

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2020년 8월 13일 (13.08.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호  
WO 2020/162684 A2

- (51) 국제특허분류:  
C07K 14/47 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2020/001678
- (22) 국제출원일: 2020년 2월 6일 (06.02.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2019-0014304 2019년 2월 7일 (07.02.2019) KR
- (71) 출원인: 차의과학대학교 산학협력단 (CHA UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 11160 경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 백광현 (BAEK, Kwang-Hyun); 06291 서울시 강남구 삼성로 151, 11-1201, Seoul (KR). 최지혜 (CHOI, Ji-Hye); 14230 경기도 광명시 모세로 27, 824-205, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 오국진 (OH, Kook-Jin); 06595 서울시 서초구 법원로3길 24 두연빌딩 302호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

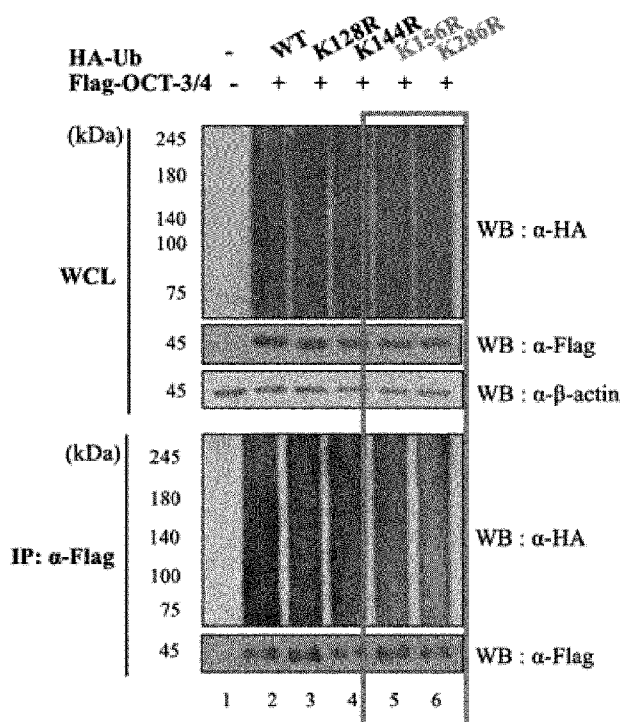
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NOVEL OCT-3/4 VARIANT

(54) 발명의 명칭: 신규의 OCT-3/4 변이체



(57) Abstract: The present invention provides an Oct-3/4 protein variant in which lysine at position 156, lysine at position 286, or lysine at positions 156 and 286 in an Oct-3/4 protein is substituted with arginine. The Oct-3/4 protein variant according to the present invention can suppress a protein degradation mechanism through ubiquitination, and exhibits high stability by exhibiting a high half-life compared to wild-type Oct-3/4.

(57) 요약서: 본 발명은 Oct-3/4 단백질에 있어서, 156번의 라이신; 286번의 라이신; 또는 156번 및 286번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 Oct-3/4 단백질 변이체를 제공한다. 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 유비퀴틴화를 통한 단백질 분해작업을 억제할 수 있으며, 야생형 Oct-3/4에 비해 높은 반감기를 나타냄으로써 높은 안정성을 나타낸다.



