



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0051466  
(43) 공개일자 2009년05월22일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0117868

(22) 출원일자 2007년11월19일

심사청구일자 2007년11월19일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

박성수

서울 강서구 화곡동 화곡푸르지오 145동 1502호

남선영

경기 안성시 공도읍 용두리 293

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다래

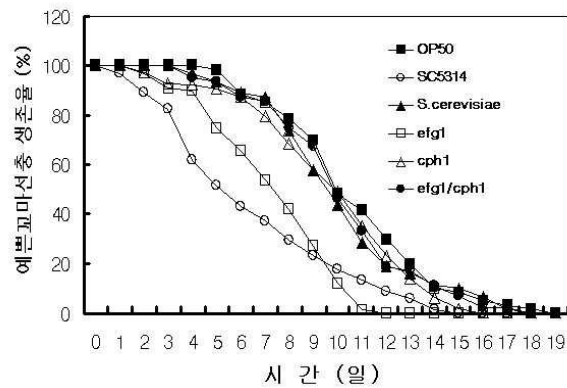
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 예쁜꼬마선충을 이용한 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자스크리닝 방법

### (57) 요약

본 발명은 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공하는 것을 포함하는 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법에 관한 것으로, 배양이 용이하고 육안으로도 생존 여부 관찰이 용이한 예쁜꼬마선충을 이용함으로써 스크리닝 과정이 간단하고 용이하며 시간을 단축시킬 수 있는, 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**이강무**

서울 강남구 개포동 대치아파트 209-201

**최원자**

서울시 강남구 대치동 506 선경아파트 8동 1302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10816 , 20050401-034-698-007-03-00

부처명 서울특별시, 농촌진흥청

연구사업명 서울시 산학연 협력사업(2006년기술기반구축사업), 바이오그린 21 사업

연구과제명 나노기술을 이용한 바이오 융합산업 혁신클러스터, High Throughput  
Caenorhabditiselegans Killing assay

주관기관 연세대학교 산학협력단, 고려대학교 산학협력단

연구기간 2006년 08월 01 일~2008년 07월 31일 , 2005년 05월 26일~2007년 12월 31일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공하는 것을 포함하는 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 타겟 유전자는 형태전환관련 유전자, 부착단백질 생성 유전자, 항산화제 유전자, 유해산 소제거효소 유전자 및 산 프로테아제 생성 유전자 중 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 병원성 유전자 스크리닝 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 예쁜꼬마선충 배양용 고체 배지에 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 배양한 배양물을 도말함으로써 예쁜꼬마선충에게 먹이를 제공하는 것을 특징으로 하는 병원성 유전자 스크리닝 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스가 제공된 예쁜꼬마선충과 야생형 캔디다 알비칸스가 제공된 예쁜꼬마선충을 육안으로 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 병원성 유전자 스크리닝 방법.

### 청구항 5

타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공하는 것을 포함하는 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법을 이용한 항진균성 물질의 스크리닝 방법.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 타겟 유전자는 형태전환관련 유전자, 부착단백질 생성 유전자, 항산화제 유전자, 유해산 소제거효소 유전자 및 산 프로테아제 생성 유전자 중 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항진균성 물질의 스크리닝 방법.

## 명 세 서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술 분야

- <1> 본 발명은 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공하는 것을 포함하는 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법에 관한 것으로, 배양이 용이하고 육안으로도 생존 여부 관찰이 용이한 예쁜꼬마선충을 이용함으로써 스크리닝 과정이 간단하고 용이하며 시간을 단축시킬 수 있는, 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법에 관한 것이다.

