(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0041903
(43) 공개일자 2009년04월29일

(51) Int. Cl.
C12N 15/64 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0107678
(22) 출원일자 2007년10월25일
심사청구일자 2007년10월25일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
박재용
경남 진주시 주약동 금호석류마을 아파트 105동 201호
황은미
경남 진주시 주약동 금호석류마을 아파트 105동 201호
홍성근
경남 진주시 평거동 326 평거주공1차 아파트 103동 204호
(74) 대리인
이문섭, 양부현, 윤여강

전체 청구항 수 : 총 10 항

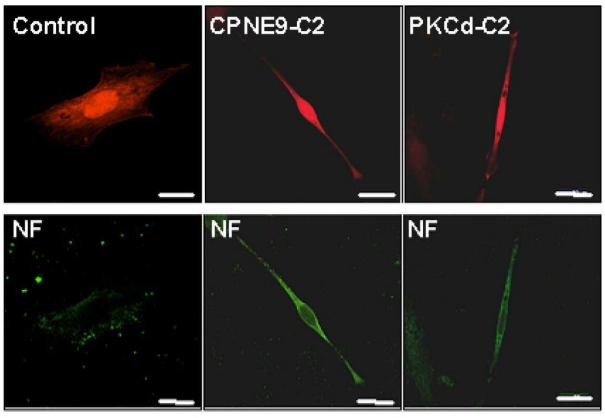
(54) 유전자의 고속 기능분석을 위한 붉은형광단백질 융합단백질 생산용 벡터

(57) 요 약

본 발명은 CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 사이트가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R) 및 자살 ccdB 박스가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트 또는 attR2 부위의 3' 방향에 붉은 형광 단백질이 위치하는 것을 특징으로 하는 데스티네이션 벡터(Destination Vector)에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, cDNA에서 특정 유전자 또는 특정 도메인을 선택적으로 데스티네이션 벡터에 삽입하여 발현 클론(expression clone)을 생산하고, 생산된 발현 클론을 이용하여 특정 유전자의 기능을 세포 내에서 쉽게 관찰할 수 있으므로 총체적(high throughputly, HTP)으로 유전체 내에 보존된 동종의 기능을 수행하는 유전자들의 세포 내에서 역할을 고속으로 탐지할 수 있다.

대 표 도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 사이트가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R) 및 자살 ccdB 박스가 위치하고, 상기 attR2 부위의 3' 방향에 붉은 형광 단백질(RFP) 유전자가 위치하는 것을 특징으로 하는 도 1의 개열지도를 갖는 데스티네이션 벡터(Destination Vector).

청구항 2

CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 사이트가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 붉은 형광 단백질(RFP) 유전자가 위치하고, 상기 붉은 형광 단백질 유전자의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R) 및 자살 ccdB 박스가 위치하는 것을 특징으로 하는 도 3의 개열지도를 갖는 데스티네이션 벡터(Destination Vector).

청구항 3

제1항의 데스티네이션 벡터(Destination Vector)의 attR1 부위 및 attR2 부위 사이의 부위가 LR 재조합 반응에 의해 attL1 부위, C2 도메인, 및 attL2 부위로 치환된 것을 특징으로 하는 익스프레션 클론(expression clone).

청구항 4

제2항의 데스티네이션 벡터(Destination Vector)의 attR1 부위 및 attR2 부위 사이의 부위가 LR 재조합 반응에 의해 치환되어 attL1 부위, C2 도메인, 및 attL2 부위인 것을 특징으로 하는 익스프레션 클론(expression clone).

청구항 5

서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 프라이머들(primers)을 포함하는 단백질인산화효소δ(PKCδ)-C2 도메인 유전자의 도너 벡터(doner vector) 결합용 PCR 산물을 만들기 위한 프라이머 세트.

청구항 6

서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열을 갖는 프라이머들(primers)을 포함하는 코핀9단백질(CPNE9)-C2 도메인 유전자의 도너 벡터(doner vector) 결합용 PCR 산물을 만들기 위한 프라이머 세트.

청구항 7

서열번호 5의 아미노산 서열을 코딩하는 C2 도메인 유전자 또는 그 발현 펩타이드를 함유하는 신경세포 분화용 조성물.

청구항 8

서열번호 6의 아미노산 서열을 코딩하는 C2 도메인 유전자 또는 그 발현 펩타이드를 함유하는 신경세포 분화용 조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 C2 도메인 유전자는 동물세포 형질전환용 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 신경세포 분화용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 동물세포 형질전환용 발현벡터는 제1항 또는 제2항의 데스티네이션 벡터(Destination Vector)인 것을 특징으로 하는 신경세포 분화용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 유전자의 고속 기능분석을 위한 붉은형광단백질 융합 단백질 생산용 벡터와 이를 함유한 신경세포 분화용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 부위가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R) 및 자살 ccdB 박스가 위치하고, 상기 멀티클로닝 사이트 또는 attR2 부위의 3' 방향에 붉은 형광 단백질이 위치하는 것을 특징으로 하는 데스티네이션 벡터(Destination Vector)에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 게놈 프로젝트 이후 유전자의 기능을 분석함에 있어서, 유전체 범위의 규모로 총체적인(high throughput, HTP) 방법에 의해 분석을 수행하는 방법이 중요하게 부각되고 있다. 그러나 총체적 분석방법론에 대한 현재의 기술은 분석해야 하는 세포에 대해 제한된 범위의 표현형 분석만을 허용한다. 즉 지난 10년에 걸쳐 유전체(genome) 서열분석에 있어서 급격한 진보는 엄청난 수의 유전자 동정을 가능하게 하였고, 유전체 범위에서 총체적인 분석을 수행하기 위하여 기능적으로 정의된 요소들의 목록을 창조하고 적용하는 것을 가능하게 했지만(Gibbs et al., 2004; Waterston et al., 2002), 여전히 최근에 유용한 유전체 서열들로부터 예상되는 대부분의 유전자는 기능적으로 특정되지 않은 채 남아있다. 유전체 범위의 분석에 있어서 하나의 필수적인 단계는 역 단백질체학적 접근(reverse proteomics approaches)을 사용한 고분자 결합 및 생화학적 반응의 조직적인 지도화이다(Walhout and Vidal, 2001).

<3> 그러나 역 단백질체학적 프로젝트(Reverse proteomics projects)는 오픈 리딩 프레임(open reading frames, ORFs), 또는 단백질 암호화 서열에 대해 다수의 조작 및 클로닝을 필요로 한다. 최근에는 실험관 내에서 유전자 재조합을 수행하는 클로닝 시스템이 개발되었고, 상기 시스템을 이용하여 인간 유전체에 대해 총체적인(high throughput, HTP) 클로닝을 수행할 수도 있다(Hartley et al., 2000; Siegel et al., 2004). 게이트웨이 클로닝 기술(gateway cloning technology, GCT)은 복제를 위해 실험관 내의 위치 특이적 유전자 재조합을 사용하고, 벡터 골격 사이에 DNA 단편을 순차적으로 전달하는 하나의 시스템이다(Hartley et al., 2000). 이 시스템은 양 끝에 attB1 및 attB2의 유전자 재조합 장소를 갖는 단편을 PCR 반응을 수행하여 준비하는 과정과 상기 준비된 PCR 결과물을 BP 클로네이즈(BP clonase)를 처리하는 실험관 내 유전자 재조합 반응을 수행하여 attP1 및 attP2의 유전자 재조합 장소를 갖는 도너 벡터(donor vector)로 도입하는 과정으로 이루어진다. 차례로, 소위 엔트리 클론(entry clones)이라고 하는 마스터 벡터(master vectors)가 생산되는데, 이는 attL1 및 attL2의 유전자 재조합 장소를 갖는 중요한 절편을 포함한다. 이 시스템은 여러 인간, 생쥐, 및 쥐 유전자(http://mgc.nci.nih.gov)들은 물론 개구리(Xenopus, http://xgc.nci.hih.gov) 및 제브라피시(zebrafish, http://xgc.nci.nih.gov)들과 같은 생물의 대량 복제 클론을 생산하는데 사용되었다. 또한 어떤 전장 복제(full-length clones)들에 대해서도 게이트웨이 클로닝 기술을 사용하여 엔트리 벡터를 생성한 바 있다. 더욱이 8,076개의 인간 ORF를 포함하는 인간 오페옴(ORFeome)의 최초 버전은 게이트웨이 클로닝 기술을 사용하여 최근 생성된 것이다(Rual et al., 2004).

<4> 120개 이상의 아미노산의 보존된 단백질 모듈인 C2 도메인은 PKC(단백질 인산화효소 C)의 C2 조절부위와 동일한 것으로 최초에 정의되었다(Newton and Johnson, 1998). 상기 도메인은 현재 진핵세포의 수많은 신호전달 단백질, 인산화 효소, GTP 분해효소 활성 단백질(GTPase-activating proteins), 유비퀴틴화 효소(ubiquitination enzymes), 및 소포체 이동에 관여하는 단백질들에 존재하는 것으로 알려졌다. 더구나 최근에는 빈즈(Benes et al.2005)가 PKCδ의 C2 도메인이 직접 인산화 티로신(phosphotyrosine)에 결합할 수 있다고 제시했다. 코핀 9(Copine 9, CPNE9)은 편재하는 칼슘 의존 인지질 결합 단백질(Ca^{2+}-dependent phospholipidbinding proteins)의 새로운 패밀리인 코핀 패밀리에 속하며 최근에 클로닝 되었다(Xie et al., 2004). 신경세포 분화에 있어 코핀 9의 역할은 아직 설명되지 않았다.

