

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0037106 (43) 공개일자 2013년04월15일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01) A61K 38/16 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2011-0101479		(72) 발명자 최의주 서울특별시 강남구 연주로29길 34, 우성 5차 501동 605호 (도곡동)
(22) 출원일자 2011년10월05일 심사청구일자 2011년10월05일		김은경 서울특별시 종로구 난계로 251, 404호 (송인동, 동양파라빌) 권정은 서울특별시 종로구 지봉로13길 20-2, B동 109호 (창신동, 창신아파트)
		(74) 대리인 한양특허법인

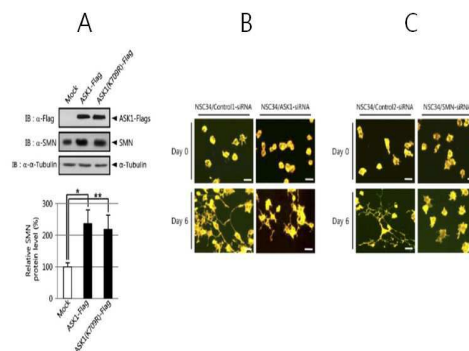
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 SMN 단백질의 분해에 관여하는 다유비퀴틴화를 억제하여 SMN 단백질을 안정화시키므로, 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료에 효과를 가진다.

대표도 - 도13



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A090536100

부처명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 CIB1 단백질을 이용한 파킨슨 질환 제어 기전 연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) 단백질 또는 그 단편,

ASK1 단백질 또는 그 단편의 유전자, 및

ASK1 단백질 과발현 벡터로

이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 ASK1 단백질의 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 ASK1 단백질의 유전자는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열을 갖고, ASK1 단백질의 단편의 유전자는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 ASK1 단백질 과발현 벡터는 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병은 척수성 근위축증 (SMA), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease) 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료는 ASK1 단백질이 SMN (survival motor neuron)단백질과 결합하여, SMN 단백질의 다유비퀴틴화를 억제함으로써 SMN 단백질을 안정화시키는 것에 기인하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

ASK1 단백질에 대한 siRNA (small-interfering RNA) 및 SMN 단백질에 대한 siRNA로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 siRNA를 포함하는 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 진단용 키트.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 ASK1 단백질 siRNA는 서열번호 6 또는 서열번호 7의 올리고뉴클레오티드 서열을 갖고,

상기 SMN 단백질에 대한 siRNA는 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 운동성신경 세포 사멸에 기인하는 질병의 진단용 키트.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병은 척수성 근위축증 (SMA), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease) 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)으로 이루어진 군 으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사람의 SMN (survival motor neuron) 유전자는 상염색체 5q13의 말단소립 (telomere)와 중심체 (centromere) 쪽에 각각 SMN1과 SMN2 두 종류로 구성되어 있다.

[0003] SMN 유전자의 결핍으로 인하여 SMN 단백질 농도가 감소되면 운동성신경세포가 사멸하게 되어 여러가지 질병이 초래될 수 있다. 따라서, 세포내에서 SMN 단백질의 양을 인위적으로 증가시키려는 연구가 수행되어 왔다 (비특 허문헌 1 및 2 참조).

[0004] 그러나 세포내 SMN 단백질을 인위적으로 증가시키더라도 SMN 단백질이 다유비퀴틴화 (polyubiquitination)을 통한 프로테오솜에 의하여 분해되는 것은 피할 수 없으므로, SMN 단백질을 증가시키기 위한 약물의 지속시간이 짧 아지는 등, 그 효과에 한계가 있다.

[0005] 또한, SMN을 인위적으로 증가시키는 과정에서 화학적 조성물을 사용하게 되므로, 여러 가지 부작용을 야기시킬 수 있다.

[0006] 본 발명에서는 상기와 같은 한계를 극복하기 위하여 SMN 단백질의 다유비퀴틴화에 의한 분해를 저해할 수 있는 물질에 대해 주목하였다.

[0007] 본 발명에서 신규한 기능이 밝혀진, ASK1 단백질에 대한 선행 연구에서는, 활성 산소에 의한 스트레스, TNF- α 같은 염증반응을 촉진하는 사이토카인 (cytokine), NGF와 같은 신경성장인자의 결핍에 의한 아폽토시스 (apoptosis)성 세포사멸에 관여하는 것에 집중되어 왔다.

[0008] 그러나, 본 발명자들은 ASK1 단백질의 새로운 기능으로서, SMN 단백질과의 결합을 통하여 SMN 단백질의 분해에 관여하는 다유비퀴틴화 (polyubiquitination)를 억제함으로써 SMN 단백질을 안정화시킨다는 사실을 최초로 발견 하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Le TT at al., 2005 Hum. Mol. Genet., 14: 845-857
(비특허문헌 0002) Jarecki et al., 2005 Hum. Mol. Genet., 14: 2003-2018;

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
[0011] 본 발명의 다른 목적은 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 진단용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여,
[0013] 본 발명은 ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) 단백질 또는 그 단편,
[0014] ASK1 단백질 또는 그 단편의 유전자, 및
[0015] ASK1 단백질 과발현 벡터로
[0016] 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
[0017] 또한 본 발명은, ASK1 단백질에 대한 siRNA (small-interfering RNA) 및 SMN 단백질에 대한 siRNA로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 siRNA를 포함하는 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 SMN 단백질의 분해에 관여하는 다유비퀴틴화를 억제하여 SMN 단백질을 안정화시키므로, 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료에 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 293T 세포에 과발현시킨 ASK1 단백질과 SMN 단백질 간의 상호 결합을 면역침강법에 이은 웨스턴 블랏을 통해 분석한 도이다.
도 2는 HeLa 세포에서 세포 수준의 농도로 존재하고 있는 ASK1 단백질과 SMN의 상호 결합을 면역침강법에 이은 웨스턴 블랏을 통해 분석한 도이다.
도 3은 293T 세포에 과발현시킨 ASK1 단백질 및 ASK1(K709R) 단백질과 SMN 단백질 간의 상호 결합을 면역침강법에 이은 웨스턴 블랏을 통해 분석한 도이다.
도 4는 ASK1 단백질의 단편과 SMN 단백질의 결합여부에 관한 도이다.
도 5는 ASK1 단백질 또는 ASK1(K709R)의 농도와 SMN 단백질의 농도와의 관계를 나타내는 도이다.
도 6은 ASK1 단백질의 감소가 SMN 단백질 및 그 mRNA 농도 변화에 미치는 영향을 나타내는 도이다.
도 7은 ASK1 단백질이 SMN 단백질의 세포 내 농도의 조절에 미치는 영향을 나타내는 도이다.
도 8은 인간 SMN1 및 SMN2 유전자에서 만들어진 SMN1 및 SMN2 단백질에 대한 ASK1 단백질의 영향을 나타내는 도

이다.

도 9는 ASK1 단백질의 감소에 따른 SMN 단백질 및 mRNA양의 변화를 나타내는 도이다.

도 10은 ASK1 단백질의 농도와 SMN 단백질의 안정성과의 관계를 나타내는 도이다.

도 11은 ASK1 단백질의 감소와 SMN 단백질의 다유비퀴틴화와의 상호관계에 관한 도이다.

도 12는 ASK1 단백질의 카이네이즈 (kinase)활성과 SMN 단백질의 다유비퀴틴화와의 상호관계에 관한 도이다.

도 13은 ASK1 단백질과 SMN 단백질의 양적인 상관관계 및 두 단백질이 신경분절 분화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 14는 도 13에서 신경분절을 가진 세포와 신경분절의 길이를 비교하여 그래프로 나타낸 도이다.

도 15는 ASK1 단백질과 SMN 단백질의 감소와 신경분절 분화의 지표인 β -Actin의 양과의 관계를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0021] 본 발명은,
- [0022] ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) 단백질 또는 그 단편,
- [0023] ASK1 단백질 또는 그 단편의 유전자, 및
- [0024] ASK1 단백질 과발현 벡터로
- [0025] 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 ASK1 단백질은 미토젠-활성화 단백질 카이네이즈 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 신호전달 경로의 상위 MAPK 카이네이즈 카이네이즈 (MAPKKs) 중의 하나로, 캐스캐이드 (cascade) 방식으로 SEK1/MKK7, MKK3/MKK6와 같은 하위 MAPK 카이네이즈 (MAPKKs)를 통하여 최종적으로 JNK, p38과 같은 MAPK를 활성화시키는 단백질이다.
- [0027] 본 발명의 ASK1 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 1로 표현되며, ASK1 단백질 유전자의 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3으로 표현된다.
- [0028] 본 발명에 따른 한 구현예에 따르면, ASK1 단백질은 SMN 단백질과 결합하는 데 (도 1, 도 2 및 도 3 참조), 이때 ASK1 단백질의 SMN 단백질과의 결합은 특히 일정 부위에서 강하게 일어났다 (도 4 참조).
- [0029] ASK1 단백질의 일부 단편 만으로도 SMN 단백질과 결합하므로, 본 발명에 따른 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 및 치료에는 ASK1 단백질의 일부 단편이 이용될 수도 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 ASK1 단백질의 단편은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하며, ASK1 단백질의 단편의 유전자는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열을 갖는 것이 바람직하다.
- [0031] 또한, 본 발명의 ASK1 단백질 과발현 벡터란, ASK1 단백질을 세포 내에서 과발현 (overexpression) 시킬 수 있는 재조합 벡터를 말한다.
- [0032] 상기 벡터는 세포의 형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 위해 당업계에서 사용되는 어떠한 벡터도 사용될 수 있으나, 바람직하게는 재조합된 플라스미드 벡터, 더 바람직하게는, 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열을 가지는 벡터가 좋다.

- [0033] 본 발명에 따른 한 구현예에 따르면, ASK1 단백질은 SMN 단백질과 결합하는 것을 알 수 있다 (도 1, 도 2 및 도 3 참조).
- [0034] 본 발명에 따른 다른 한 구현예에 따르면, SMN 단백질은 ASK1 단백질의 농도의존적으로 세포 내 농도가 유지되었다 (도 5 및 도 9 참조). 즉, ASK1 단백질에 의해서 SMN 단백질의 농도를 조절할 수 있었다. 상기 SMN 단백질의 조절은 mRNA 단계가 아닌 단백질 단계에서 조절되었다 (도 6 및 도 9 참조).
- [0035] 본 발명에 따른 ASK1 단백질이 SMN 단백질의 다유비퀴틴화를 억제하여 SMN 단백질을 안정화 시키기 때문임이 증명되었다 (도 11 및 12 참조).
- [0036] 본 발명에 따른 또 다른 한 구현예에 따르면, ASK1 단백질의 감소는 신경분절 분화에 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다 (도 13, 도 14 및 도 15 참조).
- [0037] 이를 종합해보면, ASK1 단백질은 SMN 단백질의 안정화에 도움을 주므로, 신경분절 분화에 도움을 줄 수 있다는 것을 용이하게 알 수 있다.
- [0038] 특히, ASK1 단백질이 감소할 경우, SMN 양과 함께 신경분절 분화의 지표인 β -Actin의 양도 동반하여 감소하는 것을 볼 때, 본 발명에 따른 약학 조성물은 척수성 근위축증 (SMA) 뿐만 아니라, 파킨슨병 (Parkinson's disease), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease) 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)에 효과적인 것이 명백하다.
- [0039] 본 발명에서 의미하는 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병이란, 세포 내 SMN 단백질의 결핍으로 인하여 발생하는 질환을 의미하며, 바람직하게는, 척수성 근위축증 (SMA), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease) 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 말한다.
- [0040] 본 발명에 따른 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 SMN 단백질의 분해에 관여하는 다유비퀴틴화 (polyubiquitination)를 억제하여 SMN 단백질을 안정화시키므로, 세포 내 SMN 단백질이 감소되지 않도록 하여 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 한 구현예에 따르면, ASK1 단백질이 감소된 세포의 경우, SMN 단백질의 다유비퀴틴화가 진행되었고 (도 11 참조), 이는 ASK1 단백질의 종래 기능으로 알려진 카이네이즈 활성과는 관계가 없었다 (도 12 참조).
- [0042] 또한, 본 발명은,
- [0043] ASK1 단백질에 대한 siRNA (small-interfering RNA) 및 SMN 단백질에 대한 siRNA로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 siRNA를 포함하는 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병의 진단용 키트를 제공한다.
- [0044] 본 발명에 따른 ASK1 단백질에 대한 siRNA는 서열번호 6 또는 서열번호 7의 올리고뉴클레오타이드 서열을 갖는 것이 바람직하고, SMN 단백질에 대한 siRNA는 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 서열을 갖는 것이 바람직하다.
- [0045] 본 발명에 따른 진단용 키트에서 진단할 수 있는 운동성신경세포 사멸에 기인하는 질병이란, 척수성 근위축증 (SMA), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease) 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 의미한다.
- [0046] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 실시예 1-ASK1 단백질과 SMN 단백질의 상호 결합 분석

