



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0048014
(43) 공개일자 2016년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A23K 1/16 (2006.01)
A23K 1/18 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A23K 1/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0148263

(22) 출원일자 2015년10월23일

심사청구일자 2015년10월23일

(30) 우선권주장

1020140144319 2014년10월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이영식

서울특별시 종로구 명륜길 15-16 (명륜3가)

홍재상

서울특별시 강동구 고덕로 131, 118동 2402호(암사동, 강동롯데캐슬퍼스트아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

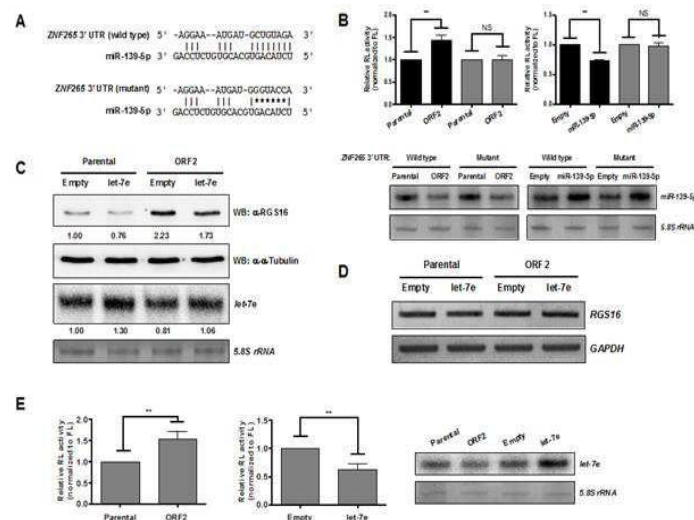
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 마이크로RNA를 유효성분으로 포함하는 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 마이크로RNA를 유효성분으로 포함하는 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 예방 또는 치료용 조성물, 돼지 서코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 치료를 위한 후보물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 마이크로RNA는 PCV2 감염 저항성 연관 유전자의 발현을 조절하여 PCV2의 감염성을 저하시키는 우수한 효과를 가지고 있다. 따라서, 상기 마이크로RNA는 PCV2 감염 또는 PCV2에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A23K 1/184 (2013.01)

C12N 15/1131 (2013.01)

C12Q 1/701 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

(72) 발명자

김남훈

서울특별시 동대문구 제기로4길 40-3, 301호 (제기동)

이준성

서울특별시 성북구 보문로26길 83-7, 301호 (안암동1가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008089

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 돼지 이유후전신소모성증후군(PMWS) 발병 방지를 위한 면역조절 기전 구명 및 이를 이용한 질병저항성 활용 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, mi R)를 유효성분으로 포함하는 돼지 서코바이러스 제2형(PCV2) 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miR-139-5p는 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 let-7e는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 마이크로RNA는 ZNF265 또는 RGS16 단백질에 결합하는 것을 특징으로 하는, 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, mi R)를 유효성분으로 포함하는 돼지 서코바이러스 제2형(PCV2) 감염의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 6

miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, mi R)를 유효성분으로 포함하는 돼지 서코바이러스 제2형(PCV2) 감염의 예방 또는 개선용 사료 첨가용 조성물.

청구항 7

miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, mi R)를 유효성분으로 포함하는, 돼지 서코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 돼지 서코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환은 돼지 이유후 전신소모성 질환(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS), 돼지 생식기 및 호흡기 증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 가성 광견병(pseudorabies), 글래서씨병(Glasser's disease), 및 화농성 기관지 폐렴(suppurative bronchopneumonia)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는, 돼지 서코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

다음 단계를 포함하는 돼지 서코바이러스 제2형(PCV2) 감염의 치료를 위한 후보물질의 스크리닝 방법:

- (a) miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, miR)를 발현하는 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 세포에서 상기 마이크로RNA의 발현 정도를 분석하는 단계; 및
- (c) 상기 시험물질이 상기 마이크로RNA의 발현을 증가시키는 경우, 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 치료를 위한 후보물질로 판단하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 마이크로RNA를 유효성분으로 포함하는 돼지 서코바이러스 제2형(이하, PCV2와 혼용함) 감염의 예방 또는 치료용 조성물, 돼지 서코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 치료를 위한 후보물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 돼지 이유후 전신소모성 질환(Post-weaning multisystemic wasting syndrome, PMWS)은 1991년 캐나다에서 처음 보고된 이래(Harding, 1997; Clark, 1997), 전 세계적으로 양돈농가에 피해를 주고 있는 대표적인 질병이다. PMWS는 말초 림프관의 확장, 림프구의 감소, 점진적인 체중감소, 호흡기 장애(respiratory dysfunction), 설사 등의 증상을 가지며 다양한 원인에 의해 발병한다(Allan and Ellis, 2000; Segales et al., 2005). PMWS의 병인의 하나로 돼지 서코바이러스 2형(PCV2)이 보고되었다(Chae, 2005; Segales et al., 2005; Opriessnig et al., 2007).
- [0003] 돼지 서코바이러스는 돼지에게 질병을 일으키지 못하는 제1형과 이유후 전신 소모성 증후군(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS)의 병인학적 요인이 되는 제2형으로 나눌 수 있다(Tischer et al., 1995; Allan et al., 1999). PCV2는 Circoviridae family의 바이러스로서, virion은 icosahedron 형태의 캡시드(capsid)를 지니며, 비-외피(non-envelop) 형태를 지닌 단일 가닥의 원형의 DNA(single stranded circular DNA)로 구성되고(Pringle et al., 1999), 1768개의 염기서열을 갖는다(Rose et al., 2012).
- [0004] PMWS 이외에, PCV2가 연관된 감염 질병으로는 돼지 생식기 및 호흡기 증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 가성 광견병(pseudorabies), 글래스씨병(Glasser's disease), 화농성 기관지폐렴(suppurative bronchopneumonia) 등이 있다. 2010년 정부가 300억 원의 예산을 조성, 농가에 관납백신을 공급할 정도로 PCV2 감염으로 인한 피해는 매우 심각하다.
- [0005] PCV2는 3개의 ORF(open reading frame)를 가지는 것으로 알려져 있고, 이 중 ORF1은 바이러스 복제를 위한 단백질(Mankertz et al., 1998), ORF2는 약 30kDa의 분자량을 갖는 당단백질로서 바이러스의 유전체 핵산을 둘러싸는 캡시드(capsid) 단백질(Mankertz et al., 1998; Nawagitgul et al., 2000), ORF3는 바이러스 복제에는 영향을 미치지 않고 숙주세포의 세포사멸을 유도하는 단백질(Liu et al., 2005)을 각각 발현하는 것으로 보고되었다. 최근 PCV2의 ORF들과 감염과의 연관성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0006] 한편, RNAi(RNA interference) 또는 RNA간섭은 진핵생물에서 진화적으로 보존되는 현상으로, 21-23 뉴클레오타이드(nucleotide) 길이의 작은 RNA들[small interfering RNA(siRNA), microRNA(miRNA)]에 의해 염기서열 상보적인 유전자의 발현억제가 유도되는 것이다(Hannon, 2002). RNAi는 다양한 생물학적 과정에 관여해 생체 발생, 유전체 안정성, 바이러스 저항성, 그리고 인간 질병 등에 중요한 현상으로 밝혀지고 있으며, 그 응용범위가 넓어 역유전학(reverse genetics) 방식의 중요한 연구방법으로뿐만 아니라 이를 이용하여 의약품 개발, 인간질환 치료 및 농업분야 등에 응용하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다(Bumcrot et al., 2006). 최근 바이러스의 감염에 따른 마이크로RNA의 발현 변화분석을 통해 바이러스 감염 억제를 위한 유전자발현 조절 기법이 보고되고 있다.

