



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년03월23일
(11) 등록번호 10-1130552
(24) 등록일자 2012년03월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/563 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2009-0086003
- (22) 출원일자 2009년09월11일
심사청구일자 2009년09월11일
- (65) 공개번호 10-2011-0028082
- (43) 공개일자 2011년03월17일
- (56) 선행기술조사문헌
Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet., Vol. 117B, No. 1, pp. 114-117*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
중앙대학교 산학협력단
서울 동작구 흑석동 221
- (72) 벌명자
최경희
서울특별시 용산구 이촌로64길 15, LG한강 자이아파트 107-603 (이촌동)
장상민
서울특별시 광진구 뚝섬로54길 29 (자양동)
김정웅
서울특별시 동작구 상도로47길 116-4, 장원빌리지 102호 (상도1동)

(74) 대리인
양부현

심사관 : 박정웅

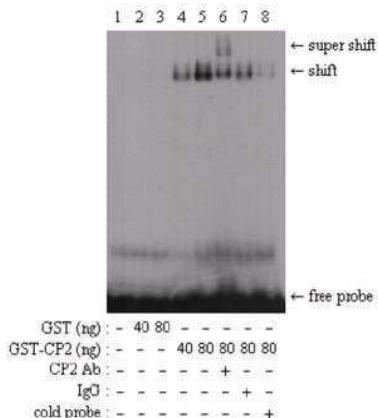
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 신경퇴행성 질환에 관여하는 CP2 전사인자

(57) 요약

본 발명은 신경퇴행성 질환에 관여하는 CP2 전사인자에 관한 것이다. 본 발명은 다운 스트림(downstream)에 위치하는 발병 유전자를 전사 기작 측면에서 조절한다는 특이성이 있으며, 이는 종래의 APP 유전자나 이에 관련된 효소들의 억제방법에서 야기되는 심각한 신경발생 장애와 같은 부작용 없이 치료가 가능하다. 또한, 본 발명은 신경 퇴행성 질환(특히, 알츠하이머병)을 치료하는데 있어서 CP2 전사인자의 조절을 통한 신약 개발 및 치료방법에 기초적인 자료를 제공한다.

대 표 도 - 도5



이) 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10543
부처명 서울특별시
연구사업명 기술기반구축사업
연구과제명 나노바이오 시스템 및 응용 소재
주관기관 서울대학교 산학협력단
연구기간 2005년 12월 01일 ~ 2010년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 알츠하이머병 또는 파킨슨씨 질병 치료 또는 예방용 물질의 스크리닝 방법:

(a) (i) CP2 유전자 또는 CP2 단백질, 그리고 (ii) CP2 결합 모티프 I 서열을 포함하는 트랜스페린 유전자의 프로모터 서열 및 상기 프로모터 서열에 작동적으로 결합된 리포터 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 리포터 유전자의 발현양을 측정하는 단계, 상기 리포터 유전자의 발현양이 감소-조절(down-regulation)되는 것으로 측정되는 경우에는 상기 시료는 알츠하이머병 또는 파킨슨씨 질병 치료 또는 예방용 물질로 판정된다.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경퇴행성 질환에 관여하는 CP2 전사인자에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 알츠하이머병(Alzheimer's disease: AD)은 신경퇴행성 질환으로 건강, 인지와 행동에 영향을 끼치는 질병이다. 이 질병은 두 가지 타입의 단백질 뭉침 현상이 일어나는 특징이 있는데 하나는 세포 바깥쪽의 초로성 반점(neuritic plaque), 또 하나는 세포 안쪽에서 다발성 병변(neurofibrillary tangles)이 생성된다는 것이다. 초로성 반점을 구성하는 대표적인 구성요소는 40~42개의 아미노산으로 이루어진 β -아밀로이드(β -amyloid) 단백질이다. 이는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein: APP) 단백질이 베타(β), 감마(γ) 분비효소라는 효소에 의해 잘려지면서 생성된다. 다발성 병변은 미세소관을 구성하는 타우(tau)라는 단백질이 글리코겐 합성효소 인산화효소 3 β (glycogen synthase kinase 3beta: GSK3b)에 의해 다양으로 인산화됨으로 인해서 서로 뭉쳐지면서 일어난다. 이 두 가지는 신경세포의 사멸과 시냅스의 손실을 가져옴으로써 AD를 유발한다.

[0003] 산화적인 스트레스(oxidative stress)는 AD를 포함하여 신경세포의 사멸을 유도하는 대표적인 인자이다. 산화적 스트레스의 생성은 단백질, DNA, 세포의 막에 직접적으로 손상을 유발한다고 알려져 있다. 많은 연구들을 통해서 세포 바깥쪽 뿐만 아니라 세포 안쪽에 존재하는 Ab는 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)을 증가시킴으로써 세포를 사멸시킨다고 알려졌다. 또한 활성산소종은 세포 호흡 사슬에 관련된 효소의 활성이 떨어지거나, 세포의 산소 소비량이 줄어듬으로써 생성될 수 있다고 알려졌다.

[0004] 철 이온은 대표적으로 활성산소종의 증가를 일으킬 수 있는 인자이다. 이는 펜톤 반응(Fenton reaction)이라는 기작을 통해過산화수소(hydrogen peroxide)로부터 OH기를 생성하는 것을 촉매함으로써 활성산소종을 만들어낸다. 이렇게 증가한 활성산소종은 산화적 스트레스를 유발하며 이는 곧 다발성 병변과 초로성 반점의 축적을 야기할 수 있다. 실제로 철이 축적된 세포나 동물에서 상대적으로 많은 신경세포의 축색돌기의 위축현상이 일어났고 신경세포의 괴사(necrosis)와 자연적 사멸(apoptosis) 역시 증가한 것으로 보고되었다. 따라서 이러한 철을 조절하는 단백질들의 변화가 철의 비정상적인 분배를 야기하여 AD를 포함한 질병들을 일으킬 수 있다. 하나의 예로 철 조절 단백질(Iron regulatory protein-2: IRP2)은 세포내 철을 저장, 흡수하는 단백질인데 AD 환자의 뇌 속에 상당히 높은 농도로 존재하고 있다는 것이 보고되었다. 철을 조절하는 단백질 중의 하나로 트랜스페론(Transferrin: TF)은 일반적으로 많은 세포내에서 존재하고 있다. 이들은 사이클을 통해서 철 이온을 세포 내로 수송하여 세포의 철 농도를 조절하는 중요한 역할을 수행하고 있다. 실제적으로 AD 환자와 TF의 유전적 변이가 관련된 보고들이 있어 TF 단백질에 의한 철 농도의 비정상적인 분포가 AD를 야기할 가능성이 대두되고 있다.

[0005] CP2 전사인자는 글로빈(globin) 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다(Kang et al., Erythroid Cell-Specific-Globin Gene Regulation by the CP2 Transcription Factor, Family MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY; Vol(25): 60056020(2005)). CP2는 일반적으로 널리 발현하고 있으나 특정한 타입의 세포에서 특수한 기능을 수행하고 있다. 인간 염색체의 경우 12번 염색체 12q13에 위치하며, 전장서열은 NC_000012에 공지되어 있고, mRNA 서열은 NM_005653.3에, 단백질은 NP_005644.2에 각각 공지되어 있다. 조혈모세포에서는 글로빈 유전자의 프로모터 부위에 직접적으로 결합함으로써 발현을 촉진시킨다. 신경세포에서는 AD와 관련된 유전자의 발현 가능성에 관한 연구들이 보고되고 있으며 특히 다발성 병변을 일으키는 핵심 효소인 GSK3beta를 조절함으로써 신경세포의 사멸을 유도한다(Y Xu et al., Intracellular domains of amyloid precursor-like protein 2 interact with CP2 transcription factor in the nucleus and induce glycogen synthase kinase-3b expression, Cell Death and Differentiation Vol(14): 7991(2007)). 이처럼 CP2 전사인자는 신경세포 내에서 특징적인 역할을 하고 있으나, AD를 유발할 가능성이 있는 CP2 전사인자의 다른 새로운 표적 유전자들에 대한 연구는 더 이상 이루어지지 않고 있다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0007] 본 발명자들은 신경 퇴행성 질환(특히, 알츠하이머)의 발병과 관련된 신규한 치료 타깃을 개발하고자 연구 노력 하였고, 그 결과 CP2가 신경 퇴행성 질환의 발병과 직접적인 연관이 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 신경 퇴행성 질환의 진단용 키트를 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 신경 퇴행성 질환 치료 또는 예방용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

