(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0006016
(43) 공개일자 2017년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2013.01)
G01N 33/57423 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0096321
(22) 출원일자 2015년07월07일
심사청구일자 2015년07월07일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

전체 청구항 수 : 총 10 항

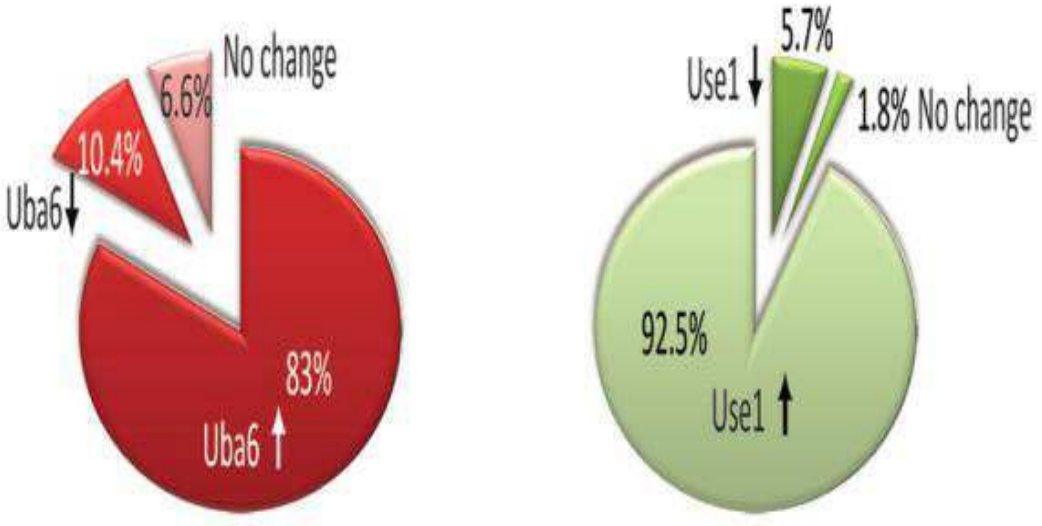
(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
이창환
서울특별시 서초구 효령로 391, 10동 1006호(서초동, 무지개 아파트)
이태형
울산광역시 중구 화합로 388, 3881동 903호(반구동, 세한프리빌 2차)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

(54) 발명의 명칭 **암 진단마커로서 Ｕｂａ６ 또는 Ｕｓｅ１의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 암 진단용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 의해 암의 조기 진단에 유용하게 쓰일 수 있는 민감성 및 특이성이 뛰어난 암 진단용 조성물이 제공된다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

김성진

대전광역시 동구 동서대로1678번길 32-22, A동 202호(성남동, 유락빌라)

최세훈

서울특별시 강남구 남부순환로381길 15, 1004호(도곡동, 포스코트아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A1A1005381
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	울산대학교 산학협력단
연구사업명	신진연구지원사업
연구과제명	Uba6-Use1의 대한 핵심 표적 단백질의 확인 및 작용기작 규명
기 여 율	1/1
주관기관	한국연구재단
연구기간	2013.06.01 ~ 2016.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Uba6(Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6) 또는 Use1(Uba6 specific E2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유전자 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 Uba6 또는 Use1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 암 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유전자 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 Uba6 또는 Use1 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 암 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 Uba6 또는 Use1 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 암 진단용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 암 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것을 특징으로 하는 암 진단용 키트.

청구항 7

(a) 생물학적 시료에 존재하는 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a)단계의 측정결과를 정상대조군 시료의 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는, 암의 예측 및 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암의 예측 및 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 및 면역침전분석법으로 이

루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암의 예측 및 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 생물학적 시료에서 존재하는 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양이 대조군에 비해 증가된 경우, 암이 발병된 것으로 판정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 암의 예측 및 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암 진단마커로서 Uba6 또는 Use1의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 폐암은 현재 국내뿐만 아니라, 전 세계적으로 높은 치사율을 보이는 암 중 하나이다. 이러한 경향은 자각 증상이 적고 민감도가 높은 조기 진단 방법의 부재로 기인한 것이다. 현재 폐암의 경우는 이미징방법(X-ray, CT, MRI 등)에 의존도가 높은 편으로 생화학적 지표로 사용될 수 있는 물질은 발견된 예가 적다.

[0003] 바이오마커란 신체의 생리, 병태학적 상황을 진단할 수 있는 모든 물리적, 생화학적 지표를 일컫는 단어이다. 현재 암 치료의 패러다임이 암을 직접적으로 치료하는 항암제의 개발에서 조기발견을 유도, 그에 따른 효과적인 치료와 지속적인 모니터링을 가능하게 하는 방향으로 패러다임이 변하고 있다. 따라서 이러한 변화에 가장 필요한 것이 암의 조기진단 및 모니터링을 가능하게 할 수 있는 물질인 바이오마커이다.

[0004] 현재 바이오마커라는 이름으로 암 진단을 위해 제시된 물질들이 존재하지만, 여전히 충분한 특이성(specificity)과 민감성(sensitivity)을 나타내지 못하고 있다. 따라서 여러 질환에서 교차반응성이 존재하고 있고, 이를 보완할 수 있는 방법의 부재로 인하여 미국에서도 FDA 승인을 받아 실제로 임상에 적용되고 있는 바이오마커의 수는 매우 적은 상황이다.

[0005] 폐암의 경우에도, 바이오마커 후보물질에 관한 다수의 논문이 출판되었고, 새로운 바이오마커 후보 단백질들이 계속 연구되고 있는 상황이지만 현재까지 폐암을 특이적으로 진단할 수 있는 바이오마커로 상용화된 것은 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 미국공개특허 제2014-0323331호

(특허문헌 0002) 미국공개특허 제2014-0243211호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여 암 특이적인 바이오마커를 발굴하여 암을 빠르고 간편하며 정확하게 진단하는 데 그 목적이 있다.

[0008] 따라서, 본 발명은 Uba6(Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6) 또는 Use1(Uba6 specific E2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0010] 나아가 본 발명은 (a) 생물학적 시료에 존재하는 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a)단계의 측정결과를 정상대조군 시료의 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양

과 비교하는 단계를 포함하는 암의 예측 및 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Uba6(Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6) 또는 Use1(Uba6 specific E2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 Uba6 또는 Use1 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자 mRNA의 발현 수준을 측정하는 제제는 Uba6 또는 Use1 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 Uba6 또는 Use1 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트일 수 있다.

[0017] 본 발명은 (a) 생물학적 시료에 존재하는 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a)단계의 측정결과를 정상대조군 시료의 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는 암의 예측 및 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 및 면역침전분석법으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것이다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생물학적 시료에서 존재하는 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양이 대조군에 비해 증가된 경우, 암이 발병된 것으로 판정하는 단계를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 의해 암의 조기 진단에 유용하게 쓰일 수 있는 민감성 및 특이성이 뛰어난 암 진단용 조성물이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 암 및 정상조직 105쌍에서 Uba6 및 Use1 유전자의 발현양상을 확인한 결과이다.

도 2는 암 및 정상조직 105쌍에서 Uba6 및 Use1 유전자의 발현양상을 통계처리한 결과이다.

도 3은 TC1 세포에서 Uba6 또는 Use1를 과발현시킨 후 발현양상을 확인한 결과이다.

도 4는 Uba6, Use1를 과발현시킨 세포의 군락 형성 정도를 확인한 결과이다.

도 5는 Uba6, Use1를 과발현시킨 세포의 증식 정도를 확인한 결과이다.

