



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0093288
(43) 공개일자 2017년08월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/033 (2014.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 67/0339 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0014148
(22) 출원일자 2016년02월04일
심사청구일자 2016년02월04일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이은일
서울특별시 성북구 인촌로17가길 64 (안암동1가, 삼성래미안아파트)
유수연
서울특별시 성북구 안암로 145 의과대학 문숙의학관 224호 (안암동5가, 고려대학교안암캠퍼스)
(74) 대리인
손민

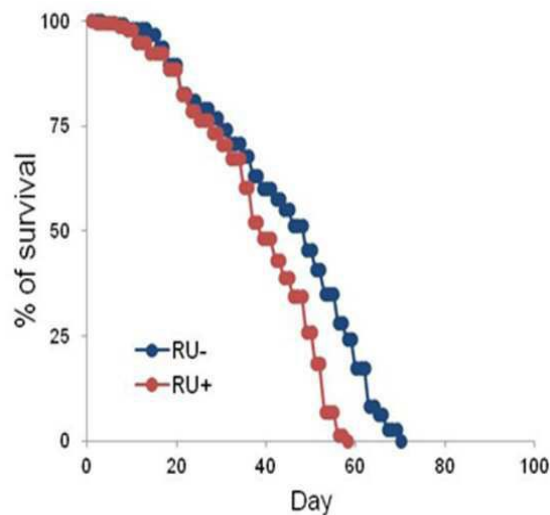
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법

(57) 요약

본 발명은 초파리로부터 유래된 산화 스트레스 저항성 유전자인 Art1 유전자의 발현수준을 조절하는 단계를 포함하는 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법, Art1 유전자가 도입되고 과발현되어, 산화 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 초파리 및 상기 형질전환 초파리를 이용하여 산화 스트레스 저항성 체제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법을 이용하면, 수명과 직접적으로 연관된 Art1 유전자의 생체내 작용기작을 보다 정밀하게 연구할 수 있으므로, 수명과 연관된 스트레스 관련 연구에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

G01N 33/5085 (2013.01)

A01K 2217/203 (2013.01)

A01K 2227/706 (2013.01)

A01K 2267/03 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 h114-00135-0210-0

부처명 환경부

연구관리전문기관 환경산업기술원

연구사업명 생활공감 환경보건기술개발사업

연구과제명 빛공해 인체 및 생태 위해성 평가기술과 위해성 평가시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.07.01 ~ 2015.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

초파리에서 Art1 유전자의 발현수준을 조절하는 단계를 포함하는 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 산화 스트레스 저항성 조절은 성특이성을 나타내는 것인 방법

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 성특이성은 암컷 특이성인 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 Art1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 Art1 유전자의 발현수준 조절은 결실, 치환 또는 삽입에 의해 Art1 유전자 자체를 손상시키거나, Art1 유전자의 전사조절인자를 불활성시키거나 또는 siRNA 또는 miRNA를 사용하여 Art1 유전자의 mRNA를 불활성화시켜서 Art1 유전자의 발현수준을 감소시키는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 Art1 유전자의 발현수준 조절은 Art1 유전자를 포함하는 발현벡터를 초파리의 수정란에 도입하여 Art1 유전자의 발현수준을 증가시키는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 Art1 유전자의 발현수준이 감소되면 초파리의 수명이 감소되는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 Art1 유전자의 발현수준이 증가되면 산화 스트레스에 대한 초파리의 저항성이 증가하는 것인 방법.

청구항 9

Art1 유전자가 도입되고 과발현되어, 산화 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 초파리.

청구항 10

(a) Art1 유전자가 불활성화된 형질전환 초파리에 산화 스트레스 저항성 제제 후보물질을 투여하는 단계;

(b) 상기 후보물질이 투여된 Art1 유전자가 불활성화된 형질전환 초파리와 Art1 유전자가 과발현된 형질전환 초파리에 각각 산화 스트레스를 가하고, 시간의 경과에 따른 각 초파리의 생존율을 측정하는 단계; 및,

(c) Art1 유전자가 과발현된 형질전환 초파리보다도 높은 생존율을 나타내는, Art1 유전자가 불활성화된 형질전환 초파리에 투여된 후보물질을 산화 스트레스 저항성 제제로 판정하는 단계를 포함하는, 산화 스트레스 저항성 제제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 초파리로부터 유래된 산화 스트레스 저항성 유전자인 Art1 유전자의 발현수준을 조절하는 단계를 포함하는 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법, Art1 유전자가 도입되고 과발현되어, 산화 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 초파리 및 상기 형질전환 초파리를 이용하여 산화 스트레스 저항성 제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

노화는 모든 생명체가 피할 수 없는 자연적인 생명현상으로서 시간의 흐름에 따라 생리적 기능이 저하되고 종국에는 죽음에 이르게 되는 전 과정을 의미한다. 노화의 기전을 설명하는 대표적인 가설에는 활성 산소 축적에 따른 산화 스트레스에 의한 노화 촉진 이론이다. 생명체는 끊임없이 외부 자극과 내부 스트레스에 대한 저항성을 갖게 되는데 노화에 따라 이 저항능력이 상실되어 노화를 촉진하게 된다는 이론이다. 스트레스에 대한 저항성 증가가 수명을 연장시키고 항노화 효과가 있다는 연구 결과들이 많이 보고되고 있으며 여전히 이러한 측면에서 스트레스 저항성을 갖는 유전자를 발굴하여 항노화 연구에 적용하려는 노력이 계속되고 있다. 특별히 의학 및 연구 분야에서는 유전자 삽입 및 유전자 발현 조절이 용이하고 평균 수명이 짧으며 인간의 유전자의 삽입 및 기능 연구가 가능한 초파리 모델이 널리 이용되고 있다.

