



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월16일

(11) 등록번호 10-2443764

(24) 등록일자 2022년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)
C12Q 1/6883 (2018.01) G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 3/10 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-0040444

(22) 출원일자 2020년04월02일

심사청구일자 2020년04월02일

(65) 공개번호 10-2021-0123116

(43) 공개일자 2021년10월13일

(56) 선행기술조사문헌

Pathology - Research and Practice. 2019.
Vol.215, Article 152510.

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene
Regulatory Mechanisms. 2016. Vol.1859. No.11,
pp.1429-1439.

Clinical Chemistry. 2009. Vol.55, No.3,
pp.425-438.*

Journal of Lipid Research. 2012. Vol.53,
pp.755-766.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

허만옥

서울특별시 마포구 상암산로1길 92, 717동 501호
(상암동, 상암월드컵파크 7단지)

최원일

대전광역시 유성구 어은로 57, 115동 605호(어은동, 한빛아파트)

윤재현

서울특별시 광진구 천호대로132길 38, 401호(구의동)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 8 항

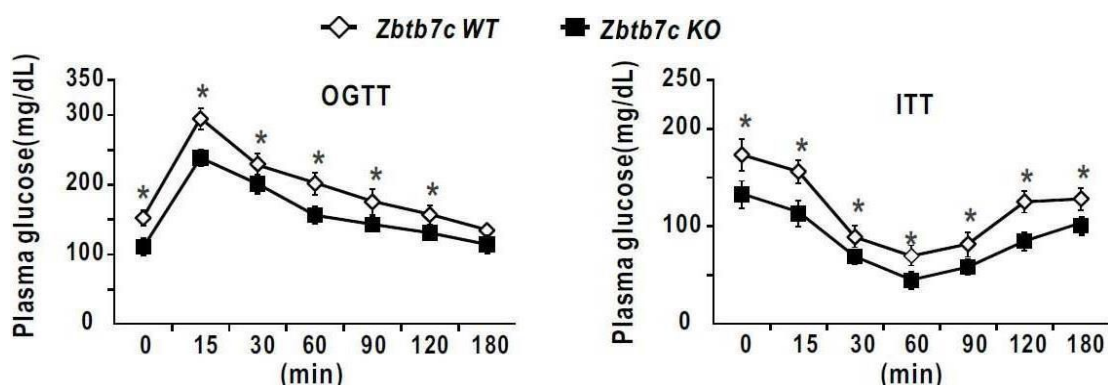
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 ZBTB7C 억제제를 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물

(57) 요약

본 발명은 고혈당증(Hyperglycemia) 및 저혈당증(hypoglycemia) 각각에 대한 예방 또는 치료용 조성물 및 이들 조성물의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명은 ZBTB7C가 대표적인 당신합성 유전자인 *G6pc* 및 *Pck1*의 전사를 직접적으로 조절한다는 새로운 발견에 기반하여, ZBTB7C의 발현 억제를 통해 혈중 글루코스 농도를 효율적으로 감소시킴으로써 당뇨를 비롯한 고혈당 관련 난치성, 만성 질환에 대한 근원적인 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2500/04 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

Zbtb7c 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 유효성분으로 포함하는 당뇨 또는 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 당신합성 유전자(gluconeogenic genes)의 전사를 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 당신합성 유전자는 *G6pc* 및 *Pck1*를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 조성물은 *G6pc* 및 *Pck1*의 프로모터와 FOXO1(Forkhead box protein 01) 간의 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 당신합성 억제용 조성물의 스크리닝 방법:

(a) ZBTB7C (Zinc finger and BTB domain containing 7c) 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(2) 상기 시료 내 ZBTB7C 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,

상기 ZBTB7C 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험물질은 당신합성 억제용 조성물로 판정한다.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 당신합성 억제용 조성물은 당뇨 또는 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)에 대한 예방 또는 치료용 조성물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 당신험성 증진용 조성물의 스크리닝 방법:

(a) ZBTB7C (Zinc finger and BTB domain containing 7c) 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(2) 상기 시료 내 ZBTB7C 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,

상기 ZBTB7C 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 증가한 경우, 상기 시험물질은 당신험성 증진용 조성물로 판정한다.

청구항 11

제 8 항 또는 제 10 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 간(liver) 조직 또는 간 조직으로부터 유래된 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 ZBTB7C 억제제를 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물, 구체적으로는 당뇨를 비롯한 고혈당증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 대표적인 난치성 대사질환인 당뇨병은 국내에서도 서구화된 식습관 및 운동 부족 등으로 인해 그 유병률이 계속적으로 증가하고 있으며 비만, 이상지질혈증, 동맥 경화, 관상 심장 질환 등의 심혈관 질환이나, 당뇨병성 신장 및 망막 질환 등의 수많은 합병증을 유발하면서 심각한 사회적 비용을 야기하고 있다.

[0004] 당뇨병은 크게 인슐린 의존형 당뇨병(Insulin dependent diabetes mellitus)과 인슐린 비의존형 당뇨병(Non insulin dependent diabetes mellitus)으로 구분되는데, 인슐린 의존형 당뇨병, 즉 제 1형 당뇨병은 면역학적 기전에 의해 췌장 베타세포가 파괴되어 인슐린 생성장애가 오는 면역매개성 1형 당뇨병과 아직 그 원인이 밝혀지지 않은 특발성 1형 당뇨병으로 구분된다(Lancet, 367, 847-858, 2006). 2형 당뇨병은 인슐린 저항성과 인슐린 분비장애가 모두 관련되는 질환으로 이는 다시 인슐린 저항성이 주된 역할을 하는 인슐린 저항성 2형 당뇨병, 인슐린 분비장애가 주된 역할을 하는 인슐린 결핍성 2형 당뇨병으로 구분된다. 당뇨병은 고혈당 자체로 인한 대사교란 뿐 아니라 만성화될 때 동반되는 다양한 합병증으로인해 의학적으로나 사회 경제적으로 해결해야 할 시급한 과제로 대두되고 있다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 미국 공개특허공보 제2020-0041492호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 수많은 합병증을 유발하는 만성 대사질환인 당뇨를 비롯하여, 높은 혈중 글루코오스 농도를 원인

으로 하는 다양한 고혈당 관련 질환에 대한 효과적이고 근원적인 치료제를 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 원발암 유전자 활성을 가지는 BTB-POZ 패밀리 전사인자 ZBTB7C가 대표적인 당신합성 유전자인 *G6pc* 및 *Pck1*을 활성화시키며, ZBTB7C의 발현을 억제할 경우 *G6pc* 및 *Pck1*의 발현이 전사 수준에서 효율적으로 억제됨으로써 혈액 내 글루코오스 농도가 현저히 저하됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 고혈당증(Hyperglycemia)의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 저혈당증(hypoglycemia)의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 ZBTB7C (Zinc finger and BTB domain containing 7c)의 억제제를 유효 성분으로 포함하는 고혈당증(Hyperglycemia)의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명자들은 수많은 합병증을 유발하는 만성 대사질환인 당뇨병을 비롯하여, 높은 혈중 글루코오스 농도를 원인으로 하는 다양한 고혈당 관련 질환에 대한 효과적이고 근원적인 치료제를 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 원발암 유전자 활성을 가지는 BTB-POZ 패밀리 전사인자 ZBTB7C가 대표적인 당신합성 유전자인 *G6pc* 및 *Pck1*을 활성화시키며, ZBTB7C의 발현을 억제할 경우 *G6pc* 및 *Pck1*의 발현이 전사 수준에서 효율적으로 억제됨으로써 혈액 내 글루코오스 농도가 현저히 저하됨을 발견하였다.

[0017] 본 명세서에서 용어 “억제제”는 ZBTB7C의 활성 또는 발현의 저하를 유도하는 물질을 의미하며, 이에 의해 ZBTB7C의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, ZBTB7C에 의한 당신합성 유전자들의 전사 활성화가 유의하게 저하될 수 있을 정도로 ZBTB7C의 활성 또는 발현을 저하시키는 물질을 의미한다.

[0018] ZBTB7C의 억제제는 예를 들어 당업계에 이미 그 서열 및 구조가 공지된 단백질인 ZBTB7C의 발현을 유전자(*Zbtb7c*) 수준에서 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids), gRNA(guideRNA) 및 안티센스 올리고뉴클레오타이드와, 단백질 수준에서 억제하는 항체 또는 앵타머 뿐 아니라, 바이페린의 활성을 억제하는 화합물, 펩타이드 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본 명세서에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA)”는 인 비보 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 도입되어 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.

[0020] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.

[0021] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다.

[0022] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.

[0023] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지면서 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로

합성되며, 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 특이적 결합(hybridization)을 통해 이중가닥을 형성하여 타겟 유전자의 발현을 조절한다.

- [0024] 본 명세서에서 용어 “gRNA(guideRNA)”는 타겟 유전자를 인식하여 핵산분해효소(nuclease)를 유도함으로써 인식된 분위를 특이적으로 절단하는 유전자 편집 시스템에 사용되는 RNA 분자를 의미한다. 이러한 유전자 편집 시스템에는 대표적으로 CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템이 있다.
- [0025] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 mRNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당솔포네이 등으로 변형될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따르면, 본 발명의 ZBTB7C 억제제는 ZBTB7C의 활성을 단백질 수준에서 저해하는 ZBTB7C 특이적 항체일 수 있다. ZBTB7C를 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [0027] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984에 상세하게 기재되어 있다.
- [0028] 본 발명은 항체 대신 ZBTB7C에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용하여 이의 활성을 억제할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med.* 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 “고혈당증(Hyperglycemia)”은 과식, 고탄수화물식이, 운동부족, 스트레스, 염증, 인슐린 결핍, 인슐린 저항성을 비롯한 다양한 원인으로 인해 혈중 글루코오스 농도가 정상인에 비해 유의하게 높은 질환 및 이를 직접적 또는 간접적 원인으로 하는 모든 합병증을 포괄하는 의미이다. 일반적으로 공복 혈당이 130 mg/dL 이상, 식후 2시간 뒤의 혈당이 180mg/dL 이상인 경우를 의미하나, 이에 제한되지 않고 정상인과 비교하여 유의한 혈당 수치 차이가 나타나는 경우를 모두 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 고혈당증은 당뇨병, 이상지질혈증(dyslipidemia), 고혈압 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “당뇨”은 포도당-비관용(intolerance)을 초래하는 인슐린의 상대적 또는 절대적 부족으로 특징되는 만성질환을 의미한다. 본 발명의 조성물로 치료 또는 예방되는 당뇨병은 모든 종류의 당뇨병을 포함하며, 예를 들어, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병 및 유전성 당뇨병을 포함한다. 제1형 당뇨병은 인슐린 의존성 당뇨병으로서, β -세포의 파괴에 의해 주로 초래된다. 제2형 당뇨병은 인슐린 비의존성 당뇨병으로서, 식사 후 불충분한 인슐린 분비에 의해 초래되거나 또는 인슐린 내성에 의해 초래된다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 “이상지질혈증(dyslipidemia)”은 혈액 내의 지방농도 수치가 정상범위 밖에 있는 병적 상태(pathologic condition)를 의미하며, 예를 들어 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 저-HDL-콜레스테롤혈증 및 고-LDL-콜레스테롤혈증 외에도 지단백의 대사이상을 원인으로 하는 비정상적 지질 상태를 모두 포함한다.
- [0033] 구체적으로는, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 이상지질혈증은 고지혈증이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “고지혈증”은 중성지방과 콜레스테롤 등의 지방대사가 제대로 이루어지지 않아 혈액 중에 높은 지질농도가 유지되어 유발되는 질환을 의미한다. 보다 구체적으로 고지혈증이란 혈액내의 중성지방, LDL 콜레스테롤, 인지질 및 유리 지방산 등의 지질 성분이 증가된 상태로 발생빈도가 높은 고콜레스테롤혈증 또는 고중성지방혈증

을 포함한다.

- [0034] 본 명세서에서 용어 “고혈압(hypertension)”은 정상인에 비해 높은 혈압을 가지는 만성 질환을 의미하며, 임상적으로는 수축기 혈압이 140mmHg을 초과하고 이완기 혈압이 90mmHg을 초과하는 경우를 고혈압으로 판단한다. 인슐린 저항성을 가지는 당뇨병 환자는 산화질소 생성을 억제해 혈관 이완을 감소시키고, 고인슐린혈증은 세포 성장을 자극해 혈관 비대, 신장에서 나트륨의 재흡수를 증가시켜 체액의 증가 및 교감신경의 항진을 유발하여 혈압을 상승시킨다. 따라서 고혈당과 고혈압은 밀접한 관계가 있으며, 다수의 당뇨병 환자는 고혈압을 동반한다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 “인슐린 저항성”은 혈당을 낮추는 인슐린의 기능이 떨어져 세포가 포도당을 효과적으로 연소하지 못하는 상태를 의미한다. 인슐린 저항성이 높을 경우, 인체는 너무 많은 인슐린을 만들어 내고 이로 인해 고혈압이나 이상지방혈증은 물론 심장병, 당뇨병 등까지 초래할 수 있다. 특히 제2형 당뇨병에서는 근육과 지방조직에서 인슐린의 증가를 알아채지 못하여, 인슐린의 작용이 일어나지 않는다. 용어 “인슐린 저항성 증후군”은 상기 인슐린 저항성에 의하여 유발된 질환을 총칭하는 개념으로 인슐린 작용에 대한 세포의 저항성, 고인슐린혈증 및 초저밀도지단백(very low density lipoprotein, VLDL)과 중성지방의 증가, 고밀도지단백(high density lipoprotein, HDL)의 감소 및 고혈압 등을 특징으로 하는 질환을 의미하며, 심혈관질환과 제2형 당뇨병의 위험인자로 인식되고 있는 개념이다(Reaven GM, Diabetes, 37: 1595-607, (1988)).
- [0037] 본 명세서에서 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0038] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 ZBTB7C의 발현량 또는 활성이 감소함으로써 당신합성 유전자의 발현이 저하되므로, 과도한 혈중 글루코오스 농도를 원인으로 하는 다양한 질환의 진행을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 고혈당증에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0040] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0041] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한 없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0043] 본 발명의 구체적인 구현 예에 따르면, 본 발명의 조성물은 당신합성 유전자(gluconeogenic genes)의 전사를 억제한다. 보다 구체적으로는, 상기 당신합성 유전자는 *G6pc* 및 *Pck1*를 포함한다.
- [0044] 본 발명의 구체적인 구현 예에 따르면, 본 발명의 조성물은 *G6pc* 및 *Pck1*의 프로모터와 FOXO1(Forkhead box protein O1) 간의 결합을 저해한다.
- [0046] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 ZBTB7C (Zinc finger and BTB domain containing 7c) 단백질, ZBTB7C 단백질을 인코딩하는 핵산분자 및 ZBTB7C 단백질의 활성화제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 저혈당증(hypoglycemia)의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 명세서에서 용어 “저혈당증(hypoglycemia)”은 혈중 글루코오스 농도가 정상인에 비해 유의하게 낮은 질환 및 이를 직접적 또는 간접적 원인으로 하는 모든 합병증을 포괄하는 의미이다. 일반적으로 혈당이 50 mg/dL 이하로 유지되는 경우 저혈당증의 위험이 있는 것으로 간주하나, 이에 제한되지 않고 정상인과 비교하여 유의한 혈당 수치 차이가 나타나는 경우를 모두 포함한다. 저혈당증의 원인으로는 섭식 장애로 인한 영양 불균형, 과도한 운동량, 음주, 부신피질호르몬 또는 글루카곤 결핍, 췌장 종양, 인슐린에 대한 자가면역, 탄수화물 대사효소 기능이상이 있으며, 저혈당증의 증상은 공복감, 두통, 피로감 등의 가벼운 증상에서부터 오래 지속 시 경련이나 발작, 쇼크 상태가 올 수 있으며 의식을 잃을 수도 있다. 일시적인 영양 불균형 및 과도한 신체 활동으로 인한 급성 저혈당의 경우 음식 섭취와 안정을 통해 증상을 제거할 수 있으나, 호르몬 불균형, 유전적 요인 또는

