



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0067627
(43) 공개일자 2020년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57438 (2019.01)
(21) 출원번호 10-2018-0154681
(22) 출원일자 2018년12월04일
심사청구일자 2018년12월04일

(71) 출원인
재단법인대구경북과학기술원
대구 달성군 현풍면 테크노중앙대로 333,
기초과학연구원
대전광역시 유성구 엑스포로 55(도룡동)
(72) 발명자
윤중혁
대구광역시 동구 반야월로 360, 101동 605호 (신
서동, 각산역 더뉴클래스2차)
황대희
대구광역시 달서구 조암남로 10, 106동 1304호 (월
성동, 월성 e-편한세상)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

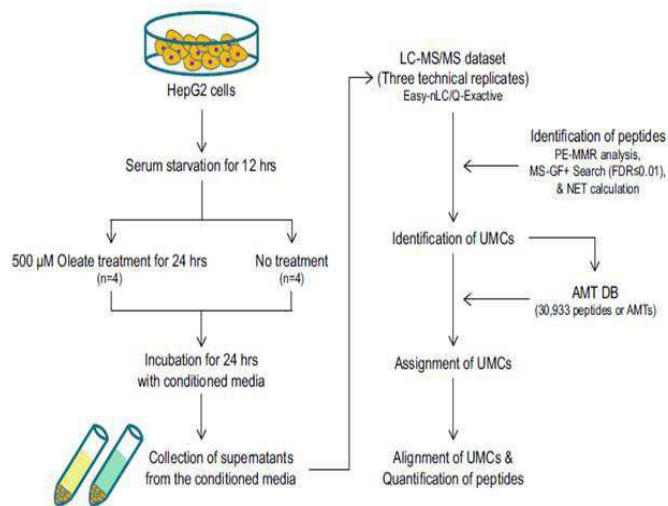
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신규한 간암 진단 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 간암 진단 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 간암을 예측 및 진단하기 위한 신규한 바이오 마커 조성물, 간암 진단용 조성물, 간암 진단 키트 및 간암을 예측 및 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규한 간암 진단 마커들은 단일 불포화 지방산에 의한 증식성 간암세포에서 발현수준이 증가되어 있는 것으로 확인됨에 따라 이들 마커들을 간암 진단을 위한 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

류성호

경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 5동 204호 (지곡동, 교수아파트)

박소연

서울특별시 강북구 한천로150길 6-5 (수유동)

박지환

서울특별시 마포구 양화로 45, 101동 3602호 (서교동, 메세나폴리스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 18-BR-02

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국뇌연구원

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 뇌발달 및 뇌질환의 원인규명, 진단 및 제어법 개발

기 여 율 1/3

주관기관 한국뇌연구원

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016K1A1A2912722

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌 연구실사업 (GRL)

연구과제명 당뇨병 치료를 위한 인슐린 수용체 이성질체의 특이적 조절 연구

기 여 율 1/3

주관기관 포항공과대학교

연구기간 2018.05.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 IBS-R013-A1

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 캠퍼스연구단사업

연구과제명 식물노화 및 생애 전주기의 총합적 분자 네트워크 및 시공간적 역동성 규명

기 여 율 1/3

주관기관 기초과학연구원

연구기간 2017.01.01 ~ 2018.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

하기 표에 기재된 18개의 유전자들 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는, 간암을 예측 및 진단하기 위한 바이오 마커 조성물.

번호	UniProtKB accession	Entrez ID	약어	유전자명
1	Q96DT5	8701	DNAH11	dynein, axonemal, heavy chain 11
2	Q9BPW8	8508	NIPSNAP1	nipsnap homolog 1
3	O15067	5198	PFAS	phosphoribosylformylglycinamide synthase
4	Q6IN85	55671	PPP4R3A	protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A
5	Q8NI22	90411	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2
6	O43847	4898	NRDC	nardilysin convertase
7	Q86V81	10189	ALYREF	Aly/REF export factor
8	P51659	3295	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
9	Q14651	5357	PLS1	plastin 1
10	P20142	5225	PGC	progastricsin (pepsinogen C)
11	Q9H993	79624	ARMT1	acidic residue methyltransferase 1
12	Q9UHG2	27344	PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor
13	Q9NYU2	56886	UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1
14	O95433	10598	AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)
15	P02795	4502	MT2A	metallothionein 2A
16	Q14696	23184	MESDC2	mesoderm development candidate 2
17	P06865	3073	HEXA	hexosaminidase subunit alpha
18	P19823	3698	ITIH2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유전자는 단일 불포화 지방산(monounsaturated fatty acid) 처리 시, 간암 세포에서 발현 수준이 증가하는 것을 특징으로 하는, 간암을 예측 및 진단하기 위한 바이오 마커 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 바이오 마커 조성물은 단일 불포화 지방산(monounsaturated fatty acid)에 의한 간암 세포의 증식 여부를 결정하는 것을 특징으로 하는, 간암을 예측 및 진단하기 위한 바이오 마커 조성물.

청구항 4

하기 표에 기재된 18개의 유전자들 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질 수준을

측정하는 물질을 포함하는, 간암 진단용 조성물.

번호	UniProtKB accession	Entrez ID	약어	유전자명
1	Q96DT5	8701	DNAH11	dynein, axonemal, heavy chain 11
2	Q9BPW8	8508	NIPSNAP1	nipsnap homolog 1
3	O15067	5198	PFAS	phosphoribosylformylglycinamide synthase
4	Q6IN85	55671	PPP4R3A	protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A
5	Q8NI22	90411	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2
6	O43847	4898	NRDC	nardilysin convertase
7	Q86V81	10189	ALYREF	Aly/REF export factor
8	P51659	3295	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
9	Q14651	5357	PLS1	plastin 1
10	P20142	5225	PGC	progastricsin (pepsinogen C)
11	Q9H993	79624	ARMT1	acidic residue methyltransferase 1
12	Q9UHG2	27344	PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor
13	Q9NYU2	56886	UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1
14	O95433	10598	AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)
15	P02795	4502	MT2A	metallothionein 2A
16	Q14696	23184	MESDC2	mesoderm development candidate 2
17	P06865	3073	HEXA	hexosaminidase subunit alpha
18	P19823	3698	ITIH2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 물질은 상기 표에 기재된 18개의 유전자들 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 항체인 것을 특징으로 하는, 간암 진단용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 간암 진단용 조성물은 단일 불포화 지방산(monounsaturated fatty acid)에 의한 간암세포의 증식 여부를 결정하는 것을 특징으로 하는, 간암 진단용 조성물.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 간암 진단용 조성물을 포함하는, 간암 진단 키트.

청구항 8

(a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 제1항의 표에 기재된 18개 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현양을 측정하는 단계; 및

(b) 정상 대조군 시료로부터 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현양을 측정하여 상기 (a) 단계의 측정 결과와 비교하는 단계를 포함하는,

간암을 예측 및 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 피검체로부터 분리된 간 조직, 간 세포 또는 간 세포 배양액인 것을 특징으로 하는, 간암을 예측 및 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현양이 정상 대조군에 비해 증가되어 있는 경우, 간암이 발병하였거나 증식성 간암인 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 간암을 예측 및 진단하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 간암은 단일 불포화 지방산(monounsaturated fatty acid)에 의한 암 세포 증식활성을 갖는 증식성 간암인 것을 특징으로 하는, 간암을 예측 및 진단하기 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 간암 진단 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 간암(hepatocellular carcinoma; HCC)은 세계적으로 가장 치명적인 암 중 하나이다. 특히 아시아와 사하라 이남 아프리카에서, 해마다 약 오십만명 이상이 간암으로 사망하고 있으며 우리나라의 경우도 해마다 간암 환자수가 증가하고 있다. 간암의 발생은 p53이나 p16^{INK4A}과 같은 종양 억제제 유전자의 불활성화로 발병되기도 하고, 그 밖에 잘 알려지지 않은 발암유전자(oncogene)에 의해 활성화된다. 그 외, 간 조직에 B형 간염과 C형 간염 바이러스의 감염 및 아플라톡신 β1의 노출이 그 원인으로 보고되고 있으며, TGF-α(transforming growth factor α) 및 TGF-β와 같은 몇 가지 성장인자(growth factor)들이 간암의 진행기작에 연관됨이 보고되고 있다. 이 외에도 DNA 돌연변이와 유전자 발현의 유전적 변화(genetic alteration)등이 간암의 환자조직에서 확인된다는 보고가 있다.

[0003] 한편, 간암의 근본적 치료로 간절제술이 있으나, 초기에 진단받은 30~40%만이 수술적 치료를 할 수 있으며, 수술을 시행할 수 없는 진행된 간암에 대한 보존적 항암치료는 효과가 낮고 재발율이 높아 초기 진단이 매우 중요시되고 있다.

[0004] 현재 간암 진단을 위해 사용되는 방법으로는 초음파 검사, CT 검사, MRI 검사 등의 화상 진단 검사, 혈청 검사(AFP, PIVKA-II) 및 생검 재료의 병리 조직 검사가 이용되고 있다.

[0005] 또한 최근에는 암을 초기에 진단하기 위하여 종양 마커를 이용한 진단방법이 사용되고 있는데, 종양 마커의 경우 특정 암 세포에서 과발현되는 경우가 많기 때문에 종양 마커가 기준치 이상으로 발현되었다는 것이 확인되면 바로 특정 장기의 암을 진단할 수 있기 때문이다. 또한 종양 마커를 이용한 암의 진단은 대부분 항체를 이용한 혈액 검사방법으로 수행되고 있으며, 일부는 조직 추출액, 소변, 대변 등을 이용하여 검사하기도 한다. 간암의 대표적인 종양 마커로는 알파-페토프로틴, 즉, 알파태아단백(Alpha-Fetoprotein:AFP)이 사용되고 있는데, AFP는 간세포가 형질전환되어 암세포로 탈분화 되었을 때 비정상적으로 생성되는 당단백질로서, 원발성 간암, 간염, 간경변 및 태아성암 등의 발견과 치료경과의 관찰에 이용되고 있다.

[0006] 그러나 종래 사용되고 있는 AFP 간암 마커의 경우, 이에 대한 진단율은 40~50%에 불과하고 지방간이나 간염 환자들과의 차이가 나질 않는다는 단점이 있다. 따라서 이런 단점을 보강하여 초기 간암의 진단율을 효과적으로

증가시킬 수 있는 새로운 종양 마커의 개발이 시급한 실정이다.

[0007] 한편, 지방산(fatty acid)은 높은 증식율을 보이는 암에서 증가되어 있는 것으로 보고되고 있으며, 암 세포로부터 분비 단백질을 조절하는 것으로 알려져 있다. 예로, 리놀레익산(linoleic acid)은 유방암에서 플라즈미노겐 활성 억제제 1(plasminogen activator inhibitor-1)의 분비를 증가시키는 것으로 알려져 있고, 올레이트산(Oleate)은 유방암 세포에서 MMP9의 분비를 증가시켜 암의 침습을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 스테로이드 성 간암 세포에서 인터루킨-8의 분비를 증가시켜 간염의 발생가능성을 높이는 것으로 알려져 있다. 특히, 지방산의 종류 중에서 올레이트산은 포유동물에서 가장 풍부한 순환형 자유 지방산(circulating free FA)이며, 암 조직에서 지방산의 수준이 증가되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0008] 그러나 아직까지 단일불포화 지방산인 올레이트가 간암에 미치는 구체적인 영향 및 올레이트 지방산에 의해 간암 세포 또는 간암 조직에서 발현의 변화를 보이는 인자들에 대한 연구는 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0325766호

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-1351234호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 간암세포, 구체적으로는 단일불포화 지방산에 의한 증식성 간암세포에서 발현수준이 증가되어 있는 유전자들을 발굴하였고, 발굴된 이들 유전자들을 새로운 간암 진단용 바이오마커로 사용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 간암을 예측 및 진단하기 위한 신규한 바이오 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 신규한 간암 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 간암 진단용 조성물을 포함하는 간암 진단 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 간암을 예측 및 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 표에 기재된 18개의 유전자들 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는, 간암을 예측 및 진단하기 위한 바이오 마커 조성물을 제공한다.

번호	UniProtKB accession	Entrez ID	약어	유전자명
1	Q96DT5	8701	DNAH11	dynein, axonemal, heavy chain 11
2	Q9BPW8	8508	NIPSNAP1	nipsnap homolog 1
3	O15067	5198	PFAS	phosphoribosylformylglycinamide synthase
4	Q6IN85	55671	PPP4R3A	protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A
5	Q8NI22	90411	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2
6	O43847	4898	NRDC	nardilysin convertase
7	Q86V81	10189	ALYREF	Aly/REF export factor
8	P51659	3295	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
9	Q14651	5357	PLS1	plastin 1
10	P20142	5225	PGC	progastricsin (pepsinogen C)
11	Q9H993	79624	ARMT1	acidic residue methyltransferase 1
12	Q9UHG2	27344	PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor
13	Q9NYU2	56886	UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1
14	O95433	10598	AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)
15	P02795	4502	MT2A	metallothionein 2A
16	Q14696	23184	MESDC2	mesoderm development candidate 2
17	P06865	3073	HEXA	hexosaminidase subunit alpha
18	P19823	3698	ITIH2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2

[0016]

[0017]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자는 단일불포화 지방산 처리 시, 간암 세포에서 발현 수준이 증가하는 것일 수 있다.

[0018]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 바이오 마커 조성물은 단일불포화 지방산에 의한 간암 세포의 증식 여부를 결정하는 것일 수 있다.

[0019]

또한, 본 발명은 상기 표에 기재된 18개의 유전자들 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 간암 진단용 조성물을 제공한다.

[0020]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 물질은 상기 표에 기재된 18개의 유전자들 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 항체일 수 있다.

[0021]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간암 진단용 조성물은 단일불포화 지방산에 의한 간암세포의 증식 여부를 결정하는 것일 수 있다.

[0022]

또한 본 발명은 상기 본 발명의 간암 진단용 조성물을 포함하는, 간암 진단 키트를 제공한다.

[0023]

나아가 본 발명은, (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 제1항의 표에 기재된 18개 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현양을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 대조군 시료로부터 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현양을 측정하여 상기 (a) 단계의 측정 결과와 비교하는 단계를 포함하는, 간암을 예측 및 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0024]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 생물학적 시료는 피검체로부터 분리된 간 조직, 간 세포 또는 이들의 배양액일 수 있다.

[0025]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현양이 정상 대조군에 비해 증가되어 있는 경우, 간암이 발병하였거나 증식성 간암인 것으로 판단하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0026]

본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간암은 단일불포화 지방산에 의한 암 세포 증식활성을 갖는 증식성 간암일

수 있다.

발명의 효과

[0027] 본 발명은 간암을 예측 및 진단하기 위한 신규한 바이오 마커 조성물, 간암 진단용 조성물, 간암 진단 키트 및 간암을 예측 및 진단하기 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규한 간암 진단 마커들은 간암 발생의 원인이 되는 단일불포화 지방산을 처리할 경우, 발현이 증가되는 것으로 확인됨에 따라 이들 마커들을 간암 진단을 위한 용도로 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 본 발명의 일실시예에서 간암세포주(HepG2)를 대상으로 올레이트 처리에 따른 분비 단백질체의 변화 양상을 분석하기 위한 실험과정을 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는 올레이트 처리에 따른 간암세포주의 세포증식 촉진 작용을 확인한 것으로, 2a는 올레이트 처리 농도별 간암세포의 증식 정도를 확인한 것이고, 2b는 팔미테이트와 올레이트를 함께 처리한 군 및 올레이트 단독 처리 군에서의 간암 세포의 증식 정도를 비교 분석한 것이다.

도 3은 올레이트를 처리한 군(Ole-CM#) 및 올레이트를 처리하지 않은 군(NT-CM#)에서의 LC-MS/MS 실험에 따른 베이스 피크의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 4는 LC-MS/MS 분석에 의해 수득한 24개의 LC-MS/MS 데이터세트에 대한 ID (4a) 및 강도(4b)에 대한 유사도를 히트맵(heat map) 형식으로 나타낸 것으로, 올레이트 처리군은 'Oleate treated' 로, 올레이트 미처리군은 'Control' 로 나타내었고, 칼라 막대기는 유사도 점수의 정도를 나타낸 것이다.

도 5는 올레이트 처리군 및 올레이트 미처리군에 대한 MS-GF+ 분석 결과로 동정된 펩타이드 수와(도 5a), AMT-DB를 이용하여 동정한 펩타이드 수를 나타낸 것이다(도 5b).

도 6은 간암 세포주에서 올레이트 처리에 의해 상향 조절된 분비 단백질들을 세포 기능별로 분석하여 분류한 것을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명은 간암을 예측 및 진단할 수 있는 신규한 바이오마커 및 이의 용도를 제공함에 특징이 있다.

[0030] 본 발명자들은 간암을 정확하고 효과적으로 예측 및 진단할 수 있는 바이오마커를 발굴하기 위해 연구하던 중, 간암 세포주를 대상으로 단일불포화 지방산을 처리한 군과 처리하지 않은 군에서 발현 수준의 차이를 보이는 유전자들을 동정하였다.

[0031] 구체적으로 단일불포화 지방산의 종류 중, 올레이트가 암 세포의 증식을 유도하는 것을 하기 실험을 통해 확인하였으며, 올레이트 처리에 의해 간암 세포에서 발현이 증가되는 유전자들을 분비 단백질체의 프로파일 분석을 통해 동정하였고, 이 중에서 최종 총 18개의 유전자들을 간암의 예측 및 진단을 위한 신규한 바이오 마커로 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0032] 따라서 본 발명은 하기 표에 기재된 18개의 유전자들 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는, 간암을 예측 및 진단하기 위한 바이오 마커 조성물을 제공할 수 있다.

번호	UniProtKB accession	Entrez ID	약어	유전자명
1	Q96DT5	8701	DNAH11	dynein, axonemal, heavy chain 11
2	Q9BPW8	8508	NIPSNAP1	nipsnap homolog 1
3	O15067	5198	PFAS	phosphoribosylformylglycinamide synthase
4	Q6IN85	55671	PPP4R3A	protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A
5	Q8NI22	90411	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2
6	O43847	4898	NRDC	nardilysin convertase
7	Q86V81	10189	ALYREF	Aly/REF export factor
8	P51659	3295	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4
9	Q14651	5357	PLS1	plastin 1
10	P20142	5225	PGC	progastricsin (pepsinogen C)
11	Q9H993	79624	ARMT1	acidic residue methyltransferase 1
12	Q9UHG2	27344	PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor
13	Q9NYU2	56886	UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1
14	O95433	10598	AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)
15	P02795	4502	MT2A	metallothionein 2A
16	Q14696	23184	MESDC2	mesoderm development candidate 2
17	P06865	3073	HEXA	hexosaminidase subunit alpha
18	P19823	3698	ITIH2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2

[0033]

[0034]

또한, 상기 표에 기재된 18개의 유전자들은 올레이트에 의한 간암 세포의 증식 여부를 결정할 수 있는데, 즉 상기 18개의 유전자들 중에서 선택된 하나 이상의 유전자의 발현이 환자로부터 수득한 시료에서 정상 대조군에 비해 증가되어 있는 경우, 간암 세포의 증식 가능성 또는 간암의 발병 가능성이 있다고 판단할 수 있다.

[0035]

따라서 본 발명은 상기 표에 기재된 18개의 유전자들 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 대한 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하는 물질을 포함하는, 간암 진단용 조성물을 제공할 수 있다.

[0036]

또한, 상기 물질은 상기 표에 기재된 18개의 유전자들 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 프라이머, 프로브 또는 항체일 수 있다.

[0037]

본 발명에서 상기 바이오마커란, 간암 발병 시, 간 조직 또는 간 세포에서 발현의 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 바이오마커는 정상 간 조직에 비해 단일불포화지방산, 바람직하게는 올레이트가 처리된 간 세포에서 발현량이 증가하는 상기 18개의 유전자 또는 상기 유전자들이 발현된 단백질일 수 있다.

[0038]

본 발명에서 유전자의 발현수준은, 바람직하게 상기 유전자가 발현된 mRNA 수준, 즉, mRNA의 양을 의미하며, 상기 수준을 측정할 수 있는 물질로는 상기 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 18개 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브는 상기 유전자의 전체 또는 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에서 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.

[0039]

본 발명에서 상기 프라이머란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 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 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.

[0040] 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.

[0041] 본 발명에서, 상기 프로브라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 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 메틸 포스포네이트 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, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 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.

[0042] 또한, 본 발명에서 상기 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질로는 상기 본 발명의 마커 유전자로부터 발현된 단백질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등의 항체를 포함할 수 있다.

[0043] 상기 “항체”는 당해 기술분야의 일반적 기술자가 공지된 기술을 이용하여 제조된 것을 사용할 수 있는데, 상기 항체의 제조는 예컨대, 다클론 항체의 경우에는 상기 단백질의 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 중 숙주로부터 제조가능하다. 단일클론 항체의 경우에는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마(hybridoma) 방법(Kohler et al., European Journal 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. 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 간암 진단용 마커 또는 상기 간암 진단용 조성물을 포함하는 간암 진단 키트를 제공할 수 있다.

[0044] 본 발명의 간암 진단 키트는 상기 마커 유전자의 발현 수준 또는 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있으며, 이들의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.

[0045] 본 발명의 간암 진단 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 litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 간암 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.

[0046] 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0047] 또한 본 발명은 상기 간암 진단용 바이오 마커를 포함하는 간암 진단용 마이크로어레이를 제공할 수 있다.

[0048] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 마커 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.

[0049] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0050] 나아가 본 발명은 간암을 예측 및 진단하기 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있는데, 바람직하게 상기 방법은 (a) 환자로부터 분리된 생물학적 시료로부터 제1항의 표에 기재된 18개 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현량을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 대조군 시료로부터 상기 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현량을 측정하여 상기 (a) 단계의 측정 결과와 비교하는 단계를 포함한다.

[0051] 상기에서 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 양을 측정하는 방법은 공지의 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"란 간암의 발생 또는 진행 정도에 따른 상기 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 있고, 바람직하게는 간암 조직, 간암 세포 또는 이들의 배양액일 수 있다.

[0053] 상기 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응, RNase 보호 분석법, 노던 블롯 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0054] 또한, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사선 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)등을 이용하여 수행할 수 있다.

[0055] 상기 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 상기 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. 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블롯, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.

[0056] 따라서 본 발명은 상기와 같은 검출 방법들을 통하여, 대조군의 마커 유전자의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양과 간암 환자 또는 간암 의심환자에서의 마커 유전자의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양을 확인할 수 있고, 상기 발현 양의 정도를 대조군과 비교함으로써 간암의 발병 여부, 진행단계 또는 예후 등을 예측 및 진단할 수 있다.

[0057] 보다 구체적으로 상기 간암의 발병을 예측 또는 진단하는 방법은 본 발명에 따른 마커 유전자의 발현 수준 또는 그 발현 단백질의 양이 정상 대조군 시료에 비해 증가되었을 경우, 간암이 유발하였거나 증식성 간암인 것으로 판단할 수 있다.

[0058] 또한, 상기 증식성 간암은 단일불포화 지방산에 의해 암 세포의 증식이 촉진된 증식성 간암일 수 있으며, 바람직하게 상기 단일불포화 지방산은 올레이트일 수 있다.

[0059] 이상 기술한 바와 같이, 본 발명에서 동정한 18개의 신규 간암 진단 및 예측용 바이오마커는 단일불포화 지방산에 의한 암세포 증식 활성을 갖는 간암 세포에서 발현이 증가되고 분비가 증가되는 분비 단백질로서, 이들 마커의 발현수준을 측정함으로써 간암을 손쉽게 예측 및 진단할 수 있다.

[0061] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0063] <준비에 및 실험방법>

[0064] 시약 및 세포배양

[0065] 소듐 올레이트(07501, St. Louis, MO) 및 소듐 팔미테이트(P9767, St. Louis, MO)는 시그마 알드리치사로부터 구입하였다. 소태아 혈청(BSA), fraction V 및 자유 지방산(fatty acid-free)(126575, San Diego, CA)은 칼바 이오켄으로부터 구입하여 사용하였다. 올레이트 또는 팔미테이트는 100% 메탄올에 용해하여 사용하였고, 자유지방산과 BSA를 결합시켰는데, 이때 지방산 대 BSA는 5:1의 몰비로 사용하였다. 또한 이들을 세포에 처리할 때에는 혈청이 없는 MEM(Minimum Essential Medium)로 희석하여 적절한 최종 농도를 제조하여 사용하였다. HepG2 세포는 MEM(Welgene, LM 007-07)배지를 이용하여 배양하였고, 이후 10%(v/v)의 FBS(Lonza), 2mM 글루타민 및 1% 페니실린-스트렙토마이신(Gibco)을 첨가하고 37℃, 5% CO₂ 및 95% 습도 조건에서 배양하였다.