[0003]

상기 스트레스 중에서도 산화 스트레스는 세포내에서 활성산소 (ROS; reactive oxygen species)와 활성질소 (RNS; reactive nitrogen species)가 증가되어 산화환원 재조절이 필요한 상태를 말한다. 즉, 활성산소와 활성질소들은 정상적인 상태의 미토콘드리아와 퍼옥시좀, 그리고 세포질의 전자 전달 과정에서 생성되며 항생제, 항암제, 독성 화합물, 기타 전이 금속 등의 작용과 같은 여러 가지 기전을 통해 생성될 수 있는데 이러한 활성산소는 생체 내에서 생리학적, 병리학적 과정의 매개체로 작용하여 만성과 급성의 염증질환을 유발하기도 하고 환경적으로 스트레스를 받는 상황에서 그 농도가 높아져 세포를 사멸 시킨다. 그러나 세포 내에는 항산화 효소 등과 같은 다양한 방어기작이 존재하기 때문에 이러한 활성산소, 활성질소를 제거하고 정상적인 상태를 유지할 수 있다. 그러나, 특정한 원인으로 인하여 상기 방어기작이 손상되면, 세포는 산화 스트레스에 의한 손상을 받게 된다. 즉, 지질 과산화, 아미노산 (특히 cysteine)의 산화, 단백질간의 크로스 링크, DNA 손상, DNA strand 붕괴, 단백질의 분절이 유발 되고 세포사멸에 의한 세포 죽음 뿐만 아니라 돌연변이와 암, 노화, 심혈관계 질병, 자가 면역 질환, 신경 퇴화성 질환 등 100 여종 이상의 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0004]

이러한 산화 스트레스와 관련된 유전자를 연구하여, 체내의 방어기작을 규명하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 한국공개특허 제2003-0076058호에는 aNDPK2 유전자를 식물체에 형질전환시켜 스트레스 저항성을

갖게 하는 방법이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2015-0055582호에는 가금류의 환경 스트레스에 특이적인 유전자로서 m-calpain, Caspase 3 및 Cathepsin B가 개시되어 있다. 그러나, 이들 스트레스 관련 유전자를 이용하여 노화 또는 수명 등의 생체내 활성을 조절하는 연구에 대하여는 지금까지 밝혀지지 않고 있는 실정이다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 노화 또는 수명과 직접적으로 연관된 스트레스 관련 유전자를 이용하여 노화 또는 수명 등의 생체내 활성을 조절하는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 초파리에서 유래된 Art1 유전자의 발현수준을 조절할 경우, 산화 스트레스에 대한 저항성을 조절할 수 있고, 특히 Art1 유전자의 발현이 억제되는 경우에는 초파리의 수명이 감소되는 효과를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 초파리에서 Art1 유전자의 발현수준을 조절하는 단계를 포함하는 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 Art1 유전자가 도입되고 과발현되어, 산화 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 초파리를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 초파리를 이용하여 산화 스트레스 저항성 체제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은 노화 또는 수명과 직접적으로 연관된 스트레스 관련 유전자를 이용하여 노화 또는 수명 등의 생체내 활성을 조절하는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던 중 초파리에 주목하게 되었다. 초파리는 사육이 쉽고 세대시간이 짧아 다수의 자손을 빠른 시간 내에 얻을 수 있으며, 유전자 조작이 용이하고, 유전자 해석이 가장 높은 수준으로 진행되었기 때문에, 스트레스 유전자의 효과를 직접적으로 연구하기 위한 실험동물로서 사용될 수 있을 것으로 예상하고, 초파리로부터 유래된 Art1 유전자를 결실 또는 과발현시켜서, 이에 따른 효과를 연구하고자 하였다. 그 결과, 초파리에서 상기 Art1 유전자를 결실시키면, 암컷 초파리 특이적으로 수명이 감소함을 확인하였다. 이에, 상기 수명과 관련된 스트레스에 대한 저항성과 상기 Art1 유전자의 발현조절의 연관성을 분석한 결과, 산화 스트레스에 대한 저항성을 직접적으로 조절할 수 있음을 확인하였다. Art1 유전자가 초파리의 산화 스트레스를 직접적으로 조절할 수 있고, 이에 따라 초파리의 수명에 직접적으로 영향을 미칠 수 있다는 연구결과는 지금까지 전혀 보고되지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 규명되었다.

[0010] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 초파리에서 Art1 유전자의 발현수준을 조절하는 단계를 포함하는 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에서 제공하는 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법은 성특이성을 나타내는데, 수컷 초파리의 경우에는 Art1 유전자의 발현수준을 조절하여도 산화 스트레스에 대한 저항성이 변화되지 않는 반면, 암컷 초파리의 경우에는 Art1 유전자의 발현수준을 증가시킬 경우, 산화 스트레스에 대한 저항성이 증가될 수 있고, 상기 Art1 유전자의 발현수준을 감소시킬 경우, 초파리의 수명이 단축될 수 있다.