<5> 현재 게이트웨이 클로닝 기술을 사용하여 특정 유전자의 유전체 범위내에서 기능 분석을 한 사례는 드물며, 또한 C2 도메인에 대해서 HTP 게이트웨이 클로닝 기술을 수행하여 C2 도메인의 신경세포의 분화 촉진기능을 밝혀

낸 사례는 보고된 적이 없다. 또한 게이트웨이 클로닝 기술이 다-유전자 클로닝(multi-gene cloning)에 효과적 수단임에도 불구하고, 형광 단백질로 표지된 실질적인 발현 벡터는 상업적으로 이용되지 않았으며, 붉은형광단백질로 표지된 게이트웨이용 발현 벡터는 현재 보고된 바 없다. 또한 상기 게이트웨이 클로닝 기술을 수행하여 관심유전자(gene of interest)에 대한 엔트리 클론을 제작하는 과정은 서열 특이적 프라이머를 생산하여 특정 염기서열 부분을 갖는 PCR 생성물을 생산하는 단계를 포함하는데, 실제 우리가 원하는 관심유전자가 발현벡터로 도입되었는지의 여부는 PCR 프라이머를 고안하는 단계에서 결정된다고 할 수 있다. 특히 PCR 프라이머를 엄격하게 디자인하는 경우 관심유전자들이 발현 벡터에 거의 도입되지 않을 수 있으며, 반대로 PCR 프라이머를 유연하게 디자인 하는 경우 원치 않은 유전자들이 발현 벡터에 도입 될 수 있는 단점이 있다.

<6> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에서는 인간 C2도메인에 대한 서열 특이적 프라이머를 새롭게 디자인하여 게이트웨이 클로닝 기술을 수행하였고, C2도메인을 포함한 붉은 형광 단백질로 표지된 단백질을 발현하는 발현 클론을 신규하게 생산한 후 이를 해마전구세포에 도입하여 C2 도메인의 역할을 총체적으로 분석하였다. 본 발명에서 60개의 대표 인간 C2 도메인을 포함하는 붉은 형광 단백질을 표지한 발현 클론을 해마전구세포에 총체적으로 도입하였고, 60개의 대표 인간 C2 도메인 중에서 선택된 두개의 C2도메인(PKCδ-C2 및 CPNE9-C239)이 신경세포의 분화를 촉진함을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 게이트웨이 클로닝 기술을 이용하여 고속으로 형질도입 할 수 있고, 유전체의 총체적인 분석을 쉽게 수행할 수 있는 붉은형광단백질 융합 단백질 생산용 벡터를 제공하는 데 있다.

<8> 본 발명의 다른 목적은 붉은형광단백질로 표지된 C2 도메인 유전자 또는 그 발현 펩타이드를 함유하는 신경세포 분화용 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

<9> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 사이트가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R) 및 자살 ccdB 박스가 위치하고, 상기 attR2 부위의 3' 방향에 붉은 형광 단백질(RFP) 유전자가 위치하는 것을 특징으로 하는 도 1의 개열지도를 갖는 데스티네이션 벡터(Destination Vector)를 제공한다. 본 발명의 데스티네이션 벡터는 발현에 필요한 서열인 프로모터, 항생제 저항 유전자(예를 들면 CM^R유전자)서열, attR1 및 attR2서열, 및 ccdB 서열 정보를 모두 포함하는 벡터로서 attR1 및 attR2 서열 특이적 유전자 재조합 반응을 수행하여 용이하게 형질도입을 수행할 수 있는 벡터이다. 상기 데스티네이션 벡터의 특성상 발현되는 단백질은 C' 방향에 붉은형광단백질로 표지된다. 또한 본 발명의 항생제 저항 유전자는 데스티네이션 벡터의 세포내 도입을 스크린 할 수 있는 특정 항생제에 내성을 보이는 어떠한 항생제 저항 유전자도 될 수 있다.

<10> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 사이트가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 붉은 형광 단백질(RFP) 유전자가 위치하고, 상기 붉은 형광 단백질 유전자의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R) 및 자살 ccdB 박스가 위치하는 것을 특징으로 하는 도 3의 개열지도를 갖는 데스티네이션 벡터(Destination Vector)를 제공한다. 상기 데스티네이션 벡터의 특성상 발현되는 단백질은 N' 방향에 붉은형광단백질로 표지된다. 또한 본 발명의 항생제 저항 유전자는 데스티네이션 벡터의 세포내 도입을 스크린 할 수 있는 특정 항생제에 내성을 보이는 어떠한 항생제 저항 유전자도 될 수 있다.

<11> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 사이트가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R, CAT gene, chloramphenicol acetyl transferase) 및 자살 ccdB 박스가 위치하고, 상기 attR2 부위의 3' 방향에 붉은 형광 단백질 유전자가 위치하는 것을 특징으로 하는 도 1의 개열지도를 갖는 데스티네이션 벡터(Destination Vector)의 attR1 부위 및 attR2 부위 사이의 부위가 LR 재조합 반응에 의

해 attL1 부위, C2 도메인, 및 attL2 부위로 치환된 것을 특징으로 하는 익스프레션 클론(expression clone)을 제공한다. 본 발명의 상기 LR 재조합 반응은 박테리오 파지 λ의 단백질인 Xis 단백질 및 인터그라제(Integrase)와 대장균 단백질 IHF(Integration Host Factor)를 포함한 효소 혼합물을 처리하여 각각 attR 부위와 attL 부위 사이에서 크로스오버(cross-over)가 일어나 관심유전자를 데스티네이션 벡터로 치환하여 형질도입시키는 반응이다.

<12> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 사이트가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 붉은 형광 단백질 유전자가 위치하고, 상기 붉은 형광 단백질 유전자의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R) 및 자살 ccdB 박스가 위치하는 것을 특징으로 하는 도 3의 개열지도를 갖는 데스티네이션 벡터(Destination Vector)의 attR1 부위 및 attR2 부위 사이의 부위가 LR 재조합 반응에 의해 attL1 부위, C2 도메인, 및 attL2 부위로 치환된 것을 특징으로 하는 익스프레션 클론(expression clone)을 제공한다.

<13> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 갖는 프라이머들(primers)을 포함하는 단백질인산화효소δ(PKCδ)-C2 도메인 유전자의 도너 벡터(doner vector) 결합용 PCR 산물을 만들기 위한 프라이머 세트를 제공한다. 본 발명의 상기 프라이머 세트는 attB1 서열, 코작 서열(Kozak sequence) 및 시작 코돈 서열(진한 표시), 및 단백질인산화효소δ(PKCδ)-C2 도메인 유전자 특이적 서열을 암호화하는 부위로 구성된 5' 프라이머, 및 attB2, 종결코돈 및 단백질인산화효소δ(PKCδ)-C2 도메인 유전자 특이적 서열을 암호화한 부위로 구성된 3' 프라이머로 이루어진 세트이다.

<14> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열을 갖는 프라이머들(primers)을 포함하는 코핀9단백질(CPNE9)-C2 도메인 유전자의 도너 벡터(doner vector) 결합용 PCR 산물을 만들기 위한 프라이머 세트를 제공한다. 본 발명의 상기 프라이머 세트는 attB1 서열, 코작 서열(Kozak sequence) 및 시작 코돈 서열(진한 표시), 및 코핀9단백질(CPNE9)-C2 도메인 유전자 특이적 서열을 암호화하는 부위로 구성된 5' 프라이머, 및 attB2, 종결코돈 및 코핀9단백질(CPNE9)-C2 도메인 유전자 특이적 서열을 암호화한 부위로 구성된 3' 프라이머로 이루어진 세트이다.

<15> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 5 또는 서열번호 6의 아미노산 서열을 코딩하는 C2 도메인 유전자 또는 그 발현 펩타이드를 함유하는 신경세포 분화용 조성물을 제공한다. 본 발명의 실시예 4에서는 C2 도메인이 도입된 발현 클론을 신경전구세포(ex. HiB5)에 형질 도입하여 신경돌기가 신장된 신경세포로 분화함을 증명하였다. 본 발명의 상기 서열번호 5의 아미노산은 PKCδ-C2(단백질인산화효소 Cδ의 C2 도메인)로서 PKCδ 단백질의 Ca^{++} 결합 도메인에서 유래하였으며, 상기 서열번호 6의 아미노산은 칼슘 의존 인지질 결합 단백질(Ca^{2+}-dependent phospholipidbinding proteins)의 새로운 패밀리인 코핀 패밀리에 속하는 코핀 9(Copine 9, CPNE9)단백질의 Ca^{++} 결합 도메인에서 유래하였다. 본 발명의 상기 발현벡터는 상기 C2 도메인을 발현시킬 수 있는 프로모터와 클로닝을 위한 멀티클로닝사이트를 가지고 있는 어떤 발현벡터도 사용할 수 있으나, 바람직하게는 동물세포 형질전환용 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하며, 더욱 바람직하게는 도 1 또는 도 3의 개열지도를 갖는 데스티네이션 벡터(Destination Vector)의 attR1 부위 및 attR2 부위 사이에 삽입되는 것을 특징으로 한다.

<16> 이하, 본 발명의 데스티네이션 벡터를 생산하는 방법과 익스프레션 클론을 생산하는 방법인 게이트웨이 클로닝 기술(Gateway Cloning Technology)을 단계별로 보다 구체적으로 설명한다.

<17> 게이트웨이 클로닝 기술은 대장균 염색체의 DNA로 도입될 수 있는 박테리오 파지 λ의 위치 특이적 유전자 재조합 시스템에 기원한다. 각각 대장균은 attP, 박테리오 파지 λ는 attB의 유전자 재조합 부위를 가진다. 유전자 도입과정(lysogeny)은 두개의 효소에 의해 수행되는데 인터그라제(Integrase)는 박테리오 파지 λ에, 대장균 단백질 IHF(Integration Host Factor)는 대장균 염색체에 코딩된다. 도입(integration)시 attB와 attP 사이의 유전자 재조합은 박테리오 파지 λ DNA의 양쪽 측면에 attL(100nt)과 attR(168nt)를 생성시킨다. 상기 과정은 가역적이며, 이탈(Excision) 또한 박테리오 파지 λ의 단백질인 Xis 단백질과 함께 인터그라제 및 IHF에 의해서 일어난다.

