



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0114872
(43) 공개일자 2016년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0041319
(22) 출원일자 2015년03월25일
심사청구일자 2015년03월25일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자
김성훈
서울특별시 강남구 언주로30길 57, E동 2405호 (도곡동, 타워팰리스)

손은정
서울특별시 동대문구 회기로 194-14, 715호 (회경동)

(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 12 항

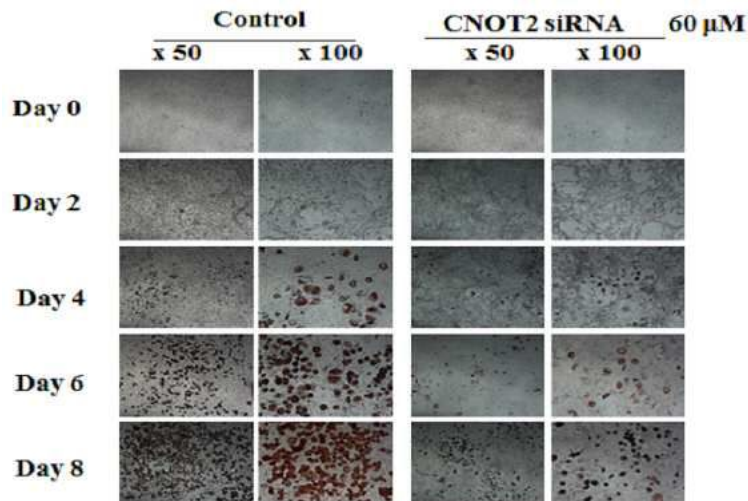
(54) 발명의 명칭 대사성 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 CCR4-NOT transcription complex subunit 2 (CNOT2) 유전자의 신규 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 CNOT2 유전자는 세포내에서 지방 분화의 조절자로서 역할을 하며 지방 형성 유전자들의 발현을 촉진시킴으로써 지질의 축적 및 지방세포의 크기 증가에 영향을 주어 대사성 질환을 유발시키므로, CNOT2 유전자 억제제로 이 유전자의 발현을 저해시키면 대사성 질환의 유발을 억제시키는 작용 효과를 가질 수 있으며, 또한 대사성 질환의 진단 또는 치료제의 표적 유전자로 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/53 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

G01N 2800/00 (2013.01)

G01N 2800/042 (2013.01)

G01N 2800/044 (2013.01)

G01N 2800/323 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A1A10052872

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 경희대학교 산학협력단

연구사업명 한국연구재단 도약과제

연구과제명 간섭유화 및 암화 유발 유전자를 표적하는 한약 소재의 분자 작용 기전

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

CCR4-NOT transcription complex subunit 2 (CNOT2) 유전자 억제제를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 CNOT2 유전자 억제제는 CNOT2 단백질을 코딩하는 유전자의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interfering RNA) 또는 shRNA(small hairpin RNA)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상인 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 siRNA는 서열번호 27 및 서열번호 28인 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 shRNA는 서열번호 29 또는 서열번호 30인 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 또는 지방간으로부터 선택되는 어느 하나인 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

CNOT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 대사성 질환 진단용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 프로브 또는 프라이머는 서열번호 3 및 4로 이루어지거나, 서열번호 17 및 서열번호 18로 이루어진 대사성 질환 진단용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 또는 지방간으로부터 선택되는 어느 하나인 대사성 질환 진단용 조성물.

청구항 9

CNOT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 대사성 질환 진단용 키트.

청구항 10

(a) CNOT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 CNOT2 유전자의 발현양, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정결과, CNOT2 유전자의 발현양, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 대사성 질환의 치료 또는 예방용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (b) 단계의 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블랏, 노던 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝 하는 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간 중에서 선택되는 어느 하나인 대사성 질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CNOT2 유전자의 신규 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대사성 질환(Metabolic Disease)이란 체내의 과잉영양 축적 및 운동부족으로 인한 비만, 당뇨, 고혈압 및 동맥경화 등과 같은 위험인자가 함께 나타나는 증후군을 말하며, 세계보건기구와 미국 국립보건연구원의 심, 폐, 혈액 연구소가 제정한 성인 치료프로그램을 통해 대사증후군이라고 공식 명명되었다.

[0003] 경제발전으로 따른 생활수준의 향상으로 대사성 질환의 주원인이 되는 비만에 속하는 현대인들이 급속히 증가하고 있다. 이러한 비만은 과다 열량의 섭취로 인해 여분의 열량이 체내에 지방의 형태로 축적되는 현상을 말하는 것으로서, 특히 내장 기관에 증식되고 있는 지방세포가 더욱 직접적으로 지질대사에 영향을 주어 발생한다고 알려져 있다. 또한, 이러한 비만 및 당뇨병과 같은 대사성 질환을 일으킬 수 있는 위험 요인 중 대표적인 것이 지방화(Adipogenesis)인데, 지방화란 미성숙지방세포(preadipocytes)로부터 지방세포가 분화되어 지방을 축적하게 되는 과정을 말하며, 성숙한 지방 세포는 섬유아세포(fibroblast)와 같은 미성숙지방세포로부터 분화되어 궁극적으로 세포 내에 지방 방울(lipid droplet)을 형성하게 된다.

[0004] 따라서 비만을 포함하는 대사성 질환들은 앞서 기술한 바와 같이 세포 내에서 매우 복잡한 메카니즘에 의해 유발되는 것인만큼, 상기 메카니즘을 보다 효율적으로 조절함으로써 대사성 질환을 진단하고 예방 및 치료할 수 있는 기술들의 개발이 필요하다.

