



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/28 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0039263

(43) 공개일자 2007년04월11일

(21) 출원번호 10-2005-0094398

(22) 출원일자 2005년10월07일

심사청구일자 2005년10월07일

(71) 출원인 충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자 김군언
대전 서구 둔산동 목련아파트 203-1302
김기광
충남 청양군 장평면 죽림리 219

(74) 대리인 윤여강
이문섭
양부현

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 암 발생을 억제하기 위한 GW112 유전자 및 이를 이용한항암제 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 암 발생을 억제하기 위한 GW112 유전자 및 이를 이용한 항암제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 암의 발생을 억제하기 위한 단리된 GW112 유전자, 이의 폴리펩타이드, 상기 유전자를 포함하는 벡터를 제공하며, 이들 을 이용한 암발생 억제물질 스크리닝 방법 및, 상기 스크리닝 방법에 의해 얻어진 암 발생 억제 물질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

대표도

도 3

특허청구의 범위

청구항 1.

하기와 같이 구성된 그룹으로서 선택되는 암의 발생을 억제하기 위한 단리된 유전자;

(a) 서열번호 1로 표시되는 DNA 서열을 갖는 GW112 유전자; 또는

(b) 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 GW112 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 2.

암의 발생을 억제하기 위한 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 GW112 폴리펩타이드.

청구항 3.

암의 발생을 억제하기 위한 제 1 항에 따른 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 4.

서열번호 1로 표시되는 GW112 DNA 서열로부터 만들어진 mRNA의 일부에 상보적으로 결합하여, GW112 유전자의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 암의 발생을 억제하기 위한 GW112 유전자 활성 억제 siRNA.

청구항 5.

GW112 유전자의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암제 스크린 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

아폽토시스(apoptosis)는 생물계의 항상성의 유지 및 발달에서 기본적인 과정이다. 이것은 다수체 생물에서 원하지 않은 세포를 제거하기 위해서 일반적으로 개시되어지는 매우 엄격하게 조절되어지는 과정이다. 이 과정으로부터의 이탈은 여러 가지의 병리학적인 상태, 즉 암, 신경퇴화질환, 자가면역질환 및 바이러스 감염을 일으킨다. 아폽토시스는 암발생에서 주요한 역할을 하는데, 보통의 포유동물 세포가 암세포화 하기 위해서는 이 과정을 통과하여야 하기 때문이다. 아폽토시스의 조절 유전자의 결핍은 종양성의 세포의 증가를 가져온다. 때문에 암세포에서 아폽토시스에 의한 조절은 생물학적으로 그리고 임상적으로 매우 중요하다.

GW112 유전자는 처음에는 인간의 골수모구(myeloblasts)에서 클론되었다. 그러나 이들의 기능과 구조에 대해서는 거의 알려져 있지 않다.

GW112는 다른 유전자와 거의 상동성이 없는 신규한 유전자이다. 이 유전자는 여러 인간의 종양 타입, 특히 소화기 관련에서 과량 발현이 된다. 지항(Zhang)등에 의해서 이들 유전자가 GRIM-19 단백질과 관련되어 있음을 보였다. 이 GRIM-19 단백질은 세포의 아폽토시스를 조절하는 단백질로 알려져 있다. 지항 등은 GW112 단백질이 GRIM19의 활성을 떨어뜨리게 하여 망막의 산성-IFN β 매개 세포 아폽토시스가 일어나지 않게하고, 아폽토시스 관련 유전자의 발현을 떨어뜨릴 것으로 보았다. 또한 GW112 유전자를 강제적으로 과량발현 시켰을 경우에 쥐의 전립선 암이 더욱 빨리 발생되는 것을 보았다.

그러나, 지항 등에 의해서는 GW112 유전자의 과다발현이 종양의 아폽토시스를 억제하여 종양을 많이 일으킨다는 것만 보고되어졌으나, 이 유전자를 억제하였을 경우에 암세포의 발생을 억제할 수 있다는 것에 대하여서는 어떤 추측이나 예시적인 데이터가 없다.

본 발명자들은 GW112 유전자의 발현을 억제하는 경우에 아폽토시스가 많이 일어남을 보고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 암발생을 억제하는 GW112 유전자 및 이로부터 발현되는 폴리펩타이드의 특성을 규명하고, 신규의 항암제 스크린 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명은 암발생을 억제하기 위한 GW112 유전자 또는 이의 단백질을 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

본 발명은 암발생을 억제하기 위한 GW112 폴리펩타이드에 관한 것이다.

본 발명은 암발생을 억제하기 위한 상기 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

본 발명은 GW112 유전자의 활성을 억제하여 암발생을 억제하는 siRNA에 관한 것이다.

본 발명은 GW112 유전자의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암제 스크린 방법에 관한 것이다.

제 1 양태로, 본 발명은 암발생을 억제하기 위한 단리된 핵산서열을 제공한다. 상기 핵산 서열은 GW112로 지칭된 DNA 및 RNA 서열이다. 상기 핵산서열들은 구체적으로 서열번호 1로 표시되는 GW112이다.

상기 "핵산서열"이란 용어는 암발생을 억제하는 GW112 천연의 mRNA, 그에 상보적인 cDNA 및 이에 등가의 핵산서열을 포함한다.

"등가의 핵산서열"에는 본 명세서에서 제공하는 서열과 알릴(allelic)변형에 의한 서열, 종(species)간의 변이에 의한 서열 또는 코돈 축퇴성 서열을 포함한다.

"코돈 축퇴성 서열"이란 상기 자연 발생의 서열과는 상이하나 본 발명에 개시된 자연 발생이 GW112 폴리펩타이드와 동일한 서열의 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산서열을 의미한다.

"알릴(allelic) 변형에 의한 서열" 또는 "종(species)간 변형에 의한 서열"은 상기 자연 발생의 핵산서열과는 상이하나 본 명세서에 개시된 상기 폴리펩타이드들과 실질적으로 동일한 기능적 성질을 보유하는 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 의미한다.

제 2 양태로, 본 발명은 암발생을 억제하기 위한 서열번호 2의 폴리펩타이드를 제공한다.

본 명세서에 사용된 "GW112 폴리펩타이드"는 조혈성 과립백혈구 콜로니-형성 인자(G-CSF) 유도 올팩토메딘(olfactomedin)관련 당단백질이다. 이것은 예전에는 hGC-1 (human G-CSF-stimulated clone-1)이라 불렸었다. GW112의 2862 염기쌍의 cDNA 클론은 1530 뉴클레오타이드의 오픈 리딩 프레임에 가지고 있으며, 번역되어져서 510개 아미노산의 단백질이 된다. 이 단백질에는 시그널 펩타이드와 6개의 N-연결 당화되는 모티프를 가지고 있다. 이 유전자는 전립선, 소장, 그리고 대장에서 강하게 발현이 되고, 골수와 복부에서 약간 발현이 되고, 다른 조직들에서는 관측되어지지 않는다.

본 발명의 정의상 GW112 폴리펩타이드의 "기능적 동등물"이란 천연형 GW112 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. 본 발명의 기능적 동등물에는 천연형 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 GW112의 생리활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다.

