) 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 AMPK 활성이 후보 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 후보 물질을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

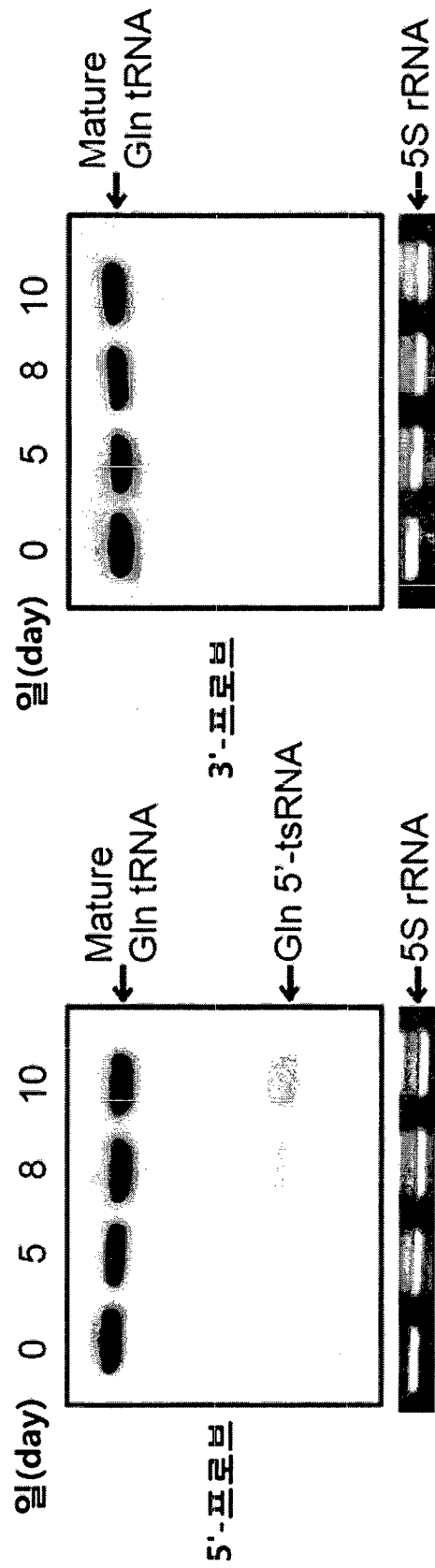
[Fig.1]



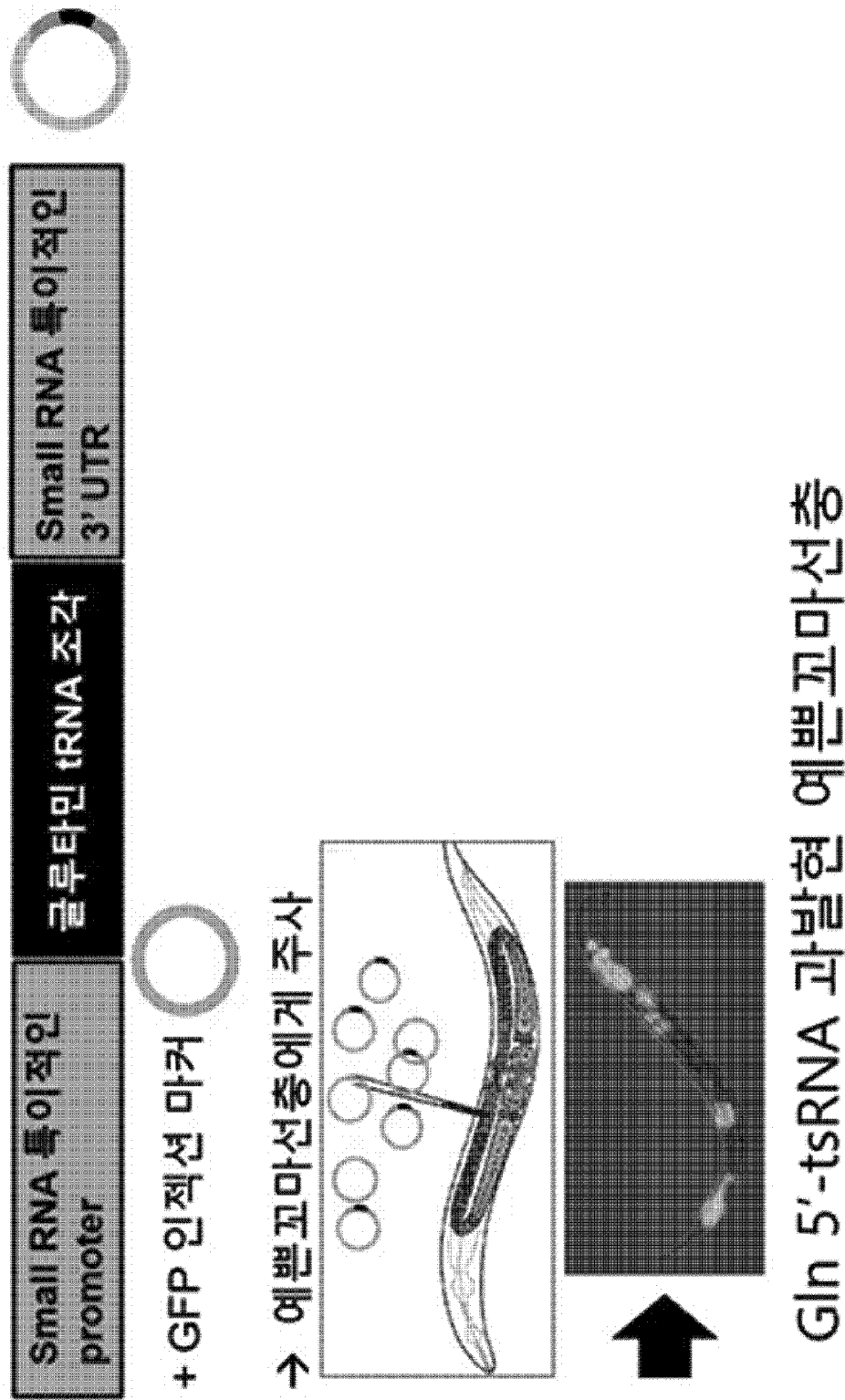
[Fig.2]



