



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년06월03일

(11) 등록번호 10-1524653

(24) 등록일자 2015년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/02 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0119623

(22) 출원일자 2012년10월26일

심사청구일자 2013년07월01일

(65) 공개번호 10-2014-0053556

(43) 공개일자 2014년05월08일

(56) 선행기술조사문헌

US20070196867 A1

WO2005010152 A2

US6180365 B1

JP2005533483 A

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자

김선홍

대전광역시 유성구 과학로 125

이수의

대전광역시 유성구 과학로 125

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 5 항

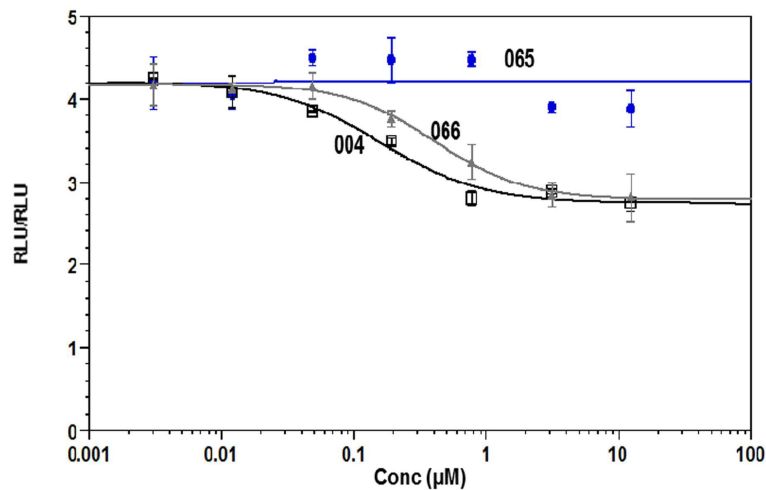
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 G P R43의 활성평가법

(57) 요약

본 발명은 GPR43(G protein receptor 43) 활성 조절 물질의 활성평가 방법에 관한 것이다. 구체적으로, GPR43의 활성에 따라 농도가 변하는 cAMP를 측정할 수 있는 세포주를 개발하였고, GPR43가 활성화되면 세포 내로 이동하는 성질을 이용하여 GPR43 및 GFP가 융합되어 발현되는 세포주를 개발하였으며, GPR43가 활성화되면 베타-아레스틴2와 결합하는 성질을 이용하여 GPR43 및 베타-아레스틴2에 각각 루시페라아제의 단편을 융합하여 발현하는 세포주를 개발하여 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

곽영신

대전광역시 유성구 과학로 125

강종순

대전광역시 유성구 과학로 125

김문욱

대전광역시 유성구 과학로 125

오수진

대전광역시 유성구 과학로 125

이상구

대전광역시 유성구 과학로 125

이현준

대전광역시 유성구 과학로 125

조성찬

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM3211221

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 주요사업(연구개발과제)

연구과제명 혁신 신약 타겟 검증 연구 플랫폼

기여율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 서열번호 1로 기재되는 GPR43(G protein receptor 43) 유전자를 글로센서(Glosensor) 세포에 형질전환시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
- 2) 단계 1)의 형질전환 세포를 루시페린(luciferin)을 포함하는 시약에서 배양시키는 단계;
- 3) 단계 2)의 배양된 형질전환 세포에서 피검물질을 처리하여 반응시키는 단계; 및
- 4) 단계 3)의 반응된 형질전환 세포에서 발광(luminescence)을 측정하는 단계를 포함하는, GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 글로센서 세포는 Glosensor™ cAMP HEK293 세포인 것을 특징으로 하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 글로센서 세포는 웰 플레이트에서 측정하는 것을 특징으로 하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 반응은 20℃에서 2시간 반응시키는 것을 특징으로 하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 단계 3)의 반응은 20℃에서 15분 내지 2시간 반응시키는 것을 특징으로 하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] G-protein coupled receptor(GPCR)는 가장 큰 부분을 차지하는 세포막 수용체로서 하고 있으며, 약 800여가지의 GPCR들이 포유동물(Mammal)에서 존재하는 것으로 규명되었다. 현재까지 GPCR은 신경전달물질(Neurotransmitter), 내분비 호르몬(Hormone), 사이토카인(Cytokine), 향기(Odorants), 및 빛(Light)과 같은 다양한 세포 외 자극(Extracellular stimuli)에 의해 활성화되어 다양한 세포 반응을 매개한다. 이 중에서 특이적 단백질(protein), 펩타이드(peptide), 아미노산(amino acid), 핵산 또는 지방산 유도체(fatty acid derivative)들과 같은 신호전달 물질들은 특정 세포에서 분비되어 특이적 수용체를 갖는 표적 세포(Target cell)에 세포반응을 유도하게 된다. GPCR은 세포 내 G-단백질(Heterotrimeric G-protein)의 활성을 통해서 세포 내 신호전달과정을 촉발하게 되는데, G-단백질은 수용체에 의해서 GTP와 결합이 유도됨으로써 활성화되고, 다시 GDP 형태로 변화됨으로써 불활성화되게 된다. 이어서 활성화된 G-단백질들은 세포 내의 다양한 신호전달분자(Effector)들의 활성을 유도함으로써 하위 신호전달을 매개하게 된다. 생체 내에서 GPCR들은 케모카인(chemokine) 수용체들의 예에서 보여진 것처럼 다양한 생리 또는 병리 현상을 매개하는 과정에서 중추적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 따라서 GPCR에 대한 연구는 현재 학술적인 연구대상으로서 뿐만 아니라 신약 개발의 중요한 타겟으로 생각되고 있다.

[0003] 세포 외부의 신호전달분자(Extracellular Ligands)의 결합에 의해 GPCR들은 활성화되어 다양한 세포 내 G-단백질(Gq/11, Gs, Gi/o, G12/13)의 활성을 유도한다. 활성화된 G-단백질들은 포스포리파아제(phospholipase) C β , 아데닐산고리화효소(adenylate cyclase), 포스포이노시티드(phosphoinositide)-3-키나아제(kinase), Ras 및 Rho 패밀리(family) G-단백질과 같은 하위 신호전달매개분자의 활성을 유도함으로써 수용체 신호를 전달하게 된다.

