



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월22일  
(11) 등록번호 10-2206288  
(24) 등록일자 2021년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 9/14 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 9/14 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0162699  
(22) 출원일자 2019년12월09일  
심사청구일자 2019년12월09일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR101308971 B1  
Schmitt H. et al, Cell 53:pp.635-647 (1988. 5.20.).  
Zhang L. et al, FEMS Yeast Res 13:pp.200-218 (2012.12. 4.).  
KR1020170127141 A

(73) 특허권자  
경상대학교산학협력단  
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)  
(72) 발명자  
이상열  
경상남도 진주시 진주대로 829번길 21, 삼환나우빌 101동 1801호  
채호병  
경상남도 진주시 서장대로 385번길 9  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김동완

전체 청구항 수 : 총 4 항

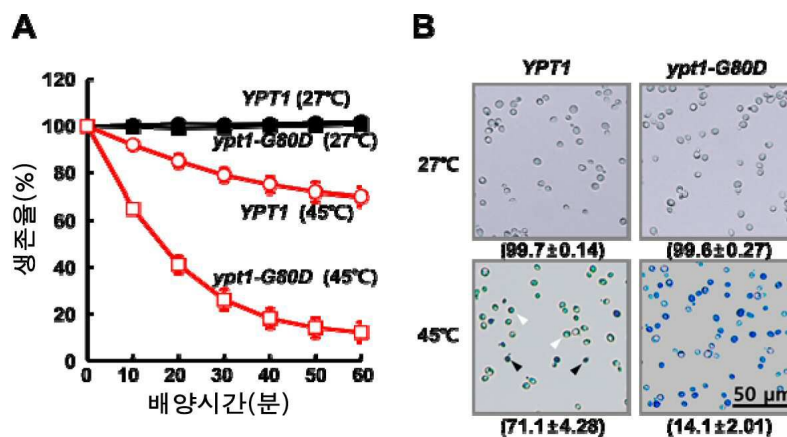
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 열 스트레스 저항성을 넘어아웃 시킨 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물

(57) 요약

본 발명은 열 스트레스 저항성을 넘어아웃 시킨 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 야생형 Ypt1p 단백질 내의 80번째 아미노산 잔기를 글리신(G)에서 아스파르트산(D)로 치환시켜 실온에서 GTPase 효소로 작용하나 열 충격시 고분자량의 복합체로 전환되는 기능을 상실하여 열 스트레스 저항성이 소실된 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**박정훈**

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

**강창호**

경상남도 진주시 호탄길28번길 10-2 (호탄동) 303호

**지용훈**

경상남도 진주시 진양호로125번길 17 (평거동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2019-0274  
 부처명 과학기술정보통신부  
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단  
 연구사업명 이공학개인지초연구지원사업(기본연구)  
 연구과제명 리보솜인자를 통한 식물 스트레스 내성기작 연구 및 활용  
 기여율 1/3  
 과제수행기관명 경상대학교 산학협력단  
 연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2019-0401  
 부처명 농촌진흥청  
 과제관리(전문)기관명 시스템합성농생명공학사업단  
 연구사업명 차세대바이오그린사업  
 연구과제명 레드스 매개 리보핵산결합단백질의 식물 스트레스 반응 조절 연구  
 기여율 1/3  
 과제수행기관명 경상대학교 산학협력단  
 연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2019-0461  
 부처명 농촌진흥청  
 과제관리(전문)기관명 시스템합성농생명공학사업단  
 연구사업명 차세대바이오그린사업  
 연구과제명 시스템생물학 기반 유용신소재 생산을 위한 소포체스트레스 방어기전 연구  
 기여율 1/3  
 과제수행기관명 경상대학교 산학협력단  
 연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

공지예외적용 : 있음

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 야생형 Ypt1p 단백질 내의 80번째 아미노산 잔기를 글리신(G)에서 아스파르트산(D)로 치환시켜 실온에서 GTPase 효소로 작용하는 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물에 있어서, 상기 효모 Ypt1p 변이 단백질은 45 °C에서 60분간 열 충격시 고분자량의 복합체로 전환되어 분자 샤페론으로 작용하는 기능을 소실함으로써 열 충격에 민감하게 작용함을 특징으로 하는 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 효모 Ypt1p 변이 단백질의 열 충격시 분자 샤페론 기능은 4-페닐부티르산 처리를 통해 회복됨을 특징으로 하는 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물.

**청구항 3**

제 1항에 있어서, 상기 효모 Ypt1p 변이 단백질의 대사 조절과 관련된 효소는 알코올 탈수소효소 1p(Adh1p, E7LZZ9), 포스포릴라아제(Gph1p, B3LKC1), 바큐오라 단백질 분류 29p(Vps29p, E7KDB3), ADP-리보실화 인자 1(P11076), 리포아미드 탈수소효소 1p(Lpd1p, E7NH76) 및 YMR051C- 유사 단백질(E7QCY4)에서 선택된 효소임을 특징으로 하는 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물.

**청구항 4**

제 1항에 있어서, 상기 효모 Ypt1p 변이 단백질의 열 충격시 대사 조절 기능이 소실되는 효소는 스트레스-70 서브 패밀리 A 1p(Ssa1p, E7Q0L2), ATP 신타제 서브 유닛 베타(Atp2p, E7Q5S7), 무기 파이로포스파타제(Ipp1p, P00817), 포린(Por1p, B3LNR6) 및 번역 신장 인자 2(Eft2p, E7NN07)에서 선택된 효소임을 특징으로 하는 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 열 스트레스 저항성을 낮아주 시킨 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 야생형 Ypt1p 단백질 내의 80번째 아미노산 잔기를 글리신(G)에서 아스파르트산(D)로 치환시켜 실온에서 GTPase 효소로 작용하나 열 충격시 고분자량의 복합체로 전환되는 기능을 상실하여 열 스트레스 저항성이 소실된 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] Ypt1p 단백질은 활성 GTP-결합 형태와 비활성 GDP-결합 형태 간에 순환하는 소 GTPase의 Rab 패밀리 멤버이다. Ypt1p는 GDP-GTP 교환 및 신호전달 프로세스의 연이은 활성화를 위해 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자를 필요로 한다. 또한 결합 GTP의 가수분해를 위해 GTPase-활성화 단백질을 필요로 한다.

[0005] Rab 패밀리에 속하는 다수의 소 GTPase는 소포 유통(trafficking)으로 기능하며 Ypt1p 단백질은 소포체로부터 시스-골지 또는 시스-골지로부터 메디얼-골지로의 수송을 위한 다단계 효모 분비 경로에 필수적이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 대한민국 특허 제10-1826009호 '열 충격에 의해 기능 전환을 나타내는 효모 Ypt1p 단백질'에서 열 충격에 의해 기능 전환을 나타내는 효모 Ypt1p 단백질을 개시한 바 있으며 특히 실온에서는 세포질 내에서 GDP를 GTP로 활성화시키는 GTPase로 작용하나 열 충격시 기질 보호를 위한 분자 샤페론으로 작용하는 효모

Ypt1p 단백질을 개시한 바 있다. 또한 상기 효모 Ypt1p 단백질을 과발현시켜 열 스트레스 저항성을 증진시킨 형질 전환 생물체 역시 개시한 바 있다.