- [0011] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열에 기재된 CP2의 뉴클레오타이드 서열, 상기 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열, 상기 뉴클레오타이드의 단편 또는 서열목록 제2서열에 기재된 CP2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앱타머를 포함하는 신경퇴행성 질환의 진단용 키트를 제공한다.
- [0012] 본 발명자들은 신경 퇴행성 질환(특히, 알츠하이머)의 발병과 관련된 신규한 치료 타깃을 개발하고자 연구 노력 하였고, 그 결과 CP2에 의한 트랜스페린(transferrin)의 발현 증가가 신경 퇴행성 질환의 발병과 직접적인 연관이 있음을 규명하였으며, 특히 알츠하이머병과 연관이 있음을 규명하였다.
- [0013] 본 발명은 CP2 유전자 및 단백질의 신규한 용도에 관한 것으로서, 신경 퇴행성 질환 특히, 알츠하이머병과 관련하여 CP2의 진단 마커 및 치료 타깃으로서 신규한 용도에 관한 것이다. 본 발명의 이러한 신규한 용도는 신경 퇴행성 질환 특히, 산화적 스트레스(oxidative stress)로 인한 알츠하이머병과 관련되어 있다고 알려진 트랜스페린을 CP2 전사인자가 감소-조절함으로써, 궁극적으로 CP2 전사인자 억제가 알츠하이머병 치료 및 예방과 크게 관련이 있다는 본 발명자들의 발견에 따른 것이다.
- [0014] 트랜스페린은 인간 몸에서 철 이온을 운반하는 혈장단백질이며, 비가역적으로 철과 결합하는 당단백질이다. 분자량은 80 kDa이며 2개의 특이적인 고친화 Fe(III) 결합 부위를 가지고 있다. 또한, 트랜스페린은 인간의 경우 3번 염색체상에 존재하며, mRNA은 NM_001063로, 단백질은 NP_001054로 공지되어 있다.
- [0015] 본 발명의 진단키트에서 이용되는 프로브 또는 프라이머는 서열목록 제1서열에 기재된 CP2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는다. 본 명세서에서 용어 “상보적(complementary)”은 어떤 특정한 혼성화 또는 어닐링 조건 하에서 서열목록 제1서열에 기재된 CP2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화 할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미한다. 따라서 용어 “상보적”은 용어 완전 상보적(perfectly complementary)과는 다른 의미를 가지며, 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 서열목록 제1서열에 기재된 CP2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도이면, 하나 또는 그 이상의 미스매치(mismatch) 염기서열을 가질 수 있다.
- [0016] 본 명세서에서, 용어 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일쇄이다. 바람직하게는, 프로브는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [0017] 본 명세서에서, 용어 “프라이머”는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.

- [0018] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 CP2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 CP2의 gDNA 또는 cDNA 서열, 바람직하게는 cDNA를 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 프로브를 포함하는 신경 퇴행성 질환의 진단용 키트는 마이크로어레이(microarray) 포맷에 포함되며, 보다 바람직하게는 DNA 또는 cDNA 마이크로어레이이고, 가장 바람직하게는 cDNA 마이크로어레이이다.
- [0020] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 젤, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리아이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커 (예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.
- [0021] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 진단방법은 혼성화(hybridization)에 기초하여 실시할 수 있다. 이 경우, 서열목록 제1서열에 기재된 CP2의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브가 이용된다.
- [0023] CP2 유전자 또는 CP2의 cDNA, 바람직하게는 CP2의 cDNA에 혼성화 되는 프로브를 이용하여 혼성화-기초 분석을 하여 신경 퇴행성 질환, 보다 바람직하게는 알츠하이머병, 헌팅تون 질병, 파킨슨씨 질병 및 근위축성 측삭 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환, 가장 바람직하게는 알츠하이머병을 진단 할 수 있다. 본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 프로브의 이점, 즉 혼성화 특이성의 개선이 손상되지 않는 범위 내에서, 본 발명의 프로브를 변형할 수 있다. 이를 변형, 즉 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민 (lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타제 또는 호스래디쉬 페옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 퀄레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 햅텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법 (Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [0024] 분석 대상이 되는 핵산 시료, 바람직하게는 cDNA는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 상기 생시료는, 바람직하게는 인간으로부터 얻은 뇨, 혈액, 혈장, 골수, 척수, 세포 또는 조직이다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.
- [0025] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타깃 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다.

예를 들어, 상기 염격조건 중에서 고 염격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65°C 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 염격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 염격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42°C 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

[0026] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 페옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 페옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤자린, D-루시페린, 루시케닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 니트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다. 따라서 본 발명의 진단방법을 혼성화에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 서열목록 제1서열에 기재된 CP2의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브를 핵산 시료에 혼성화시키는 단계; (ii) 상기 혼성화 반응 발생 여부를 검출하는 단계를 포함한다.

[0027] 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 바람직하게는 신경 퇴행성 질환, 보다 바람직하게는 알츠하이머병, 헌팅تون 질병, 파킨슨씨 질병 및 근위축성 측삭 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환, 가장 바람직하게는 알츠하이머병을 진단할 수 있다. 즉, 시료에서 CP2 cDNA에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료보다 강하게 나오는 경우에는 알츠하이머병으로 진단된다.

[0028] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머는 유전자 증폭 반응(amplification reactions)에 이용 된다.

[0029] 본 명세서에 기재된 용어 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고 되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타깃 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

[0030] 본 발명의 가장 바람직한 구현예에서, 증폭 과정은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.

[0031] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(boosters) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-

Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

[0032] 본 발명의 진단방법을 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 CP2 유전자의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 CP2 유전자의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 인간 뇨, 혈장, 혈액, 끌수, 척수, 세포 또는 조직)에서 CP2의 mRNA 양을 조사하여 CP2 유전자의 발현 정도를 결정한다.

[0033] 따라서 본 발명은 원칙적으로 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다.

[0034] mRNA를 얻기 위하여, 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: *PNAS USA*, 85:8998(1988); Libert F, et al., *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다.

[0035] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중체 구조를 형성한다. 이러한 이중체 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.

[0036] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I의 “클레나우” 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다.

[0037] 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서 어닐링은 타깃 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 염격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 염격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.

[0039] 이렇게 증폭된 CP2 cDNA를 적합한 방법으로 분석하여 CP2 유전자의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 CP2 유전자의 발현 정도를 조사한다. 이러한 증폭 반응을 통하여, 생시료(biosamples)에서 CP2 유전자의 발현이 정상 시료(예를 들면, 신경 퇴행성 질환이 없는 정상인) 보다 높게 나오는 경우에는 바람직하게는 신경 퇴행성 질환, 보다 바람직하게는 알츠하이머병, 헌팅تون 질병, 파킨슨씨 질병 및 근위축성 측삭 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환, 가장 바람직하게는 알츠하이머병으로 진단된다.

[0040] 따라서 본 발명의 진단방법을 cDNA를 이용하는 증폭반응에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 서열목록 제1서열에 기재된 CP2의 뉴클레오타이드 서열에 어닐링되는 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 실시하는 단계; 및 (ii) 상기 증폭 반응의 산물을 분석하여 CP2 유전자의 발현정도를 결정하는 단계를 포함한다.

