

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0090341 (43) 공개일자 2010년08월16일
(51) Int. Cl. <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>C07H 21/02</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0009547 (22) 출원일자 2009년02월06일 심사청구일자 2010년06월17일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내 (72) 발명자 김준 서울특별시 강남구 대치1동 888 아이파크 106-901 김태성 서울특별시 성동구 행당2동 대림아파트 122-707 (뒷면에 계속) (74) 대리인 이덕록	

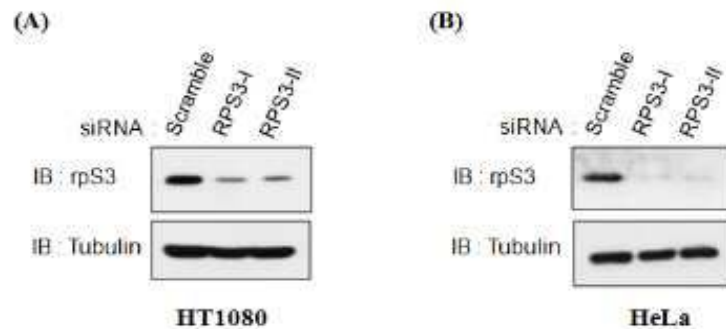
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 세포 내 r p S3 발현 억제 s i R N A

(57) 요약

본 발명은 세포 내에 존재하는 리보솜 단백질의 발현을 특이적으로 억제하는 짧은 간섭(small interference RNA; siRNA)에 관한 것으로, 본 발명에 따른 siRNA는 세포내 존재하는 rpS3의 발현을 특이적으로 감소시키며, 종래 상업화된 상품에 비해 경제적 및 효율적 측면에서 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김학동

경기도 수원시 장안구 영화동 124-78

주유진

서울특별시 광진구 구의동 631-1 프라임아파트
3-801

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 FPR08-B1-230

부처명 교육과학기술부

연구사업명 프로테오믹스 연구개발사업

연구과제명 캔디다증 발병 관련 표적 단백질 발굴 연구

주관기관 고려대학교

연구기간 2008년 4월 1일 ~ 2009년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

세포내 존재하는 rpS3의 발현을 특이적으로 감소시킬 수 있는 서열번호 1의 siRNA.

청구항 2

세포내 존재하는 rpS3의 발현을 특이적으로 감소시킬 수 있는 서열번호 2 siRNA.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 내에 존재하는 리보솜 단백질의 발현을 특이적으로 억제하는 짧은 간섭(small interference RNA; siRNA)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세포 내에는 단백질 합성의 중요한 기능을 하는 리보솜이 존재한다. 이러한 리보솜은 많은 리보솜단백질들과 리보솜 RNA (ribosomal RNA)의 결합으로 만들어지는 거대한 복합체이다.

[0003] 본 발명에서는 실험을 통해 약 80가지의 리보솜 단백질 중에서 리보솜 단백질(ribosomal protein S3; rpS3)라는 40S small subunit의 한 구성요소에 대한 small interference RNA (siRNA)를 제작하여 세포내 존재하는 rpS3의 발현을 특이적으로 감소시킬 수 있는 시스템을 확립하고, 또한, 이렇게 제작된 본 발명의 rpS3에 대한 siRNA와 이미 상업화되어 있는 상품과의 비교를 통해 본 발명의 siRNA가 경제적인 면에서 또는 효율적 측면에서 어떠한 차이가 있는지를 비교/분석하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0004] 따라서 본 발명의 목적은 세포내 존재하는 rpS3의 발현을 특이적으로 감소시킬 수 있는 siRNA를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0005] 상기와 같은 본 발명의 목적은 siRNA를 제작하여 이를 통해 세포내 존재하는 rpS3의 발현을 특이적으로 감소시킬 수 있음을 확인하고, 이를 종래 상업화된 상품과 비교하여 본 발명의 siRNA가 경제적 및 효율적 측면에서 우수함을 확인함으로써 달성되었다.

[0006] 본 발명은 세포내 존재하는 rpS3의 발현을 특이적으로 감소시킬 수 있는 서열번호 1의 siRNA를 제공한다.

[0007] 또한 본 발명은 세포내 존재하는 rpS3의 발현을 특이적으로 감소시킬 수 있는 서열번호 2의 siRNA를 제공한다.

