(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0044545
(43) 공개일자 2011년04월29일

(51) Int. Cl.
C07K 14/47 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0101278
(22) 출원일자 2009년10월23일
심사청구일자 2009년10월23일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
고제상
서울 영등포구 여의도동 52 은하@ A-707
강혜린
서울 마포구 성산동 114
(74) 대리인
이원희

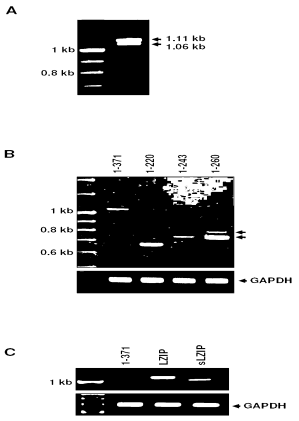
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 신규한 인간 류신 지퍼 단백질 아형 및 이의 용도

(57) 요 약

본 발명은 신규한 인간 류신 지퍼 단백질(leucine zipper protein, LZIP) 아형 및 이의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 신규한 LZIP 아형은 인간 LZIP의 막통과 도메인(아미노산 229-245)이 결핍된 354개의 아미노산으로 구성되어 있으며, LZIP와 달리 주로 핵에 위치하고 주화성 매개 신호경로에 대한 관련성이 없으며, 히스톤 탈아세틸라제(histone deacetylase, HDAC)를 모집 및 활성화시켜 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor, GR) 유전자의 발현을 억제하여 글루코코르티코이드 유도성 GR 전사활성을 억제함으로써, 스트레스 장애, 염증성 질환 및 면역 질환 등의 GR에 의해 매개되는 질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 R0710013
부처명 한국과학재단
연구관리전문기관
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 염증신호전달 네트워크 규명을 통한 신규 동맥경화 제어물질 개발
기여율
주관기관 건국대학교
연구기간 2009년 09월 01일 ~ 2010년 07월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 인간 류신 지퍼 단백질(small leucine zipper protein, sLZIP).

청구항 2

제 1항의 인간 류신 지퍼 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제 2항에 있어서, 서열번호 2로 기재되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제 2항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 5

제 4항의 발현벡터가 숙주세포에 형질전환된 형질전환체.

청구항 6

제 1항의 인간 류신 지퍼 단백질을 유효성분으로 함유하는 글루코코르티코이드 수용체 매개 질환 예방 및 치료용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 글루코코르티코이드 수용체 매개 질환은 스트레스 장애, 염증성 질환 및 자가면역 질환으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

1) 제 1항의 인간 류신 지퍼 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리한 후 배양하는 단계;

2) 배양된 발현 세포주에서 상기 인간 류신 지퍼 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및

3) 상기 인간 류신 지퍼 단백질의 발현 또는 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 글루코코르티코이드 수용체 매개 질환 예방 및 치료제 스크리닝 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 단계 2)의 단백질의 발현 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 11

제 8항에 있어서, 상기 글루코코르티코이드 수용체 매개 질환은 스트레스 장애, 염증성 질환 및 자가면역 질환으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 인간 류신 지퍼 단백질(leucine zipper protein, LZIP) 아형 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인간 류신 지퍼 단백질(leucine zipper protein, LZIP)은 염기성 DNA 결합 도메인, 추정적 막통과 도메인 및 류신 지퍼 도메인을 포함하는 bZIP 전사인자이다(Raggo C, et al., Mol Cell Biol 22:5639-5649, 2002). 편재적으로 발현되는 인간 LZIP는 염기성 글루코코르티코이드 반응 부위(glucocorticoid responsive element, CRE)에 결합하여 세포증식을 조절한다(Freiman RN, et al., Genes Dev 11:3122-3127, 1997). 또한, LZIP는 종양억제제 및 ER 스트레스 관련 단백질 분해 인자로서 기능하는 것으로 알려져 있다(Jin DY, et al., EMBO J 19:729-740, 2000; Liang G, et al., Mol Cell Biol 26:7999-8010, 2006). 이전에 본 발명자들에 의해 인간 LZIP가 CC 케모카인 수용체 1(CC chemokine receptor 1, CCR 1)에 결합하고, CC 케모카인 류코탁틴 1(CC chemokine leukotactin(Lkn)-1)에 의해 유도된 세포 이동에서 양성 조절자인 것을 보고된바 있다(Ko J, et al., FASEB J 18:890-892, 2004). 최근 연구에서는 LZIP가 HIV-1 LTR(long terminal repeat)의 Tat 매개 전사 및 CCR2 발현에 관련되어 있음이 보고된바 있다(Blot G, et al., J Mol Biol 364:1034-1047, 2006; Sung HJ, et al., Exp Mol Med 40:332-338, 2008). 이런 결과는 인간 LZIP가 전사인자 뿐만 아니라 세포 조절자로서 기능을 한다는 것을 나타낸다. 이런 인간 LZIP의 다양한 역할이 제시되어 있음에도 불구하고, 이의 기능이 완전히 알려져 있지 않으며 LZIP의 세포내 위치는 여전히 논쟁의 여지가 있다.

[0003] 인간 *LZIP* 유전자는 염색체 9p(chromosome 9p)에 위치하고, 371개의 아미노산 폴리펩티드를 암호화하는 9개의 엑손(exon)과 8개의 인트론(intron)으로 구성되어 있다(Jang SW, et al., J Biol Chem 282:11092-11100, 2007). LZIP는 마우스, 과일파리 및 선충 서열에 대해 70% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로 진화상의 서열 보존이 높다(Jin DY, et al., EMBO J 19:729-740, 2000; Burbelo PD, et al., Gene 139:241-245, 1994; Abel T, et al., Genes Dev 6:466-480, 1992). 전사 기구에 관련된 전사인자는 세포 프로세스에서 다양한 역할을 하는 다양한 유형의 아형들로 구성된다. 쥐 LZIP 계열 중 2종류인 LZIP-1 및 LZIP-2가 확인된바 있다. LZIP-1의 마우스 cDNA는 379개의 아미노산 잔기 단백질을 암호화하고, LZIP-2는 N-말단에서 25개의 아미노산을 추가적으로 포함한다(Burbelo PD, et al., Gene 139:241-245, 1994). 그러나, 인간 LZIP의 아형은 아직 보고된바 없다.

[0004] 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor, GR)는 핵 수용체 계열 중 하나로서, 항상성, 스트레스 반응 및 염증을 포함하는 다양한 세포 프로세스에서의 글루코코르티코이드(glucocorticoid)의 효과를 매개하는 리간드 의존적 전사인자이다(Cato AC, et al., Bioessays 18:371-378, 1996). 글루코코르티코이드가 결합된 활성된 GR은 핵내로 들어가고, 여기서 스테로이드 반응 유전자의 프로모터 부위에서 글루코코르티코이드 반응 부

위(glucocorticoid responsive element, GRE)에 결합함으로써 초기 반응에서 리간드에 의해 활성화된 전사 자극자(stimulator) 또는 억제자(repressor)로서 기능을 한다(Mangelsdorf DJ, et al., Cell 83:835-839, 1995).

[0005] GR은 억제보체(corepressor) 및 공동활성보체(coactivator)의 조절자를 모은 다음, 이의 전사활성을 조절하는 것이 가능하다(Ito K, et al., J Exp Med 203:7-13, 2006). 현재까지 다양한 GR에 상호작용하는 단백질이 GR의 전사 효율을 변경할 수 있음이 보고된바 있다(Adcock IM, et al., Proc Am Thorac Soc 1:247-254, 2004).

[0006] 호르몬에 의해 활성화된 GR은 다른 전사인자 및 보조단백질과 직접 상호작용함으로써 전사에 영향을 줄 수 있다(Rogatsky I, et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:16701-16706, 2002). 글루코코르티코이드는 GR의 하향 조절(down-regulation)을 유도하고, 상기 조절은 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 발생한다고 보고된바 있다(Bellingham DL, et al., Mol Endocrinol 6:2090-2102, 1992; Dong Y, et al., Proc Natl Acad Sci USA 85:767-771, 1988). 레티노이드 수용체(retinoid receptor) 및 티로이드 호르몬 수용체(thyroid hormone receptor)를 위한 핵 수용체 억제보체 및 침묵 매개체(silencing mediator)를 포함하는 억제보체, 및 관련된 히스톤 탈아세틸라제(histone deacetylase, HDAC)는 프로모터 부위에 cis-활성 분자의 접근을 막음으로써 침묵 유전자 전사를 가져오는 히스톤의 탈아세틸화를 유발한다(McKenna NJ, et al., Endocr Rev 20:321-344, 1999). 히스톤 아세틸화는 활성적으로 전사화된 크로마틴에서 유발하는 동적인 프로세스이다(Ito K, et al., J Exp Med 203:7-13, 2006). 염증성 유전자의 증가된 발현과 관련된 히스톤의 아세틸화는 HDAC의 활성에 의해 억제되고, 히스톤을 탈아세틸화시키는 11개의 HDAC는 포유류 세포에서 확인되었다(de Ruijter AJ, et al., Biochem J 370:737-749, 2003; Thiagalingam S, et al., Ann NY Acad Sci 983:84-100, 2003). 다양한 HDAC가 아세틸화의 다양한 패턴을 표적으로 하여 유전자 발현의 다양한 형태를 조절한다는 증거가 있다(Peterson CL, Mol cell 9:921-922, 2002). HDAC 억제제는 성장 억제, 분화, 세포독성 및 세포사멸의 유도를 포함하는 다양한 프로세스에 영향을 주는 유전자의 발현에서 특이적인 변화를 유도한다(de Ruijter AJ, et al., Biochem J 370:737-749, 2003). HDAC 억제제인 뷰티르산염(sodium butyrate)은 GR에 의해 활성화되는 전사를 방해한다고 보고된바 있다(Plesko MM, et al., J Biol Chem 258:13738-13744, 1983). 그러나, GR에 의해 매개되는 기작에서 HDAC의 역할은 여전히 불분명하다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 인간 LZIP 및 이의 용도에 관한 연구를 하던 중, 인간 LZIP의 신규한 아형을 확인하였고, 상기 신규한 인간 LZIP 아형은 기존의 인간 LZIP과 달리 추정적 막통과 도메인(229-245 아미노산 잔기)이 결핍된 354개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 인간 LZIP과 달리 핵내에 주로 위치하고 있으며, 리간드에 의해 유도되는 GR의 전사활성을 억제하는 기능을 가지고 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 신규한 인간 류신 지퍼 단백질(leucine zipper protein, LZIP) 아형, 및 상기 단백질을 이용한 글루코코르티코이드 수용체 매개 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 인간 류신 지퍼 단백질(small leucine zipper protein, sLZIP)을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 sLZIP 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 발현벡터를 형질전환시킨 형질전환체를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 sLZIP 단백질을 유효성분으로 함유하는, 글루코코르티코이드 수용체 매개 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 sLZIP 단백질의 발현을 증가시키는 피검물질을 탐색하여 글루코코르티코이드 수용체 매개

질환 예방 및 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

효 과

[0015] 본 발명의 신규한 인간 류신 지퍼 단백질(leucine zipper protein, LZIP) 아형은 기존의 인간 LZIP과 달리 막통과 도메인(아미노산 229-245)이 결핍된 354개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 핵내에 위치하며, 글루코코르티코이드 유도성 GR 전사활성을 억제하는 특성을 가짐으로써, 상기 단백질을 스트레스 장애, 염증성 질환 및 면역 질환 등의 GR 매개 질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 신규한 인간 류신 지퍼 단백질(small leucine zipper protein, sLZIP), 상기 sLZIP 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터, 및 상기 발현벡터를 형질전환시킨 형질전환체를 제공한다.

[0018] 상기 sLZIP는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2로 기재되는 핵산 서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0019] 본 발명에서는 신규한 인간 류신 지퍼 단백질(small leucine zipper protein, sLZIP) 아형을 동정하기 위해, 인간 단핵구 세포에서 반정량적(semi-quantitative) RT-PCR을 수행하여 LZIP을 발현한 결과, 두개의 다른 크기의 인간 LZIP을 확인하였다(도 1A 참조). 또한, 다양한 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 220-260 부위의 아미노산들이 두 유형의 인간 LZIP 사이 크기 차이를 가져오는 것을 확인하였다(도 1B 참조). 또한, 상기 두 유형의 인간 LZIP 증폭 산물을 pcDNA3.1/V5-His 발현 벡터 내로 클론시킨 후, PCR을 이용한 결과, 두 유형의 인간 LZIP을 확인하였다(도 1C 참조). 아울러, 상기 두 유형의 인간 LZIP을 서열 분석한 결과, LZIP는 371개의 아미노산 크기를 나타내는 밴드를 보였으며, 새롭게 확인된 인간 LZIP 아형은 추정적 막통과 도메인(아미노산 229-245)이 결핍되어 354개의 아미노산 크기를 나타내는 밴드를 보였다(도 2 참조).

[0020] 따라서, 새로운 인간 LZIP 아형을 sLZIP(small LZIP) 아형으로 지칭하였으며, 상기 뉴클레오티드 서열을 유전자 등록번호(GeneBank accession number) FJ263669로 등록하였다.

[0021] 본 발명에서는 신규한 sLZIP 아형의 세포내 위치를 알아보기 위해, 인간 세포 및 조직에서 mRNA 발현을 분석한 결과, 다양한 인간 세포주 및 조직에서 발현되었다(도 3A 및 3B 참조). 또한, 두 유형의 LZIP 아형의 세포내 위치를 분석한 결과, LZIP는 주로 시토졸에 위치한 반면에, sLZIP는 핵에 주로 위치하였다(도 4A 및 4B 참조).

[0022] 따라서, 본 발명의 sLZIP는 인간 LZIP의 새로운 아형이고, 두 LZIP 아형은 세포내 위치가 서로 다르므로 이들이 서로 다른 기능을 하는 것을 알 수 있다.

[0023] 본 발명에서는 신규한 sLZIP 아형이 기존의 인간 LZIP의 특성을 가지는지 알아보기 위해, sLZIP가 Lkn-1 유도성 세포이동에 관련성을 Lkn-1 유무의 존건 하에서 주화성 분석을 수행한 결과, sLZIP로 형질전환된 세포는 LZIP로 형질전환된 세포와 달리 Lkn-1에 대한 영향을 나타내지 않았다.

