



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0095264
(43) 공개일자 2010년08월30일

(51) Int. Cl.

G01N 33/483 (2006.01) G01N 23/225 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01) C12R 1/85 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0014450

(22) 출원일자 2009년02월20일

심사청구일자 2009년02월20일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

(72) 발명자

송기원

서울특별시 종로구 평창동 345-103 102호

(74) 대리인

양부현

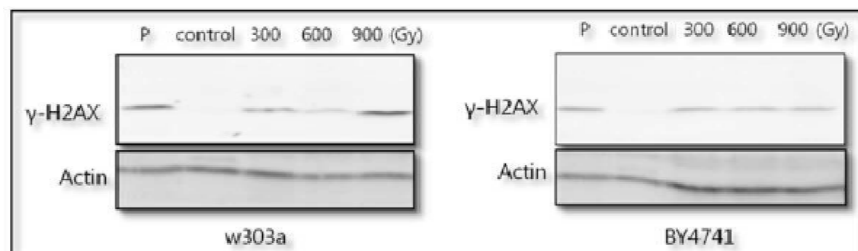
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 전자빔에 의한 진핵세포의 DNA 이중사슬 절단

(57) 요약

본 발명은 진핵세포에서 전자빔에 의해 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB)을 유도하는 조건, 전자빔에 의한 진핵세포에 야기된 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB) 발생을 분석하는 방법, 전자빔에 의한 진핵세포의 세포사멸(cell death)을 촉진 또는 억제하는 물질을 스크리닝 하는 방법, 그리고 전자빔에 의한 진핵세포의 세포사멸(cell death)과 관련된 기전에 관한 것이다. 본 발명은 전자빔에 의한 진핵세포에서 세포사멸 유도하는 분자적 기전을 최초로 제시한다. 본 발명은 전자빔으로 진핵세포에서 DSB를 유도하는 효율적인 조건, DSB를 분석하는 효율적인 방법, 그리고 전자빔을 이용하여 진핵세포의 DSB가 유발되었을 때 이를 복구하거나 세포사멸을 유도하는 기전의 유전자를 스크리닝 할 수 있는 시스템 및 방법을 제공한다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-8-0389

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관

연구사업명 원자력연구개발

연구과제명 효모 세포를 모델로 전지빔에 의한 유전체의 손상 및 감시체계 연구

기여율

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2008년 4월 1일 ~ 2009년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

진핵세포에 전자빔을 조사(irradiation) 하는 단계를 포함하는 진핵세포에서 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB)을 유도하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 진핵세포는 곰팡이(fungi), 식물세포 또는 동물세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 곰팡이는 효모인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 효모는 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 사이조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 스포로보로마이세스(*Sporobolomyces*), 토루로프시스(*Torulopsis*), 트리코스포론(*Trichosporon*), 워커하미아(*Wickerhamia*), 아쉬바이아(*Ashbya*), 블라스토마이세스(*Blastomyces*), 캔디다(*Candida*), 사이테로마이세스(*Citeromyces*), 크레브로테슘(*Crebrothecium*), 크립토크커스(*Cryptococcus*), 드바리오마이세스(*Debaryomyces*), 에노마이코프시스(*Endomycopsis*), 지오텐리쿰(*Geotrichum*), 한센룰라(*Hansenula*), 클로엑케라(*Kloeckera*), 리포마이세스(*Lipomyces*), 피키아(*Pichia*), 로도스포리둠(*Rhodospiridium*) 또는 로도토룰라(*Rhodotorula*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 전자빔은 300-600 Gy의 조사 흡수량(absorbed dose of radiation)으로 조사된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전자빔은 0.8-1.3 MeV의 에너지를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

(a) 진핵세포에 전자빔을 조사하는 단계; 및 (b) 상기 진핵세포에서 γ -H2AX의 인산화를 분석하는 단계를 포함하는 전자빔에 의한 진핵세포의 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB)의 발생을 분석하는 방법.

청구항 8

(a) 진핵세포에 전자빔을 조사하여 DSB를 유도하는 단계; 및 (b) 상기 진핵세포에서 γ -H2AX의 인산화를 분석하는 단계를 포함하며, 상기 단계 (a)의 전 또는 후에 분석 대상의 시험물질을 진핵세포에 처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 전자빔에 의한 진핵세포의 세포사멸(cell death) 촉진 또는 억제하는 물질을 스크리닝 하는 방법.

청구항 9

(a) *사카로마이세스 세레비시애* 결손(deletion) 변이체 라이브러리에 전자빔을 조사하여 DSB를 유도하는 단계; 및 (b) 상기 *사카로마이세스 세레비시애* 세포에서 γ -H2AX의 인산화를 분석하는 단계를 포함하며, 상기 결손 변이체에서 전자빔 조사 전후의 γ -H2AX의 인산화를 비교하여 진핵세포에서 전자빔에 의한 DSB를 복구하거나 세포 사멸(cell death)을 촉진하는데 관여하는 유전자를 스크리닝하는 방법.

