(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0039034
(43) 공개일자 2009년04월22일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/04 (2006.01) *C12Q 1/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0104428
(22) 출원일자 2007년10월17일
심사청구일자 2007년10월17일

(71) 출원인
숭실대학교산학협력단
서울 동작구 상도동 511
(72) 발명자
반용선
서울 동작구 상도동 511
(74) 대리인
서원호

전체 청구항 수 : 총 5 항

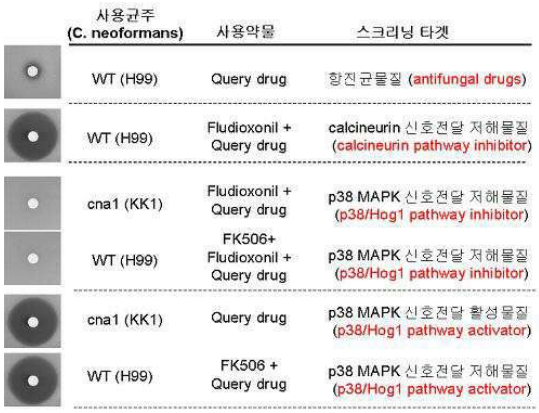
(54) 크립토코커스 네오포만스 균주를 이용하여신호전달조절물질을 스크리닝하는 방법

(57) 요 약

본 발명은 p38/Hog1 MAPK 신호전달체계 및 calcineurin 신호전달체계를 조절하는 활성 물질의 다중 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 *Cryptococcus neoformans* 균주를 이용하여 p38 MAPK/calcineurin 신호전달조절물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 항진균 물질뿐 아니라, 인간에게서 각종 염증반응 및 면역반응을 조절하는 p38/Hog1 MAPK와 calcineurin 신호전달체계의 조절물질을 간단하고 빠르게 또한 저비용으로 스크리닝하고, 스크리닝된 물질의 표적 유전자를 탐색할 수 있다. 본 방법은 기존의 신약 스크리닝이 특정 유전자/단백질 타깃을 중심으로 이루어지는 데 반해, 해당 신호전달체계 전체를 모니터링 할 수 있어, 새로운 신호전달조절물질을 타깃으로 하는 약물을 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

Cryptococcus neoformans 균주를 이용하여 p38 MAPK/calcineurin 신호전달조절물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

야생형 *C. neoformans* 균주(WT)에 후보 물질 및 fludioxonil을 점적하여 상기 신호전달조절물질 중 Calcineurin 신호전달 저해물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

Calcineurin pathway가 저해된 *C. neoformans cna1* 돌연변이 균주(cna1) 또는 FK506를 점적한 *C. neoformans* 균주(WT)에 후보 물질 및 fludioxonil를 점적하여 상기 신호전달조절물질 중 p38/Hog1 MAPK 신호전달 저해물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

Calcineurin pathway가 저해된 *C. neoformans cna1* 돌연변이 균주(cna1) 또는 FK506를 점적한 *C. neoformans* 균주(WT)에 후보 물질을 점적하여 상기 신호전달조절물질 중 p38/Hog1 MAPK 신호전달 활성물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 5

야생형 *Cryptococcus neoformans*(WT), p38/Hog1 pathway가 저해된 *C. neoformans hog1* 돌연변이 균주(hog1) 또는 Calcineurin pathway가 저해된 *C. neoformans cna1* 돌연변이 균주*(cna1)*를 포함하는 p38 MAPK/calcineurin 신호전달조절물질 스크리닝용 키트.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 p38/Hog1 MAPK 신호전달체계 및 calcineurin 신호전달체계를 조절하는 활성 물질의 다중 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 *Cryptococcus neoformans* 균주를 이용하여 p38 MAPK/calcineurin 신호전달조절물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 진핵 생물인 곰팡이는 계통학적으로 식물보다도 동물에 가까운 것으로 알려져 있다. 따라서 많은 곰팡이의 유전자, 단백질 및 이들의 생리현상을 조절하는 신호전달체계는 인간에게서도 상당히 진화적으로 보존되어 있다는 것이 잘 알려져 있다. 이러한 곰팡이와 인간 생체시스템의 유사성으로 인해, 곰팡이 병원균을 제거하기 위한 항진균제 등은 대부분 인간에게 독성을 끼치는 것으로 알려져 있다.