[0004] GPCR은 그 이름에서 알 수 있듯이, G 단백질(heterotrimeric G protein)의 활성을 조절하여 세포 내로 신호를 전달한다. G 단백질은 α , β 및 γ 의 세 가지 단위체로 나뉘고, 그 중 $G\alpha$ 단백질이 이차 전달자(second messenger)인 Ca^{2+} 와 cAMP의 세포내 농도를 조절한다. GPR43는 활성화되었을 때 Ca^{2+} 의 농도를 올리고, cAMP의 농도는 감소시킨다. 이러한 성질을 이용하여 기존에는 Ca^{2+} 의 농도를 형광염색약으로 측정하는 방법을 많이 사용하였다. 하지만, 염색약이 고비용이고, 반응시간이 짧아 특수한 장비를 사용해야 한다는 단점이 있었다. 그리고, cAMP의 농도 변화를 측정하는 방법으로 CRE-루시페라아제(luciferase) 및 cAMP ELISA법이 많이 사용되어 왔으나, CRE-루시페라아제의 경우 측정 시간이 오래 걸리고, 많은 변수가 생기는 단점이 있고, cAMP ELISA는 비용이 높았다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 기존의 방법들의 단점을 극복하기 위하여 글로센서 시스템(Glosensor system), 세포이미지 분석 및 단백질-단백질 결합을 이용한 세가지 GPR43 활성 평가법을 개발하였다. 구체적으로, GPR43의 활성에 따라 농도가 변하는 cAMP를 측정할 수 있는 세포주를 개발하였고, GPR43가 활성화되면 세포 내로 이동하는 성질을 이용하여 GPR43 및 GFP가 융합되어 발현되는 세포주를 개발하였으며, GPR43가 활성화되면 베타-아레스틴2와 결합하는 성질을 이용하여 GPR43 및 베타-아레스틴2에 각각 루시페라아제의 단편을 융합하여 발현하는 세포주를 개발하여 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은,
- [0007] 1)GPR43(G protein receptor 43) 유전자를 글로센서(Glosensor) 세포에 형질전환시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
- [0008] 2) 단계 1)의 형질전환 세포를 루시페린(luciferin)을 포함하는 시약에서 배양시키는 단계;
- [0009] 3) 단계 2)의 배양된 형질전환 세포에서 피검물질을 처리하여 반응시키는 단계; 및
- [0010] 4) 단계 3)의 반응된 형질전환 세포에서 발광(luminescence)을 측정하는 단계를 포함하는, GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은,
- [0012] 1) GPR43(G protein receptor 43)-GFP(green fluorescent protein) 유전자를 포함하는 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
- [0013] 2) 단계 1)의 형질전환 세포에 피검물질을 처리하여 반응시키는 단계;
- [0014] 3) 단계 2)의 반응된 형질전환 세포의 핵을 염색한 후, 세포형광이미지 분석을 수행하여 형광 스팟(spot) 이미지를 획득하는 단계; 및
- [0015] 4) 단계 3)의 획득한 형광 스팟 이미지를 스팟 분석 프로그램을 이용하여 수치화하는 단계를 포함하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은,
- [0017] 1) 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) N-말단 도메인(domain) 및 베타-아레스틴2(β -arrestin2)의 융합 단백질을 발현하는 벡터를 제조하는 단계;
- [0018] 2) 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) C-말단 도메인(domain) 및 GPR43(G protein receptor 43)의 융합 단백질을 발현하는 벡터를 제조하는 단계;
- [0019] 3) 상기 단계 1)의 벡터 및 단계 2)의 벡터를 숙주세포에 공동-형질 전환 시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
- [0020] 4) 단계 3)의 형질 전환 세포에서 피검 물질을 처리하여 반응시키는 단계; 및

[0021] 5) 단계 4)의 반응된 형질전환 세포에 루시페린(luciferin)을 포함하는 시료를 첨가한 후 발광(luminescence)을 측정하는 단계를 포함하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여,
 [0023] 본 발명은 1)GPR43(G protein receptor 43) 유전자를 글로센서(Glosensor) 세포에 형질전환시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
 [0024] 2) 단계 1)의 형질전환 세포를 루시페린(luciferin)을 포함하는 시약에서 배양시키는 단계;
 [0025] 3) 단계 2)의 배양된 형질전환 세포에서 피검물질을 처리하여 반응시키는 단계; 및
 [0026] 4) 단계 3)의 반응된 형질전환 세포에서 발광(luminescence)을 측정하는 단계를 포함하는, GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법을 제공한다.

[0027] 상기 목적을 달성하기 위하여,
 [0028] 본 발명은 1) GPR43(G protein receptor 43)-GFP(green fluorescent protein) 유전자를 포함하는 벡터를 숙주 세포에 형질전환시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
 [0029] 2) 단계 1)의 형질전환 세포에 피검물질을 처리하여 반응시키는 단계;
 [0030] 3) 단계 2)의 반응된 형질전환 세포의 핵을 염색한 후, 세포형광이미지 분석을 수행하여 형광 스팟(spot) 이미지를 획득하는 단계; 및
 [0031] 4) 단계 3)의 획득한 형광 스팟 이미지를 스팟 분석 프로그램을 이용하여 수치화하는 단계를 포함하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법을 제공한다.

[0032] 상기 목적을 달성하기 위하여,
 [0033] 본 발명은 1) 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) N-말단 도메인(domain) 및 베타-어레스틴2(β -arrestin2)의 융합단백질을 발현하는 벡터를 제조하는 단계;
 [0034] 2) 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) C-말단 도메인(domain) 및 GPR43(G protein receptor 43)의 융합단백질을 발현하는 벡터를 제조하는 단계;
 [0035] 3) 상기 단계 1)의 벡터 및 단계 2)의 벡터를 숙주세포에 공동-형질 전환 시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
 [0036] 4) 단계 3)의 형질 전환 세포에서 피검 물질을 처리하여 반응시키는 단계; 및
 [0037] 5) 단계 4)의 반응된 형질전환 세포에 루시페린(luciferin)을 포함하는 시료를 첨가한 후 발광(luminescence)을 측정하는 단계를 포함하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0038] 본 발명은 GPR43(G protein receptor 43) 활성 조절 물질의 활성평가 방법에 관한 것이다. 구체적으로, GPR43의 활성에 따라 농도가 변하는 cAMP를 측정할 수 있는 세포주를 개발하였고, GPR43가 활성화되면 세포 내로 이동하는 성질을 이용하여 GPR43 및 GFP가 융합되어 발현되는 세포주를 개발하였으며, GPR43가 활성화되면 베타-어레스틴2와 결합하는 성질을 이용하여 GPR43 및 베타-어레스틴2에 각각 루시페라아제의 단편을 융합하여 발현하는 세포주를 개발하여 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 cAMP가 결합하면 루시페라제가 활성화되는 글로센서(Glosensor) 시스템의 개요를 나타낸 그림이다.
 도 2는 글로센서/hGPR43 세포주의 프로피오네이트에 의한 활성평가를 나타낸 그래프이다.
 도 3은 글로센서/hGPR43 세포주의 GPR43의 활성을 조절한다고 알려진 물질에 의한 활성평가를 나타낸 그래프이다.
 도 4는 글로센서/hGPR43 세포주를 이용한 화합물을 검색하여 우수한 활성 평가계를 확인한 그래프이다.
 도 5는 초고속 이미지 장비를 이용한 GPR43 조절 화합물을 발굴하기 위한 개요를 나타낸 그림이다.
 도 6은 세포이미지분석을 이용한 GPR43의 활성을 장비내 분석 프로그램(Spot Detector)을 이용하여 수치화한 결과를 나타낸 그림이다.
 도 7은 단백질-단백질 결합을 세포내에서 쉽게 정량적으로 측정하는 루시페라제 단편 상보성 분석(luciferase fragment complementation) 방법을 나타낸 그림이다.
 도 8은 GPR43의 작용제(agonist)에 의한 GPR43 및 베타-어레스틴2의 결합을 정량화하여 확인한 결과를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0041] 본 발명은
- [0042] 1) GPR43(G protein receptor 43) 유전자를 글로센서(Glosensor) 세포에 형질전환시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
- [0043] 2) 단계 1)의 형질전환 세포를 루시페린(luciferin)을 포함하는 시약에서 배양시키는 단계;
- [0044] 3) 단계 2)의 배양된 형질전환 세포에서 피검물질을 처리하여 반응시키는 단계; 및
- [0045] 4) 단계 3)의 반응된 형질전환 세포에서 발광(luminescence)을 측정하는 단계를 포함하는, GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법을 제공한다.
- [0046] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 GPR43은 서열번호 1인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0047] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 글로센서 세포는 Glosensor™ cAMP HEK293 세포인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0048] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 반응은 20℃에서 2시간 반응시키는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0049] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 반응은 20℃에서 15분 반응시키는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0050] 상기 방법에 있어서, 상기 GPR43은 GPCR(G preotein-coupled receptor) 중 하나이며 G 단백질(heterotrimeric G protein)은 활성을 조절하여 세포 내로 전달한다. G 단백질은 α , β 및 γ 의 세가지 단위체로 나뉘고, 그 중 $G\alpha$ 단백질이 이차 전달자인 Ca^{2+} 및 cAMP의 세포 내 농도를 조절하므로 GPR43도 활성이 되었을 때 Ca^{2+} 의 농도를 높이고 cAMP의 세포 내 농도를 감소시키는 원리를 이용하였다.

