



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0058439
(43) 공개일자 2010년06월03일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0038994(분할)

(22) 출원일자 2010년04월27일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2008-0018672

원출원일자 2008년02월29일

심사청구일자 2008년02월29일

(71) 출원인

(주)아모레퍼시픽

서울 용산구 한강로2가 181번지 태평양빌딩

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

장희경

경기 용인시 기흥구 상갈동 금화마을주공아파트
307동 1507호

김수정

경기 수원시 영통구 영통동 황골주공아파트 128동
1704호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영철, 김 순 영, 임희택

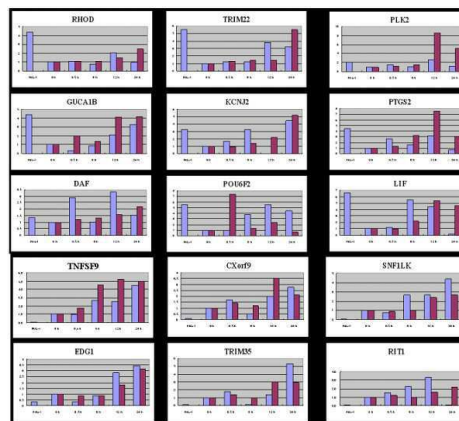
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 과색소침착성 피부 진단용 키트

(57) 요약

본 발명에 따른 과색소침착성 피부 진단용 키트는 본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자 또는 본원 명세서 표 1에 기재된 단백질들로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 포함하는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

안수미

경기 수원시 영통구 원천동 원천주공아파트 103동
708호

황재성

서울 송파구 가락2동 미림아파트 105동 1201호

윤태진

서울 강남구 압구정동 458 현대아파트 83동 1204호

이중훈

대전 중구 대서동 640번지

김진화

대전 동구 판암동 주공아파트 102동 807호

특허청구의 범위

청구항 1

본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자를 포함하는 과색소침착성 피부 진단용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자는 자외선 조사에 의해 그 발현이 증감하는 것을 특징으로 하는 과색소침착성 피부 진단용 키트.

청구항 3

본원 명세서 표 1에 기재된 단백질들로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 포함하는 과색소침착성 피부 진단용 마커.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 단백질은 자외선 조사에 의해 그 발현양이 증감하는 것을 특징으로 하는 과색소침착성 피부 진단용 키트.

청구항 5

본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자의 폴리뉴클레오타이드 또는 그 단편으로서,

상기 단편은 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드,

또는 상기 폴리뉴클레오타이드 및 그 단편에 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및 상기 폴리뉴클레오타이드를 표면에 결합시킨 고상 지지체를 포함하며,

상기 폴리뉴클레오타이드에 혼성화된 전사체의 양이 정상치에 비해 증가하거나 감소하면 과색소침착성 피부인 것으로 진단하는 것을 특징으로 하는 과색소침착성 피부 진단용 키트.

청구항 6

본원 명세서 표1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자의 폴리뉴클레오타이드의 단편으로서 18-22개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드; 및

본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자의 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 단편으로서 18-22개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하며,

상기 폴리뉴클레오타이드들을 프라이머로 하여 증폭된 cDNA 양이 정상치에 비해 증가하거나 감소하면 과색소침착성 피부인 것으로 진단하는 것을 특징으로 하는 과색소침착성 피부 진단용 키트.

청구항 7

본원 명세서 표 1에 기재된 단백질들로 구성된 군으로부터 선택된 단백질에 대한 모노클로날 항체를 포함하며,

상기 항체에 결합된 항원의 양이 정상치보다 증가하거나 감소하면 과색소침착성 피부인 것으로 진단하는 것을 특징으로 하는 과색소침착성 피부 진단용 키트.

청구항 8

본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자에 시험 물질을 처리하는 단계; 및

상기 시험 물질이 상기 유전자의 발현을 촉진 또는 억제하는지를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 과색소침착 억제제의 스크리닝방법.

청구항 9

본원 명세서 표 1에 기재된 단백질들로 구성된 군으로부터 선택된 단백질에 시험 물질을 처리하는 단계; 및

상기 시험 물질이 상기 단백질의 활성을 촉진 또는 억제하는지를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 과색소침착 억제제의 스크리닝방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 과색소침착(hyperpigmentation)성 피부를 진단하기 위한 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 과색소침착을 효과적으로 예방 및 개선시키는 미백제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 신체 피부의 멜라닌 세포에서 생성되는 멜라닌 색소는 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 갖는 페놀계 고분자 물질로서, 태양으로부터 조사되는 자외선에 의한 피부손상 저해에 중요한 역할을 담당한다. 그러나, 멜라닌이라는 색소의 과잉 합성 및 축적은 피부에 기미, 주근깨 및 노인성 흑자(senile lentigo)등 심각한 미적(美的) 문제를 일으킬 뿐만 아니라, 피부노화를 촉진하며 피부암을 유발하기도 한다(참고: Hearing V.J. et al., FASEB J., 5: 2902-2909, 1991).