[0007] 본 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 특허공보 10-1030792(2011.04.27)에는 돼지 쉼코바이러스2(PCV2) ORF2 유전자의 표면발현용 벡터 및 이로 형질전환된 살모넬라 백신 균주에 대해 기재되어 있고, 국제공개 W02006/132598 A1(2006.12.14)에는 PCV2의 ORF3 및 이의 세포자살(apoptosis) 작용을 확인하고, 부분적으로 비정상인 ORF3 발현을 이용한 약독화된 PVC2 바이러스 백신에 관해 기재되어 있다. 하지만 현재까지 PCV2의 바이러스 단백질들과 상호작용하는 단백질을 직접 표적으로 하거나 이들의 하부신호전달 단백질을 표적으로 하는 마이크로RNA를 이용하여 PCV2 감염을 억제시키는 것에 대해서는 확인된 바가 없다.

[0008] 이에 본 발명자들은 PCV2 감염 및 비감염 세포를 이용하여 발현양이 변화하는 마이크로RNA를 선별한 후, 마이크로RNA의 발현조절을 통해 PCV2 감염 저항성이 증진될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 10-1030792(2011.04.27)

(특허문헌 0002) 국제공개 W02006/132598 A1(2006.12.14)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 마이크로RNA(microRNA, miR)를 유효성분으로 포함하는 돼지 쉼코바이러스 제2형(PCV2) 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 마이크로RNA를 유효성분으로 포함하는 돼지 쉼코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 돼지 쉼코바이러스 제2형 감염의 치료를 위한 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, miR)를 유효성분으로 포함하는 돼지 쉼코바이러스 제2형(PCV2) 감염의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 (a) miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, miR)를 발현하는 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; (b) 상기 세포에서 상기 마이크로RNA의 발현 정도를 분석하는 단계; 및 (c) 상기 시험물질이 상기 마이크로RNA의 발현을 증가시키는 경우, 돼지 쉼코바이러스 제2형 감염의 치료를 위한 후보물질로 판단하는 단계를 포함하는, 돼지 쉼코바이러스 제2형(PCV2) 감염의 치료를 위한 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0015] 이하, 본 발명에 대해서 상세하게 설명한다.

[0016] 본 발명자들은 PCV2의 각 ORF가 과발현된 세포에서 발현양이 변화하는 마이크로RNA를 선별하였으며, 선별된 마이크로RNA인 miR-139-5p 또는 let-7e의 발현조절을 통해 PCV2 감염 저항성이 증진될 수 있음을 확인하였다.

[0017] 따라서, 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, miR)를 유효성분으로 포함하는, 돼지 쉼코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 조성물은 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 사료 첨가용 조성물을 포함한다.

[0019] 본 발명의 구체적인 일 양태에 의하면, 본 발명의 마이크로RNA인 miR-139-5p는 이에 한정되는 것은 아니나, 서열번호 1(5'-UCUACAGUGCACGUGUCUCCAG-3')의 염기서열로 표시될 수 있으며, ZNF265 전사체(mRNA)의 3'UTR에 결

합하는 것을 특징으로 한다.

- [0020] 또한, 본 발명의 마이크로RNA인 let-7e는 이에 한정되는 것은 아니나, 서열번호 2의 염기서열(5'-UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU-3')로 표시될 수 있으며, RGS16 전사체(mRNA)의 3'UTR에 결합하는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 조성물은 상기 마이크로RNA 자체를 포함할 수도 있으나 그의 단편을 포함할 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0022] 바람직한 형태로서, 본 발명의 약학적 조성물은 당업자에게 공지된 추가 성분을 포함할 수 있고, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0023] 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0024] 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0026] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 1,000 mg/kg(체중)의 양으로 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 조성물은 돼지 서코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 식품 조성물, 바람직하게는 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명에서, 건강기능식품이란 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 생체에 무해하여야 한다.
- [0029] 본 발명의 식품 조성물에 포함되는 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 조성물은 돼지 서코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환의 예방 또는 개선을 목적으로 사료 첨가제로 사용될 수 있다.

- [0031] 본 발명에 따른 사료 첨가제는 발효 사료, 배합 사료, 펠렛 형태 및 사일리지(silage) 등의 형태로 제조될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 상기 발효 사료는 여러 가지 미생물 균 또는 효소들을 첨가함으로써 유기물을 발효시켜 제조될 수 있으며, 상기 배합 사료는 여러 종류의 일반 사료와 본 발명의 조성물을 혼합하여 제조될 수 있다. 상기 펠렛 형태의 사료는 상기 발효 사료 또는 배합 사료를 펠렛기로 제형화하여 제조될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, miR)를 유효성분으로 포함하는, 돼지 서코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0033] 상기 조성물은 약학적 조성물, 식품 조성물 또는 사료 첨가용 조성물을 포함한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 돼지 서코바이러스 제2형에 의한 감염성 질환은 돼지 이유후 전신소모성 질환(Post-weaning Multisystemic Wasting Syndrome, PMWS), 돼지 생식기 및 호흡기 증후군(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS), 가성 광견병(pseudorabies), 글래서씨병(Glasser's disease), 또는 화농성 기관지폐렴(suppurative bronchopneumonia)일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 본 발명자들은 miR-139-5p 또는 let-7e가 PCV2의 감염성을 조절할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 상기 마이크로RNA는 PMWS 등을 일으키는 PCV2 감염에 의한 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 (a) miR-139-5p, let-7e 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 마이크로RNA(microRNA, miR)를 발현하는 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; (b) 상기 세포에서 상기 마이크로RNA의 발현 정도를 분석하는 단계; 및 (c) 상기 시험물질이 상기 마이크로RNA의 발현을 증가시키는 경우, 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 치료를 위한 후보물질로 판단하는 단계를 포함하는, 돼지 서코바이러스 제2형(PCV2) 감염의 치료를 위한 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명자들은 miR-139-5p 또는 let-7e의 발현 조절을 통해 PCV2 감염 저항성 연관 유전자 발현을 조절할 수 있으며, 이를 통해 PCV2 감염을 치료할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 상기 마이크로RNA의 발현을 증가시키는 물질은 돼지 서코바이러스 제2형 감염의 치료를 위한 후보물질이 될 수 있다.