- [0051] 본 발명은
- [0052] 1) GPR43(G protein receptor 43)-GFP(green fluorescent protein) 유전자를 포함하는 벡터를 숙주세포에 형질전환시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
- [0053] 2) 단계 1)의 형질전환 세포에 피검물질을 처리하여 반응시키는 단계;
- [0054] 3) 단계 2)의 반응된 형질전환 세포의 핵을 염색한 후, 세포형광이미지 분석을 수행하여 형광 스팟(spot) 이미지를 획득하는 단계; 및

- [0055] 4) 단계 3)의 획득한 형광 스팟 이미지를 스팟 분석 프로그램을 이용하여 수치화하는 단계를 포함하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법을 제공한다.
- [0056] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 GPR43은 서열번호 1인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0057] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 벡터는 pIRES-hGPR43-GFP-neo-puro인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0058] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 숙주세포는 HeLa 세포인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0059] 상기 방법에 있어서, GPR43은 GPCR(G protein-coupled receptor) 중 하나이며 GPCR 수용체는 작용제(agonist)와 결합한 후 GPCR 수용체가 세포내로 이동하는 원리를 이용하였다.
- [0060] 본 발명은
- [0061] 1) 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) N-말단 도메인(domain) 및 베타-어레스틴2(β -arrestin2)의 융합 단백질을 발현하는 벡터를 제조하는 단계;
- [0062] 2) 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) C-말단 도메인(domain) 및 GPR43(G protein receptor 43)의 융합 단백질을 발현하는 벡터를 제조하는 단계;
- [0063] 3) 상기 단계 1)의 벡터 및 단계 2)의 벡터를 숙주세포에 공동-형질 전환 시켜 형질전환 세포를 제조하는 단계;
- [0064] 4) 단계 3)의 형질 전환 세포에서 피검 물질을 처리하여 반응시키는 단계; 및
- [0065] 5) 단계 4)의 반응된 형질전환 세포에 루시페린(luciferin)을 포함하는 시료를 첨가한 후 발광(luminescence)을 측정하는 단계를 포함하는 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가 방법을 제공한다.
- [0066] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 벡터는 PB-CMV-MCS-EF1-Puro(SBI) 인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0067] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) N-말단 도메인은 서열번호 2인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0068] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 베타-어레스틴2(β -arrestin2)은 서열번호 3인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0069] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) C-말단 도메인은 서열번호 4인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0070] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 벡터는 PB-EF1-MCS-IRES-neo(SBI)인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0071] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 GPR43은 서열번호 1인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0072] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 숙주세포는 HEK 293 세포인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0073] 상기 방법에 있어서, 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) 단백질을 둘로 분리해서 N-말단 조각에는 β -어레스틴2를 융합하고 C-말단 조각에는 hGPR43을 융합하는 형태로 세포에서 발현시키면 β -어레스틴2 및 hGPR43 사이의 단백질 결합력에 의해서 N-말단과 C-말단 과편이 원래의 효소활성을 가지게 되는 시스템을 이용하였다.
- [0074] 본 발명의 실시예에서는 본 발명의 사이클릭 AMP(cyclic AMP, cAMP) 측정법을 이용한 GPR43의 활성평가를 알아보기 위해, GPR43가 안정적으로 발현되는 Glosensor/hGPR43를 확립하여 활성평가를 한 결과 천연리간드인 하기 [화학식 1] 프로피오네이트(propionate)의 EC 50이 314 μ M로 측정되었고(도 2 참조), 합성 화합물인 하기 [화학식 2] 004는 EC50이 160 nM, 합성 화합물인 하기 [화학식 3] 065는 EC 50 > 10 μ M 및 합성 화합물인 하기 [화학식 4] 066은 EC50이 416 nM으로 좋은 활성평가계임을 입증하였다(도 3 참조). 또한, Glosensor/hGPR43 세포주를 이용하여 화합물탐색 예비실험을 수행한 결과 Glosensor/hGPR43 세포주의 변이 계수(Coefficient of Variation, CV)가 8.79% 및 Z 인자(factor)가 0.584로 측정되어 우수한 활성을 나타내어 좋은 활성평가계의 기준을 만족하였다(도 4 참조).
- [0075] 본 발명의 실시예에서는 세포이미지분석을 이용하여 GPR43의 활성 평가를 알아보기 위해, GPCR 수용체의 특징

중의 하나인 작용제(agonist)와 결합한 후 GPCR 수용체가 세포 내로 이동한다는 것을 이용하여 GPR43이 안정적으로 발현되는 GPR43-GFP를 확립하여 HeLa 세포에 형질 도입하였고, 화합물을 처리하여 형광 스팟을 초고속 형광이미지 장비로 확인한 결과 DMSO가 처리된 것에 비해 아세테이트, 프로피오네이트(propionate), 004 화합물에서 각각 형광을 띤 스팟이 형성됨을 확인하였다(도 6A 참조). 또한, 음성대조군(negative group)인 065 화합물은 스팟이 형성되지 않는 것을 확인하여 본 발명의 활성평가계가 잘 만들어졌음이 확인되었다(도 6B 참조).

[0076] 본 발명의 실시예에서는 단백질-단백질 결합을 이용한 GPR43의 활성을 평가하기 위해 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) 단백질을 둘로 분리해서 N-말단 조각에는 β -어레스틴2를 융합하고 C-말단 조각에는 hGPR43을 융합하는 형태로 세포에서 발현시키면 β -어레스틴2 및 hGPR43사이의 단백질 결합력에 의해서 N-말단과 C-말단 파편이 원래의 효소활성을 가지게 되는 시스템(도 7 참조)을 이용하여 분석한 결과 아세테이트 및 프로피오네이트가 약 2배 내지 3배 증가한 것에 비해 004 화합물을 처리한 것은 대조군에 비해 약 8배 증가한 것을 확인하였다(도 8 참조).

[0077] 따라서, 본 발명의 GPR43(G protein receptor 43) 활성 조절 물질의 활성평가 방법으로 GPR43의 활성에 따라 농도가 변하는 cAMP를 측정할 수 있는 세포주를 개발하였고, GPR43가 활성화되면 세포 내로 이동하는 성질을 이용하여 GPR43 및 GFP가 융합되어 발현되는 세포주를 개발하였으며, GPR43가 활성화되면 베타-어레스틴2와 결합하는 성질을 이용하여 GPR43 및 베타-어레스틴에 각각 루시페라아제의 단편을 융합하여 발현하는 세포주를 개발하여 GPR43 활성 조절 물질의 활성평가로 유용하게 이용될 수 있다.