도 6은 Uba6, Use1를 과발현시킨 세포의 상처 치유 정도를 확인한 결과이다.

도 7은 Uba6, Use1를 과발현시킨 세포의 전이 정도를 확인한 결과이다.

도 8은 Uba6, Use1를 과발현시킨 세포에 암을 이종이식한 후의 암 형성 정도를 확인한 결과이다.

도 9는 폐암 환자 군의 폐암 조직을 대상으로 Uba6 또는 Use1의 과발현 정도를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 암 조직에서 Uba6 또는 Use1의 이상 발현이 암 발생과 관련이 있는지를 확인하고, 정상조직 및 정상

세포에 비해 암조직 및 암세포에서 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현이 과발현되어 있다는 사실을 확인함으로써 상기 유전자를 암 진단을 위한 바이오마커로 사용할 수 있음을 규명하였다는 점에 특징이 있다.

[0024] 즉, 본 발명자들은 암 및 정상조직 105쌍에서 UBA6와 USE1유전자의 발현양상을 확인하고, 이들의 발현양상을 통계 처리한 결과 암 환자에서 특이적으로 UBA6와 USE1이 각각 83%, 92% 과발현되어 있음을 알 수 있었다(도 2 참조).

[0025] 본 발명의 일실시예에 따르면, UBA6와 USE1유전자가 각각 과발현된 TC1 세포들이 과발현되지 않은 세포보다 빠르게 균체형성을 함을 확인하였다(도 4 참조).

[0026] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따르면, UBA6와 USE1유전자가 각각 과발현된 TC1 세포들이 과발현되지 않은 세포보다 빠르게 증식함을 알 수 있었다(도 5 참조).

[0027] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따르면, UBA6와 USE1유전자가 각각 과발현된 TC1 세포들이 과발현되지 않은 세포보다 상처 치유 능력이 탁월하였다(도 6 참조).

[0028] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따르면, UBA6와 USE1유전자가 각각 과발현된 TC1 세포들이 과발현되지 않은 세포보다 암의 형성능력이 있음을 이종이식 모델로 확인하였다(도 7 참조).

[0029] 결과적으로, 본 발명자들은 UBA6와 USE1유전자가 암에서 과발현된다는 사실과 함께, 세포에 각각의 유전자를 인위적으로 과발현시키게 되면 암의 특징인 증식성, 이동성, 침윤성이 각각 증가하게 되었음을 알 수 있었다. 또한, UBA6와 USE1유전자가 과발현된 세포를 누드마우스에 이종이식시키면 마우스에서 암이 발생함을 확인할 수 있었다.

[0030] 따라서 본 발명의 UBA6 또는 USE1 유전자는 암 진단을 위한 조성물로 사용할 수 있으며, 그러므로 본 발명은 Uba6(Ubiquitin-like modifier activating enzyme 6) 또는 Use1(Uba6 specific E2) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 암 진단용 조성물을 제공할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 상기 UBA6 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 것일 수 있고, UBA6의 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 본 발명에서 상기 USE1 유전자는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 갖는 것일 수 있고, USE1 단백질은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다.

[0032] 본 발명에서, 상기 '진단'이라는 용어는 병리 상태를 확인하는 것을 의미하는 것으로서, 본 발명의 목적상 상기 진단은 암 진단 마커의 발현 유무를 확인하여 암의 발병 여부를 확인하는 것을 의미하며, 또한, 본 발명에서의 진단은 암 진단 마커의 발현 유무 및 발현 정도를 확인하여 암의 발병여부, 발전 및 경감 등을 판단하는 것도 포함한다.

[0033] 본 발명에서 포함하는 '암'은 위암, 결장암, 유방암, 폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호킨슨병, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환을 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니나, 보다 바람직하게는 폐암일 수 있다.

[0034] 또한, 상기 진단용 마커(diagnosis marker)란 암의 세포를 정상 세포와 구분하여 진단할 수 있는 물질을 의미하며, 정상 세포에 비하여 암의 세포에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예컨대, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명에서 제공하는 암 진단용 마커는 정상 세포에 비해 암의 세포에서 발현양이 증가하는 Uba6 또는 Use1의 유전자 또는 단백질일 수 있다.

[0035] 본 발명에서 상기 Uba6 또는 Use1 유전자의 수준은, 바람직하게 Uba6 또는 Use1 유전자가 발현된 mRNA 수준, 즉, mRNA의 양을 의미하며, 상기 수준을 측정할 수 있는 물질로는 Uba6 또는 Use1 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 Uba6 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브는 서열번호 1로 나타내는 Uba6 유전자 전체 또는 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명에서 상기 Use1 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브는 서열번호 3으로 나타내는 Use1 유전자 전체 또는 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.

[0037] 본 발명에서 상기 '프라이머' 란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 Uba6 또는 Use1 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하다. 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0038] 본 발명에서, 상기 '프로브' 라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타켓 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명에서 상기 Uba6 또는 Use1 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질로는 Uba6 또는 Use1 단백질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등의 항체를 포함할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 기술한 바와 같이 암을 진단할 수 있는 마커 단백질로서 Uba6 또는 Use1 단백질이 규명되었으므로, 상기 단백질을 이용하여 항체를 생성하는 방법은 당해 기술분야의 일반적 기술자가 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 다클론 항체의 경우에는 Uba6 또는 Use1 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있으며, 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조가능하다. 단일클론 항체의 경우에는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마(hybridoma) 방법(Kohler et al., European Jounral of Immunology, 6, 511-519, 1976)을 이용하여 제조할 수 있거나 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, Nature, 352, 624-628, 1991, Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 Uba6 또는 Use1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0042] 본 발명의 암 진단용 키트에 포함되는 암 진단용 조성물은 Uba6 또는 Use1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있으며, 이들의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.

[0043] 본 발명의 암 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth),

Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 암 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.

[0044] 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명은 Uba6 또는 Use1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 마이크로어레이를 제공한다.

[0046] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, Uba6 또는 Use1 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0047] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다.

[0048] 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명은 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현수준 또는 Uba6 또는 Use1 단백질 수준을 측정하여 암을 예측 및 진단을 위해 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은 (a) 생물학적 시료에 존재하는 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a)단계의 측정결과를 정상대조군 시료의 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 상기에서 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현수준 또는 Uba6 또는 Use1 단백질 수준을 측정하는 방법은 공지의 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다.

[0050] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"란 암 발생 또는 진행 정도에 따른 상기 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 수준이 정상 대조군과는 다른, 생체로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨 등이 포함될 수 있다.

[0051] 상기 Uba6 또는 Use1 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0052] 상기 Uba6 또는 Use1 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 Uba6 또는 Use1 마커 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.

[0054] 따라서 본 발명은 상기와 같은 검출 방법들을 통하여, 대조군의 Uba6 또는 Use1 mRNA 발현양 또는 단백질의 양과 암 환자 또는 암 의심환자에서의 Uba6 또는 Use1 mRNA 발현양 또는 단백질의 양을 확인할 수 있고, 상기 발현양의 정도를 대조군과 비교함으로써 암의 발병여부, 진행단계 또는 예후 등을 예측 및 진단할 수 있다.

[0055] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0056] **<실시예 1>**

[0057] **폐암 조직에서 UBA6와 USE1의 발현 양상 확인**

[0058] 본 실험을 위하여 서울아산병원 조직세포자원센터에서 폐암 (lung-squamous cell carcinoma, lung-adenocarcinoma) 환자 조직 105쌍을 2014년 11월3일, 2014년 12월 24일에 제공 받았다(IRB: 2014-0960).