#### 배 경 기 술

- <2> 캔디다 알비칸스 (*Candida albicans*)는 인간의 점액질 막과 장에 살고 있는 효모세포로, 정상인의 경우 상주 균으로써 존재하지만 면역체계가 약화되거나 또는 항생제 등에 의해 유익 세균들이 죽게 될 때 병원성으로 변해 피부나 구강 또는 질 등에 국부적인 캔디다 증(candidiasis)을 일으키며, 캔디다 진균이 소화체계의 통제 영역을 벗어나게 되면 혈행성 전신 감염증을 일으켜 생명을 위협한다고 알려져 있다. 특히, 최근 의료기술의 발달 및 항생제의 남용, AIDS 환자의 증가는 면역저하증 환자의 확산을 가져왔으며 이로 인한 발병률은 기하급수적인 증가를 보여 캔디다 알비칸스에 의한 치사율은 전체 치사율의 4위를 기록하고 있다 (Gudlaugsson O 등, *Clin Infect Dis.* **37**:1172-7, 2003).
- <3> 이에 대한 항진균제로는 암포테리신(amphotericin)이나 아졸 화합물 (azole compound)이 주로 쓰이나 암포테리신은 그 독성으로 인해 말기 AIDS 환자에게는 사용이 불가하며 아졸 화합물의 경우 내성 균주의 등장으로, 독성

과 내성이 없는 새로운 항진균제의 개발이 시급한 실정이다. 새로운 항진균제의 개발을 위해서는 새로운 항진균제의 타겟 분자 (target molecule)에 대한 연구와 대표적인 병원성 진균인 캔디다의 병원성 기작에 대한 기초적인 연구가 절대적으로 필요하다.

- <4> 숙주모형을 이용하여 인체에 질병을 일으키는 병원균에 대한 병원성 유전자의 스크리닝 및 병원성 기작에 대한 기초적인 연구는 예전부터 활발히 진행되어 왔으며, 캔디다의 경우 마우스, 초파리 및 꿀벌부채명나방유충 모델이 인체 대체모델로써 각광을 받아왔다. 한국특허공개 제2005-102977호에서도 캔디다 알비칸스에서 이형전환에 관련된 신규 유전자 CaMOB2를 발굴하고, 이 유전자 결손 캔디다 알비칸스를 마우스에 주입하여 생존율을 측정함으로써 병원성과의 관련성을 밝혔으며, 이 유전자 또는 단백질을 항진균 물질 스크리닝용으로 사용할 수 있음을 개시하고 있다.
- <5> 하지만 상기 마우스와 같은 동물 모델들은 윤리적, 시간적 및 비용적인 문제로 인하여 사용에 제한을 받아왔다. 최근에 병원균의 감염에 대한 모델로서 크기가 작으면서 윤리적인 문제를 피할 수 있는 동물모델이 주목받고 있으며, 그 중의 하나가 예쁜꼬마선충을 사용한 모델이다.
- <6> 예쁜꼬마선충(Caenorhabditis elegans)은 흙에서 박테리아를 잡아먹고 사는 선충류로, 성체의 길이가 약 1mm이고 단순한 형태를 지닌 다세포 동물이다. 자웅동체와 웅체의 2가지 성별로 존재하고, 자웅동체인 경우 단독으로 자가수정에 의해서 320마리 정도의 자손을 만들 수 있고 웅체와의 교미를 통해 더 많은 자손을 만들 수 있다. 이들이 성장하기에 적당한 온도는 15~25℃로, 알에서 부화한 뒤 4단계의 탈피과정을 거쳐 성충이 되는데 약 3일이 소요되며 평균수명은 2~3주이다. 1970년대에 실험 모델로 이용되기 시작한 이래, 발생 단계가 비교적 단순할 뿐만 아니라 수정란에서 성체에 이르기까지 세포분열 양상이 개체마다 동일하고, 투명한 몸체를 지녀 그 과정을 현미경으로 모두 관찰할 수 있으며, 수명주기가 빠르고, 배양하기 쉬우며, 또한 냉동보관이 가능하여 조작 용이성이 뛰어나 널리 이용되고 있다. 또한, 1999년 게놈 프로젝트가 완료되어 6개의 염색체 지도와 염기서열로의 접근이 용이하다는 장점이 있다.
- <7> 이러한 예쁜꼬마선충을 살모넬라의 모델 숙주로서 이용한 연구가 소수의 팀들에 의해 진행되고 있지만 (Labrousse A 등, *Curr. Biol.* **10(23)**:1543-5, 2000), 항진균 물질의 탐색을 위한 시스템으로 사용한 예는 국내외적으로 전무하다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