[0048] 본 발명자들은 ASK1 단백질과 SMN 단백질이 세포 내에서 서로 결합할 수 있는지를 확인하기 위하여 사람 신장 세포주인 293T에 ASK1-Flag과 SMN1-Myc을 형질감염 (transfection) 시켰다. 48시간 뒤에 이 형질감염 된 세포들을 PBS (phosphate-buffered saline) 용액으로 세척한 후, 단백질 분해효소 저해제가 들어 있는 NETN 완충용액 (0.5% Nonidet P-40 (NP-40), 1 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 120 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 µg/ml leupeptine, 2 µg/ml aprotinin, 2 mM Na₃VO₄)을 넣어 세포를 용혈시킨 후, 12,000 g로 4℃에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 침전물을 제거하고 얻은 라이세이트 (lysate)에 항-Flag 항체를 넣어 면역침강 (immunoprecipitation)을 수행하였다. 상기 반응액에 단백질-G 세파로스 (Protein-G sepharose)를 넣어 4℃에서 1시간 동안 혼합하였다. 이로부터 얻은 면역복합체 (immunocomplex)를 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)을 수행하여 항-Myc 항체를 사용하여 웨스턴 블랏 (western blot)을 실시하였다. 그 결과, 세포 내에서 ASK1 단백질과 SMN 단백질이 서로 결합하고 있음을 알 수 있었다 (도 1 참조).

[0049] 본 발명자들은 처음에 사람 HeLa cDNA 라이브러리 (library)를 이용하여 효모 2-혼성 스크리닝 (yeast 2-hybrid screening)을 수행한 결과 ASK1 단백질이 SMN 단백질과 결합한다는 것을 발견하였기 때문에 HeLa 세포에서 세포 수준의 농도로 존재하고 있는 두 단백질간의 결합을 293T 세포에서와 같이 면역침강법을 이용하여 분석하였다. 그 결과 두 단백질이 세포 수준의 농도에서도 상호 결합함을 알 수 있었다 (도 2).

[0050] 이러한 ASK1 단백질과 SMN 단백질의 결합이 ASK1 단백질의 카이네이즈 활성화에 의해 영향을 받는지를 조사하기 위하여 카이네이즈 활성을 가지고 있는 ASK1-Flag과 카이네이즈 활성이 없는 ASK1(K709R)-Flag을 SMN1-Myc과 함께 293T 세포에 형질감염 시킨 후 <도 1>에 기술한 바와 같은 방법으로 면역침강과 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과 ASK1 단백질과 SMN 단백질의 상호 결합에 ASK1 단백질의 카이네이즈 활성이 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다 (도 3 참조). ASK1(K709R) 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 9에 나타내었다.

[0051] 본 발명자들은 ASK1 단백질의 어느 부위에 SMN 단백질이 결합하는지를 조사하기 위하여 ASK1 단백질 결실 돌연변이체 (deletion mutant)를 제작하였다. 구체적으로, ASK1 단백질 N-말단 1번에서 936번 아미노산을 포함하는 ASK1 단백질-ΔC, ASK1 단백질 N-말단 649번부터 C-말단 1375번까지의 아미노산을 포함하는 ASK1 단백질-ΔN, ASK1 단백질 N-말단 1번에서 656번까지의 아미노산을 포함하는 ASK1 단백질-NT를 코딩하는 ASK1 단백질의 염기서열 부위를 PCR로 증폭한 후 pcDNA3-HA 벡터에 삽입하였다. 상기 제작된 ASK1 단백질 단편 (fragment)을 <도 4, 위>에 도식적으로 나타내었다 (도 4, 위).

[0052] HA-ASK1 단백질, HA-ASK1 단백질-ΔC, HA-ASK1 단백질-ΔN, HA-ASK1 단백질-NT와 SMN1-Myc을 293T에 형질감염 시킨 후, 상기 <도 1>에서와 마찬가지로 항-Myc 항체를 이용하여 면역침강을 수행하고, 항-HA 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 실시하였다. 그 결과 ASK1 단백질의 모든 단편과 SMN1이 상호 결합함을 알 수 있었다. 특히, ASK1 단백질의 카이네이즈 활성을 저해하는 것으로 알려진 ASK1 단백질의 N-말단부위가 제거된 HA-ASK1 단백질-ΔN이 ASK1 단백질의 다른 결실 돌연변이체보다 SMN 단백질과 강한 결합을 보였으며, 항-Myc 항체를 이용한 웨스턴 블랏에서 보는 바와 같이 HA-ASK1 단백질-ΔN의 발현만으로도 SMN 단백질의 세포 내 농도를 증가시킬 수 있다는 사실을 알 수 있었다 (도 4, 중간).

[0053] ASK1 단백질과 SMN 단백질이 직접적으로 결합할 수 있는지를 결정하기 위하여 in vitro 결합 (binding) 실험을 수행하였다. HA-ASK1 단백질, HA-ASK1 단백질-ΔC, HA-ASK1 단백질-ΔN, HA-ASK1 단백질-NT를 TNT 레티큘로싸이트 라이세이트 시스템 (TNT reticulocyte lysate system, Promega)과 ³⁵S-메싸이오닌 (³⁵S-methionine)을 이

용하여 in vitro에서 전사 (transcription)와 번역 (translation)이 일어나게하여 ^{35}S -메싸이오닌 (^{35}S -methionine)이 표지된 ASK1 단백질과 ASK1 단백질 결실 돌연변이체를 얻었다 (도 4, 아래-오른쪽). 이 ^{35}S -메싸이오닌 표지된 ASK1 단백질과 ASK1 단백질 단편들을 GST-SMN1과 대조군으로 GST를 완충용액 A (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1% NP-40, 5 mg/ml BSA)에 넣어 4°C에서 1시간동안 반응시켰다. 여기에 글루타치온-아가로스 비드 (glutathione-agarose bead)를 넣어 GST와 GST-SMN1 단백질이 결합하도록 한 후, 완충용액 B (50 mM Hepes (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.1% Tween 20)로 3번 씻어 준 후 GST-SMN1 결합된 ^{35}S -메싸이오닌 (^{35}S -methionine)이 표지된 ASK1 단백질과 ASK1 단백질 결실 돌연변이체를 용출하여 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동 (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)을 수행한 후 BAS 2500 (Fuji)에서 오토레디오그램 (autoradiogram)을 분석하였다. 그 결과 <도 4, 중간>의 면역침강법에서와 마찬가지로 ASK1 단백질의 모든 단편들과 SMN1 단백질이 직접적으로 결합함을 알 수 있었다. 특히, ASK1 단백질 아미노산서열 649번에서 1375번 부위를 포함하는 ASK1 단백질- ΔN 이 SMN과 직접적으로 강하게 결합함을 알 수 있었다 (도 4, 아래).

[0054] 실시예 2-ASK1 단백질이 SMN 단백질의 농도를 증가시키는 효과가 RNA 수준 또는 단백질 수준에서 작용하는 지 여부

[0055] 본 발명자들은 <도 1>의 항-Myc 항체를 사용하여 수행한 웨스턴 블랏에서 보는 바와 같이 ASK1-Flag과 SMN1-Myc을 동시에 발현시켰을 때 SMN1-Myc의 단백질 양이 SMN1-Myc만을 발현한 경우에 비해 현격히 증가하는 현상을 발견하였다.

[0056] 따라서 이러한 ASK1-Flag이 SMN1-Myc의 세포 내 농도를 증가 시키는 효과가 세포 내에서 발현되는 ASK1-Flag 또는 카이네이즈 활성이 없는 ASK1(K709R)-Flag의 농도에 비례하는 지를 결정하기 위하여 293T 세포에 일정량의 SMN1-Myc과 ASK1-Flag 또는 ASK1(K709R)-Flag의 농도를 순차적으로 증가시켜 발현한 경우 ASK1-Flag, ASK1(K709R)-Flag의 농도 증가와 비례하여 SMN1-Myc의 세포 내 농도도 함께 증가함을 알 수 있었다 (도 5 참조).

[0057] ASK1 단백질에 의한 SMN 단백질의 안정화 효과를 검증하기 위하여 ASK1 단백질 mRNA에 특이적으로 결합하여 ASK1 단백질 mRNA를 분해함으로써 세포 내 ASK1 단백질의 농도를 줄이는 ASK1 단백질-siRNA를 제작한 후 대조군 siRNA (control-siRNA)와 병행하여 293T 세포에 형질감염시켰다.

[0058] <도 6>의 라인 (lane) 1 과 2에서 보는 바와 같이 ASK1 단백질-siRNA에 의해 세포 내 ASK1 단백질의 농도가 감소한 경우 SMN 단백질의 양도 함께 감소한다는 사실을 확인 할 수 있었다.

[0059] 그 다음으로, 새로운 단백질의 합성을 억제하는 억제제인 cycloheximide (CHX, 100 μM)를 처리한 후 이미 존재하고 있던 SMN 단백질의 안정성에 ASK1 단백질이 미치는 영향을 조사해 본 결과 <도 6>의 라인 3 과 4에서 보는 바와 같이 ASK1 단백질에 의해 SMN mRNA의 농도는 영향을 받지 않은 반면 (도 6 아래, RT-PCR 결과), ASK1 단백질의 세포 내 농도를 siRNA를 이용하여 감소시킨 경우 (293T/ASK1 단백질-siRNA) SMN 단백질의 안정성이 감소됨을 알 수 있었다 (도 6 위, 웨스턴 블랏 결과 참조).

[0060] ASK1 단백질이 SMN 단백질의 세포 내 농도의 조절에 직접적인 영향을 미친다는 것을 입증하기 위하여 ASK1 단백질-siRNA를 이용하여 세포 내 ASK1 단백질의 양을 인위적으로 줄인 293T 세포 (293T/ASK1 단백질-siRNA)에 ASK1-Flag 또는 ASK1(K709R)-Flag를 형질감염 시켰다. <도 7>의 항-SMN 항체를 이용한 웨스턴 블랏의 결과에서 보는 바와 같이 ASK1 단백질의 도입에 의해 세포 내 SMN 단백질의 양이 증가함을 알 수 있었다 (도 7 참조).

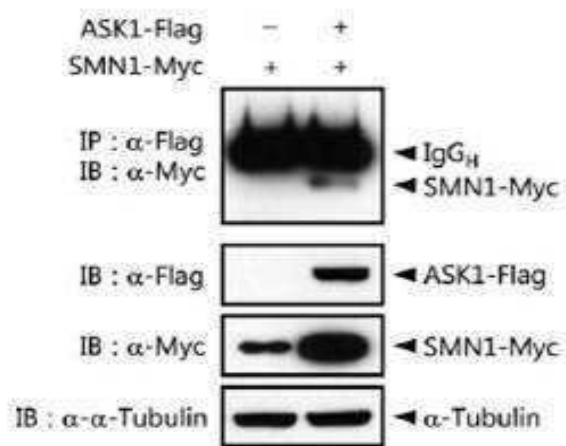
[0061] 이러한 ASK1 단백질이 SMN 단백질을 안정화시키는 효과는 SMN1과 SMN2 (또는 SMN $\Delta 7$ 이라고도 함) 단백질 모두에 있음을 알 수 있었다 (도 8 참조).