WO 2020/162684 A2

## 명세서

### 발명의 명칭: 신규의 OCT-3/4 변이체

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 Oct-3/4 단백질의 변이체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 본 발명은 Oct-3/4 단백질의 특정 부위의 라이신 잔기를 아르기닌으로 치환한 Oct-3/4 단백질의 변이체에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] Oct-3/4는 유전자 활동을 조절하는 단백질 전사인자의 하나로서 줄기세포가 몸체의 조직을 형성하는 능력을 유지하도록 한다. 또한, 줄기세포에 특이하게 작용하는 Oct-3/4 단백질은 일반적인 세포 분화나 혹은 세포가 더욱 특별하게 분화하도록 하는 어떤 유전자들의 마중물 역할을 한다. 2007년, Yamanaka 연구팀과 Thomson 연구팀은 역분화 인자인 Oct-3/4를 사용하여 역분화 줄기세포를 제작함으로써 Oct-3/4가 역분화 줄기세포를 유도하는 핵심인자인 것을 밝힌 바 있다(Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). *Cell*, 126(4), 663-676). (Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, II., & Thomson, J.A. (2007). *Science*, 318(5858), 1917-1920). 신체의 다양한 조직으로 분화시킬 수 있는 능력을 가진 역분화 줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)는 전 세계적으로 활발하게 연구하는 분야 중 하나이며, 향후 세포전환기술 개발에 중요한 부분을 차지할 것으로 평가되고 있다. 그러나 역분화 줄기세포를 제작, 유지하는 방법이 상당히 까다로우며, 전능성을 지속시키는 기술개발은 현재 많은 연구자들이 도전하고 있는 분야이다.
- [3] 세포 증식 및 분화에 관여하는 주요 단백질들이 유비퀴틴-프로테아좀 과정(ubiquitin-proteasome pathway; UPP)에 의해 조절된다는 연구들이 점차 알려짐으로써 단백질 분해기전 연구의 중요성이 점차 증가되고 있다. 세포내 대부분의 단백질의 경우, 유비퀴틴(ubiquitin)에 의해 표지되어 UPP를 통해 단백질의 항상성을 유지하게 되며, 이 기작의 이상은 암 등 여러 질병과 밀접한 관련이 있음이 다양하게 보고되고 있다(Naujokat, C., & Saric, T. (2007). *Stem Cells*, 25(10), 2408-2418). 체세포에 줄기세포 인자를 도입하여 배아 줄기세포와 같은 상태로 세포를 재프로그래밍하여 암의 개시 및 진행에서 줄기세포 특성이 어떠한 영향을 미치는가에 대한 연구진들의 관심이 점점 증가하고 있다. 예를 들어 Oct-3/4는 암에서 비정상적인 발현을 보인다는 연구 결과가 보고되고 있어, 줄기세포 조절인자가 암 연구 및 치료 타겟으로 그 비중이 증가하고 있다. Oct-3/4는 배아와 암 줄기세포 모두에서 세포의 운명을 결정짓는 중요한 조절인자이며, 만약 부적절한 타이밍에 Oct-3/4가 활성화된다면 정상 줄기세포가 아닌 암 줄기세포가 될 가능성이 높아지게 된다. 실제로 Oct-3/4의

발현이 다양한 종류의 암 환자의 생존율과 상당한 상관관계가 있다는 것을 보고하는 많은 문헌이 존재한다(Villodre, E. S., Kipper, F. C., Pereira, M. B., & Lenz, G., (2016). *Cancer Treat Rev*, 51, 1-9). 또한, 암과 같은 다양한 질병의 치료제를 개발하기 위해, 세포 내 다양한 신호전달 경로를 통해 세포 기전을 조절하는 단백질을 사용한 연구가 많이 진행되고 있다(Ring, K. L., Tong, L. M., Balestra, M. E., Javier, R., Andrews-Zwilling, Y., Li, G., Walker, D., Zhang, W. R., Kreitzer, A. C., & Huang, Y. (2012). *Cell Stem Cell*, 11(1), 100-109).

- [4] 최근 본 발명자들을 비롯한 일부 연구팀들은 증식 및 분화와 관련된 중요한 단백질이 UPP에 의해 항상성이 조절된다는 것을 규명한 바 있다(Choi, J., & Baek, K.H. (2017). *Cell Mol Life Sci*, 2017, 75: 1947-1957). 세포 내에서 유비쿼틴 프로테아좀 기전은 많은 단백질들에 의해 조절되므로, 세포의 성장에 관여하는 단백질들을 확인하고 이들의 분해기전을 억제하거나 유도하는 것을 조절한다면 세포의 증식과 분화를 조절할 수 있으며, 이로 인하여 암과 같은 질병의 기능 강화 및 고도화된 세포치료제를 개발할 수 있을 것으로 기대된다. Oct-3/4의 경우 할구(blastomere) 초기과정에서 발현이 시작되다가

트로포블라스트(trophoblast)와 초기 엔도덤(primitive endoderm) 시기에 발현이 점점 감소하는 특징을 가지고 있다. 또한 Oct-3/4의 발현이 결손된