[0024] 따라서, 본 발명의 sLZIP는 Lkn-1에 의해 유도되는 주화성 신호와 관련성이 없는 것을 알 수 있다.

[0025] 본 발명에서는 신규한 sLZIP 아형이 핵 수용체인 GR과의 상호작용 및 GR의 전사 활성에 관여하는지 알아보기 위해, sLZIP과 GR 사이 단백질과 단백질의 상호작용을 면역침강분석을 이용하여 조사한 결과, sLZIP가 GR에 직접적으로 결합하지 않는 것을 확인하였다. 또한, sLZIP가 GR의 전사 활성에 영향을 미치는지 조사하기 위해, 다양한 양의 sLZIP 발현 플라스미드를 이용하여 GR의 전사 활성을 분석한 결과, Dex로 자극된 세포에서 sLZIP는 농도 의존적으로 루시퍼라제 활성을 감소시켰고, Dex이 결핍된 세포에서 sLZIP는 GR 전사활성에 영향을 미치지 않는 반면에 LZIP는 투여량 의존적으로 루시퍼라제 활성을 증가시켰다(도 5A 및 5B 참조).

[0026] 따라서, 본 발명의 sLZIP는 글루코코르티코이드에 의해 유도되는 GR의 전사활성을 억제하는 특성을 가진 것을

알 수 있다.

[0027] 본 발명에서는 신규한 sLZIP 아형이 GR의 전사 활성을 억제하는지 확인하기 위해, siRNA-sLZIP(siLZIP)를 이용하여 GR의 전사활성을 분석한 결과, sLZIP는 Dex에 대한 반응에서 GR의 전사활성을 감소시킨 반면에, siLZIP는 sLZIP에 의한 GR의 전사활성의 감소를 억제하였다(도 6A, 6B 및 도 7 참조).

[0028] 따라서, 본 발명의 sLZIP는 Dex에 의해 유도되는 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성을 억제하는 것을 알 수 있다.

[0029] 본 발명에서는 신규한 sLZIP 아형이 다른 공동인자의 결합 및 GR의 전사활성 조절에 대한 sLZIP의 LxxLL 모티프와의 관련성을 알아보기 위해, LxxLL 모티프가 수용체 상호작용이 불가능하도록 돌연변이시킨 sLZIP의 돌연변이 형태를 이용하여 GR의 전사활성을 분석한 결과, 돌연변이 sLZIP는 GR의 전사활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타내었다(도 8A 참조).

[0030] 따라서, 본 발명의 sLZIP는 LxxLL 모티프가 공동인자의 결합 및 GR 전사활성의 조절 역할을 하는 것을 알 수 있다.

[0031] 본 발명에서는 LZIP의 위치가 GR의 전사활성에 미치는 영향을 알아보기 위해, LZIP의 결핍 돌연변이 형태를 이용하여 GR의 전사활성을 분석한 결과, 잘못된 위치의 LZIP 돌연변이는 GR의 전사활성을 농도 의존적으로 억제하였다(도 8B 및 도 8C).

[0032] 따라서 LZIP의 위치가 GR 전사활성의 조절에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다.

[0033] 본 발명에서는 HDAC가 sLZIP에 의한 GR 전사활성의 억제와 관련되어 있는지 알아보기 위해, ChIP 분석을 이용하여 조사한 결과, sLZIP가 특정 HDAC를 모집하고, HDAC를 활성시키는 것을 확인하였다. 또한, sLZIP가 HDAC 활성을 자극하는지 확인하기 위해, Dex의 존재유무 하에서 HDAC 활성을 분석한 결과, sLZIP는 HDAC 활성을 증가시켰다(도 9A 및 9B 참조).

[0034] 본 발명에서는 sLZIP에 의한 HDAC 활성의 특이성이 있는지 알아보기 위해, 다양한 HDAC를 이용하여 HDAC 활성을 분석한 결과, 특정 HDAC가 sLZIP으로 형질전환된 세포의 HDAC 활성을 증가시켰다.

[0035] 따라서, 본 발명의 sLZIP는 특정 HDAC를 포함하는 복합체를 모집한 후, 상기 HDAC 활성을 증가시킴으로써 글루코코르티코이드에 대한 반응에서 GR의 전사활성을 조절하는 것을 알 수 있다.

[0036] 본 발명에서는 sLZIP에 의한 GR 전사활성의 억제가 GR에 의해 매개된 유전자인 ANX-I 및 IκB의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위해, 웨스턴 블랏 분석을 수행한 결과, sLZIP는 농도 의존적으로 GR 표적 유전자들의 mRNA 및 단백질 수준을 감소시켰다(도 10A 및 도 10B 참조).

[0037] 따라서, 본 발명의 sLZIP는 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성을 억제하고, 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성 경로에 의해 유도된 유전자 발현의 억제를 유도하는 것을 알 수 있다.

[0038] 상기 실시 태양의 결과를 종합하면, 본 발명의 신규한 sLZIP 아형은 인간 LZIP의 막통과 도메인(아미노산 229-245)이 결핍된 354개의 아미노산으로 구성되어 있으며, LZIP와 달리 주로 핵에 위치하고 주화성 매개 신호경로에 대한 관련성이 없으며, HDAC를 모집 및 활성화시켜 글루코코르티코이드 유도성 GR 전사활성을 억제하는 것을 알 수 있다. 즉, sLZIP 아형은 GR 전사활성을 억제함으로써, GR에 의해 매개되는 질환인 스트레스 장애, 염증성 질환 또는 면역 질환의 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 본 발명의 sLZIP 단백질을 유효성분으로 함유하는 글루코코르티코이드 수용체(GR) 매개 질환 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명의 sLZIP는 HDAC를 모집 및 활성화시켜 GR 유전자의 발현을 억제하여 글루코코르티코이드 유도성 GR 전사활성을 억제함으로써, 상기 sLZIP을 스트레스 장애, 염증성 질환 및 면역 질환 등의 GR 매개 질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0041] 상기 sLZIP는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0042] 상기 GR 매개 질환은 스트레스 장애, 염증성 질환 및 자가면역 질환으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0043] 상기 조성물은 본 발명의 sLZIP 단백질에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.

[0044] 상기 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0045] 상기 조성물의 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 ㎎/㎏이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 ㎎/㎏이며, 하루 1회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하나 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0046] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있고, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명은

[0048] 1) 본 발명의 sLZIP 단백질의 발현 세포주에 피검물질을 처리한 후 배양하는 단계;

[0049] 2) 배양된 발현 세포주에서 상기 sLZIP 단백질의 발현 또는 활성 정도를 측정하는 단계; 및

[0050] 3) sLZIP 단백질의 발현 또는 활성 정도가 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가된 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 글루코코르티코이드 수용체(GR) 매개 질환 예방 및 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0051] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 단백질의 발현 정도는 면역침강법(immunoprecipitation), 방사능면역분석법(RIA), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블롯(Western Blotting) 및 유세포 분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0052] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 단백질의 활성 정도는 면역형광법, 효소면역분석법(ELISA), 질량분석 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0053] 상기 방법에 있어서, GR 매개 질환은 스트레스 장애, 염증성 질환 및 자가면역 질환으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0054] 본 발명의 sLZIP는 HDAC를 모집 및 활성화시켜 GR 유전자의 발현을 억제하여 글루코코르티코이드 유도성 GR 전사활성을 억제함으로써, 상기 sLZIP를 스트레스 장애, 염증성 질환 및 면역 질환 등의 GR 매개 질환 예방 및 치료제의 후보물질로 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있다.

실 시 예

[0055] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.

[0056] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0057] **<실시예 1> 세포의 배양**

[0058] 본 발명자들은 COS-7, HeLa, HEK 293A 및 CCR1 발현 인간 골육종(human osteogenic sarcoma) 세포(HOS/CCR1 세포)를 10% 열-비활성(heat-inactivated) FBS(GIBCO Technologies, Inc., Gaithersburg, MD), 페닐실린(penicillin)(100 U/ml) 및 스트렙토마이신(streptomycin)(100 ㎍/ml)을 포함하는 DMEM(GIBCO Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)에서 배양하였다. 또한, THP-1 세포를 10% 열-비활성 FBS, 페닐실린(100 U/ml) 및 스

트랩토마이신(100 μg/ml)을 포함하는 RPMI 1640(GIBCO Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)에서 배양하였다.

[0059] **<실시예 2> 일시적 형질감염**

[0060] 본 발명자들은 COS-7 세포를 6웰 플레이트에 웰 당 4 × 10^5 세포의 농도로 접종하였다. 접종 18 ~ 24시간 후에, 제조사(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)의 지시에 따라 상기 세포를 리포펙타민 2000(lipofectamine 2000)을 이용하여 0.5 μg의 리포터 유전자 플라스미드와 실험 플라스미드를 동시에 형질감염시켰다. 형질감염 24시간 후에 상기 세포를 0.5% FBS를 포함하는 동일한 배지에 24시간 동안 배양하였다. 무혈청 세포(Serum-starved cell)를 이용하여 분석하였다. HOS/CCR1 세포를 6-웰 플레이트에 웰 당 3 × 10^5 세포의 농도로 접종하였다. 24시간 후에 상기 세포를 리포펙타민 2000 시약을 이용하여 2 μg의 대조군 플라스미드와 sLZIP 발현 플라스미드로 형질감염시켰다.

[0061] **<실험예 1> 신규한 인간 LZIP 아형의 동정**

[0062] 본 발명자들은 THP-1 단핵구 세포에서 LZIP 발현을 결정하기 위해, 반정량적(semi-quantitative) RT-PCR을 수행하였다. 상기 반정량적 RT-PCR은 구체적으로 하기와 같이 수행하였다. 우선, 제조사(Invitrogen)의 지시에 따라 트리졸(Trizol) 시약을 이용하여 세포로부터 총 RNA를 추출하였다. 약 2 μg의 총 RNA를 Superscript FirstStrand cDNA Synthesis Kit(Bioneer, Daejeon, South Korea)를 이용하여 cDNA를 제조하였다. PCR 조건은 다음과 같이 수행하였다: 96℃에서 40초, 60℃에서 40초, 및 72℃에서 40초를 22 사이클. sLZIP 및 GR의 프라이머쌍은 다음과 같은 것을 사용하였다: sLZIP의 센스 프라이머(sense primer) 5'-ATGGAGCTGGAATTGGATGC-3'(서열번호: 3) 및 안티센스 프라이머(antisense primer) 5'-CTAGCCTGAGTATCTGTCCT-3'(서열번호: 4), 및 GR의 센스 프라이머 5'-TTTCTTATGGCATTTGCTCTG-3'(서열번호: 5) 및 안티센스 프라이머 5'-GATGACGACTCAACTGCTTCTG-3'(서열번호: 6). GAPDH를 내부 대조군(internal control)으로 증폭시켰다. 상기 PCR 산물을 1 × Tris-acetate-EDTA(TAE) 완충용액내 2%(w/v) 아가로즈 젤에서 전기영동시킨 다음, EtBr(Ethidium bromide) 용액으로 염색하였다. 모든 PCR 반응은 적어도 3번 반복하였다. RT-PCR에 의해 증폭된 각 밴드의 강도는 MultiImageTM Light Cabinet(version 5.5, Alpha Innotech Corp., San Leandro, CA)를 이용하여 분석하였으며, 시료에 대응하는 GAPDH mRNA의 밴드 강도로 표준화하였다.

[0063] 상기 분석 결과, 두개의 다른 크기의 인간 LZIP을 확인하였다(도 1A). 따라서, 인간 LZIP의 또다른 유형이 존재한다는 것을 알 수 있다.

[0064] 또한, 인간 LZIP의 또다른 유형의 존재를 확인하기 위해, 다른 크기의 가능한 LZIP 아형을 구별하기 위한 다양한 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0065] 그 결과, 220-260 부위의 아미노산들이 두 유형의 인간 LZIP 사이 크기 차이를 가져오는 것을 확인하였다(도 1B). 상기 부위는 추정적 막통과 도메인(아미노산 229-245)을 포함하였다.

[0066] 또한, 두 유형의 인간 LZIP 앰플리머(amplimer)를 pcDNA3.1/V5-His 발현 벡터 내로 클론시킨 후, PCR을 이용한 결과, 두 유형의 인간 LZIP을 확인하였다(도 1C).

[0067] 또한, 상기 두 유형의 인간 LZIP을 서열 분석한 결과, LZIP가 371개의 아미노산 크기를 나타내는 밴드를 보였으며, 새롭게 확인된 인간 LZIP 아형이 단지 354개의 아미노산 크기를 나타내는 밴드를 보였다(도 2). 상기 새로운 인간 LZIP 아형은 추정적 막통과 도메인(아미노산 229-245)이 결핍되어 있었다(도 2).

[0068] 따라서, 본 발명자들은 새로운 인간 LZIP 아형을 sLZIP(small LZIP) 아형으로 지칭하였으며, 상기 뉴클레오티드 서열을 유전자 등록번호(GeneBank accession number) FJ263669로 등록하였다.

[0069] **<실험예 2> 인간 LZIP 아형의 세포내 위치 확인**

[0070] 본 발명자들은 다양한 세포주(THP-1, HeLa, HEK 293A, MDA-MB-231, SK-BR-3, COS-7) 및 인간 조직(뇌, 가슴, 자궁, 정소, 방광, 위, 간, 심장, 췌장, 난소, 태반, 근육, 흉선, 피부, 비장)에서 LZIP 및 sLZIP의 내생 mRNA

발현 수준을 알아보기 위해, 반 정량적 RT-PCR을 이용하여 조사하였다.

[0071] 그 결과, 도 3A 및 도 3B에서 보는 바와 같이 LZIP 및 sLZIP는 조사된 모든 세포주 및 조직에서 편재적으로 발현되었고, LZIP가 더 많이 발현되었다.