[0059] 도 1에 폐암 및 정상조직 105쌍에서 UBA6와 USE1유전자의 발현양상을 나타내었고, 상기 유전자들의 발현양상을 통계처리한 결과, 폐암 환자에서 특이적으로 UBA6와 USE1이 각각 83%, 92% 과발현되어 있음을 알 수 있었다(도 2 참조).

[0060] **<실시예 2>**

[0061] **웨스턴 블롯 실험**

[0062] 상기 실시예 1의 방법으로 준비된 조직을 NP40 lysis buffer(Tris 50mM, NaCl 150 mM, NP40 0.5%)에 protease inhibitor cocktail(Complete Mini EDTA-free; Roche)를 첨가한 라이시스 버퍼(lysis buffer)를 200㎕ 가하고 균질기(homogenizer)로 분쇄한뒤 4℃에서 rotaion 30분간 incubation하였다.

[0063] 13,000 x g에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 새 마이크로센트리퓨지 튜브(microcentrifuge tube)에 옮긴 후 단백질 농도를 BCA protein assay kit (Pierce BCA protein assay kit ;Thermo)을 가지고 측정하였다. 30 ㎍ 단백질을 5X 로딩버퍼(loading buffer)와 혼합하여 95℃에서 5분간 가열 후, 8% SDS-PAGE(sodium dodesylsulfate-poly acrylamide gel electrophoresis)를 시행하였다.

[0064] 전기영동후 gel의 단백질을 polyvinylidenedifluoride transfer membrane (Immun-blot PVDF membrane For protein Blotting; Bio RAD)으로 100mV에서 1시간 동안 이동(transfer)시켰다. 멤브레인은 PBST (PBS에 0.01% Tween 20 첨가)에 5% 탈지유(skim milk)를 용해한 액에서 1시간 동안 블락킹(blocking) 후 PBST로 10분마다 3번씩 세척하였다. 그런 다음 일차 항체를 5% 탈지유에 희석하여 4℃에서 O/N 반응시킨 후, PBST로 10분마다 3번씩 세척하였다. 그 다음 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)가 결합된 이차 항체를 5% 탈지유에 희석하여 상온에서 1시간 반응시키고, PBST로 10분마다 3번씩 세척하였다. 또한, 멤브레인을 ECL (clarity western ECL substrate ;BIO-RAD)를 이용하여 X-ray film에 노출시키면서 특정 단백질의 발현 양상을 확인하였다(도 3 참조).

[0065] **<실시예 3>**

[0066] **안정된 세포 구축**

[0067] TC1 세포는 DMEM/High Glucose(HyClone, SH30243.01)에 10% Fetal Bovine Serum (hyClone, SH30919.03), 1% 페니실린-스트렙토마이신(HyClone, SV30010) 첨가 후 배양하였다. TC1 세포에 UBA6와 USE1유전자를 과발현 시키기 위해서 Retroviral system을 이용하였다.

[0068] Gateway system을 이용하기 위해 특정서열을 포함하는 UBA6, USE1 프라이머를 KOD Hot start DNA Polymerase(Novagen, 71086)를 사용하여 PCR(중합연쇄효소반응)을 하였다. 그 후 PCR을 이용하여 UBA6와 USE1 생산물을 만들고, 그 생산물들을 Gateway system인 BP reaction을 통하여 pDONR223 벡터에 융합시켰다. 그 이후 *E.coli* DH5α에 형질전환 시킨 후, 스펙티노마이신(Spectinomycin)이 첨가된 Lunia-Bertani(LB) agar plate에 도말 후 37℃에서 배양하였다. 플레이트(Plate)에 자란 콜로니를 LB broth에 키운 후 DNA-Spin (iNtRON, 17087)을 이용하여 플라스미드(Plasmid)를 정제하였다.

[0069] UBA6, USE1 유전자가 있는지를 확인하기 위해서 제한효소 중 하나인 BsrG I(BioLabs, R0575L)으로 확인하였다. 확인된 UBA6, USE1 유전자를 레트로 바이러스를 이용하여 안정된 세포(stable cell)를 만들기 위해서 Gateway system인 LR reaction을 통하여 MSCV-N-HA-Flag Puro vector에 융합시켰다. BsrG I으로 다시 한번 유전자 유무를 확인하였다. 레트로바이러스는 MSCV 벡터와 그의 helper DNA인 Gag/Pol, VSV G를 1:1:1로 섞은 후 iNfect transfection reagent(iNtRON, 15081)를 이용하여 293T 세포에 형질주입(transfection)시켰다. 다음날 새로운 배지로 교체하였으며, 이틀째 TC1 세포에 polyblene과 함께 바이러스를 주입시킨 후 다음 날 새로운 배지로 교

체하였다. 주입 후 3일째 되는 날, 2ug / ml의 푸로마이신(puromycin; R&D, 4089)이 첨가된 배지로 선발하였으며, 배지는 매 2-3일마다 갈아 주었다. 같은 방법으로 A549 세포에 UBA6, USE1을 구축하였다.

[0070] **<실시예 4>**

[0071] **UBA6, USE1을 과발현시킨 세포의 군체 형성 분석**

[0072] TC1 세포를 PBS용액으로 한번 세척한 후, 1분동안 37℃, CO_2배양기에서 트립신화하였다. 떼어낸 TC1 세포는 1,200 rpm에서 5분동안 원심분리하였다. 배양용액을 이용하여 세포를 섞어준 후, 혈구계수계(hemacytometer)를 이용하여 ml 당 1,000개의 세포를 준비하였다. 미리 2 ml의 배양을 첨가한 6 웰 플레이트에 준비된 TC1 세포를 1 ml 첨가한 후 잘 섞어주었다. 37℃ CO_2배양기에서 10일에서 20일 동안 세포를 배양시킨 후, 배양액을 제거하였으며, PBS로 한번 세척 후, 3.7% PFA (EMS, 15710-S) 용액으로 5분간 세포를 고정시켰다. 0.05% 크리스탈 바이올렛(Sigma-Aldrich, C3886) 용액으로 30분 동안 염색한 후 플레이트의 염색약을 수돗물을 이용하여 제거하였으며, 플레이트가 마를 때까지 기다린 후 스캔 또는 사진을 찍었다.

[0073] 상기와 같이 UBA6, USE1를 과발현시킨 세포의 균체형성 정도를 확인한 결과, UBA6, USE1이 각각 과발현된 TC1 세포들이 과발현되지 않은 대조군 세포보다 빠르게 균체를 형성함을 확인할 수 있었다(도 4 참조).

[0074] **<실시예 5>**

[0075] **UBA6, USE1을 과발현시킨 세포의 증식 분석**

[0076] CellTiter-Glo Luminescenct Cell Viability Assay(Promega)를 이용하여 TC1 세포의 증식(Proliferation)능력을 평가하였다. TC1 세포를 PBS용액으로 세척한 후, 1분동안 37℃, CO_2배양기에서 트립신화하였다.

[0077] 떼어낸 TC1 세포는 1,200 rpm의 속도로 5분동안 원심분리하였으며, 배양용액을 이용하여 세포를 섞어준 후, 혈구계수계(hemacytometer)를 이용하여 100ul 당 10,000개의 세포를 준비하였다. 96-Well Black or White Solid Plate(Costar, 3917) 에 동일 세포당 100 ul씩의 세포 혼탁액을 웰(well)에 3반복씩 첨가하였다. 37℃, CO_2배양기에서 세포를 배양하였으며, 분석하기 위해 30분동안 플레이트(plate)를 상온에서 안정화시켰다. 각각의 웰(well)에 CellTiter-Glo reagent (Promega, G755A) 100씩 첨가한 후 2분동안 셰이커(shaker)를 이용하여 세포를 용해시켰다. 10분 동안 상온에서 반응시킨 후 GloMax 96 Microplate Luminometer(Promega)를 사용하여 값을 얻었다.