넉-아웃(knock-out) 마우스는 ICM(inner cell mass)이 없다고 알려져 있다. 또한, 특이하게도, Oct-3/4의 경우 단백질의 양에 따라 각각 다른 표적세포로 분화하는 방향이 결정되며, 따라서 Oct-3/4 단백질의 발현량을 조절한다면 효율적이고 다량으로 특정 분화세포를 생산할 수 있을 것으로 기대된다. 이를 토대로 단백질 분해 기작을 밝힘으로써 효율적인 세포 증식 및 분화 조절 방법을 구축하고, 궁극적으로는 분화를 통한 치료 목적으로 사용할 대량의 치료제를 발굴할 수 있다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [5] 본 발명자들은 Oct-3/4 단백질의 유비쿼틴화 기전을 밝혀내기 위해 bioinformatics 분석을 포함한 다양한 연구를 수행하였다. 그 결과, Oct-3/4 단백질의 특정 아미노산 잔기, 즉 Oct-3/4 단백질의 156번, 및 286번의 라이신을 아르기닌으로 치환한 단백질 변이체가 유비쿼틴화를 통한 단백질 분해기작을 억제할 뿐만 아니라 높은 반감기를 나타냄으로써 높은 안정성을 나타낸다는 것을 발견하였다. 따라서, 본 발명은 Oct-3/4 단백질 변이체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제 해결 수단

- [6] 본 발명의 일 태양에 따라, 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Oct-3/4 단백질에 있어서, 156번의 라이신; 286번의 라이신; 또는 156번 및 286번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 Oct-3/4 단백질 변이체가 제공된다.

- [7] 일 구현예에서, 상기 Oct-3/4 단백질 변이체는 서열번호 3, 4, 또는 5의 아미노산 서열로 구성된 변이체일 수 있다.

### 발명의 효과

- [8] 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 유비퀴틴화를 통한 단백질 분해기작을 억제할 수 있으며, 야생형(wild type) Oct-3/4에 비해 높은 반감기를 나타냄으로써 높은 안정성을 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 변이체는 효과적으로 Oct-3/4를 발현시킬 수 있으므로, 역분화 줄기세포 제작 등에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 배상체(embryonic body, EB)로부터, 외배엽(ectoderm)으로 분화되는 신경 세포(neuron cell), 중배엽(mesoderm)으로 분화되는 심근 세포(cardiac muscle), 및 내배엽(endoderm)으로 분화되는 췌장 세포(pancreatic cell) 등을 타깃으로 세포의 분화기전에 관여하는 Oct-3/4 단백질의 분해기작 억제를 통해 치료에 필요한 방향의 표적 세포를 특이적으로 생산될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 높은 반감기를 나타냄으로써 높은 안정성을 가지므로 대량 생산이 가능하다. 또한, 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 세포의 증식 및 분화를 조절할 수 있으므로, 세포치료제 개발에 유용하게 사용될 수 있다. Oct-3/4는 암세포에서 높은 발현량을 보인다. Oct-3/4 변이체에 작용하는 E3 ligase는 아직 밝혀진 것이 없으며, E3 ligase를 통해 조절되는 Oct-3/4 단백질의 발현은 암세포의 증식을 억제하며 이는 세포치료제에 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [9] 도 1은 HA-표지된 유비퀴틴화 효소 및 Flag로 각각 표지된 야생형 Oct-3/4 또는 Oct-3/4 변이체(Oct-3/4 K128R, Oct-3/4 K144R, Oct-3/4 K156R, 또는 Oct-3/4 K286R)를 293T 세포에 형질감염(transfection)한 후, 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과(상부 패널)와 Flag 항체로 면역침강법을 수행한 결과(하부 패널)를 나타낸다.
- [10] 도 2는 야생형 Oct-3/4, Oct-3/4 K156R 및 Oct-3/4 K286R 각각을 293T 세포에 형질감염(transfection)한 뒤 단백질 합성 억제제인 시클로헥시미드(Cycloheximide, CHX)를 처리한 후, 0시간부터 1시간 간격으로 3시간까지의 Oct-3/4 발현량을 웨스턴 블롯팅을 통하여 측정한 결과를 나타낸다.
- [11] 도 3은 도 2의 결과로부터 0시간부터 3시간까지의 상대적인 Oct-3/4 발현량을 계산한 결과를 나타낸다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [12] 본 발명자들은 Oct-3/4 단백질의 유비퀴틴화 부위를 찾기 위하여 bioinformatics 분석을 수행하였으며, 특정 부위의 라이신 즉, 128번, 144번, 156번, 및 286번 라이신 부위가 Oct-3/4 단백질의 유비퀴틴화와 관련될 수 있다는 것을 밝혀냈다. 또한, 상기 결과로부터 128번, 144번, 156번, 또는 286번 라이신을 각각 아르기닌으로 치환한 Oct-3/4 변이체(즉, Oct-3/4 K128R, Oct-3/4 K144R, Oct-3/4