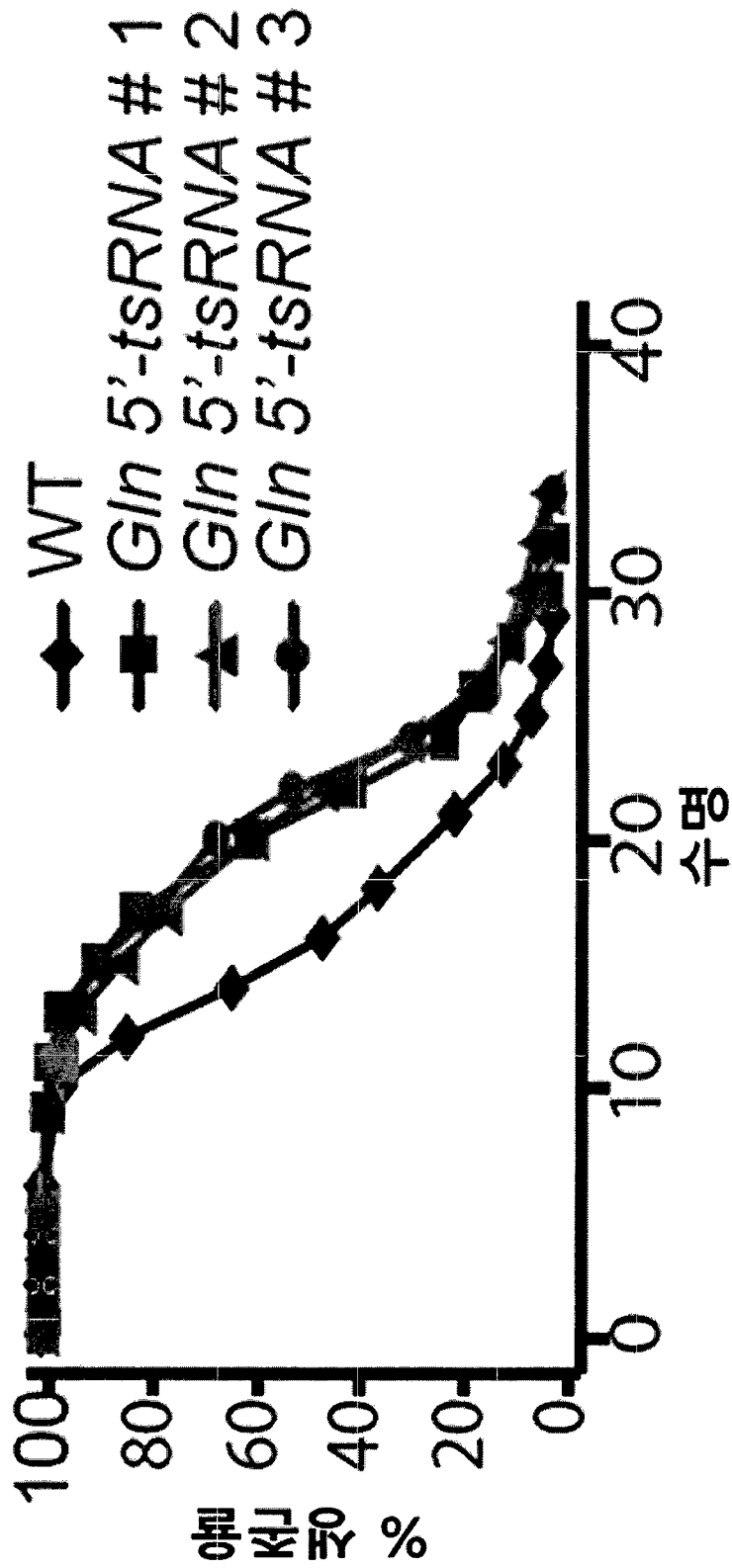
[Fig.3]



