



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0081036
(43) 공개일자 2016년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0194169

(22) 출원일자 2014년12월30일

심사청구일자 2014년12월30일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

최지하

서울특별시 양천구 목동동로 430, 612동 802호

(74) 대리인

이원희

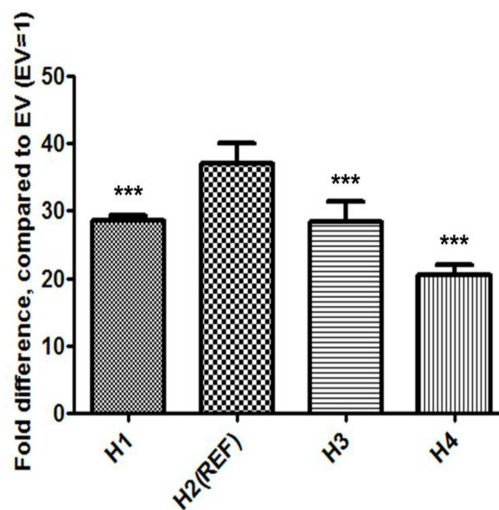
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 OCTN1 프로모터 내 단일염기다형성 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 OCTN1(organic cation/carnitine transporter 1) 프로모터 영역 내 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP) 및 이의 용도에 관한 것으로, OCTN1 프로모터 영역에 발생하는 변이를 확인하고 상기 변이를 포함하는 반수체(haplotype)를 갖는 플라스미드를 제작하여 그 중 프로모터 영역에 g.-1875T>A 변이 또는 g.-1745A>G 변이가 발생하였을 때 상기 프로모터의 활성이 유의적으로 증가하고, g.-1145A>G 변이 또는 g.-248C>G 변이가 발생하였을 때 상기 프로모터 활성이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 본 발명의 g.-1875T>A 변이는 OCTN1 전사 억제자인 nuclear factor Y(NF-Y)와 결합 친화도가 낮아 OCTN1 프로모터 활성을 증가시키는데 관여한다는 것을 확인함으로써, 본 발명의 OCTN1 단일염기다형성은 약물의 반응성 및 질병의 감수성 확인을 위한 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트 및 이를 이용한 확인방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C0070

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업-차세대맞춤의료 유전체 사업단

연구과제명 양이온계 약물 SLC 수송단백 연구

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2011.07.01 ~ 2015.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0027945

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-선도연구센터육성사업-기초의학분야(MRC)

연구과제명 조직손상 방어 연구센터-내인성 염증 치유 및 조직 복구 프로그래밍 강화를 통한 조직 손

상 개선 연구(1세부)

기 여 율 50/100

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2019.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

OCTN1(organic cation/carnitine transporter 1) mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 2063번째 염기가 C(g.-2063A>C), 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661), 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660), 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 538번째 염기가 G(g.-538C>G; rs460089), 510번째 염기가 T(g.-510C>T) 및 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)로 구성된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 포함하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단일염기다형성은 하기 H1 내지 H4로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 일배체형인 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트:

일배체형	유전자 변이						
	g.-2063 A>C	g.-1875 T>A	g.-1745 A>G	g.-1145 A>G	g.-538 C>G	g.-510 C>T	g.-248 C>G
H1	A	T	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	C	<u>G</u>
H2	A	T	A	<u>A</u>	<u>C</u>	C	<u>C</u>
H3	A	<u>A</u>	A	<u>G</u>	<u>G</u>	C	<u>G</u>
H4	A	T	A	<u>G</u>	<u>G</u>	C	<u>G</u>

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 OCTN1은 서열번호 12로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 SNP를 포함하는 20 내지 100개의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 OCTN1 mRNA 서열의 전사 시작부위로부터, 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661) 또는 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660)인 SNP는 OCTN1 프로모터 활성을 증가시키고, 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)인 SNP는 OCTN1 프로모터 활성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 OCTN1 프로모터 활성은 약물의 반응성 및 질병의 감수성 확인을 위한 것인 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 약물은 가바펜틴(gabapentin), 메트포르민(metformin), 세팔렉신(cephalexin), 세프라딘(cephradine), 시메티딘(cimetidine), 및 프로카인아미드(procainamide)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 질병은 크론병(Crohn's disease)인 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 9

제 2항에 있어서, 상기 일배체형은 OCTN1 전사 억제자인 nuclear factor Y(NF-Y)와 결합하는 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서, NF-Y는 제 2항의 H1, H2 및 H4와 결합 친화도가 높은 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 11

OCTN1 mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 2063번째 염기가 C(g.-2063A>C), 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661), 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660), 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 538번째 염기가 G(g.-538C>G; rs460089), 510번째 염기가 T(g.-510C>T) 및 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)인 SNP 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트.

청구항 12

- 1) 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈(genome) DNA를 추출하는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 게놈 DNA 서열에서 OCTN1 mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 2063번째 염기가 C(g.-2063A>C), 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661), 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660), 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 538번째 염기가 G(g.-538C>G; rs460089), 510번째 염기가 T(g.-510C>T) 및 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)인 군으로부터 선택되는 어느 하나의 SNP 부위를 확인하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 결과를 확인하는 단계를 포함하는 OCTN1 프로모터 활성 확인방법.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 단계 1)의 시료는 머리카락, 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 확인방법.

청구항 14

제 12항에 있어서, 상기 단계 2)의 SNP 부위의 확인방법은 마이크로레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유

전자 특이적 탐침 혼성화(allele-specific hybridization), 대립유전자 특이적 증폭(allele-specific amplification), 서열분석(sequencing), 5' 뉴클라아제 분해(5' nuclease digestion), 분자 비콘어세이(molecular beacon assay), 올리고뉴클레오티드 결합 어세이(oligonucleotide ligation assay), 크기분석(size analysis) 및 단일가닥 배좌 다형성(single-stranded conformation polymorphism)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 확인방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 OCTN1(organic cation/carnitine transporter 1) 프로모터 영역 내 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP) 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간 유기 양이온/카르니틴 수송체1(OCTN1, SLC22A4)는 용질담체(solute carrier; SLC)의 수송체에 속하며, 신장, 골격근, 기관지, 골수, 태아의 간에서 주로 발현된다[1,2]. OCTN1은 또한, 쥐의 소장, 간, 뇌신경세포 및 염증관절에서 발현된다[3-5]. OCTN1은 pH 의존적으로 테트라에틸암모늄(tetraethylammonium; TEA)을 포함한 유기 양이온 수송에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[2,6]. 최근 Grunde-mann 등[7]은 L-ergothioneine가 OCTN1 수송체의 자연기질(natural substrate)이라고 밝힌바 있다.

[0003] 많은 지난 연구에서는 OCTN1의 미스센스 변이체가 인간 질병, 특히 크론병에 있어서 감수성, 또는 병의 진행에 연관이 있다고 밝힌 바 있다. 예를 들어, Peltekova 등[8]은 OCTN1의 L503F가 체외 흡수 분석(in vitro uptake assay)을 통해 카르니틴을 포함하는 다른 내인성 화합물은 감소된 수송 활성을 나타낸 반면 TEA에 대해서는 증가된 수송 활성을 나타냈다. 또한, OCTN1의 L503F 및 OCTN2의 g.-207G>C로 구성된 일배체형은 크게 크론병에 대한 감수성과 연관이 있다는 것을 밝혔다[9-14].

[0004] OCTN1의 몇 가지 알려진 기질이 있지만, 이 수송체의 유전자 변형체는 OCTN1 기질인 약물 동력학(pharmacokinetics or pharmacodynamics)을 변경할 수 있다. L503는 이전에 항 경련제 가바펜틴(gabapentin)에 대한 수송 활성 감소를 나타내었고, 이의 변형은 가바펜틴의 신장 분비 감소 결과를 가져왔다[16]. 다른 예로, 나카미치 등[17]은 메트포르민(metformin)은 OCTN1의 기질이며, 이의 최대 혈장 농도(maximum plasma concentration; C max)는 OCTN1 녹아웃 마우스에서 크게 변화될 수 있음을 보고하였다.

[0005] 현재까지 OCTN1 프로모터의 유전적 변이의 효과를 연구한 사례가 있다. 최근, 인종적으로 다양한 인구로부터 272 DNA 샘플에 대해 직접 서열분석을 하였다. 6개의 OCTN1 프로모터 변이가 밝혀졌고, 8개의 일배체형의 기능적 특성이 분석되었다[18]. 그러나, 상기 연구에서는 기준 일배체형(reference haplotype)에 비해 크게 변화된 프로모터 활성을 나타내지 않았다. 마에다 등[19]은 OCTN1 발현의 조절 메커니즘을 조사하였고, RUNX1, Sp1 및 NF-κB를 포함하는 다양한 전사 인자에 의해 조절될 수 있다는 것을 밝혔다.

[0006] 이전 연구에서, Tahara 등[18]에 따르면, 68명의 백인, 68명의 중국계, 68명의 라틴아메리카계(Hispanic) 및 68명의 아프리카계에서 얻은 272개의 DNA 샘플의 스크리닝에 의해 OCTN1 근위 프로모터(proximal promoter)의 유전자 분석을 수행하였다. 이들은 OCTN1 프로모터의 7개의 유전적 변이를 확인하였고, 중국인의 샘플로부터 2개의 변이, g.-256C>G 및 g.-248C>G를 발견하였다. g.-248C>G의 마이너 대립유전자(minor allele)의 빈도수는 본 발명의 연구 결과와 비슷하게 나왔다. 그러나, 상기 선행 연구에서는 g.-256C>G의 변이체 빈도수가 1.5%로 드물었으며, 한국인에서는 발견되지 않았다.

[0007] 최근, OCTN1 변이체 L503F 및 OCTN2 변이체 g.-207G>C로 구성된 일배체형은 크게 크론병에 대한 감수성(susceptibility to Crohn's disease)과 연관이 있다고 알려져 있다. 또 다른 연구에서, OCTN1의 인트론 변이체는 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)과 관련이 있음을 보고하였다[3]. 그러나, OCTN1 및 류마티스 관절염 사이의 관계에 대한 연구 결과는 아직 논란의 여지가 남아있다[27, 28].

[0008] NF-Y(nuclear factor-Y)는 약제 내성 3(multidrug resistance 3; MDR3) 전사 조절에 관련된 전사인자이며, 해당 유전자의 발현을 유도할 수 있다[20]. 또한, NF-Y는 MDR3 전사의 역할과 달리 OCTN1 전사를 억제한다[20]. 이전 연구에 따르면, NF-Y는 유전자 발현을 유도하거나 억제할 수 있는 이작용 전사인자(bifunctional transcription factor)이다[25, 26].