[0067] 세포증식 어세이

[0068] 세포 증식은 비색 분석법으로 MTT (시그마 알드리치, M5655)를 사용하여 세포 생존 능력을 분석하였다. HepG2 세포를 96 웰 플레이트에 분주하고 24시간 동안 배양 후, 배지를 첨하지 않은 상태로 12시간 동안 배양한 다음, 24시간 동안 지방산을 첨가하여 배양하였고, 이후 세포분비체 분석(secretome analysis)을 위한 시료 준비를 하였다. 이때 대조군 시료는 지방산 대신 동일 농도의 메탄올 및 BSA를 처리한 것을 사용하였다. 세포에 0.5 mg/ml MTT 시약을 처리하고 페놀-레드 배지로 희석 후, 37℃ CO₂ 배양기에서 배양하였다. 2시간 후, 100 μl DMSO를 첨가하여 포르마잔 크리스탈을 용해시켰다. 강도측정은 540 nm 흡광도에서 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 측정하였다.

[0070] 시료제조

[0071] HepG2 세포를 지방산 처리 전 12시간 동안 기아 상태를 유지시킨 후, 이들 세포로부터 분비되는 분비인자(secretory factors)들의 제거를 위해 1xPBS로 3회 세척하였다. 올레익산이 처리된 시료의 제조를 위해 BSA-결합된 올레익산(Oleate)를 혈청이 없는 배지를 이용하여 최종 500μM의 농도가 되도록 희석하여 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 올레익산이 없는 혈청 없는 배지를 동일량으로 처리한 것을 사용하였다. 또한 컨디션화된 배지(conditioned media)는 보충되지 않은 혈청이 없는 배지로 교체하여 24시간 동안 37℃ CO₂ 배양기에서 배양하여 제조하였다. 이후 상기 배양배지를 3000rpm으로 4℃에서 10분 동안 원심분리하였고, 상층액을 수득하여 여과필터로 여과하여 오염물질들을 제거하였으며, 최종 수득한 컨디션화된 배지(conditioned media)는 동결건조기를 이용하여 건조시켜 시료를 제조하였다.

[0073] 단백질 추출 및 분해

[0074] 상기 방법으로 수득한 건조된 시료를 용해버퍼(urea, NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8.2))로 용해시키고 복합 미니 프로테아제 억제제 타블렛(Roche Applied Science, Basel, Switzerland)을 처리하였다. 이후 초원심분리기로 45,000xg로 4℃에서 1시간 동안 원심분리하였다. 이후, 상층액에 함유된 단백질을 DC protein assay (Bio-Rad, Hercules, USA)를 이용하여 정량하였고, 단백질 시료를 0.5M DTT(100 μl)를 이용하여 50분동안 37℃에서 환원반응 시켰다. 이후 1.5 μl의 1M iodoacetamide를 처리하고 암 조건에서 30분 동안 상온에서 알킬화 반응을 수행하였다. 반응이 완료된 시료를 트립신으로 분해(1:50 enzyme-to-protein ratio (w/w), Promega, Madison, WI, USA)반응 시켰는데 37℃에서 밤새도록 반응시켰다. 반응이 완료된 펩타이드 시료들은 2500xg로 10분 동안 상온에서 원심분리 하였으며, 수득한 수용액을 reverse-phase tC18 Sep-Pak solid-phase extraction cartridges를 이용한 고상 추출(solid-phase extraction)을 통해 탈염처리 하였다. 이후 최종적인 펩타이드를

50% ACN 및 0.5% HAcO의 용매를 이용하여 용출시켰으며, 스피브백에서 건조시키고 0.1% 포름산 용액으로 용해시켰다. 이후 상기 시료를 LC-MS/MS 분석이전까지 20℃에서 보관하였다.

[0076] LC-MS/MS 분석

[0077] 모든 펩타이드 시료들은 분석용 컬럼(Thermo Scientific, Easy-Column, 75 $\mu\text{m} \times 50\text{ cm}$) 및 트랩 컬럼(75 $\mu\text{m} \times 2\text{ cm}$)이 구비된 Thermo EASY-nLC 1000 (Thermo Scientific, Odense, Denmark) 장비를 이용하여 분리하였다. 이때 분석용 컬럼을 위한 작동 온도는 50℃가 되도록 하였고, 유속은 300 nl/min이 되도록 하였으며, 용매로 용매 A는 0.1% 포름산 및 2% 아세트니트릴이 함유된 물을 사용하였고 용매 B는 0.1% 포름산 및 2% 물이 함유된 아세트니트릴 용매를 사용하였다. 목적하는 단백질을 분석을 위해 120분 동안 농도 구배 조건으로 펩타이드를 분석하였으며, 상기 농도구배는 2~40% 용매 B로 90분간 용출, 40~80% 용매 B로 10분간 용출, 80% 용매 B로 10분간 용출, 80~2% 용매 B로 10분간 용출시켰다. LC로부터 분리된 펩타이드들은 nanoelectrospray 소스가 구비된 QExactive™ hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Scientific)를 이용하여 분석하였으며, 용출된 펩타이드의 이온화를 위해 전사분사 이온화의 전기적 포텐셜이 1.7 kV가 되도록 하였고, 탈용매 모세관(desolvation capillary)의 온도가 270℃가 되도록 하였다. 또한 Q-Exactive 질량분석기는 데이터 종속 모드에서 450~2000 Thomsons (Th)의 질량범위에 대한 조사 스캔들을 70,000의 해상도 (m/z 200)로 획득하도록 작동시켰다. 이후 MS/MS 분석을 위해, 2.0Th의 분리 윈도우를 사용하여 조사 스캔에서 가장 많이 함유된 상위 10개의 이온들을 선별하였고, 25 표준 충돌 에너지 및 10초의 제외 기간으로 설정된 높은 에너지 충돌해리(HCD) 방식으로 펩타이드 이온을 단편화하였다.

[0078] 이후 MS/MS 스캔들은 17,500의 해상도로 획득하였고, 전체 MS 및 MS/MS 스캔을 위한 최대 이온 주입시간은 각각 100ms 및 50ms로 하였다. 자동 게인 컨트롤(AGC) 목표 값은 전체 MS 및 MS/MS 스캔 각각에 대해 1.0×10^6 및 1.0×10^5 로 설정하였다.

[0080] 펩타이드 동정

[0081] 각 질량들의 스펙트럼은 MSConvert(ProteoWizard release: 3.0.4323) 방법을 이용하여 mzXML 파일로 생성되었다. MS 데이터는 1차적으로 탠덤 MS 데이터에 정확한 전구체 질량을 할당하기 위해 PE-MMR(postexperiment-monoisotopic mass refinement)을 사용하여 스펙트럼을 보정하였다. 또한 MS-GF + Beta (v10089) 분석 엔진을 사용하여 human-reference proteome (UniProtKB release 2015_11, 42,123개 단백질의 UniProtKB / Swiss-Prot 항목과 179 개의 일반적인 오염 단백질 목록이 포함된 복합 데이터베이스에 대해 target-decoy 설정으로 MS/MS 스펙트럼을 검색하였으며, 이때 다음의 파라미터들에 대한 분석을 수행하였다; semitryptic, 전구체 질량 허용 오차 10 ppm, 시스테인의 카르바미도메틸화를 고정 변형 옵션으로, 메티오닌 산화를 가변 변형 옵션으로 설정하였다. 또한 24개의 LC-MS/MS 데이터 세트의 검색 결과를 모두 결합하고, 타겟-디코이 분석을 상기 결합된 데이터 세트에 적용하여 거짓 검출율 (FDR)이 0.01 이하인 펩타이드를 동정하였다.

[0083] 비 표지 방식의 펩타이드의 정량분석

[0084] 동정된 펩타이드에 대해 각각 MS 강도를 할당하기 위해, 이전에 기술된 바와 같이 24 개의 LC-MS/MS 데이터 세트에 MS 강도 기반의 비 표지 방식의 정량화 방법을 적용 하였다. 간단하게, PE-MMR 분석을 통해 LC-MS/MS 실험에서 LC 용출 동안 특정 시간에서 연속적으로 나타난 펩타이드의 MS 스펙트럼들을 고유질량등급 (UMC)으로 분류하였다. 이상적으로, 각각의 UMC는 하나의 펩타이드에 상응하며, 펩타이드에 상응하는 이온들 및 그들의 전하 상태, 존재량 (강도), 스캔 번호 및 측정된 단일 동위원소 질량 등의 질량 스펙트럼 특징을 포함한다. 각 UMC에 대해 UMC에 속하는 모든 이온의 단일동위원소질량의 강도 가중 평균을 계산하여 UMC 질량을 계산하였다. UMC에 상응하는 펩타이드의 경우, 해당 펩타이드의 존재량은 UMC (UMC 강도)의 모든 이온 존재량의 합계로 평가하였다. 또한 PE-MMR으로 보정된 MS/MS 스펙트럼의 전구체 질량을 UMC 질량과 부합시킨 다음, 해당 값을 UMC의 질량으로 대체하였다. 이 과정에서 MS/MS 스펙트럼 정보는 부합된 UMC에 연동하였다. 연동된 MS/MS 스펙트럼은 이전 MS-GF + 검색 및 타겟-디코이 분석으로 계산된 $\text{FDR} \leq 0.01$ 의 펩타이드서열 (펩타이드 ID)에 할당되었다. 펩타이드 ID는 UMC에 할당되었고, UMC 강도는 펩타이드 ID의 강도 값으로 할당하였다.

[0086] 마스터 정밀질량/시간 태그 데이터베이스에 의한 UMC의 할당

[0087] 미확인된 UMC에 펩타이드 ID를 할당하기 위해 이전에 기술한대로 마스터 정밀 질량/시간 태그 (AMT) 데이터베이스 (DB)를 제작하여 사용하였다. 간단히 설명하면, 24개의 LC-MS/MS 데이터 (8개 시료를 3회 반복한 LC-MS/MS 분석)의 펩타이드 ID를 가진 UMC에 대한 정보를 마스터 AMT DB 형태로 수집하였다. AMT는 실험으로 측정된 단일 동위원소 질량(monoisotopic masses)과 표준화된 용출 시간 (NET)으로 결정되는 독특한 펩타이드 서열이며, 각 AMT에 상응하는 펩타이드가 여러 번 측정된 경우 펩타이드의 평균 질량 및 NET의 중앙값을 AMT에 기록하였다. 이후 ± 10 p.p.m.의 질량 및 ± 0.02 의 NET 오차를 허용하여 미확인된 UMC를 마스터 AMT DB의 AMT에 매핑하였다. 매핑 과정에서 확인되지 않은 UMC가 질량 및 NET 허용 오차 내에서 AMT에 매핑된 것을 확인하고, AMT와 UMC의 MS/MS 스펙트럼 간의 유사성을 평가하기 위해 Xcorr 측정 값을 계산하였다. 마지막으로 미확인된 UMC는 Xcorr이 3.0보다 클 때 AMT와 일치하도록 결정하였고, AMT와 일치하는 각각의 미확인된 UMC에 대해 AMT에 대한 펩타이드 ID를 미확인된 UMC에 할당하였고, 이때 AMT (UMC mass 및 NET)에 대한 모든 정보를 함께 할당하였다.

[0089] 동정된 펩타이드의 정렬 과정

[0090] 마스터 AMT DB를 사용하여 미확인 UMC를 할당한 후, LC-MS/MS 데이터 세트의 할당 및 확인된 UMC를 nm 정렬 표 (m개 시료에서 나타난 n개의 UMC 및 UMC 강도에 대한 펩타이드 ID)로 정리하였다. 정렬 표의 누락된 값은 펩타이드가 해당 데이터 세트에서 확인되지 않았다는 것을 의미한다. 표의 각 행에 누락된 값을 채우기 위하여 UMC 질량 및 NET을 기준으로 정렬된 UMC와 일치할 가능성이 있는 미확인 UMC를 다음과 같은 오차 허용 기준으로 추가 검색하였다: 같은 시료에 대한 반복 데이터세트에 대해서는 ± 10 p.p.m. 질량오차 및 ± 0.01 NET 오차의 허용, 다른 실험 시료에 대해서는 ± 10 p.p.m. 질량오차 및 ± 0.02 NET 오차의 허용. 추가 검색으로 정렬표의 누락된 값을 추가한 뒤, 표에 나타난 UMC 강도에 대해 표본분위 표준화 (Quantile normalization)를 수행하여 데이터 세트 전반의 펩타이드 존재량을 보정하였다. 또한 LC-MS/MS 분석의 재현성을 평가를 위해, LC-MS/MS 데이터 세트 사이에서 중복되는 펩타이드 ID 개수와 펩타이드 강도를 측정하여 각각을 두 가지 유형의 유사성 점수 (ID 유사성, 강도 유사성)로 계산하였다.

[0092] 분비량이 유의하게 변하는 단백질의 동정

[0093] 올레이트 처리 유무에 따라 분비량이 유의하게 변하는 단백질 (differentially secreted proteins; DSP)을 확인하기 위해, 이전에 보고된 통합 통계 방법을 정렬 표의 UMC (펩타이드) 강도에 적용하여 유의하게 발현이 변하는 펩타이드 (DEpeptides)를 선택하였다. 해당 통계 방법을 간단히 설명하면, 올레이트 처리된 시료에서 각 펩타이드의 $\log_2$ - 강도를 Student 's t- 테스트 및 각 펩타이드에 대한 T- 값 및 $\log_2$ - 중간비를 결과로 하는 중위도 테스트에 의해 미처리된 대조군의 $\log_2$ - 강도와 비교하였다. 이후 24 개의 시료를 무작위로 1000번 반복하여 T 값과 $\log_2$ - 중간비의 경험적 귀무 분포를 추정하였다. 각 펩타이드에 대해 관찰된 T 값과 $\log_2$ - 중간비의 조정된 P 값은 양측 테스트를 통해 경험적 분포를 사용하여 계산하였고 Stouffer의 방법을 사용하여 통합된 P값을 계산하였다. DEpeptide는 다음과 같은 기준으로 정의되었다. 첫째, 올레이트를 처리, 혹은 처리하지 않은 조건 중 하나에서 적어도 6개의 시료에서 해당 펩타이드가 검출된 경우, 둘째, 펩타이드의 통합된 P 값이 0.05 미만이며 펩타이드의 $\log_2$ -비율의 절대값이 $\log_2$ - 중간비의 실험적 귀무 분포 상에서 95 백분위 이상인 경우, 해당 펩타이드를 DEpeptide로 동정하였다. 또한, 이렇게 얻은 DEpeptide에 추가로 올레이트의 처리 유무에 두 조건 중에서, 하나의 조건 하에서 모든 시료에서 검출이 되지 않았지만 다른 조건 하에서는 적어도 6개 시료에서 검출되는 펩타이드를 DEpeptides로 선택했다. 마지막으로, 올레이트 처리시 증가하거나 감소한 고유 DEpeptide 수가 2개 이상인 단백질에 대해서, 각각 증가하거나 감소한 DSP로 동정하였다.

[0095] 검출된 단백질 또는 DSPs의 기능적 분석

[0096] 검출된 단백질 또는 DSPs의 단백질 리스트들에 대한 Gene Ontology 생물학적 과정(GOBPs) 또는 Kyoto Encyclopedia의 Genes 및 Genomes (KEGG) 경로의 분석(enrichment analysis)을 DAVID 소프트웨어를 이용하여 분석하였다. 특정 단백질 목록을 대표하는 GOBP는 $P < 0.01$ 인 GOBP로 동정하였고, 세포 기능의 P 값은 시각화를

위해 $Z = -N^{-1}(P)$ 를 사용하여 Z- 점수로 변환하였으며 여기서 N^{-1} 은 역 표준 정규 분포를 나타낸다.

[0098] 웨스턴 블롯팅

[0099] 웨스턴 블롯팅을 위해 HepG2 세포를 프로테아제 각테일(Roche Diagnostics, Indianapolis, USA)이 함유된 용해 버퍼(10mM Tris-HCl, pH 7.4, 1.5mM EDTA, 10% Glycerol)를 이용하여 수집하였다. 이후 초음파 처리 및 원심분리를 수행하였고 브래드포드 시약으로 단백질을 정량하였다. 분비체(Secretome) 시료를 용해버퍼로 용해시키고 동결건조시켜 농축시킨 후, SDS 버퍼와 혼합하였다. 이후 6~16%의 농도구배 SDS-PAGE 겔 전기영동하고 니트로셀룰로스 막으로 이동시킨 후, 5% 스킵 밀크를 함유한 TBS-T 용액으로 30분 동안 블록킹을 수행한 다음, 1차 항체로 4℃에서 밤새도록 반응시켰고 이후 horseradish peroxidase가 결합된 항-마우스 또는 항-레빗 항체로 1시간 동안 반응시켰다. 이후 TBS-T 용액으로 멤브레인을 세척하고 ECL 용액을 이용하여 현상화시켜 단백질 발현 정도를 분석하였다.

[0100]

[0101] 데이터 이용

[0102] 질량 분석 프로테오믹스 데이터는 PRIDE (데이터 세트 식별자 PXD007906 및 10.6019 / PXD007906)를 통해 ProteomeXchange 컨소시엄에 기탁된 것을 사용하였다.

[0104] **<실시예 1>**

[0105] **올레이트 지방산 처리에 의한 간암 세포의 세포증식 여부 확인**

[0106] 본 발명자들은 먼저 올레이트 지방산이 간암 세포의 세포증식을 촉진하는 작용을 하는지 확인하기 위해, 올레이트를 각 농도별로 간암 세포주인 HepG2 세포에 처리한 후, MTT 분석을 통해 간암 세포의 증식 여부를 분석하였다.

[0108] 그 결과, 올레이트를 처리한 HepG2 세포군이 올레이트를 처리하지 않은 세포군에 비해 세포증식이 더 높은 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 통해 지방산인 올레이트가 간암 세포주의 세포 증식을 촉진할 수 있음을 알 수 있었다(도 2a 참조).

[0109] 한편, 포화지방산 중 하나인 팔미테이트(palmitate)는 암 세포의 증식을 억제하는 활성이 있는 것으로 알려져 있어, 본 발명자들은 올레이트의 암세포 증식 활성을 재확인하기 위해 올레이트 단독처리군 및 올레이트와 팔미테이트 복합처리군에서의 세포증식 정도를 분석하였다.

[0110] 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이, 올레이트 단독처리군이 올레이트와 팔미테이트의 복합처리군에 비해 암세포 증식이 현저히 높은 것으로 나타났다.

[0111] 이로써 지방산 중 하나인 올레이트는 간암세포의 세포증식을 촉진시키는 활성이 있음을 알 수 있었고, 올레이트에 의한 암세포 증식에 의해 간암이 발병 및 진행될 수 있음을 알 수 있었다.

[0112]

[0113] **<실시예 2>**

[0114] **올레이트 지방산 처리에 의해 발현수준의 변화를 보이는 간암세포주에서의 분비 단백질체 분석**

[0115] 나아가 본 발명자들은 실시예 1의 결과를 토대로, 올레이트 지방산에 의한 간암 발병여부 및 간암세포의 증식여부를 확인할 수 있는 바이오마커의 발굴을 위한 방법으로 질량분석 실험을 수행하였다. 간암 세포주인 HepG2 세포에 올레이트 지방산을 처리한 군과 처리하지 않은 군을 대상으로 상기 세포에서 분비되는 단백질을 중, 발현수준의 변화를 보이는 분비 단백질체들을 스크리닝하였다. 해당 분석 방법은 앞서 기술된 실험방법으로 수행하였고, 실험의 모식도는 도 1에 나타내었다. 또한 올레이트 처리군(n=4)과 미처리군(n=4)의 세포주에 대해 각각 3번씩 반복실험을 수행하여 결과를 추출하였다.

[0117] <2-1> LC-MS/MS 분석결과

[0118] 올레이트 지방산을 처리한 HepG2 세포군과 올레이트 미처리 HepG2 세포군의 배양배지를 수득한 후, 트립신 처리로 단백질을 가수분해하고, LC-MS/MS 분석을 수행하였다.

[0119] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 올레이트를 처리한 HepG2 세포군에 대해 12개의 LC-MS/MS 데이터세트를 수집하였고, 올레이트 미처리 HepG2 세포군에 대해 12개의 LC-MS/MS 데이터세트를 수집하여 총 24개의 LC-MS/MS 데이터세트를 얻었다.

[0121] <2-2> 펩타이드 동정

[0122] 상기 방법으로 수득한 24개의 LC-MS/MS 데이터세트에 대해 타겟 디코이 방법을 이용한 MS-GF+ 검색방법으로 PE-MMR 분석을 수행하여 펩타이드들의 특성을 분석하였고, 24개의 데이터세트로부터 확인된 UMC(고유질량등급:unique mass class)를 이용하여 30,933개의 펩타이드를 포함하는 마스터 AMT DB를 구축하였다. 이후 AMT DB를 사용하여 개별 시료의 미확인된 UMC에 대한 질량 및 NET 허용 오차를 사용하여 DB의 펩타이드와 일치시킨 다음, 일치된 펩타이드에 대해 ID를 할당하였다. AMT DB 검색 후 펩타이드는 24 개의 LC-MS/MS 데이터 세트에서 UMC 강도로 정량화시킨 다음 정렬표로 정리하였다. Quantile normalization에 의해 정상화된 펩타이드 존재량(peptide abundances; UMC 농도)을 사용하여 Mueller et al.에 의해 ID 및 강도 유사성 점수를 사용하여 비 표지 LC-MS/MS 분석의 재현성을 조사하였고, 24 개의 LC-MS/MS 데이터 세트의 평균 ID 및 강도 유사성 점수는 각각 0.94 및 0.90으로 비 표지 LC-MS/MS 분석의 높은 재현성을 확인하였다(도 4 참조). 또한, AMT DB에 있는 30,933 개의 펩타이드를 기반으로 2개 이상의 고유 펩타이드를 가진 단백질로 높은 신뢰성을 지닌 2640 개의 HepG2 분비 단백질(2630 개의 단백질 부호화 유전자)을 확인하였다. 상기 방법에 따른 MS-GF+ 분석 및 AMT DB 분석 결과는 도 5에 나타내었다.

[0123] <2-3> 올레이트 처리에 따른 발현변화를 보이는 분비 단백질의 확인

[0125] 본 발명자들은 올레이트 처리 시, 간암 세포의 분비 단백질 중에서 발현 변화를 보이는 단백질을 분석하였다. 이를 위해 먼저 24개의 상기 LC-MS/MS 세트(올레이트를 처리한 12개 시료 및 올레이트 미처리 12개 시료)에서 정량화된 30,933 펩타이드를 정렬표로 구성하고, 올레이트 처리군 및 미처리군에서의 이들 펩타이드의 존재량(abundances)을 비교분석 하였다. 즉, 정렬된 펩타이드에 대해 상기 기술된 통합 통계 방법을 사용하여 올레이트 처리에 의해 유의하게 증가 또는 감소된 2461개의 고유 펩타이드를(DEpeptide)를 동정하였다(P < 0.05).