[0078] 상기와 같이 UBA6, USE1를 과발현시킨 세포의 증식정도를 확인한 결과, UBA6, USE1이 각각 과발현된 TC1 세포들이 과발현되지 않은 대조군 세포보다 빠르게 증식함을 알 수 있었다(도 5 참조).

[0079] **<실시예 6>**

[0080] **UBA6, USE1을 과발현시킨 세포의 상처 치유 능력 분석**

[0081] TC1 세포의 이동(migration) 능력을 알아보기 위해서 상처 치유 분석(Wound healing assay)을 시행하였다. TC1 세포를 PBS용액으로 한번 세척한 후, 1분동안 37℃의 CO_2배양기에서 트립신화하였다. 떼어낸 TC1 세포는 1,200 rpm, 5분동안 원심분리하였으며, 배양용액을 이용하여 세포를 다시 섞어준 후, 혈구계수계(hemacytometer)를 이용하여 ml 당 500,000개의 세포를 준비하였다.

[0082] 그 후 6웰 플레이트의 바닥면에 한 줄 또는 두 줄의 선을 그은 후, 먼저 1 ml의 배양용액을 각각의 웰에 넣었다. 준비된 TC1 세포를 1 ml씩 첨가한 후 플레이트를 골고루 흔들었으며, 그 후 37℃, CO_2배양기에서 세포를 배양하였다. 세포밀집도가 80 ~ 90 %되었을 때, 200P tip을 이용하여 조심스레 선을 그었고, 배양액을 이용하여 조심스레 두 번 세척하였다. 그 후 현미경 (NiKon eclipse Ti-U) 을 이용하여 100배의 0시간의 사진을 얻었다. 다음 사진을 얻을 시, 세포를 데워진 배양액으로 한번 세척해준 후, 사진을 얻었으며, 사진의 분석은 Image J program을 이용하여 분석하였다.

[0083] 상기와 같이 UBA6, USE1를 과발현시킨 세포의 상처 치유 정도를 확인한 결과, UBA6, USE1이 각각 과발현된 TC1

세포들이 과발현되지 않은 대조군 세포보다 상처 치유(wound healing) 능력이 탁월함을 알 수 있었다(도 6 참조).

[0084] **<실시예 7>**

[0085] **UBA6, USE1을 과발현시킨 세포의 전이 분석**

[0086] TC1 세포의 암으로써 전이능력(invasive ability)을 확인하기 위하여 트랜스웰 침습 분석(Transwell invasion assay)을 시행하였다.

[0087] 24-well cuture inserts (SPL, 35224)에 Matrigel Matrix (Corning, C354234)을 2ug/ml의 농도로 희석 후 120 ul의 마트리겔(Matrigel)을 인서트(insert)안의 막에 전체적으로 코팅하였으며, 37℃의 CO_2배양기에서 젤화하였다. 다음날, insert 안쪽부분인 well에 800 ul의 FBS가 첨가된 배양액을 첨가하였다. 3시간 동안 37℃, CO_2배양기에 두었다. TC1 세포를 PBS용액으로 한번 세척한 후, 1분동안 37℃의 CO_2배양기에서 트립신화하였다. 떼어낸 TC1 세포는 1,200 rpm, 5분동안 원심분리하였으며, 배양용액을 이용하여 세포를 다시 섞어준 후, 혈구계수계(hemacytometer)를 이용하여 500 ul 당 100,000개의 세포를 준비하였다. 이때 배양용액은 serum-free(혈청이 없는 배양액)에 세포를 섞었다. Insert에 세포 혼탁액 500 ul 씩 첨가 후 36 시간동안 37℃의 CO_2배양기에서 배양하였다.

[0088] 36시간 후 insert를 PBS를 이용하여 두 번 세척 후 3.7 % PFA/ 5.4 % 수크로즈(Sucrose)를 이용하여 15분간 고정하였다. PBS를 이용하여 두 번 세척 과정을 거친 후 메탄올에 20분간 둔다. 20분 경과 후 다시 PBS를 이용하여 두 번 세척 과정을 거친 후, 0.5% 크리스탈 바이올렛 용액에 10분간 염색 하였다. PBS를 이용하여 두 번 세척 후 면봉을 이용 인서트 안의 non-invaded cell (Matrix을 침투하지 못한 세포들)을 조심스럽게 제거하였다. 한 시간 정도 인서트(insert)를 말린 후 슬라이드 위에 올린 후 현미경으로 관찰하였다.

[0089] 상기와 같이 UBA6, USE1를 과발현시킨 세포의 전이 정도를 확인한 결과, UBA6, USE1이 각각 과발현된 TC1 세포들이 과발현되지 않은 대조군 세포보다 전이가 빠름을 알 수 있었다(도 7 참조).

[0090] **<실시예 8>**

[0091] **암종 이종이식 모델**

[0092] Uba6, Use1 및 control이 과발현된 A549 세포를 배양후, 5×10^6cells/200㎕가 되도록 PBS에 농축하였다. 6주령 Balb/c nude mice의 우측 허리에 세포를 200 ㎕씩 피하주사한 후 캘리퍼(Caliper)를 이용하여 3일에 한번씩 30일동안 암의 크기를 측정하였다.

[0093] 그 결과, Uba6 또는 Use1이 각각 과발현된 A549 세포에서 과발현되지 않은 세포보다 암이 형성됨을 알 수 있었다(도 8 참조).

[0094] 따라서, 상기의 결과로 본 발명의 Uba6 또는 Use1 유전자는 폐암을 포함하여 암 진단을 위한 용도로 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0095] **<실시예 9>**

[0096] **UBA6 및 USE1의 폐암 진단마커 사용 가능성의 입증**

[0097] 나아가 본 발명자들은 실제적으로 Uba6 및 Use1를 폐암 진단을 위한 바이오마커로서 사용 가능함을 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 아산병원에서 폐암으로 진단받은 총 105명의 환자군을 대상으로 이들 환자로부터 병변 폐조직과 정상 폐조직을 수득한 후, 조직 내의 Uba6 및 Use1의 발현 정도를 웨스턴 블럿을 통해 분석하였다.