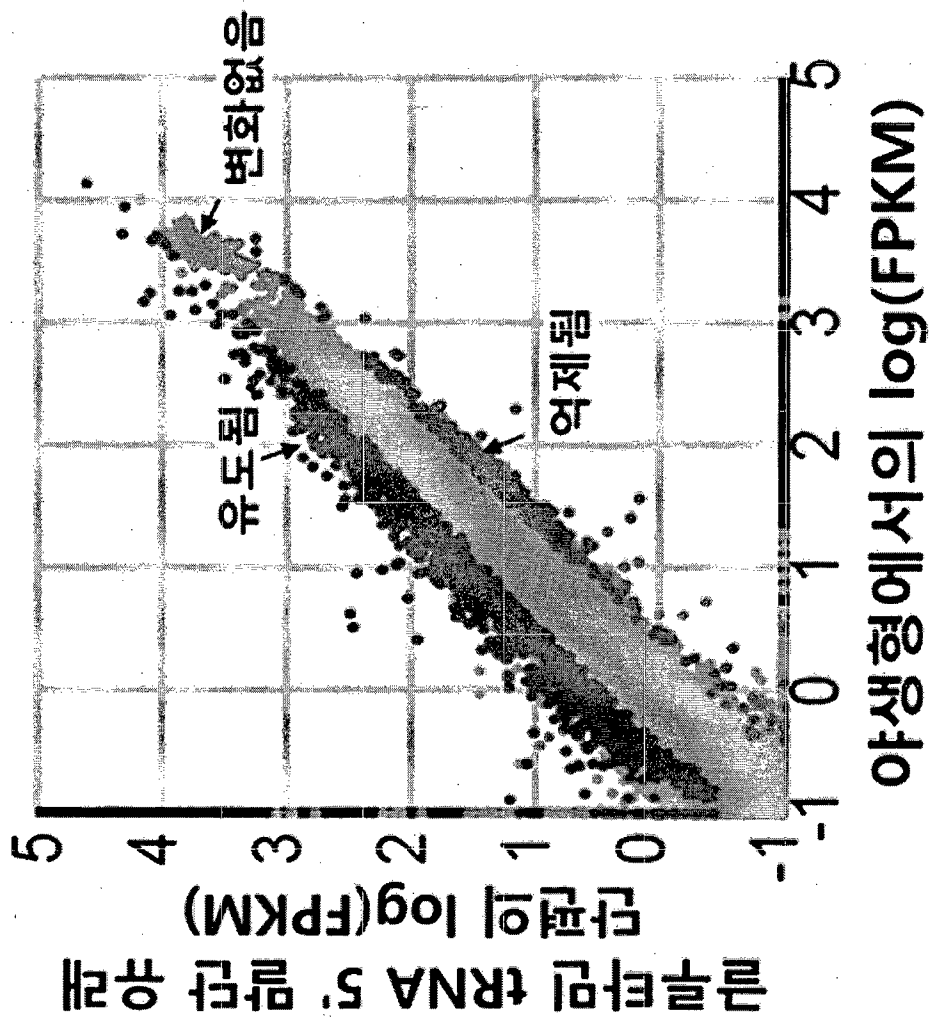
[Fig. 4]



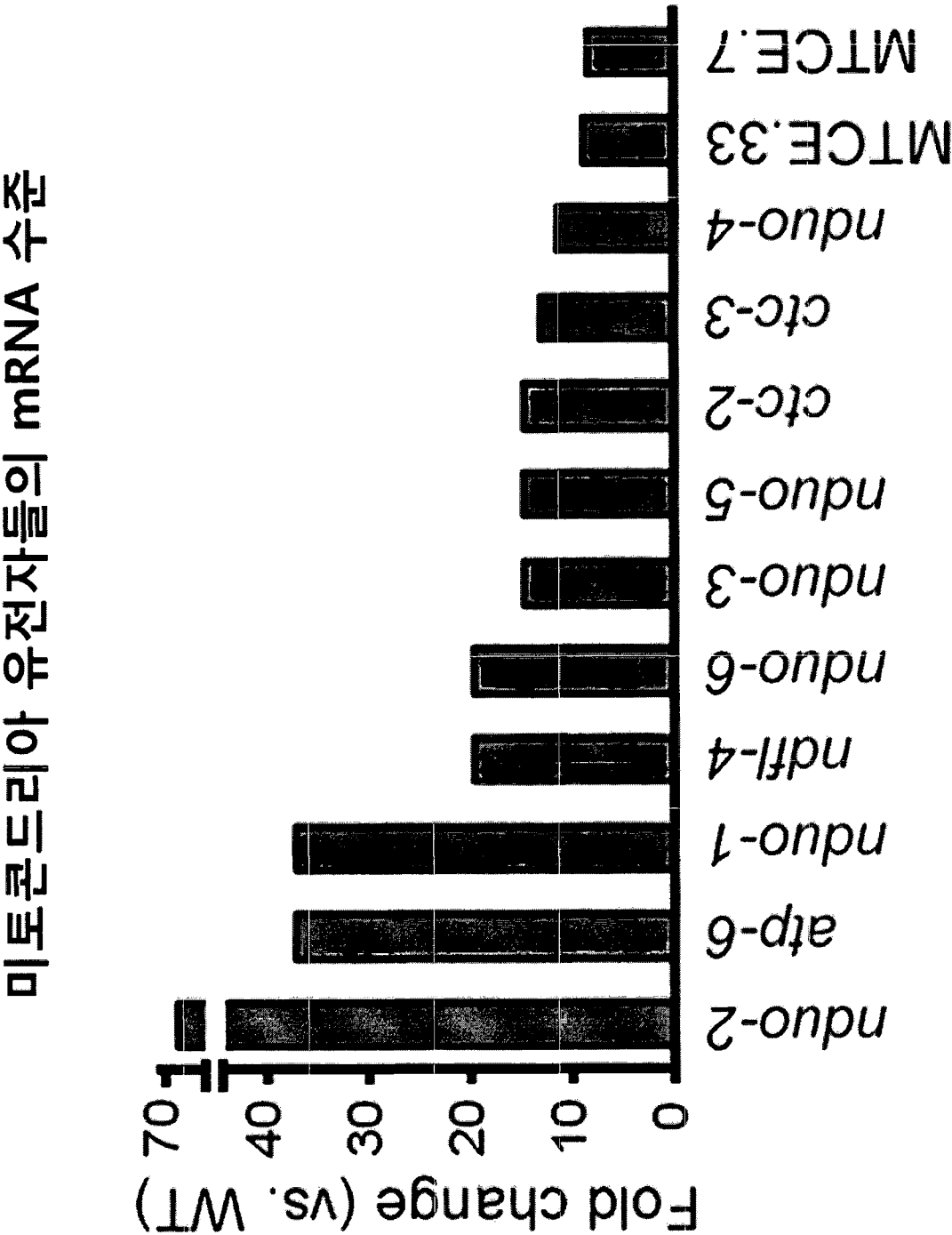
[Fig.5]



