



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월13일
(11) 등록번호 10-1425140
(24) 등록일자 2014년07월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/02 (2006.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 5/0735 (2010.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-0019261
(22) 출원일자 2014년02월19일
심사청구일자 2014년02월19일
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020090103964 A
- (73) 특허권자
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
- (72) 발명자
이대엽
대전광역시 유성구 배울2로 61, 1015동 802호 (관평동, 대덕테크노밸리10단지아파트)
김승균
대전광역시 중구 선화로22번길 25, 103동 1304호 (용두동, 미르마을아파트)
이호석
전라북도 전주시 완산구 덕적골2길 11, 202동 808호 (평화동1가, 평화주공2단지아파트)
- (74) 대리인
장제환, 이처영

전체 청구항 수 : 총 10 항

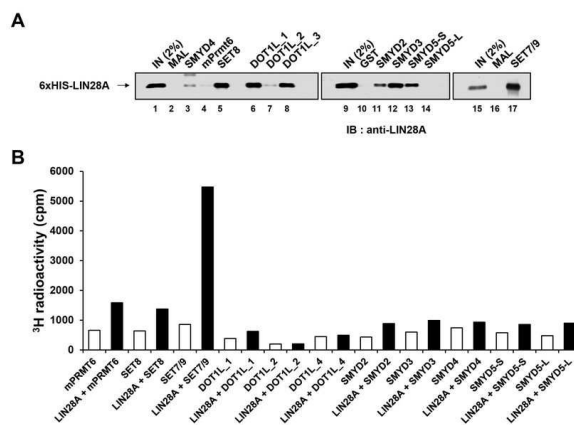
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 LIN28A 메틸화 억제제를 포함하는 줄기세포 전능화 조절용 조성물 및 LIN28A 메틸화 억제제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 LIN28A 메틸화 억제제를 포함하는 줄기세포 전능화 조절용 조성물 및 LIN28A 메틸화 억제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 Set7/9에 의해 메틸화 되는 LIN28A 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 포함하는 줄기세포 전능화 조절용 또는 암 치료용 조성물 및 상기 억제제를 스크리닝하는 방법으로, 상기 스크리닝 방법은 (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계 (b) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계 및 (c) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 조절용 조성물 또는 항암 조성물 및 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 배아줄기세포의 전분화능을 조절할 수 있는 물질 또는 항암활성이 있는 물질을 효과적으로 스크리닝 할 수 있으며, 본 발명의 방법에 의해 스크리닝된 억제제는 배아줄기세포의 전분화능을 조절하고, 암세포의 성장을 억제하여 줄기세포 분화 장애 또는 암 치료제 제조에 효과적이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012M3A9B4027953
부처명 미래창조과학부
연구사업명 줄기세포연구사업
연구과제명 후성 유전자 적중 기술을 응용한 줄기세포 후성 유전체 연구
기여율 1/1
주관기관 한국과학기술원
연구기간 2012.06.01 ~ 2017.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

SET7/9에 의한 LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 또는 LIN28A과 SET7/9의 결합을 각각 독립적으로 제어하는 억제제를 유효성분으로 포함하는 배아줄기세포 전분화능 억제용 조성물.

청구항 2

SET7/9에 의한 LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 또는 LIN28A과 SET7/9의 결합을 각각 독립적으로 제어하는 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 억제제는 LIN28A 또는 SET7/9에 특이적인 항체 또는 압타머; LIN28A 또는 SET7/9의 발현을 간섭하는 RNAi; LIN28A 또는 SET7/9의 발현을 억제하는 miRNA; 및 LIN28A 또는 SET7/9의 발현을 억제하는 천연 화합물 또는 합성 화합물 중에서 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 억제제는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 서열을 센스가닥으로 가지고 이에 대한 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥으로 이루어진 siRNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

- (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계;
- (b) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 억제물질의 스크리닝 방법.

청구항 6

- (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계;
- (b) LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 억제물질의 스크리닝 방법.

청구항 7

- (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계;
- (b) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 항암물질의 스크리닝 방법.

청구항 8

- (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계;
- (b) LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 항암물질의 스크리닝 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 물질은 천연 화합물, 합성 화합물, DNA, RNA, 펩티드, 효소, 리간드, 세포 추출물 및 포유동물의 분비물 중 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 H9, HEK293T 및 NCCIT로 이루어진 군에서 선택된 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 LIN28A 메틸화 억제제를 포함하는 줄기세포 전능화 조절용 조성물 및 LIN28A 메틸화 억제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 Set7/9에 의해 메틸화 되는 LIN28A 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 포함하는 줄기세포 전능화 조절용 또는 암 치료용 조성물 및 상기 억제제를 스크리닝하는 방법으로, 상기 스크리닝 방법은 (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계 (b) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계 및 (c) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 조절용 조성물 또는 항암 조성물 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 줄기세포 (stem cell)는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화 (differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 여러 가지 줄기세포 분류 중 만능줄기세포 (pluripotent stem cell)라 함은 생체를 구성하는 3가지 배엽 (germ layer) 모두로 분화할 수 있는 다기능성을 지닌 줄기세포를 지칭한다.

[0003] 줄기세포는 분리된 개체에 따라, 배아 (embryo)에서 분리된 경우 배아줄기세포 (embryonic stem cell, ES cell)와 성체에서 분리된 경우 성체줄기세포 (adult stem cell)로 나눌 수 있다. 또한 줄기세포는 하나의 줄기세포로부터 몇 종류의 분화된 세포를 만들어 낼 수 있는가에 따라 만능 (pluripotency), 다분화능 (multipotency) 및 단분화능 (unipotent) 줄기세포로 나눌 수 있으며, 일반적으로 배아줄기세포 (embryonic stem cell, ES cell)는 만능줄기세포로, 성체줄기세포 (adult stem cell)는 다분화능 (multipotency) 및 단분화능 (unipotent) 줄기세포로 구분할 수 있다.

[0004] 마이크로 RNA (microRNA, miRNA)는 길이가 19 내지 25개의 뉴클레오티드를 가지는 짧은 단일가닥 리보핵산 (RNA)으로, 세포내에서 발현되어 많은 유전자의 발현을 조절한다고 알려져 있다(Bartel D.P., (2004) Cell, 116(2):281-97; He L. and Hannon G.J., (2004) Nat. Rev. Genet., 5(7):522-31). 현재까지는 인간에서 약 700여종이 발견되었는데, 하나의 miRNA가 여러 종류의 mRNA를 조절하는 것이 가능하기 때문에, 인간 유전자 중의 약 30%가 miRNA에 의해 조절될 것이라고 예측되고 있다(참조: Bentwich, et al., Nat. Rev. Genet., 37(7):766-70, 2005; Berezikov, et al., Cell, 120(1):21-4, 2005; Lewis, et al., Cell, 120(1):15-20,

2005; Krek, et al., Nat. Genet., 37:495-500, 2005; Friedman, et al., Genome Res., 19:92-105, 2009). let-7 miRNA는 miRNA의 하나로 배아의 발생과 암세포 생성 등과 관련이 있으며, let-7 miRNA가 정상적으로 만들어지지 않거나 제대로 작동하지 않으면 배아 발달과정에 문제가 생기고 암이 발생할 수 있다. 미국특허공개 제 2006/0189557호에는 let-7 miRNA를 암세포에 도입하여 RAS 발암 유전자의 활성을 억제함으로써 암세포를 치료하는 방법이 개시되어 있다.

[0005] LIN28A는 보존된 RNA-결합 단백질로 이들의 발현은 동물 발생과정에서 엄격히 조절된다. LIN28A는 발생 및 특정 질병에서 중요한 역할을 한다. 예를 들어, LIN28A는 배아줄기세포에서 높게 발현되어, 인간 또는 생쥐의 fibroblast를 만능유도줄기세포 (induced pluripotent stem cells (iPSCs))로 변화시키는데 필요한 4개의 인자 중 하나이다. 지금까지 LIN28A가 어떤 기작에 의해 핵 내에서 활성화되는지 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 줄기세포의 전분화능을 조절하는 물질에 관하여 연구하던 중, 인간배아줄기세포의 LIN28A 단백질의 135번째 라이신의 메틸화가 줄기세포의 전분화능과 관련이 있으며, SET7/9과 결합하여 이 효소에 의해서 135번째 라이신이 메틸화 된 LIN28A이 let-7 miRNAs의 조절을 통하여 전분화능 조절에 영향을 미치는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 Set7/9에 의해 메틸화 되는 LIN28A 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 포함하는 배아줄기세포 전분화 조절용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 Set7/9에 의해 메틸화 되는 LIN28A 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 포함하는 암 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 조절물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 측정하는 단계; LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 조절물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 항암 물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 측정하는 단계; 및 LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 항암물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기의 목적을 달성하기 위해 본 발명은 Set7/9에 의해 메틸화 되는 LIN28A 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 포함하는 배아줄기세포 전능화 조절용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 Set7/9에 의해 메틸화 되는 LIN28A 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 포함하는 암 치료용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 조절물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 측정하는 단계; LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 조절물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 항암 물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해 본 발명은 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 측정하는 단계; 및 LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 항암물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0019] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0020] 본 발명의 용어 "줄기세포"는 뛰어난 증식력을 가지며, 신체 여러 조직으로 분화가 가능한 세포를 의미한다.
- [0021] 전분화능 (Pluripotency)이란 태어나 성체의 모든 세포로 가는 분화능을 말하며, 전분화능을 가진 줄기세포는 초기 수정란세포가 분열하면서 여러 장기로 분화되기 전 단계의 세포로써 시험관 내에서 미분화 상태로 무한히 증식시킬 수 있고, 이러한 세포는 심장, 채장, 간, 피부, 신경 등 다양한 장기로 분화가 가능하다.
- [0022] 마이크로RNA (microRNA: 이하 "miRNA"라 칭함)는 부분적으로 이중나선을 이루는 헤어핀 RNA (hairpin RNA)로부터 생성되며 특정 메신저 RNA (mRNA)에 특이적으로 결합하여 mRNA로부터 단백질이 생성되는 프로세스를 억제하는 방법으로 많은 유전자의 발현을 조절한다.
- [0023] 특히 miRNA와 암 사이에 강한 연관이 최근 증명되어 암 생물학 분야에서 새로운 연구 주제로 떠오르고 있으며 (Esquela-kerscher, A. and Slack, FJ., (2006) Nat. Rev. Cancer 6(4):259-269), miRNA의 발현이 발달과 세포분화 프로세스 중에 극적으로 변화함에 따라 miRNA의 프로파일링 (profiling)은 발달 계통과 질병 단계에서 믿을만한 결과들을 보여주었다 (Lu, J. et al., (2005) Nature 435:834-838).
- [0024] let-7 miRNA는 miRNA의 하나로 배아의 발생과 암세포 생성 등과 관련이 있으며, let-7 miRNA가 정상적으로 만들어지지 않거나 제대로 작동하지 않으면 배아 발달과정에 문제가 생기고 암이 발생할 수 있다. 미국특허공개 제 2006/0189557호에는 let-7 miRNA를 암세포에 도입하여 RAS 발암 유전자의 활성을 억제함으로써 암세포를 치료하는 방법이 개시되어 있다.

- [0025] LIN28A는 보존된 RNA-결합 단백질로 이들의 발현은 동물 발생과정에서 엄격히 조절된다. LIN28A는 발생 및 특정 질병에서 중요한 역할을 한다. 예를 들어, LIN28A는 배아줄기세포에서 높게 발현되어, 인간 또는 생쥐의 fibroblast를 만능유도줄기세포 (induced pluripotent stem cells (iPSCs))로 변화시키는데 필요한 4개의 인자 중 하나이다.
- [0026] 지금까지 LIN28A가 어떤 기작에 의해 핵 내에서 활성화되는지 밝혀진 바가 없다. 본 발명의 연구진은 135번째 라이신이 메틸화 된 LIN28A가 핵 내에 안정하게 존재하며, pri-let-7 miRNA의 프로세싱을 억제하고, 이를 통하여 전형성능, 분화능을 조절하며, 암 억제와 관련된 mature let-7 수준을 억제한다는 것을 밝혀내었다. 이와 같은 점은 본 발명에서 최초로 공개되는 것이다.
- [0027] 따라서 LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 억제하는 물질은 배아줄기세포의 전분화능을 정상화 시키며, 암세포 생성을 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [0028] SET7/9는 SETD7이라고도 불리우며, 히스톤 H3 및 p53, TAF10 및 estrogen 수용체 알파와 같은 비 히스톤 단백질을 메틸화 시키는 메틸트랜스퍼라제이다. SET7/9는 활성화된 크로마틴에서 주로 발견된다. SET7/9는 현재 주요한 번역 후 (post-translation) 모디파이어로 히스톤 단백질 뿐만 아니라, 비 히스톤 단백질의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있다.
- [0029] 본 발명의 연구진은 전술한 LIN28A의 메틸화 기작에 관하여 연구한 결과, LIN28A의 135번째 라이신이 메틸화 되는 것은 SET7/9에 의한 것이며, 이는 SET7/9와 LIN28A의 직접적인 결합에 의하여 이루어지는 것을 밝혀내었다. 이와 같은 점은 본 발명에서 최초로 공개되는 것이다.
- [0030] 따라서, LIN28A와 SET7/9의 결합 수준에 영향을 주는 물질은 배아줄기세포의 전분화능을 정상화 시키며, 암세포 생성을 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [0031] 따라서 본 발명은 Set7/9에 의해 메틸화 되는 LIN28A 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 포함하는 배아줄기세포 전능화 조절용 조성물을 제공한다.
- [0032] 또한 본 발명은 Set7/9에 의해 메틸화 되는 LIN28A 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명 방법의 '억제제'는 LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 억제하거나, LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 억제하는 특성을 가지는 것은 어떠한 것도 가능하나, 바람직하게는 생체에 적용이 가능한 것으로, 이에 한정되지 아니하나, 예를 들어 LIN28A 또는 SET7/9에 특이적인 항체, 압타머; LIN28A 또는 SET7/9의 발현을 간섭하는 RNAi; LIN28A 또는 SET7/9의 발현을 억제하는 miRNA; 및 LIN28A 또는 SET7/9의 발현을 억제하는 천연 화합물 또는 합성 화합물 일 수 있다.
- [0034] 바람직하게는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 서열을 센스가닥으로 가지고 이에 대한 상보적 서열을 포함하는 안티센스 가닥으로 이루어진 siRNA일 수 있다.
- [0035] 또한 본 발명은 (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; (b) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 (c) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 조절물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0036] 또한 본 발명은 (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; (b) LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 측정하는 단계; 및 (c) LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 배아줄기세포 전분화능 조절물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0037] 또한 본 발명은 (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; (b) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화 수준을 측정하는 단계; 및 (c) LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 항암 물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0038] 또한 본 발명은 (a) 후보물질을 LIN28A 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; (b) LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 측정하는 단계; 및 (c) LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 제어하는 억제제를 선택하는 단계를 포함하는 항

암물질 스크리닝 방법을 제공한다.

- [0039] LIN28A는 처음 선충류인 *C. elegans*에서 발견되었으며, worm에서부터 인간까지 단백질이 동족체이므로 본 발명의 배아줄기세포는 그 유래가 특별히 제한되지 아니하며, 예를들어, 선구동물 (Protostomia)과 후구동물 (Deuterostomia)을 포함하는 모든 좌우대칭동물 (Bilateria) 유래일 수 있으며, 바람직하게는 척삭동물문 (Chordata)의 동물 유래일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 포유강 (Mammalia)의 동물 유래일 수 있으며, 가장 바람직하게는 인간유래의 인간배아줄기세포일 수 있다.
- [0040] 본 발명 방법의 '물질'은 LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 억제하거나, LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 억제하는 특성을 가지는 것은 어떠한 것도 가능하나, 바람직하게는 생체에 적용이 가능한 것으로, 이에 한정되지 아니하나, 예를 들어 천연 화합물, 합성 화합물, DNA, RNA, 펩티드, 효소, 리간드, 세포 추출물 및 포유동물의 분비물 중에서 선택될 수 있다.
- [0041] 바람직하게는 LIN28A 또는 SET7/9에 특이적인 항체, 압타머; LIN28A 또는 SET7/9의 발현을 간섭하는 RNAi; LIN28A 또는 SET7/9의 발현을 억제하는 miRNA; 및 LIN28A 또는 SET7/9의 발현을 억제하는 천연 화합물 또는 합성 화합물 중에서 선택될 수 있다.
- [0042] 본 발명 방법의 LIN28A 유전자가 도입된 세포는 LIN28A 유전자가 도입되어 발현될 수 있는 세포이면 어떤 것이든 가능하나, 바람직하게는 줄기세포일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 H9, HEK293T 또는 NCCIT 세포일 수 있다.
- [0043] HEK293T 세포는 인간 태아 신장 세포를 말한다. H9 세포는 Hut 78 세포주 (ATCC TIB-161)의 derivative로 인간 배아줄기세포의 일종이다. NCCIT 세포 (ATCC CRL-2073)는 nonseminomatous germ cell tumors 유래의 줄기세포주로 seminoma 및 embryonal carcinoma의 하이브리드이다.
- [0044] 본 발명의 일실시예에서는 LIN28A를 메틸화시키는 효소를 확인하였다. 그 결과, 다양한 메틸화효소 중 SET7/9가 LIN29A에 대하여 효소활성을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0045] 본 발명의 다른 일실시예에서는 생체 내에서 LIN28A와 SET7/9가 직접적으로 반응하는지 여부를 pull-down 분석을 통하여 확인하였다. 그 결과 LIN28A와 SET7/9는 서로 직접 반응하는 것을 확인하였다.
- [0046] 본 발명의 다른 일실시예에서는 LIN28A가 SET7/9에 의해 메틸화되는 위치를 확인하기 위하여 LIN28A의 각각 다른 4개의 단편을 독립적으로 발현하여 SET7/9에 의한 메틸화를 측정하였다. 그 결과, LIN28A의 135번째 라이신 (K135)을 가지는 단편만이 메틸화가 되는 것을 확인하였다.
- [0047] 본 발명의 다른 일실시예에서는 LIN28A 내의 K135를 포함한 다양한 라이신을 각각 charge는 같지만 라이신 특이적 메틸화효소인 SET7/9에 메틸화 되지않는 알지닌(R)으로 치환한 돌연변이를 제작하여 SET7/9에 의한 메틸화 여부를 확인하였다. 그 결과, K135 돌연변이에서 SET7/9에 의한 메틸화 반응이 완전히 제거된 것을 확인하여, SET7/9가 LIN28A의 lysine135를 메틸화함을 확인하였다.
- [0048] 본 발명의 다른 일실시예에서는 LIN28A의 메틸화의 영향을 알아보기 위하여 메틸화된 LIN28A의 세포내 수준을 측정하였다. 그 결과 메틸화된 LIN28A의 세포내 안정성이 향상되며, 반감기가 증가한 것을 확인하였다.
- [0049] 본 발명의 다른 일실시예에서는 메틸화된 LIN28A의 세포내 분포를 측정하였다. 그 결과 메틸화된 LIN28A는 핵, 특히 핵소체 내에 존재하는 것을 확인하였다.
- [0050] 본 발명의 다른 일실시예에서는 메틸화된 LIN28A의 특성을 확인하기 위하여 메틸화된 LIN28A에 의한 pri-let-7 miRNA 프로세싱을 확인하였다. 그 결과 pri-let-7 miRNA 프로세싱의 억제는 메틸화된 LIN28A에 의해 일어나는 것임을 확인하였다.
- [0051] 본 발명의 다른 일실시예에서는 LIN28A 또는 SET7/9를 표적으로 하는 siRNA를 사용하여 H9 인간 배아줄기세포에

서 LIN28A 또는 SET7/9를 녹다운하는 방법으로 LIN28A의 메틸화를 억제한 효과를 확인하였다.

- [0052] 그 결과, LIN28A의 메틸화를 억제하는 경우, 메틸화된 LIN28A에 의해 강화되는 pri-let-7 miRNA 프로세싱 억제가 해소되어 mature let-7이 축적되는 것을 확인하였다.
- [0053] 또한 메틸화된 LIN28A에 의한 전사발현 프로파일링의 변화를 분석한 결과, 메틸화된 LIN28A의 억제에 의해 초기 계통 마커들 (early lineage markers)의 발현이 증가하는 것을 확인하였으며, 메틸화된 LIN28A은 let-7 miRNA를 특이적으로 조절함으로써 전형성능과 분화능을 조절하는데 중요한 기능을 하는 것을 확인하였다.
- [0054] 이와 같이, LIN28A의 135번째 라이신의 메틸화를 억제하거나, LIN28A과 SET7/9의 결합 수준을 억제하는 물질은 배아줄기세포의 전분화능을 조절하거나, 암세포 생성을 억제할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 조성물은 본 발명의 방법에 의해 스크리닝 된 억제제를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0056] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 물질을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 유효한 양"이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 암을 치료하기에 충분한 양을 말한다.
- [0057] 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.
- [0058] 상기 암은 그 종류가 특별히 제한되지 아니하며, 예를 들어 유방암, 대장암, 폐암, 소세포폐암, 위암, 간암, 혈액암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암, 질암, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체 선종 일 수 있다.
- [0059] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 물질은 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조될 수 있다.
- [0060] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 상기 화학식 1의 아릴 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들어, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들어 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0061] 비 경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비 수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다.
- [0062] 본 발명의 치료용 조성물은 임의의 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Alfonso, R., ed, Mack Publishing Co. (Easton, PA: 1995))와 바람직한 순도를 갖는 본 발명의 물질을 혼합하여 저장하기 위해 동결건조된 케이크 또는 수용액의 형태로 제조할 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충용액, 예를 들어 인산, 시트르산 및 다른 유기산; 아스코르브산을 비롯한 항산화제; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신; 단당

류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 다른 탄수화물; 킬레이트제, 예를 들어 EDTA; 당 알콜, 예를 들어 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 및 (또는) 비이온성 계면활성제, 예를 들어 트윈, 플루로닉스 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 포함된다.