- <8> 이에, 본 발명자들은 병원성 진균인 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충에게 섭취하게 하였을 때 정상보다 빨리 사멸하는 점에 착안하여, 형태전환관련 유전자, 유해산소제거효소 유전자 또는 항산화제 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공한 결과 예쁜꼬마선충의 생존율이 증가하는 것을 확인함으로써 예쁜꼬마선충이 병원성 진균인 캔디다 알비칸스 병원성 확인에 좋은 모델이 됨을 확인하였다.
- <9> 따라서 본 발명은 병원성 유전자로 추정되는 유전자를 파괴한 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충에게 먹이로 제공하여 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자를 스크리닝하고, 이러한 방법을 또한 항진균성 물질의 스크리닝에 도입하는 것을 목적으로 한다.

### 과제 해결수단

- <10> 따라서 본 발명은 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공하는 것을 포함하는 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법을 제공한다.
- <11> 또한 본 발명은 상기 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법을 이용한 항진균 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

### 효과

- <12> 본 발명의 스크리닝 방법은, 배양이 용이하고, 육안으로도 생존여부 관찰이 용이한 예쁜꼬마선충을 이용함으로써 항진균 물질 개발의 기초가 되는 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝을 간단하고 용이하게 하고, 병원성 유전자를 정확하게 스크리닝할 수 있으며, 스크리닝 시간을 단축시키는 작용효과가 있다.
- <13> 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은 마우스 등과 같은 실험 동물을 사용하는 것과 달리 윤리적 문제에서 벗어날

수 있으며, 비용 면에서도 경제적이며, 실험실 내 HTS(high throughput screening)을 가능하게 한다.

