



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년09월20일  
(11) 등록번호 10-0982909  
(24) 등록일자 2010년09월13일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0062261

(22) 출원일자 2009년07월08일

심사청구일자 2009년07월08일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020050053607 A

Cell Death and Differentiation, 2006

Journal of Reproduction and Development, 2004

PNAS, 2004

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

강성만

서울특별시 서초구 잠원동 한신한강@ 1-702

이소연

서울특별시 용산구 후암동 48-6

홍성희

서울특별시 중구 신당동 845번지 한진 그랑빌 아파트 102동 508호

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 7 항

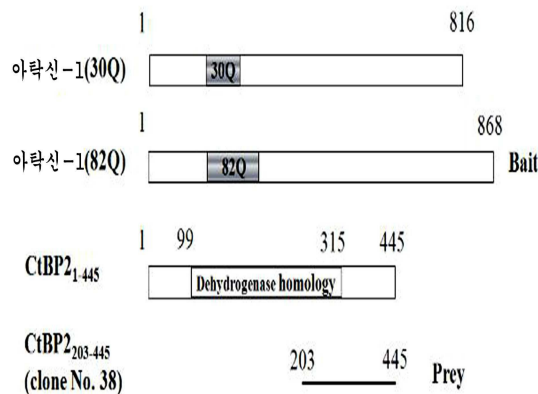
심사관 : 박정웅

(54) 아탁신-1 유전자 또는 아탁신-1 단백질을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물 및 그를 이용한 항암제 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 아탁신-1(Ataxin-1) 유전자 또는 아탁신-1 단백질을 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물 및 그를 이용한 항암제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 아탁신-1 단백질 또는 그를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 또는 항전이용 조성물은 E-cadherin의 발현을 억제하는 CtBP2(C-terminal binding protein 2)와 상호작용하여 CtBP2에 의한 발현 억제 활성을 막아 E-cadherin의 발현을 촉진시키므로, E-cadherin의 발현 감소에 의한 암의 진전 또는 전이를 억제하는 조성물로 유용하게 이용될 수 있다. 또한 아탁신-1에 의한 E-cadherin 프로모터의 활성을 측정함으로써, E-cadherin의 발현을 촉진하는 항암제 스크리닝 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

아탁신-1(Ataxin-1) 단백질 또는 그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 함유하는 항암 또는 항전이 용 조성물.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 아탁신-1 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 항암 또는 항전이용 조성물.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 아탁신-1 단백질은 글루타민 반복체의 글루타민 반복횟수가 3 내지 39인 것을 특징으로 하는 항암 또는 항전이용 조성물.

### 청구항 4

- 1)아탁신-1 단백질에 CtBP2를 피검 물질의 존재하에 접촉시키는 단계; 및
- 2)피검 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 아탁신-1 단백질과 CtBP2의 결합 정도를 증가시킨 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법.

### 청구항 5

- 1)E-cadherin 프로모터를 아탁신-1 단백질에 피검 물질의 존재하에서 접촉시키는 단계; 및
- 2)피검 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 E-cadherin 프로모터 및 아탁신-1 단백질의 결합정도를 증가시킨 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법.

### 청구항 6

- 1)E-cadherin 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터유전자를 포함하는 제1 발현벡터를 제조하는 단계;
- 2)상기 제1발현벡터를 아탁신-1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 발현벡터와 함께 세포주에 공형질감염시키는 단계;
- 3)상기 세포주에 피검 물질을 처리한 후 리포터 분석을 수행하는 단계; 및
- 4)피검 물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 리포터 유전자의 활성이 증가된 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법.

### 청구항 7

- 1)E-cadherin 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터유전자를 포함하는 제1 발현벡터를 제조하는 단계;
- 2)상기 발현벡터를 아탁신-1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제 2발현벡터 및 CtBP2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제3발현벡터와 함께 세포주에 공형질감염시키는 단계;
- 3)상기 세포주에 피검 물질을 처리한 후 리포터 분석을 수행하는 단계; 및
- 4)피검 물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 리포터 유전자의 활성이 증가된 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 아탁신-1 단백질 또는 그를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 유효성분으로 포함하는 항암용 조성물 및 그를 이용한 항암제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 아탁신-1(Ataxin-1)은 다중글루타민 질환 단백질로써, SCA1(Spinocerebellar ataxia type 1) 유전자에 의해 발현되는 단백질을 말한다. 아탁신-1은 뉴런의 세포핵에 지배적으로 분포하고 몇몇의 전사 보조 조절물질과 상호작용하는 것으로 알려져 있다. 또한, 아탁신-1의 글루타민 반복체가 확장된 돌연변이는 상염색체 우성유전의 퇴행성 뇌질환인 SCA1을 일으키며, 아탁신-1의 SCA1 유발 기능외의 정확한 기능은 아직 밝혀지지 않았다.

[0003] 상염색체 우성 대뇌소실증(autosomal dominant cerebellar ataxias, ADCA)은 대뇌, 뇌간 및 척수의 급격한 퇴화로 특징지어지는 퇴행성 신경질환의 이질적인 그룹 중 하나이다. 상기 질환은 추체로 또는 추체외로소실증상, 안근마비, 치매 또는 말초신경병증 등의 증상을 동반한다. 임상적으로, ADCA는 I, 내지 III의 세 가지 형태로 구분된다. ADCAI는 척수뇌소실증(spinocerebellar ataxia, SCA) 1, 2, 3, 4 및 6의 다섯 좌위를 서로 다른 다섯 염색체 상에 가진 유전학적으로 이질적이다. ADCAII는 항상 망막 퇴화와 함께 나타나며(SCA7), ADCAIII는 종종 ‘순수’ 대뇌 실조증(SCA5)로 지칭되며, 가장 균질한 질환으로 여겨진다. 몇몇 ADCA 유전자가 클로닝되었는데, 이들은 암호화 부위에 CAG 반복체를 가지고 있는 것으로 나타났다. ADCA는 상기 CAG 반복체의 확장에 의해 유발되는데, 그럼으로써 상응하는 단백질에 연장된 다중글루타민 관(polyglutamin tract)가 형성된다. 상기 연장된 반복체는 크기 상에 변이가 있고 불안정한데, 일반적으로 직계 세대로 전달될 때 크기가 증가한다. 상기 유전자에 의해 암호화되는 아탁신(Ataxin)의 기능에 관해서는 아직 알려진 바가 없다. 상기 유전자의 자위는 염색체 6으로 매핑되었으며, 질병관련 대립유전자에는 41-81 개의 CAG 반복체가 있고, 정상 대립유전자에서는 6-39 개의 반복체가 존재하는 것으로 밝혀졌다. 그러나 상기 유전자와 다른 질환과의 관계에 대하여는 전혀 밝혀진 바 없다.

[0004] 한편, 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고, 비조절적인 방식으로 증식하고, 불사화되어 발생하는 질병이다.

[0005] 암과 관련된 다양한 생화학적 기전이 규명되고 그에 따른 치료제가 개발되어 오고 있으나, 아직까지 암에 대한 근본적인 치료방법은 제시되지 않고 있고, 이에 따라, 암과 관련된 다양한 생체내 분자를 동정하고 이를 표적으로 하는 약물을 개발하는 노력이 경주되고 있으며, 이러한 약물 중 일부를 조합하여 암 치료효과를 증진시키려는 노력 역시 시도되고 있다. 따라서 암과 관련된 표적 분자를 추가적으로 발굴하는 노력은 매우 중요한 일이라고 할 수 있다.

[0006] 한편, E-cadherin은 5개의 cadherin 반복체로 구성된 세포의 도메인, 막투과 도메인 및 p120-카테닌(catenin) 및 베타-카테닌과 결합하는 세포내 도메인으로 구성되어 있다. 상기 세포내 도메인은 베타-카테닌의 결합에 필수적이고 따라서, E-cadherin의 기능에 필요한 고-인산화 부위를 포함하고 있고, 알파-카테닌은 액틴-포함 세포골격 섬유의 조절에 관여한다. 상피세포에서, E-cadherin-포함 세포-대-세포 접합은 종종 상기 세포골격의 액틴-포함 섬유에 연결해 있다. E-cadherin은 포유동물 발달과정에서 2세포기에서 처음으로 발현되며, 8세포에 인산화되어 압축을 야기한다. 성체 조직에서는 E-cadherin은 상피세포에서 발현되는데, 세포 표면에서 5시간의 반감기를 가지고 항상적으로 재생된다.

[0007] E-cadherin의 기능 또는 발현의 상실은 암의 진전 및 전이에 관련되어 있다. E-cadherin의 하향조절은 조직내

에서 세포 접합의 강도를 떨어뜨리고, 그에 의해 세포 이동성을 증진시킨다. 이는 결국 암세포가 기저막을 통과하고 주변 조직으로 침윤할 수 있게 한다. 실제, 많은 암종에서 E-cadherin의 발현이 억제되어 있는 것으로 나타나, E-cadherin이 종양 억제 유전자임이 밝혀졌다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 암과 관련된 새로운 표적 분자를 발굴하고자 예의 노력한 결과, 아탁신-1이 CtBP2(C-terminal binding protein 2)과 상호작용하고, E-cadherin 프로모터에 결합하여 CtBP2에 의해 억제된 상기 E-cadherin 프로모터 기능을 활성화시킴으로써, 암의 증식 및 전이를 억제할 수 있음을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 항암 또는 항전이용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 항암제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

### 과제 해결수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아탁신-1(Ataxin-1) 단백질 또는 그를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 또는 항전이용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 아탁신-1 단백질과 CtBP2의 상호작용을 촉진하는 화합물을 탐색하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 아탁신-1 단백질과 E-cadherin 프로모터의 결합을 촉진하는 화합물을 탐색하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법을 제공한다.