[0009] 본 발명은 한국인의 OCTN1 프로모터 영역에서 유전적 변이를 기능적으로 특성화하고, 어떤 OCTN1 변이에 의해 프로모터 활성이 변형되는 것인지에 대한 메커니즘을 확인하기 위해 수행되었다. 먼저, 본 발명자들은 OCTN1 프로모터의 변이를 확인하기 위해 건강한 한국인으로부터 48개의 지놈 DNA 샘플을 이용하여 유전적 분석을 수행하였다. 본 발명자들은 이후, 공통 OCTN1 프로모터 일배체형(common OCTN1 promoter haplotypes)을 구축하였으며, 이중-루시퍼레이즈 리포터(dual-luciferase reporter) 및 전기영동 이동성 시프트 분석법(electrophoretic mobility shift assays)을 포함한 인비트로 분석을 이용하여 각 일배체형의 기능을 분석하였다. 본 발명을 통해, 한국인의 OCTN1의 신규 프로모터 변이체를 확인하였으며, 상기 유전자의 전사 조절을 위한 주요 메커니즘을 결정하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) 1. Tamai I, Yabuuchi H, Nezu J, Sai Y, Oku A, Shimane M, Tsuji A. Cloning and characterization of a novel human pH-dependent organic cation transporter, OCTN1. FEBS Lett. 1997;419: 107-111.
- (비특허문헌 0002) 2. Yabuuchi H, Tamai I, Nezu J, Sakamoto K, Oku A, Shimane M, Sai Y, Tsuji A. Novel membrane transporter OCTN1 mediates multispecific, bidirectional, and pH-dependent transport of organic cations. J Pharmacol Exp Ther. 1999;289:768- 773.
- (비특허문헌 0003) 3. Tokuhito S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. Nat Genet. 2003;35:341-348.
- (비특허문헌 0004) 4. Nakamichi N, Taguchi T, Hosotani H, Wakayama T, Shimizu T, Sugiura T, Iseki S, Kato Y. Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1 in mouse brain neurons: possible involvement in neuronal differentiation. Neurochem Int. 2012;61:1121-1132.
- (비특허문헌 0005) 5. Sugiura T, Kato S, Shimizu T, Wakayama T, Nakamichi N, Kubo Y, Iwata D, Suzuki K, Soga T, Asano M, Iseki S, Tamai I, Tsuji A, Kato Y. Functional expression of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in mouse small intestine and liver. Drug Metab Dispos. 2010;38:1665-1672.
- (비특허문헌 0006) 6. Kawasaki Y, Kato Y, Sai Y, Tsuji A. Functional characterization of human organic cation transporter OCTN1 single nucleotide polymorphisms in the Japanese population. J Pharm Sci. 2004;93:2920-2926.
- (비특허문헌 0007) 7. Grundemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schomig E. Discovery of the ergothioneine transporter. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102:5256-5261.
- (비특허문헌 0008) 8. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. Nat Genet. 2004;36:471-475.

- (비특허문헌 0009) 9. Noble CL, Nimmo ER, Drummond H, Ho GT, Tenesa A, Smith L, Anderson N, Arnott ID, Satsangi J. The contribution of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus to disease susceptibility and severity in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2005;129:1854-1864.
- (비특허문헌 0010) 10. Russell RK, Drummond HE, Nimmo ER, Anderson NH, Noble CL, Wilson DC, Gillett PM, McGrogan P, Hassan K, Weaver LT, Bisset WM, Mahdi G, Satsangi J. Analysis of the influence of OCTN1/2 variants within the IBD5 locus on disease susceptibility and growth indices in early onset inflammatory bowel disease. *Gut*. 2006;55:1114-1123.
- (비특허문헌 0011) 11. Martinez A, Martin MC, Mendoza JL, Taxonera C, Diaz-Rubio M, de la Concha EG, Urcelay E. Association of the organic cation transporter OCTN genes with Crohn's disease in the Spanish population. *Eur J Hum Genet*. 2006;14:222-226.
- (비특허문헌 0012) 12. Leung E, Hong J, Fraser AG, Merriman TR, Vishnu P, Krissansen GW. Polymorphisms in the organic cation transporter genes SLC22A4 and SLC22A5 and Crohn's disease in a New Zealand Caucasian cohort. *Immunol Cell Biol*. 2006;84:233-236.
- (비특허문헌 0013) 13. Lin Z, Nelson L, Franke A, Poritz L, Li TY, Wu R, Wang Y, MacNeill C, Thomas NJ, Schreiber S, Koltun WA. OCTN1 variant L503F is associated with familial and sporadic inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis*. 2010;4:132-138.
- (비특허문헌 0014) 14. Xuan C, Zhang BB, Yang T, Deng KF, Li M, Tian RJ. Association between OCTN1/2 gene polymorphisms (1672C-T, 207G-C) and susceptibility of Crohn's disease: a meta-analysis. *Int J Colorectal Dis*. 2012;27:11-19.
- (비특허문헌 0015) 15. Angelini S, Pantaleo MA, Ravegnini G, Zenesini C, Cavrini G, Nannini M, Fumagalli E, Palassini E, Saponara M, Di Battista M, Casali PG, Hrelia P, Cantelli-Forti G, Biasco G. Polymorphisms in OCTN1 and OCTN2 transporters genes are associated with prolonged time to progression in unresectable gastrointestinal stromal tumours treated with imatinib therapy. *Pharmacol Res*. 2013;68:1-6.
- (비특허문헌 0016) 16. Urban TJ, Brown C, Castro RA, Shah N, Mercer R, Huang Y, Brett CM, Burchard EG, Giacomini KM. Effects of genetic variation in the novel organic cation transporter, OCTN1, on the renal clearance of gabapentin. *Clin Pharmacol Ther*. 2008;83:416-421.
- (비특허문헌 0017) 17. Nakamichi N, Shima H, Asano S, Ishimoto T, Sugiura T, Matsubara K, Kusuvara H, Sugiyama Y, Sai Y, Miyamoto K, Tsuji A, Kato Y. Involvement of carnitine/organic cation transporter OCTN1/SLC22A4 in gastrointestinal absorption of metformin. *J Pharm Sci*. 2013;102:3407-3417.
- (비특허문헌 0018) 18. Tahara H, Yee SW, Urban TJ, Hesselson S, Castro RA, Kawamoto M, Stryke D, Johns SJ, Ferrin TE, Kwok PY, Giacomini KM. Functional genetic variation in the basal promoter of the organic cation/carnitine transporters OCTN1 (SLC22A4) and OCTN2 (SLC22A5). *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329:262-271.
- (비특허문헌 0019) 19. Maeda T, Hirayama M, Kobayashi D, Miyazawa K, Tamai I. Mechanism of the regulation of organic cation/carnitine transporter 1 (SLC22A4) by rheumatoid arthritis-associated transcriptional factor RUNX1 and inflammatory cytokines. *Drug Metab Dispos*. 2007;35:394-401.
- (비특허문헌 0020) 20. Jang GH, Kim TH, Choe Y, Ham A, Choi JH. Functional characterization of genetic variations in the MDR3 promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430:1312-1318.
- (비특허문헌 0021) 21. Yoo YK, Ke X, Hong S, Jang HY, Park K, Kim S, Ahn T, Lee YD, Song O, Rho NY, Lee MS, Lee YS, Kim J, Kim YJ, Yang JM, Song K, Kimm K, Weir B, Cardon LR, Lee JE, Hwang JJ. Fine-scale map of encyclopedia of DNA elements regions in the Korean population. *Genetics*. 2006;174:491-497.

(비특허문헌 0022) 22. Inoue T, Kamiyama J, Sakai T. Sp1 and NF-Y synergistically mediate the effect of vitamin D(3) in the p27(Kip1) gene promoter that lacks vitamin D response elements. J Biol Chem. 1999;274:32309-32317.

(비특허문헌 0023) 23. Lutzner N, De-Castro Arce J, Rosl F. Gene expression of the tumour suppressor LKB1 is mediated by Sp1, NF-Y and FOXO transcription factors. PLoS One. 2012;7:e32590.

(비특허문헌 0024) 24. Bungartz G, Land H, Scadden DT, Emerson SG. NF-Y is necessary for hematopoietic stem cell proliferation and survival. Blood. 2012;119:1380-1389.

(비특허문헌 0025) 25. Bernadt CT, Nowling T, Wiebe MS, Rizzino A. NF-Y behaves as a bifunctional transcription factor that can stimulate or repress the FGF-4 promoter in an enhancer-dependent manner. Gene Expr. 2005;12:193-212.

(비특허문헌 0026) 26. Ceribelli M, Dolfini D, Merico D, Gatta R, Vigano AM, Pavesi G, Mantovani R. The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor. Mol Cell Biol. 2008;28:2047-2058.

(비특허문헌 0027) 27. Newman B, Wintle RF, van Oene M, Yazdanpanah M, Owen J, Johnson B, Gu X, Amos CI, Keystone E, Rubin LA, Siminovitch KA. SLC22A4 polymorphisms implicated in rheumatoid arthritis and Crohn's disease are not associated with rheumatoid arthritis in a Canadian Caucasian population. Arthritis Rheum. 2005;52:425-429.

(비특허문헌 0028) 28. Barton A, Eyre S, Bowes J, Ho P, John S, Worthington J. Investigation of the SLC22A4 gene (associated with rheumatoid arthritis in a Japanese population) in a United Kingdom population of rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum. 2005;52:752-758.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 OCTN1(organic cation/carnitine transporter 1) 프로모터 영역 내 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP) 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 OCTN1(organic cation/carnitine transporter 1) mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 2063번째 염기가 C(g.-2063A>C), 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661), 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660), 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 538번째 염기가 G(g.-538C>G; rs460089), 510번째 염기가 T(g.-510C>T) 및 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)로 구성된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 포함하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 OCTN1 mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 2063번째 염기가 C(g.-2063A>C), 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661), 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660), 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 538번째 염기가 G(g.-538C>G; rs460089), 510번째 염기가 T(g.-510C>T) 및 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)인 SNP 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트를 제공한다.