[0005] 한편, 현재까지 개발된 종래 기술들에 있어서, 제니칼(Xenical™, 로슈 제약회사, 스위스), 리덕틸(Reductil™, 애보트사 미국), 엑소리제(Exoise™, 아코파마, 프랑스) 등의 약물들이 비만 치료제로써 사용되고 있지만 혈압 감소 또는 유산 산증을 발생시킬 수 있으며, 비타민의 흡수를 저해하거나 심혈관계 질환 또는 현기증 등을 초래하는 부작용들이 일어나고 있다.

[0006] 이러한 배경 하에, 근본적인 비만의 예방 및 억제를 위한 대안으로 제시되고 있는 것이 지방 세포 분화 억제제이다. 지방 조직에서의 에너지 저장 및 내분비 물질 분비는 지방세포의 분화와 성장 및 지방 생성 과정과 밀접한 관련이 있다. 즉, 지방 전구 세포의 지방 세포로의 분화를 차단하면서 생성되는 지방 세포수를 조절하고 그에 따른 축적되는 여분의 에너지를 조절하는 약물이 연구될 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 CNOT2 유전자 억제제를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0008] 본 발명은 CNOT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 대사성 질환 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0009] 본 발명은 (a) CNOT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상

기 CNOT2 유전자의 발현양, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, CNOT2 유전자의 발현양, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 대사성 질환의 치료 또는 예방용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명자는 대사성 질환을 진단하고 예방하며 치료할 수 있는 새로운 방법을 연구하던 중, CCR4-NOT transcription complex subunit 2 (CNOT2) 유전자가 지방 세포의 분화를 조절하고 지방 형성 관련 유전자들의 발현을 촉진시킴으로써 대사성 질환을 유발할 수 있다는 기사를 최초로 확인함으로써 지질대사에 있어서 CCR4-NOT transcription complex subunit 2 (CNOT2) 유전자의 신규한 용도를 규명하였다.
- [0011] 이에 따라, 본 발명은 CNOT2 유전자 억제제를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 CNOT2 유전자 억제제는 CNOT2 유전자의 발현을 억제하여 지방 세포의 분화를 억제하고 지방 형성 관련 유전자들의 발현을 억제시킴으로써 대사성 질환을 조절하는 효과가 우수하므로, 대사성 질환을 효과적으로 치료할 수 있다.
- [0013] 상기 CNOT2 유전자는 인간(NCBI Gene ID BC002597), 마우스(NCBI Gene ID BC063105 등 다양한 종에 존재하는 유전자이다.
- [0014] 상기 CNOT2 유전자는 CCR4-NOT transcription Complex를 구성하는 subunit 중 하나로써, yeast, 인간 등에서 확인되는 유전자이다. CCR4-NOT transcription complex는 CNOT1, CNOT2, CNOT3, CNOT6, CNOT7, CNOT8, CNOT9, CNOT10, CNOT11 등의 subunit을 포함하며, 각각의 유전자마다 담당하는 기능의 다르다. CNOT2, CNOT4 및 CNOT8은 CNOT1과 interaction하는 반면, CNOT3은 CNOT1과 binding 하지 않고 CNOT8과 binding 하는 것으로 알려져 있다. CNOT2 유전자는 transcriptional repressor로서 알려져 있으나, 지방 세포 분화 억제와 관련된 어떠한 용도도 알려진 바가 없다.
- [0015] 본 발명의 CNOT2 유전자 억제제는 CNOT2 단백질을 코딩하는 유전자의 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interfering RNA) 또는 shRNA(small hairpin RNA)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 CNOT2 유전자의 발현을 조절할 수 있는 물질을 제한없이 사용할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 CNOT2 mRNA에 상보적이고 CNOT2 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하며, CNOT2 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 일례는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.
- [0017] 본 발명에서 siRNA는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. 본 발명의 siRNA 분자는, 센스 가닥(CNOT2 mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(CNOT2 mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중체를 이루는 구조를 가질 수 있으며, 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일쇄 구조를 가질 수 있다. 나아가 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 mismatches(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 또한, siRNA 말단 구조는 CNOT2 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하고, 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출구조 모두 가능하다. 또한, 본 발명의 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스탬-앤

드-루프 구조를 형성하게 된다. 이시스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

- [0018] 본 발명에서 shRNA는 small hairpin RNA 혹은 short hairpin RNA (shRNA)을 말하며, RNA 간섭으로 유전자의 발현을 침묵(silencing)시킬 때 사용하는 작은 hairpin 구조를 가진 RNA이다. shRNA는 벡터를 이용하여 세포로 도입되며, shRNA hairpin 구조는 세포 내 다른 물질에 의하여 절단되어 siRNA가 되는데 이 siRNA가 RNA induced silencing complex (RISC)와 결합하게 되고, 이 결합체(complex)는 siRNA와 서열이 맞는 부분을 가진 mRNA에 달라붙어서 그 mRNA를 절단하고, 그 결과 mRNA가 파괴되므로 그 유전자 발현이 되지 않게 되어 유전자침묵이 일어나게 된다.
- [0019] 본 발명에 있어서 CNOT2 유전자 억제제는 바람직하게는 siRNA, 또는 shRNA일 수 있다. 더욱 바람직하게는 서열번호 27 (sense sequence) 및 28(anti-sense sequence)의 siRNA일 수 있으며, 서열번호 29 또는 서열번호 30의 shRNA일 수 있다.
- [0020] 상기와 같이 본 발명에 따른 CNOT2 유전자 억제제는 CNOT2 유전자를 억제함으로써 지방 세포 형성을 조절할 수 있으므로, CNOT2 유전자 억제제를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 대사성 질환은 체내의 에너지 대사 과정의 이상으로 야기되는 질환을 일컫는 용어로서, 지방 세포의 분화 및 지질대사의 조절이상으로 야기되는 질환을 말한다. 상기 대사성 질환으로는 이에 제한되지는 않으나, 비만, 당뇨병, 고지혈증, 고콜레스테롤증, 동맥경화증 및 지방간 등이 포함될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 본 발명의 CNOT2 유전자 억제제를 포함하는 약학적 조성물의 제형은 약학적으로 허용가능한 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약앰플 또는 다중 투약형태로 제조할 수 있다. 기타 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [0023] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 의약으로서, 대사 질환 치료제로서 사용할 수 있고, 경구 또는 비경구 투여가 가능하며 특히 주사 형태로 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 구강, 비강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 장관, 설하, 흡입 또는 국소 투여가 가능하다. 이와 같은 임상 투여를 위해 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 기술을 이용하여 적합한 제형으로 제제화할 수 있다.
- [0025] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다.
- [0026] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0027] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필레글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여 시 예컨대 피하주사, 정맥주사 등을 통하여 투여될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 CNOT2 유전자 억제