췌장암 등에 의한 인슐린 생성 이상의 경우 본 발명의 조성물이 효율적인 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

- [0048] 본 명세서에서 용어 “ZBTB7C 단백질의 활성화제”는 ZBTB7C 단백질의 발현량 또는 활성을 증진시키는 유효성분을 의미하며, 예를 들어 당업계에서 이미 그 서열과 구조가 공지된 ZBTB7C 단백질의 발현을 유전자 또는 단백질 수준에서 증진시키거나 고유의 생물학적 활성을 증진시키는 핵산분자, 펩타이드, 단백질, 화합물 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이에, “ZBTB7C 단백질의 활성화제(activator)”는 “ZBTB7C 단백질 작용제(agonist)”와 동일한 의미로 사용된다.
- [0049] 본 발명의 구체적인 구현 예에 따르면, 본 발명의 조성물은 *G6pc* 및 *Pck1* 유전자의 전사를 활성화한다. 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, ZBTB7C는 FOXO1를 탈아세틸화하여 FOXO1가 당 신합성 유전자인 *G6Pc* 및 *PCK1* 프로모터 내 IRE와 더 잘 결합하도록 함으로써 이들의 전사를 촉진하고, 궁극적으로는 혈중 글루코오스 농도가 증가하도록 한다.
- [0050] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0051] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0052] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 경구, 정맥, 피하 또는 복강 투여될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.
- [0054] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 혈당 강하용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0057] (a) ZBTB7C (Zinc finger and BTB domain containing 7c) 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0058] (2) 상기 시료 내 ZBTB7C 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,
- [0059] 상기 ZBTB7C 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험물질은 고혈당증의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.
- [0060] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, ZBTB7C를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로는, 상기 생물학적 시료는 간(liver) 조직 또는 간 조직으로부터 유래된 세포를 포함하는 생물학적 시료이다.
- [0061] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 ZBTB7C를 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 ZBTB7C의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 ZBTB7C의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 측정 결과, ZBTB7C의 발현량 또는

활성이 감소된 경우 상기 시험물질은 혈당 강하용 조성물로 판정될 수 있다.

- [0062] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 방법으로 스크리닝된 혈당 강하용 조성물은 당뇨, 이상지질혈증(dyslipidemia), 고혈압 및 인슐린 저항성 증후군(insulin resistance syndrome)으로 구성된 군으로부터 선택되는 고혈당증에 대한 예방 또는 치료용 조성물로 적용될 수 있다.
- [0063] 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 감소”는 ZBTB7C에 의해 매개되는 당 신합성 유전자의 전사 촉진 효과가 측정 가능한 수준으로 감소될 정도로 ZBTB7C의 발현량 또는 생체 내 고유한 기능이 감소하는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 저혈당증의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0066] (a) ZBTB7C (Zinc finger and BTB domain containing 7c) 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0067] (2) 상기 시료 내 ZBTB7C 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,
- [0068] 상기 ZBTB7C 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 증가한 경우, 상기 시험물질은 저혈당증의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.
- [0069] 본 발명에서 사용하는 생물학적 시료, 시험물질 및 본 발명의 방법으로 스크리닝된 조성물이 예방 또는 치료할 수 있는 저혈당증에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0070] 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 증가”는 ZBTB7C에 의해 매개되는 당 신합성 유전자의 전사 촉진 효과가 측정 가능한 수준으로 증가될 정도로 ZBTB7C의 발현량 또는 생체 내 고유한 기능이 증가하는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 증가한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 증가한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 증가한 상태를 의미할 수 있다.

발명의 효과

- [0072] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0073] (a) 본 발명은 고혈당증(Hyperglycemia) 및 저혈당증(hypoglycemia) 각각에 대한 예방 또는 치료용 조성물 및 이들 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0074] (b) 본 발명은 ZBTB7C가 대표적인 당신합성 유전자인 *G6pc* 및 *Pck1*의 전사를 직접적으로 조절한다는 새로운 발견에 기반하여, ZBTB7C의 발현 억제를 통해 혈중 글루코오스 농도를 효율적으로 감소시킴으로써 당뇨를 비롯한 고혈당 관련 난치성, 만성 질환에 대한 근원적인 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0076] 도 1은 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스에서 혈당 수준이 감소하며 금식에 의해 *Zbtb7c* 발현이 유도됨을 보여주는 그림이다. 도 1a는 16시간 동안 금식시킨 마우스에 대해 경구 투여 글루코오스를 이용하여 OGTT(경구 글루코오스 내성 시험)를 수행한 결과를 나타낸다. ITT(인슐린 내성 시험)을 위해 마우스를 6시간 동안 금식시키고 인슐린을 복강 주사하였다($n=3$). 에러바, 표준편차. *, $p < 0.005$ WT vs. *Zbtb7c* 녹아웃 마우스. 도 1 b는 d1324 대조군 아데노바이러스 또는 *Zbtb7c* mRNA를 타겟팅하는 shRNA 발현 재조합 아데노바이러스인 d1324-shZbtb7c RNA로 감염시킨 C57BL/6J 마우스에서의 글루코오스 항상성 시험(GTT, ITT) 및 간의 당신합성 시험(PTT) 결과를 보여준다. 아데노바이러스 d1324 대조군 또는 d1324-shZbtb7c RNA 아데노바이러스 1.5×10^9 pfu를 주입한 뒤 5일 후 GTT, ITT 및 PTT를 시험하였다. 아데노바이러스는 대부분 간으로 타겟팅되었다. $n=8$, AUC, 곡선아래 면적(임의 유닛). *, $p < 0.05$ (GTT); *, $p < 0.05$ (ITT); *, $p < 0.05$ (PTT). 도 1c는 재조합 아데노바이러스 d1324-대조군 또는 d1324-sh *Zbtb7c* RNA로 감염된 C57BL/6J 마우스 ($n=8$)의 간에서의 *Zbtb7c*, *G6pc* 및 *Pck1* 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 도 1d는 상기 마우스의 간에서의 mRNA 발현에 대한 RT-qPCR 분석 결과이다. 도 1e는 야생형 및 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스의 1차 간세포에서의 글루코오스 생산 분석 결과이다. *, $p < 0.05$ WT vs. *Zbtb7c* 녹아웃 마우스. 도 1f 및 1g는 야생형 마우스 간에서 *Zbtb7c*, *G6pc* 및 *Pck1* 발현에 대한 RT-qPCR 및 웨스턴 블롯 결과를 각각 보여준다. 마우스($n=3$)는 먹이를 주거나 12시간 동안 금식시켰다. 에러바, 표준편차. *, $p < 0.05$ 섭식 vs. 금식. 웨스턴 블롯 분석을 위해 간 조직으로부터 총 단백질을 제작하

고 지정된 항체를 이용하여 분석하였다. Gapdh, 로딩 대조군. 도 1h 및 1i는 섭식, 금식(16시간) 및 재섭식 조건($n=4$)에서 Zbtb7c WT 및 녹아웃 마우스의 간에서의 혈당 수준 및 Zbtb7c, G6pc 및 Pck1 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 보여준다. 바, 표준편차.

도 2는 포스콜린($10 \mu\text{M}$) 처리 C57BL/6J 마우스($N=3$)로부터 분리한 1차 간세포(도 2a 및 2b) 및 스트렙토조토신(STZ)-유도 당뇨 마우스($n=4$)의 간에서의 Zbtb7c 발현을 웨스턴 블롯 및 mRNA에 대한 RT-qPCR로 분석한 결과를 각각 나타낸다. *, $p < 0.05$; n.s., 유의성 없음; Gapdh, 대조군.

도 3은 Zbtb7c가 당신합성 유전자인 G6pc 및 Pck1의 전사를 활성화함을 보여주는 그림이다. 도 3a 좌측 그림은 당신합성에 관여하는 단백질의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 야생형 및 Zbtb7c 녹아웃 마우스($n=3$, 수컷 8-12주령)를 밤새(12h) 금식시킨 뒤 아침에 희생시켰다. 단백질 및 mRNA 발현 분석을 위해 간 조직을 분리하고 총 단백질을 제작한 뒤 지정된 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 분석하였다. Gapdh, 로딩 대조군. 도 3a 우측 그림은 Zbtb7c, G6pc, Pck1, Foxo1 및 Hnf4a의 mRNA 발현에 대한 RT-qPCR 분석 결과이다. *, $p < 0.05$; n.s., 유의성 없음; Gapdh, 대조군. 에러바, 표준편차. 도 3b는 FSK를 6시간 동안 처리한 야생형 및 Zbtb7c 녹아웃 마우스에서 분리한 1차 간세포에서의 G6pc 및 Pck1 mRNA에 대한 RTqPCR 분석 결과이다. 에러바, 표준편차; FSK, 포스콜린; 18S RNA, 정규화 대조군. 도 3c 및 3d는 전사 분석 결과이다. Zbtb7c 발현 플라스미드 및 G6pc 또는 Pck1 리포터 플라스미드를 HepG2 세포에 함께 도입시킨 후 세포를 추가로 배양한 후 루시페라제 활성을 측정하였다. 또한, HepG2 세포를 재조합 아데노바이러스 d1324 또는 d1324-sh-Zbtb7cRNA로 감염시키고 리포터 플라스미드를 도입시켰다. 24시간 동안 배양한 뒤, 세포 수집 전 6시간 동안 FSK를 처리하고 루시페라제 활성을 분석하였다. RLU(상대적 루시페라제 활성); FSK, 포스콜린; 에러바, 표준편차; *, $p < 0.05$.

도 4는 Zbtb7c가 IRE 부위에 결합함으로써 G6pc의 전사를 활성화시킴을 보여주는 그림이다. 도 4a는 G6pc 유전자의 전사 분석 결과(좌측)와, 5' -업스트림 조절서열 길이가 다양한 G6pc 프로모터 및 루시페라제 유전자 융합 컨스트럭트들의 모식도(우측)를 나타낸다. HepG2 세포를 Zbtb7c 발현벡터 및 다양한 pGL4b-G6pc-Luc 리포터 플라스미드로 36시간 동안 도입하고 루시페라제 활성을 분석하였다. 모든 분석은 3회 반복하였다. 검은 원, HNF1-결합 부위; 흰 원, IRE(Insulin Response Element); 검은 사각형, CRE(cAMP Response Element); 흰 사각형, HNF4a 결합 부위. 도 4b는 일시적 전사 분석 및 다양한 G6pc 프로모터 및 루시페라제 유전자 융합 컨스트럭트를 보여주는 그림이다. X, 돌연변이 IRE. 도 4c는 Zbtb7c와 G6pc 프로모터의 IRE(프로브 #1, 프로브 #2/3)의 결합에 대한 올리고뉴클레오타이드 풀-다운 분석 결과를 보여준다. pcDNA3-FLAG-Zbtb7c를 도입시킨 HepG2 세포의 세포 용해물을 프로브와 배양한 뒤 풀-다운하고 침전물을 항-FLAG 항체를 이용한 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 도 4d는 HepG2 세포에서 Zbtb7c와 내재적 G6PC 유전자의 IRE 영역(bp, -250 ~ -100)에 대한 ChIP-qPCR 분석 결과이다. HepG2 세포에 pcDNA3-FLAG-Zbtb7c를 도입시키고 항-FLAG(FLAG-Zbtb7c용 항체), 항-Zbtb7c 또는 대조군 IgG 항체를 이용하여 크로마틴을 면역침전 시켰다. 에러바, 표준편차. *, $p < 0.05$; N.S., 유의성 없음.

도 5는 Zbtb7c가 IRE 부위에 작용함으로써 Pck1 프로모터의 전사를 활성화함을 보여주는 그림이다. 도 5a는 전사 분석 결과 및 Pck1 프로모터 루시페라제 유전자 융합 컨스트럭트의 구조를 보여준다. HepG2 세포를 다양한 조합의 pcDNA3.0, pcDNA3.0-FLAG-Zbtb7c, pGL3-Pck1-Luc (야생형, WT) 또는 pGL3-Pck1-Luc 돌연변이 플라스미드로 같이 세포내로 도입시키고, 배양 후 루시페라제 활성을 분석하였다. 모든 분석은 세 번 반복하였다. 에러바, 표준편차. 도 5b는 Zbtb7c와 Pck1 프로모터의 IRE와의 결합에 대한 올리고뉴클레오타이드 풀-다운 분석 결과이다. pcDNA3-FLAG-Zbtb7c로 HepG2 세포를 도입하고 세포 용해물을 침전시킨 뒤 항-FLAG 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 통해 침전물을 분석하였다. 도 5c는 HepG2 세포 내에서의 Zbtb7c와 Pck1 프로모터의 IRE와의 결합에 대한 ChIP-qPCR 분석 결과를 보여준다. HepG2 세포를 pcDNA3-FLAG-Zbtb7c로 도입하거나 재조합 아데노바이러스 d1324-shZbtb7cRNA로 감염시키고 지정된 항체로 크로마틴을 면역 침전하였다. 에러바, 표준편차. *, $p < 0.05$; N.S., 유의성 없음.

도 6은 Zbtb7c가 FOXO1과 G6PC 및 PCK1 프로모터의 IRE와의 결합을 증가시키고 FOXO1의 발현, 아세포성 위치 또는 인산화에는 영향을 미치지 않음을 보여주는 그림이다. 도 6a는 전사 분석 결과이다. Zbtb7c 및/또는 FOXO1 발현 플라스미드 및 pG5-3x(IRE)-Luc 리포터 플라스미드를 HepG2 세포에 같이 도입하고 루시페라제 활성을 측정하였다. 결과 값은 세 번의 독립적인 분석에 대한 평균으로 나타났다. 에러바, 표준편차. 도 7b는 내재적 FOXO1과 G6PC 및 PCK1 프로모터 내의 IRE와의 결합에 대한 ChIP-qPCR 분석 결과이다. 항-FOXO1 항체 및 대조군 IgG를 이용하여 세포를 면역 침전하였다. 에러바, 표준편차. 도 6c는 포스콜린 처리를 통해 ZBTB7C가 유도된 HepG2 세포에서 내재적 FOXO1과 G6PC 및 PCK1 유전자 프로모터와의 결합에 대한 ChIP-qPCR 분석 결과를 보여준다. HepG2 세포를 아데노바이러스 d1324-Zbtb7c 또는 d1324-shZbtb7c RNA로 감염시킨 후 36시간 뒤에 6시간

동안 FSK를 처리하고 세포를 수확하여 FOXO1 결합을 분석하였다. 에러바, 표준편차. FSK, 포스콜린. *, $P < 0.05$. 도 6d는 Zbtb7c가 인슐린에 의해 유도된 Foxo1의 인산화에 영향을 미치지 못함을 보여주는 그림이다. 야생형 마우스에서 분리된 1차 간세포를 재조합 아데노바이러스 d1324-*Zbtb7c* 또는 d1324-sh-*Zbtb7c* RNA로 감염시키고, 36시간 뒤 10 μ M 인슐린을 6시간 동안 처리한 다음 1차 간세포 용해물에서 인산화된 Foxo1, Foxo1 및 Zbtb7c를 웨스턴 블롯으로 분석하였다. Gapdh, 로딩 대조군. 도 6e는 *Zbtb7c* 발현 플라스미드로 도입된 HepG2 세포와, 야생형 및 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스 간에서의 내재적 FOXO1 mRNA 발현을 분석한 RT-qPCR 결과이다. 에러바, 표준편차. 도 6f는 재조합 아데노바이러스 d1324 or d1324-*Zbtb7c*로 도입된 HepG2 세포 내에서의 FOXO1의 아세포성 위치를 보여준다. 세포를 용해하고, 세포 분획을 분리하여 웨스턴 블롯으로 FOXO1 및 Zbtb7c 발현을 분석하였다. GAPDH, 세포질 분획 마커; HDAC1, 핵 분획 마커. 도 6g는 Zbtb7c 및 Foxo1의 공동 면역침전 및 웨스턴 블롯 분석 결과를 보여준다. 항-Zbtb7c 또는 Foxo1 항체를 이용하여 *Zbtb7c* 야생형 및 녹아웃 마우스 간의 용해물을 면역침전하고, 웨스턴 블롯으로 Foxo1 및 Zbtb7c를 분석하였다. Gapdh, 대조군.