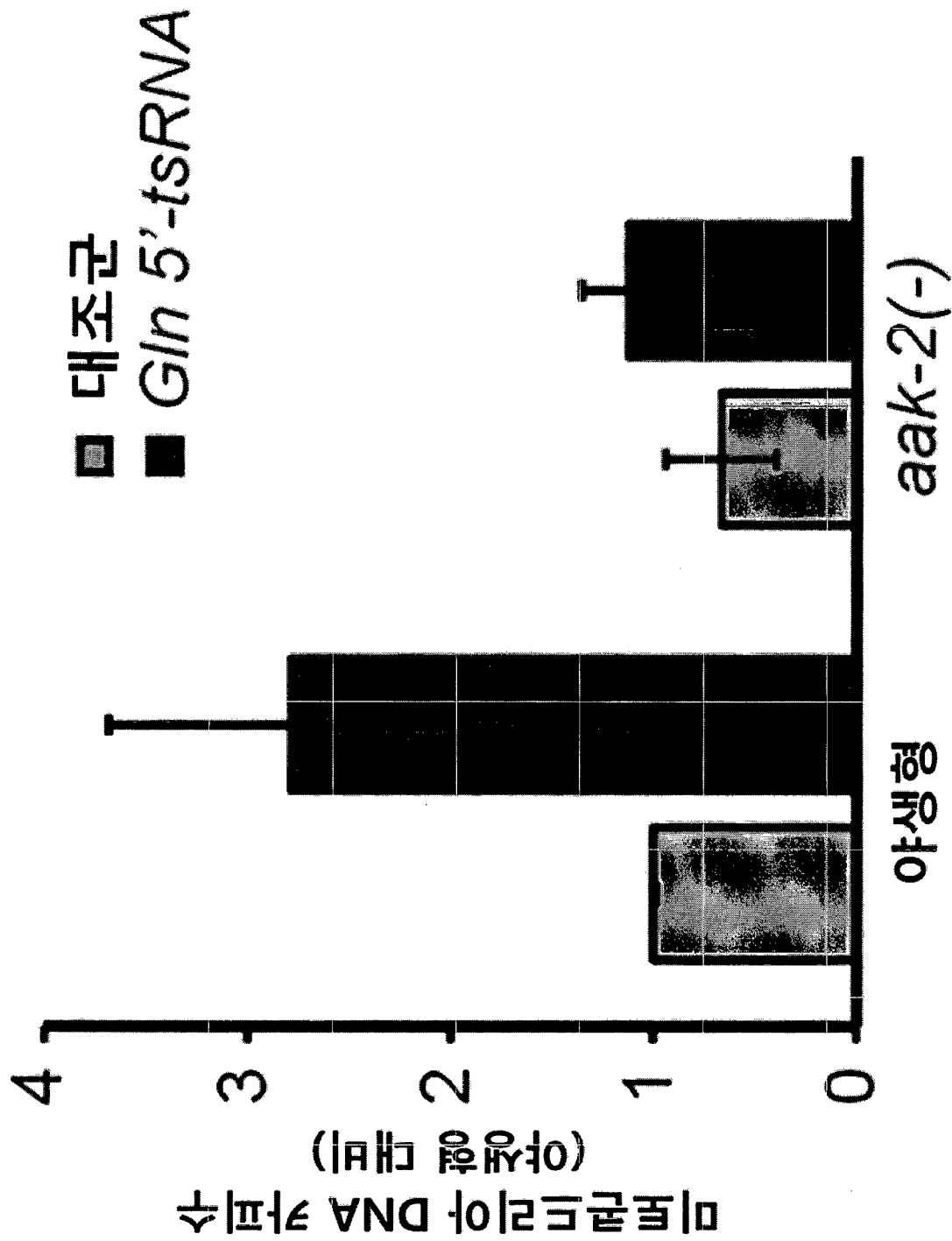
[Fig.6]