"기능적 유도체"는 상기 GW112 폴리펩타이드의 단편, 상기 단편을 포함하는 단백질, 또는 단백질의 물리화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질을 말한다. "단편"이란 용어는 단백질의 일부에 해당하는 아미노산 서열로서, 본 발명의 범위내에서 속하는 공통의 기원 요소, 구조 및 작용 메커니즘을 가진 것을 말한다. GW112 폴리펩타이드의

안정성, 저장성, 용해도 등을 변경시키기 위한 변형 또는 예를 들어 GW112와 상호 작용하는 물질과의 관계를 변경시키기 위해 변형을 가한 유도체도 본 발명의 범위에 포함된다. 상기와 같은 단백질의 기능적 유도체를 만드는 방법은 공지되어 있다.

본 발명은 제 3 양태로는 암발생 억제제를 위한 GW112 폴리펩타이드를 코딩하는 분리된 DNA 분절 및 이를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

본 발명은 상기 GW112 폴리펩타이드를 코딩하는 분리된 DNA 분절을 제공한다. 상기 "DNA 분절"에는 서열번호 1, 및 서열번호 2로 표시되는 GW112 폴리펩타이드, 그의 기능적 동등물 및 기능적 유도체를 코딩하는 서열이 포함된다. 나아가, 본 발명은 상기 DNA 분절을 포함하는 각종 벡터, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 파지, 바이러스 등의 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터를 만드는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

본 발명의 제 4 양태로서, 본 발명은 GW112 유전자의 활성을 억제하는 물질을 포함하는 암발생 억제 조성물에 관한 것이다. 상기 GW112 유전자의 활성을 억제하는 물질은 GW112 siRNA 유전자 또는 GW112 siRNA 유전자를 포함하는 발현 벡터가 될 수 있다.

본 발명의 제 5 양태로서, GW112 유전자의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암제 스크린 방법에 관한 것이다.

GW112 유전자를 포함하고 있는 세포주를 배양하는 단계;

항암후보 물질을 상기 세포에 처리하는 단계;

GW112의 유전자의 발현정도를 측정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 항암제 스크린 방법에 관한 것이다.

세포내에서 GW112 유전자의 발현을 확인하는 방법은 리포터 유전자를 이용하여 할 수 있다. 리포터 유전자는 특정한 유전자로 제한되지 않는다. 용이하게 측정할 수 있는 생성물을 발현하는 어떠한 유전자라도 이용되어질 수 있다. 적합한 리포터 유전자는 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 리포터 유전자의 예로는 CAT(클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제), 루시페라아제, 베타-갈락토시다아제와 같은 다른 효소검출시스템; 세균성 루시페라아제, 알칼리성 포스파타제 및 녹색형광물질(GFP)이 포함되나 이들로 제한되는 것은 아니다. 리포터 유전자의 검출은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 리포터 유전자가 그의 효소활성에 의해 검출되는 경우에는, 일반적으로 효소를 그의 적절한 기질과 함께 제공하고, 반응생성물(예를 들어 루시페라아제에 의해 생성된 빛)을 검출하는 단계를 포함한다. 검출은 리포터 유전자 생성물의 존재 또는 부재를 간단히 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 또 다른 방법으로는 리포터 유전자 생성물의 발현 레벨의 정량화를 포함할 수도 있다. 정량화하는 방법은 절대적 정량화일 수 있거나, 하우스키핑 유전자의 발현 레벨에 비교하여 정량화 할 수 있다. 이러한 검출은 수동으로 수행될 수 있거나, 고처리량(high-throughput)선별 시스템에서와 같이 자동으로 수행될 수 있다.

유전자 발현의 존재, 부재 또는 정량화에 대한 고처리량 시험방법은 본 기술분야에서 숙련된 전문가에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국특허 제 5,559,410호에는 단백질에 대한 고처리량 선별방법이 기술되어 있고, 미국 특허 제 5,585,635호에는 핵산결합에 대한 고처리량 선별방법이 기술되어 있다. 또한 미국특허 제 5,576,220호 및 5,541,061호에는 리간드/항체 결합에 대한 고처리량 선별 방법이 기술되어 있다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것이 아니다.

<실시예 1>

(1) 재료 및 방법

1) 세포배양과 시약

AGS 세포를 10% 열 비활성화 우태아혈청(FBS), 100 u

nits/ml 페니실린, 100 g/ml 스트렙토마이신 및 0.1 g/ml 퓨로마이신을 함유하는 RPMI 1640 배지(Gibco BRL, CA, USA)로 37°C, CO₂ 배양기 내에서 배양하였다.

293 세포를 10% 열 비활성화 우태아혈청(FBS), 100

units/ml 페니실린 및 100 g/ml 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 배지(Gibco BRL, CA, USA)로 37°C, CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. MG132(Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) 및 TNF α 는 칼바이오캠(Calbiochem, San Diego, CA)에서 구입하였다. H₂O₂는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)에서 구입하였다. Z-VAD-fmk (pan-카스파제 억제제), DEVD (카스파제-3 억제제), Z-IETD (카스파제-8 억제제) 및 Z-LEHD (카스파제-9 억제제)는 비디 파미젠(BD Pharmingen, San Diego, CA)에서 구입하였다.

PARP-1, IAP-1, 2 및 카스파제-3, 8, 9에 대한 항체들은 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)에서 구입하였다. 항-Bax 및 Bcl-2 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA)에서 구입하였고, 항- α -튜불린 항체는 시그마-알드리치에서 구입하였다. HRP가 결합된 항-생쥐 및 토끼 Ig 항체는 시그마-알드리치에서 구입하였다. HRP가 결합된 항-염소 Ig 항체는 잭슨 이뮤노리서치 레보러토리(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)에서 구입하였다.

심바스타틴(Simvastatin, Zocor)는 에스엠디 코리아(SMD Korea, Ansan, Korea)에서 구입하였다. 심바스타틴을 100% 에탄올에 용해시켜 -20°C에서 보관하였다.

2) GW112 녹-다운 세포주 확립

헤어핀 siRNA 주형 올리고뉴클레오티드는 온라인 디자인 소프트웨어(www.ambion.com)

)를 사용하여 디자인 하였다. 본 발명에서 센스 서열은 5'-GATC CCCG GAAT TCAC AGCT CATG TTCT CGAA AGAA CATG AGCT GTGA ATTC CTTT TTA-3' 이고(서열번호 3), 안티센스 서열은 5'-AGCT TAAA AAGG AATT CACA GCTC ATGT TCTT TCGA GAAC ATGA GCTG TGAA TTCC GGG-3' 이며(서열번호 4), 본 센스 가닥과 안티센스 가닥을 헤어핀 siRNA 주형 인서트를 형성하기 위하여 융합시켰다. 융합된 siRNA 주형 인서트를 pSUPER 레트로 벡터에 클로닝하고 DNA 시퀀싱으로 확인하였다. 상기 클론을 AGS 세포에서 퓨로마이신 선별을 사용하여 안정적으로 확립하였다. 상기 형질감염된 세포를 5일 동안 퓨로마이신(5g/ml)에 의해 선별하였고, 퓨로마이신(0.1g/ml)을 사용하여 보관하였다.