도 7은 Zbtb7c가 Foxo1과 상호작용하고 Hdac3을 데려와 Foxo1를 탈아세틸화함을 보여주는 그림이다. 도 7a는 야생형 및 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스($n=2$) 간 추출물에서의 아세틸화된 내재적 Foxo1에 대한 웨스턴 블롯 분석결과를 나타낸다. Foxo1 항체로 면역 침전된 아세틸화 Foxo1를 항-아세틸화 라이신 항체를 이용하여 분석하였다. Gapdh, 로딩 대조군. 도 7b는 포스콜린 처리 HepG2 세포에서의 내재적 아세틸화 FOXO1에 대한 웨스턴 블롯 분석결과를 나타낸다. HepG2 세포를 아데노바이러스 d1324-sh-*Zbtb7c* RNA로 26시간 감염시킨 뒤 FSK를 6시간 동안 처리하였다. 세포 용해물을 항-FOXO1 항체로 면역침전하고 항-아세틸화 라이신 항체로 아세틸화된 FOXO1를 분석하였다. GAPDH, 대조군; FSK, 포스콜린. 도 7c는 내재적 HDAC3, Zbtb7c, FOXO1 및 HDAC3 간의 단백질 상호작용에 대한 공-면역침전 및 웨스턴 블롯 결과를 보여주는 그림이다. 과발현 FLAG-Zbtb7c이 함유된 HEK293A 세포 추출물을 항-HDAC3 항체로 면역 침전하였다. 침전물은 이후 웨스턴 블롯으로 FLAG-Zbtb7c 및 내재적 FOXO1의 상호작용을 분석하였다. GAPDH, 대조군; FSK, 포스콜린. 도 7d는 공-면역침전 및 Zbtb7c, 내재적 FOXO1 및 HDAC3 간의 단백질 상호작용에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 보여준다. HEK293A 세포를 재조합 아데노바이러스인 d1324-sh-*Zbtb7c* RNA 바이러스로 감염시키고 6시간 동안 FSK를 처리하였다. 항-HDAC3 항체를 이용하여 세포 추출물을 면역 침전한다. 이후 침전물과 FOXO1의 결합을 분석하였다. GAPDH, 대조군; FSK, 포스콜린. 도 7e 및 7f는 HepG2 세포에서 내재적 HDAC3와 *G6pc* 및 *Pck1* 프로모터의 IRE의 결합에 대한 ChIP-qPCR 분석 결과이다. 세포를 재조합 아데노바이러스, d1324, d1324-*Zbtb7c* 바이러스 또는 d1324-sh-*Zbtb7c* RNA 바이러스로 36시간 동안 감염시키고 6시간 동안 FSK를 처리하였다. 세포를 고정하고 총 크로마틴을 지정된 항체를 이용하여 면역 침전한 다음 DNA 분리 및 실시간 qPCR을 수행하였다. IgG, 대조군; FSK, 포스콜린; * $P < 0.05$.

도 8은 Zbtb7c가 금식 조건에서 *G6pc* 및 *Pck1* 프로모터로의 Foxo1, Hdac3 및 NCoR 유입을 증가시킴을 보여주는 그림이다. 도 8a 및 8b는 금식 조건의 야생형 및 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스 간에서 내재적 Zbtb7c, Foxo1, Hdac3 및 NCoR과 IRE 요소의 결합에 대한 ChIP-qPCR 분석 결과를 보여준다. 간을 세척하고 포르말데히드로 고정하였다. 용해물에 초음파 처리를 한 뒤 항-Zbtb7c, 항-Foxo1, 항-Hdac3, 항-NCoR 항체 및 대조군 IgG를 이용하여 면역침전을 수행하였다. 도 8c는 섭식 또는 금식 조건 하에서 야생형 및 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스의 간에서 Zbtb7c, *G6pc* 및 *Pck1* 발현에 대한 웨스턴 블롯 결과를 보여주는 그림이다. GAPDH, 대조군; * $P < 0.05$. 도 8d는 섭식 또는 금식 조건 하에서 야생형 및 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스의 간에서 *G6pc* 및 *Pck1* 프로모터의 IRE 요소에서의 H3K4Me3 및 H3K27Me3 히스톤 마크에 대한 ChIP-qPCR 분석 결과이다.

도 9는 Zbtb7c가 *G6pc* 및 *Pck1*의 전사를 조절하는 가정적인 모델을 보여주는 그림이다. 섭식에 의해 췌장 인슐린 분비가 증가하면 인슐린 수용체(IR)에 결합하고 간에서의 인슐린 신호 경로를 활성화한다. 활성화된 Akt도 Foxo1를 직접적으로 인산화하여 핵으로 이동하지 못하도록 한다. 공복 기간에 글루카곤과 글루카곤 수용체(GR)의 결합은 아데닐 사이클레이즈의 활성화를 촉발하여 ATP로부터의 cAMP 생산을 촉매한다. cAMP와 PKA(Protein kinase A)의 결합은 PKA가 핵으로 이동하도록 유도한다. 이러한 신호는 JNK가 Zbtb7c의 단백질 안정성을 증가시키지 못하도록 한다. Zbtb7c는 Foxo1, Hdac3 및 NCoR가 *G6pc* 및 *Pck1* 프로모터로 모이도록 하고, 이후 Hdac3가 Foxo1를 탈아세틸화하여 Foxo1 결합을 증가시키고 *G6 ps* 및 *Pck1*의 전사를 촉진한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0079] 실시예

- [0080] **실험방법**
- [0081] **동물 실험**
- [0082] 동물 실험은 연세대학교 의과대학 실험동물 위원회의 승인 하에 수행하였다. Zbtb7c 녹아웃 마우스는 종래에 보고된 방법으로 제작하였다[22]. 스트렙토조토신-유도 당뇨 마우스를 제작하기 위해, 8주령 수컷 C57BL/6J 마우스에 스트렙토조토신(pH 4.5의 구연산 나트륨 완충액 내 100 mg/kg)을 2일 연속 복강주사하였다. 14일 뒤, 3일 연속 25mmol/L 초과혈당을 보이는 마우스를 선별하여 실험을 진행하였다.
- [0084] **플라스미드, 항체 및 시약**
- [0085] pGL4b-G6pc-루시퍼라제(Luc) 및 pcDNA3-HA-HDAC3 발현 플라스미드는 각각 연세대학교 의과대학의 안용호 박사 및 김정섭 박사에게 제공받았다. pcDNA3.0-FLAG-Zbtb7c[22] 및 pcDNA3.1-Foxo1은 cDNA를 pcDNA3.0 또는 -3.1dp 벡터에 클로닝함으로써 제작하였다. pcDNA3.1-Foxo1을 제작하기 위해, Foxo1 cDNA는 정방향, 5' - GATCCTCGAGACCATGGCCGAGGCGCCTCAGGTG-3' ; 역방향, 5' -GATCGGATCCGCCTGACACCCAGCTATGTG-3' 의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭한 뒤 pcDNA3.1-Myc/His 벡터/XhoI-BamHI로 클로닝하였다. Pck1 프로모터 및 업스트림 조절서열(-700 to +70 bp)을 포함하는 pGL3-Pck1-Luc를 제작하기 위해 지놈 DNA를 정방향 5' - GATCCTCGAGCATGGGTTGTTC; 역방향 GATCAAGCTTCTTCCGCCAGC의 프라이머 세트로 PCR 증폭한 뒤 pGL3-Basic/XhoI-Hind3로 클로닝하였다. pG5-3×(IRE)-Luc 플라스미드를 제작하기 위해, 5' - CTAGCGCAAAACAACTTATTTGAAGCAAAACAACTTATTTGAAGCAAAACAACTTATTTGAAG-3' 및 5' - CTAGCTTCAAAATAAGTTGTTTGTCTTCAAAATAAGTTGTTTGTCTTCAAAATAAGTTGTTTGTGCG-3' 의 두 개 올리고뉴클레오타이드를 어닐링하고 pG5-Luc 벡터의 NheI 부위에 라이게이션하였다.
- [0086] pGL4b-G6pc-Luc 플라스미드들은 마우스 G6pc 프로모터 DNA 절편(bp, -500 ~ +66; bp, -231 ~ +66; bp, -158 ~ +66; bp, -85 ~ +66)을 pGL4b 벡터 (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝함으로써 제작하였다. G6pc-Luc 및 Pck1-Luc 플라스미드의 프로모터 내의 다양한 돌연변이 IRE(Insulin Response Element)는 상술한 특정 프라이머 및 위치 특이적 돌연변이(site-directed mutagenesis) 생성 키트(MGmed, Seoul, Korea)을 이용하여 제작하였다. 모든 플라스미드 컨스트럭트는 시퀀싱을 통해 검증하였다. Gapdh(Santa Cruz sc-32233), G6pc(Santa Cruz sc-27198), Pck1(Santa Cruz sc-32879), HA-Tag(Santa Cruz sc-7392), FLAG-Tag(Millipore F3165), 아세틸-라이신(Cell Signaling Cat.9441L), Hnf4a(Santa Cruz sc-8987), 히스톤 H3K4Me3(abcam ab8580) 및 Foxo1(Cell Signaling Cat. 2880s)에 대한 항체를 사용하였으며, Zbtb7c에 대한 래빗 다클론 항체는 종래에 보고된 방법에 따라 제작하였다[22].
- [0088] **위치 특이적 돌연변이 생성**
- [0089] 다음의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 G6pc 및 Pck1 프로모터와, IRE에 위치 특이적 돌연변이 생성을 통해 돌연변이가 도입된 루시퍼라제 유전자 융합 컨스트럭트를 제작하였다: G6pc의 mIRE1 (정방향, 5' - AATGGCGATCAGGCTCAAAATGTGTGCTGTTTG-3' ; 역방향, 5' - CAAAACAGGCACACATTTGAGCCTGATCGCCATT-3'), G6pc의 mIRE2 (정방향, 5' -TGTTTTGTGTGCTCAAAAGCTATTTTACGTAAA-3' ; 역방향, 5' - TTTACGTAAATAGCTTTTGAGGCACACAAAAACA-3'), G6pc의 mIRE3 (정방향, 5' - TGTGCTGTTTGTCTCAAAACGTAAATCACCTG-3' ; 역방향, 5' -CAGGGTGATTTACGTTTTGAGCAAAACAGGCACA-3'), Pck1의 mIRE (정방향, 5' -ATCTTATAGCTGTGGTGAAACCAACCAGCAGCTCT-3' ; 역방향, 5' - AGAGTGCTGGTTGGTTTTCACCACAGCTATAAGAT-3'). 위치 특이적 돌연변이 생성을 위해 95℃에서 30초간 변성, 55℃에서 1분간 혼성화, 68℃에서 10분 간 최종 연장반응으로 구성된 18번의 PCR 사이클을 수행하였다. 증폭 혼합물에 DpnI(NEB, Beverly, MA, USA)를 37℃에서 1시간 동안 처리하고, 분주하여 적절한 E. coli를 형질전환하는 데에 사용하였다. 모든 컨스트럭트는 DNA 시퀀싱으로 검증하였다.
- [0091] **세포 배양 및 일시적 전사 분석**
- [0092] 인간 배아신장 세포(HEK293) 및 간세포암(HepG2) 세포를 37℃, 5% CO₂ 가습 인큐베이터 내의 10% FBS(fetal bovine serum), 100 units/ml 스트렙토마이신 및 100 units/ml 페니실린이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified eagle medium)에서 유지하였다. 세포 배양 배지 및 보충 성분은 Invitrogen /Gibco-BRL(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. pGL3-Pck1-Luc 및 다양한 pGL4b-G6pc-Luc, pcDNA3-FLAG-Zbtb7c 및 pcDNA3-HAHDac3를 다양한 조합으로 HepG2 세포에 리포펙타민 3000 시약(Invitrogen)을 이용하여 일시적으로 도입하였다. 24 내지 36시간 배양 후, 세포를 수확하여 Microplate LB 96 V 발광분석기(EG&G Berthold, Vienna, Austria)로 루시퍼라제 활성을 분석하였다. 모든 반응은 세 번 반복하였다. 리포터 활성은 루시퍼라제 반응의 총 단백질 농도를 고려하

여 보정하였다.

[0094] 아세포 분획

[0095] 핵 추출 키트(Active Motif, San Diego, CA, USA)을 이용하여 HepG2 세포의 세포질과 핵을 분획하였다. 세포를 1 x 저장 완충액에서 재부유하고 15분간 얼음에서 배양한 다음 계면활성제를 첨가하고 잘 섞어주었다. 세포질 분획(상등액)을 원심분리로 수집하였다. 핵이 함유된 침전물을 완전 용해 완충액에 재부유하고 원심분리 후 핵 분획(상등액)을 분석에 사용하였다.

[0096]

[0097] *Zbtb7c* 및 *Zbtb7c* shRNA 발현 재조합 아데노바이러스의 제작

[0098] *Zbtb7c* ORF cDNA를 아데노바이러스 E1 서플렉터 pCA14 (Microbix Biosystems, Mississauga, Ontario, Canada)에 클로닝하여 pCA14-*Zbtb7c*를 생성하였다. *Zbtb7c*에 대한 shRNA(short hairpin RNA)를 발현하는 재조합 아데노바이러스를 제작하기 위해 어닐링된 shRNA DNA 서열(센스: 5' -GATCCCTCCAGTGCATCGTGAATGTTTTCAGAGA(루프)-ACATTCACGATGCACTGGATTTTTTGGAA(루프)-A-3' , 안티센스: 5' -AGCTTTTCAAAAA(루프)-AATCCAGTGCATCGTGAATGTTCTCTTGAA(루프)-AAACATTCACGATGCACTGGAGG-3')을 pSilencer 2.0-U6(Ambion, Waltham, MA, USA)에 클로닝하고 pDE1sp1A 벡터에 서브클로닝하였다. pCA14-*Zbtb7c* 서플렉터 또는 pΔE1sp1A-U6-sh*Zbtb7c* RNA 벡터, 및 아데노바이러스 벡터인 vmd1324Bst를 제한효소 분해를 통해 선형으로 만든 후 *E. coli* BJ518 세포에 같이 도입하여 상동 재조합을 형성하였다. 상동 재조합 아데노바이러스 플라스미드를 Pac1로 분해하고 HEK293 세포에 도입함으로써 *Zbtb7c*(d1324-*Zbtb7c*) 또는 항-*Zbtb7c* shRNA(d1324-sh-*Zbtb7c* RNA)를 발현하는 아데노바이러스를 제작하였다.