[0014] 아울러, 본 발명은

[0015] 1) 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈(genome) DNA를 추출하는 단계;

[0016] 2) 상기 단계 1)의 게놈 DNA 서열에서 OCTN1 mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 2063번째 염기가 C(g.-2063A>C), 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661), 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660), 1145번째 염기

가 G(g.-1145A>G; rs162887), 538번째 염기가 G(g.-538C>G; rs460089), 510번째 염기가 T(g.-510C>T) 및 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)인 군으로부터 선택되는 어느 하나의 SNP 부위를 확인하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 결과를 확인하는 단계를 포함하는 OCTN1 프로모터 활성 확인방법을 제공한다.

발명의 효과

본 발명은 OCTN1(organic cation/carnitine transporter 1) 프로모터 영역 내 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP) 및 이의 용도에 관한 것으로, OCTN1 프로모터 영역에 발생하는 변이를 확인하고 상기 변이를 포함하는 반수체(haplotype)를 갖는 플라스미드를 제작하여 그 중 프로모터 영역에 g.-1875T>A 변이 또는 g.-1745A>G 변이가 발생하였을 때 상기 프로모터의 활성이 유의적으로 증가하고, g.-1145A>G 변이 또는 g.-248C>G 변이가 발생하였을 때 상기 프로모터 활성이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 본 발명의 g.-1875T>A 변이는 OCTN1 전사 억제자인 nuclear factor Y(NF-Y)와 결합 친화도가 낮아 OCTN1 프로모터 활성을 증가시키는데 관여한다는 것을 확인함으로써, 본 발명의 OCTN1 단일염기다형성은 약물의 반응성 및 질병의 감수성 확인을 위한 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트 및 이를 이용한 확인방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1a는, OCTN1 반수체(haplotype)를 포함하는 리포터 플라스미드(reporter plasmid)로부터 OCTN1 프로모터 활성에 있어서 변이체의 효과를 확인한 도이다. 상기 데이터는 세 개의 well의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸 것이며, ***p<0.001이다.

도 1b는, 유전적 변이체를 포함하는 리포터 플라스미드로부터 OCTN1 프로모터 활성에 있어서 변이체의 효과를 확인한 도이다. 상기 데이터는 세 개의 well의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸 것이며, ***p<0.001이다.

도 2a는, OCTN1 참조(reference) 및 g.-1875T>A 변이체 서열의 전기 영동 이동성 시프트 분석(Electrophoretic mobility shift analysis)을 나타낸 도이다:

lanes 1: 32 P-표지된 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드;

lanes 2: 32 P-표지된 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드 + 표지되지 않은 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드;

lanes 3: 32 P-표지된 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드 + 표지되지 않은 NF-Y 돌연변이 consensus 올리고뉴클레오타이드;

lanes 4: 32 P-표지된 참조 g.-1875T 올리고뉴클레오타이드;

lanes 5: 32 P-표지된 참조 g.-1875T 올리고뉴클레오타이드 + 표지되지 않은 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드;

lanes 6: 32 P-표지된 참조 g.-1875T 올리고뉴클레오타이드 + 표지되지 않은 NF-Y 돌연변이 consensus 올리고뉴클레오타이드;

lanes 7: 32 P-표지된 변이체 g.-1875A 올리고뉴클레오타이드;

lanes 8: 32 P-표지된 변이체 g.-1875A 올리고뉴클레오타이드 + 표지되지 않은 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드; 및

lanes 9: 32 P-표지된 변이체 g.-1875A 올리고뉴클레오타이드 + 표지되지 않은 NF-Y 돌연변이 consensus 올리고뉴클레오타이드.

도 2b는, OCTN1 참조 및 g.-1875T>A 변이체 서열의 수퍼시프트(supershift) 분석을 나타낸 도이다:

lanes 1: 32 P-표지된 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드;

lanes 2: ³²P-표지된 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드 + NF-Y에 대한 항체;

lanes 3: ³²P-표지된 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드+ MZF-1에 대한 항체;

lane 4: ³²P-표지된 참조 g.-1875T 올리고뉴클레오타이드 + NF-Y에 대한 항체;

lane 5: ³²P-표지된 변이체 g.-1875A 올리고뉴클레오타이드 + NF-Y에 대한 항체.

도 3는, NF-Y의 양 증가에 따른 OCTN1의 참조 및 변이체(g.-1875T>A) 프로모터의 활성을 나타낸 도이다. *p<0.05, ***p<0.001 vs. naive 프로모터 활성 및 † p<0.01 vs. 참조 프로모터 활성.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

이하, 본 발명에 사용된 용어를 상세히 설명한다.

[0021]

본 명세서에서, 용어 “뉴클레오타이드”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

[0022]

본 명세서에서 용어 “단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)”은 게놈에서 단일염기(A, T, C 또는 G)가 종의 멤버들 간 또는 한 개체(individual)의 쌍 염색체 간에 다른 경우에 발생하는 DNA 서열의 다양성을 의미한다. 예를 들어, 서로 다른 개체의 세 개의 DNA 단편들(예: AAGT[A/A]AG, AAGT[A/G]AG, AAGT[G/G]AG)처럼 단일염기에서 차이를 포함하는 경우, 두 개의 대립 유전자(C 또는 T)라고 부르며, 일반적으로 거의 모든 SNPs는 두 개의 대립 유전자를 가진다. 한 집단(population) 내에서, SNP는 소수 대립인자 빈도(minor allele frequency, MAF; 특정 집단에서 발견되는 유전자위치(locus)에서 가장 낮은 대립인자 빈도)로 할당될 수 있다. 인간 집단 내에서 변이성(variations)이 존재하며, 지질학적 또는 민족적 군에서 공통적인 하나의 SNP 대립 유전자는 매우 희귀하다. 단일염기는 폴리뉴클레오타이드 서열에 변화(대체), 제거(결실) 또는 첨가(삽입)될 수 있다. SNP는 번역 프레임의 변화를 유발할 수 있다.

[0023]

단일염기다형성은 유전자의 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic regions)에 포함될 수 있다. 유전자의 코딩 서열 내의 SNP는 유전암호의 중복성(degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열 상에 변화를 일으키지는 않는다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고(침묵 돌연변이라고도 불림), 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP의 경우 비-동의적(non-synonymous)이라고 한다. 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있으며, 미스센스 변화는 다른 아미노산을 발생시키는 반면에 넌센스 변화는 비정숙 종결코돈을 형성한다. 단백질-코딩 부위가 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발시킬 수 있다.

[0024]

본 명세서에서 사용된 SNP의 진뱅크 등록번호(GeneBank Accession number)는 NCBI dbSNP의 확인번호(identification number)를 의미하는 것으로 상기 각 SNP의 서열 및 그 위치를 나타내는 것이다. 당업자라면 상기 등록번호를 이용하여 SNP의 위치 및 서열을 용이하게 확인할 수 있다. 또한, NCBI에 등록되어 있는 SNP의 rs 번호에 해당하는 구체적인 서열은 시간이 지남에 따라 약간 변경될 수 있으나, 본 발명의 범위가 상기 변경된 서열에도 미치는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0025]

인간의 DNA 서열 상의 변이성은 병의 발병 및 인간이 어떻게 병원체, 화학물질, 약물, 백신 및 다른 시약에 반응하는가에 영향을 미칠 수 있다. 또한, SNP는 맞춤형 의학의 개념을 실현하기 위한 중요한 도구(keyenabler)로 생각된다. 무엇보다도, 최근에 마커로서 활발하게 개발되고 있는 SNP는 질병을 가지거나 또는 가지지 않는 군들 간에 게놈 부위를 비교함으로써 질병을 진단하는 생의학적 연구에서 가장 중요하다. SNP는 인간 게놈의 가장 많은 변이이며, 1.9 kb 당 하나의 SNP 비율로 존재하는 것으로 추측되고 있다(Sachidanandam et al., 2001). SNP는 매우 안정된 유전적 마커이고, 때때로 표현형에 직접적인 영향을 미치며, 자동화된 유전자형 규명 시스템에 매우 적합하다(Landegren et al., 1998; Isaksson et al., 2000). 또한, SNP 연구는 곡식 및 가

축 육성 프로그램에서도 중요하다.

- [0026] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0028] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산의 제1위치에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 본 명세서에서, 프라이머 서열과 관련하여 사용되는 용어, “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [0029] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍 시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 용어 “어닐링” 또는 “프라이밍”은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.
- [0030] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것(예컨대, 대사 이상 또는 당뇨병의 동정), 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 SNP를 마커로 하여 이의 존재가 상술한 방법을 통해 확인되면 유방암의 발병 위험도가 높은 것으로 판단된다.
- [0032] 본 발명에서 용어 “아시아”는 한국, 중국 및 일본 등을 비롯한 몽골계 인종이 거주하는 극동 지역을 의미한다. “아시아인”이란 조상이 아시아인인 개체군을 의미하며, 바람직하게는 적어도 10대 이상의 조상이 아시아인인 개체군을 의미한다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 아시아인은 한국인이다.
- [0033] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0034] 본 발명은 OCTN1(organic cation/carnitine transporter 1) mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 2063번째 염기가

C(g.-2063A>C), 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661), 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660), 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 538번째 염기가 G(g.-538C>G; rs460089), 510번째 염기가 T(g.-510C>T) 및 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)로 구성된 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 포함하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트를 제공한다.

[0035] 상기 단일염기다형성은 하기 표의 H1 내지 H4로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나의 일배체형인 것이 바람직하다.

일배체형	유전자 변이						
	g.-2063 A>C	g.-1875 T>A	g.-1745 A>G	g.-1145 A>G	g.-538 C>G	g.-510 C>T	g.-248 C>G
H1	A	T	<u>G</u>	G	G	C	G
H2	A	T	A	<u>A</u>	<u>C</u>	C	<u>C</u>
H3	A	<u>A</u>	A	G	G	C	G
H4	A	T	A	G	G	C	G

[0036]

[0037] 상기 OCTN1은 진뱅크 넘버 NM_003059.2이거나, 본 명세서에 서열번호 12로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 SNP를 포함하는 20 내지 100개의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0038] 상기 OCTN1 mRNA 서열의 전사 시작부위로부터, 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661) 또는 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660)인 SNP는 OCTN1 프로모터 활성을 증가시키고, 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)인 SNP는 OCTN1 프로모터 활성을 감소시키는 것이 바람직하다.