3) 세포 생존율의 측정

wt AGS 및 AGS-K3 세포(5X10⁴/well)를 심바스타틴 처리 하루전에 96 웰 배양접시 내의 200 μ l의 배지에 접종하였다. 12시간 배양후에 MG132, H₂O₂ 및 TNF α 를 도면에 명시된 농도대로 처리하였다. 생존 세포의 상대적인 양을 측정하기 위하여 10 μ l 의 2 mg/ml 3-[4, 5-디메틸치아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드 {3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, MTT} 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. 37°에서 4시간 배양후에 배양 상층액을 500g에서 3분 동안 원심분리하여 제거하였고, 결정화된 보라색 생성물을 0.1 % 이소프로판올/염산 용액을 첨가하여 용해시켰다. 상대 흡광도를 570 nm에서 모델 550 엘리자 리더(Model 550 ELISA reader, Bio-rad, Hercules, CA)를 사용하여 측정하였다.

4) 지노믹 DNA 분해

지노믹 DNA는 지노믹 DNA 추출 키트(genomic DNA extraction kit, Intron, Suwon, Korea)를 사용하여 wt AGS 및 AGS-K3 세포로부터 획득하였다. 2X10⁵ 세포의 동등물로부터의 DNA 알리쿼트(aliquot)를 1.2% 아가로스겔 위에 용해시켰다. DNA를 UV 투과조명법에 의해 시각화하였다.

5) RT-PCR 분석

총 RNA 추출은 TRIzol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 분리하였다. 약 2g의 총 RNA를 몰로니 뮤린 류케미아 바이러스[moloney murine leukemia virus (MMLV)] 역전사 효소 및 올리고-dT 프라이머(Promega, Madison, WI)를 사용하여 42°C에서 4시간동안 역전사 시켰다. 합성 cDNA를 위한 반정량적 PCR을 택 폴리머라제 프레-믹스처(Taq polymerase pre-mixture, TAKARA, Japan)를 사용하여 수행하였다. RT-PCR 생성물을 1% 아가로스겔 상의 전기영동에 주입하였고 에티디움 브로마이드로 염색하였다.

정량적 실시간 PCR 은 로터 진 2000(a Rotor Gene 2000, Corbett Research, Sydney, Australia) 및 제조자의 설명에 따른 SYBR Green I 반응(Qiagen, Hilden, Germany) 으로 실시하였다. PCR은 다음의 프라이머 쌍: GW112센스 5'-GAATCTTCTACCTCATAACTTCCT-3'(서열번호 5), GW112안티센스 5'-GCAACAACCTGATAACTCATAAGT-3'(서열번호 6), SPARC센스 5'-CAAGAAGCCCTGCCTGATGAG-3'(서열번호 7), SPARC안티센스 5'-GGGGTCCTGGCACACGCACAT-3'(서열번호 8), Bax 센스 5'-ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC-3'(서열번호 9), Bax안티센스 5'-ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC-3'(서열번호 10), Bcl-2센스 5'-TGCACCTGACGCCCTTCAC-3'(서열번호 11), Bcl-2안티센스 5'-AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG-3

'(서열번호 12) 및 β -actin 센스 5

'-

TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3

'(서열번호 13), β -actin 안티센스 5

'-

CAGCGGAACCGCTCATGCCAATGG-3'(서열번호 14)과 함께 수행하였다.

6) 면역이적법(immunoblot) 분석

wt AGS 및 AGS-K3 세포는 차가운 PBS로 세척하였고, 프로테아제 억제제(Complete; Roche Molecular Biochemicals)가 첨가된 라이시스 버퍼(1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Hcl (pH 7.4), 5 mM EDTA, 1 mM PMSF) 에 현탁하였다. 30g의 단백질을 SDS-PAGE에 주입하였고 PVDF 막(Millipore, USA)에 전이시켰다. 5% 탈지 우유로 블로킹한 후에 본 발명의 막을 항-카스파제-3, 8, 9(1:1000), 항-PARP(1:500), 항-Bax, Bcl2(1:500) 및 항- α -튜불린(1:2000) 1차 항체 및 이에 따른 2차 항체로 면역검출하였다. 면역 염색된 블롯의 현상을 위하여 화학발광 기질(Pierce, Rockford, IL)을 암조건에서 사용하였다.

7) 카스파제-3 활성 측정

모든 실험은 카스파제 형광 측정 키트(Peptron, Daejeon, Korea)를 사용하여 수행하였고 실험순서는 제조자의 설명에 따라서 수행하였다.

간단히 설명하면 wt AGS 및 AGS-K3 세포($1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ /tube)를 최고속도에서 3분동안 미량원심분리 후에 얼음위에서 10분 동안 라이시스 버퍼에 현탁하였다. 상층액을 37°C에서 1시간동안 준비된 카스파제-3 기질과 혼합하였다. 형광의 강도는 빅터 형광발광측정기 (VICTOR fluoroluminometer, PerkinElmer, Wellesley, MA)를 이용하여 360nm 여기상태에서 460nm로 검출되었다. 형광 능력 검출을 위한 측정 대조구는 제조자로부터 공급된 카스파제-3 억제제를 첨가하여 준비하였다.

8) sub-G₀ DNA 함량 및 세포 주기 분포의 측정을 위한 흐름세포측정(flow cytometry)

세포(1×10^6 /ml)를 수확한 후 600g에서 4분 동안 얼음처럼 차가운 PBS 로 두 번 세척하였다. 그런 후, 세포를 얼음처럼 차가운 70% 에탄올로 4°C에서 밤새도록 고정하였다. 고정된 세포를 두 번 세척한 후, 37°C에서 1시간 동안 50 g/ml RNase를 함유한 500 g/ml 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide, PI) 용액과 혼합하였다. 흐름세포측정 분석은 FACSCalibur(Becton-Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 수행하였다. 형광세포의 여기(excitation)를 위하여 488nm

아르곤 레이저를 사용하였고, 세포 크기 및 입도(granularity)의 분석을 위하여 포워드 스캐터(forward scatter, FSC) 및 오쏘고날 사이드 스캐터(orthogonal side scatter, SSC)를 사용하였다. 세포 주기 분포 및 sub-G₀ DNA 함량의 분석을 위하여 FL-2 검출기를 사용하였고, FL-2 구역 (FL2-A) 및 폭(FL2-W)의 범위에서 분석하였다.

모든 자료는 FACS 소프트웨어, 셀 퀘스트(FACS software, Cell Quest, Becton-Dickinson)를 사용하여 계산하고 도시하였다.

9) 플라스미드 및 일과성 형질감염

wt AGS 및 AGS-K3 세포를 이전에 보고된(Song SB, Rhee M, Roberson MS, Maurer RA, Kim KE 2003) PEI 테크닉에 의하여 형질감염시켰다. 루시페라제 검출은 전에 기재된 방법으로(Song SB, Rhee M, Roberson MS, Maurer RA, Kim KE 2003), 표준 프로토콜에 따라 LB 953 오토루멧(LB 953 Autolumat, EG&G Berthold, Nashua, NH)을 사용하여 수행하였다.