[0072] 또한, 단백질의 세포내 위치가 이들의 세포내 기능을 제공하고 막통과 도메인이 단백질의 위치에 영향을 주기 때문에, 상기 두 유형의 LZIP 아형의 세포내 위치를 조사하였다. 우선, LZIP 및 sLZIP를 cDNA3.1/V5-His 벡터 내로 서브클로닝시킨 후, HEK 293A 세포를 LZIP 및 sLZIP으로 일시적으로 형질전환시켰다. 그런 다음, LZIP 및 sLZIP의 발현은 RT-PCR 및 웨스턴 블랏 분석(Western blot analysis)을 이용하여 확인하였다. 세포 용해물을 세포질 분획 및 핵 분획으로 분획한 후, 상기 세포질 분획을 시토졸 및 막 분획으로 분획하였다. 상기 웨스턴 블랏 분석은 구체적으로 하기와 같이 수행하였다. 우선, 세포를 채취한 후, 차가운 인산완충식염수(phosphate buffer saline, PBS)로 세척하였다. 그런 다음, 세포를 100 ml의 용해 완충용액(lysis buffer)[150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0.5% DC(deoxycholate), 0.1% SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.5 mM PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.1 mM 디티오트레이톨(dithiothreitol), 0.1 mM Na3VO4, 및 프로테아제 억제제]에서 재현탁시켰다. 상기 현탁액을 4℃에서 20분 동안 16,000×g로 원심분리하였다. 단백질 시료(각 레인의 20 μg)를 10% SDS 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 의해 분리한 다음, 니트로셀룰로오즈 필터에 이동시켰다. 상기 블랏을 항-GR 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 및 항-sLZIP 항체[KHL(keyhole limpet hemocyanin)에 결합된 C-말단 펩타이드를 이용하여 제조]로 배양하였다. 막은 화학발광 검출 시약(chemiluminescence detection reagents)(Pierce, Rockford, IL)을 이용하여 프로세싱하였다. 상기 동일한 블랏을 제거한 후, 내부 대조군으로서 항-β-액틴 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)로 재탐침하였다.

[0073] 상기 분석 결과, LZIP는 시토졸에 주로 위치하고 부분적으로 막 분획에 위치하는 반면에, sLZIP는 핵에 주로 위치하고 부분적으로 시토졸에 위치하였다(도 4A).

[0074] 또한, 본 발명자들은 두 LZIP 아형의 위치를 공초점 현미경(confocal microscopy)을 이용하여 위치를 시각화하였다. HeLa 세포를 LZIP 및 sLZIP으로 형질전환시킨 다음, 공초점 현미경으로 관찰하였다. 상기 공초점 현미경 분석은 구체적으로 하기와 같이 수행하였다. 우선, LZIP 및 sLZIP로 일시적 형질감염시킨 HeLa 세포를 커버슬립 위에 배양하였다. 배양 24시간 후, 상기 세포를 10분 동안 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시킨 다음, 5분 동안 0.2% Triton-X 100로 투과시켰다. 상기 세포를 1시간 동안 1% BSA와 배양시킨 후, 1시간 동안 다클론 항-sLZIP 항체(Rabbit polyclonal anti-sLZIP antibody)와 배양시켰다. PBS로 세척한 후, 세포를 1시간 동안 FITC-결합 항-래빗(FITC-conjugated anti-rabbit)항체(Invitrogen)와 배양시켰다. 커버 슬립을 PBS로 세척한 후, LSM 510 META 공초점 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)에 적재하여 관찰하였다.

[0075] 상기 관찰 결과, LZIP는 거의 모두 세포질에 위치하는 것으로 관찰되었고, sLZIP는 대부분 핵에 위치하는 것으로 관찰되었다(도 4B).

[0076] 따라서, sLZIP는 인간 LZIP의 새로운 아형이고, 두 LZIP 아형은 세포내 위치가 서로 다르므로 이들이 서로 다른 기능을 하는 것을 알 수 있다.

[0077] **<실험예 3> sLZIP의 Lkn-1 유도성 세포이동과의 관련성 확인**

[0078] 기존에 LZIP가 CCR1에 결합하고 Lkn-1에 의해 유도되는 주화성 신호(Lkn-1-induced chemotaxis signaling)의 조절에 관여하는 것이 보고된바 있다(Ko J, et al., FASEB J 18:890-892, 2004; Jang SW, et al., J Biol Chem 282:11092-11100, 2007; Jang SW, et al., J Cell Physiol 211:630-63733, 2007).

[0079] 이에, 본 발명자들은 sLZIP의 기능을 조사하기 위해, sLZIP가 Lkn-1 유도성 세포이동(Lkn-1-induced cell migration)에 관련되어 있는지 분석하였다. 안정성 HOS/CCR1 세포를 목(mock), LZIP 및 sLZIP 플라스미드로 형질전환시킨 다음, 100 ng/ml의 Lkn-1(R & D system, Minneapolis, MN) 유무의 존건 하에서 주화성 분석을 수행하였다.

[0080] 상기 분석 결과, LZIP로 형질전환된 HOS/CCR1 세포의 주화성 활성은 벡터로 형질전환된 세포와 비교하여 약 2.5배 증가한 반면에, sLZIP는 Lkn-1의 화학유인물질(chemoattractant) 효과에 대한 영향을 나타내지 않았다.

[0081] 따라서, sLZIP가 Lkn-1에 의해 유도되는 주화성 신호와 관련성이 없으므로 핵내에서 별다른 기능을 가지는 것을

알 수 있다.

[0082] **<실험예 4> sLZIP의 GR의 전사 활성 억제 효과 확인**

[0083] 기존에 전사 공동작용자(coactivator)들이 LxxLL 모티프를 포함하고 핵 호르몬 수용체와 같은 다른 전사인자와 상호작용하며, 상기 LxxLL 모티프가 핵 수용체 인식 모티프인 것으로 알려져 있다(Luciano RL, et al., Proc Natl Acad USA 97:10757-10762, 2000; Ding XF, et al., Mol Endocrinol 12:302-313, 1998). 인간 LZIP는 두 개의 LxxLL 모티프를 포함하나 이의 상호작용 협력자(interaction partner)는 알려져 있지 않다.

[0084] 이에, 본 발명자들은 sLZIP가 핵 수용체와 상호작용하고 핵 수용체의 전사 활성에 관여하는지 조사하였다. 핵 수용체로 알려진 인자들 중, LZIP가 염증 반응과 관련되어 있음이 알려져 있으므로 sLZIP과 GR의 관련성에 초점을 맞추었다. GR은 스테로이드 호르몬 글루코코리티코이드의 항염증 반응을 위한 중요한 매개 전사인자이고, 상기 글루코코리티코이드의 프로모터에서 GRE를 잠복시키는 다양한 표적 유전자의 발현을 조절한다(Adcock IM, et al., Proc Am Thorac Soc 1:247-254, 2004).

[0085] 우선, sLZIP과 GR 사이 단백질과 단백질의 상호작용을 면역침강분석(immunoprecipitation analysis)을 이용하여 조사하였다.

[0086] 그 결과, sLZIP가 GR에 직접적으로 결합하지 않는 것을 확인하였다.

[0087] 또한, sLZIP가 GR의 리간드 유도 전사 활성에 영향을 미치는지 조사하기 위해, 다양한 양의 sLZIP 발현 플라스미드와 GR에 의해 조절되는 것으로 알려져 있는 GRE 포함 MMTV 프로모터(GRE-containing MMTV promoter) 리포터 유전자로 공동 형질전환시켰다. 형질전환된 세포를 덱스트린(Dex)의 유무 조건으로 자극한 후, 루시퍼라제 분석 시스템(Luciferase Assay System)(Promega Corporation, Madison, WI)을 이용하여 GR 전사활성을 측정하였다. 상기 루시퍼라제 분석은 구체적으로 하기와 같이 수행하였다. 우선, 형질감염된 세포를 차가운 PBS로 두번 세척한 후, 리포터 용해 완충용액으로 배양 접시에서 용해시켰다. 루시퍼라제 활성은 제조사(Turner BioSystems, Sunnyvale, CA)의 지시에 따라 Luminometer 20/20n으로 기록하였다. 루시퍼라제 활성은 베타-갈락토시다제(β-galactosidase) 활성으로 표준화하였다. 베타-갈락토시다제 분석을 위해, pSV-베타-갈락토시다제를 루시퍼라제 리포터 유전자와 함께 형질감염시켰다. 세포 추출물을 베타-갈락토시다제 효소 분석 시스템(Promega) 및 DU530 분광 광도계(spectrophotometer)(Beckman Instruments, Fullerton, CA)을 이용하여 베타-갈락토시다제 활성을 분석하였다. 베타-갈락토시다제 활성에 대한 루시퍼라제 활성의 비율은 3배로 결정하였다. 모든 데이타는 3번의 반복 실험에 의한 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

[0088] 그 결과, Dex는 MMTV 리포터 유전자만으로 형질전환된 세포에서 루시퍼라제 활성을 80배까지 증가시켰다. Dex로 자극된 세포에서, sLZIP는 투여량 의존적으로 루시퍼라제 활성을 감소시켰다. 4 μg의 sLZIP으로 형질전환된 세포는 목(mock) 벡터만으로 형질전환된 세포와 비교하여 Dex에 대한 반응으로 GR 전사활성을 약 2.1배까지 감소시켰다. 그러나, MMTV 루시퍼라제 활성에 대한 LZIP의 효과는 매우 작았다. Dex의 결핍 하에서, sLZIP는 GR 전사활성에 영향을 미치지 않는 반면에, LZIP는 투여량 의존적으로 루시퍼라제 활성을 증가시켰다(도 5A).

[0089] 또한, sLZIP가 내생 GR의 전사활성에 영향을 미치는지 조사하기 위해, ELISA를 기반으로 하는 GR 전사인자 분석 키트(ELISA-based GR transcription factor assay kit)(Active motif, Carlsbad, CA)를 이용하여 분석하였다. 상기 GR 전사 활성 분석은 구체적으로 하기와 같이 수행하였다. 목(mock) 또는 sLZIP으로 형질감염된 HeLa 세포로부터 분리한 핵 추출물을 GRE 공통 배열을 포함하는 올리고뉴클레오티드로 코팅된 96-웰 플레이트에서 배양하였다. 상기 핵 추출물에서 항-GR 항체를 이용한 효소면역측정법(enzymeimmunosorbent method)을 이용한 비색계로 올리고뉴클레오티드에 결합된 GR을 탐색하였다. 우선, HeLa 세포를 목(mock) 벡터 및 sLZIP로 형질전환시킨 후, 핵 추출물을 제조하였다. 그런 다음, Dex의 존재 유무 조건 하에서 GR 전사활성을 측정하였다.

[0090] 상기 측정 결과, Dex는 목(mock) 벡터만으로 형질전환된 세포에서 GR 전사활성을 약 3.3배까지 증가시킨 반면에, sLZIP으로 형질전환된 세포는 목(mock) 벡터만으로 형질전환된 세포와 비교하여 2배까지 감소하였다(도 5B).

[0091] 따라서, sLZIP가 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성을 음성적으로 조절하는 것을 알 수 있다.

[0092] **<실험예 5> siRNA sLZIP을 이용한 GR의 전사활성 억제 효과 확인**

[0093] 본 발명자들은 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성에 대한 siRNA-sLZIP(siLZIP)의 효과를 조사하였다. 내생 sLZIP의 발현을 약 50% 수준으로 감소시키는 sLZIP에 대한 siRNA를 제조하였다. Dex는 MMTV 리포터 유전자만으로 형질전환된 세포에서 GR 전사활성을 유도하였다.

[0094] 그 결과, GR 전사활성은 sLZIP으로 형질전환된 세포의 경우, Dex에 대한 반응에서 감소하였다. 그러나 sLZIP과 siLZIP으로 공동 형질전환된 세포의 경우, siLZIP가 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성에 대한 sLZIP의 음성 효과가 농도 의존적으로 제거되었다. 2 μg의 sLZIP을 포함하는 세포는 MMTV 리포터 유전자만으로 형질전환된 세포에 비해 GR 전사활성을 최대 55%까지 감소하였다. 그러나, 4 μg의 sLZIP을 추가적으로 포함하는 세포의 경우 대조군의 GR 전사활성으로 회복하였다(도 6A).

[0095] 또한, 내생적으로 다양한 농도로 sLZIP을 포함하는 세포에서 siLZIP의 효과를 조사하였다. sLZIP 및 siLZIP 발현 플라스미드를 MMTV 리포터 유전자와 함께 COS-7 세포내로 공동 형질전환시킨 다음, 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

[0096] 그 결과, sLZIP으로 형질전환된 세포의 GR 전사활성은 농도 의존적으로 감소하였다. 그러나, siLZIP는 다양한 농도의 sLZIP을 포함하는 세포에서 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성에 대한 sLZIP의 음성 효과를 효율적으로 억제하였다(도 6B).

[0097] 또한, GR 전사활성에서 내생 sLZIP의 기능을 조사하기 위하여, 내생 sLZIP 및 GR을 발현하는 HeLa 세포에서 siLZIP를 이용하여 루시퍼라제 분석을 수행하였다.

[0098] 그 결과, siLZIP는 내생 GR의 전사활성을 농도 의존적으로 증가시켰다. 그러나, 스크램블된 siRNA는 GR 전사활성에 영향을 미치지 않았다(도 7). 따라서, sLZIP가 Dex에 의해 유도되는 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성의 음성 조절자로서 기능하는 것을 알 수 있다.

[0099] 또한, sLZIP가 GR에 직접 결합하지 않으므로, 다른 공동인자의 결합 및 GR 전사활성의 조절에 대한 sLZIP의 LxxLL 모티프의 관련성을 조사하였다. 두 개의 LxxLL 모티프가 수용체 상호작용이 불가능하도록 LxxAA로 돌연변이시킨 sLZIP의 돌연변이 형태를 제조하였다.

[0100] 그 결과, 돌연변이 sLZIP는 GR의 전사활성에 영향을 미치지 않는 것으로 나타내었다(도 8A). 따라서 sLZIP가 LxxLL 모티프가 공동인자의 결합 및 GR 전사활성의 조절 역할을 하는 것을 알 수 있다.

[0101] 기존에 LZIP의 위치가 ER 막이고, LZIP 결핍 추정적 막통과 도메인(아미노산 229-243, LZIP △TM) 및 LZIP의 결핍 돌연변이 형태(아미노산 1-220)는 핵에 위치하고 있음이 보고된바 있다(Raggo C, et al., Mol Cell Biol 22:5639-5649, 2002; Lu R, et al., J Virol 74:934-943, 2000).

