



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0172647
(43) 공개일자 2023년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) *C07K 16/18* (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12Q 1/6886 (2018.01) *G01N 33/574* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-0072622

(22) 출원일자 2022년06월15일

심사청구일자 2022년06월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

고제상

서울특별시 영등포구 여의동로3길 10, 101동 2401호(여의도동, 여의도자이)

김수현

전라북도 정읍시 신태인읍 상삼길 17

(74) 대리인

특허법인다나

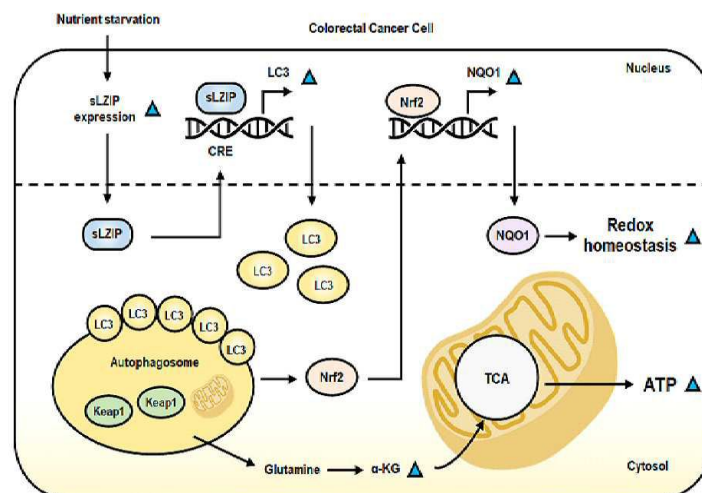
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 암의 진단 또는 치료를 위한 작은 류신 지퍼 단백질의 용도

(57) 요약

본 발명은 대장암의 진단 또는 치료를 위한 류신 지퍼 단백질의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 류신 지퍼 단백질 (Leucine-zipper protein)이 암세포의 자가포식 기전 및 대사 프로그래밍을 조절함으로써, 대장암세포의 대사에 중요한 역할을 함을 확인할 수 있었으나, 상기 본 발명의 단백질 또는 이의 단편은 대장암의 진단, 개선 또는 치료를 위한 표적으로 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

C07K 14/47 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C12N 15/102 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12Q 1/6886 (2022.01)

G01N 33/57419 (2013.01)

C12N 2310/11 (2013.01)

C12N 2310/14 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

작은 류신 지퍼 단백질 (small leucine-zipper protein)의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 포함하는 대장암 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자의 발현 억제제는 작은 류신 지퍼 단백질을 암호화하는 유전자에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA: shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA: siRNA) 및 유전자 가위로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 대장암 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 단백질의 활성 억제제는 작은 류신 지퍼 단백질에 특이적으로 결합하는 펩티드, 펩티드 미메틱스, 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 대장암 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 작은 류신 지퍼 단백질 (small leucine-zipper protein)은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인 대장암 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 영양 결핍 상태에서 대장암 세포의 자가 포식을 억제하는 것을 특징으로 하는, 대장암 개선 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

작은 류신 지퍼 단백질(small leucine-zipper protein)의 활성 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 프로브를 포함하는, 대장암 진단용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 프로브는, 상기 작은 류신 지퍼 단백질과 특이적으로 결합하는 항체; 또는 상기 작은 류신 지퍼 단백질을 코딩하는 유전자와 상보적으로 결합하는 핵산 프로브 또는 프라이머인, 대장암 진단용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 작은 류신 지퍼 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인 대장암 진단용 조

성물.

청구항 9

개체로부터 분리된 세포 또는 조직에 후보물질을 처리하고 상기 세포 또는 조직에서 작은 류신 지퍼 단백질의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하며,

상기 후보물질이 작은 류신 지퍼 단백질의 발현을 하향조절할 때 대장암 개선 또는 치료용 의약으로 판별하는, 대장암 개선 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 작은 류신 지퍼 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인 대장암 개선 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암의 진단 또는 치료를 위한 작은 류신 지퍼 단백질의 신규 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암 미세 환경(tumor microenvironment)에서는 암세포의 빠른 증식으로 인해 세포 성장에 필요한 포도당 등의 영양분 공급이 부족한 특징을 보인다. 세포의 해당과정(glycolysis) 불활성화는 대사 스트레스를 유발하고, 암세포는 대사물질의 재분배를 촉진하기 위하여 자가포식(autophagy) 기전을 활성화한다. 암세포는 자가포식 기전을 통한 높은 대사 유연성으로 대사 리프로그래밍(metabolic reprogramming)을 유도함으로써 스트레스 환경을 극복하기 때문에 대사 억제제를 이용한 항암치료를 빠르게 저항성을 갖게 되고 효과적인 치료에 어려움을 겪는다. 따라서, 암세포의 대사 리프로그래밍에 밀접하게 관여하는 물질을 발굴하고 연구하는 것은 암 진단과 대사항암제 개발을 위하여 중요하다.

[0003] 인간 류신 지퍼 단백질(leucine zipper protein, LZIP)은 염기성 DNA 결합 도메인, 추정적 막통과 도메인 및 류신 지퍼 도메인을 포함하는 bZIP 전사인자이다(Raggo C, et al., Mol Cell Biol 22:5639-5649, 2002). 편재적으로 발현되는 인간 LZIP는 염기성 글루코코르티코이드 반응 부위(glucocorticoid responsive element, CRE)에 결합하여 세포증식을 조절한다(Freiman RN, et al., Genes Dev 11:3122-3127, 1997). 또한, LZIP는 종양 억제제 및 ER 스트레스 관련 단백질 분해 인자로서 기능하는 것으로 알려져 있다(Jin DY, et al., EMBO J 19:729-740, 2000; Liang G, et al., Mol Cell Biol 26:7999-8010, 2006). 이전에 본 발명자들에 의해 인간 LZIP가 CC 케모카인 수용체 1(CC chemokine receptor 1, CCR 1)에 결합하고, CC 케모카인 류코탁틴 1(CC chemokine leukotactin(Lkn)-1)에 의해 유도된 세포 이동에서 양성 조절자인 것을 보고된바 있다(Ko J, et al., FASEB J 18:890-892, 2004). 최근 연구에서는 LZIP가 HIV-1 LTR(long terminal repeat)의 Tat 매개 전사 및 CCR2 발현에 관련되어 있음이 보고된바 있다(Blot G, et al., J Mol Biol 364:1034-1047, 2006; Sung HJ, et al., Exp Mol Med 40:332-338, 2008). 이런 결과는 인간 LZIP가 전사인자 뿐만 아니라 세포 조절자로서 기능을 한다는 것을 나타낸다. 이런 인간 LZIP의 다양한 역할이 제시되어 있음에도 불구하고, 이의 기능이 완전히 알려져 있지 않으며 LZIP의 세포내 위치는 여전히 논쟁의 여지가 있다.

[0004] 아울러, 본 발명자에 의해 인간 LZIP의 아형이 발견되었고, 상기 LZIP는 기존의 인간 LZIP과 달리 추정적 막통과 도메인(229-245 아미노산 잔기)이 결핍된 354개의 아미노산으로 구성되어 있으며(small leucine zipper protein, 이하 sLZIP으로 명명), 인간 LZIP과 달리 핵내에 주로 위치하고 있으며, 리간드에 의해 유도되는 GR의 전사활성을 억제하는 기능을 가지고 있음을 확인되었다(공개특허 KR10-2011-0044545호).

[0005] sLZIP은 세포의 핵에서 전사인자로 기능하여, 암의 발달 및 세포 내 조절 기전들에 관여하는 유전자들의 전사를

직접적으로 조절하여 다양한 암과 대사성질환의 악성화에 관여한다고 알려져 있으나, 대장암의 대사 리프로그래밍 및 자가포식 기전 활성화에 관한 조절 기능은 알려진 바가 없다.

[0006] 이에 본 발명자들은 sLZIP가 대장암세포의 자가포식을 유도하여 대장암의 진행에 기여하는 것을 확인하고, 이를 대장암 치료의 후보 바이오마커로써 대장암의 치료를 위한 대사항암제로의 활용 가능성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 공개특허 KR10-2011-0044545호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 대장암의 진단을 위한 작은 류신 지퍼 단백질의 용도를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 목적은 대장암의 치료를 위한 대사항암제로써의 류신 지퍼 단백질의 용도를 제공하는데 있다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여,

[0012] 본 발명은 작은 류신 지퍼 단백질의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 대장암 개선 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 작은 류신 지퍼 단백질(small leucine-zipper protein)의 활성 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 프로브를 포함하는, 대장암 진단용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 개체로부터 분리된 세포 또는 조직에 후보물질을 처리하고 상기 세포 또는 조직에서 작은 류신 지퍼 단백질의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하며,

[0015] 상기 후보물질이 작은 류신 지퍼 단백질의 발현을 하향조절할 때 대장암 개선 또는 치료용 의약으로 판별하는, 대장암 개선 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따르면, 작은 류신 지퍼 단백질(small leucine-zipper protein)이 암이 진행중인 대장암 세포에서의 자가포식 기전을 조절하는데 중요한 역할을 함을 확인함으로써, 상기 본 발명의 작은 류신 지퍼 단백질 또는 이의 단편은 대장암의 진단, 개선 또는 치료를 위한 대사항암제의 표적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1A-1C는 포도당과 글루타민이 결핍된 환경에서 sLZIP의 발현 변화를 측정한 결과이다.

도 1D-1F는 sLZIP의 발현과 LC3B의 발현과의 관계를 확인한 결과이다.

도 2A-2B는 sLZIP 발현 증가에 따른 LC3의 프로모터의 활성을 확인한 결과이다.

도 2C-2E는 sLZIP가 결합하는 LC3B의 프로모터 부위 및 결합 부위를 도식한 것이다.

도 3A-3C는 sLZIP에 의한 LC3B 발현 증가가 자가 포식체 형성에 영향을 주는지 여부를 확인한 결과이다.

도 3D-3E는 영양분 결핍 조건에서 sLZIP 과발현에 의해 LC3 단백질의 발현이 증가함과 동시에 p62 단백질의 양은 감소하는 것을 통해 자가 포식이 촉진됨을 확인한 결과이다.

도 3F-3G는 대장암 세포에서 sLZIP의 발현 억제에 따른 영양 결핍 스트레스에 의한 세포 사멸의 증가를 확인한 결과이다.

도 4A-4G는 대장암세포에서 sLZIP가 자가포식 활성화를 통해 미토콘드리아 호흡을 촉진하는 대사 리프로그래밍을 유도하는지 여부를 확인한 결과이다.

도 5A-5I는 대장암세포에서 자가포식 활성화를 통해 산화환원 항상성 조절에 관여하는지 여부를 확인한 결과이다.

도 6A-6I는 대장암세포에서 sLZIP의 발현 억제에 따른 해당과정 억제에 의한 세포 사멸의 증가를 확인한 결과이다.

도 7A-7E는 sLZIP의 발현이 억제된 대장암세포에서 해당 과정 억제제에 대한 종양 억제 민감도를 확인한 결과이다.

도 7F-7G는 대장암 환자 및 정상인의 조직에서의 CREB3와 LC3B 유전자 발현량을 비교한 결과이다.

도 8A-8C는 대장암 환자 및 정상인의 조직에서의 CREB3와 LC3B 단백질 발현량을 비교한 결과이다.

도 9는 대장암에서 sLZIP가 관여하는 대사 리프로그래밍 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

[0019] 본 발명은 대장암의 개선 또는 치료를 위한 류신 지퍼 단백질의 용도를 제공한다.

[0020] 보다 구체적으로, 본 발명은 작은 류신 지퍼 단백질의 활성 억제제 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 대장암 개선 또는 치료용 약학적 조성물; 및 치료상 유효량의 작은 류신 지퍼 단백질의 활성 억제제 또는 발현 억제제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대장암 개선 또는 치료 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어, “개선”이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 대장암 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 대장암 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0023] 본 발명에서, 류신 지퍼 단백질 (LZIP)은 bZIP 패밀리의 구성원으로서 CREB/ATF 유전자 패밀리에 속한다. 류신 지퍼 단백질은 기본 DNA-결합 도메인 (basic DNA-binding domain)과 류신 지퍼 도메인을 가지고 있고, cAMP-responsive element (CRE)와 AP-1 element에 결합한다. 또한 HCF-1 결합 단백질로 밝혀졌으며, 세포 증식과 세포성 형질 전환을 촉진하고, 2개의 LxxLL-전사 도움인자 결합 모티프를 포함하고 있다. 아울러, 류신 지퍼 단백질은 CREB3 (LZIP, Luman), CREB3L1 (OASIS), CREB3L2 (BBF2H7), CREB3L3 (CREB-H), CREB3L4 (AIBZIP)로 5개의 구성원으로 되어있으며, 이들은 상동성을 가지고 있으나, 전사 인자 각각의 기능은 다르다. 보고된 류신 지퍼 단백질의 기능으로는 CCR1에 결합하여 Lkn-1 의존성 세포이동을 조절하고, CCR2 프로모터에 결합하여 CCR2의 발현을 조절함 등이 있으나, 본 발명에서 개시하고 있는 바와 같이, 대장암에서 암세포의 자가포식 및 대사 리프로그래밍 조절에 대해서는 알려진 바가 없는 실정이다.

[0024] 구체적으로 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 사용된 류신 지퍼 단백질은 기존의 인간 LZIP과 달리 추정적 막 통과 도메인(229-245 아미노산 잔기)이 결핍된 354개의 아미노산으로 구성되어 있으며(GeneBank (accession No FJ263669)), 인간 LZIP과 달리 핵내에 주로 위치하고 있는 것을 특징으로 한다. 본 명세서에서는 인간 LZIP과 구분하여 작은 류신 지퍼 단백질(small leucine zipper protein, sLZIP)로 명명하여 사용하였다.

