

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0038149 (43) 공개일자 2009년04월20일
(51) Int. Cl. <i>C12N 15/12</i> (2006.01) <i>C12N 15/09</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2007-0103493 (22) 출원일자 2007년10월15일 심사청구일자 2007년10월15일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내 (72) 발명자 김윤기 서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학 (녹지) 장승기 경북 포항시 남구 효자동 포항공과대학교 생명과학과 (뒷면에 계속) (74) 대리인 김선애	

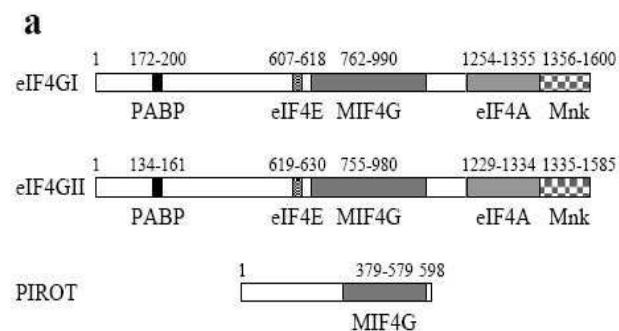
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) M I F 4 G 도메인을 지니는 신규 유전자 P I R O T을이용한 NMD 조절 방법

(57) 요약

본 발명은 넌센스-매개 mRNA 깨짐 (Nonsense-mediated mRNA Decay, 이하 'NMD'라고 함)을 조절할 수 있는 유전자 PIROT 및 이를 이용하여 인위적으로 NMD를 조절할 수 있는 방법을 제공한다. 본 발명에 의한 NMD의 분자생물학적인 이해와 인위적인 NMD 효율 조절 기술을 통해서, NMD 관련 유전병 및 암의 치료제 또는 억제제를 개발할 수 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

김경미

서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학(
녹지)

조하나

서울 성북구 안암동5가 고려대학교 생명과학대학(
녹지)

최고봉

경북 포항시 남구 효자동 포항공과대학교 생명과학
과

특허청구의 범위

청구항 1

NMD에 관여하는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 PIROT.

청구항 2

NMD에 관여하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 DNA.

청구항 3

NMD에 관여하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질 PIROT.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 단백질은 CBP80와 결합되어 파이오니어 라운드 오브 트랜스레이션(pioneer round of translation) 개시에 관여하는 것을 특징으로 하는 단백질 PIROT.

청구항 5

제1항 기재의 유전자의 발현을 억제하는 DNA를 포함하는 NMD 저해제.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 DNA는 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 작은 간섭 이중-나선 RNA(small interfering double-stranded RNA, siRNA) 서열을 포함하는 NMD 저해제.

청구항 7

제1항 기재의 유전자 PIROT의 발현을 억제하여 NMD를 저해하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 방법은 제1항 기재의 유전자가 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 작은 간섭 이중-나선 RNA(small interfering double-stranded RNA, siRNA) 서열에 의해 발현이 억제되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

- <1> 본 발명은 넌센스-매개 mRNA 깨짐 (Nonsense-mediated mRNA Decay, 이하 'NMD'라고 함)을 조절할 수 있는 유전자 PIROT 및 이를 이용한 인위적 NMD 조절 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 CBP80에 의한 단백질 번역(pioneer round of translation)의 결과로 이루어지는 NMD에 관련된 신규 유전자 PIROT 및 이를 이용한 NMD 조절 방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 모든 세포는 필요한 유전정보를 적당한 시기에 적당한 양을 적당한 위치에 발현하기 위해 많은 유전자 발현조절 기전을 가지고 있다. 유전자의 발현 조절 기전은 사람세포에 있어서 전사, 스플라이싱(splicing), 번역 과정 동안 필수적으로 수반되는 작용기전으로서, 정확한 유전정보를 세포내에 발현하는 기능을 담당하고 있다.
- <3> 많은 종류의 유전자 발현조절 기전 중, 특히 mRNA의 양질조절(quality control)에 관여하는 대표적인 기전으로 넌센스-매개 mRNA 깨짐(Nonsense-mediated mRNA Decay, NMD)이 잘 알려져 있다. 상기 NMD 기전은 mRNA 상에서 비정상인 단백질 종결코돈(Premature termination codon, 이하, 'PTC'라고 함)이 생성되었을 경우, 이 mRNA를 인식하여 최종적으로 세포 내에서 제거하는 기전이다.