[0003] 사람의 유전체는 대략 5 만개의 유전자를 가지고 있는 것으로 추측되며, 하나의 세포에서 발현되는 기능성 유전자의 개수는 대략 10,000개 정도로 추정된다. 즉, 50,000개의 유전자 중 약 10,000개의 단백질만을 선택적으로 만들어내고 있으며, 어떤 단백질을 만들어내고 그 단백질들이 어떻게 상호 작용하느냐에 따라 그 세포의 기능적 특성이 결정된다. 기존에는 이러한 유전자 발현의 변화를 일대일의 관계로부터 찾는 것이 관례였으나, 특정 단백질의 작용이 하나의 단백질에 국한되는 것만은 아니며 다양한 단백질의 발현에 상호 관여한다고 생각할 때 과거의 접근은 매우 제한적일 수밖에 없다. 또 일반적 관점에서 세포의 특성은 특정 단백질 하나에 의하여 결정되는 것이 아니라 다양한 단백질들의 특성이 총체적으로 조화를 이룸으로써 결정된다고 판단된다. 이러한 관점에서, 특정 외부 자극에 대한 세포의 반응은 어떤 한 유전자에 의해서 결정이 되는 것이 아니라, 세포 내에 내재적으로 존재하고 있는 유전자와 단백질 수준에서 상호 작용을 통해 결정이 되므로, 최근에는 생물정보학 기법을 이용하여, 외부 자극에 의해 변화를 유도한 상황에서 가장 핵심적인 역할을 수행하는 허브 분자(hub molecule)를 발굴하는 작업에 대한 관심이 증대되고 있다. 생체 내에서 유전자 기능은 대부분 관련된 표현형에 직접적으로 작용하는 것이 아니라 수많은 연속적인 하위 단계 유전자들에 대한 영향을 거쳐 발휘되게 되어 있다(cascade effect). 더구나 일반적으로 개개의 유전자들은 특정 반응에만 관계하는 것이 아니라 여러 다양한 반응들에 관여하게 되어 있다. 따라서 유전자 기능의 이와 같은 속성 때문에 어떤 유전자(hub gene)의 작은 변화는 세포 전체 나아가 개체의 형태 및 기능에 큰 변화를 야기할 수 있다. 일반적으로 중심유전자(hub gene)는 자극에 의한 발현 변화가 뚜렷하며, 일반 유전자들에 비해 상호작용이 가능한 유전자 혹은 단백질의 수와 관계가 월등히 많은 것으로 정의되어 있다.

[0004] 자외선이 피부에서 색소침착을 야기하는 주요 자극임은 분명한 사실이다. 그러나, 자외선 조사에 의해 세포 내에서 어떠한 변화가 일어나며, 그것을 대변하는 각종 유전자와 단백질의 발현 변화가 일어나는 지에 대해 보고된 바 없다. 또한, 상호 작용의 변화 중에 어떤 기전이 핵심이 되는 것이며, 어떤 유전자가 중심유전자인지에 대한 보고 역시 거의 없는 상황이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일실시예의 목적은 과색소침착성 피부를 진단하는 키트를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 미백에 효과적인 물질을 스크리닝하는 방법 및 키트를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 일실시예의 목적은 피부의 색소 침착 문제를 유발한 원인과 해결 방안을 효과적으로 예측하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명의 일실시예에 따른 과색소침착성 피부 진단용 키트는 본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따른 과색소침착성 피부 진단용 키트는, 본원 명세서 표 1에 기재된 단백질들로 구성된 군으로부터 선택된 단백질을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0010] 본 발명의 일실시예에 따른 과색소침착성 피부 진단용 키트는, 본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자의 폴리뉴클레오타이드 또는 그 단편으로서, 상기 단편은 10개 이상의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드,
- [0011] 또는 상기 폴리뉴클레오타이드 및 그 단편에 상보적인 폴리뉴클레오타이드; 및 상기 폴리뉴클레오타이드를 표면에 결합시킨 고상 지지체를 포함하며,
- [0012] 상기 폴리뉴클레오타이드에 혼성화된 전사체의 양이 정상치에 비해 증가하거나 감소하면 과피부침착성 피부인 것으로 진단하는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따른 과색소침착성 피부 진단용 키트는, 본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자의 폴리뉴클레오타이드의 단편으로서 18-22개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드; 및
- [0014] 본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자의 폴리뉴클레오타이드에 상보적인 폴리뉴클레오타이드의 단편으로서 18-22개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하며,
- [0015] 상기 폴리뉴클레오타이드들을 프라이머로 하여 증폭된 cDNA 양이 정상치에 비해 증가하거나 감소하면 과색소침착성 피부인 것으로 진단하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따른 과색소침착성 피부 진단용 키트는, 본원 명세서 표 1에 기재된 단백질들로 구성된 군으로부터 선택된 단백질에 대한 모노클로날 항체를 포함하며,
- [0017] 상기 항체에 결합된 항원의 양이 정상치보다 증가하거나 감소하면 과색소침착성 피부인 것으로 진단하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명의 일실시예에 따른 피부 과색소침착 억제제의 스크리닝 방법은, 본원 명세서 표 1에 기재된 유전자들로 구성된 군으로부터 선택된 유전자에 시험 물질을 처리하는 단계; 및 상기 시험 물질이 상기 유전자의 발현을 촉진 또는 억제하는지를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따른 피부 과색소침착 억제제의 스크리닝방법은, 본원 명세서 표 1에 기재된 단백질들로 구성된 군으로부터 선택된 단백질에 시험 물질을 처리하는 단계; 및 상기 시험 물질이 상기 단백질의 활성을 촉진 또는 억제하는지를 확인하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따르면 피부색소침착 유도에 의해 변화를 나타내는 유전자들중 중심유전자가 되는 135종의 유전자를 피부색소침착 마커 유전자로 하여 피부에서의 피부 색소침착 가능성을 민감하고 빠르게 예측할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 대표적인 과색소침착성 피부 진단용 유전자 15종의 PCR 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 2,431개의 유전자가 코딩하는 단백질 도메인 간의 상호작용을 이용하여 각 시간대별(0.5, 3, 12, 24h)로 작성된 네트워크이다.
- 도 3은 상호작용이 활발한 중심 유전자를 중심으로 시간 별로 증감하는 유전자 클러스터를 나타낸 것이다.
- 도 4는 도 3의 유전자들 중 결합 파트너의 변화가 많은 상위 53개 네트워크를 선별하여 나타낸 것이다.
- 도 5는 도 4의 53개 네트워크 중 발현이 2배 이상 증감한 유전자만을 모아 네트워크로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명자들은 정상 멜라닌형성세포에 자외선을 조사하여 색소 침착을 유발시킨 후, 마이크로어레이 기법을 이