β -갈락토시다제 활성은 표준 프로토콜에 따라 색측정법으로 분석하였다. 루시페라제 활성을 RSV- β -갈락토시다제의 발현을 위하여 표준화하였다. PCR 방법으로 pEGFP-N1에서 본 발명의 GW112 을 구축하였다. AGS 총 cDNA를 주형으로 하여 Kpn I 및 Nhe I 링커를 함유하는 프라이머로 PCR을 수행하였다. Ig-kB-luc 플라스미드(Hong, S. Y., Yoon, W. H., Park, J. H., Kang, S. G., Ahn, J. H., and Lee, T. H. (2000)) 는 Dr. Tae H. Lee (Yonsei University, Seoul, Korea) 로부터 공급받았다.

(2) 결과

GW112 발현을 억제하는 RNA 간섭의 잠재적 유용성을 밝혀내기 위하여 그리고 AGS

인간 소화기 암세포주의 아폽토시스에 대한 RNA 간섭의 효과를 밝혀 이를 암치료에 이용하기 위하여 본 발명을 수행하였다. 먼저, GW112에 특이한 작은 간섭 RNA를 만들기 위하여 올리고들을 디자인하고 H1 프로모터에 기초한 pSuper 벡터에 서브클로닝 하였다.

상기 구축물로 안정적으로 형질감염된 AGS 세포에서, GW112 발현은 원래수준에 비하여 20%정도로 억제되었다. 본 발명의 GW112 녹다운 세포는 증가된 아폽토시스 정도를 보이면서 여러 아폽토틱 신호에 더 감수성인 것으로 나타났다. MG132 또는 H₂O₂로 아폽토시스가 야기되었을 때, 카스파제-3 활성 및 Bax 발현 모두 본 발명의 녹다운 세포에서 증가하였다. 더구나, 세포내부의 카스파제 억제제인 IAP1 및 IAP2의 발현이 본 발명의 녹다운 세포에서 0.4 폴드(fold) 정도 감소되었다. 종합하여 볼 때, 이러한 결과들은 GW112의 항-아폽토시스 기능이 카스파제 활성화에 의존적인 양상으로 중개된다는 것을 암시한다.

또한 본 발명의 GW112 녹다운 세포주는 증가된 아폽토시스 정도를 보이면서 심바스타틴 처리에 보다 감수성인 것으로 나타났다. 아폽토시스가 이 방법에 의하여 GW112 녹다운 세포에서 야기되었을 때, 카스파제-3 활성은 2.5 폴드(fold)로 증가하였다.

이러한 아폽토시스는 메발로네이트 (mevalonate) 또는 z-VAD-fmk 처리에 의하여 완전히 억제되었다. 더구나, GGPP 및 FPP는 스타틴이 야기한 아폽토시스를 특이적으로 억제하였다. GW112의 과발현은 스타틴이 야기한 아폽토시스를 구제할 수 있었다.

이러한 결과들은 스타틴이 야기한 아폽토시스가 메발로네이트 경로 및 세포 신호 캐스케이드에 의해 차례로 영향을 받는 GW112에 의해 중개된다는 것을 나타낸다.

발명의 효과

본 발명의 GW112 유전자는 암발생의 억제를 위한 유전자로서, 본 발명은 암발생 억제에 효과적인 GW112 유전자 및 이로부터 유래하는 폴리펩타이드를 제공하여서, 소화기 관련 암세포의 발생을 억제할 수 있는 신규의 화합물을 찾는데 효과적으로 이용 가능하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 AGS-K3 세포주가 GW112 siRNA를 안정적으로 발현하는 것을 보인다. (A)는 GW112 siRNA를 만들기 위한 헤어핀 주형을 보인다. (B)는 GFP에 연결된 GW112의 발현이 억제되는 것을 보인다.

도 2는 AGS-K3 세포주의 특징을 분석한 것이다. (A)는 야생형의 AGS와 AGS-K3의 세포주기 분석을 보인다. (B)와 (C)는 GW112 mRNA 발현 수준을 RT-PCR과 실시간 RT-PCR로 각각 분석한 것이다.

도 3는 세포 생존 능력을 테스트 한 것을 보인다. 야생형의 AGS와 AGS-K3 세포가 표시된 양으로 각각 12시간 처리되었다. (A) H_2O_2 처리; (B) MG132 처리; (C) TNF α 처리됨.

도 4는 MG132에 의해 AGS-K3에서 일어나는 아폽토시스를 보인다. 야생형은 AGS와 GW112 siRNA AGS 세포가 12시간 동안 MG132를 1 μ M 처리되었다.

도 5는 야생형의 AGS세포와 AGS-K3 세포주에서 여러 아폽토시스 단백질을 정량화한 것이다. 두 세포 모두 12시간 동안 MG132를 1 μ M 처리하였다.

도 6는 AGS-K3의 아폽토시스에서 NF κ B 활성이 관여함을 보인다. AGS 세포는 NF- κ B p65를 코딩하고 있는 발현 플라스미드 1 μ g으로 형질전환되었고, 12시간 동안에 0.5 μ M 의 MG132가 존재 또는 부존재하에서 항온배양되었다.

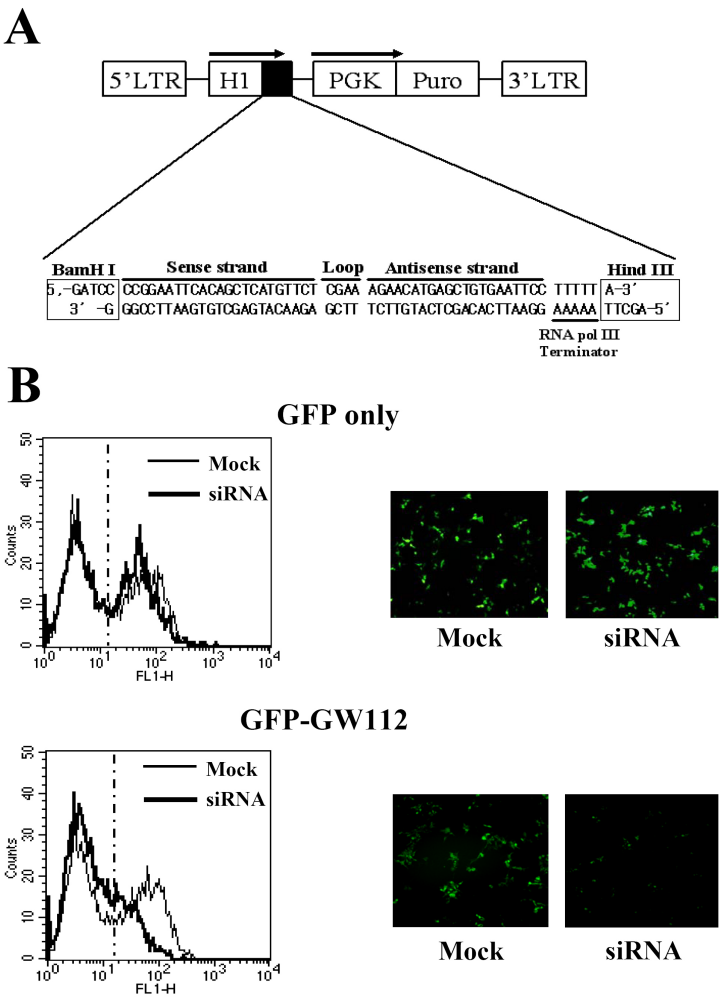
도 7은 AGS-K3 세포가 스타틴(statin) 유도 아폽토시스를 증가시켜주는 것을 보인다. 야생형의 AGS 세포와 AGS-K3 세포가 표시된 것과 같은 양으로 심바스타틴(simvastatin)으로 24시간 동안 처리되었다. 야생형의 AGS 세포와 AGS-K3 세포가 5 μ M의 심바스타틴과 함께 20 μ M의 z-VAD-fmk(보편의 카스파아제 저해제) 또는 100 μ M 메발로네이트의 존재 또는 부존재하에서 처리되었다. 이들 세포는 플로우 사이토메트리에서 (A 와 B); DNA 단편 분석 (C); 및 카스파아제-3 활성화 테스트(D)를 하였다. 세 번의 실험에 의한 결과가 표준편차와 같이 나타내었다.

