



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0004860
(43) 공개일자 2012년01월13일

(51) Int. Cl.

C12N 5/02 (2006.01) C07K 14/72 (2006.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2010-0065564

(22) 출원일자 2010년07월07일

심사청구일자 2010년07월07일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

김정호

경기도 김포시 고촌읍 수기로 8, 104동 502호 (오룡마을)

고여립

서울특별시 마포구 백범로 28, 서강레지덴시아 907호 (신수동, 제2서강빌딩)

이정운

서울특별시 송파구 올림픽로4길 15, 아시아선수촌 아파트 13동 407호 (잠실동, 아시아선수촌아파트11동)

(74) 대리인

양부현

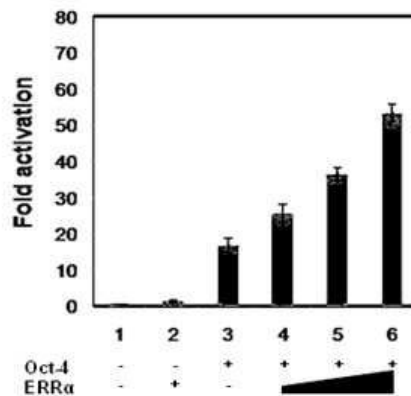
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) ERR α 를 유효성분으로 포함하는 Oct-4 전사인자의 활성 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 ERR (Estrogen Related Receptor) α 를 유효성분으로 포함하는 Oct-4 전사인자의 활성 촉진용 조성물 및 ERR α 를 유효성분으로 포함하는 만능성 세포의 분화 조절용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 ERR α 단백질은 전사인자 Oct-4의 활성을 촉진하여 Oct-4가 관여하는 만능성 세포의 분화과정을 조절하는데 이용될 수 있다.

대표도 - 도5b



특허청구의 범위

청구항 1

ERR (Estrogen Related Receptor) α 단백질 또는 이의 발현 컨스트럭트를 포함하는 Oct-4 전사인자의 활성 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 ERR α 단백질은 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

ERR (Estrogen Related Receptor) α 단백질 또는 이의 발현 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 만능성 세포의 분화 조절용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 ERR α 단백질은 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 만능성 세포는 ES (embryonic stem), EC (embryonic carcinoma) 또는 EG (embryonic germ) 세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 ERR (Estrogen Related Receptor) α 를 유효성분으로 포함하는 Oct-4 전사인자의 활성 촉진용 조성물 및 ERR α 를 유효성분으로 포함하는 만능성 세포의 분화 조절용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 배아줄기세포는 크게 두 가지의 특징을 가진다. 그 중 하나의 특징은 만능성으로 삼배엽 모두로 분화할 수 있다는 점이고, 다른 하나는 미분화 상태를 유지하면서 무한히 자기 자신을 증식할 수 있는 자가 재생산성이다. 마우스 배아줄기세포의 자가 생산성에는 LIF-STAT 신호전달체계와 BMP가 중요하게 작용한다(Niwa et al., 1998). Wnt 신호전달체계는 인간과 마우스 배아줄기세포 모두를 유지하는데 관여한다고 알려져 있다 (Sato et al., 2004). 이러한 외부적인 조절자 외에도 내부적인 전사인자 또한 배아줄기세포의 미분화 상태를 유지시키기 위해 중요하게 작용한다. 대표적으로 Oct4, Sox2, 그리고 Nanog 전사인자는 조절 네트워크를 형성함으로써 배아줄기세포의 만능성과 자가 재생산성에 기여한다 (Boyer et al., 2005).

[0003] Oct4는 POU (for Pit, Oct, UNC)과에 속하는 전사인자이다 (Nicholas et al., 1998; Scholer et al., 1990). POU 과에 속하는 모든 전사인자는 POU 호메오도메인(homeodomain)과 POU 특이적 도메인(specific domain)을 가지고 있는데, 이 두가지의 도메인은 15-56 개의 아미노산으로 구성된 링커로 연결되어 있다(Klemm JD et al., 1994).