<18> 게이트웨이 반응(Gateway Reaction)의 궁극적인 목표는 발현클론을 만드는 것이다. 이것은 2단계로 나누어진다. 1단계는 BP 반응을 수행하여 엔트리 벡터로 관심유전자(gene of interest)를 도입하는 단계이고, 2단계는 엔트리 클론과 데스티네이션 벡터로 LR 반응을 수행하여 관심유전자를 데스티네이션 벡터로 서브클로닝(Subclonin

g)하고 발현클론을 생산하는 단계이다. 상기 엔트리 클론은 전사를 할 수 없기 때문에 엔트리 클론에 도입된 관심유전자가 발현되기 위해서는 발현에 필요한 서열, 항생제 저항 유전자(예를 들면 CM^R)서열, attR1 및 attR2서열, 및 ccdB 서열 정보를 모두 포함하는 데스티네이션 벡터로 서브클로닝 하여야 한다. 엔트리 클론과 데스티네이션 벡터는 LR 클로네이즈 효소 혼합물(LR clonase enzyme Mix)을 처리하여 반응을 수행하는데 이 반응은 특이적이고 일방향의 반응이다. 즉 각각 attL1은 attR1과 attL2는 attR2과 반응한다. 유전자 재조합의 LR 반응은 의도한 발현클론과 부산물인 도너 벡터(Donor Vector)를 생성한다. 생성된 발현 클론은 항생제 내성(Kan^r, positive selection) 및 유독 ccdB 단백질(negative selection)에 의해 선별할 수 있다. 게이트웨이 클로닝의 결과 99% 이상의 높은 수준의 양성클론(positive clone)이 생성된다. 게이트웨이 클로닝 기술의 주요 장점 중의 하나는 엔트리 클론을 한번 생산하면, LR 반응을 수행하여 관심유전자를 쉽게 다양한 종류의 데스티네이션 벡터 중 하나에 서브클로닝할 수 있기 때문에 유전자의 기능에 대해 총체적인 분석이 가능하다는 점이다.

<19> 본 발명에서는 붉은 형광 리포터 단백질(red fluorescent reporter protein, RFP)유전자로 표지한 두개의 총체적 최적화 발현 벡터(HTP-optimized expression vectors)를 제작하였다. 이들 벡터는 게이트웨이 클로닝 기술(gateway cloning technology, GCT)을 사용한 복합적 발현 시스템(multiple expression system)에 있어서 붉은 형광 단백질로 표지된 표적 단백질을 생산한다. 붉은 형광 단백질 표지는 복제된 유전자와 융합되고, 포유류 세포에서 발현된 단백질을 집중 분석하는 것을 허용한다. 상기 벡터의 유용성을 붉은 형광 단백질-스크리닝 시스템(HTP-screening system)을 사용하여 평가하였다. 60개의 대표 인간 C2 도메인을 붉은 형광 단백질로 표지하였고, HiB5 신경전구세포(neuronal progenitor cells; Ronald D.G. McKay et al., Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain, Cell. 1991 Aug 23;66(4):713-29.)에서 과발현시켰고 HiB5 세포의 신경분화를 촉진하는 2개의 C2도메인을 상세하게 분석하였다. 본 발명에서 개발된 유전체 범위 규모의 붉은 형광 단백질-스크리닝 시스템(HTP-screening system)을 이용하여 얻어낸 발현벡터는 유전자의 기능 분석에 있어서 유용함을 보여주었다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<20> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<21> **실시예 1. 게이트웨이 데스티네이션 벡터(gateway destination vectors)의 제작**

<22> pDsRed-Monomer-N1 벡터(Clontech 사)를 도 1의 데스티네이션 벡터(pDEST-N-RFP 벡터)에 대한 기본 벡터로 사용하였다. 상기 데스티네이션 벡터(pDEST-N-RFP 벡터)는 RFP 단백질 유전자의 5' 방향에 관심 유전자가 도입되어 발현시 RFP 단백질의 N' 방향에 관심유전자의 단백질이 연결되어 발현되는 것을 특징으로 하는 벡터이다. ccdB 유전자, 클로르암페니콜(CM) 아세틸 트랜스퍼라제(CAT) 유전자, 및 attR 부위를 포함하는 자살 ccdB 박스(Bernard and Couturier 1992)를 주형으로 제공하는 pDEST 15 벡터(Invitrogen 사)를 PCR 반응으로 증폭시켰는데, 사용된 PCR 프라이머는 5' 프라이머로 BamHI 및 3' 프라이머로 BglII 부위(각각 5'-GGG**GGATCC**CCACAAGTTTGTACAAAAAAGC-3' 및 5'-GGG**TGATCA**ACCACTTTGTACAAGAAAGC-3)를 각각 갖는다. PCR 결과물을 BamHI 및 BglII 제한효소를 이용하여 절단하였고, pDsRed-Monomer N1 벡터에 BamHI 제한효소를 처리한 후, 각각의 절편을 리가아제(lygase)로 접합하였다. 그 결과 pDsRed-Monomer-N1 벡터의 BamHI 부위에 자살 ccdB 박스가 도입되어 데스티네이션 벡터(pDEST-N-RFP 벡터)를 생산하였다. 여기서 BamHI 제한효소는 G gatcc 서열을 인식하고 BglII 제한효소는 A gatct 서열을 인식하기 때문에 각각 효소 처리후 다시 접합하면 G gatct 서열이 생성되어 BamHI 및 BglII 제한효소로 자를 수 없는 염기서열로 바뀌게 된다. 따라서 생산된 데스티네이션 벡터는 모벡터의 BamHI 및 BglII 제한효소 사이트를 그대로 사용할 수 있는 장점을 갖는다. 상기 과정은 도 2의 모식도에 나타내었다.

<23> pDEST-RFP-C 벡터(도 3)는 pEGFP-C1(Clontech 사) 벡터를 기본 벡터로 사용하였다. pDsRed-Monomer-N1 벡터를 주형으로 하여 5' 프라이머에 AgeI 및 3' 프라이머에 BamHI 부위(5'-GGG**ACCGGT**CGCCACCATGGACAACACCGAGG-3' 및 5'-GGG**GGATCC**GGACTGGGAGCCGGAGTGGCG-3')를 각각 갖는 프라이머를 사용하여 PCR 반응을 수행하였고 DsRed-Monomer 유전자를 포함하는 PCR 산물을 생산하였다. 또한 자살 ccdB box를 상기 pDEST15 벡터에서 증폭하였는데 5' 프라이머로 BamHI 및 3' 프라이머에 BglII 부위(각각 5'-GGG**AGATCT**AACAAGTTTGTACAAAAAAGC-3' 및 5'-GGG**GGATCCTCA**AACCACTTTGTACAAGAAAGC-3)를 각각 사용하였다. 볼드체의 밑줄 그어진 종결 코돈을 불필요한 아미노산의 표지를 방지하기 위하여 3' 프라이머에 부가했다. DsRed-Monomer 유전자를 포함하는 PCR 산물을 AgeI 및 BamHI의 제한효소로 절단하였고, 자살 ccdB box 유전자를 포함하는 PCR 산물을 BamHI 및 BglII의 제한효소로

절단하였다. 상기 제한효소를 처리하여 생산된 PCR 산물의 절편을 기본 벡터인 pEGFP-C1 벡터의 AgeI 및 멀티 클로닝 사이트 내에 위치한 BamHI 부위에 도입하여 데스티네이션 벡터(pDEST-RFP-C, 도 3)를 생산하였다. 상기 데스티네이션 벡터(pDEST-RFP-C)는 RFP 단백질 유전자의 3' 방향에 관심 유전자가 도입되어 발현시 RFP 단백질의 C' 방향에 관심유전자 단백질이 연결되어 발현되는 것을 특징으로 하는 벡터이다. 이 때 BamHI 제한효소는 G gatcc 서열을 인식하고 BglII 제한효소는 A gatct 서열을 인식하기 때문에 각각 효소 처리후 다시 접합하면 G gatct 서열이 생성되어 BamHI 및 BglII 제한효소로 자를 수 없는 염기서열로 바뀌게 된다. 결국 기본 벡터의 AgeI 부위와 DsRed-Monomer 유전자를 포함하는 PCR 산물의 AgeI 부위가 접합되며, 기본 벡터의 BamHI 부위와 자살 ccdB box 유전자를 포함하는 PCR 산물의 BamHI 또는 BglII의 제한효소 부위가 접합되고, DsRed-Monomer 유전자를 포함하는 PCR 산물의 BamHI 부위와 자살 ccdB box 유전자를 포함하는 PCR 산물의 BamHI 또는 BglII의 제한효소 부위가 접합된다. 상기 과정은 도 4에 도식화 하였다.

<24> **실시예 2. 붉은 형광 단백질 융합된 C2 도메인이 도입된 발현 벡터의 제작**

<25> 본 발명의 새로운 붉은 형광 단백질 표지된 발현 벡터를 GCT 플라스미드 시리즈(Invitrogen)를 사용한 유전자재조합에 기초한 클로닝에 근거하기로 결정했다. 게이트웨이 클로닝 기술(GCT)은 원하는 발현 벡터를 생산하기위해 소위 엔트리 벡터(entry vector, pENTR)에 부위 특이적 유전자 재조합 반응을 이용하는데, 그 후 원하는 유전자를 클로닝 하기위해 소위 데스티네이션 벡터(destination vector, pDEST)로 재조합 된다. 상기 클로닝 시스템을 이용하면 하나의 공정으로 여러 관심유전자를 포함하는 각각의 발현벡터를 쉽게 생산할 수 있다. 본 발명에서는 자살 ccdB 박스와 결합된 붉은 형광 단백질을 포함하는 데스티네이션 벡터를 고안했다. 우리가 개발한 데스티네이션 벡터에 사용되는 붉은 형광 단백질(DsRed-Monomer 단백질)을 암호화하는 유전자는 pDsRed-Monomer 유전자인데(도 1 및 도 3), 이 리포터 단백질은 디스코소마 스포.(*Discosoma sp.*)의 사합체(tetrameric) 붉은 형광 단백질 DsRed에서 유래한 단위체 돌연변이 단백질이다(Matz et al., 1999). 원하는 유전자를 포한한 엔트리 벡터로 게이트웨이 유전자재조합 반응을 수행하여, 사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus)의 초기(immediate-early) 프로모터 아래에 붉은 형광 단백질을 발현하는 새로운 데스티네이션 벡터를 생산하였다.

