(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0156707
(43) 공개일자 2021년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) *A61K 38/45* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1007 (2013.01)
A61K 38/45 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0111757
(22) 출원일자 2020년09월02일
심사청구일자 2020년09월02일
(30) 우선권주장
1020200074360 2020년06월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이영식
서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가)
이승재
서울특별시 용산구 이촌로69길 30, 209동 706호 (이촌동, 한가람아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

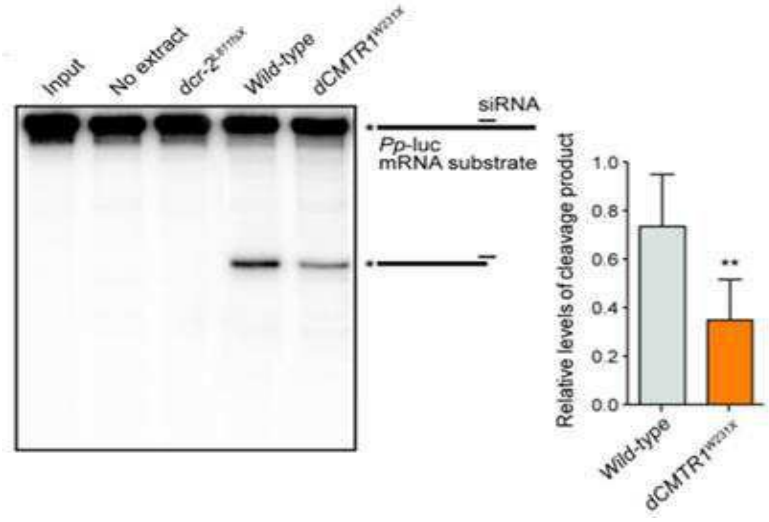
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **siRNA의 생성 및 기능 증진 활성을 갖는 CMTR1의 신규용도**

(57) 요 약

본 발명은 siRNA의 생성 및 기능 증진 활성을 갖는 CMTR1의 신규용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는 siRNA의 생성 증진용 조성물 및 siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물에 관한 것이며, 또한 본 발명은 시험관 내에서 유전자 침묵(gene silencing)을 위한 siRNA를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CMTR1은 유전자 침묵을 위한 siRNA의 생성을 증진시킬 수 있고 동시에 RNAi 기전에서 타겟 유전자의 침묵에 작용하는 holo-RISC(RNA-induced silencing complex)의 형성 증진을 통해 궁극적으로 siRNA의 인위적인 화학적 변형 없이도 siRNA의 생성 및 기능을 증진시키는 효과가 있다. 따라서 본 발명의 CMTR1을 이용할 경우 siRNA를 치료제로 하는 의약품의 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
A61P 37/00 (2018.01)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12Y 201/01057 (2013.01)
(72) 발명자
홍재상
서울특별시 성북구 안암로 145 (안암동5가)

임도환
서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 501동 2107호 (서초동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1D1A1B0704779213
과제번호	2018R1D1A1B0704779213
부처명	연구지원부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인기초연구지원-기본연구
연구과제명	RNA 메틸화 연관 신규 RNAi 양성 조절 인자의 작용 기전 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는, siRNA의 생성 증진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CMTR1 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, siRNA의 생성 증진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CMTR1 단백질은 서열번호 2 또는 서열번호 6의 염기서열로 암호화된 것을 특징으로 하는, siRNA의 생성 증진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CMTR1은 dsRNA에 의해 시작되는 RNAi 경로(pathway)에서,

상기 CMTR1은 dsRNA에 의해 시작되는 RNAi 경로(pathway)에서, 2' -O-ribose methylation에 의한 cap1 구조 형성을 통해 dsRNA로부터 siRNA의 생성을 증가시키며, 유전자 침묵의 타겟 mRNA을 절단할 수 있는 holo-RISC(RNA-induced silencing complex)의 형성을 촉진시켜 유전자 침묵 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는, siRNA의 생성 증진용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 CMTR1의 카르복실 말단 영역은 holo-RISC 복합체 중에서 R2D2의 카르복실 말단 영역과 결합하는 것을 특징으로 하는, siRNA의 생성 증진용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 CMTR1의 카르복실 말단 영역은 서열번호 1의 388번째부터 788번째의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, 상기 R2D2의 카르복실 말단 영역은 서열번호 3의 R2D2 아미노산 서열에서 237번째부터 311번째의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, siRNA의 생성 증진용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase)은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 CMTR1 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는, siRNA의 생성 증진용 조성물.

청구항 8

CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는, siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 CMTR1 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 CMTR1 단백질은 서열번호 2 또는 서열번호 6의 염기서열로 암호화된 것을 특징으로 하는, siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 CMTR1은 dsRNA에 의해 시작되는 RNAi 경로(pathway)에서,

2'-O-ribose methylation에 의한 cap1 구조 형성을 통해 dsRNA로부터 siRNA의 생성을 증가시켜 유전자 침묵 활성을 증가시키며,

CMTR1의 카르복실 말단 영역은 holo-RISC 복합체 중에서 R2D2의 카르복실 말단 영역과 결합하여 유전자 침묵의 타겟 mRNA을 절단할 수 있는 holo-RISC(RNA-induced silencing complex)의 형성을 촉진시키는 것을 특징으로 하는, siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 CMTR1의 카르복실 말단 영역은 서열번호 1의 388번째부터 788번째의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, 상기 R2D2의 카르복실 말단 영역은 서열번호 3의 R2D2 아미노산 서열에서 237번째부터 311번째의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물.

청구항 13

서열번호 1 또는 서열번호 5의 CMTR1 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 세포에 처리하는 단계를 포함하는,

시험관 내에서 유전자 침묵(gene silencing)을 위한 siRNA를 생산하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 유전자는 서열번호 2 또는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 시험관 내에서 유전자 침묵(gene silencing)을 위한 siRNA를 생산하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase)의 siRNA의 생성 및 기능 증진 활성을 갖는 신규 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] RNAi는 진핵생물에서 진화적으로 보존되는 현상으로, 21-23개의 뉴클레오티드 길이를 갖는 RNA(siRNA, miRNA)에 의해 염기서열 상보적인 mRNA를 분해하거나 단백질로의 번역을 억제함으로써 유전자 발현을 조절하는 기능을 갖는다. RNAi는 생체의 발생 및 생리, 세포의 분화, 증식, 사멸, 트랜스포존(transposon)의 활성억제를 통한 유전체 안정성 등 다양한 생물학적 과정에 밀접하게 관련되어 있다. 또한 바이러스에 대한 저항성 및 다양한 인간

질병과도 밀접하게 연관되어 있어 의약품 개발, 질병의 진단/치료 및 농축산 분야 등에 응용하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

[0003] 현재까지의 대표적 RNAi 기전은 세포의 유전체로부터 발현되는 이중 가닥 RNA(dsRNA) 또는 헤어핀(hairpin) miRNA 전구체(pre-miRNA)가 세포질(cytoplasm)에서 Dicer에 의해 인식되어 프로세싱 됨으로써 두 부류의 작은 RNA들인 siRNA와 miRNA로 전환된 후, Argonaute(Ago) 패밀리 단백질을 핵심 구성성분으로 갖는 RISC(RNA-induced silencing complex)와 결합해 염기서열 상보적인 mRNA를 절단/분해 또는 단백질로 번역되는 것을 저해하여 해당 유전자의 발현을 억제한다.

[0004] 또한, 이러한 RNAi 현상에는 다양한 단백질 인자들이 관여하는 것으로 보고되고 있는데, 예를 들어 Dicer는 siRNA와 miRNA의 생산뿐만 아니라, RISC의 형성에도 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. Dicer는 다양한 dsRNA-결합 도메인을 지닌 인자들(TRBP, PACT, R2D2, 또는 Loqs)과 필요에 따라 상호결합을 하여 작용하며, Ago 패밀리 단백질과도 상호작용 하는 것으로 알려져 있다. 또 다른 주요 RNAi 인자인 Ago는 추가적으로 FMRP, Gemin3, Gemin4, MOV10, TNRC6B 등 다양한 단백질과 상호작용하며 RNAi 현상을 조절하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 최근에는 siRNA를 질병 치료제로 이용하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, FDA는 2018년 앨나이람 파마슈티컬스(Alnylam Pharmaceuticals)의 RNA 간섭(RNAi)치료제인 온파트로(Onpattro, patisiran)를 유전성 트랜스티레틴 매개성(hATTR) 아밀로이드증 성인 환자의 다발신경병증에 대한 치료제로 승인한 바 있다. 온파트로는 siRNA 치료제 약물로 FDA가 이 적응증에 승인한 최초이자 유일한 치료제이다. 이 외에도 siRNA를 통한 유전자 억제 기술을 이용한 다양한 질병 치료제가 다수 임상 단계에 있다.

[0006] 초파리뿐만 아니라 다양한 포유동물의 체세포(somatic cell)에서 발현되는 siRNA는 cis-dsRNA, trans-dsRNA, long hairpin 구조의 전구체로부터 생성되며, 트랜스포존의 활성을 억제함으로써 유전체의 안정성을 유지하며, 또한 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 중요한 생물학적 기능을 수행하는 것으로 보고되고 있다.

[0007] Dicer와 Ago 단백질들과 같은 주요 RNAi 조절인자 이외에 다양한 추가 RNAi 조절인자들은 조직 또는 세포 특이적인 방식에 유전자 발현을 조절하기 위한 기능을 수행할 가능성이 높고, 그에 따른 해당 RNAi 조절인자의 생물학적 기능의 규명은 향후 siRNA를 통한 질병 치료제의 생산 및 능력을 향상시키는데 중요한 역할을 할 수 있다.

[0008] 한편, siRNA는 RNAi 현상에 중요한 역할을 담당하고 있지만 치료제로 사용하기에는 다양한 문제점이 존재한다. 우선 siRNA는 효소에 의해 쉽게 분해되고 작은 크기로 인해 신장에서 빠르게 제거되며, siRNA가 혈액 순환 시, 간, 췌장에서 옵소닌 작용에 의해 RES(Reticuloendothelial system)/MPS(mononuclear phagocytic system)를 통해 인식되어 쉽게 제거되므로 치료효과가 감소한다는 문제점이 있다. 또한 siRNA는 음전하(40-50 negative phosphate charge)를 띄기 때문에 세포막간 이동이 쉽지 않다는 문제점이 있다.

[0009] 이에 이러한 문제점을 개선하여 siRNA의 효율적인 전달 및 안정성 증진을 위한 기술이 개발되었는데, siRNA 당의 2’-OH를 2’-O-methyl, 2-H, 2-fluoro와 같은 화학적 그룹으로 치환함으로써 안정성을 높이거나, 리포좀, PEI (polyethylenimine), PPL (poly-L-lysine), 키토산, 덴드리머와 같은 양이온 폴리머를 이용하여 siRNA의 생체 내 투과율을 높이려는 방법이 개발된 바 있다.

[0010] 그러나 종래 개발된 기술은 화학적 변형을 통한 siRNA의 기능 향상으로서 화학적 변형 없이 세포 내에서 siRNA의 기능을 조절할 수 있는 조절자를 발굴하고 해당 조절자를 통해 siRNA의 생산과 기능을 향상시킬 수 있는 새로운 기술의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) 1. DHX15 Regulates CMTR1-dependent Gene Expression and Cell Proliferation (Life Sci Alliance. 2018 Jun 18).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 이에 본 발명자들은 CMTR1(cap1 2 ‘-O-ribose methyltransferase)이 siRNA의 생산과 기능을 증진시키는 활성이

있음을 최초로 규명하였다.

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는 siRNA의 생성 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는, siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 CMTR1의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 유전자 침묵(gene silencing)을 위한 siRNA를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 그러므로 본 발명은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는, siRNA의 생성 증진용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1 단백질은 서열번호 2 또는 서열번호 6의 염기서열로 암호화된 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1은 dsRNA에 의해 시작되는 RNAi 경로(pathway)에서, 상기 CMTR1은 dsRNA에 의해 시작되는 RNAi 경로(pathway)에서, 2'-O-ribose methylation에 의한 cap1 구조 형성을 통해 dsRNA로부터 siRNA의 생성을 증가시키며, 유전자 침묵의 타겟 mRNA을 절단할 수 있는 holo-RISC(RNA-induced silencing complex)의 형성을 촉진시켜 유전자 침묵 활성을 증가시키는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1의 카르복실 말단 영역은 holo-RISC 복합체 중에서 R2D2의 카르복실 말단 영역과 결합할 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1의 카르복실 말단 영역은 서열번호 1의 388번째부터 788번째의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, 상기 R2D2의 카르복실 말단 영역은 서열번호 3의 R2D2 아미노산 서열에서 237번째부터 311번째의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase)은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 CMTR1 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가 발현벡터에 삽입되어 있는 것일 수 있다.

[0023] 또한 본 발명은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는, siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1 단백질은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1 단백질은 서열번호 2 또는 서열번호 6의 염기서열로 암호화된 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1은 dsRNA에 의해 시작되는 RNAi 경로(pathway)에서, 2'-O-ribose methylation에 의한 cap1 구조 형성을 통해 dsRNA로부터 siRNA의 생성을 증가시켜 유전자 침묵 활성을 증가시키며, CMTR1의 카르복실 말단 영역은 holo-RISC 복합체 중에서 R2D2의 카르복실 말단 영역과 결합하여 유전자 침묵의 타겟 mRNA을 절단할 수 있는 holo-RISC(RNA-induced silencing complex)의 형성을 촉진시킬 수 있다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 CMTR1의 카르복실 말단 영역은 서열번호 1의 388번째부터 788번째의 아미노산 서열로 이루어진 것이고, 상기 R2D2의 카르복실 말단 영역은 서열번호 3의 R2D2 아미노산 서열에서 237번째부터 311번째의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0028] 또한 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 CMTR1 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 유전자 침묵(gene silencing)을 위한 siRNA를 생산하는 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2 또는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것일 수

있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는 siRNA의 생성 증진용 조성물 및 siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물에 관한 것이며, 또한 본 발명은 시험관 내에서 유전자 침묵(gene silencing)을 위한 siRNA를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 CMTR1은 유전자 침묵을 위한 siRNA의 생성을 증진시킬 수 있고 동시에 RNAi 기전에서 타겟 유전자의 침묵에 작용하는 holo-RISC(RNA-induced silencing complex)의 형성 증진을 통해 궁극적으로 siRNA의 인위적인 화학적 변형 없이도 siRNA의 생성 및 기능을 증진시키는 효과가 있다. 따라서 본 발명의 CMTR1을 이용할 경우 siRNA를 치료제로 하는 의약품의 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 GMR-wIR 전이유전자를 유전적 배경으로 갖고 있으며 EMS 처리에 의한 초파리 X 염색체상 돌연변이를 갖는 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체, Ago2^{414} 돌연변이체와 야생형 초파리에 대한 눈의 색깔을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에서 유전자 침묵과 관련된 유전자로 동정된 초파리의 dCMTR1와 각 진핵생물에서 초파리의 dCMTR1와 같은 기능을 갖는 동원체(ortholog)들에 대한 규명결과를 나타낸 것이다.