[0041] 또한, 본 발명의 신경 퇴행성 질환의 진단용 키트는 서열목록 제2서열에 기재된 CP2 단백질에 특이적으로 결합

하는 항체를 포함시켜 제작될 수도 있다.

[0042] 본 발명에서 이용되는 CP2 단백질에 대한 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. CP2 단백질에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 CP2 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[0043] 본 발명의 진단 방법을 CP2 단백질에 대한 항체를 이용하여 실시하는 경우, 본 발명은 통상적인 면역분석 방법에 따라 실시하여 바람직하게는 보다 바람직하게는 알츠하이머병, 헌팅تون 질병, 파킨슨씨 질병 및 근위축성 측삭 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환, 가장 바람직하게는 알츠하이머병을 진단하는 데 이용될 수 있다.

[0044] 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경재 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0045] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵)로 레이블링된 항체가 CP2 단백질을 검출하는 데 이용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료(예컨대, 혈액 또는 세포) 분해물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 CP2 단백질에 특이적으로 결합하는 항체와 상기 세포 분해물을 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.

[0047] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.

[0048] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β-갈락토시다아제, 호스 래디쉬 페옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P₄₅₀을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemiluminescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 페옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤자린, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미돌, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.

[0049] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing

antibody)로서 CP2 단백질에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 시료(예컨대, 혈액 또는 세포)를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, CP2 단백질에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

[0050] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P₄₅₀), 방사능물질((예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.

[0051] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널이 검출은 CP2 단백질의 정성적 또는 정량적 분석을 가능하게 한다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시퍼라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

[0052] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 세기를 분석함으로써, 바람직하게는 신경 퇴행성 질환, 보다 바람직하게는 알츠하이머병, 헌팅تون 질병, 파킨슨씨 질병 및 근위축성 측삭 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환, 가장 바람직하게는 알츠하이머병을 진단할 수 있다. 즉, 생시료에서 CP2 단백질에 대한 시그널이 정상 시료 보다 강하게 나오는 경우에는 알츠하이머병으로 진단된다.

[0053] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소 (예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0054] 본 발명은 신경 퇴행성 질환의 발병, 발전 및 경감 등을 분석할 수 있다. 따라서 본 명세서에서 사용되는 용어 “진단”은 질병 유무의 판단뿐만 아니라, 질병의 발병, 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함하는 의미를 갖는다.

[0055] 바람직하게는, 본 발명은 CP의 과발현에 의하여 발병 및 발전되는 신경 퇴행성 질환, 보다 바람직하게는 알츠하이머병, 헌팅تون 질병, 파킨슨씨 질병 및 근위축성 측삭 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환, 가장 바람직하게는 알츠하이머병을 진단하는 데 특히 유용하다.

[0056] 본 발명의 진단 방법은 바람직하게는 신경 퇴행성 질환, 보다 바람직하게는 알츠하이머병, 헌팅تون 질병, 파킨슨씨 질병 및 근위축성 측삭 경화증으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환, 가장 바람직하게는 알츠하이머병의 상태(conditions)를 보다 개선된 효율로 진단할 수 있도록 하며, 더욱이 정상인과 구별하여 알츠하이머병을 가지고 있는 환자를 분별적으로 진단할 수 있는 장점이 있다.

[0057] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 신경 퇴행성 질환 치료 또는 예방용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) CP2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 CP2 유전자의 발현양, CP2 단백질의 양 또는 CP2 단백질의 활성을 측정하는 단계, 상기 CP2 유전자의 발현양, CP2 단백질의 양 또는 CP2 단백질의 활성이 감소-조절(down-regulation)되는 것으로 측정되는 경우에는 상기 시료는 신경 퇴행성 질환 치료 또는 예방용 물질로 판정된다.

[0058] 본 발명의 명세서 용어 ‘감소-조절(down-regulation)’은 CP2 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성이 시료를 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 감소되는 것을 의미한다. 본 발명에서 CP2 유전자 발현양, 단백질의 양 또는 CP2 단백질의 활성의 감소-조절은, 예를 들면, RT-PCR 결과물을 젤(gel) 전기영동한 경우 CP2 유전자 증폭물의 특정 밴드가 나타나지 않거나 시료를 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 밴드의 세기(intensity)가 감소되는 것으로 확인할 수 있다. 또한, 면역화학반응(예를 들면, ELISA)에서 리더기를 이용하여 발색 시그널을 측정하는 경우 시료를 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여 발색이 낮게 나타난다.

- [0059] 본 발명의 스크리닝 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 분석(binding assay)에 따라 고속(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시료 또는 CP2 유전자 또는 단백질은 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스티드 페오시다아제, 알칼린 포스파타아제, 페오시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광 표지[예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM], 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.
- [0061] 검출가능한 표지가 레이블링된 CP2 유전자, 단백질 또는 시료를 이용하는 경우, CP2 유전자 또는 단백질과 시료 사이의 결합 발생 여부는 표지로부터 나오는 시그널을 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemiluminescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 히드록시페오시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤자닌, D-루시페린, 루시케닌(비스-N-메틸아크리디늄 닉트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), *o*-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.
- [0062] 택일적으로, 시료의 CP2 유전자 또는 단백질로의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 분석 할 수도 있다. 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 시료가 CP2 유전자 또는 단백질에 결합하는 지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 셀이 그의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는, 시료와 CP2 유전자 또는 단백질 사이의 결합에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다(McConnell et al., *Science* 257:19061912(1992)).
- [0063] 시료의 CP2 유전자 또는 단백질과의 결합 능력을 실시간 이분자 상호작용 분석(BIA)를 이용하여 분석할 수 있다 (Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63:23382345(1991), and Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699705(1995)). BIA는 실시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술로서, 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 실시할 수 있다(예컨대, BIACore™). 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자를 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은, 투-하이브리드 분석 또는 쓰리-하이브리드 분석 방법에 따라 실시할 수 있다 (U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al., *Cell* 72, 223232, 1993; Madura et al., *J. Biol. Chem.* 268, 1204612054, 1993; Bartel et al., *BioTechniques* 14, 920924, 1993; Iwabuchi et al., *Oncogene* 8, 16931696, 1993; 및 WO 94/10300). 이 경우, CP2 단백질을 베이트(bait) 단백질로 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, CP2 단백질에 결합하는 물질, 특히 단백질을 스크리닝 할 수 있다. 투-하이브리드 시스템은 분할 가능한 DNA-결합 및 활성화 도메인으로 구성된 전사인자의 모듈 특성에 기초한다. 간단하게는, 이 분석 방법은 두 가지 DNA 컨스트럭트를 이용한다. 예컨대, 하나의 컨스트럭트에서, CP2-코딩 폴리뉴클레오타이드를 공지의 전사 인자(예컨대, GAL-4)의 DNA 결합 도메인-코딩 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 다른 컨스트럭트에서, 분석 대상의 단백질(“프레이” 또는 “시료”)을 코딩하는 DNA 서열을 상기 공지의 전사인자의 활성화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 만일, 베이트 및 프레이가 인 비보에서 상호작용하여 복합체를 형성하면, 전사인자의 DNA-결합 및 활성화 도메인이 인접하게 되며, 이는 리포터 유전자(예컨대, *LacZ*)의 전사를 촉발하게 된다. 리포터 유전자의 발현을 검출할 수 있으며, 이는 분석 대상의 단백질이 CP2 단백질과 결합할 수 있음을 나타내는 것이며, 결론적으로 심부전의 치료 또는 예방용 물질로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다.
- [0065] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 CP2 유전자 또는 단백질에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킨다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시료”는 CP2 유전자 또는 단백질의 활성에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시료는 단일

화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 세포 또는 조직 배양물)이다. 시료는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[0066] 이어, 시료가 처리된 세포에서 CP2 유전자 또는 단백질의 양 또는 CP2 유전자 또는 단백질의 활성을 측정한다. 측정 결과, CP2 유전자 또는 단백질의 양 또는 CP2 유전자 또는 단백질의 활성이 감소-조절(down-regulation)되는 것이 측정되면, 상기 시료는 심부전의 치료 또는 예방용 물질로 판정될 수 있다.