- [0062] 실시예 3-ASK1 단백질이 SMN 단백질을 안정화시키는 메커니즘 규명
- [0063] 운동성 신경세포에서 ASK1 단백질의 SMN 단백질 안정화 효과를 조사하기 위하여 쥐의 운동성 신경 세포주인 NSC34 세포에 ASK1 단백질-siRNA를 이용하여 ASK1 단백질의 세포 내 농도를 인위적으로 감소시켰다. 이렇게 제작한 NSC34 세포를 NSC34/ASK1 단백질-siRNA로 명명하고, 대조군 si-RNA로 제작한 경우는 NSC34/Control1-siRNA로 명명하였다.
- [0064] 이 경우 상위에서 기술한 293T 세포에서의 결과와 마찬가지로, ASK1 단백질의 양이 감소함에 따라 SMN 단백질의 양이 또한 감소함을 보였다 (도 9 위, 웨스턴 블랏 결과 참조).
- [0065] 반면, SMN mRNA의 양은 ASK1 단백질의 농도 변화에 영향을 받지 않았다 (도 9 아래, RT-PCR 결과 참조). NSC34/ASK1 단백질-siRNA 세포의 SMN 단백질의 안정성을 cycloheximide (CHX, 100 μ M) 를 1 시간, 2 시간, 4 시간동안 각각 처리한 후, NSC34/Control1-siRNA 세포에 CHX를 처리한 결과와 비교하였다.
- [0066] <도 10>의 아래 항-SMN 항체를 이용한 웨스턴 블랏 결과를 보면 운동성 신경세포 내에서 ASK1 단백질의 세포 내 농도가 감소된 경우 NSC34/Control1-siRNA 세포에 비해 SMN 단백질의 안정성이 현저하게 감소함을 알 수 있었다. 이러한 웨스턴 블랏 상의 단백질 밴드 (band)의 밀도를 정량하여 <도 10>의 위에 나타낸 바와 같이 그래프(graph)로 나타내었다 (도 10 참조).
- [0067] SMN 단백질은 유비퀴틴/프로테아좀 (ubiquitin/proteasome) 경로를 통해 분해되는 것으로 알려져 있다. 프로테아좀을 통해 분해되는 단백질들의 특징중의 하나는 다유비퀴틴화가 진행되는 것이다.
- [0068] 따라서, NSC34/ASK1 단백질-siRNA 세포와 NSC34/Control1-siRNA 세포에서 SMN 단백질의 다유비퀴틴화 정도를 비교해 보았다. 두 세포의 라이세이트 (lysate)를 상기 <실시예 1>에서 기술한 바와 같이 수득한 후, 항-SMN 항체로 면역침강 (immunoprecipitation)을 실시하고 항-ubiquitin (Ub) 항체로 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [0069] 그 결과 세포 내 ASK1 단백질의 양이 감소되어 있는 경우 SMN 단백질의 다유비퀴틴화가 대조군 세포에 비해 현격히 증가되어 있음을 관찰 할 수 있었다 (도 11 참조).
- [0070] 따라서, 운동성 신경세포 내에서 ASK1 단백질은 SMN 단백질의 다유비퀴틴화의 억제, 그 결과 프로테아좀을 통한 SMN 단백질의 분해를 억제함으로써 SMN 단백질을 안정화시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [0071] 이러한 ASK1 단백질의 SMN 단백질에 대한 다유비퀴틴화 억제가 ASK1 단백질의 카이네이즈 활성화에 의해 영향을 받는 지를 조사하기 위하여 293T 세포에 SMN1-Myc, HA-Ub, ASK1-Flag 또는 ASK1(K709R)-Flag을 형질감염시킨 후, SMN1-Myc의 다유비퀴틴화에 ASK1-Flag 또는 ASK1(K709R)-Flag이 미치는 영향을 분석하였다. 인간 ASK(K709R) 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 9와 같았다.
- [0072] SMN1-Myc의 다유비퀴틴화를 관찰하기 위하여 형질감염 된 세포를 용혈시키기 전에 프로테아좀 억제제인 MG132 (10 μ M)를 6시간 동안 처리하였다.
- [0073] 이와 같이 형질감염 된 세포를 PBS로 세척한 후 완충용액 (1% Nonidet P-40 (NP-40), 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, 10 mM NaF, 2 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 2 μ g/ml leupeptin, 2 μ g/ml aprotinin)으로 세포를 용혈시킨 후, 12,000 g로 4°C에서 15분 동안 원심분리하였다.
- [0074] 원심분리 후 침전물을 제거하고 얻은 라이세이트 (lysate)에 항-Myc 항체를 넣어 면역침강 (immunoprecipitation)을 수행 후 항-HA 항체로 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [0075] 그 결과 ASK1 단백질은 그 카이네이즈 활성화에 관계없이 SMN의 다유비퀴틴화를 억제 하였다 (도 12 참조).
- [0076] <실시예 4> 운동성 신경세포에서 ASK1 단백질과 SMN 단백질 감소가 신경분절 분화에 미치는 영향

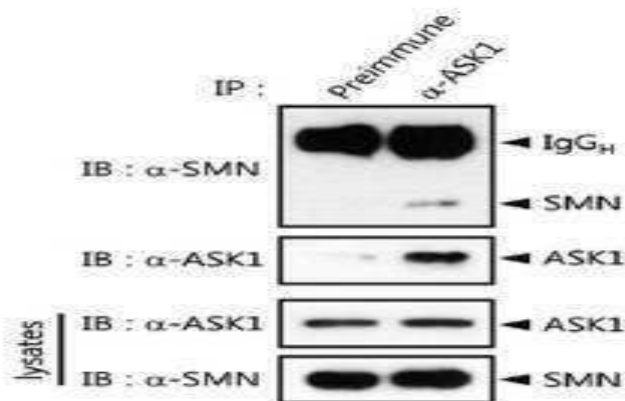
- [0077] 본 발명의 상기 실시예들에서는 첫째로, ASK1 단백질과 SMN 단백질을 동시에 과발현한 경우에 ASK1-Flag이 SMN-Myc의 세포 내 농도를 증가시키는 효과가 있음을 보였고, 둘째로, 사람의 신장세포주 293T와 쥐의 운동성 신경세포주 NSC34에서 ASK1 단백질-siRNA를 이용하여 세포 내 ASK1 단백질의 농도를 인위적으로 감소시켰을 때 세포 내 SMN 단백질의 농도가 ASK1 단백질 농도에 비례해서 감소하는 양상을 보였다. 그렇다면 ASK1-Flag과 ASK1(K709R)-Flag을 과발현시키면 세포 내에 존재하는 SMN 단백질의 양을 증가시킬 수 있는지를 또한 조사하였다.
- [0078] <도 13, A>에서 보는 바와 같이 ASK1-Flag과 ASK1(K709R)-Flag을 과발현시키면 SMN 단백질의 농도가 증가함을 보여 주었다.
- [0079] ASK1 단백질과 SMN 단백질 간의 상호 결합이 운동성 신경세포의 분화에 밀접한 연관성이 있음을 <도 13, B 및 C> 실험을 통하여 입증하였다.
- [0080] NSC34 세포에 ASK1 단백질-siRNA를 형질감염 시킨 것 (NSC34/ASK1 단백질-siRNA) 과 SMN-siRNA를 형질감염 시킨 것 (NSC34/SMN-siRNA)을 대조군 siRNA를 형질감염 시킨 것과 병행하여 분화유도배지 (DMEM/F-12[1:1], 1% FBS, 비필수 아미노산 [nonessential amino acid])에서 신경분절 분화 (neurite outgrowth)를 유도하였다.
- [0081] 여기서 대조군 siRNA를 형질감염 시킨 NSC34/Conroll-siRNA와 NSC34/Conrol2-siRNA는 녹색형광단백질 (green fluorescent protein, GFP)의 일부 서열을 코드하는 이중 나선 올리고뉴클레오타이드 (double-stranded oligonucleotide)를 ASK1 단백질-siRNA가 삽입되어 있는 것과 동일한 벡터인 pSuper retro 벡터 (Oligoengine)와 SMN-siRNA가 삽입되어 있는 것과 동일한 벡터인 pSilencer 4.1-CMV 벡터 (Ambion)에 각각 삽입한 것이다.
- [0082] 분화유도배지는 2일마다 배지를 갈아 주면서 6일 동안 신경분절 분화를 유도하였다. 신경분절 분화의 마커 (marker)로써 β -Actin을 염색하기 위하여, 상기 세포들을 3.7% 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde)로 1시간 동안 고정 한 후, 0.5% Triton X-100으로 5분 동안 세포를 천공 (permeabilization) 시켰다.
- [0083] 3% BSA (bovine serum albumin)로 30 분 동안 블로킹 (blocking) 하고, 로다민-팔로이딘 (rhodamine-phalloidin)으로 β -Actin을 염색한 후 Zeiss Axioplan 2 현미경 (Carl Zeiss Inc.)으로 관찰하였다 (도 13, B 및 C).
- [0084] 신경분절 (Neurite)의 길이를 200 배 배율로 12 군데 이상을 측정하여 Metamorph 이미지 분석 프로그램 (Universal Imaging)을 이용하여 분석하였다. 이 때 신경분절의 길이가 20 μ m 이하인 것은 배제하였다.
- [0085] 상기 운동성 신경세포들의 신경세포 분화 유도 후 신경분절을 가진 세포 (Neurite-bearing cells)와 신경분절의 길이 (neurite length)를 비교 측정하여 <도 14>에 그래프 (graph)로 나타내었다. 뿐만 아니라, 상기 운동성 신경세포들의 신경분절 분화 유도기간인 6일 동안 ASK1 단백질, SMN 단백질, β -Actin 단백질의 변화를 각각 항-ASK1 단백질, 항-SMN, 항-Actin 항체와 GAPDH를 대조군 단백질로 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하여 조사하였다.
- [0086] 그 결과 NSC34/ASK1 단백질-siRNA 와 NSC34/SMN-siRNA 세포에서 β -Actin의 현격한 감소를 보였으며 신경분절의 분화가 대조군에 비해 상당히 손상되었음을 알 수 있었다 (도 15 참조).
- [0087] 상기 실시예를 종합해보면, ASK1 단백질은 SMN 단백질과 결합하는 신규한 기능을 가진 단백질이며, ASK1 단백질이 SMN 단백질과 상호결합을 통하여 그 카이네이즈 활성화에 무관하게 SMN 단백질의 분해에 관여하는 다유비퀴틴화를 억제함으로써 SMN 단백질을 안정화시키는 기능이 있다는 것을 알 수 있다.
- [0088] 또한, ASK1 단백질이 감소할 경우, SMN 단백질의 양과 함께 신경분절 분화의 지표인 β -Actin의 양도 동반하여 감소하는 것을 볼 때, 본 발명에 따른 약학 조성물은 척수성 근위축증 (SMA) 뿐만 아니라, 파킨슨병 (Parkinson's disease), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease) 및 근위축성 측삭 경화증 (ALS)에 효과적인 것임이 명백하다.