발명의 효과

- [0038] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 마이크로RNA는 PCV2 감염 저항성 연관 유전자의 발현을 조절하여 PCV2의 감염성을 저하시키는 우수한 효과를 가지고 있다. 따라서, 상기 마이크로RNA는 PCV2 감염 또는 PCV2에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0039] 도 1은 PCV2의 각 ORF 발현 PK15 세포를 확인하기 위한 ORF 내 프라이머 디자인(A) 및 상기 프라이머를 이용한 RT-PCR 결과(B)를 나타낸 도이다.
- 도 2는 PCV2의 각 ORF 발현 PK15 세포에서의 작은 RNA 분리(small RNA isolation) 과정 도식도 및 QC 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 각 샘플(PK15-control, PK15-PCV2 ORF1, PK15-PCV2 ORF2, PK15-PCV2 ORF3)에 대한 cDNA 라이브러리를 확인한 결과 및 PK15-PCV2 ORF1 샘플에 대해 제작된 small RNA 라이브러리를 재확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 하이-쓰루풋 시퀀싱(High-throughput sequencing) 결과 분석 모식도를 나타낸 도이다.
- 도 5는 각 샘플(PK15-control, PK15-PCV2 ORF1, PK15-PCV2 ORF2, PK15-PCV2 ORF3)에서 분석된 서열(sequence)의 길이 분포(length distribution)를 나타낸 도이다.
- 도 6은 각 샘플에서 분석된 마이크로RNA의 종류(A) 및 orthologous miRNA의 발현을 Splinted-ligation assay 분석 결과(B)를 나타낸 도이다.
- 도 7은 PCV2의 각 ORF 발현에 의해 발현이 변화하는 마이크로RNA(A) 및 Splinted-ligation assay 분석 결과(B),

C)를 나타낸 도이다.

도 8은 ZNF265 3' UTR 염기서열을 지닌 Renilla-luciferase reporter를 제작하기 위한 서열 위치(A); wild-type 또는 mutated ZNF265 3' UTR 염기서열을 지닌 Renilla-luciferase reporter를 이용한 Dual-luciferase assay 분석 결과(B); ORF2 또는 let-7e가 과발현된 세포에서 RGS16 단백질을 웨스턴 블랏(C) 및 RT-PCR(D)을 통해 확인한 결과; 및 RGS16 3' UTR 염기서열을 지닌 Renilla-luciferase reporter를 이용한 Dual-luciferase assay 분석 결과(E)를 나타낸 도이다.

도 9는 miR-139-5p 및 let-7e의 발현 증가에 의한 PCV2의 ORF 발현 변화를 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 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 1: PCV2 ORF 발현세포 제작

PCR(polymerase chain reaction)을 통해 PCV2의 각 ORF(ORF1, ORF2, ORF3) 염기서열을 증폭한 후, 이를 포함하는 pLNCX2 레트로바이러스 벡터를 제작하고, 293 GPG packaging cell에 형질주입(transfection)을 진행하였다. 3일 후 형질주입된 세포의 배양액에서 돼신장상피세포(porcine kidney epithelial 15 cell, PK15 cell)를 배양하여 각 PCV2 ORF의 형질도입(transduction)을 유도하였다. 이를 1일 간격으로 3회 반복 진행한 후 네오마이신(neomycin)을 이용해 선별하였다. PCV2는 크게 3개의 ORF로 구성되어 있는데, 특히 ORF3을 암호화하는 염기서열은 ORF1 부분에 포함되어 있지만 전사방향이 반대이다. Neomycin selection이 완료된 PK15 세포에서 특이적인 PCV2의 ORF 발현 여부를 확인하기 위해 RT-PCR을 통해 RNA 수준에서 PCV2의 ORF 발현을 확인하였다. GAPDH는 internal control로 사용되었다. 프라이머 위치 및 RT-PCR 결과를 도 1에 나타내었으며, PCV2의 각 ORF를 증폭하기 위한 PCR 및 RT-PCR 프라이머 서열 정보를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Name	Sequence (5' to 3')
ORF1-F	CC CTCGAG GGCAGCACCTCAGCAGCAAC
ORF1-R	ATT GCGGCCGC TGTGACCAAGTAGGCCTCG
ORF2-F	CC CTCGAG GAACTACTTACAGCGCACTT
ORF2-R	ATT GCGGCCGC GAAGCTCTCTATCGGAGGATTAC
ORF3-F	CC CTCGAG GACAGCAGTTGAGGAGTACCATTCAC
ORF3-R	ATT GCGGCCGC GGTAAAGGGAAGGACGAACACC
ORF1/3-RT-F	TCGATCTCAAGGACAACGGAGT
ORF1-RT-R	CAGCAGTTGAGGAGTACCATTCAC
ORF2-RT-F	AGTGGAGTCAAGAACAGG
ORF2-RT-R	GTCAAGCGTACCAGTCAACA
ORF1/3-RT-R	TTGGTCTTCCATCAGCTTCTGC
GAPDH-RT-F	ATGACCACAGTCCATGCCATC
GAPDH-RT-R	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
miR-139-F	AACTCGAGATCCTGACGAGGAGACCACA
miR-139-R	AATCTAGAGCAGACTCTGGCATCAGTTG
let-7e-F	AACTCGAGTCTGTCTGTCCACCTGCC
let-7e-R	AATCTAGATGACAGGGGCCAGGAGTC
ZNF265 WT-F	AACTCGAGGGGGTGAAGGCAACAGAG
ZNF265 WT-R	AAGCGGCCGCACACCACTTGATGCTTGA
RGS16-F	AACTCGAGTCCAGTACTGCGGACTGA
RGS16-R	AAGCGGCCGC AAACCACTCTCTGTGTCAAC
ZNF265 mutant-F	CTTGATGCTTGACTTACAAGCTTATTTACATTTGTGGTACCCATCATTTCTTACGAAATGAAGTAGTACAGTTTAG
ZNF265 mutant-R	CTAAACTGTACTAGTTTCATTTGTAAGGAAATGATGGGTACCAATGTAAATAAGCTTGAAGTCAAGCATCAAG

[0044] 실시예 2: PCV2 ORF 발현세포 유래 작은 RNA 라이브러리(small RNA library) 제작 및 하이-쓰루풋 시퀀싱(high-throughput sequencing) 실시

[0045] 상기 실시예 1에서 제작한 PCV2의 각 ORF를 발현하는 돼지 숙주세포 PK15 세포(신장상피세포)로부터 200 nt 이하의 작은 RNA를 분리한 후 QC(quality control)를 실시하였다. 보다 구체적으로, PCV2의 각 ORF가 발현되는 PK15 세포에서 RNeasy Mini Kit, RNeasy MinElute Cleanup Kit(Qiagen)를 이용하여 200 nt 이하의 작은 RNA를 분리한 후, Experion(BioRad) 장비를 이용하여 QC를 실시하여 200 nt 이하의 작은 RNA를 확인하였다(도 2 참조).