- [0004] POU 도메인은 ATGCAAAT의 옥타머 서열에 헬릭스-턴-헬릭스(helix-turn-helix) 구조로 결합하는데 중요하게 작용한다 (Herr et al., 1995). Oct4는 이러한 옥타머 서열에 결합하여 타겟 유전자의 전사를 조절한다. Oct4는 POU 도메인 이외에 N- 그리고 C-말단 도메인을 가지고 있고 이 두 도메인은 POU 도메인보다 낮은 서열 유사성을 지닌다. N-말단 도메인은 프롤린(proline)과 산성을 띠는 잔기로 이루어져 있고(Scholer H., 1991) 트랜스활성화(transactivation) 기능을 지닌다. C-말단 도메인은 프롤린(proline), 세린(serine), 그리고 트레오닌(threonine) 잔기가 많다(Scholer H., 1991). C-말단 도메인 또한 트랜스활성화 기능을 지니지만 세포 종류에 따라 특이적으로 나타난다는 특징이 있다(Vigano MA et al., 1996).
- [0005] Oct4는 수정되지 않은 난자, 배아줄기세포, 배아종양세포에서 발현된다. 그 발현은 난형성과 정자형성 시기에 줄어들며 이것은 세포분열의 감수분열 시기로 들어가는 시점과 일치한다(Scholer et al., 1990). 이것은 Oct4가 배아줄기세포에서 만능성과 자가 재생산성을 유지키는 주요 조절자라는 것을 보여준다. Oct4의 발현양은 배아줄기세포에서 매우 엄격히 조절되는데, Oct4의 발현이 2배 이상 증가하면 세포는 원시내배엽과 중배엽으로 분화하고 반대로 Oct4 발현이 감소하면 세포는 영양외배엽으로 분화하여 만능성을 잃는다고 알려져 있다 (Niwa et al., 2000).
- [0006] ERRs (Estrogen related receptors)는 orphan nuclear receptors로 분류된다. 즉 ERR은 알려진 리간드가 없이 DNA에 결합하여 그 기능을 수행한다(Giguere, 1999). ERR의 DNA결합 도메인의 서열은 ER (estrogen receptor)과 상당히 높은 유사성을 보인다. DNA 결합 도메인은 전형적인 nuclear receptor-type zinc finger 모티프를 지니고 5'-TCAAGGTCA-3' (ERR response element, ERRE) 서열에 특이적으로 결합한다. N-말단 도메인은 서열이 보존되어 있지 않으며 리간드에 독립적인 트랜스활성화(transactivation) 기능 (AF-1)을 가진다. 한편 C-말단은 리간드에 결합하는 기능뿐만 아니라 리간드 의존적인 트랜스활성화 기능 (AF-2)을 가진다. DNA 결합 도메인과 리간드 결합 도메인 사이에는 유연한 경첩 부분이 존재하는데, 이는 2량체의 수용체(receptor)가 다양하게 회전하여 직접적으로, 반대로, 혹은 palindromic repeat에 결합하는 것을 용이하게 한다. (Hadzopoulou-Cladaras et al, 1997; Umesono et al., 1989).
- [0007] ERR α , ERR β , 그리고 ERR γ 는 서로 매우 높은 상동관계를 가지고 있고 특히 ERR β 과 ERR γ 사이에서 가장 높은 서열 유사성을 보인다. DNA결합 도메인과 리간드 결합 도메인은 각각 99%, 그리고 77%의 유사성을 보인다 (Heard et al., 2000).
- [0008] ERR 아형들의 발현 패턴은 서로 매우 다르게 나타난다. ERR α 는 신장, 심장, 소장, 뼈근육, 등 지방산을 에너지 원으로 사용하는 기관에 많이 분포되어있다. 또한 ERR α 는 조골세포와 자궁에서도 발현한다고 알려져 있다. ERR α 는 쥐의 배아줄기세포에서도 발현하고 발생이 진행됨에 따라 급격한 발현 차이는 나타내지 않는다. 이러한 발현 패턴은 ERR α 가 근육, 신경, 피부 등 여러 조직으로 세포가 분화하는 데 관여한다는 것을 암시한다 (Bonnelye et al., 1997). ERR α 와는 반대로 ERR β 는 쥐의 배아 발생 단계 중 좁은 범위에서 그 발현이 나타난다. 즉 E6.5부터 영양외배엽 선구세포에서 발현이 시작되고 E8.5 때 사라져 그 후에 나타나는 발생 단계에서는 발현을 찾아볼 수 없다 (Pettersson et al., 1996). ERR β 를 없앤 쥐는 비정상적인 태반의 형성으로 10.5dpc에 죽는다고 보고되어 있다 (Tremblay et al., 2001). 또한 ERR β 는 Nanog, Oct4, Sox2, 그리고 Zfx와 함께 배아줄기세포의 자가 재생산성과 만능성을 조절한다고 알려져 있다. ERR β 는 Oct4와 ERRE를 통해 Nanog promoter에 결합하여 Nanog의 발현을 조절한다 (van den Berg et al., 2008). 또한 ERR β 를 단독으로 발현시켰을 때, 배아줄기세포의 특성을 유지시킬 수 있고 (Zhang et al., 2008), 최근 ERR β 를 이용하여 Oct4, Sox2, 그리고 c-Myc와 함께 MEF를 역분화시키는 데에 성공했다는 보고도 잇따르고 있다 (Feng et al., 2008). ERR γ 는 estrogen-related receptor subfamily 중 가장 최근에 발견되었다. ERR γ 는 뇌, 뼈근육, 심장, 신장, 망막, 등의 여러 인간 성체와 태아 조직에서 발현한다 (Heard et al., 2000). ERR γ 는 항증식 또는 전립선 암에서 항암 기능을 수행한다고 보고 되었다 (Yu et al., 2007). 또한 ERR β 와 동일하게 역분화의 기능을 가진다는 보고가 있다 (Feng et al., 2008).
- [0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 ERR α 와 Oct4와의 상호작용 가능성에 대해 주목하고, ERR α 가 Oct4의 전사활성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과 ERR α 가 인 비보(in vivo)에서 Oct4와 결합한다는 것을 확인하였고, GST-풀 다운(pull down) 분석을 통하여 이러한 상호작용이 Oct4의 POU 도메인에 의해서 이루어지고, 루시페라아제 분석(luciferase assay)을 통해 ERR α 가 Oct4 전사인자의 전사촉진 활성을 크게 증가시킨다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 목적은 ERR (Estrogen Related Receptor) α 를 유효성분으로 포함하는 Oct4 전사인자의 활성 촉진용 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 ERR (Estrogen Related Receptor) α 를 유효성분으로 포함하는 만능성 세포의 분화 조절용 조성물을 제공하는 것에 있다.
- [0013] 본 발명의 목적 및 장점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 ERR(Estrogen Related Receptor) α 단백질 또는 이의 발현 컨스트럭트를 포함하는 Oct-4 전사인자의 활성 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 본 발명은 ERR (Estrogen Related Receptor) α 단백질 또는 이의 발현 컨스트럭트를 유효성분으로 포함하는 만능성 세포의 분화 조절용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명자들은 ERR α 와 Oct4와의 상호작용 가능성에 대해 주목하고, ERR α 가 Oct4 전사인자의 활성에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. 그 결과 ERR α 가 인 비보(in vivo)에서 Oct4와 결합한다는 것을 확인하였고, GST-풀 다운(pull down) 분석을 통하여 이러한 상호작용이 Oct4의 POU 도메인에 의해서 이루어지고, 루시페라아제 분석(luciferase assay)을 통해 ERR α 가 Oct4 전사인자의 활성을 크게 증가시킨다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0017] Oct-4 유전자는 배아줄기세포의 만능성 상태를 유지하고 분화단계 동안에 활성화되는 유전자들의 발현을 억제하는데 중요한 역할을 하는 전사인자(transcription factor)를 인코딩한다. Oct-4 단백질은 일반적으로, (i) 수정되지 않은 난모세포(oocytes), (ii) 초기 분화단계의 배아, (iii) 배반포 단계의 내부세포괴, (iv) 낭배 형성 전(pregastrulation) 배아 외배엽 및 (v) 원시 생식 세포를 포함하는 증식 세포들에서 발견된다. 따라서, Oct-4 단백질은 만능성 능력을 갖거나 만능성 능력을 발달시킬 수 있는 세포들을 조절함으로써 분화과정 동안에 주요한 스위치로써 기능할 것으로 생각되고 있다 (Ovitt & Scholer, 1998; Pesce & Scholer, 2001).
- [0018] ERR (Estrogen related receptor)은 리간드가 알려지지 않은 orphan nuclear receptor이고, ERR에는 세 가지 구조적 아형들이 존재하는데 이는 ERR α , ERR β 그리고 ERR γ 이다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면 상기 ERR α 단백질은 서열목록 제 1 서열의 아미노산 서열로 이루어져 있다.
- [0020] ERR α 단백질은 전사인자 Oct-4에 결합하여 Oct-4의 활성을 촉진한다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 "발현 컨스트럭트"는 발현 목적의 폴리뉴클레오타이드 서열 및 이 서열의 발현을 유도하는 발현서열(예컨대, 프로모터)을 포함하는 발현을 위한 최소한의 엘리먼트(elements)를 의미한다.
- [0022] 이러한 발현 컨스트럭트는 바람직하게는, 전사조절 서열 - 발현 목적의 뉴클레오타이드 서열-폴리아데닐화 서열을 포함한다.
- [0023] 상기 발현 컨스트럭트는 예컨대 진핵세포에서 작동 가능한 프로모터 - ERR (Estrogen related receptor) α 단백질 코딩 뉴클레오타이드 서열 - 폴리 아데닐화 서열을 포함한다.
- [0024] 본 명세서에서 사용되는 용어 "진핵세포에서 작동 가능한 프로모터"는 진핵세포에서 목적 유전자의 전사를 유발

할 수 있는 전사 조절 서열을 의미한다.