- <14> 나아가서는 본 발명의 스크리닝 방법은 이에 의해 발굴된 병원성 유전자 또는 이의 단백질을 이용하여 항진균 물질 스크리닝을 가능하게 하고, 캔디다 알비칸스의 병원성 기작 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <15> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <16> 본 발명은 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공하는 것을 포함하는 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법에 관한 것으로, 배양이 용이하고 육안으로도 생존 여부 관찰이 용이한 예쁜꼬마선충을 이용함으로써 스크리닝 과정이 간단하고 용이하며 시간을 단축시킬 수 있는, 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- <17> 먼저, 본 발명의 타겟 유전자는 캔디다 알비칸스에서 병원성을 나타내는 것으로 추정되어 캔디다 알비칸스의 병원성과 관련 여부를 확인하려는 유전자로서, 캔디다 알비칸스에서 알려진 모든 유전자가 대상이 될 수 있으며, 특히 형태전환관련 유전자, 부착단백질 생성 유전자, 항산화제 유전자, 유해산소제거효소 유전자 또는 산 프로테아제 생성 유전자가 될 수 있다. 바람직하게는, *cph1*(*Cell* **90**, 939-949 (1997)), *efg1*(*Cell* **90**, 939-949 (1997); *EMBO J.* **16**, 1982-1991(1997)), *tup1*, *rbf1*, *czf1*, *rim101*(*Mol. Cell. Biol.* **20**, 4635-4647 (2000)) 및 *tec1*(*Mol. Microbiol.* **38**, 435-445 (2000)) 을 포함하는 형태전환 관련 유전자, *als1*(*Infect. Immun.* **66**, 1783-1786 (1998)), *ala1*, *hwp1*(*Science* **283**, 1535-1538 (1999)), *int1*(*Science* **279**, 1355-1358 (1998)) 및 *mnt1*(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 7670-7675 (1998)) 을 포함하는 부착단백질 생성 유전자, *cat1*, *tsal* 을 포함하는 항산화제 유전자, *sod1*(*Microbiology* **148**, 3705-3713 (2002)), *sod2*, *sod3*, *sod4*, *sod5*, *sod6*을 포함하는 유해산소제거효소 유전자, *sap1*, *sap2*, *sap3*, *sap4*, *sap5*, *sap6*(*Infect. Immun.* **65**, 3529-3538 (1997); *Infect. Immun.* **65**, 3539-3546 (1997))을 포함하는 산 프로테아제 생성 유전자 중 선택된 하나 이상이 될 수 있다.
- <18> 상기 형태전환관련 유전자, 부착단백질 생성 유전자, 항산화제 유전자, 유해산소제거효소 유전자 및 산 프로테아제 생성 유전자를 포함하는 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스는 당업계 공지인 캔디다 알비칸스 유전자 녹아웃(knock-out) 방법으로 제작할 수 있는데, 참고문헌(Yeast 2005 vol.22 p907-918)의 방법을 그대로 또는 변형하여 제작할 수 있다. 예를 들어 설명하면, 우선, mini-CaURA3 선택표지 카세트를 함유하고 있는 벡터 pDDB57 (Gene Bank Accession No. AF173953)를 변형하여 CaURA3 선택표지 카세트를 제조한다. 그 다음 캔디다 알비칸스 표적 유전자 파쇄카세트 제조를 제조하기 위하여, pDDB57 벡터를 제한효소로 자른 후 링커를 삽입하여 벡터를 제조한 다음, 유전자 파쇄 카세트를 제조하기 위하여 타겟 프라이머를 제조 및 PCR을 통해 증폭한 후 제한효소를 이용하여 3-조각 라이게이션 방법으로 벡터에 삽입하였고, 제조된 벡터를 캔디다 알비칸스에 넣어 형질전환시켜 제조한다.
- <19> 상기 방법 이외에 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 ATCC, KCTC, KACC 등에서 입수하여 사용할 수도 있다.
- <20> 본 발명의 바람직한 일 실시예에서는, 형태전환관련 유전자 *efg1* 또는 *cph1* 또는 *efg1/cph1* 가 파괴된 캔디다 알비칸스 균주, 항산화제 유전자 *cat1* 또는 *tsal*이 파괴된 캔디다 알비칸스 균주 또는 유해산소제거효소 유전자 *sod1*, *sod2* 또는 *sod3*이 파괴된 캔디다 알비칸스 균주를 사용한다.
- <21> 또한, 본 발명에서 사용하는 예쁜꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)은 한 세대가 2-3주로 짧고, 한 세대에 300 마리 이상의 자손을 번식할 수 있으며, 배양하기 쉽고 관찰도 쉬우므로 스크리닝 모델로서 적합하다.
- <22> 본 발명의 바람직한 일 실시예에서는, 25℃ 이상의 온도에서는 증식할 수 없는 돌연변이 *glp-4* 예쁜꼬마선충을 사용하여 스크리닝을 수행하였으나, 야생형 예쁜꼬마선충이나 돌연변이 예쁜꼬마선충 모두를 사용할 수 있다.
- <23> 이러한 예쁜꼬마선충에게 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 먹이로 제공하여 스크리닝하는데, 먹이로 제공하는 방식은 예쁜꼬마선충 배양용 고체 배지에 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 배양한 배양물을 도말함으로써 예쁜꼬마선충에게 먹이를 제공하는 것을 특징으로 한다.
- <24> 본 발명의 스크리닝 방법은 또한, 형태전환관련 유전자, 부착단백질 생성 유전자, 항산화제 유전자, 유해산소제거효소 유전자 및 산 프로테아제(acid protease) 생성 유전자 중 선택된 하나 이상의 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스가 제공된 예쁜꼬마선충과 야생형 캔디다 알비칸스가 제공된 예쁜꼬마선충을 육안으로 비교하는

단계를 추가로 포함한다.