[0039] 상기 OCTN1 프로모터 활성은 약물의 반응성 및 질병의 감수성 확인을 위한 것인 것이 바람직하며, 상기 약물은 가바펜틴(gabapentin), 메트포르민(metformin), 세팔렉신(cephalexin), 세프라딘(cephradine), 시메티딘(cimetidine), 및 프로카인아미드(procainamide)로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 또한, 상기 질병은 크론병(Crohn's disease)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0040] 상기 일배체형은 OCTN1 전사 억제자인 nuclear factor Y(NF-Y)와 결합하는 것이 바람직하며 상기 NF-Y는 제 2항의 H1, H2 및 H4와 결합 친화도가 높은 것이 바람직하다.

[0041] 또한, 상기 키트는 상기 폴리뉴클레오티드를 프라이머로서 포함하는 동시에 증폭에 필요한 시약을 포함할 수 있고, 이를 위하여 핵산의 증폭에 필요한 시약을 더 포함할 수 있으며, 이때, 상기 핵산은 검출가능한 표지로 표시될 수 있다. 또한, 상기 검출가능한 표지로는 스트렙타비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(streptavidin-like phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescence) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 추가적으로 포함하여 혼성화하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0042] 또한, 상기 혼성화는 완충용액, 역전사효소(reverse transcriptase), dNTP, rNTP(사전혼합형 또는 분리공급형), 표식시약, 및 세척 완충용액으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 추가적으로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 프라이머는 표적 부위인 상기 SNP를 증폭할 수 있고, 크기 및 주형에 결합하는 위치가 제한되지 않으며, 당업자라면 통상의 프라이머 선정용 소프트웨어를 이용하여 용이하게 프라이머의 고안이 가능할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 OCTN1 mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 2063번째 염기가 C(g.-2063A>C), 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661), 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660), 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 538번째 염기가 G(g.-538C>G; rs460089), 510번째 염기가 T(g.-510C>T) 및 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)인 SNP 부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트를 제공한다.

[0044] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 OCTN1 프로모터 지역에서 유전적 변이체를 확인하기 위해, 대한민국 서울에 위치한 서울대학교 한국 약물 유전학 연구 네트워크(Korea Pharmacogenomics Research Network)의

DNA 은행으로부터 건강한 한국인 지놈 DNA 48개의 샘플을 수득하여 2,136 bp PCR 단편(번역 시작 사이트로부터 -2,240 에서 -105 bp)을 증폭하였고, automated genetic analyzer(Life Technologies, Carlsbad, CA)를 이용하여 직접 서열분석(sequencing)하였다. 일배체형(haplotype) 어셈블리는 Haploview program(version 4.2, developed by the Broad Institute, Cambridge, MA)를 이용하여 수행하였고 뉴클레오티드 위치 번호는 OCTN1의 mRNA 서열(GenBank accession number; NM_003059.2)에 기초하여 번역 개시 사이트에서 결정하였다. 그 결과, OCTN1 프로모터 영역의 7개의 변이체를 확인하였으며, 이 중 두 개는 신규한 것으로 확인되었다(표 1 참조). 각각의 유전적 데이터를 사용하여 어셈블된 공통 일배체형의 빈도수를 나타내었다(frequency $\geq 5\%$)(표 2 참조). g.-1745A>G에 마이너 대립유전자(minor allele) 하나를 제외한 모든 주요 대립유전자(major allele)로 구성된 일배체형 1(H1)은 본 발명의 집단에서 가장 일반적인 일배체형이었으며, 일배체형 2(H2)는 g.-1145A>G, g.-538C>G, 및 g.-248C>G에서 3개의 마이너 대립유전자를 포함하며, 참조 서열(NM_003059.2)을 포함하였으며, 본 발명에서 상기 일배체형 2를 OCTN1 참조 일배체형(OCTN1 reference haplotype)으로 사용하였다.

[0045] 또한, 본 발명자들은 OCTN1 프로모터 변이의 기능적 영향을 확인하기 위해 OCTN1 프로모터 참조 서열(NM_003059.2)의 지놈 DNA 샘플로부터 OCTN1 유전자 2,127 bp를 증폭하여 pGL4.11b[luc2] 벡터에 삽입시켰다. 이로써, 제작된 pGL4.11b-OCTN1 벡터로부터 OCTN1 프로모터 변이체 리포터 플라스미드는 QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 이용하여 제작되었으며 서열분석(direct sequencing)을 통해 DNA 서열을 확인하였다.

[0046] 또한, 본 발명자들은 상기에서 제작한 OCTN1 참조(reference) 및 이의 변이체(variant) 리포터 플라스미드를 이용하여 프로모터의 활성을 측정하였으며 그 결과, 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms; SNP)을 포함하는 세 개의 일배체형(H1, H3, H4) 모두에서 참조 일배체형과 비교하여 23~45% 프로모터 활성이 크게 감소하는 것을 확인하였다(도 1a 참조). 또한, 일배체형에 존재하는 각각의 단일염기다형성의 루시퍼레이스 활성을 측정하였으며, 5개의 변이체 중 두 개(g.-1875T>A 및 g.-1745A>G)가 프로모터 활성이 증가한 반면에, 두 개(g.-1145A>G 및 g.-248C>G)는 활성이 감소하였으며, g.-538C>G의 활성을 참조(reference, H2)와 비슷하였다(도 1b 참조). 프로모터 활성의 감소를 나타낸 세 개의 일배체형 모두는 g.-1145A>G 및 g.-248C>G 변이체를 가지고 있으나, H1 및 H3은 각각 프로모터 활성을 증가시키는 g.-1745A>G 및 g.-1875T>A 변이체를 가지고 있다.

[0047] 또한, 본 발명자들은 OCTN1 프로모터 변이체의 전사 조절 메커니즘을 조사하기 위해, TFSearch(version 1.3, developed by RWCP, Tokyo, Japan) 및 MatInspector(Genomatrix Software GmbH, Munich, Germany)을 사용하여 일배체형 1, 3 및 4에 존재하는 각 변이체 부근에서 OCTN1의 프로모터 영역에 결합할 수 있는 전사 인자를 파악하였고 그 결과, 오직 변이체 g.-1875T>A가 전사 인자 NF-Y(nuclear factor-Y)의 결합 친화도에 영향을 주는 것으로 예측되었다. 상기 예측된 전사인자 및 OCTN1의 결합을 확인하기 위하여 전기 영동 이동성 시프트 분석(Electrophoretic mobility shift assay of OCTN1)을 수행하였고 그 결과, 참조(g.-1875T) 프로브는 NF-Y consensus 프로브와 같은 위치에서 검출되는 DNA-단백질 복합체를 형성하였지만, 강도는 감소하였다(lanes 1 및 4, 도 2a 참조). 그러나, 변이체(g.-1875A) 프로브와 함께 DNA-단백질 복합체의 강도는 매우 약하였다(lane 7, 도 2a 참조). 경쟁 분석 결과에서, 상기 결합 복합체와 표지되지 않은 NF-Y consensus 올리고뉴클레오티드는 경쟁하였지만 NF-Y 서열의 돌연변이 올리고뉴클레오티드와는 경쟁하지 않는 것을 확인하였다(lanes 3 및 6, 도 2a 참조). 또한, NF-YA, NF-YB, 및 NF-YC 항체의 혼합물을 이용한 슈퍼시프트(super-shift) 분석 결과, DNA-단백질 복합체가 NF-Y에 대한 항체의 존재 하에 시프트됨이 관찰되어 이 복합체 내에 NF-Y가 존재함을 재차 확인하였다(lanes 2, 4 및 5, 도 2b 참조).

[0048] 또한, 본 발명자들은 OCTN1 프로모터 활성의 nuclear factor-Y(NF-Y)의 영향을 확인하기 위해, NF-Y 유전자를 pcDNA3.1(+) 벡터에 삽입하여 플라스미드를 제작하였으며, 상기 제작된 플라스미드를 참조서열 또는 변이 리포터 플라스미드와 함께 NF-Y-pcDNA3.1(+) 플라스미드의 양을 5 내지 20 ng으로 증가시키면서 HCT-116 세포주에 공동-형질감염(co-transfection)한 후, OCTN1 프로모터 활성을 루시퍼레이스 분석을 통해 확인하였다. 그 결과, NF-Y 과발현은 용량존적(dose-dependent)으로 OCTN1 프로모터 활성을 감소시키는 것을 확인하였다(도 3a 참조). 또한, NF-Y는 변형체 g.-1875A 보다 참조 g.-1875T 에서 프로모터 활성에 큰 영향을 가하였다(도 3b 참조).

[0049] 따라서, 본 발명의 OCTN1 프로모터 영역에 g.-1875T>A 변이 또는 g.-1745A>G 변이가 발생하였을 때 상기 프로모터의 활성이 유의적으로 증가하고, g.-1145A>G 변이 또는 g.-248C>G 변이가 발생하였을 때 상기 프로모터 활성이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 본 발명의 g.-1875T>A 변이는 OCTN1 전사 억제자인 nuclear factor Y(NF-Y)와 결합 친화도가 낮아 OCTN1 프로모터 활성을 증가시키는데 관여한다는 것을 확인함으로써, 본

발명의 OCTN1 단일염기다형성은 약물의 반응성 및 질병의 감수성 확인을 위한 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트 및 이를 이용한 확인방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명은

[0051] 1) 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈(genome) DNA를 추출하는 단계;

[0052] 2) 상기 단계 1)의 게놈 DNA 서열에서 OCTN1 mRNA 서열의 전사 시작부위로부터 2063번째 염기가 C(g.-2063A>C), 1875번째 염기가 A(g.-1875T>A; rs3761661), 1745번째 염기가 G(g.-1745A>G; rs3761660), 1145번째 염기가 G(g.-1145A>G; rs162887), 538번째 염기가 G(g.-538C>G; rs460089), 510번째 염기가 T(g.-510C>T) 및 248번째 염기가 G(g.-248C>G; rs460271)인 군으로부터 선택되는 어느 하나의 SNP 부위를 확인하는 단계; 및

[0053] 3) 상기 단계 2)의 결과를 확인하는 단계를 포함하는 OCTN1 프로모터 활성 확인방법을 제공한다.