[0100] 정량적 실시간 PCR (RT-qPCR)

[0101] TRIzol 시약(Invitrogen)을 이용하여 HepG2 세포 및 마우스 간 조직으로부터 총 RNA를 분리하였다. 5μg의 총 RNA, 임의 6량체 (10 pmol) 및 Superscript 역전사효소 II (200 units/μl)를 총 20μl 부피로 이용하여 역전사 키트(Invitrogen)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR은 SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)와 유전자-특이적 프라이머를 이용하여 수행하였으며, 모든 반응은 세 번 반복되었다. 다음의 qRT-PCR 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 이용하였다:

[0102] 인간 ZBTB7C (정방향, 5' -CCCATCTGCCACAAAGTCATC-3' ; 역방향, 5' -TGGTGACATGTATGGCTTCTC-3'), 인간 *G6PC* (정방향, 5' -GGCTCAACCTCGTCTTTAAGTG-3' ; 역방향, 5' -CTCCCTGGTCCAGTCTCACA-3'), 마우스 *G6pc* (정방향, 5' -TCGGAGACTGGTTCAACCTC-3' ; 역방향, 5' -TCACAGGTGACAGGGAAGT-3'), 인간 *PCK1* (정방향, 5' -ACGGATTCACCTACGTGG-3' ; 역방향, 5' -CCCCACAGAATGGAGGCATT-3'), 마우스 *Pck1* (정방향, 5' -CTGGCACCTCAGTGAAGACA-3' ; 역방향, 5' -TCGATGCCTCCAGTAAAC-3'), 인간 *FOXO1* (정방향, 5' -GGCTGAAGAATTCAATTCGTC-3' ; 역방향, 5' -ACCTCTGGATTGAGCATCCAC-3'), 마우스 *Foxo1* (정방향, 5' -TTCAATTCGCCACAATCTGTCC-3' ; 역방향, 5' -GGGTGATTTCCGCTCTGC-3'). 18S rRNA를 대조군으로 사용하였다.

[0104] 올리고뉴클레오타이드 풀-다운(pull-down) 분석

[0105] 세포를 HKMG 완충액(10mM HEPES pH 7.9, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 10% 글리세롤, 1mM DTT, 0.5% NP40 및 완전 미니-프로테아제 억제제 콕테일)으로 용해하였다. 세포 추출물을 1μg 바이오틴화된 이중가닥 올리고뉴클레오타이드와 함께 16시간 동안 배양하였다. DNA-결합 단백질을 수집하기 위해, 혼합물을 2시간 동안 NeutrAvidin-아가로스 비드(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)와 함께 배양하고, HKMG 완충액으로 세척한 후, 침전시킨 다음 원심 분리하였다. 침전물을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 올리고뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다(top strand만 표시): *G6pc* 프로모터 IRE#1(5' -GATCAGGCTGTTTTGTGTGC-3' ; *G6pc* 프로모터 IRE#2/3 (5' -GCCTGTTTTGCTATTTACGTA-3' ; *Pck1* 프로모터 IRE (5' -AGCTGTGGTGTGTTGCCAACCAG-3'). 올리고뉴클레오타이드 프로브는 95°C에서 5분간 가열하고 서서히 상온으로 냉각시킴으로써 어닐링하였다.

[0107] 웨스턴 블롯 분석

[0108] 세포를 수확하여 RIPA 완충액(50.0mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP-40, 0.25% 디옥시콜산 나트륨염, 150mM NaCl, 1mM EGTA 및 완전 미니-프로테아제 콕테일)에서 용해하였다. 세포 추출물(30μg)을 12% SDS-PAGE로 분리하고 Immuno-Blot™ PVDF 막(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 옮겼다. 이후 막을 5% 탈지유(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)로 블로킹하고, GAPDH (Santa Cruz sc-32233), FLAG-TAG(Millipore F3165), HA-TAG(Santa Cruz

sc-7392), Zbtb7c(인하우스), G6pc(Santa Cruz sc-27198), Pck1(Santa Cruz sc-32879), Hnf4 α (Santa Cruz sc-8987) 또는 FoxO1(Cell Signaling Cat. 2880s)dp 대한 항체와 함께 배양한 뒤 HRP(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)가 접합된 항-마우스, -래빗 또는 -고트 2차 항체와 배양하였다. 단백질 밴드는 ECL 용액(Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 시각화하였다.

[0110] 공동면역침전

[0111] 세포를 세척하고 침전물을 라이시스 완충액(20mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 10% 글리세롤, 1% Triton X-100, 및 완전 미니-프로테아제 카테일)에서 재부유하였다. 세포 용해물을 제거하고 상등액을 항-FLAG (Millipore F3165), 항-HA(Santa Cruz sc-7392), 항-Zbtb7c(인하우스) 또는 항-Foxo1(세포 Signaling Cat. 2880s) 항체와 함께 회전 플랫폼에서 4℃로 밤새 배양한 다음 세척 후 단백질 A-세파로스 Fast Flow Bead(GE Healthcare, Tokyo, Japan)와 함께 반응시켰다. 이후 비드를 수집하고 세척한 다음 동일한 부피의 5 x SDS 로딩 완충액에서 재부유하였다. 면역침전된 단백질을 12% SDS-PAGE로 분리하고, 웨스턴 블롯으로 결합된 단백질을 분석하였다.

[0113] 정량적 크로마틴 면역침전과 PCR 조합 (ChIPRT-qPCR) 분석

[0114] 세포에 포름알데히드(최종 농도 1%)를 15분 간 처리하여 단백질과 DNA를 가교시켰다. 이후 세포를 세척하고 SDS 라이시스 완충액(1% SDS, 10mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 8)으로 용해시켰다. 용해물을 초음파 처리하여 DNA를 500 내지 1000 bp 절편으로 잘랐다. 초음파 처리된 상등액을 ChIP 회석 완충액(1% SDS, 1% Triton X-100, 16.7mM Tris-HCl, pH 8.1, 167mM NaCl, 1.2mM EDTA)으로 10배 희석하고 항체와 함께 4℃에서 밤새 회전배양하였다. DNA-단백질-항체 복합체를 수집하기 위하여, 단백질 A/G-아가로스 슬러리를 혼합물에 첨가하고 4℃에서 2시간 동안 회전배양한 다음 원심분리로 침전물을 얻었다. 침전물을 세척 완충액(저염 면역 복합체 세척 완충액, 고염 면역 복합체 세척 완충액, LiCl 면역 복합체 세척 완충액, 및 TE 완충액)으로 강하게 세척한 뒤에, 침전물을 500 μ l 용출 완충액에 용해시키고, 회전시켜 과량의 아가로스를 제거하였다. 이후 상등액에 20 μ l의 5M NaCl을 처리하고 65℃로 2시간 동안 가열하여 단백질-DNA 가교를 제거하였다. EDTA 및 프로테아제 K를 처리한 뒤에, 상등액을 페놀/클로로포름으로 추출하고 DNA를 에탄올로 침전시켰다. 면역침전된 DNA를 이용하여 PCR 반응을 수행하였으며, 특정 프로모터 영역을 증폭하기 위해 사용된 프라이머 세트는 다음과 같다:

[0115] 인간 *G6PC* 프로모터(IRE 포함 영역)(정방향, 5' -CTTGCACTGCCAAGAAGCAT-3' ; 역방향, 5' -ATTGATCAAAGGTGCATCAC-3'), *G6PC* 3' -UTR 영역(정방향, 5' -AGTCATCTGTCCAGAATGG-3' ; 역방향, 5' -TCTCACCATGTTGCCAGGC-3'), 마우스 *G6pc* 프로모터(정방향, 5' -TGGCTTCAAGGACCAGGAAG-3' ; 역방향, 5' -TGCAACATGTTTCAGGGTGA-3'), 인간 *PCK1* 프로모터(정방향, 5' -GGGTGCATCCTTCCCATGAA-3' ; 역방향, 5' -GACTTCGAGCCCTCAACCAA-3'), *PCK1* 3' -UTR 영역(정방향, 5' -TAAGGATAAGAACCACAGAA-3' ; 역방향, 5' -TGTGCATTCTAGCTAATCCA-3'), 및 마우스 *Pck1* 프로모터(정방향, 5' -TGGCTCAGAGCTGAATTTCC-3' ; 역방향, 5' -CCTGTGCTGATGCAAACTG-3'). PCR 반응은 ABI PRISM 7300 RT-PCR System (Applied Biosystem)으로 다음의 조건 하에서 수행하였다: 초기 5분간 94℃ 변성 후 94℃에서 30초; 55℃에서 어닐링 및 72℃에서 30초간 연장의 50 사이클.

[0117] 글루코스, 인슐린 및 피루베이트 내성 시험

[0118] 피루베이트 내성 시험(PTT)을 위해 마우스를 16시간 동안 금식시키고 소듐 피루베이트(2g/kg 체중; Sigma, St. Louis, MO, USA)를 복강주사하였다. 이후 글루코스(20% w/v)를 경구투여(2 mg/kg 체중)하여 마우스에 대해 경구 글루코스 내성시험(OGTT)을 수행하고, 혈당 수준을 특정 시점에 모니터링하였다. 인슐린 내성 시험(ITT)을 위해, 마우스를 6시간 동안 금식시키고 인슐린(0.75 units/kg Humulin®; Eli Lilly, Indianapolis, IN, USA)을 복강 투여하였다. 꼬리 정맥 채혈 후 자동 글루코스 모니터(One Touch, LifeScan, Inc., Milpitas, CA, USA)를 이용하여 혈장 글루코스 수준을 측정하였다.

[0120] 1차 간세포 분리 및 배양

[0121] Zhang 등의 방법을 이용하여 콜라게나아제(Sigma, St. Louis, MO, USA) 분해 및 Percoll 구배 정제를 통해 8주령 수컷 마우스로부터 간세포를 분리하였다[40]. 분리된 간세포의 생존성을 평가하여 생존성 >80%의 세포만을 사용하였다. 간세포를 배양접시에 씨딩하여 흡착시키고 100 nM 인슐린 및 10 nM 텍사메타손을 포함하는 10% FBS가 보충된 DMEM에서 유지하였다. 세포 배양배지 및 보충성분은 Invitrogen/Gibco-BRL (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다.

- [0123] 글루코스 생산 분석
- [0124] 1차 간세포의 글루코스 생산을 비색(colorimetric) 글루코스 옥시다제 분석을 통해 제조자의 프로토콜 (Invitrogen)에 따라 측정하였다. 1차 간세포를 넣고, 12시간 동안 배양 후 PBS로 3회 세척한 뒤 배지를 글루코스 생산 완충액(20 mmol/l 소듐 락테이트, 1 mmol/l 소듐 피루베이트 및 15 mmol/l HEPES를 포함하고 페놀레드가 없는 pH 7.4의 무-글루코스 DMEM)으로 교체한 다음 9시간 동안 배양하였다. 글루코스 분석은 3회 반복하였다.
- [0126] 통계적 분석
- [0127] 모든 통계적 비교에 ANOVA(분산분석)를 사용하였다.
- [0129] 실험결과
- [0130] 금식으로 인해 야생형 마우스의 *Zbtb7c* 발현과 혈당이 증가하는 반면 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스에서 당신합성 유전자인 *G6pc* 및 *Pck1*는 감소한다
- [0131] *Zbtb7c* 녹아웃 마우스를 이용하여 *Zbtb7c*의 대사적 기능을 조사하였다. *Zbtb7c* 녹아웃 마우스는 감소된 혈당 수준을 보여주므로, 글루코스 및 인슐린 내성 시험, 그리고 1차 간세포의 글루코스 생산 분석을 통해 글루코스 항상성에서의 *Zbtb7c*의 기능을 조사하였다. *Zbtb7c* 녹아웃 마우스의 혈당 수준은 야생형 마우스보다 낮았으나, 두 마우스 모두 유사한 혈당 수준의 회복을 보였다(도 1a). 간은 글루코스 항상성을 조절하는 1차 조직이므로, 본 발명자들은 C57BL/6J 마우스를 대조군 d1324 아데노바이러스 또는 *Zbtb7c* mRNA를 타겟팅하는 shRNA 과발현 재조합 아데노바이러스로 감염시키고 GTT 및 ITT를 수행하여 간 글루코스 항상성에서의 *Zbtb7c*의 역할을 시험하고자 하였다. *Zbtb7c* 녹아웃 마우스에서처럼 혈당 수준이 낮은 반면 글루코스 및 인슐린 민감성은 간에서 *Zbtb7c*의 녹다운으로 인해 조금 증가하였다(도 1b). 유사하게, 간에서의 당신합성을 측정하는 PTT 분석 결과 글루코스 생산이 감소함을 확인하였다(도 1b). 또한, *Zbtb7c* 녹아웃 마우스의 1차 간세포는 야생형 마우스의 간세포에 비해 글루코스 생산능력이 떨어졌다(도 1e).
- [0132] 척추동물에서 당신합성은 주로 간에서 일어나며 금식, 기아, 저탄수화물 식이 또는 격렬한 운동 시 발생한다 [4,5]. 흥미롭게도 야생형 마우스에서 16시간의 금식 뒤 간의 *Zbtb7c* 단백질 수준이 증가함에도 mRNA 수준은 증가하지 않았다. 당신합성 유전자인 *G6pc* 및 *Pck1*은 금식 동안 mRNA 및 단백질 수준 모두에서 증가하였다(도 1f, 1g).
- [0133] 본 발명자들은 섭식, 금식 및 재섭식 조건에서 *Zbtb7c* WT 및 KO 마우스에서의 혈당 수준과 *G6pc* 및 *Pck1* 단백질 발현 수준을 분석하였다. 혈당 수준은 세 가지 조건 모두에서 *Zbtb7c* KO 마우스가 약 25% 더 낮았다(도 1h). *Zbtb7c*, *G6pc* 및 *Pck1*의 발현은 *Zbtb7c* WT 마우스에서 금식으로 인해 증가하였으며, 재섭식으로 다시 감소하였다. 그러나 *Zbtb7c* KO 마우스에서 *G6p1* 및 *Pck1* 발현은 감소하였으며 발현 패턴 변화는 두드러지지 않았다(도 1i).
- [0134] 또한 항-*Zbtb7c* shRNA를 과발현하는 재조합 d1324 아데노바이러스를 감염시킨 C57BL/6J 마우스의 간에서 *G6p1* 및 *Pck1* 발현이 실질적으로 감소하였다(도 1c, 1d). 이들 데이터는 *Zbtb7c*의 구조적인 발현이 식이 조건과 무관하게 혈당 항상성에 필수적임을 보여준다. 또한 금식 시 *Zbtb7c* 발현이 증가하고 간에서 당신합성 유전자인 *G6pc* 및 *Pck1*의 증가에 의해 혈당 수준이 증가함을 알 수 있다.
- [0136] 화학적으로 유도된 금식 및 당뇨 모델에서 *Zbtb7c* 단백질 발현이 증가한다.
- [0137] 화학적으로 유도된 금식 및 1형 당뇨 모델로서, 포스콜린 및 스트렙토조토신을 각각 처리한 C57BL/6J 야생형 마우스에서 *Zbtb7c*, *G6pc* 및 *Pck1* I의 발현을 조사하였다. 포스콜린(cyclic AMP의 유도제)을 처리한 야생형 마우스 1차 간세포에서는 내재적 *Zbtb7c*, *G6pc* 및 *Pck1* 단백질이 시간 의존적으로 증가하였다. 그러나 포스콜린 처리에 의해 *Zbtb7c* mRNA 발현은 영향을 받지 않은 반면 *G6pc* 및 *Pck1* mRNA 발현은 증가하였다(도 2a). 나아가, 포스콜린-처리 세포에서의 *Zbtb7c* 단백질은 대조군 세포에서보다 천천히 분해되어 금식 동안 안정화된 *Zbtb7c*가 간의 당신합성에 기여함을 보여주었다(도 2b). 췌장 베타-세포 특신인 스트렙토조토신을 이용하여 화학적으로 유도된 당뇨 마우스에서 *Zbtb7c* 발현을 조사한 결과[25], *Zbtb7c* 단백질 발현이 강하게 유도됨을 확인하였다. 이를 통해 1형 당뇨에서 *Zbtb7c*가 당신합성에 역할을 함을 알 수 있었다(도 2c).
- [0139] *Zbtb7c*는 *G6pc* 및 *Pck1*의 전사를 활성화한다
- [0140] *Zbtb7c*가 금식에 의해 유도되고 혈당 수준을 증가시키므로, 이것이 당신합성(gluconeogenic) 유전자의 발현에