K156R, 및 Oct-3/4 K286R)를 제작하였으며, 이들 변이체 중 Oct-3/4 K156R, 및 Oct-3/4 K286R이 유비퀴틴화가 유의성 있게 억제되는 것을 확인하였다. 또한, Oct-3/4 K156R, 및 Oct-3/4 K286R을 단백질 합성 억제제인 시클로헥시미드(Cycloheximide)와 함께 처리하였을 때, 야생형(wild type) Oct-3/4에 비해 높은 반감기를 나타냄으로써, 우수한 안정성을 가짐을 밝혀냈다. 따라서, 상기 변이체는 효과적으로 Oct-3/4를 발현시킬 수 있으므로, 역분화 줄기세포 제작 등에 유용하게 사용될 수 있으며, 또한 높은 반감기를 나타냄으로써 높은 안정성을 가지므로 대량 생산이 가능하다.

- [13] 본 발명은 Oct-3/4 단백질(서열번호 1의 아미노산)의 변이체를 제공한다. 즉, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Oct-3/4 단백질에 있어서, 156번의 라이신; 286번의 라이신; 또는 156번 및 286번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 Oct-3/4 단백질 변이체를 제공한다.
- [14] Oct-3/4 단백질의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 염기 서열은 모두 공지되어 있으며, 예를 들어, Oct-3/4 단백질의 NCBI 액세스 번호(NCBI accession number)는 NP\_002692.2 (서열번호 1) 이고, Oct-3/4 단백질을 코딩하는 염기 서열의 NCBI 액세스 번호는 NM\_001285986.1 (서열번호 2) 이다.
- [15] 일 구현예에서, 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Oct-3/4 단백질에 있어서 156번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 변이체, 즉 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 변이체일 수 있다. 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Oct-3/4 단백질에 있어서 286번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 변이체, 즉 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성된 변이체일 수 있다. 또다른 구현예에서, 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Oct-3/4 단백질에 있어서 156번 및 286번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 변이체, 즉 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 변이체일 수 있다.
- [16] 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 생명공학 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 156번의 라이신; 286번의 라이신; 또는 156번 및 286번의 라이신을 아르기닌으로 치환함으로써 제작할 수 있다. 예를 들어, 하기 서열번호 10 및 11의 프라이머 세트를 사용하여, Oct-3/4 단백질을 코딩하는 유전자(예를 들어, 서열번호 2의 염기서열을 갖는 유전자)를 주형으로 하여 중합효소연쇄반응을 수행함으로써 156번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 변이체를 얻을 수 있다. 또한, 예를 들어, 하기 서열번호 12 및 13의 프라이머 세트를 사용하여, Oct-3/4 단백질을 코딩하는 유전자(예를 들어, 서열번호 2의 염기서열을 갖는 유전자)를 주형으로 하여 중합효소연쇄반응을 수행함으로써 286번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 변이체를 얻을 수 있다.
- [17] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 유비퀴틴화를 통한 단백질 분해기작을 억제할 수 있으므로, 역분화 줄기세포 제작 등에 유용하게

사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 높은 반감기를 나타냄으로써 높은 안정성을 가지므로 대량 생산이 가능하다. 따라서, 본 발명에 따른 Oct-3/4 단백질 변이체는 효과적인 세포 치료제 및 항암제 개발에 응용될 수 있다.