도면

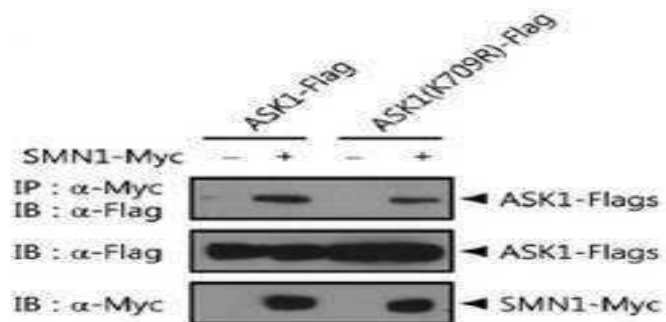
도면1



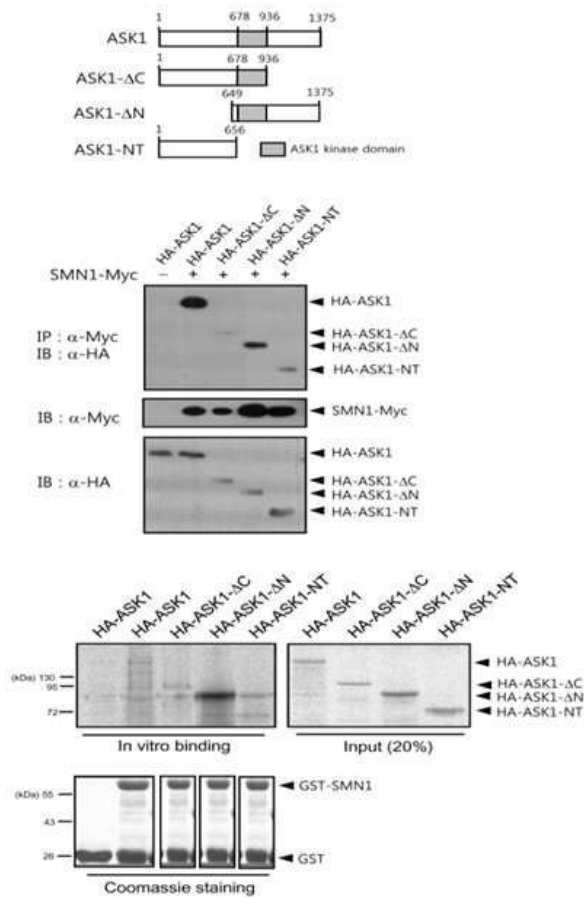
도면2



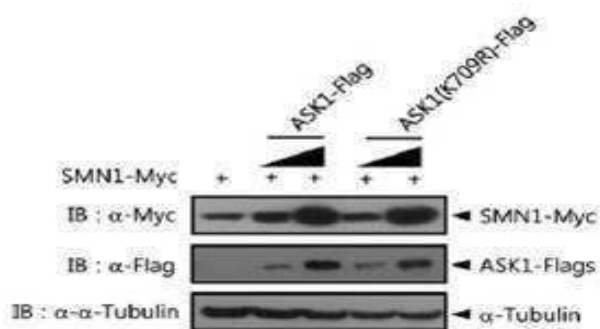
도면3



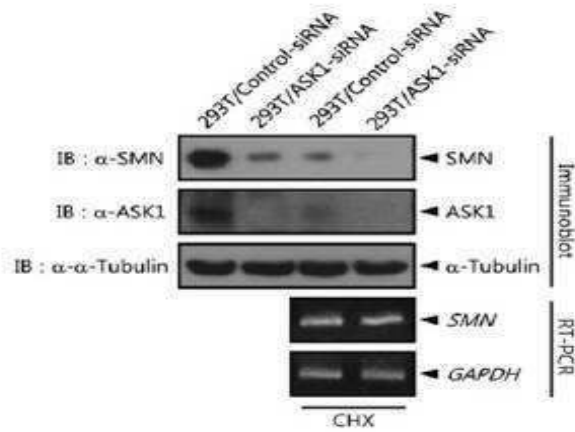
도면4



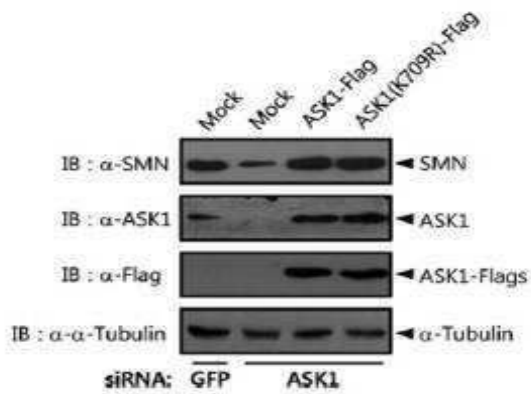
도면5



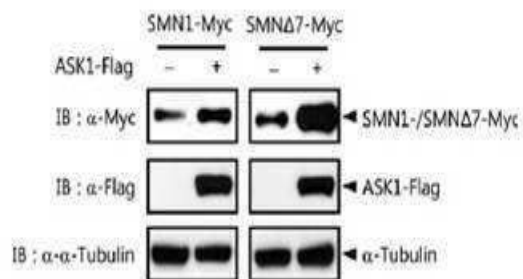
도면6



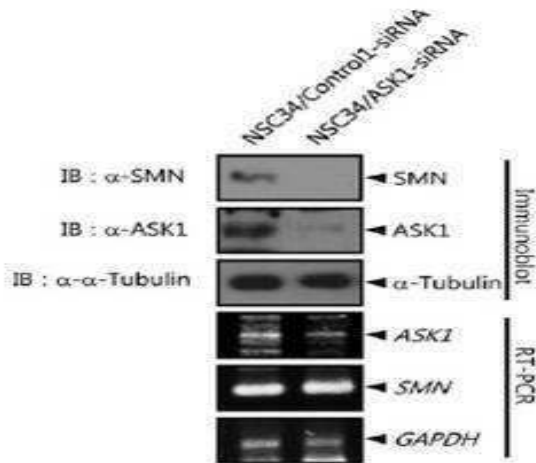
도면7



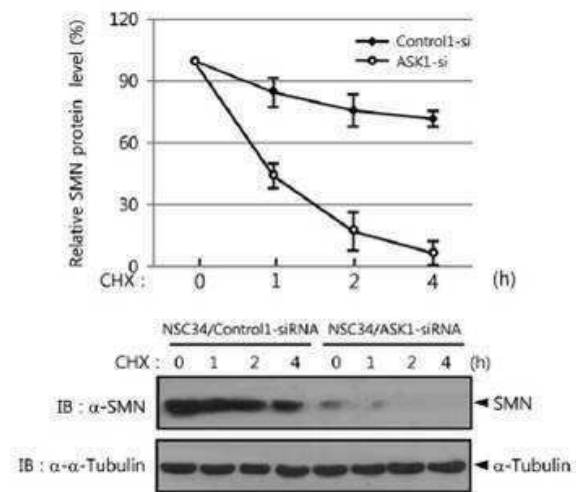
도면8



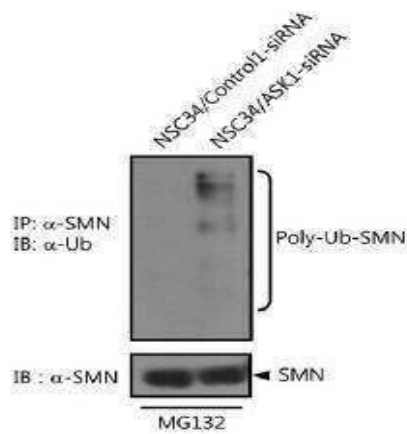
도면9



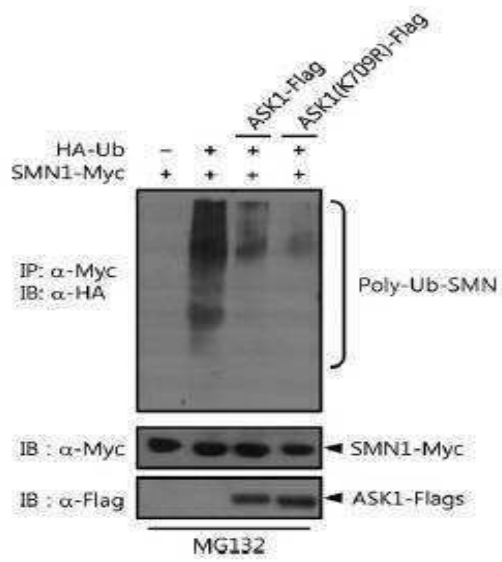
도면10



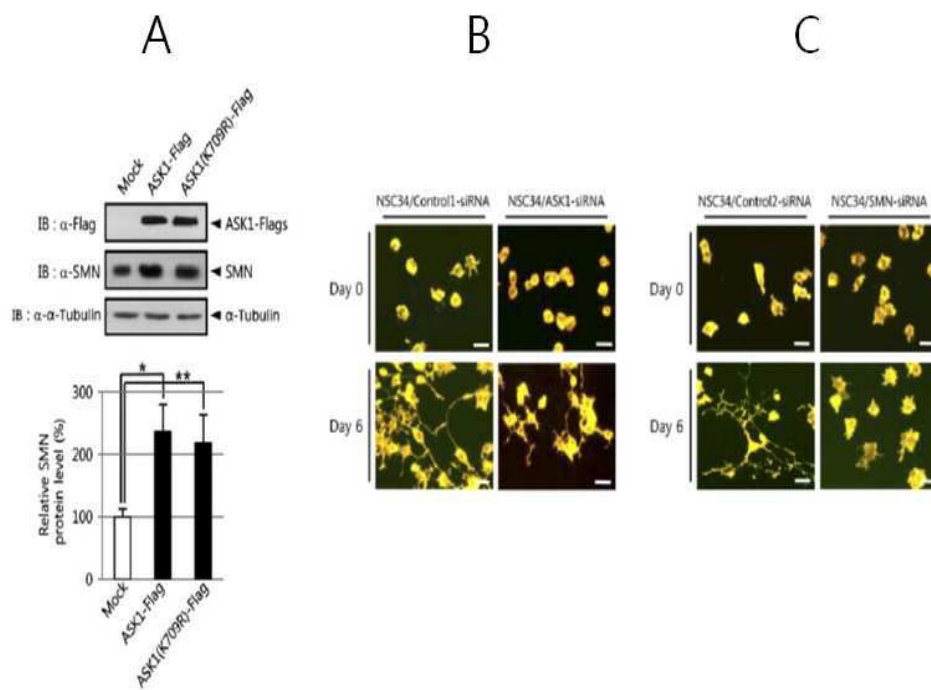
도면11



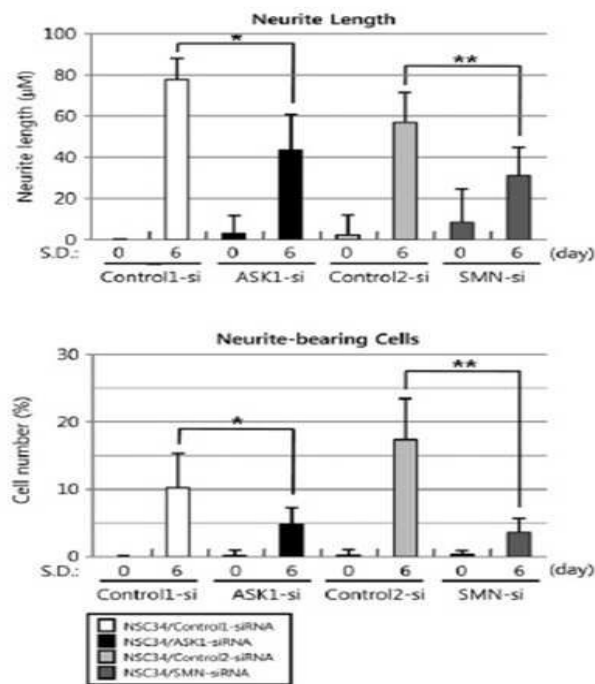
도면12



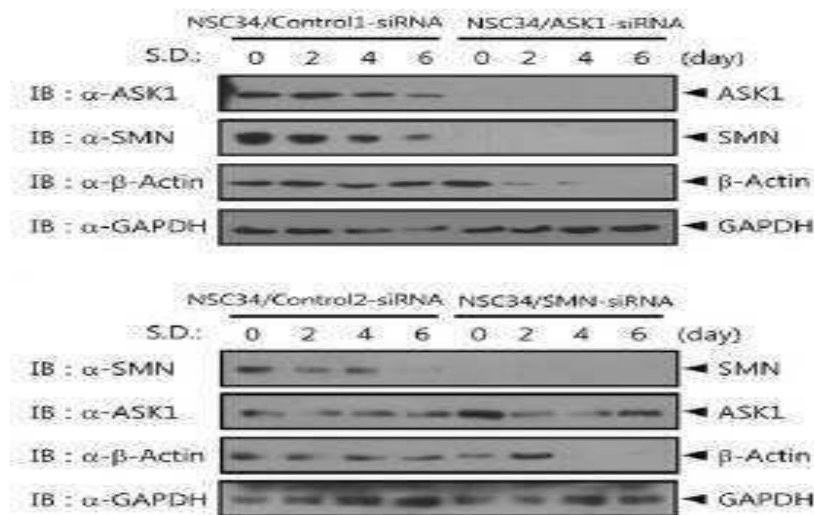
도면13



도면14



도면15



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR PREVENTION OR TREATMENT OF A DISEASE CAUSED BY MOTORNEURONAL CELL DEATH
- <130> DP-2011-0434
- <160> 9