- [0009] 그러나 상기 효모 Ypt1p 단백질 변이체의 경우에도 실온 내에서 GTPase로서의 활성과 열 충격시 분자 샤페론으로서의 기능 전환이 일어나는지 여부는 측정하지 않았다.
- [0011] 특히 효모 내에서 YPT1 유전자의 녹아웃은 치명적인 것으로 본 발명자들은 온도-민감성을 포함하는 여러 조건부 ypt1 변이체를 생성시켜 그 특성을 측정하였다.
- [0013] ypt1-G80D 변이체의 온도 민감성 성장 표현형을 측정하고 본 발명자들은 (a) Ypt1p 변이체가 잘 알려진 GTPase 기능 외에 새로운 기능을 가지고 있는지, (b) Ypt1p 변이체의 알려지지 않은 기능은 온도 의존적인지, (c) Ypt1p 변이체의 알려지지 않은 기능은 열-스트레스 하에서 세포의 생존 및 성장을 촉진하는지 여부를 확인코자 하였다.
- [0015] 또한 이미 본 발명자들은 열 충격이 GTPase의 기능에서 분자 샤페론의 기능으로 야생형 Ypt1p의 기능적 변환을 유발한다는 것을 확인한 바 있으며 이러한 변환은 저분자량(LMW)에서 고분자량(HMW) 형태로의 구조적 변환에 의해 야기되는 것임을 상기 특허문헌에서 개시한 바 있다.
- [0017] 이를 통해 본 발명에서는 Ypt1p<sup>G80D</sup> 변이체의 조건부 샤페론 활성을 측정하고 시험관 내 및 생체 내에서 야생형 Ypt1p 단백질 및 Ypt1p<sup>G80D</sup> 변이체 단백질의 생화학적 특성을 측정코자 하였다.
- [0019] 따라서 본 발명은 열 스트레스 조건 하에서 Ypt1p 단백질에 의해 조절되는 세포 프로세스에 대해 규명하기 위해 YPT1(야생형) 및 ypt1-G80D 변이체 세포의 프로테오솜을 비교 측정한 것이다.
- [0021] 따라서 본 발명자들은 야생형 Ypt1p의 샤페론 기능이 열 스트레스에 대한 세포의 저항성을 향상시키는 반면에 ypt1-G80D 변이 세포에서는 열 스트레스에 따른 고분자량 복합체로의 변환이 야기되지 않으므로 열에 민감한 표현형을 유발한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0023] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 열 스트레스 조건 하에서 Ypt1p 단백질에 의해 조절되는 세포 프로세스에 대해 규명하기 위해 YPT1(야생형) 및 ypt1-G80D 변이체 세포의 프로테오솜을 비교 측정코자 한 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0025] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 야생형 Y따라서 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 열 스트레스 조건 하에서 Ypt1p 단백질에 의해 조절되는 세포 프로세스에 대해 규명하기 위해 YPT1(야생형) 및 ypt1-G80D 변이체 세포의 프로테오솜을 비교 측정코자 한 것이다. pt1p 단백질 내의 80번째 아미노산 잔기를 글리신(G)에서 아스파르트산(D)로 치환시켜 실온에서 GTPase 효소로 작용하는 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물에 있어서, 상기 효모 Ypt1p 변이 단백질은 열 충격시 고분자량의 복합체로 전환되어 분자 샤페론으로 작용하는 기능을 소실함으로써 열 충격에 민감하게 작용함을 특징으로 하는 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물을 제공하는 것이다.
- [0027] 이때 상기 효모 Ypt1p 변이 단백질의 열 충격시 분자 샤페론 기능은 4-페닐부티르산 처리를 통해 회복됨을 특징으로 한다.
- [0029] 또한 상기 효모 Ypt1p 변이 단백질의 대사 조절과 관련된 효소는 알코올 탈수소효소 1p(Adh1p, E7LZZ9), 포스포릴라아제(Gph1p, B3LKC1), 바큐오라 단백질 분류 29p(Vps29p, E7KDB3), ADP-리보실화 인자 1(P11076), 리포아미드 탈수소효소 1p(Lpd1p, E7NH76) 및 YMR051C- 유사 단백질(E7QCY4)에서 선택된 효소임을 특징으로 한다.
- [0031] 한편 상기 효모 Ypt1p 변이 단백질의 열 충격시 대사 조절 기능이 소실되는 효소는 스트레스-70 서브 패밀리 A 1p(Ssa1p, E7Q0L2), ATP 신타제 서브 유닛 베타(Atp2p, E7Q5S7), 무기 파이로포스파타제(Ipp1p, P00817), 포린(Por1p, B3LNR6) 및 번역 신장 인자 2(Eft2p, E7NN07)에서 선택된 효소임을 특징으로 한다.

**발명의 효과**

[0033] 본 발명의 효과는 열 스트레스 저항성을 나아웃 시킨 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물을 제공하는 것이다. 더욱 상세하게는 야생형 Ypt1p 단백질 내의 80번째 아미노산 잔기를 글리신(G)에서 아스파르트산(D)로 치환시켜 실온에서 GTPase 효소로 작용하나 열 충격시 고분자량의 복합체로 전환되는 기능을 상실하여 열 스트레스 저항성이 상실된 효모 Ypt1p 변이 단백질 조성물을 제공하는 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0035] 도 1은 변이체 ypt1-G80D 효모 세포가 열 스트레스에 민감함을 나타낸 것이다.

(A) 세포 생존력에 대한 열처리의 효과. YPD 배지에서 성장한 YPT1 및 ypt1-G80D 세포( $5 \times 10^7$  세포/mL)를 27°C 또는 45°C에서 배양하고, 생존 카운트의 측정을 위해 표시된 시간에 샘플을 회수하였다. 각 시점에서의 세포 생존율(백분율)은 그 시점에서의 생존 카운트 대 시간 제로에서의 생존 카운트의 비율의 100배로 계산되었다. 오차 막대는 3회 이상의 독립 실험에서 평균±SD를 의미한다.

(B) 열 충격 유발 세포 사멸의 트리판 블루(TB) 배제 분석. (A)에서 60분 시점에 YPT1 및 ypt1-G80D 세포의 샘플을 TB로 염색한 후 형광 현미경으로 가시화 하였다. TB 음성 세포의 백분율은 이미지 아래에 표시하였다. 데이터는 3회 이상의 독립적인 실험의 평균±SD로 표시된다. 흰색과 검은색 화살촉은 각각 TB-음성 및 -양성 세포의 예를 나타낸다. 스케일 바는 50µm를 나타낸다.

도 2는 효모 세포에서의 열충격-유도된 세포질 단백질 응집을 나타낸 것이다.

(A) YPT1 및 ypt1-G80D 세포에서 열 충격-유도된 세포질 단백질 응집체. 세포 ( $5 \times 10^7$  세포/mL)를 YPD 배지에서 성장시키고 27°C 또는 45°C에서 배양하였다. 60분 시점에 샘플을 회수하고, 불용성 시토줄 단백질의 양을 측정하였다. 불용성 분획에 SDS-PAGE를 실시한 후 은-염색시켰다. 각 레인은  $3 \times 10^6$  세포의 불용성 분율을 나타낸다.

(B) (A)에서 추출된 총 세포질 단백질에서 불용성 분획의 비율. 적색선은 45°C에서 YPT1과 ypt1-G80D 샘플의 비교를 나타내고, 청색선은 27°C와 45°C에서 2 개의 ypt1-G80D 샘플의 비교를 나타내며, 흑색선은 27°C와 45°C에서 2개의 YPT1 샘플의 비교 또는 27°C에서 YPT1과 ypt1-G80D 샘플의 비교를 나타낸다.

도 3은 열-충격이 Ypt1p G80D가 아닌 Ypt1p의 분자 상태 변화를 유도함을 나타낸다.

(A) 생체 내에서 Ypt1p 및 Ypt1p G80D의 분자 상태 변화. YPT1 및 ypt1-G80D 세포를 YPD 배지( $1 \times 10^8$  세포/mL)에서 성장시키고 27°C 또는 45°C에서 45분 동안 배양하였다. 열처리된 세포의 절반을 100 µg/mL 시클로헥시미드를 함유하는 동일한 부피의 새로운 YPD 배지로 옮기고 27°C에서 10시간 동안 회복시켰다(45/27). 총 단백질 추출물(10 µg)을 SDS-PAGE로 분석하고 단백질을 CBB 염색(왼쪽 이미지)으로 시각화하였다. 또한, SDS-PAGE(중간 이미지) 또는 네이티브-PAGE(오른쪽 이미지)에 의한 분별 후 폴리클로날 항-Ypt1p 항체로 면역 블롯팅하여 총 단백질 추출물(50 µg)을 분석하였다.

(B, C) 시험관 내에서 Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 분자 상태 변화. (B) 정제된 박테리아로 발현된 Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup> (3 µg/µL)를 25°C 또는 45°C에서 30분 동안 인큐베이션하고, 네이티브-PAGE(위 이미지) 또는 SDS-PAGE(아래 이미지)에 적용한 후 은-염색. (C) (B)에 기술된 단백질 용액의 SEC 분석.

(D) Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup>에서 소수성 도메인의 열 충격-유도 노출을 식별하기 위한 비스-ANS 결합 분석. 비스-ANS의 형광 스펙트럼은 380nm에서 여기와 400-600nm에서 방출 스캔으로 측정되었다. 사용된 샘플은 10 µM 비스-ANS (a), 25°C (b) 또는 45°C (b')에서 배양된 10 µM 비스-ANS + 30 µM Ypt1p, 25°C (c) 또는 45°C (c')에서 배양된 10 µM 비스-ANS + 30 µM Ypt1p 이었다.

도 4는 Ypt1p<sup>G80D</sup>에는 GTPase 활성은 있지만 분자 샤페론 활성은 없음을 나타낸다.

(A, B) 샤페론 활성 분석. 15분 인큐베이션 기간에 걸쳐 340 nm에서 광 산란을 모니터링 하였다. 3번 이상의 독립적인 시험에서 얻은 대표적인 데이터가 표시되었다.

(A) 50mM HEPES(pH 8.0)에서 MDH(1.67 µM) 단독(-○-) 또는 8.35 µM GST(-●-), Ypt1p(-▲-) 또는 Ypt1p<sup>G80D</sup>(-■-) 용액을 45 °C에서 분광 광도계 셀에서 배양하였다.

(B) 50mM HEPES (pH 8.0) 내에서 MDH(1.67  $\mu$ M) 단독(-○-) 용액 또는 25 $^{\circ}$ C(-▲-) 또는 45 $^{\circ}$ C(-▲-)에서 전처리된 3.34  $\mu$ M Ypt1p 또는 25 $^{\circ}$ C(-■-) 또는 45 $^{\circ}$ C(-■-)에서 전처리된 3.34  $\mu$ M Ypt1p<sup>G80D</sup>로 보충된 용액을 45 $^{\circ}$ C에서 분광 광도계 셀에서 배양하였다.

(C) GTPase 활성 분석. 재조합 Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup>(각각 2  $\mu$ g)를 30  $^{\circ}$ C에서 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] GTP와 함께 인큐베이션하고, 반응 혼합물의 샘플을 상이한 시점에서 회수하여 TLC로 분석하였다.

(D) Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 상대 GTPase(240분) 및 사페론(15분) 활성. Ypt1p의 활성은 100%로 설정되었다. 데이터는 3회 이상의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타내었다.