<26> 인간 C2 도메인의 엔트리 클론은 다음과 같이 제작하였다. 처음에 Pfam(www.sanger.ac.uk/Software/Pfam) 및 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)의 데이터 베이스에서 나열된 250개의 단백질에서 보존된 부위를 갖는 175개의 공표된 C2 도메인을 동정하였다. 인간 C2 도메인 유전자를 얻기 위하여 역전사 PCR(reverse transcription-PCR)반응을 수행하였다. 인간 뇌조직, 태반 조직, 및 HeLa 세포에서 분리된 전체 RNA를 프로토콜에 따라 TRIZOL(Invitrogen, CA) 키트를 사용하여 분리하였고, 분리된 혼합 RNA 1 μg을 슈퍼스크립트II RT(SuperScript II RT, Invitrogen)를 사용하여 랜덤 헥사머(50 pmol), dNTPs (1 mM), 42° C의 조건에서 1 시간 동안 역전사 반응을 수행 하였다. 역전사 반응에서 생성된 cDNA를 하이 PCR 프리믹스(HiPi PCR premix, Elpis-Biotech, Korea)를 사용하여 PCR 기기((GeneAmp 2400, Perkin Elmer, MA))에서 증폭시켰다. PCR 반응을 수행할 때, 인간 C2 도메인을 표적 서열 특이적 attB1/attB2 프라이머를 사용하여 상보 DNA(cDNA)로부터 PCR 증폭하였다. 5' 프라이머는 코작 서열(Kozak sequence), 시작 코돈 서열(진한 표시)과 attB1 서열(밑줄 표시)로 구성하였다 (5' -GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT**CCACCATG**-[유전자 특이적 20-25 서열]-3'). 또한 3' 프라이머는 5' -GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT**TTA**-[유전자 특이적 20-25 서열]-3' 로 구성하였다. 밑줄 친 attB2 서열을 진한 표시의 마지막 종결 코돈 바로 뒤에 도입하였으므로 attB1과 attB2 사이에 도입된 C2 유전자가 ORF를 형성하게 된다. 상기 프라이머는 하기 표 1에 나타내었는데 소문자로 표시된 부분이 목표 유전자에 대한 상보적인 서열이다.

<27> [표 1]

목적유전자	프라이머	염기서열
PKCδ-C2	5' 프라이머 (서열번호 1)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAC CATG- gcgccgttcctgcgcatcgc
	3' 프라이머 (서열번호 2)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTA- ctccaggaaatactgaacagaca
CPNE9-C2	5' 프라이머 (서열번호 3)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCAC CATG-gccatgtctctcggcgga
	3' 프라이머 (서열번호 4)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTA- acccgtgagggttcgctctac

<28>

<29> 상기 프라이머로 PCR 반응을 수행하여 인간 C2 도메인 유전자를 포함하는 PCR 생성물을 생산하였다. 이 때 PCR 반응 조건은 변형(denaturation): 94° C, 30초; 어닐링(annealing): 57° C, 30초; 신장(extension): 72° C, 45초로 하여 25사이클을 반복 수행하였고, 증폭후 2% 아가로스 겔에서 전기영동 한 후 EtBr로 착색하여 관찰하였다. PCR 결과 생성된 재조합 DNA를 pDONR207 도너 벡터(Invitrogen)에 도입하였고, 그 결과 생성된 엔트리 벡터로 삽입된 C2 도메인의 염기서열을 확인하여 목적 C2 도메인의 염기서열과 일치함을 검증하였다(Macrogen Inc.). 150개의 인간 C2 도메인이 도입된 엔트리 벡터를 게이트웨이 클로닝 기술(gateway cloning technology, GCT)의 BP 반응을 수행하여 생성하였다. 이들로부터 무작위로 60개의 엔트리 클론을 선택하였고 이들을 게이트웨이 클로닝 기술의 LR 반응을 경유하여 데스티네이션 벡터(pDEST-RFP-C)로 도입하였다.

<30> **실시예 3. 세포 배양, 총체적 형질도입, 및 아데노바이러스 감염**

<31> 무한 증식의 특성이 있는 HiB5 세포주를 0.11 mg/ml 나트륨 피루베이트, 7 mg/ml NaHCO3, 50 U/ml 페니실린, 50㎍/ml 스트렙토마이신, 및 10% 태아 소 혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함유한 둘베코 이글베지(Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM)에서 33° C 및 5% CO_2의 조건으로 배양하였다. 당업계의 공지된 것처럼(Kwon, 1997; Sung et al., 2001), 분화를 위해 세포를 39° C 5 ㎍/ml 인슐린, 100 ㎍/ml 트랜스페린, 20 nM 프로게스테론, 30 nM 셀레늄, 60 ㎍M 푸트레신, 0.1 mg/ml 나트륨 피루베이트, 및 2 mM 글루타민을 포함하는 화학적으로 정제된 N2 배지에 2일 동안 배양했다. 인간 C2 도메인이 도입된 발현클론을 96-공 플레이트에 준비된 33° C HiB5 세포에 도입하였다. 반자동 조작 조건에서 각각의 발현 벡터(200 ng)를 리포좀의 형질전환 시약(liposomal transfection reagent, lipofectamin 2000, Invitrogen)을 사용하여 도입하였고, 10,000개 이상의 HiB5 해마전구세포(hippocampal progenitor cells)를 포함하는 공(well)에 도입하였다. 48시간 동안 더 배양한 후, 세포 이미지를 분석기(In Cell Analyzer 1000 automated high-content imaging system, Amersham Biosciences)를 사용하여 분석하였다. 이 후 HiB5 세포의 신경돌기 증식물(neurite outgrowth)을 유도하는 인간 C2 도메인에 대해서 스크린 하였다. 또 각각 녹색 형광 단백질 표지된 CPNE9-C2 및 PKCδ-C2(Neurogenex Co., Korea)를 포함하는 복제 결함 아데노바이러스(rAd5) 두개를 제작하였다. HiB5 세포를 50의 감염다중도(multiplicity of infection, MOI)에서 90% 수준에서 감염시켰다.

<32> **실시예 4. 이미지 분석 및 면역세포화학**

<33> 스크린 한 C2 도메인을 발현하는 세포를 인버티드 현미경(inverted microscope, Olympus BX81)을 탑재한 60배율로 고정된 동일 초점 현미경(confocal microscope, Olympus Fluoview FV 1000)을 사용하여 붉은 형광 단백질 형광 탐지 방법으로 재분석 하였다. 자극 광원 소스(excitation light source)는 녹색 HeNe 레이져의 543-nm 광선이다. 포토 멀티플라이어 관(photo multiplier tube)에 도달하기 전에, 방출 형광발광을 580-nm(40-nm 폭)의 일차 장벽 필터(primary barrier filter)를 통하여 통과시켰다. 염료 표백을 방지하기 위해서 레이저 강도를 최소화하였다. 디지털 이미지 출력은 32 비트 해상도를 갖는 512 × 512 픽셀이었다. 이미지 분석을 위하

여 4 × 10^4 세포/ml 수준으로 유리 커버슬립에 세포를 덮었다. 이틀 후에 세포를 둘베코 용액에 두 번 세척하였고, 동일 초점 현미경으로 모니터하였다. 면역세포화학 프로토콜을 변형하여(Choi et al. 2005), 커버슬립(4 × 10^4 세포)에서 자란 HiB5 세포를 4% 포름알데하이드에서 고정시키고 차가운 메탄올에서 5분간 투과(permeabilize)시켰다. 그리고 상기 세포를 신경섬유(neurofilamment, NF; 1:500)에 대한 일차 판-뉴로널 뉴로필라멘트 마커 단일항원 항체(primary pan-neuronal neurofilament marker monoclonal antibody; SMI 311; Covance Research Products)를 사용하여 4° C에서 하루 밤(overnight) 배양하였다. 다음날 세포를 세척하고 상온에서 1시간 동안 플로레신 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, FITC) 결합 이차항체(HTP transfection) 또는 사이3-접합 이차항체(Cy3-conjugated secondary antibody, rAd infection)를 처리하였다. 모든 이미지를 같은 동일 초점 현미경에서 촬영하였다.

<34> **실시예 4. HiB5 세포의 신경세포 분화에서 C2 도메인의 추정적 역할에 대한 총체적 스크리닝**

<35> 신경세포의 분화에 관여하는 C2 도메인을 스크린하기 위하여 우리는 무작위로 인간 C2 도메인을 포함한 60개의 엔트리 클론을 선택하였고, 상기 C2 도메인을 게이트웨이 클로닝 기술의 LC 반응에 의하여 pDEST-RFP-C 발현 벡터로 도입하였다(도 5 및 표 2).