청구항 10

제 7 항 또는 제 8 항에 있어서, 상기 진핵세포는 곰팡이(fungi), 식물세포 또는 동물세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서, 상기 곰팡이는 효모인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 효모는 *사카로마이세스*(*Saccharomyces*), *사이조사카로마이세스*(*Schizosaccharomyces*), *스포로보로마이세스*(*Sporobolomyces*), *토루로프시스*(*Torulopsis*), *트리코스포론*(*Trichosporon*), *윅커하미아*(*Wickerhamia*), *아쉬바이아*(*Ashbya*), *블라스토마이세스*(*Blastomyces*), *캔디다*(*Candida*), *사이테로마이세스*(*Citeromyces*), *크레브로테슘*(*Crebrothecium*), *크립토크커스*(*Cryptococcus*), *드바리오마이세스*(*Debaryomyces*), *에노마이코프시스*(*Endomycopsis*), *지오텍리쿰*(*Geotrichum*), *한세놀라*(*Hansenula*), *클로엑케라*(*Kloeckera*), *리포마이세스*(*Lipomyces*), *피키아*(*Pichia*), *로도스포리둠*(*Rhodospiridium*) 또는 *로도토룰라*(*Rhodotorula*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전자빔은 300-600 Gy의 조사 흡수량(absorbed dose of radiation)으로 조사된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전자빔은 0.8-1.3 MeV의 에너지를 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 고상의 배지 상에 있는 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전자빔이 조사되는 세포는 초기 대수기까지 배양된 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 γ -H2AX인산화 분석 대상의 세포는 살아 있는 세포(living cells)인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진핵세포에서 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB)을 유도하는 방법, 전자빔에 의한 진핵세포의 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB)의 발생을 분석하는 방법, 그리고 전자빔을 이용하여 진핵세포의 DSB가 유발되었을 때 이를 복구하거나 세포사멸을 유도하는 기전의 유전자를 스크리닝 할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 세계적으로 전자빔(electron beam) 가속기를 이용한 분야는 매우 다양하다. 전자빔은 금속의 용융 및 증발을 이용하여 금속의 용접 및 장착 분야에서 주로 적용되었지만, 최근에 그 응용 분야가 크게 확대되었다. 특히, 전자빔 공정을 통해 고무경화, 고분자 가교 및 개질, 수지경화, 섬유 개질 등에 기술향상이 크게 이루어졌고, 최근에는 수질처리 및 대기 정화에도 이용되고 있다. 또한 식품의 저장성을 높이고 용기 혹은 실험, 의학 도구를 멸균하는데도 전자빔이 많이 응용되고 있다.

[0003] 한편, 현재까지 공개된 전자빔을 이용한 국내 특허 문헌에는 이식용 의료 장치 및 구성성분, 동물이나 인체에 직/간접적으로 치료적 기능을 가진 활성 제제를 포함하는 조합물을 만드는데 사용된 예가 있고, 하수나 폐수 처리장에서 발생하는 방류수에 전자선을 조사하여 생성된 라디칼에 의해 화학 약품을 투입하지 않고 미생물 및 유기물질을 동시에 제거하는 등 살균 및 소독에 전자빔을 이용하는데 관한 것이다.

[0004] 또한, 국외 특허 문헌에는 전자빔 조사를 통해 감마선보다 비용과 시간, 인력, 독성을 가진 화학약품 사용 등을 줄이고 이식할 생체 조직을 효과적으로 멸균하는데 사용된 예가 있으며(미국 특허 제5989498호; 미국 특허 제6203755호), 실험동물들이 먹는 사료를 저가의 비용으로 멸균하거나 식품의 저장성을 높이는데 전자빔을 사용하는 용도 등이다. 그 밖에도 전자기 조사 소스에 모발 성장 구조물을 노출시켜 임상적으로 유효한 광선 강도로 모발의 성장을 촉진하는 장치나 전자빔을 산소 공급 장치에서 균을 제거하는데 이용하는 특허 문헌도 있다.

[0005] 그러나 전자빔이 살아있는 세포에 미치는 영향은 X-선 또는 IR(infrared)처럼 자세하게 규명되어 있지 않다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명자들은 전자빔이 진핵세포에 미치는 영향 및 그 영향을 설명할 수 있는 분자적 수준의 기전을 규명하여, 전자빔의 진핵세포 응용 가능성을 넓히고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 전자빔이 진핵세포의 DNA 이중사슬절단(double strand break: DSB)을 유도하여 세포사멸을 초래한다는 것을 규명하였고, 전자빔에 의한 진핵세포의 영향을 연구하기 위한 적합한 모델을 구축함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 진핵세포에서 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB)을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 전자빔에 의한 진핵세포의 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB)의 발생을 분석

하는 방법을 제공한다.

- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 전자빔에 의한 진핵세포의 세포사멸(cell death)을 촉진 또는 억제하는 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 전자빔에 의한 진핵세포의 DSB를 복구하거나 세포사멸을 유도하는 기전의 유전자를 스크리닝 할 수 있는 방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 진핵세포에 전자빔을 조사(irradiation) 하는 단계를 포함하는 진핵세포에서 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB)을 유도하는 방법.
- [0014] 본 발명자들은 전자빔이 진핵세포에 미치는 영향 및 그 영향을 설명할 수 있는 분자적 수준의 기전을 규명하여, 전자빔의 진핵세포 응용 가능성을 넓히고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 전자빔이 진핵세포의 DNA 이중사슬절단(double strand break: DSB)을 유도하여 세포사멸을 초래한다는 것을 규명하였고, 전자빔에 의한 진핵세포의 영향을 연구하기 위한 적합한 모델을 구축하였다.
- [0015] 본 발명은 전자빔을 이용한다. 전자빔은 감마선과 달리 전자가 직접 물체에 입자의 형태로 물리적인 충격을 가하는 성질이 있다. 본 발명은 살아 있는(living) 진핵세포에 대한 전자빔의 영향 및 이 영향에 대한 분자적 기전을 최초로 제시한다.
- [0016] 본 발명이 적용될 수 있는 세포는 특별하게 제한되지 않으며, 곰팡이(fungi), 식물세포(예컨대, 아가장대 세포) 또는 동물세포(예컨대, 곤충, 마우스, 래트, 인간 세포)를 포함한다.
- [0017] 바람직하게는 본 발명이 적용되는 곰팡이는 효모이고, 보다 바람직하게는 상기 효모는 *사카로마이세스* (*Saccharomyces*), *스키조사카로마이세스* (*Schizosaccharomyces*), *스포로보로마이세스* (*Sporobolomyces*), *토루로프시스* (*Torulopsis*), *트리코스포론* (*Trichosporon*), *윅커하미아* (*Wickerhamia*), *아쉬바이아* (*Ashbya*), *블라스토마이세스* (*Blastomyces*), *칸디다* (*Candida*), *사이테로마이세스* (*Citeromyces*), *크레브로테슘* (*Crebrothecium*), *크립토크스* (*Cryptococcus*), *드바리오마이세스* (*Debaryomyces*), *엔노마이코프시스* (*Endomycopsis*), *지오텍리컴* (*Geotrichum*), *한세눌라* (*Hansenula*), *클로엑케라* (*Kloeckera*), *리포마이세스* (*Lipomyces*), *피키아* (*Pichia*), *로도스포리둠* (*Rhodospiridium*) 또는 *로도토룰라* (*Rhodotorula*) 속(genus)에 속하는 효모이고, 보다 바람직하게는 *사카로마이세스*에 속하는 효모이고, 가장 바람직하게는 *사카로마이세스 세레비시애*이다.
- [0018] 또한, 본 발명이 적용될 수 있는 세포는, 생체 내 세포, 초기 배양된 세포(primary cultured cells), 계대 배양 세포 또는 암 세포 등을 모두 포함한다.
- [0019] 본 발명에서 이용되는 전자빔은 적합한 에너지를 갖는 빔을 생성시킬 수 있는 전자가속기(electron accelerator)를 이용하여 제공될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 전자빔은 0.1-3 MeV(mega electron-volt), 보다 바람직하게는 0.5-2 MeV, 보다 더 바람직하게는 0.8-1.3 MeV, 가장 바람직하게는 0.9-1.1 MeV의 에너지를 갖는다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 0.0001-0.1 mA, 보다 바람직하게는 0.01-0.05 mA, 보다 더 바람직하게는 0.01-0.04 mA, 가장 바람직하게는 0.015-0.03 mA의 에너지를 갖는다.
- [0021] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 진핵세포에서의 DSB를 유도하는 전자빔은 100-2000 Gy(gray), 보다 바람직하게는 200-1500 Gy, 가장 바람직하게는 300-600 Gy의 조사 흡수량(absorbed dose of radiation)으로 확인된다.
- [0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 진핵세포에 전자빔을 조사하는 단계; 및 (b) 상기 진핵세포에서 γ -H2AX의 인산화를 분석하는 단계를 포함하는 전자빔에 의한 진핵세포의 DNA 이중사슬 절단(double strand

break: DSB)의 발생을 분석하는 방법을 제공한다.