도 5는 PBA가 ypt1-G80D 세포의 열 저항성을 증가시킴을 나타낸다.

(A) 효모 포트 분석. 효모 세포( $5 \times 10^7$  세포/mL)는 YPD 배지에서 성장되고, 1mM PBA의 존재(+PBA) 또는 부재(-PBA) 하에 27 $^{\circ}$ C 또는 45 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션 시켰다. YPT1 및 ypt1-G80D 세포의 샘플을 분석을 위해 회수하였다. 이들 세포 현탁액의 10배 연속 희석액의 분취량(6  $\mu$ l)을 YPD 플레이트에 적가하고, 플레이트를 27 $^{\circ}$ C에서 3일 동안 인큐베이션 시킨 후 사진을 찍었다.

(B) YPT1 및 ypt1-G80D 세포의 열충격 저항에 대한 PBA의 효과. 효모 세포 ( $5 \times 10^7$  세포/mL)를 YPD 배지에서 성장시키고 1 mM PBA의 존재(+PBA) 또는 부재(-PBA) 하에 45 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션 시켰다. 생존 카운트 측정을 위해 지시된 시간에 샘플을 회수하였다. 각 시점에서의 세포 생존율(백분율)은 각 시점에서의 생존 카운트 대 최초 시간에서의 생존 카운트의 비율의 100배로 계산되었다. 오차막대는 3회 이상의 독립 시험에서 평균 $\pm$ SD를 의미한다.

(C) 열 충격 유발 세포 사멸의 트리판 블루 배제 분석. (B) 내의 시점에서 60분에서의 YPT1 및 ypt1-G80D 세포의 샘플은 트리판 블루로 염색한 후 형광 현미경으로 시각화하였다. TB-음성 세포의 백분율은 이미지 아래에 표시되었다. 데이터는 3회 이상의 독립적인 시험의 평균 $\pm$ SD로 나타내었다.

도 6은 LC/MS 데이터 분석을 나타낸다.

(A) 벤 다이어그램은 27 $^{\circ}$ C에서 배양된 YPT1 및 ypt1-G80D 세포의 추출물(왼쪽 위), 27 $^{\circ}$ C 또는 45 $^{\circ}$ C에서 배양된 YPT1 세포의 추출 오른쪽 위), 27 $^{\circ}$ C 또는 45 $^{\circ}$ C에서 배양된 ypt1-G80D 세포의 추출물(왼쪽 아래) 및 45 $^{\circ}$ C에서 배양된 YPT1 및 ypt1-G80D 세포의 추출물(오른쪽 아래)에서 LC/MS 분석에 의해 확인된 단백질의 수를 나타낸다.

(B) 27 $^{\circ}$ C 또는 45 $^{\circ}$ C에서 배양된 YPT1 및 ypt1-G80D 세포 추출물에서 LC/MS 분석으로 확인 된 단백질 간의 관계를 나타내는 벤 다이어그램. YPT1 세포 내에서 45 $^{\circ}$ C에서 유도되었지만 ypt1-G80D 세포에서는 유도되지 않은 49 개의 단백질 군은 적색 윤곽선으로 표시되었다. (C) 상이한 세포 프로세스 사이에서 이들 49개 단백질의 분포를 보여주는 원형 차트.

도 7은 열 충격이 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 분자 상태 변화를 유발하지 않음을 나타낸다. 변이체 ypt1-G80D 세포를 YPD 배지 ( $1 \times 10^8$  세포/ml)에서 성장시키고 27 $^{\circ}$ C 또는 45 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 배양하였다. 이어서 세포의 총 세포질 추출물을 SEC 분석하였다.

상부 패널은 SEC 분석에서 분해된 단백질 피크의 추적을 나타내며(상부 이미지) 하부 패널은 SDS-PAGE 후 해당 분획에서 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 면역 블롯 검출을 나타낸다. 총 단백질의 2.5mg 분취량을 SEC 컬럼에 적용하고, 각 분획의 30  $\mu$ l를 SDS-PAGE에 적용하였다. Ypt1p<sup>G80D</sup>는 폴리클로날 항-Ypt1p 항체로 검출되었다.

도 8은 Ypt1p는 분자 사페론 활동을 보유하나 Ypt1p<sup>G80D</sup>에는 없음을 나타낸다. 사페론 활성 분석을 위해, 광 산란을 15분 인큐베이션 기간에 걸쳐 340 nm에서 모니터링 하였다. (C) 50  $\mu$ M HEPES(pH 8.0)에서 1  $\mu$ M CS 단독(-○-) 또는 8.35  $\mu$ M GST(-●-), Ypt1p(-▲-) 또는 Ypt1p<sup>G80D</sup>(-■-)의 용액을 45 $^{\circ}$ C에서 분광 광도계 셀에서 배양하였다. 3회 이상의 독립적인 실험에서 얻은 대표적인 데이터를 나타내었다.

도 9는 Ypt1p 사페론 활동의 추정 표적을 식별하기 위해 수행된 LC/MS 분석을 위한 실험 워크 플로우를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0036] 본 발명은 온도에 민감한 형질전환 효모 ypt1-G80D 변이체를 통해 형질전환된 효모 세포는 정상적인 GTPase 기능을 유지하더라도 열 충격시 고분자량의 복합체의 형성을 유도하지 못하므로 인해 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 분자 샤페론 기능을 소실하므로 상기 변이체 단백질은 열 충격에 매우 민감하게 반응한다는 것을 확인한 것이다.
- [0038] 또한 ypt1-G80D 효모 세포의 열 스트레스 민감도는 화학적 샤페론인 4-페닐부티르산으로 처리함으로써 부분적으로 회복되나 본 발명의 Ypt1p 변이 단백질도 대사, 합성, 세포 에너지 생성, 스트레스 반응 및 DNA 조절에 관련된 다수의 단백질의 기능을 제어함을 측정 확인한 것이다.
- [0040] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0042] 1. ypt1-G80D 변이 효모 세포는 열 충격에 민감하다.
- [0044] 동질유전자 ypt1 변이체 균주는 비-허용 온도(예를 들면 37°C)에서 야생형 세포보다 더 느리게 성장하며 Ypt1p의 샤페론 활성의 상실은 유기체의 열충격에 대한 생리학적 감수성에 기인한다. Ypt1p에서 G80D 변이의 생리학적 중요성을 확인하기 위해 열 충격 YPT1 세포 및 열 충격 ypt1-G80D 세포의 생존율을 비교하였다(도 1).
- [0046] 중간 단계 기하급수적 성장기에서 두 균주의 배양물을 동일한 세포 밀도로 조정하고 분취액을 27°C 또는 45°C에서 인큐베이션 시켰다. 생존 가능한 카운트를 일정한 시간 간격으로 측정하였다(도 1A). 27°C에서 최대 60분 동안 인큐베이션 할 때 YPT1 및 ypt1-G80D 균주의 생존율 간에 유의미한 차이는 없었다.
- [0048] 그러나 45°C에서 인큐베이션 할 때, ypt1-G80D 균주의 생존율은 YPT1 균주의 생존율보다 현저하게 감소하였다(30분에서 각각 26±4.37 %와 79±2.99 %; 60분에서 각각 12±4.31 %와 70±3.95 %).
- [0050] 이러한 결과를 확인하기 위해 트리판 블루(TB) 배제 에세이를 사용하여 세포 사멸을 평가하였다. TB 배제 에세이는 죽은 세포만이 염료를 배제할 수 없기 때문에 과란색으로 염색된다는 원리를 기반으로 한다. 도 1B에 나타난 바와 같이 27°C에서 60분 배양 후 TB-양성 YPT1 또는 ypt1-G80D 세포가 관찰되지 않았다.
- [0052] 대조적으로 45°C에서 60분 동안 인큐베이션 시킨 후, 대부분의 ypt1-G80D 세포는 강하게 청색으로 염색되었으며 이는 사멸한 것을 나타내고 대부분의 YPT1 세포는 단지 약간만 염색되어 생존함을 나타낸다.
- [0054] 2. 열-충격은 ypt1-G80D 효모 세포에서 시토졸 단백질 응집을 유도한다.
- [0056] 세포 생존능의 상실은 세포 내의 열민감 단백질의 응집과 관련되어 있다. 따라서 본 발명자들은 Tomoyasu 등에 의해 개발된 백그라운드 신호를 최소화하고 응집 감지의 감도를 향상시키는 프로토콜을 사용하여 27°C 또는 45°C에서 60분 동안 인큐베이션 시킨 후 YPT1 및 ypt1-G80D 세포에서 시토졸 단백질 응집체의 양을 비교하였다. YPT1 세포에서 불용성 단백질 응집체의 양은 25°C보다 45°C에서 약간만 높았다. 그러나 ypt1-G80D 세포에서는 45°C에서 인큐베이션 시킬 때 훨씬 더 큰 증가가 관찰되었다(도 2A).
- [0058] 불용성 단백질의 양을 총 단백질의 양과 비교하여 정량화 하였다(도 2B). 27°C에서 최대 60분 동안 인큐베이션 시킨 후 YPT1 및 ypt1-G80D 균주에서 불용성 단백질의 백분율 간에는 유의미한 차이가 없었다. 45°C에서 인큐베이션 시킬 때 ypt1-G80D 균주에서 불용성 단백질의 백분율은 YPT1 균주에서보다 상당히 증가하였다(각각 21.5% 대 9.1%).
- [0060] 3. Ypt1p<sup>G80D</sup>는 생체 내에서 열 충격으로 인한 구조적 변화를 나타내지 않는다.
- [0062] 앞서 본 발명자들은 우리는 Ypt1p가 가역적인 온도 의존적 구조 변화를 나타냄을 확인하였다. 따라서 본 발명자들은 또한 Ypt1p<sup>G80D</sup>가 생체 내 및 시험관 내에서 온도-의존적 구조 변형을 경험하는지 여부를 측정하였다.
- [0063]
- [0064] 먼저, YPT1 및 ypt1-G80D 세포를 45°C에서 45분 동안 열충격 시킨 후 세포의 절반을 단백질 합성 억제제인 사이클로헥시미드를 함유하는 새로운 성장 배지에서 27°C에서 10시간 동안 회복시켰다. 이 샘플들의 총 단백질 추출물을 SDS-PAGE와 native-PAGE에 의해 분획화 시켰으며 Ypt1p/Ypt1p<sup>G80D</sup>를 항-Ypt1p 폴리클로날 항체로 면역 블롯팅하여 검출하였다.
- [0065]