[0025] 상기 작은 류신 지퍼 단백질은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으며, 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과, 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0026] 또한, 상기 작은 류신 지퍼 단백질을 코딩하는 유전자는 바람직하게, 서열번호 1로 표시되는 아미노산을 코딩할 수 있는 모든 종류의 염기서열을 포함할 수 있고, 가장 바람직하게, 서열번호 2으로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있으며, 상기 서열번호 2으로 표시되는 염기서열과 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게

는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

- [0027] 구체적일 일 실시예에서, 본 발명자들은 대장암에서 sLZIP의 자가포식 유도 기능을 비롯하여 영양소가 결핍된 조건에서 대장암 세포의 생존에 미치는 영향에 대하여 조사하였다. 대장암 세포 내 영양소가 고갈되면 sLZIP의 전사량이 영양소 결핍 시간에 비례하여 증가할 뿐만 아니라, 자가포식소체의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 LC3B 유전자의 프로모터 인근 부위에 직접적으로 sLZIP이 결합하여 LC3B 유전자의 전사를 증가시킴을 확인하였다. sLZIP에 의해 유도된 자가포식소체의 분해는 대사스트레스 상황에서 글루타민을 공급하여 미토콘드리아의 ATP 생성 기능을 유지시키고 대사 스트레스가 주어지는 상황에서 세포의 Nrf2 기전을 활성화시켜 암 세포 미세환경에서 산화환원 항상성을 유지하는 것을 확인하였다. 아울러, 동물 실험을 통해 억제제를 통한 sLZIP 유전자 발현의 감소가 대장암 세포의 대사 유연성을 낮춤으로써 암 세포 진행 억제에 대한 민감도를 높인다는 사실을 확인하였다.
- [0028] 본 발명에서, 발현 억제제는 류신 지퍼 단백질을 암호화하는 유전자에 대하여 상보적인 유전자 가위, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 또는 이를 포함하는 벡터일 수 있다. 이러한 유전자 가위, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA 또는 이들을 포함하는 벡터는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제작할 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 "벡터"는 폴리캡타이드를 암호화하는 게놈 내로 삽입된 외부 DNA를 포함하는 유전자 작제물을 말한다. 본 발명과 관련된 벡터는 상기 유전자를 저해하는 핵산 서열이 게놈 내로 삽입된 벡터로서, 이들 벡터는 DNA 벡터, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 효모 벡터, 또는 바이러스 벡터를 예로 들 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명에서, 작은 류신 지퍼 단백질의 활성 억제제는 류신 지퍼 단백질의 기능 저하, 바람직하게, 상기 단백질 기능의 탐지가 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하도록 하는 물질을 의미한다. 보다 구체적으로, 상기 활성 억제제는 류신 지퍼 단백질과 특이적으로 결합하는 항체; 류신 지퍼 단백질 내 특정 단편을 코딩하는 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, miRNA, 유전자 기위 또는 이를 포함하는 벡터; 류신 지퍼 단백질 내 특정 단편의 활성을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 첨가제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 첨가제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학적 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 개선 또는 치료, 또는 뼈 성장 유도 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 저해제는 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리캡타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 유전자 가위, 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, 또는 miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, '개체'는 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

- [0037] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, 대장암의 진단을 위한 작은 류신 지퍼 단백질의 용도를 제공한다.
- [0038] 구체적인 일 실시예에서, 본 발명자들은 대장암 환자의 암 조직 내 유전자 및 단백질 발현을 비교했을 때, 본 발명의 sLZIP의 아형인 CREB3의 발현이 정상조직에 비해 증가되어 있었으며 대장암의 진행 단계와 상관관계를 보이는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 sLZIP의 발현은 대장암의 진행과 관련되어 있고, sLZIP는 대장암의 진단의 바이오마커로 이용될 수 있다.
- [0039] 이에 따라, 본 발명은 작은 류신 지퍼 단백질의 활성 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 프로브를 포함하는, 대장암 진단용 조성물; 및 유효량의 작은 류신 지퍼 단백질의 활성 또는 상기 단백질을 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 프로브를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 대장암의 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 진단용 조성물 등은 역시 상술한 작은 류신 지퍼 단백질을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0041] 본 발명에서 사용되는 용어, "진단"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 병리 상태, 즉 대장암의 존재 또는 특징을 확인하는 행위이다. 본 발명의 목적 상, 생체 조직 내 작은 류신 지퍼 단백질 또는 상기 작은 류신 지퍼 단백질 내 특정 단편의 발현 또는 활성이 증진된 경우, 대장암으로 판단하는 것을 의미한다.
- [0042] 본 발명에서, 상기 작은 류신 지퍼 단백질의 발현을 측정하기 위한 프로브는, 작은 류신 지퍼 단백질과 특이적으로 결합하는 항체, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합하는 핵산 프로브 또는 프라이머일 수 있고, 상기 류신 지퍼 단백질의 활성을 측정하기 위한 프로브는, 류신 지퍼 단백질 내 특정 단편과 특이적으로 결합하는 항체, 또는 상기 단편을 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합하는 핵산 프로브 또는 프라이머일 수 있으나, 류신 지퍼 단백질의 발현 또는 활성을 측정할 수 있는 물질이라면, 제한없이 포함될 수 있다.
- [0043] 상기 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간항체 및 인간화 항체, 또는 이들의 단편을 사용할 수 있다. 또한 상기 항체 단편은 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디 (diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체 등을 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 핵산 프로브는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄 (linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP (즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건 (즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 좋다. 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응 (PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응 (RT-PCR), 리가아제 연쇄반응 (LCR), 전자 중재 증폭 (TMA),

핵산 염기서열 기관 증폭 (NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0046] 본 발명의 대장암 진단용 조성물은 키트의 형태로 포함될 수 있다.

[0047] 상기 키트는 작은 류신 지퍼 단백질 또는 작은 류신 지퍼 단백질 내 특정 단편의 발현 또는 활성을 측정할 수 있는 항체, 프로브 또는 프라이머 등을 포함할 수 있고, 이들의 정의는 상술한 바와 같다.

[0048] 상기 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소 (예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합효소 보조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 상기 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차 항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명의 대장암 진단용 조성물은 마이크로어레이의 형태로 포함될 수 있다.

[0050] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 류신 지퍼 단백질 또는 류신 지퍼 단백질 내 특정 단편의 발현 또는 활성을 측정할 수 있는 프 항체, 프로브 또는 프라이머 등은 혼성화 어레이 요소 (hybridizable array element)로서 이용되며, 기질 (substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커 (예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0051] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지될 수 있고, 마이크로어레이 상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0052] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 대장암의 개선 또는 치료용 의약의 개발을 위한 류신 지퍼 단백질의 용도를 제공한다.

[0053] 본 발명의 스크리닝 방법 등은 역시 상술한 류신 지퍼 단백질을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.

[0054] 한 구현예로서, 본 발명은 체외 (in vitro)에서, 류신 지퍼 단백질을 발현하는 세포 또는 조직에 후보물질을 처리하고, 상기 세포 또는 조직에서 류신 지퍼 단백질의 발현 수준을 측정하는 것을 포함하며, 상기 후보물질이 류신 지퍼 단백질의 발현을 하향조절할 때 대장암 개선 또는 치료용 의약으로 판별하는, 대장암 개선 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0055] 다른 구현예로서, 본 발명은 체외 (in vitro)에서, 류신 지퍼 단백질을 발현하는 세포 또는 조직에 후보물질을 처리하고, 상기 세포 또는 조직에서 류신 지퍼 단백질을 암호화하는 유전자의 발현량을 측정하는 것을 포함하며, 상기 후보물질이 류신 지퍼 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 하향조절할 때 대장암 개선 또는 치료용 의약으로 판별하는, 대장암 개선 또는 치료용 의약의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0056] 상기 후보물질은 통상적인 선정방식에 따라 류신 지퍼 단백질 또는 이의 특정 단편으로의 전사, 번역을 억제하는 물질. 또는 류신 지퍼 단백질 또는 이의 특정 단편의 기능 또는 활성을 억제하는 의약으로서의 가능성을 지닌 것으로 추정되거나 또는 무작위적으로 선정된 개별적인 핵산, 단백질, 펩타이드, 기타 추출물 또는 천연물, 화합물 등이 될 수 있다.

[0057] 이후, 후보물질이 처리된 세포에서 상기 유전자의 발현량, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과, 상기 유전자의 발현량, 단백질의 양 또는 단백질의 활성이 감소되는 것이 측정되면 상기 후보물질은 대장암을 개선 또는 치료할 수 있는 물질로 판단할 수 있다.

[0058] 상기에서 유전자의 발현량, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응 (real time-polymerase chain

reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 (radioimmunoassay) 및 면역침전분석법 (immunoprecipitation assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.

[0059] 본 발명의 스크리닝 방법을 통해 얻은, 류신 지퍼 단백질 또는 이의 특정 단편의 발현을 저해시키거나 단백질의 기능을 저해시키는 활성을 나타내는 후보물질이 대장암 개선 또는 치료용 대사항암제로써의 후보물질이 될 수 있다.

[0060] 이와 같은 대장암 개선 또는 치료용 의약의 후보물질은 이후의 대장암 대사항암제 개발과정에서 선도물질 (leading compound)로서 작용하게 되며, 선도물질이 류신 지퍼 단백질 또는 이의 특정 단편의 기능에 대한 억제 효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써, 새로운 대장암 치료제를 개발할 수 있다.

[0062] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0064] [실험 재료 및 실험 방법]

[0065] 1.재료

[0066] RPMI 1640 및 DMEM 배지는 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. 소태아혈청(FBS)은 HyClone Laboratories(Logan, UT, USA)에서 입수하였다. Myco-Guard™는 Biomax(한국, 서울)에서 구입하였다. β -액틴, α -튜불린, p62/SQSTM1 및 녹색 형광 단백질(GFP)을 인식하는 마우스 단일클론 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. LC3, PARP, Keap1, Nrf2 및 절단된 caspase-3에 대한 토끼 단일클론 항체 및 마우스 단일클론 NQ01 항체는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 입수하였다. 토끼 다중클론 Lamin A/C 항체는 GenScript Biotech(Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다. 토끼 다중클론 CREB3 항체는 Proteintech(Catalog number. 11275-1-AP, Chicago, IL, USA)에서 구입하였다. 토끼 다중클론 CREB3 항체는 sLZIP의 발현 여부 및 발현량을 정량하는데 사용되었다. 마우스 단일클론 플래그-M2 항체, 토끼 다중클론 LC3B 항체, 3-브로모포루베이트, 바필로마이신 A1, 브레펠딘 A, 다이싸이오프레틸, 과산화수소 용액, 탐시가르진, 투니카마이신은 Millipore Sigma(Burlington, MA, USA)에서 입수하였다. sLZIP에 대한 인간 작은 간섭 RNA(si-sLZIP)는 GenePharma(중국, 상하이)에서 입수하였다. 구체적으로, 상기 si-sLZIP는 5'-CCAGAUGACUCCACAGCAU-3'(서열번호 3)의 염기서열로 이루어졌다.

[0068] 2.세포 배양, 형질 감염, 및 안정한 세포주 생성 방법

[0069] HCT116, LoVo, SW620 및 HEK 293 세포는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. HCT116 및 SW620 세포를 RPMI 1640 배지에서 성장시켰다. LoVo 세포는 F12K 배지에서 성장되었고 HEK 293 세포는 DMEM에서 성장되었다. 모든 세포주는 10% FBS, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 마이코플라스마 제거 시약을 함유하는 배지에서 성장시켰다. E-fection Plus(Lugen Sci, Seoul, South Korea)를 사용하여 세포를 플라스미드로 형질감염시켰다. Interferin(Polyplus, New York, NY, USA)을 사용하여 세포를 siRNA로 형질감염시켰다. sLZIP-과발현 안정 세포주를 확립하기 위해, HCT116 세포를 cLV-CMV-CopGFP 또는 cLV-CMV-3xFlag-sLZIP로 감염시켰다. 감염 48시간 후에 배양 배지를 교체하고 2 μ g/ml 푸로마이신을 사용하여 안정한 집단을 선택하였다. CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 sLZIP-녹아웃 세포주를 확립하기 위해 HCT116 세포를 pRGEN-Cas9-CMV 또는 pRGEN-sgRNA(ToolGen Inc., Seoul, South Korea)로 형질감염시켰다. 2 μ g/ml 푸로마이신을 사용하여 안정한 집단을 선택하였다. 여기서 CRISPR/Cas9 시스템에서 sgRNA의 표적 서열은 서열번호 2로 표시되는 sLZIP을 암호화하는 염기서열 중 CCCAGCGTCGTTGAACATTCTCA 이다.

[0071] 3.RNA 분리 및 정량적 RT-PCR

[0072] MiniBEST Universal RNA Extraction Kit(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 Total RNA를 분리하고 PrimeScript™ RT Master Mix(Takara, Shiga, Japan)를 사용하여 total RNA에서 cDNA를 합성하였다. cDNA 샘플은 QuantStudio3 실시간 PCR 기기(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 EvaGreen Express 2x qPCR

Master Mix(Applied Biological Materials)를 사용하여 삼중으로 분석되었다. qPCR 및 semi-qPCR 분석에 각각 하기 표 1 및 표 2의 프라이머가 사용되었다.

표 1

[0073]

The primer sequences used for qPCR

mRNA	Primer sequence	
MAP1LC3B	F: AGCAGCATCCAACCAAAATC	R: CTGTGTCCGTTACCAACAG
ATG3	F: GTTGGAAACAGATGAGGCTACC	R: TAGCCAAACAACCATAATCGTG
ATG4B	F: ACTGGGAAGATGGACGCAG	R: AGTATCCAAACGGGCTCTGA
ATG5	F: GAAAGGGAAGCAGAACCATACTATTG	R: TCAGTGGTGTGCCTTCATATTCA
BECN1	F: GGAGAGGAGCCATTATTGAAA	R: AGAGTGAAGCTGTTGGCACTTT
ATG7	F: AAGCAAGAGAAAGCTGGTCATC	R: AGTAGCAGCCAAGCTTGTAACC
ATG10	F: CTGAAGGACATATGGGAAGGAG	R: GAGGTAGATTACGCCCAACAAC
NQO1	F: AAGAGCACTGATCGTACTGGC	R: GGATACTGAAAGTTCGCAGGG
CHOP	F: ACCAAGGGAGAACCAGGAAACG	R: TCACCATTCCGTCAATCAGAGC
GSTM1	F: TTCCCAATCTGCCCTACTTG	R: GGTTGTCCATGGTCTGGTTC
HMOX1	F: CCATAGGCTCCTTCCTCCTTTC	R: GGCCTCTTTCTAGAGAGGGAATT
SQSTM1	F: ATCGGAGGATCCGAGTGT	R: TGGCTGTGAGCTGCTCTT
sLZIP	F: AGCAGCAGCATGTACTCCTCT	R: AGGCAGCTCCAGCTGGTAAG
β-Actin	F: AGCGAGCATCCCCAAAGTT	R: GGCACGAAGGCTCATCATT

표 2

[0074]

The primer sequences used for semi-qPCR

mRNA	Primer sequence	
MAP1LC3B	F: TCGGAGAAGACCTTCAAGCA	R: GGCATAGACCATGTACAGGA
BECN1	F: CCAGGATGGTGTCTCTCGCA	R: CTGCGTCTGGGCATAACGCA
ATG5	F: AGCAACTCTGGATGGGATTG	R: CACTGCAGAGGTGTTTCAA
XBP-1	F: AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC	R: TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG
sLZIP	F: AGCAGCAGCATGTACTCCTCT	R: CTAGCCTGAGTATCTGTCCT
β-Actin	F: AGCGAGCATCCCCAAAGTT	R: GGCACGAAGGCTCATCATT

[0076]

4. 웨스턴 블랏 분석 방법

[0077]

세포를 얼음 상에서 20분 동안 RIPA 완충액에 용해시키고 4 °C에서 12,000 x g에서 20분 동안 원심분리하였다. 단백질을 4 °C에서 밤새 특정 1차 항체로 프로브되었다. 블랏들은 25 °C에서 1시간 동안 2차 항체와 함께 배양되었다. 면역복합체는 West Save Gold western blot detection kit(YoungIn Frontier, Seoul, South Korea)를 이용하여 검출하였다.

