



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0085709
(43) 공개일자 2020년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 5/09 (2010.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5011 (2013.01)
C07K 14/705 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0083744(분할)
(22) 출원일자 2020년07월07일
심사청구일자 2020년07월07일
(62) 원출원 특허 10-2018-0123015
원출원일자 2018년10월16일
심사청구일자 2018년10월16일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
이진우
인천광역시 연수구 송도문화로28번길 28, 103동 702호(송도동, 송도글로벌캠퍼스푸르지오)
최은주
인천광역시 동구 옥송로16번길 15(송림동)
(74) 대리인
특허법인 하나

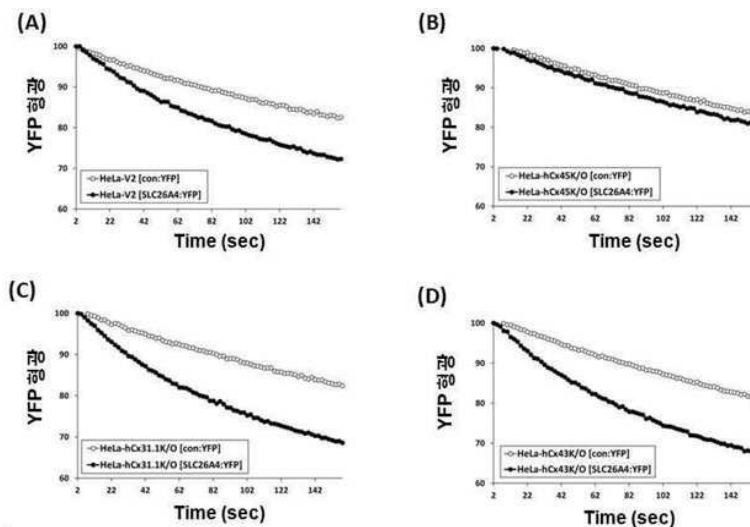
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 커넥신 발현에 의한 갭정선 활성 측정방법

(57) 요약

본 발명은 자궁경부암 세포 및 폐암 세포에서의 세포 간 갭정선 활성 측정방법, 세포 간 갭정선 활성 측정용 키트 및 갭정선 활성 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 갭정선 활성 측정 및 스크리닝에 있어 세포 간 갭정선 활성에 관여하는 커넥신 유전자에 대한 가이드 RNA 및 커넥신 유전자가 녹아들인 세포주의 제조방법에 관한 것이다.-

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 5/0693 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12N 2510/00 (2013.01)

G01N 2333/705 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1D1A1A02937397

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업

연구과제명 캡정선 조절 물질 발굴

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A6A1A03023718

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구기반구축사업

연구과제명 난치성 질환 치료를 위한 트랜스포톤 제어 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교

연구기간 2018.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 19 및 서열번호 20의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트 또는 서열번호 21 및 서열번호 22의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 어닐링(annealing) 후 BsmBI 효소로 반응시키는 단계를 포함하는, 커넥신 45 유전자에 대한 가이드 RNA를 제조하는 방법.

청구항 2

서열번호 15 및 서열번호 16의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트 또는 서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 어닐링(annealing) 후 BsmBI 효소로 반응시키는 단계를 포함하는, 커넥신 31.1 유전자에 대한 가이드 RNA를 제조하는 방법.

청구항 3

서열번호 23 및 서열번호 24의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트 또는 서열번호 25 및 서열번호 26의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 어닐링(annealing) 후 BsmBI 효소로 반응시키는 단계를 포함하는, 커넥신 26 유전자에 대한 가이드 RNA를 제조하는 방법.

청구항 4

- a) 제1항의 방법에 따라 가이드 RNA를 제조하는 단계;
- b) 상기 단계 a)에서 제조된 가이드 RNA를 벡터에 삽입하여 가이드 RNA 벡터를 제조하는 단계; 및
- c) 상기 단계 b)에서 제조된 가이드 RNA 벡터를 세포에 형질주입시켜 커넥신 45 유전자의 표적 서열에 DNA 결실(deletion)을 유발하는 단계를 포함하는, 커넥신 45 유전자 녹아웃(knock out) 세포주를 제조하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 커넥신 45 유전자 녹아웃 세포주는 자궁경부암 세포주 또는 폐암 세포주인 것인, 커넥신 45 유전자 녹아웃 세포주를 제조하는 방법.

청구항 6

- a) 제2항의 방법에 따라 가이드 RNA를 제조하는 단계;
- b) 상기 단계 a)에서 제조된 가이드 RNA를 벡터에 삽입하여 가이드 RNA 벡터를 제조하는 단계; 및
- c) 상기 단계 b)에서 제조된 가이드 RNA 벡터를 세포에 형질주입시켜 커넥신 31.1 유전자의 표적 서열에 DNA 결실(deletion)을 유발하는 단계를 포함하는, 커넥신 31.1 유전자 녹아웃(knock out) 세포주를 제조하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 커넥신 31.1 유전자 녹아웃 세포주는 자궁경부암 세포주 또는 폐암 세포주인 것인, 커넥신 31.1 유전자 녹아웃 세포주를 제조하는 방법.

청구항 8

- a) 제3항의 방법에 따라 가이드 RNA를 제조하는 단계;
- b) 상기 단계 a)에서 제조된 가이드 RNA를 벡터에 삽입하여 가이드 RNA 벡터를 제조하는 단계; 및
- c) 상기 단계 b)에서 제조된 가이드 RNA 벡터를 세포에 형질주입시켜 커넥신 26 유전자의 표적 서열에 DNA 결실(deletion)을 유발하는 단계를 포함하는, 커넥신 26 유전자 녹아웃(knock out) 세포주를 제조하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 커넥신 26 유전자 넥아웃 세포주는 폐암 세포주인 것인, 커넥신 26 유전자 넥아웃 세포주를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자궁경부암 세포 및 폐암 세포에서의 세포 간 갭정선 활성 측정방법, 세포 간 갭정선 활성 측정용 키트 및 갭정선 활성 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 갭정선 활성 측정 및 스크리닝에 있어 세포 간 갭정선 활성에 관여하는 커넥신 유전자에 대한 가이드 RNA 및 커넥신 유전자가 넥아웃 된 세포주의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 갭정선(Gap junction, GJ)은 cAMP, Ca^{2+} 및 IP3와 같은 신호전달 물질이나, 영양소 및 대사산물을 포함하는 1kDa 미만의 소분자 물질의 확산을 위한 세포 내 통로이다. 6 개의 커넥신(connexin, Cx) 단백질들이 커넥손(connexon)이라고 하는 튜브 구조를 이루는데, 이러한 커넥손 구조는 세포 외부로의 헤미채널(hemichannel)로서의 역할을 하거나, 이웃하는 세포의 커넥손과 결합하여 갭정선을 형성한다. 인간의 커넥신 그룹은 21 종류의 커넥신 단백질로 구성될 수 있으며, 이들은 각각 자신의 분자량에 따라 명명된다.

[0003] 상기 커넥신 유전자의 변이로 인해 다양한 질병이 야기될 수 있다. 인간 커넥신 26을 암호화하는 GJB2의 변이는 피부 질환과 함께 중후군성 청력 손실 또는 비-중후군성 청력 손실을 야기하는 것으로 보고된 바 있고, GJA1 유전자의 변이에 의한 커넥신 43의 결함은 다양한 발달적 이상 현상을 야기할 수 있는 눈, 코, 치아, 골격 이형성증(Oculodentodigital dysplasia)의 원인이 되는 것으로 보고된 바 있다.

[0004] 또한, 갭정선은 심장근육 수축의 전파 현상에 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어, 갭정선에 대한 조절자는 부정맥(arrhythmia)에 대한 치료 효과를 가질 수 있을 것으로 예상되고 있으며, 심장근육 수축의 전파 현상에 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어, 갭정선에 대한 조절자는 부정맥(arrhythmia)에 대한 치료 효과를 가질 수 있을 것으로 예상되고 있다.

[0005] 상기와 같이 변이가 나타나는 커넥신 단백질의 종류에 따라 갭정선 활성 및 질환의 발생이 달리 나타날 수 있는 바, 이와 같은 갭정선 활성을 조절하여 질병을 치료하고자 하는 연구가 지속되고 있다.