- <25> 본 발명의 일 실시예에서는, 공지된 주요 병원성 기작 중 하나인 형태전환과 관련된 유전자 *efg1*, *cph1* 및 *efg1/cph1* 이 파괴된 캔디다 알비칸스를 배양한 배양물을 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공하고 14일간 배양하면서 야생형 캔디다 알비칸스가 제공된 예쁜꼬마선충과 비교했을 때, 형태전환관련 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스가 제공된 예쁜꼬마선충에게서 생존율(%)이 증가하는 것을 확인하였다(도 1).
- <26> 상기와 같이, 생존율(%)을 지표로 하여 캔디다 알비칸스에서 파괴시킨 타겟 유전자가 병원성인지 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, 형태전환관련 유전자 A를 파괴시킨 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공시, 야생형 캔디다 알비칸스를 제공한 경우에 비해 예쁜꼬마선충의 생존율(%)이 증가한다면 형태전환관련 유전자 A는 병원성과 관련된 유전자라고 간주할 수 있고, 반대로 형태전환관련 유전자 B를 파괴시킨 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공시 야생형 캔디다 알비칸스를 제공한 경우에 비해 예쁜꼬마선충의 생존율(%)이 유사하거나 차이가 작다면 특정 유전자 B는 병원성과 관련된 유전자가 아니라고 간주할 수 있다.
- <27> 상기한 단계에 의해 캔디다 알비칸스의 병원성과 관련된 것으로 밝혀진 타겟 유전자의 경우, 이 유전자 자체 또는 이로부터 발현된 단백질을 또한 항진균성 물질의 스크리닝에 다시 이용될 수 있는 가능성을 보여준다.
- <28> 따라서 본 발명은 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공하는 것을 포함하는 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝 방법을 이용한 항진균성 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- <29> 자세하게는, 형태전환관련 유전자, 부착단백질 생성 유전자, 항산화제 유전자, 유해산소제거효소 유전자 및 산 프로테아제 생성 유전자 중 선택된 하나 이상의 타겟 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스를 예쁜꼬마선충의 먹이로 제공하는 단계; 상기 유전자가 파괴된 캔디다 알비칸스가 제공된 예쁜꼬마선충과 야생형 캔디다 알비칸스가 제공된 예쁜꼬마선충을 일정 기간 동안 적정 배양온도에서 배양하면서 일정 시간마다 생존한 예쁜꼬마선충의 개체수를 육안으로 비교하는 단계; 상기 유전자의 병원성 여부를 결정하는 단계; 및 병원성 유전자 자체 또는 이로부터 발현된 단백질을 이용하여 항진균성 물질을 스크리닝하는 단계를 통하여 항진균성 물질을 스크리닝할 수 있다.
- <30> 상기에서 병원성 유전자인 것으로 결정된 유전자 또는 이로부터 발현된 단백질을 이용하여 항진균성 물질을 스크리닝하는 단계는 당업계 공지된 방법이나 공개문헌(예, 한국특허공개 제2005-102977호 및 미국특허등록 6,582,911)에 기재된 방법 응용하여 수행할 수 있다.
- <31> 상술한 본 발명의 스크리닝 방법은, 배양이 용이하고, 육안으로도 생존여부 관찰이 용이한 예쁜꼬마선충을 이용함으로써 항진균 물질 개발의 기초가 되는 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝을 간단하고 용이하게 하고, 병원성 유전자를 정확하게 스크리닝할 수 있으며, 스크리닝 시간을 단축시키는 작용효과가 있다.
- <32> 또한, 본 발명의 스크리닝 방법은 마우스 등과 같은 실험 동물을 사용하는 것과 달리 윤리적 문제에서 벗어날 수 있으며, 비용 면에서도 경제적이며, 실험실 내 HTS(high throughput screening)을 가능하게 한다.
- <33> 나아가서는 본 발명의 스크리닝 방법은 이에 의해 발굴된 병원성 유전자 또는 이의 단백질을 이용하여 항진균 물질 스크리닝을 가능하게 하고, 캔디다 알비칸스의 병원성 기작 연구에 유용하게 사용될 수 있다.
- <34> 이하, 실시예를 통하여 본원 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본원 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본원 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- <35> **실시예 1: 예쁜꼬마선충을 이용한 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝**
- <36> (1) 예쁜꼬마선충 및 캔디다 알비칸스를 포함한 세균의 배양
- <37> 예쁜꼬마선충으로는 선충유전센터 (Caenorhabditis Genetic Center, CGC, USA)에서 생식선 증식의 이상으로 25℃ 이상의 온도에서 증식할 수 없는 예쁜꼬마선충의 돌연변이 *glp-4*를 입수하여 사용하였고, NGM 고체배지 (염화나트륨 3g/L, 아가 17g/L, 박토 펄톤 25g/L, 1M 황산마그네슘 1mL/L, 1M 인산칼륨 25mL/L, 1M 염화칼슘 1mL/L, pH 6.0)에 비병원성 대장균 OP50 균주를 도말한 것을 먹이로 공급하며 25℃에서 배양하였다.
- <38> 비병원성 대장균 OP50은 ATCC (American Type Culture Collection, USA)에서 분양 받아 LB 배양액 (Luria-bertani broth; 트립톤 10g/L, 효모추출물 5g/L, 염화나트륨 10g/L)을 이용하여 37℃에서 배양하였다.
- <39> 또한, 병원성 균주인 캔디다 알비칸스의 야생형 SC5314, 효모인 사카로마이세스 세레비지아 및 병원성의 주요인인 형태전환관련 유전자(*efg1*, *cph1*, *efg1/cph1*)가 파괴된 캔디다 균주(입수처: 이화여대 최원자교수님 진