[18] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[19] 실시예

[20] (1) 유비퀴틴화 부위의 선별 및 변이체의 제작

[21] 하기 9개의 웹사이트(표 1)를 통하여 bioinformatics 분석을 수행하여 Oct-3/4 단백질의 유비퀴틴화 부위 후보군을 분석하였다. 분석 결과, 128번, 144번, 156번, 및 286번 라이신이 가장 많이 반복적으로 나타나는 아미노산 잔기, 즉 효율이 가장 높은 아미노산 잔기로 나타났으며, 이를 유비퀴틴화 부위 후보군으로 하였다.

[22] [표1]

| 유비퀴틴화 예측 부위(Ubiquitination Prediction Sites)                                                                              |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <a href="http://www.ubpred.org">http://www.ubpred.org</a>                                                                 |
| <a href="http://csb.cse.yzu.edu.tw/UbiSite/">http://csb.cse.yzu.edu.tw/UbiSite/</a>                                       |
| <a href="http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php">http://bdmpub.biocuckoo.org/prediction.php</a>                       |
| <a href="http://202.195.183.4:8000/mUbiSiDa.php">http://202.195.183.4:8000/mUbiSiDa.php</a> (reprod.njmu.edu.cn/mUbiSiDa) |
| <a href="http://www.jci-bioinfo.cn/iUbiq-Lys">http://www.jci-bioinfo.cn/iUbiq-Lys</a>                                     |
| <a href="http://protein.bio.unipd.it/rubi/">http://protein.bio.unipd.it/rubi/</a>                                         |
| <a href="http://csb.cse.yzu.edu.tw/UbiNet/">http://csb.cse.yzu.edu.tw/UbiNet/</a>                                         |
| <a href="https://omictools.com/ubiquitination-sites-category">https://omictools.com/ubiquitination-sites-category</a>     |
| <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/</a>                             |

[23] 하기 표 2의 프라이머 세트를 사용하여 Oct-3/4 단백질의 128번, 144번, 156번, 또는 286번 라이신을 각각 아르기닌으로 치환한 Oct-3/4 변이체(즉, Oct-3/4 K128R, Oct-3/4 K144R, Oct-3/4 K156R, 및 Oct-3/4 K286R)를 제작하였다. 구체적으로 야생형 Oct-3/4 유전자(서열번호 2의 유전자)를 주형으로 하고, 각각의 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. PCR 조건은 변성 단계 95°C에서 3분, 결합 단계 56°C에서 1분, 신장 단계 68°C에서 12분으로 총 14 사이클을 수행하였다. 아가로스 겔에서 전기영동을 한 뒤, 젤 락을 통해 각각의 프라이머에 의해 증폭된 밴드를 확인하였다.

[24] [표2]

| 변이체           | 서열번호 | 서열  |                             |
|---------------|------|-----|-----------------------------|
| Oct-3/4 K128R | 6    | 정방향 | GAG AAG GAG AGG CTG GAG CAA |
|               | 7    | 역방향 | TTG CTC CAG CCT CTC CTT CTC |
| Oct-3/4 K144R | 8    | 정방향 | GCT CTG CAG AGA GAA CTC GAG |
|               | 9    | 역방향 | CTC GAG TTC TCT CTG CAG AGC |
| Oct-3/4 K156R | 10   | 정방향 | CTG AAG CAG AGG AGG ATC ACC |
|               | 11   | 역방향 | GGT GAT CCT CCT CTG CTT CAG |
| Oct-3/4 K286R | 12   | 정방향 | CAG AAG GGC AGG CGA TCA AGC |
|               | 13   | 역방향 | GCT TGA TCG CCT GCC CTT CTG |

[25] 얻어진 변이체, 즉 Oct-3/4 K128R, Oct-3/4 K144R, Oct-3/4 K156R, 및 Oct-3/4 K286R 플라스미드를 지정한 프라이머(ATT TAG GTG ACA CTA TAG)와 미국 Applied Biosystems 사의 3730xl Analyzer를 이용하여 염기서열을 분석한 결과, Oct-3/4의 128번, 144번, 156번, 및 286번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 것을 확인하였다.

