

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.⁷
C12Q 1/68

(45) 공고일자 2005년03월10일
(11) 등록번호 10-0475645
(24) 등록일자 2005년02월28일

(21) 출원번호 10-2002-0079882
(22) 출원일자 2002년12월13일

(65) 공개번호 10-2003-0086216
(43) 공개일자 2003년11월07일

(30) 우선권주장 1020020024460 2002년05월03일 대한민국(KR)

(73) 특허권자 한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자 원미선
대전광역시서구월평동한아름아파트110-1407

유향숙
대전광역시동구용전동신동아아파트3동406호

장영주
대전광역시유성구어은동한빛아파트133-1104

정경숙
대전광역시유성구어은동한빛아파트136-1203

박조영
대전광역시유성구어은동한빛아파트121-604

허광래
대전광역시유성구어은동한빛아파트130-1403

최영철
대전광역시유성구전민동464-1엑스포아파트406동1401호

이용욱
대전광역시유성구전민동삼성푸른아파트105-1502

김동욱
대전광역시유성구전민동464번지엑스포아파트504-1702

이민연
대전광역시유성구궁동다솔아파트101-1001

박한오
대전광역시유성구전민동464-1번지엑스포아파트208-601

유석중
충청북도청주시흥덕구가경동진로아파트104-201

김형배
서울특별시송파구문정동훼미리아파트220-701

(74) 대리인 이원희

심사관 : 백경업

(54) 유전자 결손 분열효모 돌연변이 균주를 이용한 약물 검색방법

요약

본 발명은 유전자 결손 카세트를 이용하여 표적 유전자를 제거시킨 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주, 이의 제조방법 및 이를 이용한 약물 검색 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 PCR 방법으로 분열효모에서 저항성을 나타내는 항생마커, 결손된 유전자를 구별하기 위한 표식염기 및 공통 프라이머로 구성된 유전자 결손 카세트를 제조하고, 상기 유전자 결손 카세트를 분열효모에 형질전환시킨 후 유전자 결손을 확인함으로써 제조된 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주, 이의 제조방법 및 이를 이용한 약물 검색 방법에 관한 것이다. 본 발명의 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주는 약물에 민감하게 반응하므로, 약물 표적 검색에 활용될 수 있으며 결손된 유전자의 기능 보상을 통한 관련 유전자의 기능 연구 및 미확인 유전자의 기능 분석에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 2b

명세서

도면의 간단한 설명

도1a는 컴퓨터 알고리즘에 의해 21개의 공통 프라이머를 디자인한 후 염색체 DNA를 전사틀로 하여 각 조합의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 결과이며,

도1b는 비특이적인 PCR 산물을 적게 만드는 프라이머를 선택하여 온도의 변화에 따른 PCR 산물의 생성을 조사한 결과이고,

도2a는 PCR의 전사틀로 사용하는 플라스미드 pFA6-kanMX4의 개략도이며,

도2b는 본 발명의 유전자 결손 카세트의 모식도이고,

도2c는 유전자 결손 돌연변이 균주의 제조에 사용할 유전자 결손 카세트를 PCR 방법으로 제조하는 과정을 나타낸 모식도이고,

도3a는 *nda2* 유전자의 결손을 확인한 콜로니 PCR 결과이고,

도3b는 *psp1* 유전자의 결손을 확인한 콜로니 PCR 결과이고,

도4a는 *nda2* 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 액체배지에서의 치아벤다졸(thiabendazole, 이하 'TBZ'라 함) 민감성을 나타낸 것이고,

도4b는 *nda2* 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 고체배지에서의 TBZ민감성을 SP286 균주 및 *psp1* 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주와 비교한 것이고,

도5a는 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 액체배지에서의 TBZ 민감성을 나타낸 것이고,

1: SP286, 2: *nda2*, 3: *pak1*, 4: *crm1*, 5: *ste7*,

6: *ste11*, 7: *dis3*, 8: *dis2*, 9: *rad16*, 10: *rad24*,

11: *chk1*, 12: *cds1*, 13: *cdr1* 및 14: *cdc24*

도5b는 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 고체배지에서의 TBZ 민감성을 나타낸 것이고,

1: SP286, 2: *nda2*, 3: *pak1*, 4: *crm1*, 5: *ste7*,

6: *ste11*, 7: *dis3*, 8: *dis2*, 9: *rad16*, 10: *rad24*,

11: *chk1*, 12: *cds1*, 13: *cdr1* 및 14: *cdc24*

도 6은 SP286 및 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 일정비율로 혼합하여 배양한 후 *nda2*의 상대적인 양을 확인한 것이며,

1: SP286, 2: nda2, 3: pak1, 4: crml1, 5: ste7,
 6: ste11, 7: dis3, 8: dis2, 9: rad16, 10: rad24,
 11: chk1, 12: cds1, 13: cdr1 및 14: cdc24

도 7a는 RT-PCR을 이용하여 nda2 유전자를 분열효모 발현벡터에 클로닝한 벡터를 나타낸 것이고,

도 7b는 nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주에 nda2 유전자를 발현시킨 후 TBZ 민감성의 변화를 보여준 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 이용한 약물 표적 검색에 관한 것으로, 보다 상세하게는 PCR 방법으로 제조된 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주, 이의 제조방법 및 이를 이용한 약물 표적 검색 방법에 관한 것이다.

신약을 개발하기 위해 사용하는 방법으로는 조합 화학적(combinatorial chemistry) 방법 및 유전체 기능학(functional genomics)을 이용한 방법이 있다. 조합 화학적 방법은 알려진 약물 표적을 대상으로 유기화학적으로 합성된 화합물 라이브러리를 스크리닝하는 방법이며, 유전체 기능학을 이용한 방법은 동물세포 또는 대상 세포에 특정 약물을 처리한 후 DNA 칩을 이용하여 미처리군과 비교했을 때 발현 양상이 다른 유전자를 찾아내어 약물의 효과 및 질환과 관련된 유전자군을 찾는 방법이다. 유전체 기능학을 이용한 방법의 경우 약물에 반응하는 작용기전 및 목표 유전자(target gene)를 예측할 수 있으나, 비용이 많이 들고 정확한 목표 유전자를 찾기 위한 보완 연구도 함께 진행되어야 하기 때문에 번거로운 방법이다. 이에, 유기합성된 화학 라이브러리(chemical library) 또는 천연물을 사용하여 약물의 효과에 따라 세포내에서 유사한 발현현상을 보이는 약물을 탐색하는 방법으로 신약 개발에 접근하거나, 분열효모의 생장에 영향을 미치는 약물을 이용하여 표적유전자만을 찾아내는 세포내 분석(in vivo assay) 방법으로 유전자 결손 돌연변이를 이용한 약물의 표적 유전자 검색 방법이 사용된다. 후자의 방법은 특정 약물에 대한 이형접합체 돌연변이의 민감도 변화를 대량으로 측정함으로써 모든 가능한 표적 유전자를 쉽게 찾을 수 있는 방법으로 특정 약물, 독소, 천연혼합물 등에 대한 표적유전자 탐색에 유용하다.

유전자가 결손된 돌연변이는 유전자 특이적인 표현형(phenotype)을 나타내므로 유전자의 기능을 연구하는 효율적인 수단으로 사용된다. 일반적으로 효모 또는 분열효모에서 사용하는 유전자 결실 돌연변이 균주의 제조방법은 1 단계 유전자 결손법(one-step gene deletion)으로 표적 유전자의 양쪽 끝 부위의 작은 DNA 단편을 마커 유전자의 양끝에 클로닝하여 유전자 결손용 DNA 단편을 제조한 후 이를 세포 내로 도입시키면 세포 내에서 상동성 유전자 재조합(homologous recombination)이 일어나 염색체 상의 표적 유전자와 마커 유전자의 치환이 일어나게 되어 마커 유전자가 염색체로 들어가고 표적 유전자의 결손이 일어나는 것이다.

분열효모에서 표적 유전자의 결손을 위한 마커로 현재 사용되는 것으로는 아미노산 또는 핵산 합성에 요구되는 영양요구 마커(auxotrophic marker)인 ura4, leu1, his3 등이 있다. 그러나, 이러한 마커를 이용하려면 반드시 한 개 또는 그 이상의 영양요구 돌연변이(auxotrophic mutation)가 있는 균주를 반드시 사용해야 한다. 또, DNA 도입에 의한 영양요구 돌연변이의 유전자 전환(gene conversion)이 일어날 수 있고 영양요구 돌연변이가 자체가 다른 돌연변이와 함께 삼투압 감수성(osmosensitivity) 또는 질소 결핍에 의한 분화(nitrogen-starvation regulated cellular differentiation), 포자형성(sporulation), 의사균사(pseudohyphae) 등의 예측하기 힘든 표현형을 나타낼 수 있으며 또한, 많은 영양요구 돌연변이는 일반 배지에서 성장저해를 나타내는 경우가 있다.