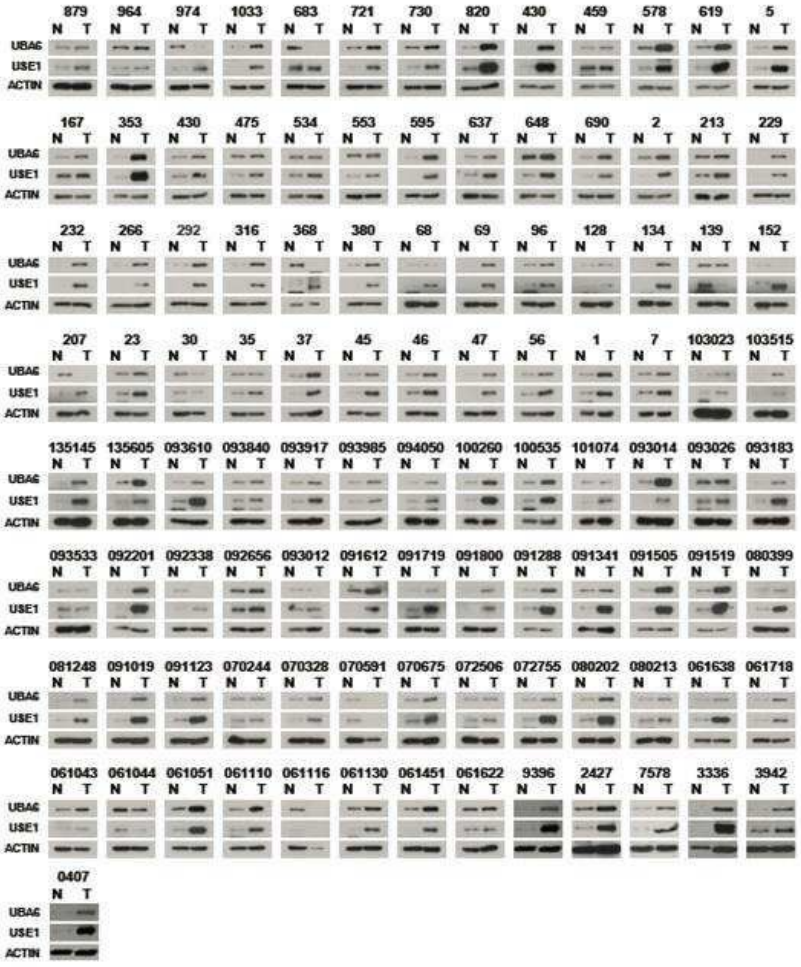
[0098] 분석 결과, 총 105명 폐암 환자 중에서 3명을 제외한 102명의 환자 군에서 Uba6 또는 Use1의 발현이 정상에 비해 증가된 것으로 나타났고, 82명의 환자 군에서는 Uba6 및 Use1이 함께 과발현되어 있는 것으로 나타났다.

[0099] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 Uba6 또는 Use1의 발현 정도 분석을 통해 폐암의 발병 여부를 확인할 수 있다는 것을 알 수 있었고, 나아가 Uba6 및 Use1을 함께 사용하여 진단할 경우 진단의 정확성 및 확률을 높일 수 있다는 것을 알 수 있었다(도 9 참조).

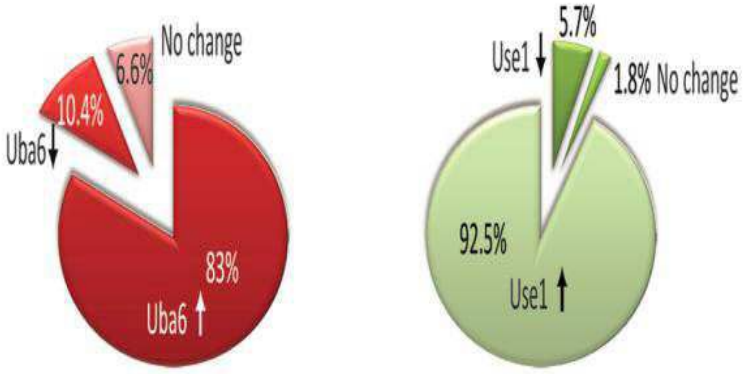
[0100] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

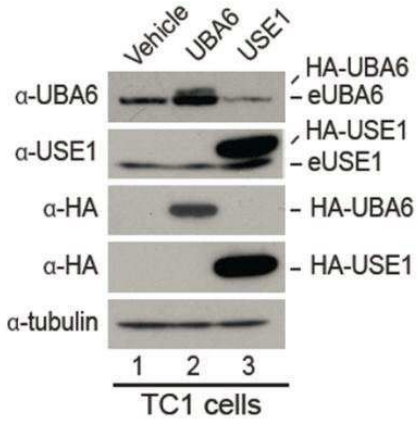
도면1



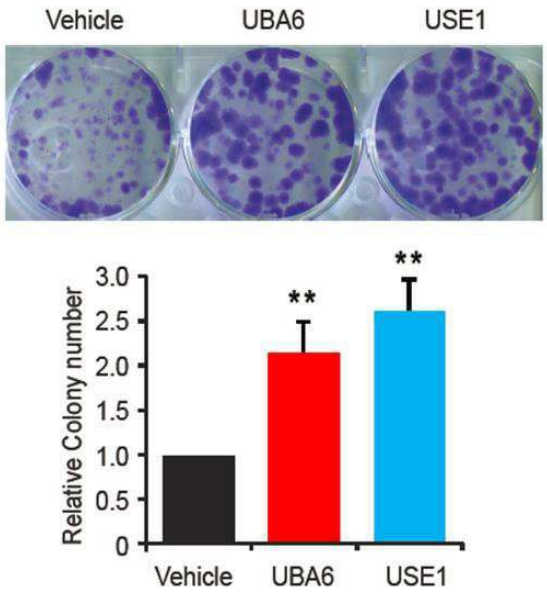
도면2


No change
6.6%
10.4%
Uba6
83%
Uba6
5.7%
Use1
1.8% No change
92.5%
Use1

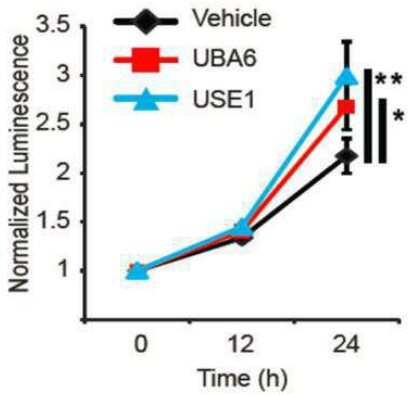
도면3


Vehicle
UBA6
USE1
α-UBA6
HA-UBA6
eUBA6
α-USE1
HA-USE1
eUSE1
α-HA
HA-UBA6
α-HA
HA-USE1
α-tubulin
1 2 3
TC1 cells

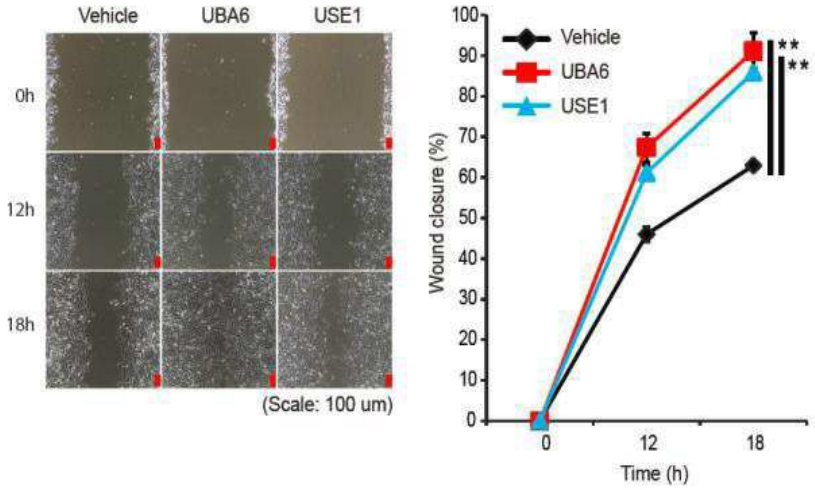
도면4


Vehicle
UBA6
USE1
Relative Colony number
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
**
**
Vehicle
UBA6
USE1