균유전학 연구실)는 YPD 배양액 (효모추출물(Y), 펩톤(P), 및 텍스트로오즈 (D)을 함유한 배지; 효모추출물 1%, 펩톤 2%, 글루코스 2%)을 이용하여 30℃에서 배양하였다.

<40> (2) 캔디다 알비칸스 감염에 의한 예쁜꼬마선충의 생존율 확인

<41> 상기 실시예 1-(1)에서 준비한 예쁜꼬마선충에게 비병원성 대장균 OP50과 사카로마이세스 세레비지아, 병원성 진균인 캔디다 알비칸스 야생형 균주 SC5314 및 형태전환관련 관련 유전자(efg1, cph1, efg1/cph1)가 파괴된 캔디다 균주를 먹이로 제공하고 배양하여 예쁜꼬마선충의 생존율을 관찰하였다.

<42> 먼저, LB 배양액에서 하룻밤 키운 비병원성 대장균 OP50과 YPD 배양액에서 하룻밤 키운 사카로마이세스 세레비지아 (S. cerevisiae), 병원성 진균인 캔디다 알비칸스 야생형 균주 SC5314 및 형태전환관련 관련 유전자(efg1, cph1, efg1/cph1)가 파괴된 캔디다 균주를 NGM 배지에 도말하였다.

<43> 이때, 예쁜꼬마선충의 개체간의 차이를 줄이기 위하여, 한 모체에서 나온 알에서 자란 선충을 회수하여 세균들이 도말된 NGM 배지 위에 옮기고 25℃에서 14일 동안 배양하였다. 배양하면서 매일 현미경을 통해 살아있는 선충의 개수를 계수하고 그 생존율을 도 1에 나타내었다.

<44> 도 1의 결과를 보면, 비병원성 대장균 OP50에 감염된 예쁜꼬마선충(■) 및 사카로마이세스 세레비지아에 감염된 예쁜꼬마선충(▲)에 비해, 병원성 진균 SC5314에 감염된 예쁜꼬마선충(○)은 배양 초기부터 생존율이 급격히 감소하여 낮은 생존율을 나타냄을 알 수 있다.

<45> 이와 비교하여, 군사 형성 관련 유전자가 파괴된 진균에 감염된 예쁜꼬마선충(□, △, ●)의 생존율이 병원성 진균 SC5314에 감염된 경우에 비해서 높은 것을 확인할 수 있었다. 특히, cph1 유전자가 파괴된 진균 및 efg1/cph1 유전자가 파괴된 진균에 감염된 예쁜꼬마선충의 경우 비병원성 대장균에 감염된 예쁜꼬마선충의 생존율과 비슷한 수준으로 나타나, 형태전환관련 관련된 유전자 efg1 및 cph1 가 병원성 진균인 캔디다 알비칸스가 병원성을 나타낼 수 있게 하는 매우 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

<46> 실시예 2: 예쁜꼬마선충을 이용한 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝

<47> 상기 실시예 1과 동일하게 병원성 유전자 스크리닝을 수행하되, 실시예 1에서 사용한 형태전환관련 관련 유전자가 파괴된 균주 대신 유해산소 제거효소 유전자(sod1, sod2, sod3)가 파괴된 캔디다 균주를 사용하여 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자를 스크리닝하고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<48> 도 2의 결과를 보면, 비병원성 대장균 OP50에 감염된 예쁜꼬마선충(■)에 비해 병원성 진균 SC5314에 감염된 예쁜꼬마선충들(△)은 배양 초기부터 생존율이 급격히 감소하여 낮은 생존율을 나타냄을 알 수 있다.