[0102] 이에, GR 전사활성에 대한 잘못된 위치의 LZIP의 효과를 조사하기 위해, LZIP 결핍 추정적 막통과 도메인(아미노산 229-243, LZIP △TM)의 잘못된 위치의 돌연변이 및 LZIP의 결핍 돌연변이 형태(아미노산 1-220)를 제조한 후, 루시퍼라제 활성을 분석하였다.

[0103] 그 결과, 잘못된 위치의 LZIP 돌연변이가 투여량 의존적으로 GR의 전사활성을 효율적으로 억제하는 것을 나타내었다(도 8B 및 도 8C). 따라서 LZIP의 위치가 GR 전사활성의 조절에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다.

[0104] **<실험예 6> sLZIP의 HDAC 활성에 의한 GR 전사 활성 억제 효과 확인**

[0105] 기존에 억제보체가 HDAC를 모집하여 글루코코르티코이드에 대한 반응에서 GR의 전사활성에 대한 감소를 가져온다고 보고된바 있다(Ichijo T, et al., J Biol Chem 280:42067-2077, 2005).

[0106] 이에, sLZIP가 글루코코르티코이드에 대한 반응에서 GR의 전사활성을 억제하기 때문에, HDAC 억제제 TSA(Sigma, St. Louis, MO)를 이용하여 HDAC가 sLZIP에 의한 GR 전사활성의 감소와 관련되어 있는지 조사하였다. GR 발현 플라스미드 및 MMTV 리포터 유전자를 COS-7 세포에 공동 형질전환시킨 다음, TSA로 처리하였다.

[0107] 그 결과, TSA가 결핍된 경우, sLZIP으로 형질전환된 세포는 Dex(Sigma, St. Louis, MO)에 대한 반응에서 MMTV 리포터 유전자만으로 형질전환된 세포에 비해 GR 전사활성이 47%까지 감소하였다. 그러나, 10 mM 및 100 mM의 TSA 처리는 GR 전사활성을 각각 33% 및 6%까지 감소시켰다(도 8A). 따라서, TSA가 투여 농도 의존적으로 GR 전사활성에 대한 sLZIP의 음성 효과를 억제하고, sLZIP가 히스톤 탈아세틸화에 의한 글루코코르티코이드 유도성

GR의 전사활성을 음성적으로 조절하는 것을 알 수 있다.

[0108] 또한, HDAC가 sLZIP 매개된 GR의 전사 억제와 관련되어 있는지 크로마틴 면역침강(Chromatin immunoprecipitation, ChIP) 분석을 이용하여 조사하였다. 우선, sLZIP 발현 플라스미드가 존재유무 하에, GR 발현 플라스미드 및 MMTV 리포터 유전자로 COS-7 세포를 공동 형질전환시켰다. 그런 다음, Dex의 존재 및 결핍 하에 HDAC 1, 2, 3, 4, 5 및 6에 대한 항체를 이용하여 ChIP 분석을 수행하였다. 상기 ChIP 분석은 구체적으로 하기와 같이 수행하였다. 시료마다 약 1×10^6 세포를 PBS로 세척한 후, 25℃에서 10분 동안 배지에 1% 포름알데하이드로 처리한 다음, 5분 동안 최종 농도가 0.125 M가 되도록 글라이신(glycine)을 첨가하였다. 그런 다음, 상기 세포를 PBS로 세척한 후, 4℃에서 5분 동안 1,000 × g으로 원심분리하였다. 상기 ChIP 분석은 DNA-단백질 복합체와 항-아세틸 H4 항체(Upstate Biotechnology, Charlottesville, VA), 항-HDAC1, 2, 3, 4, 5 및 6 항체(Cell Signaling Technology, Beverly, MA) 및 내부 대조군으로서 항-래빗 IgG를 함께 공침전(coprecipitation)시킴으로써 수행하였다. 2개의 기능적 GRE를 포함하는, 생쥐 유선종양 바이러스(mouse mammary tumor virus, MMTV) 긴 말단 반복(long terminal repeat)(단편 크기: 173 bp)의 프로모터 부위(-219 내지 -47)는 프라이머쌍[센스 프라이머: 5'-AACCTTGCGGTTCCCAG-3'(서열번호: 7) 및 안티센스 프라이머: 5'-GCATTTACATAAGATTTGG-3'(서열번호: 8)]을 이용하여 상기 제조된 DNA 샘플로부터 증폭시켰다.

[0109] 그 결과, 목(mock) 벡터만으로 형질전환된 세포에서 HDAC는 Dex 처리와 관계없이 MMTV GRE로 유도되었다. 그러나, sLZIP, HDAC 1, 2 및 6로 형질전환된 세포의 경우에는 Dex에 대한 반응에서 GRE로 유도된 반면에, HDAC는 Dex 처리 없이 GRE와 함께 공동 침전되었다. 또한, sLZIP는 양성대조군으로 사용되는 히스톤4의 아세틸화 수준을 유의성있게 감소시켰다(도 8B). 따라서, sLZIP을 발현하는 세포에서 HDAC 1, 2 및 6를 포함하는 특정 HDAC 단백질이 MMTV GRE로 모집되는 것을 알 수 있다. 또한, sLZIP가 특정 HDAC를 모집하고, GR 전사활성의 억제를 야기하는 MMTV 크로마틴에서의 히스톤 탈아세틸화를 위해 HDAC를 활성시키는 것을 알 수 있다.

[0110] 또한, sLZIP가 HDAC 활성을 자극하는지 확인하기 위해, Dex의 존재유무 하에서 HDAC 활성을 분석하였다. 상기 HDAC 활성은 구체적으로 하기와 같이 수행하였다. 우선, sLZIP로 형질감염된 HeLa 세포의 핵 추출물로부터 유래한 항-HDAC 항체 및 래빗 IgG 면역침전물을 분석 완충용액으로 세척한 후, HDAC fluorimetric assay kit(Anaspec, San Jose, CA)에 제공하였다. 그런 다음, 상기 면역침전물을 형광 생성 기질(HDAC 520 기질)과 함께 25℃에서 배양시킨 후, 현상액(developer solution)으로 15분 동안 처리하였다. 형광신호는 96-웰 플레이트에서 Zenyth 3100 UV/VIS FLUORO detector(Anthos Labtec Instruments, Austria)를 이용하여 490 nm의 여기(excitation) 및 520 nm의 방출(emission)로 탐색하였다. 억제제 대조군을 포함시켰으며, 모든 반응을 두 번 수행하였다.

[0111] 그 결과, sLZIP가 투여량 의존적으로 Dex에 대한 반응에서 HDAC 활성을 증가시켰다. 그러나, HDAC 활성은 Dex의 존재 하에서 sLZIP에 의해 유도되지는 않았다(도 9A). 증가된 HDAC 활성은 sLZIP 및 siLZIP를 공동 형질전환된 세포에서 sLZIP를 감소시켰다. 또한, HDAC 활성은 TSA로 처리함에 의해 감소되었다. 그러나, HDAC 활성은 TSA로 처리된 세포에서 siLZIP에 의해 추가적으로 감소하였다(도 9B).

[0112] 또한, HDAC 활성의 특이성을 결정하기 위하여, 음성대조군으로 HDAC 1, 2 및 6, 및 HDAC 3를 면역침강시킨 후, HDAC 활성을 분석하였다. 래빗 IgG 대조군 항체를 음성 대조군으로 사용하였다.

[0113] 그 결과, 면역침강된 HDAC 1, 2 및 6은 Dex에 대한 반응에서 sLZIP으로 형질전환된 세포의 HDAC 활성을 증가시켰다.

[0114] 따라서, sLZIP가 특정 HDAC를 포함하는 복합체를 모집한 후, 상기 HDAC 활성을 증가시킴으로써 글루코코르티코이드에 대한 반응에서 GR의 전사활성을 조절하는 것을 알 수 있다.

[0115] **<실험예 7> sLZIP에 의한 GR 전사활성 음성 조절에 의한 글루코코르티코이드 유발성 유전자 발현의 억제 유발 확인**

[0116] 본 발명자들은 GR이 염증 반응에 관련된 유전자의 다양한 배열의 발현을 유도하기 때문에, sLZIP에 의한 GR 전사활성의 감소가 GR에 의해 매개된 유전자 어넥신-I(Annexin-I, ANX-I) 및 IκB의 발현에 영향을 미치는지 조사하였다. 우선, HeLa 세포를 목(mock) 벡터 및 sLZIP으로 형질전환시킨 다음, Dex의 존재유무 하에서 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.

[0117] 그 결과, Dex 처리는 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 ANX-I 및 IκB의 발현을 유도하였다. sLZIP는 Dex의 결핍

하에서 mRNA 및 단백질 수준 중 어느 하나에서 ANX-I 및 IκB의 발현을 유도하지 않았으나, Dex로 처리된 세포에서는 sLZIP가 투여량 의존적으로 GR 표적 유전자들의 mRNA 및 단백질 수준을 감소시켰다(도 10A 및 도 10B).

[0118] 따라서, sLZIP가 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성에서 음성 대조군으로 기능하고, 글루코코르티코이드 유도성 GR의 전사활성 경로에 의해 유도된 유전자 발현의 억제를 유도하는 것을 알 수 있다.

산업이용 가능성

[0119] 상기와 같이, 본 발명의 신규한 인간 류신 지퍼 단백질(leucine zipper protein, LZIP) 아형은 히스톤 탈아세틸라제(histone deacetylase, HDAC)를 모집 및 활성화시켜 리간드에 의해 유도되는 글루코코르티코이드 수용체(glucocorticoid receptor, GR)의 전사활성을 억제함으로써, 상기 단백질을 이용하여 스트레스 장애, 염증성 질환 및 면역 질환 등의 GR 매개 질환 예방 및 치료용 조성물 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0120] 도 1은 인간 LZIP의 신규한 변이를 확인한 결과를 나타내는 그림이다.

[0121] A: THP-1 세포 유래 총 RNA를 전장 인간 LZIP에 대한 특이적 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과를 나타내는 그림이다(화살표는 인간 LZIP의 두 개의 다른 PCR 산물).

[0122] B: THP-1 세포 유래 cDNA를 인간 LZIP의 다른 부위를 증폭하기 위한 PCR을 수행한 결과이다.

[0123] C: 두 개의 LZIP 변이를 정제한 후 pcDNA3.1/V5-His 벡터로 서브클로닝한 결과이다.

[0124] 도 2는 LZIP 및 sLZIP의 구조 및 이를 암호화하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열을 나타내는 그림이다.

[0125] A: 인간 LZIP의 구조이다[전사활성 도메인(Transactivation domain)(1-52), 염기성 부위(basic region)(155-172), 류신지퍼 도메인(leucine zipper domain)(178-220), 추정적 막통과 도메인(putative transmembrane domain)(229-245)].

[0126] B: 클론화된 인간 LZIP 아형을 서열화한 결과이다.

[0127] 도 3은 LZIP 아형의 발현 및 세포내 위치를 나타내는 그림이다.

[0128] A: 6개의 다른 세포주로부터 획득된 mRNA를 이용한 반 정량적 RT-PCR에 의해 LZIP 아형의 mRNA 발현 수준을 조사한 결과이다.

[0129] B: 15개의 다른 인간 조직으로부터 획득된 mRNA를 이용한 반 정량적 RT-PCR에 의해 LZIP 아형의 mRNA 발현 수준을 조사한 결과이다.

[0130] 도 4는 LZIP 아형의 발현 및 세포내 위치를 나타내는 그림이다.

[0131] A: LZIP 또는 sLZIP 발현 플라스미드로 형질전환시킨 HEK 293A 세포를 이용하여 세포질 및 핵내로 채취 및 분획한 결과이다(왼쪽 그림). 세포질을 추가적으로 시토졸 및 막으로 분획한 결과이다(오른쪽 그림).

[0132] B: sLZIP 및 LZIP로 형질전환시킨 HeLa 세포에서 레이저 스캐닝 공초점 현미경을 통해 sLZIP 및 LZIP를 관찰한 결과이다.

[0133] 도 5는 sLZIP가 리간드에 의해 유도되는 GR의 전사활성을 억제하는 것을 나타내는 그래프이다.

[0134] A: LZIP 또는 sLZIP의 존재 유무 하에서 GR, MMTV-Luc 및 베타-갈락토시다제(β-galactosidase)로 형질전환시킨 COS-7 세포를 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석한 결과이다.

[0135] B: 목(mock) 및 sLZIP 발현 벡터로 형질전환시킨 HeLa 세포에서 분리한 핵 추출물을 이용하여 ELISA를 이용한 GR의 전사활성을 분석한 결과이다.

[0136] 도 6은 siRNA-sLZIP가 GR의 전사활성에 대한 sLZIP의 음성 조절 효과를 제거하는 것을 나타내는 그래프이다.

[0137] A: siLZIP 발현 플라스미드의 존재 유무 하에서 GR 발현 플라스미드, MMTV-Luc 리포터 유전자 플라스미드 및

sLZIP 발현 플라스미드로 공동 형질전환시킨 COS-7 세포를 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석한 결과이다.

[0138] B: GR 발현 플라스미드 및 MMTV-Luc 리포터 유전자 플라스미드의 존재 하에 sLZIP 및 siLZIP로 형질전환시킨 COS-7 세포를 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석한 결과이다.

[0139] 도 7은 siRNA-sLZIP가 GR의 전사활성에 대한 sLZIP의 음성 조절 효과를 제거하는 것을 나타내는 그래프이다. 스크램블된 siRNA 및 siLZIP, 및 MMTV-Luc 리포터 유전자 플라스미드로 형질전환시킨 HeLa 세포를 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석한 결과이다.

[0140] 도 8은 sLZIP의 LxxLL 모티프가 GR 전사활성의 음성조절에 중요한 것임을 나타내는 그래프이다.

[0141] A: 목(mock), sLZIP(wt) 및 sLZIP 돌연변이(mt) 발현 벡터와 GR, MMTV-Luc, 및 베타-갈락토시다제 발현 벡터와 함께 형질전환시킨 COS-7 세포를 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석한 결과이다.