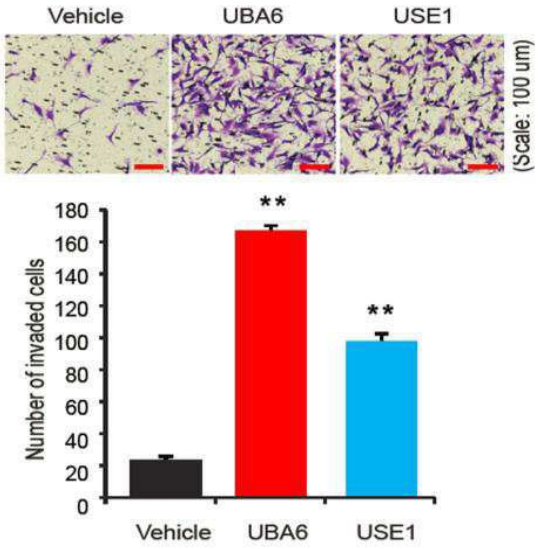
도면5


Vehicle
UBA6
USE1
Normalized Luminescence
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0
12
24
Time (h)
**
*

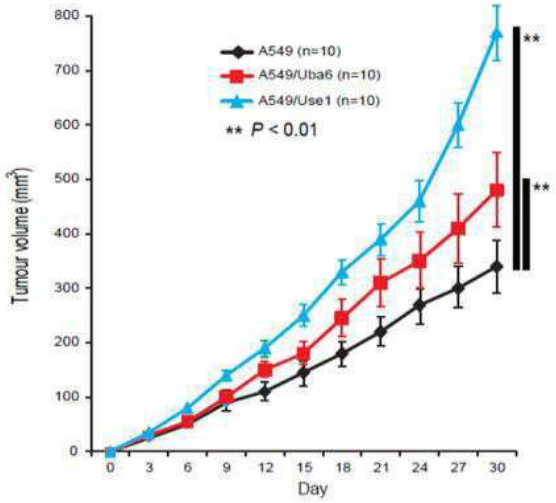
도면6


Vehicle
UBA6
USE1
0h
12h
18h
(Scale: 100 um)
Wound closure (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
12
18
Time (h)
**
**

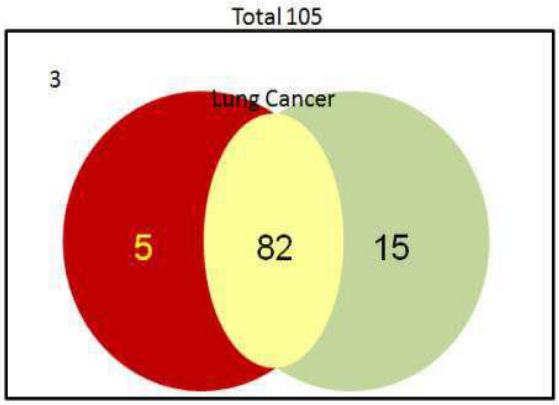
도면7


Vehicle
UBA6
USE1
(Scale: 100 um)
Number of invaded cells
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
Vehicle
UBA6
USE1

도면8



도면9



Lung cancer 105쌍중 UBA6 또는 USE1이 증가한 경우는 103 쌍임 (98%)