[0046] 또한, 총 4개의 작은 RNA 샘플(PK15-control, PK15-PCV2 ORF1, PK15-PCV2 ORF2, PK15-PCV2 ORF3)을 이용하여 작은 RNA에 대한 cDNA 라이브러리를 제작하였다(도 3 참조). 보다 구체적으로, 각각의 5', 3' RNA adapter를 작은 RNA에 라이게이션(ligation)을 실시한 후, 3' adapter specific RT 프라이머를 이용하여 역전사(reverse transcription, RT)를 수행하였다. 생성된 cDNA를 이용하여 라이브러리를 제작하는 과정에서 각 작은 RNA 샘플을 표지할 수 있는 인덱스 시퀀스(index sequence)를 지닌 프라이머(primer)들을 이용하여 PCR 반응을 통해 143 nt 크기의 cDNA 라이브러리를 제작하였으며, 하이-쓰루풋 시퀀싱(high-throughput sequencing)을 실시하였다.

[0047] 실시예 3: PCV2의 ORF 발현에 의해 변화되는 숙주세포의 마이크로RNA(microRNA) 선별

[0048] PCV2의 각 ORF의 발현에 의해 변화(증가 또는 감소)되는 숙주세포의 마이크로RNA를 선별하기 위하여, 상기 실시예 2에서의 하이-쓰루풋 시퀀싱(high-throughput sequencing)을 결과를 상세 분석하였다(도 4 참조). 보다 구체적으로, 각 샘플의 시퀀싱 데이터(sequencing data)에서 낮은 quality를 보이는 염기서열들을 제거한 후, adaptor 및 다른 contaminant를 제거한 18 nt 이상의 clean read를 확보하여, 아래 언급된 내용들을 상세 분석하였다.

[0049] 1) Small RNA들의 길이 분포(length distribution) 확인 및 돼지 유전체(Sscrofa10.2)와의 매칭 확인

[0050] 2) Small RNA들의 identity(rRNAs, tRNAs, snRNAs, snoRNAs, scRNAs, repeat associated RNAs, degraded fragments of mRNA, miRNAs)를 돼지 데이터베이스 (NCBI Ensembl Trace Archive; Rfam: <http://www.rfam.sanger.ac.uk>; BGI (Beijing Genomics Institute) developed programs)에 근거하여 확인

[0051] 3) 인간 마이크로RNA 데이터베이스를 이용한 돼지-인간 보존 마이크로RNA의 추가 선별

[0052] 4) High-throughput sequencing을 통해 확인된 각 샘플의 마이크로RNA read count 확인

[0053] 5) 각 샘플의 마이크로RNA read count의 표준화(normalization)를 통한 대조군(control) 샘플과 각 PCV2의 ORF 발현 샘플간의 발현량 비교 분석

[0054] 6) Fisher's exact test를 통한 대조군(control) 샘플과 각 PCV2의 ORF 발현 샘플간의 발현량 차이에 대한 통계적 유의성 분석

[0055] 7) 상기 5, 6 항목을 동시에 충족하는 마이크로RNA 선별

[0056] 8) 선별된 마이크로RNA의 표적 유전자 분석을 통한 생물학적 기능 및 신호전달체계 분석

[0057] 먼저, 상기 실시예 2에서의 하이-쓰루풋 시퀀싱(high-throughput sequencing)을 통해 대조군(control), ORF1, ORF2, 및 ORF3 샘플에서 확보한 small RNA 염기서열은 각각 4,654,382 read, 5,014,372 read, 5,887,207 read 및 4,565,856 read로 전체 20,121,817 read의 small RNA 염기서열을 확보하였으며, 결과 분석에 사용될 clean read는 평균적으로 high-quality read의 75.55%에 해당하는 15,022,534 read를 확보하였다. 또한, clean read로 length distribution을 실시한 결과, 각 샘플에서 마이크로RNA의 평균 길이에 해당되는 22 nt에서의 peak를 이루고 있음을 확인하였다(도 5 참조). 또한 돼지 데이터베이스를 이용하여, Clean read를 이용하여 각 샘플에서 확보한 small RNA 염기서열의 identity를 조사하였다. 그 결과, 대조군(control), ORF1, ORF2, 및 ORF3 샘플에서 1,205,500 read, 861,472 read, 623,299 read, 및 1,409,182 read의 마이크로RNA를 각각 확보하였다. 이는 전체 분석된 small RNA 중 가장 높은 abundance로 약 27.93% 나타났다. 이상의 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Category	Control		ORF1		ORF2		ORF3	
	Count	%	Count	%	Count	%	Count	%
Raw reads	4,654,382	100.00	5,014,372	100.00	5,887,207	100.00	4,565,856	100.00
Low-quality reads	42,632	0.92	45,864	0.91	57,174	0.97	40,451	0.89
High-quality reads	4,611,750	99.08	4,968,508	99.09	5,830,033	99.03	4,525,405	99.11
High-quality reads	4,611,750	100.00	4,968,508	100.00	5,830,033	100.00	4,525,405	100.00
Clean reads (≥ 18 nucleotides)	3,476,739	75.39	3,604,325	72.54	4,293,063	73.64	3,648,407	80.62
Clean reads	3,476,739	100.00	3,604,325	100.00	4,293,063	100.00	3,648,407	100.00
miRNA	1,205,500	34.67	861,472	23.90	623,299	14.52	1,409,182	38.62
rRNA	698,265	20.08	775,446	21.51	1,568,539	36.54	808,436	22.16
scRNA	4,100	0.12	3,292	0.09	2,835	0.07	2,541	0.07
snRNA	15,446	0.44	12,003	0.33	19,892	0.46	12,971	0.36
snoRNA	16,659	0.48	10,548	0.29	11,925	0.28	11,051	0.30
srpRNA	332	0.01	509	0.01	1,428	0.03	591	0.02
tRNA	186,300	5.36	289,446	8.03	283,870	6.61	192,332	5.27
mRNA	44,231	1.27	48,588	1.35	68,330	1.59	52,302	1.43
Repeat-associated small RNA	8,168	0.23	8,876	0.25	10,357	0.24	9,058	0.25
Unannotated ^a	1,297,738	37.33	1,594,145	44.23	1,702,588	39.66	1,149,943	31.52

^a Sequences do not match any known RNA species.