### 효 과

[0014] 본 발명의 아탁신-1(Ataxin-1) 단백질 또는 그를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 또는 항전이용 조성물은 E-cadherin의 발현을 촉진하므로, E-cadherin의 발현 감소에 의한 암의 진전 또는 전이를 억제하는 약제로 유용하게 이용될 수 있고, 아탁신-1에 의한 E-cadherin 프로모터의 활성을 측정함으로써, E-cadherin의 발현을 촉진하는 항암제 스크리닝 방법으로 유용하게 이용될 수 있다.

### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은 아탁신-1(Ataxin-1) 단백질 또는 그를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 또는 항전이용 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 아탁신-1 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 이때, 상기 아탁신-1 단백질은 글루타민 반복체의 글루타민 반복횟수가 41 ~ 81일 경우, 대뇌척수실조증을 야기할 수 있기 때문에, 바람직하게는 6 ~ 39인 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 발명자들은 질병유발 변이체 특이적으로 상호작용하는 단백질을 동정하기 위하여, 글루타민 반복체의 글루타민 반복 횟수가 82인 아탁신-1(82Q)를 발현하는 발현벡터를 미기로 이용하여, 효모 two-hybrid 분석방법을 적용한 결과, CtBP2가 아탁신-1(82Q)에 특이적으로 결합함을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조).

- [0020] 또한 본 발명자들은, 글루타민 연속체의 존재가 아탁신-1 및 CtBP2의 상호작용에 중요한 역할을 수행하는지 확인하기 위해, 30Q를 발현하는 발현백터를 이용하여 CtBP2와 상호작용 여부를 확인한 결과, 30Q와 CtBP2 역시 결합함을 확인하여, 글루타민 연속체의 길이가 상기 두 단백질의 상호작용에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 2 참조).
- [0021] 또한 본 발명자들은, 실제 아탁신-1의 어느 부위가 CtBP2와 결합하는지 확인하기 위해, 다양한 결실 돌연변이체(1-196, 82Q<sub>1-396</sub>, 30Q<sub>275-587</sub>, 및 30Q<sub>537-816</sub>)를 발현하는 발현백터를 이용하여, 효모 two-hybrid 분석을 수행한 결과, N-말단 부위가 결합에 중요한 역할을 수행함을 발견하였으며, 특히 1-196 단편은 전장 아탁신-1 단백질보다 CtBP2에 대한 결합력이 강한 것으로 나타났다(도 3 참조).
- [0022] 이에, 본 발명자들은 세포내에서 아탁신-1과 CtBP2가 실제 결합함을 면역공침전 분석으로 확인하였으며(도 4 참조), 세포면역화학분석을 통해, 상기 두 단백질이 세포의 핵에 공위치함을 확인하였다(도 5 참조).
- [0023] 또한, 본 발명자들은 CtBP2가 E-cadherin 프로모터에 결합하여 음성적인 조절을 하는 것으로 알려져 있었기 때문에, 아탁신-1이 CtBP2와 함께 E-cadherin 프로모터에 결합하는지 여부를 ChIP(chromatin immunoprecipitation) 분석을 통해 확인하였는데, 그 결과, 생체 내에서 CtBP2와 아탁신-1이 동시에 E-cadherin 프로모터에 결합함을 확인하였다(도 6 참조).
- [0024] 이에, 본 발명자들은 아탁신-1이 E-cadherin 프로모터에 어떠한 작용을 하는지 확인하기 위해, E-cadherin 프로모터에 연결된 루시페레이즈 유전자를 포함하는 발현백터로 형질전환된 세포주에 아탁신-1 유전자 및/또는 CtBP2 유전자를 형질감염시켰다. 그 결과, 아탁신-1은 E-cadherin 프로모터를 활성화시켰으며, 아탁신-1과 CtBP2 유전자를 공형질감염시킨 경우에는 상기 프로모터를 더욱 활성화시키는 것으로 나타났다(도 7 참조).
- [0025] 또한, 본 발명자들은 실제 아탁신-1이 세포 내에서 E-cadherin의 발현을 촉진시키는지 확인하기 위해, MCF-7 세포를 아탁신-1 및 CtBP2를 각각 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드로 공형질감염시킨 후, E-cadherin의 단백질 및 mRNA 수준을 각각 웨스턴 블랏 분석 및 RT-PCR 분석을 통해 분석하였다. 그 결과 아탁신-1의 과발현에 의해 E-cadherin의 발현 수준이 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 증가하였다(도 8 참조).
- [0026] 또한, 본 발명자들은 CtBP2와 아탁신-1의 상호작용의 기작을 이해하기 위해, CtBP2에 특이적인 siRNA를 제조하여, 아탁신-1 유전자와 공형질감염시킨 경우, E-cadherin 프로모터를 활성화시키긴 하나, 아탁신-1 유전자의 양적 증가에도 불구하고 E-cadherin 프로모터 활성화는 크게 증가하지 않은 것으로 나타나(도 9 참조), 아탁신-1의 E-cadherin 프로모터 활성화에는 CtBP2의 존재가 필요한 것으로 추정되었다(도 10 참조).
- [0027] E-cadherin은 종양 억제 유전자로 알려져 있으므로, E-cadherin의 활성화 또는 발현을 촉진하는 약물을 탐색할 경우, 항암제로 사용이 가능하다. 본 발명자들은 상기에서 살펴본 바와 같이, 아탁신-1을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 세포에 형질감염시켰을 때, 세포의 E-cadherin의 발현 수준이 증가함을 입증하였다. 따라서, 본 발명의 아탁신-1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자 자체는 항암 또는 항전이제로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 아탁신-1과 CtBP2가 공동으로 E-cadherin 프로모터에 결합하여, E-cadherin 프로모터의 활성을 증가시켜 E-cadherin의 발현을 촉진함을 입증하였다. 따라서, 아탁신-1과 CtBP2의 결합정도를 이용하거나 아탁신-1과 E-cadherin 프로모터의 결합정도를 이용하여, 보다 효율적인 항암제의 스크리닝이 가능함을 입증하였다.
- [0029] 본 발명의 일 실시태양은, 하기와 같다:
- [0030] 본 발명은 1)아탁신-1 단백질에 CtBP2를 피검 물질의 존재하에 접촉시키는 단계; 및
- [0031] 2)피검 물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 아탁신-1 단백질과 CtBP2의 결합 정도를 증가시킨 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0032] 상기 방법에 있어서, 아탁신-1 단백질과 CtBP2의 결합 정도는 통상의 방법을 이용하여 분석하는 것이 가능하다. 구체적으로는 효모 two-hybrid 분석, 단백질 microarray, 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 분석 등을 사용할 수 있다.

- [0033] 본 발명의 다른 일 실시태양은 하기와 같다:
- [0034] 본 발명은 1)E-cadherin 프로모터를 아탁신-1 단백질에 피검 물질의 존재하에서 접촉시키는 단계; 및
- [0035] 2)피검 물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 E-cadherin 프로모터 및 아탁신-1 단백질의 결합정도를 증가시킨 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0036] 상기 방법에 있어서, E-cadherin 프로모터와 아탁신-1 단백질의 결합 정도는 공지 방법으로 측정이 가능하다. 구체적으로, 전통적인 핵산분자와 단백질 사이의 상호작용의 측정에 사용되는 gel shift assay, DNA footprinting assay의 사용이 가능하고, 보다 high-throughput한 방식으로, E-cadherin 프로모터를 microarray 형태로 식재하고, 피검 물질과 형광물질로 표지된 아탁신-1 단백질을 접촉시켜 세척한 후, 형광 정도를 측정하거나, 형광물질이 표지되지 않은 아탁신-1 단백질을 피검 물질의 존재하에 상기 microarray에 접촉시켜 세척한 후, 형광물질로 표지된 아탁신-1 단백질에 특이적인 항체를 처리한 후, 형광 정도를 측정하는 방법의 사용이 가능하다. 반대로, 아탁신-1 단백질이 식재된 단백질 microarray를 제조하고, 형광물질이 표지된 E-cadherin 프로모터를 피검 물질의 존재하여 상기 단백질 microarray에 접촉시킨 후 형광 정도를 측정하는 방법이 가능하다. 뿐만 아니라, 상기 분석은 형광물질의 표지 없이 수행되는 것도 가능한데, 이 경우에는 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 분석이 사용되는 것이 바람직하다.
- [0037] 더 나아가, 본 발명의 방법은 리포터 분석을 통해 수행될 수 있는데, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다:
- [0038] 본 발명은 1)E-cadherin 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터유전자를 포함하는 제1발현벡터를 제조하는 단계;
- [0039] 2)상기 제1발현벡터를 아탁신-1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2발현벡터와 함께 세포주에 공형질감염시키는 단계;
- [0040] 3)상기 세포주에 피검 물질을 처리한 후 리포터 분석을 수행하는 단계; 및
- [0041] 4)피검 물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 리포터 유전자의 활성이 증가된 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0042] 상기 방법에 있어서, 리포터 유전자는 베타-갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase) 유전자, GUS( $\beta$ -glucuronidase) 유전자, GFP(green fluorescent protein) 유전자, 루시페레이즈(luciferase) 유전자, CAT(chloramphenicol acetyltransferase) 유전자 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 아니하다.
- [0043] 아울러, 본 발명의 방법은 하기와 같은 단계를 포함할 수 있다:
- [0044] 본 발명은 1)E-cadherin 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터유전자를 포함하는 제1발현벡터를 제조하는 단계;
- [0045] 2)상기 발현벡터를 아탁신-1 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2발현벡터 및 CtBP2 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제3발현벡터와 함께 세포주에 공형질감염시키는 단계;
- [0046] 3)상기 세포주에 피검 물질을 처리한 후 리포터 분석을 수행하는 단계; 및
- [0047] 4)피검 물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 리포터 유전자의 활성이 증가된 피검 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0048] 상기 방법에 있어서, 리포터 유전자는 베타-갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase) 유전자, GUS( $\beta$ -glucuronidase) 유전자, GFP(green fluorescent protein) 유전자, 루시페레이즈(luciferase) 유전자, CAT(chloramphenicol acetyltransferase) 유전자 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지는 아니하다.