도 3은 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에서 cap1 2 '-O-ribose methyltransferase(2'-O-MTase) 활성에 따른 GMR-wIR 유도 white RNAi 여부를 확인한 결과를 각각 나타낸 것으로, (A) dCMTR1^{+}; GMR-GAL4, GMR-wIR/+ (B) dCMTR1^{W231X}; GMR-GAL4, GMR-wIR/+ (C) dCMTR1^{W231X}; GMR-GAL4, GMR-wIR/UAS-dCMTR1 (D) dCMTR1^{W231X}; GMR-GAL4, GMR-wIR/UAS-dCMTR1^{K179A} (E) dCMTR1^{W231X}; GMR-GAL4, GMR-wIR/UAS-hCMTR1 (F) dCMTR1^{W231X}; GMR-GAL4, GMR-wIR/UAS-dCMTR1^{K239A}에 대한 결과를 초파리 눈의 색으로 나타낸 것이고(3A), 이에 대한 흡광도 측정결과를 그래프로 나타낸 것이다(3B).

도 4는 2D-TLC를 통한 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에서의 2'-O-ribose methylation을 확인한 결과를 나타낸 것으로, (A) 2 '-O-ribose methylation의 유무에 따른 standard mononucleotides의 2D-TLC 결과를 나타낸 것이고, (B) Wild-type과 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에서의 2D-TLC 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 2D-TLC를 통한 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에서의 CMTR1 및 dCMTR1의 catalytic dead 단백질의 과발현을 통한 2'-O-ribose 메틸화를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 dsRNA의 cap1 구조에 따른 유전자 침묵 현상 증가를 확인한 결과를 나타낸 것으로, A는 cap 구조 없음(no cap), cap0, cap1의 구조를 나타낸 것이고, B는 이들에 대한 GFP 유전자의 침묵 활성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 dCMTR1의 siRNA 생성과의 연관성을 노던블럿(northern blotting)을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에서의 siRNA 유발 타겟 mRNA의 절단 감소활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에서의 RISC 복합체 형성 감소를 native 겔 전기영동을 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에 의한 duplex siRNA로부터 단일가닥 siRNA로의 풀림(unwinding) 감소 현상을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 dCMTR1와 holo-RISC 복합체 형성의 시작을 위한 필수인자인 R2D2의 물리적 상호작용을 확인한 결과를 나타낸 것으로, A 및 C는 면역침강 결과를 웨스턴 블럿(western blotting)으로 확인한 것이고, B는 면역염색 후 공초점 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 12는 dCMTR1와 R2D2와의 결합부위를 확인하기 위해, dCMTR1의 다양한 결손 단편들과 R2D2의 결합여부를 공동

면역침강 후, 웨스턴 블럿으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 dCMTR1와 R2D2와의 결합부위를 확인하기 위해, R2D2의 다양한 결손 단편들과 dCMTR1의 결합여부를 공동 면역침강 후, 웨스턴 블럿으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 siRNA를 이용한 질병 치료제 기술분야에서 종래 siRNA의 효율적인 전달 및 안정성 증진에만 주력하는 방법을 벗어나 타겟 유전자의 유전자 침묵을 유도하는 siRNA 자체의 생산을 증진시키고 유전자 침묵 기능을 향상시킬 수 있는 새로운 기술을 연구하던 중, CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase)이 siRNA의 생산과 기능을 증진시키는 활성이 있음을 최초로 규명하였다.

[0033] 구체적으로 본 발명자들은 초파리 생체 내에서 EMS를 이용하여 초파리의 X 염색체에 돌연변이를 유도하였고, white 유전자의 침묵을 유도하는 hairpin dsRNA를 발현하는 GMR-wIR 전이유전자 2개를 유전적 배경으로 가지고 있는 초파리에서 white 유전자 침묵이 저해되어 흰색의 눈이 노란색으로 변하는 돌연변이체를 동정하였고, 유전자 맵핑(genetic mapping)을 통해 돌연변이 보유 유전자를 동정한 결과, 초파리의 CG6379 유전자가 돌연변이 되었음을 확인하였고, 상기 돌연변이체는 2'-O-MTase 도메인이 기능하지 못할 것으로 확인하였으며 이를 본 발명의 일실시예에서는 $dCMTR1^{W231X}$ 으로 명명하였다.

[0034] 여기서 상기 GMR-wIR은 초파리 눈에서 white 유전자의 RNAi를 유도하는 hairpin dsRNA를 발현 가능하게 하는 유전자로서, 2개의 GMR-wIR 유전자를 갖는 초파리는 눈에서 white 유전자에 대한 유전자 침묵 현상에 의해 빨간색 눈이 흰색이 된다.

[0035] RNAi와 관련하여 동정된 초파리의 CG6379 유전자에 대하여, 진핵생물의 유전체를 대상으로 다른 종간에 동일한 기능을 가질 것으로 예상되는 동원체(ortholog) 유전자들을 분석한 결과, 다양한 진행생물에서 보존되어 있는 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase)임을 확인하였다.

[0036] 이에 본 발명자들은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase)의 효소활성이 dsRNA에 기인한 RNAi와 관련성이 있는지와 그 RNAi 경로 상에서 어떤 단계에 관련성이 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0037] CMTR1은 cap0-mRNA를 2'-O-ribose 메틸화시켜 cap1 구조를 형성하도록 한다. 이에 본 발명자들은 GMR-wIR 전이유전자 1개에 의해 유도되는 유전자 침묵이 저해된 짙은 주황색 눈의 $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체에 대하여 전장 인간 CMTR1(hCMTR1) 유전자의 과발현을 눈 조직에서 유도한 결과, white 유전자 침묵의 저해가 복구되어 짙은 주황색 눈이 옅은 주황색 눈으로 변한 것으로 나타났다.

[0038] 반면, 2'-O-MTase 활성이 상실된 CMTR1을 발현하는 $hCMTR1^{K249A}$ 또는 $dCMTR1^{K179A}$ 돌연변이 유전자의 과발현을 눈 조직에서 유도한 경우에는 white 유전자 침묵의 저해가 복구되지 못하는 것으로 나타났다.

[0039] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase)이 유전자 침묵에 관여한다는 것을 알 수 있었고, CMTR1의 2'-O-methyltransferase 도메인에 의한 cap1 methyltransferase 활성이 RNAi 기전에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

[0040] 또한 본 발명의 다른 일실시예에서는 유전자 침묵이 저해된 $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체에 대하여 cap1 구조에 대한 프로파일 변화를 분석하였는데, $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체에서는 mRNA 전사체 유래의 2'-O-methyluridine 5'-monophosphate, 2'-O-methylguanosine 5'-monophosphate 및 2'-O-methylcytidine 5'-monophosphate은 검출되지 않았고, 2'-O-methyladenosine 5'-monophosphate도 극히 미량으로 검출되었다. 반면, 야생형 dCMTR1 또는 인간 CMTR1 유전자를 과발현시킨 경우, 2'-O-ribose methylated nucleotide의 양이 증가됨을 확인하였다.

[0041] 따라서 이는 유전자 침묵이 저해된 $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체의 경우, 즉, CMTR1의 작용이 제대로 작동하지 못하는 경우, 2'-O-ribose methylated nucleotide의 생성이 저해됨을 의미하며, 또한 CMTR1이 cap1 methyltransferase의 활성을 가지고 있음을 의미한다.

[0042] 또한 본 발명의 다른 일실시예에서는 본 발명의 CMTR1이 cap1 methyltransferase의 기능이 있음을 상기에서 확인한 바에 의해, CMTR1에 의한 dsRNA의 cap1 메틸화가 유전자 침묵(RNAi)과 관련이 있는지 확인하기 위해, $CuSO_4$ 유무에 따라 GFP를 발현하는 초파리 세포에 5'ppp(no cap)-, cap0-, 또는 cap1-GFP dsRNA를 도입시킨 후,

유전자 침묵 현상을 분석하였다.

[0043] 그 결과, 5'ppp- 및 cap0-GFP dsRNA에 의한 GFP 유전자 침묵의 활성 변화를 확인할 수 없었다. 그러나 cap1-GFP dsRNA에 의한 GFP 유전자 침묵의 활성은 크게 증가되었음을 확인할 수 있었다.

[0044] 따라서 dsRNA의 cap1 구조가 유전자 침묵현상을 증가시키는데 기여함을 알 수 있었고, 본 발명의 CMTR1이 cap1 methyltransferase의 작용을 통해 dsRNA의 cap1 구조를 형성하도록 하며 이를 통해 유전자 침묵현상을 증가시킬 수 있음을 알수 있었다.

[0045] 또한 본 발명자들은 본 발명의 CMTR1이 siRNA의 생성 및 유전자 침묵 기전에 있어서 어떻게 구체적으로 작용하는지 확인하기 위해, 초파리를 대상으로 유전자 침묵이 저해된 돌연변이체인 $dCMTR1^{W231X}$ 및 야생형 초파리(정상대조군)을 대상으로 wIR siRNA의 생성양을 노던블럿을 통해 확인하였다.

[0046] 그 결과, $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체는 정상대조군에 비해 siRNA의 양이 현저하게 감소된 것으로 나타났고, 반면 상기 돌연변이체에 야생형 dCMTR1 유전자를 과발현시킨 경우, 감소된 siRNA의 양이 증가되는 것으로 나타났다.

[0047] 한편, 2'-O-MTase 활성을 상실시키는 돌연변이를 갖는 $dCMTR1^{K179A}$ 유전자를 과발현시킨 경우에는 감소된 siRNA의 양이 증가되지 못하는 것으로 나타났다.

[0048] 따라서 이러한 결과를 통해 CMTR1은 유전자 침묵을 위한 siRNA의 생성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0049] 또한 본 발명자들은 siRNA에 의한 유전자 침묵에 관여하는 기전에 있어서, CMTR1이 RISC(RNA-induced silencing complex) 복합체와의 관련성을 확인하기 위해, $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체 및 야생형 정상대조군에서 siRNA에 의한 타겟 mRNA의 절단 정도를 분석하였는데, 그 결과 야생형 정상대조군이 돌연변이체에 비해 절단된 타겟 mRNA의 양이 더 증가한 것으로 나타났다.

[0050] 또한, RISC 복합체(RNA-induced silencing complex)에 미치는 CMTR1의 영향도 분석하였는데, $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체는 타겟 mRNA의 분해에 필요한 holo-RISC의 형성에 이상을 초래함을 확인하였다.

[0051] 일반적으로 세포 내에서 존재하는 dsRNA는 Dicer라는 리보핵산 가수분해효소에 의해 잘려 21-23bp의 작은 RNA로 전환되며, 잘린 작은 RNA 형태를 siRNA (short interfering RNA)이라 한다. 세포질에서 잘린 siRNA는 RISC (RNA-induced silencing complex) 복합체와 결합하는데, RISC assembly는 duplex siRNA가 R2D2/Dicer-2 heterodimer에 결합하여 R2D2/Dicer-2 initiator(RDI) 복합체의 형성으로 시작되며, 이후 다른 단백질들이 RDI 복합체에 결합하여 RISC-loading complex(RLC)가 형성되며 여기에 Argonaute-2(Ago2)가 결합하여 pre-RISC가 형성된다. 이후 duplex siRNA가 풀림(unwinding)이 진행되면 타겟 mRNA를 절단할 수 있는 holo-RISC가 형성된다.

[0052] 이에 본 발명자들은 타겟 mRNA를 절단할 수 있는 holo-RISC의 형성에 CMTR1이 미치는 영향을 분석하였는데, 그 결과, CMTR1의 기능이 상실된 $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체의 경우, RISC 복합체에 대한 native 겔 전기영동 분석에서 holo-RISC에 비해 전기적 이동이 늦는 현상으로 나타났다.

[0053] 이는 pre-RISC의 duplex siRNA가 풀림(unwinding)이 되면 타겟 mRNA를 절단할 수 있는 holo-RISC로 전환이 되며, siRNA의 풀림으로 인해 holo-RISC는 pre-RISC에 비해 크기가 감소하여 전기영동에서 이동성이 더 증가되어진다.

[0054] 그러나, $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체에서는 native 겔 전기영동에서 RISC 복합체의 이동이 holo-RISC에 비해 전기적 이동이 늦는 현상으로 확인됨에 따라 pre-RISC에서 holo-RISC로 전환되지 못함을 알 수 있었으며, 정상군에 비해 duplex siRNA의 풀림(unwinding) 정도가 감소됨을 알 수 있었다.

[0055] 이는 CMTR1이 RNAi(유전자 침묵)에 있어서, pre-RISC 에서 holo-RISC로의 전환 촉진을 통해 유전자 침묵 활성을 증진시킬 수 있음을 의미한다.

[0056] 뿐만 아니라 본 발명자들은 CMTR1이 holo-RISC 복합체 형성의 시작을 위한 필수인자인 R2D2와 물리적인 결합작용을 갖는지 확인하기 위해, 초파리 S2 세포 내에서 CMTR1과 R2D2와의 공동 면역침강을 수행하였다.

[0057] 그 결과, CMTR1과 R2D2간의 상호 물리적인 결합을 확인할 수 있었고, 특히 CMTR1의 카르복실-말단 영역과 R2D2의 카르복실-말단 영역이 서로 결합하고 있음을 알 수 있었다.

[0058] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 CMTR1이 R2D2와 상호작용 하며, pre-RISC에서 holo-RISC로의 전환 촉진을 통해 궁극적으로 siRNA에 의한 타겟 유전자의 침묵을 향상시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0059] 그러므로, 본 발명은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는, siRNA의 기능 증진용 조성물을 제공할 수 있다.

[0060] 본 발명에서 상기 CMTR1은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 서열번호 1은 초파리(Drosophila) CMTR1 단백질에 대한 아미노산 서열이며, 상기 서열번호 5는 인간 CMTR1 단백질에 대한 아미노산 서열이다.

[0061] 또한, 상기 서열번호 1의 CMTR1 단백질은 서열번호 2의 염기서열로 암호화되어 있고, 상기 서열번호 5의 CMTR1 단백질은 서열번호 6의 염기서열로 암호화된 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않으며, 상기 서열의 상동체가 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

[0062] 구체적으로, 상기 CMTR1은 서열번호 2 또는 서열번호 6의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱더 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.