[0063] 또한, 본 발명의 물질의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로 0.01 - 100 mg/kg/일이며, 바람직하게는 0.1 - 20 mg/kg/일이며, 또한 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0064] 본 발명의 조성물의 투여 경로는 공지된 방법, 예를 들어 정맥 내, 복강 내, 뇌 내, 피하, 근육 내, 안내, 동맥 내, 뇌척수 내, 또는 병변 내 경로에 의한 주사 또는 주입, 또는 하기 기재된 서방성 (sustained release) 시스템에 의한 주사 또는 주입이다. 바람직하게는 전신으로 투여될 수 있다.

[0065] 본 발명의 약학적 조성물은 암 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0066] 따라서, 본 발명의 방법은 배아줄기세포의 전분화능을 조절할 수 있는 물질 또는 항암활성이 있는 물질을 효과적으로 스크리닝 할 수 있으며, 본 발명의 방법에 의해 스크리닝 된 물질은 배아줄기세포의 전분화능을 조절하고, 암세포의 성장을 억제하여 줄기세포 분화 장애 또는 암 치료제 제조에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 다양한 히스톤 메틸트랜스퍼라제와 LIN28A의 in vitro pull-down assay 결과이다.

1A : LIN28A와 다양한 히스톤 메틸트랜스퍼라제의 interaction을 확인하기 위한 in vitro pull-down assay 결과이다. Pull-down assay는 4℃에서 수행되었으며, 결합 버퍼로 4회 세척되었다. 결합된 샘플은 SDS-PAGE로 분석되어, 그림에 표시된 항체로 면역블롯 분석을 하였다.

1B : In vitro 메틸트랜스퍼라제 assay 결과이다. MAL-mPRMT6, MAL-SET8, MAL-SET7/9, MAL-DOT1L (1-467), (468-1002), (1-1002), GST-SMYD2, GST-SMYD3, MAL-SMYD4, GST-SMYD5-S, 및 GST-SMYD5-L의 다양한 히스톤 메틸트랜스퍼라제를 박테리아 발현 시스템에서 정제하여 full-length 6xHIS-LIN29A 및 [³H] SAM과 반응시켰다.

도 2는 LIN28A의 SET7/9 메틸화 관련성에 관한 실험결과이다.

2A : H9 세포주에서 발현한 endogenous LIN28A와 SET7/9의 면역침강 결과이다.

2B : HEK293T 세포주에서 발현한 SET7/9와 LIN28A의 면역침강 결과이다.

2C : LIN28A와 SET7/9의 다른 라이신 메틸화 타겟 단백질의 서열 비교 결과이다.

2D : LIN28A의 K135 메틸화 단백질에 특이적으로 결합하는 항체의 특이도 실험 결과이다. LIN28A-K135-me0 (K135에 메틸화 되지 않은 펩타이드) 및 LIN28A-K135-me1 (K135에 메틸화 된 펩타이드)에 대한 항-LIN28A-K135-me0 항체 또는 항-LIN28A-K135-me1 항체의 닛블롯 실험 결과로 loading control은 Ponceau S 염색으로 확인되었다.

2E : FLAG표지 LIN28A 야생형 또는 FLAG표지 LIN28A-K135R 돌연변이를 과발현한 HEK293T 세포의 과쇄물에서 항-LIN28A-K135-me1 항체로 면역블롯하여 단일 메틸화된 LIN28A (mono-methylated LIN28A)를 검출한 결과이다. 단일 메틸화된 LIN28A는 항-LIN28A-K135-me1 항체로 검출되는 것을 확인하였다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다.

도 3은 LIN28A와 SET7/9의 결합에 관련된 실험 결과이다.

3A : NCCIT 세포주 유래의 endogenous LIN28A와 SET7/9를 면역침강한 결과이다. 세포의 과쇄물을 항 IgG 또는 항 LIN28A와 4℃에서 면역침강하였다. SET7/9의 역 면역침강도 시행되었다. 면역침강된 샘플을 SDS-PAGE로 분리하여 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다.

3B : HEK293T 세포를 FLAG-SET7/9 및 HA-LIN28A를 발현하는 벡터로 형질감염하여, 48시간 배양 후 세포 과쇄물을 수득하여 항-FLAG 아가로즈에서 4°C에서 면역침강 하였다. 면역침강 된 샘플을 SDS-PAGE로 분리하여 그림 오른쪽에 기재된(IB) 항체로 면역블롯 하였다.

3C : HA-LIN28A를 발현하는 벡터로 형질감염된 HEK293T 세포를 3B와 같이 배양하여 LIN28A로 면역침강한 결과 및 SET7/9로 역면역침강한 결과이다.

3D : 다양한 동물의 LIN28A 내의 K135 및 주위 서열을 비교한 결과이다(Hs, Homo sapiens; Mm, Mus musculus; Xl, Xenopus laevis; Dm, Drosophila melanogaster; Ce, Caenorhabditis elegans). CCHC 모티프가 표시되어 있다. 서열비교는 ClustalW2 multiple sequence alignment program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>) 및 the GENEDOC software로 수행되었다.

도 4는 LIN28A와 SET7/9의 유전자 모식도 및 이들의 단편을 제작한 결과이다.

4A : LIN28A와 LIN28B의 완전한 형태의 구조 및 제작된 단백질 단편들의 모식도이다.

4B : SET7/9 단백질의 완전한 형태의 모식도이다.

4C : 실험을 위하여 제작된 재조합 단백질의 확인 결과이다. MAL-LIN28A, MAL-LIN28A (1-124), (69-209), (125-209), 6xHIS-LIN28A, 6xHIS-LIN28A (1-124), (69-209), (125-209), (125-156), (157-209) 및 6xHIS-LIN28A-K135R이 제작되었으며, 이들은 모두 SDS-PAGE로 분리되어 그 크기는 쿠마시 블루로 염색하여 확인하였다.

4D : 실험을 위하여 제작된 재조합 단백질의 확인 결과이다. GST, GST-SET7/9, GST-SET7/9 (1-207), GST-SET7/9 (208-367), MAL, MAL-SET7/9, 및 SET7/9가 제작되었으며, 이들은 모두 SDS-PAGE로 분리되어 쿠마시 블루로 염색하여 확인하였다.

4E : 재조합 인간 코어 히스톤 (rC/H) 및 HeLa long 올리고뉴클레오타이드 (LON)의 SDS-PAGE로 분리 후 쿠마시 블루로 염색한 결과이다.

도 5는 in vitro에서 SET7/9와 LIN28A의 결합을 확인한 실험 결과이다.

5A 및 5B : interacting 도메인을 메핑하기 위한 in vitro pull-down assay 실험 결과이다. GST, MAL, 또는 6xHIS가 융합된 full-length 또는 단편의 단백질을 4°C에서 반응시킨 다음, 4회 세척 후 SDS-PAGE로 결합한 샘플을 분리하고, 표시된 (IB) 항체로 면역블롯하여 확인하였다.

5C : in vitro 메틸트랜스퍼라제 분석 결과이다. [³H] SAM을 methyl donor로 하여 박테리아에서 발현된 재조합 full-length SET7/9를 full-length LIN24A 또는 rC/H와 반응시켰다. 방사능 촬영결과 (위 그림) 및 Ponceau S 염색 결과 (아래)가 메틸화 및 단백질 수준을 각각 표시한다. 재조합 인간 코어 히스톤 (rC/H)은 positive control로 사용되었다.

5D : 6xHIS-tagged LIN28A 단편을 이용한 in vitro 메틸트랜스퍼라제 분석 결과이다. LIN28A (1-124), (125-209), (125-156), 및 (157-209)이 SET7/9와 함께 실험되었으며, 재조합 인간 코어 히스톤 (rC/H)은 positive control로 사용되었다.

5E : full-length 6xHIS-LIN28A를 이용한 라이신이 알지닌으로 각각 치환된 K78R, K88R, K98R, K99R, K102R, K125R, K127R, K131R, K135R, K150R 및 K153R의 full-length SET7/9를 이용한 in vitro 메틸트랜스퍼라제 분석 결과이다.

도 6은 SET7/9에 의한 LIN28B 및 DOT1L에 의한 LIN24A의 라이신 잔기의 메틸화 실험 결과이다.

6A : in vitro 메틸트랜스퍼라제 분석 결과이다. [³H] SAM을 methyl donor로 하여 박테리아에서 발현된 재조합 full-length SET7/9를 full-length 6xHIS-LIN24A 또는 -LIN28B와 반응시켰다. 방사능 촬영결과 (위 그림) 및 Ponceau S 염색 결과 (중간 그림)가 메틸화 및 단백질 수준을 각각 표시한다. 재조합 인간 코어 히스톤 (rC/H)은 positive control로 사용되었다. 밴드의 농도는 LIN28A 또는 LIN28B 메틸화 신호 농도를 사용된 단백질의 밴드 농도로 일반화한 임의 유닛 (arbitrary unit) 으로 측정되었다 (아래 그림).

6B : Sf-21 곤충 세포 기반 baculovirus 발현 시스템에 의한 full-length DOT1L을 full-length 6xHIS-LIN24A와 반응시킨 in vitro 메틸트랜스퍼라제 분석 결과이다. 방사능 촬영결과 (위 그림) 및 Ponceau S 염색 결과 (아래

그림)가 메틸화 및 단백질 수준을 각각 표시한다. LON은 positive control로 사용되었다.

도 7은 SET7/9가 라이신 메틸화를 통하여 LIN28A의 안정성을 높이는 것에 관한 실험 결과이다.

7A : HEK293T세포를 FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R을 단독 또는 HA-SET7/9와 함께 발현하는 벡터로 형질 감염 하였다. 48시간 동안 배양 후 세포 파쇄물을 수득하여 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다 (오른쪽그림).

7B : HEK293T세포를 FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R을 단독 또는 HA-SET7/9와 함께 발현하는 벡터로 형질 감염하였다. 24시간 동안 배양 후 세포를 60 마이크로그램/밀리리터 ($\mu\text{g/ml}$)의 cycloheximide (CHX)로 처리하고, CHX 처리 0, 4, 8, 12 시간 후 세포 파쇄물을 회수하여 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다. 3번의 독립된 반복 실험 중 대표적인 결과가 상단 panel에 표시되었으며, 아래 panel은 정량 결과 그래프이다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

7C : HA-SET7/9가 과 발현되거나, endogenous SET7/9가 siRNA (100nM)에 의해 감소된 H9 세포의 파쇄물을 이용한 면역블롯 결과이다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다.

도 8은 SET7/9가 LIN28A의 분해를 억제하는 것에 관한 실험결과이다.

8A 및 8B : HEK293T세포를 FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R을 단독 또는 HA-SET7/9와 함께 발현하는 벡터로 형질감염 하였다. Real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR)을 통하여 LIN28A 및 SET7/9의 mRNA 수준을 측정하였다. 발현 수준은 GAPDH의 발현수준으로 보정 (Normalization)되었다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

8C : HEK293T세포를 FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R을 단독 또는 HA-SET7/9와 함께 발현하는 벡터로 형질 감염하였다. 24시간 동안 배양 후 세포를 0, 20, 40, 60 마이크로그램/밀리리터 ($\mu\text{g/ml}$)의 cycloheximide (CHX)로 처리하고, CHX 처리 12 시간 후 세포 파쇄물을 회수하여 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다. 3번의 독립된 반복 실험 중 대표적인 결과가 표시되었다.

8D : HA-SET7/9가 과 발현되거나, endogenous SET7/9가 siRNA (100nM)에 의해 감소된 NCCIT 세포의 파쇄물을 이용한 면역블롯 결과이다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다.

도 9는 메틸화된 LIN28A가 주로 핵에 존재하는 것에 관한 실험 결과이다.

9A : HEK293T세포를 FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R을 발현하는 벡터로 형질감염 하였다. 세포의 핵 또는 세포질의 생화학적 분획을 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다. H3은 핵의 마커로 사용되었다. α -tubulin은 세포질의 마커로 사용되었다. 정량적 결과는 밴드 농도를 임의의 단위 (arbitrary unit)으로 나타내었다 (오른쪽 panel). Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

9B : H9 세포의 핵 또는 세포질의 생화학적 분획으로부터 endogenous LIN28A를 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다. H3은 핵의 마커로 사용되었다. α -tubulin은 세포질의 마커로 사용되었다.

9C : H9 세포의 핵소체 또는 핵질질의 생화학적 분획을 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다. Fabrilin은 핵소체의 마커로 사용되었다.

9D : H9 세포의 endogenous LIN28A, LIN28A-me1, Fabrilin, 및 SET7/9를 면역형광분석법으로 촬영한 결과이다.

9E : 왼쪽 panel은 EGFP control 또는 SET7/9를 siRNA로 knockdown한 H9세포의 면역형광분석 결과 사진이다. scale bar는 50 마이크로미터 (μm)를 나타낸다. 면역블롯 (오른쪽 panel)은 endogenous SET7/9가 siRNA에 의해 억제된 H9 세포의 파쇄물을 사용하여 실시되었다.

도 10은 NCCIT 세포주에서 메틸화된 LIN28A의 분포에 관한 실험 결과이다.

10A : EGFP-LIN28A, EGFP-LIN28A-K135R, EGFP-SET7/9, 및 EGFP 벡터가 과발현된 HEK293T세포의 면역형광분석이다.

10B : NCCIT 세포의 핵 또는 세포질의 생화학적 분획으로부터 endogenous LIN28A를 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다. H3은 핵의 마커로 사용되었다. α -tubulin은 세포질의 마커로 사용되었다.

10C : NCCIT 세포의 endogenous LIN28A, LIN28A-me1, 및 SET7/9를 면역형광분석한 결과이다. scale bar는 50

마이크로미터 (μm)를 나타낸다.

10D : LIN28A의 K135 및 주위 시퀀스와 LIN28B의 NoLS 부위 시퀀스의 비교 분석 결과이다. 비교분석은 ClustalW2 multiple sequence alignment program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>)과 GENEDOC software로 수행되었다.

도 11은 메틸화된 LIN28A가 pri-let-7 miRNA의 processing을 저해하는 활성화 형태임을 확인한 실험 결과이다.

11A : HEK293T 세포를 인간 pri-let-7a-1 (primary let-7a-1)과 FLAG-LIN28A, FLAG-LIN28A-K135R, 또는 FLAG-AGO2와 the firefly luciferase gene (let-7aBS-Luc, let-7a의 three binding sites를 포함함) 및 the renilla (pRL-CMV)가 포함된 발현벡터로 공형질감염 시켰다. RT-qPCR을 통하여 let-7aBS-Luc, pri-let-7a-1, 및 mature let-7a-1의 상대적인 발현 수준을 측정하였다. the firefly 유전자의 3' UTR은 3개의 let-7a 결합부위를 가지고 있다. firefly luciferase의 signal은 우선 renilla의 signal로 보정되었다. 각 수치는 GAPDH의 수치로 보정되었다. U6 snRNA는 mature let-7a-1 수준의 reference로 사용되었다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

11B : 도면에 표시된 바와 같이 HEK293T를 벡터로 공형질감염시켰다. RT-qPCR을 통하여 miR-16BS-Luc (miR-16에 대한 하나의 결합부위를 가지고 있음), pri-miR-16-1 및 mature miR-16-1의 상대적인 발현 수준을 측정하였다. 각 수치는 11A에 기재한 바와 같이 보정되었다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

11C : H9세포에서 control, LIN28A, 또는 SET7/9의 knockdown에 따른 endogenous primary (위쪽 panel) 또는 mature (아래쪽 panel) let-7a family 및 control miRNA 수준 변화를 RT-qPCR로 측정한 결과 그래프이다. GAPDH 및 U6 snRNA가 primary 및 mature miRNA의 reference로 각각 사용되었다.

도 12는 LIN28A의 let-7 miRNA의 processing 과정 억제는 메틸화 신호에 의한 것이라는 실험 결과이다.

12A : FLAG-LIN28A, FLAG-LIN28A-K135R, 또는 FLAG-AGO2를 도면에 표시된 바와 같이 renilla 및 firefly luciferase 유전자와 함께 pri-let-7a-1과 함께 HEK293T 세포에 공형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간 후 세포 파쇄물을 그림 왼편에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다.

12B : FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R을 도면에 표시된 바와 같이 renilla 및 firefly luciferase 유전자와 함께 pri-miR-16-1과 함께 HEK293T 세포에 공형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간 후 세포 파쇄물을 그림 왼편에 기재된 (IB) 항체로 면역블롯 하였다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다.

12C : 벡터들을 도면에 표시된 바와 같이 HEK293T 세포에 공형질감염시켰다. pri-let-7g 및 mature let-7g의 상대적 발현 수준을 측정하기 위하여, RT-qPCR을 실시하였다. GAPDH 및 U6 snRNA가 primary 및 mature miRNA의 reference로 각각 사용되었다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

12D : 벡터들을 도면에 표시된 바와 같이 HEK293T 세포에 공형질감염 시켰다. 세포 파쇄물로 그림 왼편에 기재된 (IB) 항체를 이용하여 면역블롯 하였다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다.

12E : control, FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R을 도면에 표시된 바와 같이 HEK293T 세포에 공형질감염 시켰다. LIN28A mRNA 수준을 측정하기 위하여 RT-qPCR을 실시하였다. 각 발현 수준은 GAPDH의 발현 수준으로 보정하였다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

12F : HEK293T 세포에서의 FLAG-LIN28A, 또는 FLAG-LIN28A-K135R에 의한 endogenous primary (위 panel) 또는 mature (아래 panel) let-7a family 및 control의 miRNA 수준 변화를 RT-qPCR로 측정한 결과이다. GAPDH 및 U6 snRNA가 primary 및 mature miRNA의 reference로 각각 사용되었다.

도 13은 Pri-let-7이 내핵형 (nuclear form) LIN28A에 친화도를 보인다는 실험 결과이다.

13A : in vitro RNA pull-down assay결과이다. FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R로 형질감염 된 HEK293T 세포로부터 핵 추출물을 분획하여 let-7a-1 또는 miR-16-1 RNA와 4°C에서 반응시켰다. S와 B는 각각 상등액 (supernatant)과 비드 (또는 결합된) 분획을 의미한다. let-7a-1에 결합된 LIN28A의 signal의 정량적 결과는 밴드 농도의 임의의 유닛으로 표시하였다 (오른쪽 panel). Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

13B : RNA 면역침강 분석 (RIP) 결과이다. 13A에서와 같이 형질감염 된 HEK293T 세포의 핵과 세포질의 생화학적

분획을 도면에 표시된 항체를 이용하여 RIP 분석하였다. 모든 signal은 input signal로 보정하였다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

도 14는 LIN28A가 SET7/9 mRNA에 결합하여 이의 번역을 촉진하는 것에 관한 실험결과이다.

14A : RNA 번역침강 분석 (RIP) 결과이다. FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R 발현벡터로 HEK293T 세포를 형질감염 시켰으며, RIP 분석은 anti-LIN28A 또는 anti-mel 항체로 수행하였다. 모든 signal은 input으로 보정하였다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

14B : LIN28A와 SET7/9의 3'UTR의 LIN28A 결합 모티브를 나타낸다.

14C : HEK293T 세포를 control, FLAG-LIN28A 또는 FLAG-LIN28A-K135R 발현 벡터로 형질감염 시켰다. RT-qPCR로 LIN28A, SET7/9의 mRNA 수준을 측정하였다. 각 발현 수준은 GAPDH의 발현수준으로 보정하였다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

14D : 세포 파쇄물로 그림 왼쪽에 기재된 (IB) 항체를 이용하여 번역블롯 하였다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다 (왼쪽 panel). SET7/9 signal의 정량적 결과는 밴드 농도의 임의의 유닛으로 표시하였다 (오른쪽 panel). Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

도 15는 LIN28A 및 SET7/9가 H9 세포주에서 다형성 조절에 관여하는 것에 관한 실험 결과이다.

15A : control, LIN28A 또는 SET7/9 siRNA를 H9 세포에 형질감염 시켰다. mRNA 수준을 RT-qPCR로 측정하였다. 발현 수준은 GAPDH의 발현수준으로 보정하였다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

15B : control, LIN28A 또는 SET7/9 siRNA를 H9 세포에 형질감염 시켰다. 세포 파쇄물을 SDS-PAGE로 분리하여 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 번역블롯 하였다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다.

15C : 대표적인 유전자들의 정량적 비교 결과이다. siRNA들은 15A에서와 같이 H9 세포에 형질감염 되었다. WINT3 및 T (mesoderm differentiation에 관련됨), GATA4 및 FOXA2 (endoderm differentiation에 관련됨), 그리고 PAX6 및 Nestin (ectoderm differentiation에 관련됨) 등의 초기 계통 (lineage) 마커들의 mRNA 수준이 RT-qPCR로 측정되었다. 각 발현 수준은 GAPDH의 발현수준으로 보정하였다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

도 16은 내핵형 LIN28A가 NCCIT 세포의 다형성 조절에 중요하다는 것에 관한 실험 결과이다.

16A : control, LIN28A 또는 SET7/9 siRNA를 NCCIT 세포에 형질감염 시켰다. mRNA 수준을 RT-qPCR로 측정하였다. 발현 수준은 GAPDH의 발현수준으로 보정하였다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

16B : control, LIN28A 또는 SET7/9 siRNA를 NCCIT 세포에 형질감염 시켰다. 세포 파쇄물을 SDS-PAGE로 분리하여 그림 오른쪽에 기재된 (IB) 항체로 번역블롯 하였다. 베타-액틴은 loading control로 사용되었다.

16C : 대표적인 유전자들의 정량적 비교 결과이다. siRNA들은 16A에서와 같이 NCCIT 세포에 형질감염 되었다. 초기 계통 (lineage) 마커들의 mRNA 수준이 RT-qPCR로 측정되었다. 각 발현 수준은 GAPDH의 발현수준으로 보정하였다. Error bar는 3번의 독립된 반복실험의 표준편차를 나타낸다.