- [0025] 본 발명에서 ERR α 단백질 코딩 뉴클레오타이드 서열은 작동가능한 프로모터에 작동적으로 결합되어 있다.
- [0026] 본 명세서에서, 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절 인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0027] 상기 ERR α 단백질 코딩 뉴클레오타이드 서열에 결합된 프로모터는, 바람직하게는 동물세포, 보다 바람직하게는 포유동물 세포에서 작동하여 서브유니트 서열의 전사를 조절할 수 있는 것으로서, 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예컨대, CMV(cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터 및 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 ERR α 단백질 코딩 뉴클레오타이드 서열에 결합된 폴리 아네닐화 서열은, 소성장 호르몬 터미네이터(Gimmi, E. R., et al., Nucleic Acids Res. 17:6983-6998(1989)), SV40 유래 폴리 아네닐화 서열(Schek, N, et al., Mol. Cell Biol. 12:5386-5393(1992)), HIV-1 polyA(Klasens, B. I. F., et al., Nucleic Acids Res. 26:1870-1876(1998)), β -글로빈 polyA(Gil, A., et al, Cell 49:399-406(1987)), HSV TK polyA(Cole, C. N. and T. P. Stacy, Mol. Cell. Biol. 5:2104-2113(1985)) 또는 폴리오마바이러스 polyA(Batt, D. B and G. G. Carmichael, Mol. Cell. Biol. 15:4783-4790(1995))를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명의 발현 컨스트럭트는 발현 벡터로서 제조될 수 있다. 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pL ^{λ} 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli* (예, HB101, BL21, DH5 α 등)가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (pL ^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다. 숙주세포로서 바실러스 균이 이용되는 경우, 바실러스 슈린겐시스 독소단백질 유전자의 프로모터 (Appl. Environ. Microbiol. 64:3932-3938(1998); Mol. Gen. Genet. 250:734-741(1996)) 또는 바실러스균에서 발현 가능한 어떠한 프로모터라도 조절부위로 이용될 수 있다. 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pTRG, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λ gt4 $\times$ λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0030] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우, 벡터에 포함되는 진핵세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, Adeno 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있고, 전사 종결 서열로서 폴리아네닐화 서열이 포함되며, 예를 들어 SV40 polA 서열 및 BGH polA 서열등이 있다.
- [0031] 본 발명에 이용될 수 있는 진핵 세포용 발현 벡터는 당업계에 공지된 다양한 벡터로부터 선택할 수 있다. 예를 들어, pSG5, pEGFP, YIp5, YCp19, 아데노바이러스-유래 벡터, 폴리오바이러스-유래 벡터 및 소 파필로마 바이러스-유래 벡터가 있다.
- [0032] 또한, 본 발명에서 이용되는 발현 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 앰피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있고, 바람직하게는 비용의 측면을 고려하여 앰피실린 또는 겐타마이신 내성 유전자가 있다.

- [0033] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉼린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트 (Saccharomyces cerevisiae), 곤충 세포 및 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN, MDCK 세포주, 인간 ES 세포, 마우스 ES 세포, P19 EC 세포, HEK293T 및 NIH3T3) 등이 이용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.
- [0036] 상기 형질전환된 숙주를 선별하는 단계는 상술한 선택표지에 의해 발현되는 표현형(phenotype)을 이용하여, 용이하게 실시할 수 있다. 예컨대, 상기 선택표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 ERR α 단백질은 전사인자 Oct-4와 결합하여 이것의 전사인자 활성을 촉진함으로써 만능성 세포의 분화를 조절할 수 있다.
- [0038] Oct-4 단백질은 일반적으로, 수정되지 않은 난모세포(oocytes), 초기 분화단계의 배아, 배반포 단계의 내부세포괴(inner cell mass), 낭배 형성전(pregastrulation) 배아 외배엽 및 원시 생식 세포를 포함하는 증식 세포들에서 발견되고(Rosner et al., 1990; Scholer, Dressler et al., 1990; Scholer, Ruppert, Suzuki, Chowdhury, & Gruss, 1990; Yeom, Ha, Balling, Scholer, & Artzt, 1991), 분화과정 동안에는 발현이 감소하며, 마우스에서 Oct-4를 녹아웃 시키면 내부세포괴가 형성되지 않아 초기에 치사를 나타낸다(Nichols et al., 1998). 이 결과에 의해 Oct-4는 포유동물 발달 및 배아줄기세포의 자가 재생산(self-renewal) 특성 유지에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다(Pesce, Wang, Wolgemuth, & Scholer, 1998; Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000). Oct-4는 만능성 세포에 특이적으로 발현하는 중요 유전자의 전사 개시점에 인접하여 위치하거나 원거리에 위치하는 옥타머 모티프(5'-ATGCAAAT-3')를 통해 전사를 활성화시킨다(Lamb & Rizzino, 1998; Scholer, Dressler et al., 1990; Scholer, Ruppert et al., 1990). Oct-4 결합 자리는 Sox-2, fgf-4 (fibroblast growth factor-4), pdgfar (platelet-derived growth factor-receptor), opn (osteopontin), Utf1 (undifferentiated transcription factor 1), Rex-1, Fbx15, 및 Nanog 를 포함하는 다양한 유전자내에서 발견되었다. (Ambrosetti, Basilico, & Dailey, 1997; Ben-Shushan, Thompson, Gudas, & Bergman, 1998; Fukushima et al., 1998; Kraft et al., 1996; Kuroda et al., 2005; Nishimoto, Fukushima, Okuda, & Muramatsu, 1999; Okuda et al., 1998; Rodda et al., 2005; Tokuzawa et al., 2003; Vigano & Staudt, 1996).
- [0039] 또한, Oct-4는 Cdx2, Hand-1, IFN- τ (tau interferon) 와 같은 유전자들의 발현과, 배반포 형성전 영양배엽 세포(trophectoderm)에서 발현되고 배아(embryo)에서는 발현되지 않는 융모성 생식선 자극호르몬(chorionic gonadotropin)의 α 및 β 서브유닛의 발현을 억제한다(Ezashi, Gosh, & Roberts, 2001; Liu & Roberts, 1996; Liu, Leaman, Villalta, & Roberts, 1997; Niwa et al., 2000). 이는 Oct-4가 만능성 능력을 갖거나 만능성 능력을 발달시킬 수 있는 세포를 조절함으로써 분화과정 동안에 주요한 스위치로써 기능한다는 것을 암시하는 것이다(Ovitt & Scholer, 1998; Pesce & Scholer, 2001). 이와 같은 결과들은 내부세포괴의 체세포성 분화를 방해하기 위하여 Oct-4가 요구되고, 배 발달 단계에서 미분화된 상태를 유지하기 위해 Oct-4 가 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.
- [0040] 따라서, 본 발명의 조성물은 Oct-4 전사인자의 활성을 촉진하여 Oct-4가 관여하는 만능성 세포의 분화과정을 조

절하는데 이용될 수 있다.

[0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 만능성 세포는 바람직하게는 ES (embryonic stem), EC (embryonic carcinoma) 및 EG (embryonic germ) 세포이고, 가장 바람직하게는 ES 세포이다.

[0042]

발명의 효과

[0043] 본 발명은 ERR (Estrogen Related Receptor) α 를 유효성분으로 포함하는 Oct-4 전사인자의 활성 촉진용 조성물 및 ERR α 를 유효성분으로 포함하는 만능성 세포의 분화 조절용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 ERR α 단백질은 전사인자 Oct-4의 전사 활성을 촉진하여 Oct-4가 관여하는 만능성 세포의 분화과정을 조절하는데 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 RT-PCR을 통해 알아본 ES, EC, 3T3, 그리고 293T 세포에서의 Oct4와 ERR α 의 발현 패턴을 보여준다. J1 ES, P19 EC, NIH3T3, 그리고 HEK293T 세포에서 추출한 RNA를 역전사시키고 ERR α 와 Oct4에 특이적인 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 증폭된 산물은 2% 아가로오스 젤에서 분리시켰다. β -액틴은 표준화를 위해 사용되었다.