[0012] 본 발명의 용어 "초파리(Drosophila)"란, 절지동물문 곤충강 쌍시목에 속하는 1개 속의 곤충을 총칭하여 나타내는데, 대체로, 노랑초파리(D. melanogaster), 검은초파리(D. virilis) 등을 포함한다. 상기 초파리는 사육이 쉽고 세대시간이 짧아 다수의 자손을 빠른 시간 내에 얻을 수 있다는 장점이 있어, 유전학의 연구를 위한 실험동물로서 사용되고 있다. 특히, 노랑초파리는 유전자 해석이 가장 발달된 동물의 하나로서 유전학 뿐만 아니라, 발생학, 행동학, 시간생물학, 생태학을 비롯한 다양한 분야에서 주요 실험동물로서 사용되고 있다.

[0013] 본 발명의 용어 "Art1(Arginine methyltransferase 1) 유전자"란, PRMT(Protein arginine methyltransferase)의 상동 유전자(homologs)로서, 히스톤 수식화(Histone modification)에 관여하며 호르몬 리셉터를 수식하는 것으로 알려진 단백질 아르기닌 메틸화 효소인 아르기닌 메틸트랜스퍼라제 1을 코딩하는 유전자를 의미한다. 본 발명에서는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 Art1 유전자를 사용하였다.

[0014] 상기 Art1 유전자의 발현수준 조절은 상기 Art1 유전자의 발현수준을 감소시키거나 또는 증가시켜서 수행될 수 있다.

[0015] 상기 Art1 유전자의 발현수준을 감소시키는 방법으로는 결실, 치환, 삽입 등의 방법으로 Art1 유전자 자체를 손

상시키거나, Art1 유전자의 전사조절인자를 불활성시키거나, siRNA 또는 miRNA를 사용하여 Art1 유전자의 mRNA를 불활성화시키는 등의 방법이 사용될 수 있다. 일 예로서, 손상된 Art1 유전자를 포함하는 발현벡터를 초파리의 수정란에 도입하면, 상기 수정란에 도입된 발현벡터에 포함된 손상된 Art1 유전자가 초파리의 게놈 DNA에 포함된 Art1 유전자와 치환되어 상기 Art1 유전자가 정상적으로 발현되지 않거나 또는 발현이 억제될 수 있다.

[0016] 또한, 상기 Art1 유전자의 발현수준을 증가시키는 방법으로는 정상적인 Art1 유전자를 포함하는 발현벡터를 초파리의 수정란에 도입하는 등의 방법이 사용될 수 있다. 일 예로서, 정상적인 Art1 유전자를 포함하는 발현벡터를 초파리의 수정란에 도입하면, 상기 수정란에 도입된 발현벡터에 포함된 정상적인 Art1 유전자가 초파리의 게놈 DNA에 다수 삽입되거나, 또는 세포질에서 플라스미드의 형태로 Art1 유전자가 발현되어, Art1 유전자의 발현수준을 증가시킬 수 있다.

[0017] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 적당한 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 본 발명의 발현벡터는 적합한 발현벡터가 일반적으로 가지고 있는 요소로서 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈 같은 발현조절 요소들을 포함한다. 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0018] 또한, 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 융합 폴리펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시 코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.

[0019] 발현벡터는 통상의 모든 발현벡터를 다 사용할 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 사용될 수 있다. 플라스미드 DNA의 구체적인 예로는 pUC18, pIDTSAMRT-AMP 같은 상업적인 플라스미드를 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 플라스미드의 다른 예로는 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50)가 있다. 파아지 DNA의 구체적인 예로는 λ-파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP)가 있다. 또한, 리트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus) 또는 백신시아 바이러스(vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스, 배콜로바이러스(baculovirus)와 같은 곤충 바이러스가 또한 사용될 수 있다. 이러한 발현벡터는 숙주 세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용하면 된다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 발현벡터는 불활성화되거나 또는 정상적인 Art1 유전자를 포함하고, 초파리의 수정란에 도입되기 위한 발현벡터인 것으로 해석될 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 의하면, Art1 유전자가 결손된 형질전환 초파리를 제작하고(도 1), 상기 Art1 유전자가 결손된 형질전환 초파리의 수명을 측정한 결과, 암컷 초파리에서는 Art1 유전자의 결손에 의하여 평균수명이 감소된 반면, 수컷 초파리에서는 Art1 유전자가 결손되어도 평균수명이 감소되지 않음을 확인하였다(도 2a 및 2b). 이에, Art1 유전자의 과발현이 미치는 효과를 검증하기 위하여, Art1 유전자가 과발현된 형질전환 초파리를 제작하고, 상기 Art1 유전자가 결손되거나 또는 과발현된 형질전환 초파리가 나타내는 스트레스 저항성을 분석한 결과, 고온 스트레스 저항성(도 3a 및 3b) 및 기아 스트레스 저항성(도 3c 및 3d)에 대하여는 Art1 유전자의 과발현이 별다른 영향을 미치지 못하였으나, 산화 스트레스 저항성에 대하여는 Art1 유전자가 결손되었을 경우에는 저항성이 감소하고, Art1 유전자가 과발현되었을 경우에는 저항성이 증가함을 확인하였다(도 3e 및 3f).

[0022] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 Art1 유전자가 도입되고 과발현되어, 산화 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 초파리를 제공한다.