제의 약학적으로 유효한 양은 0.5~100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5~5 mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 비만 또는 지질 관련 대사성 질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다. 본 발명의 CNOT2 유전자 억제제는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량의 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0030] 또한 본 발명의 조성물은 대사성 질환 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있으며 의약품 외에도 보충제, 의약 부외품 등으로도 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명은 CNOT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머를 포함하는 대사성 질환 진단용 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 CNOT2 유전자의 발현량을 측정함으로써 대사성 질환의 진단이 가능하다.

[0032] 본 발명의 진단용 조성물에 포함되는 상기 프로브 또는 프라이머는 CNOT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 특징이 있으며, 본 발명에서 언급한 CNOT2 유전자의 서열은 서열번호 1 또는 2 일 수 있다.

[0033] 상기 진단은 병리 상태를 확인하는 것을 나타내는 용어로서, 본 발명에서의 진단은 CNOT2 유전자의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하여 대사성 질환의 발병여부, 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함하는 의미를 갖는다. 본 발명의 진단용 조성물은 본 발명의 CNOT2 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 프로브 또는 프라이머 이외에도 상기 프로브 또는 프라이머의 구조 또는 생리활성을 안정하게 유지시켜 주는 완충액 또는 반응액이 추가로 포함할 수 있으며, 안정성을 유지하기 위해, 분말 상태 또는 적절한 완충액에 용해된 상태로 제공될 수 있다.

[0034] 본 발명에서, 프로브는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다.

[0035] 본 발명에서, 프라이머란는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하며, 서열번호 3 및 4로 이루어진 프라이머 쌍, 또는 서열번호 17 및 18로 이루어진 프라이머 쌍일 수 있다. 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기관 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다. 본 발명의 대사성 질환 진단용 조성물이 키트의 구성 요소로써 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다.

[0036] 본 발명은 (a) CNOT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 CNOT2 유전자의 발현량, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, CNOT2 유전자의 발현량, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성이 감소되는 경우에 상기 시료는 대사성 질환의 치료 또는 예방용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 대사성 질환의 예방 또는 치료용 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 방법에 따르면, 먼저 CNOT2 유전자 또는 단백질을 포함하는 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킬 수 있다. 여기서 상기시료는 CNOT2 유전자의 발현량, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이후, 시료가 처리된 세포에서 CNOT2 유전자의 발현량, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과, CNOT2 유전자의 발현량, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성이 감소되는 것이 측정되면 상기 시료는 대사성 질환의 치료 또는 예방용 물질로 판정될 수 있다.

[0038] 상기에서 CNOT2 유전자의 발현량, CNOT2 단백질의 양 또는 CNOT2 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블랏, 노던 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0039] 본 발명에 따른 CNOT2 유전자는 세포내에서 지방 분화의 조절자로서 역할을 하며 지방 형성 유전자들의 발현을 촉진시킴으로써 지질의 축적 및 지방세포의 크기 증가에 영향을 주어 대사성 질환을 유발시키므로, CNOT2 유전자 억제제로 이 유전자의 발현을 저해시키면 대사성 질환의 유발을 억제시키는 작용 효과를 가질 수 있으며, 또한 대사성 질환의 진단 또는 치료제의 표적 유전자로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 3T3L-1세포로부터 지방세포 분화 과정에서 CNOT2 및 지방 형성 관련 유전자들의 단백질 및 mRNA 발현 증가를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 CNOT2 발현이 억제된 3T3L-1세포에서 지방 세포 형성의 억제 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 CNOT2 발현이 억제된 3T3L-1세포에서 지방 세포 형성의 억제에 관하여 측정된 OD값 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 CNOT2 발현이 억제된 3T3L-1세포에서 지방 형성 관련 단백질 발현 저해를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 5은 CNOT2 발현이 억제된 breast cancer cell MDA-MD-231 세포에서 지방 형성 관련 단백질 및 mRNA의 발현이 억제되는 것을 확인한 결과를 나타내는 도이다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 또는 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0042] <실시예 1>3T3-L1 세포주의 지방세포 분화

[0043] 3T3-L1 세포(출처 : American Type Culture Collection, Manassas,VA, USA)를 6-well 플레이트에 Seeding한 후, 100% confluent 상태에서 이틀 간 배양하고 (day 0), 0.5mM IBBX, 1 μ M 텍사메타손, 1 μ g/mL 인슐린을 포함한 DME 배양액을 첨가하여 분화를 유도하였다. 분화는 100% confluent 상태에서 이틀 간 배양하고 (day 0)로 하여 8일까지 이루어졌으며, 2, 4, 6 및 8일에 세포가 수집되었다.

[0044] <실시예 2>3T3-L1 세포주의 지방세포 분화 과정에서의 유전자 발현 변화 확인

[0045] 3T3-L1 세포의 지방세포로의 분화 과정 동안 지방 세포와 관련되는 유전자들과 CNOT2 유전자의 발현 변화를 웨스턴 블랏 및 RT-PCR을 통해 확인하였다.