[0063] 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명의 CMTR1은 dsRNA에 의한 RNAi 경로(pathway)에서, dsRNA의 cap1 메틸화를 통해 siRNA의 생성을 증가시킬 수 있고, 유전자 침묵의 타겟 mRNA을 절단할 수 있는 holo-RISC(RNA-induced silencing complex)의 형성을 촉진시킬 수 있다.

[0065] 상기 CMTR1은 카르복실 말단 영역이 holo-RISC 복합체에 포함되는 R2D2의 카르복실 말단 영역과 상호결합하여, pre-RISC에서 holo-RISC로의 형성을 촉진시킬 수 있다.

[0066] 여기서 상기 R2D2와 상호결합하는 CMTR1의 카르복실 말단 영역은 서열번호 1의 388번째부터 788번째의 아미노산 서열로 이루어진 영역이며, 이는 서열번호 2의 1162번째부터 2367번째의 염기서열로 이루어진 영역에 해당한다.

[0067] 또한, 상기 CMTR1과 상호결합하는 R2D2의 카르복실 말단 영역은 서열번호 3의 237번째부터 311번째의 아미노산 서열로 이루어진 영역이며, 이는 서열번호 4의 709번째부터 936번째의 염기서열로 이루어진 영역에 해당한다.

[0068] 상기 조성물에 함유된 CMTR1은 단백질 형태로 포함될 수도 있고, 서열번호 1 또는 서열번호 5의 CMTR1 아미노산 서열을 코딩하는 유전자가 발현벡터에 삽입된 형태로 포함될 수도 있다.

[0069] 또한 본 발명은 CMTR1(cap1 2 '-O-ribose methyltransferase) 단백질을 유효성분으로 포함하는, siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물을 제공할 수 있다.

[0070] 앞서 기술한 바와 같이, 본 발명의 CMTR1은 cap1 메틸화를 유도하며, 유전자 침묵을 위한 siRNA의 생성을 증가시키는 활성이 있음을 확인하였고, pre-RISC에서 holo-RISC로의 형성 촉진을 통해 타겟 mRNA의 절단을 통한 타겟 유전자의 침묵 활성을 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[0071] 그러므로 본 발명의 CMTR1을 포함하는 조성물은 siRNA에 의한 타겟 유전자 침묵(gene silencing) 활성을 증진시킬 수 있다.

[0072] 나아가 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 5의 CMTR1 아미노산 서열을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 유전자 침묵(gene silencing)을 위한 siRNA를 생산하는 방법을 제공할 수 있다.

[0073] 즉, 시험관 내에서 세포에 CMTR1 유전자가 삽입된 발현벡터를 도입하여 상기 세포내에서 CMTR1의 과발현 유도를 통해, 상기 세포로부터 유전자 침묵을 위한 siRNA를 대량 생산할 수 있다.

[0074] 본 발명에 따른 siRNA의 생성 증진용 조성물 및 siRNA에 의한 유전자 침묵(gene silencing) 활성 증진용 조성물은 특히 siRNA를 이용한 치료제의 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

[0076] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설

명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0078] **<준비예 및 실험방법>**

[0079] 재료

[0080] 모든 파리는 25 ℃에서 표준 옥수수 가루/한천 배지를 이용하여 사육하였다. 또한, dCMTR1^{W231X} 돌연변이체는 GMR-wIR의 유전적 배경에서 성체 눈에 대한 FRT19A를 갖는 X 염색체의 모자이크 분석을 기반으로 한 유전자 스크린 방법을 통해 분리하였다. FRT19A 균주는 야생형으로 사용하였고 w^{1118} 균주는 대조군으로 사용하였다. dcr-2^{L811fsX}, Ago2^{414} 및 Ago2^{V966M} 대립 유전자는 Kim et al., 2007; Lee et al., 2004; Okamura et al., 2004 문헌에 기술된 바와 같으며, Ago2^{414} 균주는 M. Siomi(도쿄 대학, 도쿄, 일본)으로부터 제공받아 사용하였다.

[0082] 형질전환 초파리의 제조

[0083] GAL4/UAS 시스템을 통한 야생형 dCMTR1 또는 hCMTR1 발현 형질전환 초파리를 만들기 위해 각 유전자의 전장 cDNA를 하기 표 1의 프라이머들을 이용하여 역전사 반응 및 PCR 방법을 통해 합성한 후, NotI 및 XbaI 제한효소 사이트를 이용하여 pUAST 벡터에 삽입하였다.

표 1

Name	Sequence (5' to 3')	Use
wIR siRNA	AGCTTTCTTGGGCACTCCCAG	Northern blotting
miR-100	CACAAGTTCGGATTTACGGGTT	Northern blotting
let-7	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	Northern blotting
miR-11	GCAAGAACTCAGACTGTGATG	Northern blotting
2S rRNA	TACAACCCTCAACCATATGTAGTCCAAGCA	Northern blotting
hp-w(Ex3)-F	GAGATGCAGGCCAGGTGCGC	Northern blotting
hp-w(Ex3)-R	GGCGGTAAAGGAGTCCAGTC	Northern blotting
Pp-luc siRNA sense	p-CGUACGCGGAAUACUUCGAUU-OH	Preparation of siRNA duplex
Pp-luc siRNA sense (asymmetric)	p-UGUACGCGGAAUACUUCGAUU-OH	Preparation of siRNA duplex
Pp-luc siRNA antisense	p-UCGAAGUAUUCCGCGUACGUG-OH	Preparation of siRNA duplex
UAS-dCMTR1-F	AAGCGGCCGCATGGACGAACCTTCGGACGATG	Cloning
UAS-dCMTR1-R	AATCTAGACTAGCTGTGGCCCAACTTGTCC	Cloning
UAS-hCMTR1-F	AAGCGGCCGCATGAAGAGGAGAACTGACCC	Cloning
UAS-hCMTR1-R	AATCTAGATTAGGCCCTGTGCATCTGGA	Cloning
GST-dCMTR1-F	AATCTAGAAGACGAACCTTCGGACGATGA	Cloning
GST-dCMTR1-R	AAAAGCTTCTAGCTGTGGCCCAACTTGT	Cloning
GFP-F	AAGAATTCGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGT	Cloning
GFP-R	AAGCGGCCGCCTAGAAGCTTGAGCTCGAGA	Cloning
dCMTR1-full-F	AAACTAGTATGTACCCATACGATGTTCCTGAC	Cloning
dCMTR1-full-R	AAGAATTCTTAGCAGCGTAATCTGGAACGTCATA	Cloning
dCMTR1-D1-F	AAGAATTCCCTGCCTGCGAGGAGCTC	Cloning
dCMTR1-D2-F	AAGAATTCGCGGAGACGGCGGGCATC	Cloning
dCMTR1-D1-D2-R	AAGCGGCCGCCTAGCTGTGGCCCAAC	Cloning
dCMTR1-D3-F	AAGAATTCGACGAACCTTCGGACGAT	Cloning
dCMTR1-D3-R	AAGCGGCCGCCTACGCATCCGAACGT	Cloning
dsLacZ-F	TAATACGACTCACTATAGGGCATTATCCGAACCATCC	dsRNA synthesis
dsLacZ-R	TAATACGACTCACTATAGGGCAGAACTGGCGATCGTTCG	dsRNA synthesis
T7-GFP-SNS-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAGGGCGAGGAGCTGTT	dsRNA synthesis
T7-GFP-SNS-R	TGCTCAGGTAGTGGTTGTCG	dsRNA synthesis
T7-GFP-ANS-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACTTGTACAGCTCGTCCATGC	dsRNA synthesis
T7-GFP-ANS-R	CCTGAAGTTCATCTGCACCA	dsRNA synthesis
dCMTR1-K179A-S	GATGTTGGCCATCGCGACGGCGGCGCGG	Site-directed mutagenesis
dCMTR1-K179A-AS	CCGCGCCGCCGTCGCGATGGCCAACATC	Site-directed mutagenesis
hCMTR1-K239A-S	TACAAAATCCATGTTAGCCATCGCCATTGCTGCCCTGTTTAGAAAG	Site-directed mutagenesis
hCMTR1-K239A-AS	CTTTCTAAACAGGGCAGCAATGGCGATGGCTAACATGGATTTTGTA	Site-directed mutagenesis
2'-O-Me-A	p-AMeCGAAGUAUUCCGCGUACCUG-OH	Standard oligonucleotide for 2D-TLC analysis
2'-O-Me-U	p-UMeCGAAGUAUUCCGCGUACCUG-OH	Standard oligonucleotide for 2D-TLC analysis
2'-O-Me-G	p-GMeGUACGCGGAAUACUUCGUUU-OH	Standard oligonucleotide for 2D-TLC analysis
2'-O-Me-C	p-CMeGUACGCGGAAUACUUCGUUU-OH	Standard oligonucleotide for 2D-TLC analysis

NMe, 2'-O-ribose methylated nucleotide; p-, 5' phophorylation

[0084]

[0085] 또한, Site-directed mutagenesis는 PfuUltra High-Fidelity DNA 중합효소(Stratagene, San Diego, CA, USA)

및 dCMTR1 또는 hCMTR1의 전장 cDNA를 이용하여 진행한 후 cap1 MTase-dead 변이체들(dCMTR1K^{179A} 또는 hCMTR1^{K239A})을 발현하는 UAS-전이유전자(transgene)라인을 제조하였다. 이를 위해 사용한 프라이머 세트들은 상기 표 1에 기재된 바와 같다. 제조한 각 DNA 구축물(construct)은 유전자전이효소(transposase)를 발현하는 P{Δ2-3}와 함께 w^{1118} 배아로 공동 미세주입 되었다. 아미노 말단에 트리플 FLAG 에피토프(epitope)를 갖는 야생형 R2D2 또는 이의 결실 유도체 발현은 S2세포에서 유도시켰다. 또한 S2 세포에서 발현된 아미노 말단에 트리플-HA 또는 FLAG 에피토프를 갖는 녹색 형광 단백질(GFP)은 이종 대조군으로 사용하였고, GFP 코딩서열은 상기 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR 방법으로 증폭시켰고, SpeI/EcoRI 제한효소 사이트를 이용하여 pMT-HA 또는 pMT-FLAG 벡터로 클로닝하였다. 아미노 말단에 트리플-HA 에피토프를 갖는 야생형 dCMTR1 또는 이의 결실 유도체들은 S2 세포에서 발현시켰고, dCMTR1의 전장 cDNA 또는 이의 결실 변이체들은 상기 표 1의 프라이머들을 이용하여 PCR 증폭하였으며, EcoRI/NotI 제한효소 사이트를 이용하여 pMT-HA 벡터로 클로닝하였다.

[0087] 눈 색소분석(Eye pigment assay)

[0088] 눈 색소는 30마리의 성체 초파리로부터 수득하였고, 0.01M HCl이 함유된 에탄올로 균질화시킨 후, 65℃에서 10분 동안 배양하였다. 이후 원심분리 수행 후, 각 샘플의 상층액을 수득한 후, 480nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0090] 시험관 내 RNAi 및 siRNA의 풀림 분석(unwinding assays)

[0091] 배아 추출물의 준비 및 타겟 RNA의 절단은 Pham 등에 의해 알려진 공지의 방법에 의해 수행하였다. RISC assembly는 센스 가닥의 5' 말단에 G : U wobble이 있으며 Ago2에서 가이드 가닥의 유지를 위해 고도로 비대칭을 갖는 Pp-luc siRNA duplex를 사용하여 native 겔 전기영동을 수행하였다. siRNA 의 풀림 분석은 비대칭적인 Pp-luc siRNA duplex를 이용하여 수행하였고, Pp-luc siRNA의 센스 및 안티센스 가닥의 서열은 상기 표 1에 기재된 바와 같다.

[0093] RNA 분석

[0094] GMR-wIR로부터 발현된 헤어핀 RNA은 노던블럿으로 검출하였는데, 이때 상기 표 1의 hp-w(Ex3)-F 및 hp-w(Ex3)-R 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 합성된 5'-말단이 표지된 DNA 프로브(probe)를 사용하였다. 노던블럿은 작은 RNA를 검출하는 방법으로, 5′-말단 표지된 DNA 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 이용하였다.

[0096] 웨스턴블럿

[0097] 웨스턴블럿은 anti-dCMTR1 (1:200 dilution; Abmart, Berkeley Heights, NJ, USA), anti-hCMTR1 (1:1000 dilution; Abcam, Cambridge, UK), anti-R2D2(1:1000 dilution; a gift from M. Siomi), anti-FLAG (1:1000 dilution; Sigma, St. Louis, MO, USA), anti-HA (1:1000 dilution; Sigma), anti-Dcr-2 (1:1000 dilution; Abcam), anti-Dcr-1 (1:500 dilution; Abcam), anti-Ago2 (1:3 dilution; a gift from M. Siomi), anti-Ago1 (1:1000 dilution; Abcam), anti-dFMR (1:1000 dilution; a gift from G. Hannon, University of Cambridge, Cambridge, UK) 및 anti-VIG (1:1000 dilution; a gift from G. Hannon)의 항체들을 이용하여 수행하였다. 또한 Anti-β-actin (1:1000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)은 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0099] TLC(Thin-layer chromatography) 분석

[0100] 총 RNA는 유전자형별 20 마리의 성체 초파리 또는 유전자형별 100마리의 성체 초파리로부터 트리졸 시약을 이용하여 추출하였다. 이후 magnetic mRNA 분리 키트(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 이용하여 총 RNA로부터 mRNA를 정제하였다. 정제한 mRNA는 RNA 5′ pyrophosphohydrolase (New England Biolabs)를 이용하여 37℃에서 1시간 반응하여 디캡핑(decapping)하였고, 이후 FastAP thermosensitive alkaline phosphatase를 처리하고 37℃에서 10분 동안 추가 반응시켰다. 그런 뒤, 페놀-클로로포름 추출을 수행하고 에탄올 침전 후, RNA

의 5' 말단은 T4 polynucleotide kinase(PNK; New England Biolabs) 및 [γ-^{32}P]-ATP를 이용하여 37℃에서 30분 동안 반응시켜 방사선 표지시켰다. 또한 상기 표 1의 합성된 RNA 올리고뉴클레오티드도 T4 PNK 및 [γ-^{32}P]-ATP로 방사선 표지시켰다. 이후 열처리로 PNK를 불활성화 시키고, 표지되지 않은 방사선 동위원소는 RNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research, Irvine, CA, USA)를 이용하여 제거하였다. 이후 ^{32}P 표지된 RNA는 Nuclease P1 (Sigma)을 이용하여 37 ℃에서 2시간 동안 반응시킴으로써 5′ -monophosphate nucleosides로 완전하게 분해시켰다. Mononucleotide는 2차원으로 전개시켰는데, 한 방향은 용매 A를 이용하여 수행하였고, 이후 용매 B 또는 C를 이용하여 첫 번째 방향에 대한 직각 방향으로 전개시켰다. 이때 사용된 용매들의 조성은 다음과 같다.