따라서, 영양요구 마커의 이러한 한계를 극복하기 위하여 필립센(Philippsen) 연구팀은 항생 마커(dominant drug resistance marker)인 kanMX 모듈을 개발하였다. 이것은 효모의 유전자를 결손시키는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 결손 프로젝트(deletion project)에도 사용되었다. kanMX 모듈은 대장균 트랜스포존(transposon) Tn903의 kan^r으로 알려진 전사 해독틀(open reading frame, 이하 'ORF'라 함)을 진균 아시바로시피(*Ashbya gossypii*)의 TEF 유전자의 전사(transcriptional)와 번역(translational) 조절 부위에 접합시킨 것으로 항생제인 G418에 저항성을 나타내어 선택 마커(selection marker)로 사용 가능하도록 제조되었다. 유전자 결손의 경우 PCR 산물을 사용하거나 재조합(recombination)이 일어날 표적 유전자(target gene)의 상동(homology) 부위가 적을 경우 잘못된 삽입의 빈도가 높게 나타난다. G418의 마커는 우성적 저항성(dominant resistance)을 나타내는 이중 선택 마커(heterologous selection marker)로, PCR-DNA 단편 사용시에도 유전자 결손의 확률이 높아 영양요구 마커에 비해 장점이 있다. 현재 히그로마이신 B(hygromycin B), 노우세오트리신(nourseothricin), 바이알라포소/포스피노트리신(bialaphos/phosphinotricin)의 우성적 약제 저항성 마커(dominant drug resistance marker)가 개발되어 있다. 한편, 분열효모에서 표식염기를 사용하여 표식된 돌연변이 제조는 아직 실행된 바가 없었다.

이에, 본 발명은 많은 시간과 노동력을 필요로 하는 유전자 클로닝 대신 항생마커, 표식염기, 표식염기를 증폭할 수 있는 공통 프라이머 및 표적 유전자의 서열이 포함되도록 PCR로 증폭하여 유전자 결손 카세트를 제조하고, 상기 유전자 결손 카세트를 분열효모에 형질전환시켜 제조한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주가 목표 유전자에 작용하는 약물을 검색하는데 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로서 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 표적 유전자를 제거시키고 표식염기가 있게 유전자 결손 카세트를 제조한 후 이를 형질 도입하여 제조한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주, 이의 제조방법, 이를 이용한 약물 검색 방법 및 유전자 기능 검색 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PCR 방법으로 표적 유전자를 제거시키고 표식염기가 있게 유전자 결손 카세트를 제조한 후 이를 형질 도입하여 제조하는 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 이용한 약물 검색방법 및 유전자 기능 검색방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 PCR 방법으로 표적 유전자를 제거시키고 표식염기가 있게 유전자 결손 카세트를 제조한 후 이를 형질 도입하여 제조한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주 및 이의 제조방법을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명은 마커로는 분열효모에서 저항성을 나타내는 항생마커를 사용하며, 결손된 유전자의 종류에 따라 특정한 표식염기를 붙여 다른 돌연변이와 구별될 수 있도록 하여 PCR을 수행하여 유전자 결손 카세트를 만든 후 상기 유전자 결손 카세트를 분열효모에 형질전환시켜 제조한 특정 표식염기를 지닌 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주 및 이를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명의 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 제조하는 방법은

- (1) 마커 유전자, 표식염기, 공통 프라이머, 제한효소 인식부위 및 표적 유전자 특이적 염기서열을 포함하는 표적 유전자 결손 카세트를 제조하는 단계;
- (2) 단계 1의 표적 유전자 결손 카세트를 분열효모에 형질전환시키는 단계; 및
- (3) 형질전환된 분열 효모에서 표적 유전자의 결손을 확인하는 단계로 구성된다.

상기 단계 1에 있어서, 유전자 결손 카세트를 제조하는 것은 PCR 방법에 의해 수행하는 것을 특징으로 하며, 유전자 결손 카세트는 마커 유전자를 중앙에 두고, 표식염기, 공통 프라이머, 제한효소 인식부위 및 표적 유전자 특이적 염기서열 좌우에 위치하는 것을 특징으로 한다. 유전자 결손 카세트를 제조하는 방법은 마커 유전자의 일부 서열, 제한효소 인식부위, 표식염기, 제한효소 인식부위, 공통 프라이머 및 표적 유전자 특이적 염기서열을 포함하도록 프라이머를 제작한후 마커 유전자를 전사틀로 하여 PCR 반응을 수행해 제조하는 것이다. PCR 반응을 수행하는데 있어서, 반응의 횟수는 1회로 수행할 수도 있고, 수회를 거쳐 표적 유전자 특이적 염기서열의 갯수를 점차 늘여가며 수행해도 무방하다. 바람직하게는, 상기 유전자 결손 카세트는 도 2b의 구조를 가진다.

상기에서, 표적 유전자 결손 카세트에 포함된 마커 유전자로는 항생마커 또는 영양요구마커 유전자인 것이 바람직하며, 항생마커 유전자인 것이 가장 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 항생마커 유전자로 G418에 저항성을 나타내는 kan^r 유전자를 사용하였다.

상기에서, 공통 프라이머는 분열효모의 유전자와 상동성이 없는 서열로 표식염기를 증폭시킬 때 비특이적인 DNA를 증폭시키지 않게 하기 위해 제조한 것으로, 서열번호 1로 기재된 C10 및 서열번호 2로 기재된 C11인 것이 바람직하다.

상기에서, 표식염기의 염기서열은 20-30개의 DNA 염기로 구성된 한 쌍으로 유전자 결손 돌연변이 균주의 표식을 목적으로 한다. 표식염기가 표식할 결손 돌연변이 균주의 유전자는 모든 유전자가 될 수 있으며, (a)nda2(GeneBank #K02841), (b)psp1(GeneBank #L36906), (c)pak1(GeneBank #L41552), (d)crm1(GeneBank #AF208056), (e)ste7(GeneBank #AB036789), (f)ste11(GeneBank #AB025942), (g)dis3(GeneBank #M74094), (h)dis2(GeneBank #M27068), (i)rad16(GeneBank #X71595), (j)rad24(GeneBank #X79206), (k)chk1(GeneBank #NM001274), (l)cds1(GeneBank #AJ222869), (m)cdr1(GeneBank #X57549) 및 (n)cdc25(GeneBank #M13158) 유전자로 구성된 균으로부터 선택될 수 있으며 목적하는 바에 따라 어떤 유전자든지 선택되어 사용될 수 있다. 상기 유전자 중에서 nda2 유전자는 세포내 미소관(microtubule) 합성에 필수적인 유전자이다(Adachi Y *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 1986, 6, 2168-2178). 본 발명의 바람직한 실시예에서는 상기 각각 유전자에 대한 표식염기로 각각 (a)서열번호 3 및 서열번호 4, (b)서열번호 5 및 서열번호 6, (c)서열번호 7 및 서열번호 8, (d)서열번호 9 및 서열번호 10, (e)서열번호 11 및 서열번호 12, (f)서열번호 13 및 서열번호 14, (g)서열번호 15 및 서열번호 16, (h)서열번호 17 및 서열번호 18, (i)서열번호 19 및 서열번호 20, (j)서열번호 21 및 서열번호 22, (k)서열번호 23 및 서열번호 24, (l)서열번호 25 및 서열번호 26, (m)서열번호 27 및 서열번호 28 및 (n)서열번호 29 및 서열번호 30으로 기재된 한 쌍을 사용하였다.

상기에서, 결손시키고자 하는 표적 유전자 특이적 서열은 표적 유전자의 ORF(open reading frame)의 아미노기 말단과 카복실기 말단의 염기서열로 구성된 한 쌍이며, 염기서열의 길이는 60 내지 150 bp인 것이 바람직하다. 상기 표적 유전자 특이적 서열이 너무 짧을 경우 상동성 재조합이 일어나기 힘들다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 표적 유전자 특이적 서열로 표적 유전자 ORF의 아미노기 말단과 카복실기 말단의 80bp 길이의 염기서열로 구성된 한 쌍의 염기 서열을 제조하였다. 상기 표적 유전자 특이적 서열은 알려진 유전자의 ORF 서열을 이용하여 아미노기 말단 및 카복실기 말단의 서열을 이용하여 제조할 수 있으며, 이는 당업자에게 있어서 용이하게 할 수 있는 방법이다.

본 발명의 표적 유전자로는 *nda2*, *psp1*, *pak1*, *crml1*, *ste7*, *stel1*, *dis3*, *dis2*, *rad16*, *rad24*, *chk1*, *cds1*, *cdr1* 및 *cdc25*로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

상기 단계 2에 있어서, 분열효모는 스킨조사카로마이세스 폼베인 것이 바람직하며 반드시 이에 한정되는 것이 아니고, 상기 분열효모 이외에도 다른 분열효모를 사용하여도 무방하다. 상기 형질전환 단계를 통해 제조된 돌연변이 균주는 유전자 결손 카세트내에 존재하는 표적 유전자 특이적 염기서열이 세포내 상동성 재조합에 의해 분열효모의 염색체 상에 존재하는 표적 유전자의 염기서열과 치환되어 표적 유전자가 염색체 상에서 결손되도록 한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주이다.