도 8은 메발로네이트 경로의 중간물질이 심바스타틴 유도 아폽토시스가 억제되어지는 것을 보인다. 야생형은 AGS와 AGS-K3 세포가 200 μ M 스쿠알렌, 10 μ M FPP(Farnesyl pyrophosphate), 10 μ M GGPP (Geranylgeranyl pyrophosphate) 및 메발로네이트의 존재 또는 부존재하에서 전처리한 후 10 μ M의 심바스타틴를 처리했다.

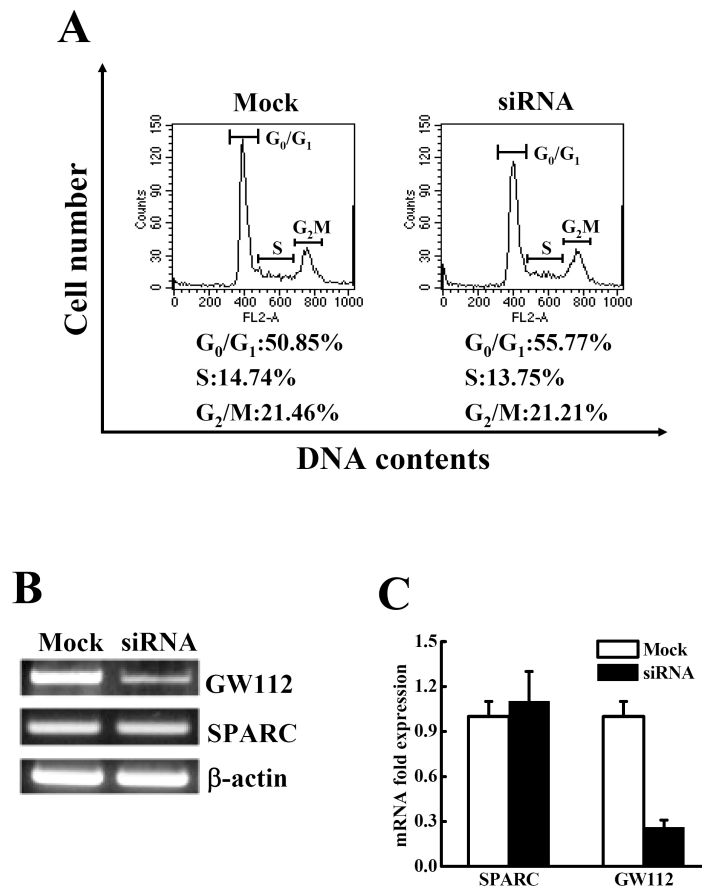
도 9는 스타틴 유도 아폽토시스가 특정 카스파아제 억제제에 의해서 억제되어지는 것을 보인다. AGS와 AGS-K3 세포가 50 μ M DEVD(카스파아제-3 억제제), 50 μ M의 z-IETD-fmk(카스파아제-8 억제제) 및 50 μ M z-LEHD-fmk (카스파아제-9 억제제)의 존재 또는 부존재하에서 전처리한 후 10 μ M의 심바스타틴를 처리했다.