[0101] 용매 A: isobutyric acid/25% ammonia/water [66:1:33 (v:v:v)]

[0102] 용매 B: 0.1M sodium phosphate buffer (pH 6.8)/ammonium sulfate/1-propanol [100:60:2 v:v:v]

[0103] 용매 C: isopropanol/concentrated HCl/water [68:18:14 (v:v:v)]

[0104] 이후 TLC 플레이트를 공기 중에서 건조시켰고 스팟(spot)은 방사선 촬영을 통해 가시화시켰다.

[0106] 세포배양

[0107] Drosophila S2 세포 및 copper sulfate-inducible, GFP-발현 S2 세포주는 25℃에서 10% fetal bovine serum(HyClone, Logan, UT, USA) 및 100 U/mL penicillin-streptomycin(HyClone)을 함유한 Schneider's Drosophila 배지(GIBCO, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 배양하였다.

[0109] RNAi-매개 유전자 넉다운(knockdown)

[0110] 5′ ppp-, cap0- 또는 cap1-GFP dsRNA, GFP 센스(602 nucleotides)에 대한 DNA 주형 및 dsRNA의 안티센스(586 nucleotides) 가닥은 상기 표 1의 프라이머 세트들을 이용하여 PCR을 통해 증폭하여 제조되었다. PCR 산물은 [α-^{32}P]-UTP 존재하에서 T7 RNA polymerase(New England Biolabs)를 이용하여 시험관에서 전사반응에 사용하였고, 전사 산물들은 겔 정제되었고, 5'ppp-GFP dsRNA를 생산을 위해 사용하였다. 각 RNA 가닥의 분주물(aliquot)은 처음으로 전사된 뉴클레오타이드에 7-메틸 구아노신을 Vaccinia Capping System (New England Biolabs)을 사용하여 캡핑하였고, 이후 cap0-GFP dsRNA를 생산을 위해 사용되었다. Cap0-methylated RNA 가닥은 RNA Clean & Concentrator-5를 이용하여 정제하였다. 그 뒤, 2'-O-ribose 메틸화는 ScriptCap 2'-O-Methyltransferase 키트 (CELLSCRIPT, Madison, WI, USA)를 이용하여 cap0 메틸화로 변형된 첫 번째 전사 뉴클레오티드에 부가되었고, 생성된 RNA는 cap1-GFP dsRNA의 생산에 사용되었다. 상보적인 가닥들은 어닐링 버퍼[30 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 100 mM potassium acetate 및 2 mM magnesium acetate]에서 1:1의 비로 혼합한 다음, 95℃에서 1분 동안 열처리 한 후, 천천히 상온의 온도로 식혀 5′ ppp-, cap0- 또는 cap1-GFP dsRNAs을 제조하였다. LacZ에 대한 dsRNA도 상기 표 1의 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 제조하였다.

[0111] S2 세포에서 GFP의 발현은 0.7 mM의 $CuSO_4$의 첨가로 유도하였고, 24시간 발현 유도 후 상기 세포들(1×10^6 cells/well)은 2 μg의 mock 또는 각각의 dsRNA를 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 이용하여 형질감염시켰고, 12시간 후 상기 세포들을 차가운 용해버퍼[20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM DTT, 0.1% Triton X-100 및 protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland)]로 용해시킨 후 웨스턴블럿을 수행하였다.

[0113] 공동면역침강[Co-immunoprecipitation (Co-IP)] 및 RNase의 처리

[0114] 공동면역침강은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. S2 세포를 서로 다른 에피토프가 태그(tag)된 2개의 단백질을 발현하는 DNA를 FuGENE HD Transfection 시약 (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 공동형질 감염시켰다. 유전자 발현의 유도는 0.7 mM의 $CuSO_4$ 첨가로 유도하였고, 48시간 동안 형질감염 시킨 후, 세포를 상기 사용한 차가운 세포 용해 버퍼를 이용하여 세포 용해물을 제조하였다. 이후 15,000x g의 속도로 원심분리하여 상층액을(500 μg)을 분리한 후, 이를 면역침강에 사용하였다.

[0115] RNase의 처리는 다음과 같은 방법으로 수행하였는데, 상기 수득한 세포 용해물의 상층액에 항체 첨가 이전에 먼저 20 μL RNase A/T1 mix(Thermo Fisher Scientific)를 첨가하고 37℃의 온도에서 15분 동안 반응시켰다. 면역침강시킨 각 시료들은 웨스턴블럿을 통해 분석하였다.

[0117] 면역형광 세포 염색(Immunofluorescence cell staining)

[0118] HA-태깅 dCMTR1 및 FLAG-태깅 R2D2을 발현시키기 위한 DNA 구조물을 FuGENE HD Transfection 시약을 이용하여 S2 세포에 공동 형질감염시켰다. 이후 0.7 mM의 $CuSO_4$ 첨가로 발현을 유도하였고, 48시간 동안 형질감염 시킨 후, 세포들을 1차 항체로서 anti-FLAG (1:200 dilution; Sigma) 및 anti-HA (1:200 dilution; Sigma) 항체를 사용하여 반응시켰고, 이후 2차 Alexa-Fluor-488- 및 Alexa-Fluor-594-conjugated 항체(1:500 dilution for each; Molecular Probes, Mulgrave, VIC, Australia)로 각각 반응시켰다. 이후 시료들을 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vector Laboratories, Stonesfield, UK)이 함유된 Vectashield 마운팅 배지에 놓고 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

[0120] **<실시예 1>**

[0121] **RNAi 양성조절 인자로서 CMTR1의 동정 및 확인**

[0122] siRNA를 통한 유전자 침묵(gene silencing)과 관련된 새로운 유전자의 발굴을 위해, 초파리(Drosophila melanogaster) 생체 내에서 white 유전자의 침묵을 유도하는 hairpin dsRNA를 발현하는 GMR-wIR 전이유전자(transgene)를 유전적 배경(genetic background)으로 가지고 있는 초파리의 X 염색체에 EMS로 유도시킨 돌연변이체의 스크리닝을 수행하였다. EMS로 유도된 돌연변이 스크리닝 분석 결과, GMR-wIR 2 카피(copy)에 의한 white 유전자 침묵 현상이 부분적으로 저해되어 눈색이 하얀색에서 노란색으로 변하는 RNAi 양성조절 인자 동형접합 돌연변이체(homozygous mutant)를 동정하였다(도 1 참조).

[0123] 또한 본 발명자들은 유전적 매핑을 통해 발굴된 돌연변이체에서 돌연변이가 일어난 유전자를 확인한 결과, CG6379 유전자임을 확인하였고, 더 나아가 상기 CG6379 유전자가 진화적으로 인간을 포함한 다양한 진핵생물(eukaryote)에 보존되어있는 CMTR1(cap1 2'-O-ribose methyltransferase; cap1 2'-O-MTase)의 동원체(ortholog)라는 것을 확인하였다. 또한 본 발명에서 동정한 상기 CG6379 유전자는 2'-O-MTase 도메인(domain)을 갖고 있으며, DNA 염기서열 분석 결과, 발굴된 돌연변이체는 2'-O-MTase 도메인에 조기 중지 코돈(premature stop codon) W231X를 가지고 있음을 확인하였다(도 2 참조).

[0124] 또한 상기 돌연변이체는 2'-O-MTase 도메인이 기능하지 못하고, dCMTR1 null 돌연변이와 같은 표현형을 보이는 것으로 나타남에 따라, 본 발명자들은 상기 발굴된 돌연변이체를 $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체($dCMTR1^{W231X}$ mutant)로 명명하였다.

[0126] **<실시예 2>**

[0127] **dsRNA-triggered RNAi 경로에서 cap1 2'-O-MTase 활성과의 연관성 분석**

[0128] 고등 진핵생물에서 CMTR1은 cap0-mRNA를 2'-O-ribose 메틸화에 의해 mRNA가 cap1 구조를 형성하도록 한다. 이에 본 발명자들은 $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체의 cap1 MTase 기능 손실이 GMR-wIR에 의해 유도되는 white 유전자 침묵에 영향을 끼치는지를 확인하기 위해, 초파리 GAL4/UAS 시스템을 이용해 $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체의 눈 조직에서 특이적으로 CMTR1 단백질의 과발현을 유도하였다.

[0130] 그 결과 GMR-GAL4에 의한 인간 CMTR1(hCMTR1) 단백질의 과발현이 $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체의 눈 조직에서 dCMTR1 유전자의 돌연변이로 인해 발생하는 white 유전자 침묵의 저해가 회복(복구)되어짐을 확인할 수 있었다(도 3 참조). 한편, GMR-GAL4에 의한 CMTR1의 catalytic dead 단백질($hCMTR1^{K249A}$, $dCMTR1^{K179A}$)의 과발현은 $dCMTR1^{W231X}$ 돌연변이체의 눈 조직에서 dCMTR1 유전자의 돌연변이로 인해 발생하는 white 유전자 침묵의 저해를 회복시키지 못

하는 것으로 나타났다(도 3 참조). 이러한 결과는 cap1 MTase 활성이 초파리에서 dsRNA에 의해서 시작되는 RNAi 경로와 관련성이 있음을 의미한다.

[0132] 또한 본 발명자들은 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체의 cap1 MTase 기능 손실에 의해 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체의 cap1 구조의 프로파일(profile) 변화 여부를 확인하기 위해 2D-TLC(two-dimensional thin-layer chromatography) 분석을 수행하였다.

[0133] 그 결과, dCMTR1^{W231X} 돌연변이체의 mRNA 전사체(transcript)에서 유래된 2'-O-methyluridine 5'-monophosphate, 2'-O-methylguanosine 5'-monophosphate 및 2'-O-methylcytidine 5'-monophosphate은 검출할 수 있는 양이 존재하지 않았으며, 2'-O-methyladenosine 5'-monophosphate은 야생형 대조군의 2D-TLC 결과와 비교했을 때 상대적으로 급격하게 감소되어 있는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 통해 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에서는 2'-O-ribose 메틸화된 뉴클레오티드가 제대로 생성되지 못하고 있음을 알 수 있었다(도 4 참조).

[0135] 또한, 초파리 GAL4/UAS 시스템을 이용하여 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체의 눈 조직에서 특이적으로 야생형 dCMTR1과 human CMTR1 cDNA의 과발현을 유도한 결과, 2'-O-ribose 메틸화된 뉴클레오티드의 양이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 5 참조). 이러한 결과는, dCMTR1 유전자가 포유동물의 동원체들과 유사하게 cap1 MTase 활성을 가지고 있음을 의미한다.

[0137] **<실시예 3>**

[0138] **dsRNA의 cap1 구조에 따른 유전자 침묵 현상 증가확인**

[0139] dsRNA의 dCMTR1에 의한 cap1 메틸화가 RNAi와 연관성이 있는지 확인하기 위해, $CuSO_4$ 유무에 따라 GFP를 발현하는 초파리 S2 세포에 5'ppp-, cap0-, 또는 cap1-GFP dsRNA를 형질감염 시켰다. GFP를 발현하는 초파리 S2 세포는 $CuSO_4$-inducible promoter를 가지고 있는 pMT 벡터에 GFP cDNA 서열을 삽입한 plasmid DNA로 형질감염 시킨 후, 안정화된 세포주로 만든 것으로 $CuSO_4$ 유무에 따라 GFP를 발현한다.

[0140] 분석 결과, 5'ppp-와 cap0-GFP dsRNA의 GFP 유전자에 대한 침묵 활성(silencing activity)의 차이는 확인할 수 없었다. 그러나 cap1-GFP dsRNA의 GFP 유전자에 대한 침묵 활성(silencing activity)은 크게 증가하는 것으로 나타났다(도 6 참조).

[0141] 따라서 이러한 결과를 통해, 초파리 S2 세포에서 dsRNA의 cap1 구조는 유전자의 침묵 현상을 증가시키는 활성이 있음을 알 수 있었다.

[0143] **<실시예 4>**

[0144] **dCMTR1의 siRNA 양적(abundance) 조절능 확인**

[0145] dCMTR1에 의한 cap1 메틸화가 siRNA 생성과 연관성이 있는지 확인하기 위해, GMR-wIR 헤어핀 dsRNA로부터 생성되는 siRNA의 양을 노던 블럿팅을 이용하여 측정하였다.

[0147] 그 결과, dCMTR1^{W231X} 돌연변이체는 야생형 대조군(control)에 비해서 wIR siRNA 양이 감소한 것으로 나타났다(도 7a 참조). 한편, dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에서 wIR siRNA양이 감소하는 현상은 초파리의 GAL4/UAS 시스템을 이용하여 야생형 dCMTR1을 과발현시킴으로써 다시 회복되는 것으로 나타났고, dCMTR1의 catalytic dead 단백질인 dCMTR1^{K179A}를 과발현시켰을 경우에는 회복되지 못하는 것으로 나타났다(도 7b 참조). 그러므로 이러한 결과를 통해 dCMTR1의 촉매적 활성(catalytic activity)이 siRNA의 생합성과 관련성이 있음을 알 수 있었다.

[0149] **<실시예 5>**

[0150] **dCMTR1의 siRNA 생성 이후 하류기전(downstream)에 대한 영향 분석**

[0151] 본 발명자들은 dCMTR1이 siRNA의 생성 이후 RNAi의 하류기전에도 영향을 미치는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 구체적으로, dCMTR1이 RISC assembly 및 타겟 mRNA의 RISC-directed cleavage와 같은 siRNA 생성 이후 하류기전과 관련이 있는지 보기 위해서, in vitro 상에서 siRNA-triggered target mRNA의 절단을 확인하였다.

[0153] 그 결과, dCMTR1^{W231X} 돌연변이체가 발현된 세포 용해물에서 야생형 대조군의 용해물에 비해 타겟 절단 활성이 감소한 것으로 나타났다(도 8 참조).

[0154] 또한 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체에 의한 타겟 절단 활성의 감소가 타겟 mRNA의 분해에 필요한 holo-RISC의 형성에 문제가 있는지를 확인하기 위하여 RNAi 복합체를 native 겔 전기영동을 통해 RISC assembly에 대한 분석을 수행하였다.