[26] (2) 웨스턴 블롯팅 분석을 통한 발현 분석

[27] HA-표지된 유비퀴틴화 효소 및 Flag로 각각 표지된 야생형 Oct-3/4 또는 Oct-3/4 변이체(Oct-3/4 K128R, Oct-3/4 K144R, Oct-3/4 K156R, 또는 Oct-3/4 K286R)를 293T 세포에 형질감염(transfection)한 후, 웨스턴 블롯팅을 수행하였으며, 그 결과는 도 1과 같다(도 1의 상부 패널). 또한, Flag 항체를 사용하여 면역침강법을 수행하였으며, 그 결과는 도 1과 같다(도 1의 하부 패널). 도 1의 결과로부터, Oct-3/4 K156R 및 Oct-3/4 K286R은 유비퀴틴화가 유의성 있게 억제되는 것을 확인할 수 있다.

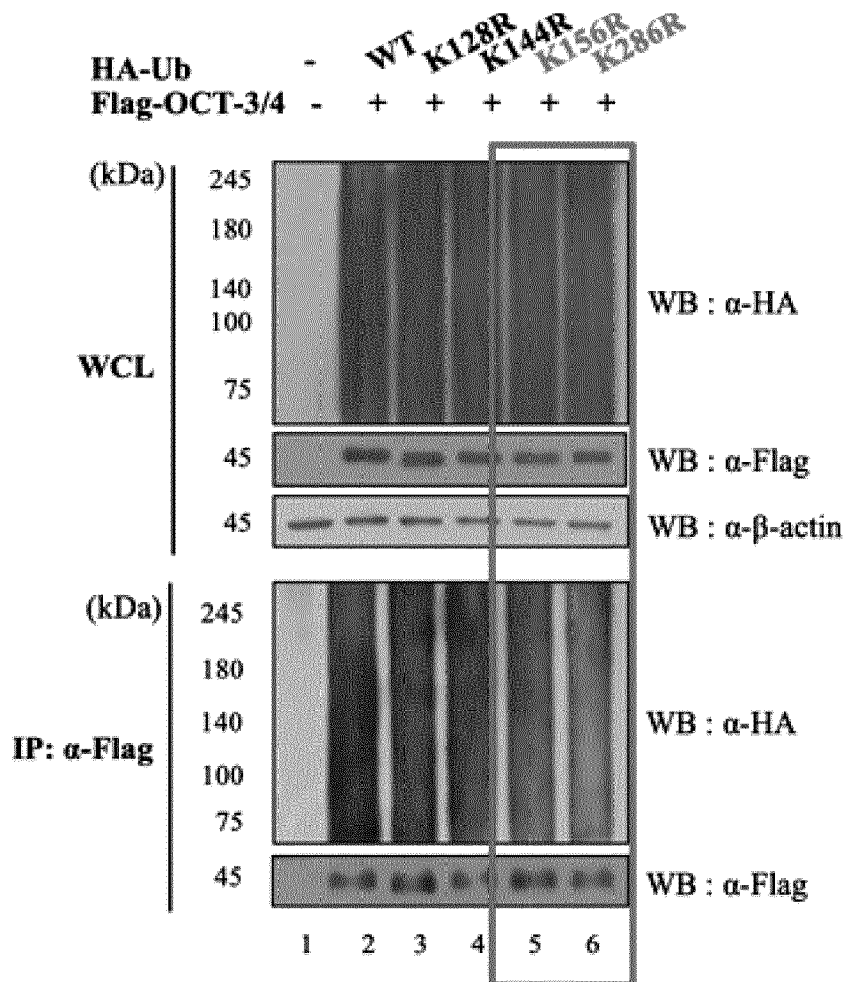
[28] (3) 단백질 합성 억제제 처리에 따른 Oct-3/4 발현 분석