<4> 만약 PTC를 가지는 mRNA가 NMD기전에 의해 인식이 되지 않을 경우, mRNA는 정상길이보다 짧은 비정상적인 단백질을 발현하게 되고, 이렇게 생성된 짧은 단백질이 우성-음성 효과 (dominant-negative effect)를 지닐 수 있는 단백질이라면 정상 단백질의 기능을 억제함으로써 세포의 기능을 저해할 수 있다. 즉, NMD 기전은 세포에게 해를 줄 수 있는 비정상적인 짧은 단백질의 발현을 mRNA 상에서 미리 인식하고 이를 제거하는 일종의 품질검증 기전이라고 볼 수 있다.

<5> NMD의 분자생물학적 기전이 규명되기 시작함에 따라 부각된 가장 흥미로운 이슈 중의 하나는 가장 처음 개시되는 단백질 번역의 정확한 실체였다. 여러 가설이 존재하지만, 일반적으로 받아들여지고 있는 모델로는 파이오니어 라운드 오브 트랜스레이션 (이하 'Pioneer round of translation'라고 함)이라고 불리는 모델이다. 진핵세포의 세포질에서 일어나는 일반적인 단백질 번역은 cap-binding protein인 eIF4E (eukaryotic translation initiation 4E, 이하 'eIF4E'라고 함)라는 단백질에 의해 유도되는 반면, Pioneer round of translation의 경우 갓 형성된 엑손-접합점 복합체 (exon-junction complex, 이하 'EJC'라고 함)를 지나는 mRNA가 핵막을 통해서 세포질로 나오는 동안 5' 말단에 존재하는 CBP80/20에 의해 단백질 번역이 유도된다. Pioneer round of translation 단계에서 mRNA가 정상인지, 아니면 NMD에 의해 제거되어야 하는 비정상적인 mRNA 인지가 결정된다. NMD 기전은 Pioneer round of translation과 직접적으로 연계(coupling)되어 있음이 기존의 연구 결과 규명되었다. 즉, Pioneer round of translation의 결과, mRNA의 질이 결정된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> NMD가 수많은 암과 유전병의 발병 요인임이 규명된 이후 NMD 효율 조절을 주목적으로 한 항암제 및 유전병 치료제 개발이 활발히 진행되고 있다. 만약 NMD와 밀접한 연관을 갖는 단백질을 다양한 방법으로 조절함으로써 NMD 효율 조절에 성공한다면, 인위적으로 NMD의 효율을 저해 또는 활성화 할 수 있다는 이점이 있을 것이다. 따라서 NMD에 대한 분자생물학적인 이해와 인위적인 NMD 효율 조절 기술을 통해서 NMD 관련 유전병 및 암의 치료제 또는 억제제를 개발할 수 있을 것이다.

<7> 따라서 본 발명의 목적은 NMD의 효율을 조절할 수 있는 표적 유전자 및 단백질을 제공하는 것이다.

<8> 본 발명의 다른 목적은 NMD의 효율을 조절할 수 있는 표적 유전자 및 단백질을 이용하여 NMD의 효율을 조절할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

<9> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

<10> 본 발명자들은 단백질 번역단계에서 필요한 eIF4GI, eIF4GII와 미들 도메인(middle domain) 유사성을 갖는 유전자를 새롭게 동정하였고 PIROT (pioneer round of translation initiation factor)이라고 명명하였다. 또한 본 발명자들은 상기 PIROT 유전자가 EJC 구성 단백질들 및 CBP80와 특이적인 결합을 하며, PIROT 단백질 발현을 저해시켰을 경우, NMD의 효율이 떨어지는 것을 확인하였다. 이를 통해 PIROT이 pioneer round of translation에 직접적으로 작용하고, 그 결과 NMD에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

<11> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 NMD에 관여하는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 PIROT을 제공한다.