<3> 현재 사용되는 항진균제의 메커니즘은 진균의 에르고스테롤이나 스테롤의 생합성을 억제하거나, 이들의 세포막을 파괴하는 방식이 대부분이었다. 최근에 기존 항진균제에 대한 내성 균주들이 출현하고 있어, 새로운 항진균 타깃의 발굴이 절실한 실정이다.

<4> 따라서, 본 발명의 발명자는 새로운 항진균 타깃을 발견하고, 인간에 대한 독성을 최소화하기 위하여 인간에게서는 발견되지 않는 신호전달시스템인 two component system에 의한 *Cryptococcus neoformans*의 p38/Hog pathway 신호전달체계와 calcineurin 신호전달체계를 동시에 조절하는 방법을 통하여 *Cryptococcus*

neoformans 감염을 치료하는 방법 등에 대하여 출원한바 있다(미국 특허 출원 번호 11/472,856 및 미국 특허 출원을 기초로 한 PCT 특허 출원 공개 번호 WO/2007/2120).

<5> 이를 요약하면, Fludioxonil를 투여하여 two-component system과 그 신호체계 하위에 위치한 p38/Hog MAPK 신호전달체계를 활성화하고 이로 인해 *Cryptococcus neoformans* 세포 내 글리세롤이 과다 축적되어 세포가 팽창하도록 하고, 이에 더하여 FK506 또는 Rapamycin과 같은 면역억제제를 투여하여 Calcineurin 신호전달체계를 저해하여 세포벽 두께를 감소시킴으로써 결국 진균 세포의 용해에 이르도록 하는 것이다.

<6> 도 1은 이들 두 신호전달체계 조절을 통하여 얻어지는 항진균의 시너지 효과를 나타낸 사진이며, 도 2는 이들 두 pathway 조절을 통하여 얻어지는 항진균의 시너지 효과의 메커니즘을 나타내는 도식이다.

<7> 한편, 생리활성 조절에 중요한 다양한 신호전달체계가 곰팡이와 인간에게서 모두 진화적으로 보존되어 있다는 사실은 (예, p38/Hog1 MAPK 와 Calcineurin), 반대로 곰팡이 시스템이 이들 신호전달체계를 연구하는 아주 중요한 도구가 될 수 있음을 의미한다. p38/Hog1 MAPK는 인간에 있어서 다양한 스트레스 반응에 관여하며 사이토카인 등에 반응하여 세포 내 면역관련 유전자의 발현을 조절하여 다양한 염증 반응의 조절에 이용되고 있다. 또한, calcineurin 신호전달체계는 calcium 신호전달에 관여하여, 궁극적으로 T-cell의 분화와 발현에 관여하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 현재 전 세계적으로 가장 널리 사용되고 있는 면역억제제인 FK506의 경우, 동일하게 곰팡이에게서 calcineurin 신호전달체계를 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 사실은 인간과 곰팡이, 두 시스템의 유사성을 반증하는 하나의 예라 할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 본 발명은 기존의 염증 및 다양한 면역반응을 조절하는 p38 MAPK나 calcineurin의 신호전달을 조절하는 신약 후보 물질의 스크리닝이 이들 신호전달시스템 내의 특정 신호전달물질(예, p38 MAPK 혹은 FK506-binding protein 등)을 타깃으로 한 좁은 범위의 스크리닝이거나, 혹은 비용과 시간이 많이 소요되는 mammalian-cell based screening system의 단점을 보완하고자 한다.

과제 해결수단

<9> 본 발명은 위의 두 가지 문제를 해결하기 위해, 뇌수막염 유발 병원성 곰팡이인 *Cryptococcus neoformans*의 신호전달체계 중 진화적으로 보존된 p38/Hog1 MAPK 및 Calcineurin 신호전달체계 간의 상호작용을 약물 및 유전자 돌연변이에 의해 조절할 수 있음을 이용하여 (도 1과 2 참조), 이들 두 신호체계를 조절하는 각각의 물질을 저비용으로 빠르고 간단하게 탐색함은 물론, 동시에 뇌수막염 *C. neoformans*를 치료할 항진균 물질을 탐색할 수 있는 다중 스크리닝 방법이다. 이는 기존의 특정 신호전달물질을 타깃으로 하거나, 고비용의 mammalian-cell base system의 각각의 단점을 보완한 새로운 신약 스크리닝 방법이다.