[0079]

5. 세포 분획 방법

[0080]

세포를 얼음 상에서 30분 동안 세포질 용해 완충액(10mM NaCl HEPES 완충액)으로 용해시켰다. 세포 용해물을 4 °C에서 20분 동안 2,000 x g에서 원심분리하여 세포와 세포질 단백질을 분리하였다. 상층액에는 세포질 단백질이 포함되어 있다. 펠릿을 RIPA 완충액으로 용해하고 4 °C에서 20분 동안 12,000 x g에서 원심분리한 후, 분획된 샘플을 웨스턴 블랏 분석에 적용하였다.

[0082]

6. 염색질 면역 침전 분석(Chromatin immunoprecipitation assay)

[0083]

ChIP 분석을 위해 세포를 포르말데히드로 고정하고 25 °C에서 15분 동안 회전시켰다. 글리신을 125mM의 최종 농도로 배지에 첨가하고 25 °C에서 5분 동안 진탕하면서 인큐베이션하였다. 염색질 샘플을 단백질 A/G 비드, 5μg

의 항-IgG 및 항-GST 항체와 함께 공동 면역침전시켰다. 샘플을 5 μ l의 proteinase K(20 mg/ml)로 65 °C에서 18시간 동안 처리한 다음 페놀/클로로포름 추출을 수행하였다. ChIP 분석을 위해 하기 표 3의 프라이머를 사용하였다.

표 3

Target site	Primer sequence	
CRE (-267/+11 bp)	F : CCCACAACCGTCACCTCA	R : AATCCGACTCTGGCGATAGC

7. 루시퍼라제 활성 분석

루시퍼라제 분석을 위해, 인간 LC3 프로모터를 인간 게놈 DNA로부터 단리하였다. 프로모터 영역을 pGL4.21 플라스미드 벡터(Promega, Madison, WI, USA)에 삽입하였다. 루시퍼라제 활성 분석은 Dual-Luciferase Reporter Assay 시스템(Promega)을 사용하여 수행되었다. Luminometer 20/20n(Turner BioSystems, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

8. 면역형광 현미경 분석

세포를 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정하고 용액 I (0.2% Triton-X 100 및 1% BSA)로 25°C에서 15분 동안 투과시켰다. 세포를 4 °C에서 24시간 동안 항-LC3 항체를 함유하는 용액 II (PBS 중 1% BSA)와 함께 인큐베이션하였다. PBS로 두 번 세척한 후 세포를 Alexa 488 또는 594-접합 항체와 함께 25 °C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 세포는 LSM 700 공초점 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 이미지화하였다.

9. 세포 생존율 및 집락 형성 분석

세포 생존율 분석을 위해 제조사의 지시에 따라 Quanti-MAX™ Cell Viability Assay Kit(BIOMAX, Seoul, South Korea)를 사용하였다. Quanti-MAX™ 시약을 세포와 30분간 배양한 후 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 콜로니 형성 분석을 위해 세포를 12 웰 플레이트에 접종하고 5일 동안 인큐베이션하였다. 콜로니를 25 °C에서 4% 파라포름알데히드로 고정하고 0.05% 크리스탈 바이올렛(Millipore Sigma, Burlington, MA, USA)을 사용하여 염색하였다.

10. 산소 소모율 측정

HCT116 세포를 24웰 플레이트에 접종하고 배지를 Seahorse 분석 배지(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 교체하였다. OCR은 Seahorse XF24 분석기(Agilent Technologies)를 사용하여 측정하고 데이터는 Seahorse Wave를 사용하여 분석하였다.

11. 세포 사멸 분석

사멸 세포는 Annexin V apoptosis 검출 키트 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 정량화되었다. 간단히 말해서, 세포를 PBS로 세척하고 결합 완충액, Annexin V 및 propidium iodide(PI)와 혼합하였다. 사멸된 집단은 유세포 분석기(BD Biosciences)를 사용하여 1시간 이내에 분석되었다.

12. ATP 및 α -케토글루타레이트 측정

세포를 24시간 동안 완전 배지 또는 글루타민이 없는 배지에서 배양하였다. 세포 성분을 측정하기 전에 각 키트가 제공된 분석 완충액으로 세포를 균질화하고 10kDa 분자량 컷오프 스핀 컬럼(BioVision, Milpitas, CA, US

A)을 사용하여 샘플을 탈단백질화하였다. 세포 내 ATP 수준은 colorimetric ATP Assay Kit(BIOMAX, Seoul, South Korea)를 사용하여 측정하였다. α -KG의 농도는 비색 α -KG 분석 키트(BioVision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 흡광도는 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 570 nm에서 측정하였다.

[0105] 13. 동물 실험 방법

[0106] 6주령 수컷 BALB/c 누드 마우스는 ORIENT BIO 동물 센터(한국 성남)에서 구입하여 12시간 명암 주기로 특정 병 원제 없는 조건에서 유지하였다. 동물 연구 프로토콜은 고려대학교 동물연구소 동물관리위원회의 승인을 받았다. 동물 실험은 실험 동물의 사용 및 관리 지침에 따라 수행되었다. 이종이식 모델의 경우, 누드 마우스에 PBS 100 μ l에서 대조군 또는 sg-sLZIP 안정 세포(5×10^6)를 피하 접종하였다. 종양 부피가 100 mm^3 에 도달하면 3-BP(2mg/kg/day)를 12일 동안 마우스에 복강내 주사하였다. 3일마다 디지털 캘리퍼스종 종양 부피를 측정하였다(종양 부피 = $0.5 \times \text{길이} \times \text{너비}^2$). 최종 약물 투여 후, 모든 마우스를 즉시 죽이고 종양 분리 및 종양 중량 측 정을 위해 해부하였다.

[0108] 14. 데이터베이스 분석

[0109] CRC 환자 샘플의 마이크로어레이 결과는 유전자 발현 옴니버스 데이터베이스(GEO Access number GSE25071; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)에 서 얻었다.

[0111] 15. 조직 마이크로어레이

[0112] 인간 대장 종양 및 인접한 정상 대장 조직은 SuperBioChips Laboratories(서울, 한국)에서 입수하였다. 40개의 암종, 10개의 전이성 암종 및 9개의 정상 조직 표본을 포함하는 인간 대장 조직 마이크로어레이 슬라이드를 IHC 검증된 특정 CREB3 및 LC3B 항체에 대한 IHC 염색에 사용하였다. IHC 결과는 전체 조직 면적에 대한 양성 염색 면적의 비율을 계산하여 분석하였다.

[0114] [실험 결과]

[0115] [실시예] 대장암 진단 및 치료에서의 작은 류신 지퍼 단백질의 역할 규명

[0116] 실시예 1. 영양분 결핍으로 인한 대사 스트레스는 sLZIP 발현 유도 확인

[0117] 암세포는 일반 세포보다 증식 속도가 매우 빠르기 때문에 세포 성장에 필요한 영양성분 공급이 충분하지 못한다. 이러한 암 미세 환경(tumor microenvironment)을 극복하기 위하여 암세포에서는 종양유전자의 발현 증 가 및 신호전달 기전에 의한 빠른 대사 리프로그래밍과 대사물질 재분배가 이루어진다. 이러한 암세포의 대사적 특징은 대사 억제를 이용하는 항암치료 후에 빠른 대사 유연성을 획득함으로써 약물저항성을 얻은 악성 암으로 발달하게 한다.

[0118] 세포의 주요 에너지원인 포도당과 글루타민이 결핍된 환경에서 sLZIP의 발현 변화를 조사한 결과, 영양분 결핍 으로 인한 대사 스트레스가 대장암 세포주 내의 sLZIP 전사 및 단백질 발현을 유도하는 것을 발견하였다 (도 1A-C). sLZIP은 대장암세포에서 자가포식 기전에 관여하는 핵심유전자인 LC3B의 발현을 증가시킨다 (도 1D).

[0119] 또한, sLZIP 발현량에 비례하여 LC3B의 mRNA 양이 조절되는 것을 관찰하였으며 (도 1E), 그로 인해 sLZIP이 LC3 단백질 발현을 조절하였다 (도 1F).

[0121] 실시예 2. sLZIP은 전사인자로 작용하여 직접적으로 LC3의 전사 유도 확인

[0122] LC3 인근 프로모터의 활성이 sLZIP 발현 증가에 의해 유도되며 (도 2A), 영양분 결핍 스트레스에 의해 증가하는 LC3 프로모터 활성이 sLZIP 발현 감소에 의해 억제되는 것을 관찰하였다 (도 2B). LC3 인근 프로모터를 여러 길

이로 나누어 sLZIP의 영향을 받는 구역을 조사하였을 때, 전사 시작부위에서 제일 근접하고 두 곳의 CREB 결합 서열을 포함하는 프로모터 영역이 조절되는 것을 발견하였다 (도 2C).

[0123] sLZIP이 LC3 유전자의 인근 프로모터에 직접적으로 결합하는 것을 관찰하였으며 (도2D), sLZIP이 -66/-58 위치의 CRE 서열을 통해 LC3 프로모터 활성을 조절하였다 (도 2E). 이러한 결과는 대장암 세포 내에서 sLZIP 유전자가 LC3의 발현에 직접적으로 관여하는 중요한 전사인자임을 알 수 있다.

[0125] 실시예 3. sLZIP에 의한 LC3 발현 증가와 자가포식 기전과의 관계 확인

[0126] LC3는 자가포식체를 형성하는 주요 단백질이기 때문에 sLZIP에 의한 LC3 발현 증가가 자가포식 기전에 영향을 주는지 조사하였다. 영양분이 부족한 환경에서 대장암 세포주의 자가포식 기전이 활성화되었으며, 그 때 sLZIP이 LC3-I 과 LC3-II를 모두 증가시킴을 관찰하였다 (도 3A). 그로 인해 sLZIP 과발현은 대사 스트레스 조건에서 자가포식체 형성을 촉진함을 확인하였다 (도 3B-C).

[0127] 세포 내 자가포식 기전의 활성화는 자가포식체 내부 물질의 분해가 촉진되는 것을 의미하는 것이므로, 분해 마커로 쓰이는 p62 단백질 양의 변화를 관찰하였다. 영양분 결핍 조건에서 sLZIP 과발현에 의해 LC3 단백질의 발현이 증가함과 동시에 p62 단백질의 양은 감소하는 것을 통해 autophagy flux가 촉진된 것을 관찰하였다 (도 3D). 또한, p62 단백질 양의 감소가 자가포식체에 의한 분해에 의한 것임을 리소좀 억제제인 bafilomycin A1을 처리하여 확인하였다 (도 3E). 따라서 sLZIP 발현이 감소된 대장암 세포는 영양분 결핍 스트레스에 의한 세포사멸이 상대적으로 증가하였다 (도 3F-G). 이는 sLZIP이 영양분 결핍 환경에서 암세포의 자가포식 기전을 조절하고 세포사멸을 억제하는 유전자라는 것을 규명하는 것이다.

[0129] 실시예 4. sLZIP의 자가포식 활성화를 통한 미토콘드리아 호흡을 촉진하는 대사 리프로그래밍 유도 확인.

[0130] 영양분 결핍 환경에서 암세포는 자가포식 기전 활성화를 통해 대사 중간체를 생산하고 ATP 공급을 유지한다. 자가포식체 분해로 생성되는 아미노산 중에서 glutamine은 미토콘드리아 대사 과정의 중간체인 α -ketoglutarate(α -KG)로 전환되어 ATP를 생산할 수 있다. 대장암세포의 glutamine 의존도를 확인하기 위하여 glutamine 결여 배지로 세포를 배양한 결과, α -KG의 농도가 약 80% 감소하며 그로 인해 ATP 농도가 약 30% 감소하는 것을 확인하였다 (도 4A). sLZIP 과발현 대장암 세포주에서 glutamine 결핍은 자가포식을 활성화하였으며 sLZIP 과발현에 의해 autophagy flux가 향상되었다 (도 4B). sLZIP의 과발현이 대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 세포의 미토콘드리아 대사를 oxygen consumption rate(OCR)로 측정하였을 때, sLZIP 발현과 OCR이 상관관계를 갖는 것을 관찰하였다 (도 4C-D). 그리고 OCR 측정 결과를 기반으로 sLZIP 발현 증가에 의해 ATP 생산과 연관된 OCR이 증가한 것을 관찰하였으며 (도 4E), 반면에 sLZIP이 ATP 생산에 쓰이는 산소의 비율에는 영향을 주지 않음을 확인하였다 (도 4F). sLZIP이 미토콘드리아 대사를 증가시키는 대사 리프로그래밍을 유도하므로 sLZIP의 발현이 감소된 대장암세포에서는 glutamine 결여 배지에 의한 α -KG 농도 감소가 약 45% 완화되었으며, 그 결과 ATP 농도가 약 20% 보완되었다 (도 4G). 이는 대장암세포에서 sLZIP이 LC3 발현을 증가시켜 자가포식 기전을 활성화하고 glutamine 공급을 통해 미토콘드리아 대사를 촉진하는 대사 리프로그래밍을 유도함을 의미한다.

[0132] 실시예 5. sLZIP의 자가포식 활성화를 통한 산화환원 항상성을 조절과의 관계 확인.

[0133] 영양분 공급이 원활하지 못하거나 세포 내 대사 기전이 억제되는 경우, 활성산소 농도가 증가하며 산화환원 항상성이 저해되고 이는 세포사멸을 일으킨다고 알려져 있다. 대사 스트레스에 의해 활성화되는 자가포식 기전은 Keap1 단백질을 자가포식체로 분해함으로써 Nrf2의 하위 유전자 발현을 증가시키고 활성산소를 완화한다. sLZIP은 glutamine이 결여된 환경에서 자가포식체를 통한 Keap1 분해를 증가시킴을 확인하였고 (도 5A), 이에 따라 sLZIP 과발현에 의해 Nrf2 단백질의 핵 이동이 증가함을 확인하였다 (도 5B). 그 결과, Nrf2의 하위 유전자로 알려진 NQO1, CHOP, SQSTM1(p62)의 전사가 유의미하게 증가하였고 (도 5C-D), p62와 NQO1의 단백질 발현을 증가시켰다 (도 5E). Nrf2의 핵 이동을 억제한다고 알려진 ascorbic acid를 처리하였을 때 sLZIP 과발현에 의해 증가하는 NQO1 단백질 발현이 감소하는 것을 통해 sLZIP이 Nrf2를 통해 NQO1의 발현을 조절한다는 것을 확인하였다 (도 5G).