<12> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 NMD에 관여하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질 PIROT을 제공한다.

<13> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 PIROT의 발현을 억제하는 DNA를 포함하는 NMD 저해제를 제공한다.

<14> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 PIROT의 발현을 억제하여 NMD를 저해하는 방법을 제공한다.

<15> 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

<16> 본 발명은 NMD에 관여하는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 PIROT 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질 PIROT을 제공한다.

- <17> 본 발명자들은 단백질 번역단계에서 필요한 eIF4GI, eIF4GII와 미들 도메인(middle domain) 유사성을 갖는 유전자를 새롭게 동정하였고 PIROT이라고 명명하였다(도 1a).
- <18> 상기 PIROT 유전자를 클로닝(cloning)하여 PIROT 면역침강(immunoprecipitation, 이하, 'IP')을 수행한 결과, PIROT은 EJC 구성 단백질들 및 CBP80와 특이적인 결합하는 것이 관찰되었다(도 1b 내지 도 1e). 또한 PIROT을 포함하는 단백질체의 조성을 알아보기 위해 여러 실험들을 수행한 결과, PIROT은 CBP80 complex와 실질적인 결합을 이루고 있다는 것을 확인할 수 있었다(도 2a 내지 도 2d). 따라서, 본 발명에 의한 유전자 PIROT은 CBP80와의 직접적인 결합을 통해 파이오니어 라운드 오브 트랜스레이션(pioneer round of translation)에 작용할 수 있음이 확인되었다.
- <19> 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 PIROT의 발현을 억제하는 DNA를 포함하는 NMD 저해제 및 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 PIROT의 발현을 억제하여 NMD를 저해하는 방법을 제공한다.
- <20> 다양한 방법을 통해 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 유전자 PIROT의 발현을 억제할 수 있다. 예를 들어 다음의 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 작은 간섭 이중-나선 RNA (small interfering double-stranded RNA, 이하 'siRNA'라고 함)를 이용해 PIROT 발현을 특이적으로 저해시킬 수 있다.
- <21> 5'- r(GCAUCAACCUGAAUGACAU)d(TT) -3'
- <22> 본 발명에 의한 PIROT의 발현을 억제시키면, Pioneer round of translation의 하위 단계인 NMD의 효율이 저해되는 것이 확인되었다(도 3a 내지 도 3b).
- <23> 또한 본 발명에 의한 PIROT의 세포내 위치를 공초점 레이저 주사현미경(confocal microscopy)를 통해 확인한 결과, 핵막에 주로 분포하는 것을 볼 수 있었다(도 4).