[0078] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0079] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0080] <실시예 1> 사이클릭 AMP(cyclic AMP, cAMP) 측정법을 이용한 GPR43의 활성 평가법

[0081] <1-1> GPR43가 안정적으로 발현되는 동물세포주의 확립

[0082] GPR43이 안정적으로 발현되는 동물 세포주를 확립하기 위하여 글로센서(Glosensor) 세포주에 인간의 GPR43-Myc 유전자를 형질 도입하였다. 구체적으로, GPR43 유전자는 PCR기법을 이용하여 인간 세포주에서 추출한 cDNA로부터 증폭한 다음 글로센서 세포주(Promega), hGPR43-Myc 유전자(Stratagene)는 pIRES-neo3 벡터에 삽입하였으며 글로센서 세포주에 Eugene6(Promega)시약을 이용하여 pIRES-neo3-hGPR43-Myc를 형질도입하였다. 단일 콜로니 세포를 분리하여 500 μ g/ml DMEM (Welgene)에 10%의 소 태아 혈청(Fetal Bovine Serum, FBS, Invitrogen) 및 200 μ g/ml 하이그로마이신(hygromycin, Goldbio) 및 G418(Goldbio)를 첨가한 배지에 5% CO₂ 및 37°C의 조건하에서 계대배양하였다. 수립된 세포주 중에서 활성이 상대적으로 우수한 한 가지 세포주를 선택하여 이후 실험에 사용하였다.

[0083] <1-2> 글로센서/hGPR43 세포주의 활성 평가 검증

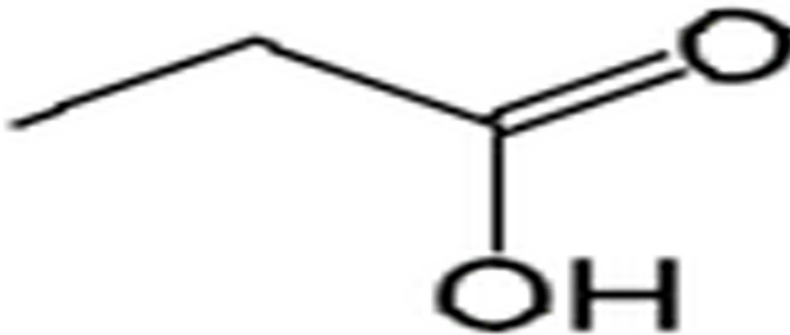
[0084] GPR43의 활성을 조절한다고 알려진 물질들을 평가하였다. 구체적으로, 실시예<1-1>의 세포주인 글로센서/hGPR43 세포를 96 웰 플레이트(well plate)에 100,000 셀/웰로 분주하고 16 - 20 시간 후, CO₂ 독립된 배지(independent media, Invitrogen)에 루시페린(luciferin)을 포함하는 cAMP 시약(Promega)를 2% 농도로 섞은 용액으로 배지에 갈아주었다. 20°C에서 2 시간 반응 후 발광측정기(luminometer) 혹은 발광(luminescence)을 측정할 수 있는 복합장비에서 발광을 측정하였다. 이때, 값이 웰(well) 사이의 세포 수 차이를 보정할 수 있는 값이다. GPR43을 조절하는 화합물 하기 [화학식 1] 프로피오네이트(Propionate, Sigma), 발명자가 합성한 하기 [화학식1] 004, [화학식 2] 065 및 [화학식 3] 066을 농도 구배에 따라 5분간 처리한 후, 1 μ M 포스콜린(Forskolin)를 15분간 처리하여 20°C에서 반응시켰다. 그런 다음 다시 발광을 측정하여 나온 값을 이전의 값으

로 나눈 값이 최종값으로 GPR43의 활성평가를 나타내었다.

[0085] 그 결과, 천연리간드인 프로피오네이트(propionate)의 EC₅₀이 314 μM로 측정되었다(도 2).

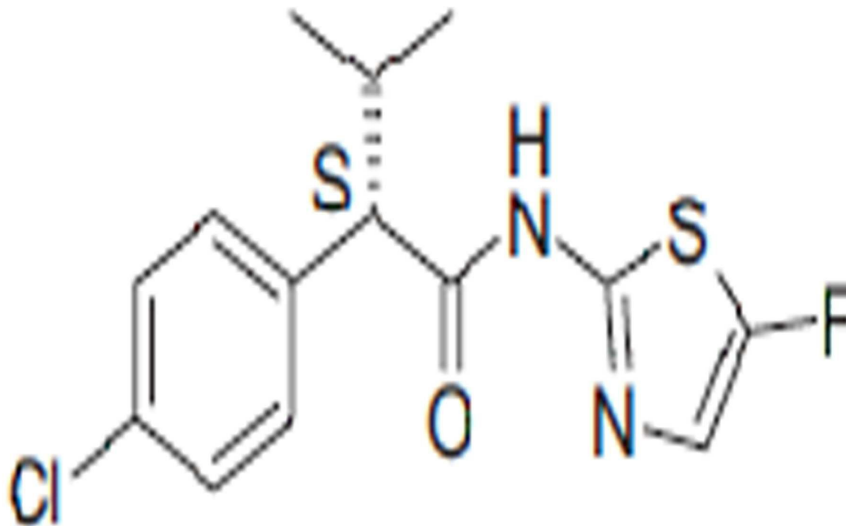
[0086] 또한, 합성 화합물인 004는 EC₅₀이 160 nM, 합성 화합물인 065는 EC₅₀ > 10 μM 및 합성 화합물인 066은 EC₅₀이 416 nM으로 나타나 이 화합물들을 처음으로 보고한 논문(Lee et al., Identification and Functional Characterization of Allosteric Agonists for the G Protein-Coupled Receptor FFA2, Mol. Pharmacol. 74:1599-609, 2008, 004 EC₅₀=480nM, 066 EC₅₀=700nM, propionate EC₅₀=125 μM)과 비교하여 비슷한 결과를 보였기 때문에 발명된 세포주가 좋은 활성평가계임을 입증하였다(도 3).

화학식 1



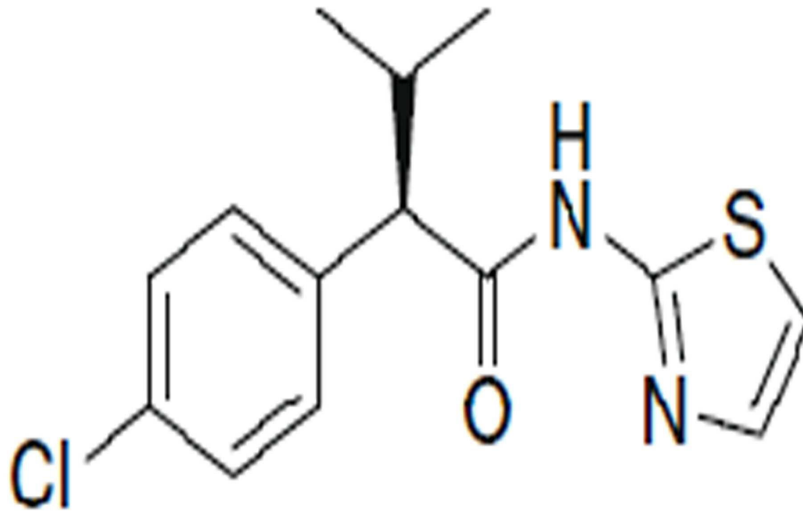
[0087]