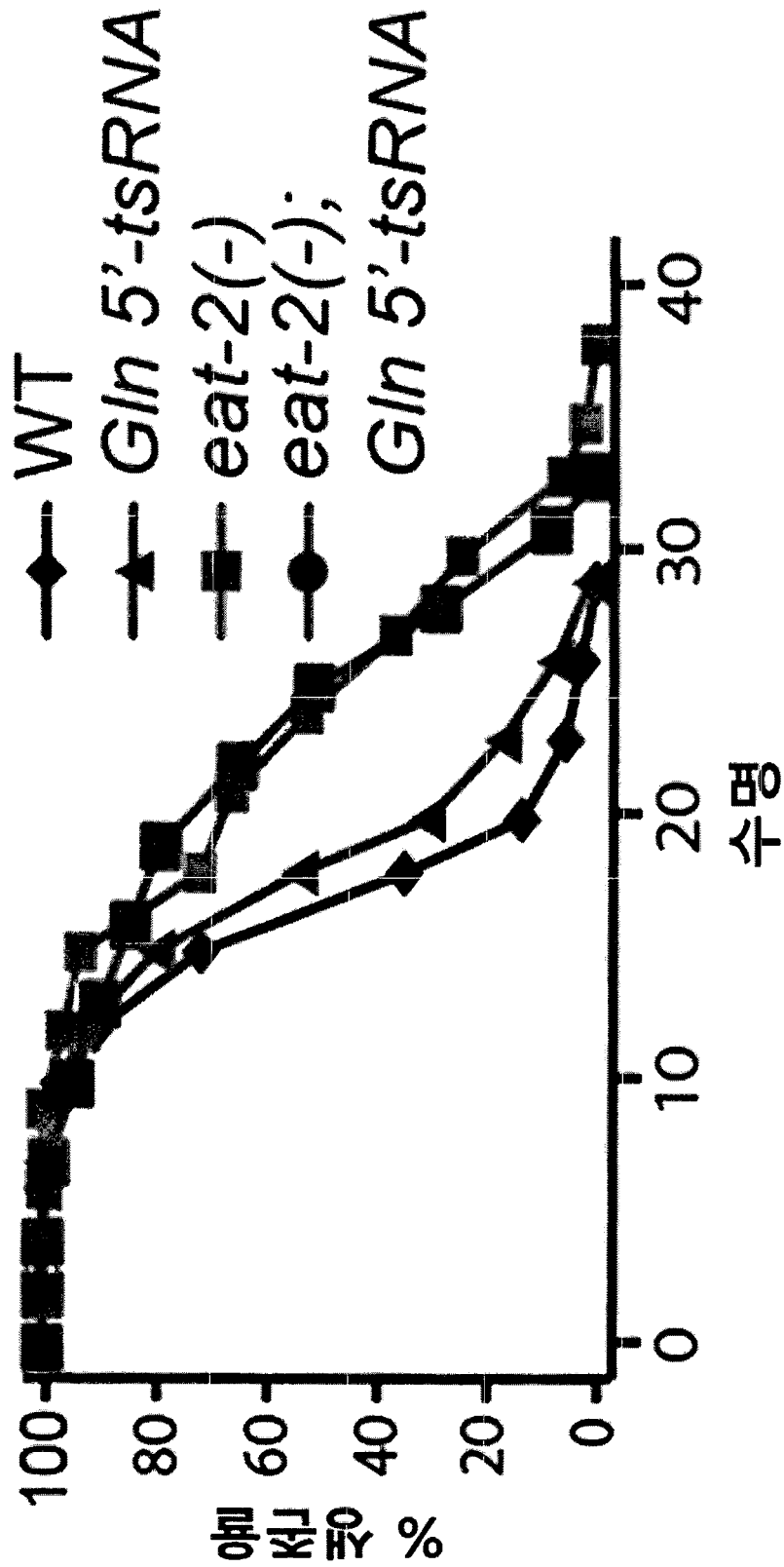
[Fig.7]



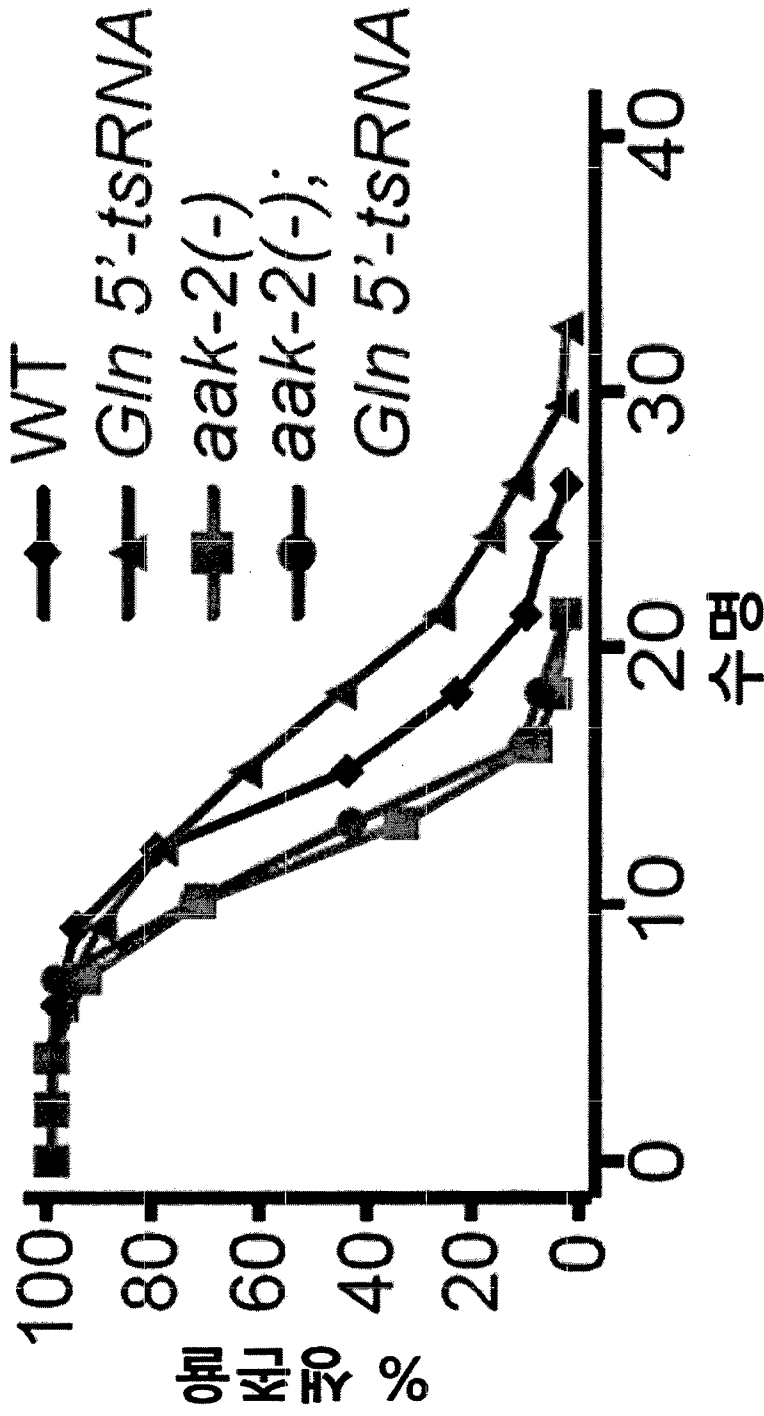
[Fig.8]