영향을 미치는지 여부를 조사하였다. 그 결과 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스 간에서 *G6pc* 및 *Pck1*는 모두 감소하지만 다른 당신합성 전사인자인 *Hnf4a* 및 *Foxo1* 등은 단백질 및 mRNA 수준이 덜 변화함을 확인하였다(도 3a). 또한, 포스콜린 처리는 *G6pc* 및 *P1*의 mRNA 발현을 실질적으로 증가시켰으나, *Zbtb7c* 녹아웃에서는 덜 증가하였다(도 3b). 일시적 도입 리포터(루시페라제) 분석 결과 *Zbtb7c*가 HepG2 세포에서 *G6pc* 및 *Pck1* 모두의 프로모터 활성을 3.8 내지 5.7배 증가시켰음을 확인하였다(도 3c, 3d). 마찬가지로, 포스콜린-처리 HepG2 세포에서 sh-*Zbtb7c* RNA 발현 재조합 아데노바이러스로 *Zbtb7c* mRNA를 녹다운하자 *G6pc* 및 *Pck1*의 전사가 모두 감소하였다(도 3c, 3d). 이를 통해 금식 조건 하에서 *Zbtb7c*가 *G6pc* 및 *Pck1*의 전사를 활성화함을 알 수 있었다.

[0142] *IRE(Insulin Response Element)*를 포함하는 프로모터 영역은 *Zbtb7c*에 의한 *G6pc* 및 *Pck1*의 전사 활성화에 중요하다

[0143] 본 발명자들은 HepG2 세포에서 *Zbtb7c*의 전사 활성화와 관련된 *G6pc* 및 *Pck1* 유전자 프로모터의 조절 인자를 조사하였다. 우선, 5' -업스트림의 조절 영역(regulatory region)의 길이가 다양한 몇몇 *G6pc* 프로모터 및 리포터 유전자 융합 리포터 컨스트럭트를 제작하였다. HepG2 세포에 대한 일시적 도입 및 전사 분석 결과 IRE 부위를 포함하는 -231 bp 및 -158 bp 사이의 영역이 *G6pc*의 전사 활성화에 중요함을 알 수 있었다(도 4a). 조절 영역을 보다 구체적으로 특정하기 위해 pGL4b-*G6pc*-Luc 컨스트럭트의 IRE 부위에 대한 위치 특이적 돌연변이 생성 후 리포터 컨스트럭트의 일시적 전사 분석을 수행한 결과, IRE #2 및 #3 부위가 *Zbtb7c*의 전사 활성화에 중요함을 발견하였다(도 4b).

[0144] 리포터 분석 외에 올리고뉴클레오타이드 풀-다운 및 ChIP 분석 역시 *Zbtb7c*가 *G6pc* 프로모터 내의 IRE와 결합하여 전사를 활성화함을 뒷받침하였다(도 4c 및 4d). 나아가, *Zbtb7c*는 IRE에 돌연변이가 발생하면 *G6pc* 전사를 활성화하지 못했다(도 4b). 이들 결과를 통해 IRE를 포함하는 프로모터 영역이 *Zbtb7c*에 의한 *G6pc* 전사 활성화에 중요함을 알 수 있었다.

[0145] 본 발명자들은 *Zbtb7c*가 어떻게 *Pck1*를 조절하는지를 조사하고자 하였다. 특정 IRE가 *G6pc* 전사에 중요하다는 사실을 발견했으므로, 본 발명자들은 pGL3-*Pck1*-Luc의 IRE에 변이를 가하고 일시적 전사 분석(도 5a)와 올리고뉴클레오타이드 풀-다운 및 ChIP 분석(도 5b, 5c)을 수행한 결과 IRE가 *Zbtb7c*와 결합하며, HepG2 세포에서의 *Pck1* 전사 활성화에 중요함을 확인하였다.

[0147] *Zbtb7c*는 FOXO1를 탈아세틸화하여 FOXO1가 *G6Pc* 및 *PCK1* 프로모터의 IRE와 더 잘 결합하도록 한다.

[0148] 인슐린-민감성 전사인자인 *Foxo1*은 *G6pc* 및 *Pck1*의 프로모터 내 IRE와 직접 결합함으로써 이들의 발현을 증가시킨다[26]. HepG2 세포에서, *Zbtb7c*만이 약하게 pG5-3x(IRE)-Luc 컨스트럭트의 전사를 활성화시켰으며 *Foxo1*은 전사 활성화를 더 강화하였다(도 6a). ChIP 분석 결과 *Zbtb7c*는 FOXO1과 *G6Pc* 및 *PCK1* 프로모터 내 두 개의 IRE를 포함하는 영역의 결합을 증가시켰음을 확인하였다(도 6b 및 6c). 이들 데이터를 통해 *Zbtb7c*가 FOXO1과 IRE의 결합을 증가시킴으로써 *G6Pc* 및 *PCK1* 전사를 활성화할 수 있음을 알 수 있다.

[0149] 금식은 *Zbtb7c*와 두 개의 당신합성 유전자인 *G6pc* 및 *Pck1*의 발현을 증가시키고(도 1g), 과발현 *Zbtb7c*는 내재적 FOXO1과 *G6Pc* 및 *PCK1*의 결합을 증가시킨다(도 6b). HepG2 세포에서 포스콜린 처리에 의해 유도된 ZBTB7C가 FOXO1과 *G6Pc* 및 *PCK1*의 결합에 영향을 미치는지를 조사하였다. HepG2 세포를 재조합 아데노바이러스 d1324-*Zbtb7c* 또는 d1324-sh*Zbtb7c* RNA로 감염시키고 6시간 동안 포스콜린을 처리한 결과 포스콜린-유도된 ZBTB7C가 FOXO1과 *G6Pc* 및 *PCK1* 프로모터의 결합을 유의하게 증가시키며, 재조합 아데노바이러스 d1323-*Zbtb7c* 감염에 의한 추가적인 *Zbtb7c* 발현은 FOXO1 결합을 더 증가시키는 것으로 확인되었다. 포스콜린-처리 HepG2 세포에서 재조합 d1324-sh*Zbtb7c*RNA 바이러스를 이용하여 ZBTB7C 발현을 녹다운하면 내재적 FOXO1과 상기 두 유전자의 IRE 영역의 결합이 유의하게 감소시킨다(도 6c).

[0150] 당신합성의 또 다른 핵심 조절자인 인슐린 신호는 *Foxo1*의 인산화, 핵 외부로의 이동 및 분해에 관련한다[6 및 이의 참조문헌]. 그러나, 야생형 마우스에서 분리한 인슐린-처리 1차 간세포에서 *Zbtb7c*의 과발현이나 녹다운 모두 *Foxo1* 인산화에 영향을 미치지 않는다(도 6d). *Zbtb7c*가 *Foxo1*의 발현, 세포내 위치 또는 인산화를 변화시키지 않기 때문에(도 6dD-F), *Zbtb7c*가 *Foxo1*과 *G6pc* 및 *Pck1* 프로모터의 결합을 증가시키는지 여부를 조사하였다. 당신합성 신호에 의한 *Foxo1*의 탈아세틸화가 *Foxo1*의 전사 활성을 증가시킨다는 사실이 알려졌다[9, 10], 마우스 간 추출물에 대한 공동면역침전 및 웨스턴 블롯 결과 *Zbtb7c*과 *Foxo1*이 서로 상호작용함을 확인하였다(도 6g).

[0151] 본 발명자들은 *Zbtb7c*가 *Foxo1* 아세틸화에도 영향을 미치는지를 조사하였으며, 그 결과 *Foxo1* 아세틸화가 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스 간에서 증가함을 관찰하였다(도 7a). 마찬가지로, 포스콜린 처리가 *Zbtb7c* 발현을 증가

시켜 Foxo1 아세틸화를 감소시키는 반면, *Zbtb7c* 녹다운과 포스콜린을 동시에 처리하면 Foxo1 아세틸화가 증가하여 *Zbtb7c*가 Foxo1 탈아세틸화에 관여함을 보여주었다(도 7b).

[0152] 본 발명자들은 *Zbtb7c*가 히스톤 탈아세틸화 효소인 HDAC3와 상호작용함으로써 *CDKN1A*의 전사를 억제함을 보고한 바 있다[22]. 이에, *Zbtb7c*가 Foxo1 및 HDAC3와 상호작용하는지 여부를 조사하였다. 과발현 FLAG-*Zbtb7c*를 발현하는 HEK293 세포 용해물에 대한 공동면역침전 및 웨스턴 블롯 분석 결과 내재적 HDAC3가 Foxo1과 약하게 상호작용하지만 과발현 *Zbtb7c*의 존재 하에서는 FOXO1와 보다 강하게 상호작용함을 확인하였다(도 7c). 포스콜린 처리된 HEK293 세포에서, 내재적 HDAC3와 FOXO1의 상호작용이 *Zbtb7c*에 의해 증가한 반면, 재조합 아데노바이러스 d1324-sh*Zbtb7c*RNA에 의한 *Zbtb7c* 녹다운은 이러한 상호작용을 감소시켰다(도 7d).

[0153] Foxo1 탈아세틸화는 HDAC3와의 상호작용을 통해 Foxo1과 DNA의 결합을 증가시킨다고 보고되었으므로[11], 포스콜린으로 유도되거나 과발현된 *Zbtb7c*에 의해 HDAC3와 *G6Pc* 및 *PCK1* 프로모터 간의 결합이 변화하는지를 조사하였다. HDAC3와 *G6Pc* 및 *PCK1* 프로모터와의 결합은 포스콜린 및 과발현 *Zbtb7c*에 의해 증가하였다. 반면, 포스콜린 처리 HepG2 세포에서 HDAC3 결합은 ZBTB7C 녹다운에 의해 실질적으로 감소하였으며, 이는 탈아세틸화 및 FOXO1과 프로모터의 결합을 감소시킨다(도 7e, 7f).

[0155] 금식에 의해 프로모터와 *Zbtb7c*, *Foxo1*, *Hdac3*, 및 *NCoR* 간의 결합이 증가하며 이는 *Zbtb7c* 녹아웃에 의해 다시 약화된

[0156] ChIP 분석 결과 야생형 및 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스(*Zbtb7c* 결합 제외) 간 조직 모두에서 *Zbtb7c*, Foxo1, Hdac3 및 NCoR가 *G6pc* 및 *Pck1* 프로모터에 결합함이 확인되었다. 금식은 프로모터와 *Zbtb7c*, Foxo1, Hdac3 및 NCoR의 결합을 강하게 증가시켰고 이러한 결합은 *Zbtb7c* 녹아웃에 의해 유의하게 약화되어 *Zbtb7c*가 Foxo1 및 두 개의 프로모터의 NCoR/Hdac3과의 결합 및 당신합성을 증가시키는데 중요함을 알 수 있었다(도 8a-8c).

[0157] *Zbtb7c*가 섭식 및 금식 조건 모두에서 결합에 일정한 역할을 하지만, *Zbtb7c*가 존재하지 않는 경우에도 금식으로 인해 Foxo1 및 Hdac3 결합이 다소간 증가하여 Hdac에 의한 탈인산화 또는 탈아세틸화와 같이 Foxo1 활성화의 다른 메커니즘이 작용하는 것을 알 수 있다. 나아가, 섭식 및 금식 조건 하에서 야생형 및 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스에서 *Zbtb7c*, *G6pc* 및 *Pck1*의 발현 변화를 관찰하였다. *Zbtb7c* 녹아웃 마우스에서 *G6pc* 및 *Pck1*의 전반적인 발현은 낮았으며 금식에 의해 조금 증가하여 ChIP 데이터와 일치하였다(도 11 및 8c).

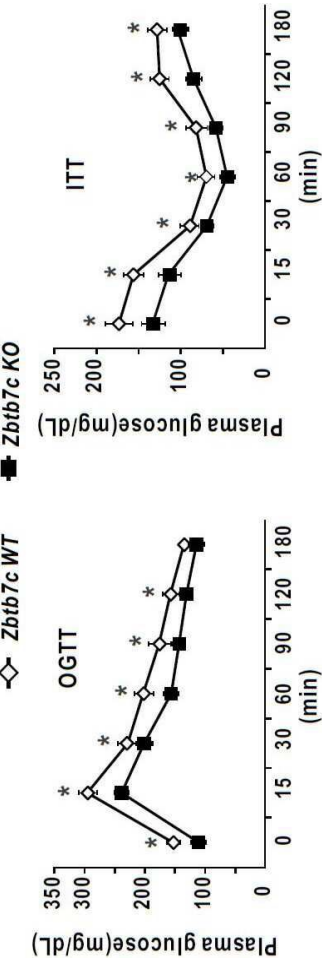
[0158] 섭식 및 금식 상황 모두에서, 야생형 마우스 간의 *G6pc* 및 *Pck1* 프로모터 IRE 영역 측면의 히스톤 H3K4 트리메틸화(H3K4Me3, 활발한 전사와 관련된 “히스톤 마크”)[27,28]는 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스 간의 동일한 히스톤 마크에 비해 5배 높았다. 야생형 및 *Zbtb7c* 녹아웃 마우스 모두에서, H3K4Me3 마크의 전체 수준은 크게 달랐으나 금식으로 인해 모두 2.5배 증가를 보였다. 흥미롭게도, H3K27Me3(전사 억제의 히스톤 마크)는 금식 또는 *Zbtb7c* 녹아웃에 의해 변화하지 않았다(도 8d). 이들 데이터는 *Zbtb7c*가 IRE 영역 주변의 히스톤의 후성유전학적 상태에 영향을 주고 Foxo1 및 Hdac3 및 NcoR와 같은 다른 단백질의 결합을 증가시킴으로서 전사를 강화함으로써 말해준다.