도 17은 LIN28A 및 SET7/9가 결핍된 hESC에서의 expression profile에 관한 실험 결과이다.

17A : 두 번 반복된 microarray 실험의 LIN28A- 또는 SET7/9-siRNA 대 EGFP-siRNA의 MA plot이다. M 및 A 축은 농도의 로그 값 (배수 변화)과 평균 로그 농도를 각각 나타낸다. 붉은 점은 각 반복실험에서 LIN28A 또는 SET7/9의 knockdown에 의해 control (EGFP-siRNA) 보다 3배 또는 그 이상 변화한 전사체를 나타낸다.

17B : 각 반복실험에서 LIN28A-siRNA (x 축)과 SET7/9-siRNA (y 축)의 유전자 발현 변화 (\log_2 비율)를 비교한 산포도 (scatter plot)이다.

17C : LIN28A- 또는 SET7/9-siRNA에 의하여 변화하는 유전자와 관련된 유전자 온톨로지 (gene ontology) 관점의 생물학적 process이다. 양쪽 반복 실험에서 3배 또는 그 이상 변화한 유전자가 선택되었다.

17D : microarray 분석을 통하여 결정된 LIN28A 및 SET7/9가 결핍된 hESC의 대표적인 초기 계통 마커 (early lineage marker)의 발현 수준 비교 그래프이다. 변화값의 배수 (\log_2) 및 상위 점수의 유전자의 발현 수준이 기

재되어 있다.

도 18은 다르게 발현된 유전자의 유전자 set 분석 및 let-7 target 유전자의 발현 변화에 대한 실험결과이다.

18A, 18B, 18C : LIN28A 및 SET7/9의 siRNA에 의한 knockdown로 인하여 3배 이상의 변화를 보이는 유전자가 관여하는 유전자 온톨로지 (GO, gene ontology) 관점의 생물학적 process이다. 상위 20개의 GO 생물학적 process가 각 그룹별로 표시되어 있다.

18D : microarray 분석을 통하여 결정된 LIN28A 및 SET7/9가 결핍된 hESC에서 let-7 target 유전자의 발현 수준 그래프이다. 변화값의 배수 (log2) 및 let-7 target 유전자의 발현 profile이 표시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하, 본 발명을 실시 예에 의하여 상세히 설명한다.

[0069] 단, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시 예에 한정되는 것은 아니다.

[0070] <실험방법>

[0071] 본 실험에 사용된 방법은 다음과 같다.

[0072] **세포주**

[0073] 인간 배아 줄기세포의 배양은 기존 보고에서 언급한 대로 실시하였다 (Rho et al., (2006) Hum Reprod 21, 405-412). 간단히 설명하면, H9 세포는 20% knockout serum replacement, 1% 비필수 아미노산, 1% 페니실린-스트렙토마이신 (Invitrogen)를 첨가한 Dulbecco modified Eagle medium (DMEM)/F12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) 배지에 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (Invitrogen, Carlsbad USA), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma, USA)을 첨가한 배아줄기세포 배양배지를 사용하고 mitomycin C (Sigma, St Louis, MO)를 처리한 mouse embryonic fibroblast (mct-MEFs)와 함께 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0074] NCCIT 세포와 HEK293T 세포는 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone)과 1% antibiotic-antimycotic solution (Hyclone)을 첨가한 RPMI 1640 (Gibco)와 DMEM (Hyclone)을 각각 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0075] **시험관 내 메틸 전달 효소 분석**

[0076] 시험관 내 메틸 전달 효소 분석은 기존 보고에 언급한 대로 실시하였다 (Shi et al., (2006) Nature 442, 96-99). 간단히 설명하면, 재조합 인간 메틸 전달 효소를 bacterial expression system으로부터 정제하여 얻었고, 재조합 full-length DOT1L 단백질은 baculovirus expression system (Kim et al., (2013) J Biol Chem 287, 39698-39709)으로부터 얻었다. 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5% glycerol, 20 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF, 1 마이크로큐리 (μCi) [³H] methyl S-adenosyl-methionine ([³H] SAM; LuCi, Amersham Biosciences)가 들어있는 용액 20 마이크로리터 (μl)에 정제한 재조합 표적 단백질, 재조합 인간 코어히스톤(rC/H), 또는 HeLa long oligonucleosomes (LON) 을 각각 500 ng 씩 녹여 30°C에서 3시간 동안 둔다.

[0077] 이후, SDS 완충액을 첨가하여 반응을 멈추고 14% SDS-PAGE하여 분리하여 그 결과를 radiography로 확인한다.

[0078] **단백질 정제 및 in vitro pull-down assay**

[0079] GST와 GST 융합 단백질을 E. coli (Rosetta 2)에서 발현하여 정제하였고, 일부 수정하여 제조사의 지침에 따라 시행하였다 (Novagen). 간략히 설명하면, 소량 정제를 위해 GST와 GST 융합 단백질을 0.5 mM IPTG (Isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside)에 의해 37°C에서 3 시간 동안 유도 발현하였고, 회수한 세포를 cell lysis/washing buffer (40 mM HEPES-NaOH, pH 7.4, 350 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 0.1% Tween-20, 1mM PMSF/Protease inhibitors)에 재현탁하고 초음파 처리하였다. 이후, 14,000 rpm, 4°C 조건으로 20 분동안 원심분리하여 얻은 맑은 세포 glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare)와 함께 4°C에서 2시간 동안 반응

하였다. 단백질과 결합한 bead는 cell lysis/washing buffer로 3번 강하게 수세하고 GST 융합 단백질은 GST elution buffer (100 mM Tris-Cl, pH 8.0, 20 mM Glutathion)로 용출하고 dialysis buffer (25 mM Tris-Cl, pH 8.0, 및 20% (v/v) glycerol)에 투석하였다. 정제된 단백질은 시험관내 pull-down 분석에 사용하였다. MBP와 MBP융합 단백질은 상기 기재한 방법으로 발현하고 MAL elution buffer (20 mM Tris-Cl, pH 7.5, 200 mM NaCl, 10 mM Maltose, 1 mM ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA))를 사용하여 제조사의 지침에 따라 정제하였다(New England Biolabs, Inc.). 6xHIS-융합 단백질은 상기 기재한 방법으로 발현하고 TALON lysis/washing buffer (8 M Urea, 50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF/Protease inhibitors)로 수세하였다. 이후, TALON elution buffer (7.2 M Urea, 45 mM sodium phosphate, pH 7.0, 270 mM NaCl, 150 mM Imidazole)로 용출하였고, dialysis buffer I (1 M Urea, 50 mM Tris-Cl, pH 10.5, 200 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol) 과 dialysis buffer II (5 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol)로 제조사의 지침에 따라 투석하였다 (Clontech).

[0080] 정제된 GST 융합 단백질, MAL 융합 단백질, 6xHIS 융합 단백질은 pull-down buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 10% glycerol, 1 mM EDTA, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 20 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF/Protease inhibitors)에 넣고 4°C에서 1시간동안 반응하였다. 이후, glutathione-Sepharose 4B beads 또는 amylose resin (New England Biolabs, Inc.)를 넣고 1시간 동안 더 반응시킨 후, 결합한 단백질 복합체를 binding buffer로 4번 수세하여 SDS-PAGE 분리한 후, immunoblot법으로 분석하였다.

[0081] **면역침강법 및 웨스턴블롯 분석법**

[0082] TurboFect in vitro (Thermo)를 이용하여 HEK293T을 형질전환 하였고, 형질전환에 사용된 plasmid는 Qiagen midiprep procedure (Qiagen)를 통해 얻었다. 형질전환한지 24시간 후에 형질전환 시킨 HEK293T 또는 H9과 형질전환하지 않은 NCCIT를 EBC buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NonidetP-40, 50 mM NaF, 200 마이크로몰 (μ M) sodium orthovanadate, 1mM PMSF/Protease inhibitors)를 사용하여 세포용해하고, FLAG M2 agarose beads (Sigma-Aldrich, A2220) 또는 해당 antibody 들과 protein G-agarose (GE Healthcare) 혼합액과 함께 4°C에서 3시간동안 교반하며 반응하였다. 침전된 단백질 복합체는 EBC buffer로 3번 수세한 후, SDS 완충액에 넣어 5분 동안 끓이고 SDS-PAGE하여 분리한 후, immunoblot법으로 분석하였다.

[0083] **항체**

[0084] LIN28A-K135-me0, LIN28A-K135-me1, H3를 인식하는데 사용한 항체는 이전 문헌 (Kim et al., (2013) J Biol Chem 287, 39698-39709; Oh et al., (2010) Biochem Biophys Res Commun 399, 512-517)에 언급된 대로 실험실에서 제작한 polyclonal rabbit antibody 들이다. LIN28A (Cell signaling, 5930S), SET7/9 (Santa Cruz Biotechnology, sc-56774), GST (Santa Cruz Biotechnology, sc-138), α -tubulin (Cell signaling, 2144), FLAG (Sigma-Aldrich, F1804), β -actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778), OCT4 (Santa Cruz Biotechnology, sc-9081), NANOG (Cell signaling, 3580), SOX2 (Cell signaling, 3579), Fibrillarin (Abcam, ab18380)은 각각 시판되는 항체를 사용하였다. Dot blot 분석을 시행하기 위해서는 nitrocellulose membrane위에 LIN28A-K135-me0 또는 LIN28A-K135-me1 펩티드로 점을 찍고, α -LIN28A-K135-me0 또는 LIN28A-K135-me1 항체를 사용하여 분석하였다.

[0085] **면역형광법**

[0086] 세포를 상온에서 20분동안 4% formaldehyde (Sigma-Aldrich, HT5011)로 고정하고 PBST (PBS containing 0.1% Tween 20; Sigma-Aldrich, P7949)로 15분 동안 3번 수세한 후, 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, T8532)를 첨가한 PBS와 반응하고 blocking solution (3% fetal bovine serum; Sigma-Aldrich, A9647)과 상온에서 1시간 동안 반응한다. blocking solution에 1:200으로 희석한 각각의 LIN28A, LIN28A-K135-me1, SET7/9, Fibrillarin에 대한 일차 항체를 4°C에서 overnight동안 세포와 반응시키고, PBST로 6회 수세한 후, blocking solution에 1:300으로 희석한 Alexa-488- 또는 -594-와 결합된 이차 항체 (Invitrogen)와 암조건 실온에서 1시간동안 반응하고 PBST로 6회 수세한다. 수세과정동안 DNA는 DAPI (4'-6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich, D5942)로 대조염색 한다. 마지막으로, argon 및 helium-neon lasers가 장착된 Zeiss LSM 510 공 초점 현미경

(Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 형광이미지를 얻는다.

[0087] **RNA 분리 및 역전사 시험**

[0088] H9, NCCIT, 또는 HEK293T세포를 중복배양하고 TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 total RNA를 분리하였다. 간략히 설명하면, 직경 35mm 배양접시에 배양한 세포를 회수하여 500 마이크로리터 (μl) TRIZOL을 첨가하고, 세포용출물을 여러 번 파이프에 통과시켜 균질화 시킨 후, 25°C에서 5분 동안 방치하여 핵단백질 복합체가 완전히 분리되도록 한다. 100 마이크로리터 (μl) 클로로포름을 첨가한 후 15초 동안 강하게 흔들어 섞고 25°C에서 2-3분 동안 방치한다. 12,000 μg, 4°C에서 15분 동안 원심분리하고, 상층액만 새 튜브로 옮긴다. RNA를 침출시키기 위해서 200 마이크로리터 (μl) isopropyl alcohol을 첨가하여 섞고 25°C에서 10분 동안 반응시킨다. 12,000μg, 4°C에서 15분 동안 원심분리하고, 75% ethanol로 수세한 수 RNA 침사를 건조하여 RNase-free water에 용리시킨다. Improm Kit (Promega)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 1 마이크로그램 (μg) DNase 처리한 total RNA로부터 cDNA를 합성한다.

[0089] **Real-time quantitative RT-PCR**

[0090] Real-time PCR 분석에는 CFX96 (Bio-Rad)를 사용하였다. DNA를 증폭시키기 위해, 2X h-Taq real time mix (Solgent), 20X Evagreen (Biotium), 20X tetraethylammonium chloride, 10 pmol of each primer와 주형 DNA를 섞어 총 부피 20 μl를 반응하였다. PCR 반응은 초기단계 95°C, 12분동안 초기단계 이후, 95°C에서 20초 (denaturation), 57°C에서 30 초 (annealing), 72°C에서 30초 (extension)를 40회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 5분 동안 반응하였다. PCR에 사용한 primer의 특이도는 agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다. PCR 시행 후, 단일 PCR 산물의 증폭을 확인하기 위해 용해곡선을 분석하였고, 각각의 반응에서 Ct (threshold cycle)을 결정하였다. 세가지 PCR 반응에서 IP DNA와 넣어준 DNA의 2 copies에 대한 평균 Ct값은 A와 B로 각각 표시하였다. 각 IP 샘플에 대한 fold enrichment(F)값 ($F = 1/2^{(A-B)}$)을 계산하였고, GAPDH와 비교하여 상대적인 mRNA 발현량을 계산하였다.

[0091] Real-time PCR 분석에 사용한 프라이머의 서열은 서열번호 6 내지 50으로 이루어져 있으며 상세한 서열은 하기 표와 같다.

표 1

Real-time PCR 분석용 프라이머 서열

[0092]

서열번호	이름	종류	서열
6	LIN28A-RT-F	DNA	AGCATGCAGAAGCGCAGATCAA
7	LIN28A-RT-R	DNA	GCTACCATATGGCTGATGCTCT
8	SET7/9-RT-F	DNA	TCATTGATGTGCTGAGCCCTA
9	SET7/9-RT-R	DNA	TCAGGGTGC GGATGCATTTGAT
10	OCT4-RT-F	DNA	AAACCCACACTGCAGCAGATCA
11	OCT4-RT-R	DNA	TCGTTGTGCATAGTCGCTGCTT
12	SOX2-RT-F	DNA	TGTGGTACCTCTTCTCCCACT
13	SOX2-RT-R	DNA	TGGTAGTGCTGGGACATGTGAA
14	NANOG-RT-F	DNA	ACCTCCAATGTGGAGCAACCA
15	NANOG-RT-R	DNA	TGCATGCAGGACTGCAGAGATT
16	GAPDH-RT-F	DNA	ACATCAAGAAGGTGGTGAAGCAGG
17	GAPDH-RT-R	DNA	CACCTGTGTGCTGTAGCCAAAT
18	Firefly-RT-F	DNA	CGAAGGTTGTGGATCTGGATA
19	Firefly-RT-R	DNA	CGCTCCGGATTGTTACATA
20	Renilla-RT-F	DNA	TTATCATGGCCTCGTAAATC
21	Renilla-RT-R	DNA	CTGGGTCGGATTCAATAAACA
22	Pri-let-7a-1-RT-R	DNA	GATTCCCTTTTACCATTACC
23	Pri-let-7a-1-RT-F	DNA	TTTCTATCAGACCGCTGGAT
24	Pri-let-7g-RT-R	DNA	CCTGTCTCAAGTGCATCCTG
25	Pri-let-7g-RT-F	DNA	CAGAGATGAGCAGGGTGACG
26	Pri-miR-16-1-RT-R	DNA	AGGTGCAGCCATATTGTGCT

27	Pri-miR-16-1-RT-F	DNA	CTGAAAAGACTATCAATAAAAC
28	Mature let-7a-RT-F	DNA	TGAGGTAGTAGGTTGTATAGTT
29	Mature let-7b-RT-F	DNA	TGAGGTAGTAGGTTGTGTGGTT
30	Mature let-7c-RT-F	DNA	TGAGGTAGTAGGTTGTATGGTT
31	Mature let-7d-RT-F	DNA	AGAGGTAGTAGGTTGCATAGTT
32	Mature let-7e-RT-F	DNA	TGAGGTAGGAGGTTGTATAGTT
33	Mature let-7f-RT-F	DNA	TGAGGTAGTAGATTGTATAGTT
34	Mature let-7g-RT-F	DNA	TGAGGTAGTAGTTTGTACAGTT
35	Mature let-7i-RT-F	DNA	TGAGGTAGTAGTTTGTGCTGTT
36	Mature miR-98-RT-F	DNA	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT
37	Mature miR-16-RT-F	DNA	TAGCAGCACGTAATATTGGCG
38	Mature miR-21-RT-F	DNA	CAACACCAGTCGATGGGCTGT
39	WINT3-RT-F	DNA	GGCCATGAACAAGCACAACA
40	WINT3-RT-R	DNA	TGCCGTGGGAGGTGACATT
41	T (Brachyury)-RT-F	DNA	GCGGAAAGAGCCTGCAGTA
42	T (Brachyury)-RT-R	DNA	TTCCCCGTTTCAGTACTTCC
43	GATA4-RT-F	DNA	TCCAAACCAGAAAACGGAAG
44	GATA4-RT-R	DNA	CTGTGCCCGTAGTGAGATGA
45	FOXA2-RT-F	DNA	CTGAGCGAGATCTACCAGTGA
46	FOXA2-RT-R	DNA	AGTCGTTGAAGGAGAGCGAGT
47	PAX6-RT-F	DNA	GTGTCCAACGGATGTGTGAG
48	PAX6-RT-R	DNA	CTAGCCAGGTTGCGAAGAAC
49	NES (Nestin)-RT-F	DNA	AAGAAATAAATCAGGGGGCA
50	NES (Nestin)-RT-R	DNA	CAGGTTCTCTCTCTTCCA

[0093] **초원심세포분획 실험**

[0094] 핵 추출물은 기존 문헌 (Kim et al., (2013) J Biol Chem 287, 39698-39709)에 언급한 방법을 일부 수정한 방법으로 준비하였다. H9 또는 HEK293T 세포를 회수하여 찬 PBS로 2회 세척한 후, 5x extraction buffer I (10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 및 1mM PMSF/Protease inhibitors)에 넣고 잘 섞어 15초 동안 vortex하고 10분 동안 ice에 둔다. 최종 농도가 0.9%가 되도록 하여 10% NP-40을 첨가하여 15초 동안 vortex하고 5분 동안 ice에 둔다. 각 샘플은 4°C, 5000rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 세포핵을 침전시키고, 상층액은 완전히 제거한다. 침전시킨 세포핵은 extraction buffer I로 2회 세척한 후, extraction buffer II (20 mM HEPES, pH 7.9, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1mM PMSF/Protease inhibitors)를 넣고 잘 섞어 20초 동안 vortex하고 40분 동안 ice에 둔다. 세포핵 현탁액은 10초 동안 vortex한 후, 23-G 주사 바늘에서 4-6회 통과시켜 균질화 하고 4°C, 14,000rpm에서 15분 동안 원심분리 한다. 상층액을 세포핵 추출물로 사용하여 RNA in vitro pull-down assay와 RNA 면역침강법을 시행하였다.

[0095] 핵소체는 기존 문헌 (Piskounova et al., (2011) Cell 147, 1066-1079)에 언급한 방법을 일부 수정한 방법으로 준비하였다. 세포핵에 extraction buffer II (with 420 mM NaCl)로 처리하여 4°C에서 30분 동안 회전교반한 후, 12,000 rpm에서 30분 동안 원심분리 하여 핵소체를 침전시킨다. 침전시킨 핵소체는 extraction buffer III (50 mM Tris-Cl, pH 7.9, 25% glycerol, 5mM MgCl₂, 0.5mM EDTA)를 넣어 재현탁하고 23-G 주사 바늘에서 4-6회 통과시켜 균질화 후 원심분리하여 가용성 또는 불용성 분획으로 분리한다. 핵소체 침전 분획은 extraction buffer IV (20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 10% Glycerol, 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 및 1mM PMSF/Protease inhibitors)에 재현탁한다.

[0096] **In vitro RNA pull-down assay**

[0097] Peptide pull-down assay는 기존 문헌 (Heo and Sung, (2011) Science 331, 76-79)에 언급한 방법을 일부 수정한 방법으로 시행하였다. 합성 biotinylated let-7a-1 (5'-Biotin-UGUAUAGUUUAGGGUCACACCCACCACUGGAGAUUAACUAUACA-3')와 miR-16-1 (5'-Biotin-GUAAAUUUGCGUUAAGAUUCUAAAAUUAUCUCCAGUAUUAACU-3') RNAs는 IDT (Integrated DNA technologies; Iowa, USA) 의 RNase Free HPLC를 사용하여 합성 및 정제하였다. 핵 추출물은 LIN28A와 K135R로 형질전환 한 샘플로부터 얻

었으며, 10 마이크로그램 (μg) biotinylated RNAs와 200 마이크로그램 (μg) 핵 추출물을 RNasin (Promega)을 첨가한 pull-down buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM DTT, 0.05% NP-40, 1mM PMSF/Protease inhibitors)에 넣고 섞어 4°C에서 6시간동안 반응하였다. 세척한 streptavidin-coated Dynabeads M280 (Invitrogen) 30 μl에 각각의 반응물을 넣어 4°C에서 1시간 더 반응한다. peptide pull-down buffer로 3회 세척한 후, SDS-PAGE로 분리하고 immunoblot법으로 분석한다.