[0155] 초파리에서 RISC assembly는 duplex siRNA가 R2D2/Dicer-2 heterodimer에 결합하여 R2D2/Dicer-2 initiator(RDI) complex를 형성하는 것으로 시작되며, 그 후 다른 여러 단백질들이 RDI 복합체에 결합하여 RISC-loading complex(RLC)를 만들고, RLC에 Ago2가 결합함으로써 pre-RISC가 형성된다. 형성된 pre-RISC의 duplex siRNA 가 풀림(unwinding)이 되면 타겟 mRNA을 절단할 수 있는 holo-RISC가 형성된다.

[0156] 이러한 점을 고려하여 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체의 경우, 야생형 대조군에 비해 상대적으로 겔 전기영동 결과에서 holo-RISC의 이동성이 늦어지는 것을 확인할 수 있었다(도 9a 참조). RISC assembly시 Ago2 slicer activity가 결여된 Ago2^{V966M} 돌연변이체는 duplex siRNA의 풀림활성(unwinding activity)에 문제가 있어 passenger siRNA strand가 제거되어 단일 가닥의 guide siRNA를 포함하는 holo-RISC 보다 duplex siRNA를 포함하는 pre-RISC에 정지되어 있었다. Pre-RISC는 siRNA passenger strand를 내보내어 holo-RISC로 전환되지 못하기 때문에 native 겔 전기영동 시, holo-RISC에 비해서 전기 이동성이 늦는다.

[0157] 또한 Ago2^{V966M} 돌연변이체의 용해물을 포함하여 RNAi complex에 대한 native 겔 전기영동을 수행한 결과, dCMTR1^{W231X} 돌연변이체 발현군은 Ago2^{V966M} 돌연변이체 발현군과 비슷한 이동성을 가지는 것을 확인할 수 있었다(도 9b 참조).

[0158] 따라서 dCMTR1^{W231X} 돌연변이체 발현군은 Ago2^{V966M} 돌연변이체 발현군과 유사하게 RISC 형성시 pre-RISC에서 holo-RISC로의 전환에 문제가 있다는 것을 알 수 있었다. 또한, dCMTR1^{W231X} 돌연변이체 발현군은 야생형 대조군에 비해 duplex siRNA의 풀림 정도가 상당히 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 10 참조).

[0160] 그러므로 이러한 결과를 통해, 본 발명자들은 dCMTR1은 pre-RISC에서 holo-RISC의 전환을 촉진함으로써 siRNA 생성 이후의 RNAi 하류기전(downstream)에 중요한 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있었다.

[0162] **<실시예 6>**

[0163] **dCMTR1과 R2D2의 물리적 상호작용 확인**

[0164] dCMTR1과 다양한 RNAi 관련 단백질과의 상호작용을 확인하기 위해서 초파리 S2 세포에 HA-태깅 dCMTR1과 FLAG-태깅 RNAi 관련 단백질을 발현시킨 후 공동-면역침강(co-IP)을 진행하였다. Anti-FLAG 항체를 이용하여 FLAG-태깅 RNAi 관련 단백질을 침전시킨 결과, 오직 FLAG-R2D2의 경우에만 HA-dCMTR1이 공동면역침강이 되는 것으로 나타났다. 또한 면역침강 전에 RNase A/T1을 처리하여도 HA-dCMTR1과 FLAG-R2D2의 상호작용에는 영향을 끼치지 못하는 것으로 나타났다(도 11a 참조).

[0165] 이를 통하여 HA-dCMTR1과 FLAG-R2D2의 상호작용은 RNA 유무에 상관이 없다는 것을 알 수 있었다.

[0166] 또한, HA-dCMTR1은 FLAG-R2D2와 초파리 S2 세포의 핵과 세포질 둘 다에서 공존(colocalization)하는 것을 확인할 수 있었다(도 11b 참조). R2D2와 dCMTR1사이의 상호작용을 확인하기 위해서 anti-R2D2 및 anti-dCMTR1 항체를 이용하여 공동 면역침강도 수행하였다.

[0167] 그 결과, 초파리 S2 세포에서 endogenous dCMTR1은 endogenous R2D2와 물리적 상호작용을 한다는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해 dCMTR1은 RISC assembly를 개시하는 RDI complex를 구성하는 단백질인 R2D2와 상호작용함을 알 수 있었다(도 11c 참조).

[0169] 또한, 상호작용이 확인된 dCMTR1과 R2D2의 상호작용 위치를 확인하기 위해, 초파리 S2 세포내에서 친화 태그(affinity tag)가 접합된 각각의 결손(deletion) 단백질 단편을 발현시킨 후, 공동 면역침강을 수행하였다. dCMTR1 단백질은 크게 Glycine rich domain인 G-patch domain, RNA methyltransferase domain 및 carboxyl-terminal region으로 구성되어 있다. dCMTR1 결손 단백질 단편은 각각의 domain을 결손시켜 제작하였고, 친화 태그로 HA를 사용하였다. 또한 R2D2 단백질은 크게 double-stranded RNA-binding domain(dsRBD) 2개와 carboxyl-terminal 영역으로 구성되어 있다. R2D2 결손 단백질 단편은 각각의 도메인을 결손시켜 제작하였으며 친화 태그로 FLAG를 사용하였다. FLAG-R2D2 단백질을 발현하는 초파리 S2 세포에 HA-tagged dCMTR1 및 dCMTR1 결손 단백질 단편들을 각각 발현시킨 후 공동 면역침강을 수행하였다.

[0170] 그 결과 dCMTR1 단백질에서 G-path 및 RNA methyltransferase 도메인이 결손된 경우에는 FLAG-R2D2 단백질과의 상호작용에 영향을 미치지 못한다는 것을 알 수 있었다. 한편, carboxyl-terminal 영역이 결손된 경우에는 FLAG-R2D2 단백질과의 상호작용이 현저히 감소한 것으로 나타났다(도 12 참조).

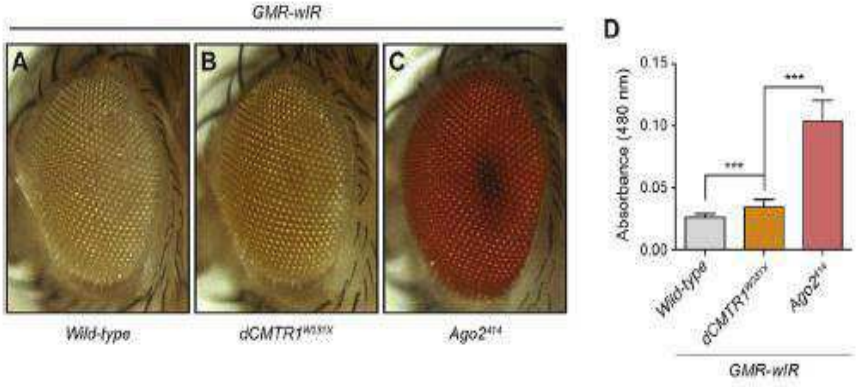
[0171] 이러한 결과를 통해 dCMTR1의 carboxyl-terminal 영역이 R2D2와의 상호작용에 매우 중요하다는 것을 알 수 있었다.

[0173] 나아가 R2D2 단백질의 경우도 carboxyl-terminal 영역이 결손된 2종류의 FLAG-R2D2 결손 단백질 단편 경우에만 HA-dCMTR1 단백질과의 상호작용이 감소하는 것으로 나타났다. 더 나아가 R2D2의 carboxyl-terminal의 237-311 잔기(residues)가 dCMTR1과 상호작용에 중요하다는 것을 확인할 수 있었고(도 13 참조). 이를 통해 dCMTR1과 R2D2는 서로의 carboxyl-terminal 영역을 통해 서로 상호작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

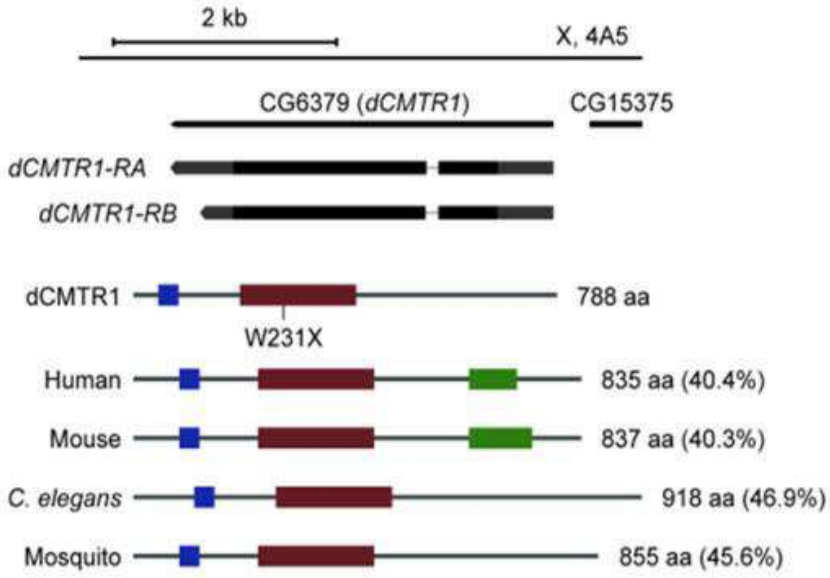
[0175] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

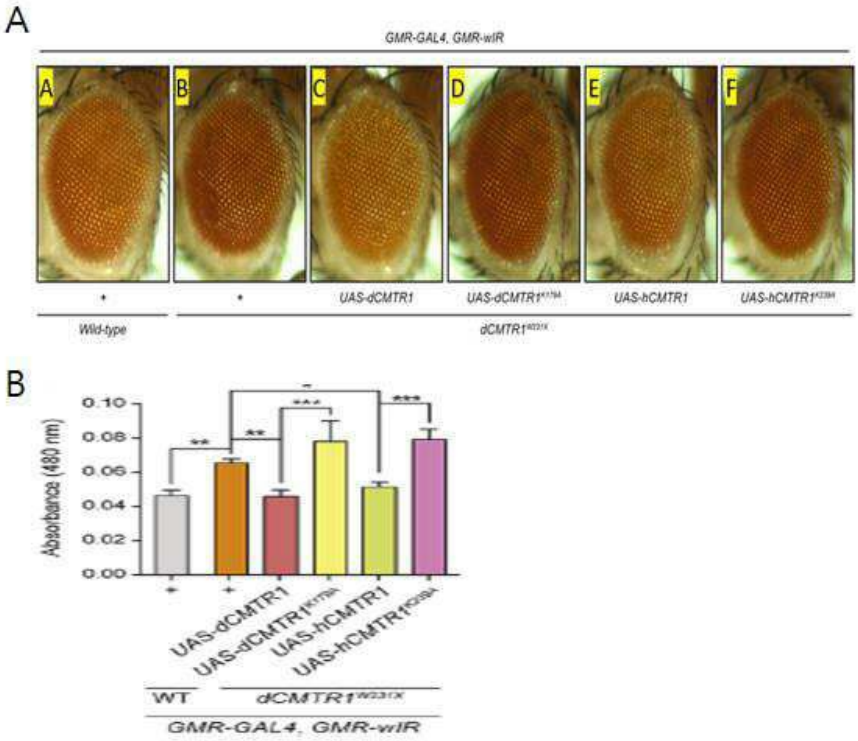
도면1



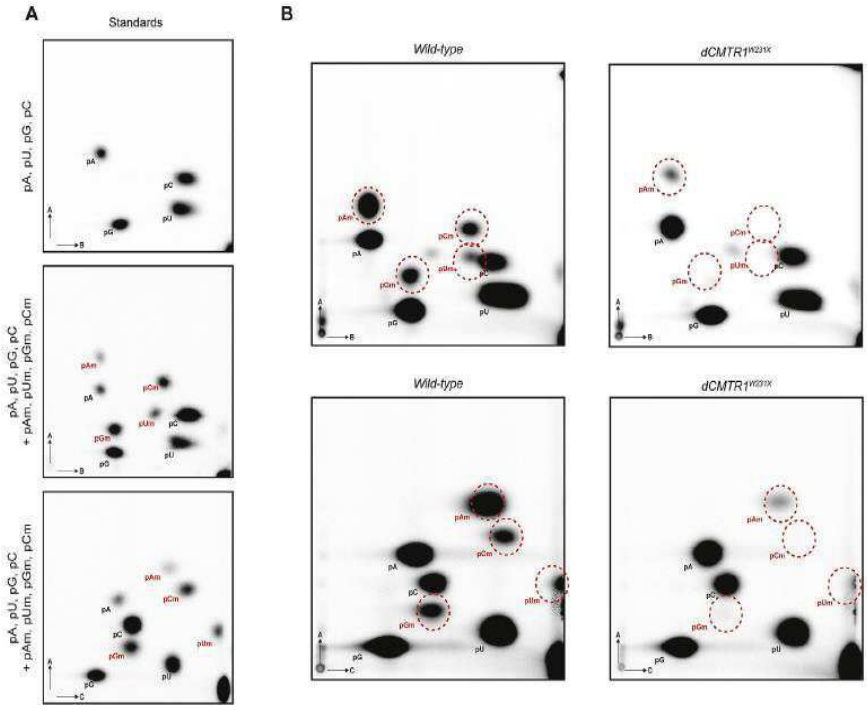
도면2


2 kb
X, 4A5
CG6379 (dCMTR1)
CG15375
dCMTR1-RA
dCMTR1-RB
dCMTR1
788 aa
W231X
Human
835 aa (40.4%)
Mouse
837 aa (40.3%)
C. elegans
918 aa (46.9%)
Mosquito
855 aa (45.6%)

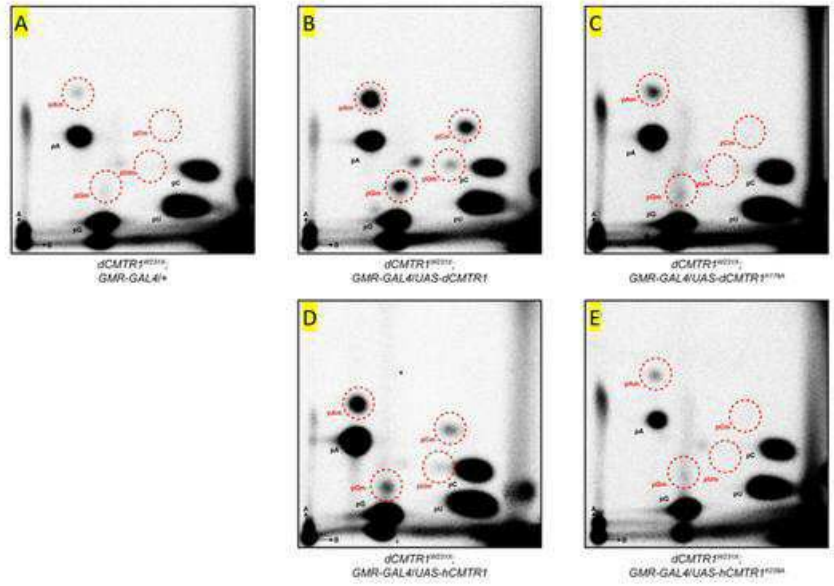
도면3


A
GMR-GAL4, GMR-wIR
A
B
C
D
E
F
+
+
UAS-dCMTR1
UAS-dCMTR1
UAS-hCMTR1
UAS-hCMTR1
Wild-type
dCMTR1
B
Absorbance (480 nm)
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
**
**
***
***
UAS-dCMTR1
UAS-hCMTR1
WT
dCMTR1
GMR-GAL4, GMR-wIR