상기 단계 3에 있어서, 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 유전자 결손을 확인하는 방법으로는 표식염기를 탐침자(probe)로 하여 혼성반응(hybridization)으로 수행하거나, 콜로니 PCR 등의 공지의 방법으로 확인할 수 있으며, 바람직하게는 콜로니 PCR 방법으로 수행할 수 있다. 상기 콜로니 PCR은 콜로니의 건조 단계 및 표적 유전자 결손 카세트 내의 염기서열을 사용하여 PCR을 수행하는 단계를 포함한다. 콜로니 PCR을 이용하여 유전자 결손을 확인하는 방법은 기존의 방법보다 간단하고 빨리 효율적으로 유전자 결손을 확인할 수 있는 장점이 있다.

또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 제공한다.

본 발명자들은 상기 방법에 의해 표적 유전자를 결손시킨 이형접합체 돌연변이 균주를 제조하고, 이 중에서 *nda2* 유전자를 표적 유전자로 하여 제조한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 '스킨조사카로마이세스 폼베 NY_BG2662_0'이라 명명하고 2002년 4월 3일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였으며(수탁번호: KCTC 10220BP), *psp1* 유전자를 표적 유전자로 하여 제조한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 '스킨조사카로마이세스 폼베 NY_BG3847_0'이라 명명하고 2002년 4월 3일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 10221BP).

본 발명의 방법에 의해 제조된 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주는 약물 표적을 검색할 수 있으며, 다양한 약물에 대한 표적 유전자를 탐색하여 신약 개발에 사용할 수 있으며, 표적 유전자의 기능 및 서로 관련 있는 유전자들의 기능 연구에 활용될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 이용한 약물 검색 방법을 제공한다.

본 발명의 약물 검색 방법은 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 약물이 포함된 배지에서 배양하여 균주의 성장 정도를 비교함으로써 검색할 수 있다.

상기 약물 검색 방법은 본 발명의 방법으로 제조한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 각각 약물이 포함된 고체 배지에서 배양하여 균주의 성장 정도를 육안으로 관찰 및 비교할 수 있고, 또한 본 발명의 방법으로 제조한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 약물이 포함된 액체 배지에서 배양한 후 균주의 성장 정도를 흡광도를 측정하여 비교할 수 있으며, 본 발명의 방법으로 제조한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 혼합물을 약물이 포함된 액체 배지에서 배양한 후 공통 프라이머 또는 표식염기를 이용한 PCR을 수행하여 각 균주의 PCR 산물의 양을 비교함으로써 약물을 검색할 수 있다.

본 발명의 바람직한 실시예에서는 *nda2*가 결손된 이형접합체 돌연변이 균주를 사용하여 TBZ(thiabendazole) 약물을 검색하였으며, 그 결과, 상기 *nda2* 결손 이형접합체 돌연변이 균주는 다른 나머지 돌연변이 균주에 비해 TBZ 약물에 대해 40배 이상 민감하게 반응함을 확인하여 표적약물 특히 TBZ의 검색에 유용함을 확인하였다(도 5a 참조). *nda2* 유전자는 생장에 필수적인 유전자로 *nda2* 유전자의 산물은 미소관(micortubule)을 구성하는 튜불린 알파 씨브유닛 1(tubulin alpha subunit 1)이다. *nda2* 돌연변이는 핵분열 단계에서 정상적인 방추사의 미소관(micortubule)이 형성되지 못해 세포분열이 진행되지 않아 세포의 생장이 정지되는 표현형을 나타낸다(Qyang Y *et al.*, *Mol Microbiol.*, 2002, 44(2), 325-34).

따라서, *nda2* 결손 이형접합체 돌연변이 균주가 TBZ에 민감한 성질을 이용하여 TBZ 존재 하에 *nda2* 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 생장이 멈추는 것을 TBZ에 민감하지 않는 돌연변이 균주와 비교하여 관찰함으로써 *nda2* 결손 이형접합체 돌연변이 균주가 TBZ를 표적으로 하는 것을 확인하여 TBZ와 같은 기능을 가지는 약물 검색, 즉, 결손된 이형접합체 돌연변이 풀을 사용하여 특정 약물에 민감한 유전자가 결손된 돌연변이 탐색을 통해 목표유전자를 찾거나, 목표 유전자가 결손된 이형접합체 돌연변이를 사용하여 목표유전자에 작용하는 약물의 검색 등의 방법으로 신약 개발에 활용할 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 이용하여 결손된 유전자의 기능을 검색하는 방법을 제공한다.

본 발명의 유전자 기능 검색 방법은

- (1) 분열효모 배양액으로부터 mRNA를 추출한 후 RT-PCR을 하여 cDNA를 제조하는 단계;
- (2) cDNA를 전사틀로 하고 유전자 ORF를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 유전자 ORF를 증폭하는 단계;
- (3) 표적 유전자 ORF를 분열효모의 발현벡터에 클로닝하는 단계;
- (4) 표적 유전자 ORF가 클로닝된 발현벡터를 표적 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주에 형질전환하는 단계; 및

(5) 표적 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주에 대한 상기 단계 4에서 제조한 형질전환 균주의 유전자 기능보상 정도를 조사하는 단계를 포함한다.

상기에서 유전자는 모든 유전자가 될 수 있으며, nda2 및 nda2 유전자와 기능적으로 유사한 유전자인 것이 바람직하며, 약물은 TBZ인 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 nda2 유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하여 이를 nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이에 형질전환시켜 TBZ 약물에 대한 민감도 변화를 측정하고, nda2 이형접합체 돌연변이 균주의 TBZ 약물 민감도를 상쇄시켜줌을 확인하였다(도 7b 참조). 따라서, 본 발명의 유전자 기능 검색방법은 nda2 유전자 이외에도 nda2 유전자의 기능을 보상해 줄 수 있는 기능적으로 유사한 다른 유전자 또는 인간의 유전자를 nda2 유전자 결손 돌연변이 균주에 발현시킬 경우에 유전자의 기능 보상 현상(functional complementation)이 나타나므로 기능적으로 서로 유사한 분열효모 또는 인간의 새로운 유전자 기능 분석에 활용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 공통 프라이머(universal primer)의 결정

표식 DNA를 증폭하기 위해 사용되는 공통 프라이머는 컴퓨터 알고리즘을 사용하여 분열효모 유전체의 염기서열과 공통되지 않고 GC 함량이 40-60% 되는 20개의 염기로 구성된 올리고뉴클레오타이드 21 종을 제작하였으며, 'C1 내지 C21'로 명명하였다. 상기 제조된 공통 프라이머를 다양한 조합으로 사용하여 분열효모의 염색체 DNA를 전사틀로 PCR을 수행한 후 PCR 산물의 생성 여부를 조사하였다(도 1a). 비특이적인 DNA를 증폭시키지 않는 올리고뉴클레오타이드를 선택한 후 온도의 변화에 따라 PCR 산물을 조사하여(도 1b) 비특이적인 DNA가 증폭되지 않는 올리고뉴클레오타이드인 서열번호 1로 기재된 C10과 서열번호 2로 기재된 C11을 최적의 공통 프라이머로 결정하여 유전자 결손 카세트의 양쪽 표식염기 다음에 공통 프라이머가 위치하도록 하였다.

<실시예 2> 표식염기의 결정

특정 유전자가 결손된 돌연변이 균주를 표식하기 위한 표식 염기서열을 결정하기 위해, 2차 구조를 형성하지 않고 Tm 값이 유사하고 분열효모 염색체 DNA와 상동성이 없는 20 개 염기로 구성된 올리고뉴클레오타이드 풀을 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 제작하였다. 이들 올리고뉴클레오타이드는 'BC0000'의 형식으로 명명하였으며 하기 표 1의 1 내지 14로 기재되는 유전자 결손 돌연변이 균주('BG0000' 형식으로 명명함)를 표식하기 위해 각각 2개씩 사용하였다. 상기에서, 1 내지 14로 기재되는 유전자는 각각 (1)nda2, (2)psp1, (3)pak1, (4)crm1, (5)ste7, (6)ste11, (7)dis3, (8)dis2, (9)rad16, (10)rad24, (11)chk1, (12)cds1, (13)cdr1 및 (14)cdc25 유전자를 의미한다. nda2(GenBank # KO2841) 결손 돌연변이 균주의 표식염기는 서열번호 3으로 기재된 BC504와 서열번호 4로 기재된 BC505이며, psp1(GenBank # L36906) 결손 돌연변이 균주의 표식염기는 서열번호 5로 기재된 BC506와 서열번호 6으로 기재된 BC507이다. 또한, 나머지 유전자 결손 돌연변이 균주의 표식염기 및 제조할 형질전환체명과 각 유전자의 GenBank accession No.는 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1.