[0098] **RNA 면역침강법(RIP)**

[0099] RIP assay는 기존 문헌 (Heo and Sung, (2011) Science 331, 76-79)에 언급한 방법을 일부 수정한 방법으로 시행하였다. 간략히 설명하면, 세포를 PBS로 2회 세척한 후 1% formaldehyde (Sigma)에 넣어 상온에서 10분 동안 반응 하여 교차결합시키고, 125 mM glycine으로 quenching하였다. 교차결합 시킨 세포를 PBS에 회수하고 400 마이크로리터 (μl) RIPA buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% SDS, 1 mM EDTA, 1 % NP-40, 0.05% sodium deoxycholate) with RNasin (Promega) 사용하여 세포용해한 후, stepped microtip (Fisher)이 장착된 Sonic Dismembrator (Model 500, Fisher)를 사용하여 5초씩 3회 초음파 처리하였다. 이후, 37°C에서 10분 동안 DNase I으로 처리하고 13,000 rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리 (Eppendorf)한다. 5 %로 분주하여 -80°C에 냉동보관 한다. 각 샘플은 확인하고자 하는 항체와 RNasin과 함께 4°C에서 2시간동안 반응하여 면역침강 실험에 사용하였는데, 생성된 면역복합체를 회수하기 위해 protein A와 G-agarose (GE healthcare) 40 마이크로리터 (μl)를 각 튜브에 첨가한 후, 회전교반기에서 2시간 이상 반응한다. 그 후, 면역복합체는 10-15분 동안 Low Salt Wash Buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS 및 1% Triton X-100), High Salt Wash Buffer (20 mM Tris-Cl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 및 1% Triton X-100), LiCl buffer (10 mM Tris-Cl, pH 8.0, 250 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% Sodium deoxycholate)으로 1회, TE buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.5, 1 mM EDTA)으로 2회 각각 세척한다. 면역복합체는 100 ul elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃)를 사용하여 25°C에서 15분 동안 회전교반하면서 반응하여 반복적으로 용출시킨다. 5 M NaCl (200 mM) 16ul를 용출액 200ul에 넣고 70°C에서 1시간동안 가열하여 역교차결합시킨다. DNA를 제거하기 위해서, 면역복합체를 DNase I으로 10분 동안 처리하였고, TRIZOL[®] Reagent (Invitrogen)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 샘플로부터 RNA를 분리해내었다.

[0100] **RNA interference**

[0101] LIN28A와 SET7/9의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 서열을 다음과 같이 각각 선정하였다 : CTACAAGTGGAGGTCTA (서열번호 3), GCCTGTAGGAGAAGTAAA (서열번호 4). EGFP에 대한 siRNA를 대조군으로 선정 하였다 : GTTCAGCGTGCCGGCGAG (서열번호 5). 21개 뉴클레오티드 서열로 합성한 siRNA duplex는 Samchully Pharm (Seoul, Korea)에서 제조하였다. NCCIT세포 (2x10⁵ cells/well)를 6-well plate에 접종하고 24시간 후, 100 nM LIN28A, SET7/9, 또는 60 nM 대조 siRNA로 DharmaFECT (Thermo)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 형질전환 하였다. 배아줄기세포의 경우, H9세포를 PBS로 세척한 후, Accutase (STEMCELL Technologies, Vancouver, Canada)로 기존 문헌 (Bajpai et al., (2008) Mol Reprod Dev 75, 818-827)에 언급한 방법으로 37 °C에서 5-10분 동안 처리하여 세포집락을 단세포로 분리하였다. 이후, 800rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 세포를 회수하고 ~ 1x10⁵ cells/ml로 matrigel (BD Biosciences, San Diego, CA)에 재접종하여 10 마이크로몰 (μM) ROCK inhibitor (Y-27632; Sigma-Aldrich, USA)을 첨가한 조건배지에서 48시간동안 배양하고 이때 지지세포 (feeder cell)은 함께 접종하지 않는다. 이 단세포들은 위에서 언급한 siRNA에 의해 형질전환 된 세포들이며, 형질전환한지 72시간 후에 면역침강법 또는 RT-qPCR법으로 분석하였다. 배양에 사용한 조건배지는 배아줄기세포 배양배지에 mct-MEFs를 9.8 x 10⁶ cells/T175 flask농도로 37°C, 5% CO₂, 습윤조건에서 7일 동안 배양하여 그 현탁액을 매일 회수하고 0.22 마이크로미터 (μm) filter (Corning Incorporated Life Sciences, MA)를 사용하여 여과한 후 냉동보관 한 것으로 사용하였다.

[0102] **Gene Expression microarray analysis**

[0103] total RNA는 Trizol Reagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA)을 사용하여 제조사의 지침에

따라 추출하여 260 nm 흡광도 측정하여 정량하고 Bioanalyzer 2100 (Agilent, CA, USA)를 사용하여 순도를 확인하였다. Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit (Agilent Technology; G4140-90040)를 사용하여 Cyanine 3-표지된 cRNA (complementary RNA)를 제조하였고, 표지된 cRNA 또한 nanodrop spectrophotometer를 사용하여 정량하였다. 이후, 50,599개 생물 특정 물질과 1280개 양성 대조물질을 갖는 Agilent SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K Microarray kit로 실험하였고, 혼성반응 시킨 Microarray는 Agilent's Gene Expression Wash Buffer Kit를 사용하여 세척하였다. 각각의 혼성물은 각각의 샘플에 사용하였다. Microarray 칩은 Agilent's DNA microarray scanner (G2505B)를 사용하여 이미지화하였고, 원시신호 강도는 Feature Extraction Software (Agilent Technology)를 사용하여 얻어 Limma R package를 사용하여 처리하였다: 변위값 표준화 작업을 시행하였고, 신호 강도가 낮은 유전자는 제거하였으며, 동일한 유전자를 나타내는 duplicate probe는 평균값으로 나타내었다. 발현 수준이 3배 이상 차이 나는 유전자 또는 LIN28A 또는 SET7/9 녹다운과 EGFP 대조군 또는 두 가지 모두에서 큰 차이를 보이는 유전자를 선별하였다. GOEAST (<http://omicslab.genetics.ac.cn/GOEAST/index.php>) (Zheng and Wang, (2008) Nucleic Acids Res 36, W358-W363)를 사용하여 차별적 발현되는 유전자 온톨로지 분석을 시행하였다.

[0104] <실시예 1>

[0105] LIN28A의 메틸화 위치 규명

[0106] <1-1> 메틸화 효소 분석

[0107] 미생물에서 발현하여 정제한 6xHIS로 표지된 인간LIN28A를 이용하여 in vitro pull-down assay를 시행하고 PRMT6, SET8, SET7/9, DOT1L, SMYD2, SMYD3, SMYD4, SMYD5-S, SMYD5-L 등 미생물에서 발현시킨 다양한 HMTase (histone methyltransferases)를 이용하여 메틸화 분석을 시행하였다.

[0108] 그 결과 [도 1]에서 보는 바와 같이 몇몇 HMTase들이 LIN28A에 비 특이적으로 결합하긴 했지만, SET7/9를 제외한 모든 HMTase들은 LIN28A에 대한 효소 활성을 나타내지 않았다. 따라서, LIN28A는 lysine 메틸화에 의해서 메틸화되어 있는 것으로 보인다.

[0109] <1-2> 면역침강 분석

[0110] LIN28A가 SET7/9에 결합하는지를 확인하기 위해서, in vivo 면역침강 분석법으로 LIN28A와 SET7/9의 물리적인 결합능을 측정하였다.

[0111] 내생 LIN28A와 과 발현시킨 LIN28A를 면역 침강하여 항체를 이용한 immunoblot으로 분석한 결과 각각 H9, NCCIT 및 HEK293T 세포에서 SET7/9이 검출되어 LIN28A와 SET7/9가 체내에서 물리적으로 결합하는 것을 입증하였다 ([도 2A], [도 2B] 및 [도 3A] 참조). LIN28A는 IgG와 반응시킨 음성대조군에서는 반응하지 않았으며, 반대로 SET7/9로 면역침강 반응하였을 때에도 동일한 결과를 보였다 ([도 3A] 내지 [도 3C] 참조).

[0112] <1-3> 메틸화 예상 위치 탐색

[0113] 다음으로, LIN28A가 SET7/9에 의해 메틸화되는 위치를 정확하게 측정하였다. LIN28A의 아미노산 서열을 histone H3 (Nishioka et al., (2002) Genes Dev 16, 479-489; Wang et al., (2001) Nature 444, 364-368), p53 (Chuikov et al., (2004) Nature 432, 353-36), TAF10 (Kouskouti et al., (2004) Mol Cell 14, 175-182), DNMT1 (Estřve et al., (2009) Proc Natl Acad Sci U S A 106, 5076-5081), ER α (Subramanian et al., (2008) Mol Cell 30, 336-347), E2F1 (Kontaki and Talianidis, (2010) Mol Cell 39, 152-160)를 갖는 SET7/9 메틸화 표적부위 주변의 서열과 비교하였다.

- [0114] 그 결과 [도 2C]에서 보는 바와 같이, LIN28A의 RNA 결합 도메인과 만나는 링커 부위의 lysine135와 그 주변 잔기들이 SET7/9 인식 서열인 K/R-S/T-K (Couture et al., (2006) Nat Struct Mol Biol 13, 140-146)와 거의 유사하게 보존되어 있었다.
- [0115] 놀랍게도, LIN28A와 상동인 LIN28B는 SET7/9 인식 서열을 갖고 있지 않았으며, 파리 lin-28, 애벌레 lin-28과 인간, 쥐, 개구리의 LIN28A/B의 전체 아미노산 서열을 비교한 결과에서도 LIN28A서열 내의 SET7/9 인식 서열은 M. musculus와 같은 고등 진핵생물의 진화과정에서 얻어진 것을 알 수 있었다 ([도 3D] 참조).
- [0116] <1-4> 항원 항체 반응에 의한 메틸화 위치 확인
- [0117] 생체 내에서 LIN28A의 SET7/9에 의한 메틸화 활성화에 대한 연구를 위해, 메틸화 되지 않은 LIN28A-K135와 한 개의 메틸기가 붙은 LIN28A-K135 에 특이적인 다가항체를 만들었다. 만들어진 다가항체는 K135에 한 개의 메틸화 또는 변형되지 않은 LIN28A 펩티드에 대해 시험하였고, 특이적으로 한 개의 메틸화된 펩티드 또는 변형되지 않은 LIN28A 둘 중 한가지만을 검출하는 항체를 선별하였다 [도 2D].
- [0118] 생체 내에서 SET7/9에 의해 LIN28A의 lysine 135에서 메틸화되는지 알아 보기위해, FLAG로 표지한 LIN28A wild type 또는 FLAG-LIN28A-K135R (K135R; LIN28A내의 SET7/9를 인식하는 부위인 lysine 135를 arginine으로 치환한 돌연변이)을 HEK293T세포에 형질감염 하였다.
- [0119] 메틸화된 LIN28A를 인지하는 anti-LIN28A-K135-me1 항체를 사용하여 immunoblot 분석한 결과, [도 2E]에 나타난 바와 같이, 과 발현된 LIN28A wild type과는 반응하였지만, K135R는 인지하지 못하였다. 따라서 LIN28A는 생체 내에서 lysine135에 메틸화 되어있음을 알 수 있었고 특히, HEK293T세포에서 형질감염 한 LIN28A는 세포에 있는 SET7/9에 의해 메틸화됨을 확인했다.
- [0120] <실시예 2>
- [0121] SET7/9과 LIN28A의 결합특성 규명
- [0122] <2-1> SET7/9의 직접 결합 실험
- [0123] 생체 내에서 LIN28A와 SET7/9가 직접적으로 반응하는지 확인하기위해, LIN28A과 SET7/9 의 전체 길이에 순서대로 MAL, 6xHIS, GST 융합단백질을 제작하여 이를 확인하였다 ([도 4C] 및 [도 4D] 참조). 제작된 융합단백질로 GST pull-down 분석을 시행하였다.
- [0124] 그 결과, LIN28A의 카르복실 말단 (아미노산 125-209)이 SET7/9와 반응하는 것을 확인하였다 ([도 5A], [도 4A] 및 [도 4B] 참조). 놀랍게도, 정상 LIN28A와 K135R돌연변이가 모두 SET7/9에 결합하였다 ([도 5B]). 이 결과로 보아 LIN28A와 SET7/9는 서로 직접 반응하는 것을 확인하였다.
- [0125] <2-2> SET7/9에 의한 LIN28의 메틸화 실험
- [0126] 다음으로는, LIN28A가 시험관내에서 SET7/9에 의해 메틸화되는지를 확인하였다. 재조합한 전체 길이의 LIN28A를 재조합 SET7/9와 함께 ³H-S-adenosine-methionine ([³H] SAM)에서 반응 하고, 재조합 LIN28A가 메틸화되었는지를 확인하였다 ([도 5C], lane 2). SET7/9 단백질이 없는 경우, LIN28A는 메틸화되지 않았고 ([도 5C], lane 3), LIN28A는 SET7/9에 의해 시험관 내에서 메틸화됨을 확인하였다. 양성 대조군으로 재조합 인간 코어 히스톤 (rC/H)은 LIN28A의 경우와 같은 조건에서 SET7/9에 의해 메틸화되었고, 시험관내 메틸 전달효소 분석법으로 입증하였다 ([도 5C], lane 4, 5, [도 4E]).
- [0127] <2-3> 메틸전달효소 분석법에 의한 메틸화 위치 확인
- [0128] 전체 길이의 LIN28A가 SET7/9에 의해 시험관내에서와 생체 내에서 메틸화됨을 확인하였으므로, 잠재적 메틸화

자리인 lysine 135가 실제 SET7/9의 표적 자리인지를 확인하기 위한 실험을 하였다. 우리는 LIN28A의 각각 다른 네 개의 단편을 포함하는 6xHIS로 표지된 단백질을 박테리아에서 발현 및 정제하였고 이 단백질들을 사용하여 시험관내 메틸 전달효소 분석법을 시행하였다.

[0129] 그 결과 4 개의 단편들 중 lysine 135를 갖는 LIN28A (125-209)와 (125-156)만이 SET7/9에 의해서 메틸화되었고 ([도 5D], lane4, 6), lysine 135를 갖지 않는 (1-124)와 (157-209)는 메틸화되지 않는 것을 확인하였다 ([도 5D], lane2, 8).

[0130] <2-4> 메틸화 가능 부위의 돌연변이 치환 실험

[0131] Lysine135 주변에는 여러 개의 lysine이 있는데, K135를 포함하여 K78, K88, K98, K99, K102, K125, K127, K131, K150, K153의 총 11개의 lysine을 메틸화되지 않도록 arginine으로 치환하여 실험한 결과, K135 돌연변이에서 SET7/9에 의한 메틸화 반응이 완전히 제거되었으며 ([도 5E], lane19), 이는 SET7/9가 LIN28A의 lysine135에서 메틸화함을 확실하게 보여준다.

[0132] <2-5> SET7/9의 LIN28A 특이적 메틸화 특성 실험

[0133] [도 2C]에서 나타난 바 LIN28B는 LIN28A의 SET7/9의 표적자리를 갖고 있지 않기 때문에, LIN28A의 K135에서 특이적으로 메틸화가 일어남을 확인하기 위해서 LIN28B를 박테리아에서 발현하여 이를 이용해 시험관내 메틸 전달효소 분석법을 시행하였다. 예상했던 바와 같이, LIN28B는 SET7/9에 의해 메틸화되지 않았다 ([도 6A]). 음성대조군으로 H3 K79 메틸 전달효소로 알려져 있는 DOT1L을 배칼로바이러스 발현 시스템으로 발현 및 정제하여 (Kim et al., (2013) J Biol Chem 287, 39698-39709) 동일한 조건에서 메틸 전달효소 분석법을 시행한 결과 LIN28A를 메틸화하지 못했다 ([도 6B]). 이를 종합해볼 때, LIN28A는 K135에서 SET7/9에 의해 특이적으로 단일 메틸화됨을 알 수 있다.

[0134] <실시예 3>

[0135] 메틸화에 의한 LIN28A의 안정성 증가 실험

[0136] <3-1> LIN28A 단백질의 세포내 수준 측정

[0137] SET7/9가 lysine을 메틸화하는 것이 R/K-S/T-K서열을 갖는 표적단백질인 p53 (Chuikov et al., (2004) Nature 432, 353-360), TAF10 (Kouskouti et al., (2004) Mol Cell 14, 175-182), DNMT1 (Estéve et al., (2009) Proc Natl Acad Sci U S A 106, 5076-5081), ERα (Subramanian et al., (2008) Mol Cell 30, 336-347), E2F1 (Kontaki and Talianidis, (2010) Mol Cell 39, 152-160)의 안정화를 조절하는 역할을 하는 것으로 보고되었다. 그러므로, SET7/9에 의한 메틸화가 생체내 LIN28A의 안정화하는데 영향을 주는지 알아보았다. K135R은 발현하지 않는 LIN28A의 발현을 증가시킨 HEK293T세포에 SET7/9를 동시발현 시킨 결과 ([도 7A]), SET7/9에 의해 메틸화된 LIN28A는 그 안정성이 증가된 것으로 보인다.

[0138] <3-2> LIN28A 단백질의 세포내 반감기 측정

[0139] 이를 더욱 뒷받침하기 위해, SET7/9를 동시 발현시킨 세포에서 LIN28A mRNA의 수준이 변화하지 않음을 확인하였다 ([도 8A], [도 8B]). 이와 같은 단백질의 안정화가 LIN28A의 lysine135에서 일어난 메틸화로 인한 것인지를 알아보기 위해, 정상 LIN28A와 LIN28A-K135R의 반감기에 대한 SET7/9의 영향을 알아보는 실험을 하였다.

[0140] 그 결과 앞에서 확인한 것과 일치하게, LIN28A는 메틸화에 의해 안정되었고, LIN28A-K135R의 반감기는 감소한 반면 ([도 7B], [도 8C]), LIN28A는 SET7/9에 의해 메틸화되어 훨씬 더 안정하였고 반감기가 월등히 증가하였다 ([도 7B 아래]). 또한, siRNA를 형질감염 하여 SET7/9를 감소시킨 H9 또는 NCCIT세포에서도 LIN28A의 안정성을 나타내었다 ([도 7C], [도 8D]). 이 결과들은 SET7/9는 LIN28A를 lysine135에서 메틸화시킴으로서 LIN28A의 안정성을 증가시킴을 보여준다.

- [0141] <실시예 4>
- [0142] 메틸화된 LIN28A의 특성 규명
- [0143] <4-1> 메틸화된 LIN28A 단백질의 세포내 분포 측정
- [0144] LIN28A과 LIN28B는 세포내에서 다르게 분포한다. LIN28A는 선충에서 포유동물까지 세포질에서 주로 발견되며, 핵에서는 거의 발견되지 않는 반면, LIN28B는 이의 기능적 NLS (nuclear localization signals) 및 NoLS (nucleolar localization signals)로 인하여 핵, 특히 핵소체에 대부분 존재하여 Microprocessor에 의한 pri-let-7 miRNAs의 processing을 차단한다. 반면, LIN28A는 세포질에서 Dicer 단계를 저해하고, Tut4 (Zcchc11)로 하여금 pre-let-7을 oligo-uridylation 되게 한다.
- [0145] 특히, LIN28A 메틸화자리인 K135 및 주위 서열은 LIN28B의 NoLS와 상동성을 가진다 ([도 4A] 및 [도 10D]). 더구나, LIN28A 및 LIN28B는 상호 배타적인 방식으로 세포내에 존재한다. 메틸화 형태의 LIN28A의 세포내 분포를 조사하기 위하여 HEK293T, H9 및 NCCIT 세포주에서 핵과 세포질의 과 발현 된 LIN28A인 K135R 및 내생 (endogenous)의 LIN28A을 생화학적으로 분획한 후 항체로 면역블롯을 시행하였다 ([도 9A], [도 9B], 및 [도 10B]).
- [0146] 공개된 자료와 일치하게, 모든 세포에서 LIN28A는 세포질에 풍부하며, 핵에서는 적었다. 반면 메틸화된 형태의 LIN28A는 핵에 존재하였다. 흥미롭게도, 메틸화된 형태의 LIN28A는 H9 세포주에서는 핵질뿐만 아니라, 인 (핵소체)에서도 존재하는 것을 확인하였다 ([도 9C]).
- [0147] H9, NCCIT, 및 HEK293T 세포주를 대상으로 한 면역형광분석 결과 많은 양의 단일 메틸화된 LIN28A와 SET7/9가 핵, 특히 인 (핵소체)에서 인의 마커인 fibrillarin과 함께 발견되었다 ([도 9D], [도 10A], 및 [도 10C]).
- [0148] SET7/9 매개 메틸화에 의하여 단일 메틸화된 LIN28A가 핵에 존재한다는 것을 추가로 증명하기 위하여, SET7/9를 siRNA를 이용하여 knock down 한 결과 내핵형 LIN28A의 특이적인 핵에서의 존재 패턴이 감소한 것이 면역블롯 및 면역형광분석결과로 확인되었다 ([도 9E]).
- [0149] 이러한 결과는 K135에 SET7/9에 의해 단일 메틸화된 LIN28A는 핵에서 LIN28B의 NoLS로 역할을 하는 것으로 판단 된다. LIN28B의 동족체의 서열 분석은 이러한 사실을 뒷받침한다 ([도 10D]).
- [0150] 메틸화되지 않은 형태 (이하 세포질형태라고 함) 및 단일 메틸화된 형태 (이하 내핵형이라고 함) LIN28A의 상이한 세포내 분포는 라이신 메틸화에 의하여 변형된 LIN28A가 LIN28B와 같이 Tut4 (Zcchc11) 독립적인 방법으로 primary let-7 (pri-let-7) miRNA의 전사체를 핵소체 내에서 격리하여 이의 생합성을 저해한다는 것을 시사한다.
- [0151] <실시예 5>
- [0152] 단일 메틸화된 LIN28A의 특성 규명-pri-let-7의 생합성을 억제
- [0153] <5-1> 단일 메틸화된 LIN28A 단백질의 miRNA 프로세싱 억제 실험
- [0154] LIN28A의 단일 메틸화되는 자리는 LIN28B의 NoLS에 상응하는 자리이고 단일 메틸화된 LIN28A는 핵 안에 축적되므로, LIN28A는 배아줄기세포와 인간 세포내에서 K135의 메틸화에 의해 핵 안에서 잔류할 수 있다. LIN28B와 비교하여 (Piskounova et al., (2011) Cell 147, 1066-1079) LIN28A의 K135 메틸화는 핵 안에서만 일어나는 신호이며 LIN28의 안정성을 증가시킨다 ([도 7], [도 8], [도 9], [도 10]). 이러한 결과로 미루어, LIN28A는 핵 안에서 단일메틸화 됨으로서 Tut4 (Zcchc11) 독립적인 방법으로 pri-let-7-1 miRNA의 프로세싱을 억제하는 기능을 한다는 가설을 세웠다.
- [0155] LIN28A의 내핵형이 miRNA 프로세싱을 억제할 수 있는지를 알아보기 위해, 메틸화 될 수 있는 FLAG 표지한 정상 LIN28A 또는 메틸화될 수 없는 FLAG 표지한 LIN28A-K135R과 함께 pri-let-7a-1과 세 개의 let-7a 결합자리를 갖고 있는 루시퍼레이즈 유전자를 mature let-7a-1의 표적이 될 수 있도록 구성하여 이것을 HEK293T세포에 형질

감염하고 정량 RT-PCR (RT-qPCR)을 시행하였다 ([도 11A]). 정상 FLAG-LIN28A 또는 FLAG-K135R과 pri-let-7a-1와 let-7aBS-Luc을 동시 형질감염 한 세포에서는 pri-let-7a-1 RNA와 루시퍼레이즈 mRNA가 mature let-7a-1 RNA가 감소 된 것과 상응하게 축적되도록 하였다. 특히, 메틸화되지 않은 LIN28A보다 메틸화된 LIN28A에 의해 축적된 pri-let-7a-1 RNA가 월등히 더 많았는데 ([도 11A], lane 4, 5), 이는 [도 9A]에서 보인 바와 같이 이들 단백질이 핵 안에서 다른 비율로 존재하는 것과 일치한다. 그러나, mature let-7 miRNA는 메틸화되지 않은 LIN28A에 의해서 또한 상당히 감소하는 것으로 나타나는데 ([도 11A], lane 5, [도 12C], lane 4), 이것은 잠재적으로 mature let-7 miRNA를 프로세싱 할 수 있는 LIN28B에 의한 것으로 보인다. 양성 대조군으로 RISC (RNA-induced silencing complex), AGO2 repressing miRNA-mediated translation (Lytle et al., (2007) Proc Natl Acad Sci U S A 104, 9667-9672) 활성 성분 에 의해서 루시퍼레이즈 mRNA가 2배까지 감소하는 것을 보였다 ([도 11A], lane 6).