[0046] 상기 실시예 1에서와 같이, 3T3-L1 cells를 지방 형성 분화시킨 후 2, 4, 6 및 8일 간격을 세포를 모은 후 웨스턴 블랏으로 CNOT2 및 지방 형성 관련 유전자 (PPAR γ , C/EBP α)들의 단백질량의 변화를 확인하였다.

[0047] 그 결과를 도 1의 A에 나타내었다. 도 1의 A에서 확인되는 바와 같이, 지방세포로의 분화가 진행됨에 따라 CNOT2 유전자가 증가하는 것이 확인되었으며, PPAR γ 및 C/EBP α 도 일정 수준 이상으로 발현이 되는 것이 확인되었다.

[0048] 마찬가지로 방법으로, 3T3-L1 cells를 지방 형성 분화 시킨 후 2, 4, 6 및 8 일 간격을 세포를 모은 후 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0049] RT-PCR을 수행하기 위하여, 세포에 TRIzol reagent (Life Technologies)를 부가하여 제조업체의 설명서에 따라 RNA를 추출한 후, 2 μ g의 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR를 위해 Lightcycler SYBR Green PCR

mater mixture (Roche Applied Sciences)를 이용하여 Lightcycler™ instrument를 통해 분석을 수행하였다. RT-qPCR에 사용된 프라이머 (primer)의 서열은 다음과 같으며, 내부대조군으로 GAPDH가 사용되었다.

[표 1] 프라이머 서열

	forward primer	reverse primer
mouse cnot2	tgctcagcaagccttctaaa (서열번호 3)	gccagatcctcaaggagatta (서열번호 4)
mouse C/EBPα	gtgctggagttgaccagtga (서열번호 5)	ccaaggagctctcaggcag (서열번호 6)
mouse C/EBPβ	gcaagagccgcgcacaag (서열번호 7)	ggctcgggcagctgctt (서열번호 8)
mouse PPARγ	atgggtgaaactctgggaga (서열번호 9)	cttgtgaagtgtctcagc (서열번호 10)
mouse adiponectin	aagaaggacaaggccgttctc (서열번호 11)	gagtcattgtgtgtccc (서열번호 12)
mouse AP2	gcatagcaccaagggaagg (서열번호 13)	cgcactgactattgttagtg (서열번호 14)
mouse GAPDH	gctgtcatcaacgggaag (서열번호 15)	gatgttagtggggctctcg (서열번호 16)
human CNOT2	ggtaacccaactcattaataaac (서열번호 17)	tgctgggtttgttaccattcc (서열번호 18)
human AP2	accaggaaagtggctgcat (서열번호 19)	caggtaacagtccttggct (서열번호 20)
human CEBPα	cgggtggacaagaacagcaac (서열번호 21)	cggatctctctagtcctggc (서열번호 22)
human CEBPβ	cacagcgacgactgcaagatc (서열번호 23)	cttgaacaagttccgagggtg (서열번호 24)
human GAPDH	cttttaactctggttaagtgg (서열번호 25)	tttggtcctcccctgcaaat (서열번호 26)

상기 실험 결과를 도 1의 B에 나타내었다. 실험결과, CNOT2 유전자의 발현이 지방 세포 분화에 따라 증가하였으며, 지방형성 분화 유전자인 PPAR γ, C/EBP α, aP2, adiponectin 역시 지방세포 분화에 따라 증가하였고, C/EBP β의 경우 일정 수준 이상을 유지하였다.

상기 결과들로부터 CNOT2의 전사 수준이 지방 분화 과정에 따라 증가하는 것을 확인하였다.

<실시예 3> siRNA 처리된 3T3-L1 세포에서 지방 세포 분화 및 지방 생성 억제 확인

CNOT2 유전자 Knockdown을 위하여, siRNA를 이용하여 각각 CNOT2 유전자의 발현을 억제하였다. siRNA로 Knockdown을 위하여, CNOT2 siRNA(서열 번호27: sense sequence- GUUGGACCUUUCAGAUUUUU, 서열번호28: antisense sequence- AAAUCUGAAAGGUCCAUCUU) (Thermo scientific 회사, 미국) 및 control siRNA(바이오니아, 한국)를 구매하고, 제조업체의 설명서에 따라 lipofetamine 2000을 이용하여 CNOT2 siRNA (Thermo scientific 회사, 미국) 및 control siRNA(바이오니아, 한국)를 각각 3T3L-1세포에 transfection하였다. 그 다음날 신선한 배지로 바꿔주고 세포를 유지시켰다.

상기에서 제조된 siRNA 처리된 대조군 지방 세포 및 CNOT2 Knockdown 지방 세포를 분화시키면서 2, 4, 6 및 8일 후에 각각 세포를 PBS에 내에서 세척하고 세포를 파라포름알데하이드로 1시간 동안 고정하였다. 그 후 물로 3회 세척하였다. 0.5g 오일-레드-0를 이소프로판올 (100ml)에 용해시켜 제조한 혼합용액 (60ml)과 증류수 (40ml)를 혼합한 용액을 세포에 투여하고 실온에서 1시간 보관하여 염색하였다. 염색은 물로 씻어서 제거 후 염색된 세포는 실온에서 말린 후 200% 이소프로판올로 10분 동안 염색된 용액을 녹인 후 500nm파장에서 분광학적으로 광학밀도를 측정하였다.

그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다. 도 2는 지방 세포 형성을 oil-red-0로 염색한 후 현미경상으로 분화를 확인한 결과를 보여주며 도 3은 측정된 OD 값을 보여준다. 확인되는 바와 같이, CNOT2 siRNA 처리된 세포에서 지방 세포의 형성이 현저히 감소하는 것을 육안상 및 OD 측정 결과를 통해 확인하였다.

또한, 상기 실시예 2와 동일한 방식으로 웨스턴 블랏을 통해 CNOT2가 억제 되었을 때 지방분화 형성의 마커들의 변화를 확인하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 확인되는 바와 같이, 지방 분화 형성 마커인 PPAR γ 및 C/EBP α 모두 CNOT2가 억제된 CNOT Knockdown 세포에서 그 발현이 감소되는 것이 확인되었다.