[0127] 그 결과, 2개의 고유 펩타이드가 올레이트 처리에 의해 일관되게 증가 또는 감소 패턴을 보일 때, 이를 DSP(differentially secreted protein)로 정의하였고, 그 결과 349개의 DSP를 동정하였다. 이중 12 개의 DSP는 2개 이상의 증가, 감소된 DEpeptide가 한 단백질에서 동시에 나타나, 해당 DSP를 배제하였다. 남은 DSP들 중에서 145개가 올레이트 처리 시 증가되는 것으로 확인되었고, 192개는 감소됨을 확인하였다. 여기서 올레이트에 의해 간암 세포주에서 증가하는 145개의 단백질 리스트를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0128] 올레이트에 의해 상향조절되는 145개의 단백질

번호	UniProtKB accession	Entrez ID	Symbol	Description	Number of unique DEpeptides
1	Q96DT5	8701	DNAH11	dynein, axonemal, heavy chain 11	2
2	Q07021	708	C1QBP	complement component 1, q subcomponent binding protein	2
3	P14174	4282	MIF	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)	3
4	P06727	-	APOA4	-	18
5	P13645	3858	KRT10	keratin 10, type I	3
6	P35637	2521	FUS	FUS RNA binding protein	3

7	P52815	6182	MRPL12	mitochondrial ribosomal protein L12	3
8	P00505	2806	GOT2	glutamic-oxaloacetic transaminase 2	2
9	Q9BPW8	8508	NIPSNAP1	nipsnap homolog 1 (C. elegans)	2
10	Q92608	1794	DOCK2	dedicator of cytokinesis 2	2
11	P23588	1975	EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	2
12	O15067	5198	PFAS	phosphoribosylformylglycinamide synthase	2
13	P02787	7018	TF	transferrin	12
14	P61916	10577	NPC2	Niemann-Pick disease, type C2	2
15	P07306	432	ASGR1	asialoglycoprotein receptor 1	2
16	Q86VP6	55832	CAND1	cullin-associated and neddylation-dissociated 1	4
17	P49902	22978	NT5C2	5'-nucleotidase, cytosolic II	2
18	P10619	5476	CTSA	cathepsin A	4
19	P53999	10923	SUB1	SUB1 homolog, transcriptional regulator	2
20	Q6IN85	55671	PPP4R3A	protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	2
21	P02753	5950	RBP4	retinol binding protein 4	3
22	Q9NTK5	29789	OLA1	Obg-like ATPase 1	3
23	P06681	717	C2	complement component 2	2
24	O43852	813	CALU	calumenin	7
25	P30566	158	ADSL	adenylosuccinate lyase	3
26	Q15582	7045	TGFB1	transforming growth factor beta induced	2
27	Q8NI22	90411	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2	2
28	Q9H4A6	64083	GOLPH3	golgi phosphoprotein 3	3
29	Q6PCB0	64856	VWA1	von Willebrand factor A domain containing 1	5
30	Q8NBS9	81567	TXNDC5	thioredoxin domain containing 5 (endoplasmic reticulum)	3
31	O43847	4898	NRDC	nardilysin convertase	2
32	O00410	3843	IPO5	importin 5	2
33	P78509	5649	RELN	reelin	18
34	Q86V81	10189	ALYREF	Aly/REF export factor	4
35	P07858	1508	CTSB	cathepsin B	8
36	P08697	5345	SERPINF2	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 2	2
37	P27797	811	CALR	calreticulin	4
38	P31937	11112	HIBADH	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	3
39	P05067	351	APP	amyloid beta precursor protein	5
40	P29622	5267	SERPINA4	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 4	2
41	P51659	3295	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	4
42	P18859	522	ATP5J	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial Fo complex subunit F6	2
43	P02751	2335	FN1	fibronectin 1	4
44	Q15084	10130	PDIA6	protein disulfide isomerase family A member 6	6
45	Q92820	8836	GGH	gamma-glutamyl hydrolase	4
46	P36955	5176	SERPINF1	serpin peptidase inhibitor, clade F (alpha-2 antiplasmin, pigment epithelium derived factor), member 1	5

47	Q14651	5357	PLS1	plastin 1	2
48	P62805	8294	HIST1H4I	histone cluster 1, H4i	3
49	O60832	1736	DKC1	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	2
50	P01019	183	AGT	angiotensinogen	10
51	O95445	55937	APOM	apolipoprotein M	5
52	P07602	5660	PSAP	prosaposin	7
53	P04040	847	CAT	catalase	3
54	P07686	3074	HEXB	hexosaminidase subunit beta	4
55	P10909	1191	CLU	clusterin	2
56	P20142	5225	PGC	progastricsin (pepsinogen C)	2
57	Q14697	23193	GANAB	glucosidase, alpha; neutral AB	3
58	P53634	1075	CTSC	cathepsin C	2
59	P07237	5034	P4HB	prolyl 4-hydroxylase subunit beta	5
60	P00751	629	CFB	complement factor B	2
61	P10451	6696	SPP1	secreted phosphoprotein 1	3
62	Q6P988	147111	NOTUM	notum pectinacetylesterase homolog (Drosophila)	5
63	P61626	4069	LYZ	lysozyme	4
64	P02647	335	APOA1	apolipoprotein A-I	6
65	Q9H993	79624	ARMT1	acidic residue methyltransferase 1	2
66	O43405	1690	COCH	cochlin	4
67	P01011	12	SERPINA3	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 3	10
68	Q13162	10549	PRDX4	peroxiredoxin 4	3
69	P04114	338	APOB	apolipoprotein B	118
70	P00450	1356	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	16
71	P59998	10093	ARPC4	actin related protein 2/3 complex subunit 4	2
72	P26641	1937	EEF1G	eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	2
73	P25705	498	ATP5A1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle	2
74	P13473	3920	LAMP2	lysosomal associated membrane protein 2	2
75	P04066	2517	FUCA1	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	4
76	P02679	2266	FGG	fibrinogen gamma chain	4
77	Q9UHG2	27344	PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	3
78	P07339	1509	CTSD	cathepsin D	3
79	P19022	1000	CDH2	cadherin 2	3
80	Q9H3G5	54504	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic like	6
81	P06396	2934	GSN	gelsolin	4
82	Q9BZZ5	8539	API5	apoptosis inhibitor 5	2
83	P14625	7184	HSP90B1	heat shock protein 90kDa beta family member 1	3
84	Q15181	5464	PPA1	pyrophosphatase (inorganic) 1	2
85	O15232	4148	MATN3	matrilin 3	4
86	P30101	2923	PDIA3	protein disulfide isomerase family A member 3	9
87	P50895	4059	BCAM	basal cell adhesion molecule (Lutheran blood group)	2
88	Q9NYU2	56886	UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1	6
89	O95433	10598	AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	2
90	P02795	4502	MT2A	metallothionein 2A	2
91	P18206	7414	VCL	vinculin	2

92	O00584	8635	RNASET2	ribonuclease T2	2
93	Q14696	23184	MESDC2	mesoderm development candidate 2	2
94	P06865	3073	HEXA	hexosaminidase subunit alpha	4
95	Q9BSE5	79814	AGMAT	agmatinase	2
96	Q08830	2267	FGL1	fibrinogen like 1	4
97	P22792	1370	CPN2	carboxypeptidase N subunit 2	2
98	P28799	2896	GRN	granulin	2
99	P05154	5104	SERPINA5	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 5	4
100	P19823	3698	ITIH2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	11
101	P14314	5589	PRKCSH	protein kinase C substrate 80K-H	6
102	P31040	6389	SDHA	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	3
103	P42765	10449	ACAA2	acetyl-CoA acyltransferase 2	2
104	P13688	634	CEACAM1	carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 1	2
105	Q02818	4924	NUCB1	nucleobindin 1	3
106	O60568	8985	PLOD3	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	3
107	Q9Y2B0	10330	CNPY2	canopy FGF signaling regulator 2	4
108	O14773	1200	TPP1	tripeptidyl peptidase I	2
109	Q9UNW1	9562	MINPP1	multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1	4
110	P02749	350	APOH	apolipoprotein H	3
111	P13667	9601	PDIA4	protein disulfide isomerase family A member 4	8
112	Q03167	7049	TGFBR3	transforming growth factor beta receptor III	2
113	P01031	727	C5	complement component 5	11
114	P14543	4811	NID1	nidogen 1	4
115	Q9BWS9	66005	CHID1	chitinase domain containing 1	3
116	Q99574	5274	SERPIN1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1	2
117	Q14978	9221	NOLC1	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	2
118	Q06033	3699	ITIH3	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 3	5
119	Q96HE7	30001	ERO1A	endoplasmic reticulum oxidoreductase alpha	6
120	Q14554	10954	PDIA5	protein disulfide isomerase family A member 5	2
121	P23141	1066	CES1	carboxylesterase 1	2
122	O94985	22883	CLSTN1	calsyntenin 1	2
123	P07996	7057	THBS1	thrombospondin 1	3
124	P02545	4000	LMNA	lamin A/C	2
125	P10253	2548	GAA	glucosidase, alpha; acid	2
126	P15144	290	ANPEP	alanyl aminopeptidase, membrane	5
127	P35613	682	BSG	basigin (Ok blood group)	2
128	O00748	8824	CES2	carboxylesterase 2	4
129	Q02809	5351	PLOD1	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	2
130	P61160	10097	ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	2
131	P55145	7873	MANF	mesencephalic astrocyte derived neurotrophic factor	4
132	P11021	3309	HSPA5	heat shock protein family A (Hsp70) member 5	2
133	P12956	2547	XRCC6	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6	2

134	P55157	4547	MTTP	microsomal triglyceride transfer protein	2
135	Q9H488	23509	POFUT1	protein O-fucosyltransferase 1	4
136	P00738	3240	HP	haptoglobin	2
137	P62158	801	CALM1	calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)	2
138	P05156	3426	CFI	complement factor I	6
139	P16870	1363	CPE	carboxypeptidase E	2
140	P62993	2885	GRB2	growth factor receptor bound protein 2	3
141	P22307	6342	SCP2	sterol carrier protein 2	2
142	P15586	2799	GNS	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase	2
143	P23284	5479	PPIB	peptidylprolyl isomerase B	2
144	P00742	2159	F10	coagulation factor X	2
145	P06576	506	ATP5B	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	7

[0130] <2-4> 올레이트 처리에 따른 발현변화를 보이는 분비 단백질들의 세포 기능분석

[0131] 상기 <2-3>에서 올레이트 처리에 의해 발현수준의 변화를 보이는 동정된 단백질들 중, 분비가 증가하는 145개의 단백질들을 대표하는 GOBPs 및 KEGG 경로를 동정하기 위해 DAVID 소프트웨어를 이용하여 기능 분석을 수행하였다.

[0132] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 올레이트 처리 시 증가하는 단백질들은 하기 표 2와 같은 세포 기능에 유의하게 관여하였다.

표 2

[0133] 올레이트 처리에 의해 분비가 증가하는 단백질들이 주로 관여하는 세포 기능

번호	Description	Count	P value
1	extracellular matrix organization	21	1.82E-10
2	protein folding	17	2.89E-10
3	response to wounding	33	6.00E-10
4	proteolysis	40	2.17E-09
5	lipid transport	15	3.44E-07
6	cell migration	26	2.46E-05
7	endocytosis	18	3.61E-05
8	inflammatory response	17	1.09E-04
9	lipid metabolic process	23	0.001905
10	cell adhesion	24	0.003426
11	Lysosome	12	5.01E-07
12	Protein processing in endoplasmic reticulum	12	1.20E-05
13	Complement and coagulation cascades	8	3.31E-05

[0135] <2-5> 간암 세포주에서 올레이트 처리에 의해 상향조절을 보이는 신규 단백질 동정

[0136] 상기 간암 세포주에서 올레이트 처리 시 발현수준이 증가하는 총 145개의 단백질들 중에서, 종래 간암과의 관련성에 대한 보고가 없고 올레이트 처리 시 처리하지 않은 군에 비해 간암 세포에서 발현 및 분비가 증가되는 총 18개의 단백질을 동정하였으며, 단백질 리스트는 하기 표 3에 나타난 바와 같다.

표 3

올레이트 처리 시 간암세포에서 증가하는 신규단백질 목록

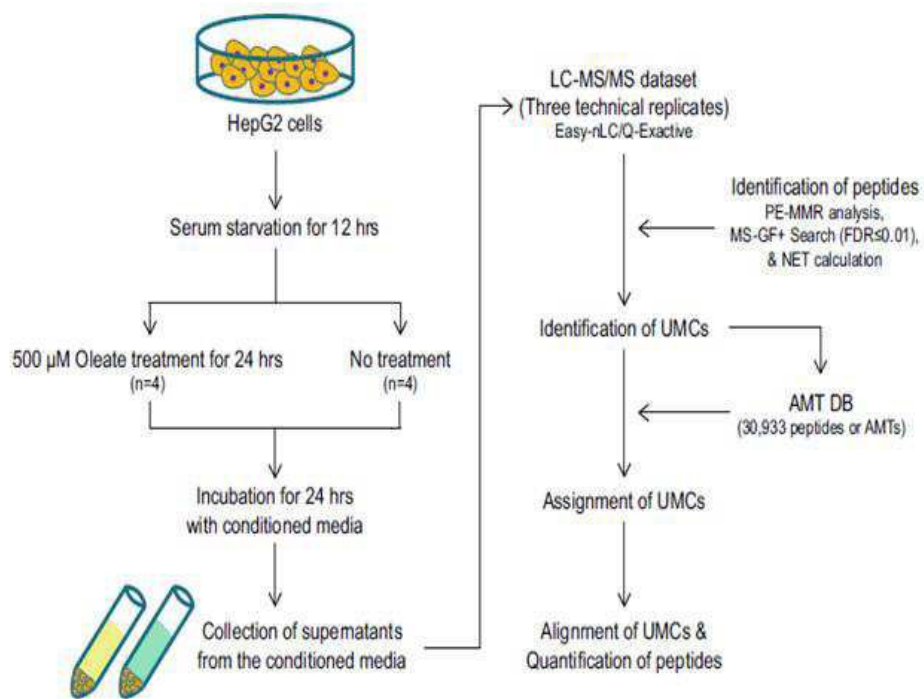
번호	UniProtKB accession	Entrez ID	Symbol	Description	log2-fold change	서열번호 (아미노산)
1	Q96DT5	8701	DNAH11	dynein, axonemal, heavy chain 11	2.865	1
2	Q9BPW8	8508	NIPSNAP1	nipsnap homolog 1	1.719	2
3	O15067	5198	PFAS	phosphoribosylformylglycinamidine synthase	1.696	3
4	Q6IN85	55671	PPP4R3A	protein phosphatase 4 regulatory subunit 3A	1.527	4
5	Q8NI22	90411	MCFD2	multiple coagulation factor deficiency 2	1.375	5
6	O43847	4898	NRDC	nardilysin convertase	1.354	6
7	Q86V81	10189	ALYREF	Aly/REF export factor	1.291	7
8	P51659	3295	HSD17B4	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4	1.265	8
9	Q14651	5357	PLS1	plastin 1	1.212	9
10	P20142	5225	PGC	progastricsin (pepsinogen C)	1.165	10
11	Q9H993	79624	ARMT1	acidic residue methyltransferase 1	1.099	11
12	Q9UHG2	27344	PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor	1.070	12
13	Q9NYU2	56886	UGGT1	UDP-glucose glycoprotein glucosyltransferase 1	1.034	13
14	O95433	10598	AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1 (yeast)	1.031	14
15	P02795	4502	MT2A	metallothionein 2A	1.029	15
16	Q14696	23184	MESDC2	mesoderm development candidate 2	1.016	16
17	P06865	3073	HEXA	hexosaminidase subunit alpha	1.014	17
18	P19823	3698	ITIH2	inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 2	1.002	18

[0139] 이상의 결과를 통해, 본 발명자들은 상기 표 3의 18개의 단백질을 간암 진단을 위한 새로운 바이오마커로서 사용가능함을 알 수 있었고, 나아가 올레이트에 의한 암 세포 증식 여부를 확인하기 위한 바이오마커로도 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

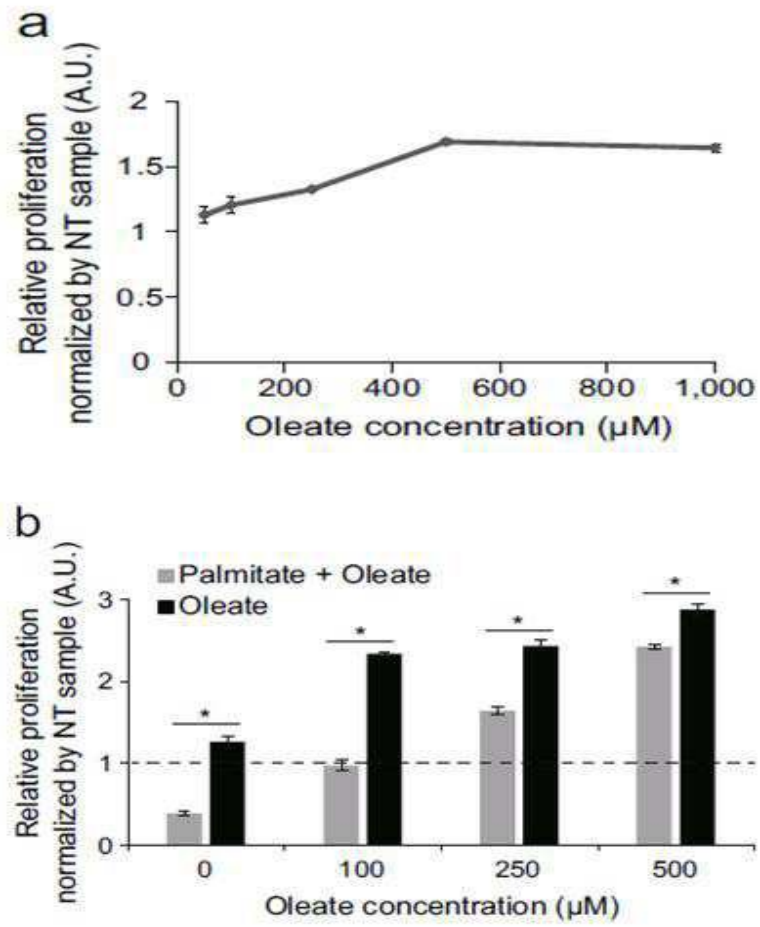
[0141] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

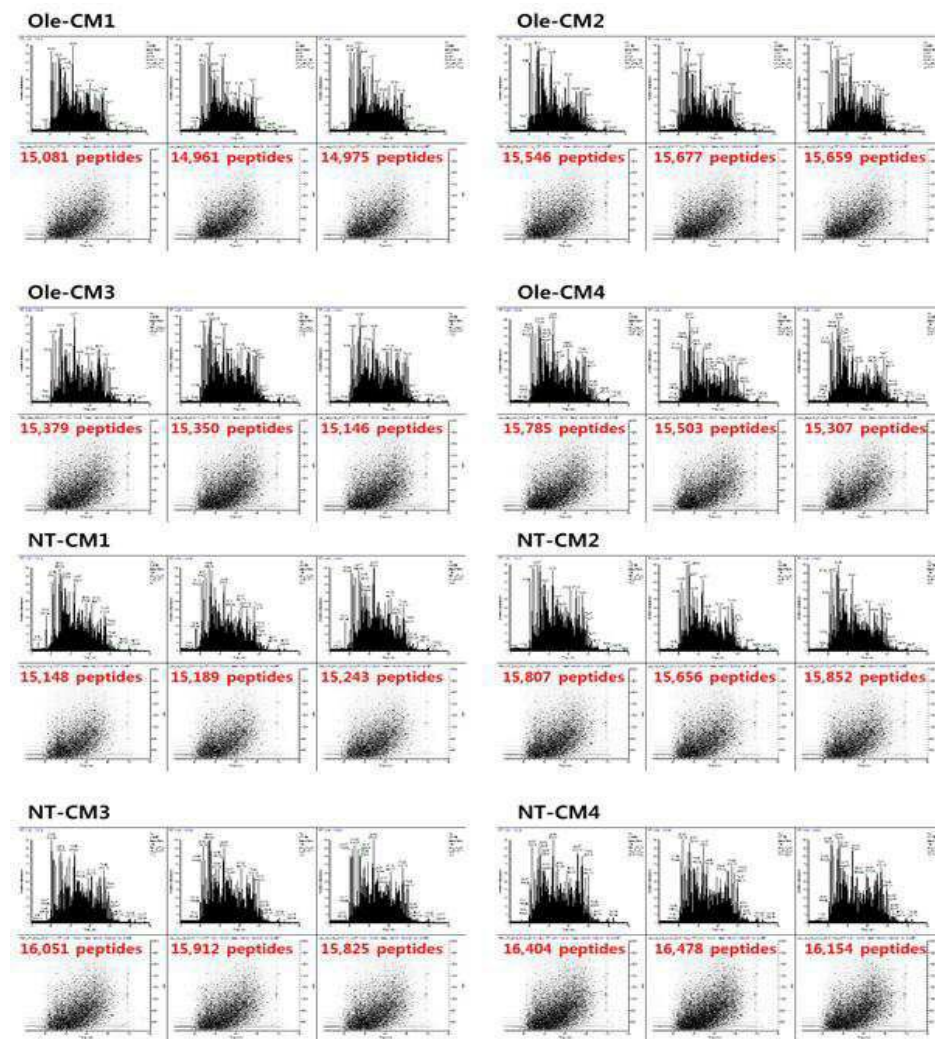
도면1



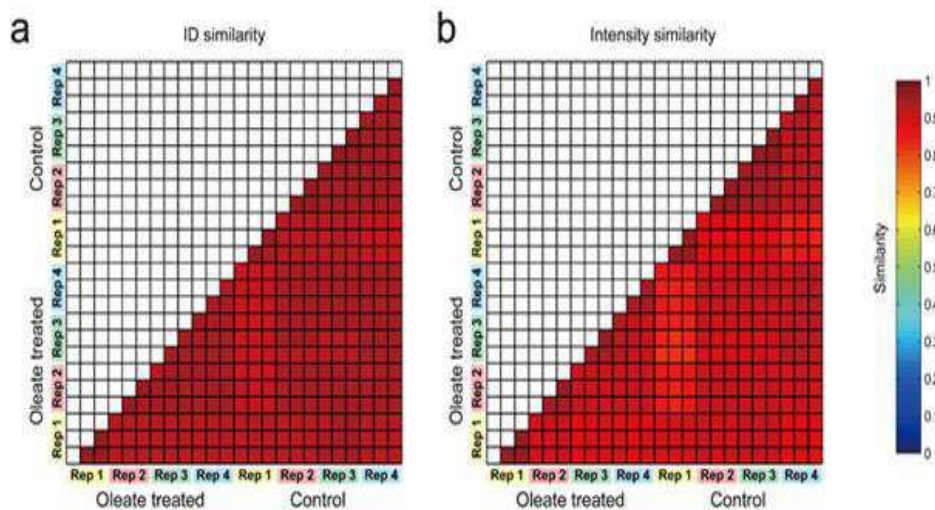
도면2



도면3



도면4



도면5

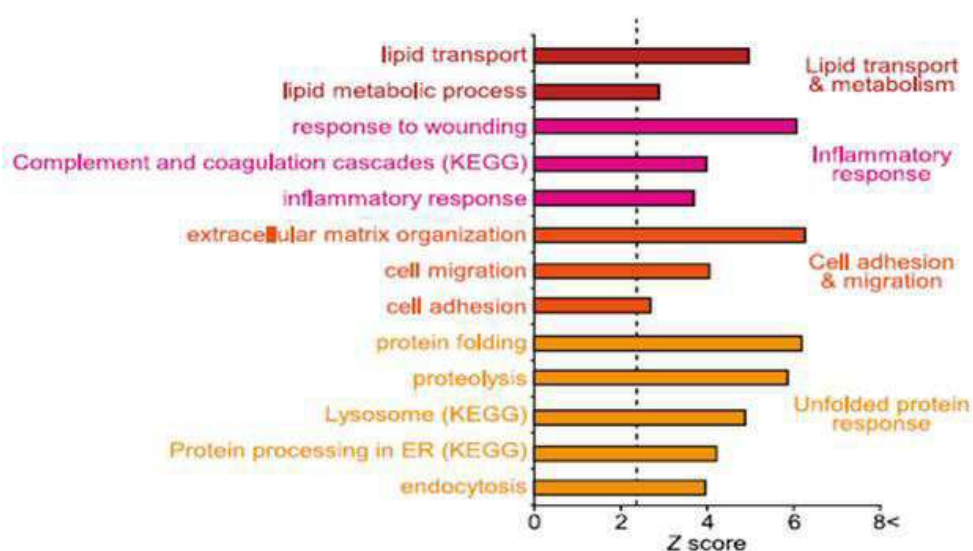
a

Replicates	1 st	2 nd	3 rd	Union
Ole-CM1	15,081	14,961	14,975	18,535
Ole-CM2	15,546	15,677	15,659	19,324
Ole-CM3	15,379	15,350	15,146	19,261
Ole-CM4	15,785	15,503	15,307	19,927
NT-CM1	15,148	15,189	15,243	18,813
NT-CM2	15,807	15,656	15,852	19,384
NT-CM3	16,051	15,912	15,825	19,475
NT-CM4	16,404	16,478	16,154	20,941

b

# peptides	1 st	2 nd	3 rd	Union
Ole-CM1	27,118	27,123	27,041	28,849
Ole-CM2	27,495	27,576	27,564	29,329
Ole-CM3	27,162	27,071	26,997	29,055
Ole-CM4	27,574	27,479	27,509	29,453
NT-CM1	27,186	27,212	27,228	28,959
NT-CM2	27,791	27,723	27,810	29,454
NT-CM3	27,817	27,817	27,914	29,484
NT-CM4	27,404	27,565	27,571	29,364
Total				30,933