서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Ulsan University

<120> Use of Uba6 or Use1 as a diagnostic marker of cancer

<130> pn1505-130

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 3159

<212> DNA

<213> UBA6 cDNA sequence

<400> 1

atggaaggat ccgagcctgt ggccgcccat caggggggaag aggcgtcctg ttcttcctgg 60

gggactggca gcacaaataa aaatttgccc attatgtcaa cagcatctgt ggaaatcgat 120

gatgcattgt atagtcgaca gaggtacgtt cttggagaca cagcaatgca gaagatggcc 180

aagtcccatg ttttcttaag tgggatgggt ggtcttggtt tggaaattgc aaagaatctt 240

gttcttgcag ggattaaggc agttacaatt catgatacag aaaaatgcca agcatgggat 300

ctaggaacca acttctttct cagtgaagat gatgttgtta ataagagaaa cagggctgaa 360

gctgtactta aacatattgc agaactaaat ccatacgttc atgtcacatc atcttctgtt 420

cctttcaatg agaccacaga tctctccttt ttagataaat accagtgtgt agtattgact 480

gagatgaaac ttccattgca gaagaagatc aatgactttt gccgttctca gtgccctcca 540

attaagttta tcagtgcaga tgtacatgga atttggtcaa ggttattttg tgatttcggt 600

gatgaatttg aagttttaga tacaacagga gaagaaccaa aagaaatttt catttcaaac 660

ataacgcaag caaatcctgg cattgttact tgccttgaaa atcatcctca caaactggag 720

acaggacaat tcctaacatt tcgagaaatt aatggaatga caggtttaaa tggatctata 780

caacaaataa cggtgatatc gccattttct tttagtattg gtgacaccac agaactggaa 840

ccatatttac atggaggcat agctgtccaa gttaagactc ctaaaacagt ttttttgaa 900

tcactggaga ggcagttaaa acatccaaag tgccttattg tggattttag caaccctgag 960

gcacctttag agattcacac agctatgctt gccttggacc agtttcagga gaaatacagt 1020

cgcaagccaa atgttggatg ccaacaagat tcagaagaac tgttgaaact agcaacatct 1080

ataagtgaaa ccttggaaga gaagcctgat gtaaatgctg acattgtgca ttggctctct 1140

tggactgccc aaggcttttt atctccactt gctgcagcag taggaggtgt tgccagccaa 1200

gaagtattga aagctgtaac aggaaaattt tctcctttgt gccagtggtt atatcttgaa 1260

gcagcagata ttgttgaatc actaggcaaa cctgaatgtg aagaatttct cccacgagga 1320

gatagatatg atgccttaag agcttgcatt ggagacactt tgtgtcagaa actgcaaaat 1380

ttaaacatct tcttagtagg gtgtggagcc ataggctgtg aaatgttgaa aaattttgct 1440

ttacttggtg ttggcacaag caaagagaaa ggaatgatta cagttacaga tcctgacttg 1500

atagagaaat ccaacttaaa tagacagttc ctatttcgtc ctcatcacat acagaaacct 1560

aaaagctaca ctgctgctga tgctactctg aaaataaatt ctcaaataaa gatagatgca 1620

cacctgaaca aagtatgtcc aaccactgag accatttaca atgatgagtt ctatactaaa 1680

caagatgtaa ttattacagc attagataat gtggaagcca ggagatacgt agacagtcgt 1740

tgcttagcaa atctaaggcc tcttttagat tctggaacaa tgggcactaa gggacacact 1800

gaagttattg taccgcattt gactgagtct tacaatagtc atcgggatcc cccagaagag 1860

gaaataccat tttgtactct aaaatccttt ccagctgcta ttgaacatac catacagtgg 1920

gcaagagata agtttgaaag ttccttttcc cacaaacctt cattgtttaa caaattttgg 1980

caaacctatt catctgcaga agaagtctta cagaagatac agagtggaca cagtttagaa 2040

ggctgttttc aagttataaa gttacttagc agaagaccta gaaattggtc ccagtgtgta 2100

gaattagcaa gattaaagtt tgaaaaatat tttaaccata aggctcttca gcttcttcac 2160

tgtttccctc tggacatacg attaaaagat ggcagtttat tttggcagtc accaaagagg 2220

ccaccctctc caataaaatt tgatttaaat gagcctttgc acctcagttt ccttcagaat 2280

gctgcaaaac tatatgctac agtatattgt attccatttg cagaagagga cttatcagca 2340

gatgccctct tgaatattct ttcagaagta aagattcagg aattcaagcc ttccaataag 2400

gttgttcaaa cagatgaaac tgcaaggaaa ccagaccatg ttcctattag cagtgaagat 2460

gagaggaatg caattttcca actagaaaag gctattttat ctaatgaagc caccaaaagt 2520

gaccttcaga tggcagtgct ttcatttgaa aaagatgatg atcataatgg acacatagat 2580

ttcatcacag ctgcatcaaa tcttcgtgcc aaaatgtaca gcattgaacc agctgaccgt 2640

ttcaaaacaa agcgcatagc tggtaaaatt atacctgcta tagcaacaac cactgctaca 2700

gtttctggct tggttgcctt ggagatgatc aaagtaactg gtggctatcc atttgaagct 2760

tacaaaaatt gttttcttaa cttagccatt ccaattgtag tatttacaga gacaactgaa 2820

gtaaggaaaa ctaaaatcag aaatggaata tcatttacaa tttgggatcg atggaccgta 2880

catggaaaag aagatttcac cctcttggat ttcataaatg cagtcaaaga gaagtatgga 2940

attgagccaa caatggtggt acagggagtc aaaatgcttt atgttcctgt aatgcctggt 3000

catgcaaaaa gattgaagtt aacaatgcat aaacttgtaa aacctactac tgaaaagaaa 3060

tatgtggatc ttactgtgtc atttgctcca gacattgatg gagatgaaga tttgccggga 3120

cctccagtaa gatactactt cagtcatgac actgattaa 3159

<210> 2

<211> 1052

<212> PRT

<213> UBA6 Protein sequence

<400> 2

Met Glu Gly Ser Glu Pro Val Ala Ala His Gln Gly Glu Glu Ala Ser
1 5 10 15

Cys Ser Ser Trp Gly Thr Gly Ser Thr Asn Lys Asn Leu Pro Ile Met
20 25 30

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

35 40 45

Tyr Val Leu Gly Asp Thr Ala Met Gln Lys Met Ala Lys Ser His Val
50 55 60
Phe Leu Ser Gly Met Gly Gly Leu Gly Leu Glu Ile Ala Lys Asn Leu
65 70 75 80
Val Leu Ala Gly Ile Lys Ala Val Thr Ile His Asp Thr Glu Lys Cys
85 90 95
Gln Ala Trp Asp Leu Gly Thr Asn Phe Phe Leu Ser Glu Asp Asp Val
100 105 110
Val Asn Lys Arg Asn Arg Ala Glu Ala Val Leu Lys His Ile Ala Glu

115 120 125
Leu Asn Pro Tyr Val His Val Thr Ser Ser Ser Val Pro Phe Asn Glu
130 135 140
Thr Thr Asp Leu Ser Phe Leu Asp Lys Tyr Gln Cys Val Val Leu Thr
145 150 155 160
Glu Met Lys Leu Pro Leu Gln Lys Lys Ile Asn Asp Phe Cys Arg Ser
165 170 175
Gln Cys Pro Pro Ile Lys Phe Ile Ser Ala Asp Val His Gly Ile Trp
180 185 190

Ser Arg Leu Phe Cys Asp Phe Gly Asp Glu Phe Glu Val Leu Asp Thr
195 200 205
Thr Gly Glu Glu Pro Lys Glu Ile Phe Ile Ser Asn Ile Thr Gln Ala
210 215 220
Asn Pro Gly Ile Val Thr Cys Leu Glu Asn His Pro His Lys Leu Glu
225 230 235 240
Thr Gly Gln Phe Leu Thr Phe Arg Glu Ile Asn Gly Met Thr Gly Leu
245 250 255
Asn Gly Ser Ile Gln Gln Ile Thr Val Ile Ser Pro Phe Ser Phe Ser

260 265 270
Ile Gly Asp Thr Thr Glu Leu Glu Pro Tyr Leu His Gly Gly Ile Ala
275 280 285

Val Gln Val Lys Thr Pro Lys Thr Val Phe Phe Glu Ser Leu Glu Arg
290 295 300
Gln Leu Lys His Pro Lys Cys Leu Ile Val Asp Phe Ser Asn Pro Glu
305 310 315 320
Ala Pro Leu Glu Ile His Thr Ala Met Leu Ala Leu Asp Gln Phe Gln
325 330 335

Glu Lys Tyr Ser Arg Lys Pro Asn Val Gly Cys Gln Gln Asp Ser Glu
340 345 350
Glu Leu Leu Lys Leu Ala Thr Ser Ile Ser Glu Thr Leu Glu Glu Lys
355 360 365
Pro Asp Val Asn Ala Asp Ile Val His Trp Leu Ser Trp Thr Ala Gln
370 375 380
Gly Phe Leu Ser Pro Leu Ala Ala Ala Val Gly Gly Val Ala Ser Gln
385 390 395 400
Glu Val Leu Lys Ala Val Thr Gly Lys Phe Ser Pro Leu Cys Gln Trp
405 410 415
Leu Tyr Leu Glu Ala Ala Asp Ile Val Glu Ser Leu Gly Lys Pro Glu
420 425 430
Cys Glu Glu Phe Leu Pro Arg Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Leu Arg Ala
435 440 445
Cys Ile Gly Asp Thr Leu Cys Gln Lys Leu Gln Asn Leu Asn Ile Phe
450 455 460
Leu Val Gly Cys Gly Ala Ile Gly Cys Glu Met Leu Lys Asn Phe Ala
465 470 475 480

Leu Leu Gly Val Gly Thr Ser Lys Glu Lys Gly Met Ile Thr Val Thr
485 490 495
Asp Pro Asp Leu Ile Glu Lys Ser Asn Leu Asn Arg Gln Phe Leu Phe
500 505 510
Arg Pro His His Ile Gln Lys Pro Lys Ser Tyr Thr Ala Ala Asp Ala
515 520 525
Thr Leu Lys Ile Asn Ser Gln Ile Lys Ile Asp Ala His Leu Asn Lys
530 535 540