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1374

<212> PRT

<213> human ASK1

<400> 1

Met Ser Thr Glu Ala Asp Glu Gly Ile Thr Phe Ser Val Pro Pro Phe

1 5 10 15

Ala Pro Ser Gly Phe Cys Thr Ile Pro Glu Gly Gly Ile Cys Arg Arg

20 25 30

Gly Gly Ala Ala Ala Val Gly Glu Gly Glu Glu His Gln Leu Pro Pro

35 40 45

Pro Pro Pro Gly Ser Phe Trp Asn Val Glu Ser Ala Ala Ala Pro Gly

50 55 60

Ile Gly Cys Pro Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Arg Gly Arg

65 70 75 80

Gly Ser Ser Val Gly Gly Gly Ser Arg Arg Thr Thr Val Ala Tyr Val

85 90 95

Ile Asn Glu Ala Ser Gln Gly Gln Leu Val Val Ala Glu Ser Glu Ala

100 105 110

Leu Gln Ser Leu Arg Glu Ala Cys Glu Thr Val Gly Ala Thr Leu Glu

115 120 125

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

130 135 140

Arg Phe Tyr Asn Ala Asp Ile Ala Val Val Glu Met Ser Asp Ala Phe

145 150 155 160

Arg Gln Pro Ser Leu Phe Tyr His Leu Gly Val Arg Glu Ser Phe Ser

165 170 175

Met Ala Asn Asn Ile Ile Leu Tyr Cys Asp Thr Asn Ser Asp Ser Leu

180 185 190

Gln Ser Leu Lys Glu Ile Ile Cys Gln Lys Asn Thr Met Cys Thr Gly

195 200 205

Asn Tyr Thr Phe Val Pro Tyr Met Ile Thr Pro His Asn Lys Val Tyr
 210 215 220
 Cys Cys Asp Ser Ser Phe Met Lys Gly Leu Thr Glu Leu Met Gln Pro
 225 230 235 240

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

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

 Val Ala Ser Asp Met Tyr Cys Leu Val Gly Arg Ile Tyr Lys Asp Met
 385 390 395 400
 Phe Leu Asp Ser Asn Phe Thr Asp Thr Glu Ser Arg Asp His Gly Ala
 405 410 415
 Ser Trp Phe Lys Lys Ala Phe Glu Ser Glu Pro Thr Leu Gln Ser Gly
 420 425 430
 Ile Asn Tyr Ala Val Leu Leu Leu Ala Ala Gly His Gln Phe Glu Ser
 435 440 445
 Ser Phe Glu Leu Arg Lys Val Gly Val Lys Leu Ser Ser Leu Leu Gly

450 455 460
 Lys Lys Gly Asn Leu Glu Lys Leu Gln Ser Tyr Trp Glu Val Gly Phe
 465 470 475 480
 Phe Leu Gly Ala Ser Val Leu Ala Asn Asp His Met Arg Val Ile Gln
 485 490 495
 Ala Ser Glu Lys Leu Phe Lys Leu Lys Thr Pro Ala Trp Tyr Leu Lys
 500 505 510
 Ser Ile Val Glu Thr Ile Leu Ile Tyr Lys His Phe Val Lys Leu Thr
 515 520 525

 Thr Glu Gln Pro Val Ala Lys Gln Glu Leu Val Asp Phe Trp Met Asp
 530 535 540
 Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Thr Asp Val Thr Val Val Arg Phe Pro
 545 550 555 560
 Val Leu Ile Leu Glu Pro Thr Lys Ile Tyr Gln Pro Ser Tyr Leu Ser
 565 570 575
 Ile Asn Asn Glu Val Glu Glu Lys Thr Ile Ser Ile Trp His Val Leu
 580 585 590
 Pro Asp Asp Lys Lys Gly Ile His Glu Trp Asn Phe Ser Ala Ser Ser

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

 Tyr Asp Tyr Glu Tyr Asp Glu Asn Gly Asp Arg Val Val Leu Gly Lys
 675 680 685
 Gly Thr Tyr Gly Ile Val Tyr Ala Gly Arg Asp Leu Ser Asn Gln Val
 690 695 700
 Arg Ile Ala Ile Lys Glu Ile Pro Glu Arg Asp Ser Arg Tyr Ser Gln

705 710 715 720
 Pro Leu His Glu Glu Ile Ala Leu His Lys His Leu Lys His Lys Asn
 725 730 735
 Ile Val Gln Tyr Leu Gly Ser Phe Ser Glu Asn Gly Phe Ile Lys Ile

 740 745 750
 Phe Met Glu Gln Val Pro Gly Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Arg Ser
 755 760 765
 Lys Trp Gly Pro Leu Lys Asp Asn Glu Gln Thr Ile Gly Phe Tyr Thr
 770 775 780
 Lys Gln Ile Leu Glu Gly Leu Lys Tyr Leu His Asp Asn Gln Ile Val
 785 790 795 800
 His Arg Asp Ile Lys Gly Asp Asn Val Leu Ile Asn Thr Tyr Ser Gly
 805 810 815

 Val Leu Lys Ile Ser Asp Phe Gly Thr Ser Lys Arg Leu Ala Gly Ile
 820 825 830
 Asn Pro Cys Thr Glu Thr Phe Thr Gly Thr Leu Gln Tyr Met Ala Pro
 835 840 845
 Glu Ile Ile Asp Lys Gly Pro Arg Gly Tyr Gly Lys Ala Ala Asp Ile
 850 855 860
 Trp Ser Leu Gly Cys Thr Ile Ile Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro
 865 870 875 880
 Phe Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Gln Ala Ala Met Phe Lys Val Gly Met

 885 890 895
 Phe Lys Val His Pro Glu Ile Pro Glu Ser Met Ser Ala Glu Ala Lys
 900 905 910
 Ala Phe Ile Leu Lys Cys Phe Glu Pro Asp Pro Asp Lys Arg Ala Cys
 915 920 925
 Ala Asn Asp Leu Leu Val Asp Glu Phe Leu Lys Val Ser Ser Lys Lys
 930 935 940
 Lys Lys Thr Gln Pro Lys Leu Ser Ala Leu Ser Ala Gly Ser Asn Glu
 945 950 955 960

Tyr Leu Arg Ser Ile Ser Leu Pro Val Pro Val Leu Val Glu Asp Thr
 965 970 975
 Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Gly Ser Val Ser Pro Asp Thr Glu Leu Lys
 980 985 990
 Val Asp Pro Phe Ser Phe Lys Thr Arg Ala Lys Ser Cys Gly Glu Arg
 995 1000 1005
 Asp Val Lys Gly Ile Arg Thr Leu Phe Leu Gly Ile Pro Asp Glu Asn
 1010 1015 1020
 Phe Glu Asp His Ser Ala Pro Pro Ser Pro Glu Glu Lys Asp Ser Gly

 1025 1030 1035 1040
 Phe Phe Met Leu Arg Lys Asp Ser Glu Arg Arg Ala Thr Leu His Arg
 1045 1050 1055
 Ile Leu Thr Glu Asp Gln Asp Lys Ile Val Arg Asn Leu Met Glu Ser
 1060 1065 1070
 Leu Ala Gln Gly Ala Glu Glu Pro Lys Leu Lys Trp Glu His Ile Thr
 1075 1080 1085
 Thr Leu Ile Ala Ser Leu Arg Glu Phe Val Arg Ser Thr Asp Arg Lys
 1090 1095 1100

 Ile Ile Ala Thr Thr Leu Ser Lys Leu Lys Leu Glu Leu Asp Phe Asp
 1105 1110 1115 1120
 Ser His Gly Ile Ser Gln Val Gln Val Val Leu Phe Gly Phe Gln Asp
 1125 1130 1135
 Ala Val Asn Lys Val Leu Arg Asn His Asn Ile Lys Pro His Trp Met
 1140 1145 1150
 Phe Ala Leu Asp Ser Ile Ile Arg Lys Ala Val Gln Thr Ala Ile Thr
 1155 1160 1165
 Ile Leu Val Pro Glu Leu Arg Pro His Phe Ser Leu Ala Ser Glu Ser

 1170 1175 1180
 Asp Thr Ala Asp Gln Glu Asp Leu Asp Val Glu Asp Asp His Glu Glu
 1185 1190 1195 1200
 Gln Pro Ser Asn Gln Thr Val Arg Arg Pro Gln Ala Val Ile Glu Asp
 1205 1210 1215

Ala Val Ala Thr Ser Gly Val Ser Thr Leu Ser Ser Thr Val Ser His
1220 1225 1230
Asp Ser Gln Ser Ala His Arg Ser Leu Asn Val Gln Leu Gly Arg Met
1235 1240 1245

Lys Ile Glu Thr Asn Arg Leu Leu Glu Glu Leu Val Arg Lys Glu Lys
1250 1255 1260
Glu Leu Gln Ala Leu Leu His Arg Ala Ile Glu Glu Lys Asp Gln Glu
1265 1270 1275 1280
Ile Lys His Leu Lys Leu Lys Ser Gln Pro Ile Glu Ile Pro Glu Leu
1285 1290 1295
Pro Val Phe His Leu Asn Ser Ser Gly Thr Asn Thr Glu Asp Ser Glu
1300 1305 1310
Leu Thr Asp Trp Leu Arg Val Asn Gly Ala Asp Glu Asp Thr Ile Ser

1315 1320 1325
Arg Phe Leu Ala Glu Asp Tyr Thr Leu Leu Asp Val Leu Tyr Tyr Val
1330 1335 1340
Thr Arg Asp Asp Leu Lys Cys Leu Arg Leu Arg Gly Gly Met Leu Cys
1345 1350 1355 1360
Thr Leu Trp Lys Ala Ile Ile Asp Phe Arg Asn Lys Gln Thr
1365 1370

<210> 2
<211> 726
<212> PRT
<213> human ASK1 fragment
<400> 2

Met Val Asn Thr Ile Thr Glu Glu Lys Gly Arg Ser Thr Glu Glu Gly

1 5 10 15
Asp Cys Glu Ser Asp Leu Leu Glu Tyr Asp Tyr Glu Tyr Asp Glu Asn
20 25 30
Gly Asp Arg Val Val Leu Gly Lys Gly Thr Tyr Gly Ile Val Tyr Ala
35 40 45
Gly Arg Asp Leu Ser Asn Gln Val Arg Ile Ala Ile Lys Glu Ile Pro

50 55 60
 Glu Arg Asp Ser Arg Tyr Ser Gln Pro Leu His Glu Glu Ile Ala Leu
 65 70 75 80