화학식 2



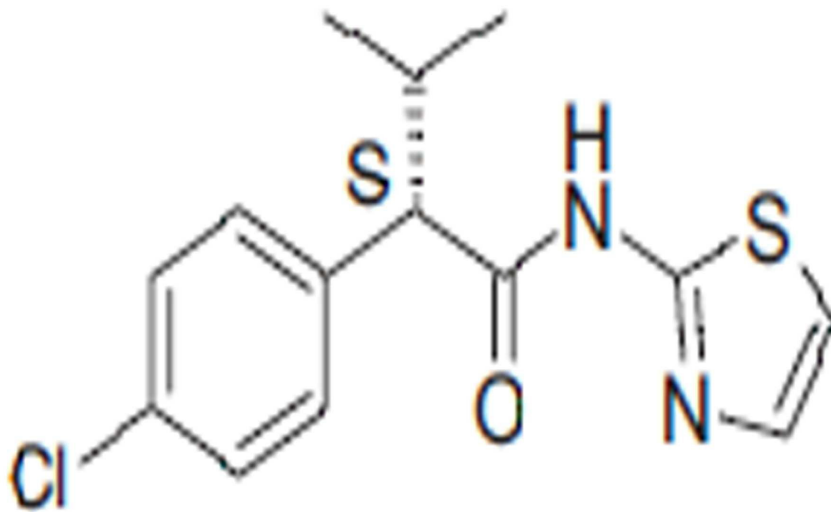
[0088]

화학식 3



[0089]

화학식 4



[0090]

[0091]

<1-3> 글로센서/hGPR43 세포주를 이용한 화합물 검증

[0092]

Glosensor/hGPR43 세포주를 이용한 화합물 검색하기 위하여 5000가지 화합물로 구성된 GPCR 라이브러리 (Library) 중 한 플레이트(80 화합물)를 무작위로 선정하여(Chembridge) 80가지 화합물을 10 μM로 처리하고, 대조군과 004 화합물을 처리한 균을 한 96-웰 플레이트에 포함하여 수행하였으며 변이 계수(Coefficient of Variation, CV) 값은 대조군을 제외한 80가지 화합물을 처리하여 얻은 값의 평균과 표준편차를 구한 후 $CV(\%) = 100 \times \text{표준편차} / \text{평균}$ 의 식으로 산출하였습니다.

[0093]

그 결과, Glosensor/hGPR43 세포주의 변이 계수(CV)가 8.79% 및 Z 인자(factor)가 0.584로 측정되었다. 이때, $CV < 10\%$ 및 $Z \text{ 인자} > 0.5$ 이때 우수한 활성평가계의 기준이다. 따라서 CV가 8.79% 및 Z 인자가 0.584로 우수한

활성을 나타내어 좋은 활성평가계의 기준을 만족하였다(도 4).

[0094] <실시예 2> 세포이미지분석을 이용한 GPR43의 활성 평가법

[0095] <2-1> GPR43-GFP가 발현되는 안정된 동물세포주 확립

[0096] GPCR 수용체의 특징 중의 하나는 작용제(agonist)와 결합한 후 GPCR 수용체가 세포 내로 이동하게 된다. 본 발명은 GPCR의 이러한 특성을 이용하여 표적 단백질인 hGPR43에 녹색형광단백질(GFP; green fluorescent protein)을 결합하여 자궁경부암세포인 HeLa 세포에 형질도입하였다. pIRESpuro3(Clontech)백터에 인간 GPR43에 녹색형광단백질(GFP)이 결합된 형태를 클로닝하기 위해서 먼저 pEGFP-N1(Clontech) 백터에 Human GRP43을 클로닝한다음 NheI과 NotI을 이용하여 인간 GRP43에 GFP가 결합된 형태로 pIRESpuro3(Clontech) 백터에 NheI 과 NotI을 이용하여 클로닝하였다. 상기 플라스미드를 사람의 자궁경부암 조직에서 얻어낸 세포인 HeLa(ATCC)에 형질도입하고자, HeLa 세포를 12 웰 플레이트에 각 웰에 1×10^5 세포를 심은 다음 24시간 후, lipofectamine 2000(Invitrogen)을 이용하여 형질도입하였다. 형질도입한지 24시간 후, 1 ug/mL 퓨로마이신(puromycin, A.G.Scientific) 처리하여 살아남은 단일 콜로니를 획득하고, 이를 계대배양하여 안정화시켰다. HeLa 세포의 성장배지는 DMEM(Hyclone, Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 10%에 해당하는 소 태아 혈청, 항생물질(antibiotics), 페니실린(penicillin) 100 units/ml + 스트렙토마이신(streptomycin) 100 μ g/ml 및 퓨로마이신(A.G.Scientific) 0.5 ug/mL를 첨가하여, 5% CO₂, 95% 공기(atmosphere) 및 37°C 온도의 환경을 가진 인큐베이터에서 배양하였으며 2일 내지 3일에 신선한 배지로 교체하였다.

[0097] <2-2> GPR43-GFP가 발현되는 작용제의 정량화

[0098] hGPR43-GFP가 안정적으로 발현되는 HeLa 세포(ATCC)에 각각의 화합물처리 후 초고속 형광이미지 장비 내 분석 프로그램(Spot Detector)을 이용하여 수치화하였다. 구체적으로, 상기 실시예<2-1>에서 안정화된 세포를 96 웰 플레이트에 8,000 세포/웰로 분주하고, 16 내지 18시간 배양한 다음, 기존에 알려진 hGPR43의 천연 리간드인 1 mM 아세테이트(Sigma) 1 mM 프로피오네이트(Sigma), 10 μ M 004 화합물을 30 분간 처리하고, 이를 4 % 포르말린으로 상온에서 5분간 고정한 다음 멸균수로 씻어냈다. PBS에 희석된 100 ng/mL 호에크스트 염료(Hoechst dye)를 첨가하여 상온에서 5분간 핵을 염색하고, PBS로 3번 씻어냈다. 그다음 PBS를 100 μ L씩 채우고 증가된 형광 스팟을 초고속 형광이미지 장비(Cellomics ArrayScan, Thermo)로 측정하였다(도 5).

[0099] 그 결과, DMSO가 처리된 것에 비해 아세테이트, 프로피오네이트 및 004 화합물에서 각각 형광을 띤 스팟이 형성됨을 확인하였다(도 6A). 또한, 음성대조군(negative group)인 065 화합물은 스팟이 형성되지 않는 것을 확인하여 본 발명의 활성평가계가 잘 만들어졌음이 확인되었다 (도 6B).

[0100] <실시예 3> 단백질-단백질 결합을 이용한 GPR43의 활성 평가법

[0101] <3-1> N말단 루시페라아제- β -어레스틴2 및 GPR43-말단 루시페라아제가 각각 발현되는 안정된 동물 세포주 확립

[0102] N말단 루시페라아제- β -어레스틴2 및 GPR43-C말단 루시페라아제를 발현하는 플라스미드를 인체 배아 신장(Human Embryonic Kidney 293, HEK293, ATCC) 세포주에 Fugene6(Promega) 시약을 이용하여 두 가지 플라스미드를 형질도입시켰다. 형질도입된 세포에 1 μ g/mL 퓨로 마이신(puromycin, A. G. Scientific사) 및 500 μ g/mL G418 처리하여 살아남은 단일 콜로니(colony)를 획득하고, 이를 계대배양하여 안정화시켰다.

[0103] <3-2> 단백질-단백질 결합을 이용한 GPR43의 활성 평가

[0104] 반딧불 루시페라아제(Firefly luciferase) 단백질을 둘로 분리해서 N-말단 조각에는 β -어레스틴 2를 융합하고 C-말단 조각에는 hGPR43을 융합하는 형태로 세포에서 발현시키면 β -어레스틴 2 및 hGPR43사이의 단백질 결합력에 의해서 N-말단과 C-말단 파편이 원래의 효소활성을 가지게 되는 시스템이다(도 7).