도 2는 인 비보(in vivo)에서 Oct4와 ERR α 의 결합 및 Oct4와 ERR α 의 공동-친화성침전(co-affinity precipitation)결과를 보여준다. 5 μ g의 pEF-BOS/GST 또는 pEF/BOS/GST-Oct4와 0.25 μ g의 pCMV-Tag2A/ERR α 를 293T 세포에 트랜스펙션(transfection) 시켰다. 48 시간 후에 세포를 용해시키고, 글루타티온 비드(glutathione bead)와 함께 인큐베이션 시켰다. 단백질은 SDS-PAGE에서 분리한 후 항-Flag 또는 항-GST 항체를 이용하여 검출하였다.

도 3a 및 도 3b는 ERR α 와 Oct4가 상호작용하는 결과를 보여준다. 도 3a는 pGEX 벡터에서 GST과 퓨전된 Oct4 cDNA의 그림이다. 숫자는 아미노산 잔기를 표시한 것이고 +는 Oct4가 ERR α 와 결합함을 가리킨다. 도 3b는 ERR α 가 Oct4의 POU 도메인과 강하게 결합하는 것을 측정한 결과이다. GST-Oct4 단백질을 발현하는 *Escherichia coli*에서 얻은 단백질을 히스티딘(histidine)으로 표지된 ERR α 와 함께 인큐베이션시켰다. GST 풀-다운(pull-down) 실험을 수행 한 후 단백질을 12% SDS-PAGE에서 분리시키고 항-Xpress 항체로 웨스턴 블로팅을 수행하였다.

도 4는 Oct4와 ERR α 의 세포안에서의 발현 위치를 보여준다. 도 4의 결과에 의하면, Oct4와 ERR α 가 293T 세포의 핵에서 함께 발현하는 것을 알 수 있다. 293T 세포를 커버슬립(cover slip)위에서 배양하고, pCDNA3/Oct4 그리고 pCMV-Tag2A/ERR α 와 공동-트랜스펙션(co-transfection)시켰다. 그 후 세포를 아세톤/메탄올 혼합물로 고정시키고 Oct4와 flag에 대한 항체를 처리하였다. Oct4와 ERR α 의 세포안에서의 분포는 형광 현미경으로 확인하였다. 세포의 핵은 DAPI로 염색하였다.

도 5a 및 도 5b는 ERR α 에 의한 Oct4의 전사 활성을 나타낸 도면이다. 도 5a는 리포터플라스미드인 pOct4 (10X) TATA luc의 모식도(왼쪽)와 ERR α 의 구조(오른쪽)를 보여준다. 도 5b는 ERR α 에 의한 Oct4 전사활성의 증가를 보여준다. 0.125 μ g의 공 벡터(레인 1 및 2), 또는 Oct4 (레인 3, 4, 5, 및 6)를 1.5 μ g의 공 벡터(레인 1 및 3) 또는 ERR α 의 양을 증가시켜(0.75, 1.125, 1.5 μ g) 공동-트랜스펙션시켰다. 루시페라아제(luciferase) 활성을 측정하고 renilla 루시페라아제 활성으로 표준화하였다. 결과는 두 번 수행한 실험 값의 평균으로 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0046] 실시예

[0047] 실험 재료와 방법

[0048] 1. 제한 효소

[0049] 폴리뉴클레오티드 키나아제(polynucleotide kinase), CIP (calf intestinal alkaline phosphatase), DNA 폴리머라아제 I의 클레나우 단편, Vent polymerase, 그리고 T4 DNA 리가아제는 New England Biolabs에서 구매하였다. Taq 폴리머라아제는 Vivagen (Seoul, Korea)에서 구매하였다. 플라스미드 DNA 분리, 제한 효소 처리, DNA의 아가로오스 젤 전기영동, DNA 리게이션, 형질전환(transformation), 그리고 단백질의 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동은 표준 실험 방법을 따랐다 (Sambrook and Russell, 2001).

[0050] 2. 플라스미드 제작

[0051] pCMV-Tag2A-ERR α 를 제작하기 위한 전체 길이의 ERR α 의 cDNA를 얻기 위해 pCDNA3-ERR α 를 BamHI과 XhoI으로 잘랐다. 이렇게 얻어진 인서트 DNA들을 pCMV-Tag2A 벡터의 각각 같은 제한효소 위치에 리게이션(ligation)하였다. pTrcHisA-ERR α 를 제작하기 위해 pCMV-Tag2A-ERR α 을 BamHI-XhoI으로 잘라 같은 제한 효소 위치의 pTrcHisA 벡터 (Invitrogen, USA)에 리게이션(ligation)하였다. GST가 퓨전된 플라스미드인 GST-Oct4(NTD), GST-Oct4(POU), 그리고 GST-Oct4(CTD) 는 기존의 실험 방법을 따랐다(Lee et al., 2005). pEF-BOS/GST와 pEF-BOS/GST-Oct4의 제작 방법 또한 기존의 실험 방법을 따랐다 (Lee et al., 2008).

[0052] 3. RT-PCR

[0053] J1 ES, P19 EC, 3T3 그리고 HEK 293T 세포로부터 Trizol Reagent (Invitrogen, USA)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 각 세포주의 5 μ g의 RNA를 Superscript First-strand Synthesis System (Invitrogen, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. ERR α 의 발현을 측정하기 위해, 5'-GGG CAC AAG GAG GAG GAT-3' 와 5'-GGA CAC GGT CCA GAC GCA CAC-3'의 프라이머(primer)를 사용하였다. Oct4의 발현은 5'-GAT CGA ATT CAT GGC TGG ACA CCT GGC T-3'와 5'-GAT CCT CGA GCT ATC AGT TTG AAT GCA TGG G-3'의 프라이머로 측정하였다. β -액틴(actin)의 발현을 측정하기 위해 Superscript First-strand Synthesis System (Invitrogen, USA)에 포함되어 있는 센스(sense)와 안티센스(antisense) 프라이머를 이용하였다. 각 샘플은 1 μ l의 cDNA, 50 pmol의 프라이머, 1 μ l dNTP mix, 10X PCR 완충액(buffer) 그리고 1U의 Taq 폴리머라아제를 이용하여 총 20 μ l의 혼합물(mixture)로 증폭하였다. ERR α 의 PCR 조건은 94°C에서 1분, 63°C에서 1분, 72°C에서 1분을 총 35 사이클로 하였고 Oct4와 β -액틴의 어닐링(annealing) 온도는 55°C로 하였다.

[0054] 4. 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis)

[0055] 단백질은 SDS 로딩 완충액[62.5 mM Tris-HCl (pH6.9), 10% 글리세롤, 2% SDS, 5% β -머캅토에탄올]로 용출(elution)하였고, 12%와 15% SDS-폴리아크릴아미드 겔로 분리하여 PDVF (polyvinylidenedifluoride)막에 옮겼다. ERR α 는 항-플래그(flag) 단일클론항체(Sigma, USA)를 이용하여 면역블로팅을 수행하고 Western lightening (PerkinElmer Life Sciences, Inc., USA)을 이용하여 CL(chemiluminescence)를 측정하였다.