[0134] sLZIP이 자가포식 촉진을 통해 활성산소 조절에 중요한 Keap1-Nrf2 기전을 조절함을 확인함으로써, 과산화수소

(H₂O₂)에 노출되었을 때 세포 생존률을 유의미하게 높이는 것을 관찰하였다 (도 5H). 또한 과산화수소 처리하에 sLZIP 과발현 세포주에서 세포사멸에 관여하는 PARP 및 caspase-3 단백질의 cleavage가 감소되었다 (도 5I). 이러한 결과는, 대장암세포에서 sLZIP 과발현에 의한 자가포식 활성화가 활성산소 조절 기전을 조절하고 활성산소 유도 세포사멸을 억제하기 위해 중요하다는 것을 알 수 있다.

[0136] 실시예 6. sLZIP 발현 억제와 대장암세포의 세포 사멸 및 증식 억제 효과 확인

[0137] 암세포는 산소의 유무와 관계없이 해당과정을 통한 포도당 대사를 과도하게 이용하는 특징이 있다. 포도당이 낮은 농도로 포함되어 있는 배지로 대장암세포를 배양하였을 때 sLZIP은 자가포식체의 형성을 증가시켰으며 (도 6A-B), sLZIP 발현이 억제된 세포는 포도당 결핍 환경에서 발생하는 세포사멸이 더욱 증가되어 있음을 관찰하였다 (도 6C-D).

[0138] 암세포가 해당과정을 통한 포도당 대사를 주된 에너지 생산 방식으로 사용하기 때문에 이를 억제하기 위한 대사항암제가 주목받고 있다. 하지만 포도당 대사를 억제하는 방법은 암세포에 대사 스트레스로 작용하기 때문에 자가포식 기전이 활성화된다는 부작용이 발생한다. 해당과정의 초기에 작용하는 hexokinase 효소를 억제하기 위해서 3-bromopyruvate(3-BP)를 처리하였을 때, 처리시간에 비례하여 자가포식 기전이 활성화되었다 (도 6E). sLZIP 유전자 발현을 CRISPR/Cas9 방식으로 억제한 대장암세포주는 LC3 발현이 낮기 때문에 3-BP 처리에 의한 자가포식 활성화가 원활하지 못하고 3-BP에 의한 세포사멸이 증가함을 확인하였다 (도 6F). 따라서 sLZIP 발현 감소는 3-BP로 인한 해당과정 억제 조건에서 대장암 세포 증식을 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다 (도 6G). sLZIP 발현 감소에 의한 대장암세포 증식 억제는 sLZIP의 하위유전자인 LC3를 과발현하였을 때 유의미하게 완화되었으며 (도 6H), 그와 동시에 세포사멸에 관여하는 cleaved PARP 단백질 양도 감소하였다 (도 6I). 이는 대사항암제에 의한 암세포 대사 저해 상황에서 sLZIP 발현 억제가 자가포식 기전 활성화를 막고 세포 증식을 억제하는 효과가 있음을 나타내는 것이다.

[0139] 또한, 대장암 세포주에서 sLZIP 발현 억제가 해당과정 저해 약물에 대한 민감도를 높였기 때문에 마우스를 이용한 동물실험에서도 종양 증식이 억제되는지 확인하였다. sLZIP 발현이 억제된 대장암세포주를 피하주사하여 종양을 형성하고 복강주사로 3-BP를 처리하였을 때, 대조군의 종양은 자라는 반면 sLZIP knockout 종양의 크기는 증가하지 못하였다 (도 7A-B). 종양형성 20일차에 마우스로부터 종양을 분리하였고, 종양의 무게가 유의미하게 차이를 보였으며 본 동물실험은 종양형성이나 대사억제제 처리에 의한 개체 무게 변화를 일으키지 않는 조건에서 수행되었음을 확인하였다 (도 7C-E). 이러한 실험 결과는 대장암 치료를 위해 대사항암제 처리할 때 sLZIP의 발현 억제가 대사항암제 민감도를 높이고 종양 증식을 억제에 중요함을 규명하였다.

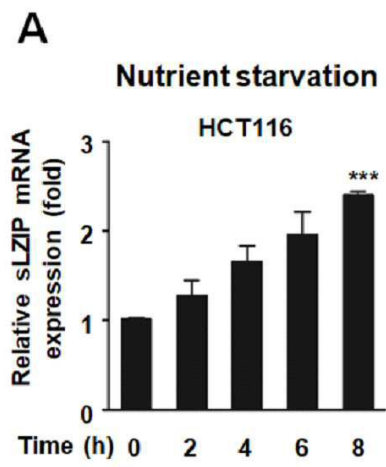
[0140] 46명의 대장암 환자 유전자 발현을 정상 조직과 비교한 결과, sLZIP이 속한 CREB3 유전자 발현이 대장암 환자에서 높았으며 질병의 단계가 높은 환자에서 유의미한 상관관계를 보였다 (도 7F). 또한 남성 대장암 환자 25명을 분석하였을 때, III 및 IV 단계의 대장암환자에서 CREB3와 LC3B 유전자가 높게 발현되어 있음을 발견하였다 (도 7G).

[0142] 실시예 7. 정상 조직과 비교하여 대장암 환자의 CREB3 및 LC3 단백질 발현이 높음.

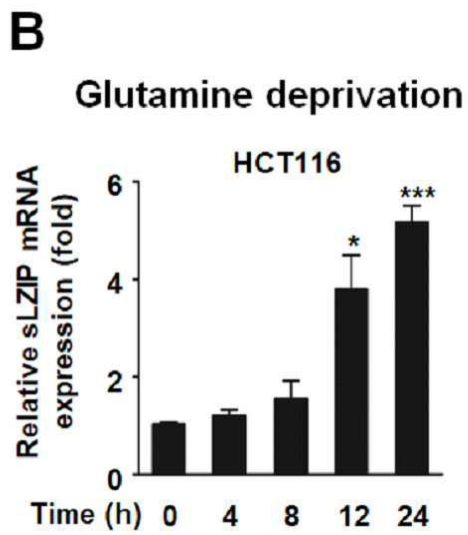
[0143] 40명의 대장암 환자 조직을 면역조직화학염색 기법으로 CREB3 및 LC3B 단백질 발현을 조사한 결과, 정상 조직에 비해 단백질 발현이 높았으며 대장암 유래 간 전이 조직에서도 CREB3 및 LC3B의 단백질이 강하게 염색되는 것을 관찰하였다 (도 8A). 또한 동일 환자의 조직으로 단백질 발현 양상을 비교하였을 때, CREB3 및 LC3B가 유사한 발현 분포 양상을 보였다 (도 8B). 조직 면역 염색 정도를 수치화한 결과에서 대장암 환자의 CREB3 및 LC3B 단백질 염색이 정상보다 유의미하게 높았고 암 발달 단계가 높을수록 통계적 상관관계를 보임을 발견하였다 (도 8C-D). 이러한 결과는 CREB3 및 LC3B 단백질이 임상 병리학적으로 대장암 진단 및 발달 단계 구분을 위한 조직 면역 염색법 후보 단백질이 될 수 있음을 의미한다.

도면

도면1a

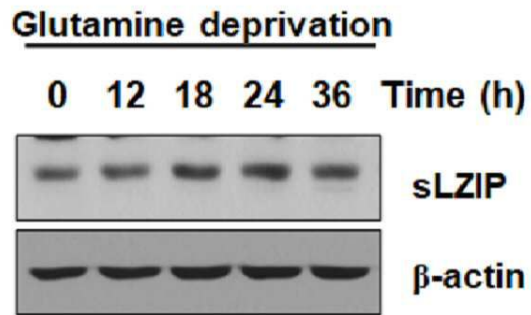


도면1b

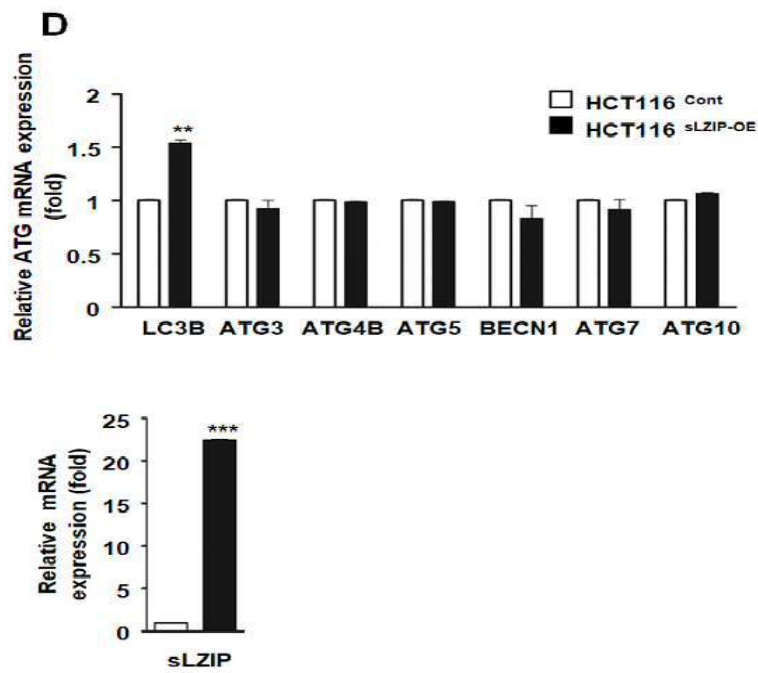


도면1c

C

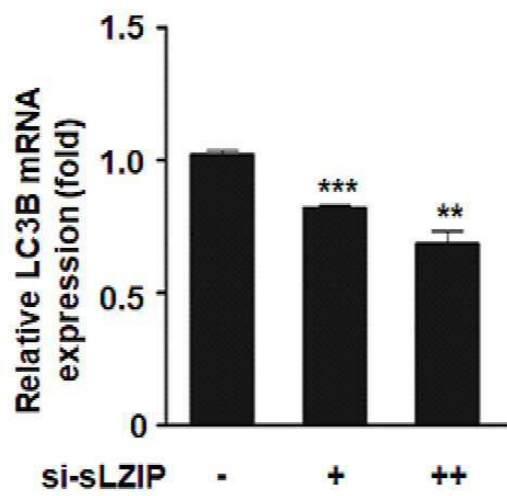
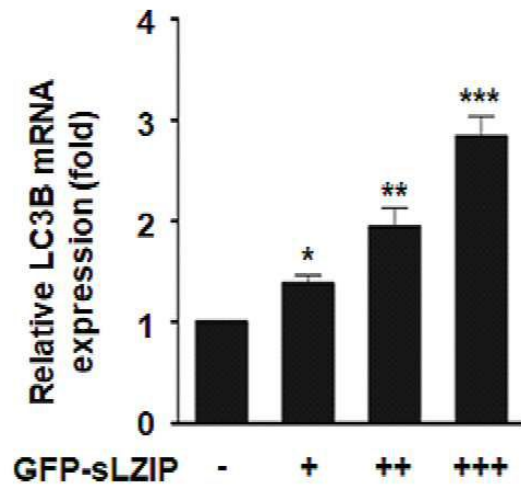