[0058]

[0059]

상기와 같이 시퀀싱을 통해 모든 샘플에서 분석된 돼지 마이크로RNA는 총 238개로, 현재까지 보고된 돼지 마이크로RNA 319개의 74.61%가 확인되었다. 돼지 마이크로RNA(319개)는 인간(2,555개)과 생쥐(1,890개)에서 보고된 마이크로RNA 보다 현저하게 적다. 대부분의 마이크로RNA는 종간에 보존되어 있다는 점에 근거하여 돼지 마이크로RNA 뿐만 아니라, miRBase에 보고된 인간 마이크로RNA와 비교 분석하여 추가적으로 118개의 돼지 마이크로RNA를 동정하였다. 종합적으로 현재까지 보고된 돼지 마이크로RNA 238개와 돼지-인간 보존 마이크로RNA 118개 등 총 356개의 마이크로RNA를 확인하였다(도 6 참조).

[0060]

PCV2의 각 ORF에 의해 발현량이 변화되는 마이크로RNA를 확인하기 위해 read count를 이용한 분석을 진행하였다. 그 결과, PCV2의 각 ORF 발현에 의해 51개, 74개 및 32개의 마이크로RNA의 발현량이 변화됨을 확인하였다(도 7A 참조).

[0061]

상기 분석 결과를 검증하기 위하여, 발현량이 변화되는 마이크로RNA 중 무작위 선별을 통해 splinted-ligation assay를 진행하였다. 상기 실험에 사용된 bridge oligo를 하기 표 3에 나타내었으며, 그 실험 결과를 도 7에 나타내었다.

표 3

Bridge oligonucleotide	Sequence (5' to 3') ^a
miR-202-5p	GAATGTCATAAGCG <u>AAAGAAGTATATGCATAGGAA</u>
miR-432-5p	GAATGTCATAAGCG <u>ACCCAATGACCTACTCCAAGA</u>
miR-25-3p	GAATCTCATAAGCG <u>TGAGACCGAGACAAGTGCAATG</u>
miR-221-3p	GAATGTCATAAGCG <u>AAACCCAGCAGACAATGTAGCT</u>
miR-151-5p	GAATGTCATAAGCG <u>ACTAGACTGTGAGCTCCTCGA</u>
let-7e	GAATGTCATAAGCG <u>AACTATACAACCTCCTACCTCA</u>
miR-103	GAATGTCATAAGCG <u>TCATAGCCCTGTACAATGCTGCT</u>
miR-139-5p	GAATGTCATAAGCG <u>ACTGGAGACACGTGCACTGTAGA</u>
miR-185	GAATGTCATAAGCG <u>CAGGAAGTGCCTTTCTCTCCA</u>

^a Each of the bridge oligonucleotides contains an identical 5' sequence that is complementary to a common 14-nucleotide detection oligonucleotide. The sequence complementary to a specific miRNA is underlined.

[0062]

[0063] 도 7에 나타난 바와 같이, miR-221-3p(ORF1에 의한 발현 증가), miR-151-5p(ORF1에 의한 발현 감소), let-7e(ORF2에 의한 발현 감소), miR-103(ORF2에 의한 발현 감소), miR-139-5p(ORF2에 의한 발현 감소) 및 miR-185(ORF2 및 ORF3에 의한 발현 감소)의 발현 변화를 실험적으로 검증하였다.

[0064] 실시예 4: PCV2 감염 저항성 연관 후보 마이크로RNA 선별

[0065] 상기 실시예 3에서 선별한 PCV2의 각 ORF의 발현에 의해 발현량이 변화하는 마이크로RNA들 중 PCV2 감염 저항성과 연관된 마이크로RNA의 선별을 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0066] 먼저, 상기 실시예 3에서 선별한 PCV2의 각 ORF에 의해 조절되는 마이크로RNA의 생물학적 역할을 조사하기 위하여, 마이크로RNA의 후보 표적 유전자들을 확인하였다. 현재까지 알려진 마이크로RNA-표적 유전자 예측 프로그램들은 많이 존재하지만, 사용되는 분석 기준에 따라 표적 유전자들이 상당히 다양하게 예측되는 실정이다. 이에 본 연구에서는 11개의 표적 유전자 예측 프로그램을 통합 분석해주는 miRecords 프로그램을 이용하였으며, 발현량이 변화하는 마이크로RNA가 5개 이상의 프로그램에서 확인되는 후보 표적 유전자만을 선택하였다. 그 결과, PCV2의 ORF1, ORF2 및 ORF3에 의해 발현이 증가되는 마이크로RNA의 표적 유전자는 각각 1,816, 1,286, 및 1,930개로 확인되었으며, 발현이 감소되는 마이크로RNA의 표적 유전자는 각각 1,245, 2,261, 및 91개가 확인되었다.

[0067] 또한, PCV2의 viral 단백질과 상호작용(interaction)하는 단백질은 PCV2의 감염 및 PMWS 질병 유발에 관련할 것으로 판단되기에, PCV2의 각 ORF와 상호작용하는 단백질을 문헌조사를 통해 확인하였으며(Tim et al., 2009, Liu et al., 2007, Timmusk et al., 2006), 이를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

Viral protein	Cellular interacting protein	Ontology of cellular protein	Identified by
Rep protein	Syncoilin	Transport processes	Bacterial two-hybrid
	c-myc	Transcriptional regulation	Bacterial two-hybrid
	ZNF265	Alternative splicing	Yeast two-hybrid
	TDG	DNA repair<comma> transcriptional regulation	Yeast two-hybrid
Cap protein	VGSQ	Angiogenesis	Yeast two-hybrid
	P-selectin	Cell adhesion molecule	Bacterial two-hybrid
	C1qB	Complement factor	Bacterial two-hybrid
	gC1qR	C1qb receptor<comma> multifunctional	Yeast two-hybrid
	MKRN1	E3 ubiquitin ligase	Yeast two-hybrid
	Par-4	Apoptosis<comma> cell mobility<comma> transport	Yeast two-hybrid
	NAP1	Transport<comma> chaperonin	Yeast two-hybrid
	Hsp40	Chaperonin	Yeast two-hybrid
	NPM1	Ribosome biogenesis<comma> transport	Yeast two-hybrid
ORF3 protein	DDE-like transposase	Transposase	Bacterial two-hybrid
	Membrane interacting protein RGS16	Cell signalling	Bacterial two-hybrid
	pPirh2	E3 ubiquitin ligase<comma> p53-induced apoptosis	Yeast two-hybrid

<Virology 386, 122>

[0068]

[0069] 최종적으로, PCV2의 ORF에 의해 발현이 조절되는 마이크로RNA의 후보 표적 유전자 중, PCV2 ORF1과 ORF3에 각각 상호작용하는 ZNF265(zinc finger protein 265)와 RGS16(regulator of G protein signaling 16)이 확인되었다. 돼지 ZNF265 3' UTR(3' untranslated region)은 miR-139-5p가 표적할 수 있는 염기서열을 포함하고 있으며, 돼지 RGS16 3' UTR은 let-7 family인 let-7b-5p, let-7c 및 let-7e가 표적할 수 있는 염기서열을 포함하고 있다. 따라서, 마이크로RNA-표적 유전자 염기서열로부터 결합(binding)을 예측해볼 수 있는 RNAhybrid(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) (Marc et al. 2004)를 이용하여 상기 마이크로RNA의 표적 유전자 발현 조절 가능성을 판단하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