<36> [표 2]

Gene name	Accession NO.	Nucleotide region	Gene name	Accession NO.	Nucleotide region	Gene name	Accession NO.	Nucleotide region
PIK3C2A	NM_002645	4720-4986	ABR	U01147	1516-1785	RGS3	NM_017790	118-381
UNC13B	NM_006377	4318-4590	doc2	D31897	316-585	PIK3C2B	NM_002646	4555-4824
RIMS1	NM_014989	2317-2592	doc2 β	NM_003585	427-696	UNC13C	XM_930037	1462-1734
SYT7	NM_004200	451-714	RASA3	NM_007368	40-288	MCTP2	NM_018349	295-537
dysferlin	NM_003494	4012-4263	PLCL1	NM_006226	1873-2145	DKFZP586P0123	NM_015531	1186-1461
GAP1 like	BC014420	403-648	RASA2	NM_006506	517-819	PLCH2	NM_014638	2493-2890
PLA2G4B	NM_005090	727-981	PLCB1	NM_015192	1-240	SYTL2	NM_032943	259-528
PKCγ	NM_002739	517-780	SYT11	NM_152280	520-786	SYTL2	NM_206930	706-969
PKCβ	NM_002738	517-780	SYT11	NM_152280	922-1191	RPGRIP1	NM_020366	2339-2730
BCR	NM_004327	2737-3006	CPNE9	NM_153635	229-492	NEDD4L	NM_015277	64-327
PKCδ	NM_006254.	1-375	PLCB3	NM_000932	2053-2301	B/K protein	NM_016524	601-882
PKCα	NM_002737	517-780	SYT3	NM_032298	946-1206	WWP1	NM_007013	508-774
SYT1	NM_005639	868-1134	SYT2	NM_177402	466-726	FLJ12548	AK022610	556-834
PLCD1	NM_006225	1891-2160	SYTL4	NM_080737	1582-1851	PLCE1	NM_016341	556-834
cadps2	AF401638	1096-1338	MTAC2D1	NM_152332	1102-1368	RIMS1	NM_014989	4550-4980
PLCG2	NM_002661	3187-3456	PLC ε	AF170071	5611-5835	NEDD4LUL1	AB048365	556-843
myoferlin	NM_013451	4-255	myoferlin	NM_013451	1078-1374	myoferlin	NM_013451	3907-4179
DAB2IP	NM_032552	64-306	C21orf25	NM_199050	793-1038	FAM62B	NM_020728	718-987
SYT13	NM_020826	949-1221	KIAA1301	AB037722	586-873	kiaa1228	NM_020728	1378-1617
PKCε	NM_005400	22-297	KIAA0941	AB023158	43-306	rabphilin-3a	NM_014954	1225-1494

<37>

<38> 붉은 형광 단백질 표지된 발현 벡터를 일시적으로 96공 플레이트에 있는 HiB5 해마 전구 세포로 트랜스펙션(transfection)하였다. 48시간 배양 후에 세포의 이미지를 포착하였고, 신경돌기 증식물에 대한 C2 도메인의 효과를 평가하였다(도 6). HiB5 세포는 16일 된 쥐 배아의 해마에서 분리된 다능성의 해마 줄기세포주를 의미하는데, 거기서 피라미드 세포의 전구세포가 증식을 시작한다(Renfranz et al., 1991). HiB5는 줄기 세포 마커인 네스틴을 발현하고, 33° C의 허용 온도(permissive temperature)에서 자라며, 온도 과민(temperature-sensitive)의 SV40대-T 항원(SV40 large T antigen)에 의해 무한증식한다. 39° C의 불허 온도(non-permissive temperature)에서 N2 배지에서 배양하는 경우, 이들 세포는 성장을 중지하고 다수가 사멸한다. 그러나 세포의 30 내지 40%는 생존하며, 생존한 세포의 30% 미만은 신경돌기 유사 구조의 세포로 분화한다. 본 발명에서는 33° C에서 이들 신경세포 유사 구조의 형성에 대한 C2 도메인의 효과를 측정했다. 그 결과 신경돌기 유사 구조의 형성을 촉진하는 것으로 나타나는 6개의 C2 도메인을 스크린 했으며, 상기 6개의 C2 도메인 중에서 PKCδ-C2 및 코핀9(CPNE9-C2)의 C2 도메인을 선택하여 이들 유전자의 기능을 분석하였다. 선택된 PKCδ-C2 및 CPNE9-C2가 신경돌기 증식물의 유도에 관여함을 확인하기 위하여, 각각의 붉은 형광 단백질 표지된 C2 도메인을 HiB5 세포에 도입하였고, 세포의 형태학적 변화를 유도하는 그들의 능력을 동일 초점 현미경으로 관찰하였다. PKCδ- C2 및 CPNE9-C2가 붉은 형광 단백질에 융합되었기 때문에 두 세포체의 길이보다 더 긴 신장으로 정의되는, 신경돌기의 존재를 관찰하여 PKCδ- C2 및 CPNE9-C2가 도입된 발현클론으로 형질 전환된 세포를 탐지하는 것은 매우

쉬었다. 도 7에서 PKCδ-C2 및 CPNE9-C2의 유전자를 발현하는 세포들은 윤곽이 뚜렷한 신경돌기 유사 구조를 갖는다. 또한 신경세포 분화를 신경세포의 분화 마커인 신경미세섬유(neurofilament)에 대한 면역세포화학(immunocytochemistry)으로 체크하였는데, PKCδ-C2 또는 CPNE9-C2의 과발현은 허용온도에서 신경돌기를 갖는 형질전환된 세포 수의 증가를 이끌었다(도 8).

<39> HiP5의 30 내지 40% 만이 39° C 불허온도의 N2 배지에서 생존하였고, 형질도입의 효과가 이 조건에서 매우 낮았기 때문에, 형질 도입된 유전자의 활성을 평가하기가 어려웠다. 따라서 우리는 형질도입의 낮은 효율을 극복하기 위하여 녹색 형광 단백질 표지된 CPNE9-C2 및 PKCδ-C2를 포함하는 재조합 아데노바이러스((주)뉴젝스에 의뢰하여 제작(www.newgex.com))를 제작하였고 39° C에서 신경세포 분화에 대한 선택된 C2 도메인의 효과를 측정하였다. 도 9에서 나타나듯이, PKCδ-C2 및 CPNE9-C239는 명확하게 39° C에서 신경돌기를 갖는 세포의 수를 증가시켰다.

<40> 결론으로 본 발명의 새로운 데스티네이션 벡터는 세포 이미지 데이터의 총체적 스크리닝에 성공적으로 적용될 수 있다. 게다가 붉은 형광 단백질의 형광은 EGFP의 형광과 쉽게 구분될 수 있으므로, 그 두개의 벡터는 녹색 형광 단백질 표지된 시스템과 함께 붉은 형광 단백질을 결합하여 2 또는 그 이상의 중요한 단백질의 동시조사를 허용한다(도 7).

<41> [참고문헌]

References

Benes, C. H., Wu, N., Elia A. E., Dharia, T., Cantley, L. C., *et al.* (2005) The C2 domain of PKCdelta is a phosphotyrosine binding domain. *Cell* **121**, 271-280.

Bernard, P. and Couturier, M. (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J. Mol. Biol.* **226**, 735-745.

Choi, S. H., Kim, D. W., Kim, S. Y., An, J. J., Lee, S. H., *et al.* (2005) Transduced human copper chaperone for Cu,Zn-SOD (PEP-1-CCS) protects against neuronal cell death. *Mol. Cells* **20**, 401-408.

Corbit, K. C., Foster, D. A., and Rosner, M. R. (1999) Protein kinase Cδ mediates neurogenic but not mitogenic activation of mitogen-activated protein kinase in neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4209-4218.

Gibbs, R. A., Weinstock, G. M., Metzker, M. L., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., *et al.* (2004) Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* **428**, 493-521.

Hartley, J. L., Temple, G. F., and Brasch, M. A. (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* **10**, 1788-1795.

Kwon, Y. K. (1997) Expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA stimulated by basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor in rat hippocampal cell line. *Mol. Cells* **7**, 320-325.

Ling, M., Trollér, U., Zeidman R., Lundberg, C., and Larsson, C. (2004) Induction of neurites by the regulatory domains of PKCδ and ε is counteracted by PKC catalytic activity and by the RhoA pathway. *Exp. Cell Res.* **292**, 135-150

Matz, M. V., Fradkov, A. F., Labas, Y. A., Savitsky, A. P., Zaraisky, A. G., *et al.* (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* **17**, 969-973.

Newton, A. C. and Johnson, J. E. (1998) Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochim. Biophysys. Acta* **1376**, 155-172.

O'Driscoll, K. R., Teng, K. K., Fabbro, D., Greene, L. A., and Weisstein, I. B. (1995) Selective translocation of protein kinase C-δ in PC12 cells during nerve growth factor-induced neuritogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 449-458.

Renfranz, P. J., Cunningham, M. G., and McKay, R. D. G. (1991) Region-specific differentiation of the hippocampal stem cell line HiB5 upon implantation into the developing mammalian brain. *Cell* **66**, 713-729.

Rual, J. F., Hirozane-Kishikawa, T., Hao, T., Bertin, N., Li, S., *et al.* (2004) Human ORFeome version 1.1: a platform for reverse proteomics. *Genome Res.* **14**, 2128-2135.

Siegel, R. W., Velappan, N., Pavlik, P., Chasteen, L., and Bradbury, A. (2004) Recombinatorial cloning using heterologous lox sites. *Genome Res.* **14**, 1119-1129.

Sung, J. Y., Lee, S. Y., Min, D. S., Eom, T. Y., Chung, K. C., *et al.* (2001) Differential activation of phospholipases by mitogenic EGF and neurogenic PDGF in immortalized hippocampal stem cell lines. *J. Neurochem.* **78**, 1044-1053.

Tomsig, J. L. and Creutz, C. E. (2002) Copine: a ubiquitous family of Ca^{2+}-dependent phospholipids-binding proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**, 1467-1477.

Trollér, U. and Larsson, C. (2006) Cdc42 is involved in PKCε- and δ- induced neurite outgrowth and stress fibre sidmantling. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* **349**, 91-98.