[0067] 본 발명의 스크리닝 방법에서 CP2 단백질의 양의 변화는 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, CP2 단백질의 양의 변화는 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경재 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은 시료가 CP2 단백질의 기능을 억제하는지 여부를 조사함으로써 실시할 수 있다. 예를 들어, 특정 시료를 처리하였을 때, CP2 단백질의 활성이 저해되어 CP2이 기질을 인산화하는 정도가 감소하는 것으로 판정되면, 시험물질은 CP2 단백질의 기능을 억제하는 것으로 판정되며, 결국 시료는 신경퇴행성 질환의 치료 또는 예방의 후보물질로 결정된다.

[0069] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 신경 퇴행성 질환 치료 또는 예방용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) (i) CP2 유전자 또는 CP2 단백질, 그리고 (ii) CP2 결합 모티프 I 서열을 포함하는 트랜스페린 유전자의 프로모터 서열 및 상기 프로모터 서열에 작동적으로 결합된 리포터 유전자를 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 리포터 유전자의 발현양을 측정하는 단계, 상기 리포터 유전자의 발현양이 감소-조절(down-regulation)되는 것으로 측정되는 경우에는 상기 시료는 신경 퇴행성 질환 치료 또는 예방용 물질로 판정된다.

[0070] 본 발명의 명세서 용어 “리포터 유전자”는 분석하고자 하는 프로모터의 전사활성에 따라 그 발현의 정도가 차이가 있게 되고, 이에 의해 발현이 되는 단백질의 활성 또는 양을 조사함으로써 프로모터의 전사활성을 용이하게 판단할 수 있게 하는 유전자를 의미한다. 본 발명에서 이용하는 리포터 유전자로서 바람직하게는, 루시퍼라아제의 유전자, 클로람페니콜 아세틸트랜스페라아제의 유전자, β -갈락토시다아제의 유전자, 사람의 성장 호르몬의 유전자, 녹색 형광단백질(green fluorescent protein), 분비성 태반 알칼린 포스파테이즈(secreted placental alkaline phosphatase) 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 리포터 유전자에 의해 발현되는 단백질의 양은 루시퍼라아제의 경우에는 de Wet J. et al., *Mol. Cell Biol.*, 7:725-737(1987)에 개시된 방법, 클로람페니콜 아세틸트랜스페라아제의 경우에는 Gorman C. et al., *Mol. Cell Biol.*, 2:1044-1051(1982)에 개시된 방법, β -갈락토시다아제의 경우에는 Hall C.V. et al., *J. Mol. Appl. Genet.*, 2:101-109(1983)에 개시된 방법, 사람의 성장 호르몬의 경우에는 Selden R. et al., *Mol. Cell Biol.*, 6:3173-3179(1986)에 개시된 방법, 녹색 형광단백질의 경우에는 Chalfie M. et al., *Science*, 263:802-805(1994)에 개시된 방법, 그리고 분비성 태반 알칼린 포스파테이즈의 경우에는 Berger, J. et al., *Gene*, 66:1-10 (1988)에 개시된 방법에 따라 측정된다.

[0072] 트랜스페린 유전자의 프로모터 부위에 있는 CP2 결합 모티프 I 서열은 CP2 전사인자의 프로모터 결합에서 가장 중요한 서열이다(참조: 실시예, 서열목록 제4서열). 리포터 유전자에 결합된 프로모터(예를 들어, 서열목록 제3서열)는 CP2 결합 모티프 I 서열을 최소 서열로서 포함하며, 트랜스페린 유전자의 프로모터 전체 부위를 포

함할 수도 있다. CP2 결합 모티프 I 서열을 포함하는 트랜스페린 유전자의 프로모터 서열은 리포터 유전자에 작동적으로 결합되어 있다. 본 명세서에서, 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.

[0073] 본 발명의 스크리닝 방법은 특정의 전사조절 서열에 결합하는 특정의 전사조절 인자의 활성도를 조사하기 위한 것으로서, CP2 전사 인자가 결합하는 부위는 상기 트랜스페린 프로모터의 일 부분인 CP2 결합 모티프 I 서열을 포함하는 프로모터 서열이다.

[0074] 본 발명의 방법에 따라 리포터 유전자의 발현양이 감소-조절 되는 것으로 측정된 경우에는, 분석하고자 하는 시료는 CP2가 트랜스페린 프로모터에 결합하는 것을 억제하는 물질, 즉 신경 퇴행성 질환 치료 또는 예방 물질로 판정될 수 있다.

[0075] 용어 “리포터 유전자의 발현양이 감소-조절”은 시료 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 리포터 유전자의 발현양이 감소되는 것을 의미한다.

효과

[0076] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0077] (i) 본 발명은 신경 퇴행성 질환의 진단용 키트 및 신경 퇴행성 질환 치료 또는 예방용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0078] (ii) 본 발명은 *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 통하여 CP2 전사인자가 TF의 발현을 직접적으로 조절하여 AD의 병리학적인 원인이 될 수 있는 새로운 분자생물학적인 기작을 규명한 것이다.

[0079] (iii) 본 발명은 다운 스트림(down-stream)에 위치하는 발병 유전자를 전사 기작 측면에서 조절한다는 특이성이 있으며, 이는 종래의 APP 유전자나 이에 관련된 효소들의 억제방법에서 야기되는 심각한 신경발생 장애와 같은 부작용 없이 치료가 가능하다.

[0080] (iv) 또한, 본 발명은 신경 퇴행성 질환(특히, 알츠하이머병)을 치료하는데 있어서 CP2 전사인자의 조절을 통한 신약 개발 및 치료방법에 기초적인 자료를 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0081] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이를 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이를 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

[0083] 다른 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) 부 또는 %, 고체/액체는 (중량/부피) 부 또는 %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) 부 또는 %이다.

실시예 1: 트랜스페린(transferrin) 프로모터에 결합할 수 있는 전사인자 확인

[0085] 트랜스페린(transferrin: TF) 유전자의 프로모터 부위에 결합할 수 있는 전사인자를 찾기 위해서 우선 종 별로 TF 유전자의 프로모터 부위에 잘 보존되어 있는 부분을 찾아보았다. 발현에 필수적인 프로모터 부위는 중요한 부분이기 때문에 진화하면서도 염기서열이 잘 바뀌지 않고 잘 보존되어 있는 특징이 있다. 따라서 인간(Homo Sapiens)과 래트(Rattus norvegicus), 마우스(Mus musculus), 소(Bos taurus) 및 말(Equus caballus)의 TF 유전자 염기서열 중 전사시작점 (-1)부터 600개의 염기서열 윗부분 (-600)을 가정적인 프로모터로 판단한 후 각 종마다 염기서열을 입력하여 다중서열정렬(Multiple Sequencing Alignment) 프로그램을 이용해 보존된 염기서열

을 확인하였다(도 1a).

[0086] 그 결과 전사 시작점으로부터 179개의 염기서열(-179)부터 전사 시작점에 이르기까지 상당한 부분이 잘 보존되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이 보존된 부위들 중 근접한 염기서열들을 각각 그룹핑(grouping)하여 총 6개의 그룹으로 나누었고, 각 그룹의 염기서열에 결합 할 가능성이 있는 전사인자들을 확인하기 위해 MOTIF 써칭 프로그램(motif.genome.jp/)을 이용하였다. 그 결과들은 수치로 표시되는데 이 점수를 색상화하여 높은 점수부터 진한 색으로 표시한 결과 CP2 전사인자가 TF 프로모터에 결합할 가능성이 큰 것으로 확인되었다(도 1b). 이를 재확인하기 위해 CP2가 DNA에 붙는다고 알려진 염기서열(binding motif)을 출판된 논문(Banerjee, D et al., *Hum Mol Genet*, 9:2275-2280(2000))에서 확인한 후, TF의 -179번째 염기서열부터 -1번째 염기서열을 각 CP2의 결합 모티프(binding motif) 염기서열과 다중서열정렬 프로그램을 이용해 비교해보았다. 그 결과, 4개의 CP2 결합 모티프는 모두 높은 비율로 TF의 프로모터 부위에 존재하고 있다는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다(도 1c).