[29] 야생형 Oct-3/4, Oct-3/4 K156R 및 Oct-3/4 K286R 각각을 293T 세포에 형질감염(transfection)한 뒤 단백질 합성 억제제인 시클로헥시미드(Cycloheximide)와 함께 처리하였다. 0시간부터 1시간 간격으로 3시간까지의 Oct-3/4 발현량을 웨스턴 블롯팅을 통하여 측정하였으며, 그 결과는 도 2와 같다. 또한, 도 2의 결과로부터 0시간부터 3시간까지의 상대적인 Oct-3/4 발현량을 계산한 결과는 도 3과 같다. 도 2 및 도 3의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, 0시간을 기준으로 1로 보았을 때, 야생형 Oct-3/4는 시클로헥시미드를 처리한 뒤 3시간 때 0.62로 감소하였으나, Oct-3/4 K156R은 0.94, Oct-3/4 K286R은 0.8로 야생형 Oct-3/4에 비해 높은 반감기를 나타내었다. 따라서, Oct-3/4 K156R 및 Oct-3/4 K286R는 반감기가 더 길게 유지되는 것을 확인할 수 있다.

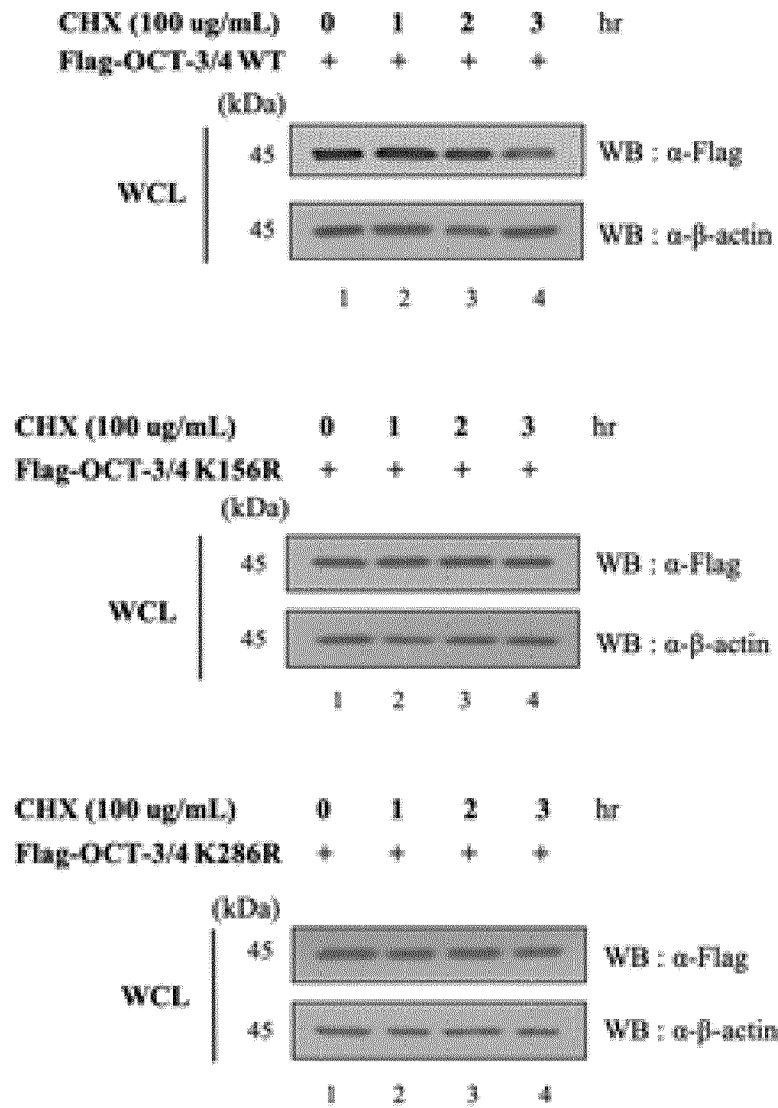
## 청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 Oct-3/4 단백질에 있어서, 156번의 라이신; 286번의 라이신; 또는 156번 및 286번의 라이신이 아르기닌으로 치환된 Oct-3/4 단백질 변이체.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 서열번호 3의 아미노산 서열로 구성된 Oct-3/4 단백질 변이체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 서열번호 4의 아미노산 서열로 구성된 Oct-3/4 단백질 변이체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 서열번호 5의 아미노산 서열로 구성된 Oct-3/4 단백질 변이체.

[도1]



[도2]



[도3]