[0156] 흥미롭게도, HEK293T세포에서 과 발현시킨 FLAG-LIN28A가 세포 안에 있는 SET7/9에 의해 현저하게 메틸화되었는데 ([도 12A], lane 4, [도 12B], lane4), 이것은 앞서 보고된 바와 같이 핵 안에서 pri-let-7 miRNA 프로세싱을 방해하는 기능을 하는 LIN28A가 HEK293T세포에서 단일 메틸화된 LIN28A임을 나타낸다 (Heo et al., (2008) Mol Cell 32, 276-284; Viswanathan et al., (2008) Science 320, 97-100). 또 다른 let-7 종류인 pri-let-7g를 이용한 유사한 결과에서 ([도 12C], [도 12D]), 음성 대조군인 miR-16-1과 달리([도 11B]), LIN28A 내핵형이 특이적으로 let-7 종류를 표적으로 함을 나타낸다.

[0157] <5-2> LIN28A에 의한 let-7 miRNA 발현 수준 조절 측정

[0158] LIN28A 내핵형이 세포내에 mature let-7 miRNA를 프로세싱 할 수 있는지를 알아보기 위해, FLAG-LIN28A 또는 FLAG-K135R로 형질감염 하여 동량의 단백질을 발현시킨 HET293T세포에서 모든 let-7 종류 구성물들의 발현 수준을 RT-qPCR을 통해 측정하였다 ([도 12E]). 측정한 모든 세포 내 pri-let-7 종류 구성물들은 K135R 보다 과 발현된 LIN28A에 의해 상당히 증가한 반면, 세포 내의 mature miR-16과 miR-21의 수준은 영향을 받지 않았다 ([도 12F], 위). 메틸화될 수 있는 LIN28A에 의해 mature let-7 종류 구성물이 감소한 것과 상응하는 수준으로 pri-let-7이 축적되는 현상이 함께 나타났다([도 12F], 아래). 다음으로, LIN28A 내핵형이 배아줄기세포에서 miRNA의 생합성을 억제하는 세포내 억제 인자인지를 알아보기 위해 LIN28A 또는 SET7/9를 표적으로 하는 siRNA를 사용하여 H9 인간 배아줄기세포에서 LIN28A 또는 SET7/9를 녹다운하였다([도 11C]). LIN28A를 녹다운한 경우, mature miRNA의 반감기가 길어져 H9세포내에 mature let-7 종류 구성물이 축적된 반면(Kim, 2005), 다른 음성 대조군 miRNA의 수준은 변화하지 않았다([도 11C], 아래). LIN28A를 녹다운하여 mature let-7 종류 구성물이 축적된 것과 상응하는 수준의 primary let-7의 수준이 함께 감소하는 것으로 나타났다 ([도 11C], 위). SET7/9를 녹다운하여 LIN28A의 메틸화를 감소시킨 경우에도 mature let-7이 증가하여 ([도 11C], S7F, 초록색) 앞선 결과와 유사한 결과를 얻었다. 모든 결과를 종합하여 보면, 핵 내에서 단일 메틸화되어 활성화된 형태인 LIN28A 내핵형은 핵 내에서 pri-let-7의 프로세싱을 완전히 억제하는 것으로 나타났다.

[0159] <실시예 6>

[0160] LIN28A는 핵내 반응 기작 실험

[0161] <6-1> LIN28A의 pri-let-7 RNA에 대한 상대적 결합능력 비교

[0162] 단일 메틸화된 LIN28A에 의해 유도되는 let-7 프로세싱 방해 과정을 상세히 설명하기 위해, LIN28A의 세포질내 형태와 핵 내 형태의 pri-let-7 RNA에 대한 상대적 결합능력을 비교하였다. 말단에 루프를 갖는 합성된 비오틴 let-7a-1 RNA 와 함께 FLAG-LIN28A or FLAG-K135R로 형질감염 한 HEK293T세포의 핵 추출물을 이용하여 시험관내 RNA 결합을 분석하였다 ([도 13A]). LIN28A가 pre-let-7 miRNA의 stem-루프 부분에 선택적으로 결합한다는 사실과 일치하여 (Piskounova et al., (2008) J Biol Chem 283, 21310-21314), 월등히 더 많은 let-7a-1 RNA가 세포질 내 형태의 LIN28A보다 핵 내 형태의 LIN28A와 결합하는 것을 발견하였다 ([도 13A], lane 5). 반면에, 두 가지 형태의 LIN28A 모두 mir-16-1 miRNA와는 결합하지 않았으며 ([도 13A], lane 7), 음성대조군으로 사용한 SET7/9도 let-7a-1과 mir-16-1 RNA 모두와 결합하지 못했다.

[0163] 핵 내 형태의 LIN28A가 프로세싱을 방해하기 위해 pri-let-7에 결합하는지 좀 더 자세히 분석하기 위해 생체 내

에서 핵 내 형태의 LIN28A와 결합한 RNA에 대해 조사하였다. 각각 FLAG-LIN28A 또는 FLAG-K135R를 발현시키고 IgG, LIN28A (메틸화된 LIN28A와 메틸화되지 않은 LIN28A를 모두 검출 할 수 있는 항체), LIN28A-K135-me1, 또는 LIN28A-K135-me0에 대한 각각의 항체를 사용하여 RNA 면역침강 (RIP) 분석법을 시행하였고, RT-qPCR을 통해 pri-let-7a-1의 상대적 수준을 분석하였다. 분석 결과는 핵 내 형태의 LIN28A가 세포질 내 형태의 LIN28A보다 핵에서 pri-let-7a-1에 직접 결합하는 것으로 나타났다 ([도 13B], 왼쪽). 핵 내 형태의 LIN28A와 결합한 pri-let-7a-1의 양이 항 LIN28A와 항LIN28A-K135-me1항체로 검출하여 각각 2.8배, 6.6배 더 높게 나타났다. LIN28A-K135-me0 신호 증가는 두 경우에서 유의한 차이를 보이지 않았으며, 이는 메틸화된 LIN28A 주요 형태가 핵에서 pre-let-7a-1에 결합한다는 것을 의미한다. 더욱이, 우리는 핵 내에서는 메틸화 될 수 없는 LIN28A (K135R 돌연변이)보다 메틸화 될 수 있는 LIN28A에 LIN28A mRNA가 훨씬 더 많이 결합하는 반면, 세포질 내에서는 메틸화 될 수 없는 LIN28A (K135R 돌연변이)가 주로 LIN28A mRNA에 결합하는 것을 발견하였으며 ([도 13B], 오른쪽), LIN28A-K135-me0 신호에는 두 경우 모두 유의한 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 LIN28A가 자신의 mRNA의 3'UTR에 결합하여 증가하도록 자가 조절 한다는 보고 (Wilbert et al., (2012) Mol Cell 48, 195-206)와 일치한다. Anti-me1 항체로 면역침강 되는 LIN28A의 세포질 내 형태에 결합한 LIN28A mRNA가 서서히 증가하는 것은 세포질 내 형태의 LIN28A가 세포질 내에 극도로 많아져서 그에 대한 항체가 비 특이적으로 결합하기 때문이다. [도 7]에서 [도 11]까지의 결과를 종합하면, 핵 안에서 안정화된 메틸화될 수 있는 LIN28A가 pri-let-7a-1에 우선하여 반응하는 것은 핵 내 형태의 LIN28A가 pri-let-7 miRNA의 프로세싱을 조절하는데 직접적으로 관여하는 잠재적인 메커니즘에 영향을 준다고 할 수 있다.

[0164] <6-2> LIN28A의 SET7/9 결합 모티브 탐색

[0165] LIN28A는 GGAGA 서열에 기초하는 몇몇 중요한 LIN28A 결합모티브를 통해 자신의 mRNA의 3'UTR과 일차적으로 결합할 것이다 (Cho et al., (2012) Cell 151, 765-777; Wilbert et al., (2012) Mol Cell 48, 195-206). 놀라운 것은, LIN28A가 자신의 mRNA뿐만 아니라 SET7/9 mRNA에도 결합한다는 것이다 ([도 14A]). 이에, SET7/9가 LIN28A 결합모티브를 갖는지 알아보기 위해, 우리는 LIN28A 3'UTR에 더 많은 모티브를 알아보았다 ([도 14B]). 이러한 결과는 LIN28A가 SET7/9의 3'UTR에 결합하여 SET7/9 mRNA의 번역 (translation)을 조절할 것임을 시사한다. 이러한 사실을 입증하기 위해, HET293T세포에 FLAG-LIN28A 또는 FLAG-K135R을 형질감염하고 SET7/9의 발현을 확인하였다. 특히, LIN28A의 핵 내 형태와 세포질 내 형태 모두가 SET7/9의 전사보다는 번역에 영향을 주었다 ([도 14C], [도 14D]). 놀라운 것은, 메틸화 될 수 있는 LIN28A가 메틸화 될 수 없는 LIN28A에 비해 SET7/9 mRNA의 번역을 현저하게 증가시킨다는 것이다. 이는 LIN28A의 핵 내 형태가 핵 밖으로 배출될 수 있도록 하는 mRNP를 형성하는 등의 mRNA 프로세싱 과정에 연관되거나 핵 안에서 SET7/9 mRNA를 안정화 하는 데에 크게 영향을 줄 수 있음을 말해준다. 종합적으로 보아, LIN28A는 SET7/9의 3'UTR에 결합하여 번역을 증가 조절하는 것으로 보인다. 물론, LIN28A는 샤페론 처럼 mRNP를 재구성함으로써 RNA 이차구조를 만드는데 영향을 줄 수 있고, 수많은 유전자들의 전사 후 조절과정에 관여할 수 있다 (Hafner et al., (2013) RNA 19, 613-626; Semrad, (2010) Biochem Res Int 2011).

[0166] <실시예 7>

[0167] LIN28A의 전형성능 관련 유전자 조절 실험

[0168] SET7/9에 의해서 메틸화 된 내핵형 LIN28A는 let-7 miRNA를 특이적으로 조절함으로써 줄기세포의 전형성능과 분화능을 조절한다.

[0169] <7-1> LIN28A 또는 SET7/9 녹다운에 의한 LIN28A 및 SET7/9의 변화 측정

[0170] Let-7 miRNA의 일차 전사체는 미분화 배아줄기세포에서 쉽게 검출 될 수 있다. 그러나, 성숙한 let-7 miRNA는 배아줄기세포에서 검출되지 않으나 전사 후 분화과정 중에 매우 높게 유도된다 (Thomson et al., (2006) Genes Dev 20, 2202-2207, Viswanathan et al., (2008) Science 320, 97-100). [도 11C] 등에서 배아 줄기 세포에서 mature let-7 종류 구성물이 증가되면 그에 상응하는 만큼 pri-let-7의 수준이 감소하는 것으로 보였다 (Viswanathan et al., (2008) Science 320, 97-100).

[0171] 그러므로, H9세포와 NCCIT세포에서 분화과정에 중요한 역할을 하는 let-7 miRNA를 조절하는 방법을 통해 배아줄

기세포의 전형성능을 조절하는 데에 LIN28A와 SET7/9가 LIN28A를 단일 메틸화시키는 것이 중요한지를 평가하였다.

[0172] 그 결과 LIN28A-siRNA 또는 SET7/9-siRNA로 형질감염한 후 LIN28A 또는 SET7/9의 단백질 발현과 mRNA의 수준이 각각 감소하였다 ([도 15A], [도 15B], [도 16A], [도 16B]). 놀랍게도, 대조군으로 사용한 EGFP-siRNA로 형질감염 한 세포에서와 달리 LIN28A를 녹다운한 것은 대표적인 NANOG과 SOX2과 같은 전형성능 조절 유전자들의 발현에 영향을 주지 않았으며, 예외적으로 OCT4은 LIN28A에 의해 전사 후 과정에서 조절되었다 (Qiu et al., (2010) Nucleic Acids Res 38, 1240-1248). 특히, LIN28A를 녹다운하면 SET7/9 mRNA가 상당히 감소되었는데 ([도 15B], lane 2, [도 16B], lane 3), 이는 LIN28A가 SET7/9의 번역을 증가시킨 결과를 뒷받침한다.

[0173] <7-2> 전사발현 프로파일링 실험

[0174] LIN28A의 메틸화가 전형성능을 조절하는데 하는 역할에 대해 더 자세히 알아보기 위해, LIN28A 또는 SET7/9를 감소시킨 H9세포의 전사 발현 프로파일링을 시행하였다. 발현이 3배 이상 변화된 것을 기준으로 하여 상당량 증가 또는 감소 조절된 유전자들을 선별하였다. 기준값에 준하여 많은 변화를 보인 유전자들의 분포를 MA plot으로 평가하였다 ([도 17A]). 이들 중 EGFP 대조군에 비해 각각 LIN28A 녹다운 세포에서 발현 변화를 보인 555 (320개는 증가, 235개는 감소)개 유전자와 SET7/9 녹다운 세포에서 발현 변화를 보인 644 (385개는 증가, 259개는 감소)개 유전자를 확인하였다. LIN28A 녹다운 세포에서 발현 변화를 보인 유전자와 SET7/9 녹다운 세포에서 발현 변화를 보인 유전자들 사이에는 매우 높은 positive 상관관계($r = 0.86 \sim 0.88$)가 보였는데 ([도 17B]), 이는 LIN28A와 SET7/9가 공통된 기능을 갖는 것을 의미한다. 발현이 변화된 유전자들은 발달 과정에 상당히 연관되어 있었다 ([도 17C], [도 181A-C]). 이러한 결과를 더욱 뒷받침하기 위해, 초기 계통 마커 (early lineage markers)들의 발현 수준을 측정하였다. 특히, LIN28A 또는 SET7/9를 녹다운한 경우에 대표적인 초기 계통 마커들의 발현이 증가를 보였다 ([도 17D]). microarray 분석 결과로 얻은 유전자들의 발현에 대한 신뢰도를 검증하기 위해 comparative RT-qPCR을 시행하였다 ([도 15C], [도 16C]).

[0175] LIN28A를 녹다운한 세포에서 예상외로 초기 계통 마커들이 약하게 유도된 것은 전형성능 조절 유전자들의 발현 수준이 많이 변화되지 않았기 때문일 수 있으며, 초기 분화 단계에서 let-7에 의해 계통 마커들이 증가됨을 보여준다. 그러므로, mature let-7가 유도되는 것은 다른 인자들이 간접적으로 분화과정에 영향을 주는 것 이라기 보다는, pre-let7 miRNA 생합성에 영향을 주는 세포질 내 형태의 LIN28A와 pri-let7 생합성에 영향을 주는 핵 내 형태의 LIN28A의 직접적인 효과에 의한 것임을 나타낸다. Let-7 miRNA의 몇몇 표적 유전자들은 초기 분화단계부터 영향을 주기 시작 한다 ([도 18D]). 모든 결과를 종합하여 볼 때, LIN28A와 SET7/9는 let-7 miRNA를 특이적으로 조절함으로써 전형성능과 분화능을 조절하는데 중요한 기능을 한다.

산업상 이용가능성

[0176] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명의 방법은 배아줄기세포의 전분화능을 조절할 수 있는 물질 또는 항암활성이 있는 물질을 효과적으로 스크리닝 할 수 있으며, 본 발명의 방법에 의해 스크리닝 된 물질은 배아줄기세포의 전분화능을 조절하고, 암세포의 성장을 억제하여 줄기세포 분화 장애 또는 암 치료제 제조에 효과적이어서 산업상 이용가능성이 높다.

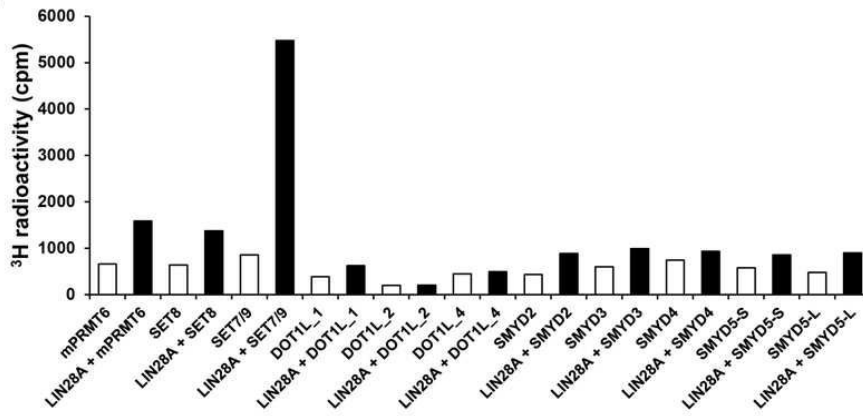
도면

도면1

A

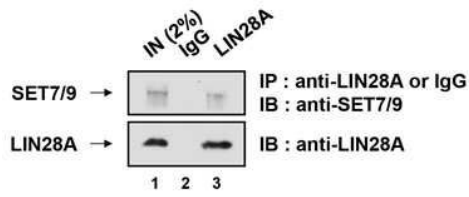


B

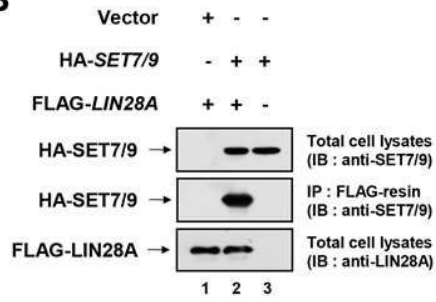


도면2

A



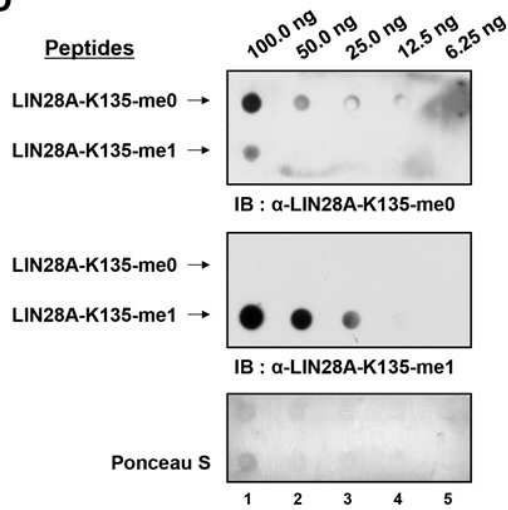
B



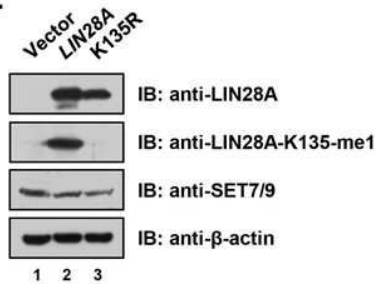
C

	R/K-S/T-K
Histone H3 (1-11)	ARTKQTARKST
p53 (365-379)	HSSHLKSKKGGQSTSR
TAF10 (182-196)	GSSRSKSKDRKYTLT
DNMT1 (135-149)	PRTPRRSKSDGEAKR
ERα (295-309)	PLMIKRSKKNLALS
E2F1 (178-192)	QLIAKSKNHIQWLG
LIN28A (128-142)	SMQRRSKGDRCYNC
LIN28B (118-132)	TLQKRKPKGDRCYNC