[0056] 5. 재조합 6-히스티딘-태그된 ERR 단백질의 정제

[0057] 재조합 pTrcHisA-ERR α 플라스미드를 *Escherichia coli*에 형질전환시키고 IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)를 처리하여 (His)₆-ERR α 를 발현시켰다. 이렇게 얻은 재조합 단백질은 제조 회사(Qiagen, Germany)의 지시 방법에 따라 NTA(Ni-nitrilotriacetic acid)-아가로스를 이용한 크로마토그래피로 정제하였다. 방법을 간단히 설명하면, 배양액으로부터 얻은 침전물을 용해/세정 완충액 [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazole]로 재현탁시키고 4°C에서 원심분리(16,000 rpm에서 15 분)시켰다. 상층액은 NTA-아가로스 레진과 함께 4°C에서 한 시간 동안 회전 휠(rotating wheel)을 이용하여 인큐베이션(incubation) 시켰다. ERR α 가 붙은 NTA-아가로스 레진을 Micro Bio-Spin Chromatography Column (Bio-rad, USA)에 팩킹시키고 용해/세정 완충액으로 세척하였다. 그 후 단백질은용출 완충액 [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole]를 이용하여 용출시키고 단일클론 Xpress 항체(Invitrogen, USA)를 이용하여 웨

스턴 블롯을 수행하였다.

[0058] **6. GST가 퓨전된 단백질의 발현과 정제**

[0059] GST (Glutathione S-transferase)-Oct4(NTD), GST-Oct4(POU), GST-Oct4(CTD) 을 *Escherichia coli*에 형질전환 시키고 1 mM IPTG (isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside)를 넣어 37°C 진탕 인큐베이터(shaking incubator)에서 4 시간 동안 발현시켰다. 그 후 단백질을 글루타티온-세파로오즈에 붙인 후 세척하였다. 단백질 농도는 Bradford (Bio-Rad, USA)로 측정하고 대조군 GST 밴드와 함께 웨스턴 밴드를 비교하였다. 단백질의 순도와 크기는 SDS-폴리아크릴아미드 겔에서 분리한 후, 쿠마시블루(coomassie blue) 염색을 통하여 알아보았다.

[0060] **7. GST 풀-다운 분석(pull-down assay)**

[0061] GST 풀-다운 분석은 GST가 퓨전된 단백질과 (His)₆-태깅된 ERR α 를 이용하여 기존의 실험 방법을 따라 수행하였다 (Kim et al., 1999). 결합한 단백질은 기존의 면역블로팅(immunoblotting) 방법을 토대로 측정하였다 (Kim et al., 2000).

[0062] **8. 세포내 국재화 (localization) 측정 실험**

[0063] HEK 293T 세포를 유리 커버 슬립(cover slip) 위에서 배양하고 제조 회사의 방법에 따라 MAGIC 시약을 이용하여 트랜스펙션(transfection)시켰다. 48 시간 후, 세포를 PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척하고 아세톤과 메탄올 (1:1, v/v)을 넣어 20°C에서 10 분간 고정시켰다. 샘플에 대한 1차 항체와 2차 항체를 처리한 후 CoolSNAP 디지털 카메라(Olympus)가 장착된 형광 현미경(Olympus, 1 X 51)으로 형광을 확인하였다.

[0064] **9. 세포배양, 트랜스펙션 및 리포터 분석**

[0065] 쥐 배아줄기세포는 기존의 방법을 토대로 배양하였다 (Lee et al., 1996). HEK293T 세포, P19 배아종양세포, 그리고 NIH3T3 세포는 10%의 열-불활성화(heat inactivation)된 FBS (fetal bovine serum) (Gibco-BRL, USA), 페니실린, 및 스트렙토마이신이 포함된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하였다. 트랜스펙션(transfection)은 제조 회사의 프로토콜에 따라 MAGIC 트랜스펙션 시약을 이용하여 수행하였다. 루시페라아제 분석(luciferase assay)은 듀얼-루시페라아제 분석 시스템을 이용하여 제조 회사의 프로토콜을 토대로 수행하였다 (Promega, USA). Renilla 루시페라아제의 활성은 트랜스펙션 효율을 표준화하기 위해 측정하였다.

[0066] **실험결과**

[0067] **1. Oct4와 ERR α 는 쥐 배아줄기세포와 배아종양세포에서 함께 발현되었다.**

[0068] Oct4 유전자는 미분화 상태의 배아줄기세포와 배아종양세포에서 발현한다고 알려져 있다 (Scholer et al., 1990). 그리고 세포가 분화함에 따라서 Oct4의 mRNA의 발현은 감소한다 (Yeom et al., 1991). 한편 ERR α 가 배아줄기세포와 배아종양세포에서 발현하는지에 대한 여부는 아직 밝혀지지 않았다. 따라서 ERR α 의 발현 패턴을 알아보기 위해 여러 가지 세포주에서 유래한 cDNA를 이용하여 RT-PCR 실험을 수행하였다. 그 결과 도 1에서 보여지는 바와 같이 Oct4에 특이적인 프라이머(primer)를 이용하여, 배아줄기세포와 배아종양세포에서 Oct4가 발현하고 293T, 그리고 3T3 세포에서는 발현하지 않음을 확인하였다. 반면 ERR α 는 네 가지 세포주에서 모두 발현하였다. 이를 통해 Oct4와 ERR α 는 모두 배아줄기세포와 배아종양세포에서 발현한다는 것을 알 수 있었다.

[0069] **2. Oct4는 ERR α 와 인 비보(in vivo)에서 결합하였다**

[0070] ERR α 이 Oct4와 결합 할 수 있는지에 대해 알아보았다. 이를 위해 Oct4와 ERR α 를 발현시키는 발현 벡터를 함께 293T 세포에 트랜스펙션(transfection)시키고 공동-침화 침전(co-affinity precipitation)을 수행하였다. 이를 위해 GST가 퓨전된 Oct4가 있는 발현 벡터, pEF-BOS/GST-Oct4, 그리고 GST만 있는 pEF/BOS/GST를 각각

pCMV-Tag2A/ERR α와 함께 293T 세포에 공동-트랜스펙션(co-transfection)시켰다. 48시간 후에 세포를 용해시키고, 얻어진 용해물(lysate)에 글루타티온 비드(glutathione bead)를 넣어 인큐베이션(incubation)시켰다. 그 후 용출액을 항-Flag 항체로 웨스턴 블롯을 수행 한 결과 ERR α가 GST-Oct4와 함께 침전되고 GST 단독으로는 이러한 결과가 나타나지 않음을 확인할 수 있었다(도 2). 따라서 Oct4는 ERR α와 인 비보(in vivo)에서 결합한다는 것을 알 수 있었다.

[0071] **3. Oct4와 ERR α의 상호작용은 Oct4의 POU 도메인에 의하여 이루어진다.**

[0072] Oct4와 ERR α의 결합에 Oct4의 어느 도메인이 관여하는지 알아보기 위해 Oct4의 절단 변이체(deletion mutant)들을 이용하여 인 비트로 GST 풀-다운 실험을 수행하였다. 도 3a는 Oct4 절단 변이체(deletion mutant)들의 대략적인 구조를 보여주고 있다. GST를 퓨전시킨 Oct4 절단 변이체(deletion mutant)들을 박테리아에서 발현시키고 글루타티온-세파로오스 비드를 넣어 고정시켰다. 이것을 His가 결합된 ERR α와 함께 인큐베이션시켰다. 그 후 전체 복합체를 12% SDS-PAGE 겔에서 분리하고 항-Xpress 항체로 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 그 결과 ERR α는 GST-Oct4 (POU)와 강하게 결합하는 것을 볼 수 있었다. 반면 GST, GST-Oct4 (NTD), 그리고 GST-Oct4 (CTD)와는 결합하지 않는 것을 보아 Oct4의 POU 도메인이 ERRα와의 결합에 중요하게 작용한다는 것을 알 수 있었다(도 3b 참조). 풀-다운 실험에는 동일한 양의 GST가 퓨전된 단백질들을 사용하였다.