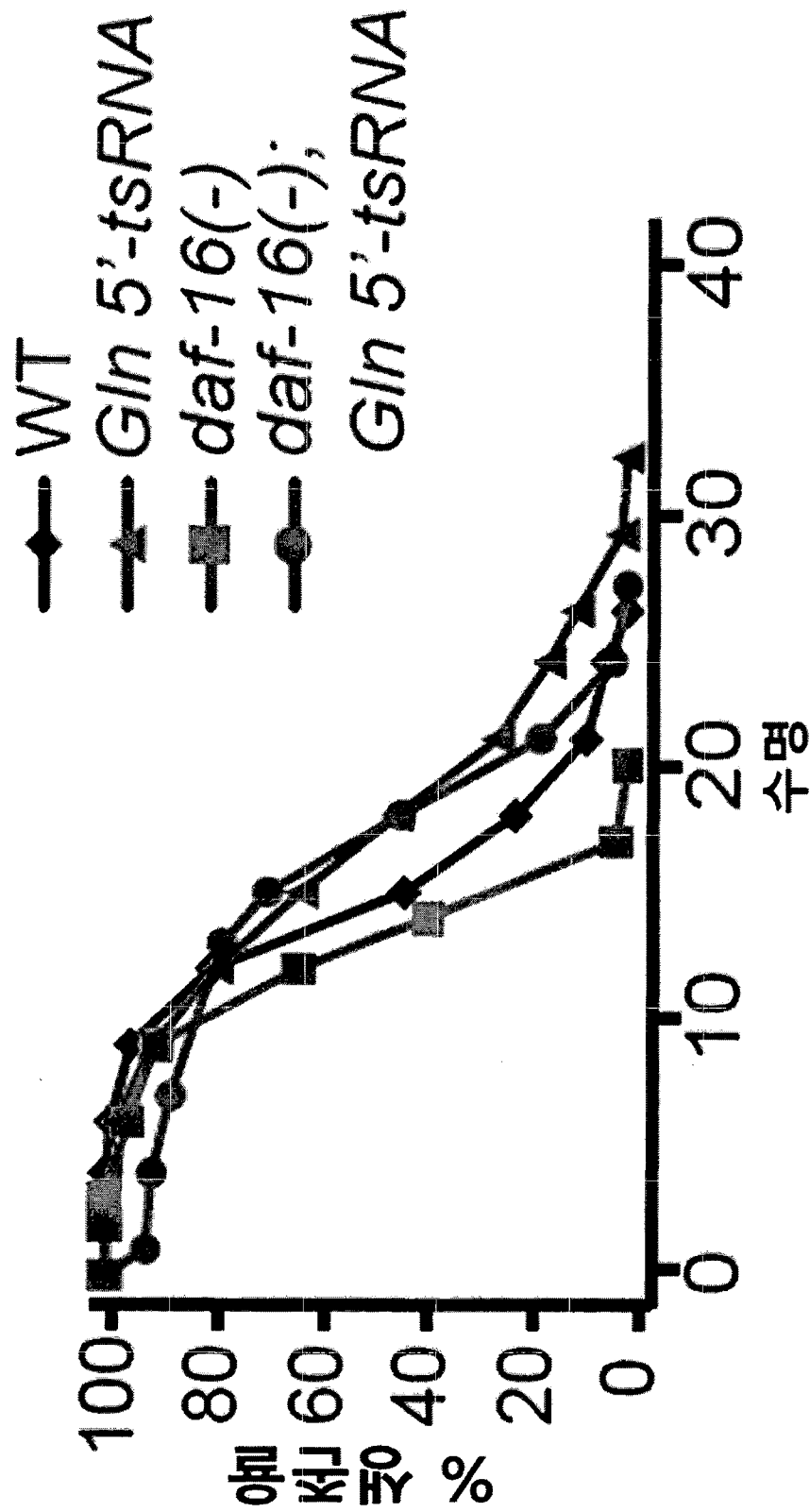
[Fig.9a]