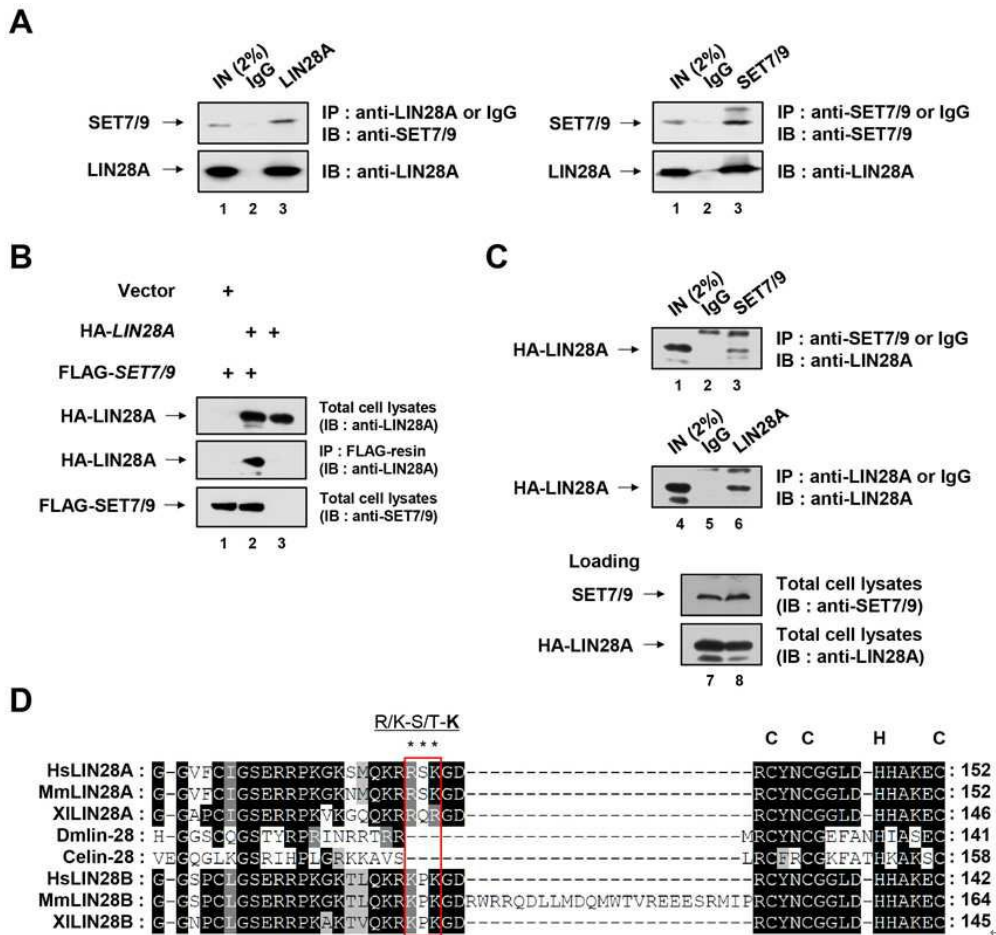
D



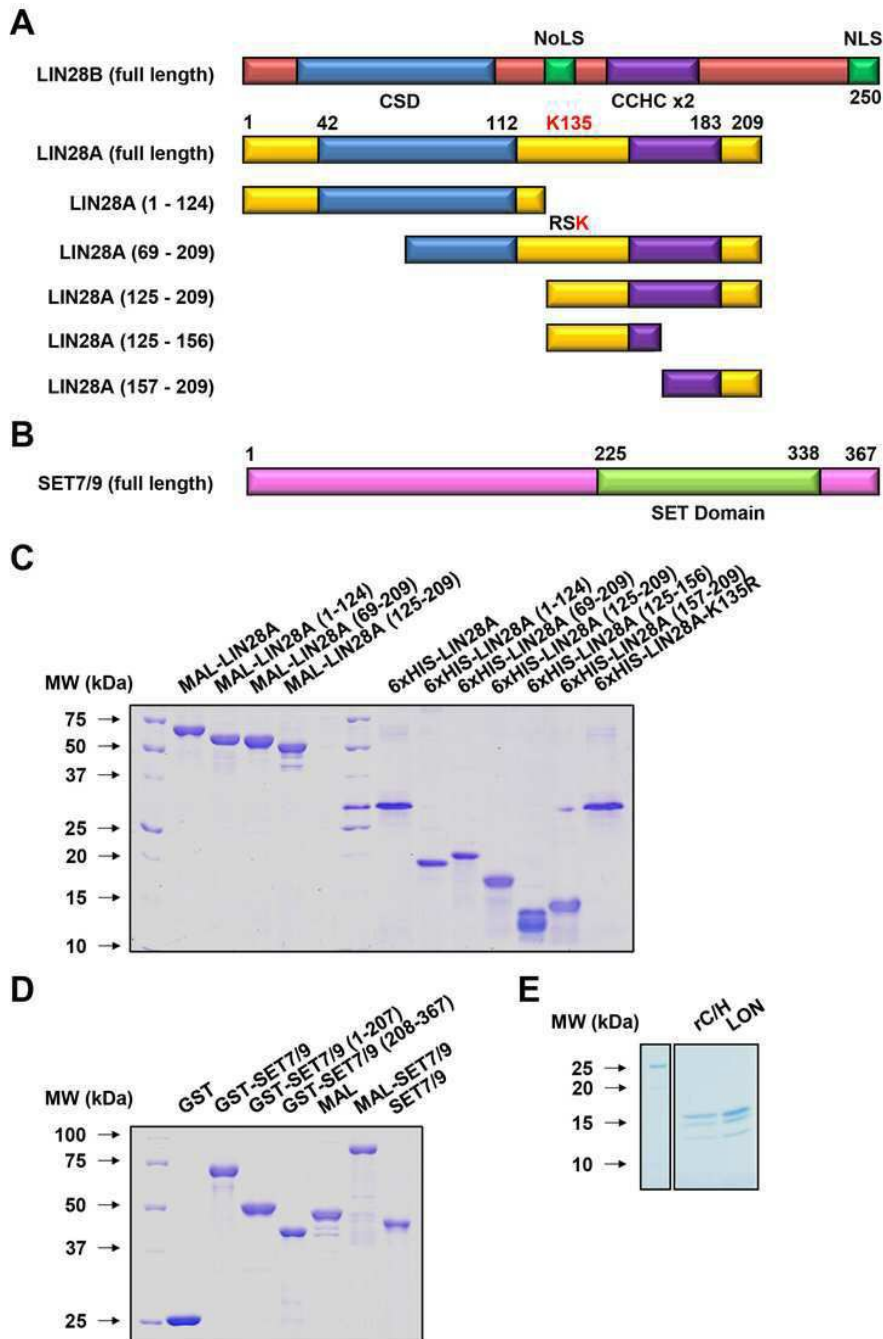
E



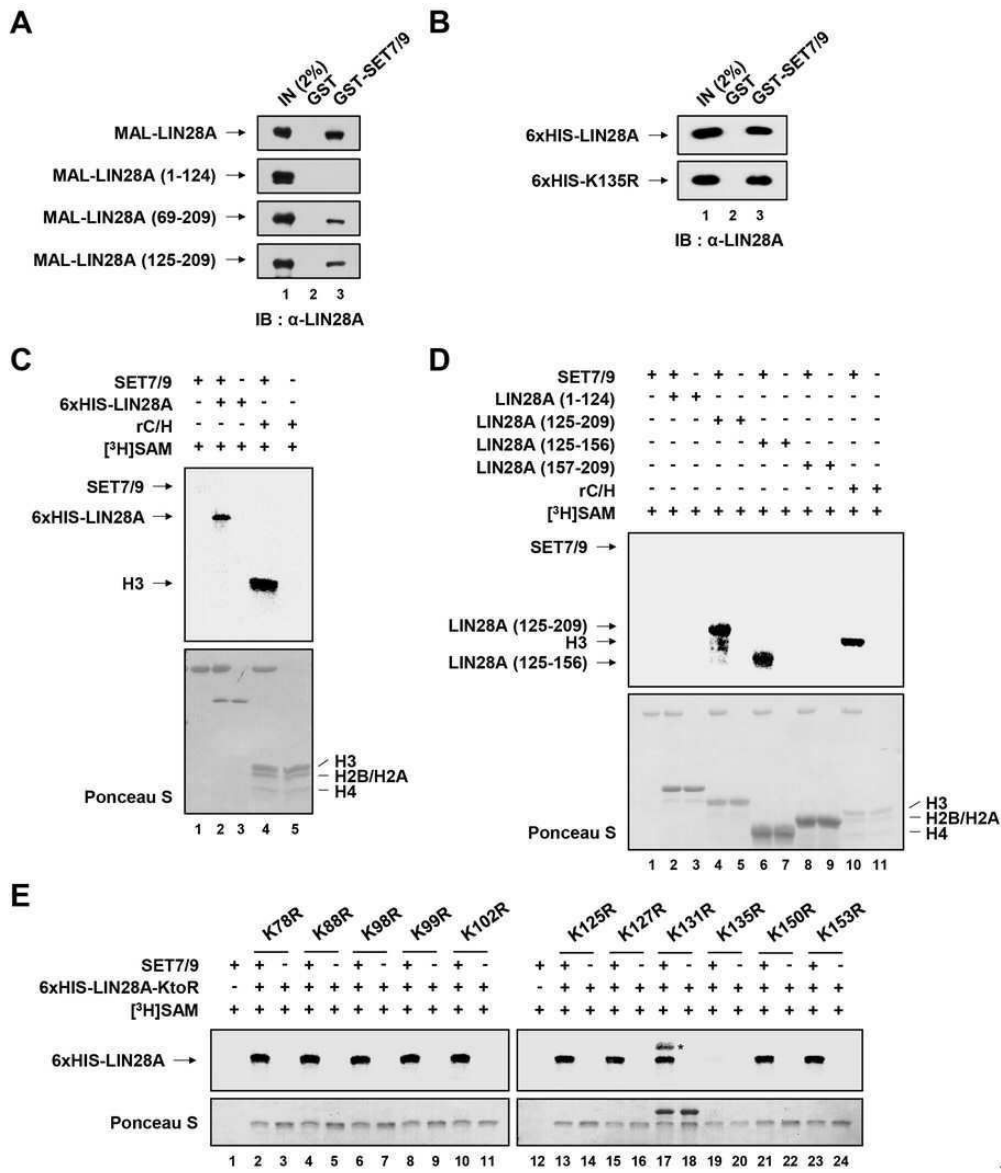
도면3



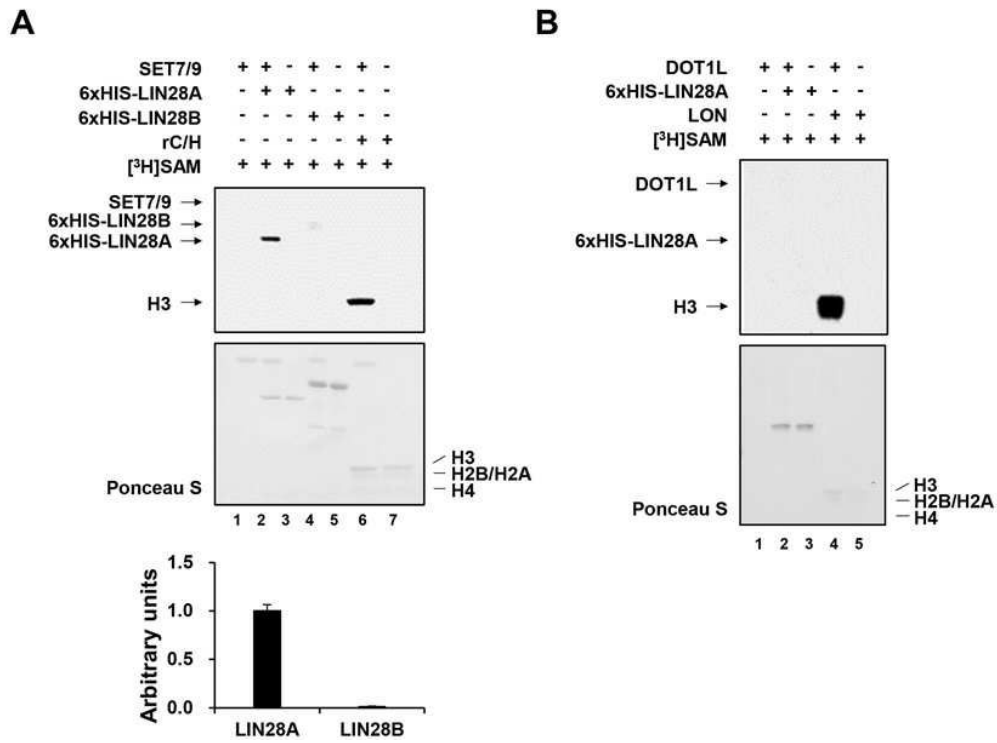
도면4



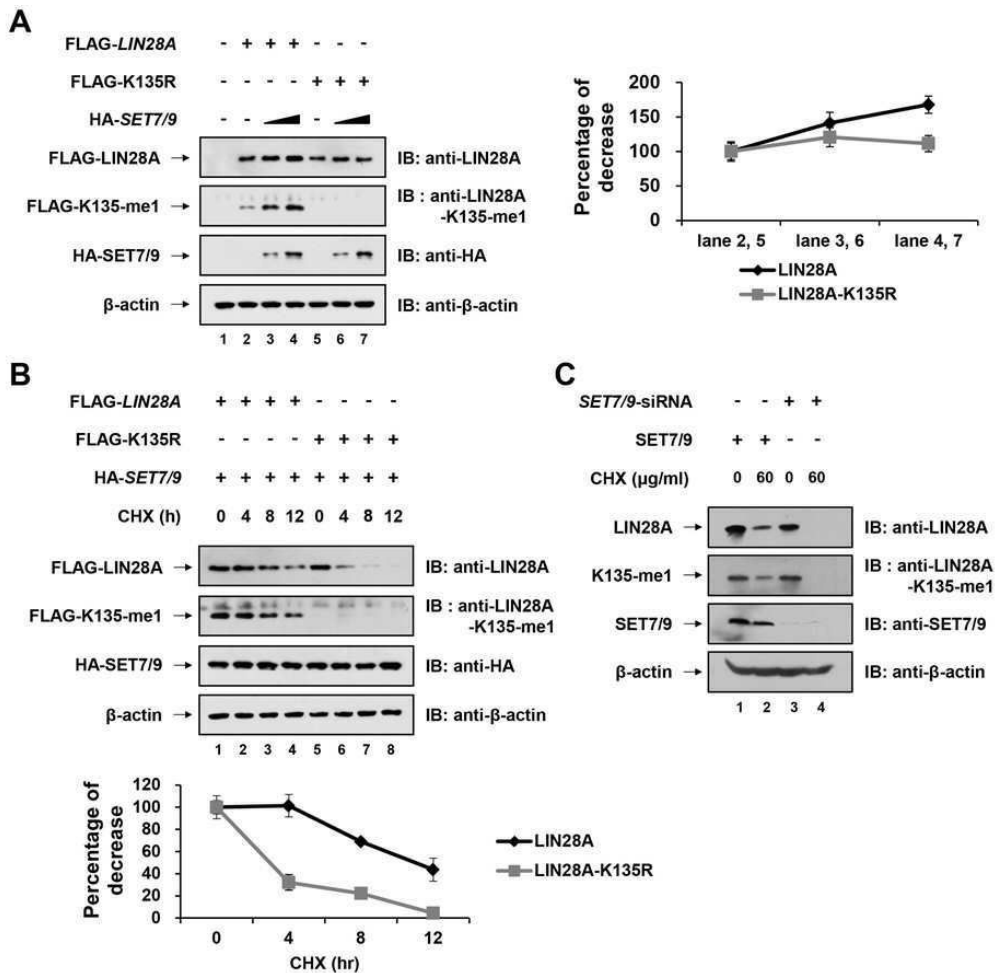
도면5



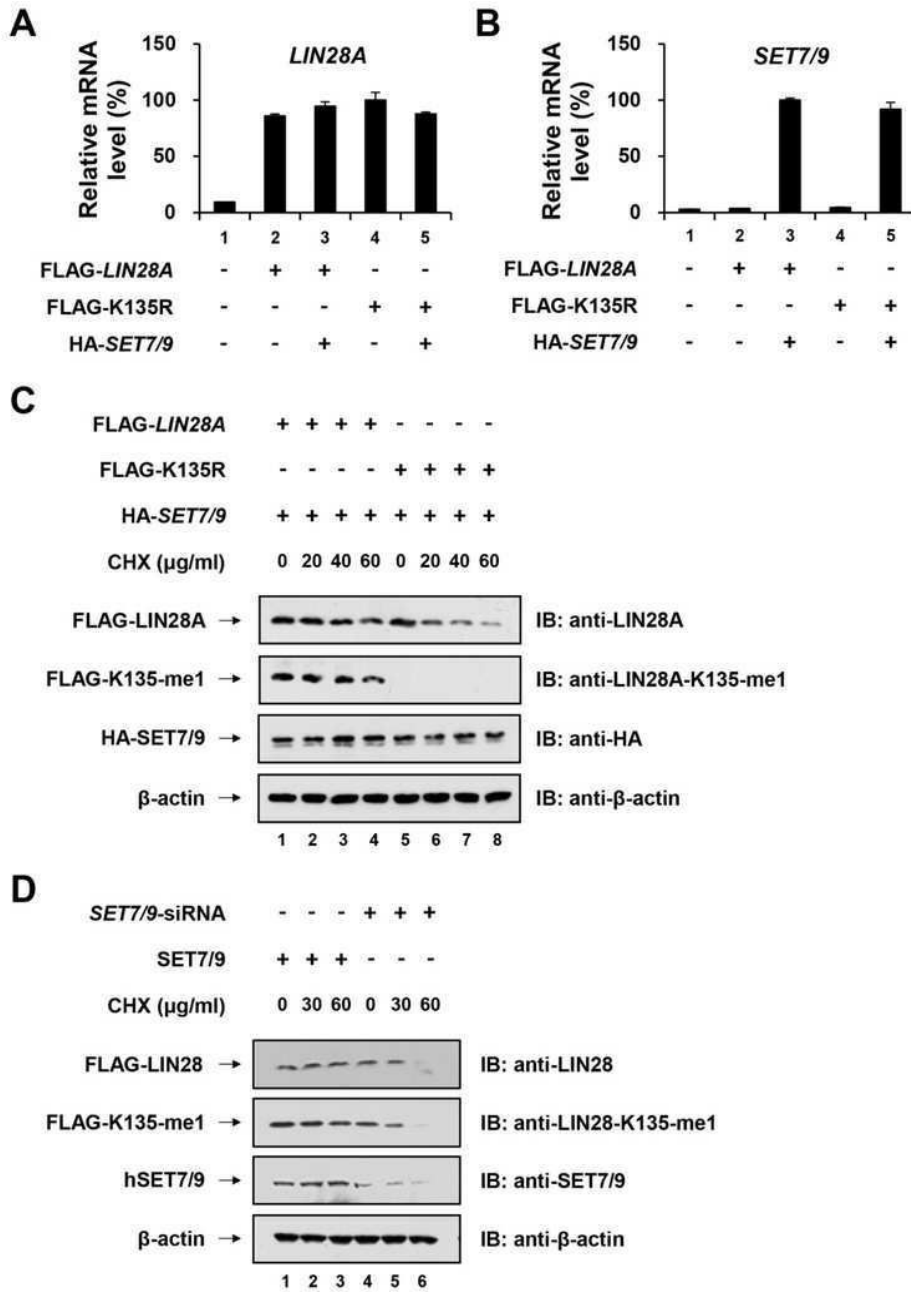
도면6



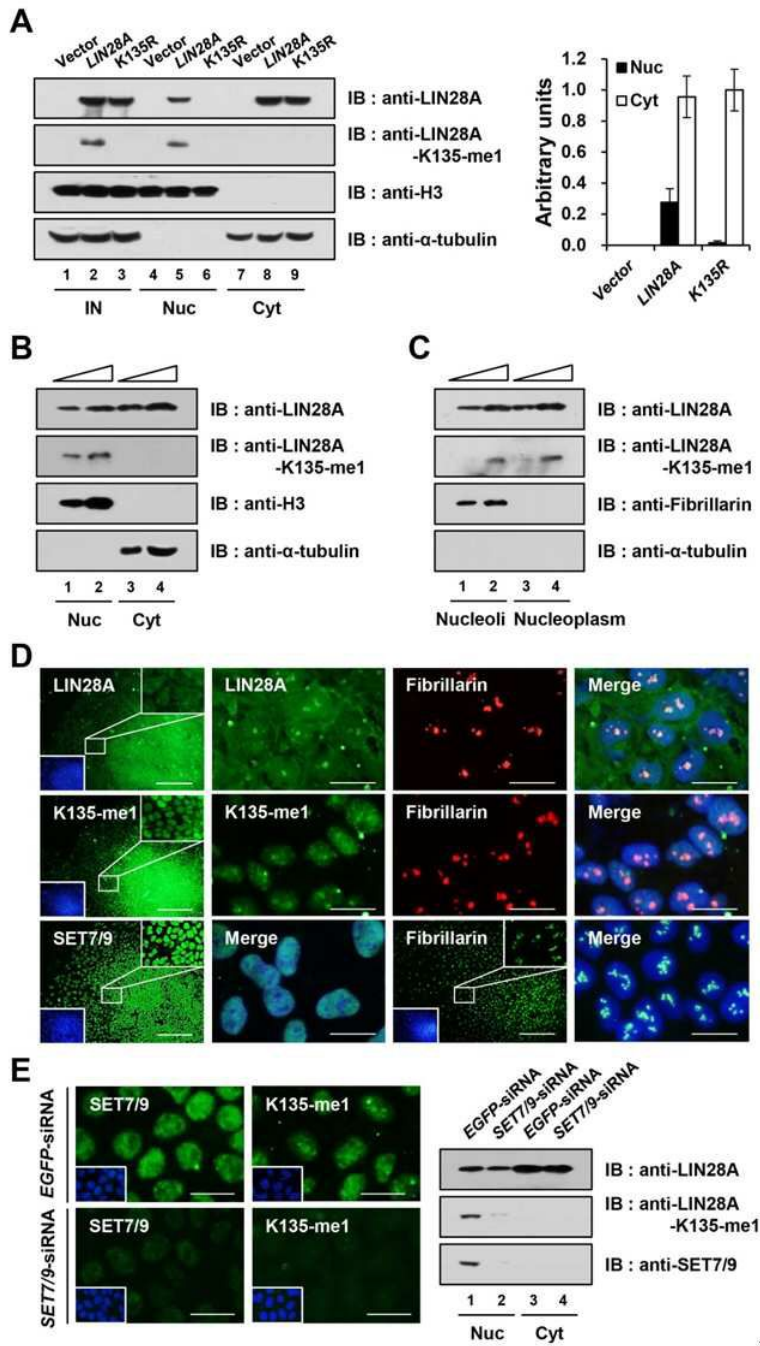