[0006] 한편, 유전자가위(engineered nuclease)란 인간 및 동물 세포의 유전체를 교정하는 데 사용되는 유전자 교정(genome editing) 기술로 유전체에서 특정 염기 서열을 인식한 후 해당 부위의 DNA를 정교하게 잘라내는 시스템을 말한다. 현재까지 개발된 유전자가위로는 1세대 징크핑거 뉴클레이즈(ZFNs·Zinc Finger Nucleases), 2세대 탈렌(TALENs·Transcription Activator-Like Effector Nucleases), 3세대 크리스퍼(CRISPR-Cas9)가 있다. 특히 가장 최근 기술인 크리스퍼 유전자가위는 유전자를 잘라내고 새로 바꾸는 데 가장 수년씩 걸리던 것이 며칠로 줄어들며, 동시에 여러 군데의 유전자를 손볼 수도 있다.

[0007] 종래에는 단백질의 활성을 저해하는 기술, 예를 들어 RNA 간섭(interference) 및 부위 특이적 돌연변이 등을 이용하여 측정하였으나, 이러한 기술들은 쉽게 적용될 수 있음에도 불구하고 해당 단백질의 무결성(integrity)에 영향을 미칠 수 있고, 의도하지 않게 다른 전사 조절 기능을 저해할 수 있는 단점이 있었다.

[0008] 이에 따라, 갭정선 활성 측정 및 관련 질환 치료제의 스크리닝 연구와 함께 상기 방법의 적용에 있어 관련 단백질의 유전자 단계에서의 연구부터 보다 정교한 방법이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1818850호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 자궁경부암 세포 및 폐암 세포에서의 세포 간 갭정선 활성측정 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 자궁경부암 세포 및 폐암 세포에서의 세포 간 갭정선 활성 측정용 키트를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 자궁경부암 세포 및 폐암 세포에서의 갭정선 활성 조절제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 갭정선 활성에 관여하는 커넥신 45 유전자에 대한 가이드 RNA를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 갭정선 활성에 관여하는 커넥신 31.1 유전자에 대한 가이드 RNA를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 갭정선 활성에 관여하는 커넥신 26 유전자에 대한 가이드 RNA를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 커넥신 45 유전자 녹아웃(knock out) 세포주를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 커넥신 31.1 유전자 녹아웃(knock out) 세포주를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 커넥신 26 유전자 녹아웃(knock out) 세포주를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 a) 요오드화물(iodide) 수송체를 발현하는 공여체 세포 및 요오드화물 센서 형광 단백질을 발현하는 수용체 세포를 제조하는 단계로서, 상기 공여체 세포 및 수용체 세포는 커넥신(connexin, Cx) 단백질을 발현하는 자궁경부암 세포 또는 폐암 세포인 것인 단계; b) 상기 단계 a)에서 제조한 공여체 세포 및 수용체 세포를 혼합하여 공동 배양하는 단계; c) 상기 단계 b)에서 공동배양한 배양액을 제거하고 요오드화물을 포함하지 않는 완충용액을 배양 플레이트에 첨가하는 단계; d) 상기 단계 c)에서 첨가한 배양 플레이트에 요오드화물을 포함하는 완충용액을 첨가하는 단계; e) 상기 단계 d)의 첨가 시점으로부터 배양 플레이트의 형광 강도를 측정하는 단계; f) 상기 단계 e)에서 측정한 형광 강도의 감소를 요오드화물 센서 형광 단백질의 소광(quenching) 비율로서 계산하는 단계; 및 g) 상기 단계 f)에서 계산한 소광 비율이 증가하면 갭정선(gap junction) 활성이 증가하는 것으로 판단하는 단계;를 포함하는, 세포 간 갭정선 활성 측정 방법에 관한 것이다.
- [0020] 구체적으로, 상기 단계 a)의 요오드화물 수송체는 SLC26A4 단백질이고, 요오드화물 센서 형광 단백질은 YFP(yellow fluorescent protein)의 H148Q/I152L 치환 변이 단백질인 것일 수 있으며, 상기 단계 e)의 측정은 2 내지 150 초 동안 수행하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명에 따른 세포 간 갭정선 활성 측정 방법은 요오드화물(iodide) 수송체 막단백질을 발현하는 공여체 세포 및 요오드화물 센서 YFP^{OL} 단백질을 발현하는 수용체 세포를 공동 배양한 후 요오드화물을 첨가하였을 때, 요오드화물이 공여체 세포 내로 들어가서 갭정선을 통해 수용체 세포로 확산 이동하게 되고, 이동한 요오드화물은 YFP^{OL} 단백질과 결합하여 형광을 소광(quenching)할 수 있으며, 이를 측정하여 갭정선의 활성 변화를 민감하고 신속하게 측정할 수 있음을 확인할 수 있으므로, 본 발명의 세포 간 갭정선 활성 측정 방법은 갭정선 활성 조절제를 이용하는 약물 스크리닝 방법에 유용하게 사용할 수 있다. 이러한 초고속 스크리닝 방법에 대해 본 발명자들은 한국등록특허 제10-1818850호를 통해 등록받은 바 있다. 이에 따라, 상기 세포 간 갭정선 활성 측정 방법은 한국등록특허 제10-1818850호를 참고할 수 있다.
- [0022] 세포 간 갭정선 활성은 커넥신 단백질(connexin, Cx)의 종류 및 발현 수준에 따라 달라질 수 있으며, 이에 따라 나타나는 질환의 종류 역시 달라질 수 있다.
- [0023] 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포는 종래 갭정선 채널이 존재하지 않는 것으로 보고되어 왔으며, 이에 따라 갭정선 활성이 없음을 전제로 갭정선 활성 측정 실험에 있어 전기생리학(electrophysiological) 연구에 활용되어 왔다(Sahu, G., Sukumaran, S. & Bera, A. K. Pannexins form gap junctions with electrophysiological and pharmacological properties distinct from connexins. *Sci Rep* **4**, 4955, doi:10.1038/srep04955 (2014).).

다만, 일부에서 커넥신 단백질들이 HeLa 세포에 발현되어 있음이 보고된 바 있으나(Mayama, T., Matsumura, K., Lin, H., Ogawa, K. & Imanaga, I. Remodelling of cardiac gap junction connexin 43 and arrhythmogenesis. *Exp Clin Cardiol* **12**, 67-76 (2007)), 갭정선 활성이 없는 것으로 보고되어옴에 따라 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에서 실제로 갭정선 채널의 구축 및 활성화에 대해 확인된 바 없다.