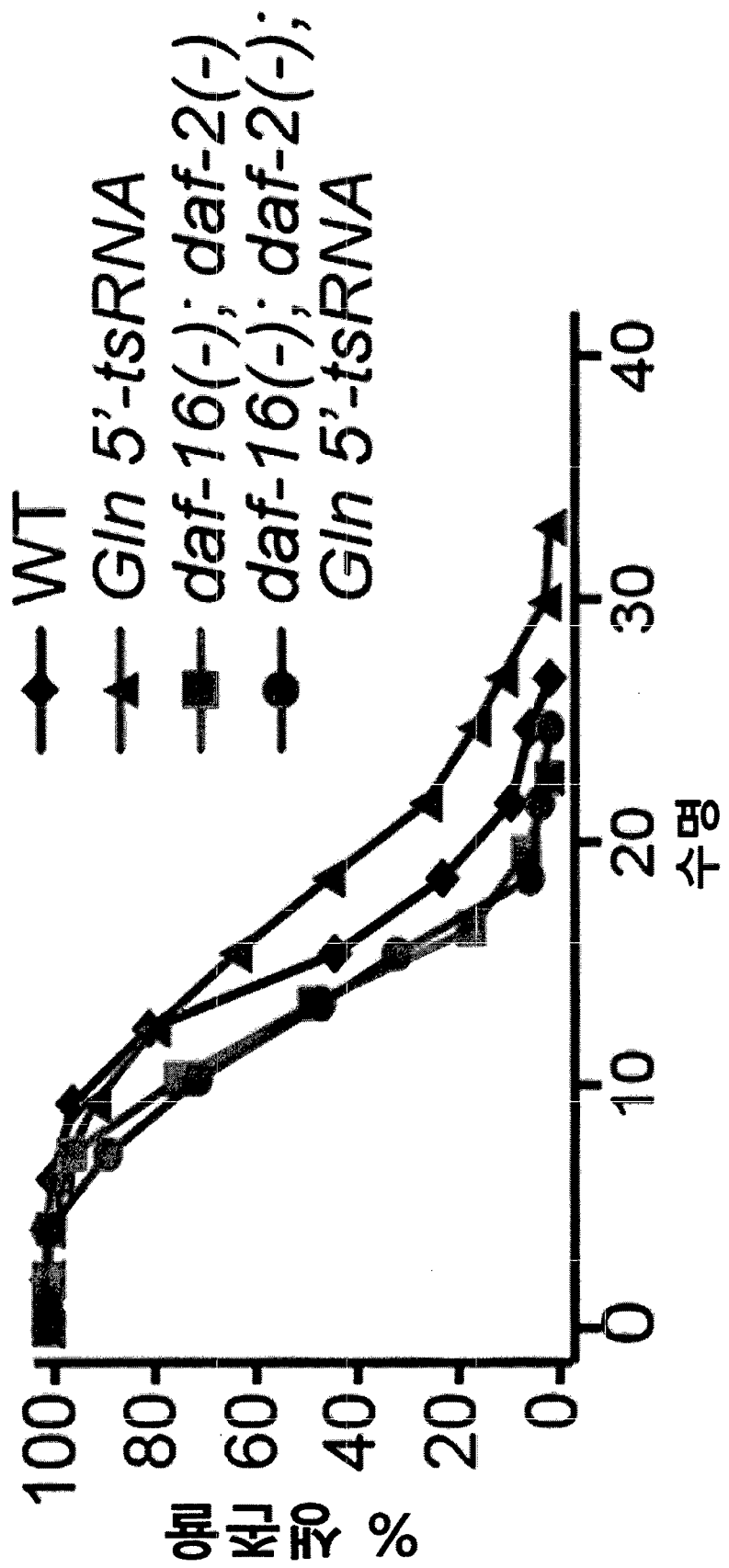
[Fig.9b]



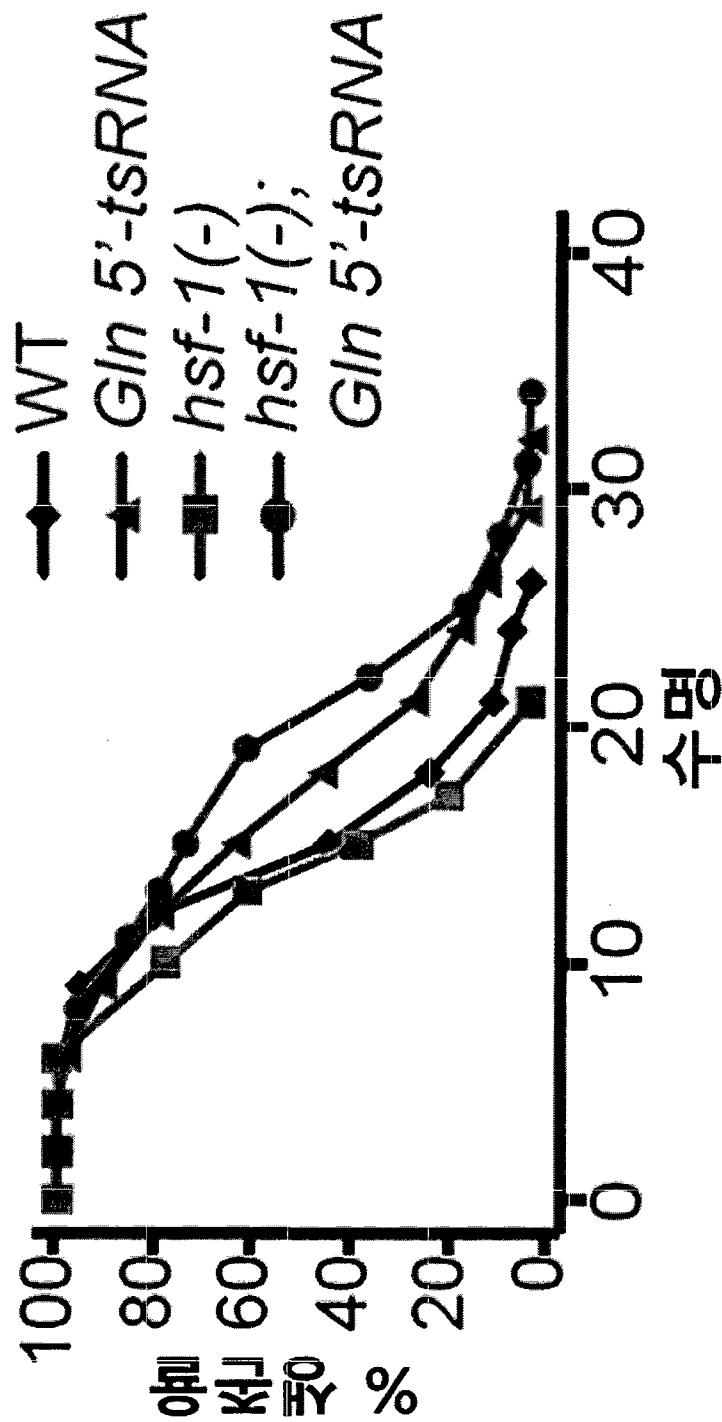
[Fig.9c]