[0159] 동물 섭식은 췌장 인슐린 분비, 간에서의 인슐린 신호 경로 및 주요 신호 매개자인 Akt를 활성화함으로써 FOXO1의 인산화와 FOXO1의 핵으로의 이동을 억제하고 유비퀴틴화 및 분해를 유발한다[29]. 그러나, 금식 동안에 글루카곤 신호는 아데닐 사이클레이즈의 활성화를 촉발하여 ATP로부터 cAMP(cyclic AMP) 생산을 촉매하면, 이는 단백질 카이네이즈 A(PKA)와 결합 후 핵으로 이동한다[30,31]. 나아가, 금식은 *Zbtb7c*의 단백질 안정성을 증가시켜 Foxo1, Hdac3 및 NCoR이 *G6pc* 및 *Pck1* 프로모터 내의 IRE로 이동하도록 유도한다(recruiting)(도 8a-8c). 이를 통해 Foxo1의 탈아세틸화가 이루어져 *G6pc* 및 *Pck1*의 증가가 정점에 달하게 된다(도 9). 이를 종합하면, *Zbtb7c*가 금식 기간 동안 당신합성의 주요 조절자임을 알 수 있다.

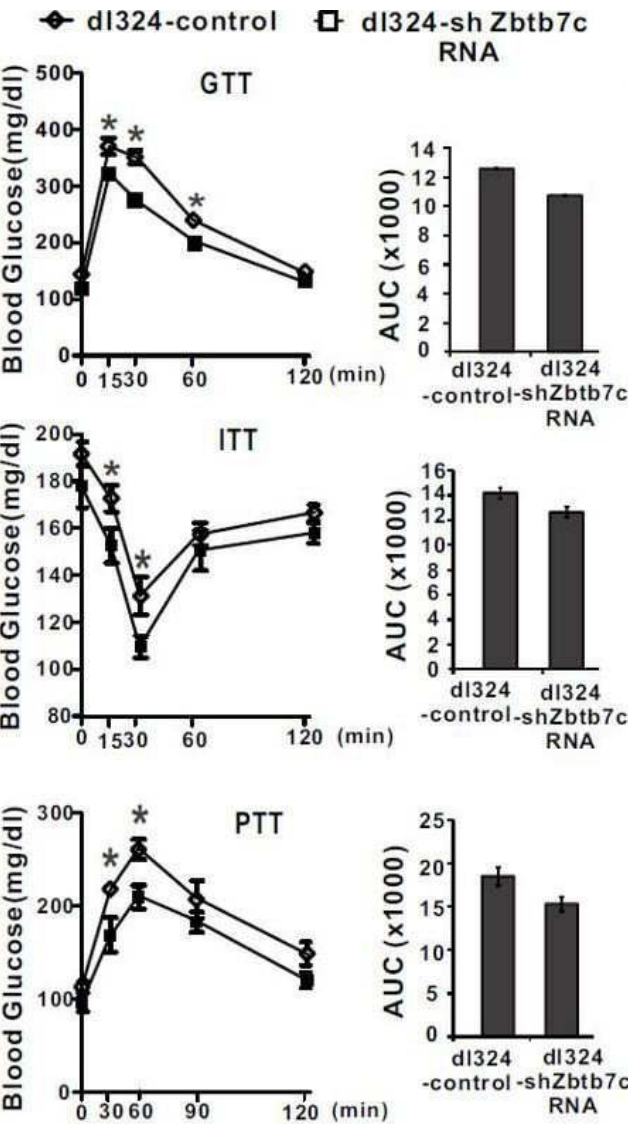
[0161] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