도면6



서 열 목록

<110> Korea Brain Research Institute

<120> Novel hepatocellular carcinomar diagnostic marker and use thereof
 <130> NPDC-71084
 <160> 18
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 4516
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DNAH11 amino acid sequence
 <400> 1
 Met Ala Ala Gln Val Ala Ala Arg Glu Ala Arg Asp Phe Arg Glu Ala
 1 5 10 15
 Pro Thr Leu Arg Leu Thr Ser Gly Ala Gly Leu Glu Ala Val Gly Ala
 20 25 30
 Val Glu Leu Glu Glu Glu Glu Asn Glu Glu Glu Ala Ala Ala Arg
 35 40 45
 Arg Ala Arg Ser Phe Ala Gln Asp Ala Arg Val Arg Phe Leu Gly Gly
 50 55 60
 Arg Leu Ala Met Met Leu Gly Phe Thr Glu Glu Lys Trp Ser Gln Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Ser Glu Asp Asn Arg Gln Val Leu Gly Glu Phe Leu Glu Ser
 85 90 95
 Thr Ser Pro Ala Cys Leu Val Phe Ser Phe Ala Ala Ser Gly Arg Leu
 100 105 110
 Ala Ala Ser Gln Glu Ile Pro Arg Asp Ala Asn His Lys Leu Val Phe
 115 120 125
 Ile Ser Lys Lys Ile Thr Glu Ser Ile Gly Val Asn Asp Phe Ser Gln
 130 135 140
 Val Val Leu Phe Gly Glu Leu Pro Ala Leu Ser Leu Gly His Val Ser
 145 150 155 160
 Ala Phe Leu Asp Glu Ile Leu Val Pro Val Leu Ser Asn Lys Asn Asn
 165 170 175

His Lys Ser Trp Ser Cys Phe Thr Ser Gln Asp Met Glu Tyr His Ile
 180 185 190
 Glu Val Met Lys Lys Lys Met Tyr Ile Phe Arg Gly Lys Met Ser Arg
 195 200 205
 Arg Thr Leu Leu Pro Ile Pro Thr Val Ala Gly Lys Met Asp Leu Asp
 210 215 220
 Gln Asn Cys Ser Glu Asn Lys Pro Pro Ser Asn Glu Arg Ile Ile Leu
 225 230 235 240
 His Ala Ile Glu Ser Val Val Ile Glu Trp Ser His Gln Ile Gln Glu
 245 250 255
 Ile Ile Glu Arg Asp Ser Val Gln Arg Leu Leu Asn Gly Leu His Leu
 260 265 270
 Ser Pro Gln Ala Glu Leu Asp Phe Trp Met Met Arg Arg Glu Asn Leu
 275 280 285
 Ser Cys Ile Tyr Asp Gln Leu Gln Ala Pro Val Val Leu Lys Met Val
 290 295 300
 Lys Ile Leu Thr Thr Lys Gln Ser Ser Tyr Phe Pro Thr Leu Lys Asp
 305 310 315 320
 Ile Phe Leu Ala Val Glu Asn Ala Leu Leu Glu Ala Gln Asp Val Glu
 325 330 335
 Leu Tyr Leu Arg Pro Leu Arg Arg His Ile Gln Cys Leu Gln Glu Thr
 340 345 350
 Glu Phe Pro Gln Thr Arg Ile Leu Ile Ala Pro Leu Phe His Thr Ile
 355 360 365
 Cys Leu Ile Trp Ser His Ser Lys Phe Tyr Asn Thr Pro Ala Arg Val
 370 375 380
 Ile Val Leu Leu Gln Glu Phe Cys Asn Leu Phe Ile Asn Gln Ala Thr
 385 390 395 400
 Ala Tyr Leu Ser Pro Glu Asp Leu Leu Arg Gly Glu Ile Glu Glu Ser
 405 410 415
 Leu Glu Lys Val Gln Val Ala Val Asn Ile Leu Lys Thr Phe Lys Asn
 420 425 430

Ser Phe Phe Asn Tyr Arg Lys Lys Leu Ala Ser Tyr Phe Met Gly Arg
435 440 445

Lys Leu Arg Pro Trp Asp Phe Gln Ser His Leu Val Phe Cys Arg Phe
450 455 460

Asp Lys Phe Leu Asp Arg Leu Ile Lys Ile Glu Asp Ile Phe Ala Thr
465 470 475 480

Thr Leu Glu Phe Glu Lys Leu Glu Arg Leu Glu Phe Gly Gly Thr Lys
485 490 495

Gly Ala Ile Leu Asn Gly Gln Val His Glu Met Ser Glu Glu Leu Met
500 505 510

Glu Leu Cys Lys Leu Phe Lys Gln Ser Thr Tyr Asp Pro Ser Asp Cys
515 520 525

Thr Asn Met Glu Phe Glu Ser Asp Tyr Val Ala Phe Lys Ser Lys Thr
530 535 540

Leu Glu Phe Asp Arg Arg Leu Gly Thr Ile Ile Cys Glu Ala Phe Phe
545 550 555 560

Asn Cys Asn Gly Leu Glu Ala Ala Phe Lys Leu Leu Thr Ile Phe Gly
565 570 575

Asn Phe Leu Glu Lys Pro Val Val Met Glu Ile Phe Ser Leu His Tyr
580 585 590

Ser Thr Leu Val His Met Phe Asn Thr Glu Leu Asp Val Cys Lys Gln
595 600 605

Leu Tyr Asn Glu His Met Lys Gln Ile Glu Cys Gly His Val Val Leu
610 615 620

Asn Lys Asn Met Pro Phe Thr Ser Gly Asn Met Lys Trp Ala Gln Gln
625 630 635 640

Val Leu Gln Arg Leu Gln Met Phe Trp Ser Asn Phe Ala Ser Leu Arg
645 650 655

Tyr Leu Phe Leu Gly Asn Pro Asp His Ala Leu Val Tyr Gln Lys Tyr
660 665 670

Val Glu Met Thr Thr Leu Leu Asp Gln Phe Glu Ser Arg Ile Tyr Asn

675 680 685
 Glu Trp Lys Ser Asn Val Asp Glu Ile Cys Glu Phe Asn Leu Asn Gln
 690 695 700
 Pro Leu Val Lys Phe Ser Ala Ile Asn Gly Leu Leu Cys Val Asn Phe
 705 710 715 720
 Asp Pro Lys Leu Val Ala Val Leu Arg Glu Val Lys Tyr Leu Leu Met
 725 730 735
 Leu Lys Lys Gln Asp Ile Pro Asp Ser Ala Leu Ala Ile Phe Lys Lys
 740 745 750

 Arg Asn Thr Ile Leu Lys Tyr Ile Gly Asn Leu Asp Leu Leu Val Gln
 755 760 765
 Gly Tyr Asn Lys Leu Lys Gln Thr Leu Leu Glu Val Glu Tyr Pro Leu
 770 775 780
 Ile Glu Asp Glu Leu Arg Ala Ile Asp Glu Gln Leu Thr Ala Ala Thr
 785 790 795 800
 Thr Trp Leu Thr Trp Gln Asp Asp Cys Trp Gly Tyr Ile Glu Arg Val
 805 810 815
 Arg Ala Ala Thr Ser Glu Leu Glu His Arg Val Glu Arg Thr Gln Lys

 820 825 830
 Asn Val Lys Val Ile Gln Gln Thr Met Arg Gly Trp Ala Arg Cys Val
 835 840 845
 Leu Pro Pro Arg Arg Glu His Arg Arg Glu Ala Ala Phe Thr Leu Glu
 850 855 860
 Asp Lys Gly Asp Leu Phe Thr Lys Lys Tyr Lys Leu Ile Gln Gly Asp
 865 870 875 880
 Gly Cys Lys Ile His Asn Leu Val Glu Glu Asn Arg Lys Leu Phe Lys
 885 890 895

 Ala Asn Pro Ser Leu Asp Thr Trp Lys Ile Tyr Val Glu Phe Ile Asp
 900 905 910
 Asp Ile Val Val Glu Gly Phe Phe Gln Ala Ile Met His Asp Leu Asp
 915 920 925
 Phe Phe Leu Lys Asn Thr Glu Lys Gln Leu Lys Pro Ala Pro Phe Phe

930 935 940
 Gln Ala Gln Met Ile Leu Leu Pro Pro Glu Ile Val Phe Lys Pro Ser
 945 950 955 960
 Leu Asp Arg Glu Ala Gly Asp Gly Phe Tyr Asp Leu Val Glu Glu Met

 965 970 975
 Leu Cys Asn Ser Phe Arg Met Ser Ala Gln Met Asn Arg Ile Ala Thr
 980 985 990
 His Leu Glu Ile Lys Asn Tyr Gln Asn Asp Met Asp Asn Met Leu Gly
 995 1000 1005
 Leu Ala Glu Val Arg Gln Glu Ile Met Asn Arg Val Val Asn Val Ile
 1010 1015 1020
 Asn Lys Val Leu Asp Phe Arg Asn Thr Leu Glu Thr His Thr Tyr Leu
 1025 1030 1035 1040

 Trp Val Asp Asp Arg Ala Glu Phe Met Lys His Phe Leu Leu Tyr Gly
 1045 1050 1055
 His Ala Val Ser Ser Asp Glu Met Asp Ala His Ala Asn Glu Glu Ile
 1060 1065 1070
 Pro Glu Gln Pro Pro Thr Leu Glu Gln Phe Lys Glu Gln Ile Asp Ile
 1075 1080 1085
 Tyr Glu Ala Leu Tyr Val Gln Met Ser Lys Phe Glu Asp Phe Arg Val
 1090 1095 1100
 Phe Asp Ser Trp Phe Lys Val Asp Met Lys Pro Phe Lys Val Ser Leu

 1105 1110 1115 1120
 Leu Thr Ile Ile Lys Lys Trp Ser Trp Met Phe Gln Glu His Leu Leu
 1125 1130 1135
 Arg Phe Val Ile Asp Ser Leu Asn Glu Leu Gln Glu Phe Ile Lys Glu
 1140 1145 1150
 Thr Asp Ser Gly Leu Gln Arg Glu Leu Asn Glu Gly Asp His Asp Gly
 1155 1160 1165
 Leu Val Asp Ile Met Val His Leu Leu Ala Val Arg Ser Arg Gln Arg
 1170 1175 1180

Ala Thr Asp Glu Leu Phe Glu Pro Leu Lys Glu Thr Ile Thr Leu Leu
1185 1190 1195 1200
Glu Ser Tyr Gly Gln Lys Met Pro Glu Gln Val Tyr Ile Gln Leu Glu
1205 1210 1215
Glu Leu Pro Glu Arg Trp Glu Thr Thr Lys Lys Ile Ala Ala Thr Val
1220 1225 1230
Arg His Glu Val Ser Pro Leu His Asn Ala Glu Val Thr Leu Ile Arg
1235 1240 1245
Lys Lys Cys Ile Leu Phe Asp Ala Lys Gln Ala Glu Phe Arg Glu Arg
1250 1255 1260
Phe Arg His Tyr Ala Pro Leu Gly Phe Asn Ala Glu Asn Pro Tyr Thr
1265 1270 1275 1280
Ala Leu Asp Lys Ala Asn Glu Glu Leu Glu Ala Leu Glu Glu Glu Met
1285 1290 1295
Leu Gln Met Gln Glu Ser Thr Arg Leu Phe Glu Val Ala Leu Pro Glu
1300 1305 1310
Tyr Lys Gln Met Lys Gln Cys Arg Lys Glu Ile Lys Leu Leu Lys Gly
1315 1320 1325
Leu Trp Asp Val Ile Ile Tyr Val Arg Arg Ser Ile Asp Asn Trp Thr
1330 1335 1340
Lys Thr Gln Trp Arg Gln Ile His Val Glu Gln Met Asp Val Glu Leu
1345 1350 1355 1360
Arg Arg Phe Ala Lys Glu Ile Trp Ser Leu Asn Lys Glu Val Arg Val
1365 1370 1375
Trp Asp Ala Tyr Thr Gly Leu Glu Gly Thr Val Lys Asp Met Thr Ala
1380 1385 1390
Ser Leu Arg Ala Ile Thr Glu Leu Gln Ser Pro Ala Leu Arg Asp Arg
1395 1400 1405
His Trp His Gln Leu Met Lys Ala Ile Gly Val Lys Phe Leu Ile Asn
1410 1415 1420
Glu Ala Thr Thr Leu Ala Asp Leu Leu Ala Leu Arg Leu His Arg Val
1425 1430 1435 1440

Glu Asp Asp Val Arg Arg Ile Val Asp Lys Ala Val Lys Glu Leu Gly
1445 1450 1455

Thr Glu Lys Val Ile Thr Glu Ile Ser Gln Thr Trp Ala Thr Met Lys
1460 1465 1470

Phe Ser Tyr Glu Val His Tyr Arg Thr Gly Ile Pro Leu Leu Lys Ser
1475 1480 1485

Asp Glu Gln Leu Phe Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Val Gln Leu Gln
1490 1495 1500

Thr Leu Leu Gln Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Phe Ile Glu Gln Val Leu
1505 1510 1515 1520

Ser Trp Gln Asn Lys Leu Asn Ile Ala Asp Leu Val Ile Phe Thr Trp
1525 1530 1535

Met Glu Val Gln Arg Thr Trp Ser His Leu Glu Ser Ile Phe Val Cys
1540 1545 1550

Ser Glu Asp Ile Arg Ile Gln Leu Val Lys Asp Ala Arg Arg Phe Asp
1555 1560 1565

Gly Val Asp Ala Glu Phe Lys Glu Leu Met Phe Lys Thr Ala Lys Val
1570 1575 1580

Glu Asn Val Leu Glu Ala Thr Cys Arg Pro Asn Leu Tyr Glu Lys Leu
1585 1590 1595 1600

Lys Asp Leu Gln Ser Arg Leu Ser Leu Cys Glu Lys Ala Leu Ala Glu
1605 1610 1615

Tyr Leu Glu Thr Lys Arg Ile Ala Phe Pro Arg Phe Tyr Phe Val Ser
1620 1625 1630

Ser Ala Asp Leu Leu Asp Ile Leu Ser Lys Gly Ala Gln Pro Lys Gln
1635 1640 1645

Val Thr Cys His Leu Ala Lys Leu Phe Asp Ser Ile Ala Asp Leu Gln
1650 1655 1660

Phe Glu Asp Asn Gln Asp Val Ser Ala His Arg Ala Val Gly Met Tyr
1665 1670 1675 1680

Ser Lys Glu Lys Glu Tyr Val Pro Phe Gln Ala Glu Cys Glu Cys Val

1685 1690 1695
 Gly His Val Glu Thr Trp Leu Leu Gln Leu Glu Gln Thr Met Gln Glu
 1700 1705 1710
 Thr Val Arg His Ser Ile Thr Glu Ala Ile Val Ala Tyr Glu Glu Lys
 1715 1720 1725
 Pro Arg Glu Leu Trp Ile Phe Asp Phe Pro Ala Gln Val Ala Leu Thr
 1730 1735 1740
 Ser Ser Gln Ile Trp Trp Thr Thr Asp Val Gly Ile Ala Phe Ser Arg
 1745 1750 1755 1760

 Leu Glu Glu Gly Tyr Glu Thr Ala Leu Lys Asp Phe His Lys Lys Gln
 1765 1770 1775
 Ile Ser Gln Leu Asn Thr Leu Ile Thr Leu Leu Leu Gly Glu Leu Pro
 1780 1785 1790
 Pro Gly Asp Arg Gln Lys Ile Met Thr Ile Cys Thr Ile Asp Val His
 1795 1800 1805
 Ala Arg Asp Val Val Ala Lys Leu Ile Ser Gln Lys Val Val Ser Pro
 1810 1815 1820
 Gln Ala Phe Thr Trp Leu Ser Gln Leu Arg His Arg Trp Glu Asp Thr

 1825 1830 1835 1840
 Gln Lys His Cys Phe Val Asn Ile Cys Asp Ala Gln Phe Gln Tyr Phe
 1845 1850 1855
 Tyr Glu Tyr Leu Gly Asn Ser Pro Arg Leu Val Ile Thr Pro Leu Thr
 1860 1865 1870
 Asp Arg Cys Tyr Ile Thr Leu Thr Gln Ser Leu His Leu Thr Met Ser
 1875 1880 1885
 Gly Ala Pro Ala Gly Pro Ala Gly Thr Gly Lys Thr Glu Thr Thr Lys
 1890 1895 1900

 Asp Leu Gly Arg Ala Leu Gly Met Met Val Tyr Val Phe Asn Cys Ser
 1905 1910 1915 1920
 Glu Gln Met Asp Tyr Lys Ser Ile Gly Asn Ile Tyr Lys Gly Leu Val
 1925 1930 1935
 Gln Thr Gly Ala Trp Gly Cys Phe Asp Glu Phe Asn Arg Ile Ser Val

1940	1945	1950	
Glu Val Leu Ser Val Val Ala Val Gln Val Lys Met Ile His Asp Ala			
1955	1960	1965	
Ile Arg Asn Arg Lys Lys Arg Phe Val Phe Leu Gly Glu Ala Ile Thr			
1970	1975	1980	
Leu Lys Pro Ser Val Gly Ile Phe Ile Thr Met Asn Pro Gly Tyr Ala			
1985	1990	1995	2000
Gly Arg Thr Glu Leu Pro Glu Asn Leu Lys Ala Leu Phe Arg Pro Cys			
2005	2010	2015	
Ala Met Val Ala Pro Asp Ile Glu Leu Ile Cys Glu Ile Leu Leu Val			
2020	2025	2030	
Ala Glu Gly Phe Val Asp Ala Arg Ala Leu Ala Arg Lys Phe Ile Thr			
2035	2040	2045	
Leu Tyr Thr Leu Cys Lys Glu Leu Leu Ser Lys Gln Asp His Tyr Asp			
2050	2055	2060	
Trp Gly Leu Arg Ala Ile Lys Ser Val Leu Val Val Ala Gly Ser Leu			
2065	2070	2075	2080
Lys Arg Gly Asp Lys Asn Arg Pro Glu Asp Gln Val Leu Met Arg Ala			
2085	2090	2095	
Leu Arg Asp Phe Asn Met Pro Lys Ile Val Thr Asp Asp Ile Pro Val			
2100	2105	2110	
Phe Leu Gly Leu Val Gly Asp Leu Phe Pro Ala Leu Asp Val Pro Arg			
2115	2120	2125	
Arg Arg Lys Leu His Phe Glu Gln Met Val Arg Gln Ser Thr Leu Glu			
2130	2135	2140	
Leu Arg Leu Gln Pro Glu Glu Ser Phe Ile Leu Lys Val Val Gln Leu			
2145	2150	2155	2160
Glu Glu Leu Leu Ala Val Arg His Ser Val Phe Val Val Gly Asn Ala			
2165	2170	2175	
Gly Thr Gly Lys Ser Lys Ile Leu Arg Thr Leu Asn Arg Thr Tyr Val			
2180	2185	2190	

Asn Met Lys Gln Lys Pro Val Trp Asn Asp Leu Asn Pro Lys Ala Val
 2195 2200 2205
 Thr Thr Asp Glu Leu Phe Gly Phe Ile His His Ala Thr Arg Glu Trp
 2210 2215 2220
 Lys Asp Gly Lys Ile Val Tyr Ser Tyr Phe Ile Gly Leu Phe Ser Ser
 2225 2230 2235 2240
 Ile Leu Arg Glu Gln Ala Asn Leu Lys His Asp Gly Pro Lys Trp Ile
 2245 2250 2255
 Val Leu Asp Gly Asp Ile Asp Pro Met Trp Ile Glu Ser Leu Asn Thr
 2260 2265 2270
 Val Met Asp Asp Asn Lys Val Leu Thr Leu Ala Ser Asn Glu Arg Ile
 2275 2280 2285
 Ala Leu Thr Pro Phe Met Arg Leu Leu Phe Glu Ile His His Leu Arg
 2290 2295 2300
 Ser Ala Thr Pro Ala Thr Val Ser Arg Ala Gly Ile Leu Tyr Val Asn
 2305 2310 2315 2320
 Pro Gln Asp Leu Gly Trp Asn Pro Tyr Val Ala Ser Trp Ile Asp Arg
 2325 2330 2335
 Arg Arg His Gln Ser Glu Lys Ala Asn Leu Thr Ile Leu Phe Asp Lys
 2340 2345 2350
 Tyr Val Pro Ala Cys Leu Asp Lys Leu Arg Thr Ser Phe Lys Thr Ile
 2355 2360 2365
 Thr Ser Ile Pro Glu Ser Ser Leu Val Gln Thr Leu Cys Val Leu Leu
 2370 2375 2380
 Glu Cys Leu Leu Thr Pro Glu Asn Val Pro Ser Asp Ser Pro Lys Glu
 2385 2390 2395 2400
 Val Tyr Glu Val Tyr Phe Val Phe Ala Cys Ile Trp Ala Phe Gly Gly
 2405 2410 2415
 Thr Leu Leu Gln Asp Gln Ile Ser Asp Tyr Gln Ala Asp Phe Ser Arg
 2420 2425 2430
 Trp Trp Gln Lys Glu Met Lys Ala Val Lys Phe Pro Ser Gln Gly Thr
 2435 2440 2445

Ile Phe Asp Tyr Tyr Val Asp His Lys Thr Lys Lys Leu Leu Pro Trp
2450 2455 2460

Ala Asp Lys Ile Ala Gln Phe Thr Met Asp Pro Asp Val Pro Leu Gln
2465 2470 2475 2480

Thr Val Leu Val His Thr Thr Glu Thr Ala Arg Leu Arg Tyr Phe Met
2485 2490 2495

Glu Leu Leu Leu Glu Lys Gly Lys Pro Leu Met Leu Val Gly Asn Ala
2500 2505 2510

Gly Val Gly Lys Thr Val Phe Val Gly Asp Thr Leu Ala Ser Leu Ser
2515 2520 2525

Glu Asp Tyr Ile Val Ser Arg Val Pro Phe Asn Tyr Tyr Thr Thr Ser
2530 2535 2540

Thr Ala Leu Gln Lys Ile Leu Glu Lys Pro Leu Glu Lys Lys Ala Gly
2545 2550 2555 2560

His Asn Tyr Gly Pro Gly Gly Asn Lys Lys Leu Ile Tyr Phe Ile Asp
2565 2570 2575

Asp Met Asn Met Pro Glu Val Asp Leu Tyr Gly Thr Val Gln Pro His
2580 2585 2590

Thr Leu Ile Arg Gln His Ile Asp Tyr Gly His Trp Tyr Asp Arg Gln
2595 2600 2605

Lys Val Met Leu Lys Glu Ile His Asn Cys Gln Tyr Val Ala Cys Met
2610 2615 2620

Asn Pro Met Val Gly Ser Phe Thr Ile Asn Pro Arg Leu Gln Arg His
2625 2630 2635 2640

Phe Thr Val Phe Ala Phe Asn Phe Pro Ser Leu Asp Ala Leu Asn Thr
2645 2650 2655

Ile Tyr Gly Gln Ile Phe Ser Phe His Phe Gln Gln Gln Ala Phe Ala
2660 2665 2670

Pro Ser Ile Leu Arg Ser Gly Pro Thr Leu Ile Gln Ala Thr Ile Ala
2675 2680 2685

Phe His Gln Thr Met Met Cys Asn Phe Leu Pro Thr Ala Ile Lys Phe

2690 2695 2700
 His Tyr Ile Phe Asn Leu Arg Asp Leu Ser Asn Val Phe Gln Gly Ile
 2705 2710 2715 2720
 Leu Phe Ala Ser Pro Glu Cys Leu Lys Gly Pro Leu Asp Leu Ile His
 2725 2730 2735
 Leu Trp Leu His Glu Ser Ala Arg Val Tyr Gly Asp Lys Leu Ile Asp
 2740 2745 2750
 Lys Lys Asp Cys Asp Leu Phe Gln Arg Arg Met Leu Glu Thr Ala Tyr
 2755 2760 2765

 Lys Tyr Phe Glu Gly Ile Asp Ser His Met Leu Leu Gln Gln Pro Leu
 2770 2775 2780
 Ile Tyr Cys His Phe Ala Asp Arg Gly Lys Asp Pro His Tyr Met Pro
 2785 2790 2795 2800
 Val Lys Asp Trp Glu Val Leu Lys Thr Ile Leu Thr Glu Thr Leu Asp
 2805 2810 2815
 Asn Tyr Asn Glu Leu Asn Ala Ala Met His Leu Val Leu Phe Glu Asp
 2820 2825 2830
 Ala Met Gln His Val Cys Arg Ile Ser Arg Ile Leu Arg Thr Pro Gln

 2835 2840 2845
 Gly Cys Ala Leu Leu Val Gly Val Gly Gly Ser Gly Lys Gln Ser Leu
 2850 2855 2860
 Ser Arg Leu Ala Ala Tyr Leu Arg Gly Leu Glu Val Phe Gln Ile Thr
 2865 2870 2875 2880
 Leu Thr Glu Gly Tyr Gly Ile Gln Glu Leu Arg Val Asp Leu Ala Asn
 2885 2890 2895
 Leu Tyr Ile Arg Thr Gly Ala Lys Asn Met Pro Thr Val Phe Leu Leu
 2900 2905 2910

 Thr Asp Ala Gln Val Leu Asp Glu Ser Phe Leu Val Leu Ile Asn Asp
 2915 2920 2925
 Leu Leu Ala Ser Gly Glu Ile Pro Asp Leu Phe Ser Asp Glu Asp Val
 2930 2935 2940
 Asp Lys Ile Ile Ser Gly Ile His Asn Glu Val His Ala Leu Gly Met