실시예 2: 세포주 배양 및 형질 감염

[0088] HEK293 세포주[ATCC(American Type Culture Collection); Cat. No. CRL-1573TM]를 10 % 우태아혈청(Fetal Bovine Serum: FBS; Invitrogen, 미국)과 페니실린-스트렙토마이신(50 units/ml)을 함유한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Invitrogen, 미국)에서 형질 감염 이전에 12시간 동안 배양 하였다. 이 세포들을 FBS가 함유되지 않은 DMEM 배지로 세척하고, 형질감염 (transient transfection)을 리포펙타민(Lipofectamine; Invitrogen, 미국)을 이용하여 pCMV-FLAG-CP2 [pCMV-FLAG 벡터(Sigma-Aldrich) *Hind*III와 *Sal*I 부위에 CP2 유전자 삽입]의 플라스미드를 HEK293 세포 내로 주입한 뒤 24시간 동안 배양하였다.

실시예 3: CP2 전사인자에 의한 TF의 mRNA 수준의 증가

[0090] 형질감염된 HEK293 세포들을 수집한 후 트리졸 시약(Invitrogen)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 여기에서 역전사효소 키트(Reverse Transcriptase Kit; Intron)를 이용하여 42°C에서 1시간 동안 HEK293 총 mRNA를 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 TF에 특이적인 염기서열을 갖는 프라이머를 이용해 PCR을 수행하였다(forward primer, 5' -CCTGATCCATGGCTAAGAA-3' reverse primer, 5' -CGACCGGAACAAACAAAAGT-3' 95°C for 3 min, 이후 30 사이클 of 98°C for 10 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 40 s, 최종 신장반응 72°C for 10 min). GAPDH(glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase)는 동일한 양을 이용하였다는 대조군으로 사용되었다.

[0091] 그 결과, 도 2에서 보듯이, 대조군에서는 CP2를 발현하지 않으므로 TF의 mRNA 수준이 그리 많지 않았으나, 실험군에서는 CP2의 발현이 증가함으로써 TF의 mRNA 수준이 증가한다는 것을 확인하였다. 또한 CP2의 발현을 더욱 증가시킨 실험군에서 TF의 mRNA 수준이 더욱 증가한다는 것을 재확인하여 TF의 mRNA의 양이 CP2 발현에 의존적이라는 것을 확인할 수 있었다.

실시예 4: CP2 전사인자가 TF의 발현 조절에 미치는 영향

[0093] CP2가 TF의 발현 조절에 미치는 변화를 측정하기 위해서, 다음과 같이 루시퍼라아제 분석(Luciferase Assay)을 수행하였다. HEK293 세포들을 60 mm 디쉬에서 배양하고, 500 ng 파이어플라이(firefly) 루시퍼라아제 TF 리포터 유전자의 전사시작점 윗부분의 600개의 염기서열)와 500 ng pCMV-β-갈락토시다아제(Promega)를 500 ng의 pCMV-FLAG-CP2와 함께 각각 3 µg씩 형질감염 시켰다. 형질감염 후 36시간 후에 리포터 용해버퍼(reporter lysis buffer; Promega)를 이용하여 용해시켰다. 세포추출액은 글로맥스 루미노메터(GloMax luminometer; Promega)를 활용하여 제조사의 지침에 따라 루시퍼라아제 리포터 분석(Luciferase reporter Assay)을 수행하였다. 루시퍼라아제 활성을 베타-갈락토시다아제 활성을 이용하여 보정하였다. 그 결과, 도 3에서 보듯이, CP2에 의해서 TF 프로모터가 활성화 된다는 것을 알 수 있었고, CP2의 단백질 양이 증가함에 따라 의존적으로 더욱 활성화 된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0094]

실시예 5: CP2에 의해 의존적으로 발현이 조절되는 TF의 프로모터 부위 확인

[0096]

CP2 전사인자가 TF의 프로모터에 붙을 수 있는 4군데 중에 어떤 부분에 특이적으로 영향을 끼쳐서 TF의 발현을 조절하는지 확인하기 위해 다음과 같이 루시퍼라아제 분석(Luciferase Assay)을 수행하였다. HEK293 세포들을 60 mM 디쉬에서 배양하고 파이어플라이 루시퍼라아제 벡터(Promega)에 완전한 TF 프로모터 부위 (서열목록 제3 서열) 그리고 이를 주형으로 하여 PCR(Tf 야생형: 정방향 프라이머 5' -AAGCTTACGGAGCCTGAGCTCA 및 역방향 프라이머 5' -AAGCTTAGCCTCCGGCGCCCC; Tf-luc mut1: 역방향 프라이머 5' -AAGCTTAGCCGGTTGCCAA-3'; Tf-luc mut2: 역방향 프라이머 5' -AAGCTTCCACTGATCACCTCA-3' 및 Tf-luc mut3: 역방향 프라이머 5' -AAGCTTGACAGAAATGTTGA-3' , 95° C for 3 min, 이후 30 사이클 of 98°C for 10 s, 59° C for 30 s, and 72° C for 1 min 20 s, 최종 신장반응 72° C for 10 min [TaKaRa])을 하여 CP2 결합 모티프 I(CP2 binding motif I, 서열목록 제4서열)을 제거한 프로모터 부위(-600 ~ -82; mutant 1), 위와 같은 방법으로 CP2 결합 모티프 I, III, IV를 제거한 프로모터 부위(-600 ~ -131; mutant 2), 마찬가지로 CP2 결합 모티프 4개를 모두 제거한 프로모터 부위 (-600 ~ -188; mutant 3)를 삽입한 후(도 4a), 이 각각의 리포터 500 ng 유전자들과 500 ng pCMV-β-갈락토시라아제를 500 ng의 pCMV-FLAG-CP2와 함께 각각 3 µg씩 형질 감염시켰다. 36시간 후에, 세포들을 리포터 용해 버퍼(Promega)를 이용하여 용해시켰다. 세포추출액은 글로맥스 루피노메터를 활용하여 제조사의 지침에 따라 루시퍼라제 리포터 분석(Luciferase reporter assay)을 수행하였다. 루시퍼라제 활성은 베타-갈락토시다제 활성을 이용하여 보정하였다. 그 결과, 도 4에서 보듯이, CP2에 의해서 활성화된 TF 프로모터는 완전한 TF 프로모터가 존재하였을 때이며, 결합 모티프 I이 제거된 프로모터들은 CP2 단백질의 양이 증가하여도 활성화 되지 않는다는 것을 알 수 있었다. 따라서 TF의 발현은 CP2 결합 모티프 I에 CP2 단백질이 영향으로 인하여 일어날 가능성이 있다는 것을 확인할 수 있었다(도 4b).

[0097]

위의 루시퍼라아제 분석 실험에서 형질 감염된 세포에서 발현된 단백질은 웨스턴 블로팅(Western Blotting)을 활용해 확인하였다. 리포터 용해 버퍼를 이용하여 용해시킨 세포추출액을 2 X 단백질 로딩ダイ(dye; protein loading dye; 25% SDS, 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% 글리세롤, 및 0.01% 브로모페놀 블루)와 함께 5분간 가열하였다. 상기 샘플들을 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동 상에서 분리하였다. 상기 전기 영동된 단백질을 니트로셀룰로오스 막(Nitrocellulose membrane)으로 옮긴 후 막을 5% 스kim 밀크(Skim milk)에서 12시간 블로킹(blocking)을 진행하였다. 그 후 항-FLAG-항체와, 로딩 콘트롤/loading control로서 항-베타 투불린(beta-tubulin)-항체를 사용하여 수행하였다. 이 때 모노클로날 FLAG와 폴리클로날 투불린 항체들은 각각 시그마(Sigma) 및 산타 그루즈(Santa Cruz)에서 구입하였다.