- [0023] 본 발명의 방법은 상기 DSB를 유도하는 방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [0024] 특히, 본 발명의 분석 방법에서 조사되는 전자빔의 세기는 매우 중요하다. 상술한 바람직한 전자빔의 세기 범위에서 실시되지 않고 그 범위보다 낮은 세기인 경우에는 DSB가 잘 유도되지 않는 문제점이 있고, 상기 세기 범위보다 초과하는 세기의 전자빔을 이용하는 경우에는 분석 대상의 세포들이 거의 사멸하여 살아있는 세포에서의 DSB 분석을 제대로 분석하지 못하는 문제점이 있다. 또한 본 발명의 예를 다른 세포에 적용하기 위해서는 세포의 종류에 따라 그 범위의 조정이 필요하다.
- [0025] 본 발명의 분석 방법은 효모 모델에서 구현하는 것이 가장 바람직하다.
- [0026] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명의 방법에서 이용되는 세포는 고체상의 배지 상에 있는 세포이다. 액상의 배지 내에 있는 세포의 경우에는 전자빔이 균일하게 조사되지 않는 문제점이 있다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 세포는 초기 대수기까지 배양된 세포이다. 예를 들어, 효모의 경우 약 10^5 세포/ml의 세포밀도를 나타낼 까지 즉 초기 대수기까지 배양된 세포를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0028] 전자빔에 의한 DSB 발생 여부는 인산화 γ -H2AX를 분석하여 실시할 수 있다. 세포 내에서 DNA 이중사슬절단이 발생되면 H2A 히스톤 변이체인 γ -H2AX는 포스포타이딘이노시톨 3-키나아제-유사 단백질 키나아제, ATM 및 ATR에 의해 인산화 된다. H2AX의 인산화는 DSB 주위의 국부적 크로마틴 구조화(organization)를 변화시키는 데 필수적이며 DNA의 다양한 복구 인자에 대한 접근가능성을 증가시킨다.
- [0029] 상기 진핵세포에서 γ -H2AX의 인산화를 분석하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 또는 면역염색 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)*, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0030] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 인산화 γ -H2AX 항체가 이용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 미지의 세포 시료를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 인산화 γ -H2AX에 대한 항체와 상기 세포 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0032] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다. 본 발명의 방법에 의해 분리 또는 동정되는 미지의 세포 시료는, 특히 제한적이지 않으며, 일차 세포배양물, 서브배양물 및 세포 현탁액을 포함한다.
- [0033] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P₄₅₀을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2 '-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), σ -페닐렌디아민(OPD)

및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.

- [0034] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 인산화 γ -H2AX에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 세포 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 인산화 γ -H2AX에 특이적으로 반응하는 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.
- [0035] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화합물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P₄₅₀), 방사능물질((예컨대, C¹⁴, I¹²⁵, P³² 및 S³⁵), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.
- [0036] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널이 검출은 미지의 세포 시료에 연골 형성능 세포가 존재한다는 것을 가리키는 것이다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.
- [0037] 한편, 본 발명의 방법은 종래의 유세포 분석 방법(flow cytometry; Ormerod, M. G., ed. 1990, *Flow Cytometry: A Practical Approach*. IRL Press), MACS(magnetic-activated cell sorting; Robert David, et al., *Stem Cells*, 23:477-482(2005) 또는 면역친화성 정제방법(Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)에 따라 실시될 수 있다.
- [0038] 한편, 본 발명을 웨스턴 블롯팅 방법에 따라 실시하면, 본 발명은 (i) 세포로부터 수득한 단백질을 변성시키는 단계 (예컨대, SDS 및 2-머캅토에탄올을 이용하여 변성); (ii) 변성된 단백질을 SDS-PAGE하는 단계; (iii) SDS-PAGE가 완료된 젤 상의 변성 단백질을 NC 멤브레인으로 전이하는 단계; (iv) NC 멤브레인상의 단백질과 1차 항체인 항-인산화 γ -H2AX 항체를 반응시키는 단계; (v) 발색반응을 촉매하는 효소가 결합된 1차 항체와의 결합능을 갖는 2차 항체를 상기 1차 항체와 반응시키는 단계; (vi) 2차 항체에 결합된 효소의 기질을 첨가하여 발색반응을 유도하는 단계; 및 (vii) 발색반응에 의해 전개된 발색의 정도를 측정하는 단계를 포함한다.
- [0039] 단계 (b)에서 전자빔을 조사하지 않은 세포와 비교하여 인산화 γ -H2AX의 레벨이 높은 것으로 분석되면 DSB가 발생된 것으로 판단된다.
- [0040] 본 발명의 방법은 γ -H2AX의 인산화와 더불어 DNA 복구 인자인 Nbs1 및 Rad50 등의 분석과 병행하여 실시할 수 있으며, 이는 본 발명의 분석 정확성을 더욱 향상시켜준다.
- [0041] 이러한 DSB의 발생 여부 판단은 전자빔의 진행세포 응용가능성을 보다 높여주며, 예를 들어 전자빔을 이용한 항암치료 가능성, 조건 확립 등에 이용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 진행세포에 전자빔을 조사하여 DSB를 유도하는 단계; 및 (b) 상기 진행세포에서 γ -H2AX의 인산화를 분석하는 단계를 포함하며, 상기 단계 (a)의 전 또는 후에 분석 대상의 시험물질을 진행세포에 처리하는 단계를 추가적으로 포함하는 전자빔에 의한 진행세포의 세포사멸(cell death) 촉진 또는 억제하는 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 방법은 상기 DSB의 발생을 분석하는 방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0044] 본 발명의 방법에서 처리되는 시험물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)이다. 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입

가능하다.