2945 2950 2955 2960
 Val Asp Ser Arg Glu Asn Cys Trp Lys Phe Phe Met Ala Arg Val Arg
 2965 2970 2975
 Leu Gln Leu Lys Ile Ile Leu Cys Phe Ser Pro Val Gly Arg Thr Leu

 2980 2985 2990
 Arg Val Arg Ala Arg Lys Phe Pro Ala Ile Val Asn Cys Thr Ala Ile
 2995 3000 3005
 Asp Trp Phe His Ala Trp Pro Gln Glu Ala Leu Val Ser Val Ser Arg
 3010 3015 3020
 Arg Phe Ile Glu Glu Thr Lys Gly Ile Glu Pro Val His Lys Asp Ser
 3025 3030 3035 3040
 Ile Ser Leu Phe Met Ala His Val His Thr Thr Val Asn Glu Met Ser
 3045 3050 3055

 Thr Arg Tyr Tyr Gln Asn Glu Arg Arg His Asn Tyr Thr Thr Pro Lys
 3060 3065 3070
 Ser Phe Leu Glu Gln Ile Ser Leu Phe Lys Asn Leu Leu Lys Lys Lys
 3075 3080 3085
 Gln Asn Glu Val Ser Glu Lys Lys Glu Arg Leu Val Asn Gly Ile Gln
 3090 3095 3100
 Lys Leu Lys Thr Thr Ala Ser Gln Val Gly Asp Leu Lys Ala Arg Leu
 3105 3110 3115 3120
 Ala Ser Gln Glu Ala Glu Leu Gln Leu Arg Asn His Asp Ala Glu Ala

 3125 3130 3135
 Leu Ile Thr Lys Ile Gly Leu Gln Thr Glu Lys Val Ser Arg Glu Lys
 3140 3145 3150
 Thr Ile Ala Asp Ala Glu Glu Arg Lys Val Thr Ala Ile Gln Thr Glu
 3155 3160 3165
 Val Phe Gln Lys Gln Arg Glu Cys Glu Ala Asp Leu Leu Lys Ala Glu
 3170 3175 3180
 Pro Ala Leu Val Ala Ala Thr Ala Ala Leu Asn Thr Leu Asn Arg Val
 3185 3190 3195 3200

Asn Leu Ser Glu Leu Lys Ala Phe Pro Asn Pro Pro Ile Ala Val Thr
 3205 3210 3215
 Asn Val Thr Ala Ala Val Met Val Leu Leu Ala Pro Arg Gly Arg Val
 3220 3225 3230
 Pro Lys Asp Arg Ser Trp Lys Ala Ala Lys Val Phe Met Gly Lys Val
 3235 3240 3245
 Asp Asp Phe Leu Gln Ala Leu Ile Asn Tyr Asp Lys Glu His Ile Pro
 3250 3255 3260
 Glu Asn Cys Leu Lys Val Val Asn Glu His Tyr Leu Lys Asp Pro Glu

 3265 3270 3275 3280
 Phe Asn Pro Asn Leu Ile Arg Thr Lys Ser Phe Ala Ala Ala Gly Leu
 3285 3290 3295
 Cys Ala Trp Val Ile Asn Ile Ile Lys Phe Tyr Glu Val Tyr Cys Asp
 3300 3305 3310
 Val Glu Pro Lys Arg Gln Ala Leu Ala Gln Ala Asn Leu Glu Leu Ala
 3315 3320 3325
 Ala Ala Thr Glu Lys Leu Glu Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Asp Leu
 3330 3335 3340

 Asp Arg Asn Leu Ser Arg Leu Thr Ala Ser Phe Glu Lys Ala Thr Ala
 3345 3350 3355 3360
 Glu Lys Val Arg Cys Gln Glu Glu Val Asn Gln Thr Asn Lys Thr Ile
 3365 3370 3375
 Lys Leu Ala Asn Arg Leu Val Lys Glu Leu Glu Ala Lys Lys Ile Arg
 3380 3385 3390
 Trp Gly Gln Ser Ile Lys Ser Phe Glu Ala Gln Glu Lys Thr Leu Cys
 3395 3400 3405
 Gly Asp Val Leu Leu Thr Ala Ala Phe Val Ser Tyr Val Gly Pro Phe

 3410 3415 3420
 Thr Arg Gln Tyr Arg Gln Glu Leu Val His Cys Lys Trp Val Pro Phe
 3425 3430 3435 3440
 Leu Gln Gln Lys Val Ser Ile Pro Leu Thr Glu Gly Leu Asp Leu Ile
 3445 3450 3455

Ser Met Leu Thr Asp Asp Ala Thr Ile Ala Ala Trp Asn Asn Glu Gly
3460 3465 3470

Leu Pro Ser Asp Arg Met Ser Thr Glu Asn Ala Ala Ile Leu Thr His
3475 3480 3485

Cys Glu Arg Trp Pro Leu Val Ile Asp Pro Gln Gln Gln Gly Ile Lys
3490 3495 3500

Trp Ile Lys Asn Lys Tyr Gly Met Asp Leu Lys Val Thr His Leu Gly
3505 3510 3515 3520

Gln Lys Gly Phe Leu Asn Ala Ile Glu Thr Ala Leu Ala Phe Gly Asp
3525 3530 3535

Val Ile Leu Ile Glu Asn Leu Glu Glu Thr Ile Asp Pro Val Leu Asp
3540 3545 3550

Pro Leu Leu Gly Arg Asn Thr Ile Lys Lys Gly Lys Tyr Ile Arg Ile
3555 3560 3565

Gly Asp Lys Glu Cys Glu Phe Asn Lys Asn Phe Arg Leu Ile Leu His
3570 3575 3580

Thr Lys Leu Ala Asn Pro His Tyr Lys Pro Glu Leu Gln Ala Gln Thr
3585 3590 3595 3600

Thr Leu Leu Asn Phe Thr Val Thr Glu Asp Gly Leu Glu Ala Gln Leu
3605 3610 3615

Leu Ala Glu Val Val Ser Ile Glu Arg Pro Asp Leu Glu Lys Leu Lys
3620 3625 3630

Leu Val Leu Thr Lys His Gln Asn Asp Phe Lys Ile Glu Leu Lys Tyr
3635 3640 3645

Leu Glu Asp Asp Leu Leu Leu Arg Leu Ser Ala Ala Glu Gly Ser Phe
3650 3655 3660

Leu Asp Asp Thr Lys Leu Val Glu Arg Leu Glu Ala Thr Lys Thr Thr
3665 3670 3675 3680

Val Ala Glu Ile Glu His Lys Val Ile Glu Ala Lys Glu Asn Glu Arg
3685 3690 3695

Lys Ile Asn Glu Ala Arg Glu Cys Tyr Arg Pro Val Ala Ala Arg Ala

3700	3705	3710	
Ser Leu Leu Tyr Phe Val Ile Asn Asp Leu Gln Lys Ile Asn Pro Leu			
3715	3720	3725	
Tyr Gln Phe Ser Leu Lys Ala Phe Asn Val Leu Phe His Arg Ala Ile			
3730	3735	3740	
Glu Gln Ala Asp Lys Val Glu Asp Met Gln Gly Arg Ile Ser Ile Leu			
3745	3750	3755	3760
Met Glu Ser Ile Thr His Ala Val Phe Leu Tyr Thr Ser Gln Ala Leu			
3765	3770	3775	
Phe Glu Lys Asp Lys Leu Thr Phe Leu Ser Gln Met Ala Phe Gln Ile			
3780	3785	3790	
Leu Leu Arg Lys Lys Glu Ile Asp Pro Leu Glu Leu Asp Phe Leu Leu			
3795	3800	3805	
Arg Phe Thr Val Glu His Thr His Leu Ser Pro Val Asp Phe Leu Thr			
3810	3815	3820	
Ser Gln Ser Trp Ser Ala Ile Lys Ala Ile Ala Val Met Glu Glu Phe			
3825	3830	3835	3840
Arg Gly Ile Asp Arg Asp Val Glu Gly Ser Ala Lys Gln Trp Arg Lys			
3845	3850	3855	
Trp Val Glu Ser Glu Cys Pro Glu Lys Glu Lys Leu Pro Gln Glu Trp			
3860	3865	3870	
Lys Lys Lys Ser Leu Ile Gln Lys Leu Ile Leu Leu Arg Ala Met Arg			
3875	3880	3885	
Pro Asp Arg Met Thr Tyr Ala Leu Arg Asn Phe Val Glu Glu Lys Leu			
3890	3895	3900	
Gly Ala Lys Tyr Val Glu Arg Thr Arg Leu Asp Leu Val Lys Ala Phe			
3905	3910	3915	3920
Glu Glu Ser Ser Pro Ala Thr Pro Ile Phe Phe Ile Leu Ser Pro Gly			
3925	3930	3935	
Val Asp Ala Leu Lys Asp Leu Glu Ile Leu Gly Lys Arg Leu Gly Phe			
3940	3945	3950	
Thr Ile Asp Ser Gly Lys Phe His Asn Val Ser Leu Gly Gln Gly Gln			

3955 3960 3965
 Glu Thr Val Ala Glu Val Ala Leu Glu Lys Ala Ser Lys Gly Gly His
 3970 3975 3980
 Trp Val Ile Leu Gln Asn Val His Leu Val Ala Lys Trp Leu Gly Thr

 3985 3990 3995 4000
 Leu Glu Lys Leu Leu Glu Arg Phe Ser Gln Gly Ser His Arg Asp Tyr
 4005 4010 4015
 Arg Val Phe Met Ser Ala Glu Ser Ala Pro Thr Pro Asp Glu His Ile
 4020 4025 4030
 Ile Pro Gln Gly Leu Leu Glu Asn Ser Ile Lys Ile Thr Asn Glu Pro
 4035 4040 4045
 Pro Thr Gly Met Leu Ala Asn Leu His Ala Ala Leu Tyr Asn Phe Asp
 4050 4055 4060

 Gln Asp Thr Leu Glu Ile Cys Ser Lys Glu Gln Glu Phe Lys Ser Ile
 4065 4070 4075 4080
 Leu Phe Ser Leu Cys Tyr Phe His Ala Cys Val Ala Gly Arg Leu Arg
 4085 4090 4095
 Phe Gly Pro Gln Gly Trp Ser Arg Ser Tyr Pro Phe Asn Pro Gly Asp
 4100 4105 4110
 Leu Thr Ile Cys Ala Ser Val Leu Tyr Asn Tyr Leu Glu Ala Asn Ser
 4115 4120 4125
 Lys Val Pro Trp Glu Asp Leu Arg Tyr Leu Phe Gly Glu Ile Met Tyr

 4130 4135 4140
 Gly Gly His Ile Thr Asp Asp Trp Asp Arg Lys Leu Cys Arg Val Tyr
 4145 4150 4155 4160
 Leu Glu Glu Phe Met Asn Pro Ser Leu Thr Glu Asp Glu Leu Met Leu
 4165 4170 4175
 Ala Pro Gly Phe Ala Ala Pro Pro Tyr Leu Asp Tyr Ala Gly Tyr His
 4180 4185 4190
 Gln Tyr Ile Glu Glu Met Leu Pro Pro Glu Ser Pro Ala Leu Tyr Gly
 4195 4200 4205

Leu His Pro Asn Ala Glu Ile Glu Phe Leu Thr Val Thr Ser Asn Thr
 4210 4215 4220
 Leu Phe Arg Thr Leu Leu Glu Met Gln Pro Arg Asn Ala Leu Ser Gly
 4225 4230 4235 4240
 Asp Glu Leu Gly Gln Ser Thr Glu Glu Lys Val Lys Asn Val Leu Asp
 4245 4250 4255
 Asp Ile Leu Glu Lys Leu Pro Glu Glu Phe Asn Met Ala Glu Ile Met
 4260 4265 4270
 Gln Lys Asn Ser Asn Arg Ser Pro Tyr Val Leu Val Cys Phe Gln Glu
 4275 4280 4285
 Cys Glu Arg Met Asn Ile Leu Ile Arg Glu Ile Arg Ile Ser Leu Glu
 4290 4295 4300
 Gln Leu Asp Leu Ser Leu Lys Gly Glu Leu Ala Leu Ser Pro Ala Val
 4305 4310 4315 4320
 Glu Ala Gln Gln Phe Ala Leu Ser Tyr Asp Thr Val Pro Asp Thr Trp
 4325 4330 4335
 Ser Lys Leu Ala Tyr Pro Ser Thr Tyr Gly Leu Ala Gln Trp Phe Asn
 4340 4345 4350
 Asp Leu Leu Leu Arg Cys Arg Glu Leu Asp Thr Trp Thr Gln Asp Leu
 4355 4360 4365
 Thr Leu Pro Ala Val Val Trp Leu Ser Gly Phe Phe Asn Pro Gln Ser
 4370 4375 4380
 Phe Leu Thr Ala Ile Met Gln Thr Met Ala Arg Lys Asn Glu Trp Pro
 4385 4390 4395 4400
 Leu Asp Lys Thr Arg Leu Thr Ala Asp Val Thr Lys Lys Thr Lys Glu
 4405 4410 4415
 Asp Tyr Gly His Pro Pro Arg Glu Gly Ala Tyr Leu His Gly Leu Phe
 4420 4425 4430
 Met Glu Gly Ala Arg Trp Asp Thr Gln Ala Gly Thr Ile Val Glu Ala
 4435 4440 4445
 Arg Leu Lys Glu Leu Ala Cys Pro Met Pro Val Ile Phe Ala Lys Ala
 4450 4455 4460

Thr Pro Val Asp Arg Gln Glu Thr Lys Gln Thr Tyr Glu Cys Pro Val
 4465 4470 4475 4480
 Tyr Arg Thr Lys Leu Arg Gly Pro Ser Tyr Ile Trp Thr Phe Arg Leu
 4485 4490 4495

Lys Ser Glu Glu Lys Thr Ala Lys Trp Val Leu Ala Gly Val Ala Leu
 4500 4505 4510

Leu Leu Glu Ala
 4515

<210> 2

<211> 284

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NIPSNAP1 amino acid sequence

<400> 2

Met Ala Pro Arg Leu Cys Ser Ile Ser Val Thr Ala Arg Arg Leu Leu
 1 5 10 15
 Gly Gly Pro Gly Pro Arg Ala Gly Asp Val Ala Ser Ala Ala Ala Ala
 20 25 30

Arg Phe Tyr Ser Lys Asp Asn Glu Gly Ser Trp Phe Arg Ser Leu Phe
 35 40 45

Val His Lys Val Asp Pro Arg Lys Asp Ala His Ser Thr Leu Leu Ser
 50 55 60

Lys Lys Glu Thr Ser Asn Leu Tyr Lys Ile Gln Phe His Asn Val Lys
 65 70 75 80

Pro Glu Tyr Leu Asp Ala Tyr Asn Ser Leu Thr Glu Ala Val Leu Pro
 85 90 95

Lys Leu His Leu Asp Glu Asp Tyr Pro Cys Ser Leu Val Gly Asn Trp

100 105 110

Asn Thr Trp Tyr Gly Glu Gln Asp Gln Ala Val His Leu Trp Arg Phe
 115 120 125

Ser Gly Gly Tyr Pro Ala Leu Met Asp Cys Met Asn Lys Leu Lys Asn
 130 135 140

Asn Lys Glu Tyr Leu Glu Phe Arg Arg Glu Arg Ser Gln Met Leu Leu
 145 150 155 160
 Ser Arg Arg Asn Gln Leu Leu Leu Glu Phe Ser Phe Trp Asn Glu Pro
 165 170 175

Gln Pro Arg Met Gly Pro Asn Ile Tyr Glu Leu Arg Thr Tyr Lys Leu
 180 185 190
 Lys Pro Gly Thr Met Ile Glu Trp Gly Asn Asn Trp Ala Arg Ala Ile
 195 200 205
 Lys Tyr Arg Gln Glu Asn Gln Glu Ala Val Gly Gly Phe Phe Ser Gln
 210 215 220
 Ile Gly Glu Leu Tyr Val Val His His Leu Trp Ala Tyr Lys Asp Leu
 225 230 235 240
 Gln Ser Arg Glu Glu Thr Arg Asn Ala Ala Trp Arg Lys Arg Gly Trp

 245 250 255
 Asp Glu Asn Val Tyr Tyr Thr Val Pro Leu Val Arg His Met Glu Ser
 260 265 270
 Arg Ile Met Ile Pro Leu Lys Ile Ser Pro Leu Gln
 275 280

<210> 3

<211> 1338

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PFAS amino acid sequence

<400> 3

Met Ser Pro Val Leu His Phe Tyr Val Arg Pro Ser Gly His Glu Gly
 1 5 10 15

Ala Ala Pro Gly His Thr Arg Arg Lys Leu Gln Gly Lys Leu Pro Glu
 20 25 30
 Leu Gln Gly Val Glu Thr Glu Leu Cys Tyr Asn Val Asn Trp Thr Ala
 35 40 45
 Glu Ala Leu Pro Ser Ala Glu Glu Thr Lys Lys Leu Met Trp Leu Phe
 50 55 60

Gly Cys Pro Leu Leu Leu Asp Asp Val Ala Arg Glu Ser Trp Leu Leu
 65 70 75 80
 Pro Gly Ser Asn Asp Leu Leu Leu Glu Val Gly Pro Arg Leu Asn Phe
 85 90 95
 Ser Thr Pro Thr Ser Thr Asn Ile Val Ser Val Cys Arg Ala Thr Gly
 100 105 110
 Leu Gly Pro Val Asp Arg Val Glu Thr Thr Arg Arg Tyr Arg Leu Ser
 115 120 125
 Phe Ala His Pro Pro Ser Ala Glu Val Glu Ala Ile Ala Leu Ala Thr
 130 135 140
 Leu His Asp Arg Met Thr Glu Gln His Phe Pro His Pro Ile Gln Ser
 145 150 155 160
 Phe Ser Pro Glu Ser Met Pro Glu Pro Leu Asn Gly Pro Ile Asn Ile
 165 170 175
 Leu Gly Glu Gly Arg Leu Ala Leu Glu Lys Ala Asn Gln Glu Leu Gly
 180 185 190
 Leu Ala Leu Asp Ser Trp Asp Leu Asp Phe Tyr Thr Lys Arg Phe Gln
 195 200 205
 Glu Leu Gln Arg Asn Pro Ser Thr Val Glu Ala Phe Asp Leu Ala Gln
 210 215 220
 Ser Asn Ser Glu His Ser Arg His Trp Phe Phe Lys Gly Gln Leu His
 225 230 235 240
 Val Asp Gly Gln Lys Leu Val His Ser Leu Phe Glu Ser Ile Met Ser
 245 250 255
 Thr Gln Glu Ser Ser Asn Pro Asn Asn Val Leu Lys Phe Cys Asp Asn
 260 265 270
 Ser Ser Ala Ile Gln Gly Lys Glu Val Arg Phe Leu Arg Pro Glu Asp
 275 280 285
 Pro Thr Arg Pro Ser Arg Phe Gln Gln Gln Gln Gly Leu Arg His Val
 290 295 300
 Val Phe Thr Ala Glu Thr His Asn Phe Pro Thr Gly Val Cys Pro Phe

305 310 315 320
 Ser Gly Ala Thr Thr Gly Thr Gly Gly Arg Ile Arg Asp Val Gln Cys
 325 330 335
 Thr Gly Arg Gly Ala His Val Val Ala Gly Thr Ala Gly Tyr Cys Phe
 340 345 350
 Gly Asn Leu His Ile Pro Gly Tyr Asn Leu Pro Trp Glu Asp Pro Ser
 355 360 365
 Phe Gln Tyr Pro Gly Asn Phe Ala Arg Pro Leu Glu Val Ala Ile Glu

 370 375 380
 Ala Ser Asn Gly Ala Ser Asp Tyr Gly Asn Lys Phe Gly Glu Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Ala Gly Phe Ala Arg Ser Leu Gly Leu Gln Leu Pro Asp Gly Gln
 405 410 415
 Arg Arg Glu Trp Ile Lys Pro Ile Met Phe Ser Gly Gly Ile Gly Ser
 420 425 430
 Met Glu Ala Asp His Ile Ser Lys Glu Ala Pro Glu Pro Gly Met Glu
 435 440 445

 Val Val Lys Val Gly Gly Pro Val Tyr Arg Ile Gly Val Gly Gly Gly
 450 455 460
 Ala Ala Ser Ser Val Gln Val Gln Gly Asp Asn Thr Ser Asp Leu Asp
 465 470 475 480
 Phe Gly Ala Val Gln Arg Gly Asp Pro Glu Met Glu Gln Lys Met Asn
 485 490 495
 Arg Val Ile Arg Ala Cys Val Glu Ala Pro Lys Gly Asn Pro Ile Cys
 500 505 510
 Ser Leu His Asp Gln Gly Ala Gly Gly Asn Gly Asn Val Leu Lys Glu

 515 520 525
 Leu Ser Asp Pro Ala Gly Ala Ile Ile Tyr Thr Ser Arg Phe Gln Leu
 530 535 540
 Gly Asp Pro Thr Leu Asn Ala Leu Glu Ile Trp Gly Ala Glu Tyr Gln
 545 550 555 560
 Glu Ser Asn Ala Leu Leu Leu Arg Ser Pro Asn Arg Asp Phe Leu Thr

565 570 575
 His Val Ser Ala Arg Glu Arg Cys Pro Ala Cys Phe Val Gly Thr Ile
 580 585 590

 Thr Gly Asp Arg Arg Ile Val Leu Val Asp Asp Arg Glu Cys Pro Val
 595 600 605
 Arg Arg Asn Gly Gln Gly Asp Ala Pro Pro Thr Pro Leu Pro Thr Pro
 610 615 620
 Val Asp Leu Glu Leu Glu Trp Val Leu Gly Lys Met Pro Arg Lys Glu
 625 630 635 640
 Phe Phe Leu Gln Arg Lys Pro Pro Met Leu Gln Pro Leu Ala Leu Pro
 645 650 655
 Pro Gly Leu Ser Val His Gln Ala Leu Glu Arg Val Leu Arg Leu Pro

 660 665 670
 Ala Val Ala Ser Lys Arg Tyr Leu Thr Asn Lys Val Asp Arg Ser Val
 675 680 685
 Gly Gly Leu Val Ala Gln Gln Gln Cys Val Gly Pro Leu Gln Thr Pro
 690 695 700
 Leu Ala Asp Val Ala Val Val Ala Leu Ser His Glu Glu Leu Ile Gly
 705 710 715 720
 Ala Ala Thr Ala Leu Gly Glu Gln Pro Val Lys Ser Leu Leu Asp Pro
 725 730 735

 Lys Val Ala Ala Arg Leu Ala Val Ala Glu Ala Leu Thr Asn Leu Val
 740 745 750
 Phe Ala Leu Val Thr Asp Leu Arg Asp Val Lys Cys Ser Gly Asn Trp
 755 760 765
 Met Trp Ala Ala Lys Leu Pro Gly Glu Gly Ala Ala Leu Ala Asp Ala
 770 775 780
 Cys Glu Ala Met Val Ala Val Met Ala Ala Leu Gly Val Ala Val Asp
 785 790 795 800
 Gly Gly Lys Asp Ser Leu Ser Met Ala Ala Arg Val Gly Thr Glu Thr

 805 810 815

Val Arg Ala Pro Gly Ser Leu Val Ile Ser Ala Tyr Ala Val Cys Pro
820 825 830

Asp Ile Thr Ala Thr Val Thr Pro Asp Leu Lys His Pro Glu Gly Arg
835 840 845

Gly His Leu Leu Tyr Val Ala Leu Ser Pro Gly Gln His Arg Leu Gly
850 855 860

Gly Thr Ala Leu Ala Gln Cys Phe Ser Gln Leu Gly Glu His Pro Pro
865 870 875 880

Asp Leu Asp Leu Pro Glu Asn Leu Val Arg Ala Phe Ser Ile Thr Gln
885 890 895

Gly Leu Leu Lys Asp Arg Leu Leu Cys Ser Gly His Asp Val Ser Asp
900 905 910

Gly Gly Leu Val Thr Cys Leu Leu Glu Met Ala Phe Ala Gly Asn Cys
915 920 925

Gly Leu Gln Val Asp Val Pro Val Pro Arg Val Asp Val Leu Ser Val
930 935 940

Leu Phe Ala Glu Glu Pro Gly Leu Val Leu Glu Val Gln Glu Pro Asp
945 950 955 960

Leu Ala Gln Val Leu Lys Arg Tyr Arg Asp Ala Gly Leu His Cys Leu
965 970 975

Glu Leu Gly His Thr Gly Glu Ala Gly Pro His Ala Met Val Arg Val
980 985 990

Ser Val Asn Gly Ala Val Val Leu Glu Glu Pro Val Gly Glu Leu Arg
995 1000 1005

Ala Leu Trp Glu Glu Thr Ser Phe Gln Leu Asp Arg Leu Gln Ala Glu
1010 1015 1020

Pro Arg Cys Val Ala Glu Glu Glu Arg Gly Leu Arg Glu Arg Met Gly
1025 1030 1035 1040