- [0066] 예상한 바와 같이, 단량체 Ypt1p/Ypt1p<sup>G80D</sup>의 크기에 상응하는 23.5 kDa의 단일 단백질 밴드가 SDS-PAGE 겔의 모든 샘플에서 검출되었다(도 3A). 이전에 보고된 바와 같이, 천연-PAGE 분석은 열 충격 처리가 생체 내에서 Ypt1p를 함유하는 고분자량 단백질 복합체의 가역적 형성을 유도함을 확인하였다. 이와 대조적으로 ypt1-G80D 세포 추출물에서 항체는 비교적 좁은 범위의 밴드 크기를 검출하였다. 특히 열처리된 ypt1-G80D 세포의 추출물에서 고분자량 Ypt1p<sup>G80D</sup> 복합체는 관찰되지 않았다 (도 3A).
- [0068] 흥미롭게도, Ypt1p/Ypt1p<sup>G80D</sup>의 LMW 밴드는 YPT1 및 ypt1-G80D 세포에서 서로 다른 패턴을 나타내며, 천연-PAGE의 다른 위치에 더블렛이 존재한다(도 3A). 이것은 천연 PAGE에서 분석된 재조합 단백질과도 유사하다(도 3B, 상부 겔). Ypt1p<sup>G80D</sup>에서 Ypt1p의 80번째 잔기인 글리신이 아스파르트산으로 대체되는 것을 고려하면, 아미노산 대체는 단백질의 2차 또는 3차 구조에 영향을 미침으로써 겔의 크기 변화에 영향을 줄 수 있다.
- [0070] Ypt1p<sup>G80D</sup>를 함유하는 열-유도 고분자량의 응집체를 형성하는 ypt1-G80D 세포의 무력화가 크기 배제 크로마토그래피(SEC)에 의해 확인되었다. 열-처리 및 비처리 ypt1-G80D 세포로부터의 총 단백질 추출물을 SEC에 의해 분획화 하였다(도 7). 분획을 SDS-PAGE로 분석하고 Ypt1p<sup>G80D</sup> 함량을 웨스턴 블롯팅으로 측정하였다(도 7). ypt1-G80D 세포에서, Ypt1p<sup>G80D</sup>는 열처리에 관계없이 저분자량 단백질 분획(≤140 kDa)에서 주로 검출되었다.
- [0072] 4. Ypt1p<sup>G80D</sup>는 시험관 내에서 열 충격으로 인한 구조적 변화를 나타내지 않는다.
- [0074] 다음으로 본 발명자들은 정제된 박테리아 발현 재조합 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 열-유도 중합 가능성을 조사하였다. 이미 관찰된 바와 같이 정제된 재조합 Ypt1p의 열-유도 구조적 변화가 확인되었다(도 3B 및 3C). 천연-PAGE 분석을 통해 25°C 또는 45°C에서 인큐베이션 시킨 후 재조합 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 단백질 밴딩 패턴에서는 차이가 없으며 대부분의 Ypt1p<sup>G80D</sup> 단백질은 두 온도에서 저분자량 올리고머로 검출되었음이 나타났다(도 3B).
- [0075]
- [0076] 또한 SEC 분석을 통해 25°C 또는 45°C에서 배양된 샘플들 사이에는 현저한 차이가 나타나지 않았다(도 3C). Ypt1p<sup>G80D</sup> 샘플에서, 25°C 및 45°C에서 인큐베이션 시킨 후 각각 33.01분 및 32.86분의 체류 시간에서 주요 단백질 피크가 관찰되었으며, 이는 두 조건 하에서 저분자량 올리고머의 형성을 나타낸다.
- [0078] Ypt1p 샘플과는 달리, 약 17분의 체류 시간을 갖는 SEC 단백질 피크는 저분자량 올리고머에 상응하며 25°C 또는 45°C에서 인큐베이션 시킨 Ypt1p<sup>G80D</sup> 샘플에서는 거의 검출할 수 없었으며, 이는 Ypt1p<sup>G80D</sup>가 열 처리에 의해 고분자량 올리고머를 형성할 수 없음을 확인하는 것이다.
- [0080] 또한 본 발명자들은 프로브로서 4,4'-비스(1-아닐리노나프탈렌 8-설포네이트)(bis-ANS)를 사용하여 정제된 박테리아 발현 Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 열처리에 의한 소수성 변화를 조사 하였다.
- [0082] Bis-ANS의 단백질의 소수성 패치로의 결합은 최대 약 470nm의 방출로 형광을 야기한다. Ypt1p가 bis-ANS와 함께 배양되었을 때(도 3D), 470 nm에서의 형광 피크는 25°C 보다 45°C에서 인큐베이션 시킬 때 더 컸다.
- [0084] 대조적으로, Ypt1p<sup>G80D</sup>는 bis-ANS와 함께 25°C에서 인큐베이션 시킬 때 470nm에서 매우 적은 형광을 나타내었으며 45°C에서 인큐베이션 시킬 때 이러한 형광은 유의미하게 증가하지 않았다(도 3D). 이러한 결과는 Ypt1p<sup>G80D</sup> 및 Ypt1p의 형태가 25°C에서 상이하고 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 형태는 45°C에서 변화하지 않음을 나타낸다.
- [0086] 따라서 이러한 결과는 Ypt1p의 표면 소수성에 있어서 열-유도된 증가(도 3d) 및 고분자량 Ypt1p 단일-중합체의 형성(도 3B, C) 모두에 Gly<sup>80</sup>이 필요하다는 것을 나타낸다. 또한 Ypt1p<sup>G80D</sup>가 Ypt1p보다 적은 양의 노출 소수성 패치를 지니며 따라서 고분자량 복합체를 형성하는 경향이 더 낮음을 의미한다.
- [0088] 5. Ypt1p<sup>G80D</sup>는 GTPase 활성을 보유하나 분자 샤페론 활성을 상실한다.
- [0090] Ypt1p<sup>G80D</sup>는 온도에 관계없이 저분자량 형태로 존재하며 Ypt1p보다 소수성이 낮으므로(도 3D), Ypt1p와 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 구조적 차이가 기능의 차이를 유발하는지 여부를 조사하였다. 이를 위해 Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 샤페론 및

GTPase 활성을 측정하였다.