유전자번호	형질전환체명	표식염기(uptag)	표식염기(downtag)	결손 유전자	GenBank #
1	NY_BG2662_0	서열번호 3(BC504)	서열번호 4(BC505)	nda2	K02841
2	NY_BG3847_0	서열번호 5(BC506)	서열번호 6(BC507)	psp1	L36906
3	NY_BG2610_0	서열번호 7(BC717)	서열번호 8(BC718)	pak1	L41552
4	NY_BG0591_0	서열번호 9(BC774)	서열번호 10(BC775)	crm1	AF208056
5	NY_BG1059_0	서열번호 11(BC3202)	서열번호 12(BC3203)	ste7	AB036789
6	NY_BG3447_0	서열번호 13(BC3212)	서열번호 14(BC3213)	ste11	AB025942
7	NY_BG3231_0	서열번호 15(BC3233)	서열번호 16(BC3234)	dis3	M74094
8	NY_BG3931_0	서열번호 17(BC3235)	서열번호 18(BC3236)	dis2	M27068
9	NY_BG4705_0	서열번호 19(BC843)	서열번호 20(BC844)	rad16	X71595
10	NY_BG2157_0	서열번호 21(BC3278)	서열번호 22(BC3279)	rad24	X79206
11	NY_BG4263_0	서열번호 23(BC3294)	서열번호 24(BC3295)	chk1	NM001274
12	NY_BG4573_0	서열번호 25(BC3298)	서열번호 26(BC3299)	cds1	AJ222869

13	NY_BG1898_0	서열번호 27(BC3300)	서열번호 28(BC3301)	cdr1	X57549
14	NY_BG1145_0	서열번호 29(BC3303)	서열번호 30(BC3304)	cdc25	M13158

<실시예 3> 유전자 결손 카세트 프라이머 제작

유전자 결손 카세트는 도 2b에 나타낸 모식도와 같이 항생제 마커 유전자인 Kan^r 유전자를 중앙으로 하고, 양쪽으로 대칭되게 제한효소 *EcoRI* 인식서열, 표식염기서열(20mer), *DraI* 인식서열, 공통 프라이머(20mer) 및 유전자 특이적 염기서열(80mer)의 순으로 위치하도록 제조하였다. 구체적으로, 상기 유전자 결손 카세트를 제조하기 위해 Kan^r 유전자로는 kanMX4(GenBank # S78175)를 전사체로 하고, PCR 과정을 용이하게 하기 위해 도 2c에 나타낸 바와 같이 4단계로 PCR을 수행하였다. 유전자 결손 카세트를 제조하기 위한 1차 PCR 프라이머는 상기 실시예 1에서 제조한 공통 프라이머 20 mer, *DraI* 인식부위 6 mer, 상기 실시예 2에서 제조한 표식염기 20 mer, *EcoRI* 인식부위 6 mer, 마커인 kanMX4(GenBank # S78175)를 증폭시키기 위한 18 mer의 순으로 제작하였다. nda2 유전자 결손 돌연변이를 제조하기 위한 1차 프라이머의 염기서열은 서열번호 31로 기재된 nda2N1 및 서열번호 32로 기재된 nda2C1의 한 쌍, psp1 유전자 결손 돌연변이를 제조하기 위한 1차 프라이머의 염기서열은 서열번호 33으로 기재된 psp1N1 및 서열번호 34으로 기재된 psp1C1의 한 쌍이며, 나머지 3 내지 14로 기재되는 유전자의 결손 돌연변이를 제조하기 위한 1차 프라이머의 염기서열은 상기 nda2 및 psp1 유전자 결손 돌연변이를 제조하는 1차 프라이머의 염기서열과 동일한 방법으로 표식염기만 다르게 하여 제조하였다.

또한, 2-4 단계 PCR에서는 결손시키고자 하는 1 내지 14로 기재되는 표적 유전자에 존재하는 ORF(open reading frame)의 아미노기 말단과 카복실기 말단의 80 bp를 추가로 포함하도록 프라이머를 제조하였다. 도 2c에서 보는 바와 같이 2차 PCR에서는 상기 1차 프라이머 서열의 마지막에 존재하는 공통 프라이머 서열에 각 유전자의 아미노기 말단 또는 카복실기 말단의 80mer 내에 있는 염기서열 30mer를 추가로 첨가하여 2차 PCR 프라이머를 제작하며, 3차 PCR 및 4차 PCR을 수행하기 위한 프라이머에는 추가로 각 유전자의 아미노기 말단 또는 카복실기 말단의 80mer를 추가로 포함하기 위해 상기 2차 PCR에서 사용한 30mer 이외에 50mer를 추가로 포함하도록 제작하였다. 상기 2차 내지 4차 PCR에 사용한 PCR 프라이머는 유전자의 ORF 서열만 있으면 당업자가 용이하게 수행할 수 있어 프라이머의 서열은 생략하기로 한다.

<실시예 4> 유전자 결손 카세트 제조

유전자 결손 카세트는 실시예 3에서 제조한 1 내지 4차 프라이머를 이용하여 도 2c에 나타난 모식도의 과정으로 연속적인 4단계 PCR을 수행하여 각 표적 유전자의 ORF가 kanMx4 DNA의 양끝에 붙도록 증폭시켜 유전자 결손 카세트를 제조하였다. 구체적으로, 플라스미드 pFA6-kanMX4(GenBank #AJ002680, 도 2a)를 전사틀로 하여 1차 프라이머로 1 단계 PCR을 수행한 후 kan^r 마커와 표식염기, 공통 프라이머가 포함된 1.5 kb의 PCR 산물을 얻었다. 상기 1단계 PCR 산물을 정제한 후, 정제된 1 단계 PCR 산물을 전사틀로 하여 유전자 특이적인 염기서열이 포함된 2차 프라이머로 2단계 PCR 산물을 얻고, 정제된 2 단계 PCR 산물을 전사틀로 하여 유전자 특이적인 염기서열이 포함된 3차 프라이머로 3 단계 PCR을 수행하며, 정제된 3단계 PCR 산물을 전사틀로 하여 4차 프라이머로 4 단계 PCR을 수행함으로써 유전자 특이적인 염기서열이 5' 말단과 3' 말단에 각각 80 bp가 포함된 1.6 kb의 유전자 결손 카세트를 제조하였다. 각 단계에서 사용한 PCR 조건은 하기 표 2에 기재한 바와 같으며, 제조된 유전자 결손 카세트의 구성요소는 도 2b에 나타내었다.

표 2.

	변성	어닐링	연장	사이클
1차 PCR	94℃, 5분	54℃, 1분	72℃, 2분	1회
	94℃, 1분	54℃, 1분	72℃, 2분	2회
	94℃, 1분	60℃, 30초	72℃, 2분	6회
	94℃, 30초	60℃, 30초	72℃, 5분	1회
2차 PCR	94℃, 4분	48℃, 1분	72℃, 2분	1회
	94℃, 1분	48℃, 1분	72℃, 2분	2회
	94℃, 1분	68℃, 1분	72℃, 2분	6회
	94℃, 1분	68℃, 1분	72℃, 7분	1회
3차 PCR	94℃, 5분	48℃, 1분	72℃, 2분	1회
	94℃, 1분	48℃, 1분	72℃, 2분	4회
	94℃, 1분	68℃, 1분	72℃, 2분	14회
	94℃, 1분	68℃, 1분	72℃, 7분	1회
4차 PCR	94℃, 5분	48℃, 1분	72℃, 2분	1회
	94℃, 1분	48℃, 1분	72℃, 2분	4회
	94℃, 1분	68℃, 1분	72℃, 2분	20회
	94℃, 1분	68℃, 1분	72℃, 7분	1회

<실시예 5> 스킨조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) 형질전환과 결손 돌연변이의 확인

리튬아세테이트 방법을 사용하여 분열효모 SP286 균주(ade 6-210/ade 6-216 ura 4-D18/ura 4-D18 leu 1-32/ leu 1-32)에 유전자 결손 카세트를 세포 내로 도입하였다(Moreno, S. et al., *Methods Enzymol.*, 1991, 194,

795-823). 선택 마커인 kan^r 유전자가 G418 저항성을 나타내므로 열충격을 가한 후 YEPD(0.5% 펩톤, 0.5% 효모 추출물, 3% 글루코스) 액체 배지에서 12 시간 배양한 후 G418을 함유하는 YEPD 고체배지에 도말한 후 3-4일 동안 배양하였다. 형질전환 돌연변이의 유전자가 결손되고 상기 실시예 4에서 제조한 유전자 결손 카세트가 삽입되었는지 확인하기 위해 콜로니 PCR을 수행하였다. 콜로니 PCR은 돌연변이 균주를 소량 튜브에 찍어 약 10분간 말려 물에 현탁한 후 직접 PCR 믹스와 혼합하여 PCR을 수행하는 것으로 기존의 방법보다 간단하고 빨리 효율적으로 유전자 결손을 확인할 수 있는 방법이다. nda2 유전자 결손을 확인하기 위한 콜로니 PCR은 서열번호 35(nda2 upN) 및 서열번호 36(nda2 downC)의 한쌍, 서열번호 35(nda2 upN) 및 서열번호 37(CPN1)의 한쌍, 서열번호 38(kanC) 및 서열번호 36(nda2 downC)의 한쌍 및 서열번호 39(CPC3) 또는 서열번호 36(nda2 downC)의 한쌍으로 각각 수행하였으며, psp1 결손 돌연변이의 경우 서열번호 40(psp1 upN) 및 서열번호 41(psp1 downC)의 한쌍, 서열번호 41(psp1 downC) 및 서열번호 38(kanC)의 한쌍, 서열번호 1(C10) 및 서열번호 42(kanB)의 한쌍 또는 서열번호 2(C11) 및 서열번호 38(kanC)의 한쌍을 콜로니 PCR을 수행하기 위한 프라이머로 사용하여 하기 표 3의 조건으로 각각 수행하였다.