- [0045] 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스를 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., *J. Med. Chem.* 37, 2678, 1994; Cho et al., *Science* 261, 1303, 1993; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop et al., *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- [0046] 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 가장 바람직한 진핵세포는 효모이다. 본 발명의 스크리닝 방법에서 조사되는 전자빔의 세기는 매우 중요하다. 상술한 바람직한 전자빔의 세기 범위에서 실시되지 않고 그 범위보다 낮은 세기인 경우에는 DSB가 잘 유도되지 않아 γ -H2AX가 잘 검출되지 않는 문제점이 있고, 상기 세기 범위보다 초과하는 세기의 전자빔을 이용하는 경우에는 분석 대상의 세포들이 거의 사멸하여 살아있는 세포에서의 γ -H2AX 레벨 분석을 제대로 분석하지 못하는 문제점이 있다.
- [0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)에서 γ -H2AX인산화 분석 대상의 세포는 살아 있는 세포(living cells)이다.
- [0048] 단계 (b)에서 γ -H2AX의 인산화가, 시험물질을 처리하지 않은 세포와 비교하여 감소된 경우에는 시험물질은 전자빔에 의한 진핵세포의 세포사멸(cell death)을 촉진하는 물질로서 이용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 물질은 전자빔에 의한 암의 라디오세라피(radiotherapy)에 있어서 보조적인 물질로서 이용될 수 있다.
- [0049] 단계 (b)에서 γ -H2AX의 인산화가, 시험물질을 처리하지 않은 세포와 비교하여 증가된 경우에는 시험물질은 세포 내 DSB를 억제하여 결국 세포사멸을 억제하는 물질로서 판정될 수 있다. 예를 들어, 이러한 물질은 화학요법제(chemotherapy)에 이용되는 많은 의약, 특히 세포독성을 나타내는 의약(예컨대, 항암제)의 투여에서 나타나는 부작용, 예컨대 정상세포의 사멸을 방지하여 부작용을 억제하는 보조적인 물질로서 이용될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) *사카로마이세스 세레비시애* 결손(deletion) 변이체 라이브러리에 전자빔을 조사하여 DSB를 유도하는 단계; 및 (b) 상기 *사카로마이세스 세레비시애* 세포에서 γ -H2AX의 인산화를 분석하는 단계를 포함하며, 상기 결손 변이체에서 전자빔 조사 전후의 γ -H2AX의 인산화를 비교하여 진핵세포에서 전자빔에 의한 DNA 이중사슬 절단(double strand break: DSB)을 복구하거나 세포사멸(cell death)을 촉진하는데 관여하는 유전자를 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0051] 본 발명의 방법은 상기 DSB의 발생을 분석하는 방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0052] 본 발명은 전자빔에 의한 DSB를 복구 또는 세포사멸을 촉진하는데 관여하는 유전자를 스크리닝 하기 위하여, 기본적으로 *사카로마이세스 세레비시애* 결손 변이체 모델을 이용한다. *사카로마이세스 세레비시애* 결손 변이체 라이브러리는 당업계에서 용이하게 구입할 수 있다(Open Biosystems Cat# YSC1053).
- [0053] 전체 유전체 중 유전자 각각이 결손 되어 있는 라이브러리에 전자빔을 조사했을 때 γ -H2AX의 인산화 정도를 동일한 조건의 전자빔 조사된 야생형과 비교하여, 전자빔에 의한 DSB 복구나 세포사멸을 촉진하는데 관여하는 유전자를 규명할 수 있다.
- [0054] *사카로마이세스 세레비시애* 결손 변이체를 이용하여 유전자의 기능을 규명하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(참조: Winzeler, E.A., et al., Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis, *Science*, 285:901-906(1999); Giaever, G., et al., Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome, *Nature* 418: 387-391(2002); Wach, A. et al., New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 10, 1793-1808.(1994)).
- [0055] 단계 (b)에서 전자빔에 의해 DSB가 유도된 *사카로마이세스 세레비시애* 결손 변이체에서 γ -H2AX의 인산화 정도가 동일한 조건의 전자빔 조사된 야생형 *사카로마이세스 세레비시애*와 비교하여 낮은 경우에는, 결손된 유전자가 DSB 복구에 관여하는 유전자로 판정한다. 반대로, 야생형 *사카로마이세스 세레비시애*와 비교하여 γ -H2AX의 인

산화 정도가 증가된 경우에는, 결손된 유전자는 DSB 복구를 억제하여 세포사멸을 촉진하는데 관여하는 유전자로 판정한다.

효 과

[0056] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0057] (a) 본 발명은 전자빔에 의한 진핵세포 세포사멸의 분자적 기전을 최초로 제시한다.

[0058] (b) 본 발명은 진핵세포의 이중사슬 절단(DSB)을 유도하는 효과적인 방법을 제공한다.

[0059] (c) 또한 본 발명은 전자빔에 의한 진핵세포의 DSB를 분석하는 효율적인 방법을 제공한다.