Pro Ser Tyr Cys Leu Pro Pro Thr Phe Pro Lys Ala Ser Val Pro Arg
1045 1050 1055

Glu Pro Gly Gly Pro Ser Pro Arg Val Ala Ile Leu Arg Glu Glu Gly
1060 1065 1070

Ser Asn Gly Asp Arg Glu Met Ala Asp Ala Phe His Leu Ala Gly Phe
1075 1080 1085

Glu Val Trp Asp Val Thr Met Gln Asp Leu Cys Ser Gly Ala Ile Gly

1090 1095 1100

Leu Asp Thr Phe Arg Gly Val Ala Phe Val Gly Gly Phe Ser Tyr Ala
1105 1110 1115 1120

Asp Val Leu Gly Ser Ala Lys Gly Trp Ala Ala Ala Val Thr Phe His
1125 1130 1135

Pro Arg Ala Gly Ala Glu Leu Arg Arg Phe Arg Lys Arg Pro Asp Thr
1140 1145 1150

Phe Ser Leu Gly Val Cys Asn Gly Cys Gln Leu Leu Ala Leu Leu Gly
1155 1160 1165

Trp Val Gly Gly Asp Pro Asn Glu Asp Ala Ala Glu Met Gly Pro Asp
1170 1175 1180

Ser Gln Pro Ala Arg Pro Gly Leu Leu Leu Arg His Asn Leu Ser Gly
1185 1190 1195 1200

Arg Tyr Glu Ser Arg Trp Ala Ser Val Arg Val Gly Pro Gly Pro Ala
1205 1210 1215

Leu Met Leu Arg Gly Met Glu Gly Ala Val Leu Pro Val Trp Ser Ala
1220 1225 1230

His Gly Glu Gly Tyr Val Ala Phe Ser Ser Pro Glu Leu Gln Ala Gln

1235 1240 1245

Ile Glu Ala Arg Gly Leu Ala Pro Leu His Trp Ala Asp Asp Asp Gly
1250 1255 1260

Asn Pro Thr Glu Gln Tyr Pro Leu Asn Pro Asn Gly Ser Pro Gly Gly
1265 1270 1275 1280

Val Ala Gly Ile Cys Ser Cys Asp Gly Arg His Leu Ala Val Met Pro
1285 1290 1295

His Pro Glu Arg Ala Val Arg Pro Trp Gln Trp Ala Trp Arg Pro Pro
1300 1305 1310

Pro Phe Asp Thr Leu Thr Thr Ser Pro Trp Leu Gln Leu Phe Ile Asn

1315 1320 1325
Ala Arg Asn Trp Thr Leu Glu Gly Ser Cys
1330 1335
<210> 4
<211> 833
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> PPP4R3A amino acid sequence
<400> 4
Met Thr Asp Thr Arg Arg Arg Val Lys Val Tyr Thr Leu Asn Glu Asp
1 5 10 15
Arg Gln Trp Asp Asp Arg Gly Thr Gly His Val Ser Ser Gly Tyr Val
20 25 30
Glu Arg Leu Lys Gly Met Ser Leu Leu Val Arg Ala Glu Ser Asp Gly
35 40 45
Ser Leu Leu Leu Glu Ser Lys Ile Asn Pro Asn Thr Ala Tyr Gln Lys
50 55 60
Gln Gln Asp Thr Leu Ile Val Trp Ser Glu Ala Glu Asn Tyr Asp Leu
65 70 75 80
Ala Leu Ser Phe Gln Glu Lys Ala Gly Cys Asp Glu Ile Trp Glu Lys
85 90 95
100 105 110
Leu Val Asp Glu Ser Glu Glu Glu Arg Phe Asp Asp Met Ser Ser Pro
115 120 125
Gly Leu Glu Leu Pro Ser Cys Glu Leu Ser Arg Leu Glu Glu Ile Ala
130 135 140
Glu Leu Val Ala Ser Ser Leu Pro Ser Pro Leu Arg Arg Glu Lys Leu
145 150 155 160
Ala Leu Ala Leu Glu Asn Glu Gly Tyr Ile Lys Lys Leu Leu Glu Leu
165 170 175
Phe His Val Cys Glu Asp Leu Glu Asn Ile Glu Gly Leu His His Leu

180 185 190
 Tyr Glu Ile Ile Lys Gly Ile Phe Leu Leu Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 195 200 205
 Glu Val Met Phe Ser Glu Glu Cys Ile Met Asp Val Ile Gly Cys Leu
 210 215 220
 Glu Tyr Asp Pro Ala Leu Ser Gln Pro Arg Lys His Arg Glu Phe Leu
 225 230 235 240

 Thr Lys Thr Ala Lys Phe Lys Glu Val Ile Pro Ile Ser Asp Pro Glu
 245 250 255
 Leu Lys Gln Lys Ile His Gln Thr Tyr Arg Val Gln Tyr Ile Gln Asp
 260 265 270
 Met Val Leu Pro Thr Pro Ser Val Phe Glu Glu Asn Met Leu Ser Thr
 275 280 285
 Leu His Ser Phe Ile Phe Phe Asn Lys Val Glu Ile Val Gly Met Leu
 290 295 300
 Gln Glu Asp Glu Lys Phe Leu Thr Asp Leu Phe Ala Gln Leu Thr Asp

 305 310 315 320
 Glu Ala Thr Asp Glu Glu Lys Arg Gln Glu Leu Val Asn Phe Leu Lys
 325 330 335
 Glu Phe Cys Ala Phe Ser Gln Thr Leu Gln Pro Gln Asn Arg Asp Ala
 340 345 350
 Phe Phe Lys Thr Leu Ser Asn Met Gly Ile Leu Pro Ala Leu Glu Val
 355 360 365
 Ile Leu Gly Met Asp Asp Thr Gln Val Arg Ser Ala Ala Thr Asp Ile
 370 375 380

 Phe Ser Tyr Leu Val Glu Tyr Asn Pro Ser Met Val Arg Glu Phe Val
 385 390 395 400
 Met Gln Glu Ala Gln Gln Asn Asp Asp Val Ser Lys Lys Leu Thr Glu
 405 410 415
 Gln Lys Ile Thr Ser Lys Asp Ile Leu Leu Ile Asn Leu Ile Ile Glu
 420 425 430
 His Met Ile Cys Asp Thr Asp Pro Glu Leu Gly Gly Ala Val Gln Leu

435 440 445
Met Gly Leu Leu Arg Thr Leu Val Asp Pro Glu Asn Met Leu Ala Thr

450 455 460
Ala Asn Lys Thr Glu Lys Thr Glu Phe Leu Gly Phe Phe Tyr Lys His
465 470 475 480

Cys Met His Val Leu Thr Ala Pro Leu Leu Ala Asn Thr Thr Glu Asp
485 490 495

Lys Pro Ser Lys Asp Asp Phe Gln Thr Ala Gln Leu Leu Ala Leu Val
500 505 510

Leu Glu Leu Leu Thr Phe Cys Val Glu His His Thr Tyr His Ile Lys
515 520 525

Asn Tyr Ile Ile Asn Lys Asp Ile Leu Arg Arg Val Leu Val Leu Met
530 535 540

Ala Ser Lys His Ala Phe Leu Ala Leu Cys Ala Leu Arg Phe Lys Arg
545 550 555 560

Lys Ile Ile Gly Leu Lys Asp Glu Phe Tyr Asn Arg Tyr Ile Met Lys
565 570 575

Ser Phe Leu Phe Glu Pro Val Val Lys Ala Phe Leu Asn Asn Gly Ser
580 585 590

Arg Tyr Asn Leu Met Asn Ser Ala Ile Ile Glu Met Phe Glu Phe Ile

595 600 605
Arg Val Glu Asp Ile Lys Ser Leu Thr Ala His Val Ile Glu Asn Tyr

610 615 620
Trp Lys Ala Leu Glu Asp Val Asp Tyr Val Gln Thr Phe Lys Gly Leu

625 630 635 640
Lys Leu Arg Phe Glu Gln Gln Arg Glu Arg Gln Asp Asn Pro Lys Leu

645 650 655
Asp Ser Met Arg Ser Ile Leu Arg Asn His Arg Tyr Arg Arg Asp Ala

660 665 670

Arg Thr Leu Glu Asp Glu Glu Glu Met Trp Phe Asn Thr Asp Glu Asp
675 680 685

Asp Met Glu Asp Gly Glu Ala Val Val Ser Pro Ser Asp Lys Thr Lys
690 695 700
Asn Asp Asp Asp Ile Met Asp Pro Ile Ser Lys Phe Met Glu Arg Lys
705 710 715 720
Lys Leu Lys Glu Ser Glu Glu Lys Glu Val Leu Leu Lys Thr Asn Leu
725 730 735
Ser Gly Arg Gln Ser Pro Ser Phe Lys Leu Ser Leu Ser Ser Gly Thr
740 745 750
Lys Thr Asn Leu Thr Ser Gln Ser Ser Thr Thr Asn Leu Pro Gly Ser
755 760 765
Pro Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly Ser Val
770 775 780
Pro Lys Asn Thr Ser Gln Thr Ala Ala Ile Thr Thr Lys Gly Gly Leu
785 790 795 800
Val Gly Leu Val Asp Tyr Pro Asp Asp Asp Glu Asp Asp Asp Glu Asp
805 810 815
Glu Asp Lys Glu Asp Thr Leu Pro Leu Ser Lys Lys Ala Lys Phe Asp
820 825 830
Ser

<210> 5

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCFD2 amino acid sequence

<400> 5

Met Thr Met Arg Ser Leu Leu Arg Thr Pro Phe Leu Cys Gly Leu Leu
1 5 10 15
Trp Ala Phe Cys Ala Pro Gly Ala Arg Ala Glu Glu Pro Ala Ala Ser
20 25 30

Phe Ser Gln Pro Gly Ser Met Gly Leu Asp Lys Asn Thr Val His Asp
35 40 45

Gln Glu His Ile Met Glu His Leu Glu Gly Val Ile Asn Lys Pro Glu
50 55 60

Ala Glu Met Ser Pro Gln Glu Leu Gln Leu His Tyr Phe Lys Met His
65 70 75 80

Asp Tyr Asp Gly Asn Asn Leu Leu Asp Gly Leu Glu Leu Ser Thr Ala
85 90 95

Ile Thr His Val His Lys Glu Glu Gly Ser Glu Gln Ala Pro Leu Met

100 105 110

Ser Glu Asp Glu Leu Ile Asn Ile Ile Asp Gly Val Leu Arg Asp Asp
115 120 125

Asp Lys Asn Asn Asp Gly Tyr Ile Asp Tyr Ala Glu Phe Ala Lys Ser
130 135 140

Leu Gln
145

<210> 6

<211> 1151

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> NRDC amino acid sequence

<400> 6

Met Leu Arg Arg Val Thr Val Ala Ala Val Cys Ala Thr Arg Arg Lys
1 5 10 15

Leu Cys Glu Ala Gly Arg Glu Leu Ala Ala Leu Trp Gly Ile Glu Thr
20 25 30

Arg Gly Arg Cys Glu Asp Ser Ala Ala Ala Arg Pro Phe Pro Ile Leu
35 40 45

Ala Met Pro Gly Arg Asn Lys Ala Lys Ser Thr Cys Ser Cys Pro Asp
50 55 60

Leu Gln Pro Asn Gly Gln Asp Leu Gly Glu Asn Ser Arg Val Ala Arg
65 70 75 80

Leu Gly Ala Asp Glu Ser Glu Glu Glu Gly Arg Arg Gly Ser Leu Ser
85 90 95

Asn Ala Gly Asp Pro Glu Ile Val Lys Ser Pro Ser Asp Pro Lys Gln
 100 105 110
 Tyr Arg Tyr Ile Lys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Ala Leu Leu Ile Ser
 115 120 125
 Asp Leu Ser Asn Met Glu Gly Lys Thr Gly Asn Thr Thr Asp Asp Glu
 130 135 140
 Glu Glu Glu Glu Val Glu Glu Glu Glu Glu Asp Asp Asp Glu Asp Ser
 145 150 155 160

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

 225 230 235 240
 Met Gly Ser Leu Lys Tyr Pro Asp Glu Asn Gly Phe Asp Ala Phe Leu
 245 250 255
 Lys Lys His Gly Gly Ser Asp Asn Ala Ser Thr Asp Cys Glu Arg Thr
 260 265 270
 Val Phe Gln Phe Asp Val Gln Arg Lys Tyr Phe Lys Glu Ala Leu Asp
 275 280 285
 Arg Trp Ala Gln Phe Phe Ile His Pro Leu Met Ile Arg Asp Ala Ile
 290 295 300

 Asp Arg Glu Val Glu Ala Val Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Ala Arg Pro
 305 310 315 320
 Ser Asp Ala Asn Arg Lys Glu Met Leu Phe Gly Ser Leu Ala Arg Pro
 325 330 335
 Gly His Pro Met Gly Lys Phe Phe Trp Gly Asn Ala Glu Thr Leu Lys
 340 345 350

His Glu Pro Arg Lys Asn Asn Ile Asp Thr His Ala Arg Leu Arg Glu
355 360 365

Phe Trp Met Arg Tyr Tyr Ser Ser His Tyr Met Thr Leu Val Val Gln
370 375 380

Ser Lys Glu Thr Leu Asp Thr Leu Glu Lys Trp Val Thr Glu Ile Phe
385 390 395 400

Ser Gln Ile Pro Asn Asn Gly Leu Pro Arg Pro Asn Phe Gly His Leu
405 410 415

Thr Asp Pro Phe Asp Thr Pro Ala Phe Asn Lys Leu Tyr Arg Val Val
420 425 430

Pro Ile Arg Lys Ile His Ala Leu Thr Ile Thr Trp Ala Leu Pro Pro
435 440 445

Gln Gln Gln His Tyr Arg Val Lys Pro Leu His Tyr Ile Ser Trp Leu
450 455 460

Val Gly His Glu Gly Lys Gly Ser Ile Leu Ser Phe Leu Arg Lys Lys
465 470 475 480

Cys Trp Ala Leu Ala Leu Phe Gly Gly Asn Gly Glu Thr Gly Phe Glu
485 490 495

Gln Asn Ser Thr Tyr Ser Val Phe Ser Ile Ser Ile Thr Leu Thr Asp
500 505 510

Glu Gly Tyr Glu His Phe Tyr Glu Val Ala Tyr Thr Val Phe Gln Tyr
515 520 525

Leu Lys Met Leu Gln Lys Leu Gly Pro Glu Lys Arg Ile Phe Glu Glu
530 535 540

Ile Arg Lys Ile Glu Asp Asn Glu Phe His Tyr Gln Glu Gln Thr Asp
545 550 555 560

Pro Val Glu Tyr Val Glu Asn Met Cys Glu Asn Met Gln Leu Tyr Pro
565 570 575

Leu Gln Asp Ile Leu Thr Gly Asp Gln Leu Leu Phe Glu Tyr Lys Pro
580 585 590

Glu Val Ile Gly Glu Ala Leu Asn Gln Leu Val Pro Gln Lys Ala Asn

595 600 605
 Leu Val Leu Leu Ser Gly Ala Asn Glu Gly Lys Cys Asp Leu Lys Glu
 610 615 620
 Lys Trp Phe Gly Thr Gln Tyr Ser Ile Glu Asp Ile Glu Asn Ser Trp
 625 630 635 640
 Ala Glu Leu Trp Asn Ser Asn Phe Glu Leu Asn Pro Asp Leu His Leu
 645 650 655
 Pro Ala Glu Asn Lys Tyr Ile Ala Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ala Phe

 660 665 670
 Asp Cys Pro Glu Thr Glu Tyr Pro Val Lys Ile Val Asn Thr Pro Gln
 675 680 685
 Gly Cys Leu Trp Tyr Lys Lys Asp Asn Lys Phe Lys Ile Pro Lys Ala
 690 695 700
 Tyr Ile Arg Phe His Leu Ile Ser Pro Leu Ile Gln Lys Ser Ala Ala
 705 710 715 720
 Asn Val Val Leu Phe Asp Ile Phe Val Asn Ile Leu Thr His Asn Leu
 725 730 735

 Ala Glu Pro Ala Tyr Glu Ala Asp Val Ala Gln Leu Glu Tyr Lys Leu
 740 745 750
 Val Ala Gly Glu His Gly Leu Ile Ile Arg Val Lys Gly Phe Asn His
 755 760 765
 Lys Leu Pro Leu Leu Phe Gln Leu Ile Ile Asp Tyr Leu Ala Glu Phe
 770 775 780
 Asn Ser Thr Pro Ala Val Phe Thr Met Ile Thr Glu Gln Leu Lys Lys
 785 790 795 800
 Thr Tyr Phe Asn Ile Leu Ile Lys Pro Glu Thr Leu Ala Lys Asp Val

 805 810 815
 Arg Leu Leu Ile Leu Glu Tyr Ala Arg Trp Ser Met Ile Asp Lys Tyr
 820 825 830
 Gln Ala Leu Met Asp Gly Leu Ser Leu Glu Ser Leu Leu Ser Phe Val
 835 840 845
 Lys Glu Phe Lys Ser Gln Leu Phe Val Glu Gly Leu Val Gln Gly Asn

850 855 860
 Val Thr Ser Thr Glu Ser Met Asp Phe Leu Lys Tyr Val Val Asp Lys
 865 870 875 880

 Leu Asn Phe Lys Pro Leu Glu Gln Glu Met Pro Val Gln Phe Gln Val
 885 890 895
 Val Glu Leu Pro Ser Gly His His Leu Cys Lys Val Lys Ala Leu Asn
 900 905 910
 Lys Gly Asp Ala Asn Ser Glu Val Thr Val Tyr Tyr Gln Ser Gly Thr
 915 920 925
 Arg Ser Leu Arg Glu Tyr Thr Leu Met Glu Leu Leu Val Met His Met
 930 935 940
 Glu Glu Pro Cys Phe Asp Phe Leu Arg Thr Lys Gln Thr Leu Gly Tyr

 945 950 955 960
 His Val Tyr Pro Thr Cys Arg Asn Thr Ser Gly Ile Leu Gly Phe Ser
 965 970 975
 Val Thr Val Gly Thr Gln Ala Thr Lys Tyr Asn Ser Glu Val Val Asp
 980 985 990
 Lys Lys Ile Glu Glu Phe Leu Ser Ser Phe Glu Glu Lys Ile Glu Asn
 995 1000 1005
 Leu Thr Glu Glu Ala Phe Asn Thr Gln Val Thr Ala Leu Ile Lys Leu
 1010 1015 1020

 Lys Glu Cys Glu Asp Thr His Leu Gly Glu Glu Val Asp Arg Asn Trp
 1025 1030 1035 1040
 Asn Glu Val Val Thr Gln Gln Tyr Leu Phe Asp Arg Leu Ala His Glu
 1045 1050 1055
 Ile Glu Ala Leu Lys Ser Phe Ser Lys Ser Asp Leu Val Asn Trp Phe
 1060 1065 1070
 Lys Ala His Arg Gly Pro Gly Ser Lys Met Leu Ser Val His Val Val
 1075 1080 1085
 Gly Tyr Gly Lys Tyr Glu Leu Glu Glu Asp Gly Thr Pro Ser Ser Glu

 1090 1095 1100

Asp Ser Asn Ser Ser Cys Glu Val Met Gln Leu Thr Tyr Leu Pro Thr
 1105 1110 1115 1120
 Ser Pro Leu Leu Ala Asp Cys Ile Ile Pro Ile Thr Asp Ile Arg Ala
 1125 1130 1135
 Phe Thr Thr Thr Leu Asn Leu Leu Pro Tyr His Lys Ile Val Lys
 1140 1145 1150
 <210> 7
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > ALYREF amino acid sequence
 <400> 7
 Met Ala Asp Lys Met Asp Met Ser Leu Asp Asp Ile Ile Lys Leu Asn
 1 5 10 15
 Arg Ser Gln Arg Gly Gly Arg Gly Gly Gly Arg Gly Arg Gly Arg Ala
 20 25 30
 Gly Ser Gln Gly Gly Arg Gly Gly Gly Ala Gln Ala Ala Ala Arg Val
 35 40 45
 Asn Arg Gly Gly Gly Pro Ile Arg Asn Arg Pro Ala Ile Ala Arg Gly
 50 55 60
 Ala Ala Gly Gly Gly Gly Arg Asn Arg Pro Ala Pro Tyr Ser Arg Pro
 65 70 75 80
 Lys Gln Leu Pro Asp Lys Trp Gln His Asp Leu Phe Asp Ser Gly Phe
 85 90 95
 Gly Gly Gly Ala Gly Val Glu Thr Gly Gly Lys Leu Leu Val Ser Asn
 100 105 110
 Leu Asp Phe Gly Val Ser Asp Ala Asp Ile Gln Glu Leu Phe Ala Glu
 115 120 125
 Phe Gly Thr Leu Lys Lys Ala Ala Val His Tyr Asp Arg Ser Gly Arg
 130 135 140
 Ser Leu Gly Thr Ala Asp Val His Phe Glu Arg Lys Ala Asp Ala Leu
 145 150 155 160

Lys Ala Met Lys Gln Tyr Asn Gly Val Pro Leu Asp Gly Arg Pro Met
 165 170 175
 Asn Ile Gln Leu Val Thr Ser Gln Ile Asp Ala Gln Arg Arg Pro Ala
 180 185 190
 Gln Ser Val Asn Arg Gly Gly Met Thr Arg Asn Arg Gly Ala Gly Gly
 195 200 205

Phe Gly Gly Gly Gly Gly Thr Arg Arg Gly Thr Arg Gly Gly Ala Arg
 210 215 220
 Gly Arg Gly Arg Gly Ala Gly Arg Asn Ser Lys Gln Gln Leu Ser Ala
 225 230 235 240
 Glu Glu Leu Asp Ala Gln Leu Asp Ala Tyr Asn Ala Arg Met Asp Thr
 245 250 255

Ser

<210> 8
 <211> 736
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HSD17B4 amino acid sequence
 <400> 8

Met Gly Ser Pro Leu Arg Phe Asp Gly Arg Val Val Leu Val Thr Gly
 1 5 10 15
 Ala Gly Ala Gly Leu Gly Arg Ala Tyr Ala Leu Ala Phe Ala Glu Arg
 20 25 30
 Gly Ala Leu Val Val Val Asn Asp Leu Gly Gly Asp Phe Lys Gly Val
 35 40 45
 Gly Lys Gly Ser Leu Ala Ala Asp Lys Val Val Glu Glu Ile Arg Arg
 50 55 60
 Arg Gly Gly Lys Ala Val Ala Asn Tyr Asp Ser Val Glu Glu Gly Glu
 65 70 75 80
 Lys Val Val Lys Thr Ala Leu Asp Ala Phe Gly Arg Ile Asp Val Val
 85 90 95

Val Asn Asn Ala Gly Ile Leu Arg Asp Arg Ser Phe Ala Arg Ile Ser
100 105 110

Asp Glu Asp Trp Asp Ile Ile His Arg Val His Leu Arg Gly Ser Phe
115 120 125

Gln Val Thr Arg Ala Ala Trp Glu His Met Lys Lys Gln Lys Tyr Gly
130 135 140

Arg Ile Ile Met Thr Ser Ser Ala Ser Gly Ile Tyr Gly Asn Phe Gly
145 150 155 160

Gln Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Lys Leu Gly Leu Leu Gly Leu Ala Asn
165 170 175