도면1d



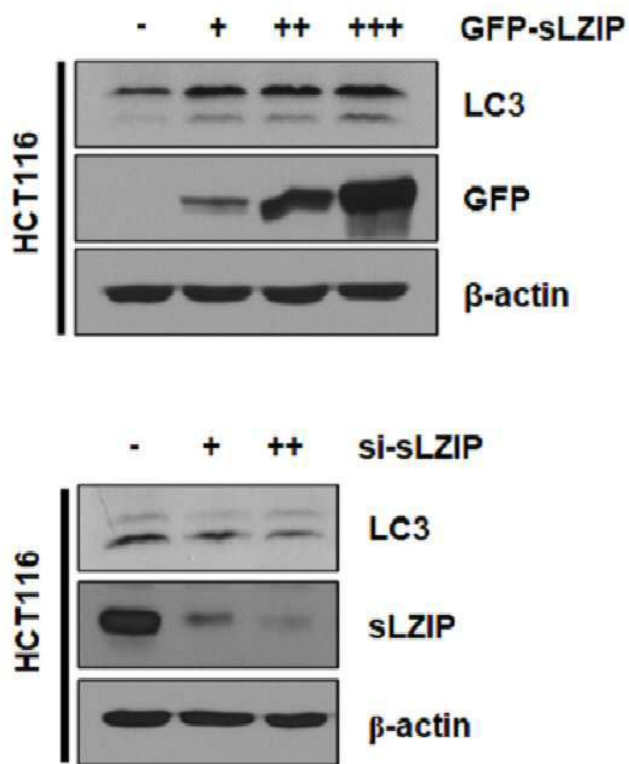
도면1e

E



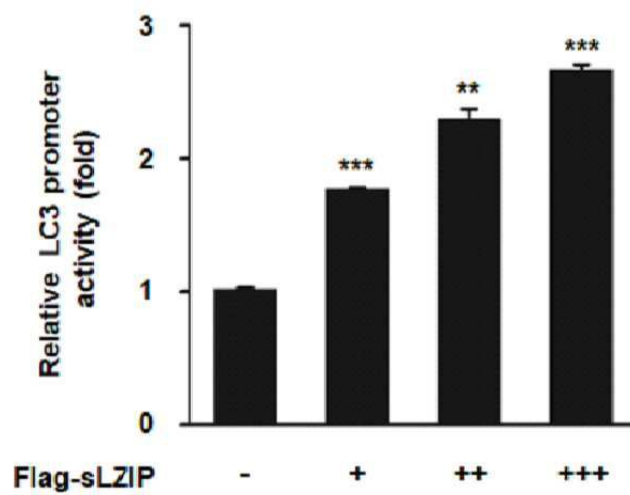
도면1f

F

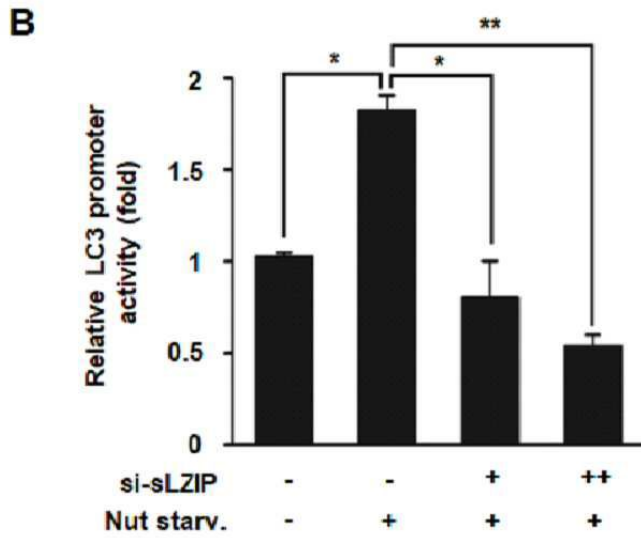


도면2a

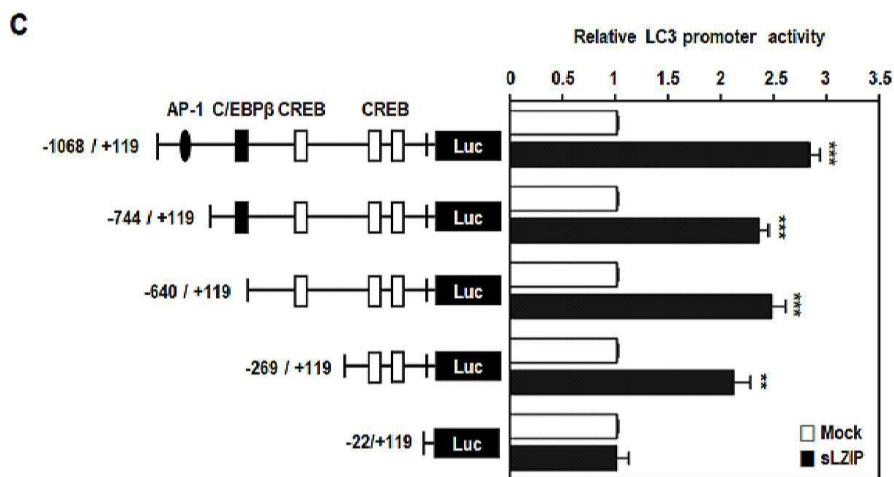
A



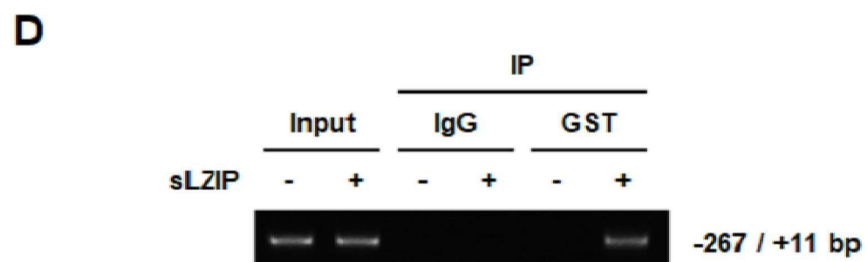
도면2b



도면2c

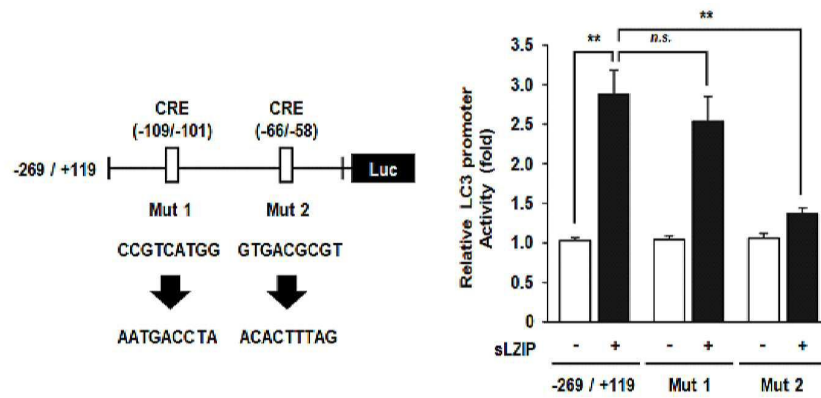


도면2d



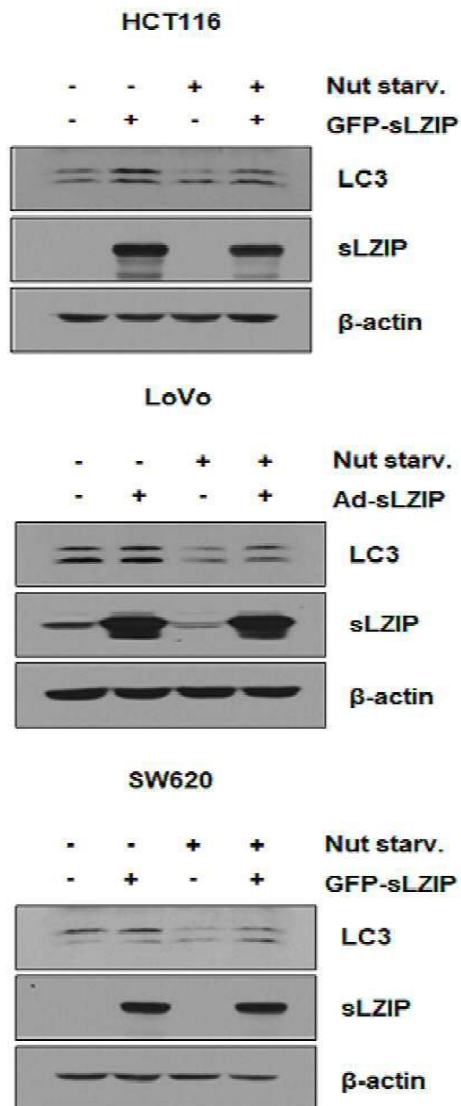
도면2e

E

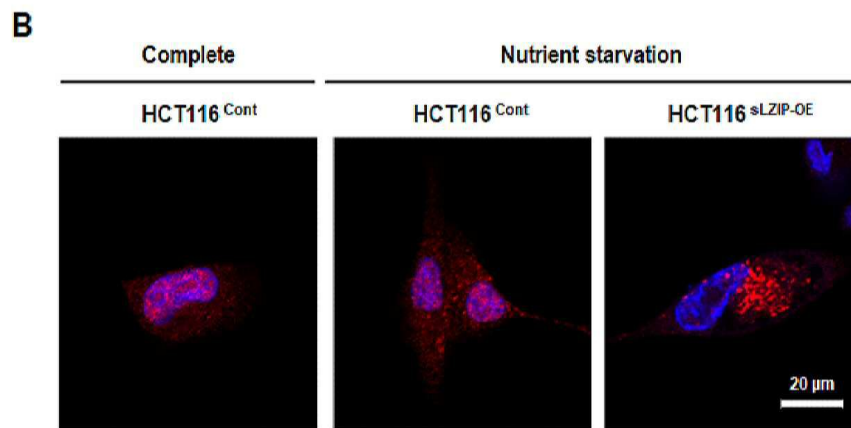


도면3a

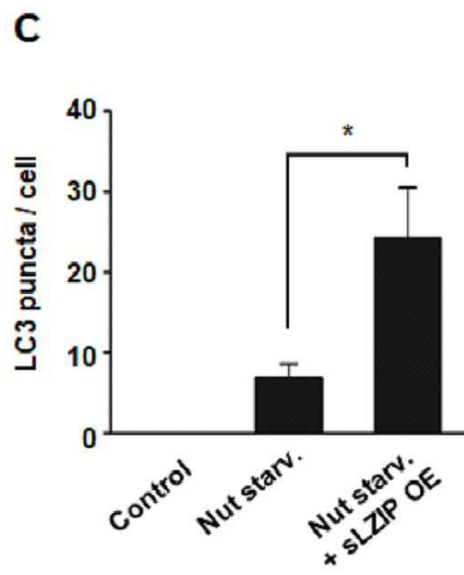
A



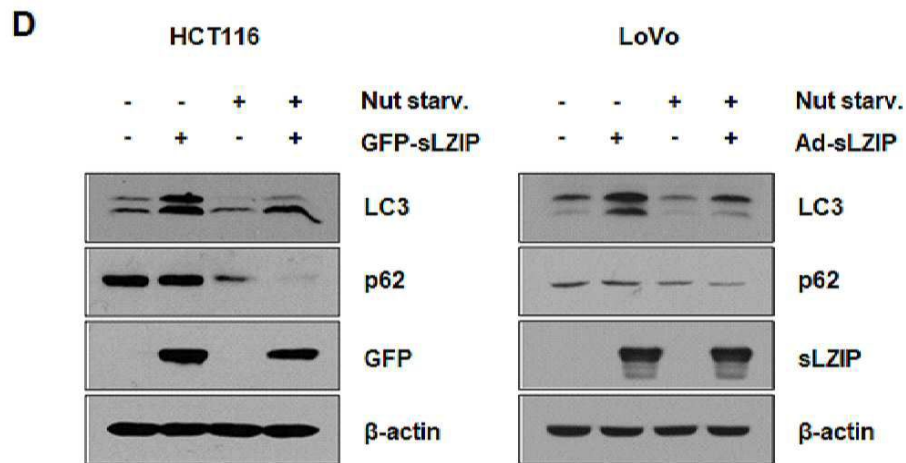
도면3b



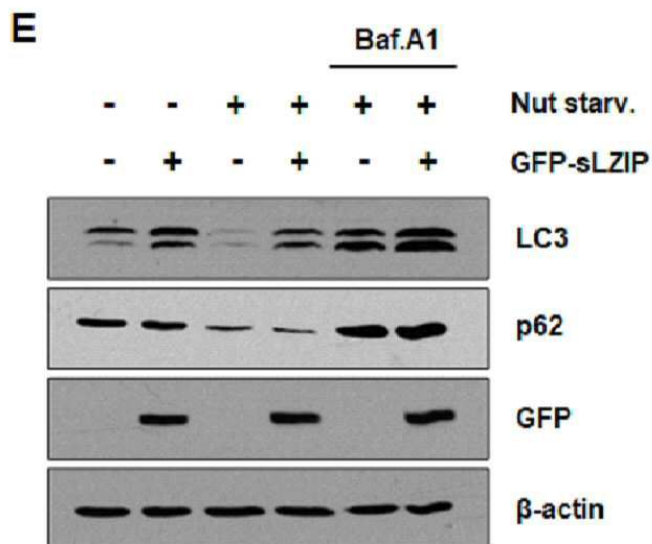
도면3c



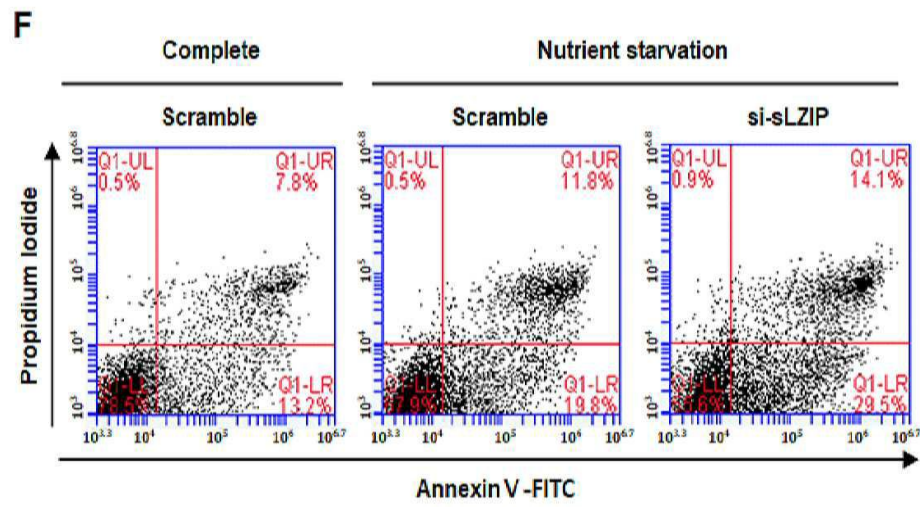
도면3d



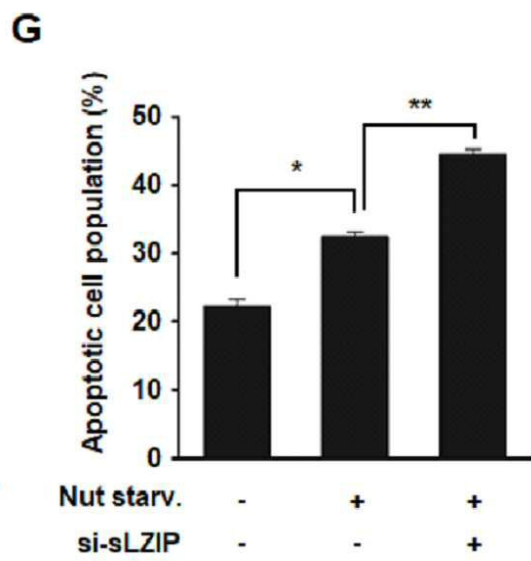
도면3e



도면3f

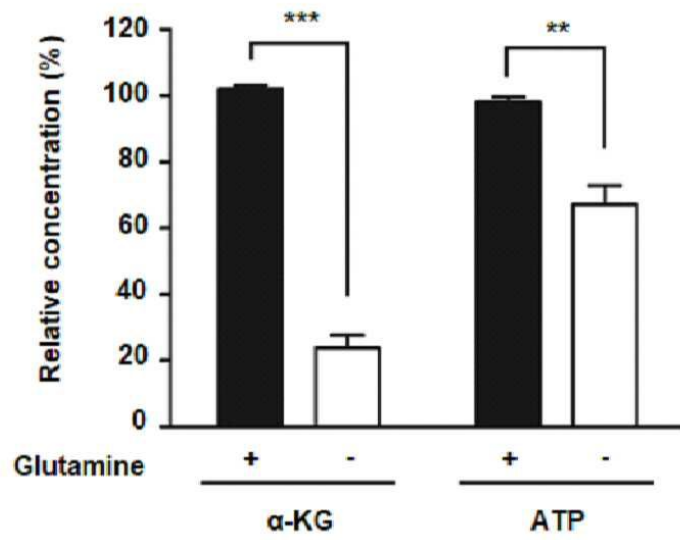


도면3g



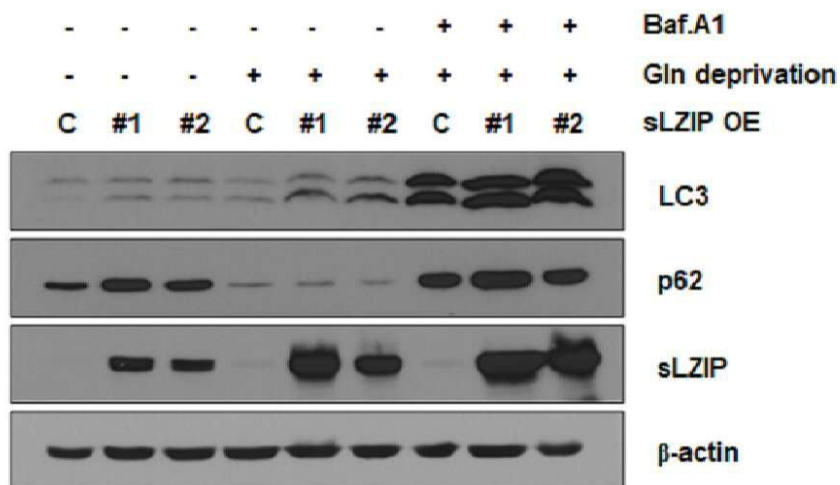
도면4a

A

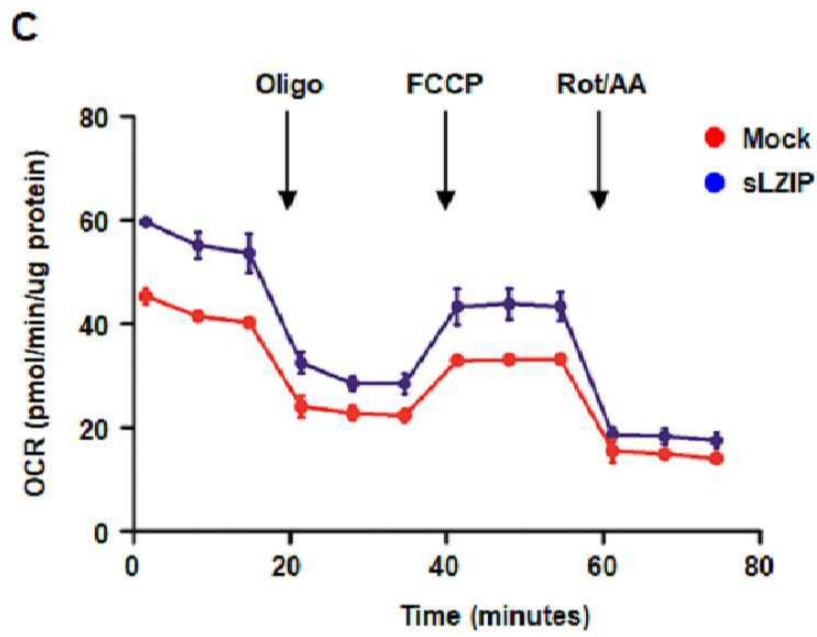


도면4b

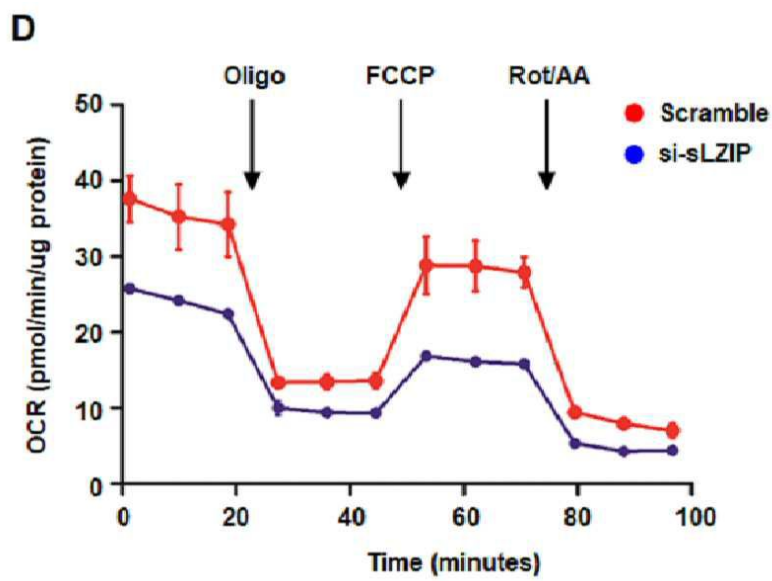
B



도면4c

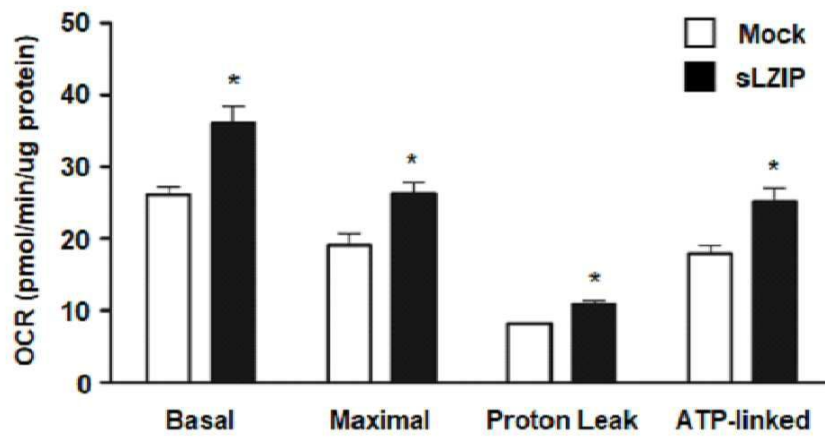


도면4d



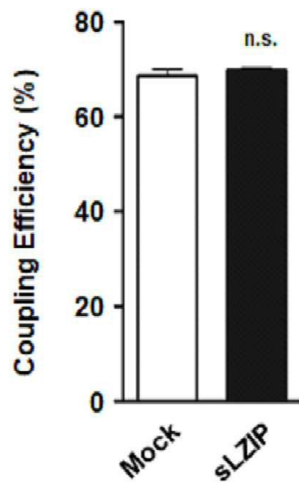
도면4e

E

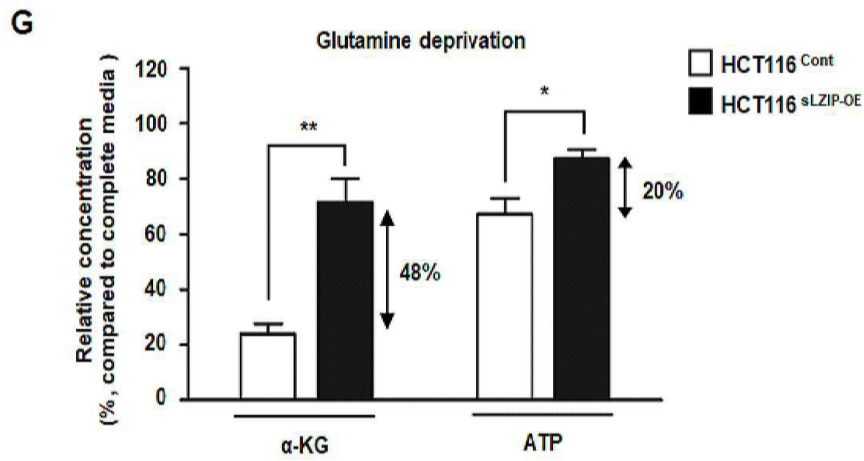


도면4f

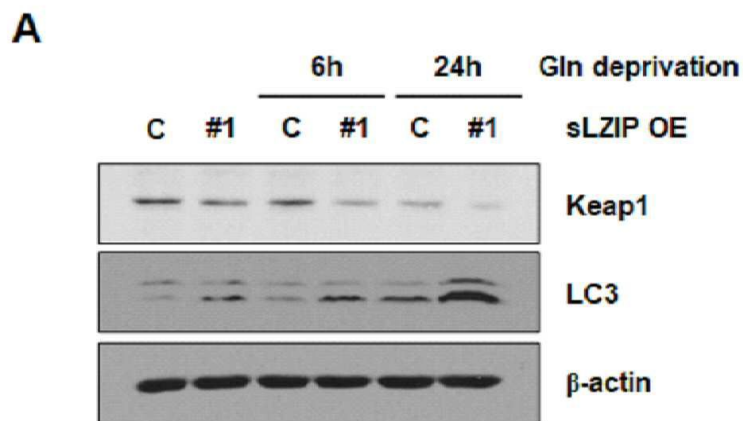
F



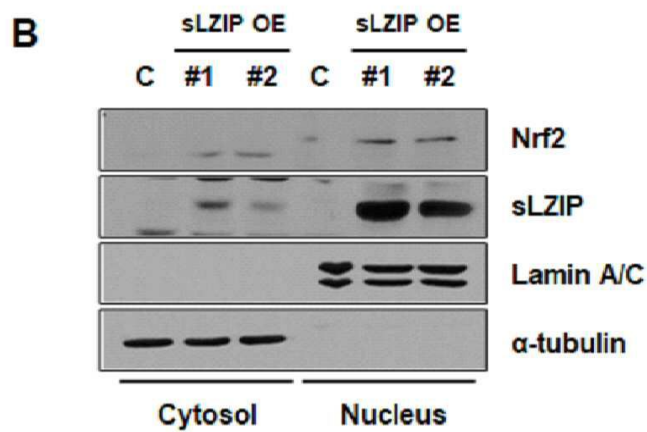
도면4g



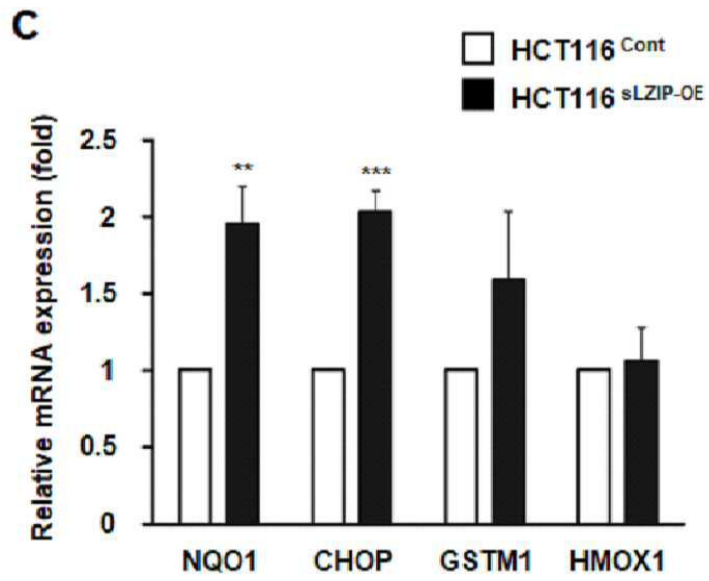
도면5a



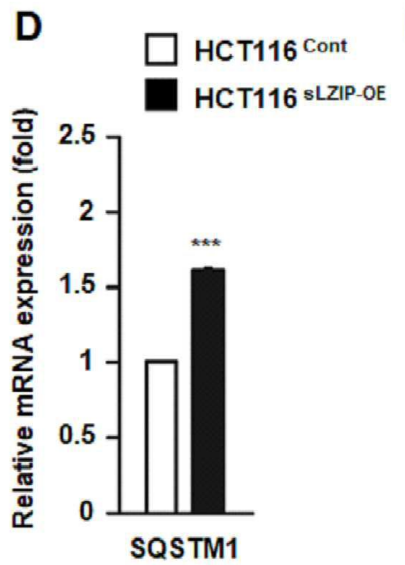
도면5b



도면5c

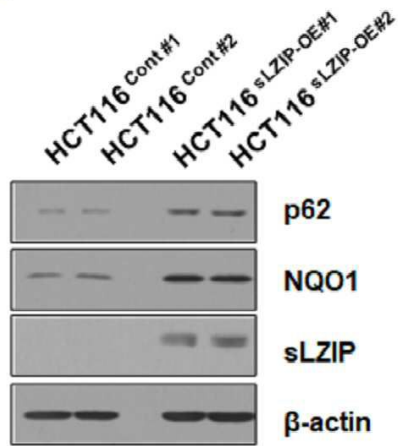


도면5d



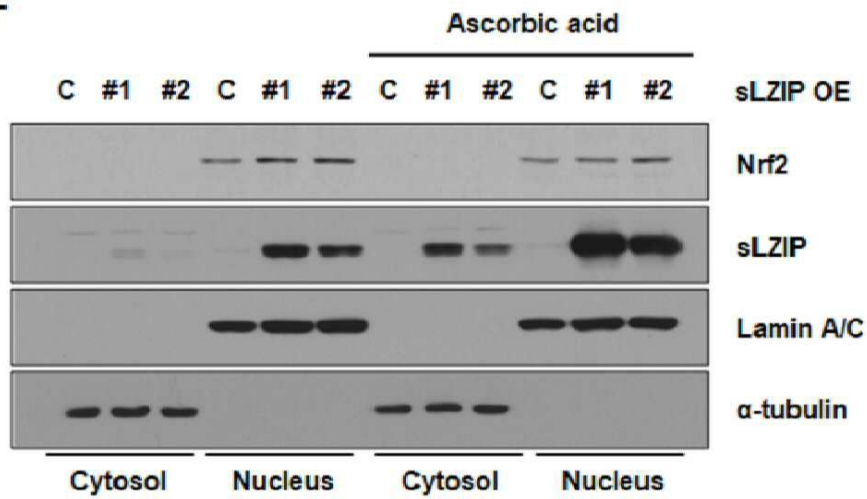
도면5e

E



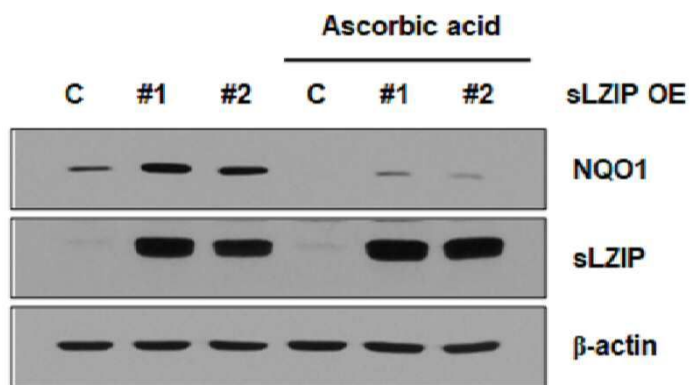
도면5f

F



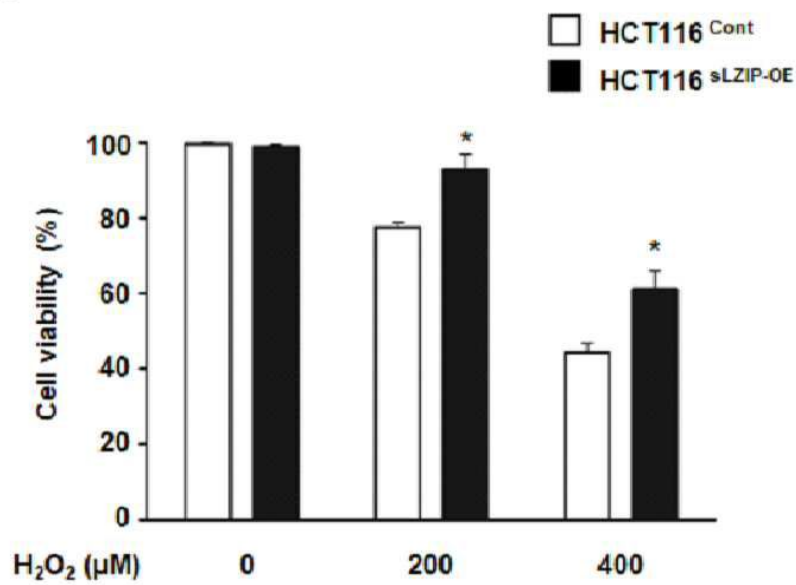
도면5g

G



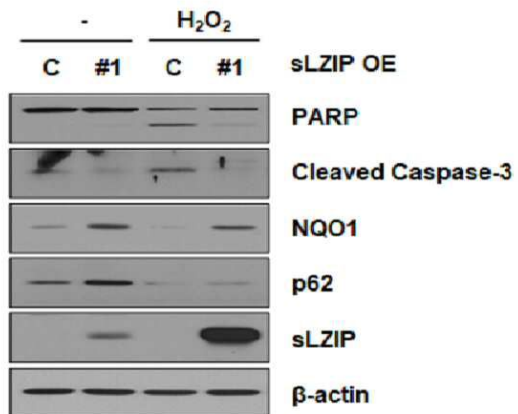
도면5h

H