[0142] B: GR 발현 플라스미드, MMTV-Luc 리포터 유전자 플라스미드 및 LZIP△TM 발현 플라스미드로 형질전환시킨 COS-7 세포를 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석한 결과이다.

[0143] C: GR 발현 플라스미드, MMTV-Luc 리포터 유전자 플라스미드 및 LZIP(1-220) 발현 플라스미드로 형질전환시킨 COS-7 세포를 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석한 결과이다.

[0144] 도 9는 HDAC가 sLZIP의 GR 전사활성의 억제에 관여하는 것을 나타내는 그림이다.

[0145] A: 목(mock) 및 sLZIP 발현 벡터와 GR, MMTV-Luc 및 베타-갈락토시다제 발현 벡터와 함께 형질전환시킨 COS-7 세포를 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석한 결과이다.

[0146] B: 목(mock) 및 sLZIP 발현 벡터와 GR 발현 플라스미드 및 MMTV-Luc 리포터 유전자 플라스미드로 형질전환시킨 COS-7 세포를 이용하여 루시퍼라제 활성을 분석한 결과이다.

[0147] 도 10은 sLZIP가 HDAC 모집 및 활성에 의해 GR 전사활성을 감소시키는 것을 나타내는 그래프이다.

[0148] A: 다양한 농도의 sLZIP으로 형질전환시킨 HeLa 세포로부터 분리한 핵 추출물을 이용하여 HDAC 활성을 분석한 결과이다.

[0149] B: 목(mock) 벡터, sLZIP 및 siLZIP 발현 벡터로 형질전환시킨 HeLa 세포로부터 분리한 핵 추출물을 이용하여 HDAC 활성을 분석한 결과이다.

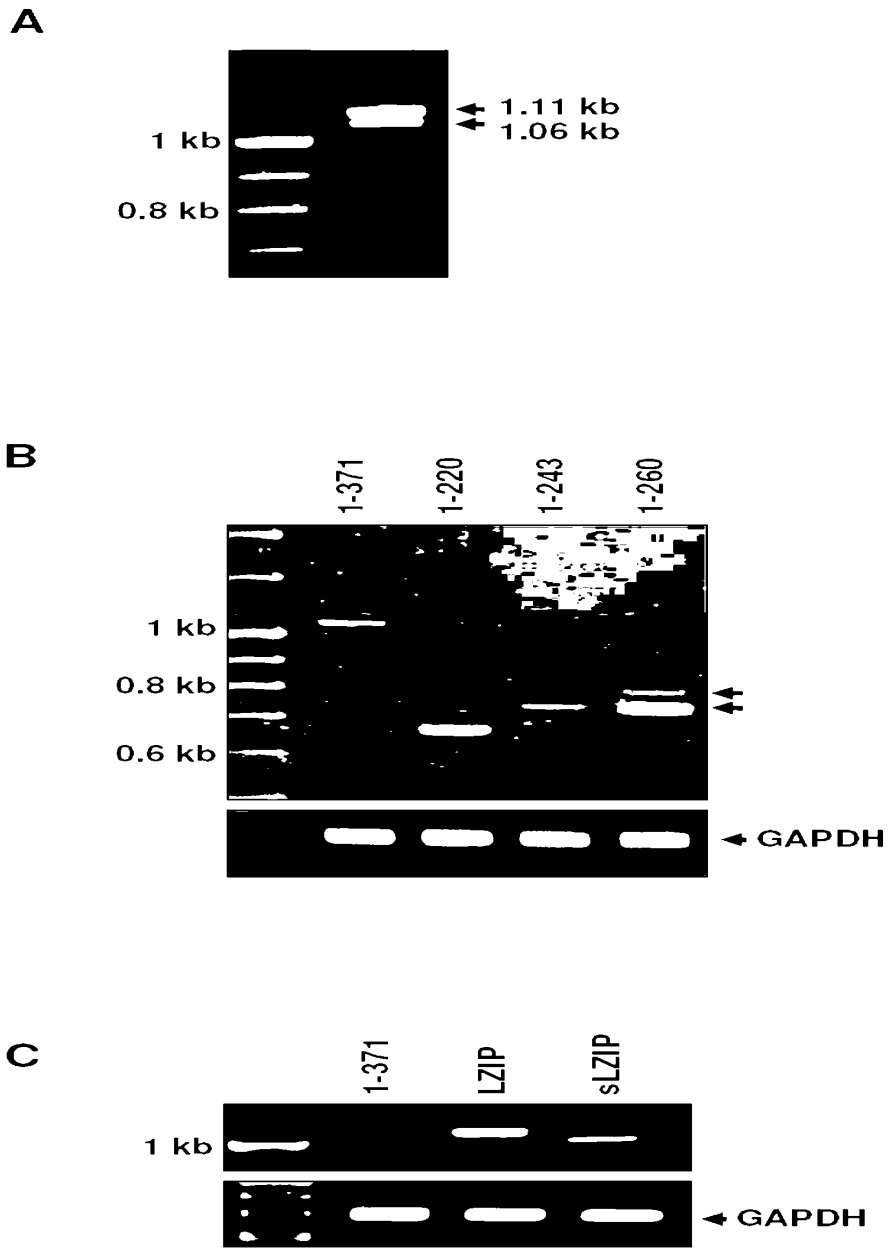
[0150] C는 목(mock) 벡터 및 siLZIP 발현 벡터로 형질전환시킨 HeLa 세포로부터 제조한 세포 용해물을 항-HDAC 1, 2 및 6 항체로 면역침강시킨 후, 상대적인 HDAC 활성을 분석한 결과이다.

[0151] 도 11은 sLZIP가 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 글루코코르티코이드 유도성 유전자의 발현을 감소시키는 것을 나타내는 그림이다. HeLa 세포를 sLZIP 발현 벡터로 형질전환시킨 다음, 24시간 동안 100 nM Dex 존재 유무 하에 배양하였다. 총 RNA를 세포로부터 추출한 후, RT-PCR 분석을 이용하여 ANX-I 및 IκB의 mRNA 발현 수준을 분석하였다. 상기 분석은 3번 반복하였고, GAPDH를 내부 대조군으로 사용하였다. Quantity One software(Bio-Rad)를 이용한 농도계 분석(Densitometric analysis)을 수행하였다.

[0152] 도 12는 sLZIP가 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 글루코코르티코이드 유도성 유전자의 발현을 감소시키는 것을 나타내는 그림이다. HeLa 세포를 sLZIP 발현 벡터로 형질전환시킨 다음, 24시간 동안 100 nM Dex 존재 유무 하에 배양하였다. 세포 용해물을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 젤(20 μg/lane)에서 분리한 후, 니트로셀룰로오즈 막으로 이동시켰다. 다클론 항--ANX-I 및 항-IκB 항체를 이용한 웨스턴블랏팅으로 ANX-I 및 IκB의 단백질 수준을 분석하였다. 상기 막을 제거한 후, 항-베타 액틴 항체로 재프로브시켰다. Quantity One software를 이용한 농도계 분석을 수행하였다.

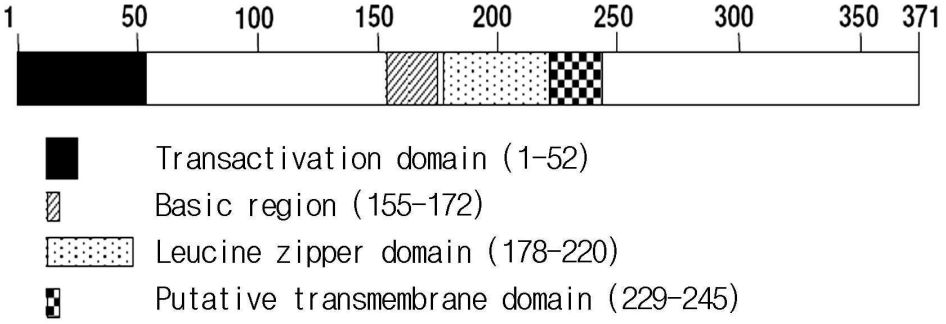
도면

도면1


A
1 kb
0.8 kb
1.11 kb
1.06 kb
B
1-371
1-220
1-243
1-260
1 kb
0.8 kb
0.6 kb
GAPDH
C
1-371
LZIP
sLZIP
1 kb
GAPDH