용하여 자외선 조사 후 발현이 증가 혹은 감소하는 유전자를 찾아내고, 그 찾아낸 유전자들을 대상으로 생물정보학 기법을 활용하여, 단백질 결합 네트워크를 구성하여, 하기 표 1과 같이 hub molecule 135종을 선별하였다.

표 1

[0023]

No.	Symbol	ID	Name
1	FSTL5	NM_020116	Follistatin-like 5
2	BARD1	NM_000465	BRCA1 associated RING domain 1
3	MID1	NM_000381	Midline 1 (Opitz/BBB syndrome)
4	PDGFRA	NM_006206	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
5	FLT1	NM_002019	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor)
6	KDR	NM_002253	Kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
7	OBSCN	NM_052843	Obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin-interacting RhoGEF
8	CDC42BPA	NM_003607	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
9	SH2B3	NM_005475	SH2B adaptor protein 3
10	PRKD3	NM_005813	Protein kinase D3
11	RASL11B	NM_023940	RAS-like, family 11, member B
12	RHOD	NM_014578	Ras homolog gene family, member D
13	RIT1	NM_006912	Ras-like without CAAX 1
14	SRMS	NM_080823	Src-related kinase lacking C-terminal regulatory tyrosine and N-terminal myristylation sites
15	ARL8B	NM_018184	ADP-ribosylation factor-like 8B
16	YES1	NM_005433	V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1
17	MYOM2	NM_003970	Myomesin (M-protein) 2, 165kDa
18	PIGR	NM_002644	Polymeric immunoglobulin receptor
19	CDK9	NM_001261	Cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)
20	PLK2	NM_006622	Polo-like kinase 2 (Drosophila)
21	SNF1LK	NM_173354	SNF1-like kinase
22	TANC1	NM_033394	Tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 1
23	TAOK2	NM_016151	TAO kinase 2
24	TRIB1	NM_025195	Tribbles homolog 1 (Drosophila)
25	CXorf9	NM_018990	Chromosome X open reading frame 9
26	FBXO8	NM_012180	F-box protein 8
27	PLK3	NM_004073	Polo-like kinase 3 (Drosophila)
28	STAT4	NM_003151	Signal transducer and activator of transcription 4
29	THBD	NM_000361	Thrombomodulin
30	ACTN2	NM_001103	Actinin, alpha 2
31	BTRC	NM_033637	Beta-transducin repeat containing
32	C6	NM_000065	Complement component 6
33	RCBTB2	NM_001268	Regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 2
34	COMP	NM_000095	Cartilage oligomeric matrix protein
35	PTGS2	NM_000963	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
36	DUSP5	NM_004419	Dual specificity phosphatase 5
37	ZNF776	NM_173632	Zinc finger protein 776
38	PLEKHA7	NM_175058	Pleckstrin homology domain containing, family A member 7
39	PTPRZ1	NM_002851	Protein tyrosine phosphatase, receptor-type, Z polypeptide 1
40	ANKRA2	NM_023039	Ankyrin repeat, family A (RFXANK-like), 2
41	CELSR2	NM_001408	Cadherin, EGF LAG seven-pass G-type receptor 2 (flamingo homolog, Drosophila)
42	FAT	NM_005245	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)