- [0024] 본 발명의 갭정선 활성 측정방법은 민감도가 매우 높아 상기와 같은 HeLa 세포에서 갭정선 활성이 나타날 수 있음을 확인하였으며, 나아가 HeLa 세포의 갭정선 활성화에 영향을 미치는 구체적인 커넥신 단백질의 종류까지 규명 되도록 하였다.
- [0025] 본 발명 일 실시예에서는 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포 및 폐암 세포주인 A549 세포에서 커넥신 단백질의 발현을 억제한 후 갭정선 활성 변화를 측정하였다. 구체적으로 HeLa 세포에서 갭정선 활성은 Cx45 발현에 크게 영향을 받음을 확인하였으며(도 4), A549 세포에서 갭정선 활성은 Cx43 발현에 크게 영향을 받음을 확인하였다(도 8).
- [0026] 본 발명의 다른 일 측면은 요오드화물 수송체를 발현하는 공여체 세포 및 요오드화물 센서 형광 단백질을 발현하는 수용체 세포를 포함하는 세포 간 갭정선 활성 측정용 키트로서, 상기 공여체 세포 및 수용체 세포는 커넥신(connexin, Cx) 단백질을 발현하는 자궁경부암 세포 또는 폐암 세포인 것인, 세포 간 갭정선 활성 측정용 키트에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 상기 요오드화물 수송체는 SLC26A4 단백질이고, 요오드화물 센서 형광 단백질은 YFP의 H148Q/I152L 치환 변이 단백질인 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 요오드화물(iodide) 수송체를 발현하는 공여체 세포 및 요오드화물 센서 형광 단백질을 발현하는 수용체 세포를 제조하는 단계로서, 상기 공여체 세포 및 수용체 세포는 커넥신(connexin, Cx) 단백질을 발현하는 자궁경부암 세포 또는 폐암 세포인 것인 단계; b) 상기 단계 a)에서 제조한 공여체 세포 및 수용체 세포를 혼합하여 공동 배양하는 단계; c) 상기 단계 b)에서 공동배양한 배양액을 제거하고 요오드화물을 포함하지 않는 완충용액을 배양 플레이트에 첨가하는 단계; d) 상기 단계 c)에서 첨가한 배양 플레이트에 요오드화물을 포함하는 완충용액을 첨가하는 단계; e) 상기 단계 d)의 첨가 시점으로부터 배양 플레이트의 형광 강도를 측정하는 단계; f) 상기 단계 e)에서 측정한 형광 강도의 감소를 요오드화물 센서 형광 단백질의 소광(quenching) 비율로서 계산하는 단계; 및 g) 상기 단계 f)에서 계산한 소광 비율을 미처리 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 갭정선 활성 조절제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0028] 구체적으로, 상기 단계 g)에서 비교한 결과, 소광 비율이 증가하면 피검물질을 갭정선 활성 유도물질로 판단하고, 소광 비율이 감소되면 피검물질을 갭정선 활성 억제물질로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명 일 실시예에서는 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포 및 폐암 세포주인 A549 세포에서 커넥신 단백질의 발현을 억제한 후 갭정선 활성 변화를 측정하였다. 구체적으로 HeLa 세포에서 갭정선 활성은 Cx45 발현에 크게 영향을 받음을 확인하여(도 4), 자궁경부암 치료에 있어 Cx45 발현을 조절하는 갭정선 활성과 관련된 치료제의 적용으로도 이어질 수 있음을 확인하였다.
- [0030] 또한, A549 세포에서 갭정선 활성은 Cx43 발현에 크게 영향을 받음을 확인하여(도 8), 폐암 치료에 있어 Cx43 발현을 조절하는 갭정선 활성과 관련된 치료제의 적용으로도 이어질 수 있음을 확인하였다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 일 측면은 커넥신 45 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 자궁경부암에서의 갭정선 활성 예측을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명에서, 상기 mRNA의 발현수준은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection assay; RPA), 마이크로어레이(microarray) 및 노던 블롯팅(northern blotting)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 상기 방법에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 또한, 본 발명에서 상기 단백질 발현수준은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 방사선면역분석법(radioimmunoassay; RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 유세포분석법(flow cytometry), 면역형광염색법(immunofluorescence), 오우크테로니(ouchterlony), 보체 고정 분석법(complement fixation assay), 및 단백질 칩(protein chip)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 통해 측정될 수 있으나, 상기 방법에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명 일 실시예에서는 자궁경부암 세포에서 다른 커넥신의 발현이 억제되는 경우와 달리 커넥신 45 유전자의 녹아웃을 통해 커넥신 45의 발현이 억제되는 경우 갭정선 활성의 대부분이 제거됨을 확인하였는 바(도 4), 커넥

신 45 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 자궁경부암에서의 껍질선 활성을 예측함에 있어 정보를 제공할 수 있다.

[0035] 본 발명의 또 다른 일 측면은 커넥신 43 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 폐암에서의 껍질선 활성 예측을 위한 정보제공 방법에 관한 것이다.

[0036] 본 발명 일 실시예에서는 폐암 세포에서 다른 커넥신의 발현이 억제되는 경우와 달리 커넥신 43 유전자의 녹아웃을 통해 커넥신 43의 발현이 억제되는 경우 껍질선 활성의 대부분이 제거됨을 확인하였는 바(도 8), 커넥신 43 유전자의 mRNA 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 폐암에서의 껍질선 활성을 예측함에 있어 정보를 제공할 수 있다.

[0037] 본 발명의 또 다른 일 측면은 서열번호 19 및 서열번호 20의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트 또는 서열번호 21 및 서열번호 22의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 어닐링(annealing) 후 BsmBI 효소로 반응시키는 단계를 포함하는, 커넥신 45 유전자에 대한 가이드 RNA를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0038] 본 발명에서, '가이드 RNA (guide RNA, gRNA)'란 RNA(ribonucleic acid)의 한 종류로, 인간이나 동식물의 특정 유전자를 교정하는 유전자 교정(genome editing)에서 교정하려는 DNA를 인식하여 찾아내는 RNA를 의미한다. 유전자 교정 기술로는 유전자가위(engineered nuclease)가 있으며, 유전자 가위의 종류로 CRISPR-Cas9를 이용할 수 있다. 상기 "CRISPR-Cas9"는 미생물의 면역체계로 알려진 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템을 이용해 원하는 유전자 염기서열을 절단하도록 고안된 것으로 고정적 구성요소로서 Cas9 단백질을 포함하고, 가변적 구성요소로서 타겟 유전자에 특이적인 가이드 RNA를 포함한다. 가이드 RNA가 타겟 유전자를 인식하면 가이드 RNA에 Cas9 단백질이 결합하여 뉴클레아제로 작용하여 타겟 유전자의 하류 약 3 bp에 위치한 두 개의 구아닌 염기(GG)를 인식하여 절단함으로써 DNA 이중가닥 손상(DNA double strand break, DSB)을 유발한다. 상기 CRISPR-Cas9 시스템에는 tracr RNA를 더 포함할 수 있으며, 상기 tracr RNA는 gRNA와 복합체를 형성하여 Cas9이 인식할 수 있는 구조를 형성하는 역할을 할 수 있다.

[0039] 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 커넥신 45 유전자를 표적으로 하며, 커넥신 45 유전자는 인간 및 동물의 공지된 서열이라면 어느 것이나 포함될 수 있다.

[0040] 본 발명의 또 다른 일 측면은 서열번호 15 및 서열번호 16의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트 또는 서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 어닐링(annealing) 후 BsmBI 효소로 반응시키는 단계를 포함하는, 커넥신 31.1 유전자에 대한 가이드 RNA를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 커넥신 31.1 유전자를 표적으로 하며, 커넥신 31.1 유전자는 인간 및 동물의 공지된 서열이라면 어느 것이나 포함될 수 있다.

[0041] 본 발명의 또 다른 일 측면은 서열번호 23 및 서열번호 24의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트 또는 서열번호 25 및 서열번호 26의 염기서열로 이루어지는 프라이머 세트를 어닐링(annealing) 후 BsmBI 효소로 반응시키는 단계를 포함하는, 커넥신 26 유전자에 대한 가이드 RNA를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 커넥신 26 유전자를 표적으로 하며, 커넥신 26 유전자는 인간 및 동물의 공지된 서열이라면 어느 것이나 포함될 수 있다.

[0042] 본 발명 일 실시예에서는 커넥신 45, 커넥신 31.1 및 커넥신 26에 대한 가이드 RNA를 제작하였으며, T7E1 분석을 통해 제작된 가이드 RNA들이 모두 효과적임을 확인하였다(도 3).

[0043] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 상기 방법에 따라 가이드 RNA를 제조하는 단계; b) 상기 단계 a)에서 제조된 가이드 RNA를 벡터에 삽입하여 가이드 RNA 벡터를 제조하는 단계; 및 c) 상기 단계 b)에서 제조된 가이드 RNA 벡터를 세포에 형질주입시켜 커넥신 45 유전자의 표적 서열에 DNA 결실(deletion)을 유발하는 단계를 포함하는, 커넥신 45 유전자 녹아웃(knock out) 세포주를 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 커넥신 45 유전자 녹아웃 세포주는 자궁경부암 세포주 또는 폐암 세포주일 수 있다.

[0044] 본 발명에서, 상기 '벡터'는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 말하며, 에 삽입하여 가이드 RNA 벡터를 제조하였으며, 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 또한, 형질주입된 세포를 비형질주입 세포로부터 구별할 수 있는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 선택성 마커로는 글리포세이트(glyphosate), 글루포시네이트암모늄(glufosinate ammonium) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 퓨로마이신(puromycin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 블라스티시딘(Blasticidine)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 제한되는 것은

아니다.