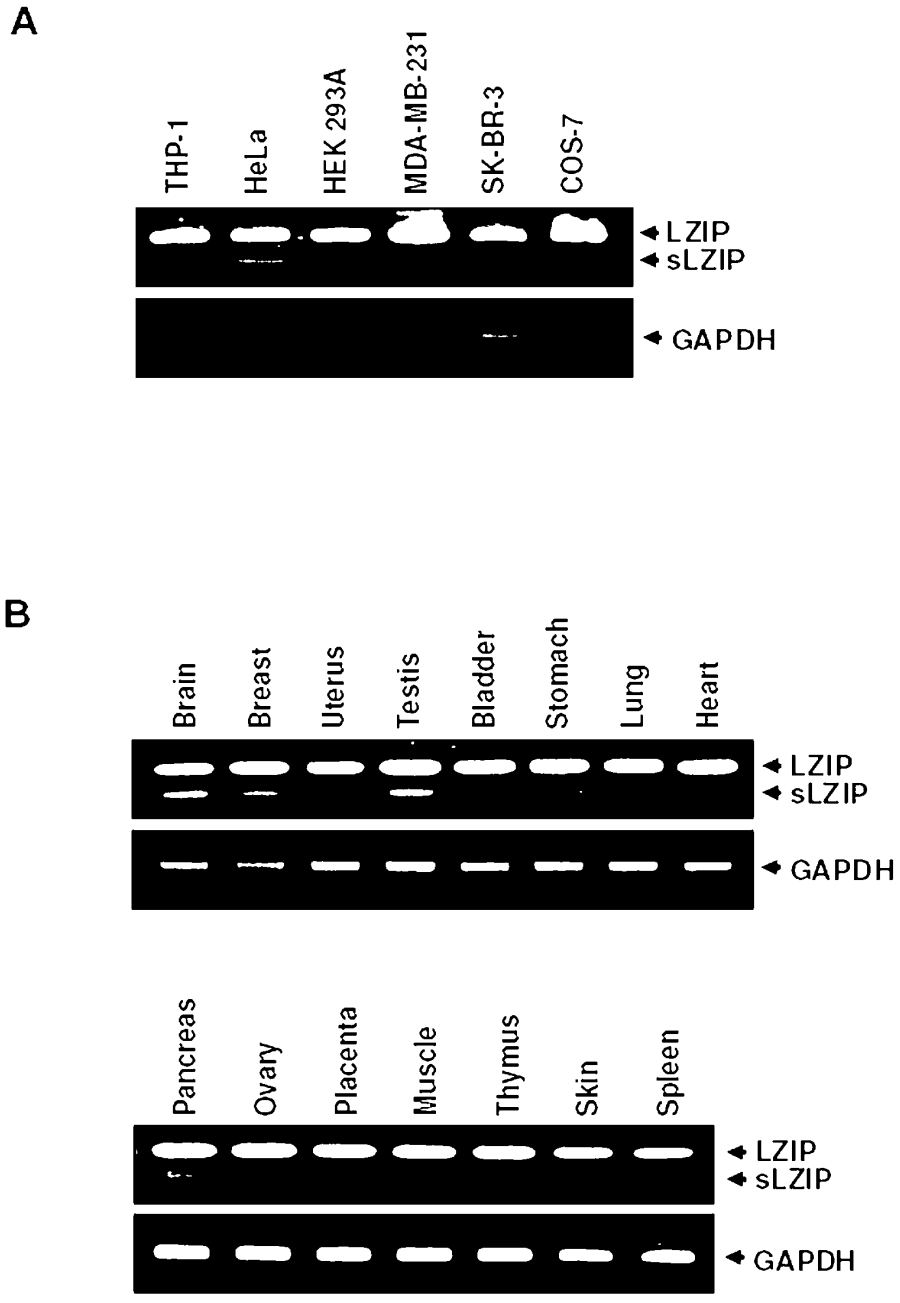
도면2

인간 LZIP의 개요도

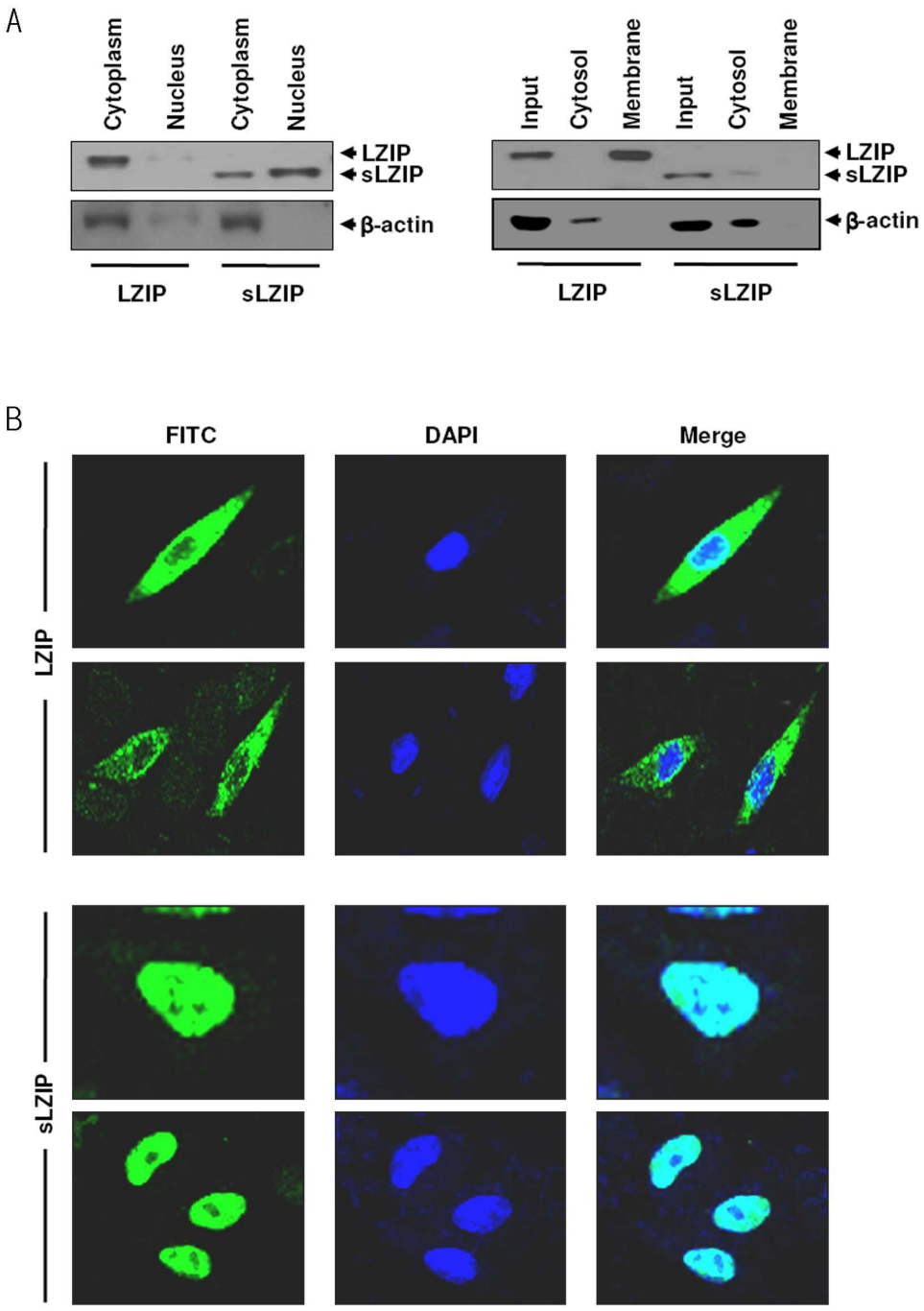



```
                 *        20        *        40        *        60        *        80
LZIP   : MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPLSEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYSLP :  84
sLZIP  : MELELDAGDQDLLAFLLEESGDLGTAPDEAVRAPLDWALPLSEVPSDWEVDDLLCSLLSPPASLNILSSSNPCLVHHDHTYSLP :  84

             *       100       *       120       *       140       *       160
LZIP   : RETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRRKIRNKRSAQESR : 168
sLZIP  : RETVSMDLESESCRKEGTQMTPQHMEELAEQEIARLVLTDEEKSLLEKEGLILPETLPLTKTEEQILKRVRRKIRNKRSAQESR : 168

          *       180       *       200       *       220       *       240       *
LZIP   : RKKKVYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQLRKLQAMVIEISNKTSSSSTCILVLLVSFCLLLVPAMYSSDTR : 252
sLZIP  : RKKKVYVGGLESRVLKYTAQNMELQNKVQLLEEQNLSLLDQLRKLQAMVIEISNKTSSSS----------------MYSSDTR : 235

             260       *       280       *       300       *       320       *
LZIP   : GSLPAEHGVLSRQLRALPSEDPYQLELPALQSEVPKDSTHQWLDGSDCVLQAPGNTSCLLHYMPQAPSAEPPLEWPFPDLFSEP : 336
sLZIP  : GSLPAEHGVLSRQLRALPSEDPYQLELPALQSEVPKDSTHQWLDGSDCVLQAPGNTSCLLHYMPQAPSAEPPLEWPFPDLFSEP : 319

          340       *       360       *
LZIP   : LCRGPILPLQANLTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG : 371
sLZIP  : LCRGPILPLQANLTRKGGWLPTGSPSVILQDRYSG : 354
```

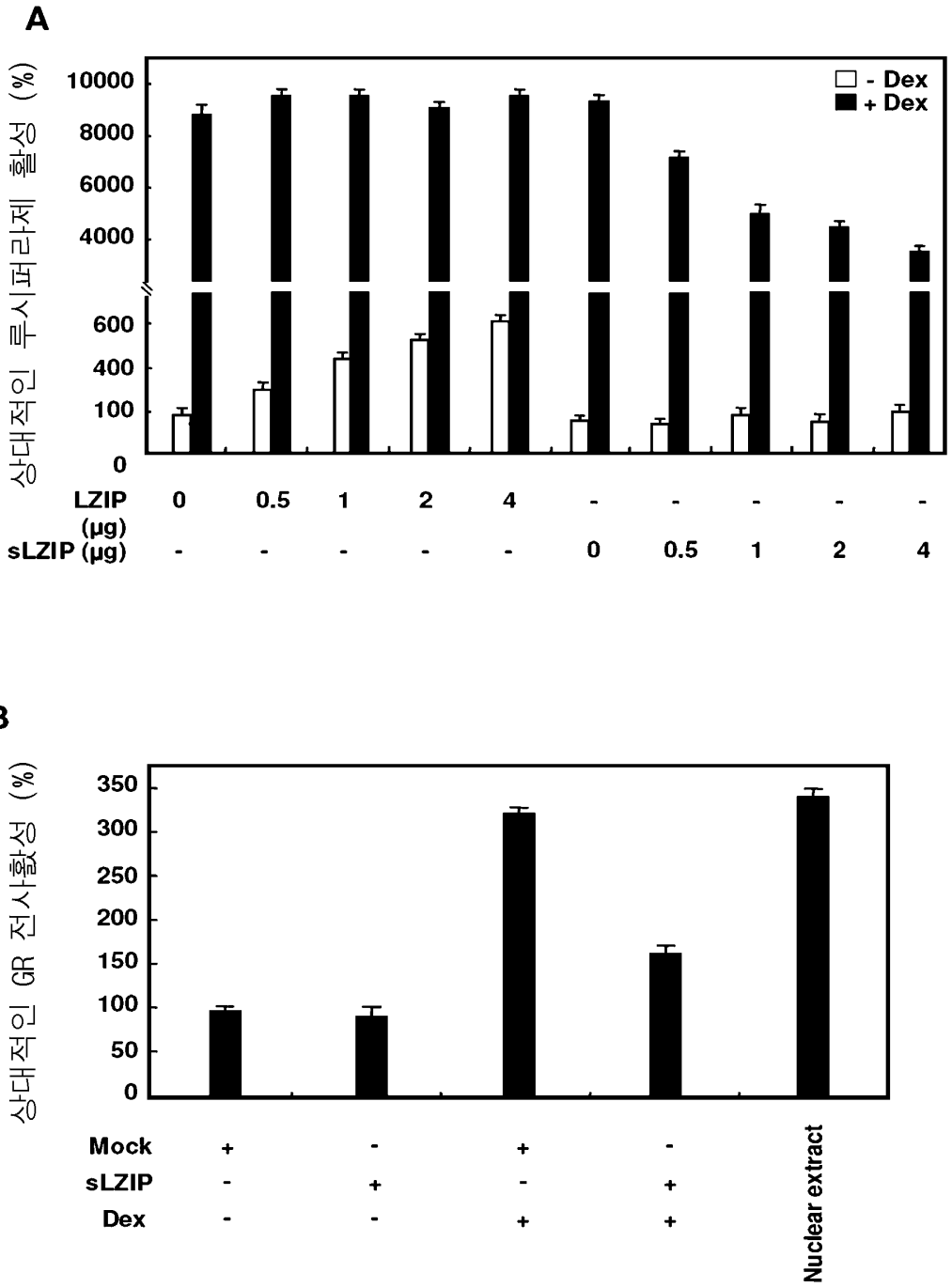
도면3


A
THP-1
HeLa
HEK 293A
MDA-MB-231
SK-BR-3
COS-7
LZIP
sLZIP
GAPDH
B
Brain
Breast
Uterus
Testis
Bladder
Stomach
Lung
Heart
LZIP
sLZIP
GAPDH
Pancreas
Ovary
Placenta
Muscle
Thymus
Skin
Spleen
LZIP
sLZIP
GAPDH

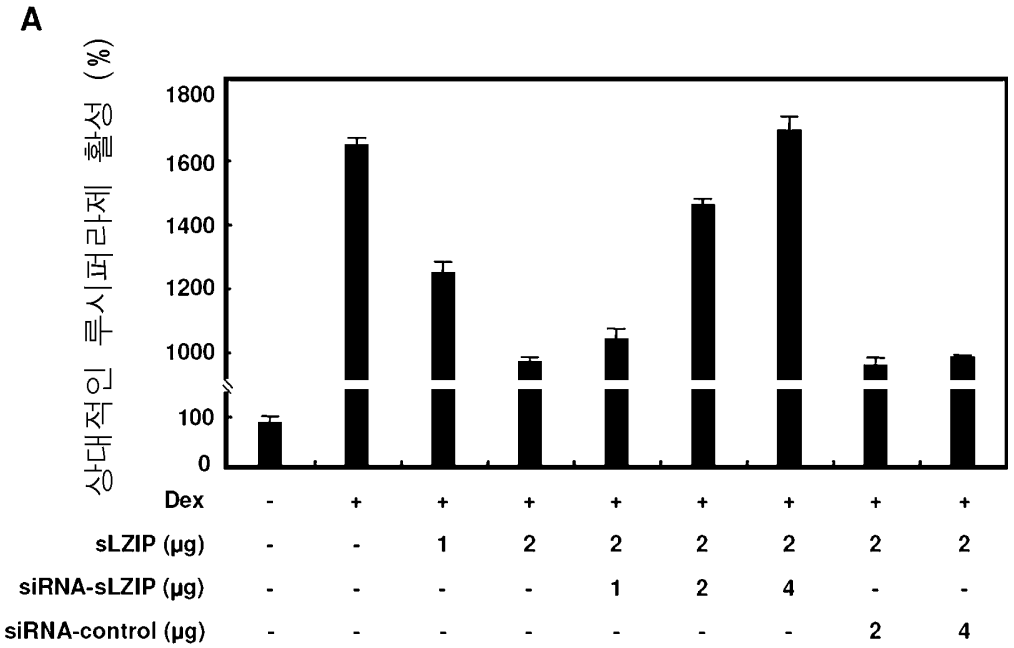
도면4

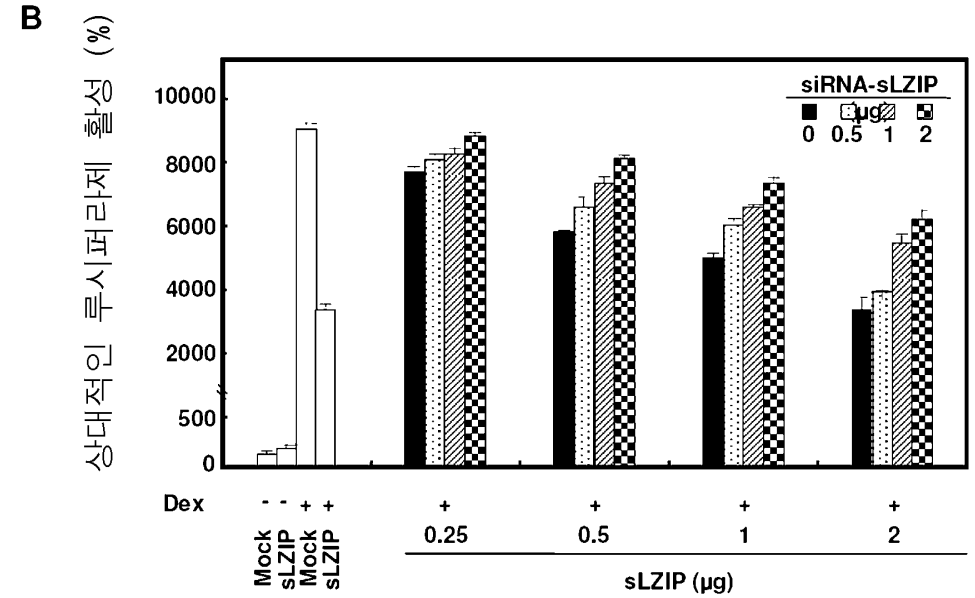

A
Cytoplasm
Nucleus
Cytoplasm
Nucleus
LZIP
sLZIP
β-actin
LZIP
sLZIP
Input
Cytosol
Membrane
Input
Cytosol
Membrane
LZIP
sLZIP
β-actin
LZIP
sLZIP
B
FITC
DAPI
Merge
LZIP
sLZIP

도면5

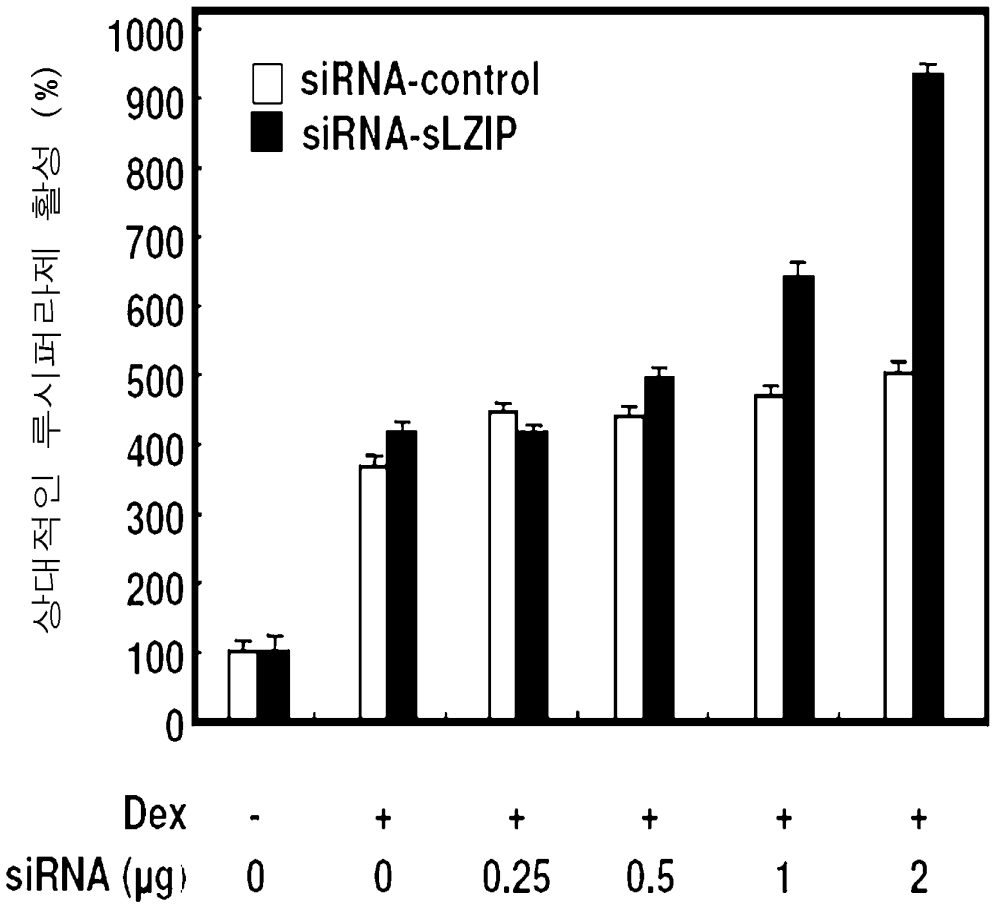

A
상대적인 루시퍼라제 활성 (%)
10000
8000
6000
4000
600
400
100
0
- Dex
+ Dex
LZIP (μg)
0 0.5 1 2 4 - - - - -
sLZIP (μg)
- - - - - 0 0.5 1 2 4
B
상대적인 GR 전사활성 (%)
350
300
250
200
150
100
50
0
Mock + - + -
sLZIP - + - +
Dex - - + +
Nuclear extract