<실시예 4> shRNA 처리된 세포에서 지방 세포 분화 및 지방 생성 억제 확인

CNOT2 유전자 Knockdown을 위하여, shRNA (서열 번호 29 shRNA#1 CCGGCGGGTTACTAATTCCTCAACTCGAGTTGAGGAATGTTAGTAACCCGTTTTT, 서열번호 30: shRNA#2 CCGGATGAATGGAGGAGCGTATTACTCGAGTAATACGTCCTCCATTCATTTTTTG)를 이용하여 각각 CNOT2 유전자의 발현을 억제 하였다. shRNA로 Knockdown을 위하여, CNOT2 shRNA를 sigma에서 구입한 후, 제조업체의 설명서에 따라 MDA-MB-231 세포주에서 CNOT2가 결핍된 shRNAcnot2 세포주를 제조하였다.

상기 실시예 2와 동일한 방법으로, 웨스턴 블랏 및 RT-qPCR을 통해 지방 관련 유전자들의 발현 변화를 확인하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

도 5의 A는 shRNA로 Knockdown된 MDA-MB-231 세포주에서 웨스턴 블랏을 통해 지방 분화 형성 마커들의 변화를 확인한 결과를 나타낸다. 도 5의 A에서 확인되는 바와 같이, CNOT2가 결핍되었을 때 PPAR γ 및 C/EBP α의 발현

이 현저히 줄어드는 것을 확인하였다.

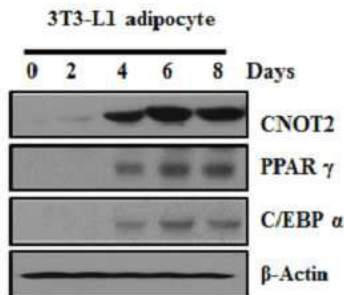
[0063] 도 5의 B는 shRNA로 Knockdown된 MDA-MB-231 세포주에서 RT-qPCR을 통해 지방 분화 형성 마커들의 변화를 확인한 결과를 나타낸다. 도 5의 B에서 확인되는 바와 같이, CNOT2가 결핍 되었을 때 C/EBP α , C/EBP β 및 AP2의 발현이 현저히 줄어드는 것을 확인하였다.

[0064] 상기 결과들을 통해서 CNOT2 유전자가 세포내에서 지방 분화의 조절자로서 역할을 하며 지방 형성 관련 유전자들의 발현을 조절함을 확인하였고, CNOT2 유전자의 억제는 대사성 질환의 예방 또는 치료에 현저한 효과가 있음이 확인되었다.