- [0045] 본 발명에서, '형질주입'이란, 동물세포에 DNA를 직접 도입하여 세포의 유전형질을 변이시키는 방법을 의미하며, 이는 당해 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어, 칼슘 인산염 형질주입법(calcium phosphate transfection), 리포펙션법(lipofection), 전기천공(electroporation), 미량주사법(microinjection), 마이크로프로젝틸법(microprojectile)법을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 진핵생물의 경우 DNA인산칼슘침전법 또는 리포펙션, PEI 등의 상용화된 시약과 DNA를 혼합하여 세포를 처리하는 방법을 이용할 수 있으며, 유전자 도입한 리포터 유전자의 발현을 측정하여 발현 세포의 동정 등을 할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서, 'DNA 결실(deletion)'이란 유전자 염기서열의 일부 또는 전부가 제거된 것을 의미하며, 가이드 RNA가 인식하는 표적 서열 부위가 CRISPR-Cas9 시스템에 의해 제거된 것일 수 있다.
- [0047] 본 발명에서, '넉아웃(knock out, KO)'이란, 유전자가 작동하지 않게 하는 것을 의미하며 '커넥신 45 유전자 넉아웃'은 커넥신 45 유전자의 발현을 억제하는 것을 말한다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 상기 방법에 따라 가이드 RNA를 제조하는 단계; b) 상기 단계 a)에서 제조된 가이드 RNA를 벡터에 삽입하여 가이드 RNA 벡터를 제조하는 단계; 및 c) 상기 단계 b)에서 제조된 가이드 RNA 벡터를 세포에 형질주입시켜 커넥신 31.1 유전자의 표적 서열에 DNA 결실(deletion)을 유발하는 단계를 포함하는, 커넥신 31.1 유전자 넉아웃(knock out) 세포주를 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 커넥신 31.1 유전자 넉아웃 세포주는 자궁경부암 세포주 또는 폐암 세포주일 수 있다.
- [0049] 상기 '커넥신 31.1 유전자 넉아웃'은 커넥신 31.1 유전자의 발현을 억제하는 것을 말하며, 상기 '커넥신 31.1 유전자 넉아웃 세포주'는 커넥신 31.1 유전자의 발현이 억제되거나 현저히 감소한 세포주를 의미한다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 상기 방법에 따라 가이드 RNA를 제조하는 단계; b) 상기 단계 a)에서 제조된 가이드 RNA를 벡터에 삽입하여 가이드 RNA 벡터를 제조하는 단계; 및 c) 상기 단계 b)에서 제조된 가이드 RNA 벡터를 세포에 형질주입시켜 커넥신 26 유전자의 표적 서열에 DNA 결실(deletion)을 유발하는 단계를 포함하는, 커넥신 26 유전자 넉아웃(knock out) 세포주를 제조하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 커넥신 26 유전자 넉아웃 세포주는 폐암 세포주일 수 있다.
- [0051] 상기 '커넥신 26 유전자 넉아웃'은 커넥신 26 유전자의 발현을 억제하는 것을 말하며, 상기 '커넥신 26 유전자 넉아웃 세포주'는 커넥신 26 유전자의 발현이 억제되거나 현저히 감소한 세포주를 의미한다.
- [0052] 본 발명 일 실시예에서는 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포 및 폐암 세포주인 A549 세포 모두에서 '커넥신 45 유전자 넉아웃 세포주' 및 '커넥신 31.1 유전자 넉아웃 세포주'를 제조하였다. 또한, 폐암 세포주인 A549 세포에서는 추가로 '커넥신 26 유전자 넉아웃 세포주'를 제조하였다.
- [0053] 상기 각 커넥신 단백질이 넉아웃 된 세포주를 이용하여 갭정선의 활성을 측정하였으며, 발현이 억제된 단백질의 종류에 따라 갭정선의 활성이 다르게 나타남을 확인하였다. 구체적으로, HeLa 세포에서는 커넥신 45의 발현이 억제되었을 때 갭정선의 활성 대부분이 소실되는 것을 확인하였으며, A549 세포에서는 커넥신 43의 발현이 억제되었을 때 갭정선의 활성 대부분이 소실되는 것을 확인하였다(도 4 및 도 8).
- [0054] 이는 질환에 따라 갭정선의 활성 및 상기 갭정선의 활성에 관여하는 커넥신 단백질이 달리 나타날 수 있으며, 이를 연구하기 위하여 본 발명의 커넥신 단백질 넉아웃 세포주를 활용할 수 있음을 나타내는 것이다.

발명의 효과

- [0055] 본 발명의 세포 간 갭정선 활성 측정 방법은 자궁경부암 세포주 또는 폐암 세포주에서의 커넥신 단백질의 발현 수준 등 여러 요인에 따른 갭정선의 활성 변화를 민감하고 신속하게 측정할 수 있다. 나아가, 본 발명의 세포 간 갭정선 활성 측정 방법을 이용하여 갭정선 활성 조절제를 이용한 자궁경부암 또는 폐암에서의 약물 스크리닝에 유용하게 사용함으로써 새로운 치료제의 개발에 활용될 수 있다.
- [0056] 또한, 본 발명의 가이드 RNA를 이용하여 갭정선의 활성에 관여하는 커넥신 단백질의 유전자를 넉아웃 시킬 수 있으며, 커넥신 단백질의 유전자가 넉아웃된 세포주를 갭정선 활성과 관련된 질환의 치료를 위한 연구에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 HeLa 세포에서의 갭정선(Gap junction)을 형성하는 단백질의 mRNA 수준에서의 발현을 확인한 결과를 나

타낸 것이다.

도 2는 I^{-} -YFP^{OL}-Cx-GJIC 분석을 통해 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에서의 갭정선 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 T7E1 분석을 통해 hCx26, hCx45 및 hCx31.1에 대한 sgRNA 효율을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 Cx-Tyro(대조군), Cx45 녹아웃(knock out), Cx31.1 녹아웃, Cx43 녹아웃 HeLa 세포의 I^{-} -YFP^{OL} GJIC 분석을 통해 갭정선 활성을 측정된 결과를 나타낸 것이다(A: 대조군, B: Cx45 녹아웃, C: Cx31.1 녹아웃, D: Cx43 녹아웃).

도 5는 웨스턴블롯(Western Blot)을 통해 HeLa-Cx45 K/O세포에서 Cx45 단백질이 발현되지 않는 것을 확인한 결과를 나타낸 것이다

도 6은 A549 세포에서의 갭정선(Gap junction)을 형성하는 단백질의 mRNA 수준에서의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 I^{-} -YFP^{OL}-Cx-GJIC 분석을 통해 폐암 세포인 A549 세포에서의 갭정선 활성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 Cx-Tyro(대조군), Cx26 녹아웃, Cx31.1 녹아웃, Cx43 녹아웃 및 Cx45 녹아웃 A549 세포의 I^{-} -YFP^{OL} GJIC 분석을 통해 갭정선 활성을 측정된 결과를 나타낸 것이다(A: 대조군, B: Cx26 녹아웃, C: Cx31.1 녹아웃, D: Cx43 녹아웃, E: Cx45 녹아웃).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0059] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0060] 실시예 1. HeLa 세포에서의 갭정선(Gap junction)을 형성하는 mRNA 수준에서의 단백질의 발현 확인

[0061] 1-1. 전체 RNA 분리

[0062] HaCat, PC-3, RT4, HEK293, 및 HeLa 세포를 각각 6 웰(well) 플레이트(plate)에서 24 시간 동안 배양하였다. 이후 전체 RNA 분리를 위하여 각 세포는 1X DPBS 500 μ l로 한 번 씻어내었으며, RNeasy mini kit(cat. Nos. 74104 and 74106, Qiagen)를 이용하여 전체 RNA를 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 구체적으로, 상기 키트에 포함된 버퍼 중 RLT를 1 웰 당 350 μ l씩 넣어주고, 파이프 팁으로 돌돌 말아 에피튜브로 옮긴 후, 350 μ l의 70% 에탄올을 넣고 파이프 팁으로 섞어 주었다. 이후 스핀컬럼(Spin column)에 옮기고 10,000 rpm에서 30초 동안 원심 분리한 후 상등액을 제거하고, 키트의 RW1 버퍼 700 μ l을 넣고 같은 조건으로 원심분리하였다. 다시 상등액을 제거한 후, RPE 버퍼 500 μ l을 넣고 같은 조건으로 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후, 남은 용액 제거를 위해 같은 조건으로 다시 원심분리하였다. 이후 새 튜브를 준비하고, 컬럼을 옮긴 후, RNase free water 50 μ l를 컬럼 중앙에 넣고 같은 조건으로 원심분리하여 분리된 RNA를 수득하였다. 이후 튜브에 레이블을 한 후, Nano drop 기계를 이용하여 분리된 RNA의 농도를 측정하였다.