실시예

- [0049] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0050] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0051] <실시예 1> 유전자 발현벡터의 제조
- [0052] <1-1> 아타신-1 발현벡터의 제조
- [0053] 글루타민 반복체의 글루타민 반복 횟수가 30인 아타신-1(30Q) 유전자를 포함하는 벡터(pcDNA1 amp/ataxin-1(30Q)) 및 글루타민 반복 횟수가 82인 아타신-1(82Q) 유전자를 포함하는 벡터[pcDNA1 amp/ataxin-1(82Q)]를 Institute of Human Genetics(University of Minnesota)로부터 제공받았다. 상기 두 벡터로부터, 아타신-1의 전장 유전자 및 다양한 결실 돌연변이체를 PCR을 통해 제조하였고, 이 PCR 산물을 *EcoRI*과 *XhoI* 제한효소로 자른 pLexA(Clontech) 또는 pcDNA3.1 HisC(Invitrogen) 벡터에 삽입하여 아타신-1 발현벡터를 제조하였다.
- [0054] <1-2> CtBP2 발현벡터의 제조
- [0055] 인간 전장 CtBP2 유전자 컨스트럭트인 pGAD10/CtBP2를 E.C. Slater Institute(BioCentrum Amsterdam, University of Amsterdam)로부터 제공받았다. CtBP2의 전장 cDNA를 PCR을 통해 증폭하였고, PCR 산물을 *XhoI* 제한효소로 자른 pB42AD(Clontech) 또는 pcDNA3.1 HisC(Invitrogen) 벡터에 삽입하여 CtBP2 발현벡터를 제조하였다.
- [0056] <1-3> E-cadherin 프로모터 리포터 벡터의 제조
- [0057] E-cadherin의 전사개시부위의 상부 427번째 염기부터 하부 53번째 염기까지의 전체 E-cadherin 프로모터 및 잘려진 E-cadherin 프로모터를 가진 벡터를 Department of Anatomy and Cell Biology(University of Florida College of Medicine)로부터 제공받았다. 클로닝된 프로모터 부위는 두 회문식 요소(E-boxes), CAAT 박스 및 CpG 아일랜드를 포함하여 E-cadherin 프로모터의 모든 추정적 조절 부위가 포함되어있다.
- [0058] <실시예 2> 세포배양 및 형질감염
- [0059] <2-1> HeLa, HEK293T 및 MCF-7 세포의 배양
- [0060] 10% 우태아혈청(FBS), 페니실린(100 U/ml) 및 스트렙토마이신(100 µg/ml)이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지에 HeLa 및 HEK293T 세포를 5% CO<sub>2</sub> 및 37℃의 조건에서 배양하였다. 또한 10% 우태아혈청(FBS), 페니실린(100 U/ml) 및 스트렙토마이신(100 µg/ml)이 첨가된 RPMI(Roswell Park Memorial Institute medium) 배지에 MCF-7 세포를 5% CO<sub>2</sub> 및 37℃의 조건에서 배양하였다.
- [0061] <2-2> 형질감염
- [0062] 형질감염은 리포펙타민(Lipofectamine)(Invitrogen) 또는 폴리에틸렌이민(polyethyleneimine)(Sigma-Aldrich)을 사용하여 이전 문헌(Choi et al., *Oncogene* 27, 1716-1725)에 보고되었던 구체적인 실험방법에 의해 수행하였다. DNA와 시약을 1:3의 비로 섞은 혼합물을 혈청이 없는 OPTI-MEM 배지에 15분간 배양한 후, DNA-시약 혼합물을 세포에 처리하였다.
- [0063] <실험예 1> 아타신-1과 인간 CtBP2의 상호작용 분석
- [0064] <1-1> 효모 two-hybrid 분석을 통한 아타신-1과 상호작용하는 단백질의 동정
- [0065] 효모 발현 벡터인 pLexA-DBD/ataxin-1(82Q)를 인간 태아 뇌의 cDNA 라이브러리[human fetal brain Matchmaker two-hybrid library(Clontech)]와 함께 효모 EGY48(Clontech)에 순차적으로 형질전환시켰다. 라이브러리의 선

별을 위해 약  $1 \times 10^7$ 의 형질전환체를 류신, 히스티딘 및 트립토판은 존재하지 않고, X-gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside)이 포함된 선택 배지에 배양하였다. 5일 후,  $\text{Leu}^+$  및  $\text{LacZ}^+$  양성 콜로니를 가려냈다. 선별된 양성 클론은 ABI sequencer를 이용하여 유전자 서열을 분석하였고, 각 클론의 서열은 NCBI BLASTN 프로그램을 이용하여 확인하였다.

그 결과, CtBP2의 C-말단부위(아미노산 203-445)의 부분적 cDNA가 독립 양성 클론으로부터 분리되었고, 이로써 CtBP2가 아타신-1(82Q)에 특이적으로 결합함을 확인하였다(도 1).

#### <1-2> 효모 정량적 베타-갈락토시다아제 분석

히스티딘 및 트립토판이 결여된 플레이트에서 선별된 형질전환체를 글루코스가 첨가된 히스티딘 및 트립토판 결여 배양액에서 24시간 배양하였다. Lex-DBD 및 B42AD 융합 단백질의 유도를 위해, 배양액을 글루코스 대신 갈락토스 및 라피노스가 첨가된 유도 배양액으로 갈아주었다. 5시간 후, 각 배양균의 흡광도를 600 nm 파장에서 측정하였고, ONPG(o-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside)를 이용하여 정량적 베타-갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase) 분석을 실시하였다. 베타-갈락토시다아제의 활성은 multi-well plate reader(Bio-Rad)를 사용하여 420 nm에서 측정하였다. 각 분석은 2회의 독립된 실험의 개별적인 콜로니로 3회 반복 실험을 통하여 실시하였다.

아타신-1(82Q)과 CtBP2 사이의 결합을 확인하기 위해, 효모 two-hybrid system을 사용하여 하기 [표 1]에 기재된 벡터를 효모에 공형질감염시켰고, 상기에 기재한 방법에 따라 베타-갈락토시다아제 분석을 실시하였다.

그 결과, pLexA-ataxin-1(82Q) 및 B42AD-CtBP2<sub>203-445</sub>를 동시에 발현하는 효모에서 베타-갈락토시다아제의 활성이 매우 높게 나타났다. 반면에, pLexA-ataxin-1(82Q)/B42AD, LexA-BD/B42AD-CtBP2<sub>203-445</sub>, LexA-Lamin C/B42AD-CtBP2<sub>203-445</sub> 및 LexA-BD/pB42AD를 가진 효모에서는 베타-갈락토시다아제 활성이 매우 낮게 나타났다. 또한, pLexA-ataxin-1(30Q) 및 B42AD-CtBP2<sub>203-445</sub>를 동시에 발현하는 효모에서도 높은 베타-갈락토시다아제 활성을 보여, 글루타민 연속체의 길이가 상기 두 단백질의 상호작용에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 2).

**표 1**

| 종류                                                   |        |
|------------------------------------------------------|--------|
| pLexA-ataxin-1(82Q) / B42AD-CtBP2 <sub>203-445</sub> |        |
| pLexA-ataxin-1(30Q) / B42AD-CtBP2 <sub>203-445</sub> |        |
| pLexA-ataxin-1(82Q) / B42AD                          | 음성 대조군 |
| LexA-BD / B42AD-CtBP2 <sub>203-445</sub>             |        |
| LexA-Lamin C / B42AD-CtBP2 <sub>203-445</sub>        |        |
| LexA-p53 / pB42AD-T <sub>Ag</sub>                    | 양성 대조군 |

#### <1-3> CtBP2에 결합하는 아타신-1의 부위 확인

아타신-1의 어느 부위가 CtBP2와 결합하는지 확인하기 위해, 다양한 결실 돌연변이체 발현벡터를 이용하여, 효모 two-hybrid 분석을 수행하였다. [도 3]에 기재된 다양한 아타신-1 결실 돌연변이체들을 LexA-DBD에 결합하여 B42AD-CtBP2<sub>1-445</sub>와 효모에 공형질감염시켰다. 그리고 나서, 실험에 <1-2>에 따라 배양액의 베타-갈락토시다아제 활성을 정량하였다. B42AD-CtBP2<sub>203-445</sub>/LexA-atrophin-1을 음성 대조군으로, LexA-p53/pB42AD-T<sub>Ag</sub>을 양성 대조군으로 사용하였다.

그 결과, 아타신-1의 N-말단 부위가 단백질 사이의 결합에 결정적인 역할을 함을 발견하였으며, 특히 1-196 단편은 전장 아타신-1 단백질보다 CtBP2에 대한 결합력이 강한 것으로 나타났다(도 3).

[0075] <1-4> 면역 공침전 분석

[0076] 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 배양된 HEK293T 세포를 FLAG로 표지된 아탁신-1(pcDNAIamp/ataxin-1) 및 Xpress로 표지된 CtBP2(pcDNA3.1 HisC/CtBP2)로 형질감염하였다. 형질감염 후 48시간 뒤, 세포를 회수하여 이전 문헌(Hong, S. et al., *Biochem Biophys Res Commun* 371, 256-260)에 보고되었던 실험방법에 따라 면역 공침전 분석 실험을 수행하였다. 면역 침전물은 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하였고, 분리된 단백질은 나이트로셀룰로스로 옮겼다. 그 후, 단백질이 옮겨진 블랏에 항-FLAG 및 항-Xpress 항체를 탐침으로 사용하여, ECL system(Pharmacia)을 통해 단백질을 검출하였다.