Putative target gene	miRNA	miRNA-mRNA interaction	ΔG (kcal/mol)
ZNF265	miR-139-5p	target 5' AGGAA--AUGAU-GCUGUAGAC 3'	-20.20
		miRNA 3' GACCUCUGUGCACGUGACAUCU 5'	
RGS16	let-7b-5p	target 5' GAGCUGGCAGCCUGACUGGCUCC 3'	-28.00
		miRNA 3' UUGGUGUGUUGGA-UGAUGGAGU 5'	
	let-7c	target 5' GAGCUG-GCAGCCUGACUGGCUCC 3'	-24.20
		miRNA 3' UUGGUAUGUUGGA-UGAUGGAGU 5'	
	let-7e	target 5' GAGCUG-GCAGCCUGACUGGCUCC 3'	-24.20
		miRNA 3' UUGAUUGUUGGAG-GAUGGAGU 5'	

[0070]

[0071] 실시예 5: miR-139-5p 및 let-7에 의한 PCV2 감염 저항성 연관 유전자 발현조절 분석

[0072] 상기 실시예 4에서 선별한 마이크로RNA인 miR-139-5p 및 let-7에 의한 PCV2 감염 저항성 연관 유전자 발현조절을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0073] 먼저, PCV2의 ORF2에 의해 발현이 감소하는 miR-139-5p가 ZNF265 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, wild-type 또는 mutated ZNF265 3' UTR 염기서열을 지닌 Renilla-luciferase reporter를 제작하여(도 8A 참조), Dual-luciferase assay를 수행하였다. 실험에 이용된 프라이머 서열을 상기 표 1(실시예 1 참조)에 나타내었으며, 그 결과를 도 8B에 나타내었다.

[0074] 도 8B에 나타난 바와 같이, wild-type ZNF265 3' UTR 연관 RL activity가 PCV2 ORF2 과발현 PK15 세포에서는 약 43% 증가됨을 확인하였으며(도 8B의 왼쪽 검은색 바 참조), miR-139-5p를 과발현 시킨 세포에서는 약 27% 감소됨을 확인하였다(도 8B의 오른쪽 검은색 바 참조). 반면 mutated ZNF265 3' UTR을 도입했을 때는 Renilla-luciferase activity의 변화를 확인할 수 없었다(도 8B의 회색 바 참조). 상기 결과를 통하여, PCV2 감염 저항성 연관 유전자인 ZNF265가 miR-139-5p에 의해 조절됨을 확인하였다.

[0075] 다음으로, PCV2의 ORF2에 의해 발현이 감소하는 let-7e가 RGS16 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, ORF2 또는 let-7e가 과발현된 세포에서 웨스턴 블랏 및 RT-PCR을 수행하였다. 이 때, let 패밀리 중 let-7c는 시퀀싱 결과 abundance가 너무 낮았으며, let-7b-5p 역시 let-7e에 비해 abundance가 상당히 낮아 let-7e를 선택하였다. 그 결과를 도 8C 및 도 8D에 나타내었다.

[0076] 도 8C에 나타난 바와 같이, 웨스턴 블랏을 통해 ORF2가 과발현된 세포에서 RGS16 단백질 발현이 2배 이상 증가됨을 확인하였으며(도 8C의 1번 및 3번 라인 참조), let-7e를 과발현한 세포에서는 RGS16 단백질 발현이 대조군에 비해 약 24% 감소함을 확인하였다(도 8C의 1번 및 2번; 3번 및 4번 라인 참조). 하지만 RT-PCR 분석 결과, 각 세포에서 RGS16 mRNA 발현양에는 변화가 없는 것을 확인하였다(도 8D 참조).

[0077] 상기 결과는 let-7e가 RGS16의 번역(translation) 억제를 통해 발현 조절 되고 있을 가능성을 제시한다. 이를 검증하기 위하여, RGS16 3' UTR 염기서열을 지닌 Renilla-luciferase reporter를 제작하여 Dual-luciferase assay를 수행하였다. 실험에 이용된 프라이머 서열을 상기 표 1(실시예 1 참조)에 나타내었으며, 그 결과를 도 8E에 나타내었다.

[0078] 도 8E에 나타난 바와 같이, RGS16 3' UTR 연관 RL activity가 PCV2 ORF2 과발현 PK15 세포에서는 약 54% 증가됨을 확인하였으며(도 8E의 왼쪽 그래프 참조), let-7e를 과발현 시킨 세포에서는 약 38% 감소함을 확인하였다(도 8E의 오른쪽 그래프 참조). 상기 결과를 통하여, PCV2 감염 저항성 연관 유전자인 RGS16이 let-7e에 의해 조절됨을 확인하였다.

[0079] 실시예 6: miR-139-5p 및 let-7e에 의한 PCV2 감염 저항성 조절 분석

[0080] 상기에서 분석한 내용을 토대로 선별한 miR-139-5p 및 let-7e에 의한 PCV2 감염 저항성을 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0081] 먼저, PCV2 ORF2에 의해 발현이 감소하는 miR-139-5p 및 let-7e의 발현증가를 위해 상기 실시예 5에서 사용한 과발현 벡터를 PK-15 세포에 각각 처리한 후, 정제된 PCV2를 처리하여 감염을 유도하였다. PCV2 감염 저항성을 확인하기 위하여 각 PK-15 세포의 RNA를 분리하였고, 역전사 (reverse transcription) 반응을 통해 cDNA 합성을 유도하였다. 그 후 PCV2의 각 ORF 발현을 RT-PCR을 통해 확인하였다. 실험에 이용된 프라이머 서열을 상기 표 1(실시예 1 참조)에 나타내었으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

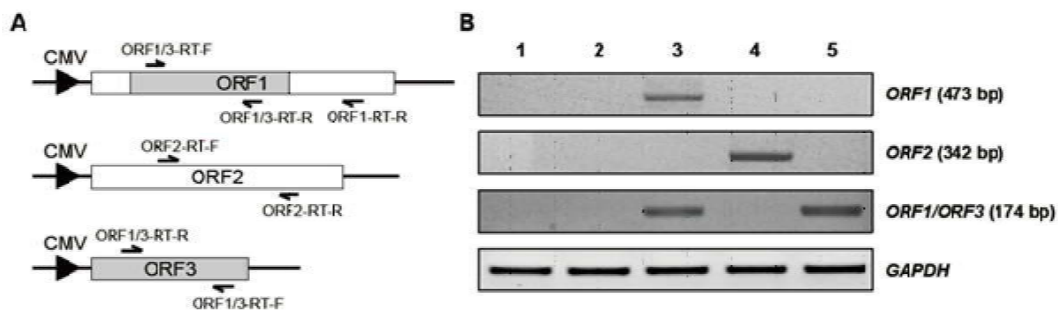
[0082] 도 9에 나타난 바와 같이, let-7e가 과발현된 세포에서는 PCV2 감염 시 PCV2의 각 ORF 발현이 감소하거나 거의 발현되지 않았으며(도 9의 세 번째 레인 참조), miR-139-5p가 과발현된 세포에서도 PCV2의 ORF2를 제외한 ORF1과 ORF3의 발현이 감소하거나 거의 발현되지 않음을 확인하였다 (도 9의 네 번째 레인 참조). 즉, miR-139-5p 및 let-7e의 발현 조절을 통해 PCV2 감염 저항성이 유도됨을 확인하였다.