<49> 이와 비교하여, 유해산소 제거효소 유전자가 파괴된 진균에 감염된 예쁜꼬마선충(●, □, ○)의 생존율이 병원성 진균 SC5314에 감염된 예쁜꼬마선충의 경우에 비해 높은 것을 확인함으로써, 유해산소 제거효소 유전자가 병원성 진균인 캔디다 알비칸스가 병원성을 나타낼 수 있게 하는 매우 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

<50> 실시예 3: 예쁜꼬마선충을 이용한 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자 스크리닝

<51> 상기 실시예 1과 동일하게 병원성 유전자 스크리닝을 수행하되, 실시예 1에서 사용한 형태전환관련 관련 유전자가 파괴된 균주 대신 항산화제 유전자(cat1, tsal, tsal/cat1)가 파괴된 캔디다 균주를 사용하여 캔디다 알비칸스의 병원성 유전자를 스크리닝 하고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

<52> 도 3의 결과를 보면, 비병원성 대장균 OP50에 감염된 예쁜꼬마선충(△) 및 사카로마이세스 세레비지아에 감염된 예쁜꼬마선충(○)에 비해, 병원성 진균 SC5314에 감염된 예쁜꼬마선충들(▲)은 배양 초기부터 생존율이 급격히 감소하여 낮은 생존율을 나타냄을 알 수 있다.

<53> 이와 비교하여, 항산화제 유전자가 파괴된 진균에 감염된 예쁜꼬마선충(●, ■, □)의 생존율이 병원성 진균 SC5314에 감염된 경우에 비해서 높은 것을 확인함으로써, 항산화제 유전자 cat1 및 tsal이 병원성 진균인 캔디다 알비칸스가 병원성을 나타낼 수 있게 하는 매우 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<54> 도 1은 캔디다 알비칸스 접종 후 예쁜꼬마선충의 생존율을 나타내는 그래프로서, 비병원성 대장균인 OP50 섭취균의 생존율(■), 제빵 효모인 사카로마이세스 세레비지아 섭취균의 생존율(▲), 병원성 캔디다 알비칸스 야생형 SC5314 섭취균의 생존율(○), 병원성 캔디다 알비칸스의 형태전환관련 조절 유전자 cph1이 파괴된 균주 섭취균의 생존율(△), 병원성 캔디다 알비칸스의 형태전환관련 조절 유전자 efg1이 파괴된 균주 섭취균의

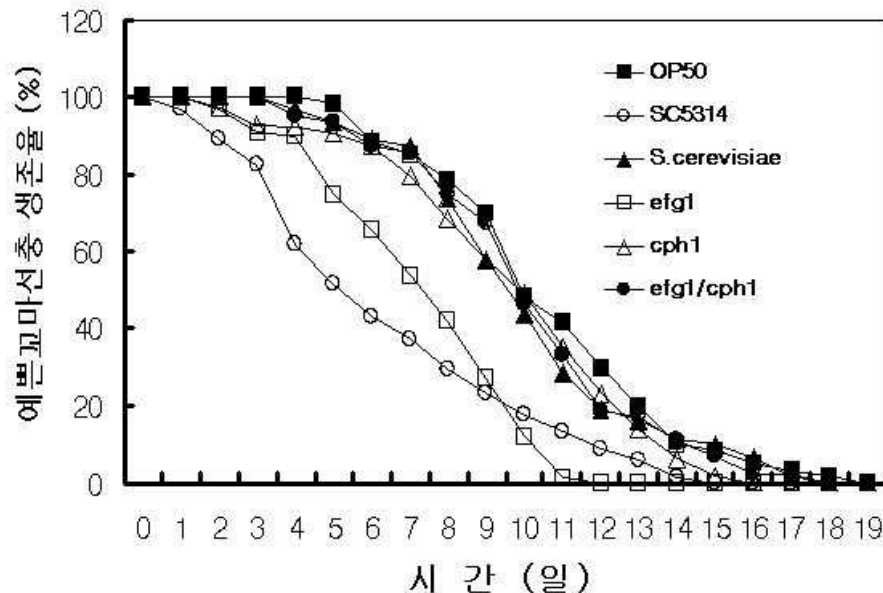
생존율(□), 및 병원성 캔디다 알비칸스의 형태전환관련 조절 유전자 *efg1/cph1*이 파괴된 균주 섭취균의 생존율(●)이다.