[0063] 1-2. cDNA 합성

[0064] 얼음을 준비하고 PrimeScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit (cat 6110A, TaKaRa)를 이용하여 분리된 분리된 전체 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 구체적으로, 각 RNA를 500 ng/5 μ l이 되도록 희석하고, 각 RNA를 Random Hexamer 1 μ l, 10 mM dNTP mix 1 μ l, RNase free water 3 μ l와 혼합하였다. 65 $^{\circ}$ C PCR 기계에서 5 분 반응시키고 바로 얼음에 넣어 주었으며, 이후 PCR 기계를 30 $^{\circ}$ C에서 10 분 어닐링(annealing), 42 $^{\circ}$ C에서 1 시간 연장(extension), 95 $^{\circ}$ C에서 5 분, 4 $^{\circ}$ C pause가 되도록 하여 수행하였다. 각 반응 샘플 10 μ l에 5X primer Script buffer 4 μ l, RNase inhibitor (40 UI/ μ l) 0.5 μ l, RTase (200 UI/ μ l) 1 μ l, RNase free water 4.5 μ l를 넣어 총 20 μ l가 되도록 혼합하였다.

[0065] 1-3. RT-PCR

[0066] 70 °C Pause, 95 °C 2 분 이후, 95 °C 20초, 60 °C 20초, 72 °C 30초의 조건으로 34 회 사이클(cycle) 반복 후, 72 °C 3분, 4 °C pause 조건으로 수행하였다. 각 샘플은 RT-PCR 용 샘플로 준비하였으며, 각 샘플의 cDNA를 1 ug/1 ml이 되도록 희석하고, 10 X Diasta taq buffer 5 ul, 10 mM dNTP mix 1 ul, 각 Cx-type에 따른 U1 primer 0.2 ul, 각 Cx-type에 따른 L1 primer 0.2 ul, Diasta-taq polymerase 0.5 ul, 및 증류수를 42.1 ul를 넣어 총 50 ul가 되도록 하여 혼합하였다. 프라이머의 경우, 인트론과 엑손에 걸쳐 프라이머를 제작할 필요가 있어 기존 보고된 논문의 프라이머를 그대로 사용하지 않고 새로 제작하였다. 이 때, 프라이머 쌍은 하기 표 1에 기재된 바와 같다. 상기 반응이 끝난 샘플들은 순서대로 2 % 아가로즈 겔(agarose gel)에 전기영동하여 밴드를 확인하였다(도 1).

표 1

서열번호	RT-PCR 프라이머	서열
1	hCx26 U1	TTCCTCCCGACGCAGAGCAAAC
2	hCx26 L1	AGCCTTCGATGCGGACCTTCTG
3	hCx30.3 U1	ACAGACAAGCCCAAGGACAAGGAAG
4	hCx30.3 L1	CTTCTGCTCATCGTCCACACCTC
5	hCx31.1 U1	GCTGCTTGCTGAGTCTTATGTC
6	hCx31.1 L1	TCCACGCTCGCCTTGAACACTAG
7	hCx43 U1	AGGCGTGAGGAAAGTACCAAACAG
8	hCx43 L1	CGCATCACATAGAACACATGAGCCAG
9	hCx45 U1	AGGAGAGGCGAGGGTGAAGG
10	hCx45 L1	TCCGAGCTGCCTTCTTGTCTGC

[0068] The human protein ATLAS 사이트를(<http://www.proteinatlas.org>) 이용하여 양성 대조군을 선정하였으며 (Ponten, F., Jirstrom, K. & Uhlen, K. The human protein Atlas—a tool for pathology. *J pathol* **4**, 387–93, doi:10.1002/path.2440 (2008)), 구체적으로 Cx26은 Hacat 세포, Cx30.3은 RT4세포, Cx43은 PC-3세포, Cx45는 HEK293 세포, Cx31.1은 HaCat 세포를 양성 대조군으로 하였다. 이들과 HeLa cDNA에서의 Cx26, Cx30.3, Cx45, Cx43, 및 Cx31.1의 mRNA 발현 유무를 측정한 것으로서 도 1에 나타난 바와 같이 HeLa 세포에서 Cx26과 Cx30.3은 mRNA가 발현되지 않았으나, Cx43, Cx45 및 Cx31.1은 발현됨을 확인하였다.

[0069] 실시예 2. HeLa 세포에서의 갭정션 활성 확인

[0070] HeLa 세포에 SLC26A4 또는 YFP^{OL}을 발현하는 세포를 제작하여 이들 I⁻-YFP^{OL}-Cx-GJIC 분석을 수행하였다. 상기 SLC26A4 또는 YFP^{OL}을 발현하는 세포의 제작 및 I⁻-YFP^{OL}-Cx-GJIC 분석은 본 발명자의 등록특허 제10-181885호의 방법을 이용하여 YFP^{OL}의 소광 정도를 측정하였다.

[0071] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 자궁경부암 세포인 HeLa 세포에서 대조군인 HeLa(cont)/YFP에 비하여 SLC26A4를 발현하도록 한 HeLa- SLC26A4/YFP에서 시간에 따른 YFP^{OL}의 소광 비율이 증가하였으며, 160 초에서 11.62%의 형광 레벨이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 HeLa 세포에서도 갭정션이 형성되어 활성이 나타남을 시사하는 것이다.

[0072] 실시예 3. sgRNA 가이드 RNA 제작 및 확인

[0073] 3-1. sgRNA 가이드 RNA 제작

[0074] “<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>” 온라인 툴(tool)을 이용하여 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)들을 제작하였다. 커넥신(connexin, Cx) 43에 대한 gRNA는 「Choi, E. J., Yeo, J. H, Yoon, S. M. & Lee, J. Gambogic acid and its analogs inhibit gap junctional intercellular communication. *Front Pharmacol* **9**, 814, doi:10.3389/fphar.2018.00814 (2018)」에서 선별된 것을 사용하였다.

[0075] Cx45와 Cx31.1에 대해서는 각 2 개의 후보군을 선별하여 올리고뉴클레오타이드들을 합성하고(COSMOGENETECH, Seoul, Korea), 어닐링 후에 BsmBI 효소로 반응시킨 후 LentiCRISPRv2 플라스미드 벡터(Addgene #52961)에 삽입하였다. 구체적인 sgRNA 프라이머 서열은 아래 표 2에 나타난 바와 같다.

[0076] 이후 DH5 α 컴피턴트 세포(competent cell)로 서브클로닝하여 hCx-Tyro-sgRNA1, hCx43-sgRNA1, hCx45-sgRNA1, hCx45-sgRNA2, hCx31.1-sgRNA1, hCx31.1-sgRNA2, hCx26-sgRNA1 및 hCx26-sgRNA2 가이드 RNA를 수득하였다. hCx-Tyro-sgRNA1는 다른 커넥신이 도입된 가이드 RNA 대비 대조군으로 활용되었다.

표 2

서열번호	sgRNA 프라이머	서열
11	hCx-Tyro-sgRNA1 s	CACCGAGTAATGCATCCATACAAAG
12	hCx-Tyro-sgRNA1 as	AAACCTTTGTATGGATGCATTACTC
13	hCx43-sgRNA1 s	CACCGAATCCTGTGCTGGGGACA
14	hCx43-sgRNA1 as	AAACCTGTCCCCAGCAGCAGGATT
15	hCx31.1-sgRNA1 s	CACCGAATCATCAAAGCAGACGT
16	hCx31.1-sgRNA1 as	AAACACGTCTGCTTTGATGAGTTC
17	hCx31.1-sgRNA2 s	CACCGGGCGCCTCTACCTGAACCC
18	hCx31.1-sgRNA2 as	AAACGGGTTTCAGGTAGAGGCGCCC
19	hCx45-sgRNA1 s	CACCGCTAAGCATGATGGCCGACGA
20	hCx45-sgRNA1 as	AAACTCGTCGGCCATCATGCTTAGC
21	hCx45-sgRNA2 s	CACCGATAGCCAGGTACATCACAG
22	hCx45-sgRNA2 as	AAACCTGTGATGTACCTGGGCTATC
23	hCx26-sgRNA1 s	CACCGCCTCCTTTGCAGCCACAACG
24	hCx26-sgRNA1 as	AAACCGTTGTGGCTGCAAAGGAGGC
25	hCx26-sgRNA2 s	CACCGTCCACGCCAGCGCTCCTAG
26	hCx26-sgRNA2 as	AAACCTAGGAGCGCTGGCGTGGAC

[0078] 3-2. T7E1 assay

[0079] HeLa 세포를 6 웰 플레이트에 도말하여 24 시간 배양한 후 각 hCx-type-sgRNAs를 HeLa 세포에 일시적 형질감염(transient transfection)을 하였다. 48 시간 후 Tissue DNA Purification Kit (LaboPass™ Tissue Mini; COSMOGENETECH, seoul, Korea)를 이용해 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출하였다. 뉴클레오 타겟 사이트가 있는 DNA 지역을 PCR을 수행하여 증폭시켰으며, 증폭된 샘플들에 열을 가해서 이중 나선 결합을 풀어준 후에, T7E1(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)을 처리 후, 30 분간 37 °C에서 반응시켰다. T7E1 분석에 사용된 프라이머 서열은 아래 표 3에 나타난 바와 같다. 반응이 끝난 샘플들을 3% 아가로스 젤에서 전기영동 하였으며, Indels를 확인하였다.