효과

[0008] 상기와 같은 본 발명에 따른 siRNA는 세포내 존재하는 rpS3의 발현을 특이적으로 감소시키며, 종래 상업화된 상품에 비해 경제적 및 효율적 측면에서 우수한 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0009] 이하에서 실시예 및 시험예를 통해 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0010] 실시예 1 : siRNA에 대한 target sequence 탐구

[0011] 우선, siRNA의 target 부위를 찾기 위해서 rpS3 DNA sequence를 target sequence를 찾아주는 프로그램에 대입하여 결과들을 비교/분석하였다 (Ambion, Promega, OligoEngine, dharmacon). Target으로 했을 경우에 높은 효과를 얻을 수 있는 예상 sequence중에서 각 프로그램에서 공통적으로 제시된 부분을 이용하여 siRNA target sequence로 결정하였다. 결정된 sequence의 siRNA는 국내의 Bioneer를 통해서 합성하였다. control siRNA는 AccuTarget™ Negative control siRNA를 이용하였다.

[0012] 세포내 rpS3 단백질의 발현을 조절하기 위해 실험방법에서 밝힌방법을 통해서 target sequence를 결정하였다. siRPS3-I은 rpS3 mRNA의 205~223 부분을 target으로 하며, siRPS3-II는 rpS3 mRNA의 637~655 부분을 target으로 하도록 합성하였다. <표 1>

[0013] RpS3에 대한 siRNA의 염기서열 및 길이 비교

siRNA oligo	siRNA sequence		Sequence 길이
siRPS3-I	CUG ACU GCU GUA GUU CAG A	서열번호 1	19 Mer
siRPS3-II	CCC AAA GAU GAG AUA CUG C	서열번호 2	19 Mer
I 사	GGG CAG UGU AGA GCU UUA UGC UGA A	서열번호 3	25 Mer

[0015]

[0016] 실시예 2 : siRNA를 통한 세포내 rpS3 발현량 조절확인

[0017] 제작된 rpS3의 siRNA가 세포내로 침투되었을 경우에 효율적으로 작동하는지를 알기 위해서, HT1080 cell을 이용하여 실험하였다. 각 siRNA(200pmole)를 Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) 4μl를 이용하여 reverse transfection방법을 통해 세포내로 침투시켜 주었다. 이때 HT1080 세포의 수는 60mm dish에 약 20,000개의 세포가 들어가도록 하였다. transfection하고 48시간이 지난 후에 cell을 harvest하여 실제 세포내 존재하는 rpS3 단백질의 양을 Western blotting을 통해 확인해 보았다.

[0018] 도 1에서 보는 것과 같이, mammalian 세포인 HT1080과 HeLa에 siRPS3와 실험상에서 대조군으로 쓰이는 scramble siRNA를 각각 침투시켜 보았다. 그림에서 보는 것과 같이, 대조군으로 사용된 scramble siRNA는 세포내 rpS3단백질의 양적인 변화를 보이지 못한 반면에, 본 실험실에서 제작한 두 개의 siRNA는 HT1080과 HeLa 모두에서 대략 70~80% 정도의 양적 감소가 일어났음을 western blot 결과를 통해 확인 할 수 있었다.

[0019] 실시예 3 : 이미 상업화 되어있는 siRNA와의 비교

[0020] 여러 회사들에 의해서 많은 단백질들에 대한 siRNA가 판매되고 있다. 본 연구진에서 제작한 siRNA가 상업화되어 있는 다른 siRNA와 효율적인 면에서 어떠한 차이가 있는지를 알기 위해서 HT1080 세포에 동일한 양(200pmole)의 siRPS3 oligo를 침투시켜 그 효율을 비교 확인해 보았다.

[0021] 도 2에서 볼 수 있는 것처럼 rpS3단백질에 대한 knock down효율은 큰 차이가 없었다. 하지만, 상기 표 1에 정리해 놓은 것을 보면, siRNA의 길이가 차이가 나는 것을 알 수 있다. I사에서 판매하는 siRNA는 25mer인데 비해서, 본 연구진에서 제작한 siRNA는 19mer로 6mer의 차이가 난다. Oligo를 제작하는데 있어서 길이가 길어지면, 그만큼 제작하는데 드는 비용도 증가하게 된다.