도면

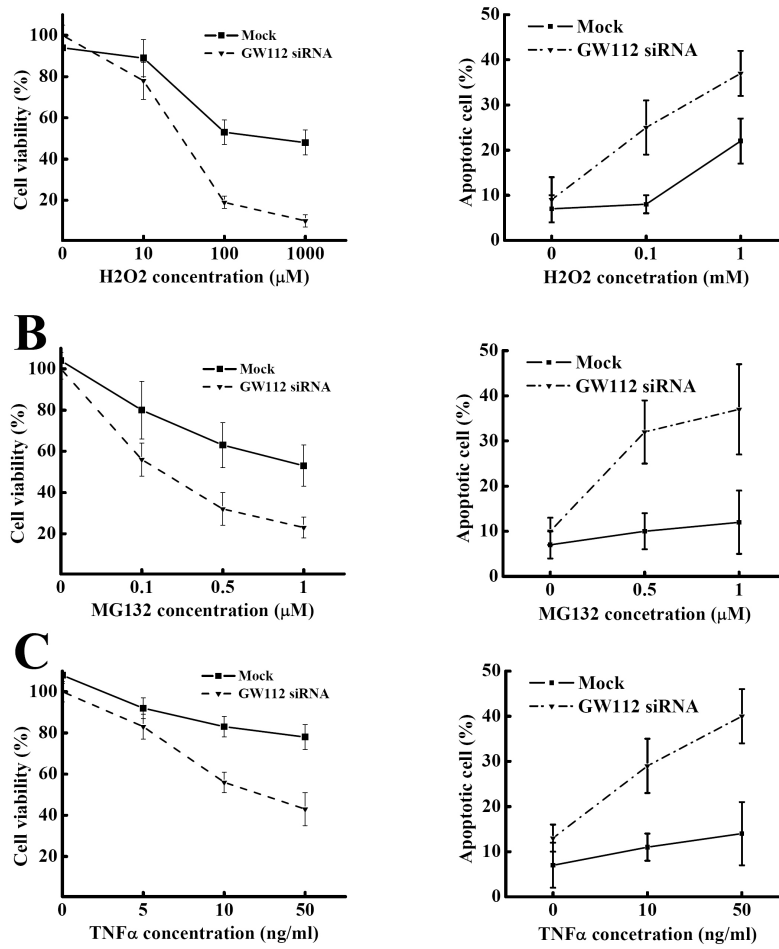
도면1



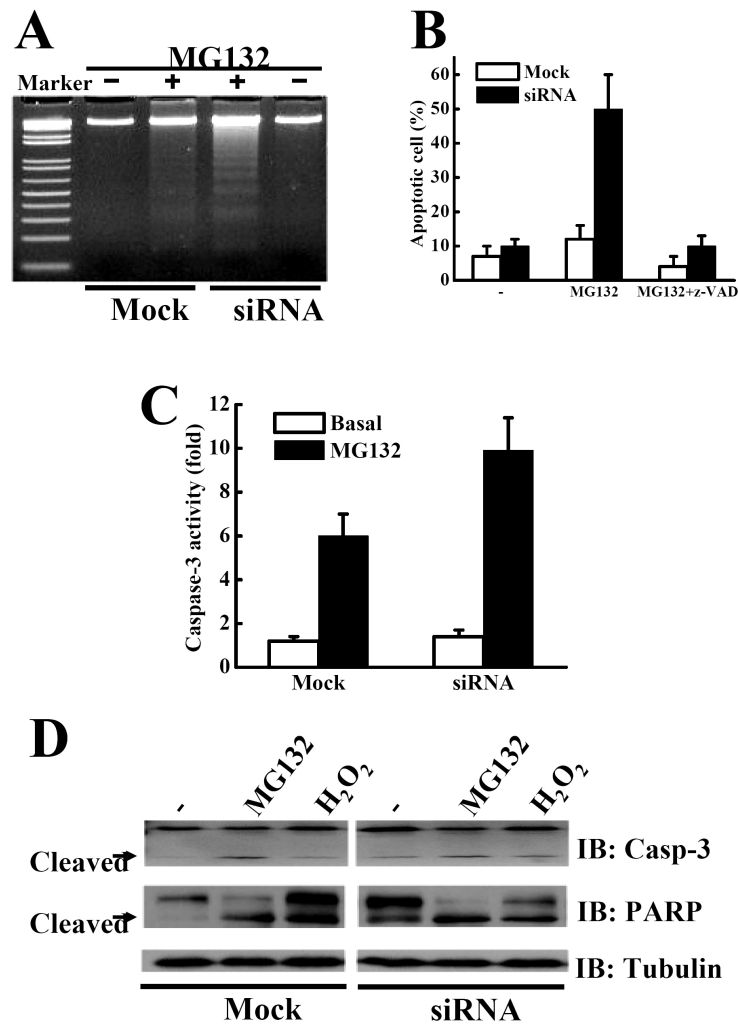
도면2



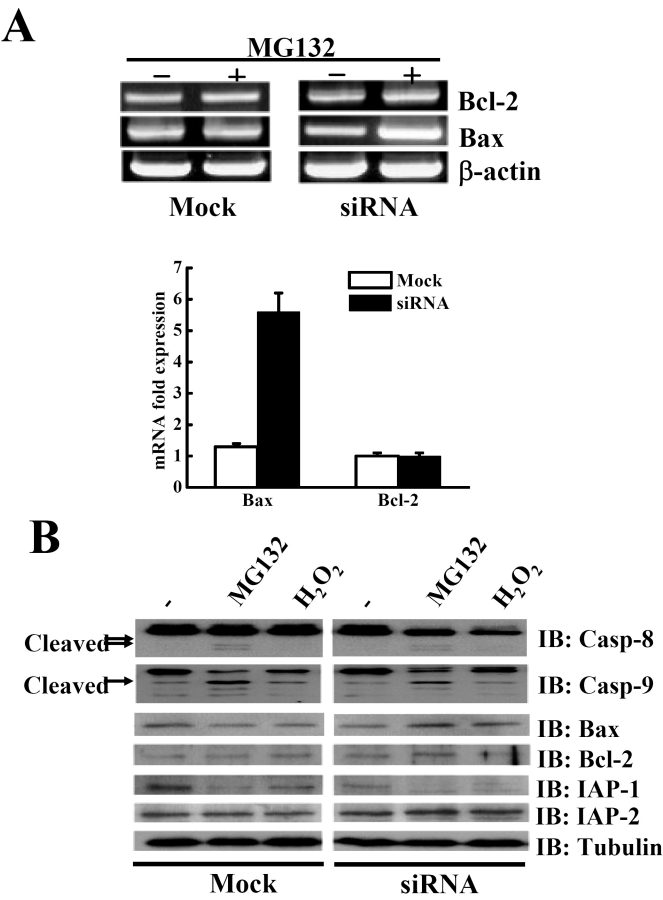
도면3



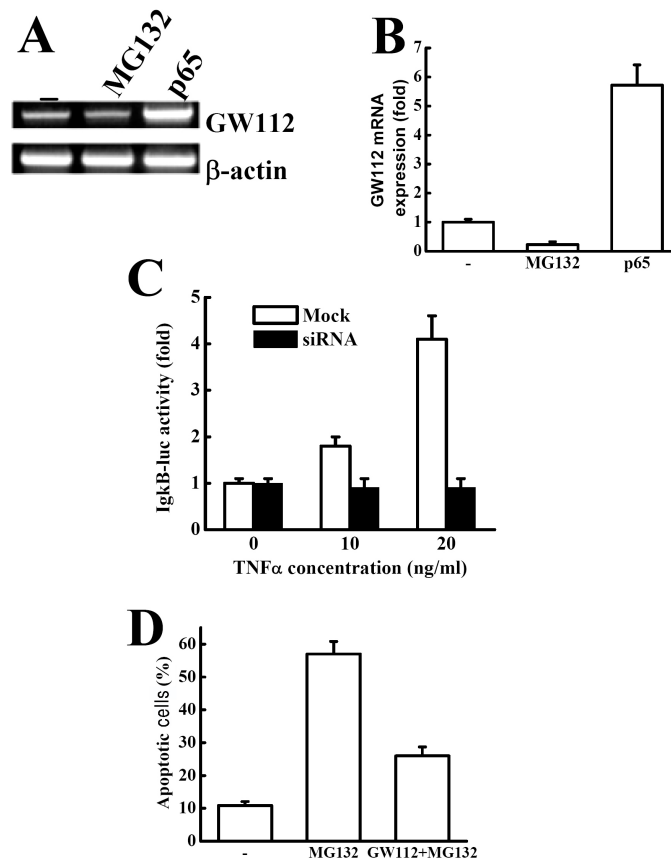
도면4



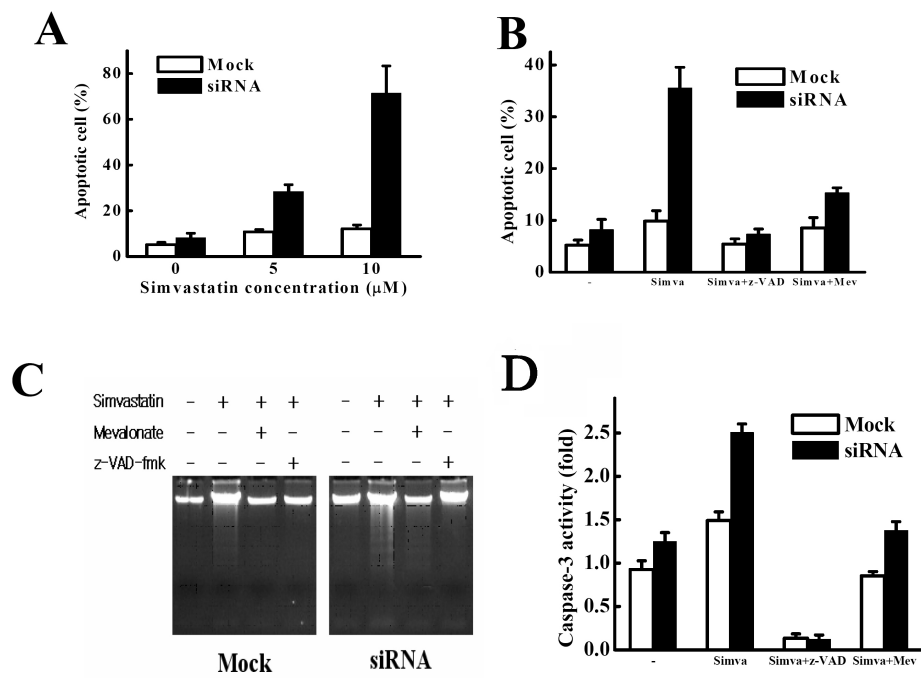
도면5



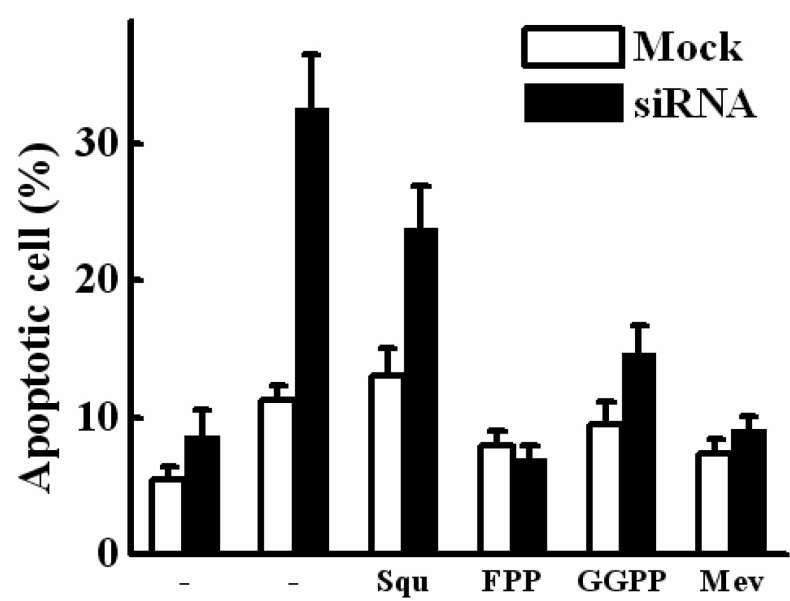
도면6



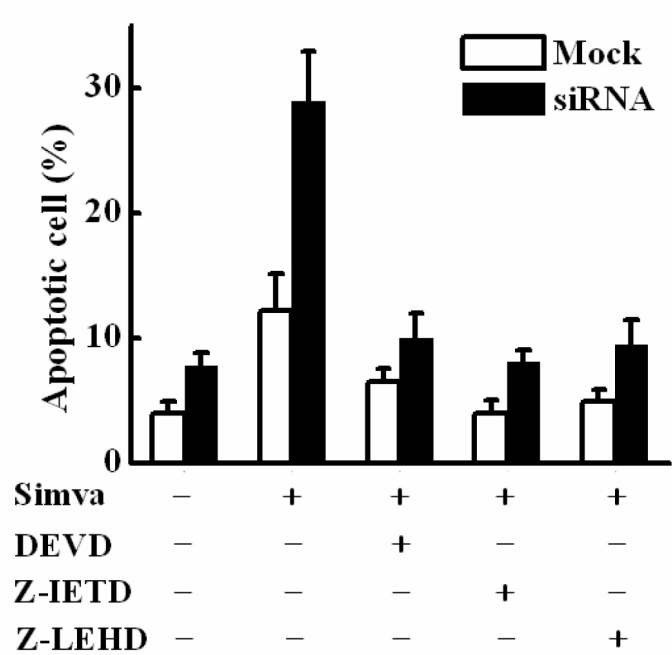
도면7



도면8



도면9



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> GW112 Gene For Inhibiting Cancer Development And Methods Of Screening Anticancer Agent by using it

<160> 14

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2844

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgaggcccg gcctctcatt tctcctagcc cttctgttct tccttggcca agctgcaggg	60
gatttggggg atgtgggacc tccaattccc agccccggct tcagctcttt ccaggtgtt	120
gactccagct ccagcttcag ctccagctcc aggtcgggct ccagctccag ccgcagctta	180
ggcagcggag gttctgtgtc ccagttgttt tccaatttca ccggctccgt ggatgaccgt	240
gggacctgcc agtgctctgt ttccctgcc gacaccacct ttcccgtaga cagagtggaa	300
cgcttggaat tcacagctca tggtctttct cagaagtttg agaaagaact ttccaaagt	360