<10> 본 발명의 스크리닝 방법은 야생형 *C. neoformans*(WT), p38/Hog1 pathway가 저해된 *C. neoformans hog1* 돌연변이 균주 (hog1) 또는 Calcineurin pathway가 저해된 *C. neoformans cna1* 돌연변이 균주(cna1)를 이용하여 p38/Hog1 MAPK 및 Calcineurin 신호전달조절물질을 스크리닝한다.

효 과

<11> 본 발명에 의한 스크리닝 방법을 이용하면, 진화적으로 보존된 p38/Hog1 MAPK 및 Calcineurin 신호전달체계를 조절하는 신호전달 물질을 저비용으로 빠르고 간단하게 탐색함은 물론, 동시에 뇌수막염 *C. neoformans*를 치료할 항진균 물질을 탐색할 수 있다. 발견된 새로운 신호전달물질은 인간의 p38 MAPK 및 Calcineurin 신호전달체계를 조절하는 면역조절후보 물질로서 테스트 될 수 있고, 항진균제 후보 물질로도 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<12> 도 3은 본 발명의 실시를 위한 대조군이다. 야생형 *C. neoformans*가 포함된 배지(WT), p38/Hog1 pathway가 저해된 *C. neoformans hog1 돌연변이 균주* (hog1)가 포함된 배지 및 Calcineurin pathway가 저해된 *C. neoformans cna1* 돌연변이균주(cna1)가 포함된 배지에 p38/Hog1 MAPK을 활성화해 항진균 활성이 있는 것으로 알려진 fludioxonil 점적한 후 헤일로의 생성 여부를 살펴보았다. 도 3에서 보듯이 약물을 점적하지 않은 경우는 세 배지 모두에서 헤일로가 생성되지 않았다. 그러나 fludioxonil 활성 물질을 WT에 점적한 경우 작은 크기의 헤일로를 발생시켜 약한 항진균 효과가 있음을 알 수 있고, 이러한 항진균 효과는 p38/Hog1 MAPK가 변이

된 *hog1 돌연변이 균에서*는 보이지 않으며, calcineurin이 변이된 cna1 돌연변이 균에서 도 2와 같은 메커니즘을 이용하여 fludioxonil과 synergistic effect를 일으켜 큰 헤일로를 발생시켰다.

<13> *hog1* 및 *cna1* 돌연변이 균주는 다음과 같은 과정으로 얻었다. *C. neoformans* 의 HOG1과 CNA1 유전자의 5'과 3' untranslated region (UTR)을 각각 PCR의 방법으로 증폭한 후 이를 dominant active selectable marker인 NAT (Nourseothricin acetyl transferase) 유전자와 함께 overlap PCR을 실시하여 disruption cassette를 만든 후 이를 야생형 균주인 *C. neoformans* H99 균주에 biolistic transformation의 방법으로 형질전환 한 후, 얻어진 Nourseothricin 저항성 균주 중에서 diagnostic PCR과 Southern hybridization을 통해 최종적으로 돌연변이 균을 검증한 후 확보하였다.

<14> 본 발명에서 이용되는 상기 균주는 한국미생물보존센터에 다음과 같이 기탁 되어 있다.

<15> *C. neoformans* wild type 균주 (H99) : 기탁번호 KCCM 50758

<16> *C. neoformans* hog1 mutant 균주 (YSB64) : 기탁번호 KCCM 50824

<17> *C. neoformans* cna1 mutant 균주 (KK1) : 기탁번호 KCCM 51286

<18> 도 4는 도 3의 결과를 대조구로 이용하여 새로운 신호전달 물질의 스크리닝 방법을 요약한 그림이다. 만약 어떤 후보 물질이 WT 균주에서 헤일로를 생성시켰다면 그 물질은 항진균 활성 물질이다.