43	F2	NM_000506	Coagulation factor II (thrombin)
44	KCNB2	NM_004770	Potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2
45	LAMC1	NM_002293	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
46	GPR126	NM_020455	G protein-coupled receptor 126
47	GUCA1B	NM_002098	Guanylate cyclase activator 1B (retina)
48	MPN2	NM_183062	Marapsin 2
49	RNF135	NM_032322	Ring finger protein 135
50	RNF26	NM_032015	Ring finger protein 26
51	TRIM22	NM_006074	Tripartite motif-containing 22
52	TRIM35	NM_171982	Tripartite motif-containing 35
53	TRAF1	NM_005879	TRAF interacting protein
54	APBA2	NM_005503	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 2 (X11-like)
55	C20orf23	NM_024704	Chromosome 20 open reading frame 23
56	CACNA2D1	NM_000722	Calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 1
57	CFD	BQ712715	Complement factor D (adipsin)
58	KCNJ2	NM_000891	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2
59	KCNN4	NM_002250	Potassium intermediate/small conductance calcium-activated channel, subfamily N
60	PIK3CD	NM_005026	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide
61	PPF1BP2	NM_003621	PTPRF interacting protein, binding protein 2 (liprin beta 2)
62	ZBTB9	NM_152735	Zinc finger and BTB domain containing 9
63	ULBP2	NM_025217	UL16 binding protein 2
64	ZBTB43	NM_014007	Zinc finger and BTB domain containing 43
65	BTA1F1	NM_003972	BTA1F1 RNA polymerase II, B-TFIIID transcription factor-associated, 170kDa
66	CD55	NM_000574	CD55 molecule, decay accelerating factor for complement (Cromer blood group)
67	ZNF1X1	NM_021035	Zinc finger, NFX1-type containing 1
68	KPNA3	NM_002267	Karyopherin alpha 3 (importin alpha 4)
69	RANBP5	NM_002271	RAN binding protein 5
70	ZBTB6	NM_006626	Zinc finger and BTB domain containing 6
71	GCN1L1	NM_006836	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)
72	HERC3	NM_014606	Hect domain and RLD 3
73	ITCH	NM_031483	Itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)
74	KCNC1	NM_004976	Potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 1
75	LRP10	NM_014045	Low density lipoprotein receptor-related protein 10
76	MGC11102	NM_032325	Hypothetical protein MGC11102
77	PPP3CA	NM_000944	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform
78	EGR3	NM_004430	Early growth response 3
79	EMILIN2	NM_032048	Elastin microfibril interfacier 2
80	IGF2BP2	NM_006548	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2
81	ZBTB39	NM_014830	Zinc finger and BTB domain containing 39
82	WWC3	NM_015691	WWC family member 3
83	KLF1	NM_006563	Kruppel-like factor 1 (erythroid)
84	KLF5	NM_001730	Kruppel-like factor 5 (intestinal)
85	KLHL21	NM_014851	Kelch-like 21 (Drosophila)
86	LIF	NM_002309	Leukemia inhibitory factor
87	NEDD4L	NM_015277	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like
88	P4HB	NM_000918	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase, beta polypeptide

89	POU6F2	NM_007252	POU domain, class 6, transcription factor 2
90	PPIL1	NM_016059	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1
91	SP4	NM_003112	Sp4 transcription factor
92	KBTBD8	NM_032505	Kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 8
93	TNFRSF10D	NM_003840	Tumor necrosis factor receptor superfamily, decoy with truncated death domain
94	TNFSF9	NM_003811	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
95	ZNF14	NM_021030	Zinc finger protein 14
96	ZNF295	NM_020727	Zinc finger protein 295
97	ZNF396	NM_145756	Zinc finger protein 396
98	ZNF498	NM_145115	Zinc finger protein 498
99	ZNF510	NM_014930	Zinc finger protein 510
100	ZNF79	NM_007135	Zinc finger protein 79
101	ANKRD27	NM_032139	Ankyrin repeat domain 27 (VPS9 domain)
102	EDG1	NM_001400	Endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 1
103	IL10RA	NM_001558	Interleukin 10 receptor, alpha
104	MAPK8	NM_002750	Mitogen-activated protein kinase 8
105	OR7A17	NM_030901	Olfactory receptor, family 7, subfamily A, member 17
106	PPIG	NM_004792	Peptidylprolyl isomerase G (cyclophilin G)
107	SYT11	NM_152280	Synaptotagmin XI
108	ARL4D	NM_001661	ADP-ribosylation factor-like 4D
109	ARFGEF2	NM_006420	ADP-ribosylation factor guanine nucleotide-exchange factor 2 (brefeldin A-inhibited)
110	BAG1	NM_004323	BCL2-associated athanogene
111	BTN3A2	NM_007047	Butyrophilin, subfamily 3, member A2
112	CIB2	NM_006383	Calcium and integrin binding family member 2
113	CPEB2	NM_182485	Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 2
114	DDX6	NM_004397	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6
115	DOCK10	NM_014689	Dedicator of cytokinesis 10
116	LINGO2	NM_152570	Leucine rich repeat and Ig domain containing 2
117	GBP4	NM_052941	Guanylate binding protein 4
118	GNA13	NM_006572	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 13
119	GPR25	NM_005298	G protein-coupled receptor 25
120	GPR32	NM_001506	G protein-coupled receptor 32
121	GUCY2F	NM_001522	Guanylate cyclase 2F, retinal
122	IL6R	NM_000565	Interleukin 6 receptor
123	KCNK3	NM_002246	Potassium channel, subfamily K, member 3
124	PPIL4	NM_139126	Peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 4
125	LMTK2	NM_014916	Lemur tyrosine kinase 2
126	MAP3K14	NM_003954	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14
127	MAPK14	NM_001315	Mitogen-activated protein kinase 14
128	C1orf89	NM_030907	Chromosome 1 open reading frame 89
129	PARD6B	NM_032521	Par-6 partitioning defective 6 homolog beta (C. elegans)
130	PHOX2B	NM_003924	Paired-like homeobox 2b
131	POU3F2	NM_005604	POU domain, class 3, transcription factor 2
132	RBM22	NM_018047	RNA binding motif protein 22
133	RNF34	NM_194271	Ring finger protein 34
134	SIX4	NM_017420	Sine oculis homeobox homolog 4 (Drosophila)
135	WDR40C	NM_001013628	WD repeat domain 40C

[0024]

본 발명의 일실시예에 따른 과색소침착성 피부 진단용 키트에서, 프로브로 사용되는 폴리뉴클레오티드는 상기 표 1에 기재된 과색소침착성 피부 마커 유전자의 전장(full length) 또는 그의 단편을 포함한다. 단편의 길이는 10개 이상의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 것이 바람직한데, 이는 프로브의 길이가 10bps 미만이면 비특이적으로 결합되기 때문이다.