[0023] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 Art1 유전자는 초파리에서 과발현 될 때, 산화 스트레스에 대한 저항성을 향상시키기 때문에, 상기 Art1 유전자가 도입된 형질전환 초파리는 산화 스트레스에 대한 연구를 수행하기에 적합한 실험모델로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 형질전환 초파리는 산화 스트레스를 유발시킬 수 있는 물질을 스크리닝하거나, 산화 스트레스를 감소시킬 수 있는 물질을 스크리닝하거나, 산화 스트레스의 전달과정에 관여하는 유전자 경로를 시험하는 등의 다양한 연구에 사용될 수 있는 실험모델로서 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 Art1 유전자가 불활성화된 형질전환 초파리 및 Art1 유전자가 과발현된 형

질 전환 초파리를 이용하여 산화 스트레스에 대한 저항성을 나타내는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0025] 구체적으로, 본 발명의 산화 스트레스 저항성 제제의 스크리닝 방법은 (a) Art1 유전자가 불활성화된 형질전환 초파리에 산화 스트레스 저항성 제제 후보물질을 투여하는 단계; (b) 상기 후보물질이 투여된 Art1 유전자가 불활성화된 형질전환 초파리와 Art1 유전자가 과발현된 형질전환 초파리에 각각 산화 스트레스를 가하고, 시간의 경과에 따른 각 초파리의 생존율을 측정하는 단계; 및, (c) Art1 유전자가 과발현된 형질전환 초파리보다도 높은 생존율을 나타내는 Art1 유전자가 불활성화된 형질전환 초파리에 투여된 후보물질을 산화 스트레스 저항성 제제로 판정하는 단계를 포함한다.

[0026] 상기 스크리닝 방법은 산화 스트레스에 대하여 저항성이 증가되지 않은 Art1 유전자가 불활성화된 형질전환 초파리에 산화 스트레스 저항성 제제 후보물질을 가하고, 이에 의하여 증가된 산화 스트레스 저항성이 Art1 유전자가 과발현된 형질전환 초파리의 산화 스트레스 저항성 보다도 증가할 경우, 상기 후보물질을 산화 스트레스 저항성 제제로 판정하여 선발하는 방법이다. 상기 방법을 사용하면, 현저하게 강한 산화 스트레스 저항성을 갖는 제제를 1차적으로 선발할 수 있어, 이후의 산화 스트레스 저항성 제제의 개발시에 불필요한 시행착오를 감소시킬 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명에서 제공하는 초파리의 산화 스트레스 저항성을 조절하는 방법을 이용하면, 수명과 직접적으로 연관된 Art1 유전자의 생체내 작용기작을 보다 정밀하게 연구할 수 있으므로, 수명과 연관된 스트레스 관련 연구에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 RU486의 처리여부에 따른 Art1 유전자의 발현수준을 수컷 및 암컷 초파리를 대상으로 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2a는 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리의 수명을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2b는 Art1 유전자가 결손된 수컷 형질전환 초파리의 수명을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3a는 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리의 고온 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3b는 Art1 유전자가 과발현된 암컷 형질전환 초파리의 고온 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3c는 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리의 기아 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3d는 Art1 유전자가 과발현된 암컷 형질전환 초파리의 기아 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3e는 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리의 산화 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3f는 Art1 유전자가 과발현된 암컷 형질전환 초파리의 산화 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 실시예 1: Art1 유전자가 결손된 형질전환 초파리의 제작 및 검증

[0031] Art1 유전자가 결손된 Art1 RNAi 초파리 라인을 Bloomington Drosophila Stock Center로부터 제공받아 Art1의 유전자 결손을 유도하기 위해서 Gal4-UAS 시스템(Brand, A. and Perrimon, N. (1993) Development, 118: 401-415) 및 유도성 유전자 발현 (inducible gene expression) 시스템인 유전자 스위치 (Gene Switch)를 이용하였다.