[Fig.9d]



[Fig.9e]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004280

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 67/027(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K 67/027; A01K 67/033; C12N 15/113; G01N 33/50; C12N 15/85

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: glutamine tRNA^S, Gln 5' -tsRNA, Caenorhabditis elegans, aging

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1606278 B1 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) 24 March 2016 See claim 1.	1-11
A	US 2014-0082757 A1 (LEE, S. J. et al.) 20 March 2014 See claims 1-3.	1-11
A	YUET, K. P. et al., "Cell-specific Proteomic Analysis in Caenorhabditis Elegans", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [E-pub.] 17 February 2015, vol. 112, no. 9, pages 2705-2710 See page 2706, left column, paragraph [1].	1-11
A	DEWEZ, M. et al., "The Conserved Wobble Uracine tRNA Thiolase Ctu1-Ctu2 is Required to Maintain Genome Integrity", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [E-pub.] 07 April 2008, vol. 105, no. 14, pages 5459-5464 See page 5459, right column, "Results" section.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 JULY 2017 (31.07.2017)

Date of mailing of the international search report

31 JULY 2017 (31.07.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004280

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BLANCHET, S. et al., "New Insights into the Incorporation of Natural Suppressor tRNAs at Stop Codons in <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> ", <i>Nucleic Acids Research</i> , [E-pub.] 23 July 2014, vol. 42, no. 15, pages 10061-10072 See abstract.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/004280

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1606278 B1	24/03/2016	KR 10-2016-0031250 A	22/03/2016
US 2014-0082757 A1	20/03/2014	CN 103561566 A	05/02/2014
		CN 103561566 B	18/03/2015
		EP 2716155 A2	09/04/2014
		EP 2716155 A4	29/10/2014
		JP 2014-517696 A	24/07/2014
		JP 5823030 B2	25/11/2015
		KR 10-1334403 B1	29/11/2013
		KR 10-2012-0131387 A	05/12/2012
		WO 2012-161538 A2	29/11/2012
		WO 2012-161538 A3	24/01/2013
		WO 2012-161538 A9	19/09/2013

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01K 67/027(2006.01)i, C12N 15/85(2006.01)i, G01N 33/50(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01K 67/027; A01K 67/033; C12N 15/113; G01N 33/50; C12N 15/85

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 글루타민 tRNA 5' , Gln 5' -tsRNA, 예쁜꼬마선충, 노화

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1606278 B1 (포항공과대학교 산학협력단) 2016.03.24 청구항 1 참조.	1-11
A	US 2014-0082757 A1 (LEE, S. J. 등) 2014.03.20 청구항 1-3 참조.	1-11
A	YUET, K. P. 등, 'Cell-specific proteomic analysis in Caenorhabditis elegans', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [전자공개] 2015.02.17, 112권, 9호, 페이지 2705-2710 페이지 2706, 좌측 컬럼, 단락 1 참조.	1-11
A	DEWEZ, M. 등, 'The conserved Wobble uridine tRNA thiolase Ctu1-Ctu2 is required to maintain genome integrity', Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, [전자공개] 2008.04.07, 105권, 14호, 페이지 5459-5464 페이지 5459, 우측 컬럼, "Results" 섹션 참조.	1-11

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 07월 31일 (31.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 31일 (31.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

강민정

전화번호 +82-42-481-8131



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	BLANCHET, S. 등, ‘New insights into the incorporation of natural suppressor tRNAs at stop codons in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>’, <i>Nucleic Acids Research</i>, [전자공개] 2014.07.23, 42권, 15호, 페이지 10061-10072 초록 참조.	1-11

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-1606278 B1

2016/03/24

KR 10-2016-0031250 A

2016/03/22

US 2014-0082757 A1

2014/03/20

CN 103561566 A

2014/02/05

CN 103561566 B

2015/03/18

EP 2716155 A2

2014/04/09

EP 2716155 A4

2014/10/29

JP 2014-517696 A

2014/07/24

JP 5823030 B2

2015/11/25

KR 10-1334403 B1

2013/11/29

KR 10-2012-0131387 A

2012/12/05

WO 2012-161538 A2

2012/11/29

WO 2012-161538 A3

2013/01/24

WO 2012-161538 A9

2013/09/19