[0098]

실시예 6: *in vitro*에서 CP2 전사인자의 TF 프로모터 결합 확인

[0099]

CP2 전사인자는 DNA에 결합하여 표적유전자의 발현을 조절하므로 CP2 단백질이 TF의 프로모터 부위에 결합하여 발현을 조절하는지를 EMSA(Electrophoresis Mobility Shift Assay)를 통해 다음과 같이 확인하였다. 우선 정제된 CP2 단백질을 얻기 위해, pGEX4T1-CP2(Clontech) 형질전환된 대장균을 1.0 mM IPTG (isopropyl-b-D-1-thiogalactopyranoside ; Sigma Aldrich)를 이용하여 GST(glutathione S-transferase)-CP2의 단백질 발현을 유도하였다. GST-CP2가 과발현된 대장균을 초음파 분쇄기(sonicator)를 이용하여 대장균 용해 버퍼(*E. Coli* lysis buffer: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM Tris-C1)상에서 세포를 용해하였다. 이 용해물에서 단백질의 상충액을 얻기 위해, 12,000 rpm으로 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 이 상충액을 GST4B 비드(GST4B bead, GE healthcare)를 이용하여 GST-CP2 단백질만을 순수 분리 정제하였다. 위의 조건으로 GST 단백질 역시 순수 분리 정제하여 양성 대조군로서 사용하였다. TF의 프로모터 부위 중에 CP2에 의존적으로 발현이 증가했던 -53에서 -35부위를 포함한 30개의 프로브 염기서열(Cosmo4 Incorporation; 정방향 브로브; 5' - TTATTCCATTCCCCGGCTGGCGGGCTGGCGCAATCTTT-3' 역방향 브로브; 5' - AAAGATTGCGCCCAGCCCGCCAGGCCGGGAATGAAATAA-3')을 제작한 후 방사선 ³²P를 이용하여 표지하였다. 이 때 표지는 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제[T4 polynucleotide kinase: (NEB)]를 프로브와 섞어준 후 100°C에서 실내온도(RT)로 서서히 내려주어 제작하였다. 또한 ³²P를 넣어주지 않은 프로브 역시 함께 제작하여 음성 대조군으로서 사용하였다. 이렇게 준비된 GST-CP2 단백질과, 방사선으로 표지된 TF 프로브를 DNA-단백질 반응 버퍼(100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 1 M KCl, 1 mM DTT(dithiothreitol), 50% 글리세롤 및 100 ng/ml BSA)에서 30°C에서 30분간 반응시킨 후 5% 네이티브 젤을 이용하여 전기영동을 하였다. 그 후 젤을 말린 후 X-ray 필름을 이용하여 방사선으로 표지된 TF 프로브의 위치를 암실에서 확인하였다.

[0100]

그 결과, 도 5에서 보듯이, 아무것도 넣어주지 않고 오직 TF 프로브만 넣어준 그룹에서는 젤의 아래쪽에 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 양성 대조군으로 GST 단백질을 넣어준 그룹 역시 그 양을 증가시켜도 TF 프로브가

아래쪽에 존재하는 것을 확인하였다. 반면에 CP2 단백질을 넣어준 그룹에서는 위쪽으로 밴드가 나타났고 CP2의 양을 늘려준 그룹 역시 위로 끌리는 밴드가 더욱 두텁게 나타났다는 것을 확인하였다. 이는 EMSA의 원리대로 TF 프로브에 CP2단백질이 결합하여 상대적으로 무거워짐으로써 전기영동시 덜 내려왔다는 것을 보여준다. 이것이 정말 CP2 단백질에 특이적으로 일어나는 반응인지 알아보기 위해 토끼에 CP2 단백질을 항원으로 주입하여 만들어낸 CP2 항체를 같이 넣고 반응시킨 그룹을 본 결과 그 위쪽으로 다른 밴드가 더 나타났다는 것을 확인하였다. 이는 CP2 단백질과 TF 프로브 결합체에 CP2 항체까지 결합하여 더욱 무거워짐으로써 덜 내려왔다는 것을 보여준다. 이것이 항체가 가지고 있는 IgG (Immunoglobulin G) 때문이 아니라는 것은 IgG를 같이 넣고 반응시켰을 때 더욱 끌린 밴드가 나타나지 않은 것을 확인함으로써 알 수 있다. 또한 방사선으로 표지되지 않은 TF 프로브를 함께 넣고 반응시켰을 때 끌린 밴드가 약해진 것을 확인하였는데 이는 CP2 단백질이 방사선 표지된 TF 프로브 뿐만 아니라 표지되지 않은 TF 프로브까지 결합함으로써 상대적으로 표지된 TF 프로브가 경쟁적으로 반응하면서 밴드가 흐려진 것을 알 수 있다. 따라서 이 실험을 통해서 CP2는 TF 프로모터 부위의 CP2 결합 부위에 직접적으로 결합한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0101] 본 연구는 활성산소종의 증가에 의한 산화적 스트레스를 유발할 수 있는 철 조절 단백질인 TF의 발현을 전사기작 측면에서 조절할 수 있는 전사인자를 생물정보학적인 근거하여 스크리닝 하였다. 또한, 본 발명자들은 CP2라는 전사인자가 가장 가능성성이 높은 단백질임을 가정하였고 TF의 프로모터 부위에 CP2가 결합할 수 있는 염기서열이 존재한다는 것을 확인하였다.

[0102] 이를 근거로 하여 우리는 *in vitro* 실험과 *in vivo* 실험을 통하여 CP2 전사인자가 TF의 발현을 직접적으로 조절하여 AD의 병리학적인 원인이 될 수 있는 새로운 분자생물학적인 기작임을 밝혀내었다.

[0103] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도 1a-1c는 CP2와 결합하는 트랜스페린(transferrin) 프로모터의 염기서열을 찾기 위하여 다중서열정렬(multiple sequence alignment)을 실시한 결과이다. 도 1a는 전사인자 CP2가 결합한다고 알려진 4가지의 염기서열을 트랜스페린 유전자의 프로모터 염기서열에서 찾기 위해 다중서열정렬을 실시한 결과이다. 도 1b는 점수를 색상화하여 높은 점수부터 진한 색으로 표시한 결과 CP2 전사인자가 TF 프로모터에 결합할 가능성이 큰 것을 나타낸 것이다. 또한, 4가의 CP2 결합 모티프(binding motif)가 트랜스페린 프로모터에 모두 존재하며, 동일성(identity) 역시 높은 것으로 확인되었다(도 1c).

[0105] 도 2는 CP2 전사인자에 의해 증가하는 트랜스페린 mRNA 수준을 측정한 결과이다. HEK293 세포에 CP2 전사인자를 과발현 시킨 후 RNA를 추출하여 cDNA로 역전사하였다. 이를 주형으로 하여 트랜스페린에 특이적인 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 CP2 과발현양이 늘어날수록 트랜스페린의 mRNA가 증가하였다. GAPDH는 동일한 양을 이용하였다는 대조군으로써 사용되었다.

[0106] 도 3은 CP2 전사인자에 의한 트랜스페린의 전사활성을 측정한 결과이다. HEK293 세포에 CP2 DNA와 트랜스페린 프로모터가 삽입된 리포터 유전자(reporter gene)를 함께 형질전환(transfection)시켰다. 그 결과 CP2 전사인자가 증가할수록 수치가 높게 나왔는데 이는 CP2 전사인자가 직접적 또는 간접적으로 트랜스페린의 프로모터에 기능을 하였다는 것을 의미한다. 따라서 CP2 전사인자는 트랜스페린의 전사활성을 일으키는 것으로 확인되었다.