도면6

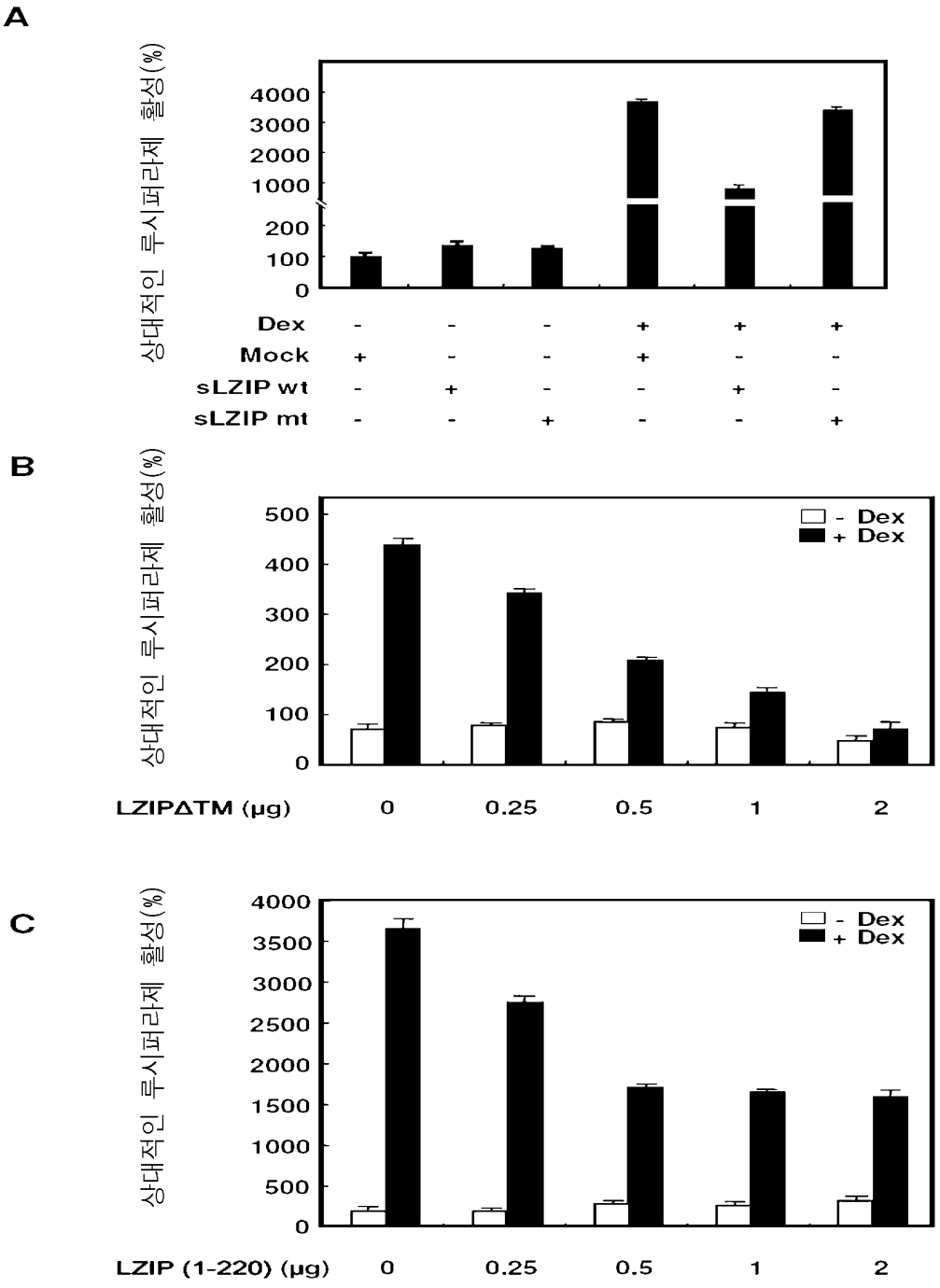

A
상대적인 루시퍼라제 활성 (%)
1800
1600
1400
1200
1000
100
0
Dex - + + + + + + + +
sLZIP (μg) - - 1 2 2 2 2 2 2
siRNA-sLZIP (μg) - - - - 1 2 4 - -
siRNA-control (μg) - - - - - - - 2 4


B
상대적인 루시퍼라제 활성 (%)
10000
8000
6000
4000
2000
500
0
siRNA-sLZIP
μg
0 0.5 1 2
Dex - - + +
Mock
sLZIP
Mock
sLZIP
+ + + +
0.25 0.5 1 2
sLZIP (μg)

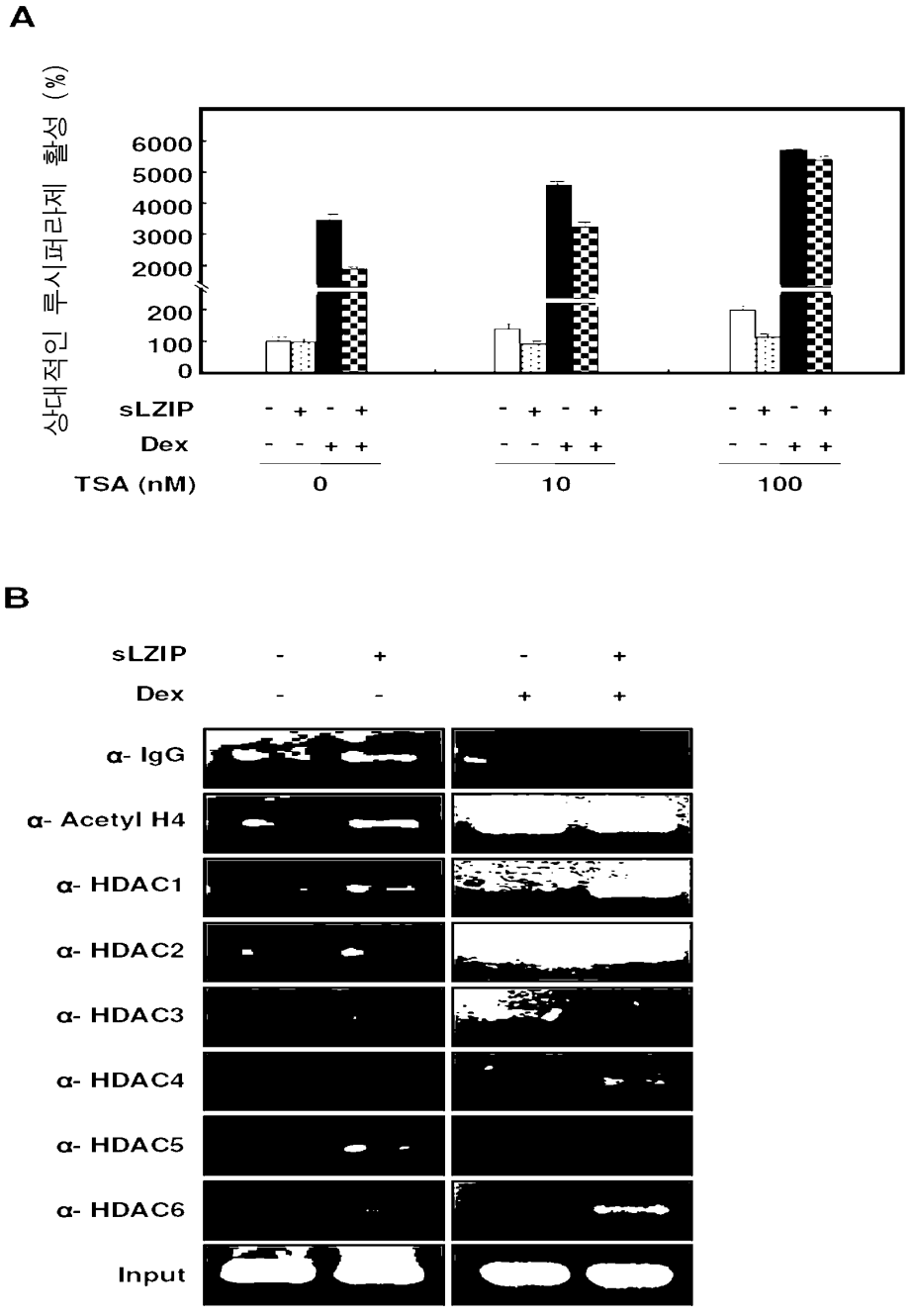
도면7


상대적인 루시퍼라제 활성 (%)
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
siRNA-control
siRNA-sLZIP
Dex - + + + + +
siRNA (μg) 0 0 0.25 0.5 1 2

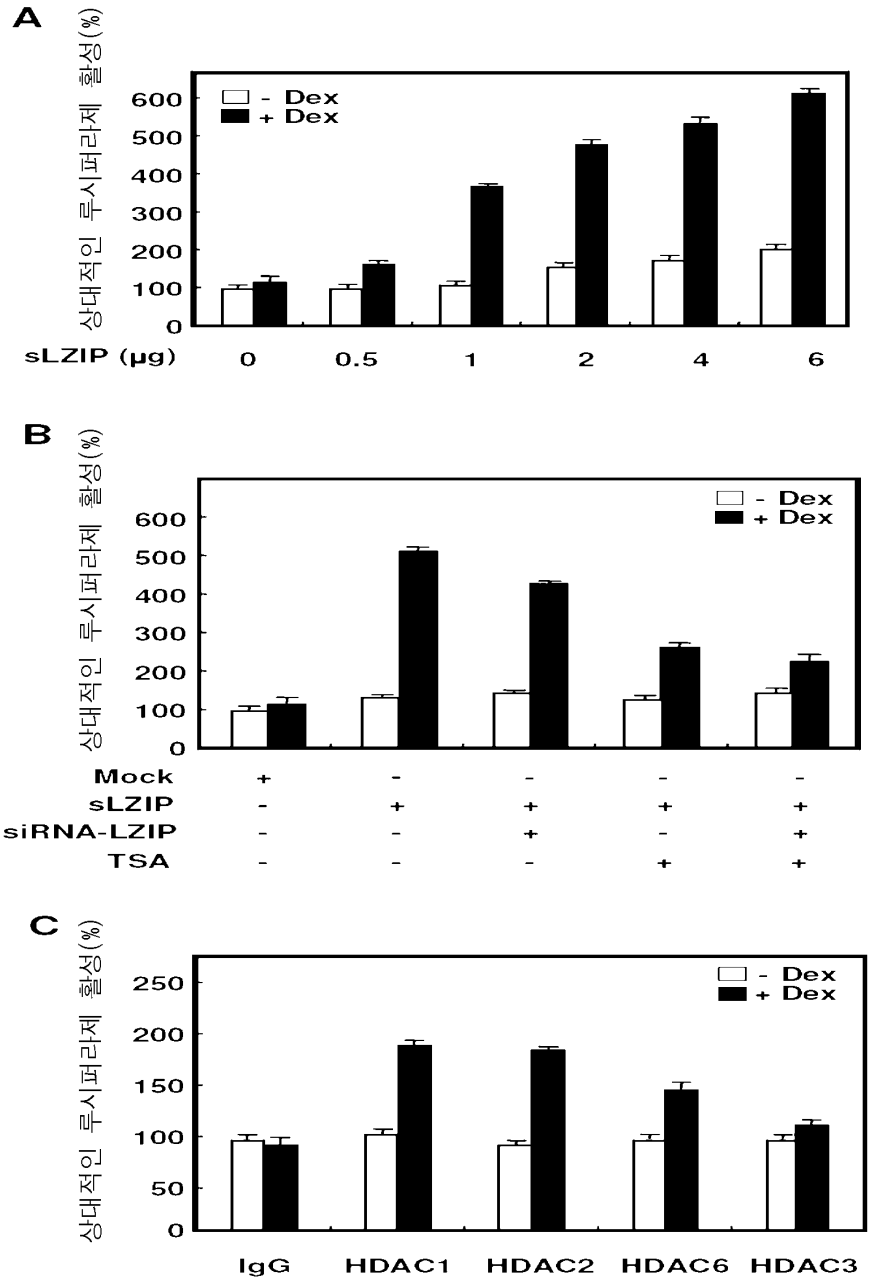
도면8


A
상대적인 루시퍼라제 활성(%)
4000
3000
2000
1000
200
100
0
Dex - - - + + +
Mock + - - + - -
sLZIP wt - + - - + -
sLZIP mt - - + - - +
B
상대적인 루시퍼라제 활성(%)
500
400
300
200
100
0
- Dex
+ Dex
LZIPΔTM (μg) 0 0.25 0.5 1 2
C
상대적인 루시퍼라제 활성(%)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
- Dex
+ Dex
LZIP (1-220) (μg) 0 0.25 0.5 1 2