Walhout, A. J. and Vidal, M. (2001) Protein interaction maps for model organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**, 55-62.

Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., *et al.* (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562.

Xie, H., Diber, A., Pollock, S., Safer, H., Meloon, B., *et al.* (2004) Bridging expressed sequence alignments through targeted cDNA sequencing. *Genomics* **83**, 572-576.

<42>

산업이용 가능성

<43> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면, cDNA에서 특정 유전자 또는 특정 도메인을 선택적으로 데스티네이션 벡터에 삽입하여 발현 클론(expression clone)을 생산하고, 생산된 발현 클론을 이용하여 특정 유전자의 기능을 세포 내에서 쉽게 관찰할 수 있으므로 총체적(high throughputly, HTP)으로 유전체 내에 보존된 동종의 기능을 수행하는 유전자들의 세포 내에서 역할을 고속으로 탐지할 수 있다. 또한 본 발명에서 생산한 데스티네이션 벡터를 통한 C2 도메인의 기능 분석에서 얻어진 CPNE9-C2 및 PKCδ-C2를 포함하는 발현 벡터를 사용하여 신경세포의 분화 유도용 조성물을 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<44> 도1은 붉은 형광 단백질 표지된 데스티네이션 벡터의 개열지도이다. 상기 벡터는 CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 부위가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R) 및 자살 ccdB 박스가 위치하고, 상기 attR2 부위의 3' 방향에 붉은 형광 단백질이 위치하는 것을 특징으로 하는 데스티네이션 벡터(Destination Vector)이다.

<45> 도2는 도1의 데스티네이션 벡터(Destination Vector)의 제작 모식도이다.

<46> 도3은 붉은 형광 단백질 표지된 데스티네이션 벡터의 개열지도이다. 상기 벡터는 CMV 프로모터의 3' 방향에 멀티 클로닝 부위가 위치하고, 상기 멀티 클로닝 사이트의 3' 방향에 붉은 형광 단백질이 위치하고, 상기 붉은 형광 단백질의 3' 방향에 attR1 부위 및 attR2 부위가 위치하고, 상기 attR1 부위 및 attR2 부위의 사이에 클로르암페니콜 저항 유전자(CM^R) 및 자살 ccdB 박스가 위치하는 것을 특징으로 하는 도 3의 개열지도를 갖는 데스티네이션 벡터(Destination Vector)이다.

<47> 도4는 도2의 데스티네이션 벡터(Destination Vector)의 제작 모식도이다.

<48> 도5는 attB1/attB2를 포함하는 프라이머로 역전사 중합 사슬 반응한 C2도메인 및 BP 반응에 의해 도너 벡터(pDONR207 벡터)로 클론닝하는 단계를 개략적으로 나타낸 도이다.

<49> 도6는 96공 플레이트에서 데스티네이션 벡터(pDEST-RFP-C2 발현벡터)로 형질 전환한 해마전구세포(HiB5)의 표현형을 나타낸 도이다. 이미지는 총체적 이미지 시스템(HTP imaging system)에 의해서 촬영되었다.

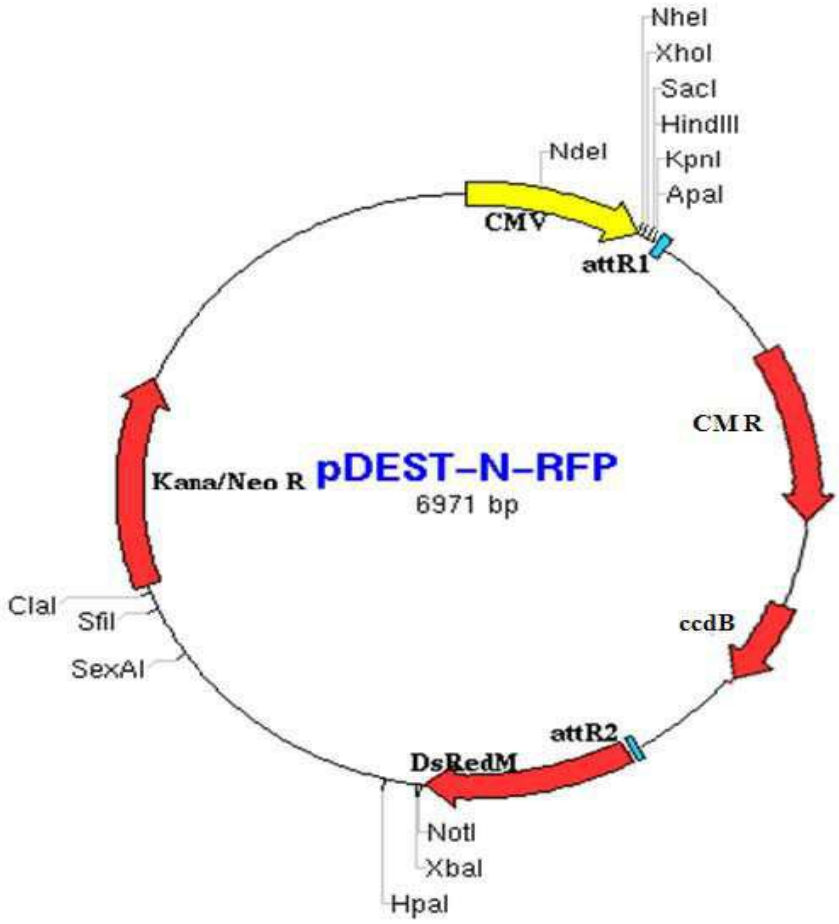
<50> 도7은 스크리닝에서 선택된 C2 도메인을 동일 초점 현미경으로 해마전구세포(HiB5)에서 관찰한 도이다. 신경돌기 증식물을 유도하는 이들 C2 도메인의 능력을 신경미세섬유에 대한 면역반응력으로 확인하였다.

<51> 도8은 33° C에서 붉은 형광 단백질 양성이고 신경돌기를 갖는 해마전구세포의 수를 정량한 도이다.

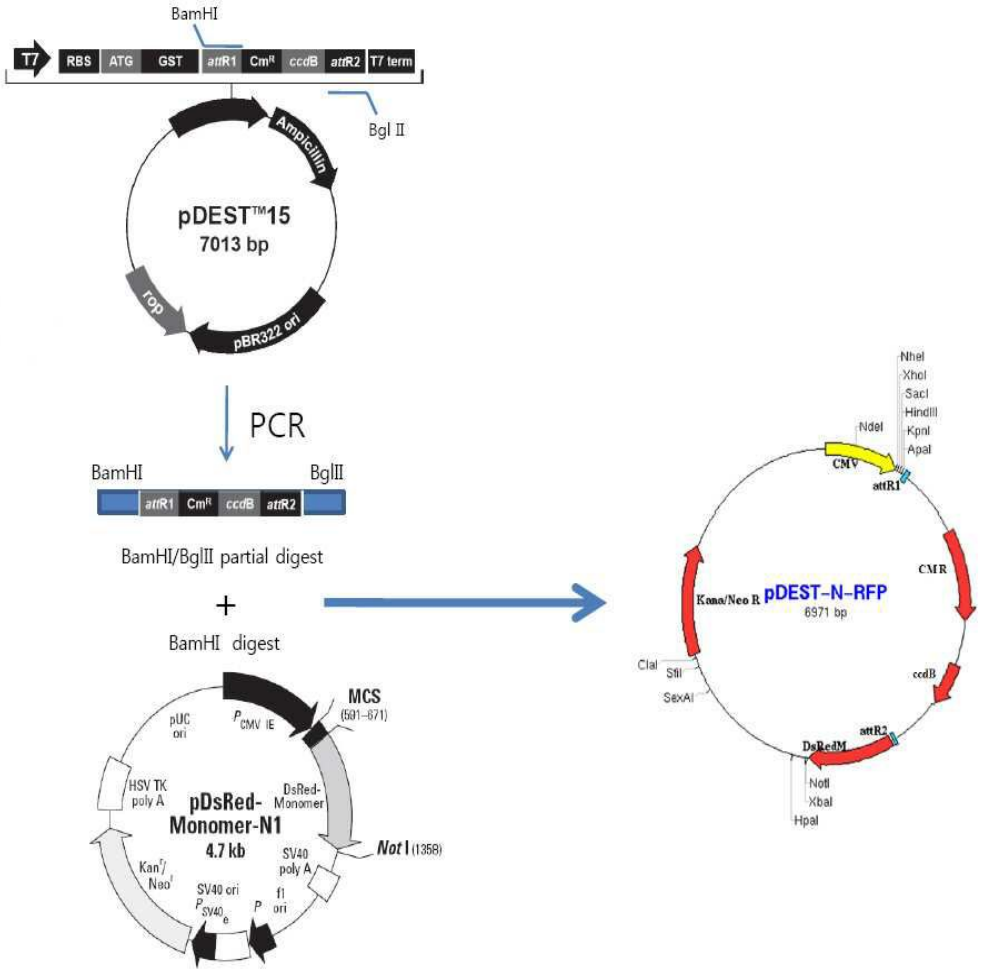
<52> 도9는 39° C에서 녹색 형광 단백질 양성이고 신경돌기를 갖는 해마전구세포의 수를 정량한 도이다.