[0107] 도 4a-4b는 CP2에 의해 의존적으로 발현이 조절되는 TF의 프로모터 부위를 확인한 결과이다. 도 4a는 완전한 TF 프로모터 부위 (-600 ~ -1), 그리고 이를 주형으로 하여 PCR(중합효소연쇄반응)을 하여 CP2 결합 모티프 I을 제거한 프로모터 부위(-600 ~ -82; mutant 1), 위와 같은 방법으로 CP2 결합 모티프 I, III, IV를 제거한 프로모터 부위(-600 ~ -131; mutant 2), 마찬가지로 CP2 결합 모티프 4개를 모두 제거한 프로모터 부위 (-600 ~ -188; mutant 3)를 나타낸 모식도이다. 도 4b는 상기 각각의 프로모터를 포함하는 벡터를 HEK293 세포에 형질감염 시킨 후 세포를 용해하여 루시피라제 리포터 분석(Luciferasse reporter assay)을 실시한 결과이다. WT는 와일드 타입(wild type)을 의미하며, WB는 웨스턴 블로팅(Western Blotting)을 의미한다.

[0108] 도 5는 CP2 전사인자가 트랜스페린 프로모터에 결합하는지를 확인한 결과이다. GST-CP2를 대장균에서 발현 시

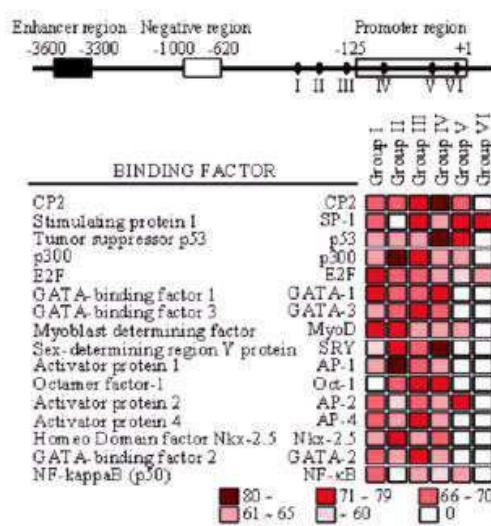
킨 후, GST4B 비드(bead)를 이용하여 GST-CP2만을 분리, 정제하였다. 트랜스페린 프로모터 염기서열의 올리고머(oligomer)를 제작, 이를 32 P로 레이블링을 한 후 CP2 전사인자 단백질과 반응시켰다. 그 결과 CP2 단백질이 트랜스페린 프로모터와 결합하여 변환되는 것을 확인 할 수 있었다.

도면

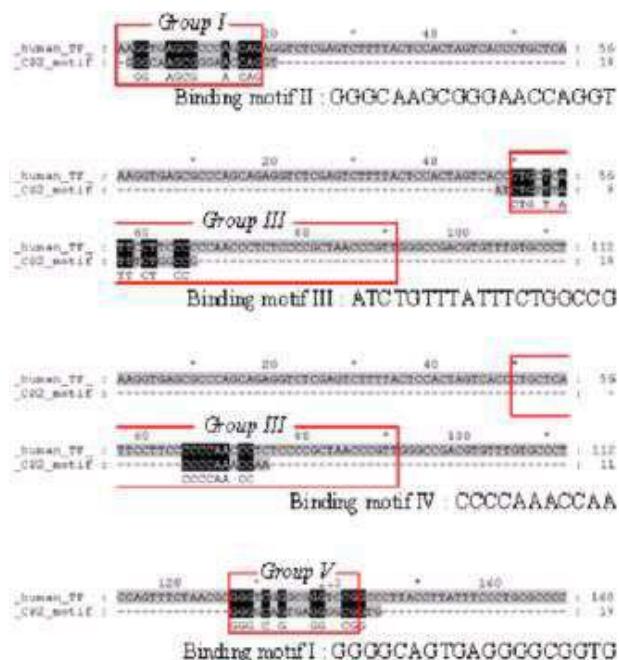
도면1a



도면1b



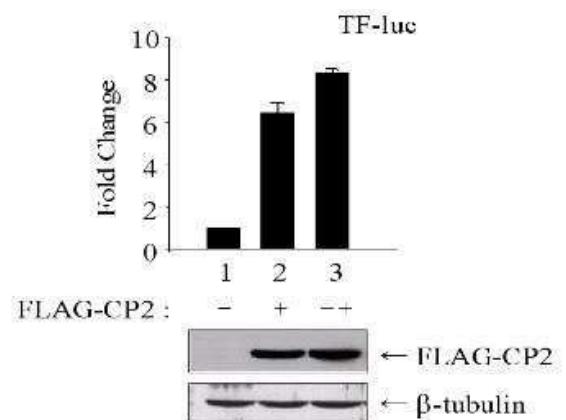
도면1c



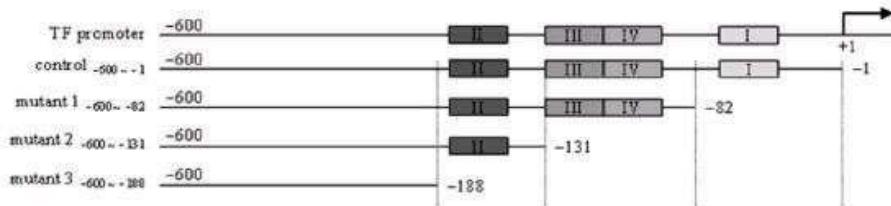
도면2



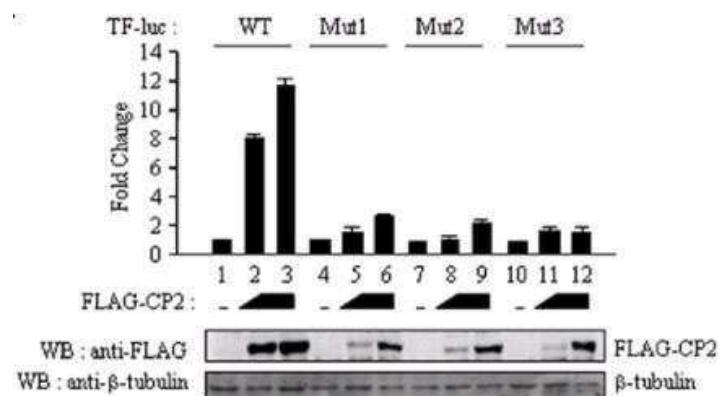
도면3



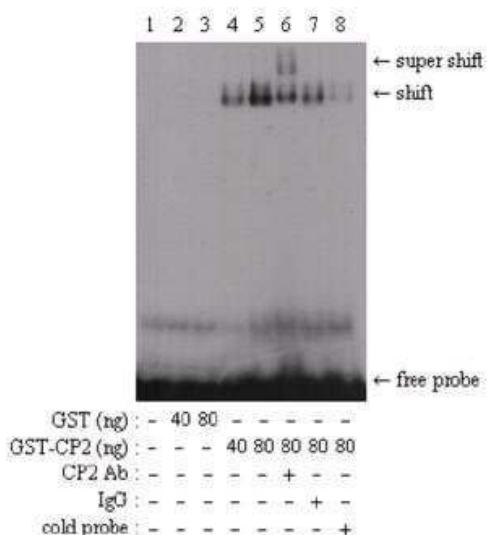
도면4a



도면4b



도면5



서 열 목 록

<110> Chung-Ang University

<120> CP2 Transcription Factor Implicated in Neurodegenerative Diseases

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1509

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggcctggg ctctgaagct gcctctggcc gacgaagtga ttgaatccgg gttggcag	60
---	----