[0073] **4. Oct4와 ERR α는 핵에서 함께 발현된다.**

[0074] 293T 세포에 Oct4와 ERR α를 공동-트랜스펙션시켜 Oct4-ERR α 복합체가 세포 안에서 발현하는 위치를 알아보았다. 이를 위해 Oct4와 flag-ERR α를 각각 포함하는 플라스미드를 293T 세포에 공동-트랜스펙션시키고 48시간 후에 항-Oct4와 항-flag 항체를 이용하여 면역세포화학법을 수행하였다. 그 후 형광 현미경으로 세포 안에서의 위치를 알아보았다. 결과, 도 4에서 보는 바와 같이 Oct4와 ERR α는 모두 DAPI가 보이는 세포의 핵 안에서 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

[0075] **5. ERR α는 Oct4에 의한 트랜스활성화를 조절한다.**

[0076] Oct4와 ERR α의 상호작용에 의한 영향을 알아보았다. 즉, 루시페라아제(luciferase) 실험을 수행하여 ERR α의 발현이 Oct4에 의한 전사 활성화에 미치는 영향을 측정하였다. 이를 위해 우선 10 개의 Oct4 인식 부위, TATA box, 그리고 루시페라아제 유전자(luciferase gene)가 포함된 pOct4 (10X) TATA luc 컨스트럭트를 제작하여 리포터 유전자로 사용하였다 (Lee et al., 2005)(도 5a 참조). 루시페라아제-기반 리포터 플라스미드를 pcDNA3/Oct4 단독으로, 또는 pCMV-Tag2A/ERR α와 함께 293T 세포에 공동-트랜스펙션시켰다. 그 후, 리포터 플라스미드의 발현을 측정함으로써 Oct4에 대한 ERR α의 영향을 알아보았다. Oct4에 의한 전사 활성화는 같은 샘플에서 firefly (Oct4에 의한 활성화도) 그리고 renilla 루시페라아제 (기본 활성화도) 활성화의 비율로 측정할 수 있었다. 이러한 듀얼 루시페라아제 실험 방법을 통해 트랜스펙션과 비 특이적인 영향에 의해 변동될 수 있는 값을 제거 할 수 있다. ERR α의 대략적인 구조는 도 5a의 오른쪽에 표시되어 있다. 실험을 수행한 결과 Oct4를 단독으로 293T 세포에 넣어주었을 때 리포터 플라스미드 전사가 약 20배 증가한 것을 볼 수 있었다(도 5b, 라인 3). 흥미롭게도 ERR α를 Oct4와 함께 넣어주었을 때 그 양에 비례하여 Oct4에 의한 전사가 증가하는 것을 볼 수 있었다 (도 5b, 라인 4, 5, 6). 따라서 ERR α는 Oct4에 의한 전사 활성을 증가시킨다고 결론 내릴 수 있었다.

[0077] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0078] **참조문헌**

[0079] Bonnelye E, Vanacker JM, Spruyt N, Alric S, Fournier B, Desbiens X, and Laudet V (1997) Expression of the estrogenrelated receptor 1 (ERR-1) orphan receptor during mouse development. Mech. Dev. 65:71-85.

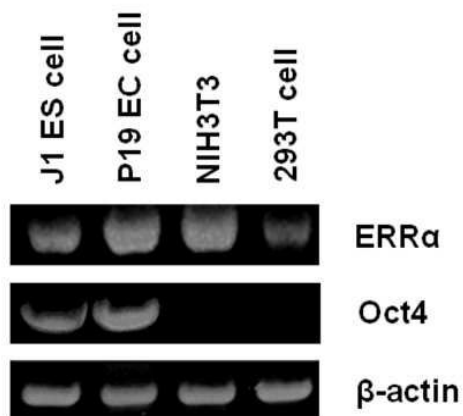
- [0080] Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL, and Ng HH. (2008) Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133(6):1106-1117.
- [0081] Eudy JD, Yao S, Weston MD, Ma-Edmonds M, Talmadge CB, Cheng JJ, Kimberling WJ, and Sumegi J. (1998) Isolation of a gene encoding a novel member of the nuclear receptor superfamily from the critical region of Usher syndrome type IIa at 1q41. *Genomics* 50(3):382-384.
- [0082] Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, Yaw LP, Zhang W, Loh YH, Han J, Vega VB, Cacheux-Rataboul V, Lim B, Lufkin T, and Ng HH. (2008) Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol.* 11(2):197-203.
- [0083] Giguère V. (1999) Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function. *Endocr Rev.* 20:689-725.
- [0084] Giguère V. (2002) To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab.* 13(5):220-225.
- [0085] Hadzopoulou-Cladaras, M., Kistanova, E., Evagelopoulou, C., Zeng, S., Cladaras, C., and Ladas, J. A. (1997) Functional Domains of the Nuclear Receptor Hepatocyte Nuclear Factor 4, *J. Biol. Chem.* 272:539-550.
- [0086] Heard DJ, Norby PL, Holloway J, and Vissing H., (2000) Human ERRgamma, a third member of the estrogen receptor-related receptor (ERR) subfamily of orphan nuclear receptors: tissue-specific isoforms are expressed during development and in the adult. *Mol. Endocrinol.* 14(3):382-392.
- [0087] Herr, W., and McCleary, M.A., (1995) The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev.* 9:1679-1693.
- [0088] Hong H, Yang L, and Stallcup MR. (1999) Hormone-independent transcriptional activation and coactivator binding by novel orphan nuclear receptor ERR3. *J Biol Chem.* 274(32):22618-22626.
- [0089] Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, and Lemischka IR. (2006) Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 442(7102):533-538.
- [0090] Jonghwan Kim, Jianlin Chu, Xiaohua Shen, Jianlong Wang and Stuart H. Orkin. (2008) An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Cell* 132: 1049-1061.
- [0091] Kim J, Lee JM, Branton PE, and Pelletier J. (2000) Modulation of EWS/WT1 activity by the v-Src protein tyrosine kinase. *FEBS Lett.* 474: 121-128.
- [0092] Kim J, Lee JM, Branton PE, and Pelletier J. (1999) Modification of EWS/WT1 functional properties by phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:14300-14305.
- [0093] Klemm JD, MA Rould, R Aurora, W Herr, and CO Pabl. (1994) Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with ththered DNA binding molecules. *Cell* 77:21-32.
- [0094] Laurie A. Boyer, Tong Ihn Lee, Megan F. Cole et al. (2005) Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122: 947-956.
- [0095] Lee J, Kim HK, Han YM, and Kim J.(2008) Pyruvate kinase isozyme type M2 (PKM2) interacts and cooperates with Oct-4 in regulating transcription. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40(5):1043-1054.
- [0096] Lee, J., Rhee, B.K., Bae G.Y., Han, Y.M., and Kim, J. (2005) Stimulation of Oct4 activity by Ewing's Sarcoma Protein. *Stem cells* 23: 738-751.
- [0097] Lee MH, Williams BO, Mulligan G, Mukai S, Bronson RT, Dyson N, Harlow E, and Jacks T. (1996) Targeted disruption of p107: functional overlap between p107 and Rb. *Genes Dev.* 10:1621-1632.
- [0098] Lorke, D.E., Susens, U., Borgmeyer, U., and Hermans-Borgmeyer, I. (2002) Differential expression of the estrogen receptor-related receptor γ in the mouse brain. *Mol. Brain Res.* 77:277-280.
- [0099] Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K et al. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the

mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.