[0077] 그 결과, CtBP2 단백질은 아탁신-1(30Q) 또는 아탁신-1(82Q)와 공침전 되었지만, 비어있는 pcDNA1 벡터에는 공침전 되지 않았다(도 4).

[0078] <실험예 2> 세포면역화학분석을 통한 단백질의 세포내 위치 확인

[0079] 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 배양된 HeLa세포를 세포커버 글라스위에 배양하여 FLAG로 표지된 CtBP2를 pEGFP-ataxin-1(30Q) 또는 pEGFP-ataxin-1(82Q) 발현벡터와 함께 일시적으로 형질감염하였다. 이때, 리포펙타민(Lipofecamine)(Invitrogen)을 사용하여 제작자가 제시한 방법에 따라 실험을 진행하였다. 형질감염 후 24시간 뒤, 3.7% 포름알데하이드가 들어있는 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 4℃에서 15분간 고정시키고 4℃에서 5분간 1% 트라이톤 X-100이 포함된 PBS를 세포에 처리하여 세포의 투과성을 높여주었다. 투과성이 생긴 세포를 PBS에 담긴 2% 우혈청알부민(BSA)으로 4℃에서 1시간 동안 블로킹을 한 뒤, 마우스 항-FLAG 항체(1:500) 및 항-Xpress 항체(1:300)를 처리하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 나서, 세포를 PBS로 3회 세척하고, TRITC(tetamethylrhodamine isothiocyanate, Sigma-Aldrich)가 결합된 항-마우스 IgG 항체(붉은색)를 1시간 처리하였다. PBS로 3회 세척한 후, 세포핵을 관찰하기 위해, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich)로 염색하였다. 마지막으로, 커버 글라스를 PBS로 3회 세척하고 글라스 슬라이드에 FluoroGuard™ Antifade Reagent(Bio-Rad)를 이용하여 고정한 뒤, 형광 현미경(OLYMPUS)을 통해 형광 이미지를 얻었다.

[0080] 그 결과, 아탁신-1(30Q) 및 아탁신-1(82Q)는 CtBP2가 발현되는 위치와 같은 지점에서 발현되었다. 즉, 아탁신-1과 CtBP2 단백질은 세포의 핵에서 함께 위치함을 확인하였다(도 5).

[0081] <실험예 3> 아탁신-1 및 CtBP2 단백질의 E-cadherin 프로모터에의 결합 확인

[0082] <3-1> ChIP(Chromatin immunoprecipitation) 분석

[0083] ChIP 분석을 이전 문헌(Aparicio, O. et al., *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 21, Unit 21 23)에 보고되었던 실험방법에 따라 수행하였다. 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 배양된 MCF-7 세포에 4 µg의 FLAG로 표지된 아탁신-1(30Q)과 FLAG로 표지된 CtBP2를 각각 형질감염하였다. 형질감염 후 48시간 뒤, 1% 포름알데하이드로 세포를 교차결합 반응시켰고 0.2 M 글리신을 첨가하여 상기 반응을 중지시켰다. 원심분리에 의해 모인 세포를 차가운 Tris 완충 식염수로 2회 세척하고 나서 MC 분해 완충용액[10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub> 및 0.5% NP-40]으로 3회 세척하였다. 이는 세포를 분쇄하고 핵 덩어리를 생성하기위한 과정이었다. 핵 덩어리는 MNase 완충용액[10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 4% NP-40 및 1 mM PMSF(phenylmethanesulphonylfluoride)]으로 다시 풀어준 뒤, 2 mM PMSF, 1x 프로테이나아제(proteinase) 억제제, 1% SDS 및 200 mM NaCl를 제시된 순서대로 웰에 첨가하고 혼합하였다. 풀어준 핵 덩어리를 초음파로 절단하여 DNA 절편의 크기를 대략 500 bp로 줄여주었다.

[0084] 세포 잔해를 제거한 뒤, 2 mM PMSF 및 1X 프로테이나아제 억제제가 포함된 FA 분해 완충용액[50 mM HEPES(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 및 0.1% SDS]을 넣어 크로마틴 시료를 희석(1:4)하였고, 단백질 G-세파로스 비드를 사용하여 전처리하였다. 전처리된 크로마틴의 10%를 투입으로 쓰고 나머지 상층액은 항-FLAG 항체로 4℃에서 4시간 동안 면역침전하였다. 이 면역침전 시료를 단백질 G-세파로스(GE Healthcare Bio-Sciences)를 첨가하여 4℃에서 2시간 동안 추가적으로 배양하였다. 단백질 G-세파로스에 비특이적으로 결합한 DNA 및 단백질은 FA 분해 완충용액/0.15 M 염화나트륨을 이용해 2회 세척하였고, FA 분해 완충용액/0.5 M 염화나트륨 및 ChIP 세척 완충용액 (10 mM Tris-Cl[pH 8.0], 0.25 M LiCl, 1 mM EDTA,

0.5% NP-40 및 0.5% sodium deoxycholate)으로 1회 세척하고, 최종적으로 TE 완충용액[10 mM Tris-Cl(pH 8.0) 및 1 mM EDTA]으로 세척하였다. 그 다음, 비드를 ChIP 용출 완충용액[50 mM Tris-Cl(pH7.5), 10 mM EDTA 및 1% SDS]으로 65℃에서 10분간 다시 섞어주었다. 용출된 단백질-DNA 혼합물은 단백질을 제거하기 위해, 2 mg/ml 프로테이나아제 K를 넣어 42℃에서 2시간 동안 배양하였고, 이어 포름알데하이드 교차결합을 전환하기 위해 65℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그 후, DNA에 페놀-추출 및 에탄올-침전을 하였다. 인간 E-cadherin 프로모터 부분을 확인하기 위해, 침전된 DNA를 이전문헌(Geisberg, J. V. et al., *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 21, Unit 21 28, Geisberg, J. V. et al., *Nucleic Acids Res* 32, e151)에 보고된 CDH1(E-cadherin) 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. CDH1(E-cadherin) 프라이머 서열은 정방향 5'-ACTCCAGGCTAGAGGGTCAC-3'(서열번호 2) 및 역방향 5'-CCGCAAGCTCACAGGTGCTTTGCAGTTCC-3'(서열번호 3)를 사용하였다. 인간 TK 유전자를 음성 대조군으로 사용하였고, 이때, TK 유전자의 서열은 정방향 5'-TCCCGATTCTCCACGAG-3'(서열번호 4) 및 역방향 5'-TGCGCTCCGGGAAGTTCAC-3'(서열번호 5)를 사용하였다(Choi, D. et al., *Oncogene* 27, 1716-1725, Wang, S. et al., *EMBO J* 21, 3019-3028). 상기 실험에 사용한 PCR 조건은 95℃에서 5분; 94℃에서 20초, 56℃에서 20초, 72℃에서 20초를 35회 후; 72℃에서 5분이었다. 증폭된 DNA는 1.5% 아가로스 겔로 분리하였고 EtBr(ethidium bromide)로 표지하였다.

[0085] 그 결과, 우선 ChIP 분석을 수행하기 위해, FLAG 표지된 CtBP2 또는 아탁신-1(30Q)으로 각각 형질감염한 MCF-7 세포에서 웨스턴 블랏 분석을 통하여 상기 두 단백질의 과발현을 확인하였다(도 6A). CtBP2 또는 아탁신-1 단백질이 항 FLAG 항체로 침전되었을 때, CDH1 프로모터 부위가 강하게 발현되었다. 음성 대조군인 TK 프로모터는 관찰되지 않았다(도 6B).

### [0086] <3-2> SeqChIP(Quantitative sequential chromatin immunoprecipitation) 분석

[0087] SeqChIP 분석은 이전 문헌에 보고된 방법에 따라 실험하였다(Geisberg, J. V. et al., *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 21, Unit 21 28, Geisberg, J. V. et al., *Nucleic Acids Res* 32, e151). 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 배양한 MCF-7 세포를 FLAG로 표지된 CtBP2 및 Xpress로 표지된 아탁신-1(30Q)으로 공형질감염시켰다. 공형질감염 후 24시간 뒤, 형질감염 세포에 최초 수행한 IP에 의한 일반적인 ChIP 과정에 따라 항 FLAG 항체를 처리하였다. 최초 IP에 의해 만들어진 단백질-DNA 혼합물을 항 Xpress 항체, 항 CtBP2 항체(C-16, Santa Cruz Biotechnology) 및 IgG 항 마우스로 SeqChIP에서 추가 IP를 수행하였다. 먼저, 침전된 혼합물을 100  $\mu$ l의 ChIP 용출 완충용액[10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 10 mM EDTA 및 1% SDS]으로 65℃에서 10분간 용출하였다. 이때, 10  $\mu$ l를 최초 면역침전 용출물(90  $\mu$ l)의 다음 분석을 위하여 최초 IP 시료로써 옮겨놓았다.

[0088] SeqChIP을 위한 최초의 면역침전물과 비슷하게 두 번째 면역침전물을 만들기 위해, 용출물을 5 mg/ml BSA, 25  $\mu$ g/ml 파지  $\lambda$  DNA, 50  $\mu$ g/ml 효모 tRNA, 적정량의 항체 및 50  $\mu$ l 단백질 G-세파로스가 첨가된 최종 부피 1 ml의 FA 분해 완충용액(SDS가 없는 150 mM NaCl)에 배양하였다. 두 번째 IP에 따른 세척, 용출 및 교차결합 반전은 상기의 방법에 따라 실시하였다.