도면

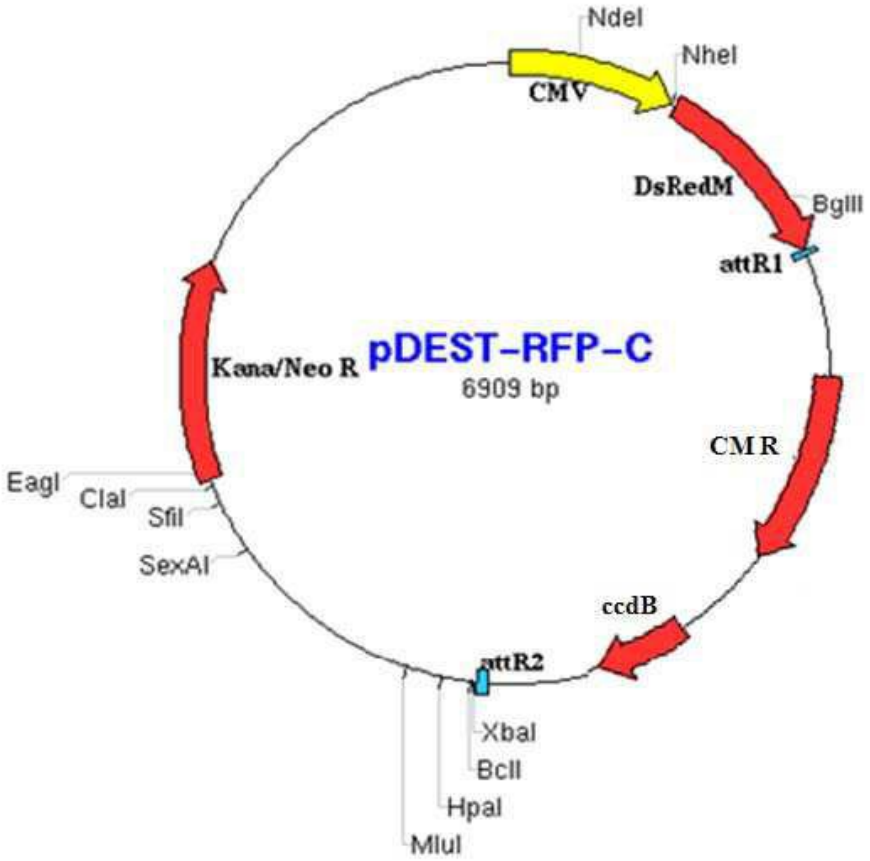
도면1


NheI
XhoI
SacI
HindIII
KpnI
ApaI
NdeI
CMV
attR1
CMR
pDEST-N-RFP
6971 bp
Kana/Neo R
ccdB
ClaI
SfiI
SexAI
attR2
DsRedM
NotI
XbaI
HpaI

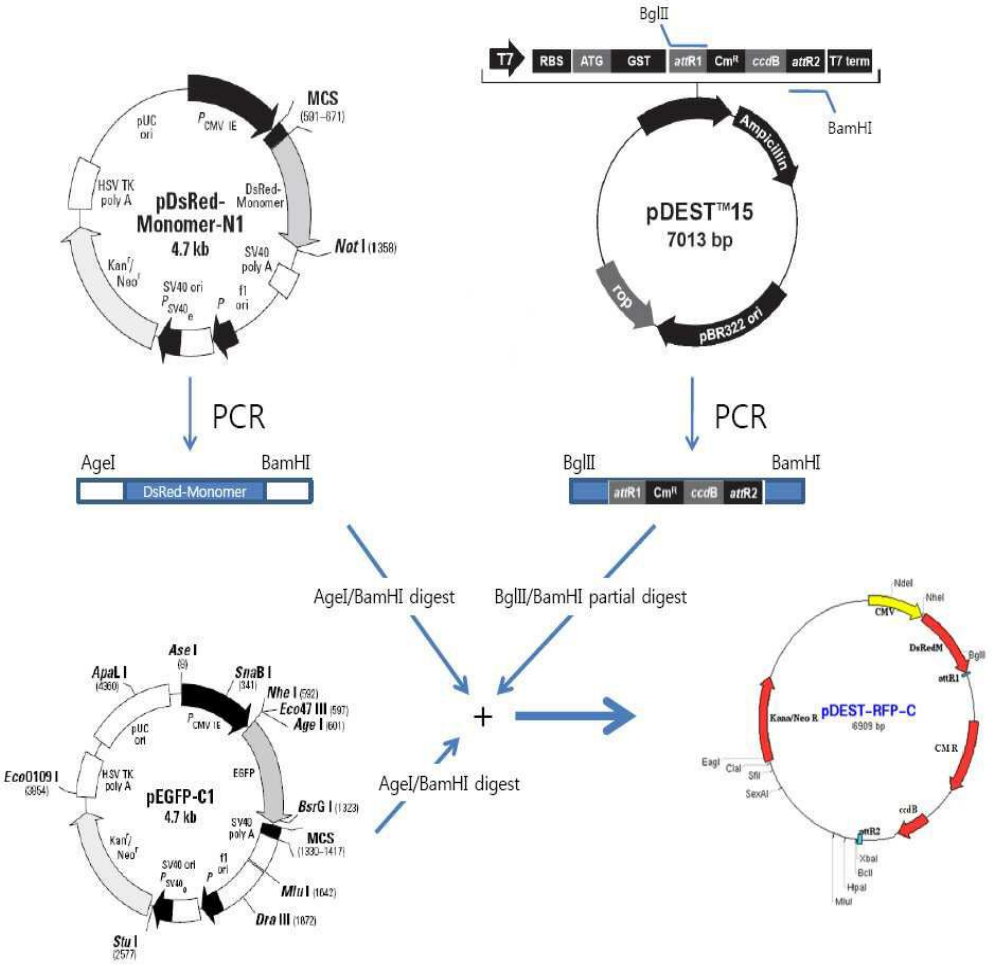
도면2


BamHI
T7
RBS
ATG
GST
attR1
CmR
ccdB
attR2
T7 term
Bgl II
Ampicillin
pDEST™15
7013 bp
rop
pBR322 ori
PCR
BamHI
BglII
attR1
CmR
ccdB
attR2
BamHI/BglII partial digest
+
BamHI digest
MCS
(591–671)
pUC ori
P CMV IE
HSV TK poly A
pDsRed-Monomer-N1
4.7 kb
DsRed-Monomer
SV40 poly A
Not I (1358)
Kan/Neo
SV40 ori
P SV40e
f1 ori
P
NheI
XhoI
SacI
HindIII
KpnI
ApaI
NdeI
CMV
attR1
CMR
Kana/Neo R
pDEST-N-RFP
6971 bp
ccdB
attR2
DsRedM
NotI
XbaI
HpaI
ClaI
SfiI
SexAI

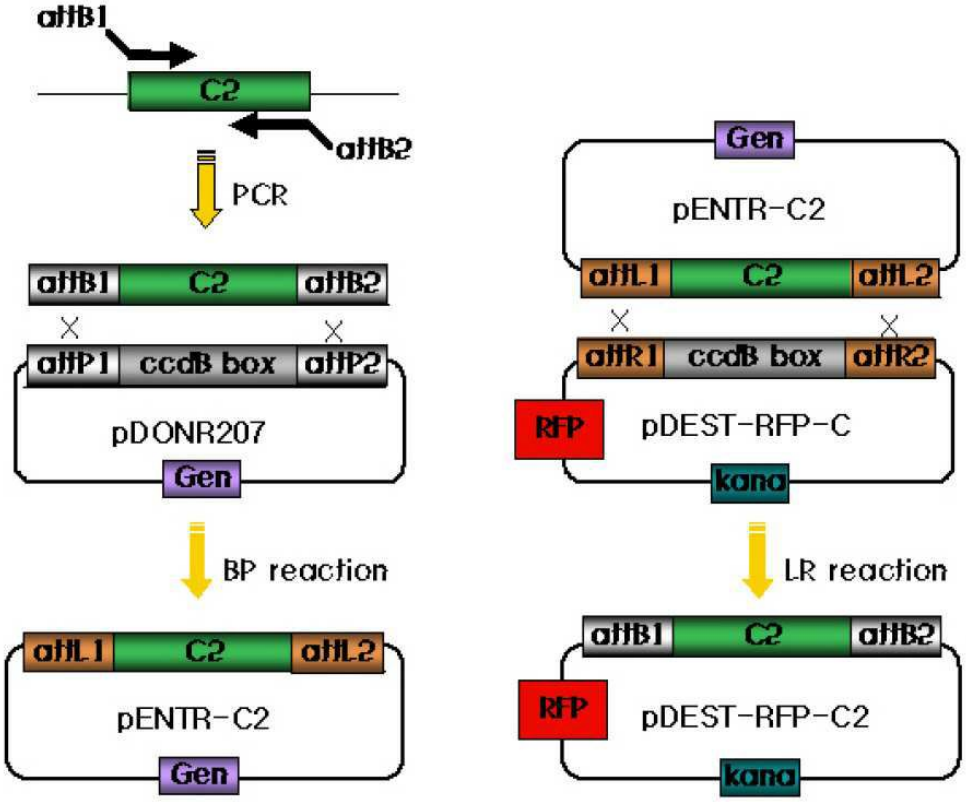
도면3


NdeI
NheI
CMV
DsRedM
BglII
attR1
Kana/Neo R
pDEST-RFP-C
6909 bp
CMR
EagI
ClaI
SfiI
SexAI
ccdB
attR2
XbaI
BclI
HpaI
MluI