- [0025] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따른 과색소침착성 피부 진단 키트에서 프라이머로 사용되는 폴리뉴클레오티드는 그 길이가 18-22개인 것이 바람직하다. 이는 프라이머의 길이가 18bps미만이면 비특이적으로 결합되고, 22bps를 초과하면 프라이머끼리 자체 결합하여 효율성이 떨어지며, 제작시에도 비용과 기술적인 면에서 비생산적이기 때문이다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 일실시예에 따른 과색소침착성 피부 진단 키트에서 피부 색소침착에 관여하는 단백질에 대한 모노클로날 항체는 일반적인 모노클로날 항체 제조방법으로 제조된다.
- [0027] 이하, 구체예를 들어 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 하기 구체예는 본 발명을 설명하기 위한 것이고 한정하기 위한 것은 아니다.
- [0028] <실시예 1: 자외선에 의해 발현의 변화를 보이는 유전자 선별>
- [0029] 1. 인체 세포의 획득 및 자외선 조사
- [0030] 신생아의 표피에서 분리하여 순수배양된 멜라닌형성세포(NHEMs)를 1 ml 당 0.5 μ g 하이드로코티손, 5 ng 표피 성장인자, 5 μ g 인슐린, 0.5% 우태아 뇌하수체 추출물을 함유한 무혈청 멜라닌세포배양 배지 (Clonetics, Walkersville, MD)에서 배양하였다. 3~5차례 계대배양된 세포에 각 시간 별 (0.5, 3, 12, 24 h)로 UVB (20mJ/cm²)를 조사하였다.
- [0031] 2. 인체 세포로부터 RNA 채취
- [0032] 1에서 준비된 세포의 RNA를 정제하기 위해 트리졸(trizol)(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 첨가해 세포를 분쇄시킨 후 클로로포름을 넣어 상층액의 RNA를 분리하였다. 얻어진 상층액의 RNA를 농축하기 위해 동량의 이소프로판올을 넣고 원심분리하여 침전된 RNA를 얻고, 염기 제거를 위해 70% 에탄올로 침전된 RNA를 세척하였다.
- [0033] 3. 마이크로어레이 실험
- [0034] 각각의 시료에서 얻은 mRNA의 발현 양상을 비교하기 위해 마이크로어레이(microarray)를 수행하였으며, 사용한 유전자 칩은 oligonucleotide (70-mer) microarray (Microarray inc, human 48.5K)이다. RNA 20 μ g으로부터 amino-allyl cDNA labeling kit (Ambion, Austin, Texas, USA)을 이용하여 형광 염색된 cDNA 프로브를 제작하였다. 자외선 조사를 하지 않은 멜라닌 형성세포(NHEM)로부터 분리한 RNA를 Cy3로 표지하여 공통 대조군으로 활용하였다. 각 시간대별로 얻은 RNA를 각각 Cy5로 표지하여 실험군으로 사용하였다. 16 시간 동안 55℃에서 혼성화(hybridization)를 수행하였다. 통계학적으로는 1-Way ANOVA test를 이용하여 의미 있는 (P<0.05) 유전자만을 추출하였다. 3회 실시한 마이크로어레이 실험 (UVB-0.5, 3, 12, 24 h)에서 통계적으로 의미 있게 증감한 유전자들 중에서 각 시점에서 2x 이상 증감한 유전자 2431 종을 확보하였다.
- [0035] 4. Real-Time PCR
- [0036] 상기 2.에서 채취한 동일한 RNA 1 μ g을 50mM 트리스-HCl(Tris-HCl, pH 8.3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 0.1M DTT, 10mM dNTP, 40유닛/ μ l RNase 저해제가 함유된 역전사 반응 완충액 25 μ l에 넣고, 0.5 μ g/ μ l 올리고(dT)16의 프라이머와 200유닛 수퍼스크립트 II[SuperScript II, 짐코비알엘(GiboBRL)]의 역전사 중합효소를 첨가하여 42℃에서 1시간 반응시켰다. 이후 역전사 반응 용액 2.5 μ l를 앰플리택(AmpliTaq)DNA 중합효소[0.04U, 퍼킨 엘멀, 쉘튼, 씨티(Perkin Elmer, Shelton, CT)], 50mM 트리스(pH 8.3), 0.25mg/ml 우혈청알부민, 3mM MgCl₂, 0.25mM dNTPs, SYBR 그린 I의 1/50,000 희석액[몰레큘라 프로브, 유진, 오알(Molecular Probes, Eugene, OR)]이 함유된 PCR 반응 완충액 50리터에 섞고, 10 μ M의 프라이머 센스 및 안티센스(하기 표 2 참조)를 첨가하여 94℃에서 30초, 53℃에서 30초, 72℃에서 1분인 사이클을 30사이클을 수행하였다. 상대적인 mRNA 레벨은 아이사이클러(ICycler) 소프트웨어를 이용하여 SYBR 그린 I 형광 변화를 측정함으로써 분석하여 도 1에 나타내었다. 자외선 처리 0시간대의 발현양 기준 1로 정한 후 각 연령별 시료의 상대적인 mRNA 레벨을 그래프화 시켰다. 그 결과,

시간대별 대표 유전자 15종의 Real-time PCR 결과는 마이크로 어레이 결과와 일치함을 알 수 있다.