- [0032] 구체적으로, Art1 유전자가 결손된 Art1 RNAi 초파리 라인을 몸 전체에 Art1 유전자의 발현을 조절하는 da-GS-Gal4가 도입된 초파리와 교배하여, 형질전환 초파리(da-GS-Gal4/+>UAS-Art1 RNAi/+)를 제작한 후, 유전자 스위치를 활성화시키는 RU486(mifepristone; Sigma-Aldrich, 미국)이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 대조군 배지를 이용하여 성체 단계에서 Art1 유전자의 발현억제를 유도하였다. Art1 유전자의 발현량을 측정하기 위해 RNA를 추출한 후 cDNA를 합성한 후 Art1 프라이머를 이용하여 real time PCR을 수행하였다. 구체적으로, cDNA 합성은 RNAiso (Takara, 일본)을 이용하여 전체 RNA를 추출한 뒤, DNase I(Invitrogen, 미국)을 처리한 후 PrimeScript RT Reagent Kit (Takara, 일본)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA 1 μ l를 주형으로 하고, 하기 프라이머 및 Power SYBR Green (Applied Biosystems, 미국) PCR master mix를 이용하여 정량적 real time PCR을 수행하였다. PCR은 95 $^{\circ}$ C에서 10분 변성해 주고, 95 $^{\circ}$ C 15초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분의 조건으로 40 회전을 돌린 후, rp49 하우스키핑 유전자의 발현량을 기준으로 Art1의 mRNA의 양을 정량 비교분석하였다(도 1).
- [0033] 도 1은 RU486의 처리여부에 따른 Art1 유전자의 발현수준을 수컷 및 암컷 초파리를 대상으로 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1에서 보듯이, 나타난 바와 같이 da-GS-Gal4/+>UAS-Art1 RNAi/+ 에서 Art1 유전자의 발현이 억제됨을 확인하였다.
- [0034] Art1 정방향 프라이머: 5'-AGCGACCTTTTAACTAGCGTGCTG-3'(서열번호 2)
- [0035] Art1 역방향 프라이머: 5'-CGCGGGACGTCATCTCGTCG-3'(서열번호 3)
- [0036] 이때, 사용된 rp49 프라이머 쌍은 다음과 같다:
- [0037] 정방향 프라이머: 5'-ATGACCATCCGCCAGCATA-3'(서열번호 4)
- [0038] 역방향 프라이머: 5'-GAGAACGCAG GCGACCGTTGG-3'(서열번호 5)
- [0039] **실시예 2: Art1 유전자가 결손된 형질전환 초파리의 수명 측정**
- [0040] 상기 실시예 1에서 제작된 형질전환 초파리에서 Art1 유전자의 결손이 수명에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상기 형질전환 초파리 1000마리 3세트를 대상으로 수명을 측정하였다. 수명을 측정하는 방법으로는 RU486이 첨가된 배지와 첨가되지 않은 배지에서 상기 형질전환 초파리를 사육하고, 3일 간격으로 사체의 수를 계수하는 방법을 사용하였다(도 2a 및 2b).
- [0041] 도 2a는 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리의 수명을 측정한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 2b는 Art1 유전자가 결손된 수컷 형질전환 초파리의 수명을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2a에서 보듯이, 암컷 초파리에서는 Art1 유전자의 결손에 의하여 평균수명이 감소된 반면, 도 2b에서 보듯이, 수컷 초파리에서는 Art1 유전자가 결손되어도 평균수명이 감소되지 않음을 확인하였다.
- [0042] **실시예 3: Art1 유전자를 과발현시키는 형질전환 초파리의 제작**
- [0043] 본 발명자는 상기 실시예 2와의 비교 연구를 위해 Art1이 도입된 형질전환 초파리를 확립하고자 하였다. 먼저, pUAST-Art1이 도입된 형질전환 초파리를 제작하기 위해 Drosophila Genomics Resource Center로부터 초파리의 Art1에 해당하는 CG6554 유전자의 cDNA인 LD28808과 초파리 형질전환용 pUAST 전이백터를 제공받았다. 정제된 각 DNA를 NotI과 XhoI 제한효소로 절단한 후 삽입하여 발현백터 pUAS-Art1을 제조하고, 제조된 발현백터를 야생형 흰색 눈 초파리 w1118 (Bloomington Drosophila Stock Center)의 난막을 제거한 알 후미에 미세주입하여 형질전환 초파리를 수득하였다. 성체가 된 초파리를 다시 흰눈 초파리와 교배하여 붉은 눈의 표현형이 나타난 초파리를 선별하고 다시 자가교배하였다. 부화한 초파리를 대상으로 시퀀싱과 지노타이핑을 통해 Art1가 도입된 형질전환 초파리 라인을 선별하였다. 제작된 형질전환 초파리 UAS-Art1의 과발현을 유도하기 위해서 Gal4-UAS 시스템(Brand, A. and Perrimon, N. (1993) Development, 118: 401-415) 및 유도성 유전자 발현 (inducible gene expression) 시스템인 유전자 스위치 (Gene Switch)를 이용하였다. 성체단계에서 Art1의 발현을 유도하기 위해 드라이버 초파리(Bloomington Drosophila Stock Center)를 이용하였는데, 몸 전체에 발현하기 위해 da-GS-Gal4와 교배하여, Art1 유전자를 과발현시키는 형질전환 초파리(da-GS-Gal4/+>UAS-Art1/+)를 제작하였다.
- [0044] **실시예 4: Art1 유전자의 과발현이 스트레스 저항성에 미치는 효과 분석**
- [0045] 상기 실시예 2의 결과로부터, Art1 유전자가 결손된 암컷 초파리의 수명이 감소됨을 확인하였는데, 상기 수명의 감소는 외부 스트레스에 대한 저항성이 감소되어 유발된 것으로 예상되었으므로, Art1 유전자의 발현이 억제되거나 또는 과발현된 암컷 초파리가 외부 스트레스에 대하여 저항성이 증가되는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[0046] **실시예 4-1: 고온 스트레스 저항성**

[0047] 상기 실시예 1에서 제작한 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리(da-GS-Gal4/+>UAS-Art1 RNAi/+)와 실시예 3에서 제작한 Art1 유전자를 과발현시키는 암컷 형질전환 초파리(da-GS-Gal4/+>UAS-Art1/+)를 각각 RU486가 포함된 배지에서 10일 동안 사육하고, 20마리씩 5세트를 40℃ 고온 배양기에 넣은 후 10분 마다 고온에 의해 기절하는 초파리를 계수하고, 그 결과를 비교하였다(도 3a 및 3b).

[0048] 도 3a는 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리의 고온 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 3b는 Art1 유전자가 과발현된 암컷 형질전환 초파리의 고온 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3a 및 3b에서 보듯이, Art1 유전자의 결손 또는 과발현에 상관없이 고온 스트레스에 대하여 저항성이 증가됨을 확인하였다.