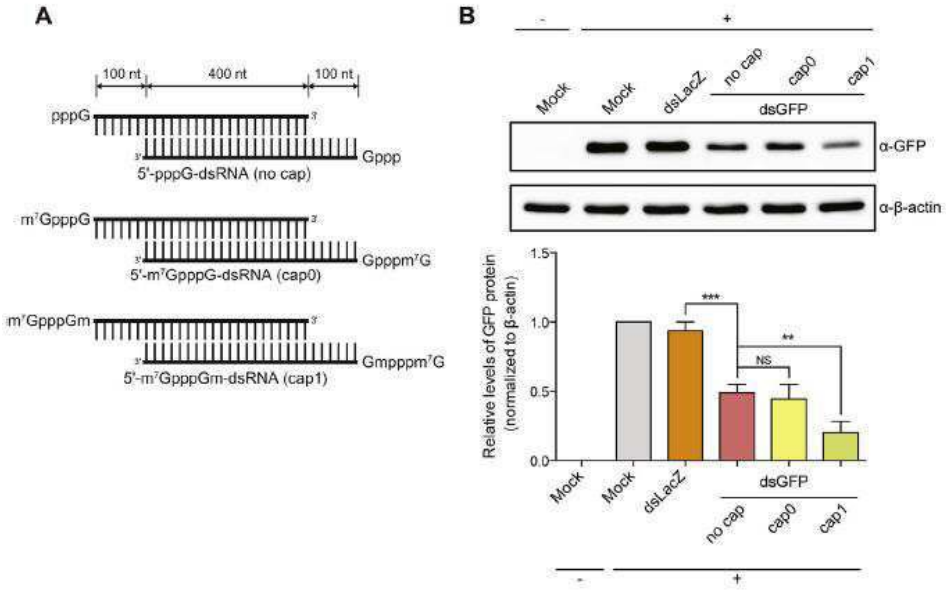
도면4


A
Standards
pA, pU, pG, pC
pA, pU, pG, pC
+ pAm, pUm, pGm, pCm
pA, pU, pG, pC
+ pAm, pUm, pGm, pCm
B
Wild-type
dCMTR1W231X
Wild-type
dCMTR1W231X

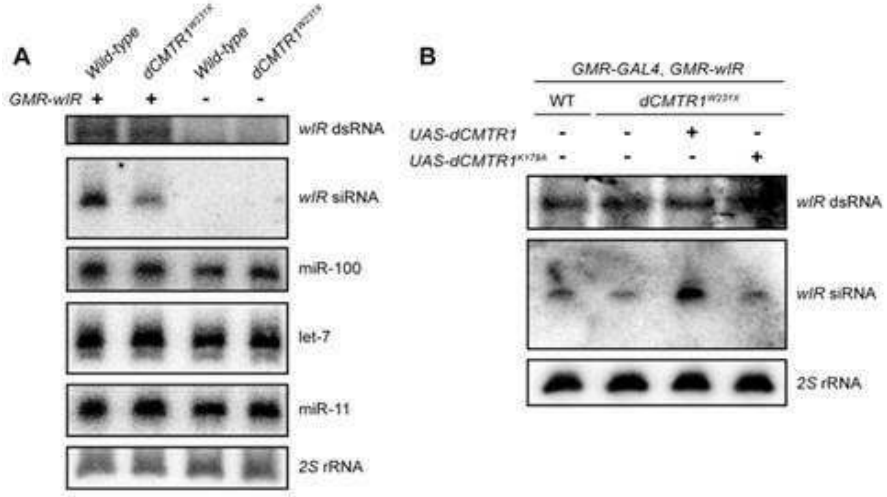
도면5


A
dCMTR1W231X;
GMR-GAL4/+
B
dCMTR1W231X;
GMR-GAL4/UAS-dCMTR1
C
dCMTR1W231X;
GMR-GAL4/UAS-dCMTR1R178A
D
dCMTR1W231X;
GMR-GAL4/UAS-hCMTR1
E
dCMTR1W231X;
GMR-GAL4/UAS-hCMTR1R178A

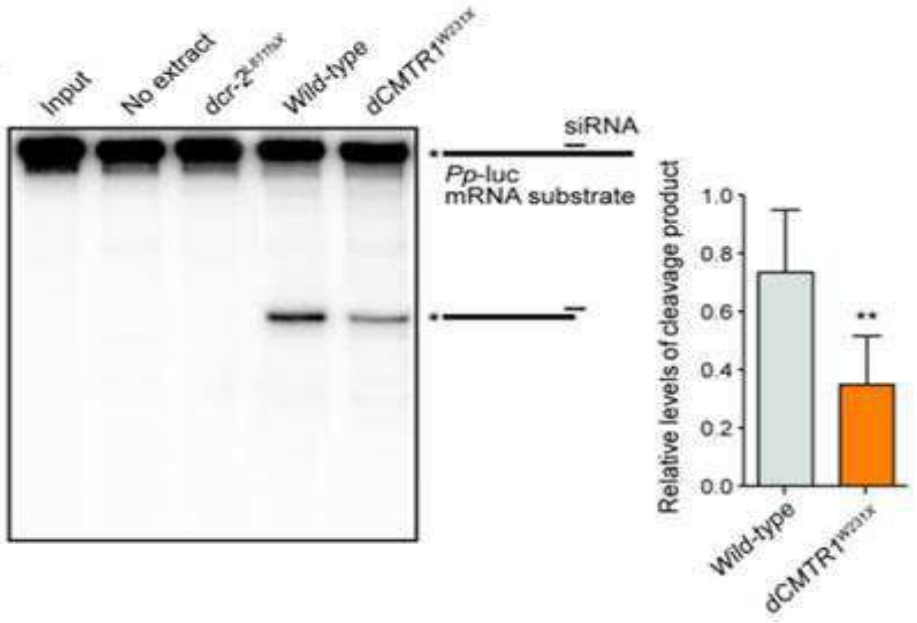
도면6


A
100 nt
400 nt
100 nt
pppG
Gppp
5'-pppG-dsRNA (no cap)
m7GpppG
Gpppm7G
5'-m7GpppG-dsRNA (cap0)
m7GpppGm
Gmpppm7G
5'-m7GpppGm-dsRNA (cap1)
B
Mock
Mock
dsLacZ
no cap
cap0
cap1
dsGFP
α-GFP
α-β-actin
Relative levels of GFP protein (normalized to β-actin)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
**
NS

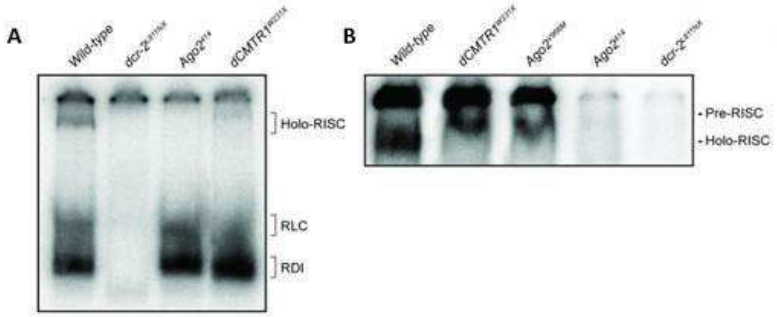
도면7


A
Wild-type
dCMTR1
Wild-type
dCMTR1
GMR-wIR + + - -
wIR dsRNA
wIR siRNA
miR-100
let-7
miR-11
2S rRNA
B
GMR-GAL4, GMR-wIR
WT
dCMTR1
UAS-dCMTR1
UAS-dCMTR1
wIR dsRNA
wIR siRNA
2S rRNA

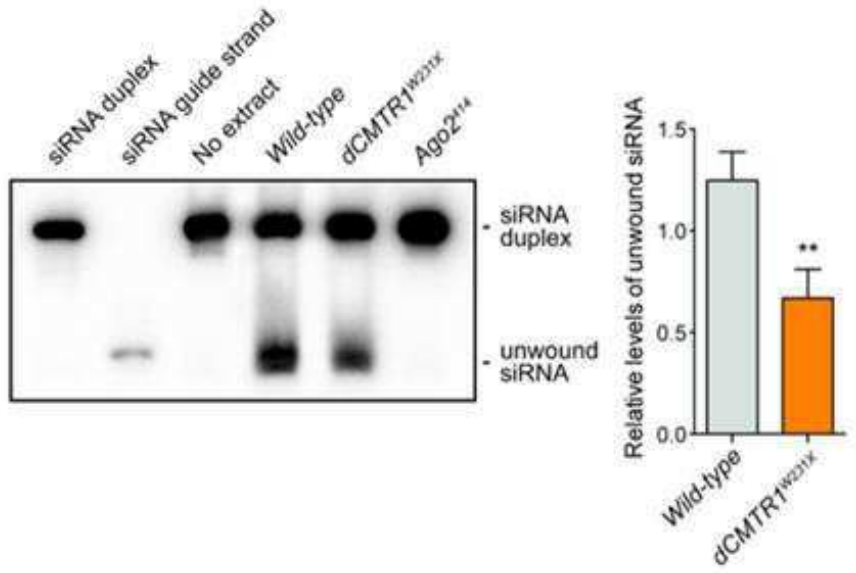
도면8


Input
No extract
dcr-2
Wild-type
dCMTR1
siRNA
Pp-luc
mRNA substrate
Relative levels of cleavage product
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
Wild-type
dCMTR1

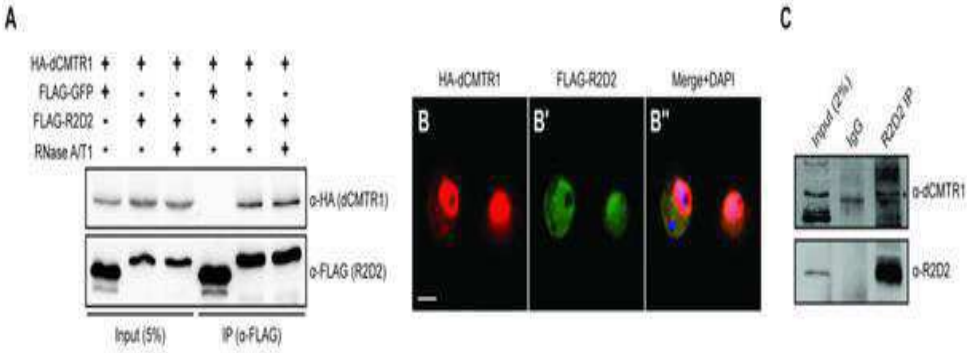
도면9


A
Wild-type
Holo-RISC
RLC
RDI
B
Wild-type
Pre-RISC
Holo-RISC

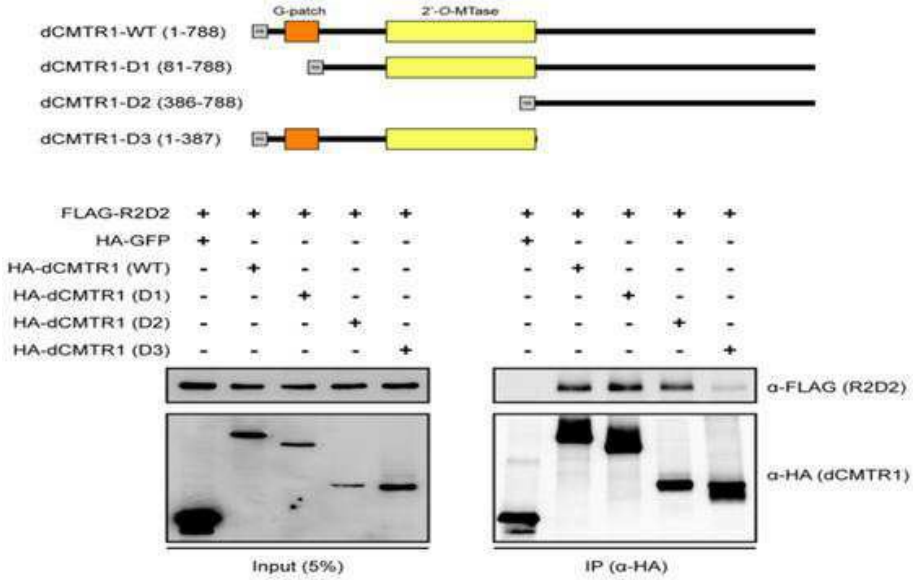
도면10


siRNA duplex
siRNA guide strand
No extract
Wild-type
dCMTR1
Ago2
siRNA
duplex
unwound
siRNA
Relative levels of unwound siRNA
1.5
1.0
0.5
0.0
**
Wild-type
dCMTR1