 His Lys His Leu Lys His Lys Asn Ile Val Gln Tyr Leu Gly Ser Phe
 85 90 95
 Ser Glu Asn Gly Phe Ile Lys Ile Phe Met Glu Gln Val Pro Gly Gly
 100 105 110
 Ser Leu Ser Ala Leu Leu Arg Ser Lys Trp Gly Pro Leu Lys Asp Asn
 115 120 125
 Glu Gln Thr Ile Gly Phe Tyr Thr Lys Gln Ile Leu Glu Gly Leu Lys
 130 135 140
 Tyr Leu His Asp Asn Gln Ile Val His Arg Asp Ile Lys Gly Asp Asn

 145 150 155 160
 Val Leu Ile Asn Thr Tyr Ser Gly Val Leu Lys Ile Ser Asp Phe Gly
 165 170 175
 Thr Ser Lys Arg Leu Ala Gly Ile Asn Pro Cys Thr Glu Thr Phe Thr
 180 185 190
 Gly Thr Leu Gln Tyr Met Ala Pro Glu Ile Ile Asp Lys Gly Pro Arg
 195 200 205
 Gly Tyr Gly Lys Ala Ala Asp Ile Trp Ser Leu Gly Cys Thr Ile Ile
 210 215 220

 Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro Phe Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Gln
 225 230 235 240
 Ala Ala Met Phe Lys Val Gly Met Phe Lys Val His Pro Glu Ile Pro
 245 250 255
 Glu Ser Met Ser Ala Glu Ala Lys Ala Phe Ile Leu Lys Cys Phe Glu
 260 265 270
 Pro Asp Pro Asp Lys Arg Ala Cys Ala Asn Asp Leu Leu Val Asp Glu
 275 280 285
 Phe Leu Lys Val Ser Ser Lys Lys Lys Lys Thr Gln Pro Lys Leu Ser

 290 295 300

Ala Leu Ser Ala Gly Ser Asn Glu Tyr Leu Arg Ser Ile Ser Leu Pro
305 310 315 320

Val Pro Val Leu Val Glu Asp Thr Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Gly Ser
325 330 335

Val Ser Pro Asp Thr Glu Leu Lys Val Asp Pro Phe Ser Phe Lys Thr
340 345 350

Arg Ala Lys Ser Cys Gly Glu Arg Asp Val Lys Gly Ile Arg Thr Leu
355 360 365

Phe Leu Gly Ile Pro Asp Glu Asn Phe Glu Asp His Ser Ala Pro Pro
370 375 380

Ser Pro Glu Glu Lys Asp Ser Gly Phe Phe Met Leu Arg Lys Asp Ser
385 390 395 400

Glu Arg Arg Ala Thr Leu His Arg Ile Leu Thr Glu Asp Gln Asp Lys
405 410 415

Ile Val Arg Asn Leu Met Glu Ser Leu Ala Gln Gly Ala Glu Glu Pro
420 425 430

Lys Leu Lys Trp Glu His Ile Thr Thr Leu Ile Ala Ser Leu Arg Glu
435 440 445

Phe Val Arg Ser Thr Asp Arg Lys Ile Ile Ala Thr Thr Leu Ser Lys
450 455 460

Leu Lys Leu Glu Leu Asp Phe Asp Ser His Gly Ile Ser Gln Val Gln
465 470 475 480

Val Val Leu Phe Gly Phe Gln Asp Ala Val Asn Lys Val Leu Arg Asn
485 490 495

His Asn Ile Lys Pro His Trp Met Phe Ala Leu Asp Ser Ile Ile Arg
500 505 510

Lys Ala Val Gln Thr Ala Ile Thr Ile Leu Val Pro Glu Leu Arg Pro
515 520 525

His Phe Ser Leu Ala Ser Glu Ser Asp Thr Ala Asp Gln Glu Asp Leu
530 535 540

Asp Val Glu Asp Asp His Glu Glu Gln Pro Ser Asn Gln Thr Val Arg
545 550 555 560

Arg Pro Gln Ala Val Ile Glu Asp Ala Val Ala Thr Ser Gly Val Ser
565 570 575
Thr Leu Ser Ser Thr Val Ser His Asp Ser Gln Ser Ala His Arg Ser
580 585 590
Leu Asn Val Gln Leu Gly Arg Met Lys Ile Glu Thr Asn Arg Leu Leu
595 600 605
Glu Glu Leu Val Arg Lys Glu Lys Glu Leu Gln Ala Leu Leu His Arg
610 615 620
Ala Ile Glu Glu Lys Asp Gln Glu Ile Lys His Leu Lys Leu Lys Ser
625 630 635 640
Gln Pro Ile Glu Ile Pro Glu Leu Pro Val Phe His Leu Asn Ser Ser
645 650 655
Gly Thr Asn Thr Glu Asp Ser Glu Leu Thr Asp Trp Leu Arg Val Asn
660 665 670
Gly Ala Asp Glu Asp Thr Ile Ser Arg Phe Leu Ala Glu Asp Tyr Thr
675 680 685
Leu Leu Asp Val Leu Tyr Tyr Val Thr Arg Asp Asp Leu Lys Cys Leu
690 695 700
Arg Leu Arg Gly Gly Met Leu Cys Thr Leu Trp Lys Ala Ile Ile Asp
705 710 715 720
Phe Arg Asn Lys Gln Thr

725

<210> 3

<211> 4125

<212> DNA

<213> human ASK1 gene

<400> 3

atgagcacgg aggcggacga gggcatcact ttctctgtgc cacccttcgc cccctcgggc 60
ttctgcacca tccccgaggg cggcatctgc aggaggggag gagcggcggc ggtgggcgag 120
ggcggaggagc accagctgcc accgccgcg ccgggcagct tctggaacgt ggagagcgcc 180
gtgtcccctg gcatcggttg tccggcggcc acctcctcga gcagtgccac ccgaggccgg 240
ggcagctctg ttggcggggg cagccgacgg accacggtgg catatgtgat caacgaagcg 300

agccaagggc aactggtggt ggccgagagc gaggccctgc agagcttgcg ggaggcgtgc	360
gagacagtgg gcgccaccct ggaaaccctg catTTtggga aactcgactt tggagaaacc	420
accgtgctgg accgctTTta caatgcagat attgcggtgg tggagatgag cgatgccttc	480
cggcagccgt ccttgtTTta ccacctggg gtgagagaaa gtttcagcat ggccaacaac	540
atcatcctct actgtgatac taactcggac tctctgcagt cactgaagga aataatttgc	600
cagaagaata ctatgtgcac tgggaactac acctttgttc cttacatgat aactccacat	660
aacaaagtct actgctgtga cagcagcttc atgaaggggt tgacagagct catgcaaccg	720
aacttcgagc tgcttcttgg acccatctgc ttacctcttg tggatcgttt tattcaactt	780
ttgaaggtgg cacaagcaag ttctagccag tacttccggg aatctatact caatgacatc	840
aggaaagctc gtaatttata cactggtaaa gaattggcag ctgagttggc aagaattcgg	900
cagcgagtag ataatatcga agtcttgaca gcagatatg tcataaatct gttactttcc	960
tacagagata tccaggacta tgattctatt gtgaagctgg tagagacttt agaaaaactg	1020
ccaacctttg atttggcctc ccatcaccat gtgaagtTtc attatgcatt tgcactgaat	1080
aggagaaatc tccttggtga cagagcaaaa gctcttgata ttatgattcc catggtgcaa	1140
agcgaaggac aagttgcttc agatatgtat tgcctagtTg gtcgaatcta caaagatatg	1200
TTTTTggact ctaatttcac ggacactgaa agcagagacc atggagcttc ttggttcaaa	1260
aaggcattTg aatctgagcc aacactacag tcaggaatta attatgcggt cctcctcctg	1320
gcagctggac accagttTga atcttctTtt gagctccgga aagttggggT gaagctaagt	1380
agtcttctTg gtaaaaaggg aaacttggaa aaactccaga gctactggga agttggattt	1440
tttctggggg ccagcgtcct agccaatgac cacatgagag tcattcaagc atctgaaaag	1500
ctttttaaac tgaagacacc agcatggtac ctcaagtcta ttgtagagac aatttttaata	1560
tataagcatt ttgtgaaact gaccacagaa cagcctgtgg ccaagcaaga acttgtggac	1620
TTTTggatgg atttctggt cgaggccaca aagacagatg ttactgtggt taggtttcca	1680
gtattaatat tagaaccaac caaaatctat caaccttctt atttgtctat caacaatgaa	1740
gttgaggaaa agacaatctc tatttggcac gtgcttctg atgacaagaa aggtatacat	1800
gagtggaatt ttagtgcctc ttctgtcagg ggagtgaTta tttctaaatt tgaagaaaga	1860
tgctgctTtc tttatgtgct tcacaattct gatgatttcc aaatctattt ctgtacagaa	1920
cttcattgta aaaagtTttt tgagatggtg aacaccatta ccgaagagaa ggggagaagc	1980
acagaggaag gagactgtga aagtgactTg ctggagtatg actatgaata tgatgaaaat	2040

ggtgacagag tcgttttagg aaaaggcact tatgggatag tctacgcagg tcgggacttg	2100
agcaaccaag tcagaattgc tattaaggaa atcccagaga gagacagcag atactctcag	2160
ccctgcatg aagaaatagc attgcataaa cacctgaagc acaaaaatat tgtccagtat	2220
ctgggctctt tcagtggaga tggtttcatt aaaatcttca tggagcaggt ccctggagga	2280
agtctttctg ctctccttcg ttccaaatgg ggtccattaa aagacaatga gcaaacaatt	2340
ggcttttata caaagcaaat actggaagga ttaaaatata tccatgacaa tcagatagtt	2400
caccgggaca taaagggtga caatgtgttg attaatacct acagtgggtg tctcaagatc	2460
tctgacttcg gaacatcaaa gaggtttgct ggcatataacc cctgtactga aacttttact	2520
ggtaccctcc agtatatggc accagaaata atagataaag gaccaagagg ctacggaaaa	2580
gcagcagaca tctggctctt gggctgtaca atcattgaaa tggccacagg aaaaccccc	2640
ttttatgaac tgggagaacc acaagcagct atgttcaagg tgggaatgtt taaagtccac	2700
cctgagatcc cagagtcctat gtctgcagag gccaaaggcat tcatactgaa atgttttgaa	2760
ccagatcctg acaagagagc ctgtgctaac gacttgcttg ttgatgagtt tttaaaagtt	2820
tcaagcaaaa agaaaaagac acaacctaaag ctttcagctc tttcagctgg atcaaatgaa	2880
tatctcagga gtatatcctt gccggtacct gtgctggtgg aggacaccag cagcagcagt	2940
gagtacggct cagtttcacc cgacacggag ttgaaagtgg accccttctc tttcaaaaca	3000
agagccaagt cctgcggaga aagagatgtc aagggaattc ggacactctt tttgggcatt	3060
ccagatgaga attttgaaga tcacagtgtc cctccttccc ctgaagaaaa agattctgga	3120
ttcttcatgc tgaggaagga cagtgcagagg cgagctaccc ttcacaggat cctgacggaa	3180
gaccaagaca aaattgtgag aaacctaatg gaattcttag ctacgggggc tgaagaaccg	3240
aaactaaat gggaacacat cacaacctc attgcaagcc tcagagaatt tgtgagatcc	3300
actgaccgaa aaatcatagc caccacactg tcaaagctga aactggagct ggacttcgac	3360
agccatggca ttagccaagt ccaggtggta ctctttggtt ttcaagatgc tgtcaataaa	3420
gttcttcgga atcataacat caagccgcac tggatgtttg ccttagacag tatcattcgg	3480
aaggcggtag agacagccat taccatcctg gttccagaac taaggccaca tttcagcctt	3540
gcatctgaga gtgatactgc tgatcaagaa gacttgatg tagaagatga ccatgaggaa	3600
cagccttcaa atcaaaactg ccgaagacct caggctgtca ttgaagatgc tgtggctacc	3660
tcaggcgtga gcacgtcag ttctactgtg tctcatgatt ccagagtgc tcaccgtca	3720
ctgaatgtac agcttgaag gatgaaaata gaaaccaata gattactgga agaattggtt	3780
cggaaagaga aagaattaca agcactcctt catcgagcta ttgaagaaaa agaccaagaa	3840
attaaacacc tgaagcttaa gtcccaacct atagaaattc ctgaattgcc tgtatttcat	3900

ctaaattctt ctggcacaaa tactgaagat tctgaactta ccgactggct gagagtgaat 3960
 ggagctgatg aagacactat aagccgggtt ttggctgaag attatacact attggatgtt 4020
 ctctactatg ttacacgtga tgacttaaaa tgcttgagac taaggggagg gatgctgtgc 4080
 aactgtgga aggctatcat tgactttcga aacaaacaga cttga 4125