[0083] 따라서, miR-139-5p 및 let-7e는 PCV2 감염 저항성 연관 유전자의 발현을 조절하여 PCV2의 감염성을 저하시키는 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다.

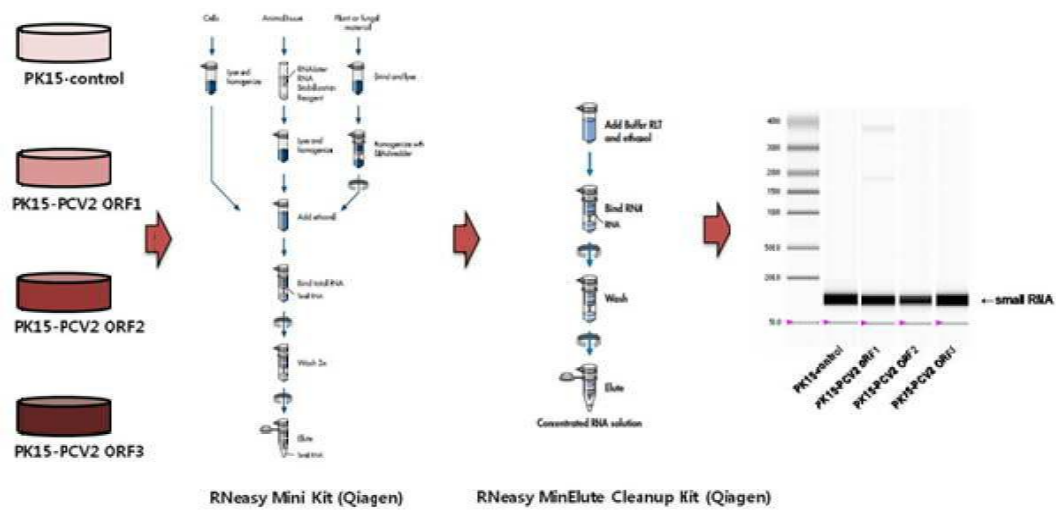
[0084] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