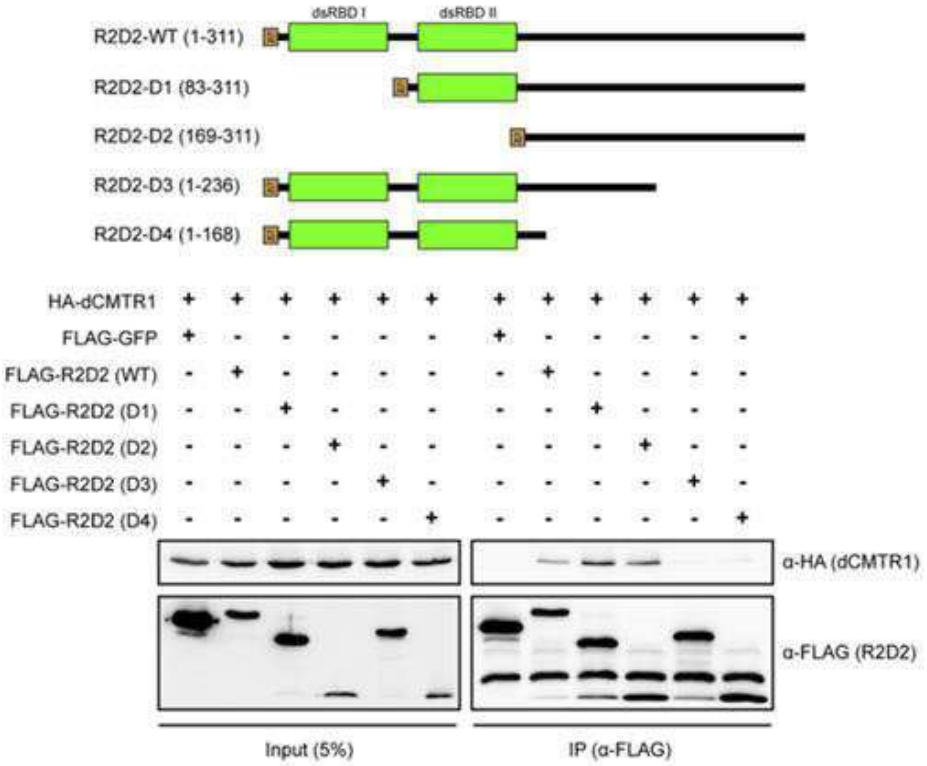
도면11


A
HA-dCMTR1
FLAG-GFP
FLAG-R2D2
RNase A/T1
α-HA (dCMTR1)
α-FLAG (R2D2)
Input (5%)
IP (α-FLAG)
HA-dCMTR1
FLAG-R2D2
Merge+DAPI
B
B'
B''
C
Input (2%)
IgG
R2D2 IP
α-dCMTR1
α-R2D2

도면12


G-patch
2'-O-MTase
dCMTR1-WT (1-788)
dCMTR1-D1 (81-788)
dCMTR1-D2 (386-788)
dCMTR1-D3 (1-387)
FLAG-R2D2
HA-GFP
HA-dCMTR1 (WT)
HA-dCMTR1 (D1)
HA-dCMTR1 (D2)
HA-dCMTR1 (D3)
α-FLAG (R2D2)
α-HA (dCMTR1)
Input (5%)
IP (α-HA)

도면13



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Korea University

<120> Novel use of CMTR1 with activity of enhancing siRNA production and function

<130> NPDC87555.01

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 788

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMTR1 amino acid sequence(Drosophila)

<400> 1

Met Asp Glu Pro Ser Asp Asp Glu Asn Ser Glu Pro Thr Pro Lys Lys
1 5 10 15

Ile Lys Arg Glu Trp Val Lys Ser Tyr Ser Asn Lys Ala Met Glu Met
20 25 30

Met Lys Lys Met Gly Tyr Glu Asn Asp Lys Gly Leu Gly Lys Ser Asn

35 40 45

Gln Gly Arg Leu Glu Pro Ile Ile Ala Val Gln Gln Asp Gly Arg Arg

50 55 60

Gly Phe Gly Leu Lys Leu Asp Thr Val Gln Ser Ser Ala Gly Gln Trp

65 70 75 80

Asp Pro Ala Cys Glu Glu Leu Glu Ile Pro Glu Pro Val Leu Trp Leu

85 90 95

His Asn Pro Gly Ser Arg Ala Asp Ala Tyr Ser Leu Asp Gln Leu Met

100 105 110

Gly His Leu Val Thr Gly Glu Lys Lys Leu Thr Leu Asp Gly Glu Thr

115 120 125

Arg Tyr Cys Asp Pro Ala Ile Leu His His Ile Leu Asn Ala Lys Thr

130 135 140

Val Phe Asp Asp Leu Asn Asp Asn Glu Lys Arg Arg Ala Arg Ser Arg

145 150 155 160

Cys Asn Pro Phe Glu Thr Ile Arg Ser Ser Ile Phe Leu Asn Arg Ala

165 170 175

Ala Val Lys Met Ala Asn Ile Asp Ser Met Cys Asn Phe Met Phe Thr

180 185 190

Asn Pro Arg Asp Pro Ala Gly Gln Thr Leu Val Ala Pro Asp Glu Leu

195 200 205

Leu Tyr Phe Thr Asp Met Cys Ala Gly Pro Gly Gly Phe Ser Glu Tyr

210 215 220

Val Leu Tyr Arg Lys Ser Trp Glu Ala Lys Gly Phe Gly Phe Thr Leu

225 230 235 240

Arg Gly Ala Asn Asp Phe Lys Leu Glu Lys Phe Phe Ala Ala Ser Pro

245 250 255

Glu Ser Phe Asp Thr Phe Tyr Gly Val Lys Glu Asp Gly Asn Ile Phe

260 265 270

Asp Glu Ser Asn Gln Asp Ser Leu Asn Glu Tyr Ile Arg Met His Thr

275 280 285

Pro Gln Gly Val His Phe Ala Met Ala Asp Gly Gly Phe Ser Val Glu

290 295 300

Gly Gln Lys Asn Ile Gln Glu Ile Leu Ser Lys Gln Leu Tyr Leu Cys

305 310 315 320

Gln Phe Leu Thr Ala Leu Lys Ile Leu Arg Pro Asn Gly Ser Phe Val

325 330 335

Cys Lys Val Phe Asp Leu Phe Thr Pro Phe Ser Val Gly Leu Val Tyr

340 345 350

Leu Met Tyr Lys Cys Phe Gln Gln Ile Ala Ile Ile Lys Pro Asn Ser

355 360 365

Ser Arg Pro Ala Asn Ser Glu Arg Tyr Leu Val Cys Lys Tyr Lys Arg

370 375 380

Ser Asp Ala Glu Thr Ala Gly Ile Val Ala Tyr Leu Asn Thr Val Asn

385 390 395 400

Leu Met Leu Ser Asp Glu Ser Gln Leu Asp Glu Asn Asp Val Leu Glu

405 410 415

Ile Phe Asn Ala Asn Glu Leu Ala Glu Asp Glu Asp Phe Leu Arg Tyr

420 425 430

Ile Ile Asp Ser Asn Asn Ala Ile Gly Lys Lys Gln Ile Val Gly Leu

435 440 445

Arg Lys Ile Ala Ala Phe Ala Gln Asn Leu Glu Leu Lys Glu Thr Lys

450 455 460

Gln Ser Glu Val Arg Gln Glu Cys Leu Lys Arg Trp Gly Leu Pro Asp

465 470 475 480

Lys Leu Arg Gln Ala Pro Glu Asn Lys Pro Thr Asp Arg Leu Leu Asp

485 490 495

Glu Leu Leu Ala Asp Trp Ala Asn Glu Arg Ser Trp Leu Ser Leu Pro

500 505 510

Ala Thr Glu Met Lys Gly Val Ala Ser Leu Asn Ala Thr Ile Lys Asn

515 520 525

Val Ala Asp Trp Tyr Phe Val Pro Val Gly Arg Glu Glu Thr Asn Ile

530 535 540

Asn Ala Cys Ser Leu Phe Leu Cys Lys Ser Arg Gly Asn Leu Leu Arg
545 550 555 560
Tyr Thr Glu His Lys Lys Trp Glu Leu Val Glu Thr Ala Phe Glu Val
565 570 575
Gln Pro Arg Ser Ile Phe Phe Gly Gln Ile Val Tyr Glu Phe Tyr Gly
580 585 590
Glu Gly Arg Thr Ile Gln Arg Met Ala Ala Leu His Ile Ile Asp Gly

595 600 605
Ile Cys Leu Gly Gly Val Asp Ile Arg Arg Arg Pro Tyr Arg Glu Arg
610 615 620
Val Ser Met Cys Asp Lys Phe Ala Arg Ser Leu Asn Lys Pro Tyr Arg
625 630 635 640
Lys Asp Arg Thr Phe Gly Ala Leu Arg Ser Lys Pro Leu Phe Arg Leu
645 650 655
Gln Asp Met Gly Ser Phe Phe Ala Asn Met Arg His Tyr Val Leu Lys
660 665 670

Asp Asn Ser Gln Arg Leu Gly Phe Ala Leu Asp Asp Asn Lys Phe Phe
675 680 685
Val Pro Gly Gly Ile Met Met Phe Cys Glu Leu Thr Asn Asn Tyr Val
690 695 700
Ser Ala His Ser Arg Ser Arg Gly Gln Leu Tyr Tyr Phe Asn Val Arg
705 710 715 720
Asn Lys Glu Ser Tyr Tyr Lys Asp Gln Ile Pro Arg Asn Lys Ala Asp
725 730 735
Glu Ile Phe Ala Ser Phe Arg Phe Ser Phe Ser Cys Arg Leu Leu Trp

740 745 750
Lys Trp Thr Asp Leu Arg Gln Val Glu Glu Leu Ala Thr Glu Asp Asn
755 760 765
Pro Lys Ile Leu Phe Arg Ser Asp Phe Val Lys Phe Ile Ala Asp Lys
770 775 780
Leu Gly His Ser
785

<210> 2

<211> 2367

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMTR1 cDNA sequence(Drosophila)