[0105] hGPR43/ β -어레스틴 2 세포주를 96 웰 화이트 플레이트에 100,000 세포/웰로 분주하고, 16 내지 20 시간 배양한 후, 1 mM 아세테이트, 1 mM 프로피오네이트, 10 μ M 004 화합물을 30 분간 처리하였다. 곧바로 세포에 ONE-

Glo™ 루시페라아제 분석 방법(ONE-Glo Luciferase Assay System, Promega)에 존재하는 기질이 포함된 완충용액을 50 μL씩 첨가하고, 측정기(Luminometer, Berthold)를 이용하여 활성을 측정하였다.

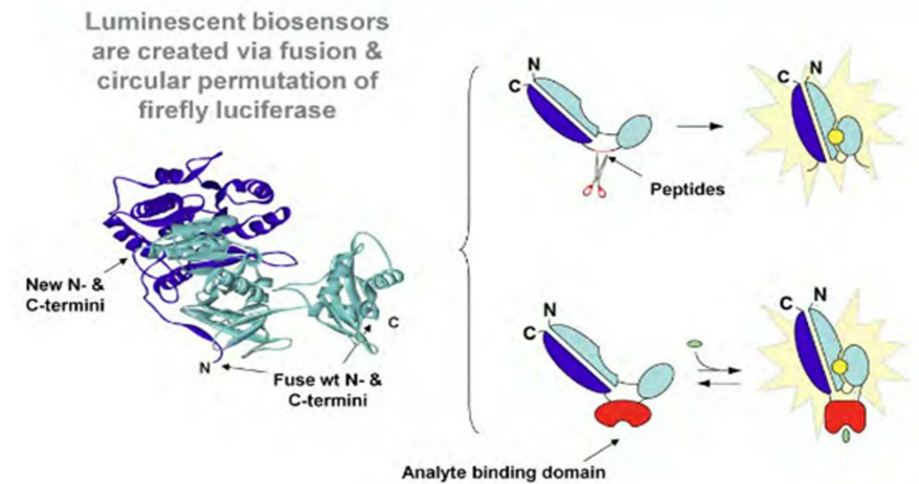
[0106]

그 결과, 아세테이트 및 프로피오네이트가 약 2배 내지 3배 증가한 것에 비해 004 화합물을 처리한 것은 대조군에 비해 약 8배 증가하였다(도 8).