<210> 4

<211> 2182

<212> DNA

<213> gene of human ASK1 fragment

<400> 4

gatgtggaac accattaccg aagagaaggg gagaagcaca gaggaaggag actgtgaaag 60
 tgacttgctg gagtatgact atgaatatga tgaaaatggg gacagagtgc ttttaggaaa 120
 aggcacttat gggatagtct acgcaggtcg ggacttgagc aaccaagtca gaattgctat 180
 taaggaaatc ccagagagag acagcagata ctctcagccc ctgcatgaag aaatagcatt 240
 gcataaacac ctgaagcaca aaaatattgt ccagtatctg ggctctttca gtgagaatgg 300
 tttcattaaa atcttcatgg agcaggtccc tggaggaagt ctttctgctc tccttcgttc 360

caaatggggg ccattaaaag acaatgagca acaattggc ttttatacaa agcaaatact 420
 ggaaggatta aaatatctcc atgacaatca gatagttcac cgggacataa agggtgacaa 480
 tgtgttgatt aatacctaca gtgggtttct caagatctct gacttcggaa catcaaagag 540
 gcttgctggc ataaaccctt gtactgaaac ttttactggg accctccagt atatggcacc 600
 agaaataata gataaaggac caagaggcta cggaaaagca gcagacatct ggtctctggg 660
 ctgtacaatc attgaaatgg ccacaggaaa accccattt tatgaactgg gagaaccaca 720
 agcagctatg ttcaagggtg gaatgtttta agtccacct gagatccag agtccatgtc 780

tgcagaggcc aaggcattca tactgaaatg ttttgaacca gatcctgaca agagagcctg 840
 tgctaacgac ttgcttggtg atgagttttt aaaagtttca agcaaaaaga aaaagacaca 900
 acctaaagctt tcagctcttt cagctggatc aaatgaatat ctcaggagta tatccttgcc 960
 ggtacctgtg ctgggtggagg acaccagcag cagcagttag tacggctcag tttcacccga 1020
 cacggagtgt aaagtggacc ccttctcttt caaaacaaga gccaagtcct gcggagaaag 1080
 agatgtcaag ggaattcggg cactcttttt gggcattcca gatgagaatt ttgaagatca 1140
 cagtgtcctt ccttcccctg aagaaaaaga tttctggattc ttcatgctga ggaaggacag 1200

tgagaggcga gctacccttc acaggatcct gacggaagac caagacaaaa ttgtgagaaa 1260
 cctaattgaa tctttagctc agggggctga agaaccgaaa ctaaaatggg aacacatcac 1320

aaccctcatt gcaagcctca gagaatttgt gagatccact gaccgaaaaa tcatagccac	1380
cacactgtca aagctgaaac tggagctgga ctctgacagc catggcatta gccaagtcca	1440
ggtggctactc tttggttttc aagatgctgt caataaagtt ctctggaatc ataacatcaa	1500
gccgcactgg atgtttgcct tagacagtat cattcggaag gcggtacaga cagccattac	1560
catcctgggtt ccagaactaa ggccacattt cagccttgca tctgagagtg atactgctga	1620
tcaagaagac ttggatgtag aagatgacca tgaggaacag ccttcaaatc aaactgtccg	1680
aagacctcag gctgtcattg aagatgctgt ggctacctca ggctgagca cgctcagttc	1740
tactgtgtct catgattccc agagtgtca ccggtcactg aatgtacagc ttggaaggat	1800
gaaaatagaa accaatagat tactggaaga attggttcgg aaagagaaag aattacaagc	1860
actccttcat cgagctattg aagaaaaaga ccaagaaatt aaacacctga agcttaagtc	1920
ccaaccata gaaattcctg aattgcctgt atttcatcta aattcttctg gcacaaatac	1980
tgaagattct gaacttaccg actggctgag agtgaatgga gctgatgaag acactataag	2040
ccggtttttg gctgaagatt atacactatt ggatgttctc tactatgtta cacgtgatga	2100
cttaaaatgc ttgagactaa ggggagggat gctgtgcaca ctgtggaagg ctatcattga	2160
ctttcgaaac aaacagactt ga	2182
<210> 5	
<211> 5446	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human ASK1 overexpression vector	
<400> 5	
gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg ctgtgtgttt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata	300
tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggccccgc ttgctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca	600

tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gcttggtaac	900
gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttctgcagat atccatcaca	960
ctggcggccg ctcgagcatg catctagagg gcctattct atagtgtcac ctaaatgcta	1020
gagctcgtg atcagcctcg actgtgcctt ctagtgtcca gccatctgtt gtttgcacct	1080
ccccctgccc ttccctgacc ctggaagggt ccactccac tgtcctttcc taataaaatg	1140
aggaaattgc atcgcatgtg ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc	1200
aggacagcaa gggggaggat tgggaagaca atagcaggca tgctggggat gcggtgggct	1260
ctatggcttc tgaggcggaa agaaccagct ggggctctag ggggtatccc cacgcgccct	1320
gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg	1380
ccagcgccct agcgcgcgt cctttcgctt tcttcccttc cttctcgcc acgttcgcgcg	1440
gctttccccc tcaagctcta aatcggggca tcccttagg gttccgattt agtgccttac	1500
ggcacctcga cccccaaaaa cttgattagg gtgatgttc acgtagtggg ccatcgccct	1560
gatagacggt ttttcgccct ttgacgttgg agtccacgtt ctttaaatgt ggactcttgt	1620
tccaaactgg aacaacactc aacctatct cggctctatc ttttgattta taagggattt	1680
tggggatttc ggcctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt	1740
aattctgtgg aatgtgtgtc agttagggtg tggaaagtcc ccaggctccc caggcaggca	1800
gaagtatgca aagcatgcat ctcaattagt cagcaaccag gtgtggaaag tccccaggct	1860
ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc atagtccgcg	1920
ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgccattct cgcgccatg	1980
gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctctgctct gagctattcc	2040
agaagtagtg aggaggcttt ttggaggcc taggcttttg caaaaagctc ccgggagctt	2100
gtatatccat tttcgatct gatcaagaga caggatgagg atcgtttcgc atgattgaac	2160
aagatggatt gcacgcaggt tctccggccg ctgggtgga gaggtattc ggctatgact	2220
gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt ccggctgtca gcgcaggggc	2280
gcccgttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg caggacgagg	2340
cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg ctgcacgttg	2400
tcactgaagc gggaaggac tggctgctat tgggcgaagt gccggggcag gatctcctgt	2460

catctcacct tgcctctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg cggcggctgc	2520
atacgtttga tccggctacc tgccattcg accaccaagc gaaacatcgc atcgagcgag	2580
cacgtactcg gatggaagcc ggtcttctcg atcaggatga tctggacgaa gagcatcagg	2640
ggctcgcgcc agccgaactg ttgccaggc tcaaggcgcg catgcccgcg ggcgaggatc	2700
tcgtcgtgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat ggccgctttt	2760
ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac atagcgttgg	2820
ctaccctga tattgctgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgcttc ctctgctttt	2880
acggtatcgc cgtctccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt gacgagtctt	2940
tctgagcggg actctggggt tcgaaatgac cgaccaagcg acgccaacc tgccatcacg	3000
agatttcgat tccaccgccg ccttctatga aaggttgggc ttcggaatcg ttttcggga	3060
cgccgctgg atgatectcc agcgcgggga tctcatctg gagttcttcg cccaccccaa	3120
cttgtttatt gcagcttata atggttaca ataaagcaat agcatcaca atttcacaaa	3180
taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgc aaactcatca atgtatctta	3240
tcatgtctgt ataccgtga cctctagcta gagcttggcg taatcatggt catagctgtt	3300
tcctgtgtga aattgttacc cgtcacaa tccacacaac atacgagccg gaagcataaa	3360
gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagttag ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact	3420
gcccgtttc cagtcgggaa acctgtctg ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc	3480
ggggagaggc ggtttgcgta ttggcgctc ttccgcttc tcgtcactg actcgtcgcg	3540
ctcggctgtt cgctgcgcg gagcggatc agctcactca aaggcggtaa tacggttatc	3600
cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag	3660
gaaccgtaaa aaggccgcgt tgcctggcgt tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca	3720
tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagagggt gcgaaacccg acaggactat aaagatacca	3780
ggcgtttccc cctggaagct cctcgtgcg ctctcctgtt ccgaccctgc cgcttaccgg	3840
atacctgtcc gcctttctcc ctccgggaag cgtggcgctt tctcaatgt cacgtgtag	3900
gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt	3960
tcagcccgac cgctgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt gattccaacc cggttaagaca	4020
cgacttatcg ccaactggcag cagccactgg taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg	4080
cggtgtcaca gatttctga agtgggtggc taactacggc tacactagaa ggacagtatt	4140
tggatatcgc gctctgtga agccagttac ctccgaaaa agagtggta gctcttgatc	4200
cggcaaaaa accaccgtg gtagcgggtg ttttttgtt tgcaagcagc agattacgcg	4260

cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct acggggtctg acgctcagtg 4320

gaacgaaaac tcacgttaag ggattttggt catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta 4380

gatcctttta aattaaaaat gaagttttta atcaatctaa agtatatatg agtaaaacttg 4440

gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc tcagcgatct gtctatttcg 4500

ttcatccata gttgcctgac tccccgtcgt gtagataact acgatacggg agggccttacc 4560

atctggcccc agtgcctcaa tgataccgcg agaccacgc tcaccggctc cagatttate 4620

agcaataaac cagccagccg gaagggccga ggcagagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc 4680

ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta agtagttcgc cagttaatat 4740

tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg tcacgctcgt cgtttggtat 4800

ggcttcattc agctccggtt cccaacgac aaggcgagtt acatgatccc ccatgttgtg 4860

caaaaaagcg gttagctcct tgggtcctcc gatcgttgtc agaagtaagt tggccgcagt 4920

gttatcactc atggttatgg cagcactgca taattctctt actgtcatgc catccgtaag 4980

atgcttttct gtgactggtg agtactcaac caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg 5040

accgagtgc tcttgcccgg cgtcaatacg ggataatacc gcgccacata gcagaacttt 5100

aaaagtgcct atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct 5160

gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc tgcaccaaac tgatcttcag catcttttac 5220

tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa aatgccgcaa aaaagggaat 5280

aaggcgaca cgaaatgtt gaatactcat actcttctt tttcaatatt attgaagcat 5340

ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catattgaa tgtatttaga aaaataaaca 5400

aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtccacct gacgtc 5446

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human ASK1 siRNA

<400> 6

gcactccttc atcgagcta 19

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> murine ASK1 siRNA

<400> 7

cctgttgctt tcctacagag a

21

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> murine SMN siRNA

<400> 8

agaaacctgt gtcgtggtt

19

<210> 9

<211> 1374

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> human ASK1(K709R)