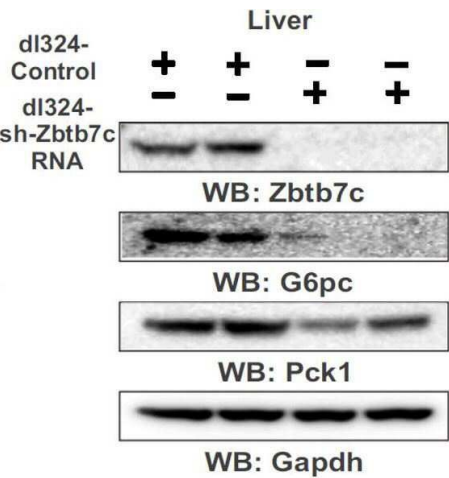
도면1a



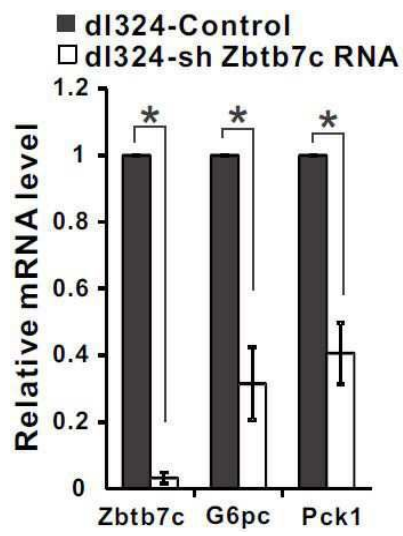
도면1b



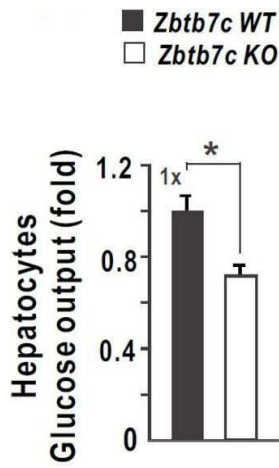
도면1c



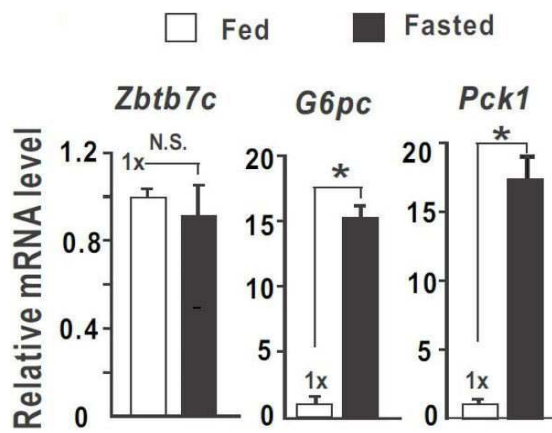
도면1d



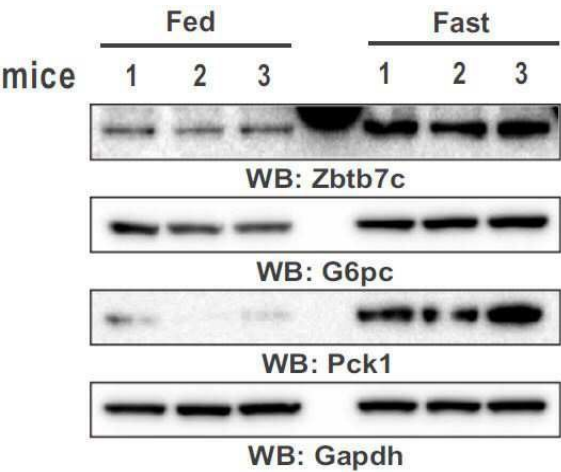
도면1e



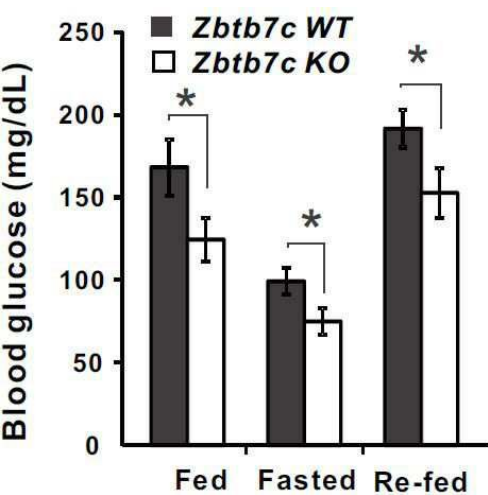
도면1f



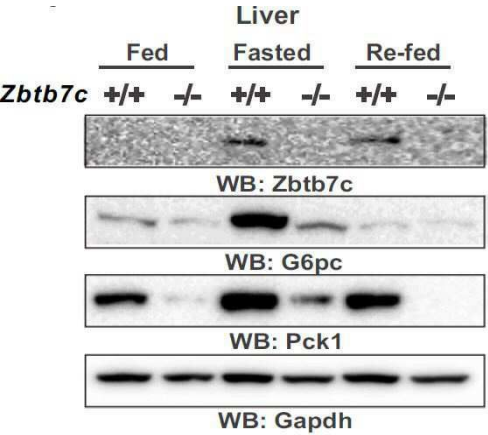
도면1g



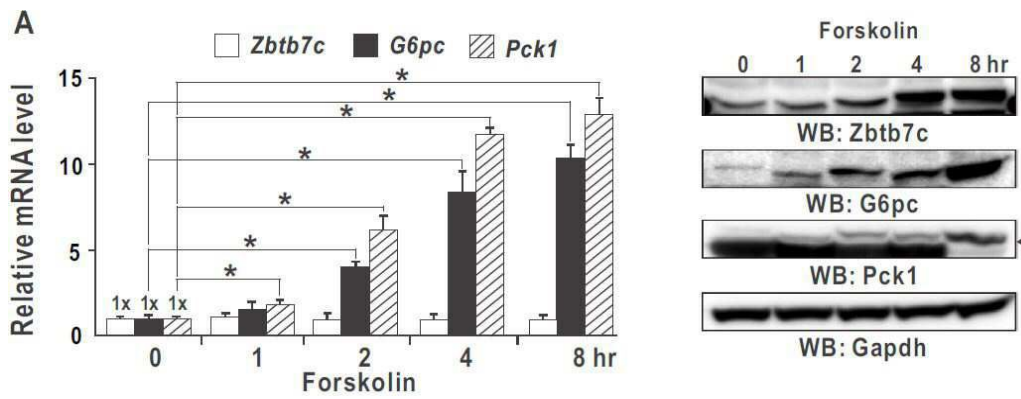
도면1h



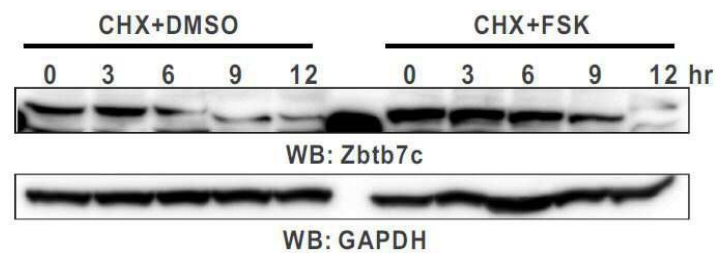
도면1i



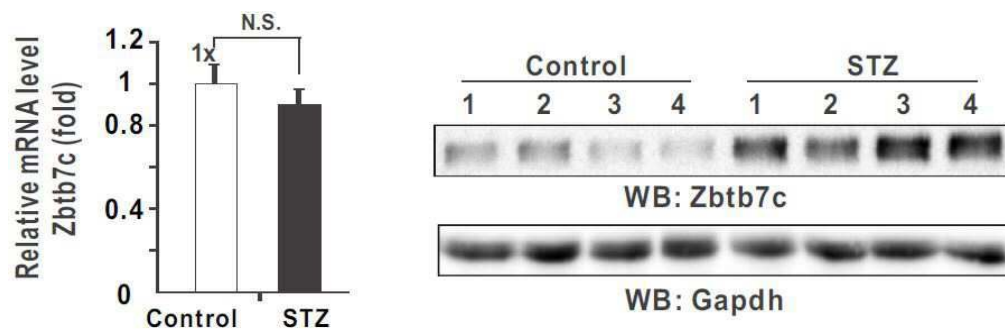
도면2a



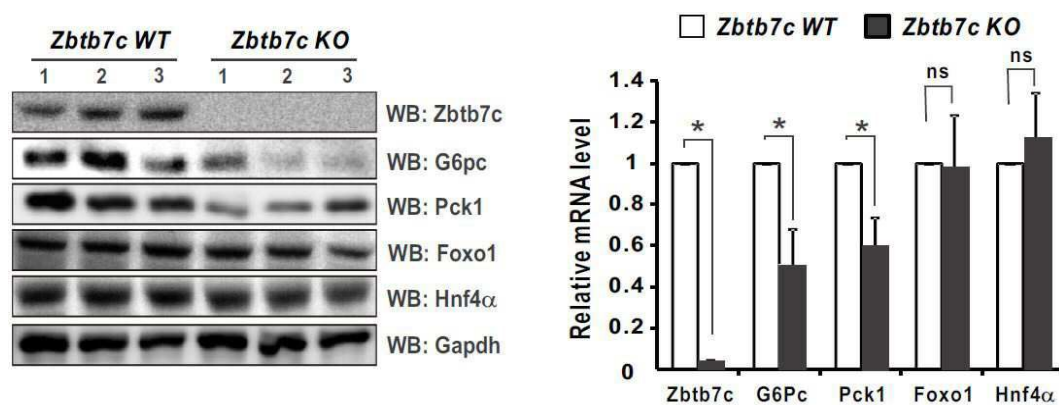
도면2b



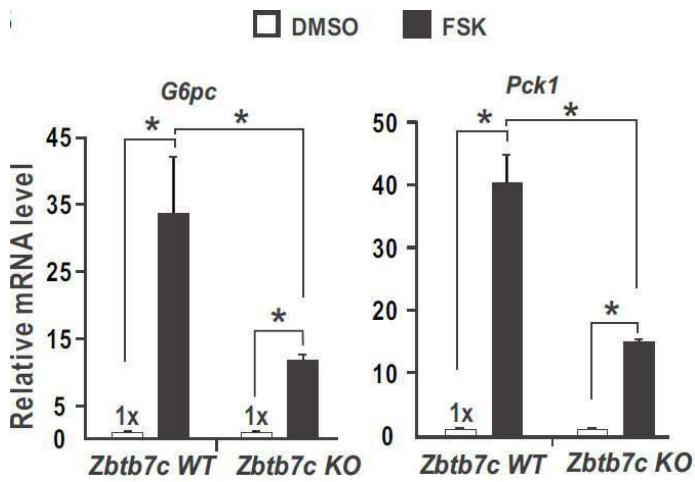
도면2c



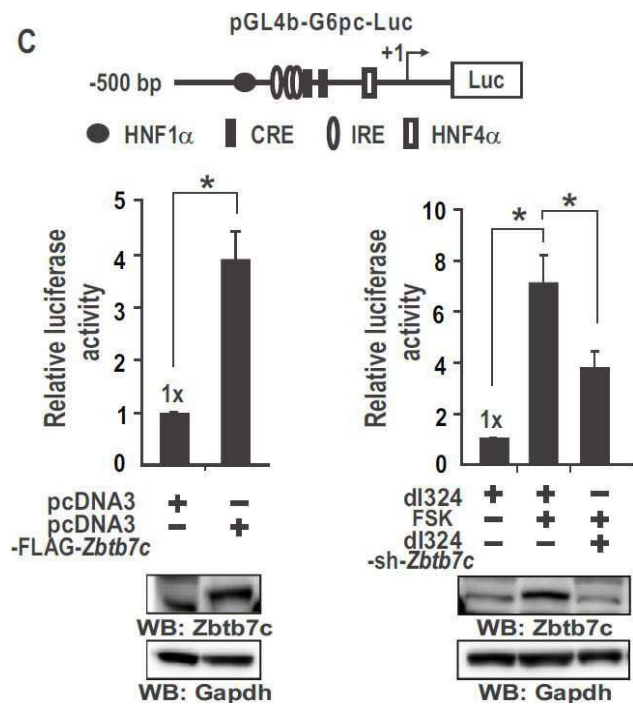
도면3a



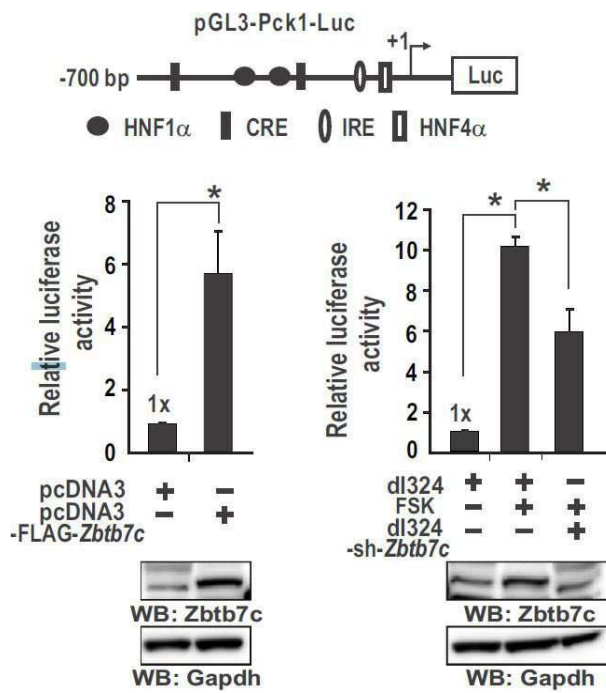
도면3b



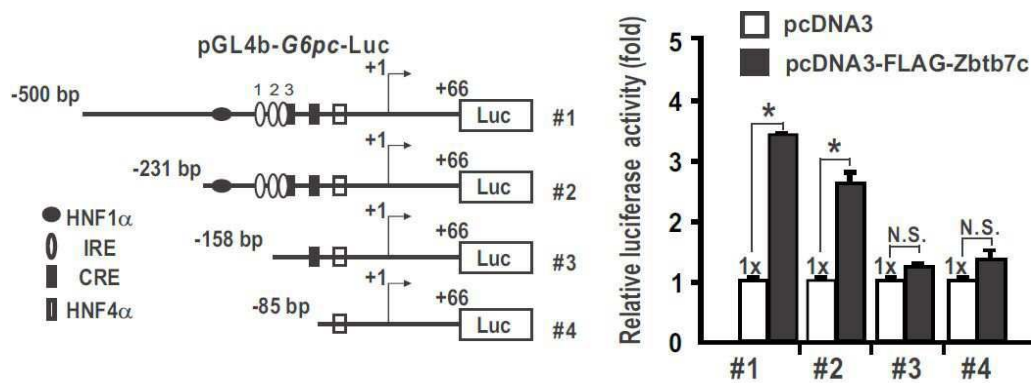
도면3c



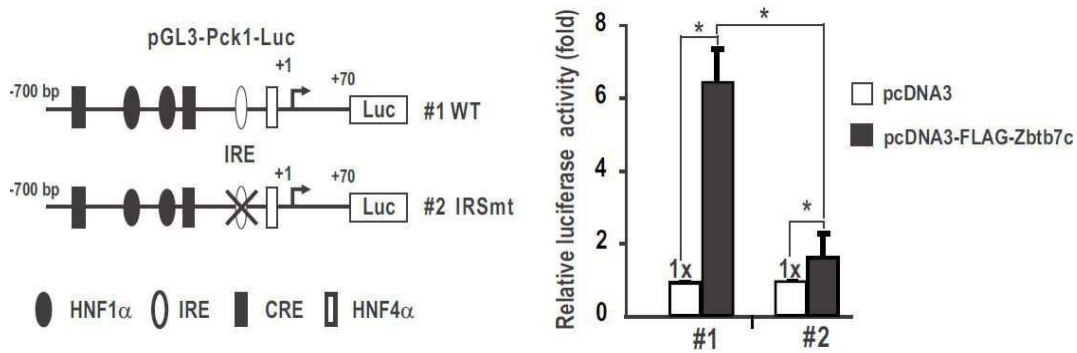
도면3d



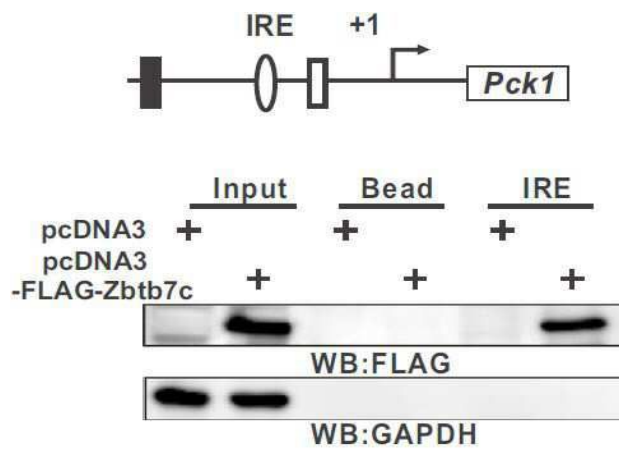
도면4a



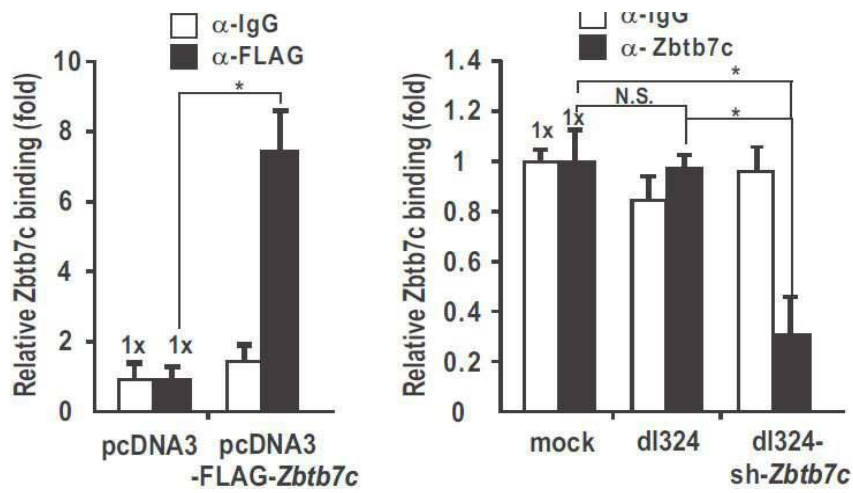
도면5a



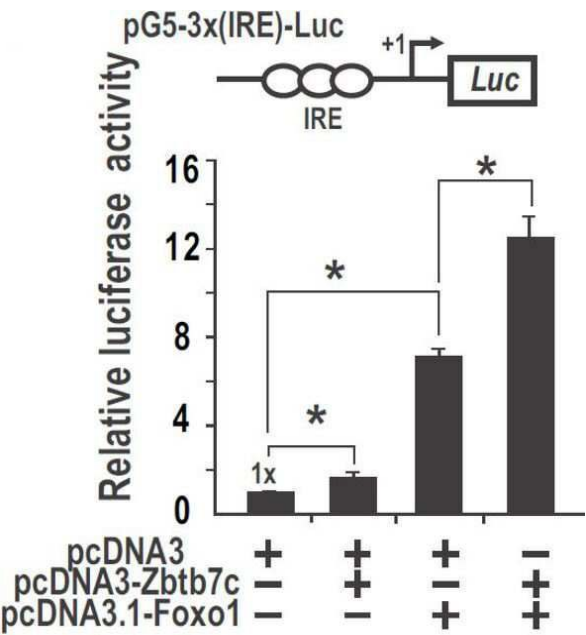
도면5b



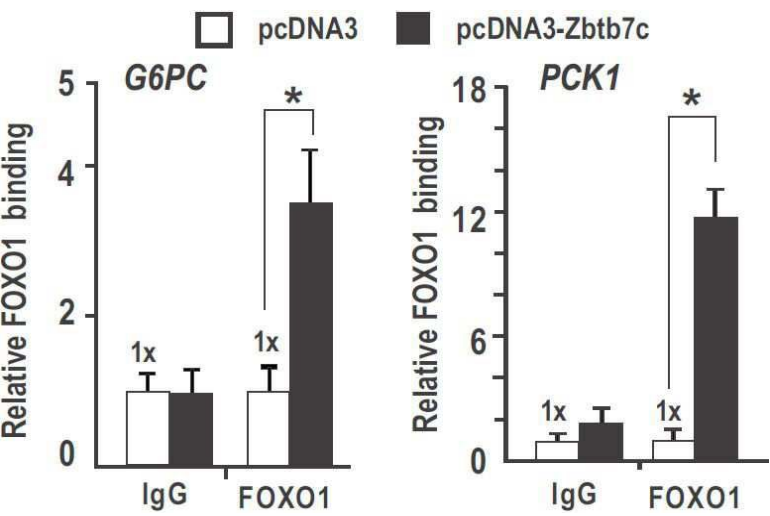
도면5c



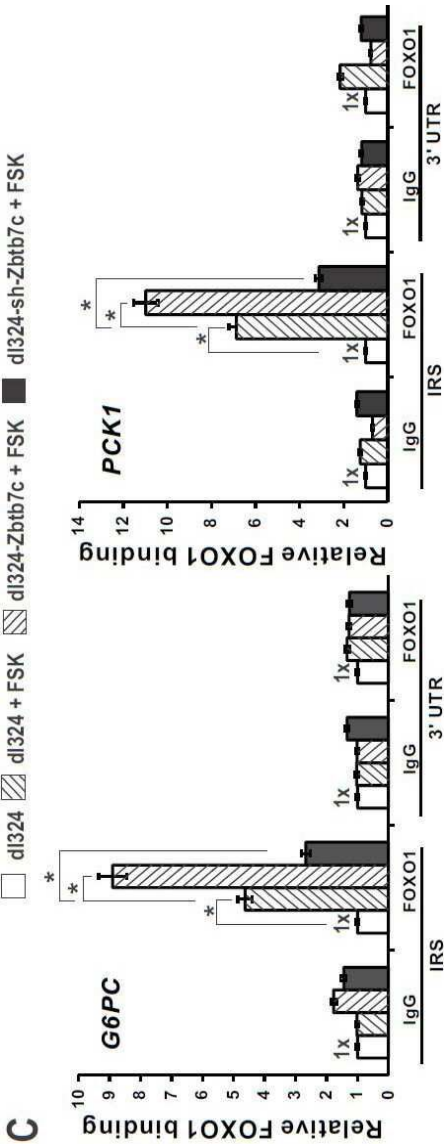
도면6a



도면6b



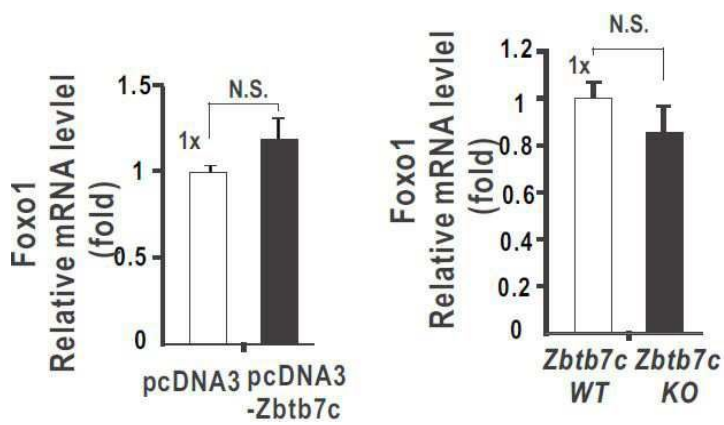
도면6c



도면6d



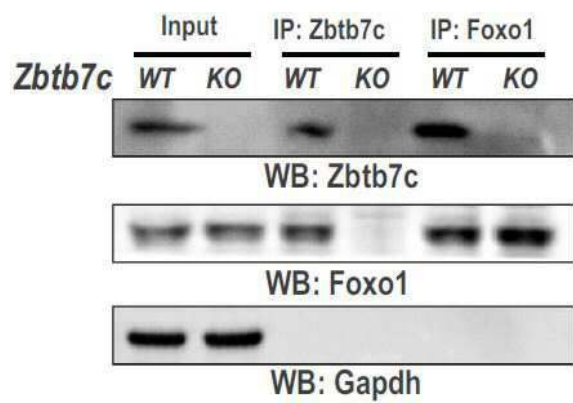
도면6e



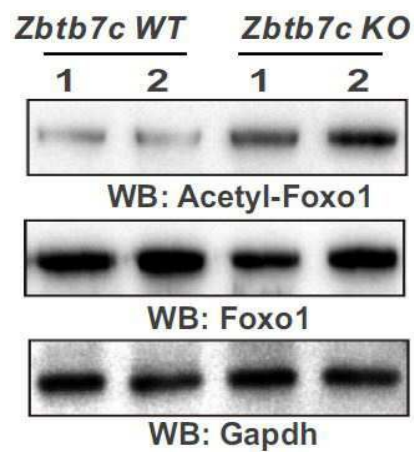
도면6f



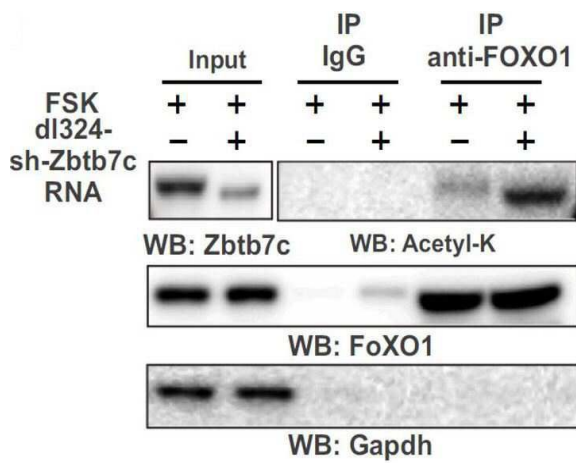
도면6g



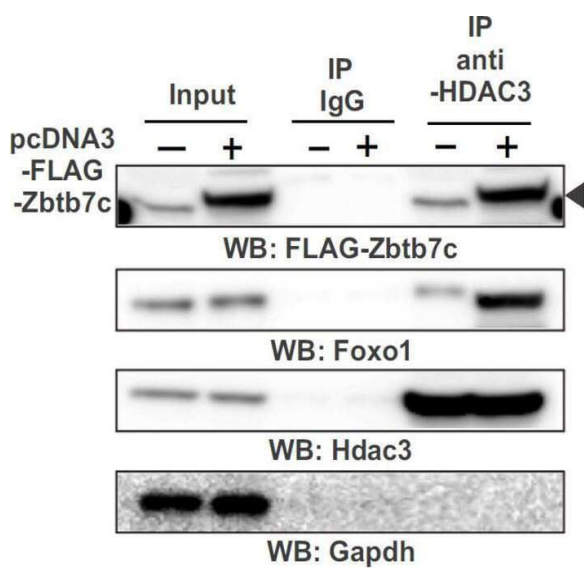
도면7a



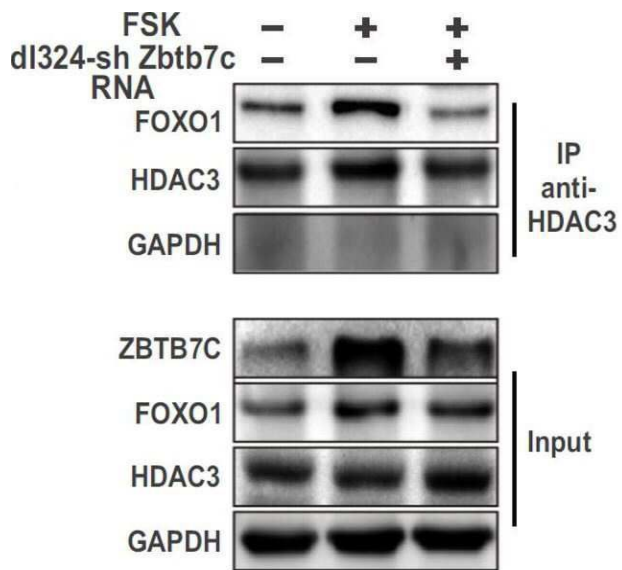
도면7b



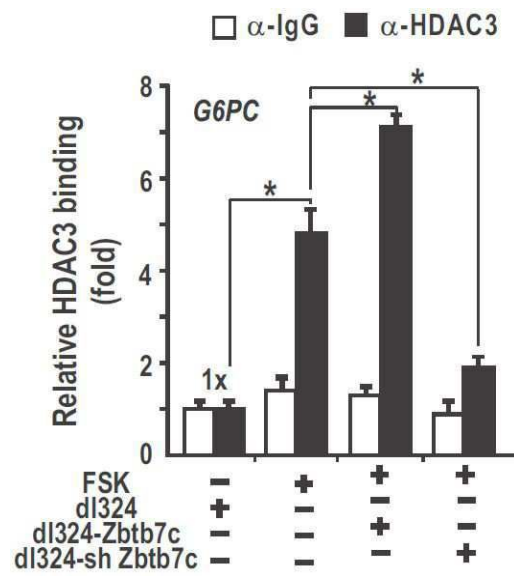
도면7c



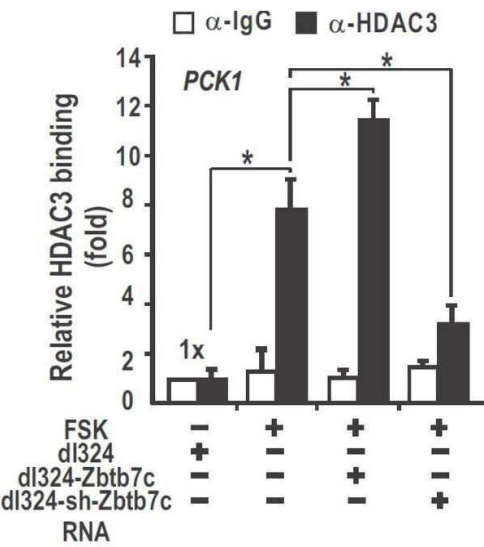
도면7d



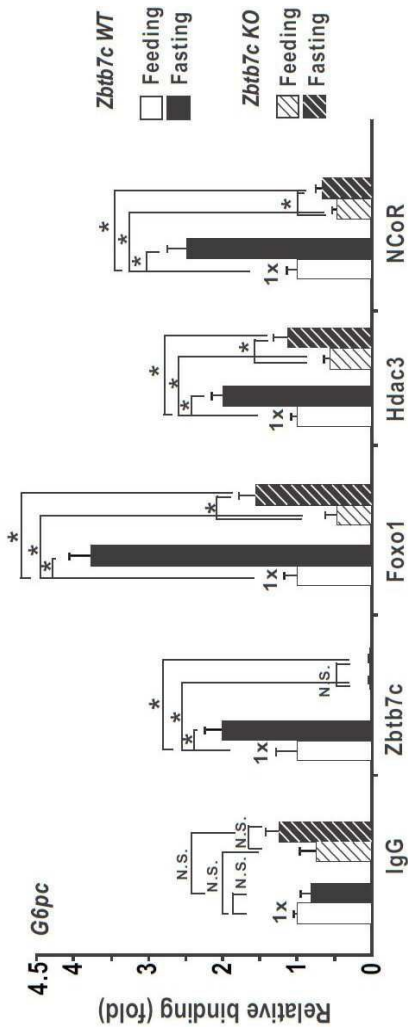
도면7e



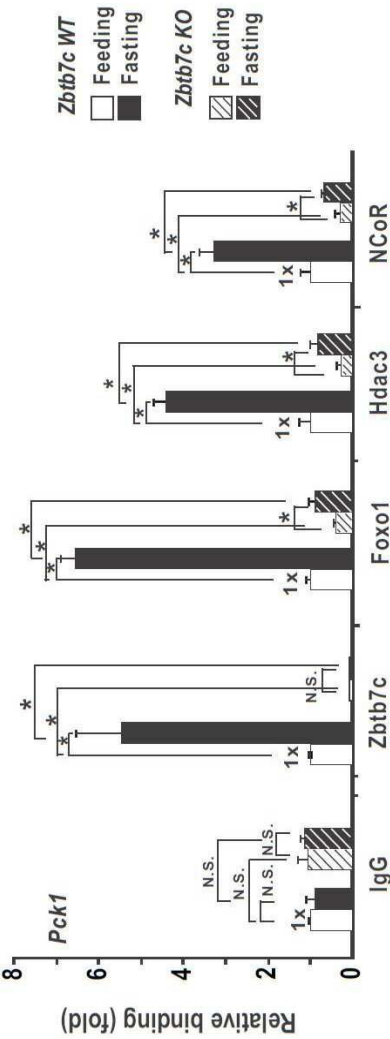
도면7f



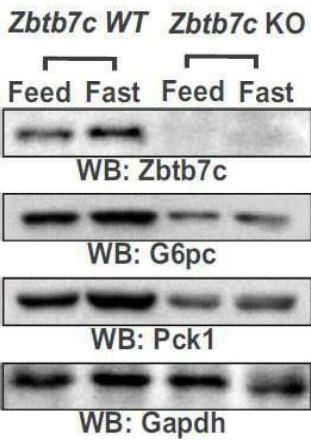
도면8a



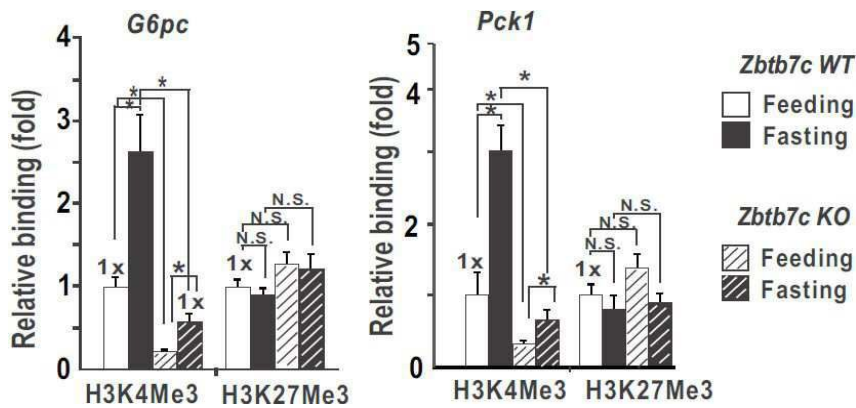
도면8b



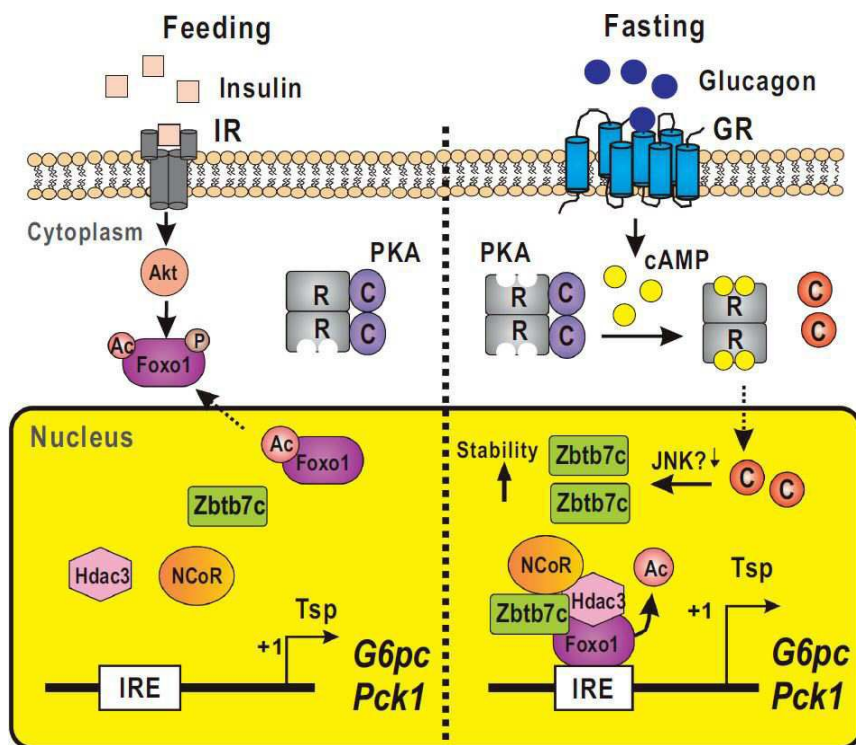
도면8c



도면8d



도면9



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> A Composition for Reducing Blood Glucose Comprising a ZBTB7C Inhibitor as an Active Ingredient
- <130> HPC-9270
- <160> 48
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 34
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxo1 F primer

<400> 1

gatacctcgag accatggccg aggcgcctca ggtg 34

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foxo1 R primer

<400> 2

gatacggatcc gcctgacacc cagctatgtg 30

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pGL3-Pck1-Luc F primer

<400> 3

gatacctcgag catgggttgt tca 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pGL3-Pck1-Luc R primer

<400> 4

gatcaagctt tcttcccgcc agc 23

<210> 5

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pG5-3x(IRE)-Luc-1

<400> 5

ctagcgcaaa acaaacttat ttggaagcaa aacaaactta tttggaagca aaacaaactt 60

atgttgaag 69

<210> 6
 <211> 69
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pG5-3x(IRE)-Luc-2
 <400> 6
 ctagcttcaa aataagtttg ttttgcttca aaataagttt gttttgcttc aaaataagtt 60
 tgttttgcg 69

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6pc-mIRE1 F primer
 <400> 7
 aatggcgatc aggctcaaaa tgtgtgcctg ttttg 35

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6pc-mIRE1 R primer
 <400> 8
 caaaacaggc acacattttg agcctgatcg ccatt 35

<210> 9
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6pc-mIRE2 F primer
 <400>
 > 9
 tgtttttgtg tgcctcaaaa gctattttac gtaaa 35

<210> 10
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> G6pc-mIRE2 R primer
 <400> 10
 tttaacgtaaa atagcttttg aggcacacaa aaaca 35
 <210> 11
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6pc-mIRE3 F primer
 <400> 11
 tgtgcctgtt ttgctcaaaa acgtaaatca ccctg 35
 <210> 12
 <211>
 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6pc-mIRE3 R primer
 <400> 12
 cagggtgatt tacgtttttg agcaaaacag gcaca 35
 <210> 13
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pck1-mIRE F primer
 <400> 13
 atcttatagc tgtgggtgaaa acccaaccag cagctct 37
 <210> 14
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pck1-mIRE R primer
 <400> 14
 agagctgctg gttgggtttt caccacagct ataagat 37
 <210> 15
 <211> 36

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shRNA sense-1