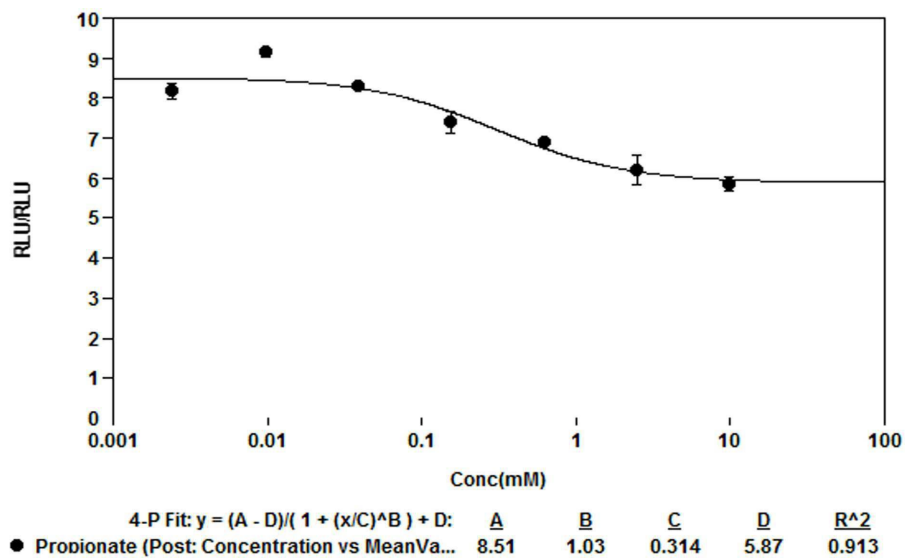
도면

도면1

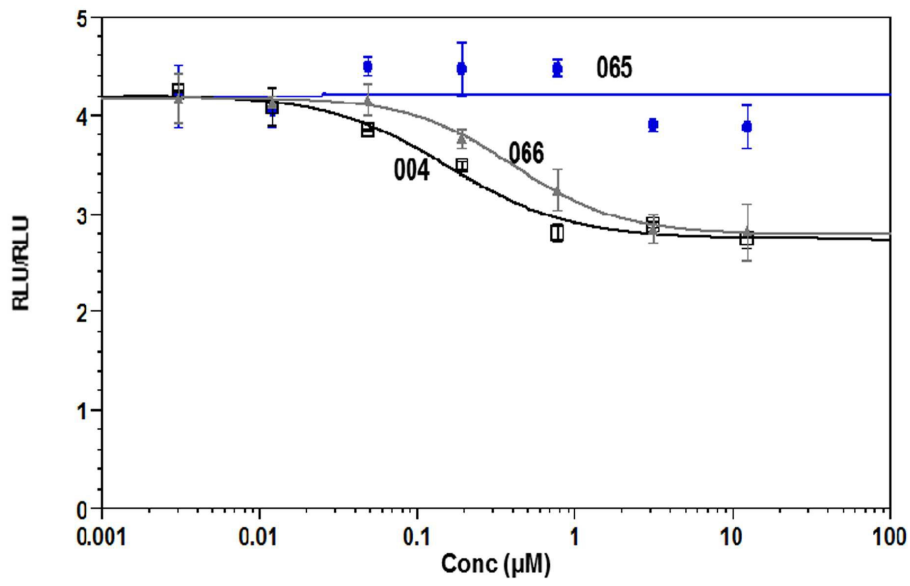
GloSensor™ Technology Overview



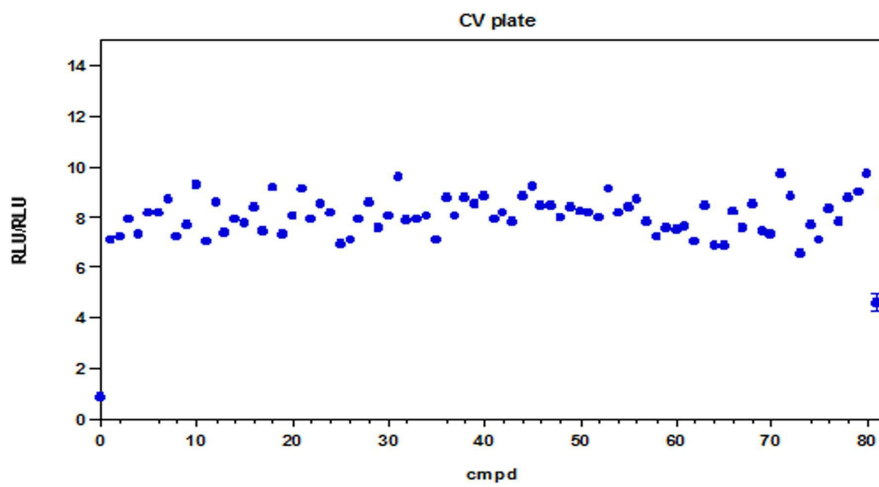
도면2



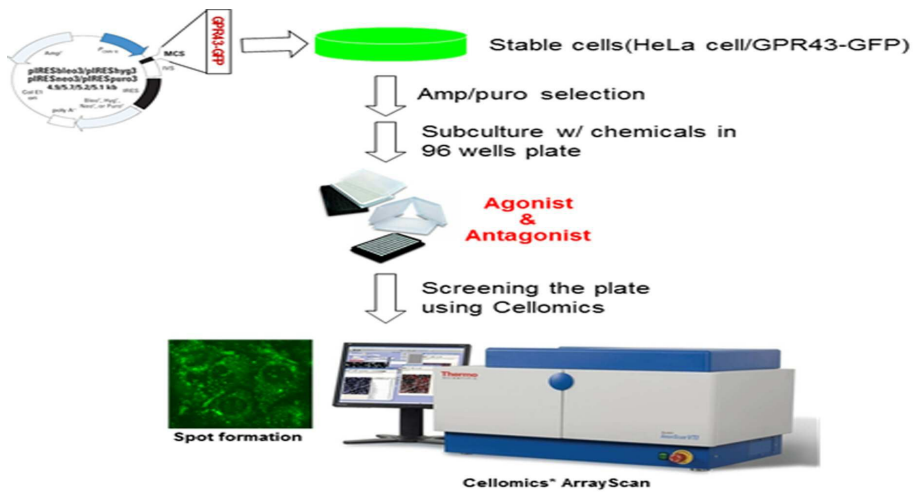
도면3



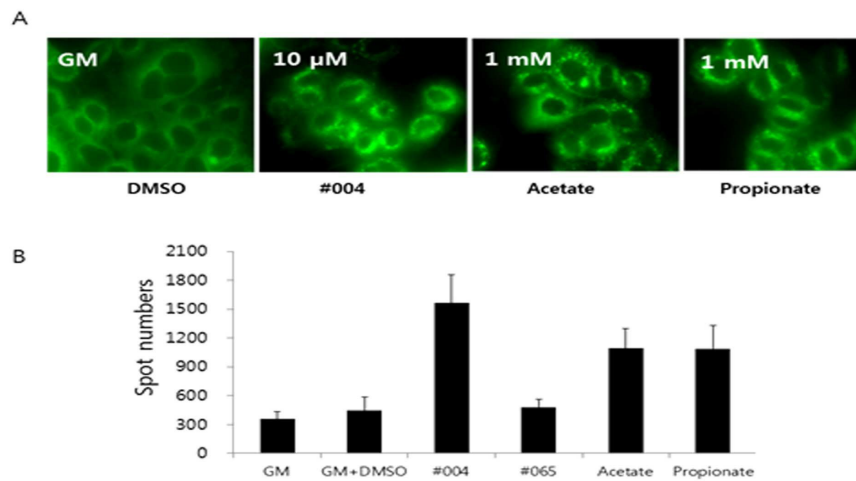
도면4



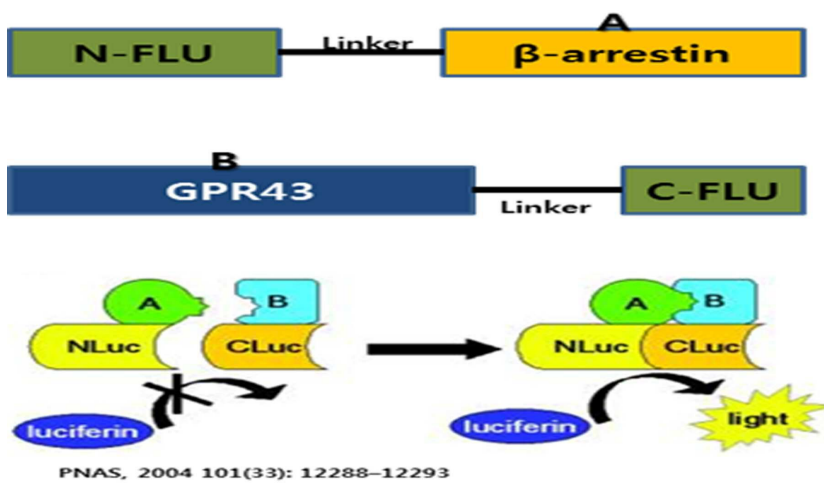
도면5



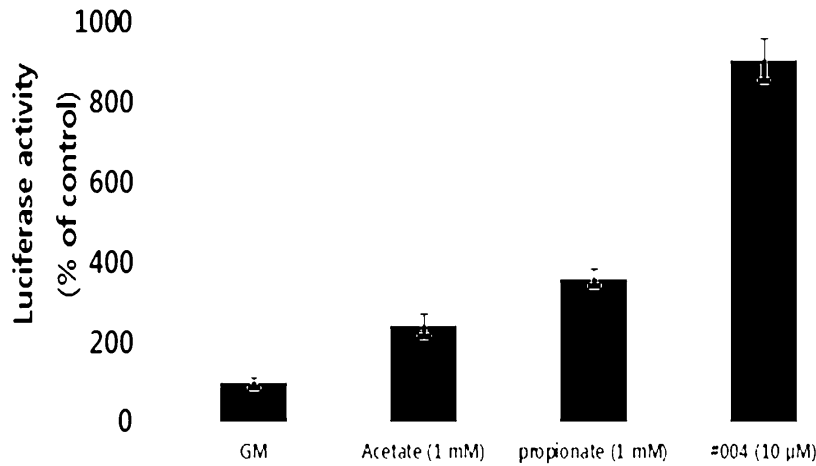
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> A method for identifying the modulators of GPR43
- <130> 12p-04-56
- <160> 4
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1709
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

gcactaggtc tggagagaca gcaaggtgct gtgcggcaga gcatttgggg tctcaaagaa      60
gcagtggcca ccacatgga tacaggcccc gaccagtctt acttctccgg caatcactgg      120
ttcgtcttct cgggtactt tctcatttc ctggtggggc tccccctcaa cctgctggcc      180
ctggtggtct tcgtgggcaa gctgcagcgc cgcccgggtg ccgtggacgt gtcctgctc      240

aacctgaccg cctcggacct gctcctgctg ctgttctctg ctttccgcat ggtggaggca      300
gccaatggca tgcactggcc cctgcccttc atcctctgcc cactctctgg attcatcttc      360
ttcaccacca tctatctcac cgccctcttc ctggcagctg tgagcattga acgcttctctg      420
agtgtggccc acccactgtg gtacaagacc cggccgaggc tggggcaggc aggtctggtg      480
agtgtggcct gctggctgtt ggctctgct cactgcagcg tggctctacg catagaattc      540
tcaggggaca tctcccacag ccagggcacc aatgggacct gctacctgga gttccggaag      600
    