[0049] **실시예 4-2: 기아 스트레스 저항성**

[0050] 상기 실시예 1에서 제작한 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리(da-GS-Gal4/+>UAS-Art1 RNAi/+)와 실시예 3에서 제작한 Art1 유전자를 과발현시키는 암컷 형질전환 초파리(da-GS-Gal4/+>UAS-Art1/+)를 각각 RU486가 포함된 배지에서 10일 동안 사육하고, 먹이가 포함되지 않은 1% 아가(agar) 배지에서 사육하면서 3시간 마다 생존율을 측정하였다(도 3c 및 3d).

[0051] 도 3c는 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리의 기아 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 3d는 Art1 유전자가 과발현된 암컷 형질전환 초파리의 기아 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3c 및 3d에서 보듯이, Art1 유전자의 결손 또는 과발현에 상관없이 기아 스트레스에 대하여 저항성이 증가됨을 확인하였다.

[0052] **실시예 4-3: 산화 스트레스 저항성**

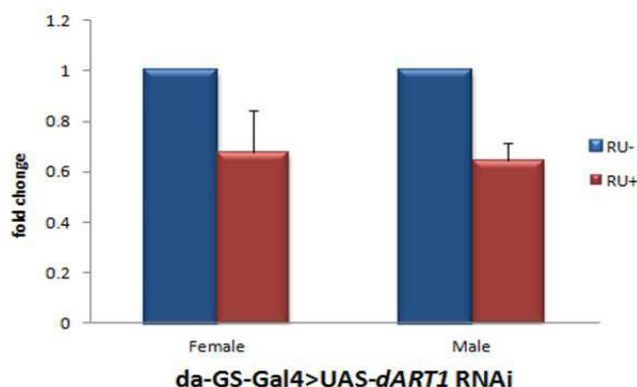
[0053] 상기 실시예 1에서 제작한 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리(da-GS-Gal4/+>UAS-Art1 RNAi/+)와 실시예 3에서 제작한 Art1 유전자를 과발현시키는 암컷 형질전환 초파리(da-GS-Gal4/+>UAS-Art1/+)를 각각 RU486가 포함된 배지에서 10일 동안 사육하고, 1% 아가(agar) 배지에서 6시간 동안 사육하여 단식시킨 후, 산화 스트레스를 유발하는 18mM 파라쿼트(paraquat, methyl viologen; Sigma-Aldrich, 미국)가 포함된 일반배지에서 사육하면서 3시간 마다 초파리의 생존율을 측정하고, 그 결과를 비교하였다(도 3e 및 3f).

[0054] 도 3e는 Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리의 산화 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 3f는 Art1 유전자가 과발현된 암컷 형질전환 초파리의 산화 스트레스에 대한 저항성을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3e 및 3f에서 보듯이, Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리는 산화스트레스에 대한 저항성이 감소한 반면, Art1 유전자가 과발현된 암컷 형질전환 초파리는 산화 스트레스에 대한 저항성이 증가함을 확인하였다.

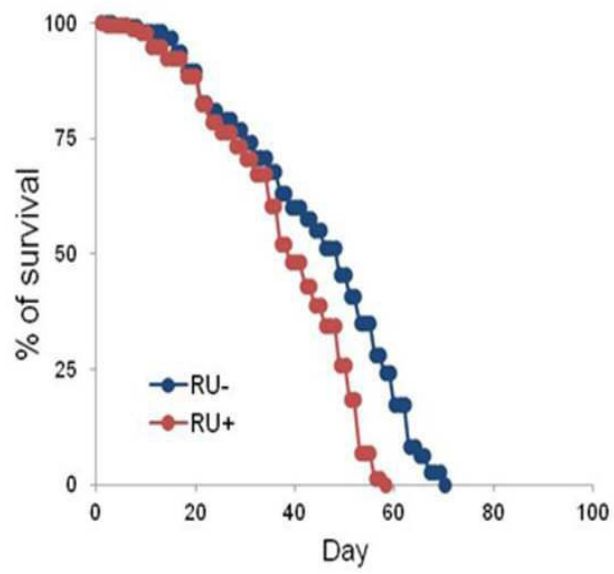
[0055] 따라서, Art1 유전자가 결손된 암컷 형질전환 초파리의 수명이 감소되는 원인은 산화 스트레스에 대한 저항성이 감소되기 때문인 것으로 분석되었다.