agggaatatg tccaattaat tagtgtgtat gaaaagaaac tggttaaacct aactgtccga	420
attgacatca tggagaagga taccatttct tacactgaac tggacttcga gctgatcaag	480
gtagaagtga aggagatgga aaaactgggtc atacagctga aggagagttt tgggtggaagc	540
tcagaaattg ttgaccagct ggaggtggag ataagaaata tgactctctt ggtagagaag	600
cttgagacac tagacaaaaa caatgtcctt gccattcgcc gagaaatcgt ggctctgaag	660
accaagctga aagagtgtga ggcctctaaa gatcaaaaca cccctgtcgt ccaccctcct	720
cccactccag ggagctgtgg tcatgggtgt gtggtgaaca tcagcaaacc gtctgtggtt	780
cagctcaact ggagaggggt ttcttatcta tatgggtgctt ggggtaggga ttactctccc	840
cagcatccaa acaaaggact gtattgggtg ggcgcattga atacagatgg gagactgttg	900
gagtattata gactgtacaa cacactggat gatttgctat tgtatataaa tgctcgagag	960
ttgcggatca cctatggcca aggtagtggg acagcagttt acaacaaca catgtacgtc	1020
aacatgtaca acaccgggaa tattgccaga gttaacctga ccaccaacac gattgctgtg	1080
actcaaactc tccctaattg tgcctataat aaccgctttt catatgctaa tgttgcttgg	1140
caagatattg actttgctgt ggatgagaat ggattgtggg ttattttattc aactgaagcc	1200
agcactggta acatgggtgat tagtaaaactc aatgacacca cacttcaggt gctaaacact	1260