<400> 2

atggacgaac cttcggacga tgagaactcg gagcccacgc ccaagaagat caagcgggaa 60

tgggtgaaga gctactcaaa caaggccatg gagatgatga agaagatggg ctacgagaat 120

gacaagggtt tgggaaagag caaccagggt cgcctggagc ccatcatcgc cgttcagcag 180

gatggtcgcc gtggcttcgg cctcaaactg gacactgtcc aatcgtcggc tggccagtgg 240

gatcctgcct gcgaggagct cgagataccc gaaccggtgc tttggctcca caatcctggc 300

agccgtgcgg acgcatacag tcttgatcag ctgatgggtc atttggtcac cggtgagaag 360

aagctgaccc tcgacgggga gacacgctac tgcgatccgg ccatcctgca tcacatcctc 420

aatgccaaaa ctgtattcga tgatctcaac gacaacgaga aacgacgggc aagatcccga 480

tgtaatccgt ttgagacgat ccgcagctcc atctttctca accgcgccgc cgtcaagatg 540

gccaacatcg actccatgtg caacttcatg ttcaccaatc cccgcgatcc cgctggccag 600

accctggtgg ctcccgatga gcttctctat ttcacggaca tgtgtgcagg tcctggcggc 660

ttctccgagt acgtgctgta ccgcaaatcg tgggaggcca aaggattcgg cttcacactt 720

cgtggcgcta acgactttaa gctggaaaag ttctttgctg cctcgccgga gtcctttgac 780

acgttctacg gcgtaaagga agatggcaac atattcgatg aaagcaacca ggactcgctg 840

aacgagtata tccgcatgca tacgccccag ggcgttcact ttgccatggc cgacggtggc 900

ttttcggtgg aaggtcagaa gaatatccag gagatcctgt ccaagcaact gtacctctgt 960

cagttcctta ccgccctgaa gatactgcgg ccgaacggca gcttcgtttg caaggtgttt 1020

gacctgttca caccgttcag tgtgggcctg gtctatctga tgtacaagtg cttccaacag 1080

attgccatca tcaagccaaa cagcagccgt ccggcaaatt cggagcgcta cctggtctgc 1140

aagtacaaac gttcggatgc ggagacggcg ggcatcgtag cctatctgaa cacggtcaac 1200

ctgatgctgt ccgatgaatc gcaactggac gagaacgacg tcctggaaat cttcaatgcc 1260

aacgagttgg ccgaggacga agacttttg cgttacatta tcgattcaaa taacgccatt 1320

ggcaagaaac agatcgtcgg cctgcgcaag atagcagcat tcgcccagaa tctggagctg 1380

aaggagacca agcagtcgga ggtgcgtcag gagtgcctga agcgctgggg actgccggat 1440

aaactgcgcc aggcaccgga gaacaagcca acggataggc tgcttgatga actccttgct 1500

gattgggcga acgaacgcag ctggctgagt ctgccggcca ccgaaatgaa aggcgtggcc 1560

agtctcaatg cgactatcaa aaacgttgcg gactggtatt ttgtgcctgt ggggcgcgag 1620

gagacaaata ttaatgcatg cagtctgttt ttgtgcaagt cccgcggcaa tttgctgcgc 1680

tacacggagc acaaaaagtg ggagctggtg gagaccgcct ttgaggtgca gccgcgctcg 1740

atcttcttcg gccagattgt gtacgagttc tacggagagg gcaggaccat tcagcgaatg 1800

gctgccctgc acattatcga tggtatctgc ctgggcggcg tcgatatccg tagacgtccg 1860

taccgcgagc gcgtaagcat gtgcgataag tttgctagga gtctaaacaa accgtaccgc 1920

aaggatcgca cttttggagc gctgcgcagc aagcccctct ttcgcctgca ggatatgggc 1980

agtttctttg cgaacatgcg ccattatgtg ctaaaggaca actcgcagag attaggattc 2040

gcgctggacg acaacaagtt ctttgtgccc ggcggcataa tgatgttctg cgagctgacc 2100

aataattatg tatccgccca ctcgcggtct cgtggtcagc tgtactactt taacgtgaga 2160

aataaggagt cgtactacaa ggatcagata cccaggaata aggccgacga gatcttcgcc 2220

tcgtttcggt ttagcttctc gtgccgcctg ctctggaagt ggacggacct gcgccaggtg 2280

gaggagctgg ccaccgagga caatccaaag atcctgttcc gcagcgactt tgtcaagttc 2340

attgcggaca agttgggcca cagctag 2367

<210> 3

<211> 311

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> R2D2 amino acid sequence

<400> 3

Met Asp Asn Lys Ser Ala Val Ser Ala Leu Gln Glu Phe Cys Ala Arg
1 5 10 15

Thr Gln Ile Asn Leu Pro Thr Tyr Ser Phe Ile Pro Gly Glu Asp Gly
20 25 30

Gly Tyr Val Cys Lys Val Glu Leu Leu Glu Ile Glu Ala Leu Gly Asn
35 40 45

Gly Arg Ser Lys Arg Asp Ala Lys His Leu Ala Ala Ser Asn Ile Leu
50 55 60

Arg Lys Ile Gln Leu Leu Pro Gly Ile His Gly Leu Met Lys Asp Ser
65 70 75 80

Thr Val Gly Asp Leu Asp Glu Glu Leu Thr Asn Leu Asn Arg Asp Met

85 90 95

Val Lys Glu Leu Arg Asp Tyr Cys Val Arg Arg Glu Met Pro Leu Pro

100 105 110

Cys Ile Glu Val Val Gln Gln Ser Gly Thr Pro Ser Ala Pro Glu Phe

115 120 125

Val Ala Cys Cys Ser Val Ala Ser Ile Val Arg Tyr Gly Lys Ser Asp

130 135 140

Lys Lys Lys Asp Ala Arg Gln Arg Ala Ala Ile Glu Met Leu Ala Leu

145 150 155 160

Ile Ser Ser Asn Ser Asp Asn Leu Arg Pro Asp Gln Met Gln Val Ala

165 170 175

Ser Thr Ser Lys Leu Lys Val Val Asp Met Glu Glu Ser Met Glu Glu

180 185 190

Leu Glu Ala Leu Arg Arg Lys Lys Phe Thr Thr Tyr Trp Glu Leu Lys

195 200 205

Glu Ala Gly Ser Val Asp His Thr Gly Met Arg Leu Cys Asp Arg His

210 215 220

Asn Tyr Phe Lys Asn Phe Tyr Pro Thr Leu Lys Lys Glu Ala Ile Glu

225 230 235 240

Ala Ile Asn Ser Asp Glu Tyr Glu Ser Ser Lys Asp Lys Ala Met Asp

245 250 255

Val Met Ser Ser Leu Lys Ile Thr Pro Lys Ile Ser Glu Val Glu Ser

260 265 270

Ser Ser Leu Val Pro Leu Leu Ser Val Glu Leu Asn Cys Ala Phe Asp

275 280 285

Val Val Leu Met Ala Lys Glu Thr Asp Ile Tyr Asp His Ile Ile Asp

290 295 300

Tyr Phe Arg Thr Met Leu Ile

305 310

<210> 4

<211> 936

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R2D2 cDNA sequence

<400> 4

atggataaca agtcagccgt atctgctcta caggagtttt gtgcccggac acagattaat 60

ctaccaacat acagttttat tcccggcgaa gacggagggt acgtctgtaa agttgaacta 120

ttggagatag aggcccttgg aaatgggcgt tcgaagcgtg atgccaaaca cctggctgcc 180

agcaatatct tgcgtaaaat ccaactgctg cccggcatac acggcttgat gaaggattcg 240

actgtgggtg atctggatga ggaactgact aacctcaacc gggacatggt gaaggagctg 300

cgtgactact gcgtccgccg cgagatgcca ctgccctgca ttgaggtagt gcagcaaagc 360

ggcaccccga gcgccccgga attcgtggcc tgttgctccg tggcctccat agtacgctac 420

ggaaagtcgg acaaaaagaa ggatgcccgt cagcgagcgg ccattgaaat gctggcctta 480

atctccagca attcggacaa tttgcgtccg gatcaaatgc aagtagcgag cacaagcaaa 540

ttgaaagttg ttgatatgga agaatctatg gaggaattgg aggcattgcg cagaaagaaa 600

tttaccacct actgggagtt gaaggaagcc gggagcgtag accatacagg catgcggctc 660

tgcgaccgac acaactactt caagaacttc tatcctaccc tgaaaaagga ggccattgag 720

gccatcaatt cagatgaata cgagagctcc aaggataagg ctatggacgt aatgagctct 780

ttaaagataa cacccaaaat cagtgaagtg gaatcttcat cgttggttcc cttgcttagc 840

gtcgagctta attgtgcatt cgacgtggtc cttatggcaa aggagaccga tatctacgac 900

catataatag actattttcg caccatgttg atttaa 936

<210> 5

<211> 835

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMTR1 amino acid sequence(Homo sapiens)

<400> 5

Met Lys Arg Arg Thr Asp Pro Glu Cys Thr Ala Pro Ile Lys Lys Gln

1 5 10 15

Lys Lys Arg Val Ala Glu Leu Ala Leu Ser Leu Ser Ser Thr Ser Asp

20 25 30

Asp Glu Pro Pro Ser Ser Val Ser His Gly Ala Lys Ala Ser Thr Thr

35 40 45

Ser Leu Ser Gly Ser Asp Ser Glu Thr Glu Gly Lys Gln His Ser Ser

50 55 60

Asp Ser Phe Asp Asp Ala Phe Lys Ala Asp Ser Leu Val Glu Gly Thr

65 70 75 80

Ser Ser Arg Tyr Ser Met Tyr Asn Ser Val Ser Gln Lys Leu Met Ala

85 90 95

Lys Met Gly Phe Arg Glu Gly Glu Gly Leu Gly Lys Tyr Ser Gln Gly

100 105 110

Arg Lys Asp Ile Val Glu Ala Ser Ser Gln Lys Gly Arg Arg Gly Leu

115 120 125

Gly Leu Thr Leu Arg Gly Phe Asp Gln Glu Leu Asn Val Asp Trp Arg

130 135 140

Asp Glu Pro Glu Pro Ser Ala Cys Glu Gln Val Ser Trp Phe Pro Glu

145 150 155 160

Cys Thr Thr Glu Ile Pro Asp Thr Gln Glu Met Ser Asp Trp Met Val

165 170 175

Val Gly Lys Arg Lys Met Ile Ile Glu Asp Glu Thr Glu Phe Cys Gly

180 185 190

Glu Glu Leu Leu His Ser Val Leu Gln Cys Lys Ser Val Phe Asp Val

195 200 205

Leu Asp Gly Glu Glu Met Arg Arg Ala Arg Thr Arg Ala Asn Pro Tyr

210 215 220

Glu Met Ile Arg Gly Val Phe Phe Leu Asn Arg Ala Ala Met Lys Met

225 230 235 240

Ala Asn Met Asp Phe Val Phe Asp Arg Met Phe Thr Asn Pro Arg Asp

245 250 255

Ser Tyr Gly Lys Pro Leu Val Lys Asp Arg Glu Ala Glu Leu Leu Tyr

260 265 270

Phe Ala Asp Val Cys Ala Gly Pro Gly Gly Phe Ser Glu Tyr Val Leu

275 280 285

Trp Arg Lys Lys Trp His Ala Lys Gly Phe Gly Met Thr Leu Lys Gly

290 295 300

Pro Asn Asp Phe Lys Leu Glu Asp Phe Tyr Ser Ala Ser Ser Glu Leu
305 310 315 320
Phe Glu Pro Tyr Tyr Gly Glu Gly Gly Ile Asp Gly Asp Gly Asp Ile
325 330 335
Thr Arg Pro Glu Asn Ile Ser Ala Phe Arg Asn Phe Val Leu Asp Asn
340 345 350
Thr Asp Arg Lys Gly Val His Phe Leu Met Ala Asp Gly Gly Phe Ser
355 360 365

Val Glu Gly Gln Glu Asn Leu Gln Glu Ile Leu Ser Lys Gln Leu Leu
370 375 380
Leu Cys Gln Phe Leu Met Ala Leu Ser Ile Val Arg Thr Gly Gly His
385 390 395 400
Phe Ile Cys Lys Thr Phe Asp Leu Phe Thr Pro Phe Ser Val Gly Leu
405 410 415
Val Tyr Leu Leu Tyr Cys Cys Phe Glu Arg Val Cys Leu Phe Lys Pro
420 425 430
Ile Thr Ser Arg Pro Ala Asn Ser Glu Arg Tyr Val Val Cys Lys Gly

435 440 445
Leu Lys Val Gly Ile Asp Asp Val Arg Asp Tyr Leu Phe Ala Val Asn
450 455 460
Ile Lys Leu Asn Gln Leu Arg Asn Thr Asp Ser Asp Val Asn Leu Val
465 470 475 480
Val Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Asp His Glu Phe Thr Asp Tyr Met
485 490 495
Ile Arg Ser Asn Glu Ser His Cys Ser Leu Gln Ile Lys Ala Leu Ala
500 505 510

Lys Ile His Ala Phe Val Gln Asp Thr Thr Leu Ser Glu Pro Arg Gln
515 520 525
Ala Glu Ile Arg Lys Glu Cys Leu Arg Leu Trp Gly Ile Pro Asp Gln

530 535 540

Ala Arg Val Ala Pro Ser Ser Ser Asp Pro Lys Ser Lys Phe Phe Glu

545 550 555 560

Leu Ile Gln Gly Thr Glu Ile Asp Ile Phe Ser Tyr Lys Pro Thr Leu

565 570 575

Leu Thr Ser Lys Thr Leu Glu Lys Ile Arg Pro Val Phe Asp Tyr Arg

580 585 590

Cys Met Val Ser Gly Ser Glu Gln Lys Phe Leu Ile Gly Leu Gly Lys

595 600 605

Ser Gln Ile Tyr Thr Trp Asp Gly Arg Gln Ser Asp Arg Trp Ile Lys

610 615 620

Leu Asp Leu Lys Thr Glu Leu Pro Arg Asp Thr Leu Leu Ser Val Glu

625 630 635 640

Ile Val His Glu Leu Lys Gly Glu Gly Lys Ala Gln Arg Lys Ile Ser

645 650 655

Ala Ile His Ile Leu Asp Val Leu Val Leu Asn Gly Thr Asp Val Arg

660 665 670

Glu Gln His Phe Asn Gln Arg Ile Gln Leu Ala Glu Lys Phe Val Lys

675 680 685

Ala Val Ser Lys Pro Ser Arg Pro Asp Met Asn Pro Ile Arg Val Lys

690 695 700

Glu Val Tyr Arg Leu Glu Glu Met Glu Lys Ile Phe Val Arg Leu Glu

705 710 715 720

Met Lys Ile Ile Lys Gly Ser Ser Gly Thr Pro Lys Leu Ser Tyr Thr

725 730 735

Gly Arg Asp Asp Arg His Phe Val Pro Met Gly Leu Tyr Ile Val Arg

740 745 750

Thr Val Asn Glu Pro Trp Thr Met Gly Phe Ser Lys Ser Phe Lys Lys

755 760 765

Lys Phe Phe Tyr Asn Lys Lys Thr Lys Asp Ser Thr Phe Asp Leu Pro

770 775 780

Ala Asp Ser Ile Ala Pro Phe His Ile Cys Tyr Tyr Gly Arg Leu Phe

785 790 795 800

Trp Glu Trp Gly Asp Gly Ile Arg Val His Asp Ser Gln Lys Pro Gln
805 810 815
Asp Gln Asp Lys Leu Ser Lys Glu Asp Val Leu Ser Phe Ile Gln Met
820 825 830
His Arg Ala
835

<210> 6
<211> 2508
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> CMTR1 cDNA sequence(Homo sapiens)
<400> 6

atgaagagga gaactgaccc agaatgcact gcccccatca agaaacagaa aaaaagagtt 60
gcagagcttg ccctgagcct cagctccacg tccgatgatg aacctccctc ctctgtcagt 120

catggagcaa aagcatctac tacaagcctt agtgggtctg atagtgagac cgaggggaaa 180
caacacagct ctgactcttt tgacgatgca ttcaaagcag actctcttgt ggaaggaact 240
tcttctcgct attccatgta taatagcgtc tcccagaagc ttatggccaa gatgggcttc 300
agggaaggtg aaggattggg taaatacagc cagggtcgga aggacatcgt tgaggcttcc 360
agtcagaaag gtcgaagagg cttgggtctg acactccggg gctttgacca ggagctgaac 420
gtggactggc gagatgagcc agagcccagt gcttgtgagc aggtgtcatg gtttccagaa 480
tgtaccactg aaattcctga cactcaggaa atgagcgatt ggatggtggt gggaaagaga 540

aagatgatta ttgaagatga aacagagttt tgtggggaag agctgcttca cagtgtgttg 600
cagtgtaaga gcgtgtttga tgtcttggat ggggaagaga tgcggcgagc tcggactcgg 660
gccaatccct atgagatgat ccgaggagtc ttctttctaa acagggcagc aatgaagatg 720
gctaacatgg attttgtatt tgatcgcatg ttcacaaatc cgcgggactc ttatgggaag 780
ccactggtga aggaccggga agctgagctt ctgtactttg ctgatgtctg cgcaggccca 840
ggtggcttct cagagtatgt gctgtggagg aagaagtggc atgcaaaggg ctttggaatg 900
actttgaagg gccctaatga cttcaagctg gaggacttct actctgcttc cagtgaactc 960

ttcgaaccct actatggtga gggtgggatt gatggagatg gagatatcac ccgcccagag 1020
aacatctctg cttttcggaa ttttgtcctg gataacacag atcgcaaggg tgtccatttt 1080

ctgatggctg atgggggttt ctcggtggag gggcaggaga acctgcagga gatcctcagc 1140

aagcagctgc ttctgtgtca gttcctcatg gcgctgtcca ttgtccggac aggaggccac 1200

ttcatctgta aaacctttga cctgttcaca ccgtttagtg tggggcttgt ctacctgctg 1260

tactgctgct ttgaacgagt ttgtctcttc aagcctatta ccagccgtcc tgccaactca 1320

gagaggtatg tggtgtgcaa gggcctgaag gtgggcatag atgatgttcg ggattacctc 1380

ttcgcagtga atattaaact caatcagctg cggaacacgg attccgacgt caacttggtg 1440

gtccccctgg aggtgatcaa gggagaccat gaatttactg actacatgat acggtccaat 1500

gagagccact gtagtctgca gatcaaagct ctggcgaaaa tccatgcctt tgttcaagac 1560

acgacactga gtgagcctcg acaggcagag atacggaagg agtgcctccg actctggggg 1620

atcccagacc aggctcgtgt ggctccttct tcctccgacc ctaaatcgaa gttctttgag 1680

ctaatccagg gcactgagat tgacatcttc agctacaagc ccacactgct cacctctaaa 1740

accctggaga agatccgccc tgtgtttgac taccgctgca tggtatctgg cagtgagcag 1800

aagttcctca tcggcctggg gaaatcccag atctacacat gggatggccg ccagtcagac 1860

cgctggatca agctagacct gaagacagag ctgccccggg acactctgct atctgtggaa 1920

attgtgcatg agctgaaagg ggaggggaag gcccagagga agatcagtgc catccacatc 1980

ctcgatgtcc ttgtgctgaa tggcaccgac gttcgggagc agcactttaa ccagcgaatt 2040

cagcttgccg agaaatttgt gaaagccgtt tccaagccta gtcggcccga catgaatccc 2100

atcagggtga aggaggtgta cagactggaa gagatggaga agatttttgt caggttggag 2160

atgaagatca tcaagggctc cagtggcacc ccaaagctca gctacacagg gcgtgatgac 2220

cggcactttg tacccatggg cctctacatc gtcaggacag tgaatgagcc ctggactatg 2280

ggattcagca aaagcttcaa gaagaagttc ttctacaaca agaaaaccaa ggactctact 2340

tttgacctcc ctgcagactc cattgcccca tttcacattt gctactatgg ccggctcttc 2400

tgggagtggg gggatggcat tcgtgtgcat gactcccaga agccccagga ccaggacaag 2460

ctgtccaagg aggacgtcct ctccttcatc cagatgcaca gggcctaa 2508