Ser Leu Ala Ile Glu Gly Arg Lys Ser Asn Ile His Cys Asn Thr Ile
180 185 190

Ala Pro Asn Ala Gly Ser Arg Met Thr Gln Thr Val Met Pro Glu Asp
195 200 205

Leu Val Glu Ala Leu Lys Pro Glu Tyr Val Ala Pro Leu Val Leu Trp
210 215 220

Leu Cys His Glu Ser Cys Glu Glu Asn Gly Gly Leu Phe Glu Val Gly
225 230 235 240

Ala Gly Trp Ile Gly Lys Leu Arg Trp Glu Arg Thr Leu Gly Ala Ile
245 250 255

Val Arg Gln Lys Asn His Pro Met Thr Pro Glu Ala Val Lys Ala Asn
260 265 270

Trp Lys Lys Ile Cys Asp Phe Glu Asn Ala Ser Lys Pro Gln Ser Ile
275 280 285

Gln Glu Ser Thr Gly Ser Ile Ile Glu Val Leu Ser Lys Ile Asp Ser
290 295 300

Glu Gly Gly Val Ser Ala Asn His Thr Ser Arg Ala Thr Ser Thr Ala
305 310 315 320

Thr Ser Gly Phe Ala Gly Ala Ile Gly Gln Lys Leu Pro Pro Phe Ser
325 330 335

Tyr Ala Tyr Thr Glu Leu Glu Ala Ile Met Tyr Ala Leu Gly Val Gly
340 345 350

Ala Ser Ile Lys Asp Pro Lys Asp Leu Lys Phe Ile Tyr Glu Gly Ser

355 360 365
Ser Asp Phe Ser Cys Leu Pro Thr Phe Gly Val Ile Ile Gly Gln Lys

370 375 380
Ser Met Met Gly Gly Gly Leu Ala Glu Ile Pro Gly Leu Ser Ile Asn

385 390 395 400
Phe Ala Lys Val Leu His Gly Glu Gln Tyr Leu Glu Leu Tyr Lys Pro

405 410 415
Leu Pro Arg Ala Gly Lys Leu Lys Cys Glu Ala Val Val Ala Asp Val

420 425 430
Leu Asp Lys Gly Ser Gly Val Val Ile Ile Met Asp Val Tyr Ser Tyr

435 440 445
Ser Glu Lys Glu Leu Ile Cys His Asn Gln Phe Ser Leu Phe Leu Val

450 455 460
Gly Ser Gly Gly Phe Gly Gly Lys Arg Thr Ser Asp Lys Val Lys Val

465 470 475 480
Ala Val Ala Ile Pro Asn Arg Pro Pro Asp Ala Val Leu Thr Asp Thr

485 490 495
Thr Ser Leu Asn Gln Ala Ala Leu Tyr Arg Leu Ser Gly Asp Trp Asn

500 505 510
Pro Leu His Ile Asp Pro Asn Phe Ala Ser Leu Ala Gly Phe Asp Lys

515 520 525
Pro Ile Leu His Gly Leu Cys Thr Phe Gly Phe Ser Ala Arg Arg Val

530 535 540
Leu Gln Gln Phe Ala Asp Asn Asp Val Ser Arg Phe Lys Ala Ile Lys

545 550 555 560
Ala Arg Phe Ala Lys Pro Val Tyr Pro Gly Gln Thr Leu Gln Thr Glu

565 570 575
Met Trp Lys Glu Gly Asn Arg Ile His Phe Gln Thr Lys Val Gln Glu

580 585 590
Thr Gly Asp Ile Val Ile Ser Asn Ala Tyr Val Asp Leu Ala Pro Thr

595 600 605
 Ser Gly Thr Ser Ala Lys Thr Pro Ser Glu Gly Gly Lys Leu Gln Ser
 610 615 620
 Thr Phe Val Phe Glu Glu Ile Gly Arg Arg Leu Lys Asp Ile Gly Pro
 625 630 635 640
 Glu Val Val Lys Lys Val Asn Ala Val Phe Glu Trp His Ile Thr Lys

 645 650 655
 Gly Gly Asn Ile Gly Ala Lys Trp Thr Ile Asp Leu Lys Ser Gly Ser
 660 665 670
 Gly Lys Val Tyr Gln Gly Pro Ala Lys Gly Ala Ala Asp Thr Thr Ile
 675 680 685
 Ile Leu Ser Asp Glu Asp Phe Met Glu Val Val Leu Gly Lys Leu Asp
 690 695 700
 Pro Gln Lys Ala Phe Phe Ser Gly Arg Leu Lys Ala Arg Gly Asn Ile
 705 710 715 720

 Met Leu Ser Gln Lys Leu Gln Met Ile Leu Lys Asp Tyr Ala Lys Leu
 725 730 735

 <210> 9
 <211> 629
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PLS1 amino acid sequence
 <400> 9
 Met Glu Asn Ser Thr Thr Thr Ile Ser Arg Glu Glu Leu Glu Glu Leu
 1 5 10 15
 Gln Glu Ala Phe Asn Lys Ile Asp Ile Asp Asn Ser Gly Tyr Val Ser
 20 25 30
 Asp Tyr Glu Leu Gln Asp Leu Phe Lys Glu Ala Ser Leu Pro Leu Pro

 35 40 45
 Gly Tyr Lys Val Arg Glu Ile Val Glu Lys Ile Leu Ser Val Ala Asp
 50 55 60
 Ser Asn Lys Asp Gly Lys Ile Ser Phe Glu Glu Phe Val Ser Leu Met

65						70						75						80						
Gln	Glu	Leu	Lys	Ser	Lys	Asp	Ile	Ser	Lys	Thr	Phe	Arg	Lys	Ile	Ile									
					85					90					95									
Asn	Lys	Arg	Glu	Gly	Ile	Thr	Ala	Ile	Gly	Gly	Thr	Ser	Thr	Ile	Ser									
					100					105					110									
Ser	Glu	Gly	Thr	Gln	His	Ser	Tyr	Ser	Glu	Glu	Glu	Lys	Val	Ala	Phe									
					115					120					125									
Val	Asn	Trp	Ile	Asn	Lys	Ala	Leu	Glu	Asn	Asp	Pro	Asp	Cys	Lys	His									
					130					135					140									
Leu	Ile	Pro	Met	Asn	Pro	Asn	Asp	Asp	Ser	Leu	Phe	Lys	Ser	Leu	Ala									
					145					150					155					160				
Asp	Gly	Ile	Leu	Leu	Cys	Lys	Met	Ile	Asn	Leu	Ser	Glu	Pro	Asp	Thr									
					165					170					175									
Ile	Asp	Glu	Arg	Ala	Ile	Asn	Lys	Lys	Lys	Leu	Thr	Pro	Phe	Thr	Ile									
					180					185					190									
Ser	Glu	Asn	Leu	Asn	Leu	Ala	Leu	Asn	Ser	Ala	Ser	Ala	Ile	Gly	Cys									
					195					200					205									
Thr	Val	Val	Asn	Ile	Gly	Ala	Ser	Asp	Leu	Lys	Glu	Gly	Lys	Pro	His									
					210					215					220									
Leu	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Trp	Gln	Ile	Ile	Lys	Val	Gly	Leu	Phe	Ala									
					225					230					235					240				
Asp	Ile	Glu	Ile	Ser	Arg	Asn	Glu	Ala	Leu	Ile	Ala	Leu	Leu	Asn	Glu									
					245					250					255									
Gly	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	Met	Lys	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Leu									
					260					265					270									
Leu	Arg	Trp	Val	Asn	Tyr	His	Leu	Thr	Asn	Ala	Gly	Trp	His	Thr	Ile									
					275					280					285									
Ser	Asn	Phe	Ser	Gln	Asp	Ile	Lys	Asp	Ser	Arg	Ala	Tyr	Phe	His	Leu									
					290					295					300									
Leu	Asn	Gln	Ile	Ala	Pro	Lys	Gly	Gly	Glu	Asp	Gly	Pro	Ala	Ile	Ala									
					305					310					315					320				

Ile Asp Leu Ser Gly Ile Asn Glu Thr Asn Asp Leu Lys Arg Ala Gly

325 330 335

Leu Met Leu Gln Glu Ala Asp Lys Leu Gly Cys Lys Gln Phe Val Thr

340 345 350

Pro Ala Asp Val Val Ser Gly Asn Pro Lys Leu Asn Leu Ala Phe Val

355 360 365

Ala Asn Leu Phe Asn Thr Tyr Pro Cys Leu His Lys Pro Asn Asn Asn

370 375 380

Asp Ile Asp Met Asn Leu Leu Glu Gly Glu Ser Lys Glu Glu Arg Thr

385 390 395 400

Phe Arg Asn Trp Met Asn Ser Leu Gly Val Asn Pro Tyr Ile Asn His

405 410 415

Leu Tyr Ser Asp Leu Ala Asp Ala Leu Val Ile Phe Gln Leu Tyr Glu

420 425 430

Met Ile Arg Val Pro Val Asn Trp Ser His Val Asn Lys Pro Pro Tyr

435 440 445

Pro Ala Leu Gly Gly Asn Met Lys Lys Ile Glu Asn Cys Asn Tyr Ala

450 455 460

Val Glu Leu Gly Lys Asn Lys Ala Lys Phe Ser Leu Val Gly Ile Ala

465 470 475 480

Gly Gln Asp Leu Asn Glu Gly Asn Ser Thr Leu Thr Leu Ala Leu Val

485 490 495

Trp Gln Leu Met Arg Arg Tyr Thr Leu Asn Val Leu Ser Asp Leu Gly

500 505 510

Glu Gly Glu Lys Val Asn Asp Glu Ile Ile Ile Lys Trp Val Asn Gln

515 520 525

Thr Leu Lys Ser Ala Asn Lys Lys Thr Ser Ile Ser Ser Phe Lys Asp

530 535 540

Lys Ser Ile Ser Thr Ser Leu Pro Val Leu Asp Leu Ile Asp Ala Ile

545 550 555 560

Ala Pro Asn Ala Val Arg Gln Glu Met Ile Arg Arg Glu Asn Leu Ser

565 570 575
 Asp Glu Asp Lys Leu Asn Asn Ala Lys Tyr Ala Ile Ser Val Ala Arg
 580 585 590
 Lys Ile Gly Ala Arg Ile Tyr Ala Leu Pro Asp Asp Leu Val Glu Val
 595 600 605
 Lys Pro Lys Met Val Met Thr Val Phe Ala Cys Leu Met Gly Lys Gly

610 615 620
 Leu Asn Arg Ile Lys
 625
 <210> 10
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PGC amino acid sequence
 <400> 10
 Met Lys Trp Met Val Val Val Leu Val Cys Leu Gln Leu Leu Glu Ala
 1 5 10 15
 Ala Val Val Lys Val Pro Leu Lys Lys Phe Lys Ser Ile Arg Glu Thr
 20 25 30
 Met Lys Glu Lys Gly Leu Leu Gly Glu Phe Leu Arg Thr His Lys Tyr

35 40 45
 Asp Pro Ala Trp Lys Tyr Arg Phe Gly Asp Leu Ser Val Thr Tyr Glu
 50 55 60
 Pro Met Ala Tyr Met Asp Ala Ala Tyr Phe Gly Glu Ile Ser Ile Gly
 65 70 75 80
 Thr Pro Pro Gln Asn Phe Leu Val Leu Phe Asp Thr Gly Ser Ser Asn
 85 90 95
 Leu Trp Val Pro Ser Val Tyr Cys Gln Ser Gln Ala Cys Thr Ser His
 100 105 110
 Ser Arg Phe Asn Pro Ser Glu Ser Ser Thr Tyr Ser Thr Asn Gly Gln
 115 120 125
 Thr Phe Ser Leu Gln Tyr Gly Ser Gly Ser Leu Thr Gly Phe Phe Gly

130 135 140
 Tyr Asp Thr Leu Thr Val Gln Ser Ile Gln Val Pro Asn Gln Glu Phe
 145 150 155 160
 Gly Leu Ser Glu Asn Glu Pro Gly Thr Asn Phe Val Tyr Ala Gln Phe
 165 170 175
 Asp Gly Ile Met Gly Leu Ala Tyr Pro Ala Leu Ser Val Asp Glu Ala

 180 185 190
 Thr Thr Ala Met Gln Gly Met Val Gln Glu Gly Ala Leu Thr Ser Pro
 195 200 205
 Val Phe Ser Val Tyr Leu Ser Asn Gln Gln Gly Ser Ser Gly Gly Ala
 210 215 220
 Val Val Phe Gly Gly Val Asp Ser Ser Leu Tyr Thr Gly Gln Ile Tyr
 225 230 235 240
 Trp Ala Pro Val Thr Gln Glu Leu Tyr Trp Gln Ile Gly Ile Glu Glu
 245 250 255

 Phe Leu Ile Gly Gly Gln Ala Ser Gly Trp Cys Ser Glu Gly Cys Gln
 260 265 270
 Ala Ile Val Asp Thr Gly Thr Ser Leu Leu Thr Val Pro Gln Gln Tyr
 275 280 285
 Met Ser Ala Leu Leu Gln Ala Thr Gly Ala Gln Glu Asp Glu Tyr Gly
 290 295 300
 Gln Phe Leu Val Asn Cys Asn Ser Ile Gln Asn Leu Pro Ser Leu Thr
 305 310 315 320
 Phe Ile Ile Asn Gly Val Glu Phe Pro Leu Pro Pro Ser Ser Tyr Ile

 325 330 335
 Leu Ser Asn Asn Gly Tyr Cys Thr Val Gly Val Glu Pro Thr Tyr Leu
 340 345 350
 Ser Ser Gln Asn Gly Gln Pro Leu Trp Ile Leu Gly Asp Val Phe Leu
 355 360 365
 Arg Ser Tyr Tyr Ser Val Tyr Asp Leu Gly Asn Asn Arg Val Gly Phe
 370 375 380
 Ala Thr Ala Ala

385

<210> 11

<211> 441

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ARMT1 amino acid sequence

<400> 11

Met Ala Val Val Pro Ala Ser Leu Ser Gly Gln Asp Val Gly Ser Phe

1 5 10 15

Ala Tyr Leu Thr Ile Lys Asp Arg Ile Pro Gln Ile Leu Thr Lys Val

20 25 30

Ile Asp Thr Leu His Arg His Lys Ser Glu Phe Phe Glu Lys His Gly

35 40 45

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

50 55 60

Leu Arg Asn Glu Leu Gln Thr Asp Lys Pro Phe Ile Pro Leu Val Glu

65 70 75 80

Lys Phe Val Asp Thr Asp Ile Trp Asn Gln Tyr Leu Glu Tyr Gln Gln

85 90 95

Ser Leu Leu Asn Glu Ser Asp Gly Lys Ser Arg Trp Phe Tyr Ser Pro

100 105 110

Trp Leu Leu Val Glu Cys Tyr Met Tyr Arg Arg Ile His Glu Ala Ile

115 120 125

Ile Gln Ser Pro Pro Ile Asp Tyr Phe Asp Val Phe Lys Glu Ser Lys

130 135 140

Glu Gln Asn Phe Tyr Gly Ser Gln Glu Ser Ile Ile Ala Leu Cys Thr

145 150 155 160

His Leu Gln Gln Leu Ile Arg Thr Ile Glu Asp Leu Asp Glu Asn Gln

165 170 175

Leu Lys Asp Glu Phe Phe Lys Leu Leu Gln Ile Ser Leu Trp Gly Asn

180 185 190

Lys Cys Asp Leu Ser Leu Ser Gly Gly Glu Ser Ser Ser Gln Asn Thr

195 200 205
 Asn Val Leu Asn Ser Leu Glu Asp Leu Lys Pro Phe Ile Leu Leu Asn
 210 215 220
 Asp Met Glu His Leu Trp Ser Leu Leu Ser Asn Cys Lys Lys Thr Arg
 225 230 235 240
 Glu Lys Ala Ser Ala Thr Arg Val Tyr Ile Val Leu Asp Asn Ser Gly
 245 250 255
 Phe Glu Leu Val Thr Asp Leu Ile Leu Ala Asp Phe Leu Leu Ser Ser
 260 265 270
 Glu Leu Ala Thr Glu Val His Phe Tyr Gly Lys Thr Ile Pro Trp Phe
 275 280 285
 Val Ser Asp Thr Thr Ile His Asp Phe Asn Trp Leu Ile Glu Gln Val
 290 295 300
 Lys His Ser Asn His Lys Trp Met Ser Lys Cys Gly Ala Asp Trp Glu
 305 310 315 320
 Glu Tyr Ile Lys Met Gly Lys Trp Val Tyr His Asn His Ile Phe Trp
 325 330 335
 Thr Leu Pro His Glu Tyr Cys Ala Met Pro Gln Val Ala Pro Asp Leu
 340 345 350
 Tyr Ala Glu Leu Gln Lys Ala His Leu Ile Leu Phe Lys Gly Asp Leu
 355 360 365
 Asn Tyr Arg Lys Leu Thr Gly Asp Arg Lys Trp Glu Phe Ser Val Pro
 370 375 380
 Phe His Gln Ala Leu Asn Gly Phe His Pro Ala Pro Leu Cys Thr Ile
 385 390 395 400
 Arg Thr Leu Lys Ala Glu Ile Gln Val Gly Leu Gln Pro Gly Gln Gly
 405 410 415
 Glu Gln Leu Leu Ala Ser Glu Pro Ser Trp Trp Thr Thr Gly Lys Tyr
 420 425 430
 Gly Ile Phe Gln Tyr Asp Gly Pro Leu
 435 440

<210> 12
 <211> 260
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PCSK1N amino acid sequence
 <400> 12
 Met Ala Gly Ser Pro Leu Leu Trp Gly Pro Arg Ala Gly Gly Val Gly
 1 5 10 15
 Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Gly Leu Phe Arg Pro Pro Pro Ala Leu
 20 25 30
 Cys Ala Arg Pro Val Lys Glu Pro Arg Gly Leu Ser Ala Ala Ser Pro
 35 40 45
 Pro Leu Ala Glu Thr Gly Ala Pro Arg Arg Phe Arg Arg Ser Val Pro
 50 55 60
 Arg Gly Glu Ala Ala Gly Ala Val Gln Glu Leu Ala Arg Ala Leu Ala
 65 70 75 80
 His Leu Leu Glu Ala Glu Arg Gln Glu Arg Ala Arg Ala Glu Ala Gln
 85 90 95
 Glu Ala Glu Asp Gln Gln Ala Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Arg Val
 100 105 110
 Trp Gly Ala Pro Arg Asn Ser Asp Pro Ala Leu Gly Leu Asp Asp Asp
 115 120 125
 Pro Asp Ala Pro Ala Ala Gln Leu Ala Arg Ala Leu Leu Arg Ala Arg
 130 135 140
 Leu Asp Pro Ala Ala Leu Ala Ala Gln Leu Val Pro Ala Pro Val Pro
 145 150 155 160
 Ala Ala Ala Leu Arg Pro Arg Pro Pro Val Tyr Asp Asp Gly Pro Ala
 165 170 175
 Gly Pro Asp Ala Glu Glu Ala Gly Asp Glu Thr Pro Asp Val Asp Pro
 180 185 190
 Glu Leu Leu Arg Tyr Leu Leu Gly Arg Ile Leu Ala Gly Ser Ala Asp
 195 200 205

Ser Glu Gly Val Ala Ala Pro Arg Arg Leu Arg Arg Ala Ala Asp His
210 215 220

Asp Val Gly Ser Glu Leu Pro Pro Glu Gly Val Leu Gly Ala Leu Leu
225 230 235 240

Arg Val Lys Arg Leu Glu Thr Pro Ala Pro Gln Val Pro Ala Arg Arg

245 250 255

Leu Leu Pro Pro

260

<210> 13

<211> 1555

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> UGGT1 amino acid sequence

<400> 13

Met Gly Cys Lys Gly Asp Ala Ser Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Leu

1 5 10 15

Pro Val Thr Gly Val Cys Tyr Lys Met Gly Val Leu Val Val Leu Thr

20 25 30

Val Leu Trp Leu Phe Ser Ser Val Lys Ala Asp Ser Lys Ala Ile Thr

35 40 45

Thr Ser Leu Thr Thr Lys Trp Phe Ser Thr Pro Leu Leu Leu Glu Ala

50 55 60

Ser Glu Phe Leu Ala Glu Asp Ser Gln Glu Lys Phe Trp Asn Phe Val

65 70 75 80

Glu Ala Ser Gln Asn Ile Gly Ser Ser Asp His Asp Gly Thr Asp Tyr

85 90 95

Ser Tyr Tyr His Ala Ile Leu Glu Ala Ala Phe Gln Phe Leu Ser Pro

100 105 110

Leu Gln Gln Asn Leu Phe Lys Phe Cys Leu Ser Leu Arg Ser Tyr Ser

115 120 125

Ala Thr Ile Gln Ala Phe Gln Gln Ile Ala Ala Asp Glu Pro Pro Pro

130 135 140

Glu Gly Cys Asn Ser Phe Phe Ser Val His Gly Lys Lys Thr Cys Glu
 145 150 155 160
 Ser Asp Thr Leu Glu Ala Leu Leu Leu Thr Ala Ser Glu Arg Pro Lys
 165 170 175
 Pro Leu Leu Phe Lys Gly Asp His Arg Tyr Pro Ser Ser Asn Pro Glu

 180 185 190
 Ser Pro Val Val Ile Phe Tyr Ser Glu Ile Gly Ser Glu Glu Phe Ser
 195 200 205
 Asn Phe His Arg Gln Leu Ile Ser Lys Ser Asn Ala Gly Lys Ile Asn
 210 215 220
 Tyr Val Phe Arg His Tyr Ile Phe Asn Pro Arg Lys Glu Pro Val Tyr
 225 230 235 240
 Leu Ser Gly Tyr Gly Val Glu Leu Ala Ile Lys Ser Thr Glu Tyr Lys
 245 250 255

 Ala Lys Asp Asp Thr Gln Val Lys Gly Thr Glu Val Asn Thr Thr Val
 260 265 270
 Ile Gly Glu Asn Asp Pro Ile Asp Glu Val Gln Gly Phe Leu Phe Gly
 275 280 285
 Lys Leu Arg Asp Leu His Pro Asp Leu Glu Gly Gln Leu Lys Glu Leu
 290 295 300
 Arg Lys His Leu Val Glu Ser Thr Asn Glu Met Ala Pro Leu Lys Val
 305 310 315 320
 Trp Gln Leu Gln Asp Leu Ser Phe Gln Thr Ala Ala Arg Ile Leu Ala

 325 330 335
 Ser Pro Val Glu Leu Ala Leu Val Val Met Lys Asp Leu Ser Gln Asn
 340 345 350
 Phe Pro Thr Lys Ala Arg Ala Ile Thr Lys Thr Ala Val Ser Ser Glu
 355 360 365
 Leu Arg Thr Glu Val Glu Glu Asn Gln Lys Tyr Phe Lys Gly Thr Leu
 370 375 380
 Gly Leu Gln Pro Gly Asp Ser Ala Leu Phe Ile Asn Gly Leu His Met

385						390						395						400
Asp	Leu	Asp	Thr	Gln	Asp	Ile	Phe	Ser	Leu	Phe	Asp	Val	Leu	Arg	Asn			
					405						410						415	
Glu	Ala	Arg	Val	Met	Glu	Gly	Leu	His	Arg	Leu	Gly	Ile	Glu	Gly	Leu			
					420						425						430	
Ser	Leu	His	Asn	Val	Leu	Lys	Leu	Asn	Ile	Gln	Pro	Ser	Glu	Ala	Asp			
					435						440						445	
Tyr	Ala	Val	Asp	Ile	Arg	Ser	Pro	Ala	Ile	Ser	Trp	Val	Asn	Asn	Leu			
					450						455						460	
Glu	Val	Asp	Ser	Arg	Tyr	Asn	Ser	Trp	Pro	Ser	Ser	Leu	Gln	Glu	Leu			
					465						470						475	480
Leu	Arg	Pro	Thr	Phe	Pro	Gly	Val	Ile	Arg	Gln	Ile	Arg	Lys	Asn	Leu			
					485						490						495	
His	Asn	Met	Val	Phe	Ile	Val	Asp	Pro	Ala	His	Glu	Thr	Thr	Ala	Glu			
					500						505						510	
Leu	Met	Asn	Thr	Ala	Glu	Met	Phe	Leu	Ser	Asn	His	Ile	Pro	Leu	Arg			
					515						520						525	
Ile	Gly	Phe	Ile	Phe	Val	Val	Asn	Asp	Ser	Glu	Asp	Val	Asp	Gly	Met			
					530						535						540	
Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Ala	Val	Leu	Arg	Ala	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ala	Gln			
					545						550						555	560
Glu	Val	Asp	Asp	Tyr	His	Ala	Phe	Gln	Thr	Leu	Thr	His	Ile	Tyr	Asn			
					565						570						575	
Lys	Val	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Lys	Val	Glu	His	Val	Val	Ser	Val			
					580						585						590	
Leu	Glu	Lys	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Val	Glu	Val	Asn	Ser	Ile	Leu	Gly	Ile			
					595						600						605	
Asp	Ser	Ala	Tyr	Asp	Arg	Asn	Arg	Lys	Glu	Ala	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Glu			
					610						615						620	
Gln	Thr	Gly	Val	Gly	Pro	Leu	Pro	Val	Val	Leu	Phe	Asn	Gly	Met	Pro			
					625						630						635	640

Phe Glu Arg Glu Gln Leu Asp Pro Asp Glu Leu Glu Thr Ile Thr Met
 645 650 655
 His Lys Ile Leu Glu Thr Thr Thr Phe Phe Gln Arg Ala Val Tyr Leu
 660 665 670
 Gly Glu Leu Pro His Asp Gln Asp Val Val Glu Tyr Ile Met Asn Gln
 675 680 685