[0089] 그 결과, SeqChIP 분석을 하기 위해, FLAG로 표지된 CtBP2 및 Xpress로 표지된 아탁신-1(30Q)을 공형질감염한 MCF-7 세포에서 웨스턴 블랏 분석을 통하여 상기 두 단백질의 과발현을 확인하였다(도 6C).

### [0090] <3-3> 정량적 실시간 PCR(Quantitative real-time PCR, qPCR)

[0091] PCR 분석은 3회 반복 실험하였고, 2  $\mu$ l의 IP 시료 및 최초 IP 시료를 주형 DNA로 사용하고 1  $\mu$ M CDH1 프라이머 및 2 x SYBR Green Master mix(Takara Bio)를 포함하여 각 웰당 최종 부피를 20  $\mu$ l로 하였다. qPCR은 Light cycler 480(Roche Applied Science)을 사용하여 수행하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분간 초기 변성한 후, 95℃에서 10초, 59℃에서 10초, 72℃에서 20초 35 내지 37회 반복하였다. Thresholds cycles( $C_t$ )은 제작자의 소프트웨어에 따라 결정되었다. 증폭된 DNA는 1.5% 아가로스 겔에서 분리하여 EtBr로 표지하였다.

[0092] 그 결과, SeqChIP 분석 과정을 통해 용출된 DNA를 주형으로 사용하여 실시간 PCR을 수행한 결과, CtBP2 단백질은 E-cadherin 프로모터에 완전하게 위치하고 아탁신-1은 부분적으로 위치하고 있음을 나타냈다(도 6D).

[0093]

[0094] <실험예 4> 아탁신-1 및 CtBP2의 E-cadherin 프로모터에 대한 영향 분석

[0095] <4-1> 루시퍼레이즈 리포터 분석을 통한 E-cadherin 프로모터 활성 확인

[0096] 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 배양된 HEK293T 세포에 0.2 g의 pGL3-E-cadherin 리포터 유전자 벡터 또는 E-cadherin 프로모터 절단 돌연변이 벡터와 0.1 g의 pSV-베타-갈락토시다아제 대조군 벡터(Promega), 서로 다른 두 농도의 Xpress로 표지된 아탁신-1(0.7 및 1.4  $\mu$ g/배양접시) 또는 CtBP2(0.5 및 1.5  $\mu$ g/배양접시)를 폴리에틸렌이민 침전법에 따라 공형질감염시켰다. pSV-베타-갈락토시다아제 벡터는 형질감염 효율을 위한 내부 대조군으로 사용하였다. 각 형질감염반응의 DNA의 양은 루시퍼레이즈 발현의 비특이적 효과를 통제하기 위해, 비어있는 발현 벡터를 사용하여 표준화하였다. 형질감염 후, 세포를 24시간 동안 배양하였고 루시퍼레이즈 분석 시스템(Promega)을 사용하여 제작자가 지시한 방법에 따라 루시퍼레이즈를 분석하였다. 루시퍼레이즈 리포터 활성은 Luminoskan Ascent(Thermo LabSystems)를 사용하여 측정하였다.

[0097] 그 결과, 아탁신-1(30Q) 및 아탁신-1(82Q)의 과발현은 아탁신-1의 농도에 의존적으로 E-cadherin 프로모터 활성을 증가시켰고, 글루타민 연속체의 길이가 E-cadherin 프로모터 활성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 7A 및 도 7B). 또한, E-cadherin의 전사 억제제로 알려진 CtBP2의 과발현은 농도 의존적으로 E-cadherin 프로모터 활성을 억제하는 것으로 나타났으나(도 7C), CtBP2 및 아탁신-1을 공형질감염 시킨 경우에는 상기 프로모터를 활성화시키는 것으로 나타났다(도 7D).

[0098] <4-2> RT-PCR 분석을 통한 E-cadherin 발현 확인

[0099] 직경 60 mm 배양접시에 상기 실시예 <2-1>에 따라 배양한 MCF-7 세포를 Xpress로 표지된 아탁신-1(30Q), 아탁신-1(82Q), CtBP2 또는 비어있는 대조군 벡터로 각각 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간 뒤, 형질감염된 MCF-7 세포에서 Trizol(Invitrogen)시약을 이용하여 총 RNA를 분리하였고, SuperScriptIII First-strand Synthesis System(Invitrogen)을 사용하여 제작자가 지시한 방법에 따라 RT-PCR을 수행하였다. 1  $\mu$ g의 총 RNA로부터 oligo(dT)<sub>20</sub> 프라이머를 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR을 통하여 cDNA를 증폭하였고, 이때 PCR 조건은 E-cadherin이 95°C에서 5분; 94°C에서 20초, 60°C에서 20초, 72°C에서 20초를 30회 후; 72°C에서 5분이었고,  $\beta$ -actin은 95°C에서 5분; 94°C에서 20초, 57°C에서 20초, 72°C에서 20초를 25회 후; 72°C에서 5분이었다. PCR에 사용된 프라이머 서열은 이전 문헌(Lee, S. et al., *Biochem Biophys Res Commun* 372, 735-740)에 보고되어있다. E-cadherin의 프라이머 서열은 정방향 5'-TTCTCTCCCAATACATCTCCCTTCACAG-3'(서열번호 6) 및 역방향 5'-CGAAGAACAGCAAGAGCAGCAGAATC-3'(서열번호 7)(Batlle, E. et al., *Nat Cell Biol* 2, 84-89)이고,  $\beta$ -actin의 프라이머 서열은 정방향이 5'-CCAACTGGGACGACATGGAG-3'(서열번호 8)이고 역방향은 5'-GCACAGCTTCTCCTTAATGTC-3'(서열번호 9)이었다.

[0100] 그 결과, 아탁신-1을 과발현시킨 세포의 E-cadherin의 mRNA 발현이 증가하였고, 반대로 CtBP2의 경우에는 감소하였다. 이는 웨스턴 블랏 분석을 통해 확인한 단백질 수준의 결과와 동일했다(도 8).

[0101] <실험예 5> CtBP2 특이적인 siRNA(Small interference RNA)의 E-cadherin 프로모터 활성에 대한 영향

[0102] CtBP2를 knock-down하기 위해 siRNA 올리고머를 Dharmacon에서 구입하였다. 구입한 siGENOME SMARTpool(M-008962-03)에는 CtBP2를 목표로 디자인된 4개의 염색된 siRNA가 혼합되어있다. 상기 실시예 <2-1>의 방법으로 배양된 HEK293T 세포에 CtBP2 siRNA 올리고머를 10, 20 또는 40 pM의 세 가지 농도로 실시예 <2-2>에 따라 형질감염시켰다. 또한, 20 pM CtBP2 siRNA를 두 가지 농도(0.7  $\mu$ g 및 1.4  $\mu$ g)의 Xpress로 표지된 아탁신-1(30Q) 또는 아탁신-1(82Q)과 공형질감염시켰다. 공형질감염 후 24시간 뒤, 전장 E-cadherin 프로모터 리포터 유전자를 사용하여 루시퍼레이즈 분석을 실시하였고, 베타-갈락토시다아제로 표준화하였다. 통계적 분석은 t-test를 사용하였다.

[0103] 그 결과, siRNA를 통한 CtBP2의 결핍은 E-cadherin 프로모터의 루시퍼레이즈 활성을 증가시켰다(도 9A). 또한, CtBP2 siRNA를 아탁신-1과 공형질감염시킨 경우, E-cadherin 프로모터를 활성화시킨 하나, 아탁신-1 유전자의 양의 증가에도 불구하고 E-cadherin 프로모터 활성화에는 증가가 나타나지 않았다(도 9B 및 도 9C). 아울러, CtBP2의 존재 유무에 따라 아탁신-1의 E-cadherin 프로모터 활성에 미치는 영향에 차이가 나타났다. 아탁신-1은 CtBP2가 존재할 때 E-cadherin 프로모터의 활성을 증가시키는 것으로 관찰되었다(도 9D, 도 9E 및 도 10).

### 산업이용 가능성

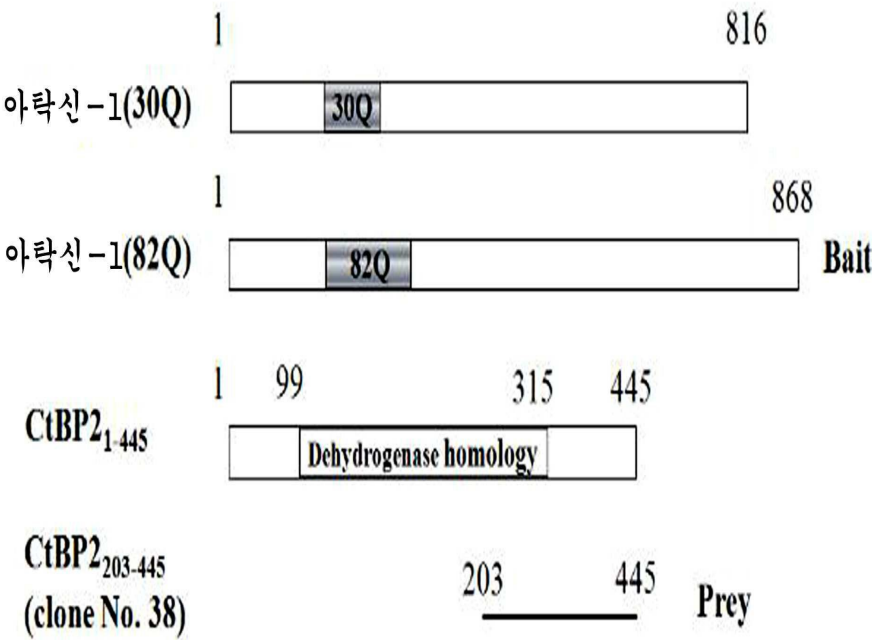
[0104] 상기와 같이, 본 발명의 아탁신-1(Ataxin-1) 단백질 또는 그를 암호화하는 유전자를 유효성분으로 함유하는 항암 또는 항전이용 조성물은 암의 진전 또는 전이를 억제하는 약제로 이용될 수 있고, 항암제 또는 항전이제의 스크리닝 방법에 효과적으로 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