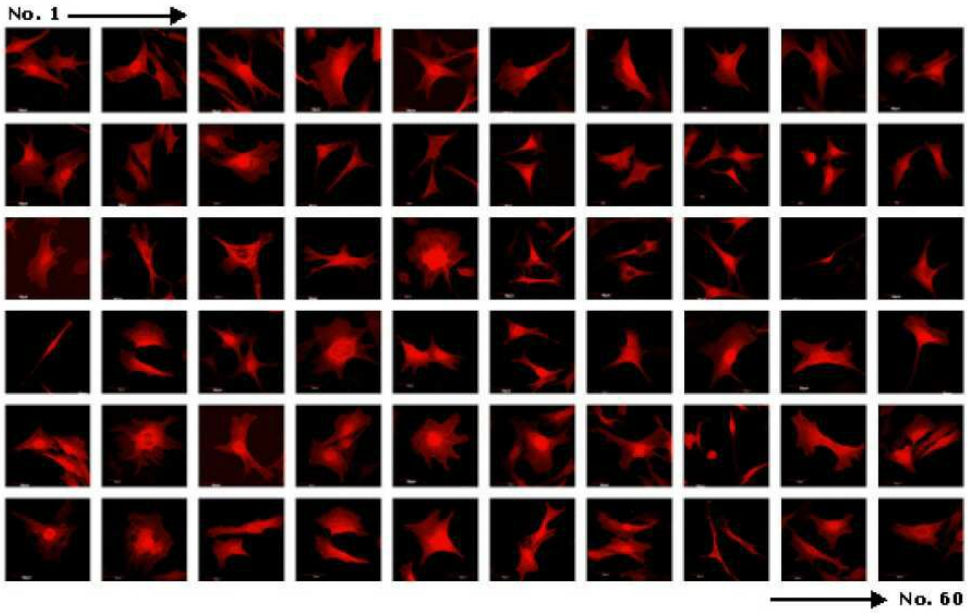
도면4


pDsRed-Monomer-N1
4.7 kb
MCS
Not I
PCR
AgeI
BamHI
DsRed-Monomer
BglII
T7
RBS
ATG
GST
attR1
CmR
ccdB
attR2
T7 term
pDEST™15
7013 bp
Ampicillin
rop
pBR322 ori
AgeI/BamHI digest
BglII/BamHI partial digest
pEGFP-C1
4.7 kb
EGFP
pDEST-RFP-C
6909 bp

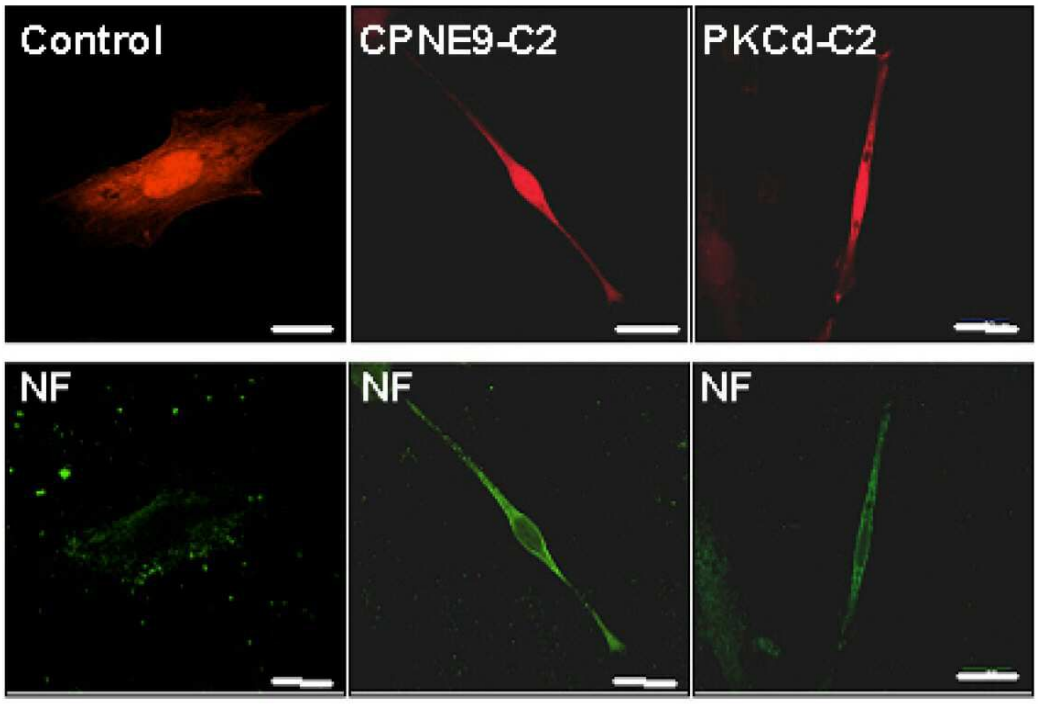
도면5


attB1
C2
attB2
PCR
attB1 C2 attB2
attP1 ccdB box attP2
pDONR207
Gen
BP reaction
attL1 C2 attL2
pENTR-C2
Gen
Gen
pENTR-C2
attL1 C2 attL2
attR1 ccdB box attR2
RFP
pDEST-RFP-C
kana
LR reaction
attB1 C2 attB2
RFP
pDEST-RFP-C2
kana

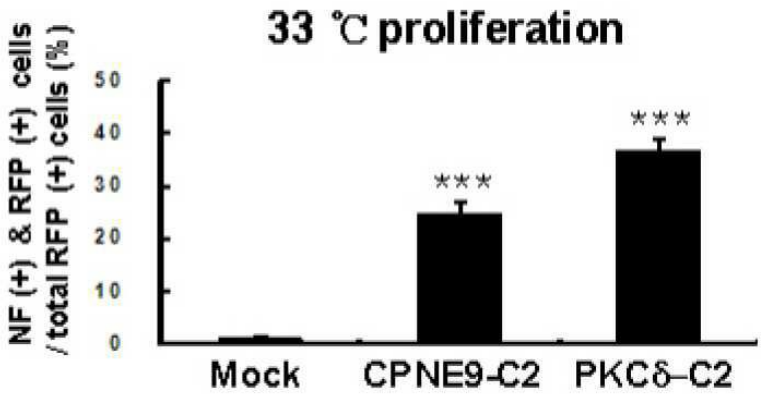
도면6


No. 1
No. 60

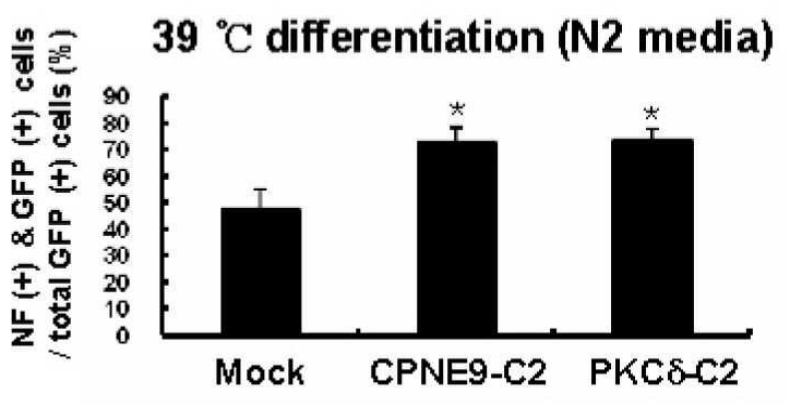
도면7


Control
CPNE9-C2
PKCd-C2
NF
NF
NF

도면8


33 ℃ proliferation
NF (+) & RFP (+) cells / total RFP (+) cells (%)
50
40
30
20
10
0
***
***
Mock
CPNE9-C2
PKCδ-C2

도면9



서 열 목 록

<110> Gyeongsang National University industry and academy cooperation foundation
<120> Gateway RFP-Fusion Vectors for High Throughput Functional Analysis of Genes

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5' PCR primer for PKC delta-C2 domaim

<400> 1
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc caccatggcg ccgttcctgc gcatcgc 57

<210> 2
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3' PCR primer for PKC delta-C2 domain

<400> 2
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt ttactccagg aaatactgaa cagaca 56

<210> 3
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 5'PCR primer for CPNE9-C2 domain

<400> 3
ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctc caccatggcc atgtctctcg gcgga 55

<210> 4
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 3'PCR primer for CPNE9-C2 domain

<400> 4
ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtt ttaacccgtg agggttcgct ctac 54

<210> 5
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PKC delta-C2 domain

<400> 5
Ala Pro Phe Leu Arg Ile Ala Phe Asn Ser Tyr Glu Leu Gly Ser Leu
1 5 10 15

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asn Gln Pro Phe Cys Ala Val Lys Met Lys
20 25 30

```
Glu Ala Leu Ser Thr Glu Arg Gly Lys Thr Leu Val Gln Lys Lys Pro
         35                  40                  45

Thr Met Tyr Pro Glu Trp Lys Ser Thr Phe Asp Ala His Ile Tyr Glu
     50                  55                  60

Gly Arg Val Ile Gln Ile Val Leu Met Arg Ala Ala Glu Glu Pro Val
 65                  70                  75                  80

Ser Glu Val Thr Val Gly Val Ser Val Leu Ala Glu Arg Cys Lys Lys
                 85                  90                  95

Asn Asn Gly Lys Ala Glu Phe Trp Leu Asp Leu Gln Pro Gln Ala Lys
            100                 105                 110

Val Leu Met Ser Val Gln Tyr Phe Leu Glu
        115                 120
```

<210> 6
<211> 129
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPNE9-C2 domain

<400> 6

```
Ala Met Ser Leu Gly Gly Ala Ser Glu Arg Ser Val Pro Ala Thr Lys
  1               5                  10                  15

Ile Glu Ile Thr Val Ser Cys Arg Asn Leu Leu Asp Leu Asp Thr Phe
             20                  25                  30

Ser Lys Ser Asp Pro Met Val Val Leu Tyr Thr Gln Ser Arg Ala Ser
         35                  40                  45

Gln Glu Trp Arg Glu Phe Gly Arg Thr Glu Val Ile Asp Asn Thr Leu
     50                  55                  60

Asn Pro Asp Phe Val Arg Lys Phe Val Leu Asp Tyr Phe Phe Glu Glu
 65                  70                  75                  80

Lys Gln Asn Leu Arg Phe Asp Val Tyr Asn Val Asp Ser Lys Thr Asn
```

85 90 95

Ile Ser Lys Pro Lys Asp Phe Leu Gly Gln Ala Phe Leu Ala Leu Gly
100 105 110

Glu Val Ile Gly Gly Gln Gly Ser Arg Val Glu Arg Thr Leu Thr Gly
115 120 125

Leu