표 3

서열번호	T7E1 프라이머	서열
27	hCx45 U2	TTGGAGCTTCCTGACTCGC
28	hCx45 L2	TCGAATGGTCCCAAACCC
29	hCx31.1 U2	TTTGAGGGACTCCTGAGTGGG
30	hCx31.1 L2	TTTCCTTGCTGCCAGGCAC
31	hCx26 U2	TGCTTACCAGACTCAGAGAAG
32	hCx26 L2	ATGACATAGAAGACGTACATGAAG

[0081] 상기와 같이 발현이 확인된 hCx45, hCx43, hCx31.1 및 hCx26에 대한 가이드 RNA를 제작한 후, T7E1 분석을 통해 자체 제작한 hCx26, hCx45 및 hCx31.1에 대한 sgRNA 효율을 확인하였다. 그 결과, 제작된 hCx26-sgRNA1, hCx26-sgRNA2, hCx45-sgRNA1, hCx45-sgRNA2, hCx31.1-sgRNA1 및 hCx31.1-sgRNA2 모두 효과적임을 확인하였다(도 3).

[0082] 본 T7E1 분석을 통해 효과가 확인된 가이드 RNA를 이하 HeLa 세포 및 A549 세포에 공통적으로 적용하여 넉아웃 세포주의 제작 및 겐정선 활성 측정 실험이 진행되도록 하였다.

[0083] 실시예 4. Lentivirus 제작

[0084] HEK293T 세포를 Poly-L-Lysin으로 코팅한 6 웰 플레이트에서 60 내지 70 % 되도록 키운 후, 배지를 항생제 없는 배지로 교환하고, 폴리에틸렌아민 (Polyethylenamine, PEI; cat. 23966-1, Polyscience, Inc)을 이용한 형질감염(transfection)을 실시하였다. 상기 실시예 2에서 제작한 컨스트럭트인 hCx-Tyro-sgRNA1, hCx45-sgRNA1,

hCx45-gRNA2, hCx31.1-gRNA1 및 hCx31.1-gRNA2를 각각 psPAX2, pMD2.G를 섞어서 총 DNA 2-3ug이 HEK293T 세포에 형질감염 되도록 하였다. 다음날 항생제가 포함된 배지로 교환 후, 이틀에 걸쳐 바이러스가 생성된 배지를 수집하고 소분하여 -80 °C에 보관하였다.

[0085] 또한, 동일 종류의 세포에 pLVX-CIH-SLC26A4와 psPAX2, pMD2.G를 섞은 DNA 2 내지 3 ug을 형질감염 시킨 후 동일한 방법으로 바이러스를 생성하여 상기와 동일한 방법으로 보관하였다.

[0086] 또한, 동일 종류의 세포에 pLVX-CIB1a-YFP^{OL}과 psPAX2, pMD2.G를 4:3:1의 비율로 섞은 DNA 2 내지 3 ug을 형질감염 시킨 후 동일한 방법으로 바이러스를 생성하여 상기와 동일한 방법으로 보관하였다.

[0087] **실시예 5. HeLa 세포에서의 I⁻-YFP^{OL} Cx-GJIC 분석**

[0088] **5-1. HeLa 세포에서의 Cx-Tyro, Cx45 녹아웃(knock out), Cx31.1 녹아웃, Cx43 녹아웃 세포 제작**

[0089] 상기 실시예 2에서 제작한 hCx-Tyro-sgRNA1, hCx45-sgRNA1, hCx45-sgRNA2, hCx31.1-sgRNA1 및 hCx31.1-sgRNA2를 HeLa 세포에 처리하고, 각 웰(well)의 배지를 1 ml 배지와 1 ml virus 배지를 섞은 것으로 교체하였다. O/N(overnight) 후 다시 정상 배지로 교환하고 48 시간 배양 후, 푸로마이신(puromycin) 2 ug/ml이 혼합된 배지로 교환하여 3 일 동안 배양하면서 선별하였다. 선별 후, 정상 배지로 교체하고 HeLa-Cx-tyro, HeLa-Cx45 K/O, HeLa-Cx31.1 K/O 및 HeLa-Cx45 K/O 세포를 수득하였다.

[0090] **5-2. HeLa- I⁻-YFP^{OL} -Cx-type-GJIC assay 제작**

[0091] 상기 4-1에서 제작된 HeLa-Cx-tyro(대조군으로 활용), HeLa-Cx45 K/O, HeLa-Cx31.1 K/O 및 HeLa-Cx45 K/O 세포를 6 웰 플레이트에 50 내지 60 % 키운 후, 각 세포마다 Lentivirus-SLC26A4와 Lentivirus-YFP^{OL}를 한 종류씩 감염시키고 O/N 후에 정상 배지로 교환하였다. 48 시간 후, 각각의 배지를 하이그로마이신(Hygromycin) 500 ug/ml 또는 블라스티시딘(Blasticidine) 5 ug/ml이 혼합된 배지로 교환하여 3 일 동안 배양하면서 선별하였다. 선별 후, 정상 배지로 교체하였다. 6 웰 플레이트에 세포가 100% 차고 난 후, 트립신 처리(Trypsinization)하여 15 ml 튜브(tube)에 각각 종류별로 모았다. 각 세포를 카운팅(counting) 하고, SLC26A4: YFP^{OL} 비율이 4: 1이 되도록 혼합하였다. 총 10,000 cell/100 ul이 되도록 섞은 후, 96 웰에 100 ul씩 도말하였다.

[0092] 이에 대한 대조군으로 SLC26A4가 형질감염 되지 않은 세포 : YFP^{OL} 비율이 4 : 1이 되도록 섞은 샘플군도 준비하였다.

[0093] **5-3. I⁻-YFP^{OL} GJIC 분석**

[0094] 96 웰 플레이트에 상기 4-2에서 제작된 I⁻-YFP^{OL} GJIC 분석을 위한 각 세포를 도말한 후, 24 시간이 지난 후, 배지를 100 ul C-solution으로 교체하였다. 그리고 마이크로플레이트 리더(microplate reader)에서 I-solution을 넣어주며 10 초 동안 형광 값의 변화를 측정하였다. 1 초가 되는 시점에서 I-solution을 넣어 준 후, 형광 값의 변화를 측정하였으며 대조군(YFP 세포 + control 세포; SLC26A4를 감염시키지 않은 세포)과 비교하여, YFP 세포 + SLC26A4 세포(SLC26A4를 감염시킨 세포) 실험군에서 형광 값이 더 감소되는 정도를 측정하였다. 상기 실험군에서의 형광 값이 감소되는 정도가 갭정선 활성을 의미한다.

[0095] 상기 방법으로 대조군, Cx45 녹아웃(knock out), Cx31.1 녹아웃, Cx43 녹아웃 HeLa 세포에서의 I⁻-YFP^{OL} GJIC 분석을 통해 갭정선 활성을 측정한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 HeLa-Cx-Tyro 대조군의 경우, 160 초에서 10.26%의 갭정선 활성을 나타낸 반면(도 4(A)), HeLa-Cx45 K/O에서의 갭정선 활성은 2.7%로 나타났다(도 4(B)). 즉, HeLa-Cx45 K/O에서의 형광 감소는 유의미한 차이가 나타나지 않았으며, 이는 HeLa-Cx45 K/O의 갭정선 활성이 거의 없음을 의미하는 것이다.