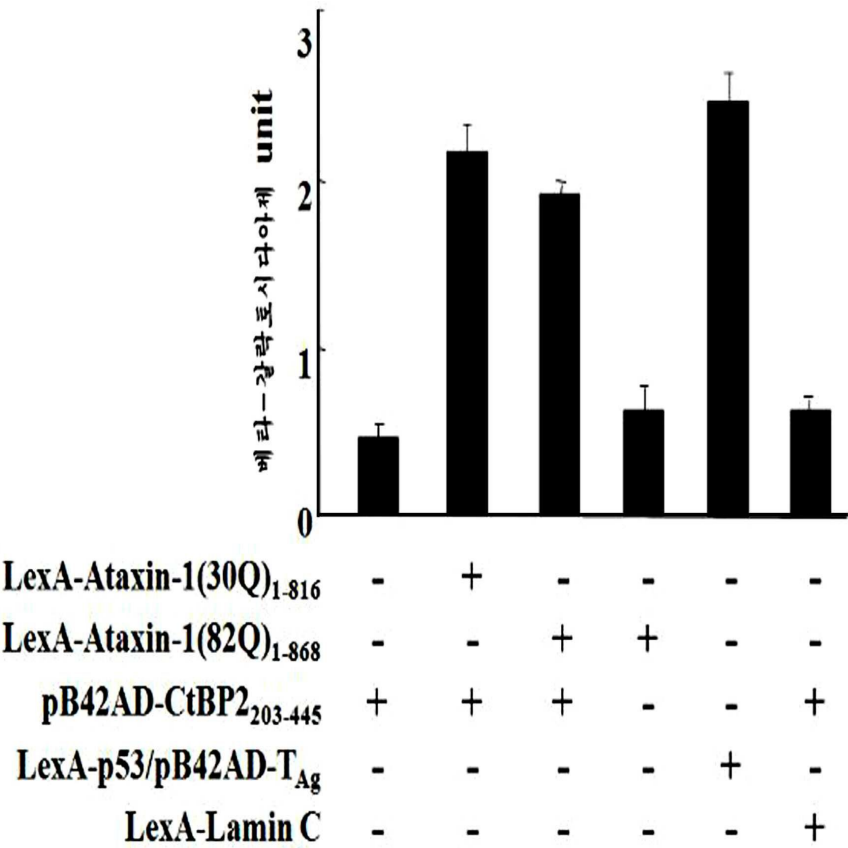
- [0105] 도 1은 본 발명에 사용한 아탁신-1 및 CtBP2를 도식적으로 나타낸 것이다.
- [0106] 도 2는 아탁신-1과 CtBP2를 공형질감염시킨 후, 아탁신-1(30Q) 및 아탁신-1(82Q)가 CtBP2와 결합함을 보기 위해 갈락토시다아제 활성을 측정한 그래프이다.
- [0107] 도 3은 LexA-DBD와 결합된 다양한 아탁신-1 돌연변이체를 도식적으로 나타낸 그림이고(오른쪽), 각각의 아탁신-1 돌연변이체를 CtBP2와 공형질감염시킨 후, 두 단백질의 결합을 보기 위해 갈락토시다아제 활성을 측정한 그래프이다.
- [0108] 도 4는 세포내에서 아탁신-1과 CtBP2의 결합을 확인하기 위해 HEK293T 세포에 아탁신-1과 CtBP2를 공형질감염시킨 후, 면역공침전 분석의 결과를 나타낸 그림이다.
- [0109] 도 5는 아탁신-1과 CtBP2 단백질이 세포의 핵에 공위치를 세포면역화학분석 실험을 통하여 나타낸 그림이다.
- [0110] 도 6은 MCF-7 세포에 CtBP2 및 아탁신-1을 각각 형질감염시킨 후, 웨스턴 블랏 분석을 통해 두 단백질의 세포내 과발현을 확인한 그림이고(A), 두 단백질로 각각 형질감염된 세포에서 CtBP2 또는 아탁신-1이 E-cadherin 프로모터와 결합함을 ChIP 분석을 통하여 나타낸 그림이며(B), MCF-7 세포에 CtBP2와 아탁신-1을 공형질감염시킨 후, 웨스턴 블랏 분석을 통해 두 단백질의 과발현을 확인한 그림이고(C) 또한, CtBP2 및 아탁신-1이 E-cadherin 프로모터와 동시에 결합함을 seqChIP 분석을 통해 나타낸 그래프이다(D).
- [0111] 도 7은 아탁신-1 및 CtBP2가 E-cadherin 프로모터에 어떠한 작용을 하는지 확인하기 위해, 루시퍼레이즈 유전자가 결합된 E-cadherin 프로모터 발현벡터가 형질감염된 HEK293T 세포에 아탁신-1 및/또는 CtBP2 유전자를 형질감염시킨 후, 상기 프로모터의 활성을 루시퍼레이즈 분석을 통해 나타낸 그래프이다.
- [0112] 도 8은 아탁신-1이 세포내에서 E-cadherin 발현을 촉진시키는지 확인하기 위해 MCF-7 세포에 아탁신-1 또는 CtBP2로 각각 형질감염시킨 후, E-cadherin의 단백질 및 mRNA 수준에서의 발현을 각각 웨스턴 블랏 분석(A) 및 RT-PCR 분석을(B) 통해 분석한 그래프이다.
- [0113] 도 9는 HEK293T 세포에 CtBP2 특이적인 siRNA를 아탁신-1 유전자와 공형질감염시킨 경우, 루시퍼레이즈 분석을 통해 E-cadherin 프로모터의 활성을 측정한 그래프이다.
- [0114] 도 10은 CtBP2의 존재에 따른 아탁신-1의 E-cadherin 프로모터 활성에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.