- [0092] 샤페론 활성을 조사하기 위해, 본 발명자들은 기질 단백질 말레이트 탈수소효소(MDH) 및 구연산 신타아제(CS)의 열-유도 변성을 방지하기 위한 Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 능력을 측정하였다. 변성된 MDH 및 CS의 불용성 단백질 응집체의 형성을 340nm에서 광 산란을 측정함으로써 모니터링 하였다(도 4A 및 도 8).
- [0094] MDH(1.67 μM) 및 CS(2 μM)를 단독으로 가열하거나 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 5배 몰 과량(8.35 μM) 또는 음성 대조군 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST) 단백질과 함께 가열할 때 광 산란이 급격하게 증가하였다. 그러나 5배 몰 과량의 Ypt1p의 존재 하에서 MDH(1.67 μM) 및 CS(2 μM)를 가열시킨 경우, 응집이 연속적으로 방지되어 Ypt1p의 분자 샤페론 활성이 확인되었다.
- [0096] 다음으로 본 발명자들은 Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 샤페론 활성의 온도-의존성을 조사하였다. MDH(1.67 μM)를 단독으로 가열하거나 25℃ 또는 45℃에서 30분간 인큐베이션 시킨 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 2배 몰 과량(3.34 μM)과 함께 가열할 때 광 산란이 급격하게 증가하였다(도 4B).
- [0098] 그러나 앞서 25℃에서 인큐베이션된 2배 몰 과량의 Ypt1p의 존재하에 MDH (1.67 μM)를 가열시킬 때, 응집은 약 50% 감소하였으며 앞서 45℃에서 인큐베이션된 Ypt1p의 존재 하에서는 실질적으로 감소되었다(도 4B). 이러한 발견은 Ypt1p의 샤페론 활성이 고온에서의 인큐베이션에 의해 향상되는 반면에 Ypt1p<sup>G80D</sup>는 온도에 관계없이 분자 샤페론 기능을 지니지 않음을 의미한다.
- [0100] 박테리아로 발현된 재조합 Ypt1p 및 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 GTPase 활성은 유사하였다(도 4c). 두 단백질 모두에서, GDP 형성은 1시간 후에 관찰되었으며 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP 기질의 대략 50%가 6시간 내에 가수분해 되었다. Ypt1p<sup>G80D</sup>는 천연 Ypt1p의 GTPase 활성의 거의 90 %를 유지하지만 샤페론 활성의 10 % 미만을 유지하였다(도 4D). 이러한 결과는 ypt1-G80D 변이체의 증가된 열-스트레스 민감도가 Ypt1p 샤페론 활성의 손실과 관련이 있음을 시사한다.
- [0102] 6. PBA는 ypt1-G80D 세포의 내열성을 향상시킨다.
- [0104] Ypt1p<sup>G80D</sup>에서 샤페론 기능의 부재가 ypt1-G80D 변이체의 열 민감성을 설명한다는 것을 추가로 확인하기 위해 본 발명자들은 YPT1 및 ypt1-G80D 균주의 열 민감도를 27℃ 또는 45℃에서 1시간 동안 화학적 샤페론인 나트륨 4-페닐부티르산(PBA)의 존재 또는 부재 하에 인큐베이션 시킴으로써 비교하였다. 27℃에서, PBA의 존재 또는 부재 하에서 균주 성장 간에 차이는 없었다. 45℃에서 인큐베이션 시킨 후 ypt1-G80D 변이체의 생존능은 PBA의 부재 하에서 YPT1 균주의 생존력보다 더 크게 감소되었다.
- [0105]
- [0106] 두 균주의 생존능은 PBA의 존재 하에 개선되었으나 개선은 YPT1 균주보다 ypt1-G80D 변이에 대해 더 두드러졌다(도 5A).
- [0108] 다음으로, 본 발명자들은 중간-대수기 세포의 비슷한 농도를 1mM PBA의 존재 또는 부재 하에서 45℃에서 최대 60분 동안 인큐베이션 시킨 후 두 균주의 생존을 비교하였다(도 5B). PBA는 생존 카운트를 측정하거나 TB 배제 에세이를 사용하여 측정한 바와 같이 45℃에서 YPT1 세포의 생존능에 영향을 미치지 않았다(도 5B, C).
- [0110] 대조적으로 PBA 노출은 ypt1-G80D 세포의 생존능을 증가시켰으나(도 5B, C), YPT1 균주에서는 눈에 띄는 수준으로 회복되지 않았다. 이러한 결과는 ypt1-G80D 변이체의 열 민감도가 Ypt1p<sup>G80D</sup>의 열-유도 샤페론 기능의 결핍에 기인한다는 결론을 지지한다.
- [0112] 7. 열-충격 하에서 추정 Ypt1p-조절 단백질의 동정
- [0114] 열-충격 효모 세포 내에서 세포 내 Ypt1p-조절 단백질을 동정하기 위해 YPT1 및 ypt1-G80D 세포를 27℃ 또는 45℃에서 1시간 동안 배양하고 총 단백질을 Velos LTQ 질량분석기를 사용하여 탠덤 MS(MS/MS)에 의해 분석하였다(도 9). 트립신화 된 펩타이드를 역상 나노유동 액체 크로마토그래피(LC)에 의해 분리한 후 고 에너지 충돌 해리(HCD) 모드에서 MS/MS 서열분석하고, 펩타이드 스펙트럼을 SEQUEST 알고리즘을 사용하여 사카로마이세스 세레비지에 단백질의 Uniprot 데이터베이스()에 대해 검색하였다.
- [0116] 충실도를 높이기 위해 컷오프를 99%의 펄스 발견 비율로 설정하였다. YPT1 세포의 총 단백질 분획으로부터, 27℃ 및 45℃에서 각각 356 및 255개의 단백질이 확인되었지만, ypt1-G80D 세포의 상응하는 수는 각각 340 및 293

개 단백질이었다. 27℃와 비교하여 45℃에서 인큐베이션된 YPT1 세포에서 총 73개의 단백질이 특이적으로 농축되었다(도 6). 비교하면, 27℃와 비교하여 45℃에서 인큐베이션된 ypt1-G80D 세포에서 89개의 단백질이 특이적으로 농축되었다(도 6).

- [0118] 알코올 탈수소효소 1p(Adh1p, E7LZZ9), 포스포릴라아제(Gph1p, B3LKC1), 바큐오라 단백질 분류 29p(Vps29p, E7KDB3), ADP-리보실화 인자 1(P11076), 리포아미드 탈수소효소 1p(Lpd1p, E7NH76) 및 YMR051C- 유사 단백질(E7QCY4)을 포함하는 6종의 열 유도 단백질이 두 균주에 대해 공통이었다.
- [0120] 총 49개의 단백질이 열처리된 YPT1 세포에서 구체적으로 농축되었으나 ypt1-G80D 세포에서는 열 충격-풍부 단백질 중에서는 확인되지 않았으며, 이는 이들 단백질이 Ypt1p의 Gly<sup>80</sup>에 직접적 또는 간접적으로 의존적임을 시사한다(표 1).
- [0122] YPT1-특이적 열충격-유도 단백질 중 23개는 대사에 관여하는 것으로 확인되었다. 8개는 단백질 합성, 조립 또는 수송에 관여한다. 7개는 세포 에너지 생성에 관여하고, 5개는 스트레스 반응에 관여하고, 3개는 DNA 조절에 관여하며, 나머지 3개 단백질은 "기타"로 확인되었다. 이 발견은 G80D 변이에 의한 열충격-유도 Ypt1p 샤페론 기능의 폐지가 대사 및 세포 에너지 생성을 방해함으로써 세포 생존능을 크게 저하시킨다는 것을 의미한다.
- [0124] 유기체는 환경 영양 유용성, 삼투압 균형, 온도 및 유해 물질의 존재 등이 끊임없이 변화하기 때문에 환경에 적응할 수 있어야 한다.
- [0126] 분자 샤페론 유전자의 기능 상실은 환경 스트레스로부터 세포를 보호하는 능력을 감소시킨다. 예를 들어 효모 세포는 cPrxI 및 cPrxII 유전자의 손실 후 열 충격 스트레스에 매우 민감하게 된다. 예상된 바와 같이 YPT1 유전자의 변이는 비-허용 온도에서의 결합있는 효모 성장을 유발한다.
- [0128] 대표적으로 ypt1-G80D 변이체 균주는 온도에 민감한 표현형을 나타낸다. 본 발명에서 ypt1-G80D 변이체 세포에서 G80D 변이의 생리학적 효과를 조사하였다. 본 발명자들은 Ypt1p<sup>G80D</sup>가 Ypt1p의 GTPase 활성의 대부분을 유지하지만 고분자량 복합체를 형성할 수 없으며 샤페론 기능이 부족하다는 것을 발견하였다(도 3, 도 4, 도 7 및 도 8).
- [0130] ypt1-G80D 변이체 균주는 열 충격에 노출되었을 때 YPT1 균주보다 생존능 손실이 더 컸으며(도 1 및 도 5) 이는 열충격-유도 증합반응과 분자 샤페론으로의 Ypt1p 기능 변환이 세포 생존에 결정적임을 의미하는 것이다. ypt1-G80D 균주의 성장 배지에 화학적 샤페론을 첨가하면 열 민감도가 감소한다(도 5).
- [0132] 따라서 본 발명자들은 열 스트레스를 경험하는 세포에서 고분자량 Ypt1p 폴리머의 비율이 증가하면 세포 내 단백질의 스트레스 유발 응집을 막는 데 도움이 된다고 제안한다(도 2).
- [0134] 일반적으로 소수성 영역은 적절히 폴딩된 단백질 내에 묻혀 있다. 그러나 세포가 열 충격 또는 산화 스트레스와 같은 심한 스트레스에 노출되면 단백질이 변성되고 소수성 영역이 노출된다. 연속적으로 외부 소수성 영역은 다수의 변성 단백질을 표적으로 하는 분자 샤페론에 의해 인식된다.
- [0136] 따라서 본 발명자들은 Ypt1p의 샤페론 기능이 결여된 ypt1-G80D 균주에서 수많은 불용성 단백질의 풍부를 관찰하였다(도 2). 스트레스를 받지 않은 및 열 충격을 받은 YPT1과 ypt1-G80D 세포에서 추출한 단백질의 단백질적 분석으로 YPT1 세포에서 열 충격에 의해 유도된 49개 단백질을 확인하였으나 ypt1-G80D 세포에서는 그렇지 않았다. 이는 Ypt1p의 샤페론 기능이 스트레스 하에서 이러한 특정 단백질의 풍부가 증가함에 필수적임을 의미하는 것이다(도 6).
- [0138] 이들 49개의 단백질에는 당분해 과정 및 트리카르복실산 사이클에 관여하는 다양한 효소 및 세포 에너지 생성, 단백질 합성, 단백질 조립 및 단백질 수송에 필요한 단백질이 포함되어 있다. 이러한 결과는 Ypt1p 샤페론 기능의 상실이 열 충격 하에서 세포 대사, 단백질 합성 및 에너지 생성에 문제를 야기시킬 수 있음을 의미한다.
- [0140] 스트레스-70 서브 패밀리 A 1p(Ssa1p, E7Q0L2), ATP 신타제 서브 유니트 베타(Atp2p, E7Q5S7), 무기 파이로포스파타제(Ipp1p, P00817), 포린(Por1p, B3LNR6) 및 번역 신장 인자 2(Eft2p, E7NN07)가 49개 단백질 중 가장 높은 펩티드-스펙트럼 매치를 나타내었다.
- [0141]
- [0142] 작은 G-단백질은 복잡한 세포 신호 처리 과정을 제어함으로써 대부분의 생물학적 프로세스에 영향을 미친다. 그들의 광범위한 세포 역할의 결과로, 작은 G-단백질의 부적절한 제어 및 기능 실패는 종종 인간 질병을

초래한다. 예를 들어, Rab GTPase의 기능 장애는 유전적 또는 후천적 인간 질병을 초래한다. 따라서 작은 G-단백질 및 이들의 조절제는 다양한 인간 의약품의 개발을 위한 표적이다.