[0022] 따라서 동일한 효율을 보이는 경우, siRNA의 길이가 짧으면 그 짧은 만큼의 경제적인 이득을 얻을 수 있음을 의미한다. 그러므로, I사의 siRNA와 본 연구진의 siRNA는 세포내에서 rpS3단백질의 감소를 일으키는 정도는 비슷하지만, 경제적인 측면까지 생각할 경우 6mer의 길이가 짧은 siRNA가 더 큰 장점을 가지고 있다 할 수 있다.

[0023] 실시예 4 : 안정적인 siRNA-resistant rpS3를 발현하는 세포의 구축

[0024] siRNA에 의해서 공격받지 못하는 rpS3 construct를 발현하는 세포를 HT1080에 만들기 위해서 DNA상의 sequence는 변하지만, 단백질을 구성하는 아미노산에는 변화가 없는 wobble sequence를 이용하였다. siRNA가 target으로 하는 부위에 1~2개의 핵산을 다른 것으로 치환시켜줌으로서 정상의 rpS3단백질을 발현하지만, siRNA에 의해서는 영향을 받지 않는 construct가 되겠다. 이러한 DNA를 세포에 침투시킨뒤, DNA가 들어간 세포만을 selection 하기 위해 G418(800 µg/ml)을 처리하여 single cell을 얻게 되는데, 이렇게 얻어진 세포는 특정 단백질을 안정적으로 발현하는 특징을 갖게 되기 때문에 “stable cell” 이라고 말한다. 이 세포의 특징 및 construct의 발현 정도를 알기 위해서 scramble 또는 rpS3-II siRNA를 처리해 보았다. 본 연구진은 siRPS3-II의 target 부분을 변형시켜주었기 때문에 siRPS3-II를 가지고 실험을 수행하였다.

[0025] 도 3에서 보는 것과 같이, siRNA를 처리한 결과는 이전과 마찬가지로 scramble에 의해서는 아무 영향 없었으며, siRPS3-II에 의해서는 endogenous rpS3(Endo-rpS3)의 존재량이 감소되었다. 특이한 것은 siRPS3-II에 의해서 endogenous rpS3가 줄게 되면, FLAG이 tagging된 rpS3(FLAG-rpS3)의 양이 증가되는 현상을 볼 수 있었다. 이는 안정되게 발현되는 FLAG-rpS3도 endogenous rpS3와 함께 양적인 조절을 받고 있음을 말해주는 것이다. 이러한 방법은 rpS3단백질 이외에도 모든 단백질에 널리 쓰일 수 있는 것으로, siRNA를 이용하여 얻은 결과를 이러한 실험적 방법을 통해 다시 한 번 확인할 수 있기 때문에, siRNA를 이용한 실험에서 가장 문제가 되는 off-target effect를 제거할 수 있는 실험방법이다.

도면의 간단한 설명

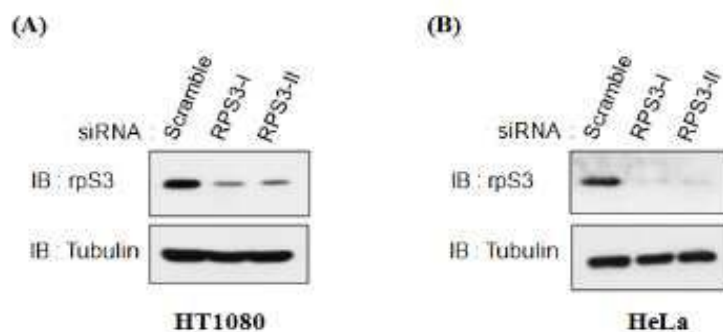
[0026] 도 1은 세포내 침투된 RpS3 siRNA의 efficiency 확인 실험 결과를 나타낸 도이다.

[0027] 도 2는 RpS3 siRNA의 efficiency 비교 결과를 나타낸 도이다.

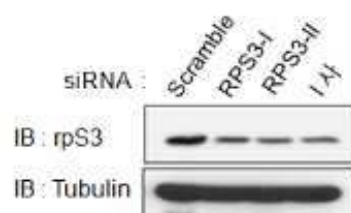
[0028] 도 3은 siRNA에 의해 영향받지 않는 rpS3를 발현하는 stable cell 확인 결과를 나타낸 도이다.

도면

도면1



도면2



도면3