표 2

유전자 기호	프라이머 종류	프라이머 서열
RHOD	센스(서열번호 1)	GAGCGGTACATGGTCAACCT
	안티센스(서열번호 2)	TAGGTCACAGGCTCCAATCC
TRIM22	센스(서열번호 3)	CCTGGAGCTCCTGACAGAAC
	안티센스(서열번호 4)	CATTCTTGACCACCTCGTT
PLK2	센스(서열번호 5)	AGGGACTCTTGGCAGCTGTA
	안티센스(서열번호 6)	GGCCAAGCTCTGCGTAATAG
GUCA1B	센스(서열번호 7)	ACACCATCGACTTCCTGGAG
	안티센스(서열번호 8)	TCTGCAGCATCTTCATCACC
KCNJ2	센스(서열번호 9)	TGCTGTTTTTCATGGTGGTGT
	안티센스(서열번호 10)	GGAGTGTGGGGACTTCGTA
PTGS2	센스(서열번호 11)	GCAGTTGTTCCAGACAAGCA
	안티센스(서열번호 12)	CAGGATACAGCTCCACAGCA
DAF	센스(서열번호 13)	ATGAGTGCCGTCCAGGTTAC
	안티센스(서열번호 14)	CTGAACGTGTTGGTGGGACCT
Pou6F2	센스(서열번호 15)	AAACTGAACCCTGGCCTTTT
	안티센스(서열번호 16)	TTAAGGGCTCCAAAGGGACT
LIF	센스(서열번호 17)	TGCCAATGCCCTCTTTATTC
	안티센스(서열번호 18)	GTTGACAGCCAGCTTCTTC
TNFSF9	센스(서열번호 19)	GCCCCAAATGTTCTGCTGAT
	안티센스(서열번호 20)	TTATTCCGACCTCGGTGAAG
CXorf9	센스(서열번호 21)	GGAAGAGTGGCAAAAAGCTG
	안티센스(서열번호 22)	TCAGCGAGTCGTGGTCATAG
SNFILK	센스(서열번호 23)	ACCTCAGTGGTTTGGAGGTG
	안티센스(서열번호 24)	TGTCAGAGCTGGTTCCCTCT
EDG1	센스(서열번호 25)	AACTGACCTCGGTGGTGTTC
	안티센스(서열번호 26)	AGTTATTGCTCCCGTTGTGG
TRIM35	센스(서열번호 27)	TACCGCGTCTGGAAGAAGAT
	안티센스(서열번호 28)	GCTCCGCGTCATAGAAAGAC
RIT1	센스(서열번호 29)	TAGGGAAGAGTGCCATGACC
	안티센스(서열번호 30)	TGTTTCCACAAGAACCACA

<실시예 2: 피부 색소침착 기전의 중심 유전자 선정>

1. PSIMAP을 이용한 유전자 네트워크 작성

유전자가 번역(translation)된다는 가정하에, 그리고 protein data bank (PDB)에 있는 단백질의 structural classification (SCOP)에 따라 각 유전자의 단백질이 상호작용하는 것을 예측하는 PSIMAP을 이용하여 그들 간의 네트워크를 작성하였다. 2,431개의 유전자가 가지고 있는 단백질 도메인간의 상호작용을 이용하여 각 시간대 별 (0.5, 3, 12, 24 h)로 네트워크를 작성하였고, 도 2에 그 결과를 나타내었다.