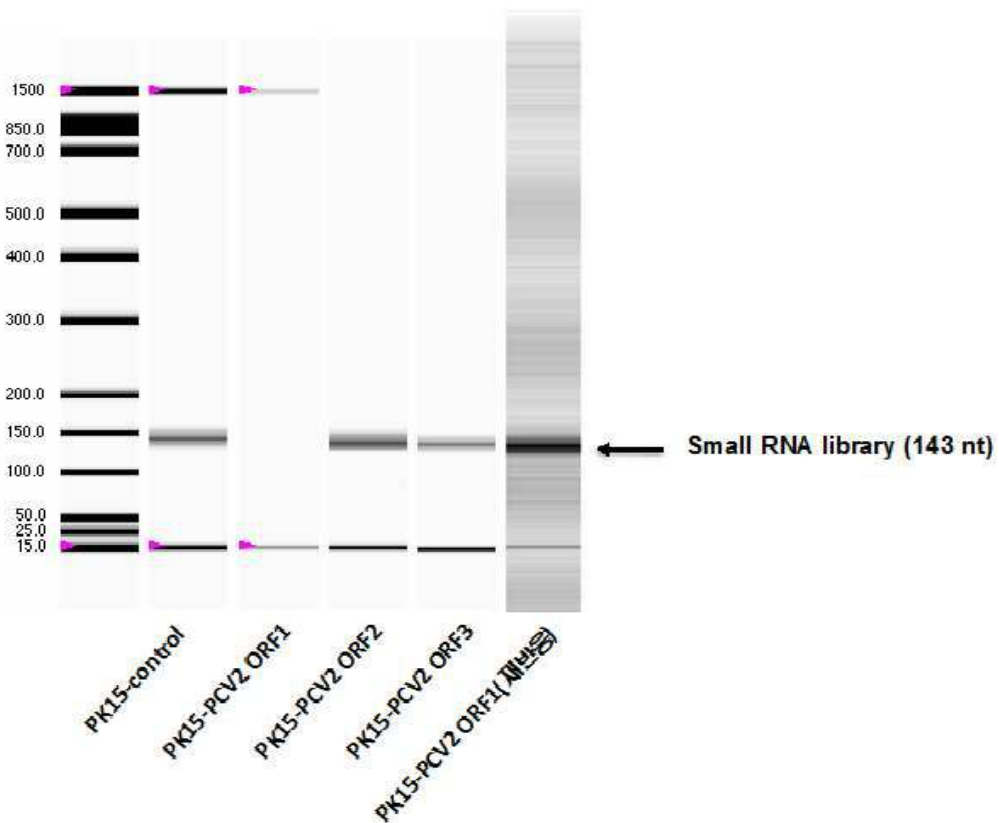
도면1



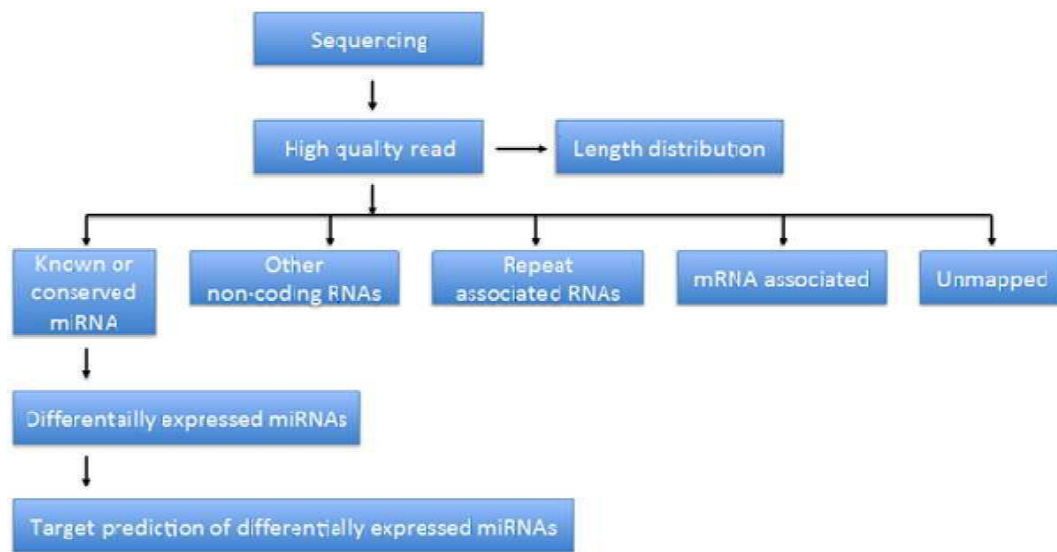
도면2



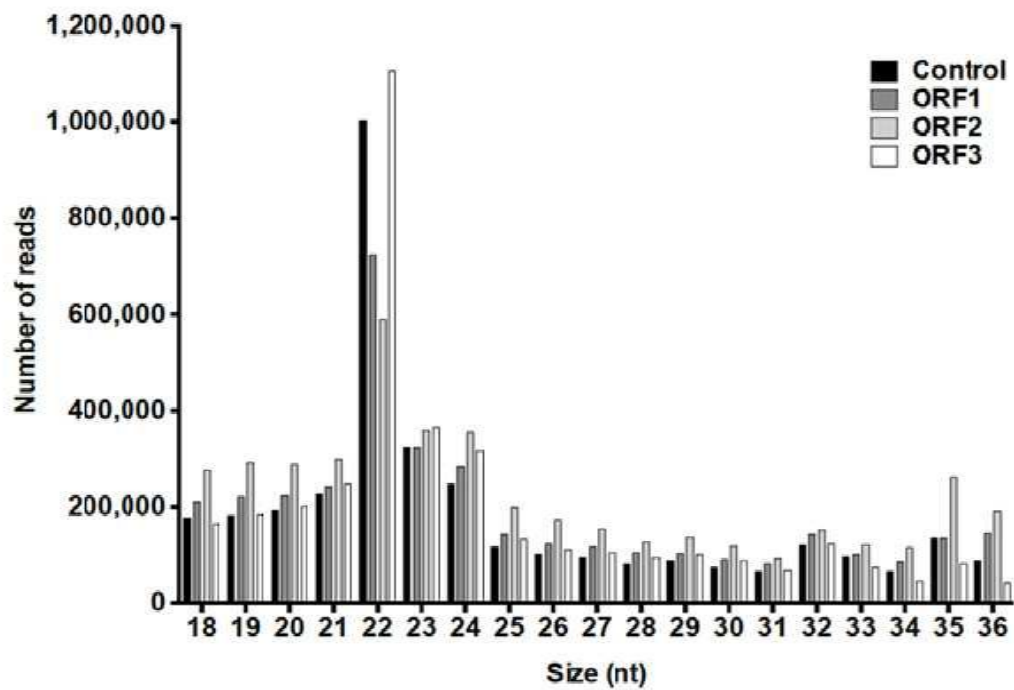
도면3



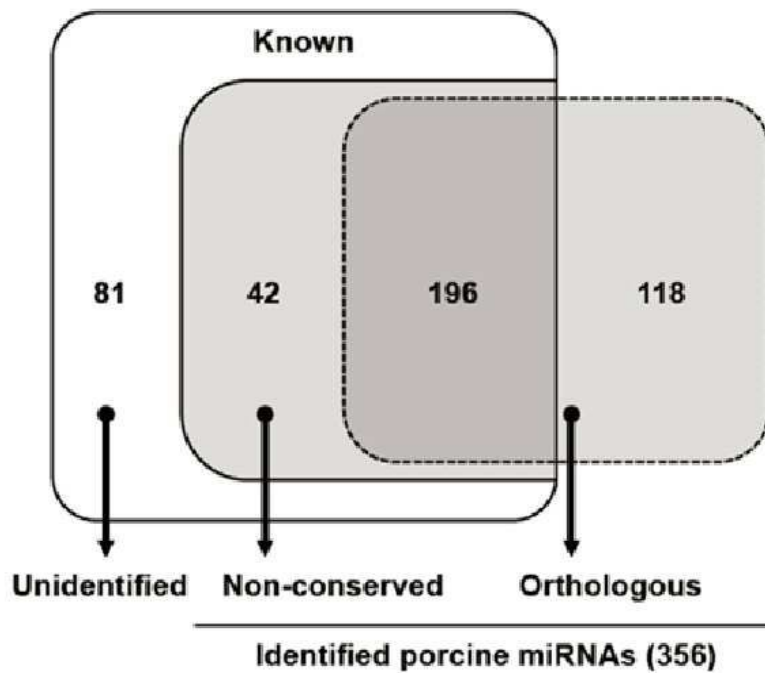
도면4



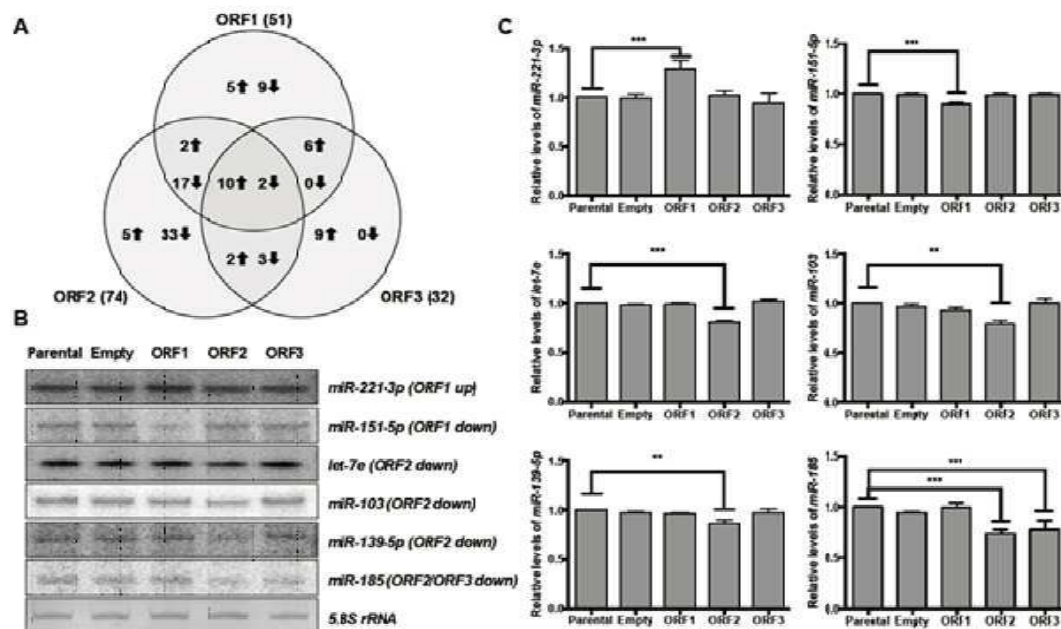
도면5



도면6



도면7



<210>	1	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	miR-139-5p	
<400>	1	
	ucuacagugc acgugucucc ag	22
<210>	2	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	let-7e	
<400>	2	
	ugagguagga gguuguauag uu	22