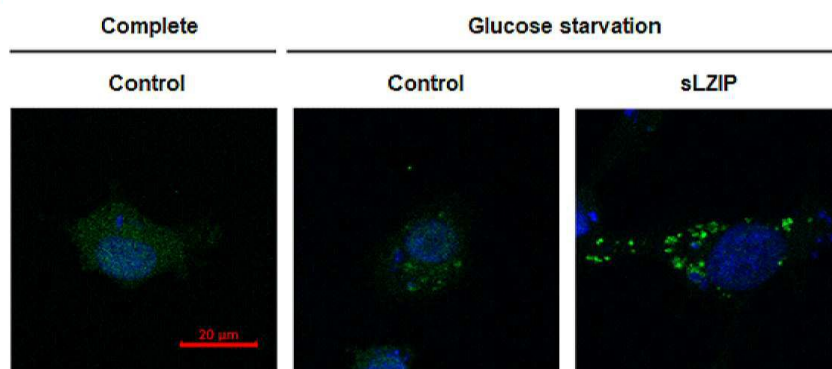
도면5i

I



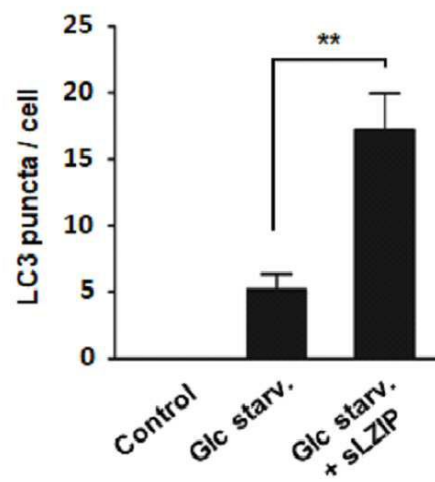
도면6a

A



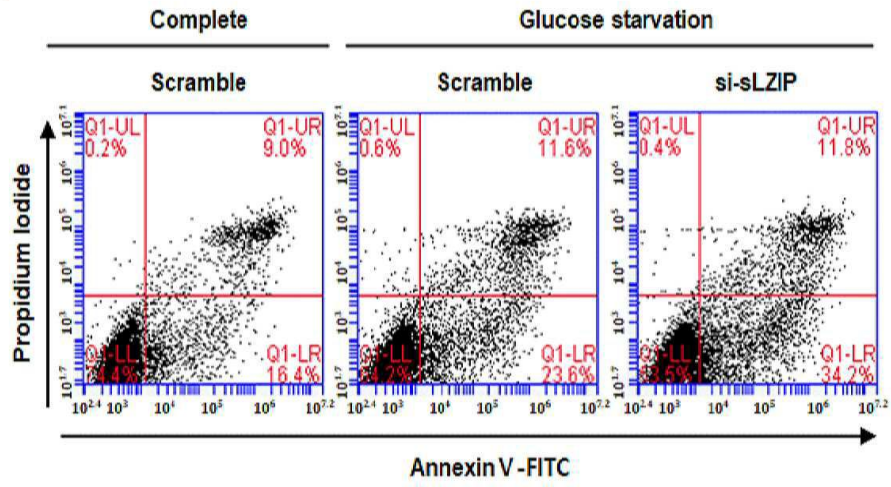
도면6b

B



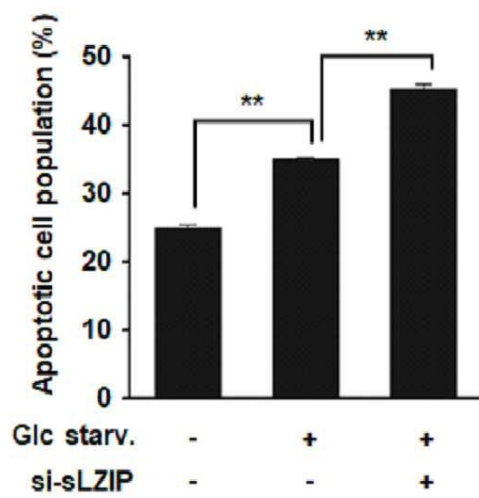
도면6c

C



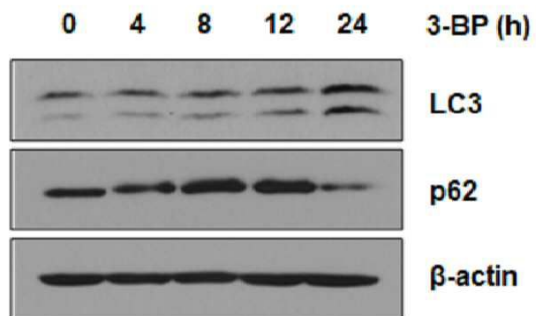
도면6d

D



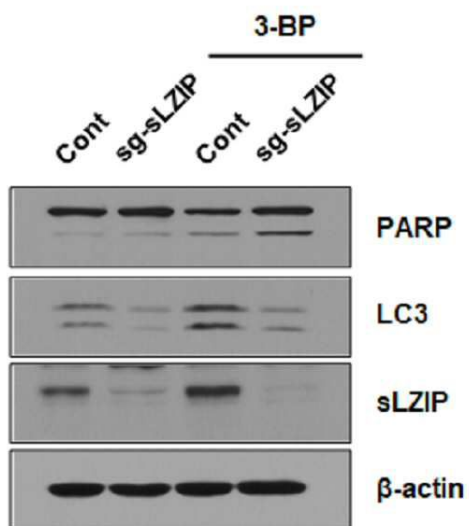
도면6e

E

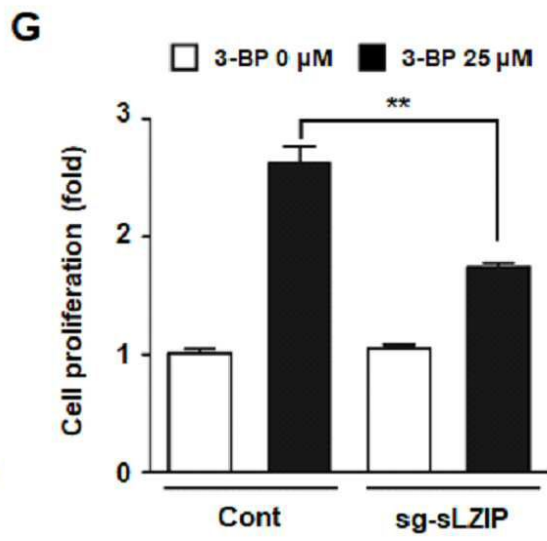


도면6f

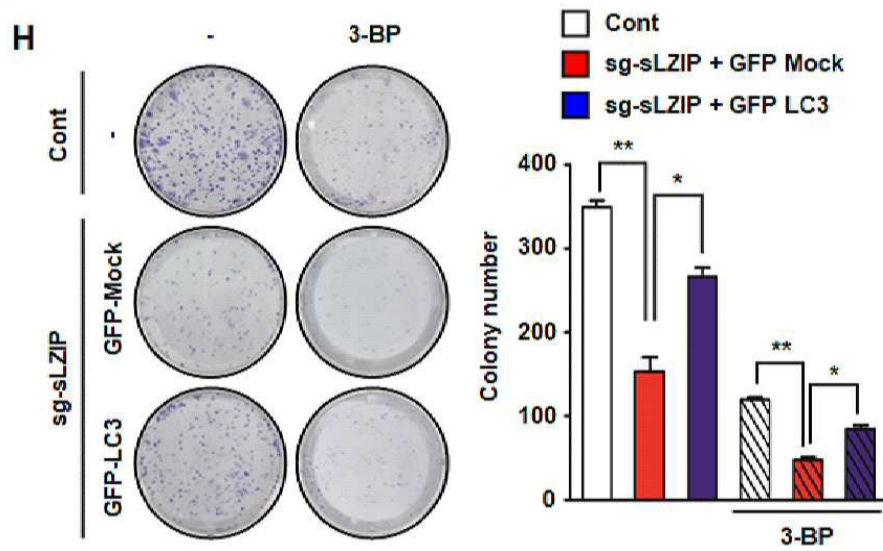
F



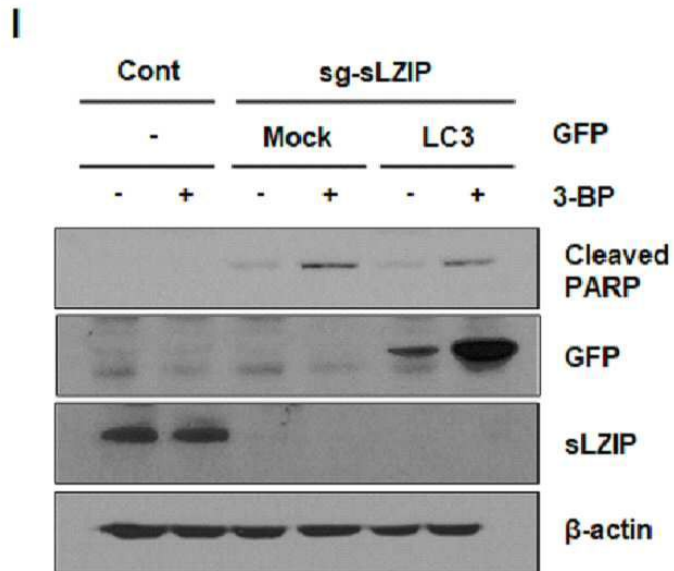
도면6g



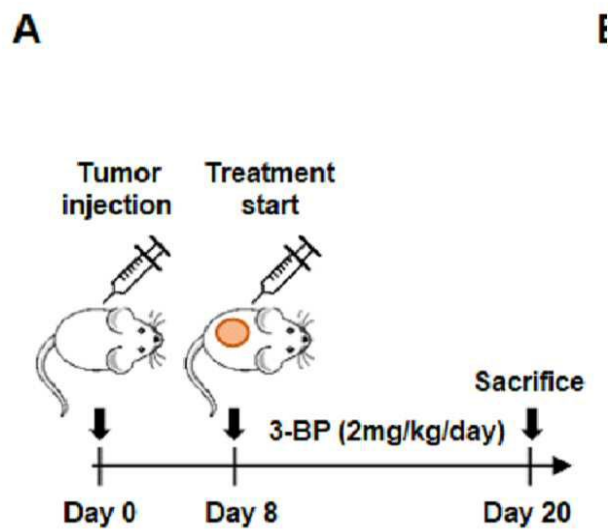
도면6h



도면6i

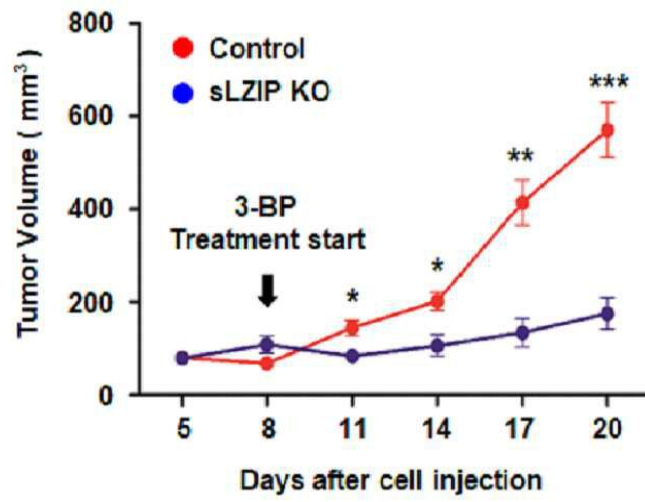


도면7a



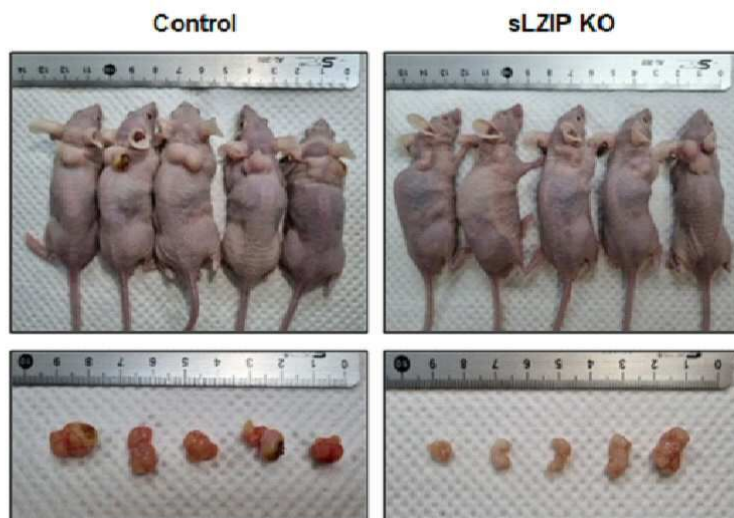
도면7b

B



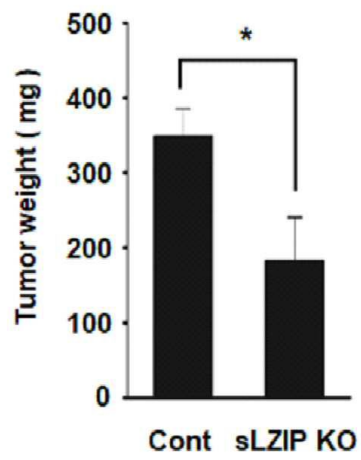
도면7c

C



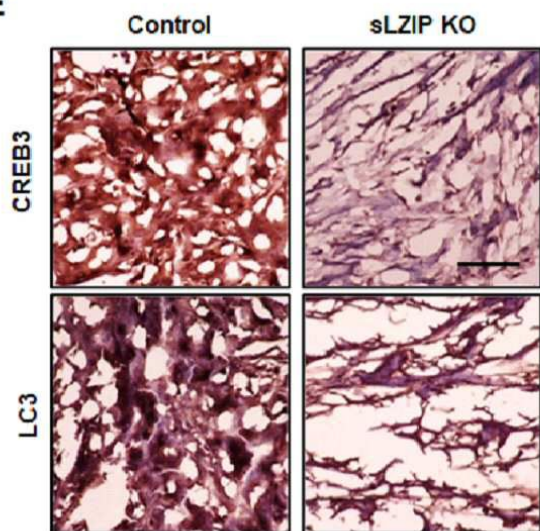
도면7d

D



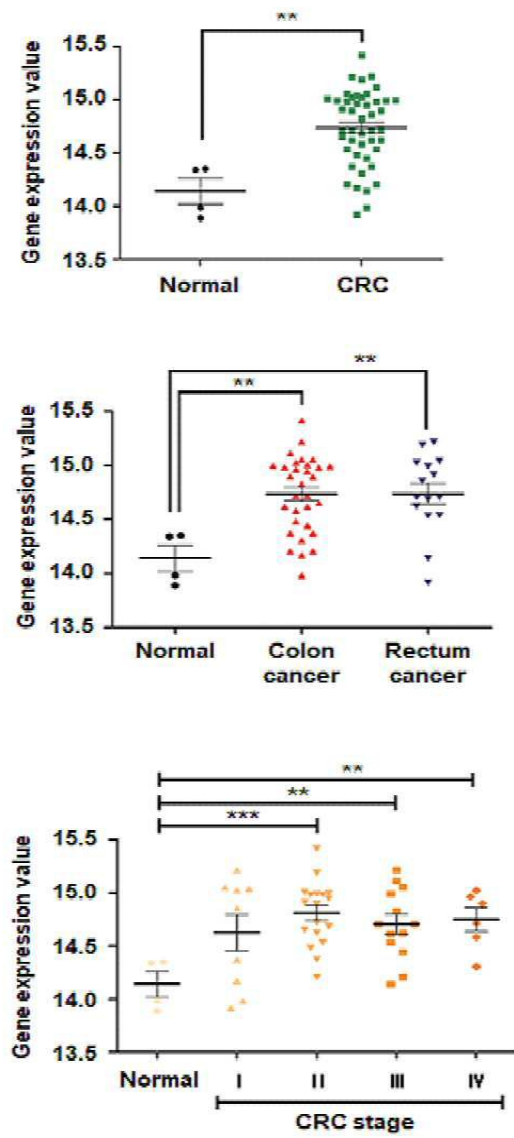
도면7e

E



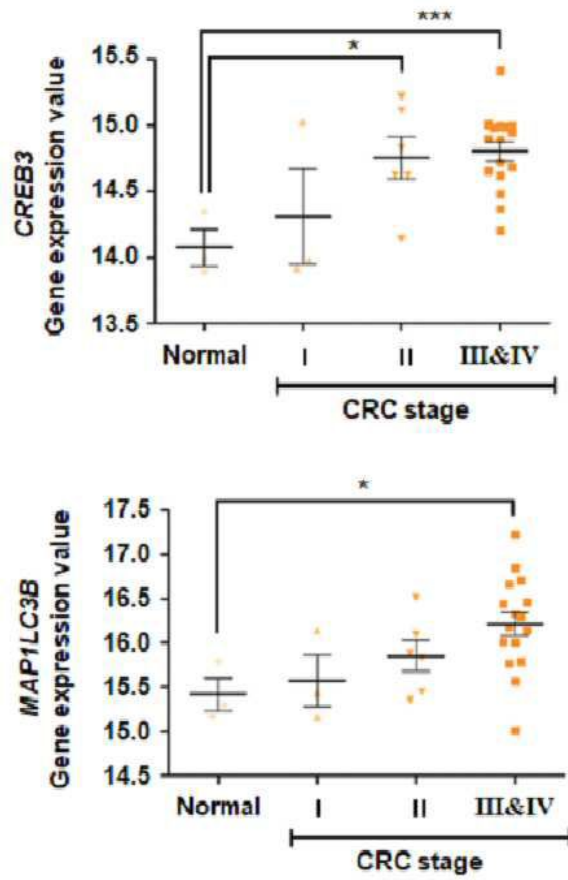
도면7f

F



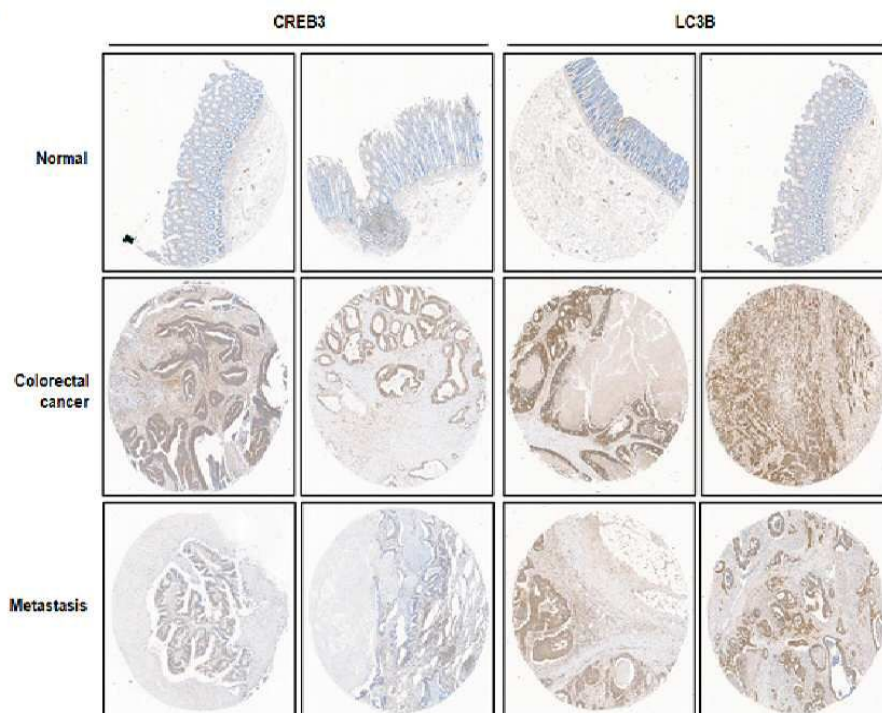
도면7g

G

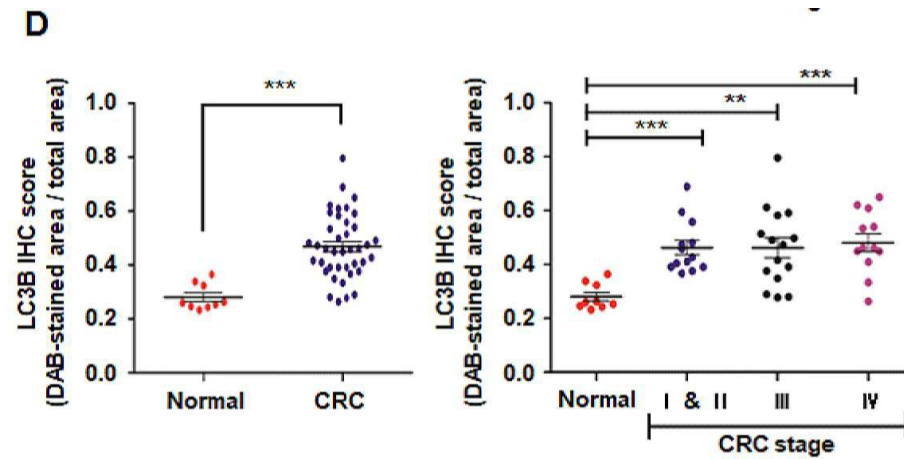


도면8a

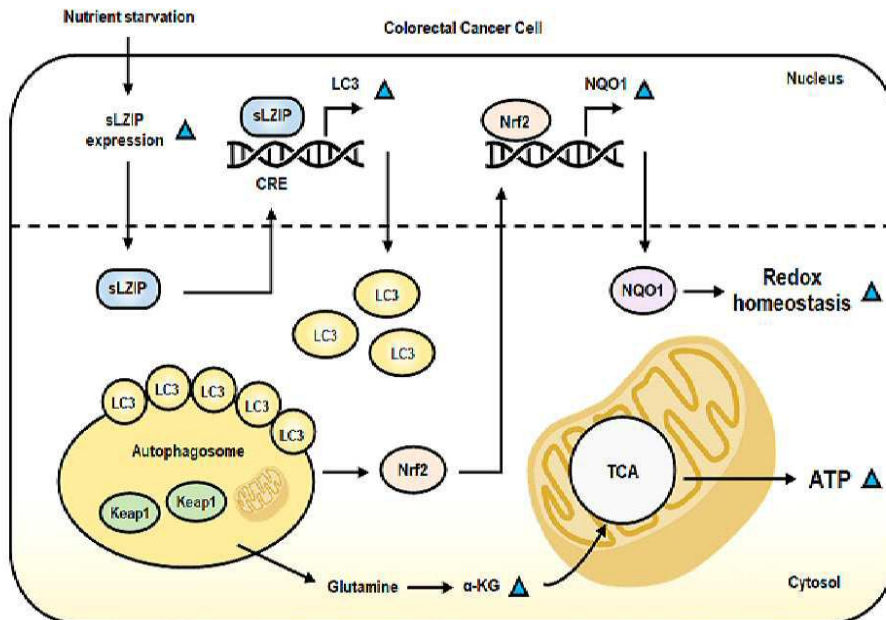
A



도면8d



도면9



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Use of leucine-zipper protein for diagnosing or treating cancer
- <130> P22U13C0203
- <160> 3
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 354
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sLZIP

<400> 1

Met Glu Leu Glu Leu Asp Ala Gly Asp Gln Asp Leu Leu Ala Phe Leu

1 5 10 15

Leu Glu Glu Ser Gly Asp Leu Gly Thr Ala Pro Asp Glu Ala Val Arg

20 25 30

Ala Pro Leu Asp Trp Ala Leu Pro Leu Ser Glu Val Pro Ser Asp Trp