도면7



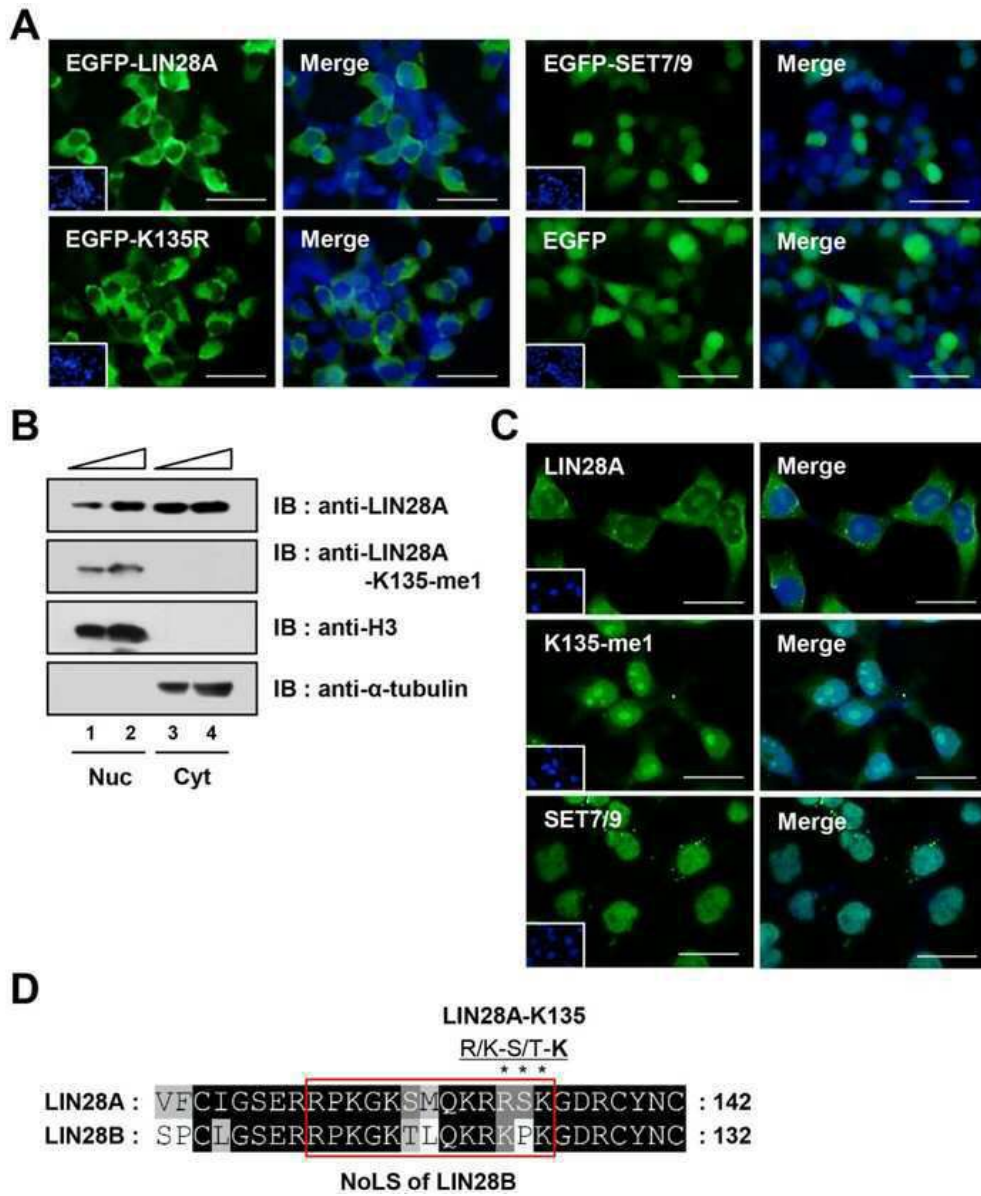
도면8



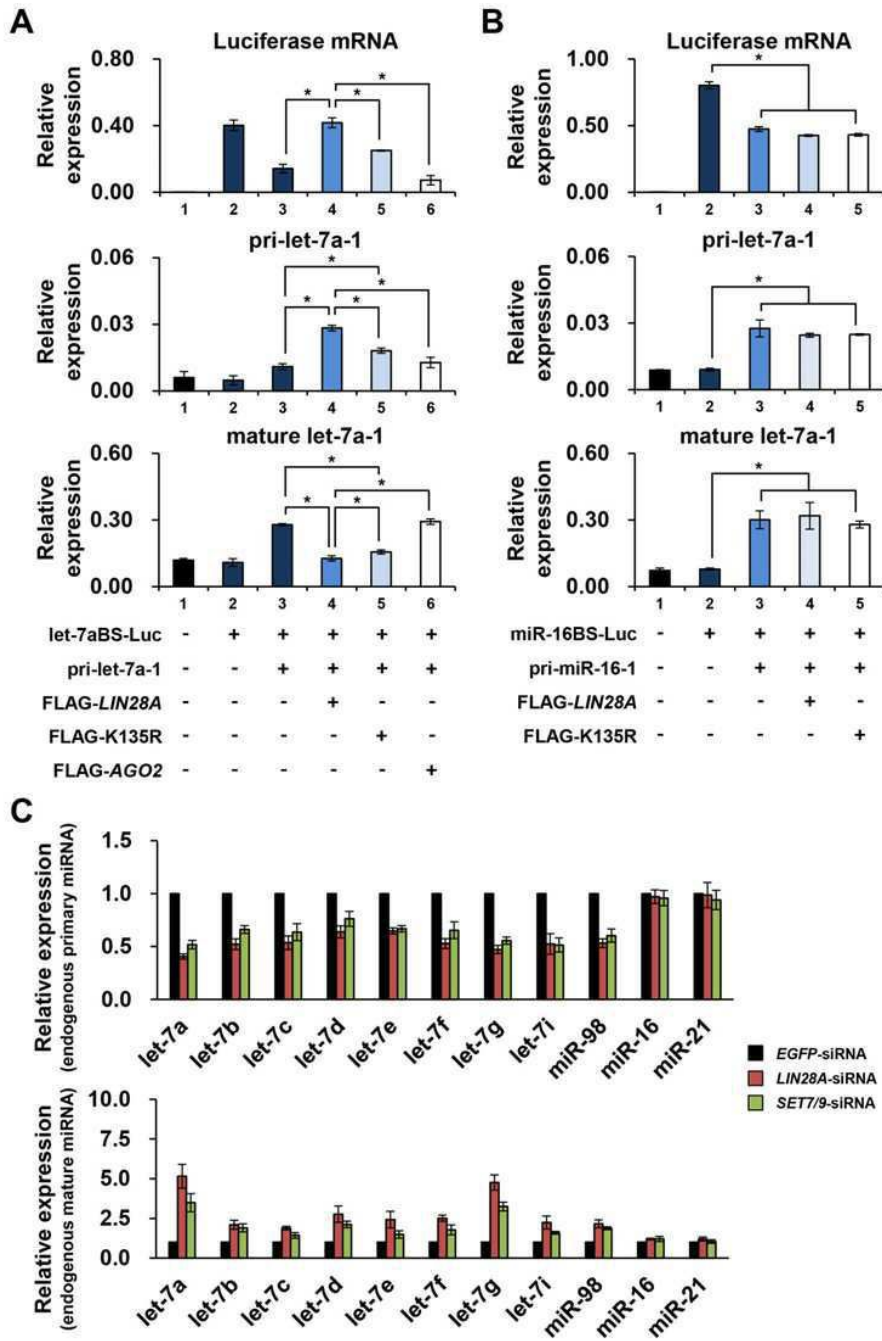
도면9



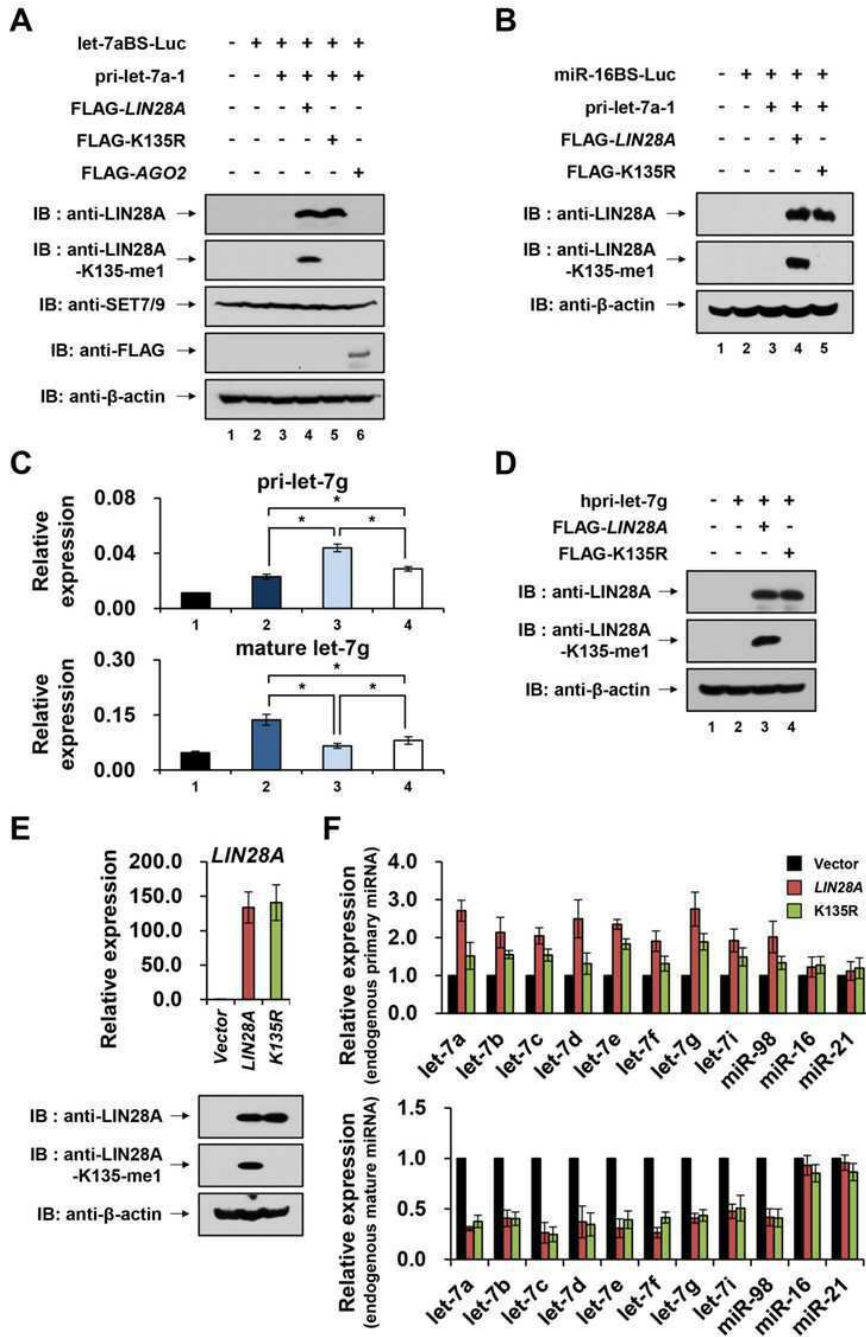
도면10



도면11

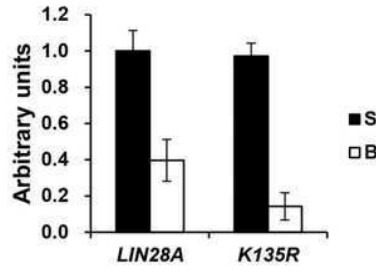
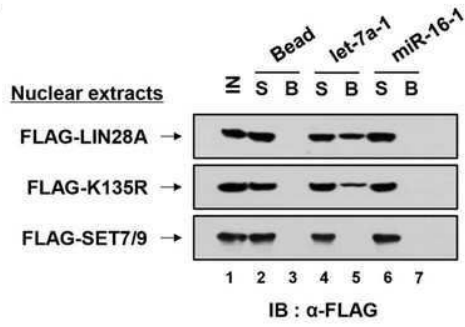


도면12

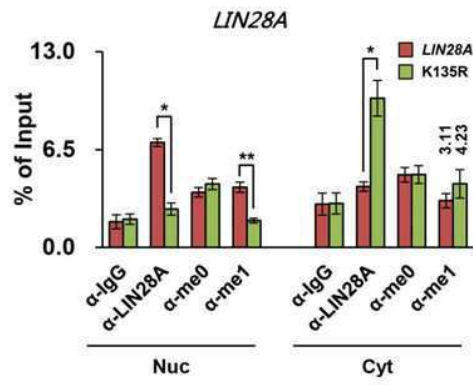
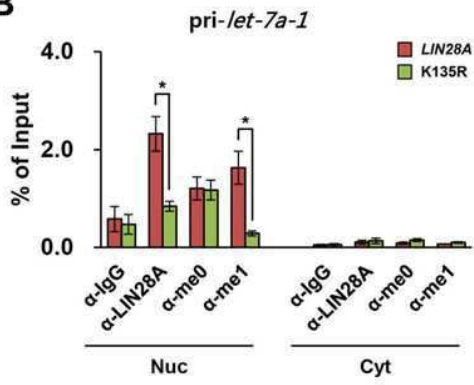