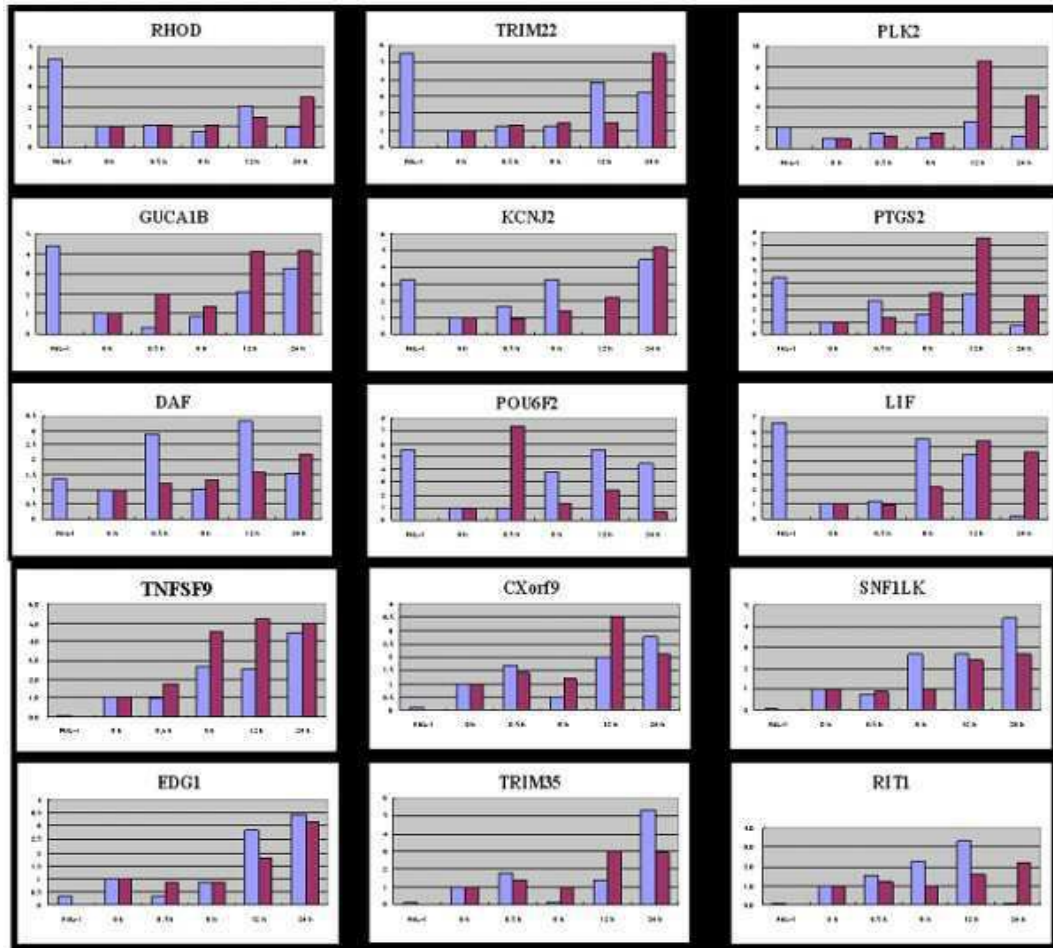
2. Network에서 hub molecules 선정

상기 1.에서 작성된 각 시간 별 (0.5, 3, 12, 24 h) 4개의 네트워크에서 상호 작용이 활발한 중심 유전자 (hub molecules)를 중심으로 시간 별로 증감하는 유전자 클러스터(cluster)를 선별하였다. 그 결과의 일부를 도 3에 나타내었다. 도 3과 같이 4개 전체 네트워크에서 각 시점(time point) 별로 2배 이상 증감한 유전자들과 결합 파트너(binding partner)가 되는 중심 유전자들 중 결합 파트너(binding partner)의 변화가 많은 상위 53개를 선별(selection) 하여 다시 작은 네트워크 53개를 작성하였다. 그 결과는 도 4에 표기하였다. 이렇게 53개의 소

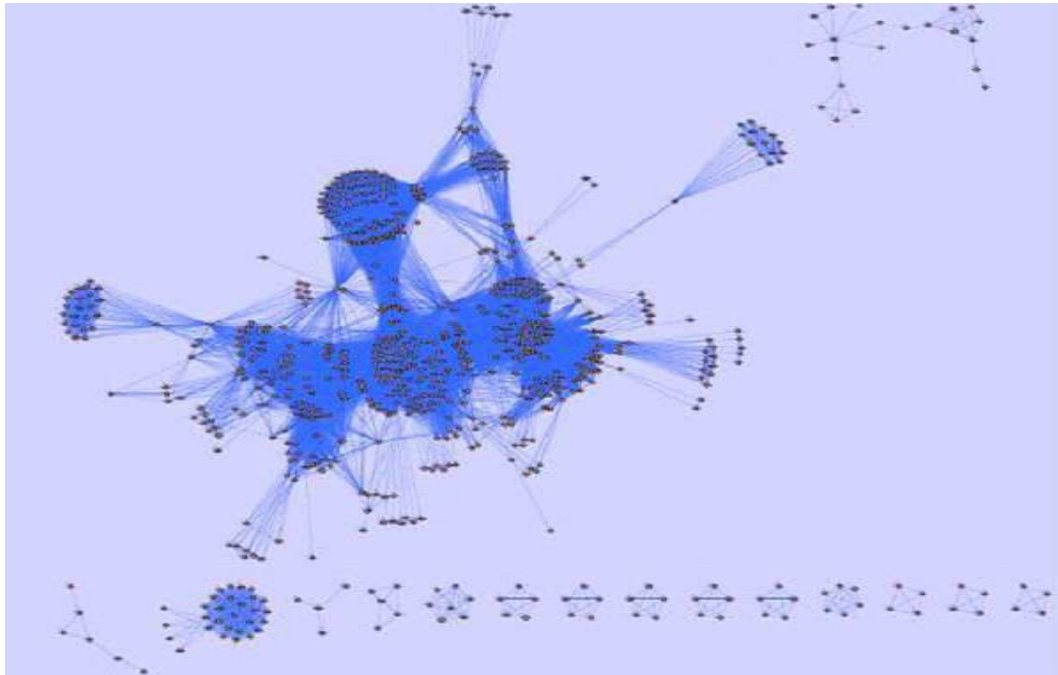
네트워크(small network)로 만들어 놓은 후, 이들 53개 중심 유전자 네트워크 가능한 유전자들 중 2배 이상 증감한 유전자만을 모아 다시 네트워크를 만들었고, 그 결과는 도 5와 같다. 이때 사용된 유전자는 140개였으며, 그 목록은 상기 표 1과 같다.