- [0144] 이전의 연구는 주로 GTPase와 같은 작은 G-단백질의 기능에 중점을 두었다. 그러나 우리의 현재 발명은 작은 G-단백질의 지평을 새로운 분자 샤페론 계열로 확장하여 인간 질병을 치료할 수 있는 새로운 방법을 찾는 것이 가능할 수 있다고 제안한다.
- [0146] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다.
- [0148] (실시예 1) 효모 균주, 생존 가능성 분석 및 TB 배제 분석
- [0150] 동종 YPT1(SVL82; MaT $\alpha$ , ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1) 및 ypt1-G80D(SVL422; MaT $\alpha$ , ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, ypt1-G80D) 사카로마이세스 세레비지에 W303 균주를 27°C에서 YPD 배지에서 성장시켰다. 생존 카운트 분석을 위해, 효모 세포를 YPD 배지에서 밤새 성장시키고, 신선한 YPD 배지 내의 세포 ( $5 \times 10^7$  세포/mL)를 27°C 또는 45°C에서 인큐베이션 시켰다. 배양 후 0, 10, 20, 30, 40, 50 및 60분에 샘플을 회수하고 생존 분석을 수행하였다. 생존 가능한 세포 또는 콜로니 형성 단위의 수는 YPD 한천 플레이트 상에 적합한 희석물을 플레이트팅하고 27°C에서 2 내지 3일의 배양 후에 나타난 콜로니를 계수함으로써 결정되었다.
- [0152] 생존 분석에서 60분 시점에 YPT1 및 ypt1-G80D 세포의 샘플에 TB 염색 및 스팟 분석을 수행하였다. TB 염색의 경우, 1 mL의 세포를 원심 분리로 수확하고, PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 및 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>[pH 7.6])로 세척하고, PBS에 재현탁시킨 후 0.4% TB로 5 내지 10분 동안 염색하였다. 세포를 형광 현미경(일본 도쿄 소재의 올림푸스 광학사)으로 검사하고, 제조자가 제공한 소프트웨어를 사용하여 결과를 기록하였다. 스팟 분석을 위해, 배양물을 1.0의 Abs<sub>600nm</sub>로 조정하고 10배 연속 희석액의 분취량(6  $\mu$ l)을 YPD 한천에 분주하였다. 플레이트를 27°C에서 2-3일 동안 배양한 후 검사하였다.
- [0154] (실시예 2) 효모 세포에서 열충격-유발 세포질 단백질 응집의 분석
- [0156] 생존 분석에서 60분 시점에서의 세포 배양 샘플로 전술한 바와 같이 세포질 단백질 응집의 측정을 수행하였다. 동일한 세포 밀도에서 수확된 효모 세포를 단백질 분해 효소 억제제 칵테일(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)을 함유하는 용해 완충액(50 mM 인산칼륨 완충액[pH 7.0], 1 mM EDTA, 5% 글리세롤 및 1mM PMSF)에 재현탁시키고 0.25 부피의 zymolase 20T(10 mg/mL)를 첨가한 후 30°C에서 30분 동안 인큐베이션 하였다.
- [0158] 비드 비터(Biospec Products, Bartlesville, OK, 미국) 내에서 1분 동안 산-세척된 글래스 비드로 세포를 3 회 충돌시켜 세포를 파괴시켰다. 각 충돌 후 4°C에서 2분 동안 냉각시켰다. 짧은 원심분리로 온전한 세포를 제거한 후, 혼합물을 30분 동안 15,000g에서 원심분리하여 불용성 펠릿 분획 및 세포질 상청액으로 분리하였다. 이어서 막 및 응집된 단백질을 함유하는 불용성 펠릿 분획을 간단한 초음파 처리에 의해 320 $\mu$ l의 용해 완충액에 재현탁시켰다.
- [0160] 80 $\mu$ l의 10%(v/v) NP40을 첨가하고 15,000g에서 20분 동안 원심분리하여 막 단백질을 제거하였다. 펠릿 내의 NP40-불용성 단백질 응집체는 겔 전기영동에 의해 분석되었다. 세포질 및 불용성 분획 중의 단백질 농도를 측정하여 총 세포질 단백질 중 불용성 분획의 비율을 분석하였다.
- [0162] (실시예 3) 발현 플라스미드의 구축
- [0164] G80D-정방(5'-TCTTACTACCGTGATTCGCATGGGATC-3')(서열번호: 2) 및 G80D-역방(5'-GATCCCATGCGAATCACGGTAGTAAGA-3')(서열번호: 3) 프라이머를 사용하여 G80D 변이체를 생성하였다. 단일 아미노산의 치환은 전술한 바와 같이 QuickChange™ 부위-지정 변이 유발 키트(Stratagene, La Jolla, USA)를 사용하여 수행하였다. pGEX-ypt1<sup>G80D</sup>를 생성하기 위해, pGEMT-YPT1 플라스미드를 표적으로 함으로써 변이가 수행되었다. 이어서 생성된 플라스미드를 BamHI 및 HindIII로 절단시킴으로써 삽입물을 방출하고, pGEX-2T 벡터의 상응하는 부위로 클로닝 하였다.
- [0166] (실시예 4) 재조합 단백질의 정제 및 폴리클로날 항체의 생성
- [0168] pGEX-YPT1 및 pGEX-ypt1<sup>G80D</sup> 벡터를 대장균 BL21(DE3)pLysS 세포로 형질 전환시켰다. 이어서 세포를 암피실린(50  $\mu$ g/mL)이 보충된 LB 배지 내에서 37°C에서 배양 하였다.
- [0170] 대략 0.5-0.6의 흡광도<sub>600nm</sub>에서, 0.2 mM 이소프로필- $\beta$ -D-티오갈락토-피라노사이드의 첨가에 의해 단백질 발현이 유도되었다. 30°C에서 추가로 4시간 배양한 후, 세포를 6000g에서 6분 동안 원심분리하여 수확하였다. 펠릿을 1

mM PMSF를 함유하는 PBS 완충액에 재현탁 시키고 -70℃에서 저장하였다. GSH-아가로스 수지를 사용하여 세포로부터 GST-융합된 Ypt1p 단백질을 정제하고, 전술한 바와 같이 트롬빈 절단에 의해 GST-태그를 제거 하였다. Ypt1p 단백질은 전술한 바와 같이 TSK 헤파린-5PW HPLC 컬럼(7.5×75 mm)을 사용하여 추가로 정제하였다.

[0172] GSH 컬럼에서 가능한 공동-정화 오염물질인 DnaK는 제조사(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, 미국)의 지시에 따라 ATP-아가로스 컬럼을 사용하여 제거되었다. 순수한 Ypt1p 단백질을 사용하기 전에 20mM HEPES(pH 8.0)에 대해 투석하였다. 정제된 Ypt1p를 토끼의 면역화에 사용하여 폴리클로날 항체를 획득하였다.

[0174] (실시예 5) 크기 배제 크로마토그래피

[0176] SEC는 100 mM NaCl을 함유하는 50 mM HEPES(pH 8.0) 완충액으로 평형화된 Superdex 200 HR 10/30 컬럼에서 0.5 mL/분의 유속으로 전술한 바와 같이 수행되었다(AKTAFPLC; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, 미국). 단백질(흡광도<sub>280nm</sub>) 피크를 모으고 Centricon YM-30(Millipore Corp., Bedford, MA, 미국)을 사용하여 농축시켰다.

[0178] (실시예 6) GTPase 활성 분석

[0180] GTPase 활성 측정을 위해 박층 크로마토그래피(TLC) 기술이 약간 수정되었다. GTPase 반응을 0.1 μM [<sup>32</sup>P]GTP 및 2 μg의 Ypt1p를 함유하는 200 μL의 HEDL 완충액(20 mM Tri-HCl[pH 7.5], 2 mM EDTA 및 10 mM DTT) 내에서 30℃에서 수행하였다.

[0182] 적절한 시간 간격으로 10 μL 분취량을 빼내고 0.5 μL의 0.5M EDTA(pH 8.0)에 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이어서 이 혼합물의 2 μL 분취량을 PEI-셀룰로오스 TLC 플레이트에 점종하였다. 플레이트를 0.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 3.4)에서 인 화하고, 건조시킨 후 전술한 바와 같이 X-선 필름에 노출시켰다.

[0184] (실시예 7) bis-ANS 형광 측정

[0186] 단백질(20mM HEPES 내의 30 μg/mL, pH 8.0) 및 bis-ANS(10 μM; Sigma-Aldrich)를 포함하는 반응 혼합물을 다양한 온도에서 30분 동안 배양시킨 후 400 내지 600nm 사이의 형광 스펙트럼 SFM25 분광형광계(Kontron, Zurich, 스위스)를 사용하여 380nm의 여기 파장에서 획득되었다.