[0060] (d) 본 발명은 전자빔에 의한 진핵세포의 DSB를 촉진 또는 억제시킬 수 있는 물질을 대량으로 스크리닝할 수 있는 시스템을 제공한다.

[0061] (e) 본 발명은 전자빔에 의한 진핵세포의 DSB를 복구하거나 세포사멸을 유도하는 기전의 유전자를 스크리닝 할 수 있는 방법을 제공한다.

[0062] (f) 본 발명은 궁극적으로 전자빔에 의한 항암 치료의 기반 지식을 제공한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험 방법

효모 균주 및 세포 배양

[0067] 본 연구에서 사용된 효모(*S. cerevisiae*) 균주는 두 개의 상이한 야생형이다: W303a(MAT α ; ade2-1; ura3-1; his3-11; trp1-1; leu2-3; 112 can 1-100, MCD Biology, CB 347, University of Colorado) 및 BY4741(MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0, Open Biosystems). 상기 효모를 30℃에서 YPAD 배지(1% 효모 추출물, 2% 박토-펩톤, 100 μ g/ml 아데닌 및 2% 텍스트로오스)에서 1차 배양하고 YPAD 배지(1% 효모 추출물, 2% 박토-펩톤, 100 μ g/ml 아데닌 및 2% 텍스트로오스)에서 24시간 동안 25℃에서 2차 배양을 하였다. 전자 빔에 노출시키기 전에, 효모 세포를 초기 대수기(10^5 세포/ml) 밀도까지 성장시켰다.

성장도 및 생존도 평가를 위한 스팟팅 분석(spotting assay)

[0069] 초기 대수기(10^5 세포/ml, OD₆₀₀ = 1)의 세포를 YPAD 플레이트 상에 연속적으로 희석시켰다. 플레이트를 25℃에서 8시간 동안 배양시킨 다음 전자빔(1.0 MeV, 0.025 mA)에 노출시켰다. 이어, 플레이트 상에 있는 전자빔-노출 세포를 25℃에서 36시간 동안 배양하였다.

세포 계수

[0071] 전자빔에 노출시킨 후, 세포를 37% 포름알데하이드의 1/10 부피로 고정화한 다음, PBS로 2회 세척하고 간단하게 소니케이션 한 다음 헤모사이토미터(Paul Marienfeld GmbH & Co.KG)로 세포를 계수 하였다.

[0072] γ -H2AX 검출하기 위한 웨스턴 블롯팅

[0073] 웨스턴 블롯팅을 다음과 같은 표준 방법으로 실시하였다. 효모의 단백질을 14% SDS-폴리아크릴아미드 젤 상에서 분리시키고 PVDF 막에 블롯팅 하였다. 상기 막을 5% 스킵-밀크로 1시간 동안 블롯팅 하고 0.1% Tween 20(in TBS)으로 세척한 다음 인산화 γ -H2AX에 대한 항체(Abcam) 또는 항-액틴 HRP 토끼 폴리클로날 IgG (Santa Cruz Biotechnology)와 반응시켰다.

[0074] 실험 결과

[0075] 효모(*S. cerevisiae*, budding yeast)는 우리에게 빵이나 맥주를 만드는데 쓰이는 것으로 잘 알려져 있다. 본 연구에서 실험 대상으로 사용된 출아형 효모는 성장속도가 빠르고 인간에게 무해한 단세포의 진핵생물로 이미 유전체가 전부 밝혀져 있으며 유전체 전체의 유전자 각각에 대한 녹-아웃 라이브러리가 존재하여 세포의 다양한 기전을 유전자 수준에서 밝히는데 매우 용이하다. 따라서 효모는 진핵세포의 유용한 모델생물체이며 이렇게 효모의 분자유전학적 연구를 통해 밝혀진 기전은 인간을 비롯한 다른 모델 생물체에서 다양한 생리 기전 및 복잡한 유전자들의 상호작용을 연구하는데 직접 적용될 수 있다.

[0076] 본 발명은 현재까지 멸균 및 살충 분야에서만 연구되어 왔던 전자빔을 처음으로 살아있는 세포에 적용시킴으로써 세포에 영향을 줄 수 있는 낮은 레벨의 전자빔 조사 범위를 정하고 전자빔이 아포토시스를 유발하며 이 아포토시스 유도에 대한 기전을 규명한 것이다.

[0077] 전자빔은 감마선과 달리 전자가 직접 물체에 입자의 형태로 물리적인 충격을 가하는 성질이 있다. 따라서 본 실험은 두 가지 다른 상태로 존재하는 세포에 같은 조건으로 에너지를 주어 비교하였다. 배지(액상) 내에 존재하는 효모 세포에 전자빔을 조사한 결과 물 분자가 전자 빔의 충격을 완화시켜 모든 세포에 균일한 에너지가 조사되지 않는 것으로 나타났다. 그에 비해 플레이트(고상)에서 자란 효모 세포에 조사한 실험에서는 세포가 에너지를 직접적으로 받아서 더 정확한 데이터를 얻을 수 있었다.