도면

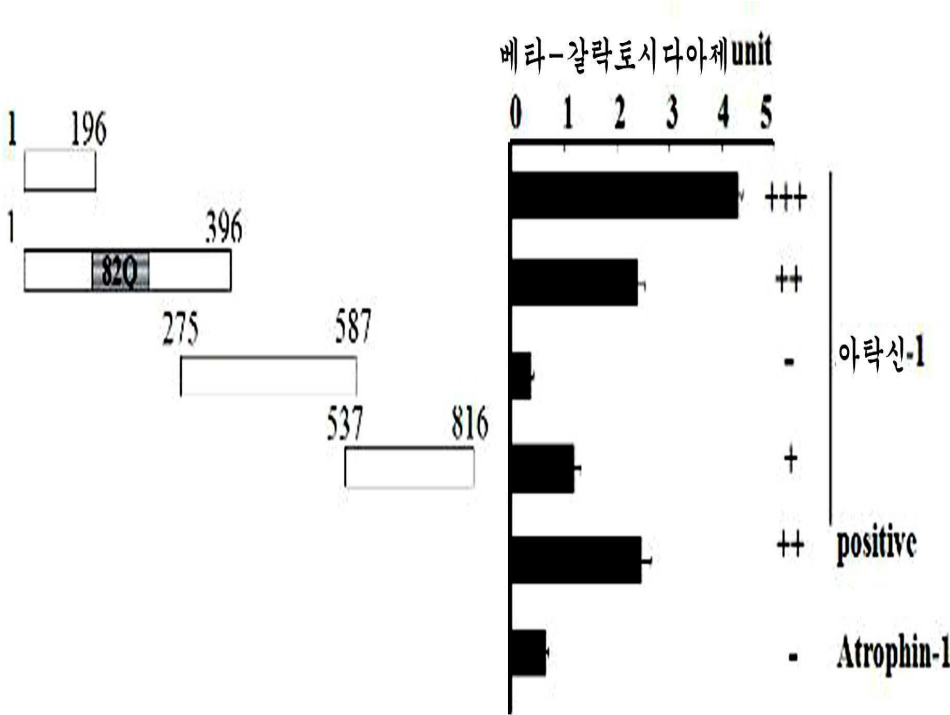
도면1



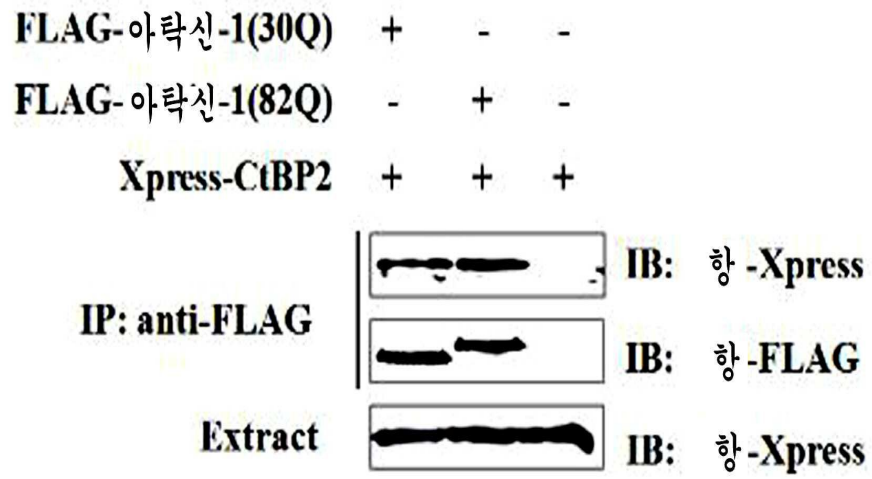
도면2



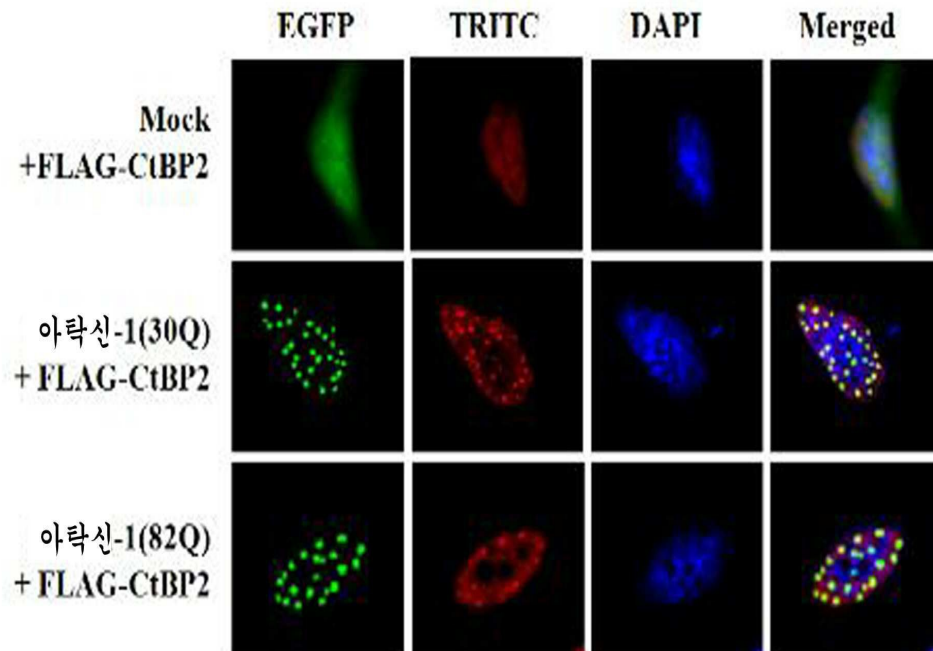
도면3



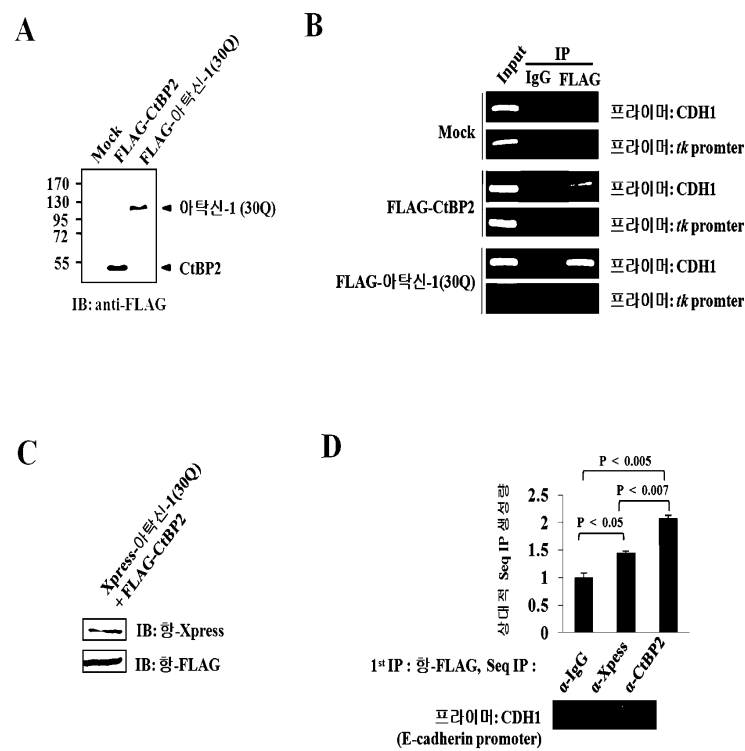
도면4



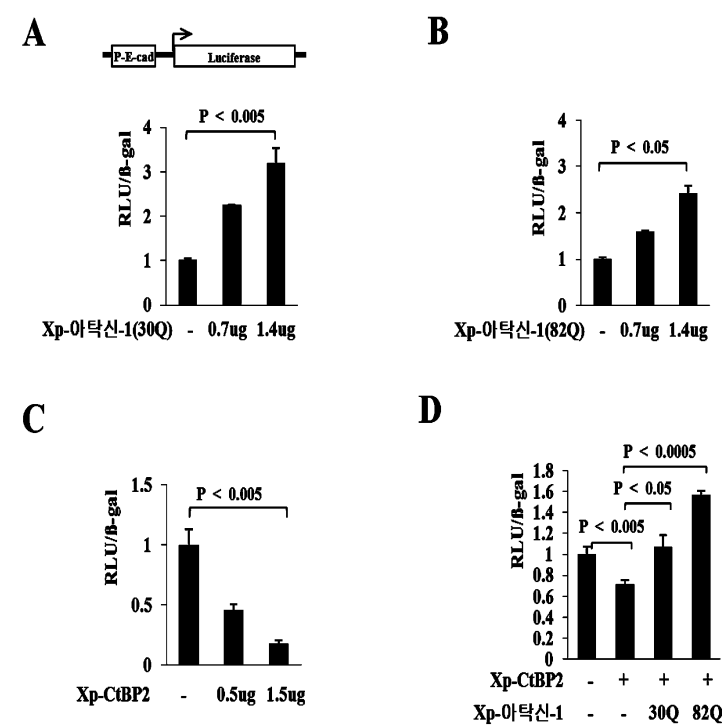
도면5



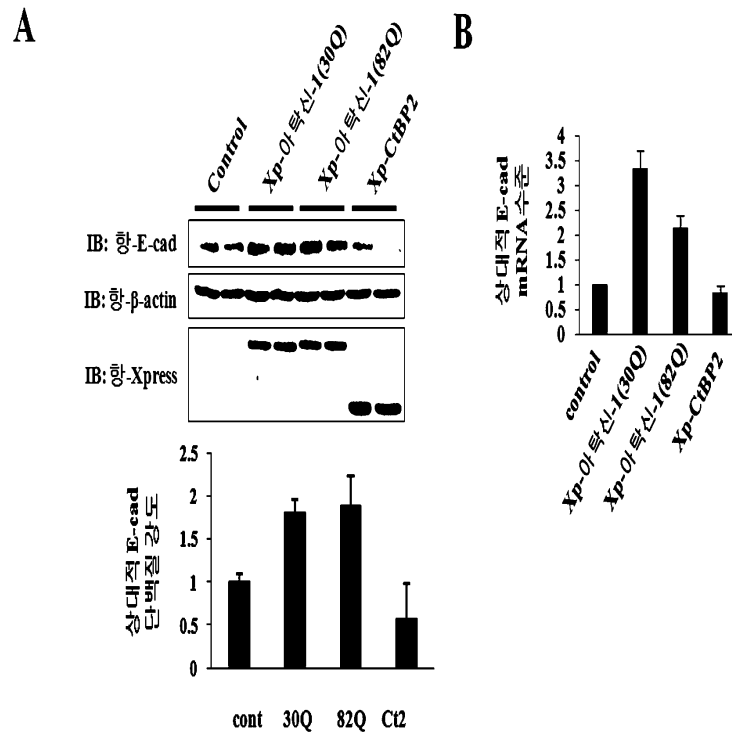
도면6



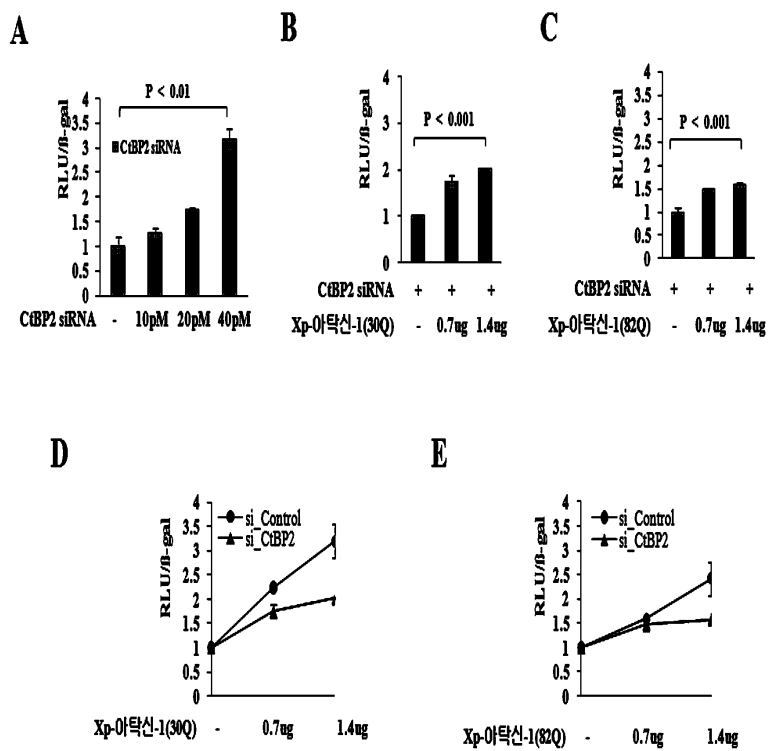
도면7



도면8



도면9

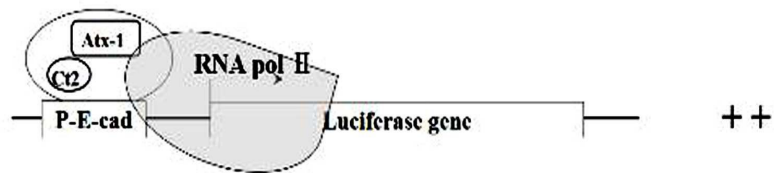


도면10

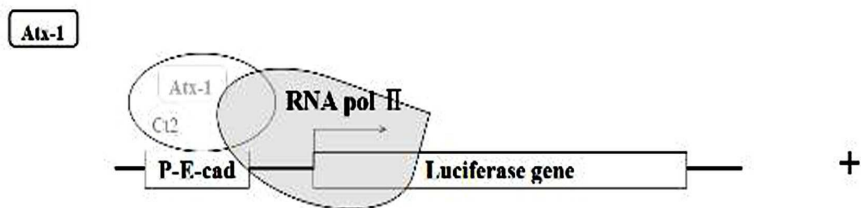
CtBP2의 과발현



CtBP2 및 아탁신-1의 과발현



CtBP2에 대한 siRNA 및 아탁신-1의 과발현



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Anti-cancer composition containing an Ataxin-1 protein or a polynucleotide encoding Ataxin-1 and a screening method of anti-cancer agents using the same
- <130> 9P-04-72
- <160> 9
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 815
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ataxin-1

<400> 1

Met Lys Ser Asn Gln Glu Arg Ser Asn Glu Cys Leu Pro Pro Lys Lys  
1 5 10 15

Arg Glu Ile Pro Ala Thr Ser Arg Ser Ser Glu Glu Lys Ala Pro Thr  
20 25 30

Leu Pro Ser Asp Asn His Arg Val Glu Gly Thr Ala Trp Leu Pro Gly  
35 40 45

Asn Pro Gly Gly Arg Gly His Gly Gly Gly Arg His Gly Pro Ala Gly  
50 55 60

Thr Ser Val Glu Leu Gly Leu Gln Gln Gly Ile Gly Leu His Lys Ala  
65 70 75 80

Leu Ser Thr Gly Leu Asp Tyr Ser Pro Pro Ser Ala Pro Arg Ser Val  
85 90 95

Pro Val Ala Thr Thr Leu Pro Ala Ala Tyr Ala Thr Pro Gln Pro Gly  
100 105 110

Thr Pro Val Ser Pro Val Gln Tyr Ala His Leu Pro His Thr Phe Gln  
115 120 125

Phe Ile Gly Ser Ser Gln Tyr Ser Gly Thr Tyr Ala Ser Phe Ile Pro  
130 135 140

Ser Gln Leu Ile Pro Pro Thr Ala Asn Pro Val Thr Ser Ala Val Ala  
145 150 155 160

Ser Ala Ala Gly Ala Thr Thr Pro Ser Gln Arg Ser Gln Leu Glu Ala  
165 170 175

Tyr Ser Thr Leu Leu Ala Asn Met Gly Ser Leu Ser Gln Thr Pro Gly  
180 185 190

His Lys Ala Glu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
195 200 205

His Gln His Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln

|                                                                 |     |         |
|-----------------------------------------------------------------|-----|---------|
| 210                                                             | 215 | 220     |
| Gln His Leu Ser Arg Ala Pro Gly Leu Ile Thr Pro Gly Ser Pro Pro |     |         |
| 225                                                             | 230 | 235 240 |
| Pro Ala Gln Gln Asn Gln Tyr Val His Ile Ser Ser Ser Pro Gln Asn |     |         |
|                                                                 | 245 | 250 255 |
| Thr Gly Arg Thr Ala Ser Pro Pro Ala Ile Pro Val His Leu His Pro |     |         |
|                                                                 | 260 | 265 270 |
| His Gln Thr Met Ile Pro His Thr Leu Thr Leu Gly Pro Pro Ser Gln |     |         |
|                                                                 | 275 | 280 285 |
| Val Val Met Gln Tyr Ala Asp Ser Gly Ser His Phe Val Pro Arg Glu |     |         |
|                                                                 | 290 | 295 300 |
| Ala Thr Lys Lys Ala Glu Ser Ser Arg Leu Gln Gln Ala Ile Gln Ala |     |         |
| 305                                                             | 310 | 315 320 |
| Lys Glu Val Leu Asn Gly Glu Met Glu Lys Ser Arg Arg Tyr Gly Ala |     |         |
|                                                                 | 325 | 330 335 |
| Pro Ser Ser Ala Asp Leu Gly Leu Gly Lys Ala Gly Gly Lys Ser Val |     |         |
|                                                                 | 340 | 345 350 |
| Pro His Pro Tyr Glu Ser Arg His Val Val Val His Pro Ser Pro Ser |     |         |
|                                                                 | 355 | 360 365 |