35 40 45

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

50 55 60

Asn Ile Leu Ser Ser Ser Asn Pro Cys Leu Val His His Asp His Thr

65 70 75 80

Tyr Ser Leu Pro Arg Glu Thr Val Ser Met Asp Leu Glu Ser Glu Ser

85 90 95

Cys Arg Lys Glu Gly Thr Gln Met Thr Pro Gln His Met Glu Glu Leu

100 105 110

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

115 120 125

Leu Leu Glu Lys Glu Gly Leu Ile Leu Pro Glu Thr Leu Pro Leu Thr

130 135 140

Lys Thr Glu Glu Gln Ile Leu Lys Arg Val Arg Arg Lys Ile Arg Asn

145 150 155 160

Lys Arg Ser Ala Gln Glu Ser Arg Arg Lys Lys Lys Val Tyr Val Gly

165 170 175

Gly Leu Glu Ser Arg Val Leu Lys Tyr Thr Ala Gln Asn Met Glu Leu

180 185 190

Gln Asn Lys Val Gln Leu Leu Glu Glu Gln Asn Leu Ser Leu Leu Asp

195 200 205

Gln Leu Arg Lys Leu Gln Ala Met Val Ile Glu Ile Ser Asn Lys Thr

210 215 220

Ser Ser Ser Ser Met Tyr Ser Ser Asp Thr Arg Gly Ser Leu Pro Ala

225 230 235 240
Glu His Gly Val Leu Ser Arg Gln Leu Arg Ala Leu Pro Ser Glu Asp

245 250 255
Pro Tyr Gln Leu Glu Leu Pro Ala Leu Gln Ser Glu Val Pro Lys Asp

260 265 270
Ser Thr His Gln Trp Leu Asp Gly Ser Asp Cys Val Leu Gln Ala Pro

275 280 285
Gly Asn Thr Ser Cys Leu Leu His Tyr Met Pro Gln Ala Pro Ser Ala

290 295 300
Glu Pro Pro Leu Glu Trp Pro Phe Pro Asp Leu Phe Ser Glu Pro Leu

305 310 315 320

Cys Arg Gly Pro Ile Leu Pro Leu Gln Ala Asn Leu Thr Arg Lys Gly

325 330 335
Gly Trp Leu Pro Thr Gly Ser Pro Ser Val Ile Leu Gln Asp Arg Tyr