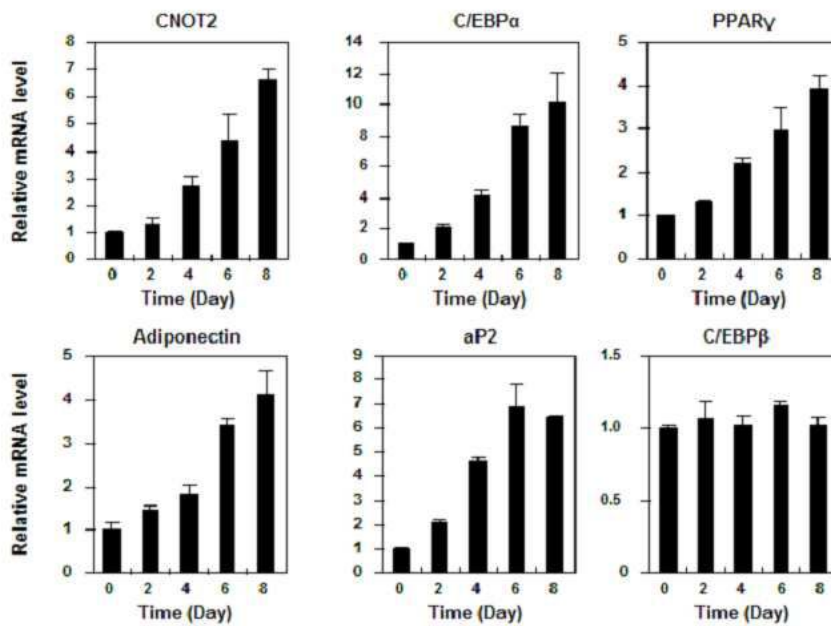
도면

도면1

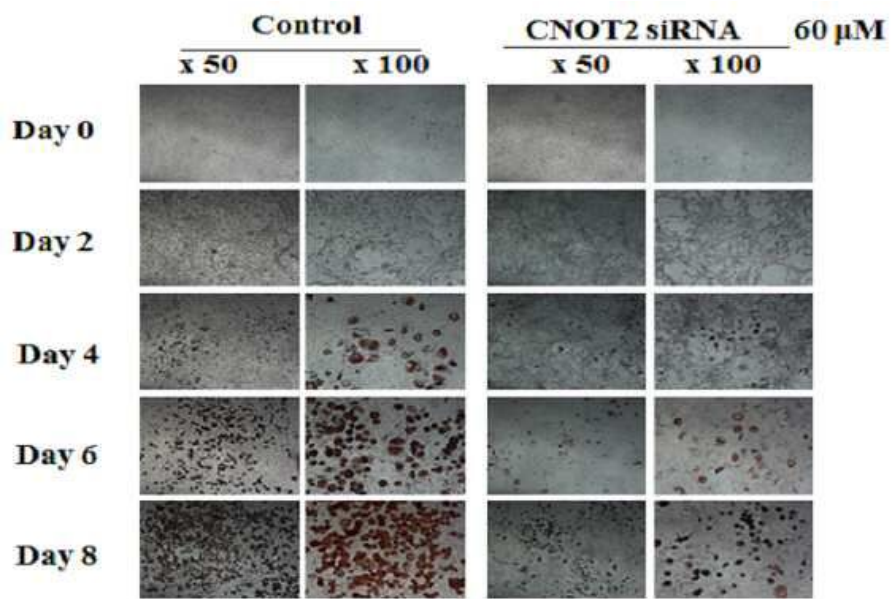
A



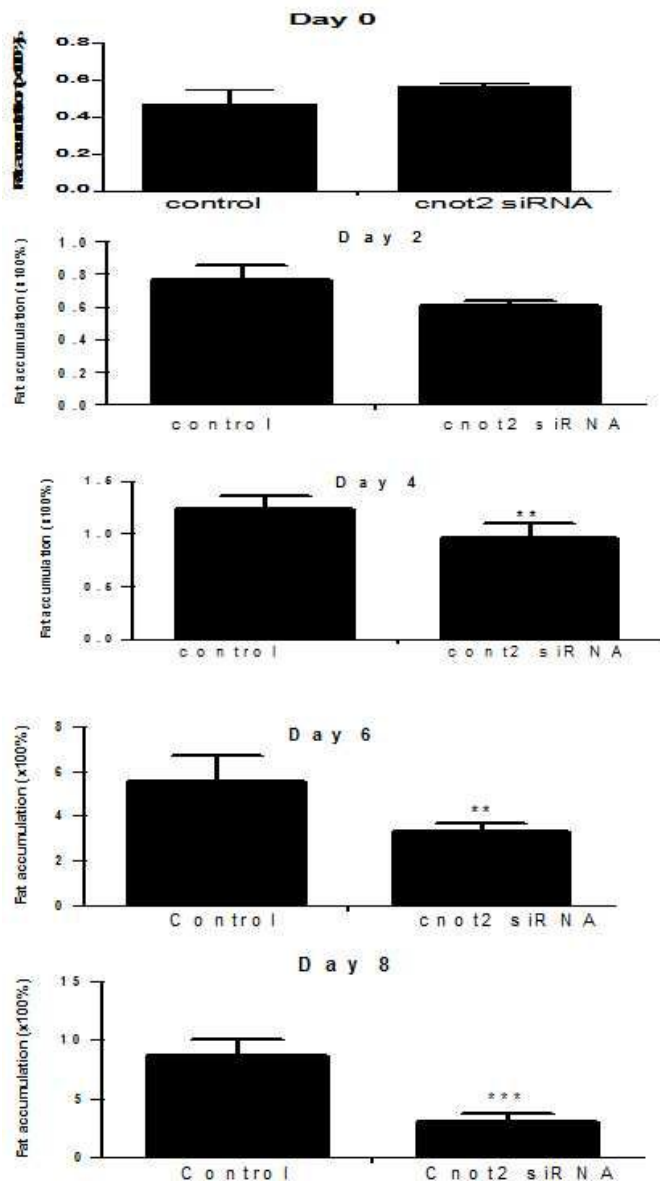
B



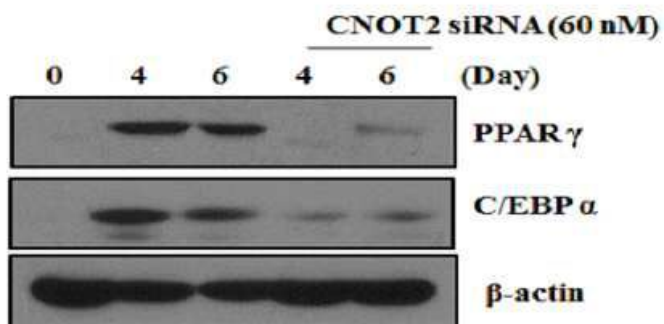
도면2



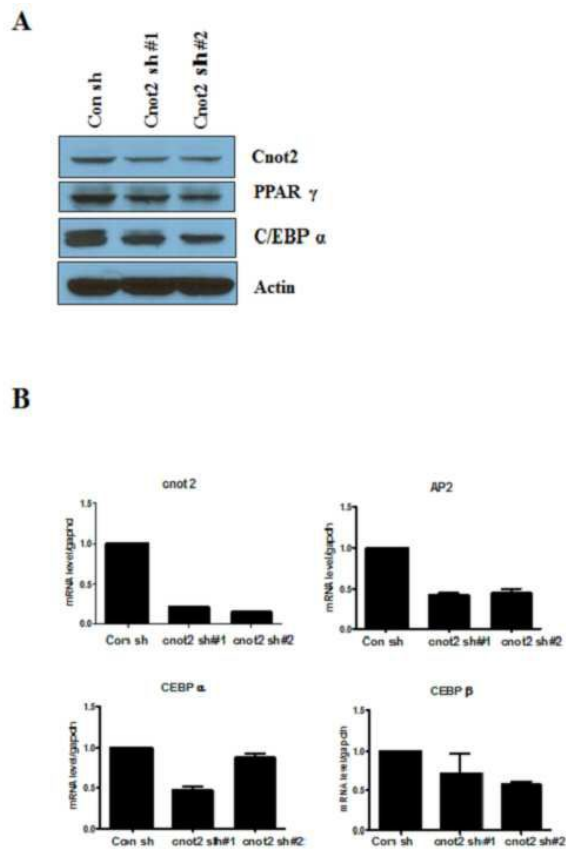
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING METABOLIC DISEASE
- <130> P15-019-KHU
- <160> 30
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1770
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <220><221> gene
- <222> (1)..(1770)
- <223> CCR4 NOT transcription complex subunit 2 mRNA
- <400> 1