<19> Calcineurin 신호전달 저해물질을 탐색하기 위해서는 WT 균주에 후보 물질과 함께 fludioxonil을 점적하여 위의 대조군에 보이는 FK506와 유사한 효과를 내는 물질을 탐색한다.

<20> p38/Hog1 MAPK 신호전달 저해물질을 스크리닝하기 위해서는 cna1 돌연변이 균 또는 FK506를 점적한 WT 균주에 후보 물질과 함께 fludioxonil를 점적하여 대조구에서 보이는 큰 헤일로를 줄여 주거나 없애주는 물질을 탐색한다.

<21> 반대로 p38/Hog1 MAPK 신호전달 활성물질을 탐색하기 위해서는 cna1 돌연변이 균 또는 FK506를 점적한 WT 균주에 fludioxonil이 없이 후보 물질만을 점적하여 대조구에서 보이는 fludioxonil과 유사하게 큰 헤일로를 만들어 주는 물질을 탐색한다.

도면의 간단한 설명

<22> 도 1은 *Cryptococcus neoformans*의 p38/Hog1 pathway 및 Calcineurin pathway 조절을 통하여 얻어지는 항진균 및 신호전달의 시너지 효과를 나타낸 사진이다.

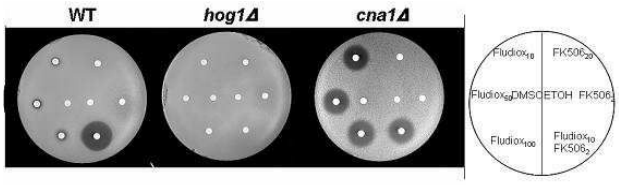
<23> 도 2는 *Cryptococcus neoformans*의 p38/Hog1 pathway 및 Calcineurin pathway 상호조절 작용을 통해 얻어지는 항진균 시너지 효과의 메커니즘을 나타낸 도식이다.

<24> 도 3은 본 발명의 실시를 위한 대조군이다.

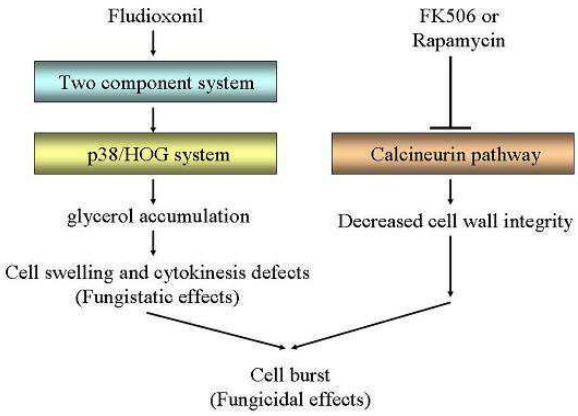
<25> 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 신호전달조절물질 스크리닝 실험 디자인이다.

도면

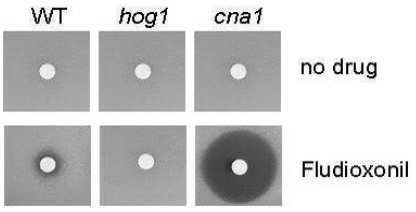
도면1



도면2



도면3



도면4

	사용균주 (C. neoformans)	사용약물	스크리닝 타겟
	WT (H99)	Query drug	항진균물질 (antifungal drugs)
	WT (H99)	Fludioxonil + Query drug	calcineurin 신호전달 저해물질 (calcineurin pathway inhibitor)
	cna1 (KK1)	Fludioxonil + Query drug	p38 MAPK 신호전달 저해물질 (p38/Hog1 pathway inhibitor)
	WT (H99)	FK506+ Fludioxonil + Query drug	p38 MAPK 신호전달 저해물질 (p38/Hog1 pathway inhibitor)
	cna1 (KK1)	Query drug	p38 MAPK 신호전달 활성물질 (p38/Hog1 pathway activator)
	WT (H99)	FK506 + Query drug	p38 MAPK 신호전달 저해물질 (p38/Hog1 pathway activator)