[0054] 상기 방법에 있어서, 피검체로부터 분리된 시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계는 당업계에 알려진 방법을 통해서 수행될 수 있다. 예컨대, 관심 DNA가 세포에 있을 때 순수한 DNA를 제조하기 위하여 먼저 세포 추출물을 제조한 다음, 차등 침강(differential precipitation), 칼럼 크로마토그래피, 유기용매 추출 등을 더 수행할 수 있고, 상기 추출물은 해당 기술분야의 표준기술에 의해서 제조될 수 있다. 상기와 같은 방법으로 세포 또는 조직으로부터 분리한 DNA는 직접적으로 정제하거나 PCR 또는 RT-PCT(real time PCR)과 같은 증폭 방법을 사용하여 특정 영역을 특이적으로 증폭하고 이를 분리함으로써 이루어질 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 상기 DNA는 DNA뿐만 아니라 mRNA로부터 합성되는 cDNA도 포함한다. 또한, PCR 또는 RT-PCR은 개체의 전체 DNA 서열에 대해 수행될 수도 있지만, 단일염기다형성으로 알려져 있는 부위 주변만에 대해서도 수행될 수 있다. 또한, 상기 시료는 머리카락, 혈액, 조직, 세포, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 소변으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0055] 상기 방법에 있어서, 분리된 DNA의 염기서열의 결정은 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들면, 디데옥시법에 의하여 직접적인 DNA의 뉴클레오타이드 서열의 결정을 통하여 이루어지거나 단일염기다형성 부위의 서열을 포함하는 프로브 또는 그에 상보적인 프로브를 상기 DNA와 혼성화시키고 그로부터 얻어지는 혼성화 정도를 측정함으로써 다형성 부위의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 방법 등이 이용될 수 있다. 상기 혼성화의 정도는 검출가능한 표지를 표적 DNA에 표지하여, 혼성화된 표적 DNA만을 특이적으로 검출함으로써 이루어질 수 있으나, 그외 전기적 신호검출방법 등이 사용될 수 있다. 구체적으로, 마이크로어레이(microarray)에 의한 혼성화, 대립유전자 특이적 탐침 혼성화(allele-specific hybridization), 대립유전자 특이적 증폭(allele-specific amplification), 서열분석(sequencing), 5'뉴클라아제 분해(5'nuclease digestion), 분자비콘어세이(molecular beacon assay), 올리고뉴클레오타이드 결합 어세이(oligonucleotide ligation assay), 크기 분석(size analysis) 및 단일가닥 배좌 다형성(single-stranded conformation polymorphism)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0056] 본 발명의 OCTN1 프로모터 영역에 g.-1875T>A 변이 또는 g.-1745A>G 변이가 발생하였을 때 상기 프로모터의 활성이 유의적으로 증가하고, g.-1145A>G 변이 또는 g.-248C>G 변이가 발생하였을 때 상기 프로모터 활성이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 본 발명의 g.-1875T>A 변이는 OCTN1 전사 억제자인 nuclear factor Y(NF-Y)와 결합 친화도가 낮아 OCTN1 프로모터 활성을 증가시키는데 관여한다는 것을 확인함으로써, 본 발명의 OCTN1 단일염기다형성은 약물의 반응성 및 질병의 감수성 확인을 위한 OCTN1 프로모터 활성 조절 확인용 키트 및 이를 이용한 확인방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0057] 이하, 본 발명을 실시예에 의해서 상세히 설명한다.

[0058] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0059] <실시예 1> OCTN1(organic cation/carnitine transporter 1) 프로모터 영역의 유전적 변이체의 확인

[0060] OCTN1 프로모터 지역에서 유전적 변이체를 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 본 연구는 대한민국

국 서울 이대목동병원의 임상 시험 심사위원회의 승인을 받아 수행하였다(ECT 12-15-02).

[0061] 구체적으로, 대한민국 서울에 위치한 서울대학교 한국 약물 유전학 연구 네트워크(Korea Pharmacogenomics Research Network)의 DNA 은행으로부터 건강한 한국인 지놈 DNA 48개의 샘플을 획득하였다. 본 발명에 사용된 상기 유전자는 동아시아 민족배경을 가지고 있는 것을 사용하였다. OCTN1의 프로모터 지역에서 유전적 변이체를 확인하기 위해, 2,136 bp PCR 단편(번역 시작 사이트로부터 -2,240 에서 -105 bp)을 증폭하였고, automated genetic analyzer(Life Technologies, Carlsbad, CA)를 이용하여 직접 서열분석(sequencing)하였다. 일배체형(haplotype) 어셈블리는 Haploview program(version 4.2, developed by the Broad Institute, Cambridge, MA)를 이용하여 수행하였다. 뉴클레오티드 위치 번호는 OCTN1의 mRNA 서열(GenBank accession number; NM_003059.2)에 기초하여 번역 개시 사이트에서 결정하였다.

[0062] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 OCTN1 프로모터 영역의 7개의 변이체를 확인하였으며, 이 중 두 개는 신규한 것으로 확인되었다(표 1). 각 변이체의 이름은 인간 게놈 변이 협회(Human Genome Variation Society; HGVS)의 명명법에 따랐다. 표 2에는 각각의 유전적 데이터를 사용하여 어셈블된 공통 일배체형의 빈도수를 나타내었다(frequency $\geq$ 5%). g.-1745A>G에 마이너 대립유전자(minor allele) 하나를 제외한 모든 주요 대립유전자(major allele)로 구성된 일배체형 1(H1)은 본 발명의 집단에서 가장 일반적인 일배체형이었다. 일배체형 2(H2)는 g.-1145A>G, g.-538C>G, 및 g.-248C>G에서 3개의 마이너 대립유전자를 포함하며, 참조 서열(NM_003059.2)을 포함하였다(표 2). 따라서, 본 발명에서 상기 일배체형 2를 OCTN1 참조 일배체형(OCTN1 reference haplotype)으로 사용하였다.

표 1

[0063] 프로모터 부위에서 OCTN1 유전적 변화의 빈도수

rs 번호	변이체	마이너 대립유전자	마이너 대립유전자 빈도수
-	g.-2063A>C	C	0.021
rs3761661	g.-1875T>A	A	0.260
rs3761660	g.-1745A>G	G	0.375
rs162887	g.-1145A>G	A	0.313
rs460089	g.-538C>G	C	0.313
-	g.-510C>T	T	0.010
rs460271	g.-248C>G	C	0.313

표 2

[0064] 프로모터 부위에서 공통 OCTN1 일배체형의 빈도수

ID	g.-2063 A>C	g.-1875 T>A	g.-1745 A>G	g.-1145 A>G	g.-538 C>G	g.-510 C>T	g.-248 C>G	빈도수
H1	A	T	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	C	<u>G</u>	0.375
H2	A	T	A	<u>A</u>	<u>C</u>	C	<u>C</u>	0.302
H3	A	<u>A</u>	A	<u>G</u>	<u>G</u>	C	<u>G</u>	0.240
H4	A	T	A	<u>G</u>	<u>G</u>	C	<u>G</u>	0.052

[0065] 단일염기다형성(SNPs; single nucleotide polymorphism)는 굵은 글씨로 표시하였다.

[0066] 마이너 대립유전자는 밑줄로 표시하였다.

[0067] <실시예 2> OCTN1 플라스미드 및 이의 변이체 구축

[0068] OCTN1 프로모터 변이의 기능적 영향을 확인하기 위해 OCTN1 프로모터 참조 서열(OCTN1 reference sequence)을 포함하는 리포터 플라스미드를 제작하였다.

[0069] 구체적으로, OCTN1 프로모터 참조 서열(NM_003059.2)의 지놈 DNA 샘플로부터 OCTN1 유전자 2,127 bp를 제한 효소 XhoI 및 HindIII가 인식하는 사이트를 포함하는 하기 표 3에 개시한 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 증

폭된 생산물은 pGL4.11b[luc2] 벡터에 삽입시켰다. 이로써, 제작된 pGL4.11b-OCTN1 벡터로부터 OCTN1 프로모터 변이체 리포터 플라스미드는 QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit(Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 및 표 1에 기재한 프라이머(서열번호 3 내지 7)를 이용하여 제작되었으며 서열분석(direct sequencing)을 통해 DNA 서열을 확인하였다.

표 3

[0070]

OCTN1 리포터 플라스미드 구축에 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

OCTN1 프로모터 클로닝을 위한 프라이머 ¹		
Reference (-2,102 to +25; 2,127 bp)		
Sense (XhoI site)	5' - CTC GAG GCA CTT GTC TCT GGT GCA AA- 3'	서열번호 1
Antisense (HindIII site)	5' - AAG CTT CGA TCA CCT CGT CGT AGT CC- 3'	서열번호 2
OCTN1 돌연변이 유발 PCR을 위한 프라이머 ²		
g.-1875T>A	5' -CTG ATC TTG GTC ATC GCC AA AAC CAT CTC AAT TTC ACA-3'	서열번호 3
g.-1745A>G	5' -CTT ATA TAC GTT CTT GTC TCC AGC TTT GCT CTA TTA TAT GGG GTG-3'	서열번호 4
g.-1145A>G	5' -GGA GAA AGC TCT GGC AGC CTG CCG CGA-3'	서열번호 5
g.-538C>G	5' -GCC CGG GGC GAC GCG GCC C-3'	서열번호 6
g.-248C>G	5' -CCC CGC GCC GGG CCG GGG A-3'	서열번호 7

[0071]

¹제한효소사이트는 밑줄 및 굵은 글씨로 표시하였다.

[0072]

²단일염기다형성(SNP) 사이트는 밑줄 및 굵은 글씨로 표시하였다.

[0073]

<실시예 3> OCTN1 프로모터 활성 측정

[0074]

상기 <실시예 2>에서 제작한 OCTN1 참조(reference) 및 이의 변이체(variant) 리포터 플라스미드를 이용하여 프로모터의 활성을 측정하기 위해 Dual-Luciferase® Reporter Assay System(Promega, 미국)을 제조사의 사용설명서대로 사용하였고, 양을 측정하기 위하여 Glomax 96-well plate luminometer(Promega, 미국)를 사용하였다. 이전의 연구에서 네 개의 세포주, ACHN(인간 신장 선암), HepG2(인간 간암), HeLa(인간 자궁 경부암) 및 HCT-116 세포에서 OCTN1 프로모터 활성을 측정하기 위해 테스트되었으며, 이 중 OCTN1-참조-HCT-116 세포가 가장 높은 프로모터 활성을 보였다[18]. 따라서, HCT-116 세포를 본 발명의 루시퍼레이즈 분석을 수행하는데 사용하였다.