[0188] (실시예 8) LC/MS 분석

[0190] YPD 배지 내에서 YPT1 및 ypt1-G80D 세포 배양물을 1.0의 흡광도<sub>600nm</sub>로 조정하고 27℃ 또는 45℃에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 원심분리로 수확하고, 배양 배지를 피펫팅에 의해 완전히 제거하였다. 총 단백질 샘플을 제조하기 위해, 막자 및 유발을 사용하여 효모 세포를 용해 완충액(8M 우레아, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 50mM 트리스[pH 8.0])에 용해시켰다. 이어서 8M 우레아 샘플을 동일한 부피의 20mM 트리스[pH 8.0]로 4M 우레아의 최종 농도로 희석시켰다. 트립신을 2mM CaCl<sub>2</sub>와 함께 1:50의 효소/단백질 비율로 용액에 첨가하였다.

[0192] 분해 후, 트립신 분해물을 C18 고체상 추출 피펫 팁(SPEC PT C18; Varian, Lake Forrest, CA, 미국)을 사용하여 탈염시키고, 진공 건조시킨 후 95% 물, 5% 아세트오니트릴, 및 0.1% 포름산 10mL에 재구성시켰다. 전기분무 이온화 FT/이온-트랩 질량 분석기(LTQ Orbitrap Velos; Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, 미국)에 온라인으로 연결된 나노 유동 액체 크로마토그래피(nanoAcquity; Waters Corp., Milford, MA, 미국)로 구성된 시스템을 사용하여 전기분무 이온화 MS에 의해 샘플을 분석하였다.

[0194] LC 분리는 3 μm 직경, 100Å 기공 크기, C18 비드(Magic C18; Bruker, Billerica, MA, 미국) 15cm로 채워진 100×365 μm 용융 실리카 모세관 마이크로 컬럼을 사용하였고, 이미터 팁은 레이저 폴리(Sutter Instruments)를 사용하여 약 2 μm 까지 당겨졌다. 펌프를 500 nL/분의 유속으로 30분 동안 컬럼에 로딩한 다음, 0.1% 포름산 내에서 2-30% 아세트오니트릴의 구배로 200 nL/분의 유속에서 120분에 걸쳐 용출시켰다.

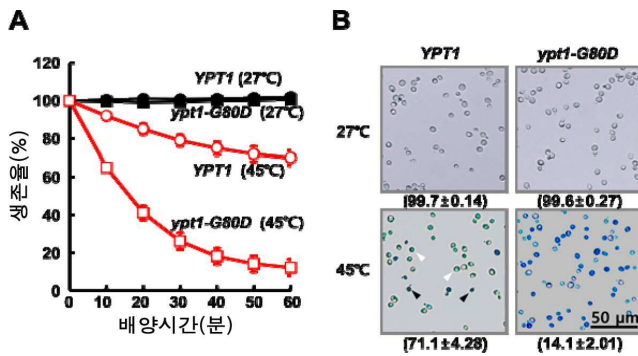
[0196] 60,000의 해상도에서 300과 1500의 질량-대-전하 비율 사이의 FT 레도에서 전체 질량 스캔을 수행한 후, 42%의 상대 충돌 에너지 및 7500 해상도에서 100 질량-대-전하 비율에서 시작하는 질량 범위로 10개의 가장 높은 강도 부모 이온에 대한 10개의 MS/MS HCD 스캔이 이어졌다. 30초 동안 반복 횟수 2와 120초의 제외 기간으로 동적 제외가 활성화 되었다. 획득된 전구체 MS 및 MS/MS 스펙트럼을 SEQUEST 버전 1.2 (ThermoFisher Scientific)를 사용하여 사카로마이세스 세레비지에 단백질의 Uniprot 데이터베이스(<http://www.uniprot.org/>)에 대해 검색하였다.

[0198] 전구체 및 단편 이온의 질량을 단일 동위원소로 처리하였다. 데이터베이스 검색은 최대 2 개의 누락된 트립신 절단을 허용하였고, 이온 질량은 전구체 질량의 경우 10 ppm, HCD 단편의 경우 0.1 D의 질량 허용 오차와 일치하였다. 확실하는 단백질 식별에 필요한 최소 2개의 펩타이드 일치와 함께 1%의 오차 발견 비율을 사용하여 데이터를 필터링 하였다.

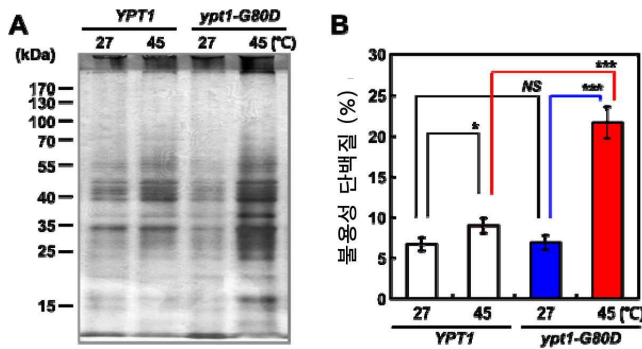
[0200] MS 분석으로부터의 펩타이드 서열을 사용한 데이터베이스 검색은 30°C 또는 45°C YPT1 샘플에 대해 각각 356 및 255 단백질, 및 *ypt1-G80D* 세포에 대해 각각 340 및 293 단백질을 확인하였다. 확인된 단백질은 공개 소프트웨어 VENNY를 사용하여 공유 또는 특정 그룹에 대해 추가로 분석되었다.