효 과

- <24> 상술한 바와 같이, 본 발명은 파이오니어 라운드 오브 트랜스레이션 (pioneer round of translation)과 직접적으로 작용하고, 그 결과 NMD에 있어서 중요한 역할을 하는 새로운 유전자 PIROT 및 이를 표적으로 하는 NMD 저해제 및 저해방법을 제공한다. 본 발명은 NMD에 대한 분자생물학적인 이해와 인위적인 NMD 효율 조절 기술을 통해서 NMD 관련 유전병 및 암의 치료제 또는 억제제 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <25> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것이 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- <26> **실험 방법 및 재료**
- <27> **1.면역침강 (immunoprecipitation, IP)**
- <28> cos7 세포에 원하는 DNA를 과발현시킨 후, 항체(Antibody)를 이용해 발현된 단백질을 침강시킨다. 이후, 웨스턴 블롯(western blot)을 통해 함께 침강되는 단백질들을 찾을 수 있다.
- <29> **2. RT-PCR**
- <30> HeLa세포에 작은 간섭 이중-나선 RNA(siRNA)를 이용해 특정 유전자 저해시킨다. 2일 후, NMD를 측정하는데 사용되는 리포터(reporter)를 세포내에 과발현시킨다. 1일 후, RNA를 얻은 뒤, 이를 역전사 효소 (Reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA로 바꿔준다. 원하는 유전자(gene)에 대한 특정한 프라이머(primer)를 사용해 PCR을 통해 증폭시킨다. 이때 방사선 32P로 DNA를 표지하게 된다. 이 재료를 gel에 running하여 RT-PCR결과를 얻게 된다.
- <31> **3. 염색(immunostaining)**
- <32> HeLa세포를 커버슬립(cover slip)에 키운다. 원하는 DNA를 과발현시킨 후, 2일 후, 염색(staining)을 한다. 먼저 파라포름알데하이드 (paraformaldehyde)로 고정한 뒤, 트라이톤 X-100(Triton X-100)으로 세포막을 뚫어준다. 1차 항체(Antibody)와 형광을 띄는 2차 항체(Antibody)를 이용해 우리가 원하는 단백질을 염색한다. 이때 핵은 DAPI라는 시약에 의해 염색된다. 만들어진 재료를 공초점레이저주사현미경 (confocal microscopy)을 통해

관찰한다.

<33> **4. 폴리솜 분획(polysome fractionation)**

<34> 세포에 원하는 DNA를 과발현시킨 후 자당농도 (sucrose gradient)에 따른 monosome, disome, polysome을 분리해 낸다.

<35> **실시예 1. 본 발명에 의한 신규한 유전자 PIROT 동정**

<36> 본 연구를 통해 CBP80에 의한 pioneer round of translation의 결과로 이루어지는 NMD에 관련하는 인자를 동정한 결과, 새로운 형태의 eIF4G 유사체(homologue)를 찾았고 이를 PIROT이라고 명명하고(도 1a), 본 명세서에서 서열번호 1로 표시하였다. 두가닥의 작은 뉴클레오타이드를 이용해 사람 뇌 cDNA 라이브러리 (human brain cDNA library)로부터 PIROT을 암호화하고 있는 DNA를 얻었다. 이것을 BamHI과 PstI 제한효소를 사용하여 pSK(-)벡터에 넣어 pSK(-)-PIROT 클론을 만들었다. 이 클론으로부터 HindIII로 자른 뒤 Klenow 효소를 사용하여 뉴클레오타이드를 합성시켜준 후 다시 제한효소 BamHI을 사용하였다. 이를 pcDNA3-FLAG 벡터에 삽입하여 pcDNA3-FLAG-PIROT 클론을 만들었다.

<37> 이하, 다양한 분자생물학적인 접근법을 통해서 다음과 같은 사실을 새롭게 규명하였다.

<38> **실시예 2. PIROT과 CBP80간의 특이적인 결합**

<39> FLAG-PIROT을 과발현 후, FLAG 항체(antibody)를 이용하여 면역침강(immunoprecipitation, IP)을 수행한 결과 여러 EJC 단백질들뿐만 아니라, CBP80과 결합하는 것을 볼 수 있었다. 하지만 eIF4E와는 결합하지 않는 것을 관찰하였다(도 1b). 역으로 CBP80, eIF4E IP를 수행했을 경우에는 CBP80 IP에서만 PIROT이 결합하는 것을 볼 수 있었다(도 1c 및 도 1d). 또한 생체의 결합분석(in vitro binding assay)을 통해 PIROT이 CBP80과 직접적으로 결합한다는 것을 확인할 수 있었다.