[0078] 본 연구는 전자빔이 감마선과 유사하게 DNA 이중사슬 절단(DNA double strand break)을 야기한다는 사실을 최초로 보고한다.

[0079] 효모에 대한 적합한 전자빔 조사 범위 결정

[0080] 전자빔은 감마선과는 달리 전자가 직접 물체에 입자의 형태로 물리적인 충격을 가하는 성질이 있다. 따라서 본 실험은 출아형 효모 세포에서 아포토시스를 유도하는 적합한 전자빔 조사 범위를 결정하기 위하여, 세포가 배지 내에 존재하는 액상과 세포가 플레이트의 표면에 존재하는 두 가지 다른 상태로 존재하는 세포에 동일한 조건으로 에너지를 주어 비교하였다. 세포에 전자빔이 직접 조사되는 플레이트 상태는 스팟팅 분석(고상)으로, 그리고 배지(액상) 내에 존재하는 효모 세포에 전자빔을 조사한 결과는 직접적으로 세포의 수를 세는 세포 계수 방법으로 실험을 수행하였다. 전자빔에 의해 아포토시스가 유도되는 적절한 범위는 전자빔에 노출되었을 때, 세포 증식이 50% 감소하는 범위로 한정하였다.

[0081] 두 종류의 다른 야생형 효모(W303a와 BY4741)를 활발하게 성장하는 초기 대수기까지 키운 후 플레이트에 10배씩 희석해 플롯팅 하고 직접 300-1500 Gy의 다양한 에너지 범위의 전자빔(1.0 MeV, 0.025 mA)을 조사하였다. 이후 전자빔에 노출된 효모 세포를 8시간 25℃에서 배양하였다.

[0082] 도 1에서 확인할 수 있듯이, 300-600Gy의 전자빔이 세포 증식을 50% 감소시키는 적합한 에너지 정도임을 알 수 있었다. 그 이상의 고 에너지의 전자빔이 조사된 경우에는 세포는 모두 사멸하고 더 이상의 생장이 관찰되지 않았다. 본 실험은 3회 이상 되풀이하여 유사한 결과를 확인하였다.

[0083] 한편, 위와 같이 두 종류의 다른 야생형 효모(W303a와 BY4741)를 활발하게 성장하는 초기 대수기까지 성장시킨 후 세포가 배지에 존재하는 상태에서 300-1500 Gy의 다양한 에너지 범위의 전자빔(1.0 MeV, 0.025 mA)을 조사하였다. 이후 세포를 바로 고정하여 정상적인 세포의 수를 확인하였다.

[0084] 도 2에서 확인할 수 있듯이, 야생형 효모 BY4741 균주는 300-600 Gy의 에너지 범위에서 세포 생존도가 50%로 감소하였음을 알 수 있다. 본 실험은 3회 이상 되풀이하여 유사한 결과를 확인하였고 스팟팅 분석에서 처리

W303 균주에 대하여도 유사한 결과를 나타내었다.

[0085] 전술한 두 가지 실험방법에 의해, 효모세포에서 전자빔에 의해 50%의 아포토시스가 유도되는 에너지 범위는 300-600 Gy(1.0 MeV, 0.025 mA)로 결정하였다.

[0086] 전자빔에 의한 세포주기(cell cycle) 정지 및 세포사멸

[0087] 위에서 결정한 대로 효모세포에서 300-600 Gy의 전자빔에 의해 세포생장이 억제되고 세포사멸이 유도되는가를 직접적인 현미경 관찰로 확인하였다. 출아형 효모 세포는 구형의 형태로 존재하다가 세포가 증식하기 위해 분열 주기(cell cycle)에 들어서면 버드를 생성하여 분열한다. 처음에는 작은 버드 상태로 모세포 옆에서 자라다가 세포주기가 진행되면 딸 버드와 모버드의 크기가 거의 비슷해지고 이어 분리된다. 그러나 세포에 손상이 생기고 세포주기를 계속 진행할 수 없게 되면 체크포인트라는 다양한 세포주기 억제 감시체제를 활성화시키고 성장을 멈추거나 사멸한다. 따라서 세포주기가 정지되고 생장이 억제된 세포들은 정상세포보다 크기가 훨씬 커져있다.

[0088] 도 3은 300-600 Gy의 전자빔을 조사한 효모세포를 12시간 배양한 뒤 세포의 형태를 관찰한 모습이다. 세포 내의 액포(vacuole)의 크기가 증가하고 비정상적인 버드 크기와 형태를 보였으며 세포분열이 진행되지 못하고 세포주기가 정지된 세포가 많이 관찰되었다. 그 중 일부는 아포토시스 과정으로 들어가는 것으로 관찰되었다.

[0089] 전자빔이 효모에서 세포사멸을 유도하는 기전

[0090] 효모를 비롯한 진핵세포에서 γ -선과 같은 이온화 조사(ionic radiation)는 DNA 이중나선 손상을 일으키고 이온화 조사의 에너지 정도가 커지면 세포사멸이 유도된다고 알려져 있다. 본 연구는 전자빔이 효모세포에서 생장 억제 및 세포사멸을 유도한다는 것을 확인하였으므로 그 기전을 이해하고자 전자빔도 DNA에 손상을 유도하는지 조사하였다.