도면

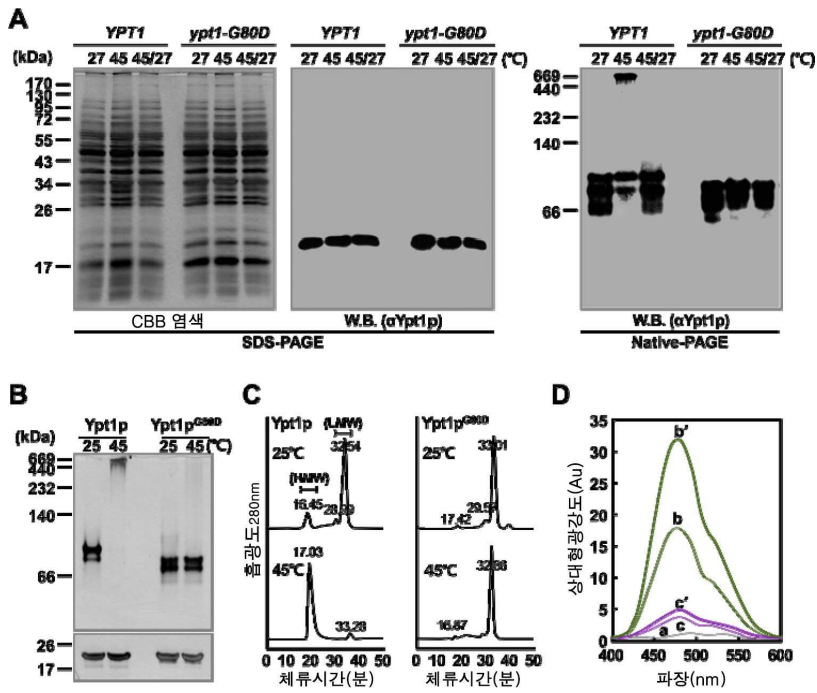
도면1



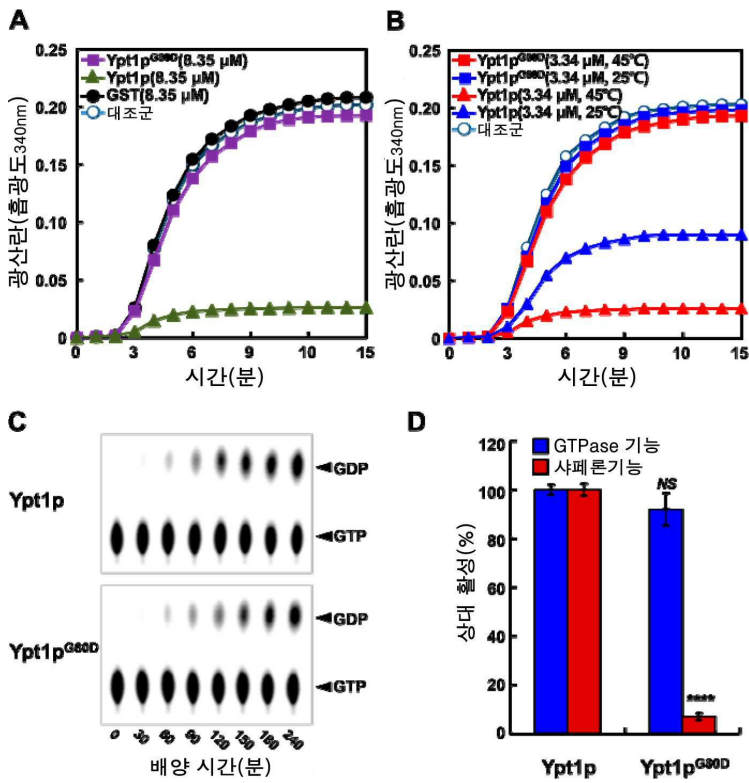
도면2



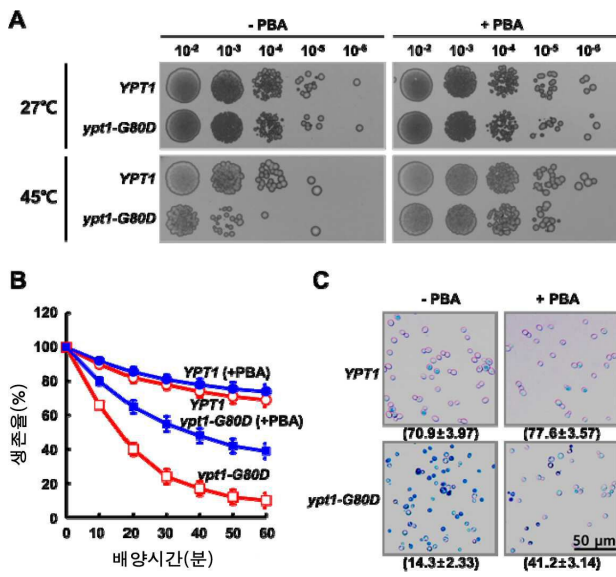
도면3



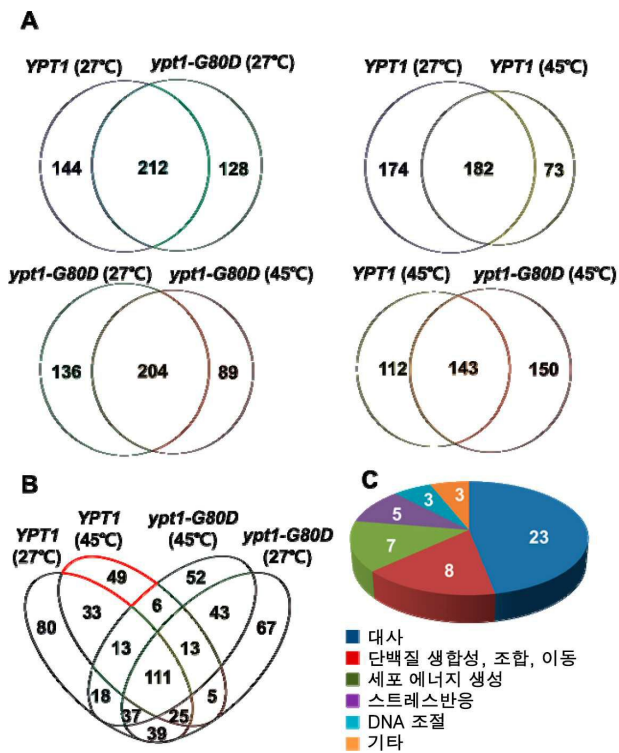
도면4



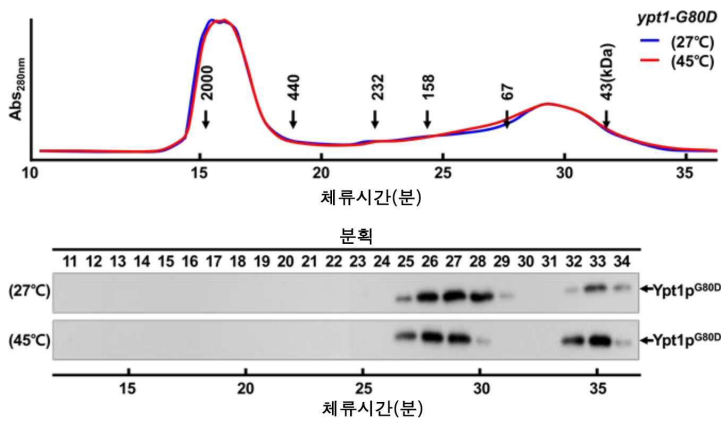
도면5



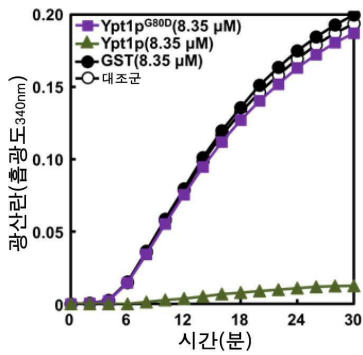
도면6



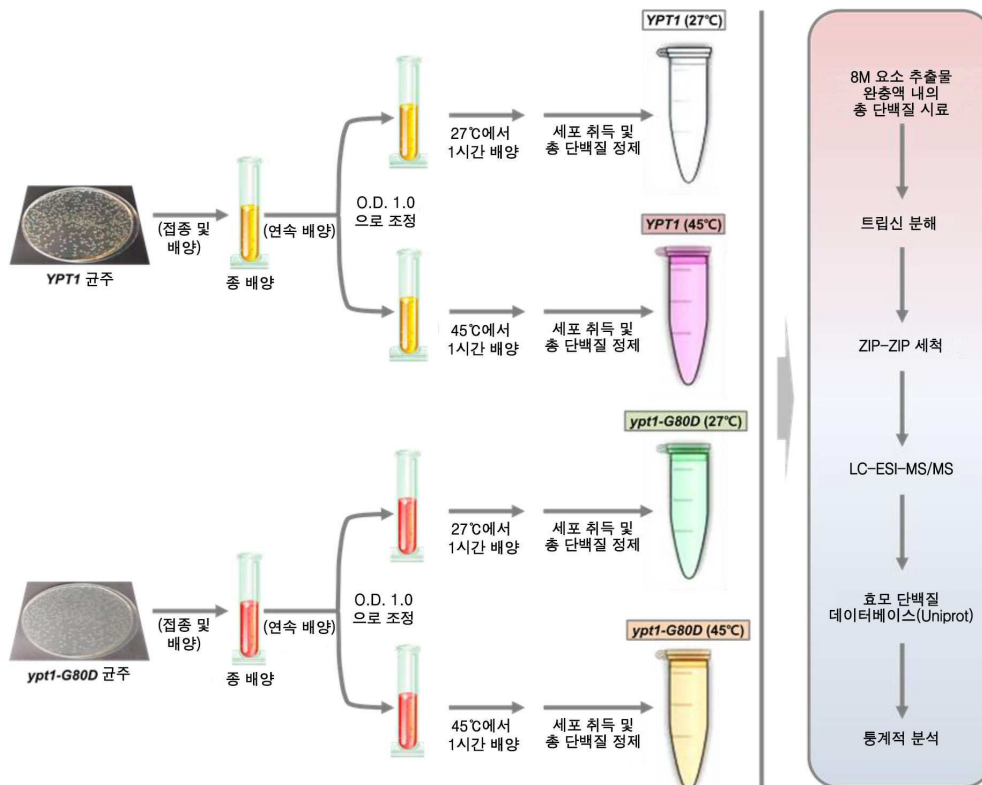
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Mutated Ypt1p yeast protein composition knocking out the heat stress resistance
- <130> KP-1033
- <160> 3
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 206
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis thaliana
- <400> 1

Met Asn Ser Glu Tyr Asp Tyr Leu Phe Lys Leu Leu Leu Ile Gly Asn  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Gly Val Gly Lys Ser Cys Leu Leu Leu Arg Phe Ser Asp Asp Thr  
                   20                    25                    30  
 Tyr Thr Asn Asp Tyr Ile Ser Thr Ile Gly Val Asp Phe Lys Ile Lys  
                   35                    40                    45  
 Thr Val Glu Leu Asp Gly Lys Thr Val Lys Leu Gln Ile Trp Asp Thr  
                   50                    55                    60  
 Ala Gly Gln Glu Arg Phe Arg Thr Ile Thr Ser Ser Tyr Tyr Arg Gly  
                   65                    70                    75                    80  
 Ser His Gly Ile Ile Ile Val Tyr Asp Val Thr Asp Gln Glu Ser Phe  
                   85                    90                    95  
  
 Asn Gly Val Lys Met Trp Leu Gln Glu Ile Asp Arg Tyr Ala Thr Ser  
                   100                    105                    110  
 Thr Val Leu Lys Leu Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Lys Asp Lys  
                   115                    120                    125  
 Arg Val Val Glu Tyr Asp Val Ala Lys Glu Phe Ala Asp Ala Asn Lys  
                   130                    135                    140  
 Met Pro Phe Leu Glu Thr Ser Ala Leu Asp Ser Thr Asn Val Glu Asp  
                   145                    150                    155                    160  
 Ala Phe Leu Thr Met Ala Arg Gln Ile Lys Glu Ser Met Ser Gln Gln

	165		170		175										
Asn	Leu	Asn	Glu	Thr	Thr	Gln	Lys	Lys	Glu	Asp	Lys	Gly	Asn	Val	Asn
	180		185		190										
Leu	Lys	Gly	Gln	Ser	Leu	Thr	Asn	Thr	Gly	Gly	Gly	Cys	Cys		
	195		200		205										
<210>	2														
<211>	27														
<212>	DNA														
<213>	Artificial Sequence														
<220><223>	Primer														
<400>	2														
tcttactacc	gtgattcgca	tgggatc													27
<210>	3														
<211>	27														
<212>	DNA														
<213>	Artificial Sequence														
<220><223>	Primer														
<400>	3														
gatcccatgc	gaatcacggt	agtaaga													27