tggtatacca agcagtataa accatctgct tctaacgcct tcatgggatg tgggggttctg	1320
tatgccaccc gtactatgaa caccagaaca gaagagattt ttactatta tgacacaaac	1380
acagggaaaag agggcaaact agacattgta atgcataaga tgcaggaaaa agtgcagagc	1440
attaactata acccttttga ccagaaactt tatgtctata acgatggtta ctttctgaat	1500
tatgatcttt ctgtcttgca gaagccccag taagctgttt aggagttagg gtgaaagaga	1560
aatgttttgt tgaaaaaata gtcttctcca cttacttaga tatctgcagg ggtgtctaaa	1620
agtgtgttca ttttgcagca atgttttaggt gcatagttct accacactag agatctagga	1680
catttgtctt gatttgggtga gttctcttgg gaatcatctg cctcttcagg cgcattttgc	1740
aataaagtct gtctaggggtg ggattgtcag aggtctaggg gcactgtggg cctagtgaag	1800
cctactgtga ggaggcttca ctagaagcct taaattagga attaaggaac ttaaaactca	1860
gtatggcgtc tagggattct ttgtacagga aatattgccc aatgactagt cctcatccat	1920
gtagcaccac taattcttcc atgcctggaa gaaacctggg gacttagtta ggtagattaa	1980
tatctggagc tcctcgaggg accaaatctc caactttttt ttcccctcac tagcacctgg	2040
aatgatgctt tgtatgtggc agataagtaa atttggcatg cttatatatt ctacatctgt	2100
aaagtgtga gttttatgga gagaggcctt tttatgcatt aaattgtaca tggcaaataa	2160
atcccagaag gatctgtaga tgaggcacct gctttttctt ttctctcatt gtccacctta	2220
ctaaaagtca gtagaatctt ctacctcata acttccttcc aaaggcagct cagaagatta	2280
gaaccagact tactaaccaa ttccaccccc caccaacccc cttctactgc ctactttaaa	2340
aaaattaata gttttctatg gaactgatct aagattagaa aaattaattt tctttaattt	2400
cattatgaac ttttatttac atgactctaa gactataaga aaatctgatg gcagtgacaa	2460
agtgctagca tttattgtta tctaataaag accttggagc atatgtgcaa cttatgagtg	2520
tatcagttgt tgcagttaat ttttgccttt gttaaagcct ggaacttgta agaaaatgaa	2580
aatttaattt ttttttctag gacgagctat agaaaagcta ttgagagtat ctagttaatc	2640
agtgcagtag ttggaaacct tgctgggtgta tgtgatgtgc ttctgtgctt ttgaatgact	2700
ttatcatcta gtctttgtct atttttcctt tgatgttcaa gtcctagtct ataggattgg	2760
cagtttaaat gctttactcc cccttttaaa ataaatgatt aaaatgtgct ttgaaaaaaa	2820
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	2844

<210> 2
 <211> 510
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 2
 Met Arg Pro Gly Leu Ser Phe Leu Leu Ala Leu Leu Phe Phe Leu Gly
 1 5 10 15

 Gln Ala Ala Gly Asp Leu Gly Asp Val Gly Pro Pro Ile Pro Ser Pro
 20 25 30

 Gly Phe Ser Ser Phe Pro Gly Val Asp Ser Ser Ser Ser Phe Ser Ser
 35 40 45

 Ser Ser Arg Ser Gly Ser Ser Ser Ser Arg Ser Leu Gly Ser Gly Gly
 50 55 60

 Ser Val Ser Gln Leu Phe Ser Asn Phe Thr Gly Ser Val Asp Asp Arg
 65 70 75 80

 Gly Thr Cys Gln Cys Ser Val Ser Leu Pro Asp Thr Thr Phe Pro Val
 85 90 95

 Asp Arg Val Glu Arg Leu Glu Phe Thr Ala His Val Leu Ser Gln Lys
 100 105 110

 Phe Glu Lys Glu Leu Ser Lys Val Arg Glu Tyr Val Gln Leu Ile Ser
 115 120 125

 Val Tyr Glu Lys Lys Leu Leu Asn Leu Thr Val Arg Ile Asp Ile Met
 130 135 140

 Glu Lys Asp Thr Ile Ser Tyr Thr Glu Leu Asp Phe Glu Leu Ile Lys
 145 150 155 160

 Val Glu Val Lys Glu Met Glu Lys Leu Val Ile Gln Leu Lys Glu Ser
 165 170 175

 Phe Gly Gly Ser Ser Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Val Glu Ile Arg
 180 185 190

 Asn Met Thr Leu Leu Val Glu Lys Leu Glu Thr Leu Asp Lys Asn Asn
 195 200 205

 Val Leu Ala Ile Arg Arg Glu Ile Val Ala Leu Lys Thr Lys Leu Lys
 210 215 220

 Glu Cys Glu Ala Ser Lys Asp Gln Asn Thr Pro Val Val His Pro Pro
 225 230 235 240

Pro Thr Pro Gly Ser Cys Gly His Gly Gly Val Val Asn Ile Ser Lys
245 250 255

Pro Ser Val Val Gln Leu Asn Trp Arg Gly Phe Ser Tyr Leu Tyr Gly
260 265 270

Ala Trp Gly Arg Asp Tyr Ser Pro Gln His Pro Asn Lys Gly Leu Tyr
275 280 285

Trp Val Ala Pro Leu Asn Thr Asp Gly Arg Leu Leu Glu Tyr Tyr Arg
290 295 300

Leu Tyr Asn Thr Leu Asp Asp Leu Leu Leu Tyr Ile Asn Ala Arg Glu
305 310 315 320

Leu Arg Ile Thr Tyr Gly Gln Gly Ser Gly Thr Ala Val Tyr Asn Asn
325 330 335

Asn Met Tyr Val Asn Met Tyr Asn Thr Gly Asn Ile Ala Arg Val Asn
340 345 350

Leu Thr Thr Asn Thr Ile Ala Val Thr Gln Thr Leu Pro Asn Ala Ala
355 360 365

Tyr Asn Asn Arg Phe Ser Tyr Ala Asn Val Ala Trp Gln Asp Ile Asp
370 375 380

Phe Ala Val Asp Glu Asn Gly Leu Trp Val Ile Tyr Ser Thr Glu Ala
385 390 395 400

Ser Thr Gly Asn Met Val Ile Ser Lys Leu Asn Asp Thr Thr Leu Gln
405 410 415

Val Leu Asn Thr Trp Tyr Thr Lys Gln Tyr Lys Pro Ser Ala Ser Asn
420 425 430

Ala Phe Met Val Cys Gly Val Leu Tyr Ala Thr Arg Thr Met Asn Thr
435 440 445

Arg Thr Glu Glu Ile Phe Tyr Tyr Tyr Asp Thr Asn Thr Gly Lys Glu
450 455 460

Gly Lys Leu Asp Ile Val Met His Lys Met Gln Glu Lys Val Gln Ser
465 470 475 480

Ile Asn Tyr Asn Pro Phe Asp Gln Lys Leu Tyr Val Tyr Asn Asp Gly
485 490 495

Tyr Leu Leu Asn Tyr Asp Leu Ser Val Leu Gln Lys Pro Gln
500 505 510

<210> 3
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> GW112 siRNA sense strand

 <400> 3
 gatccccgga attcacagct catgttctcg aaagaacatg agctgtgaat tccttttta 59

 <210> 4
 <211> 59
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> GW112 siRNA Antisense strand

 <400> 4
 agcttaaaaa ggaattcaca gctcatgttc ttctgagaac atgagctgtg aattccggg 59

 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> GW112 sense primer

 <400> 5
 gaatcttcta cctcataact tcct 24

 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> GW112 antisense primer

 <400> 6
 gcaacaactg ataactcata agt 23

<210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SPARC sense primer

<400> 7
 caagaagccc tgctgatga g 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SPARC antisense primer

<400> 8
 ggggtcctgg cacacgcaca t 21

<210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bax sense primer

<400> 9
 accaagaagc tgagcgagtg tc 22

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bas antisense primer

<400> 10
 acaaagatgg tcacggtctg cc 22

<210> 11
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bcl-2 sense primer

<400> 11
 tgcacctgac gcccttcac 19

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Bcl-2 antisense primer

<400> 12
 agacagccag gagaaatcaa acag 24

<210> 13
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Beta-actin sense primer

<400> 13
 tcacccacac tgtgcccac tacga 25

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Beta-actin antisense primer

<400> 14
 cagcggaacc gctcatgcca atgg 24