표 3.

변성	어닐링	연장	사이클횟수
94℃ 5분	40℃ 2분	72℃ 2분	3회
94℃ 1분	42℃ 1분	72℃ 1분	7회
94℃ 30초	44℃ 30초	72℃ 1분	20회
94℃ 30초	46℃ 30초	72℃ 5분	3회

그 결과, 본 발명의 nda2 및 psp1 유전자 결손 돌연변이 균주는 nda2 및 psp1 유전자의 결손이 확실하게 일어났음을 확인할 수 있었다(도 3a 및 도 3b). 이에, nda2 유전자 결손 형질전환체를 '스키조사카로마이세스 폼베 NY_BG2662_0'라 명명하고, psp1 유전자 결손 형질전환체를 '스키조사카로마이세스 폼베 NY_BG3847_0'라 명명하였으며 각각 2002년 4월 3일자로 한국생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호; KCTC 10220BP 및 수탁번호; KCTC 10221BP). 또한, 나머지 3 내지 14로 기재되는 유전자 결손 돌연변이 균주의 콜로니 PCR도 동일하게 수행하였다. 콜로니 PCR로 확인한 nda2와 psp1 결손 돌연변이 균주의 제조 효율은 각각 15%와 80%였다.

<실시예 6> nda2 유전자 결손 돌연변이 균주의 TBZ 민감도 조사

모균주인 SP286 및 nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 이용해 액체배지에서의 티아벤다졸(thiabendazole, 이하 'TBZ'라 명명함) 민감도를 조사하였다. 구체적으로, SP286 및 nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 96웰 배양기에 각각 1.5 × 10⁵/ml의 세포 농도로 135 μl 분주한 후 3.125, 6.25, 12.5, 25 및 50 μg/ml 농도의 TBZ(Sigma Co. M.O., U.S.A) 용액 15 μl를 넣은 다음 18시간 동안 배양하였다. 상기 배양후 세포 배양액을 수득하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 TBZ에 대한 민감도를 측정하였다.

그 결과, nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주는 모균주인 SP286에 비해 TBZ의 농도가 증가함에 따라 세포의 성장률(%)이 급격하게 감소하는 경향을 보여 TBZ에 민감하게 반응함을 알 수 있었다(도 4a).

또한, 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 고체배지에서의 TBZ 민감도를 조사하고자 하였다. 구체적으로, 2 × 10⁷ 세포수/ml의 세포배양액을 1:4의 비율로 순차적으로 희석한 SP286 및 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 0.2, 0.5, 1.0 및 5.0 μg/ml 농도의 TBZ를 함유하는 고체배지에 각각 5 μl씩 떨어뜨린 후 성장 정도를 관찰하였다.

그 결과, SP286 균주에 비해 nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주는 고체배지에 포함된 TBZ의 농도가 증가함에 따라 세포의 성장이 감소하여 TBZ에 민감함을 알 수 있었다(도 4b).

<실시예 7> 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 양 확인 및 약물 타겟 활용 방안 조사

돌연변이 균주의 모균주인 SP286, nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 포함한 13종의 균주의 TBZ에 대한 민감도를 액체 배지와 고체 배지에서 각각 수행하였다. 먼저 액체 배지에서의 TBZ 민감도를 조사하기 위해 1.5 × 10⁵ 세포수/ml의 세포배양액 150 μl에 2배씩 희석한 TBZ(50 μg/ml 내지 3.125 μg/ml) 용액을 넣어 18시간 동안 배양한 후 600 nm에서 세포의 흡광도를 조사하여 약물에 대한 민감도를 조사하였다. 그 결과, nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주가 TBZ에 대해 가장 민감하게 반응함을 알 수 있었다(도 5a).

다음으로, 고체 배지에서의 TBZ 민감도를 조사하기 위해 2 × 10⁷ 세포수/ml의 세포배양액을 1:4의 비율로 순차적으로 희석시켜 10 μg/ml 농도의 TBZ를 함유하는 고체 배지(TBZ) 및 TBZ를 함유하지 않는 고체 배지(EMM)에 각각 5 μl씩 떨어뜨린 후 배양하여 성장 정도를 비교 관찰하였다. 그 결과, nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주가 TBZ에 대해 가장 민감하게 반응하여 세포의 성장이 급격히 감소함을 알 수 있었다(도 5b).

<실시예 8> 표식염기에 의한 nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 양 확인 및 약물 타겟 활용 방안 조사

SP286 균주를 본 발명의 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주와 함께 동일비로 혼합한 후 20 μg/ml TBZ가 포함된 액체 배지에서 50시간 배양하여 세포를 수확한 후 일반적인 공지의 방법으로 염색체를 추출하였다. 염색체를 전사체로 하고 특정 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 DNA만을 증폭시키는 콜로니 PCR용 프라이머인 upN(nda2의 경우 서열번호 35)과 CPN1(nda2의 경우 서열번호 37) 한쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다. 상기 증폭된 PCR 산물을 전기영동하여 증폭된 DNA의 양을 비교, 조사하여 nda2 결손 돌연변이 균주의 성장 정도를 나머지 2 내지 14로 기재되는 유전자 결손 돌연변이 균주의 성장 정도와 비교하였다.

그 결과, nda2 이형접합체 돌연변이 균주와 나머지 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 TBZ 존재하에서 함께 배양하면 TBZ에 민감한 nda2 돌연변이 균주의 생장이 멈춰지고 나머지 TBZ에 민감하지 않은 균주는 생장이 증가하였다(도 6). 상기 결과를 통해 nda2 유전자 산물인 튜블린알파 서브유닛1이 TBZ 약물의 표적임을 확인할 수 있다. 따라서, TBZ를 이용하여 nda2 또는 유사 기능이 결핍된 돌연변이 균주를 찾아냄으로써 TBZ의 약물 표적을 찾아낼 수 있고 nda2 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 TBZ와 같은 기능을 갖는 약물을 검색하기 위해 활용할 수 있음을 알 수 있다.

<실시예 9> nda2의 클로닝 및 발현

분열효모 배양액으로부터 일반적으로 공지된 방법으로 mRNA를 추출한 후 RT-PCR(reverse transcriptase-PCR)을 수행하여 cDNA를 제조하였다. cDNA를 전사틀로 하여 nda2 ORF를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 nda2 ORF를 증폭하였다. nda2 ORF를 pGEMT(Promega) 클로닝 벡터에 클로닝한 후 분열 효모의 발현벡터인 pREP2에 클로닝하였다(도 7a). 클로닝된 벡터를 'pREP2-nda2'라 명명하고, 이를 nda2 결손 이형접합체 돌연변이 균주에 도입하였다. nda2 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 'Anda2(nmt1)'이라 명명하고, 상기 pREP2-nda2 벡터로 형질 전환된 Δnda2(nmt1)를 'Δnda2(nmt1-nda2)'라 명명하였으며, psp1 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 'Δpsp1(nmt1)'라 명명하고, 상기 Δpsp1(nmt1)에 pREP2-nda2 벡터로 형질전환 시킨 균주를 'Δpsp1(nmt1-nda2)'라 명명하였다. 상기 각 균주를 실시예 6과 동일한 방법으로 TBZ에 대한 민감성 조사를 한 결과, nda2 결손 이형접합체 돌연변이 균주인 Δnda2(nmt1)를 pREP2-nda2 벡터로 형질전환시킨 Δnda2(nmt1-nda2) 균주는 Δnda2(nmt1)의 TBZ에 대한 민감도를 상쇄시켜줌을 알 수 있었다(도 7b).

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 방법으로 표적 유전자를 제거시키고 특정 염기로 표식시켜 제조한 유전자 결손 카세트로 형질 도입한 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주는 약물 표적 검색, 결손된 유전자의 기능 보상을 통한 관련 유전자들의 기능연구 및 미확인 유전자의 기능분석에 유용하게 이용될 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(1) 표적 유전자의 양 말단 부위와 각각 상동인 60 내지 150 뉴클레오티드로 구성되는 표적 유전자 특이적 염기서열, 분열효모의 유전자와 상동성이 없고 표식염기를 증폭시키기 위한 제 1 공통 프라이머 부착부위, 표적 유전자 결실 돌연변이에 특이적인 상위 표식 염기서열(up tag sequence), 돌연변이 선별을 위한 마커 유전자, 표적 유전자 결실 돌연변이에 특이적인 하위 표식 염기서열(down tag sequence), 분열효모의 유전자와 상동성이 없고 표식염기를 증폭시키기 위한 제 2 공통 프라이머 부착부위를 포함하는 표적 유전자 결손 카세트를 제조하는 단계;

(2) 단계 1의 표적 유전자 결손 카세트를 분열효모에 형질전환시키는 단계; 및

(3) 형질 전환된 분열 효모에서 표적 유전자의 결손을 확인하는 단계로 구성되는 표적 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 제조 방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 표적 유전자 결손 카세트는 표적 유전자의 일 말단 부위와 상동인 60 내지 150 뉴클레오티드로 구성되는 제 1 표적 유전자 특이적 염기서열, 제 1 공통 프라이머 부착부위, 상위 표식 염기서열(up tag sequence), 마커 유전자, 표식 염기서열(down tag sequence), 제 2 공통 프라이머 부착부위 및 표적 유전자 결손 카세트는 표적 유전자의 다른 말단 부위와 상동인 60 내지 150 뉴클레오티드로 구성되는 제 2 표적 유전자 특이적 염기서열을 순차적으로 포함하며, 상기 상위 표식 염기서열 및 하위 표식 염기서열의 좌우에 제한효소 인식부위가 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3.