```


gaccagctag ccatcctcct gcccgtagcg ctggagatgg ctgtggctct ctttgggtc 660

ccgctgatca tcaccagcta ctgctacagc cgcctggtgt ggatcctcgg cagagggggc 720

agccaccgcc ggcagaggag ggtggcgggg ctgttggcgg ccacgctgct caacttcctt 780

gtctgctttg ggcctacaa cgtgtcccat gtctgggct atatctcgg tgaagcccg 840

gctgtggagga tctacgtgac gcttctcagc accctgaact cctgtgtcga cccctttgct 900

tactacttct cctcctcgg gttccaagcc gactttcatg agctgctgag gaggttgtgt 960

gggctctggg gccagtggca gcaggagagc agcatggagc tgaaggagca gaaggagggg 1020

gaggagcaga gagcggaccg accagctgaa agaaagacca gtgaacactc acagggctgt 1080

ggaactggtg gccaggtggc ctgtgctgaa agctaggtcc tccgggggag gaggtgtag 1140

ctggcatgct atcctcaggg cgttctctcg ctacgccag gagggacttg gattggcgag 1200

ctggggcccg atgggcttg gggcagagt agacatctag cctccctaa ggtatgcgcg 1260

ctaaagcca gctctgac tcacctccat cccatccac ccacacacta tggattgggc 1320

tctgggaagg ggtcagggtg agaggctgct ctggagaaca atgaggtcct catagcagca 1380

ggcagctcct gtgttttctt gaggtggca gaggagctaa gagcagtcc cagggtctga 1440

gggggctgcc cagtgagtgg caggggcagg agaggggaga accccatcct cagagctgct 1500

cccagccagc gattcaggag cgggggagac agggctccag ggatgaggcc gcattctgct 1560

cccacagcgc cttttccaga aagtcccat tgctcaataa atgtgatca tcagagacat 1620

ttatgaacaa tgacagaaga aaaattacc aaataaatgt ggaagcaagc aaaaaaaaaa 1680

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1709

<210> 2

<211> 1479

<212> DNA

<213> Firefly luciferase) N-terminus domain

<400> 2

atggaagacg ccaaaaacat aaagaaaggc ccggcggccat tctatcctct agaggatgga 60

accgctggag agcaactgca taaggctatg aagagatag ccctggttcc tggaacaatt 120

gcttttacag atgcacatat cgaggatgaac atcacgtacg cggaataactt cgaaatgtcc 180

gttcggttgg cagaagctat gaaacgatat gggtgaata caaatcacag aatcgtcgta 240

tgcagtgaaa actctcttca attctttatg ccggtgttgg gcgcgttatt tatcggagtt 300

gcagttgcgc ccgcaacga catttataat gaactgaaat tgctcaacag tatgaacatt 360

tcgcagccta ccgtagtgtt tgtttccaaa aaggggttgc aaaaaatttt gaactgcaa 420

aaaaaattac caataatcca gaaaattatt atcatggatt ctaaacgga ttaccagga 480
 tttcagtcga tgtacacgtt cgtcacgtct catctacctc cgggttttaa tgaatacga 540

 tttgtaccag agtcccttga tctgacaaa acaattgcac tgataatgaa ttctctggg 600
 tctactgggt tacctaaggg tgtggccctt ccgcatagaa ctgcctgcgt cagattctcg 660
 catgccagag atcctatfff tggcaatcaa atcattccgg aactgcgat ttaagtgtt 720
 gttccattcc atcacggttt tggaatgttt actacactcg gatattgat atgtggattt 780
 cgagtcgtct taatgatag atttgaagaa gagctgtttt tacgatccct tcaggattac 840
 aaaattcaaa gtgcgttctt agtaccaacc ctatfffcat tcttcgcaa aagcactctg 900
 attgacaaat acgatttatc taatttacac gaaattgctt ctgggggcgc acctcttctg 960

 aaagaagtcg ggaagcgggt tgcaaacgc ttccatcttc cagggatagc acaaggat 1020
 gggctcactg agactacatc agctattctg attacaccg aggggatga taaaccgggc 1080
 gcggtcggta aagtgttcc atffffttaa gcgaaggttg tggatctgga taccgggaaa 1140
 acgctggcgc ttaatcagag aggcgaatta tgtgtcagag gacctatgat tatgtccggt 1200
 tatgtaaaca atccggaagc gaccaacgcc ttgattgaca aggatggatg gctacattct 1260
 ggagacatag cttactggga cgaagacgaa cacttcttca tagttgaccg cttgaagtct 1320
 ttaattaaat acaaaggata tcaggtggcc cccgctgaat tggaatcgaat attgttaca 1380

 caccceaaca tcttcgacgc gggcgtggca ggtcttcccg acgatgacgc cggtgaactt 1440
 ccccccgcg tttgtgtttt ggagcacgga aagacgatg 1479

 <210> 3
 <211> 1735
 <212> DNA
 <213> beta-arrestin2
 <400> 3

 ggtgagaagg ctgcgagcga gccgcgaacc cggcgggtgg aggcggcga gcgcgcgcgc 60
 accatgggtg aaaaaccg gaccagggtc ttcaagaagt cgagccctaa ctgcaagctc 120
 accgtgtact tgggcaagcg tgactttgtg gatcacttgg acaaagtga tcctgtcgat 180
 ggtgtggtgc ttgtggatcc tgactacttg aaggaccgga aagtgtttgt gacctcacc 240

 tgtgccttcc gctatggcgg agaagacctg gatgtactgg gcctgtcttt ccgcaaagat 300
 ctgttcatcg ccaactacca ggccttcccc cccatgccca acccacctcg gccccacc 360
 cgcctacagg accgactgct gaagaagttg ggccagcatg cccaccctt tttttcaca 420
 ataccacaga atttgccttg ctccgtcaca ctgcagccag gaccggagga cacaggaag 480

gcctgtggag tagactttga gattcgagcc ttctgtgcc aatctataga agaaaaaagc 540
cacaaaagga actccgtgcg gcttatcatc agaaaggtag agtttgctcc tgagacaccc 600
ggccccagc catcagctga aaccacacgc cacttctca tgtctgaccg gaggtccctg 660

cacctagagg cttccctgga caaagagctg tactaccatg gggaaccctt caatgtcaac 720
gtccacgtca ccaacaattc tgccaagacc gtcaagaaga tcagagtgtc tgtgagacag 780
tatgccgaca ttgacctt cagcaccgag cagtacaagt gtctgtggc tcagcttgaa 840
caagatgacc aggtgtctcc cagttccaca ttctgcaagg tgtacacat aaccccgctg 900
ctcagtgaca accgagagaa gcgtggcctt gcccttgatg ggcaactcaa gcacgaagac 960
accaacctgg cttccagcac cattgtgaag gagggagcca acaaggaggt gctgggaatc 1020
ctagtatcct acagggtaaa ggtgaagctg gtggtgtctc gaggcgggga tgtctccgtg 1080

gagctacctt tcgicctaata gcacccaag cccacagacc acatcacctt tccccgacc 1140
cagtcagccc cccgggaaat agacatcctt gtggatacca acctcattga attcgatacc 1200
aactatgcc aagacagca catcgtgttt gaggactttg cgaggcttcg gctgaagggg 1260
atgaaggatg acgactgtga tgaccagttc tgctaggaag aggggctggg agaggtaggg 1320
gtgggcagga ctgaggtccc actgcccttg cgggtaggag ggtcccagcc tctcctcctt 1380
ccccctcctt ccaaccgaga tacacactgg acctatcact cgttgaaagt gggcattaat 1440
cttttgactt cagctctgcc accccagccc tgctccctag ggtggcaagc tgtgtacaca 1500

cctaaagttt tgggaaggga aactgaaag caaggagtga atgtagagaa aaggagtaga 1560
aaggacaccc atgtttggcc tcataccaac cactcccag tcaccacttc tgctcccaa 1620
tccttgaaga tgagatttca ggggagggac cagcaaggcc atatcttctg ttctgagcat 1680
agggaagaaa taaacctttt aataggcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 1735

<210> 4
<211> 177
<212> DNA
<213> Firefly luciferase C-terminus domain
<400> 4

atgacggaaa aagagatcgt ggattacgtc gccagtcaag taacaaccgc gaaaaagtgt 60
cgcgaggagag ttgigtgtgt ggacgaagta ccgaaaggtc ttaccggaaa actcgacgca 120

agaaaaatca gagagatcct cataaaggcc aagaaggcgg gaaagtccaa attgtaa 177