도면

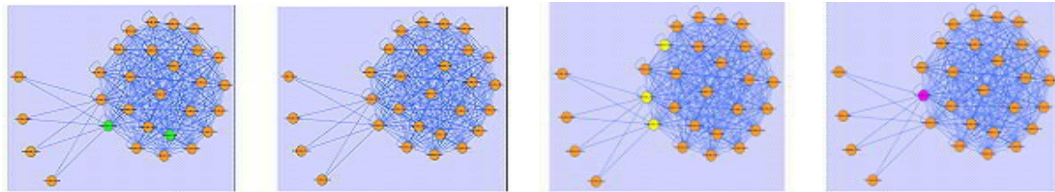
도면1



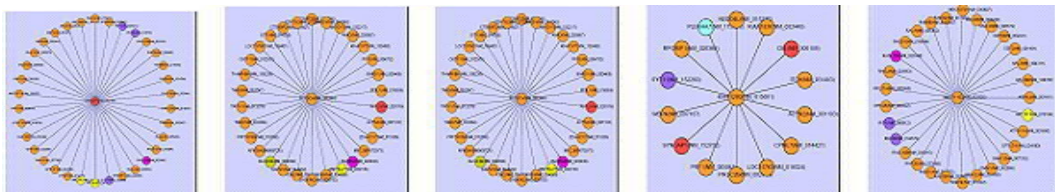
도면2



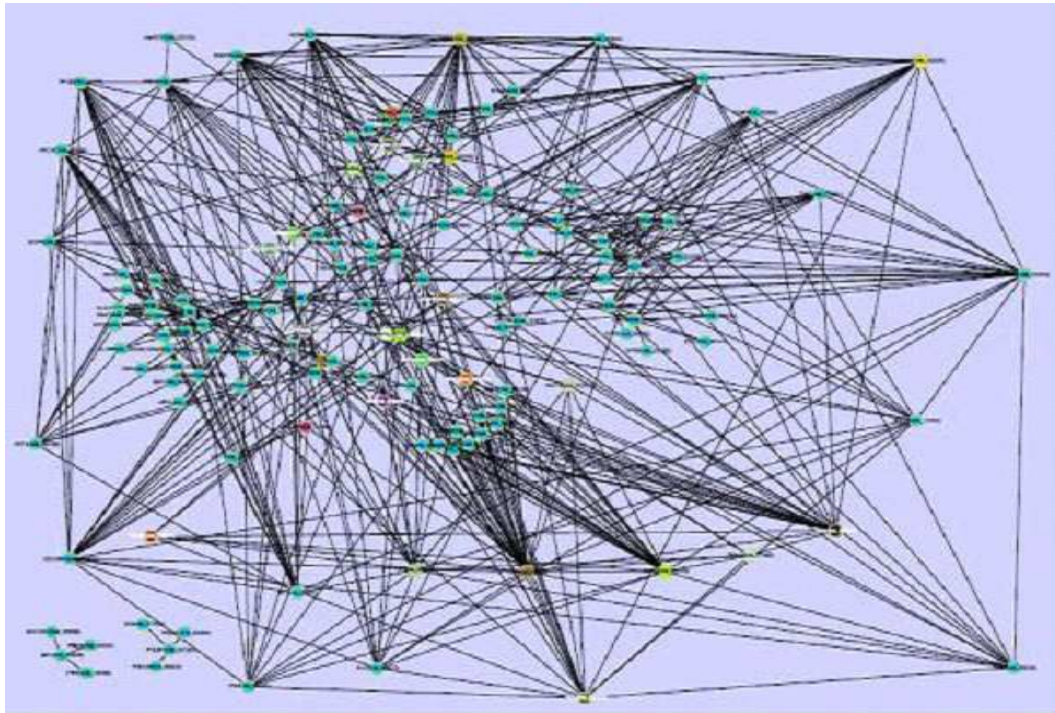
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Amorepacific Corporation
- <120> Biomarker for prediction of skin having hyperpigmentation disposition
- <130> 08P092/IND
- <160> 30
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- gagcgggtaca tgggtcaacct
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 2

20

taggtcacag gctccaatcc	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
cctggagctc ctgacagaac	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
cattccttga ccacctcgtt	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
agggactctt ggcagctgta	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
ggccaagctc tgcgtaatag	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> primer
 <400> 7
 acaccatcga cttcctggag 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 tctgcagcat cttcatcacc 20

 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 tgctgttttc atggtggtgt 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 ggagtgttgg ggacttcgta 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 gcagttgttc cagacaagca 20

 <210> 12
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 caggatacag ctccacagca 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 13
 atgagtgccg tccaggttac 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 14
 ctgaactgtt ggtgggacct 20

 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 15
 aaactgaacc ctggcctttt 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 16
 ttaagggtc caaaggact 20
 <210> 17

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 tgccaatgcc ctctttattc 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 gttgacagcc cagcttcttc 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 gcccaaatg ttctgctgat 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 ttattccgac ctcggtgaag 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21

ggaagagtgg caaaaagctg	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 22	
tcagcgagtc gtggtcatag	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 23	
acctcagtg tttggaggtg	20
<210> 24	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 24	
tgtcagagct ggttcctct	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 25	
aactgacctc ggtggtgttc	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	26	
agttattgct cccgttgtgg		20
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	27	
taccgcgtct ggaagaagat		20
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	28	
gctccgcgtc atagaaagac		20
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	29	
tagggaagag tgccatgacc		20
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	30	
tgtttccac aagaaccaca		20