삭제

청구항 4.

제 1항에 있어서, 상기 제 1 공통 프라이머는 서열번호 1로 기재되고 상기 제 2 공통 프라이머는 서열번호 2로 기재되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5.

제 1항에 있어서, 상기 마커 유전자는 항생마커 또는 영양요구마커 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6.

제 5항에 있어서, 상기 마커 유전자는 항생마커 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7.

제 6항에 있어서, 상기 항생마커 유전자는 G418에 저항성을 나타내는 *kan^r* 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8.

제 1항에 있어서, 상기 상위 표식 염기서열 및 하위 표식 염기서열은 20 내지 30개의 염기 서열로 구성된 한 쌍인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9.

삭제

청구항 10.

삭제

청구항 11.

제 1항에 있어서, 분열효모는 스킨조사카로마이세스 폼베인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12.

제 1항에 있어서, 상기 표적 유전자는 *nda2*, *psp1*, *pak1*, *crm1*, *ste7*, *stell1*, *dis3*, *dis2*, *rad16*, *rad24*, *chk1*, *cds1*, *cdr1* 및 *cdc25*로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13.

제 12항에 있어서, 상기 표적 유전자는 *nda2* 또는 *psp1*인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14.

제 1항에 있어서, 단계 3의 표적 유전자 결손의 확인은 표적 유전자와 상동성 재조합으로 치환된 표적 유전자 결손 카세트 내의 염기서열을 사용하여 콜로니 PCR을 함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15.

제 2항에 있어서, 표적 유전자 결손 카세트는 도 2b의 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16.

제 1항, 제 2항, 제 4항 내지 제 8항 및 제 11항 내지 15항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주.

청구항 17.

제 16항에 있어서, *nda2*, *psp1*, *pak1*, *crm1*, *ste7*, *stell1*, *dis3*, *dis2*, *rad16*, *rad24*, *chk1*, *cds1*, *cdr1* 및 *cdc25*로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자가 결손된 이형접합체 돌연변이 균주.

청구항 18.

제 17항에 있어서, *nda2* 유전자가 결손된 스킨조사카로마이세스 폼베 NY_BG2662_0 이형접합체 돌연변이 균주 (수탁번호; KCTC 10220BP).

청구항 19.

제 17항에 있어서, *psp1* 유전자가 결손된 스킨조사카로마이세스 폼베 NY_BG3847_0 이형접합체 돌연변이 균주 (수탁번호; KCTC 10221BP).

청구항 20.

제 16항의 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주를 약물이 포함된 배지에서 배양하여 균주의 성장 정도를 비교함으로써 약물을 탐색하는 방법.

청구항 21.

제 20항에 있어서, 균주의 성장 정도를 비교하는 것은 육안으로 세포의 성장을 관찰하거나 또는 세포 배양액의 흡광도를 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22.

제 20항에 있어서, 균주의 성장 정도를 비교하는 것은 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주의 혼합물을 약물이 포함된 액체 배지에서 배양한 후 공통 프라이머 또는 표식염기를 이용한 PCR을 수행하여 각 균주의 PCR 산물의 양을 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23.

- (1) 분열효모 배양액으로부터 mRNA를 추출한 후 RT-PCR을 하여 cDNA를 제조하는 단계;
- (2) cDNA를 전사틀로 하고 표적 유전자 ORF를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 유전자 ORF를 증폭하는 단계;
- (3) 표적 유전자 ORF를 분열 효모의 발현벡터에 클로닝하는 단계;
- (4) 표적 유전자 ORF가 클로닝된 발현벡터를 제 16항의 표적 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주에 형질전환하는 단계; 및
- (5) 표적 유전자 결손 이형접합체 돌연변이 균주에 대한 상기 단계 4에서 제조한 형질전환 균주의 유전자 기능 보상 정도를 조사하는 단계를 포함하는 표적 유전자의 기능 검색방법

청구항 24.

제 23항에 있어서, 유전자는 *nda2* 및 *nda2* 유전자와 기능적으로 유사한 유전자인 것을 특징으로 하는 검색방법.

청구항 25.

제 1항에 있어서, 단계 1은 하기의 세부 단계를 통하여 수행되는 것을 특징으로 하는 방법:

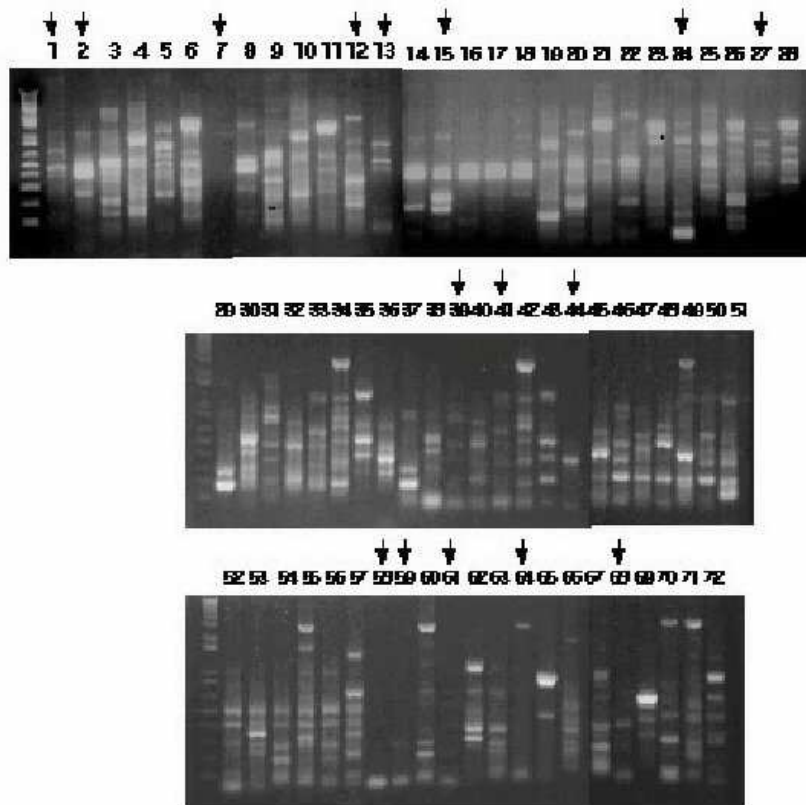
- (a) 상기 마커유전자를 포함하는 벡터를 주형으로 상기 제 1 공통 프라이머 부착부위, 상위 표식 염기서열 및 상기 마커유전자의 양 말단 중 일 말단과의 상동서열로 구성된 상위 프라이머 1 및 상기 제 2 공통 프라이머 부착부위, 하위 표식 염기서열 및 상기 마커유전자의 양 말단 중 다른 말단과의 상동서열로 구성된 하위 프라이머 1로 1차 PCR을 수행하는 단계;
- (b) 상기 1차 PCR 산물을 주형으로 상기 표적 유전자의 양 말단 중 일 말단과의 상동서열 및 상기 제 1 공통프라이머 부착부위로 구성된 상위 프라이머 2 및 상기 표적 유전자의 양 말단 중 다른 말단과의 상동서열 및 상기 제 2 공통 프라이머 부착부위로 구성된 하위 프라이머 2로 2차 PCR을 수행하는 단계; 및
- (c) 상기 2차 PCR 산물을 주형으로 상기 상위 프라이머 2의 5' 말단 부위를 포함하고 상기 표적 유전자의 양 말단 중 일 말단과의 상동 서열을 갖는 50 내지 80 bp 길이의 상위 프라이머 3 및 상기 하위 프라이머 2의 5' 말단 부위를 포함하고 상기 표적 유전자의 양 말단 중 다른 말단과의 상동 서열을 갖는 50 내지 80 bp 길이의 하위 프라이머 3으로 3차 PCR을 수행하는 단계.

청구항 26.