도면

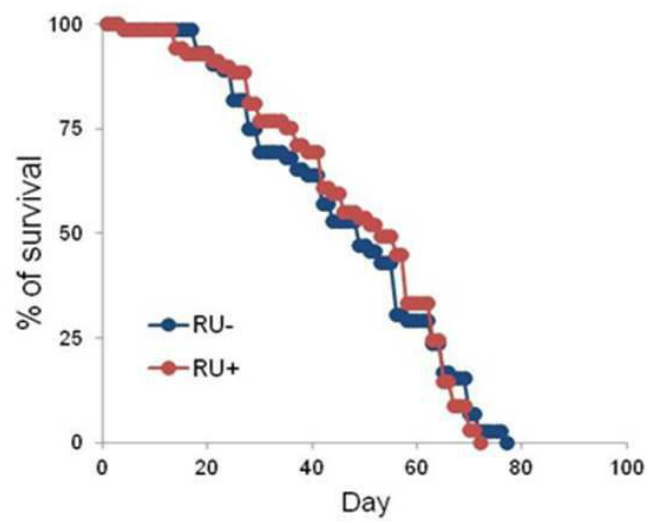
도면1



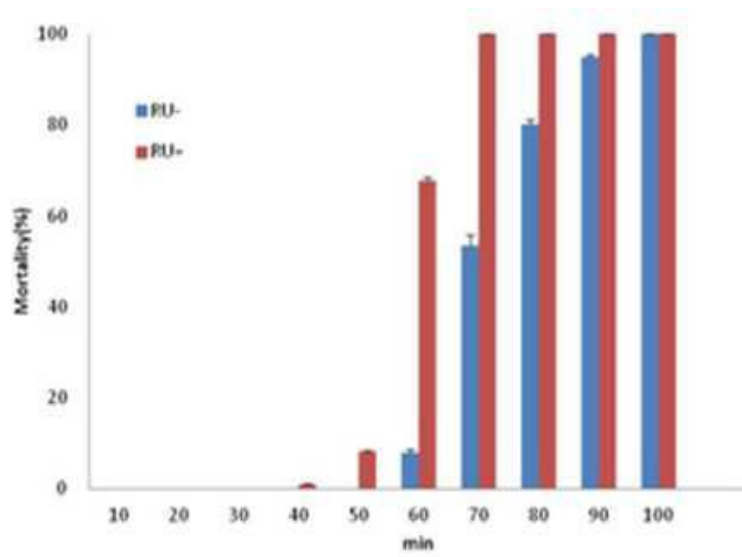
도면2a



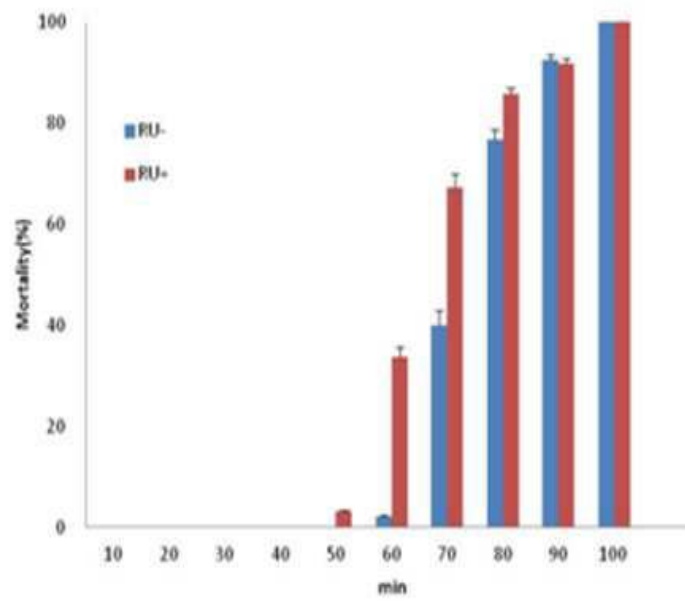
도면2b



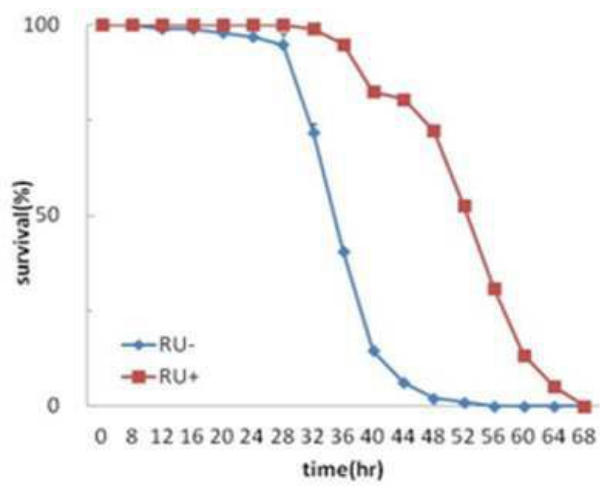
도면3a



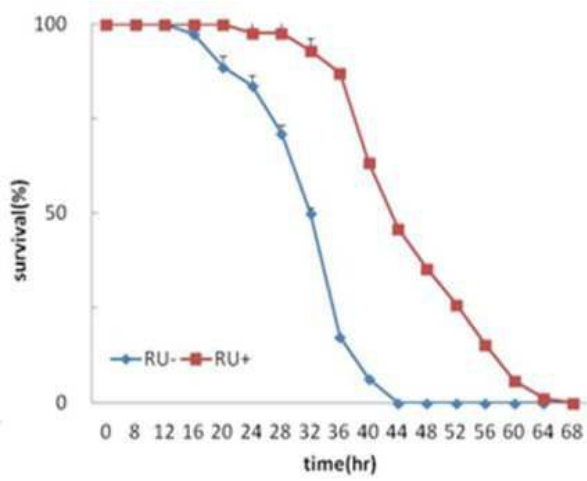
도면3b



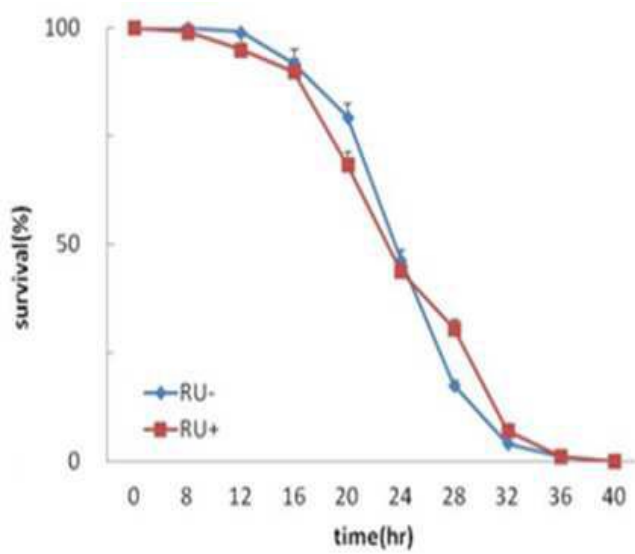
도면3c



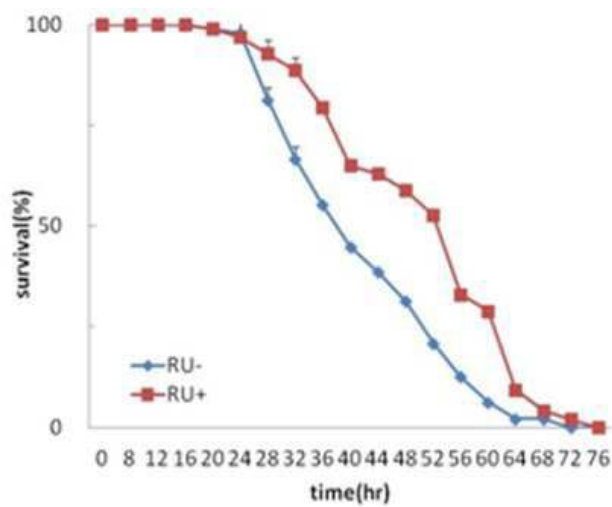
도면3d



도면3e



도면3f



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for regulating oxidative stress resistant of Drosophila
- <130> KPA151112-KR
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1746
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Recombinant Art1
- <400> 1

```

gggcagtgtt gataagcgac cttttaaaact agcgtgctgt agaaacagtc ccatcattta      60
gtcgccaatt ttctgacgtg aaaaacaaa gagacgccga agaaattaga aaatggtaag      120
ttttggtcaa aatgtgacgg caatcgacag gccagtagct gacgaaccgg attcgcaggc      180

cagcacagac attcccatgg aggcagctgt ggaatcggcg accggcatca cgcccaattc      240
aaatgcgaac tcaaacaatg tggcgaagaa gctgcccgcg gagggctcca ccggtgataa      300
tcccaatgcc aacgccgacg agatgacgtc ccgcgactat tactttgact cctatgccca      360
tttcgggata cagcaggaga tgctcaagga cgaagtgcgc accgtcacat accgcaacgc      420
catgtaccac aacaagcatt tgtttcaggg caaggtaggg ttaacttccg gggtttcccc      480
attttcgta gcccttctca ccggggatc tcctctttgc agaccgtact ggacgtgggt      540
tgcggtaccg gcattctctc catgttcgct gccaaagccg gtgctgtca ggtgattgcc      600

```

gtcgactgct ccaacatcat tgagtttgcc cgccaagtgg tcattgacaa caatctgcag 660
gatgtaatca cggttgtcaa gggcaagatt gaggagattg agcttcacaa tggatttag 720