cttggatccg cgggacaaga aaattcatgc gagggagacg tgggtggcg tccttcctgt 60

gacacgacc ttgagtgaca gttctatttg attgcctccg gtactgtgag gaaaggacac 120

gactctatgg tgaggactga tggacataca ttatctgaga aaagaaacta ccagggtgaca 180
aacagcatgt ttggtgcttc aagaaagaag tttgtagagg gggtcgacag tgactacat 240
gacgaaaaca tgtactacag ccagctcttct atgtttccac atcggtcaga aaaagatatg 300
ctggcatcac catctacatc aggtcagctg tctcagtttg gggcaagttt atacgggcaa 360
caaagtgcac taggccttcc aatgaggggg atgagcaaca ataccctca gttaaatcgc 420
agcttatcac aaggcactca gttaccgagc cacgtcacgc caacaacagg ggtaccaaca 480
atgtcacttc acacgcctcc atctccaagc aggggtatgt tgcctatgaa tcctaggaat 540

atgatgaacc actcccaggt tggtcagggc attggaattc ctagcaggac aaatagcatg 600
agcagttcag ggtaggtag ccccaacaga agctcgccaa gcataatatg tatgccaag 660
cagcagcctt ctcgacagcc ttttactgtg aacagtatgt ctggatttgg aatgaacagg 720
aatcaggcat ttggaatgaa taactcctta tcaagtaaca tttttaatgg aacagacgga 780
agtgaaaatg tgacaggatt ggacctttca gatttccag cattagcaga ccgaaacagg 840
aggaagga gtggtaaccc aactccatta ataaaccct tggctggaag agctccttat 900
gttggaatgg taacaaaacc agcaaatgaa caatcccagg acttctcaat acacaatgaa 960

gattttccag cattaccagg ctccagctat aaagatccaa catcaagtaa tgatgacagt 1020
aaatctaatt tgaatacatc tggcaagaca acttcaagta cagatggacc caaatccct 1080
ggagataaaa gttaacaac acaaaataat aaccagcaga aaaaagggat ccagggttta 1140
cctgatggtc gggttactaa cattcctcaa gggatgggtga cggaccaatt tggaatgatt 1200
ggcctgttaa catttatcag ggcagcagag acagaccag gaatggtaca tcttgatta 1260
ggaagtgact taacaacatt aggctcaat ctgaactctc ctgaaaatct ctacccaaa 1320
tttgcgtcac cctgggcac ttcacctgt cgacctcaag acatagactt ccatgttcca 1380

tctgagtact taacgaacat tcacattagg gataagctgg ctgcaataaa acttgccga 1440
tatgtgaag accttctctt ctatctctat tacatgaatg gaggagacgt attacaactt 1500
ttagctgcag tggagctttt taacctgat tggagatacc acaagaaga acgagtatgg 1560
attaccaggg caccaggcat ggagccaaca atgaaaacca atacctatga gaggggaaca 1620
tattacttct ttgactgtct taactggagg aaagtagcta aggagtcca tctggaatat 1680
gacaaattag aagaacggcc tcacctgcca tccacctca actacaaccc tgctcagcaa 1740
gccttctaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1770

<210> 2

<211> 3014

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220><221> gene

<222> (1)..(3014)

<223> CCR4-NOT transcription complex, subunit 2, mRNA

<400> 2

gatacgtcgc catcttggat ccgcgggaca agaaaattca tgcgtactgt gaggaagga	60
cacgactcta tggtagaggac tgatggacat acattatctg agaaaagaaa ctaccagagc	120
agaagaatcc catcgtttat catgttctgg ttggactcct ttcttatcgt ttgctggagt	180
ttgaacttca gagctatggg gtcaaccctg ctgtaataac tcaggggagc tcctagtgtg	240
gggctgggtgc catggctcac cctccaacct ttcttcttc acttcagcct ccagctctga	300
gctttcccat cccagagta gcaaatgttg aaagaagttg cacaggtgac aaacagcatg	360
tttgggtgctt caagaaagaa gttttagag ggggtggaca gcgactacca tgatgagaac	420
atgtactaca gccagtcttc tatgttcca catcggtcag agaaagatat gctggcatcg	480
ccatctacgt caggtcagct gtctcaattt ggggcaagtt tatacgggca acaaagtgca	540
ctaggccttc caatgagggg gatgagcaac aataccctc agttaaatcg cagcttatca	600
caaggcactc agttaccgag ccacgtcacg ccaacaacag gggtaccaac aatgtcactt	660
cacacgcctc catctccaag caggggtatt ttgcctatga atcctaggaa tatgatgaac	720
cactcccagg ttggtcaggg cattggaatt cctagcagga caaatagcat gagcagttca	780
gggttaggta gcccacacag aagctcgcca agcataatat gtatgccaaa gcaacagcct	840
tctcgacagc cttttactgt gaacagtatg tctggatttg gaatgaacag gaatcaggca	900
tttggaatga ataactcctt atcaagtaac atttttaatg gaacagatgg cagtgaaaat	960
gtgacaggat tggaccttc agatttcca gcgttagctg accggaatag aagggaaggg	1020
agcggcaacc caactccatt aataaacccc ttggctggaa gagtcctta cgttggaatg	1080
gtaacaaaac ctgcaaatga gcaatccaa gacttctca tacacaacga agattttcca	1140
gcattacctg gttccagcta taaagatcca acgtcaagta atgacgacag caaatctaat	1200
ttgagtagat cggggaagac gacttcaagt acagatggac ccaattccc tggagataaa	1260
agttaacaa cacaaaacaa taatcaacag aaaaagggga tccaggtgtt acctgatggt	1320
cgagttacta acatttctca agggatgggt acggaccaat ttggaatgat tggcctgtta	1380
acatttatca gggcagcaga gacagacca ggaatggtac atcttgcttt aggaagtgc	1440
ttaacaacat taggcctcaa tctgaactca cctgaaaac tctatccaa atttgcata	1500
ccctgggctt cttcaccttg tcggcctcaa gacatagact tccatgttcc atcagaatat	1560