<400> 9

Met Ser Thr Glu Ala Asp Glu Gly Ile Thr Phe Ser Val Pro Pro Phe

1 5 10 15

Ala Pro Ser Gly Phe Cys Thr Ile Pro Glu Gly Gly Ile Cys Arg Arg

20 25 30

Gly Gly Ala Ala Ala Val Gly Glu Gly Glu Glu His Gln Leu Pro Pro

35 40 45

Pro Pro Pro Gly Ser Phe Trp Asn Val Glu Ser Ala Ala Ala Pro Gly

50 55 60

Ile Gly Cys Pro Ala Ala Thr Ser Ser Ser Ser Ala Thr Arg Gly Arg

65 70 75 80

Gly Ser Ser Val Gly Gly Gly Ser Arg Arg Thr Thr Val Ala Tyr Val

85 90 95

Ile Asn Glu Ala Ser Gln Gly Gln Leu Val Val Ala Glu Ser Glu Ala

100 105 110

Leu Gln Ser Leu Arg Glu Ala Cys Glu Thr Val Gly Ala Thr Leu Glu

115 120 125

Thr Leu His Phe Gly Lys Leu Asp Phe Gly Glu Thr Thr Val Leu Asp
 130 135 140
 Arg Phe Tyr Asn Ala Asp Ile Ala Val Val Glu Met Ser Asp Ala Phe
 145 150 155 160
 Arg Gln Pro Ser Leu Phe Tyr His Leu Gly Val Arg Glu Ser Phe Ser
 165 170 175
 Met Ala Asn Asn Ile Ile Leu Tyr Cys Asp Thr Asn Ser Asp Ser Leu
 180 185 190
 Gln Ser Leu Lys Glu Ile Ile Cys Gln Lys Asn Thr Met Cys Thr Gly
 195 200 205
 Asn Tyr Thr Phe Val Pro Tyr Met Ile Thr Pro His Asn Lys Val Tyr
 210 215 220
 Cys Cys Asp Ser Ser Phe Met Lys Gly Leu Thr Glu Leu Met Gln Pro
 225 230 235 240
 Asn Phe Glu Leu Leu Leu Gly Pro Ile Cys Leu Pro Leu Val Asp Arg
 245 250 255
 Phe Ile Gln Leu Leu Lys Val Ala Gln Ala Ser Ser Ser Gln Tyr Phe
 260 265 270
 Arg Glu Ser Ile Leu Asn Asp Ile Arg Lys Ala Arg Asn Leu Tyr Thr
 275 280 285
 Gly Lys Glu Leu Ala Ala Glu Leu Ala Arg Ile Arg Gln Arg Val Asp
 290 295 300
 Asn Ile Glu Val Leu Thr Ala Asp Ile Val Ile Asn Leu Leu Leu Ser
 305 310 315 320
 Tyr Arg Asp Ile Gln Asp Tyr Asp Ser Ile Val Lys Leu Val Glu Thr
 325 330 335
 Leu Glu Lys Leu Pro Thr Phe Asp Leu Ala Ser His His His Val Lys
 340 345 350
 Phe His Tyr Ala Phe Ala Leu Asn Arg Arg Asn Leu Pro Gly Asp Arg
 355 360 365
 Ala Lys Ala Leu Asp Ile Met Ile Pro Met Val Gln Ser Glu Gly Gln
 370 375 380

Val Ala Ser Asp Met Tyr Cys Leu Val Gly Arg Ile Tyr Lys Asp Met
 385 390 395 400
 Phe Leu Asp Ser Asn Phe Thr Asp Thr Glu Ser Arg Asp His Gly Ala
 405 410 415

Ser Trp Phe Lys Lys Ala Phe Glu Ser Glu Pro Thr Leu Gln Ser Gly
 420 425 430
 Ile Asn Tyr Ala Val Leu Leu Leu Ala Ala Gly His Gln Phe Glu Ser
 435 440 445
 Ser Phe Glu Leu Arg Lys Val Gly Val Lys Leu Ser Ser Leu Leu Gly
 450 455 460
 Lys Lys Gly Asn Leu Glu Lys Leu Gln Ser Tyr Trp Glu Val Gly Phe
 465 470 475 480
 Phe Leu Gly Ala Ser Val Leu Ala Asn Asp His Met Arg Val Ile Gln
 485 490 495
 Ala Ser Glu Lys Leu Phe Lys Leu Lys Thr Pro Ala Trp Tyr Leu Lys
 500 505 510
 Ser Ile Val Glu Thr Ile Leu Ile Tyr Lys His Phe Val Lys Leu Thr
 515 520 525
 Thr Glu Gln Pro Val Ala Lys Gln Glu Leu Val Asp Phe Trp Met Asp
 530 535 540
 Phe Leu Val Glu Ala Thr Lys Thr Asp Val Thr Val Val Arg Phe Pro
 545 550 555 560

Val Leu Ile Leu Glu Pro Thr Lys Ile Tyr Gln Pro Ser Tyr Leu Ser
 565 570 575
 Ile Asn Asn Glu Val Glu Glu Lys Thr Ile Ser Ile Trp His Val Leu
 580 585 590
 Pro Asp Asp Lys Lys Gly Ile His Glu Trp Asn Phe Ser Ala Ser Ser
 595 600 605
 Val Arg Gly Val Ser Ile Ser Lys Phe Glu Glu Arg Cys Cys Phe Leu
 610 615 620
 Tyr Val Leu His Asn Ser Asp Asp Phe Gln Ile Tyr Phe Cys Thr Glu

625 630 635 640
 Leu His Cys Lys Lys Phe Phe Glu Met Val Asn Thr Ile Thr Glu Glu
 645 650 655
 Lys Gly Arg Ser Thr Glu Glu Gly Asp Cys Glu Ser Asp Leu Leu Glu
 660 665 670
 Tyr Asp Tyr Glu Tyr Asp Glu Asn Gly Asp Arg Val Val Leu Gly Lys
 675 680 685
 Gly Thr Tyr Gly Ile Val Tyr Ala Gly Arg Asp Leu Ser Asn Gln Val
 690 695 700

 Arg Ile Ala Ile Arg Glu Ile Pro Glu Arg Asp Ser Arg Tyr Ser Gln
 705 710 715 720
 Pro Leu His Glu Glu Ile Ala Leu His Lys His Leu Lys His Lys Asn
 725 730 735
 Ile Val Gln Tyr Leu Gly Ser Phe Ser Glu Asn Gly Phe Ile Lys Ile
 740 745 750
 Phe Met Glu Gln Val Pro Gly Gly Ser Leu Ser Ala Leu Leu Arg Ser
 755 760 765
 Lys Trp Gly Pro Leu Lys Asp Asn Glu Gln Thr Ile Gly Phe Tyr Thr

 770 775 780
 Lys Gln Ile Leu Glu Gly Leu Lys Tyr Leu His Asp Asn Gln Ile Val
 785 790 795 800
 His Arg Asp Ile Lys Gly Asp Asn Val Leu Ile Asn Thr Tyr Ser Gly
 805 810 815
 Val Leu Lys Ile Ser Asp Phe Gly Thr Ser Lys Arg Leu Ala Gly Ile
 820 825 830
 Asn Pro Cys Thr Glu Thr Phe Thr Gly Thr Leu Gln Tyr Met Ala Pro
 835 840 845

 Glu Ile Ile Asp Lys Gly Pro Arg Gly Tyr Gly Lys Ala Ala Asp Ile
 850 855 860
 Trp Ser Leu Gly Cys Thr Ile Ile Glu Met Ala Thr Gly Lys Pro Pro
 865 870 875 880
 Phe Tyr Glu Leu Gly Glu Pro Gln Ala Ala Met Phe Lys Val Gly Met

885 890 895
 Phe Lys Val His Pro Glu Ile Pro Glu Ser Met Ser Ala Glu Ala Lys
 900 905 910
 Ala Phe Ile Leu Lys Cys Phe Glu Pro Asp Pro Asp Lys Arg Ala Cys

 915 920 925
 Ala Asn Asp Leu Leu Val Asp Glu Phe Leu Lys Val Ser Ser Lys Lys
 930 935 940
 Lys Lys Thr Gln Pro Lys Leu Ser Ala Leu Ser Ala Gly Ser Asn Glu
 945 950 955 960
 Tyr Leu Arg Ser Ile Ser Leu Pro Val Pro Val Leu Val Glu Asp Thr
 965 970 975
 Ser Ser Ser Ser Glu Tyr Gly Ser Val Ser Pro Asp Thr Glu Leu Lys
 980 985 990

 Val Asp Pro Phe Ser Phe Lys Thr Arg Ala Lys Ser Cys Gly Glu Arg
 995 1000 1005
 Asp Val Lys Gly Ile Arg Thr Leu Phe Leu Gly Ile Pro Asp Glu Asn
 1010 1015 1020
 Phe Glu Asp His Ser Ala Pro Pro Ser Pro Glu Glu Lys Asp Ser Gly
 1025 1030 1035 1040
 Phe Phe Met Leu Arg Lys Asp Ser Glu Arg Arg Ala Thr Leu His Arg
 1045 1050 1055
 Ile Leu Thr Glu Asp Gln Asp Lys Ile Val Arg Asn Leu Met Glu Ser

 1060 1065 1070
 Leu Ala Gln Gly Ala Glu Glu Pro Lys Leu Lys Trp Glu His Ile Thr
 1075 1080 1085
 Thr Leu Ile Ala Ser Leu Arg Glu Phe Val Arg Ser Thr Asp Arg Lys
 1090 1095 1100
 Ile Ile Ala Thr Thr Leu Ser Lys Leu Lys Leu Glu Leu Asp Phe Asp
 1105 1110 1115 1120
 Ser His Gly Ile Ser Gln Val Gln Val Val Leu Phe Gly Phe Gln Asp
 1125 1130 1135

Ala Val Asn Lys Val Leu Arg Asn His Asn Ile Lys Pro His Trp Met
1140 1145 1150

Phe Ala Leu Asp Ser Ile Ile Arg Lys Ala Val Gln Thr Ala Ile Thr
1155 1160 1165

Ile Leu Val Pro Glu Leu Arg Pro His Phe Ser Leu Ala Ser Glu Ser
1170 1175 1180

Asp Thr Ala Asp Gln Glu Asp Leu Asp Val Glu Asp Asp His Glu Glu
1185 1190 1195 1200

Gln Pro Ser Asn Gln Thr Val Arg Arg Pro Gln Ala Val Ile Glu Asp
1205 1210 1215

Ala Val Ala Thr Ser Gly Val Ser Thr Leu Ser Ser Thr Val Ser His
1220 1225 1230

Asp Ser Gln Ser Ala His Arg Ser Leu Asn Val Gln Leu Gly Arg Met
1235 1240 1245

Lys Ile Glu Thr Asn Arg Leu Leu Glu Glu Leu Val Arg Lys Glu Lys
1250 1255 1260

Glu Leu Gln Ala Leu Leu His Arg Ala Ile Glu Glu Lys Asp Gln Glu
1265 1270 1275 1280

Ile Lys His Leu Lys Leu Lys Ser Gln Pro Ile Glu Ile Pro Glu Leu
1285 1290 1295

Pro Val Phe His Leu Asn Ser Ser Gly Thr Asn Thr Glu Asp Ser Glu
1300 1305 1310

Leu Thr Asp Trp Leu Arg Val Asn Gly Ala Asp Glu Asp Thr Ile Ser
1315 1320 1325

Arg Phe Leu Ala Glu Asp Tyr Thr Leu Leu Asp Val Leu Tyr Tyr Val
1330 1335 1340

Thr Arg Asp Asp Leu Lys Cys Leu Arg Leu Arg Gly Gly Met Leu Cys
1345 1350 1355 1360

Thr Leu Trp Lys Ala Ile Ile Asp Phe Arg Asn Lys Gln Thr
1365 1370