 <400> 15
 gatccctcca gtgcatcgtg aatgtttttc aagaga 36
 <210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shRNA sense-2
 <400> 16
 acattcacga tgcactggat ttttttgaa 30
 <210> 17
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shRNA antisense-1
 <400> 17
 agctttttcca aaaa 14
 <210> 18
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shRNA antisense-2
 <400> 18
 aatccagtgc atcgtgaatg ttctcttgaa 30
 <210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> shRNA antisense-3
 <400> 19
 aaacattcac gatgcactgg agg 23
 <210> 20

<211> 21

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7C F primer

<400> 20

cccatctgcc acaaagtcac c 21

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZBTB7C R primer

<400> 21

tggtgcacac gtatggcttc tc 22

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human G6PC F primer

<400> 22

ggctcaacct cgtctttaag tg 22

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human G6PC R primer

<400> 23

ctccctggtc cagtctcaca 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse G6PC F primer

<400> 24

tcggagactg gttcaacctc	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse G6PC R primer	
<400> 25	
tcacaggtga caggaactg	20
<210> 26	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human PCK1 F primer	
<400> 26	
acggattcac cctacgtgg	19
<210> 27	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> human PCK1 R primer	
<400> 27	
ccccacagaa tggaggcatt t	21
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mouse PCK1 F primer	
<400> 28	
ctggcacctc agtgaagaca	20
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> mouse PCK1 R primer
 <400> 29
 tcgatgcctt cccagtaaac 20
 <210> 30
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human FOX01 F primer
 <400> 30

 ggctggaaga attcaattcg tc 22
 <210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human FOX01 R primer
 <400> 31
 accctctgga ttgagcatcc ac 22
 <210> 32
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse FOX01 F primer
 <400> 32
 ttcaattcgc cacaatctgt cc 22
 <210> 33
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse FOX01 R primer
 <400> 33
 gggtgatattt ccgctcttgc 20
 <210> 34
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6pc promoter IRE#1
 <400> 34
 gatcaggctg tttttgtgtg c 21
 <210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6pc promoter IRE#2/3
 <400> 35
 gcctgttttg ctattttacg ta 22
 <210> 36
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Pck1 promoter IRE
 <400> 36
 agctgtggtg ttttgccaac cag 23
 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human G6PC promoter F primer
 <400> 37
 cttgcactgc caagaagcat 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human G6PC promoter R primer
 <400> 38
 attgatcaaa ggtgcatcac 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6PC 3-UTR F primer
 <400> 39
 agtcaccttg tccagaatgg 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> G6PC 3-UTR R primer
 <400> 40
 tctcaccatg ttgccaggc 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse G6PC promoter F primer
 <400> 41
 tggcttcaag gaccaggaag 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse G6PC promoter R primer
 <400> 42
 tgcaaacatg ttcagggtga 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> human PCK1 promoter F primer

<400>	43	
gggtgcatcc ttcccatgaa		20
<210>	44	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	human PCK1 promoter R primer	
<400>	44	
gacttcgagc cctcaaccaa		20
<210>	45	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCK1 3-UTR F primer	
<400>	45	
taaggataag aaccacagaa		20
<210>		
46		
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCK1 3-UTR R primer	
<400>	46	
tgtgcattct agctaattcca		20
<210>	47	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse Pck1 F primer	
<400>	47	
tggctcagag ctgaatttcc		20
<210>	48	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> mouse Pck1 R primer

<400

> 48

cctgttgctg atgcaactg

20