도면13

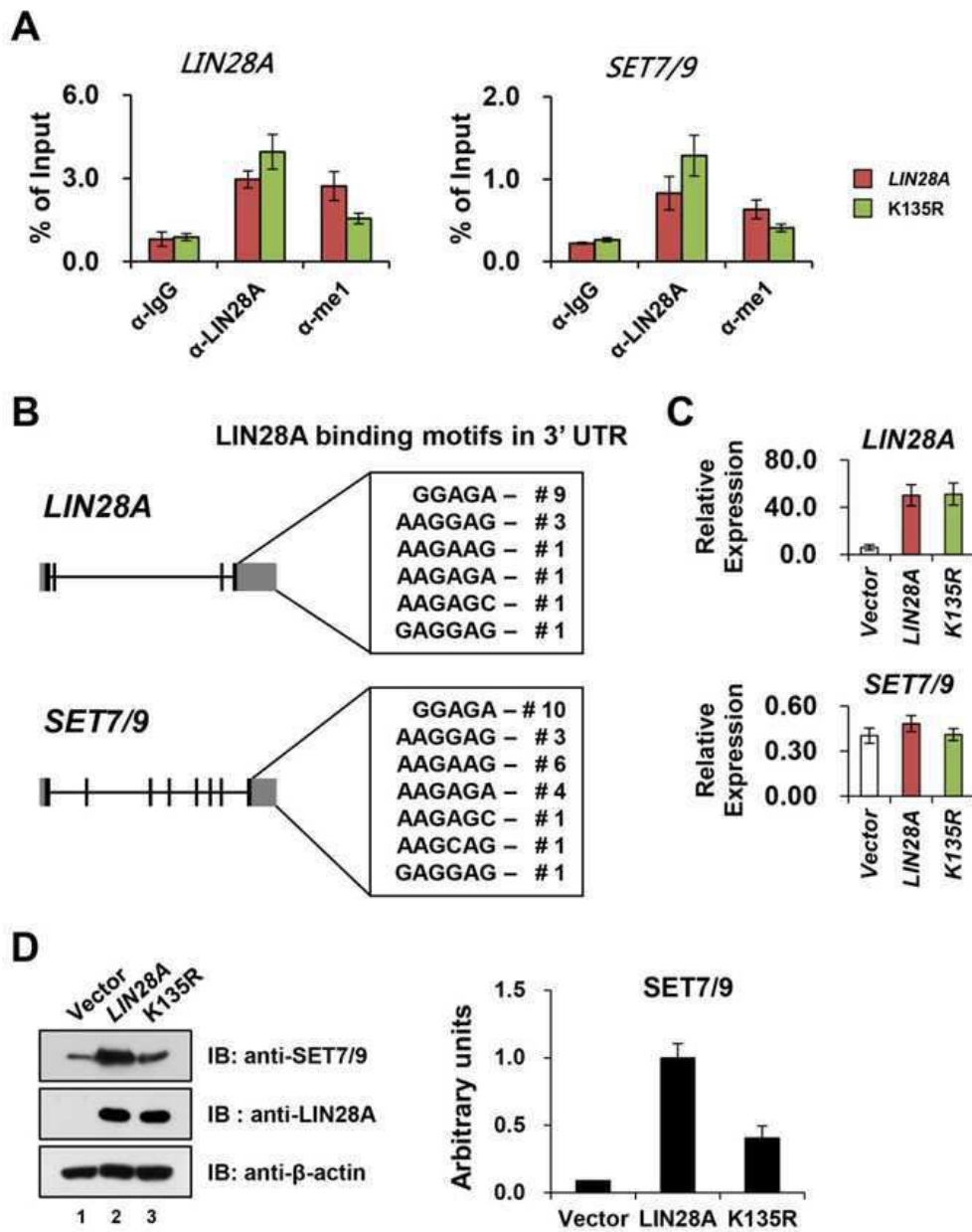
A



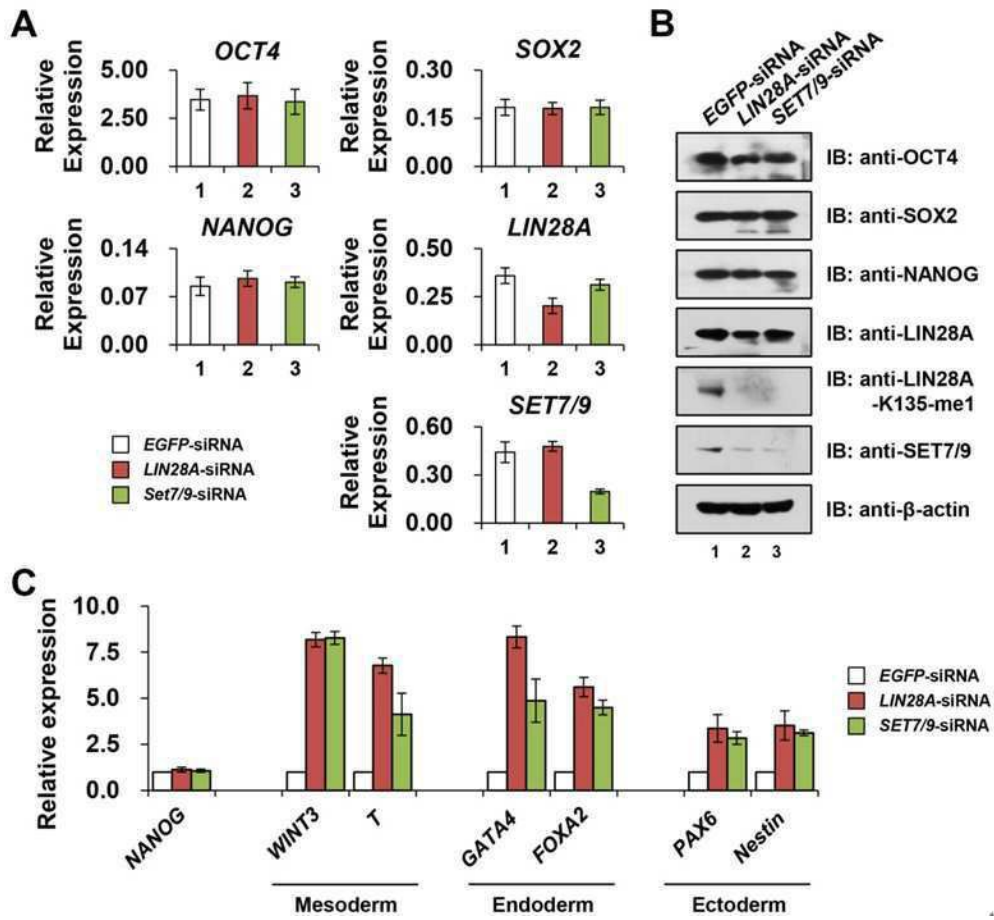
B



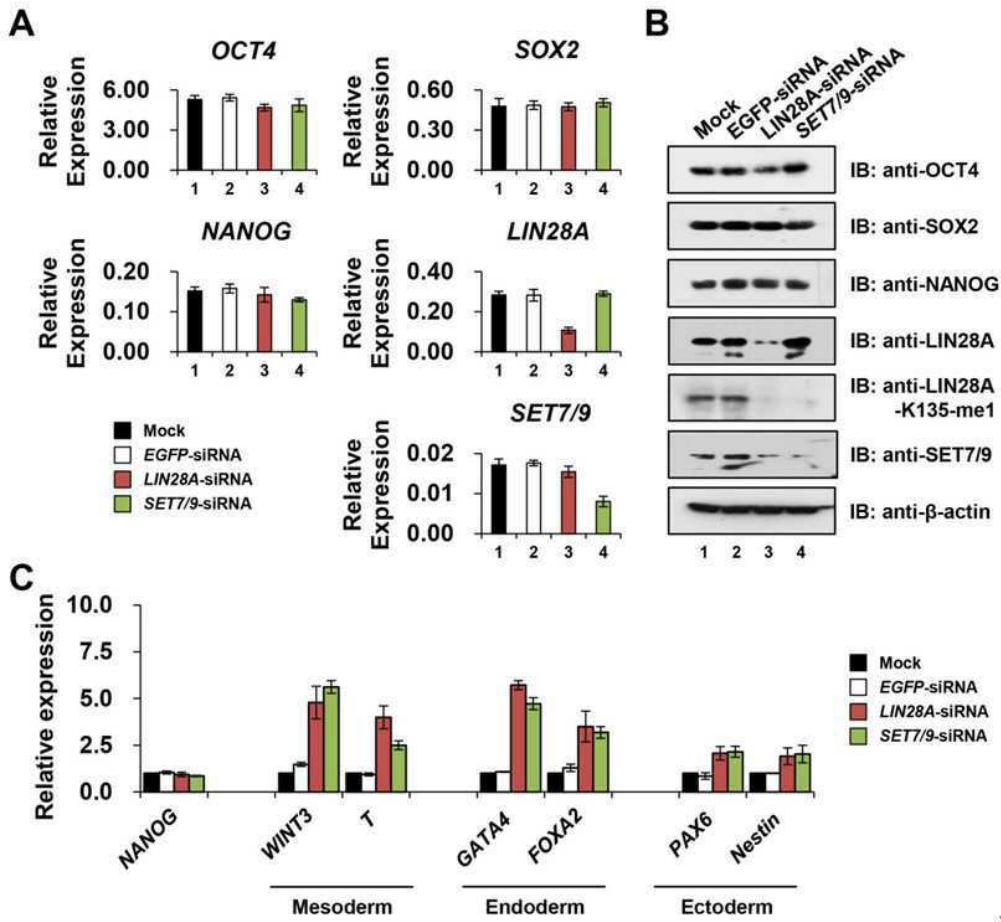
도면14



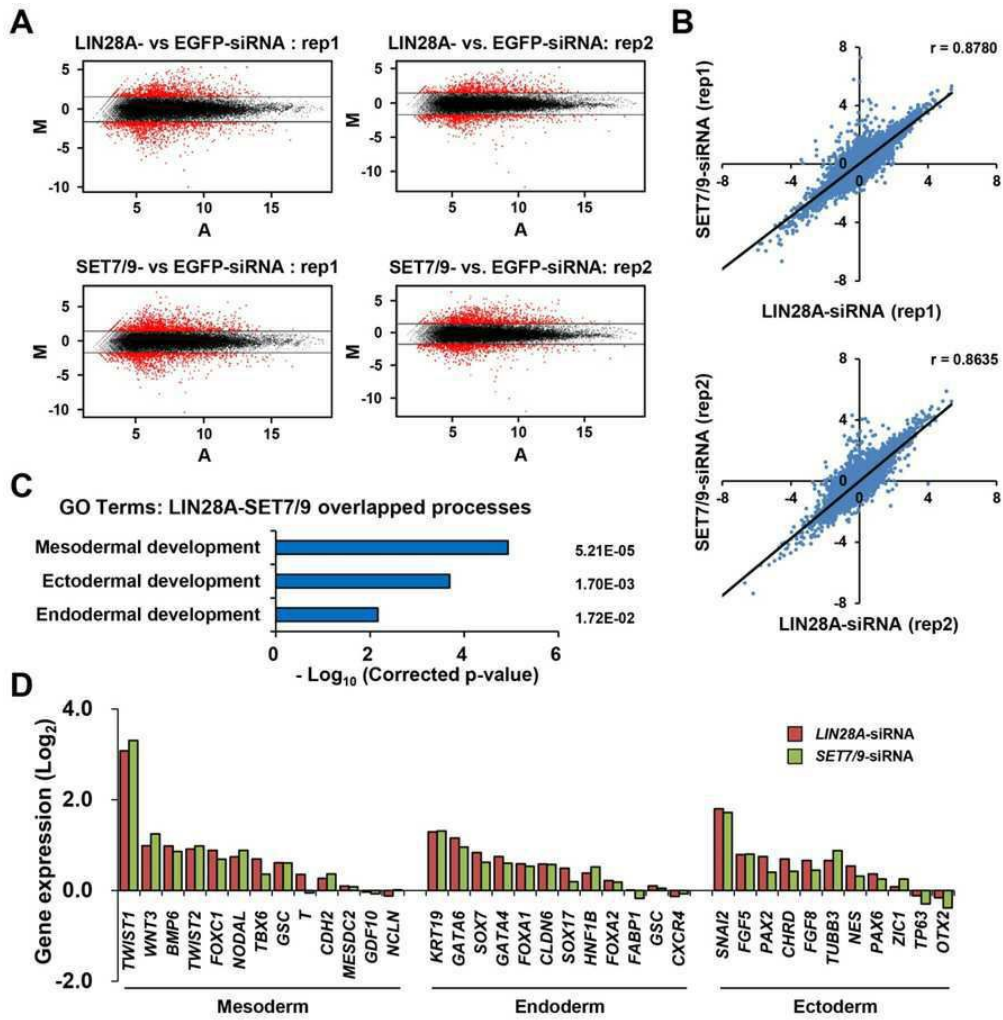
도면15



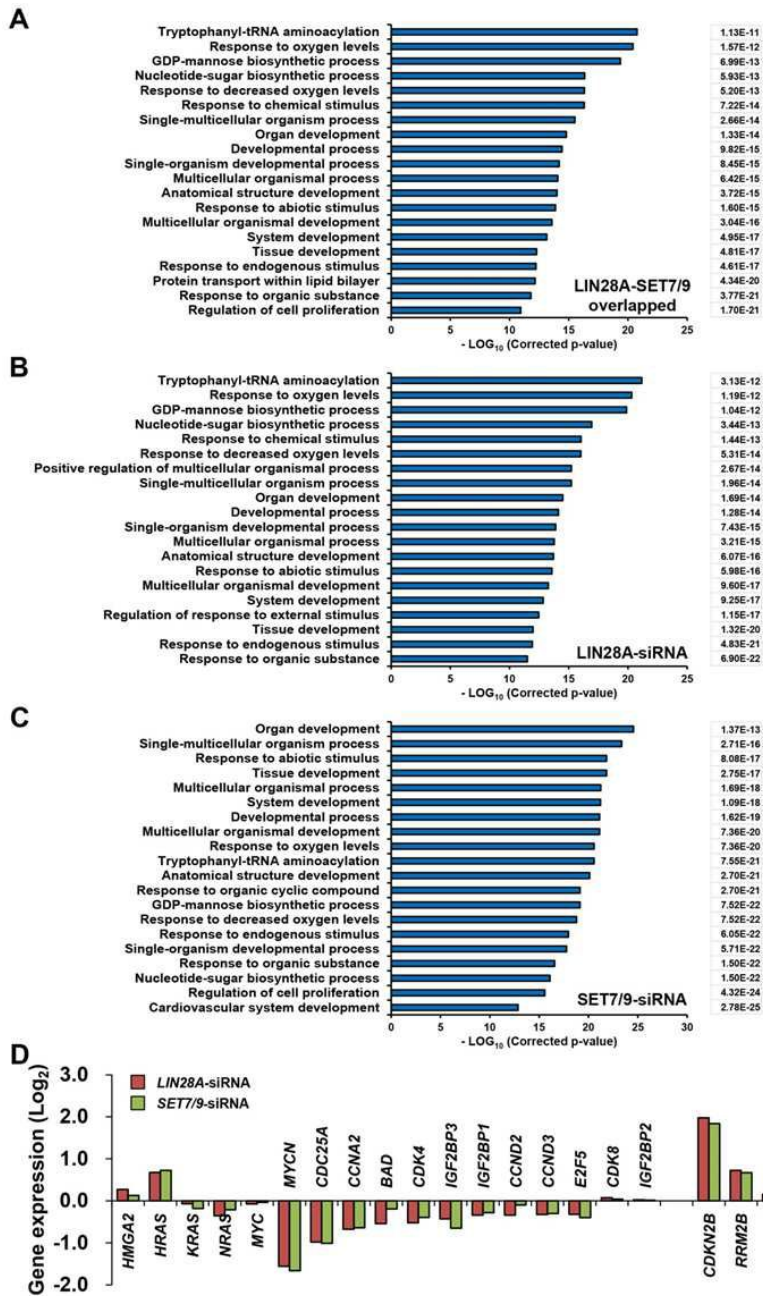
도면16



도면17



도면18



서열목록

- <110> Korea Advanced Institute of Science and Technology
- <120> Inhibitors of methylation of LIN28A for controlling differentiation of pluripotent stem cells, its screening method and Compositions of the same
- <130> P14-B043
- <160> 54
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 45
 <212> RNA
 <213> let-7a-1
 <400> 1
 uguauaguuu uaggucaca cccaccacug ggagauacu auaca 45
 <210> 2
 <211> 45
 <212> RNA
 <213> miR-16-1
 <400> 2
 guaaaauug gcguuaagau ucuaaaauua ucuccaguau uaacu 45
 <210> 3
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> sequence for siRNA of LIN28A
 <400> 3
 cuacaacugu ggaggucua 19
 <210> 4
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> sequence for siRNA of SET7/9
 <400> 4
 gccuuguagg agaaguaaa 19
 <210> 5
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> sequence for siRNA of EGFP
 <400> 5
 guucagcgug uccggcgag 19
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> LIN28A-RT-F

<400> 6
 agcatgcaga agcgagatc aa 22
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> LIN28A-RT-R
 <400> 7
 gctaccatat ggctgatgct ct 22
 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> SET7/9-RT-F
 <400> 8
 tcattgatgt gcctgagccc ta 22

 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> SET7/9-RT-R
 <400> 9
 tcagggtgcg gatgcatttg at 22
 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> OCT4-RT-F
 <400> 10
 aaaccacac tgcagcagat ca 22
 <210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> OCT4-RT-R
 <400> 11
 tcgttgtgca tagtcgctgc tt 22
 <210> 12
 <211> 23

<212>	DNA	
<213>	SOX2-RT-F	
<400>	12	
	tgtggttacc tcttctccc act	23
<210>	13	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	SOX2-RT-R	
<400>	13	
	tggtagtgtc gggacatgtg aa	22
<210>	14	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	NANOG-RT-F	
<400>	14	
	accttccaat gtggagcaac ca	22
<210>	15	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	NANOG-RT-R	
<400>	15	
	tgcatgcagg actgcagaga tt	22
<210>	16	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	GAPDH-RT-F	
<400>	16	
	acatcaagaa ggtggtgaag cagg	24
<210>	17	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	GAPDH-RT-R	
<400>	17	

caccctgttg ctgtagccaa at	22
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Firefly-RT-F	
<400> 18	
cgaaggttgt ggatctggat a	21
<210> 19	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Firefly-RT-R	
<400> 19	
cgcttccgga ttgtttacat a	21
<210> 20	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Renilla-RT-F	
<400> 20	
ttatcatggc ctctgaaat c	21
<210> 21	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Renilla-RT-R	
<400> 21	
ctgggtccga ttcaataaac a	21
<210> 22	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Pri-let-7a-1-RT-R	
<400>	
> 22	
gattcctttt caccattcac c	21
<210> 23	
<211> 21	

<212> DNA
 <213> Pri-let-7a-1-RT-F
 <400> 23
 tttctatcag accgcctgga t 21
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Pri-let-7g-RT-R
 <400> 24
 cctgtctcaa gtgcatcctg 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Pri-let-7g-RT-F
 <400> 25
 cagagatgag cagggtgacg 20

 <210> 26
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Pri-miR-16-1-RT-R
 <400> 26
 aggtgcagc catattgtgc t 21
 <210> 27
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Pri-miR-16-1-RT-F
 <400> 27
 ctgaaaagac tatcaataaa ac 22
 <210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mature let-7a-RT-F
 <400> 28
 tgaggtagta ggttgtatag tt 22

<210> 29
 <211>
 > 22
 <212> DNA
 <213> Mature let-7b-RT-F
 <400> 29
 tgaggtagta ggttgtgtgg tt 22
 <210> 30
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mature let-7c-RT-F
 <400> 30
 tgaggtagta ggttgtatgg tt 22
 <210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mature let-7d-RT-F
 <400> 31
 agaggtagta ggttgcatag tt 22
 <210> 32
 <211> 22
 <212>
 DNA
 <213> Mature let-7e-RT-F
 <400> 32
 tgaggtagga ggttgtatag tt 22
 <210> 33
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mature let-7f-RT-F
 <400> 33
 tgaggtagta gattgtatag tt 22
 <210> 34
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Mature let-7g-RT-F
 <400> 34
 tgaggtagta gttgtacag tt 22
 <210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213>
 Mature let-7i-RT-F
 <400> 35
 tgaggtagta gttgtgctg tt 22
 <210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mature miR-98-RT-F
 <400> 36
 tgaggtagta agttgtattg tt 22
 <210> 37
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Mature miR-16-RT-F
 <400> 37
 tagcagcacg taaatattgg cg 22
 <210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mature miR-21-RT-F
 <400> 38
 caacaccagt cgatgggctg t 21
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> WINT3-RT-F
 <400> 39
 ggccatgaac aagcacaaca 20

<210> 40
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> WINT3-RT-R
 <400> 40
 tgccgtggga ggtgacatt 19
 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> T (Brachyury)-RT-F
 <400> 41
 gcgggaaaga gcctgcagta 20

 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> T (Brachyury)-RT-R
 <400> 42
 ttccccgttc acgtacttcc 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> GATA4-RT-F
 <400> 43
 tccaaccag aaaacggaag 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> GATA4-RT-R
 <400> 44
 ctgtgcccg agtgatga 20
 <210> 45
 <211> 22
 <212>
 > DNA

<213> FOXA2-RT-F
 <400> 45
 ctgagcggaga tctaccagtg ga 22
 <210> 46
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> FOXA2-RT-R
 <400> 46
 agtcgttgaa ggagagcgag t 21
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> PAX6-RT-F
 <400> 47
 ggtccaacg gatgtgtgag 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> PAX6-RT-R
 <400> 48

 ctagccaggt tgcaagaac 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> NES (Nest in)-RT-F
 <400> 49
 aagaaataaa tcagggggca 20
 <210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> NES (Nest in)-RT-R
 <400> 50
 caggttctct tcctcttcca 20
 <210> 51

<211> 630
 <212> DNA
 <213> LIN28A
 <400> 51

atgggctccg tgtccaacca gcagtttgca ggtggctgcg ccaaggcggc agaagaggcg 60

cccgaggagg cgccggagga cgcgcccg gcgcgggacg agcctcagct getgcacggt 120

gcgggcatct gtaagtggtt caacgtgctc atggggttcg gcttctgtc catgaccgcc 180

cgcgccgggg tcgcgctcga cccccagtg gatgtctttg tgcaccagag taagctgcac 240

atggaagggt tccggagctt gaaggagggt gaggcagtgg agttcacctt taagaagtca 300

gcccaagggtc tggaatccat ccgtgtcacc ggacctggtg gagtattctg tattgggagt 360

gagagcggcg caaaaggaaa gagcatgcag aagcgcagat caaaaggaga caggtgctac 420

aactgtggag gtctagatca tcatgccaag gaatgcaagc tgccacccca gcccaagaag 480

tgccacttct gccagagcat cagccatatg gtagcctcat gtcgctgaa ggcccagcag 540

ggccctagtg cacagggaaa gccaacctac tttcgagagg aagaagaaga aatccacagc 600

cctaccctgc tcccggaggc acagaattga 630

<210> 52
 <211> 209
 <212> PRT
 <213> LIN28A
 <400> 52

Met Gly Ser Val Ser Asn Gln Gln Phe Ala Gly Gly Cys Ala Lys Ala
 1 5 10 15

Ala Glu Glu Ala Pro Glu Glu Ala Pro Glu Asp Ala Ala Arg Ala Ala
 20 25 30

Asp Glu Pro Gln Leu Leu His Gly Ala Gly Ile Cys Lys Trp Phe Asn
 35 40 45

Val Arg Met Gly Phe Gly Phe Leu Ser Met Thr Ala Arg Ala Gly Val
 50 55 60

Ala Leu Asp Pro Pro Val Asp Val Phe Val His Gln Ser Lys Leu His
 65 70 75 80

Met Glu Gly Phe Arg Ser Leu Lys Glu Gly Glu Ala Val Glu Phe Thr
 85 90 95

Phe Lys Lys Ser Ala Lys Gly Leu Glu Ser Ile Arg Val Thr Gly Pro

100 105 110

Gly Gly Val Phe Cys Ile Gly Ser Glu Arg Arg Pro Lys Gly Lys Ser

115 120 125

Met Gln Lys Arg Arg Ser Lys Gly Asp Arg Cys Tyr Asn Cys Gly Gly

130 135 140

Leu Asp His His Ala Lys Glu Cys Lys Leu Pro Pro Gln Pro Lys Lys

145 150 155 160

Cys His Phe Cys Gln Ser Ile Ser His Met Val Ala Ser Cys Pro Leu

165 170 175

Lys Ala Gln Gln Gly Pro Ser Ala Gln Gly Lys Pro Thr Tyr Phe Arg

180 185 190

Glu Glu Glu Glu Glu Ile His Ser Pro Thr Leu Leu Pro Glu Ala Gln

195 200 205

Asn

<210> 53

<211> 1101

<212> DNA

<213> SET7/9

<400> 53

atggatagcg acgacgagat ggtggaggag gcggtggaag ggcacctgga cgatgacgga 60

ttaccgcacg ggttctgcac agtcacctac tctccacag acagatttga ggggaacttt 120

gttcacggag aaaagaacgg acgggggaag ttcttcttct ttgatggcag caccctggag 180

gggtattatg tggatgatgc cttgcagggc cagggagttt acacttacga agatggggga 240

gttctccagg gcacgtatgt agacggagag ctgaacggtc cagcccagga atatgacaca 300

gatgggagac tgatcttcaa ggggcagtat aaagataaca ttcgtcatgg agtgtgctgg 360

atatattacc cagatggagg aagccttgta ggagaagtaa atgaagatgg ggagatgact 420

ggagagaaga tagcctatgt gtaccctgat gagaggaccg cactttatgg gaaatttatt 480

gatggagaga tgatagaagg caaactggct acccttatgt ccaactgaaga agggaggcct 540

cactttgaac tgatgcctgg aaattcagtg taccactttg ataagtcgac ttcactttgc 600

atttctacca atgctcttct tccagatcct tatgaatcag aaagggttta tgttgctgaa 660
 tctcttattt ccagtgcctgg agaaggactt ttttcaaagg tagctgtggg acctaatact 720
 gttatgtctt ttataatgg agttcgaatt acacaccaag aggttgacag cagggactgg 780
 gcccttaatg ggaacaccct ctcccttgat gaagaaacgg tcattgatgt gcctgagccc 840
 tataaccacg tatccaagta ctgtgcctcc ttgggacaca aggcaaatca ctcttctact 900
 ccaaactgea tctacgatat gtttgtccac ccccgttttg ggcccatcaa atgcatccgc 960
 accctgagag cagtggaggc cgatgaagag ctaccgcttg cctatggcta tgaccacagc 1020

ccccccggga agagtgggcc tgaagcccct gagtgggtacc aggtggagct gaaggccttc 1080
 caggccaccc agcaaaagtg a 1101

- <210> 54
- <211> 366
- <212> PRT
- <213> SET7/9
- <400> 54

Met Asp Ser Asp Asp Glu Met Val Glu Glu Ala Val Glu Gly His Leu
 1 5 10 15
 Asp Asp Asp Gly Leu Pro His Gly Phe Cys Thr Val Thr Tyr Ser Ser
 20 25 30
 Thr Asp Arg Phe Glu Gly Asn Phe Val His Gly Glu Lys Asn Gly Arg
 35 40 45
 Gly Lys Phe Phe Phe Phe Asp Gly Ser Thr Leu Glu Gly Tyr Tyr Val
 50 55 60
 Asp Asp Ala Leu Gln Gly Gln Gly Val Tyr Thr Tyr Glu Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Val Leu Gln Gly Thr Tyr Val Asp Gly Glu Leu Asn Gly Pro Ala Gln
 85 90 95
 Glu Tyr Asp Thr Asp Gly Arg Leu Ile Phe Lys Gly Gln Tyr Lys Asp
 100 105 110
 Asn Ile Arg His Gly Val Cys Trp Ile Tyr Tyr Pro Asp Gly Gly Ser
 115 120 125
 Leu Val Gly Glu Val Asn Glu Asp Gly Glu Met Thr Gly Glu Lys Ile
 130 135 140

Ala Tyr Val Tyr Pro Asp Glu Arg Thr Ala Leu Tyr Gly Lys Phe Ile
 145 150 155 160

Asp Gly Glu Met Ile Glu Gly Lys Leu Ala Thr Leu Met Ser Thr Glu
 165 170 175

Glu Gly Arg Pro His Phe Glu Leu Met Pro Gly Asn Ser Val Tyr His
 180 185 190

Phe Asp Lys Ser Thr Ser Ser Cys Ile Ser Thr Asn Ala Leu Leu Pro
 195 200 205

Asp Pro Tyr Glu Ser Glu Arg Val Tyr Val Ala Glu Ser Leu Ile Ser
 210 215 220

Ser Ala Gly Glu Gly Leu Phe Ser Lys Val Ala Val Gly Pro Asn Thr
 225 230 235 240

Val Met Ser Phe Tyr Asn Gly Val Arg Ile Thr His Gln Glu Val Asp
 245 250 255

Ser Arg Asp Trp Ala Leu Asn Gly Asn Thr Leu Ser Leu Asp Glu Glu
 260 265 270

Thr Val Ile Asp Val Pro Glu Pro Tyr Asn His Val Ser Lys Tyr Cys
 275 280 285

Ala Ser Leu Gly His Lys Ala Asn His Ser Phe Thr Pro Asn Cys Ile
 290 295 300

Tyr Asp Met Phe Val His Pro Arg Phe Gly Pro Ile Lys Cys Ile Arg
 305 310 315 320

Thr Leu Arg Ala Val Glu Ala Asp Glu Glu Leu Thr Val Ala Tyr Gly
 325 330 335

Tyr Asp His Ser Pro Pro Gly Lys Ser Gly Pro Glu Ala Pro Glu Trp
 340 345 350

Tyr Gln Val Glu Leu Lys Ala Phe Gln Ala Thr Gln Gln Lys
 355 360 365

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 3

【변경전】

2항에 있어서

【변경후】

제2항에 있어서