340 345 350
Ser Gly

<210> 2

<211> 1062

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sLZIP

<400> 2

atggagctgg aattggatgc tggtagacaa gacctgctgg ccttcctgct agaggaaagt 60

ggagatttgg ggacggcacc cgatgaggcc gtgagggccc cactggactg ggcgctgccg 120

ctttctgagg taccgagcga ctgggaagta gatgatttgc tgtgctccct gctgagtccc 180

ccagcgctgt tgaacattct cagctcctcc aacctctgcc ttgtccacca tgaccacacc 240

tactcctcc caccggaaac tgtctccatg gatctagaga gtgagagctg tagaaaagag 300

gggaccaga tgactccaca gcatatggag gagctggcag agcaggagat tgctaggcta 360

gtactgacag atgaggagaa gactctattg gagaaggagg ggcttattct gcctgagaca 420

cttcctctca ctaagacaga ggaacaaatt ctgaaacgtg tgcggaggaa gattcgaaat 480

aaaagatctg ctcaagagag ccgcaggaaa aagaaggtgt atgttggggg tttagagagc	540
agggtcttga aatacacagc ccagaatatg gagcttcaga acaaagtaca gcttctggag	600
gaacagaatt tgtcccttct agatcaactg aggaaactcc aggccatggt gattgagata	660
tcaaacaaaa ccagcagcag cagcatgtac tcctctgaca caagggggag cctgccagct	720
gagcatggag tgttgtcccg ccagcttcgt gccctcccca gtgaggacce ttaccagctg	780
gagctgcctg cctgcagtc agaagtgccg aaagacagca cacaccagtg gttggacggc	840
tcagactgtg tactccaggc ccctggcaac acttcctgcc tgctgcatta catgcctcag	900
gctcccagtg cagagcctcc cctggagtgg ccattccctg acctcttctc agagcctctc	960
tgccgaggtc ccatactccc cctgcaggca aatctcacia ggaagggagg atggcttcct	1020
actggtagcc cctctgtcat ttgcaggac agatactcag gc	1062
<210> 3	
<211> 19	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> si-sLZIP	
<400> 3	
ccagaugacu ccacagcau	19