<55> 도 2는 캔디다 알비칸스 접종 후 예쁜꼬마선충의 생존율을 나타내는 그래프로서, 비병원성 대장균인 OP50 섭취균의 생존율(■), 병원성 캔디다 알비칸스 야생형 SC5314 섭취균의 생존율(△), 제빵 효모인 사카로마이세스 세레비지아 섭취균의 생존율(▲), 병원성 캔디다 알비칸스의 유해산소제거효소 유전자 *sod1*이 파괴된 균주 섭취균의 생존율(●), 병원성 캔디다 알비칸스의 유해산소제거효소 유전자 *sod2*가 파괴된 균주 섭취균의 생존율(□), 및 병원성 캔디다 알비칸스의 유해산소제거효소 유전자 *sod3*이 파괴된 균주 섭취균의 생존율(○)이다.

<56> 도 3은 캔디다 알비칸스 접종 후 예쁜꼬마선충의 생존율을 나타내는 그래프로서, 비병원성 대장균인 OP50 섭취균의 생존율(△), 제빵 효모인 사카로마이세스 세레비지아 섭취균의 생존율(○), 병원성 캔디다 알비칸스 야생형 SC5314 섭취균의 생존율(▲), 병원성 캔디다 알비칸스의 항산화제 유전자 *cat1*이 파괴된 균주 섭취균의 생존율(●), 병원성 캔디다 알비칸스의 항산화제 유전자 *tsa1*가 파괴된 균주 섭취균의 생존율(■), 및 병원성 캔디다 알비칸스의 항산화제 유전자 *tsa1/cat1*이 파괴된 균주 섭취균의 생존율(□)이다.

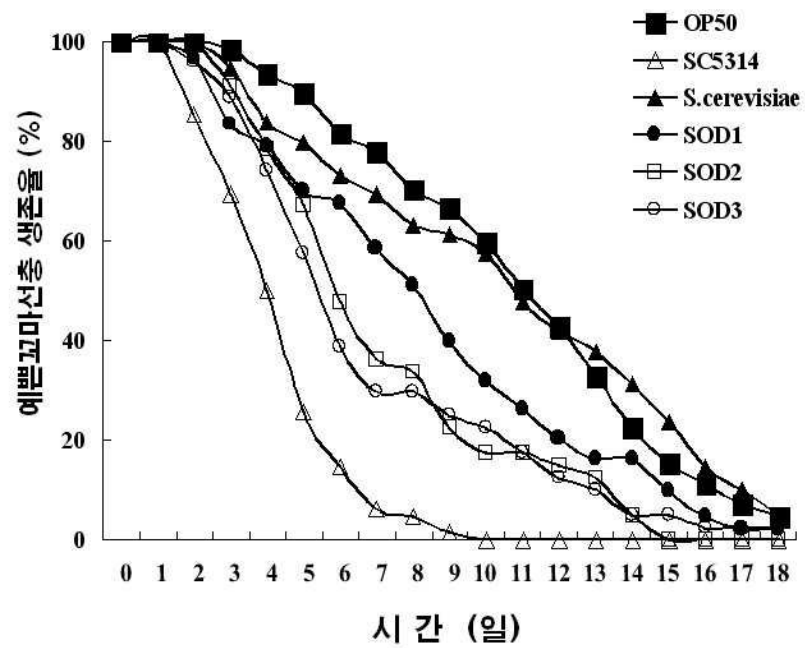
## 도면

도면1





도면2



도면3