gactttgatg ctgcgtgtc cgggatcgcc caggaactgg gtgctggc tcatacgatg	120
--	-----

agtgtatgtcc ttgcattgcc catttttaag caagaagagt cgagttgcc tcctgataat	180
---	-----

gagaataaaa tcctgcctt tcaatatgtg ctttgtctg ctacctctcc agcagtgaaa	240
---	-----

ctccatgtg aaaccctaac gtatctaat caaggacagt cttatgaaat tcgaatgcta	300
---	-----

gacaatagga aacttggaga acttccagaa attaatggca aattggtaa gagtatattc	360
--	-----

cgtgtgggt tccatgacag aaggcttcag tacactgagc atcagcagct agagggctgg	420
--	-----

aggtggaacc gacctggaga cagaattctt gacatagata tccgatgtc tgtgggtata	480
--	-----

atcgatccta gggctaattcc aactcaacta aatacagtgg agttccctgtg ggaccctgca	540
---	-----

aagaggacat ctgtgttat tcaggtgcac tgtattagca cagagttcac tatgaggaaa	600
--	-----

catggtgtag aaaaggggt gccattccga gtacaatag atacctcaa ggagaatgaa	660
--	-----

aacgggaaat atactgagca cttacactcg gccagctgcc agatcaaagt tttcaagccc	720
---	-----

aaagggtgcag acagaaaagca aaaaacggat agggaaaaaa tggagaaaacg aacacctcat	780
gaaaaggaga aatatcagcc ttcctatgag acaaccatac tcacagagtg ttctccatgg	840
cccgagatca cgtatgtcaa taactcccc tcacctggct tcaacagttc ccatagcgt	900
ttttcttttg gggaaaggaaa tggttccacca aaccaccagc cagagccacc ccctccagtc	960
acagataaacc tcttaccaac aaccacacct caggaagctc agcagtggtt gcatcgaat	1020
cgttttcta cattcacaag gctttcaca aacttcttag gggcagatgg attgaaat	1080
actagagatg atgtgatcca aatctgtggc cctgcagatg gaatcagact ttttaatgca	1140
ttaaaaggcc ggatggtgcg tccaaggta accattatg tttgtcagga atcactgcag	1200
ttgagggagc agcaacaaca gcagcagcaa cagcagcaga agcatgagga tggagactca	1260
aatggtactt tcttcgttta ccatgctatc tatctagaag aactaacagc tggtgaattt	1320
acagaaaaaa ttgctcagct ttcagcatt tcccctgcc agatcagcca gatttacaag	1380
cagggccaa caggaattca tgtgctcatc agtgatgaga tgatacagaa ctttcagggaa	1440
gaagcgtt ttattctgga cacaatgaaa gcagaaacca atgatagcta tcataatcata	1500
ctgaagttag	1509

<210> 2
<211> 502
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ala Trp Ala Leu Lys Leu Pro Leu Ala Asp Glu Val Ile Glu Ser
1 5 10 15

Gly Leu Val Gln Asp Phe Asp Ala Ser Leu Ser Gly Ile Gly Gln Glu
20 25 30

Leu Gly Ala Gly Ala Tyr Ser Met Ser Asp Val Leu Ala Leu Pro Ile
 35 40 45

Phe Lys Gln Glu Glu Ser Ser Leu Pro Pro Asp Asn Glu Asn Lys Ile
 50 55 60

Leu Pro Phe Gln Tyr Val Leu Cys Ala Ala Thr Ser Pro Ala Val Lys
 65 70 75 80

Leu His Asp Glu Thr Leu Thr Tyr Leu Asn Gln Gly Gln Ser Tyr Glu
 85 90 95

Ile Arg Met Leu Asp Asn Arg Lys Leu Gly Glu Leu Pro Glu Ile Asn
 100 105 110

Gly Lys Leu Val Lys Ser Ile Phe Arg Val Val Phe His Asp Arg Arg
 115 120 125

Leu Gln Tyr Thr Glu His Gln Gln Leu Glu Gly Trp Arg Trp Asn Arg
 130 135 140

Pro Gly Asp Arg Ile Leu Asp Ile Asp Ile Pro Met Ser Val Gly Ile
 145 150 155 160

Ile Asp Pro Arg Ala Asn Pro Thr Gln Leu Asn Thr Val Glu Phe Leu
 165 170 175

Trp Asp Pro Ala Lys Arg Thr Ser Val Phe Ile Gln Val His Cys Ile
 180 185 190

Ser Thr Glu Phe Thr Met Arg Lys His Gly Gly Glu Lys Gly Val Pro
 195 200 205

Phe Arg Val Gln Ile Asp Thr Phe Lys Glu Asn Glu Asn Gly Glu Tyr
 210 215 220

Thr Glu His Leu His Ser Ala Ser Cys Gln Ile Lys Val Phe Lys Pro
 225 230 235 240

Lys Gly Ala Asp Arg Lys Gln Lys Thr Asp Arg Glu Lys Met Glu Lys
 245 250 255

Arg Thr Pro His Glu Lys Glu Lys Tyr Gln Pro Ser Tyr Glu Thr Thr
 260 265 270

Ile Leu Thr Glu Cys Ser Pro Trp Pro Glu Ile Thr Tyr Val Asn Asn
 275 280 285

Ser Pro Ser Pro Gly Phe Asn Ser Ser His Ser Ser Phe Ser Leu Gly
290 295 300

Glu	Gly	Asn	Gly	Ser	Pro	Asn	His	Gln	Pro	Glu	Pro	Pro	Pro	Pro	Val
305					310					315					320

Thr Asp Asn Leu Leu Pro Thr Thr Thr Pro Gln Glu Ala Gln Gln Trp
325 330 335

Leu His Arg Asn Arg Phe Ser Thr Phe Thr Arg Leu Phe Thr Asn Phe
340 345 350

Ser Gly Ala Asp Leu Leu Lys Leu Thr Arg Asp Asp Val Ile Gln Ile
 355 360 365

Cys Gly Pro Ala Asp Gly Ile Arg Leu Phe Asn Ala Leu Lys Gly Arg
 370 375 380

Met	Val	Arg	Pro	Arg	Leu	Thr	Ile	Tyr	Val	Cys	Gln	Glu	Ser	Leu	Gln
385					390					395					400

Leu Arg Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Lys His Glu
 405 410 415

Asp Gly Asp Ser Asn Gly Thr Phe Phe Val Tyr His Ala Ile Tyr Leu
420 425 430

Glu Glu Leu Thr Ala Val Glu Leu Thr Glu Lys Ile Ala Gln Leu Phe
435 440 445

Ser Ile Ser Pro Cys Gln Ile Ser Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Pro Thr
 450 455 460

Gly Ile His Val Leu Ile Ser Asp Glu Met Ile Gln Asn Phe Gln Glu
465 470 475 480

Glu Ala Cys Phe Ile Leu Asp Thr Met Lys Ala Glu Thr Asn Asp Ser
485 490 495

Tyr His Ile Ile Leu Lys

500

<210> 3
<211> 600
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3	
tcctcggact cgagtcgccc cgtccttctc cctcgtag gaggcacccc ctggaaactc	60
tcgggtcctc gtcctaaagc tccctgtgga ccacccctcg tttccacga ctcagacaga	120
aactggaact cgggtcgaac aaagaggacg taggaggggg tttccccga aacggacagt	180
aagacgtcaa gatcacaccc cagaccgcg tcaagaaaag ggagaggtcg gagcctcaga	240
aggagacacc tgacgcgtct atcctgacca ccgtgcctgg tcgagacgtc gggacctcag	300
tcctcgctc gggggccga ggtcgcccg gcatcgccga ggaccgtggc tcgctcgccg	360
ctactgttac cgacgtaaca cgaagtacag ggaaggtag ttgtaaagac acgacctgag	420
gaaggtgagc gcccagcaga ggtctcgagt ctttactcc actagtccacc ctgctcatcc	480
cttccccca accctctccc cgctaaccgg ttggccgac gtgttgtgc cctccagttt	540
ctaacgcggg tcggggggc cggccctta cttattcc ctgcgcggg cggcctccga	600
	600

<210> 4
<211> 19
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 4	
gggtcgcccg ggtccggcc	19