[0075]

구체적으로, 37℃, 5% CO₂ 환경에서 배양한 HCT-116 세포주(American type culture collection, 미국)를 96-웰 플레이트에 분주하고, 상기 제작된 OCTN1 참조서열 및 이의 변이체를 Lipopectamine(Invitrogen, 미국)을 사용하여 제조사의 사용설명서대로 형질주입(transfection)하였다. 형질주입 30시간 후, 루시퍼라제 활성을 측정하여 정량하였고, 상대적인 루시퍼레이즈 활성은 renilla luciferase에 대한 firefly luciferase의 비로 정의하였다.

[0076]

그 결과, 도 1a에서 나타낸 바와 같이 단일염기다형성(single nucleotide polymorphisms; SNP)을 포함하는 세 개의 일배체형(H1, H3, H4) 모두에서 참조 일배체형과 비교하여 23~45% 프로모터 활성이 크게 감소하는 것을 확인하였다(도 1a). 또한, 일배체형에 존재하는 각각의 단일염기다형성의 루시퍼레이즈 활성을 측정하였으며, 5 개의 변이체 중 두 개(g.-1875T>A 및 g.-1745A>G)가 프로모터 활성이 증가한 반면에, 두 개(g.-1145A>G 및 g.-248C>G)는 활성이 감소하였으며, g.-538C>G의 활성을 참조(reference, H2)와 비슷하였다(도 1b). 이러한 결과는 OCTN1 일배체형으로부터 얻은 루시퍼레이즈 분석 결과(H1 및 H3의 활성은 H4보다 높았다.)와 일치하였다. 프로모터 활성의 감소를 나타낸 세 개의 일배체형 모두는 g.-1145A>G 및 g.-248C>G 변이체를 가지고 있으나, H1 및 H3은 각각 프로모터 활성을 증가시키는 g.-1745A>G 및 g.-1875T>A 변이체를 가지고 있다.

[0077] <실시예 4> OCTN1 프로모터 영역 내의 전사인자(transcriptional factor)인 NF-Y 결합 친화도에 있어서 변이체 g.-1875T>A의 영향 확인

[0078] 상기 <실시예 3>의 결과, OCTN1 프로모터 변이체의 전사 조절 메커니즘을 조사하기 위해, 본 발명자들은 TFSearch(version 1.3, developed by RWCP, Tokyo, Japan) 및 MatInspector(Genomatix Software GmbH, Munich, Germany)을 사용하여 일배체형 1, 3 및 4에 존재하는 각 변이체 부근에서 OCTN1의 프로모터 영역에 결합할 수 있는 전사 인자를 파악하였다. 그 결과, 오직 변이체 g.-1875T>A가 전사 인자 NF-Y(nuclear factor-Y)의 결합 친화도에 영향을 주는 것으로 예측되었다. 즉, 전사 인자 결합 부위(transcription factor binding site; TFBS) 분석에서 NF-Y는 변이체 g.-1875A 대립유전자보다 참조 g.-1875T 대립유전자와의 결합 친화도가 더욱 높을 것이라 판단되었다. 따라서, 상기 예측된 전사인자 및 OCTN1의 결합을 확인하기 위하여 전기영동 이동성 시프트 분석(Electrophoretic mobility shift assay of OCTN1)을 수행하였다.

[0079] 구체적으로, HCT-116 세포주로부터 수득한 핵단백질 추출물(nuclear protein extract) 25 μ g 또는 35 μ g을 7% 글리세롤(glycerol), 10 mM HEPES(pH 7.9), 1 mM EDTA(pH 8.0), 1 mM DTT, 및 0.2 μ g 폴리(데옥시이노시네이트-데옥시사이티딜레이트)[poly(deoxyinosinate-deoxycytidylate)]가 포함된 완충액에 ³²P-표지된 올리고뉴클레오타이드(2 x 10⁵ counts/min)를 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰고, 상기 올리고뉴클레오타이드의 서열은 하기 표 4에 나타내었다. 경쟁분석(competition assay)을 위해서, 라벨되지 않은 NF-Y 또는 NF-Y의 공통서열 돌연변이 올리고뉴클레오타이드 50배 농도를 결합 반응 전 핵 추출물에 추가하였다. 슈퍼시프트(supershift) 분석을 위해서는, NF-YA(sc-7712, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), NF-YB(sc-7711X, Santa Cruz Biotechnology) 및 NF-YC(sc-7714X, Santa Cruz Biotechnology) 항체의 혼합물 4.2 μ l 또는 myeloid zinc finger-1(MZF-1) 항체(sc-46178X, Santa Cruz Biotechnology) 2 μ l를 결합 반응 전에 핵 추출물과 함께 30 분 동안 상온에서 배양하였다.

[0080] 상기 반응물(reaction mixture)을 6% 비변성 폴리아크릴아마이드 겔(nondenaturing polyacrylamide gel)에 80 V로 1시간 동안 전기영동 하고, 상기 겔을 건조시켜 증감 스크린(intensifying screen)과 함께 CP-BU 필름(Agfa, 벨기에)에 노출시키기 위해 -80℃에서 15시간 동안 두었다. 상기 필름 위에 생성된 밴드(band)의 강도(intensity)는 ImageJ(National Institutes of Health, 미국)를 사용하여 측정되었다.

[0081] 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이 참조(g.-1875T) 프로브는 NF-Y consensus 프로브와 같은 위치에서 검출되는 DNA-단백질 복합체를 형성하였지만, 강도는 감소하였다(lanes 1 및 4, 도 2a 참조). 그러나, 변이체(g.-1875A) 프로브와 함께 DNA-단백질 복합체의 강도는 매우 약하였다(lanes 1 및 4, 도 2a). 그러나, 변이체(g.-1875A) 프로브와 함께 DNA-단백질 복합체의 강도는 매우 약하였다(lane 7, 도 2a). 경쟁 분석 결과에서, 상기 결합 복합체와 표지되지 않은 NF-Y consensus 올리고뉴클레오타이드는 경쟁하였지만 NF-Y 서열의 돌연변이 올리고뉴클레오타이드와는 경쟁하지 않는 것을 확인하였다(lanes 3 및 6, 도 2a). 또한, NF-YA, NF-YB, 및 NF-YC 항체의 혼합물을 이용한 슈퍼시프트(super-shift) 분석 결과, DNA-단백질 복합체가 NF-Y에 대한 항체의 존재 하에 시프트됨이 관찰되어 이 복합체 내에 NF-Y가 존재함을 재차 확인하였다(lanes 2, 4 및 5, 도 2b). 슈퍼시프트를 유도하지 않는 MZF-1(비 NF-Y 항체; non-NF-Y-specific antibody)를 이용하여 분석하였으며 경쟁하지 않는 것으로 확인되었다(lane 3, 도 2b).

표 4

[0082] 전기영동 이동성 시프트 분석(EMSA)을 위한 프라이머

참조(g.-1875T) ¹	5' -GGT CAT CGC CAA TAA CCA TCT CAA T-3'	서열번호 8
변이체(g.-1875A) ¹	5' -GGT CAT CGC CAA AAA CCA TCT CAA T-3'	서열번호 9
Consensus NF-Y ²	5' -ACT TTT AAC CAA T CA GAA AAA T-3'	서열번호 10
돌연변이 consensus NF-Y ³	5' -ACT TTT AAC CGG GCA GAA AAA T-3'	서열번호 11

[0083] ¹ 단일염기다형성(SNP) 사이트는 밑줄 및 굵은 글씨로 표시하였다.

² NF-Y의 공통(consensus) 서열은 밑줄 및 굵은 글씨로 표시하였다.

³ 공통(consensus) 서열의 돌연변이는 밑줄 및 굵은 글씨로 표시하였다.

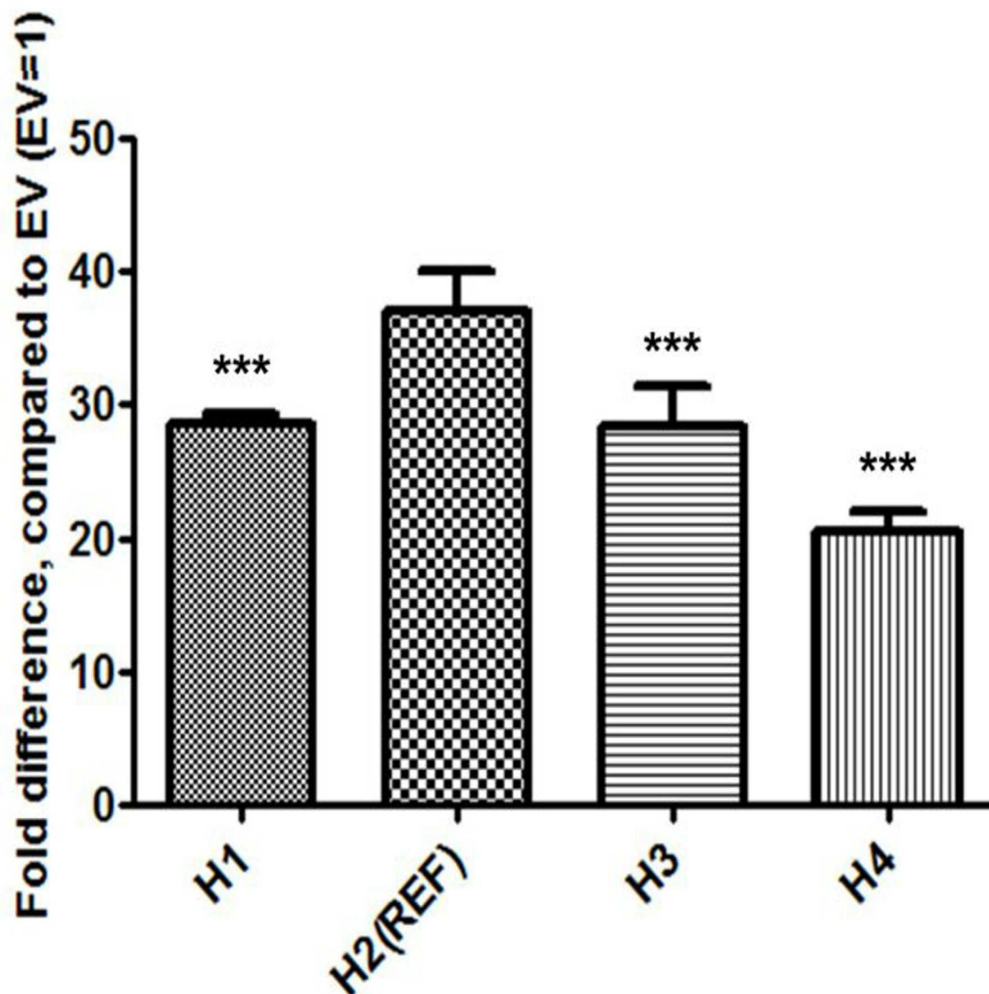
<실시예 5> OCTN1 프로모터 활성화에 있어 NF-Y의 영향 확인

OCTN1 프로모터 활성화의 nuclear factor-Y(NF-Y)의 영향을 확인하기 위해, NF-Y 유전자를 pcDNA3.1(+) 벡터에 삽입하여 플라스미드를 제작하였으며, 상기 제작된 플라스미드를 상기 <실시예 3>의 방법으로 제작된 참조서열 또는 변이 리포터 플라스미드와 함께 NF-Y-pcDNA3.1(+) 플라스미드의 양을 5 내지 20 ng으로 증가시키면서 HCT-116 세포주에 공동-형질감염(co-transfection)한 후, OCTN1 프로모터 활성을 루시퍼레이스 분석을 통해 확인하였다.