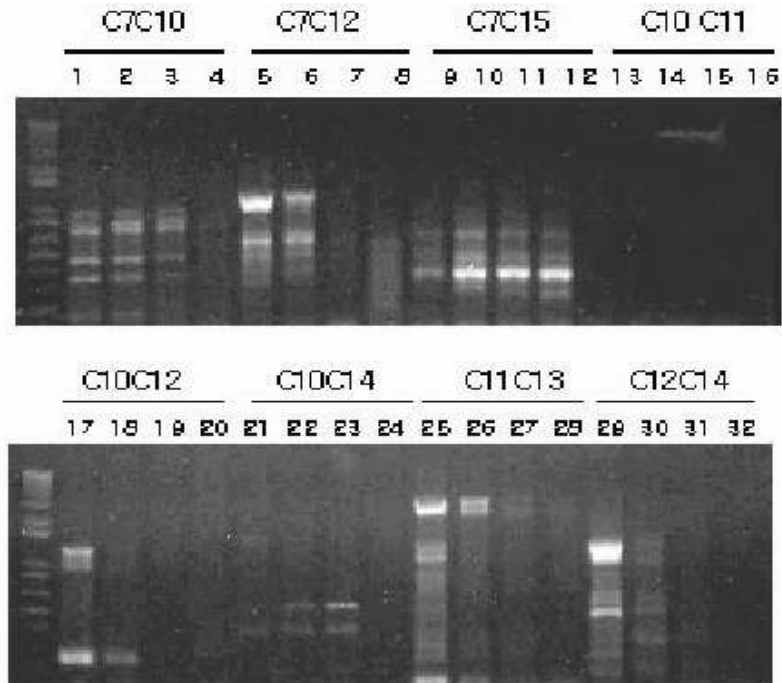
제 25항에 있어서, 상기 3차 PCR 산물을 주형으로 상기 상위 프라이머 3의 5' 말단 부위를 포함하고 상기 표적 유전자의 양 말단 중 일 말단과의 상동 서열을 갖는 50 내지 80 bp 길이의 상위 프라이머 4 및 상기 하위 프라이머 3의 5' 말단 부위를 포함하고 상기 표적 유전자의 양 말단 중 다른 말단과의 상동 서열을 갖는 50 내지 80 bp 길이의 하위 프라이머 4로 4차 PCR을 수행하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

도면

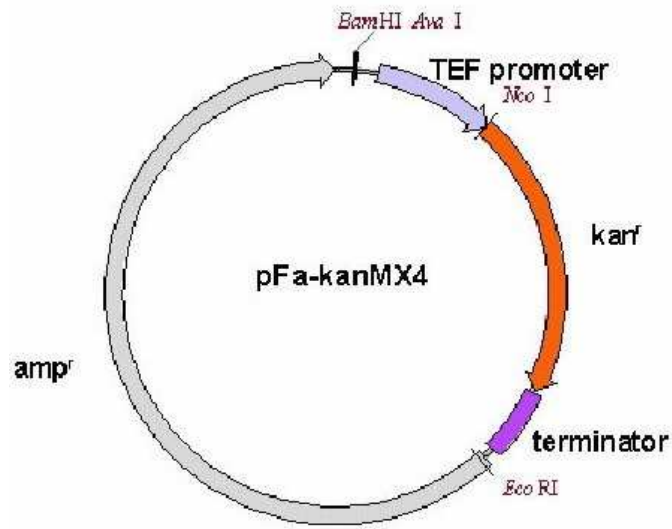
도면1a



도면1b



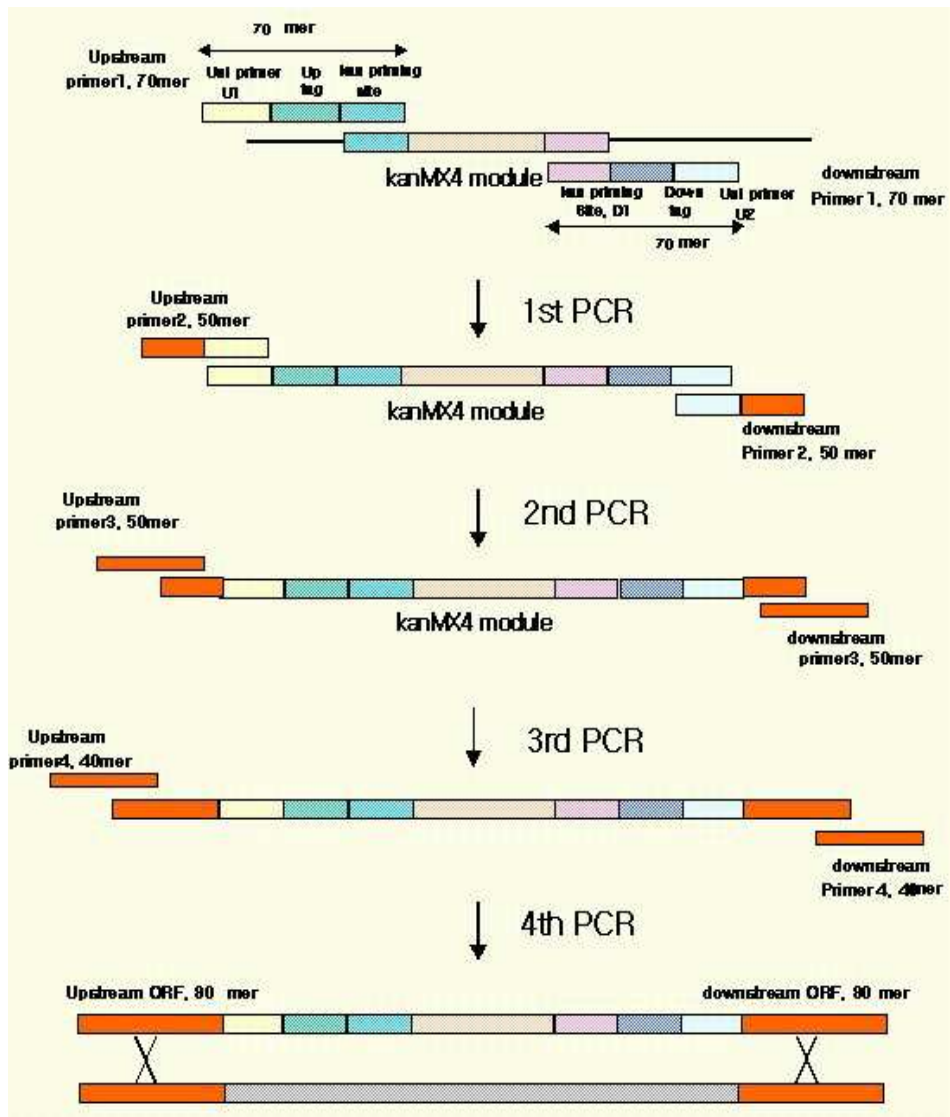
도면2a



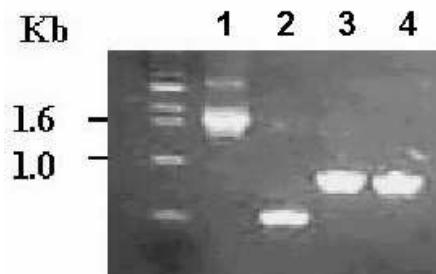
도면2b



도면2c

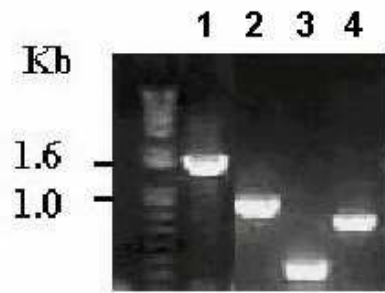


도면3a



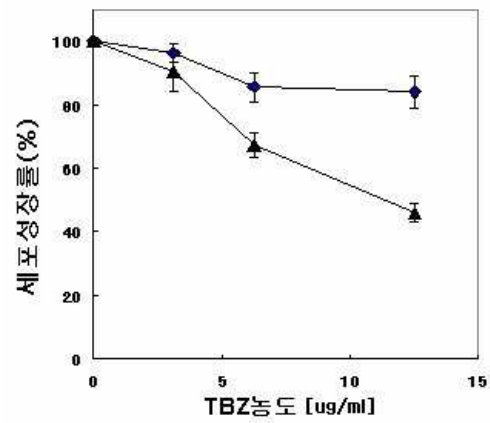
1. nda2 upN, nda2 downC
2. nda2 upN, CPN1
3. kanC, nda2 downC
4. CPC3, nda2 downC