[0096] 다른 타입인 HeLa-Cx43 K/O는 13.86%(도 4(C)), HeLa-Cx31.1 K/O는 13.63%의 갭정선 활성을 나타내어(도 4(D)), 대조군인 HeLa-Cx-Tyro에 비해 형광이 감소하지 않은 것을 나타내었으며, 이는 HeLa 세포에서 갭정선 활성은 Cx45 발현에 의한 것임을 나타내는 것이다. 이러한 결과는 자궁경부암 질환 치료에 있어 Cx45 발현을 조절하는 갭정선 활성화와 관련된 치료제의 적용으로도 이어질 수 있음을 시사하는 것이다.

[0097] **실시예 6. 웨스턴블롯(Western Blot)**

[0098] HeLa-Cx-Tyro 세포와 HeLa-Cx45 K/O세포를 6 웰 플레이트에 각각 도말하였으며, 대조군으로 A549 세포도 6 웰

플레이트에 도말하였다. 24 시간 후 세포들을 1X DPBS로 씻어내고, PBS-Triton X-100 lysis 버퍼를 넣고 10 분간 4 °C로 유지하여 세포들을 용해시켰다. 용해시킨 세포들을 각각 에피튜브에 담고, 13,000 rpm에서 10 분 동안 4 °C의 온도를 유지하면서 원심분리하여 용액을 분리하였다. 상층액을 새 튜브에 옮겨 담고, BCA 단백질 분석을 수행하여 총량의 단백질 농도를 측정하였다.

[0099] 총 단백질의 양이 20 ug이 되도록 샘플을 준비하고 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 수행하였다. 샘플이 로딩(loading)된 젤(gel)을 니트로셀룰로스 멤브레인(nitrocellulose membrane, GE healthcare life science, USA)으로 전이하고, PBS-T로 희석시킨 5% 탈지우유(skim-milk)로 1 시간 동안 반응시켰다. 이후 Mouse anti-human Cx45 항체 (MAB3100, Millipore)를 5% skim-milk에 1:1000이 되도록 희석하여 밤새도록 4 °C에서 결합시켰다. 이후 PBS-T solution으로 5 분씩 3 번 반복하여 씻어내고, HRP-conjugated 2차 항체(secondary antibodies)를 PBS-T solution에 1:5000으로 희석하여 1 시간 동안 결합시켰다. 이후 PBS-T solution으로 5 분씩 3 번 반복하여 씻어내고, ECL system (cat. NCI 4080KR, Thermo Fisher Scientific)을 이용해서 검출하였다. CCD 카메라(fusion solo, Germany)로 현상된 밴드를 확인하였다.

[0100] 도 5에 나타난 바와 같이, HeLa-Cx-Tyro 세포(도 5 내 HeLa V2로 표시) 및 A549 세포에서는 Cx45 단백질이 발현되나, HeLa-Cx45 K/O세포에서 Cx45 단백질의 발현이 나타나지 않음을 확인하였다.

[0101] **실시예 7. A549 세포에서의 갭정선(Gap junction)을 형성하는 단백질의 mRNA 수준에서의 발현 확인**

[0102] 상기 실시예 1에서 HeLa 세포에서의 갭정선을 형성하는 단백질의 발현 확인 방법과 동일한 방법으로 폐암 세포인 A549 세포에서의 갭정선을 형성하는 단백질의 발현을 mRNA 수준에서 확인하였다. Cx26은 PC-3 세포, Cx30.3은 RT4 세포, Cx40은 SK-BR-3 세포, Cx43은 HEK293 세포, Cx45는 HEK293 세포, Cx31.1은 HaCat 세포를 양성 대조군으로 하였다. 도 6에 나타난 바와 같이, A549 세포에서는 Cx26, Cx30.3, Cx40 및 Cx31.1은 양성 대조군에 비하여 mRNA의 발현 수준이 낮게 나타났으며, Cx43 및 Cx45는 양성 대조군인 HEK293의 발현 수준으로 mRNA의 발현이 나타남을 확인하였다.

[0103] **실시예 8. A549 세포에서의 갭정선 활성 확인**

[0104] 상기 실시예 2에서 HeLa 세포의 갭정선 활성을 확인 방법과 동일한 방법으로 폐암 세포인 A549 세포에서의 SLC26A4 또는 YFP^{OL}을 발현하는 세포를 제작하여 갭정선 활성 측정을 위한 I⁻-YFP^{OL}-Cx-GJIC 분석을 수행하였다. 실시예 2에서와 마찬가지로 상기 SLC26A4 또는 YFP^{OL}을 발현하는 세포의 제작 및 I⁻-YFP^{OL}-Cx-GJIC 분석은 본 발명자의 등록특허 제10-181885호의 방법을 이용하여 YFP^{OL}의 소광 정도를 측정하였다.

[0105] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 폐암 세포인 A549 세포에서 A549(cont)/YFP에 비하여 SLC26A4를 발현하도록 한 A549-SLC26A4/YFP에서 시간에 따른 YFP^{OL}의 소광 비율이 증가함을 확인하였다. 이는 A549 세포에서도 내인성 발현에 의한 갭정선 활성이 나타남을 시사하는 것이다.

[0106] **실시예 9. A549 세포에서의 I⁻-YFP^{OL}-Cx-GJIC 분석**

[0107] 상기 실시예 3-1에서 제작된 sgRNA를 이용하여 실시예 5에서와 동일한 방법으로 A549 세포에서도 녹아웃 세포를 제작하였다.

[0108] 이후 상기 실시예 5와 동일한 방법으로 A549 세포에서의 Cx-Tyro, Cx26 녹아웃, Cx31.1 녹아웃, Cx43 녹아웃 및 Cx45 녹아웃 세포를 제작하고, I⁻-YFP^{OL} GJIC 분석을 진행하였으며, 형광 값이 감소되는 정도가 갭정선 활성을 의미한다.

[0109] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 A549 세포에서는 Cx43을 녹아웃한 경우 갭정선 활성의 대부분이 제거됨을 확인하였으며, 이는 A549 세포에서 갭정선 활성은 Cx43 발현에 크게 영향을 받음을 나타내는 것이다. 이러한 결과는 폐암 치료에 있어 Cx43 발현을 조절하는 갭정선 활성화와 관련된 치료제의 적용으로도 이어질 수 있음을 시사하는 것이다.

[0110] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로

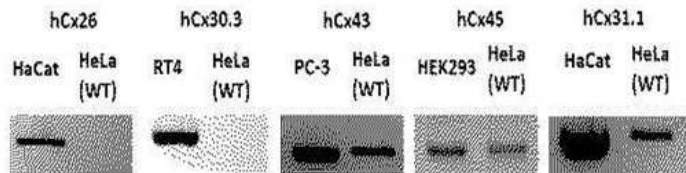
지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0111]

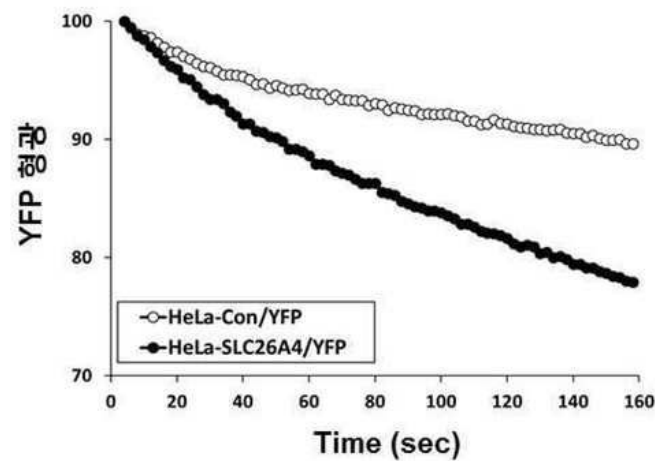
본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다. 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