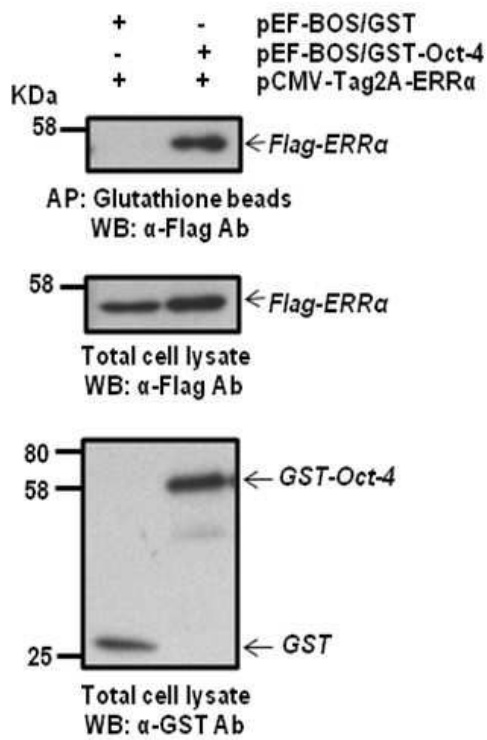
- [0100] Niwa H, Burdon T, Chambers I and Smith A., (1998) Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 12:2048-1060.
- [0101] Niwa H, J Miyazaki, and Smith A. (2000) quantitative expression of Oct3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 24:372-376.
- [0102] Pettersson K, Svensson K, Mattsson R, Carlsson B, Ohlsson R, and Berkenstam A., (1996) Expression of a novel member of estrogen response element-binding nuclear receptors is restricted to the early stages of chorion formation during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 54: 211-223.
- [0103] Pesce, M., Wang, X., Wolgemuth, D.J., and Scholer, H. (1998) Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech. Dev.* 71:89-98.
- [0104] Sambrook, J., and Russell, D.W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edition. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ; 2001.
- [0105] Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P and Brivanlou AH. (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* 10:55-63.
- [0106] Scholer H. (1991) Octamania: the POU factors in murine development. *Trends Genet.* 7:323-329.
- [0107] Scholer, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344:435-439.
- [0108] Tremblay G. B., Kunath T., Bergeron D., Lapointe L., Champigny C., Bader J. A., Rossant J., and Giguere V. (2001) Diethylstilbestrol regulates trophoblast stem cell differentiation as a ligand of orphan nuclear receptor ERR β . *Genes Dev.* 15:833-838.
- [0109] Umesono, K., and Evans, R. M. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors *Cell* 57:1139-1146.
- [0110] van den Berg DL, Zhang W, Yates A, Engelen E, Takacs K, Bezstarosti K, Demmers J, Chambers I, and Poot RA. (2008) Estrogen-related receptor beta interacts with Oct4 to positively regulate Nanog gene expression. *Mol Cell Biol.* 28(19):5986-5995.
- [0111] Vigano MA, and LM Staudt. (1996) Transcriptional activation by Oct-3: evidence for a specific role of the POU-specific domain in mediating functional interaction with Oct-1. *Nucleic Acids Res.* 24:2112-2118.
- [0112] Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, and Orkin SH. (2006) A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 444(7117):364-8.
- [0113] Yeom YI, Ha HS, Balling R, Scholer HR, and Artzt K. (1991) Structure, expression and chromosomal location of the Oct4 gene. *Mech. Dev.* 35: 171-179.
- [0114] Yu S, Wang X, Ng CF, Chen S, and Chan FL. (2007) ERRgamma suppresses cell proliferation and tumor growth of androgen-sensitive and androgen-insensitive prostate cancer cells and its implication as a therapeutic target for prostate cancer. *Cancer Res.* 67(10):4904-4914.
- [0115] Zhang X, Zhang J, Wang T, Esteban MA, and Pei D. (2008) Esrrb activates Oct4 transcription and sustains self-renewal and pluripotency in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 283(51):35825-35833.