[0091] DNA는 히스톤이라는 단백질에 감겨있는데 이온화 조사에 의해 DNA 이중사를 절단이 야기되면 히스톤2A(H2A)의 단백질 잔기 세린 129가 인산화 되는 것이 알려져 있다. 따라서 히스톤 γ -H2AX 인산화는 DNA 이중사를 절단을 확인하는 마커로 유용하게 사용되고 있다.

[0092] 본 연구는 전자빔에 의해 DNA 손상이 야기되고, 이 손상이 이중사슬절단(double strand break: DSB)인지 알아보기 위하여 위에서 결정한 300-600 Gy의 전자빔을 조사한 효모세포를 대표적으로 DSB를 판별할 수 있는 마커인 γ -H2AX 항체를 사용하여 면역블롯팅 하였다.

[0093] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 300-600 Gy의 전자빔을 조사한 효모세포에서는 조사하지 않은 대조군 세포에 비해 현저히 γ -H2AX가 증가하는 것을 볼 수 있으며, 그 정도는 이미 DSB를 유발한다고 잘 알려진 γ -선을 동일한 효모세포에 조사한 양성 대조군(도 4의 P 라인)에서 확인되는 것과 유사하다. 이러한 결과는 전자빔이 γ -선처럼 효모세포에 DNA에 이중사슬 절단을 야기하여 세포사멸을 유도함을 제시한다.

[0094] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0095] 도 1은 상이한 에너지 범위의 전자빔에 노출된 효모 세포의 생존도를 보여주는 이미지이다. W303a 및 BY4741 야생형 효모를 300-1500 Gy 에너지 범위의 전자빔(1.0 MeV, 0.025 mA)에 노출시켰다. "Control"은 전자빔을 조사하지 않은 것이다.

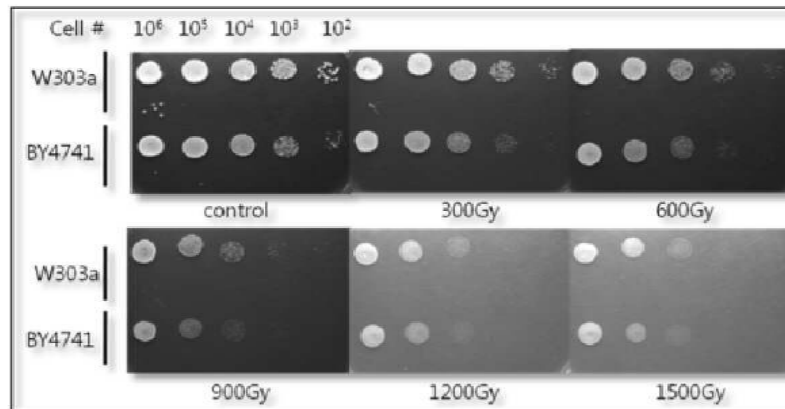
[0096] 도 2는 상이한 에너지 범위의 전자빔에 노출된 BY4741 야생형 효모 세포의 생존도를 나타내는 그래프이다.

[0097] 도 3은 전자빔이 효모 세포의 DNA에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블롯팅 결과 사진이다. 세포를 300-900 Gy 전자빔에 노출시킨 다음 DSB 마커인 γ -H2AX(14 kDa) 또는 로딩 마커인 액틴(43 kDa)에 대하여 블롯팅 하였다. P는 양성 대조군으로 DSB를 유도하기 위하여 200 Gy γ -선에 노출시킨 세포이다. C는 음성 대조군으로

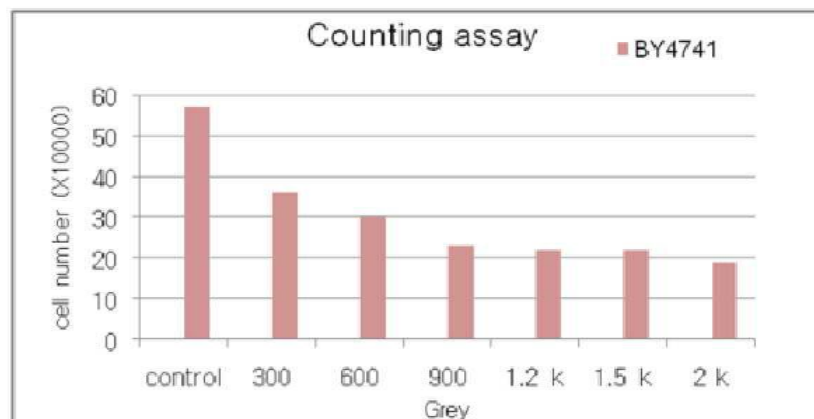
서 전자빔에 노출시키지 않은 세포이다.

도면

도면1



도면2



도면3