| Asp Tyr Ser Ser Arg Asp Pro Ser Gly Val Arg Ala Ser Val Met Val |     |         |
|                                                                 | 370 | 375 380 |
| Leu Pro Asn Ser Asn Thr Pro Ala Ala Asp Leu Glu Val Gln Gln Ala |     |         |
| 385                                                             | 390 | 395 400 |
| Thr His Arg Glu Ala Ser Pro Ser Thr Leu Asn Asp Lys Ser Gly Leu |     |         |
|                                                                 | 405 | 410 415 |
| His Leu Gly Lys Pro Gly His Arg Ser Tyr Ala Leu Ser Pro His Thr |     |         |
|                                                                 | 420 | 425 430 |
| Val Ile Gln Thr Thr His Ser Ala Ser Glu Pro Leu Pro Val Gly Leu |     |         |
|                                                                 | 435 | 440 445 |

Pro Ala Thr Ala Phe Tyr Ala Gly Thr Gln Pro Pro Val Ile Gly Tyr  
450 455 460

Leu Ser Gly Gln Gln Gln Ala Ile Thr Tyr Ala Gly Ser Leu Pro Gln  
465 470 475 480

His Leu Val Ile Pro Gly Thr Gln Pro Leu Leu Ile Pro Val Gly Ser  
485 490 495

Thr Asp Met Glu Ala Ser Gly Ala Ala Pro Ala Ile Val Thr Ser Ser  
500 505 510

Pro Gln Phe Ala Ala Val Pro His Thr Phe Val Thr Thr Ala Leu Pro  
515 520 525

Lys Ser Glu Asn Phe Asn Pro Glu Ala Leu Val Thr Gln Ala Ala Tyr  
530 535 540

Pro Ala Met Val Gln Ala Gln Ile His Leu Pro Val Val Gln Ser Val  
545 550 555 560

Ala Ser Pro Ala Ala Ala Pro Pro Thr Leu Pro Pro Tyr Phe Met Lys  
565 570 575

Gly Ser Ile Ile Gln Leu Ala Asn Gly Glu Leu Lys Lys Val Glu Asp  
580 585 590

Leu Lys Thr Glu Asp Phe Ile Gln Ser Ala Glu Ile Ser Asn Asp Leu  
595 600 605

Lys Ile Asp Ser Ser Thr Val Glu Arg Ile Glu Asp Ser His Ser Pro  
610 615 620

Gly Val Ala Val Ile Gln Phe Ala Val Gly Glu His Arg Ala Gln Val  
625 630 635 640

Ser Val Glu Val Leu Val Glu Tyr Pro Phe Phe Val Phe Gly Gln Gly  
645 650 655

Trp Ser Ser Cys Cys Pro Glu Arg Thr Ser Gln Leu Phe Asp Leu Pro  
660 665 670

Cys Ser Lys Leu Ser Val Gly Asp Val Cys Ile Ser Leu Thr Leu Lys  
675 680 685

Asn Leu Lys Asn Gly Ser Val Lys Lys Gly Gln Pro Val Asp Pro Ala  
690 695 700

Ser Val Leu Leu Lys His Ser Lys Ala Asp Gly Leu Ala Gly Ser Arg  
705 710 715 720

His Arg Tyr Ala Glu Gln Glu Asn Gly Ile Asn Gln Gly Ser Ala Gln  
725 730 735

Met Leu Ser Glu Asn Gly Glu Leu Lys Phe Pro Glu Lys Met Gly Leu  
740 745 750

Pro Ala Ala Pro Phe Leu Thr Lys Ile Glu Pro Ser Lys Pro Ala Ala  
755 760 765

Thr Arg Lys Arg Arg Trp Ser Ala Pro Glu Ser Arg Lys Leu Glu Lys  
770 775 780

Ser Glu Asp Glu Pro Pro Leu Thr Leu Pro Lys Pro Ser Leu Ile Pro  
785 790 795 800

Gln Glu Val Lys Ile Cys Ile Glu Gly Arg Ser Asn Val Gly Lys  
805 810 815

<210> 2  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> CDH1 forward primer

<400> 2  
actccaggct agagggtcac

20

<210> 3  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDH1 reverse primer

<400> 3  
ccgcaagctc acaggtgctt tgcagttcc

29

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

<220>  
<223> TK forward primer

<400> 4  
tcccggattc ctcccacgag

20

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> TK reverse primer

<400> 5  
tgcgcctccg ggaagttcac

20

<210> 6  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> E-cadherin forward primer

<400> 6  
ttcctcccaa tacatctccc ttcacag

27

<210> 7  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> E-cadherin reverse primer

<400> 7  
 cgaagaaaca gcaagagcag cagaatc 27

<210> 8  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> beta-actin forward primer

<400> 8  
 ccaactggga cgacatggag 20

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> beta-actin reverse primer

<400> 9  
 gcacagcttc tccttaatgt c 21