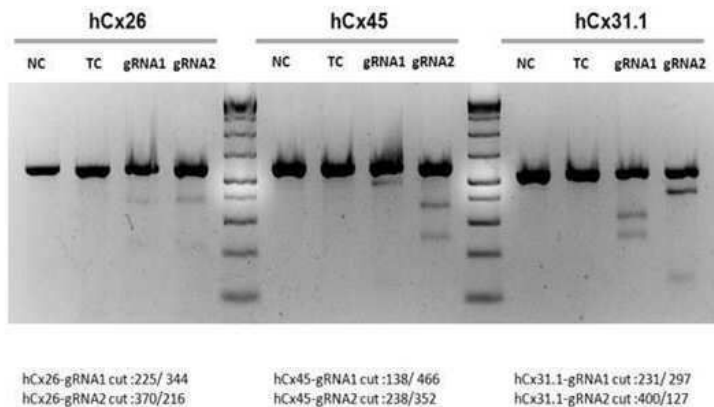
도면1



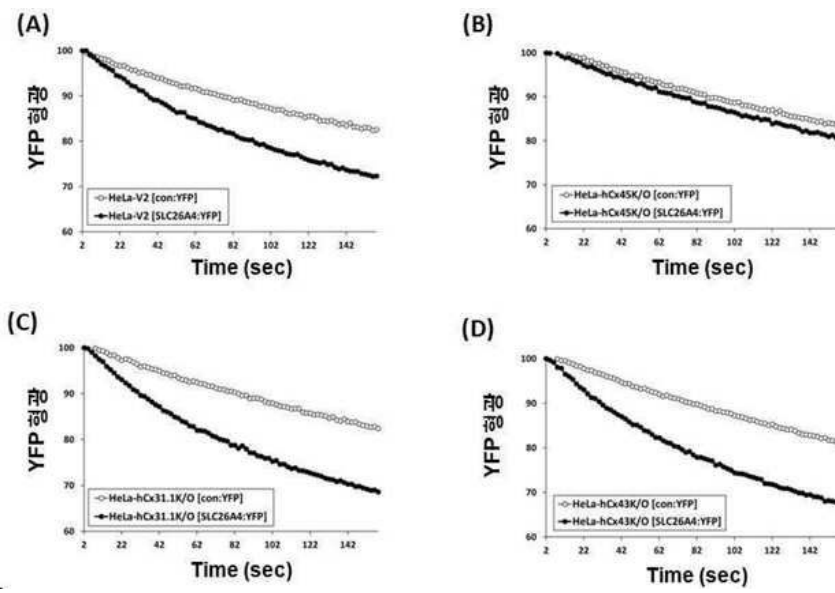
도면2



도면3



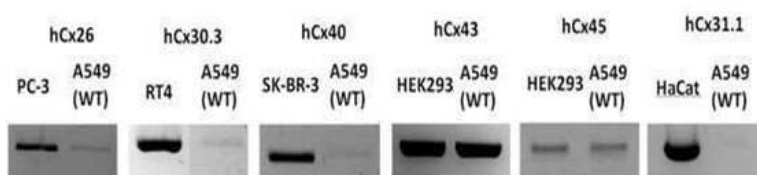
도면4



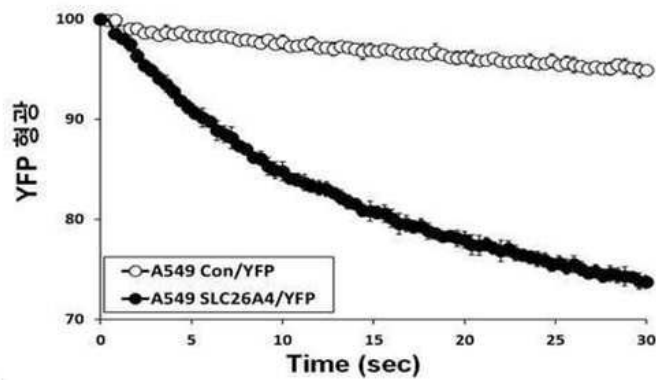
도면5



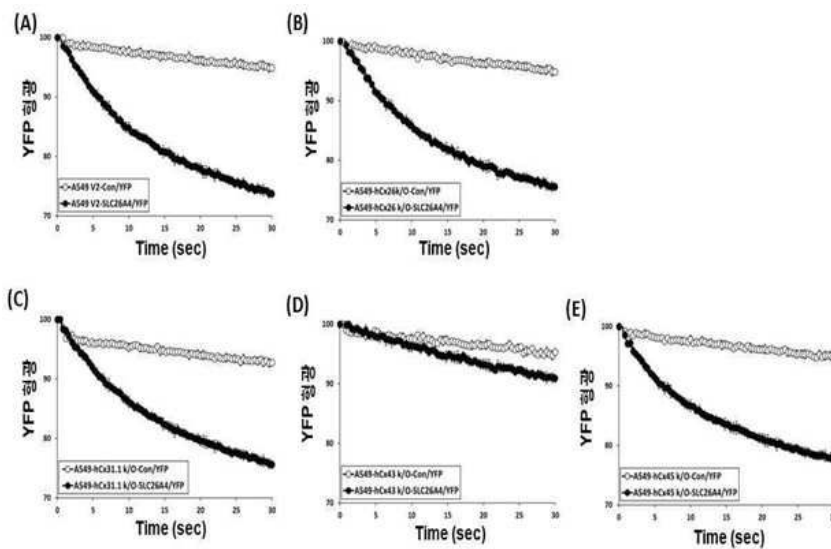
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> METHOD FOR ASSAYING ACTIVITY OF GAP JUNCTION BY CONNEXIN
EXPRESSION

<130> 20PP30574

<160> 32

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx26 U1

<400> 1

ttcctcccga cgcagagcaa ac

<210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCx26 L1
 <400>
 > 2
 agccttcgat gcggaccttc tg 22
 <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCx30.3 U1
 <400> 3
 acagacaagc ccaaggacaa ggaag 25
 <210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCx30.3 L1
 <400> 4
 cttctgctca tcgtcccaca cctc 24
 <210> 5
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCx31.1 U1
 <400> 5
 gctgcttgct gattcctatt gcc 23
 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCx31.1 L1

<400>	6	
tccacgctcg ccttgaacac tag		23
<210>	7	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCx43 U1	
<400>	7	
aggcgtgagg aaagtaccaa acag		24
<210>	8	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCx43 L1	
<400>	8	
cgcacacat agaacacatg agccag		26
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCx45 U1	
<400>	9	
aggagaggcg aggtgaagg		20
<210>	10	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCx45 L1	
<400>	10	
tccgagctgc cttcttgtct gc		22
<210>	11	
<211>	25	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx-Tyro-sgRNA1 s

<400> 11

caccgagtaa tgcattccata caaag 25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx-Tyro-sgRNA1 as

<400> 12

aaacctttgt atggatgcat tactc 25

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx43-sgRNA1 s

<400>

13

caccgaatcc tgctgctggg gaca 24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx43-sgRNA1 as

<400> 14

aaacctgtcc ccagcagcag gatt 24

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx31.1-sgRNA1 s

<400> 15

caccgaactc atcaaagcag acgt 24

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx31.1-sgRNA1 as

<400> 16

aaacacgtct gctttgatga gttc 24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx31.1-sgRNA2 s

<400> 17

caccgggcgc ctctacctga accc 24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx31.1-sgRNA2 as

<400> 18

aaacgggttc aggtagaggc gccc 24

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx45-sgRNA1 s

<400> 19

caccgctaag catgatggcc gacga 25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hCx45-sgRNA1 as

<400> 20

aaactcgtcg gccatcatgc ttagc	25
<210> 21	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hCx45-sgRNA2 s	
<400> 21	
caccgatagc ccaggtacat cacag	25
<210> 22	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hCx45-sgRNA2 as	
<400> 22	
aaacctgtga tgtacctggg ctatc	25
<210> 23	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hCx26-gRNA1 s	
<400> 23	
caccgcctcc tttgcagcca caacg	25
<210> 24	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hCx26-gRNA1 as	
<400> 24	
aaaccgttgt ggctgcaaag gaggc	25
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	hCx26-gRNA2 s	
<400>	25	
caccgtccac gccagcgctc ctag		24
<210>	26	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCx26-gRNA2 as	
<400>	26	
aaacctagga gcgctggcgt ggac		24
<210>	27	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCx45 U2	
<400>	27	
ttggagcttc ctgactcgc		19
<210>	28	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCx45 L2	
<400>	28	
tcgaatggtc ccaaacc		18
<210>	29	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	hCx31.1 U2	
<400>	29	
tttgaggac tcctgagtgg g		21
<210>	30	
<211>	19	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCx31.1 L2
 <400> 30
 ttctcttgct gccaggcac 19
 <210> 31
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCx26 U2
 <400> 31
 tgcttaccca gactcagaga ag 22
 <210> 32
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCx26 L2
 <400> 32
 atgacataga agacgtacat gaag 24