ttaacaaaca ttacacattag ggataagctg gctgcaatca aacttggccg atatggagaa 1620
 gacctcctct tctatctgta ttacatgaac ggcggggatg tattacaact cttagctgcg 1680
 gtagaacttt ttaaccgtga ttggagatac cacaaggagg agcgggtatg gattaccagg 1740
 gcaccaggca tggagccaac aatgaaaacc aacacgtatg agcgggggac ctactatttc 1800
 ttgactgtc tcaactggag gaaagtagct aaggagtcc atctggaata tgacaaatta 1860
 gaagagcggc ctcacctgcc atccaccttc aactacaacc ctgctcagca agccttctaa 1920
 aaagacttcc cttttcttgg ggtatggctg tctcagcaca atactcgaca taactgcaga 1980

gctgatgtgg ctcaggcacc ctggttttaa tcccttgagg atctggcaat tggettacgt 2040
 aaagaaaggg tcaccatttg aggtcctgcc ttaccaatta tgtgctgccc aacaactaaa 2100
 ttgttaattt gttttctcta ctttgagcag ggtctgaatt ttttcattta ttttctttt 2160
 gccagcagac agacttgggt ctataaagac aagcaagtac actgacagaa attaccattt 2220
 agtttcttaa atgtaaaaaa agaaaaccca caaaagactc aacaaaatta gaccacaaaa 2280
 ttgcatgtg tcattgtagc actattggta ataaaagaac agatgtttgt gcatttttat 2340
 gtgaagatcc ttctcgtatt tcatttggaa ggatgagcga ggtctgcttc tttcttttta 2400

cttccctgt gtttctgaaa ggcggtttgg ccaggcttac tgcaggcatc cgactgtaga 2460
 gatcgccaca gtctctgggg ctccagggtc gcgctgtaac tgagcttcat ccagaatgag 2520
 caaaacactg tcagtcctt gttacgattt tgaataaat gtgtacattt tttttaaatt 2580
 ttggacatca catgaataaa ggtatgtatg tacgaatgtg tataatattat atatatgaca 2640
 tctattttgg aaaatgtttg cctgctgta cctcatttt aggaggtgtg catggatgca 2700
 atatatgaaa atgggacatt ctggaactgc tggtcagggg actttgtcgc cctgtgcact 2760
 aaagggccag attttcagca gccaaaggaca tccataccca agtgaatgtg atggggcttc 2820

aagacgtgaa ctgagacaat tcactctggc tgtttgaaca gcagcgttc ataggaagag 2880
 aaaaagatca atcttgtatt ttctgaccac ataaaggctt cttctctttg taataaagta 2940
 gaaaagctct cctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3000
 aaaaaaaaaa aaaa 3014

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse cnot2 forward primer

<400> 3

tgctcagcaa gccttctaaa	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse cnot2 reverse primer	
<400> 4	
gccagatcct caagggatta	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse C/EBP a forward primer	
<400> 5	
gtgctggagt tgaccagtga	20
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse C/EBP a reverse primer	
<400> 6	
ccaaggagct ctcaggcag	19
<210> 7	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse C/EBP beta forward primer	
<400> 7	
gcaagagccg cgacaag	17
<210> 8	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	mouse C/EBP beta reverse primer	
<400>	8	
ggctcgggca gctgctt		17
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse PPAR gamma forward primer	
<400>	9	
atgggtgaaa ctctgggaga		20
<210>	10	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse PPAR gamma reverse primer	
<400>	10	
cttgtgaagt gctcagc		17
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse adiponectin forward primer	
<400>	11	
aagaaggaca aggccgttct c		21
<210>	12	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse adiponectin reverse primer	
<400>	12	
gagtcattg tggcccc		18
<210>	13	
<211>	20	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse AP2 forward primer	
<400>	13	
	gcatgagcca aaggaagagg	20
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse AP2 reverse primer	
<400>	14	
	ccgactgact attgtagtg	19
<210>	15	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse GAPDH forward primer	
<400>	15	
	gcttgtcatc aacgggaag	19
<210>	16	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse GAPDH reverse primer	
<400>	16	
	gatgttagtg gggctctcg	18
<210>	17	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human CNOT2 forward primer	
<400>	17	
	ggtaacccaa ctccattaat aaacc	25

<210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human CNOT2 reverse primer
 <400> 18
 tgctgggtttt gttaccattc c 21

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human AP2 forward primer
 <400> 19
 accaggaaag tggtggcat 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human AP2 reverse primer
 <400> 20
 caggtcaacg tcccttggt 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human CEBP a forward primer
 <400> 21

cggtggacaa gaacagcaac 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human CEBP a reverse primer

<400>	22	
cggaatctcc tagtcctggc		20
<210>	23	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human CEBP beta forward primer	
<400>	23	
cacagcgacg actgcaagat c		21
<210>	24	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human CEBP beta reverse primer	
<400>	24	
cttgaacaag ttccgcaggg tg		22
<210>	25	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human GAPDH forward primer	
<400>	25	
cttttaactc tggtaaagtg g		21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human GAPDH reverse primer	
<400>	26	
ttttggctcc cccctgcaaa t		21
<210>	27	
<211>	20	
<212>	RNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CNOT2 siRNA sense sequence	
<400>	27	
	guuggaccuu ucagauuuuu	20
<210>	28	
<211>	21	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CNOT2 siRNA anti-sense sequence	
<400>	28	
	aaaucugaaa gguccaaucu u	21
<210>	29	
<211>	57	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CNOT2 shRNA NO.1	
<400>	29	
	ccggcgggtt actaacattc ctcaactcga gttgaggaat gttagtaacc cgttttt	57
<210>	30	
<211>	58	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CNOT2 shRNA NO.2	
<400>	30	
	ccggatgaat ggaggagacg tattactcga gtaatacgtc tctccattc attttttg	58