 Pro Asn Val Val Pro Arg Ile Asn Ser Arg Ile Leu Thr Ala Glu Arg
 690 695 700
 Asp Tyr Leu Asp Leu Thr Ala Ser Asn Asn Phe Phe Val Asp Asp Tyr
 705 710 715 720
 Ala Arg Phe Thr Ile Leu Asp Ser Gln Gly Lys Thr Ala Ala Val Ala
 725 730 735
 Asn Ser Met Asn Tyr Leu Thr Lys Lys Gly Met Ser Ser Lys Glu Ile
 740 745 750
 Tyr Asp Asp Ser Phe Ile Arg Pro Val Thr Phe Trp Ile Val Gly Asp

 755 760 765
 Phe Asp Ser Pro Ser Gly Arg Gln Leu Leu Tyr Asp Ala Ile Lys His
 770 775 780
 Gln Lys Ser Ser Asn Asn Val Arg Ile Ser Met Ile Asn Asn Pro Ala
 785 790 795 800
 Lys Glu Ile Ser Tyr Glu Asn Thr Gln Ile Ser Arg Ala Ile Trp Ala
 805 810 815
 Ala Leu Gln Thr Gln Thr Ser Asn Ala Ala Lys Asn Phe Ile Thr Lys
 820 825 830

 Met Ala Lys Glu Gly Ala Ala Glu Ala Leu Ala Ala Gly Ala Asp Ile
 835 840 845
 Ala Glu Phe Ser Val Gly Gly Met Asp Phe Ser Leu Phe Lys Glu Val
 850 855 860
 Phe Glu Ser Ser Lys Met Asp Phe Ile Leu Ser His Ala Val Tyr Cys
 865 870 875 880
 Arg Asp Val Leu Lys Leu Lys Lys Gly Gln Arg Ala Val Ile Ser Asn
 885 890 895

Gly Arg Ile Ile Gly Pro Leu Glu Asp Ser Glu Leu Phe Asn Gln Asp

900 905 910
 Asp Phe His Leu Leu Glu Asn Ile Ile Leu Lys Thr Ser Gly Gln Lys
 915 920 925
 Ile Lys Ser His Ile Gln Gln Leu Arg Val Glu Glu Asp Val Ala Ser
 930 935 940
 Asp Leu Val Met Lys Val Asp Ala Leu Leu Ser Ala Gln Pro Lys Gly
 945 950 955 960
 Asp Pro Arg Ile Glu Tyr Gln Phe Phe Glu Asp Arg His Ser Ala Ile
 965 970 975

Lys Leu Arg Pro Lys Glu Gly Glu Thr Tyr Phe Asp Val Val Ala Val
 980 985 990
 Val Asp Pro Val Thr Arg Glu Ala Gln Arg Leu Ala Pro Leu Leu Leu
 995 1000 1005
 Val Leu Ala Gln Leu Ile Asn Met Asn Leu Arg Val Phe Met Asn Cys
 1010 1015 1020
 Gln Ser Lys Leu Ser Asp Met Pro Leu Lys Ser Phe Tyr Arg Tyr Val
 1025 1030 1035 1040
 Leu Glu Pro Glu Ile Ser Phe Thr Ser Asp Asn Ser Phe Ala Lys Gly

1045 1050 1055
 Pro Ile Ala Lys Phe Leu Asp Met Pro Gln Ser Pro Leu Phe Thr Leu
 1060 1065 1070
 Asn Leu Asn Thr Pro Glu Ser Trp Met Val Glu Ser Val Arg Thr Pro
 1075 1080 1085
 Tyr Asp Leu Asp Asn Ile Tyr Leu Glu Glu Val Asp Ser Val Val Ala
 1090 1095 1100
 Ala Glu Tyr Glu Leu Glu Tyr Leu Leu Leu Glu Gly His Cys Tyr Asp
 1105 1110 1115 1120

Ile Thr Thr Gly Gln Pro Pro Arg Gly Leu Gln Phe Thr Leu Gly Thr
 1125 1130 1135
 Ser Ala Asn Pro Val Ile Val Asp Thr Ile Val Met Ala Asn Leu Gly

1140 1145 1150
 Tyr Phe Gln Leu Lys Ala Asn Pro Gly Ala Trp Ile Leu Arg Leu Arg
 1155 1160 1165
 Lys Gly Arg Ser Glu Asp Ile Tyr Arg Ile Tyr Ser His Asp Gly Thr
 1170 1175 1180
 Asp Ser Pro Pro Asp Ala Asp Glu Val Val Ile Val Leu Asn Asn Phe

 1185 1190 1195 1200
 Lys Ser Lys Ile Ile Lys Val Lys Val Gln Lys Lys Ala Asp Met Val
 1205 1210 1215
 Asn Glu Asp Leu Leu Ser Asp Gly Thr Ser Glu Asn Glu Ser Gly Phe
 1220 1225 1230
 Trp Asp Ser Phe Lys Trp Gly Phe Thr Gly Gln Lys Thr Glu Glu Val
 1235 1240 1245
 Lys Gln Asp Lys Asp Asp Ile Ile Asn Ile Phe Ser Val Ala Ser Gly
 1250 1255 1260

 His Leu Tyr Glu Arg Phe Leu Arg Ile Met Met Leu Ser Val Leu Lys
 1265 1270 1275 1280
 Asn Thr Lys Thr Pro Val Lys Phe Trp Phe Leu Lys Asn Tyr Leu Ser
 1285 1290 1295
 Pro Thr Phe Lys Glu Phe Ile Pro Tyr Met Ala Asn Glu Tyr Asn Phe
 1300 1305 1310
 Gln Tyr Glu Leu Val Gln Tyr Lys Trp Pro Arg Trp Leu His Gln Gln
 1315 1320 1325
 Thr Glu Lys Gln Arg Ile Ile Trp Gly Tyr Lys Ile Leu Phe Leu Asp

 1330 1335 1340
 Val Leu Phe Pro Leu Val Val Asp Lys Phe Leu Phe Val Asp Ala Asp
 1345 1350 1355 1360
 Gln Ile Val Arg Thr Asp Leu Lys Glu Leu Arg Asp Phe Asn Leu Asp
 1365 1370 1375
 Gly Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Pro Phe Cys Asp Ser Arg Arg Glu Met
 1380 1385 1390
 Asp Gly Tyr Arg Phe Trp Lys Ser Gly Tyr Trp Ala Ser His Leu Ala

1395 1400 1405
 Gly Arg Lys Tyr His Ile Ser Ala Leu Tyr Val Val Asp Leu Lys Lys
 1410 1415 1420
 Phe Arg Lys Ile Ala Ala Gly Asp Arg Leu Arg Gly Gln Tyr Gln Gly
 1425 1430 1435 1440
 Leu Ser Gln Asp Pro Asn Ser Leu Ser Asn Leu Asp Gln Asp Leu Pro
 1445 1450 1455
 Asn Asn Met Ile His Gln Val Pro Ile Lys Ser Leu Pro Gln Glu Trp
 1460 1465 1470
 Leu Trp Cys Glu Thr Trp Cys Asp Asp Ala Ser Lys Lys Arg Ala Lys

 1475 1480 1485
 Thr Ile Asp Leu Cys Asn Asn Pro Met Thr Lys Glu Pro Lys Leu Glu
 1490 1495 1500
 Ala Ala Val Arg Ile Val Pro Glu Trp Gln Asp Tyr Asp Gln Glu Ile
 1505 1510 1515 1520
 Lys Gln Leu Gln Ile Arg Phe Gln Lys Glu Lys Glu Thr Gly Ala Leu
 1525 1530 1535
 Tyr Lys Glu Lys Thr Lys Glu Pro Ser Arg Glu Gly Pro Gln Lys Arg
 1540 1545 1550

 Glu Glu Leu
 1555
 <210> 14
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AHSAl amino acid sequence
 <400> 14
 Met Ala Lys Trp Gly Glu Gly Asp Pro Arg Trp Ile Val Glu Glu Arg
 1 5 10 15
 Ala Asp Ala Thr Asn Val Asn Asn Trp His Trp Thr Glu Arg Asp Ala
 20 25 30
 Ser Asn Trp Ser Thr Asp Lys Leu Lys Thr Leu Phe Leu Ala Val Gln

35 40 45
 Val Gln Asn Glu Glu Gly Lys Cys Glu Val Thr Glu Val Ser Lys Leu
 50 55 60
 Asp Gly Glu Ala Ser Ile Asn Asn Arg Lys Gly Lys Leu Ile Phe Phe
 65 70 75 80
 Tyr Glu Trp Ser Val Lys Leu Asn Trp Thr Gly Thr Ser Lys Ser Gly
 85 90 95
 Val Gln Tyr Lys Gly His Val Glu Ile Pro Asn Leu Ser Asp Glu Asn
 100 105 110
 Ser Val Asp Glu Val Glu Ile Ser Val Ser Leu Ala Lys Asp Glu Pro
 115 120 125
 Asp Thr Asn Leu Val Ala Leu Met Lys Glu Glu Gly Val Lys Leu Leu
 130 135 140
 Arg Glu Ala Met Gly Ile Tyr Ile Ser Thr Leu Lys Thr Glu Phe Thr
 145 150 155 160
 Gln Gly Met Ile Leu Pro Thr Met Asn Gly Glu Ser Val Asp Pro Val
 165 170 175
 Gly Gln Pro Ala Leu Lys Thr Glu Glu Arg Lys Ala Lys Pro Ala Pro
 180 185 190
 Ser Lys Thr Gln Ala Arg Pro Val Gly Val Lys Ile Pro Thr Cys Lys
 195 200 205
 Ile Thr Leu Lys Glu Thr Phe Leu Thr Ser Pro Glu Glu Leu Tyr Arg
 210 215 220
 Val Phe Thr Thr Gln Glu Leu Val Gln Ala Phe Thr His Ala Pro Ala
 225 230 235 240
 Thr Leu Glu Ala Asp Arg Gly Gly Lys Phe His Met Val Asp Gly Asn
 245 250 255
 Val Ser Gly Glu Phe Thr Asp Leu Val Pro Glu Lys His Ile Val Met
 260 265 270
 Lys Trp Arg Phe Lys Ser Trp Pro Glu Gly His Phe Ala Thr Ile Thr
 275 280 285

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

Leu Phe

<210> 15

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MT2A amino acid sequence

<400> 15

Met Asp Pro Asn Cys Ser Cys Ala Ala Gly Asp Ser Cys Thr Cys Ala
 1 5 10 15
 Gly Ser Cys Lys Cys Lys Glu Cys Lys Cys Thr Ser Cys Lys Lys Ser
 20 25 30
 Cys Cys Ser Cys Cys Pro Val Gly Cys Ala Lys Cys Ala Gln Gly Cys
 35 40 45

Ile Cys Lys Gly Ala Ser Asp Lys Cys Ser Cys Cys Ala
 50 55 60

<210> 16

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> MESDC2 amino acid sequence

<400> 16

Met Ala Ala Ser Arg Trp Ala Arg Lys Ala Val Val Leu Leu Cys Ala
 1 5 10 15
 Ser Asp Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Pro Pro Gly Ser Cys
 20 25 30

Ala Ala Glu Gly Ser Pro Gly Thr Pro Asp Glu Ser Thr Pro Pro Pro

35 40 45

Arg Lys Lys Lys Lys Asp Ile Arg Asp Tyr Asn Asp Ala Asp Met Ala

50 55 60

Arg Leu Leu Glu Gln Trp Glu Lys Asp Asp Asp Ile Glu Glu Gly Asp

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Pro Ser Lys Pro Glu Ser Ile Leu Lys Met Thr Lys Lys Gly Lys

100 105 110

Thr Leu Met Met Phe Val Thr Val Ser Gly Ser Pro Thr Glu Lys Glu

115 120 125

Thr Glu Glu Ile Thr Ser Leu Trp Gln Gly Ser Leu Phe Asn Ala Asn

130 135 140

Tyr Asp Val Gln Arg Phe Ile Val Gly Ser Asp Arg Ala Ile Phe Met

145 150 155 160

Leu Arg Asp Gly Ser Tyr Ala Trp Glu Ile Lys Asp Phe Leu Val Gly

165 170 175

Gln Asp Arg Cys Ala Asp Val Thr Leu Glu Gly Gln Val Tyr Pro Gly

180 185 190

Lys Gly Gly Gly Ser Lys Glu Lys Asn Lys Thr Lys Gln Asp Lys Gly

195 200 205

Lys Lys Lys Lys Glu Gly Asp Leu Lys Ser Arg Ser Ser Lys Glu Glu

210 215 220

Asn Arg Ala Gly Asn Lys Arg Glu Asp Leu

225 230

<210> 17

<211> 529

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HEXA amino acid sequence

<400> 17

Met Thr Ser Ser Arg Leu Trp Phe Ser Leu Leu Leu Ala Ala Ala Phe

1 5 10 15

Ala Gly Arg Ala Thr Ala Leu Trp Pro Trp Pro Gln Asn Phe Gln Thr

20 25 30

Ser Asp Gln Arg Tyr Val Leu Tyr Pro Asn Asn Phe Gln Phe Gln Tyr

35 40 45

Asp Val Ser Ser Ala Ala Gln Pro Gly Cys Ser Val Leu Asp Glu Ala

50 55 60

Phe Gln Arg Tyr Arg Asp Leu Leu Phe Gly Ser Gly Ser Trp Pro Arg

65 70 75 80

Pro Tyr Leu Thr Gly Lys Arg His Thr Leu Glu Lys Asn Val Leu Val

85 90 95

Val Ser Val Val Thr Pro Gly Cys Asn Gln Leu Pro Thr Leu Glu Ser

100 105 110

Val Glu Asn Tyr Thr Leu Thr Ile Asn Asp Asp Gln Cys Leu Leu Leu

115 120 125

Ser Glu Thr Val Trp Gly Ala Leu Arg Gly Leu Glu Thr Phe Ser Gln

130 135 140

Leu Val Trp Lys Ser Ala Glu Gly Thr Phe Phe Ile Asn Lys Thr Glu

145 150 155 160

Ile Glu Asp Phe Pro Arg Phe Pro His Arg Gly Leu Leu Leu Asp Thr

165 170 175

Ser Arg His Tyr Leu Pro Leu Ser Ser Ile Leu Asp Thr Leu Asp Val

180 185 190

Met Ala Tyr Asn Lys Leu Asn Val Phe His Trp His Leu Val Asp Asp

195 200 205

Pro Ser Phe Pro Tyr Glu Ser Phe Thr Phe Pro Glu Leu Met Arg Lys

210 215 220

Gly Ser Tyr Asn Pro Val Thr His Ile Tyr Thr Ala Gln Asp Val Lys

225 230 235 240

Glu Val Ile Glu Tyr Ala Arg Leu Arg Gly Ile Arg Val Leu Ala Glu

245 250 255
 Phe Asp Thr Pro Gly His Thr Leu Ser Trp Gly Pro Gly Ile Pro Gly
 260 265 270
 Leu Leu Thr Pro Cys Tyr Ser Gly Ser Glu Pro Ser Gly Thr Phe Gly
 275 280 285
 Pro Val Asn Pro Ser Leu Asn Asn Thr Tyr Glu Phe Met Ser Thr Phe

 290 295 300
 Phe Leu Glu Val Ser Ser Val Phe Pro Asp Phe Tyr Leu His Leu Gly
 305 310 315 320
 Gly Asp Glu Val Asp Phe Thr Cys Trp Lys Ser Asn Pro Glu Ile Gln
 325 330 335
 Asp Phe Met Arg Lys Lys Gly Phe Gly Glu Asp Phe Lys Gln Leu Glu
 340 345 350
 Ser Phe Tyr Ile Gln Thr Leu Leu Asp Ile Val Ser Ser Tyr Gly Lys
 355 360 365

 Gly Tyr Val Val Trp Gln Glu Val Phe Asp Asn Lys Val Lys Ile Gln
 370 375 380
 Pro Asp Thr Ile Ile Gln Val Trp Arg Glu Asp Ile Pro Val Asn Tyr
 385 390 395 400
 Met Lys Glu Leu Glu Leu Val Thr Lys Ala Gly Phe Arg Ala Leu Leu
 405 410 415
 Ser Ala Pro Trp Tyr Leu Asn Arg Ile Ser Tyr Gly Pro Asp Trp Lys
 420 425 430
 Asp Phe Tyr Ile Val Glu Pro Leu Ala Phe Glu Gly Thr Pro Glu Gln

 435 440 445
 Lys Ala Leu Val Ile Gly Gly Glu Ala Cys Met Trp Gly Glu Tyr Val
 450 455 460
 Asp Asn Thr Asn Leu Val Pro Arg Leu Trp Pro Arg Ala Gly Ala Val
 465 470 475 480
 Ala Glu Arg Leu Trp Ser Asn Lys Leu Thr Ser Asp Leu Thr Phe Ala
 485 490 495
 Tyr Glu Arg Leu Ser His Phe Arg Cys Glu Leu Leu Arg Arg Gly Val

500 505 510

Gln Ala Gln Pro Leu Asn Val Gly Phe Cys Glu Gln Glu Phe Glu Gln

515 520 525

Thr

<210> 18

<211> 946

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITIH2 amino acid sequence

<400> 18

Met Lys Arg Leu Thr Cys Phe Phe Ile Cys Phe Phe Leu Ser Glu Val

1 5 10 15

Ser Gly Phe Glu Ile Pro Ile Asn Gly Leu Ser Glu Phe Val Asp Tyr

20 25 30

Glu Asp Leu Val Glu Leu Ala Pro Gly Lys Phe Gln Leu Val Ala Glu

35 40 45

Asn Arg Arg Tyr Gln Arg Ser Leu Pro Gly Glu Ser Glu Glu Met Met

50 55 60

Glu Glu Val Asp Gln Val Thr Leu Tyr Ser Tyr Lys Val Gln Ser Thr

65 70 75 80

Ile Thr Ser Arg Met Ala Thr Thr Met Ile Gln Ser Lys Val Val Asn

85 90 95

Asn Ser Pro Gln Pro Gln Asn Val Val Phe Asp Val Gln Ile Pro Lys

100 105 110

Gly Ala Phe Ile Ser Asn Phe Ser Met Thr Val Asp Gly Lys Thr Phe

115 120 125

Arg Ser Ser Ile Lys Glu Lys Thr Val Gly Arg Ala Leu Tyr Ala Gln

130 135 140

Ala Arg Ala Lys Gly Lys Thr Ala Gly Leu Val Arg Ser Ser Ala Leu

145 150 155 160

Asp Met Glu Asn Phe Arg Thr Glu Val Asn Val Leu Pro Gly Ala Lys

165 170 175
 Val Gln Phe Glu Leu His Tyr Gln Glu Val Lys Trp Arg Lys Leu Gly
 180 185 190
 Ser Tyr Glu His Arg Ile Tyr Leu Gln Pro Gly Arg Leu Ala Lys His
 195 200 205
 Leu Glu Val Asp Val Trp Val Ile Glu Pro Gln Gly Leu Arg Phe Leu
 210 215 220
 His Val Pro Asp Thr Phe Glu Gly His Phe Asp Gly Val Pro Val Ile
 225 230 235 240
 Ser Lys Gly Gln Gln Lys Ala His Val Ser Phe Lys Pro Thr Val Ala
 245 250 255
 Gln Gln Arg Ile Cys Pro Asn Cys Arg Glu Thr Ala Val Asp Gly Glu
 260 265 270
 Leu Val Val Leu Tyr Asp Val Lys Arg Glu Glu Lys Ala Gly Glu Leu
 275 280 285
 Glu Val Phe Asn Gly Tyr Phe Val His Phe Phe Ala Pro Asp Asn Leu
 290 295 300
 Asp Pro Ile Pro Lys Asn Ile Leu Phe Val Ile Asp Val Ser Gly Ser
 305 310 315 320
 Met Trp Gly Val Lys Met Lys Gln Thr Val Glu Ala Met Lys Thr Ile
 325 330 335
 Leu Asp Asp Leu Arg Ala Glu Asp His Phe Ser Val Ile Asp Phe Asn
 340 345 350
 Gln Asn Ile Arg Thr Trp Arg Asn Asp Leu Ile Ser Ala Thr Lys Thr
 355 360 365
 Gln Val Ala Asp Ala Lys Arg Tyr Ile Glu Lys Ile Gln Pro Ser Gly
 370 375 380
 Gly Thr Asn Ile Asn Glu Ala Leu Leu Arg Ala Ile Phe Ile Leu Asn
 385 390 395 400
 Glu Ala Asn Asn Leu Gly Leu Leu Asp Pro Asn Ser Val Ser Leu Ile
 405 410 415

Ile Leu Val Ser Asp Gly Asp Pro Thr Val Gly Glu Leu Lys Leu Ser
420 425 430

Lys Ile Gln Lys Asn Val Lys Glu Asn Ile Gln Asp Asn Ile Ser Leu
435 440 445

Phe Ser Leu Gly Met Gly Phe Asp Val Asp Tyr Asp Phe Leu Lys Arg
450 455 460

Leu Ser Asn Glu Asn His Gly Ile Ala Gln Arg Ile Tyr Gly Asn Gln
465 470 475 480

Asp Thr Ser Ser Gln Leu Lys Lys Phe Tyr Asn Gln Val Ser Thr Pro
485 490 495

Leu Leu Arg Asn Val Gln Phe Asn Tyr Pro His Thr Ser Val Thr Asp
500 505 510

Val Thr Gln Asn Asn Phe His Asn Tyr Phe Gly Gly Ser Glu Ile Val
515 520 525

Val Ala Gly Lys Phe Asp Pro Ala Lys Leu Asp Gln Ile Glu Ser Val
530 535 540

Ile Thr Ala Thr Ser Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Glu Thr Leu Ala
545 550 555 560

Gln Met Asp Asp Leu Gln Asp Phe Leu Ser Lys Asp Lys His Ala Asp
565 570 575

Pro Asp Phe Thr Arg Lys Leu Trp Ala Tyr Leu Thr Ile Asn Gln Leu
580 585 590

Leu Ala Glu Arg Ser Leu Ala Pro Thr Ala Ala Ala Lys Arg Arg Ile
595 600 605

Thr Arg Ser Ile Leu Gln Met Ser Leu Asp His His Ile Val Thr Pro
610 615 620

Leu Thr Ser Leu Val Ile Glu Asn Glu Ala Gly Asp Glu Arg Met Leu
625 630 635 640

Ala Asp Ala Pro Pro Gln Asp Pro Ser Cys Cys Ser Gly Ala Leu Tyr
645 650 655

Tyr Gly Ser Lys Val Val Pro Asp Ser Thr Pro Ser Trp Ala Asn Pro
660 665 670

Ser Pro Thr Pro Val Ile Ser Met Leu Ala Gln Gly Ser Gln Val Leu

675 680 685
Glu Ser Thr Pro Pro Pro His Val Met Arg Val Glu Asn Asp Pro His

690 695 700
Phe Ile Ile Tyr Leu Pro Lys Ser Gln Lys Asn Ile Cys Phe Asn Ile
705 710 715 720

Asp Ser Glu Pro Gly Lys Ile Leu Asn Leu Val Ser Asp Pro Glu Ser
725 730 735
Gly Ile Val Val Asn Gly Gln Leu Val Gly Ala Lys Lys Pro Asn Asn
740 745 750

Gly Lys Leu Ser Thr Tyr Phe Gly Lys Leu Gly Phe Tyr Phe Gln Ser
755 760 765

Glu Asp Ile Lys Ile Glu Ile Ser Thr Glu Thr Ile Thr Leu Ser His
770 775 780

Gly Ser Ser Thr Phe Ser Leu Ser Trp Ser Asp Thr Ala Gln Val Thr
785 790 795 800

Asn Gln Arg Val Gln Ile Ser Val Lys Lys Glu Lys Val Val Thr Ile
805 810 815

Thr Leu Asp Lys Glu Met Ser Phe Ser Val Leu Leu His Arg Val Trp

820 825 830
Lys Lys His Pro Val Asn Val Asp Phe Leu Gly Ile Tyr Ile Pro Pro

835 840 845
Thr Asn Lys Phe Ser Pro Lys Ala His Gly Leu Ile Gly Gln Phe Met

850 855 860
Gln Glu Pro Lys Ile His Ile Phe Asn Glu Arg Pro Gly Lys Asp Pro

865 870 875 880
Glu Lys Pro Glu Ala Ser Met Glu Val Lys Gly Gln Lys Leu Ile Ile

885 890 895

Thr Arg Gly Leu Gln Lys Asp Tyr Arg Thr Asp Leu Val Phe Gly Thr
900 905 910

Asp Val Thr Cys Trp Phe Val His Asn Ser Gly Lys Gly Phe Ile Asp

915	920	925
Gly His Tyr Lys Asp Tyr Phe Val Pro Gln Leu Tyr Ser Phe Leu Lys		
930	935	940
Arg Pro		
945		