ggagtggaca ttattatttc cgagtggatg gggtaggttt tcattttag ttaagctttt 780
aaaaagtgtt catatttgat ttagcatatt aaccatttta atttctttcc ttaatttagt 840
tactgcctgt tctacgaatc catgctggat acagtgttgt acgctcgga caagtggctg 900
aagaaggacg gcatgatgtt cccagatagg ggcacgtgt atatcacggc catcgaggac 960
agacagtaca aggacgagaa gatcaactgg tgggacgatg tctacggctt cgacatgagc 1020

tgcattcgta aggtggccgt gaccgagcca ctggtcgacg tggtcgatcc caagcaagtg 1080
glatccacat ctgcatggt caaggagggt gatctgtata ccgtgcaaaa ggccgatctt 1140
aacttctcgt ccaagttcag cctatgcac aagcgcaacg acttcgtgca ggcattagtc 1200
acctacttta atatagagtt caccaagtgc cacaagcgtc ttgggttcag tacgtcacca 1260
gactccacat acacgcattg gaagcaaacc gtgttctacc tcgatgacca catgacggca 1320
aagaagaacg aggagatcac tggcacgttc cagatgaagc ccaacgagcg gaacaaccgt 1380
gacctggact tcgtcatcga cattaatttc aaggcgcaat tgtctcaaat tcaggagtcg 1440

aacacatacc gcatgcgcta ggggcagcca taaccaatcc gatctgcat ttgggatggg 1500
gctcagagcc ctgcagcgag gatacatata atgactagac gtaaggttta ttccagtgcg 1560
aatgtgcaa cgaattcgtg ttgcgtcttc tctaagttt aaagtgtacc ttgttagta 1620
tacataatat ttacactcg tgcgcctgtt taaattatta ttcgaaacata cttctaagca 1680
agttgtacag cagcacgtca attctcacat aataaacagt gcactaagca cgtecccttt 1740
tgctgg 1746

<210> 2
<211> 25
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

agcgaccttt taaactagcg tgctg 25

<210> 3
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3
 cgcgggacgt catctcgtcg 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 atgaccatcc gccagcata 20

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 gagaacgcag gcgaccgttg g 21