도면

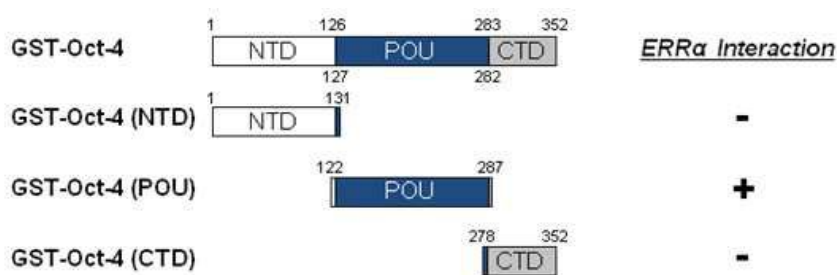
도면1



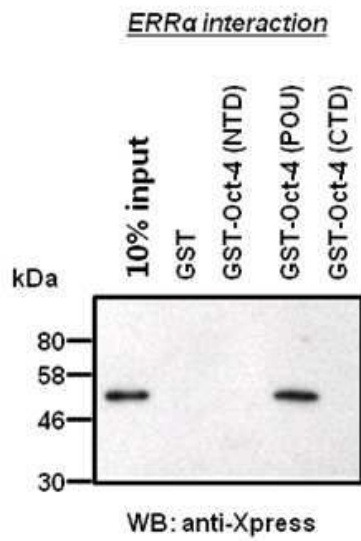
도면2



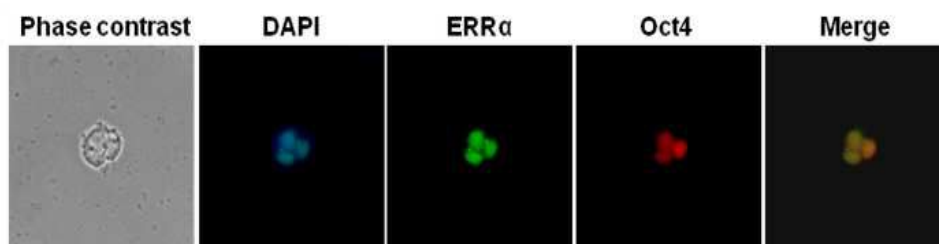
도면3a



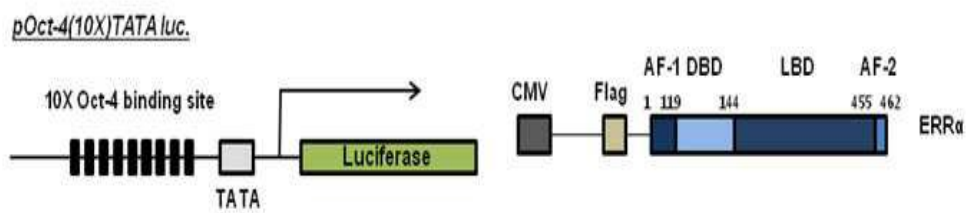
도면3b



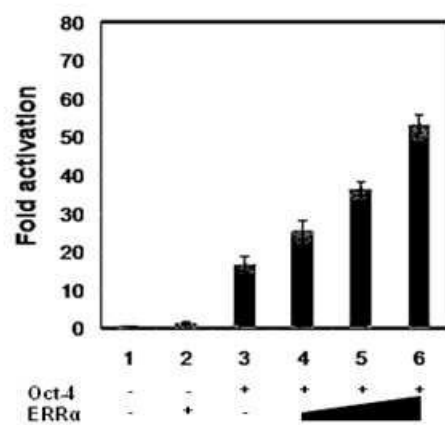
도면4



도면5a



도면5b



서열 목록

- <110> Sogang University-Industry Cooperation Foundation
- <120> Composition for Promoting Activity of Oct-4 Transcription Factor
Comprising Estrogen Related Receptor alpha
- <160> 2
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 423
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

```

Met Ser Ser Gln Val Val Gly Ile Glu Pro Leu Tyr Ile Lys Ala Glu
  1             5             10             15
Pro Ala Ser Pro Asp Ser Pro Lys Gly Ser Ser Glu Thr Glu Thr Glu
             20             25             30

Pro Pro Val Ala Leu Ala Pro Gly Pro Ala Pro Thr Arg Cys Leu Pro
             35             40             45
Gly His Lys Glu Glu Glu Asp Gly Glu Gly Ala Gly Pro Gly Glu Gln
             50             55             60
Gly Gly Gly Lys Leu Val Leu Ser Ser Leu Pro Lys Arg Leu Cys Leu
             65             70             75             80
Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Ala Ser Cys
             85             90             95
Glu Ala Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Thr Ile Gln Gly Ser Ile Glu

             100             105             110
Tyr Ser Cys Pro Ala Ser Asn Glu Cys Glu Ile Thr Lys Arg Arg Arg
             115             120             125
Lys Ala Cys Gln Ala Cys Arg Phe Thr Lys Cys Leu Arg Val Gly Met
             130             135             140
Leu Lys Glu Gly Val Arg Leu Asp Arg Val Arg Gly Gly Arg Gln Lys
             145             150             155             160
Tyr Lys Arg Arg Pro Glu Val Asp Pro Leu Pro Phe Pro Gly Pro Phe

```

165	170	175	
Pro Ala Gly Pro Leu Ala Val Ala Gly Gly Pro Arg Lys Thr Ala Ala			
180	185	190	
Pro Val Asn Ala Leu Val Ser His Leu Leu Val Val Glu Pro Glu Lys			
195	200	205	
Leu Tyr Ala Met Pro Asp Pro Ala Gly Pro Asp Gly His Leu Pro Ala			
210	215	220	
Val Ala Thr Leu Cys Asp Leu Phe Asp Arg Glu Ile Val Val Thr Ile			
225	230	235	240
Ser Trp Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Ser Ser Leu Ser Leu Ser Asp			
245	250	255	
Gln Met Ser Val Leu Gln Ser Val Trp Met Glu Val Leu Val Leu Gly			
260	265	270	
Val Ala Gln Arg Ser Leu Pro Leu Gln Asp Glu Leu Ala Phe Ala Glu			
275	280	285	
Asp Leu Val Leu Asp Glu Glu Gly Ala Arg Ala Ala Gly Leu Gly Glu			
290	295	300	
Leu Gly Ala Ala Leu Leu Gln Leu Val Arg Arg Leu Gln Ala Leu Arg			
305	310	315	320
Leu Glu Arg Glu Glu Tyr Val Leu Leu Lys Ala Leu Ala Leu Ala Asn			
325	330	335	
Ser Asp Ser Val His Ile Glu Asp Ala Glu Ala Val Glu Gln Leu Arg			
340	345	350	
Glu Ala Leu His Glu Ala Leu Leu Glu Tyr Glu Ala Gly Arg Ala Gly			
355	360	365	
Pro Gly Gly Gly Ala Glu Arg Arg Arg Ala Gly Arg Leu Leu Leu Thr			
370	375	380	
Leu Pro Leu Leu Arg Gln Thr Ala Gly Lys Val Leu Ala His Phe Tyr			
385	390	395	400
Gly Val Lys Leu Glu Gly Lys Val Pro Met His Lys Leu Phe Leu Glu			
405	410	415	

Met Leu Glu Ala Met Met Asp

420

<210> 2

<211> 422

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ser Ser Gln Val Val Gly Ile Glu Pro Leu Tyr Ile Lys Ala Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Pro Val Thr Leu Ala Ser Gly Pro Ala Pro Ala Arg Cys Leu Pro

35 40 45

Gly His Lys Glu Glu Glu Asp Gly Glu Gly Ala Gly Ser Gly Glu Gln

50 55 60

Gly Ser Gly Lys Leu Val Leu Ser Ser Leu Pro Lys Arg Leu Cys Leu

65 70 75 80

Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Tyr His Tyr Gly Val Ala Ser Cys

85 90 95

Glu Ala Cys Lys Ala Phe Phe Lys Arg Thr Ile Gln Gly Ser Ile Glu

100 105 110

Tyr Ser Cys Pro Ala Ser Asn Glu Cys Glu Ile Thr Lys Arg Arg Arg

115 120 125

Lys Ala Cys Gln Ala Cys Arg Phe Thr Lys Cys Leu Arg Val Gly Met

130 135 140

Leu Lys Glu Gly Val Arg Leu Asp Arg Val Arg Gly Gly Arg Gln Lys

145 150 155 160

Tyr Lys Arg Arg Pro Glu Val Asp Pro Leu Pro Phe Pro Gly Pro Phe

165 170 175

Pro Ala Gly Pro Leu Ala Val Ala Gly Gly Pro Arg Lys Thr Ala Pro

180 185 190

Val Asn Ala Leu Val Ser His Leu Leu Val Val Glu Pro Glu Lys Leu

195 200 205
 Tyr Ala Met Pro Asp Pro Ala Ser Pro Asp Gly His Leu Pro Ala Val
 210 215 220
 Ala Thr Leu Cys Asp Leu Phe Asp Arg Glu Ile Val Val Thr Ile Ser
 225 230 235 240

 Trp Ala Lys Ser Ile Pro Gly Phe Ser Ser Leu Ser Leu Ser Asp Gln
 245 250 255
 Met Ser Val Leu Gln Ser Val Trp Met Glu Val Leu Val Leu Gly Val
 260 265 270
 Ala Gln Arg Ser Leu Pro Leu Gln Asp Glu Leu Ala Phe Ala Glu Asp
 275 280 285
 Leu Val Leu Asp Glu Glu Gly Ala Arg Ala Ala Gly Leu Gly Asp Leu
 290 295 300
 Gly Ala Ala Leu Leu Gln Leu Val Arg Arg Leu Gln Ala Leu Arg Leu

 305 310 315 320
 Glu Arg Glu Glu Tyr Val Leu Leu Lys Ala Leu Ala Leu Ala Asn Ser
 325 330 335
 Asp Ser Val His Ile Glu Asp Ala Glu Ala Val Glu Gln Leu Arg Glu
 340 345 350
 Ala Leu His Glu Ala Leu Leu Glu Tyr Glu Ala Gly Arg Ala Gly Pro
 355 360 365
 Gly Gly Gly Ala Glu Arg Arg Arg Ala Gly Arg Leu Leu Leu Thr Leu
 370 375 380

 Pro Leu Leu Arg Gln Thr Ala Gly Lys Val Leu Ala His Phe Tyr Gly
 385 390 395 400
 Val Lys Leu Glu Gly Lys Val Pro Met His Lys Leu Phe Leu Glu Met
 405 410 415
 Leu Glu Ala Met Met Asp
 420