Val Cys Pro Thr Thr Glu Thr Ile Tyr Asn Asp Glu Phe Tyr Thr Lys

545 550 555 560

Gln Asp Val Ile Ile Thr Ala Leu Asp Asn Val Glu Ala Arg Arg Tyr

565 570 575

Val Asp Ser Arg Cys Leu Ala Asn Leu Arg Pro Leu Leu Asp Ser Gly

580 585 590

Thr Met Gly Thr Lys Gly His Thr Glu Val Ile Val Pro His Leu Thr

595 600 605

Glu Ser Tyr Asn Ser His Arg Asp Pro Pro Glu Glu Glu Ile Pro Phe

610 615 620

Cys Thr Leu Lys Ser Phe Pro Ala Ala Ile Glu His Thr Ile Gln Trp

625 630 635 640

Ala Arg Asp Lys Phe Glu Ser Ser Phe Ser His Lys Pro Ser Leu Phe

645 650 655

Asn Lys Phe Trp Gln Thr Tyr Ser Ser Ala Glu Glu Val Leu Gln Lys

660 665 670

Ile Gln Ser Gly His Ser Leu Glu Gly Cys Phe Gln Val Ile Lys Leu

675 680 685

Leu Ser Arg Arg Pro Arg Asn Trp Ser Gln Cys Val Glu Leu Ala Arg

690 695 700

Leu Lys Phe Glu Lys Tyr Phe Asn His Lys Ala Leu Gln Leu Leu His

705 710 715 720

Cys Phe Pro Leu Asp Ile Arg Leu Lys Asp Gly Ser Leu Phe Trp Gln

725 730 735

Ser Pro Lys Arg Pro Pro Ser Pro Ile Lys Phe Asp Leu Asn Glu Pro

740 745 750

Leu His Leu Ser Phe Leu Gln Asn Ala Ala Lys Leu Tyr Ala Thr Val

755 760 765

Tyr Cys Ile Pro Phe Ala Glu Glu Asp Leu Ser Ala Asp Ala Leu Leu

770 775 780

Asn Ile Leu Ser Glu Val Lys Ile Gln Glu Phe Lys Pro Ser Asn Lys

785 790 795 800

Val Val Gln Thr Asp Glu Thr Ala Arg Lys Pro Asp His Val Pro Ile

805 810 815

Ser Ser Glu Asp Glu Arg Asn Ala Ile Phe Gln Leu Glu Lys Ala Ile

820 825 830

Leu Ser Asn Glu Ala Thr Lys Ser Asp Leu Gln Met Ala Val Leu Ser

835 840 845

Phe Glu Lys Asp Asp Asp His Asn Gly His Ile Asp Phe Ile Thr Ala

850 855 860

Ala Ser Asn Leu Arg Ala Lys Met Tyr Ser Ile Glu Pro Ala Asp Arg

865 870 875 880

Phe Lys Thr Lys Arg Ile Ala Gly Lys Ile Ile Pro Ala Ile Ala Thr

885 890 895

Thr Thr Ala Thr Val Ser Gly Leu Val Ala Leu Glu Met Ile Lys Val

900 905 910

Thr Gly Gly Tyr Pro Phe Glu Ala Tyr Lys Asn Cys Phe Leu Asn Leu

915 920 925

Ala Ile Pro Ile Val Val Phe Thr Glu Thr Thr Glu Val Arg Lys Thr

930 935 940

Lys Ile Arg Asn Gly Ile Ser Phe Thr Ile Trp Asp Arg Trp Thr Val

945 950 955 960

His Gly Lys Glu Asp Phe Thr Leu Leu Asp Phe Ile Asn Ala Val Lys

965 970 975

Glu Lys Tyr Gly Ile Glu Pro Thr Met Val Val Gln Gly Val Lys Met

980 985 990

Leu Tyr Val Pro Val Met Pro Gly His Ala Lys Arg Leu Lys Leu Thr

995 1000 1005

Met His Lys Leu Val Lys Pro Thr Thr Glu Lys Lys Tyr Val Asp Leu

1010 1015 1020

Thr Val Ser Phe Ala Pro Asp Ile Asp Gly Asp Glu Asp Leu Pro Gly

1025 1030 1035 1040

Pro Pro Val Arg Tyr Tyr Phe Ser His Asp Thr Asp

1045 1050

<210> 3

<211> 1065

<212> DNA

<213> USE1 cDNA sequence

<400> 3

atggcggaga gtccgactga ggaggcggca acggcgggcg ccggggcggc gggccccggg 60

gcgagcagcg ttgctggtgt tgttggcgtt agcggcagcg gcggcgggtt cgggccgcct 120

ttcctgccgg atgtgtgggc ggcggcggcg gcagcgggcg gggccggggg cccggggagc 180

ggcctggctc cgctgcccgg gctcccgccc tcagccgctg cccacggggc cgcgctgctt 240

agccactggg accccacgct cagctccgac tgggacggcg agcgcaccgc gccgcagtgt 300

ctactccgga tcaagcggga tatcatgtcc atttataagg agcctcctcc aggaatgttc 360

gttgtacctg atactgttga catgactaag attcatgcat tgatcacagg cccatttgac 420

actccttatg aaggggttt cttcctgttc gtgtttcggt gtccgcccga ctatcccatc 480

cacccacctc gggtcaaact gatgacaacg ggcaataaca cagtgaggtt taaccccaac 540

ttctaccgca atgggaaagt ctgcttgagt attctaggta catggactgg acctgcctgg 600

agcccagccc agagcatctc ctcagtgctc atctctatcc agtccctgat gactgagaac 660

ccctatcaca atgagcccgg ctttgaacag gagagacatc caggagacag caaaaactat 720

aatgaatgta tccggcacga gaccatcaga gttgcagtct gtgacatgat ggaaggaaag 780

tgtccctgtc ctgaacccct acgaggggtg atggagaagt cctttctgga gtattacgac 840

ttctacgagg tggcctgcaa agatcgcctg caccttcaag gccaaactat gcaggaccct 900

tttggagaga agcggggcca ctttgactac cagtccctct tgatgcgcct gggactgata 960

cgtcagaaag tgctggagag gctccataat gagaatgcag aaatggactc tgatagcagt 1020

tcatctggga cagagacaga ccttcatggg agcctgaggg tttag 1065

<210> 4

<211> 354

<212> PRT

<213> USE1 Protein sequence

<400> 4

Met Ala Glu Ser Pro Thr Glu Glu Ala Ala Thr Ala Gly Ala Gly Ala

1 5 10 15

Ala Gly Pro Gly Ala Ser Ser Val Ala Gly Val Val Gly Val Ser Gly
20 25 30
Ser Gly Gly Gly Phe Gly Pro Pro Phe Leu Pro Asp Val Trp Ala Ala
35 40 45
Ala Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Pro Gly Ser Gly Leu Ala Pro
50 55 60
Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ser Ala Ala Ala His Gly Ala Ala Leu Leu
65 70 75 80

Ser His Trp Asp Pro Thr Leu Ser Ser Asp Trp Asp Gly Glu Arg Thr
85 90 95
Ala Pro Gln Cys Leu Leu Arg Ile Lys Arg Asp Ile Met Ser Ile Tyr
100 105 110
Lys Glu Pro Pro Pro Gly Met Phe Val Val Pro Asp Thr Val Asp Met
115 120 125
Thr Lys Ile His Ala Leu Ile Thr Gly Pro Phe Asp Thr Pro Tyr Glu
130 135 140
Gly Gly Phe Phe Leu Phe Val Phe Arg Cys Pro Pro Asp Tyr Pro Ile

145 150 155 160
His Pro Pro Arg Val Lys Leu Met Thr Thr Gly Asn Asn Thr Val Arg
165 170 175
Phe Asn Pro Asn Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Val Cys Leu Ser Ile Leu
180 185 190
Gly Thr Trp Thr Gly Pro Ala Trp Ser Pro Ala Gln Ser Ile Ser Ser
195 200 205
Val Leu Ile Ser Ile Gln Ser Leu Met Thr Glu Asn Pro Tyr His Asn
210 215 220

Glu Pro Gly Phe Glu Gln Glu Arg His Pro Gly Asp Ser Lys Asn Tyr
225 230 235 240
Asn Glu Cys Ile Arg His Glu Thr Ile Arg Val Ala Val Cys Asp Met
245 250 255
Met Glu Gly Lys Cys Pro Cys Pro Glu Pro Leu Arg Gly Val Met Glu
260 265 270

Lys Ser Phe Leu Glu Tyr Tyr Asp Phe Tyr Glu Val Ala Cys Lys Asp

275 280 285

Arg Leu His Leu Gln Gly Gln Thr Met Gln Asp Pro Phe Gly Glu Lys

290 295 300

Arg Gly His Phe Asp Tyr Gln Ser Leu Leu Met Arg Leu Gly Leu Ile

305 310 315 320

Arg Gln Lys Val Leu Glu Arg Leu His Asn Glu Asn Ala Glu Met Asp

325 330 335

Ser Asp Ser Ser Ser Ser Gly Thr Glu Thr Asp Leu His Gly Ser Leu

340 345 350

Arg Val