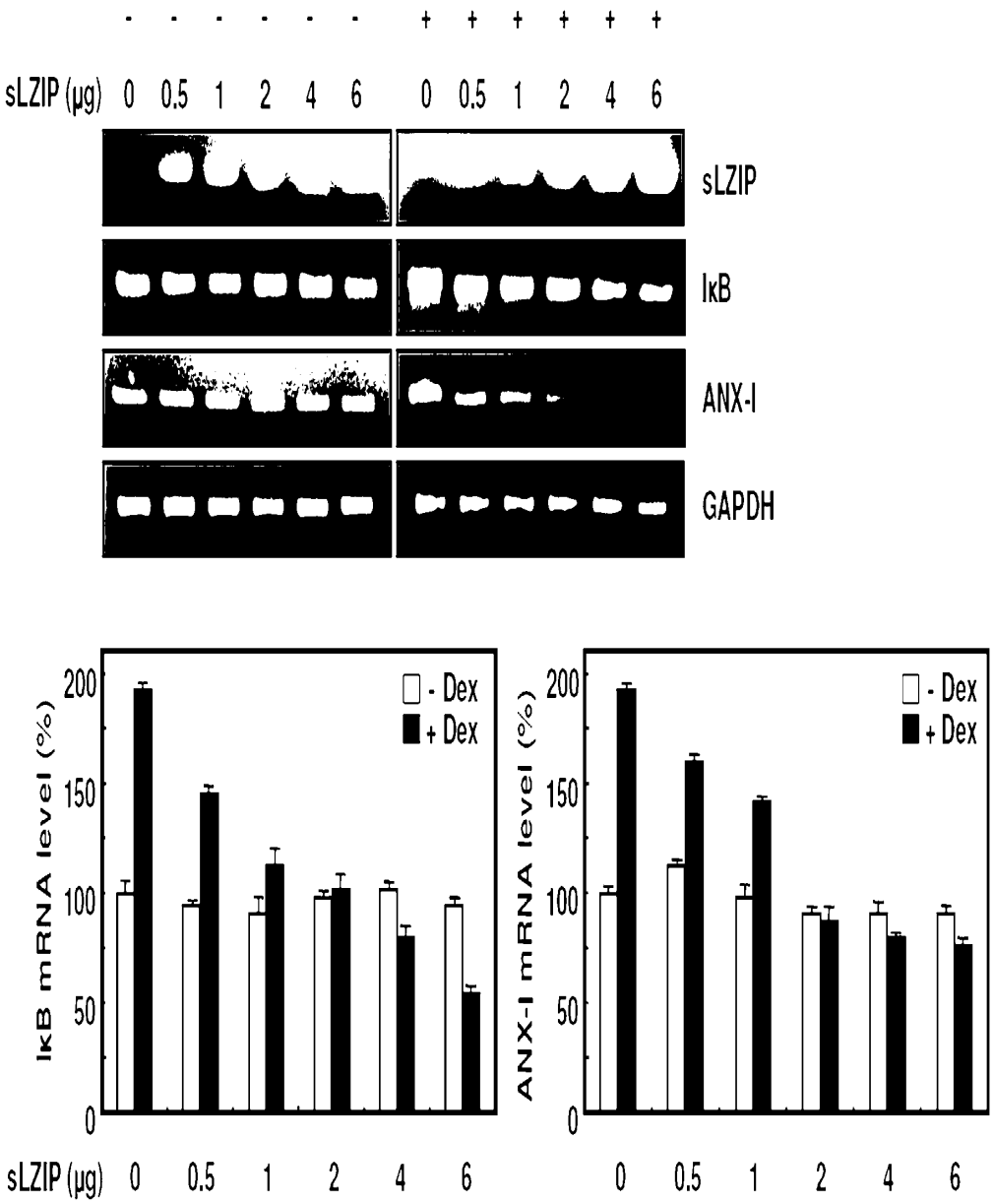
도면9


A
상대적인 루시퍼라제 활성 (%)
6000
5000
4000
3000
2000
200
100
0
sLZIP
Dex
TSA (nM)
0
10
100
B
sLZIP
Dex
α- IgG
α- Acetyl H4
α- HDAC1
α- HDAC2
α- HDAC3
α- HDAC4
α- HDAC5
α- HDAC6
Input

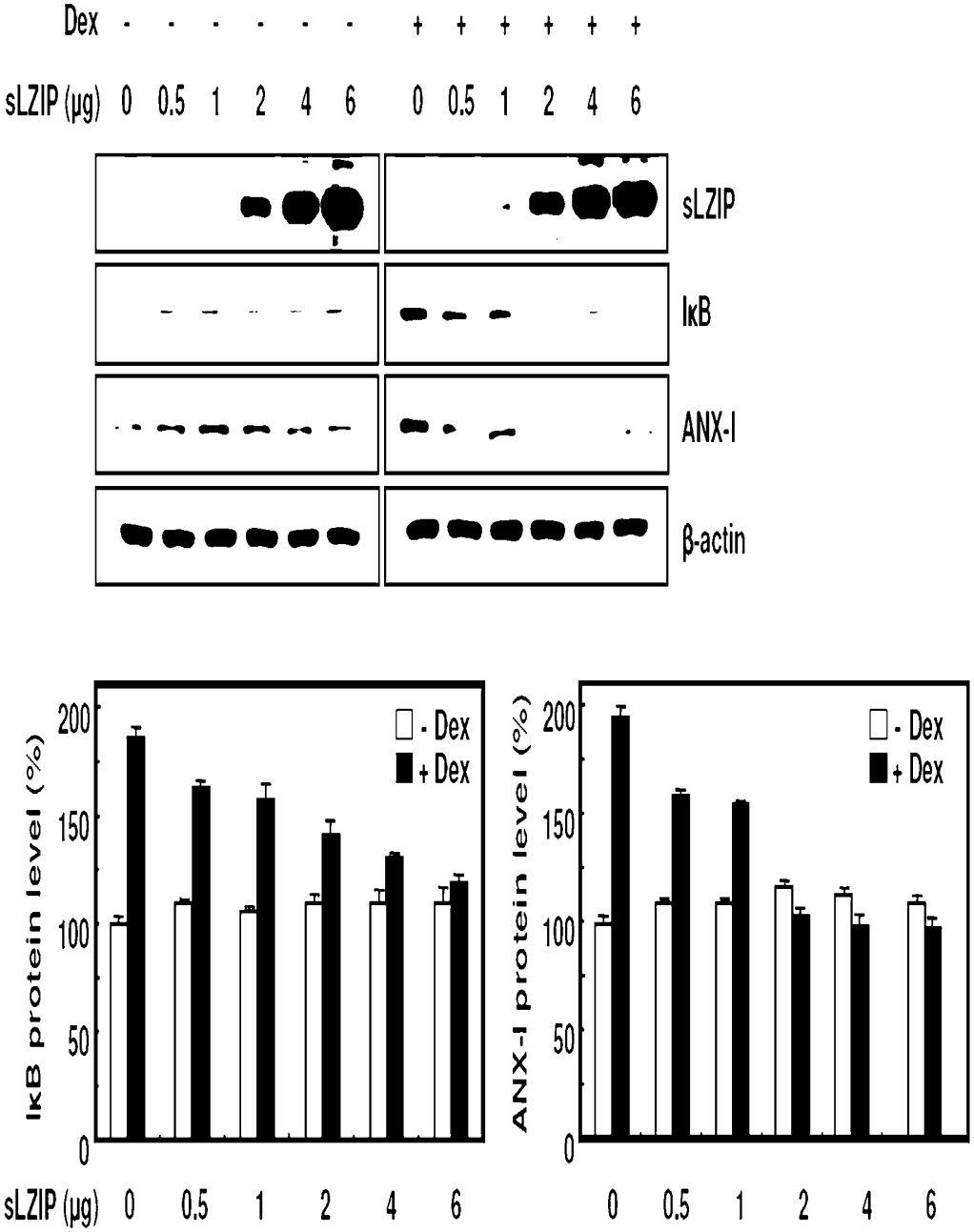
도면10


A
상대적인 루시퍼라제 활성(%)
600
500
400
300
200
100
0
- Dex
+ Dex
sLZIP (μg)
0
0.5
1
2
4
6
B
상대적인 루시퍼라제 활성(%)
600
500
400
300
200
100
0
- Dex
+ Dex
Mock
sLZIP
siRNA-LZIP
TSA
C
상대적인 루시퍼라제 활성(%)
250
200
150
100
50
0
- Dex
+ Dex
IgG
HDAC1
HDAC2
HDAC6
HDAC3

도면11


- - - - - - + + + + + +
sLZIP (μg) 0 0.5 1 2 4 6 0 0.5 1 2 4 6
sLZIP
IκB
ANX-I
GAPDH
IκB mRNA level (%)
200
150
100
50
0
- Dex
+ Dex
ANX-I mRNA level (%)
200
150
100
50
0
- Dex
+ Dex
sLZIP (μg) 0 0.5 1 2 4 6
0 0.5 1 2 4 6

도면12



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> A novel human leucine zipper protein isoform and use thereof

<130> 9p-09-34

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 354
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
Met Glu Leu Glu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Asp Leu Leu Ala Phe Leu
  1               5                  10                  15

Leu Glu Glu Ser Gly Asp Leu Gly Thr Ala Pro Asp Glu Ala Val Arg
             20                  25                  30

Ala Pro Leu Asp Trp Ala Leu Pro Leu Ser Glu Val Pro Ser Asp Trp
         35                  40                  45

Glu Val Asp Asp Leu Leu Cys Ser Leu Leu Ser Pro Pro Ala Ser Leu
     50                  55                  60

Asn Ile Leu Ser Ser Ser Asn Pro Cys Leu Val His His Asp His Thr
 65                  70                  75                  80

Tyr Ser Leu Pro Arg Glu Thr Val Ser Met Asp Leu Glu Ser Glu Ser
                 85                  90                  95

Cys Arg Lys Glu Gly Thr Gln Met Thr Pro Gln His Met Glu Glu Leu
            100                 105                 110

Ala Glu Gln Glu Ile Ala Arg Leu Val Leu Thr Asp Glu Glu Lys Ser
        115                 120                 125

Leu Leu Glu Lys Glu Gly Leu Ile Leu Pro Glu Thr Leu Pro Leu Thr
    130                 135                 140

Lys Thr Glu Glu Gln Ile Leu Lys Arg Val Arg Arg Lys Ile Arg Asn
145                 150                 155                 160

Lys Arg Ser Ala Gln Glu Ser Arg Arg Lys Lys Lys Val Tyr Val Gly
                165                 170                 175

Gly Leu Glu Ser Arg Val Leu Lys Tyr Thr Ala Gln Asn Met Glu Leu
            180                 185                 190
```

```
Gln Asn Lys Val Gln Leu Leu Glu Glu Gln Asn Leu Ser Leu Leu Asp
        195                 200                 205

Gln Leu Arg Lys Leu Gln Ala Met Val Ile Glu Ile Ser Asn Lys Thr
    210                 215                 220

Ser Ser Ser Ser Met Tyr Ser Ser Asp Thr Arg Gly Ser Leu Pro Ala
225                 230                 235                 240

Glu His Gly Val Leu Ser Arg Gln Leu Arg Ala Leu Pro Ser Glu Asp
                245                 250                 255

Pro Tyr Gln Leu Glu Leu Pro Ala Leu Gln Ser Glu Val Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Ser Thr His Gln Trp Leu Asp Gly Ser Asp Cys Val Leu Gln Ala Pro
        275                 280                 285

Gly Asn Thr Ser Cys Leu Leu His Tyr Met Pro Gln Ala Pro Ser Ala
    290                 295                 300

Glu Pro Pro Leu Glu Trp Pro Phe Pro Asp Leu Ser Ser Glu Pro Leu
305                 310                 315                 320

Cys Arg Gly Pro Ile Leu Pro Leu Gln Ala Asn Leu Thr Arg Lys Gly
                325                 330                 335

Gly Trp Leu Pro Thr Gly Ser Pro Ser Val Ile Leu Gln Asp Arg Tyr
            340                 345                 350

Ser Gly
```

<210> 2
<211> 1062
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 2

```
atggagctgg aattggatgc tggtgaccaa gacctgctgg ccttcctgct agaggaaagt        60

ggagatttgg ggacggcacc cgatgaggcc gtgagggccc cactggactg ggcgctgccg       120
```

ctttctgagg taccgagcga ctgggaagta gatgatttgc tgtgctccct gctgagtccc 180

ccagcgtcgt tgaacattct cagctcctcc aacccctgcc ttgtccacca tgaccacacc 240

tactccctcc cacgggaaac tgtctccatg gatctagaga gtgagagctg tagaaaagag 300

gggacccaga tgactccaca gcatatggag gagctggcag agcaggagat tgctaggcta 360

gtactgacag atgaggagaa gagtctattg gagaaggagg ggcttattct gcctgagaca 420

cttcctctca ctaagacaga ggaacaaatt ctgaaacgtg tgcggaggaa gattcgaaat 480

aaaagatctg ctcaagagag ccgcaggaaa aagaaggtgt atgttggggg tttagagagc 540

agggtcttga aatacacagc ccagaatatg gagcttcaga acaaagtaca gcttctggag 600

gaacagaatt tgtcccttct agatcaactg aggaaactcc aggccatggt gattgagata 660

tcaaacaaaa ccagcagcag cagcatgtac tcctctgaca caaggggggag cctgccagct 720

gagcatggag tgttgtcccg ccagcttcgt gccctcccca gtgaggaccc ttaccagctg 780

gagctgcctg ccctgcagtc agaagtgccg aaagacagca cacaccagtg gttggacggc 840

tcagactgtg tactccaggc ccctggcaac acttcctgcc tgctgcatta catgcctcag 900

gctcccagtg cagagcctcc cctggagtgg ccattccctg acctcttctc agagcctctc 960

tgccgaggtc ccatcctccc cctgcaggca aatctcacaa ggaagggagg atggcttcct 1020

actggtagcc cctctgtcat tttgcaggac agatactcag gc 1062

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sLZIP sense primer

<400> 3
atggagctgg aattggatgc 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sLZIP antisense primer

<400> 4
ctagcctgag tatctgtcct 20

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GR sense primer

<400> 5
tttcttatgg catttgctct g 21

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> GR antisense primer

<400> 6
gatgacgact caactgcttc tg 22

<210> 7
<211> 17

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sense primer for ChIP

<400> 7
aaccttgcgg ttcccag 17

<210> 8
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> antisense primer for ChIP

<400> 8
gcatttacat aagatttgg 19