도면3b

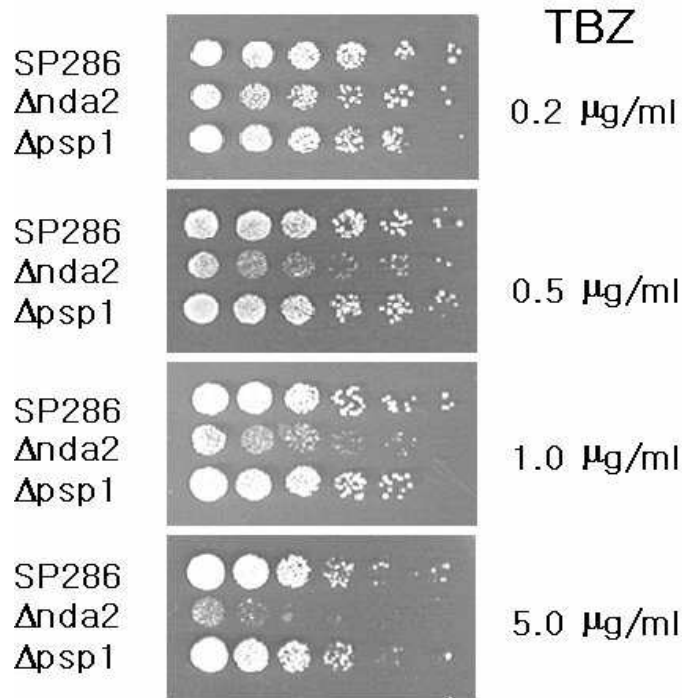


- 1. psp1 upN, psp1 downC
- 2. psp1 downC, kanC
- 3. C10, kanB
- 4. C11, kanC

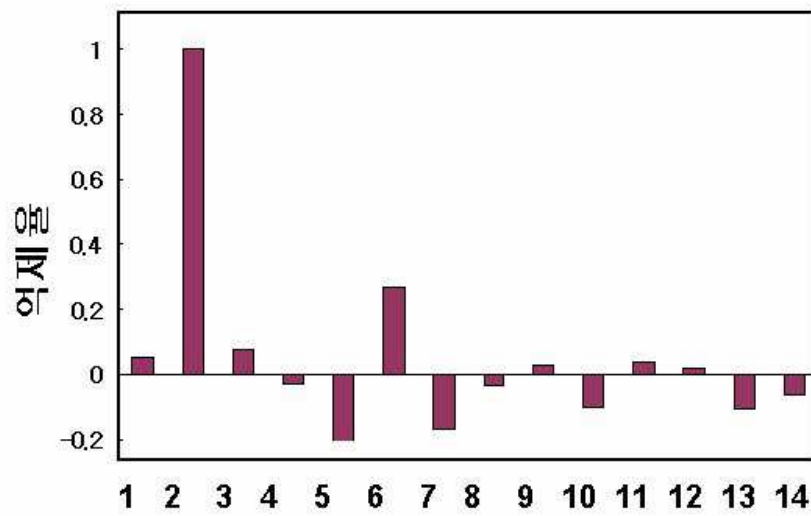
도면4a



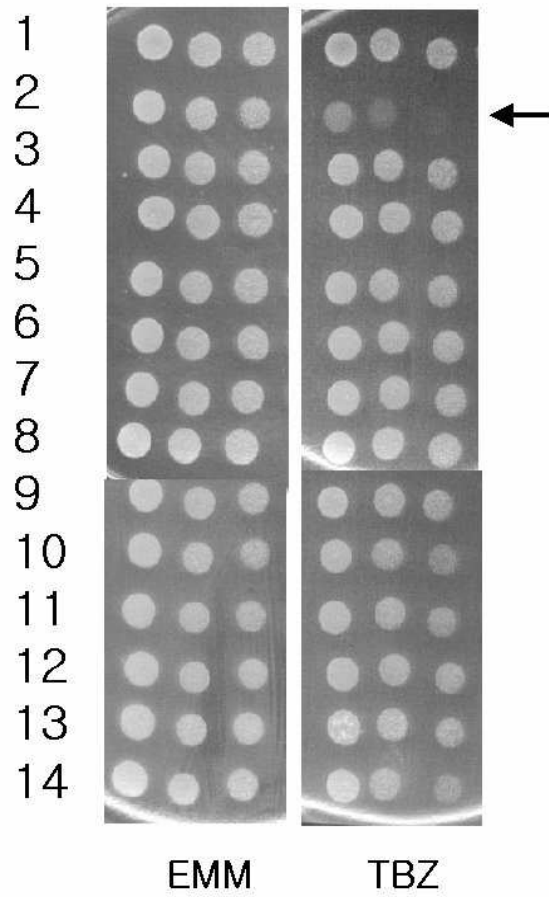
도면4b



도면5a

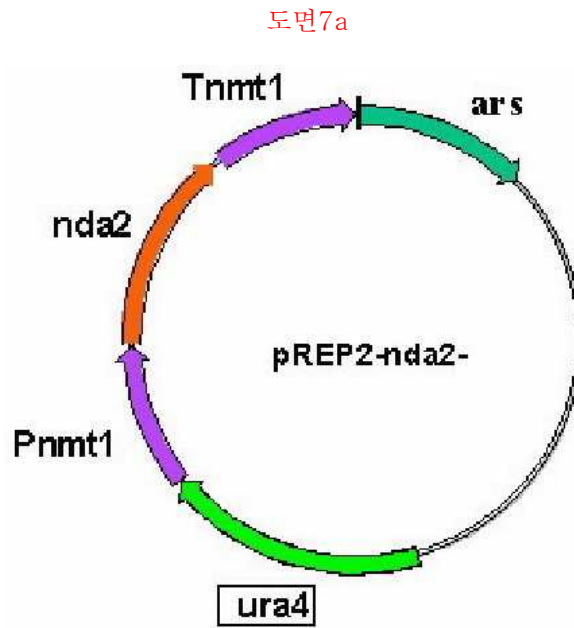


도면5b

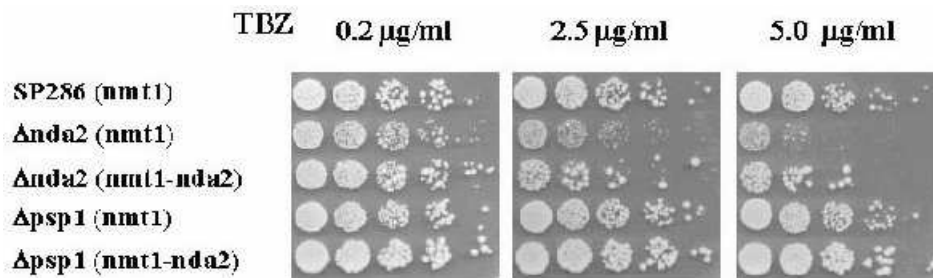


도면6





도면7b



<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
 <120> Method for screening of drug using systematic deletion mutant of fission yeast
 <130> 2p-11-48
 <150> KR-10-2002-0024460
 <151> 2002-05-03
 <160> 42
 <170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> C10
 <400> 1
 cgctcccgcc ttacttcgca 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> C11
 <400> 2
 ttgcgttgcg taggggggat 20
 <210> 3
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC504
 <400> 3
 gcgtgtgtgg gtagcagggg 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC505
 <400> 4
 agagcacagg agcaaggggc 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC506
 <400> 5
 cccgtccctc cagcaagtca 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC507
 <400> 6
 tcggttatgg gcgttgggtg 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC717
 <400> 7
 aatgccgttc ccctgtcctg 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC718
 <400> 8
 cacgattttc cctcgcccct 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC774
 <400> 9
 tcacgactac cccgccaatg 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> BC775
 <400> 10
 atacactccg cccccctcgt 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3202
 <400> 11
 cgagcccctt cccctcacca 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3203
 <400> 12
 ggggcaacgg taaaggcaac 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3212
 <400> 13
 acctcgcaat cccagcaac 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3213
 <400> 14
 catttacccg ctgccccact 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3233
 <400> 15
 atcccctcca cgcaaccgat 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3234
 <400> 16
 ccgcaaacc cgtccaacaa 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3235
 <400> 17
 acaaggcgtg gctggggaac 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3236
 <400> 18
 gccttgcgtg gggcagttct 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC843
 <400> 19
 agcggaacgg gtcaagggac 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC844
 <400> 20
 tggcaggtgt tgggggtcac 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3278
 <400> 21
 gaaggcccgg gagatgcata 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3279
 <400> 22
 tcttttccgg tcgtcaggcg 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3294
 <400> 23
 gggcggggta caagctgaac 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3295
 <400> 24
 taaaagcgtt gggaaccggg 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3298
 <400> 25
 ttcaatacgg cgggacacga 20
 <210> 26
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3299
 <400> 26
 cgggcaggta cccccaact 19
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3300
 <400> 27
 gagctgctgc acacccccag 20
 <210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3302
 <400> 28
 ttatcggaaa tcggccacgc 20
 <210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3303
 <400> 29
 ctctcccccg cacaatccct 20
 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> BC3304
 <400> 30
 aatctgcgaa atcaggcggg 20
 <210> 31
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Nda2N1
 <400> 31
 cgctccccgc ttacttcgca ttaaagcgt gtgtgggtag caggagata tcttagcttg 60
 cctcgtcccc 70
 <210> 32
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> nda2C1
 <400> 32
 ttgcgttgcg taggggggat tttaaagag cacaggagca aggggcgata cttttcgaca 60
 ctggatggcg 70
 <210> 33
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> psp1N1
 <400> 33
 cgctcccgcc ttacttcgca tttaaaccg tcctccagc aagtcagata tcttagcttg 60
 cctcgtcccc 70
 <210> 34
 <211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> psp1C1
 <400> 34
 ttgcgttgcg taggggggat tttaaacgg ttatggcgt tgggggata cttttcgaca 60
 ctggatggcg 70
 <210> 35
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> nda2 upN
 <400> 35
 tccttagtgc tttacgagtt cattc 25
 <210> 36
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> nda2 downC
 <400> 36
 ccgctgggtg aacattttaa ctctca 26
 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CPN1
 <400> 37
 cgtctgtgag gggagcgttt 20
 <210> 38
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> kanC
 <400> 38
 tgattttgat gacgagcgta at 22
 <210> 39
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> CPC3
 <400> 39
 ggctggcctg ttgaacaagt ctgga 25
 <210> 40
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> psp1 upN
 <400> 40
 ttgtatcact aggtacttcc gtcac 25
 <210> 41
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> psp1 downC
 <400> 41
 ggagatttaa ccaaaatctt atcca 25
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> kanB
 <400> 42
 ctgcagcgag gagccgtaat 20