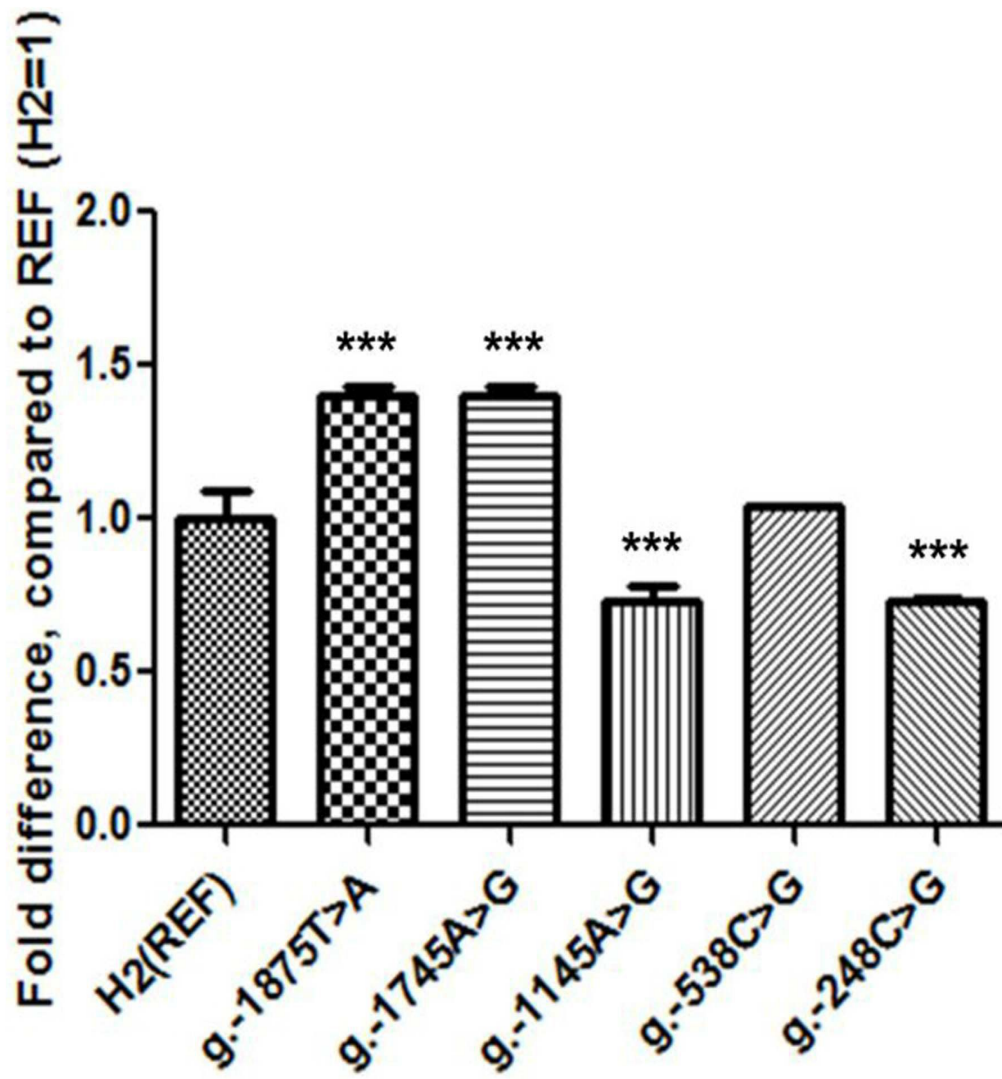
그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이 NF-Y 과발현은 용량의존적(dose-dependent)으로 OCTN1 프로모터 활성을 감소시키는 것을 확인하였다(도 3a). 또한, NF-Y는 변형체 g.-1875A 보다 참조 g.-1875T 에서 프로모터 활성화에 큰 영향을 가하였다(도 3b). 이러한 결과는 참조와 비교하여 프로모터 활성화의 큰 증가를 보여준 OCTN1 g.-1875T>A 변이체를 이용한 루시퍼레이스 분석과 일치하였다.

도면

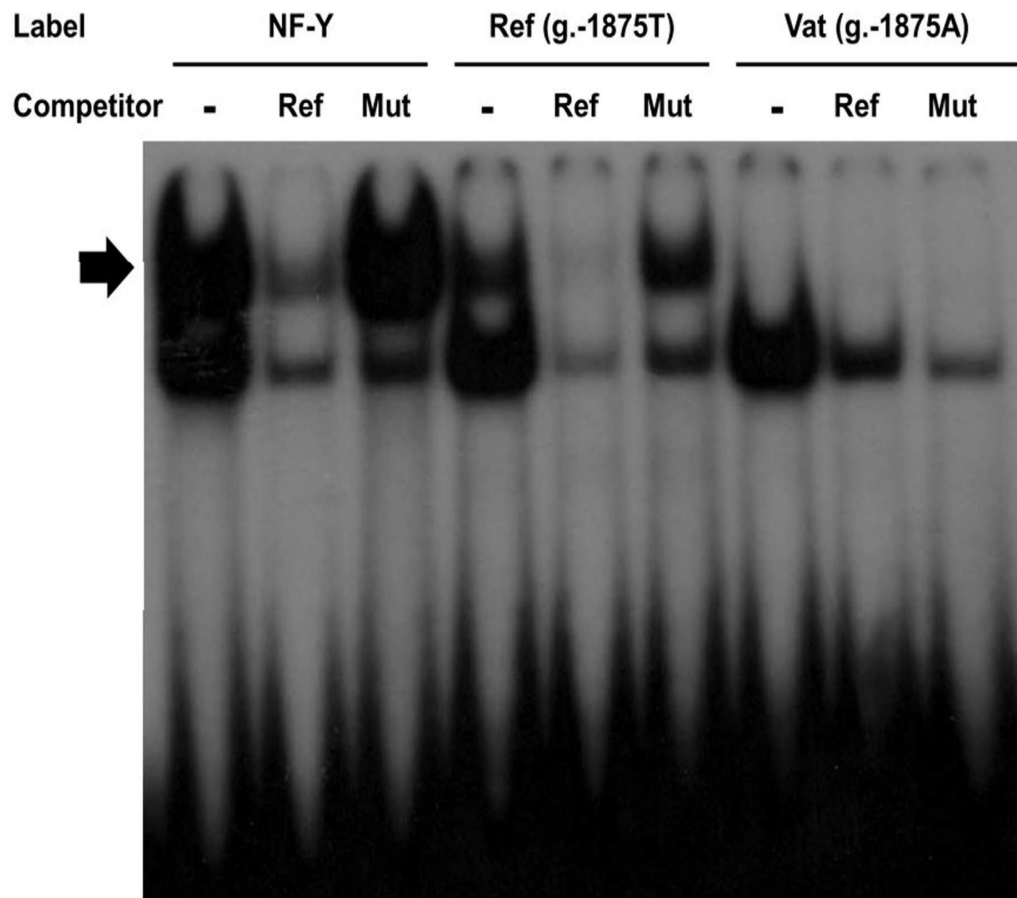
도면1a



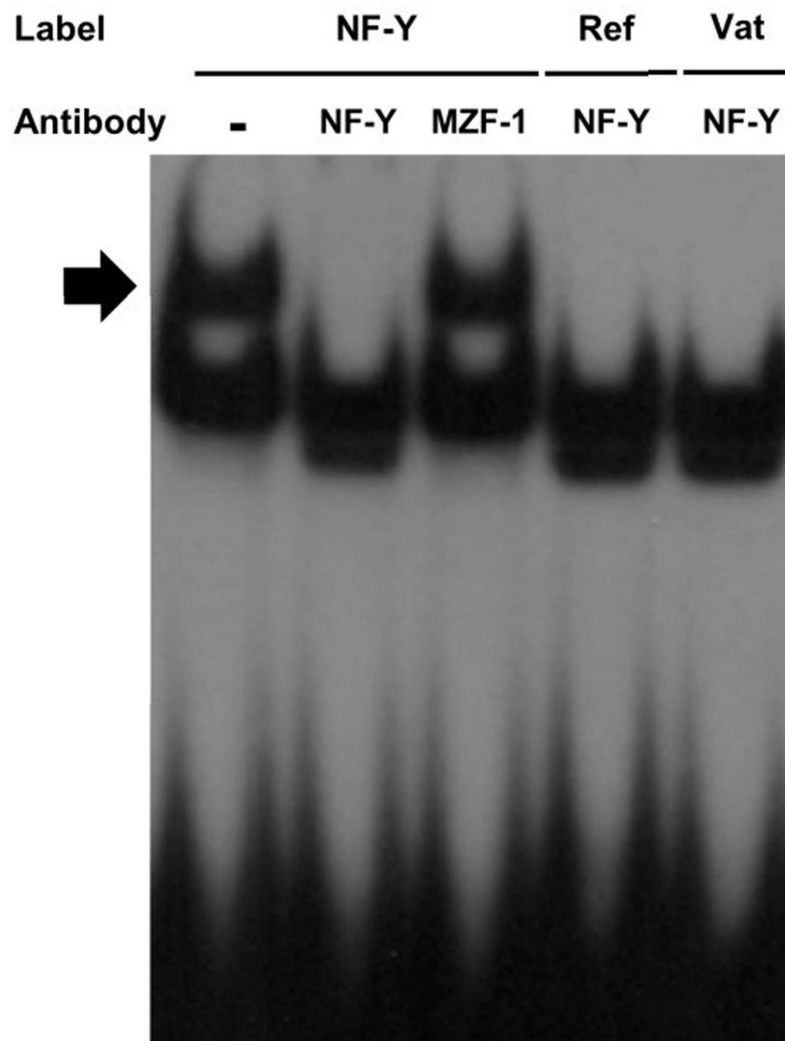
도면1b



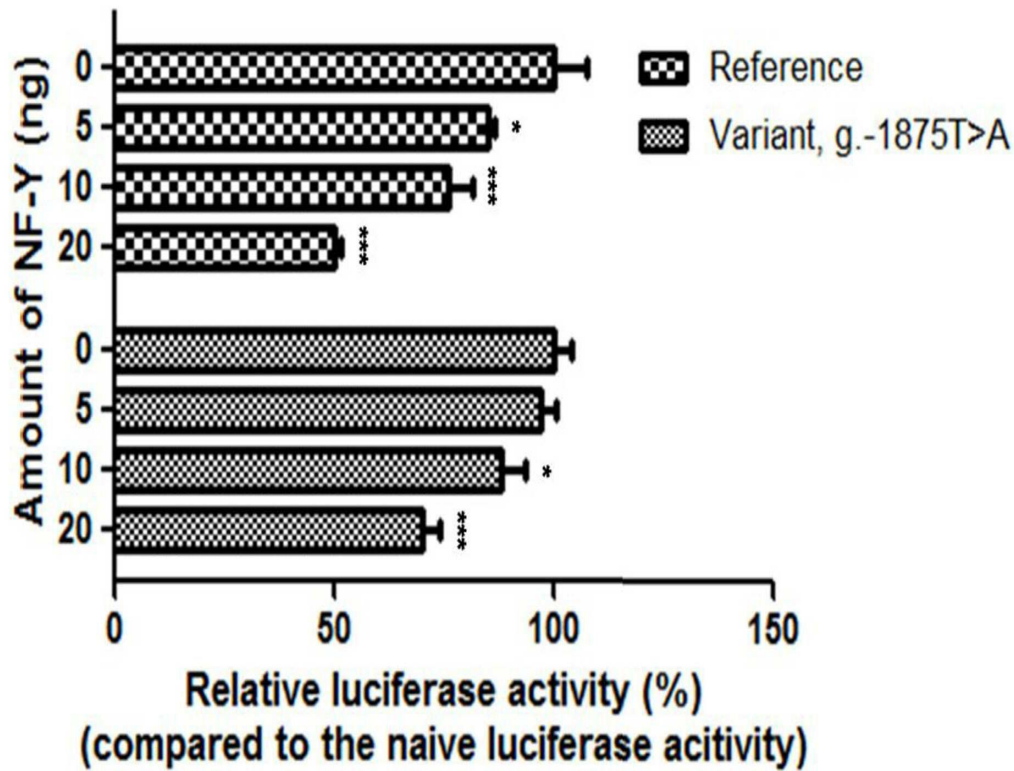
도면2a



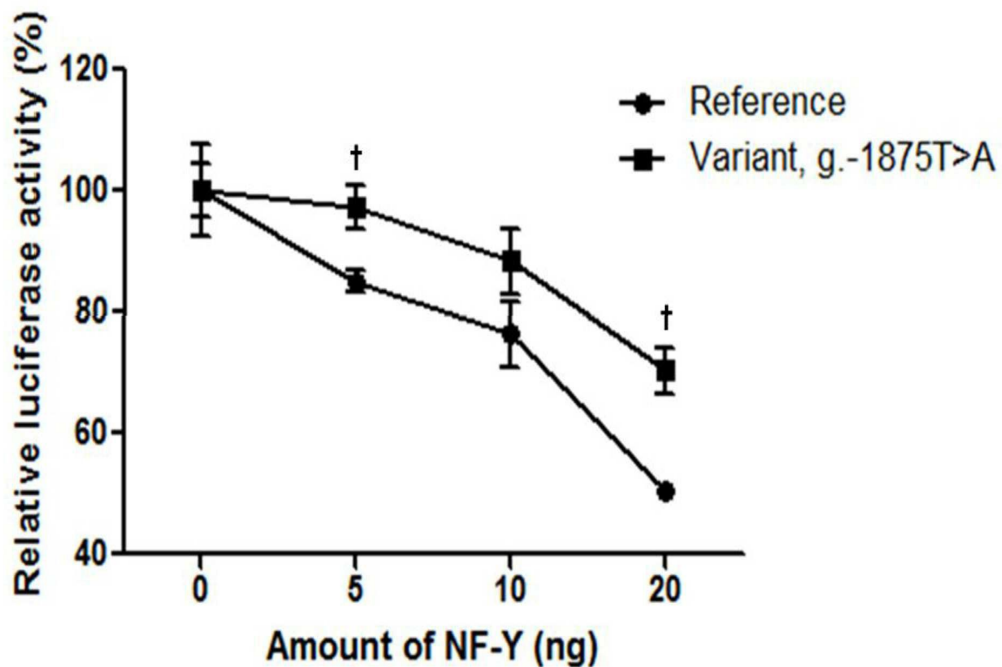
도면2b



도면3a



도면3b



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Single nucleotide polymorphism of organic cation/carnitine transporter 1 gene and use thereof

<130> 2014P-11-028
 <160> 12
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ref(OCTN1)_F
 <400> 1
 ctcgaggcac ttgtctctgg tgcaaa 26
 <210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> Ref(OCTN1)_R
 <400> 2
 aagcttcgat cacctcgtcg tagtcc 26
 <210> 3
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1875TA
 <400> 3
 ctgatcttgg tcatcgccaa aaaccatctc aatttcaca 39
 <210> 4
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1745AG
 <400> 4
 cttatatacg ttcttgtctc cagctttgct ctattatatg ggggtg 45
 <210> 5
 <211> 27

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 1145AG
 <400> 5
 ggagaaagct ctggcagcct gccgcga 27
 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 538CG
 <400> 6
 gcccggggcg acgcggccc 19
 <210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 248CG
 <400> 7
 ccccgcgccg ggccgggga 19

 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ref1875T
 <400> 8
 ggtcatcgcc aataaccatc tcaat 25
 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Var1875A
 <400> 9
 ggtcatcgcc aaaaaccatc tcaat 25
 <210> 10

<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Consensus NF-Y	
<400>	10	
acttttaacc aatcagaaaa at		22
<210>	11	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Mut_consensus NF-Y	
<400>	11	
acttttaacc gggcagaaaa at		22
<210>	12	
<211>	2214	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	12	
cctgtttccc aggaacggtc cccggcttcg cgcaccaatt tctaacagcc tgccctgtccc		60
ccgggaacgt tctaacatcc ttggggagcg cccagctac aagacactgt cctgagaacg		120
ctgtcatcac ccgtagtgc aagtttcgga gcggcagtgga gaagcatgcg ggactacgac		180
gaggtgatcg ctttctctggg cgagtggggg cccttcacgc gctcatctt cttctgtctc		240
agcgccagca tcatcccaa tggcttcaat ggtatgtcag tcgtgttcct ggccggggacc		300
ccggagcacc gctgtcaggt gccgacgcc gcgaacctga gcagcgctg gcgaacaac		360
agtgtcccgc tgcggctcgc ggacggccgc gaggtgcccc acagctgcag ccgctaccgg		420
ctcgccacca tcgccaactt ctcggcgctc gggtgggagc cggggcgcca cgtggacctg		480
gggcagctgg agcaggagag ctgcctggat ggctgggagt tcagccagga cgtctacctg		540
tccaccgtcg tgaccgagtg gaatctggtg tgtgaggaca actggaaggt gcccctcacc		600
acctccctgt tcttcgtagg cgtgtctctc ggctccttcg tgtccgggca gctgtcagac		660
aggtttggca ggaagaacgt tctcttcgca accatggctg tacagactgg cttcagcttc		720
ctgcagatct tctccatcag ctgggagatg ttcactgtgt tatttgtcat cgtgggcatg		780
ggccagatct ccaactatgt ggtagccttc atactaggaa cagaaattct tggcaagtca		840

gttcgtatta tattctctac attaggagtg tgcacatfff ttgcagttgg ctatatgctg	900
ctgccactgt ttgcttactt catcagagac tggcggatgc tgctgctggc gctgacggtg	960
ccgggagtgc tgtgtgtccc gctgtggtgg ttcattcctg aatctccccg atggctgata	1020
tcccagagaa gatttagaga ggctgaagat atcatccaaa aagctgcaaa aatgaacaac	1080
atagctgtac cagcagtgat atttgattct gtggaggagc taaatcccct gaagcagcag	1140
aaagctttca ttctggacct gticaggact cggaatattg ccataatgac cattatgtct	1200
ttgctgctat ggatgctgac ctacagtgggt tactttgtct tgtctctgga tgctccta	1260
ttacatggag atgcctacct gaactgtttc ctctctgcct tgattgaaat tccagcttac	1320
attacagcct ggctgctatt gcgaaccctg cccaggcggt atatcatagc tgcagtactg	1380
ttctggggag gaggtgtgct tctcttcatt caactggtag ctgtggatta ttacttctta	1440
tccattggtc tggatcatgt gggaaaaattt gggatcacct ctgctttctc catgctgtat	1500
gtcttcaactg ctgagctcta cccaaccctg gtcaggaaca tggcgggtggg ggtcacatcc	1560
acggcctcca gagtgggcag catcattgcc cctactttg ttacctcgg tgcttacaac	1620
agaatgctgc cctacatcgt catgggtagt ctgactgtcc tgattggaat cctcaccttt	1680
ttttccctg aaagtttggg aatgactctt ccagaaacct tagagcagat gcagaaagtg	1740
aaatggttca gatctgggaa aaaaacaaga gactcaatgg agacagaaga aaatccaag	1800
gttctaataa ctgcattctg aaaaaatata taccatctt ggtgaagtga aaacagaaa	1860
aataagacc tttggagaaa ttcgttgttc cactgaaat ggactgactg taacgattga	1920
cacaaaaatg aaccttgcta tcaagaaatg ctgctcatac agtaaaactct ggatgattct	1980
tccagataat gtctttgctt tacaaccaa ccatttctag agagtctcct tactcattaa	2040
ttcaatgaaa tggattggta agatgtcttg aaaacatgtt agtcaaggac tggtaaaata	2100
catataaaga ttaacactca tttccaatca tacaataact atccaaataa aaataacatc	2160
attgtattaa cgcaaatatt aggtgacaac aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	2214