<40> **실시예 3. 파이오니어 라운드 오브 트랜스레이션 개시 복합체(pioneer round of translation initiation complex) 내에서 PIROT의 존재 확인**

<41> PIROT을 포함하는 단백질체의 조성을 알아보기 위해 여러 실험들을 수행했다. 먼저, NMD 관련인자인 eIF4AIII로 IP를 수행했을 경우 PIROT이 결합하는 것을 볼 수 있었다(도 2a). PIROT IP를 통해 PIROT과 결합하는 RNA를 보았을 경우, pre-mRNA, mRNA에 비슷한 효율로 결합하는 것을 볼 수 있었다(도 2b). 마지막으로, 폴리솜 분획(polysome fractionation) 기법을 통해, eIF4E complex에 결합하고 있는 eIF4GI과는 달리, PIROT은 CBP80 complex에 선택적으로 결합해 있다는 것을 볼 수 있었다(도 2c 및 도 2d). 이 결과들로 미루어 보아 PIROT은 CBP80 complex와 실질적인 결합을 이루고 있고, pioneer round of translation과 직접적인 연관이 있음을 알 수 있다.

<42> **실시예 4. 본 발명에 의한 PIROT에 의한 NMD의 효율 조절**

<43> 파이오니어 라운드 오브 트랜스레이션(pioneer round of translation)의 하위단계인 NMD에서의 PIROT의 영향을 알아보기 위해 세포 내의 PIROT의 발현을 siRNA로 저해시킨 후 (도 3a), 정량적 RT-PCR 기법을 활용해 NMD 효율을 측정해 보았다. 그 결과 NMD 효율이 특이적으로 저해되는 것을 볼 수 있었다(도 3b). 이 실험을 통해 PIROT이 파이오니어 라운드 오브 트랜스레이션(pioneer round of translation)과 직접적인 관련이 있고, 또한 그 하위단계인 NMD의 효율에도 영향을 미친다는 결론을 내릴 수 있다.

<44> **실시예 5. 본 발명에 의한 PIROT의 세포내 위치 확인**

<45> 본 발명에 의한 PIROT은 eIF4E-의존 번역 (eIF4E-dependent translation)에 관여하는 eIF4GI과 다른 세포내의 위치를 갖는다는 것을 공초점레이저주사현미경(confocal microscopy)으로 확인할 수 있었다. PIROT은 핵막주위에 집중적으로 존재하는 것을 볼 수 있었다(도 4a). 또한 PIROT은 특이적인 스폿(spot) 형태를 보이고 있다. 이것은 P-body가 아닌 중심체(centrosome)에 스폿(spot) 형태로 존재하는 것을 볼 수 있었다(도 4e 및 도 4f).

<46> 위의 실험들을 통해서 CBP80은 PIROT이라는 새로운 단백질을 끌어와서 pioneer round of translation을 개시하고, 이를 통해 NMD 효율에 직접적인 영향을 미친다는 것이 규명되었다. 또한, CBP80에 의한 pioneer round of translation은 핵공 복합체 (nuclear pore complex)를 통한 mRNA 방출(mRNA export) 과정 동안 일어난다는 기존의 보고와 일치하게, PIROT은 핵주변 지역(preinuclear region)에 존재함을 알 수 있었다. 따라서 본 발명에 의한 PIROT은 NMD의 효율을 조절하는 새로운 세포내 인자로서 NMD 조절 기술 개발에 있어서 표적 단백질로서의 가능성이 크다고 할 것이다.

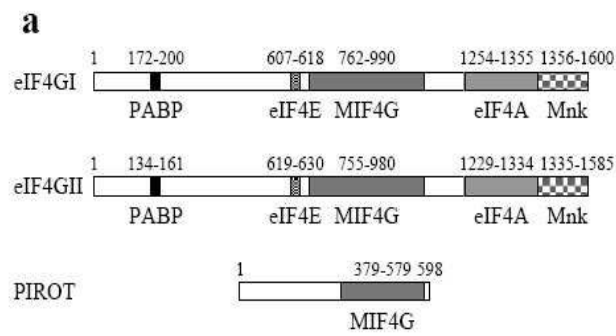
<47> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

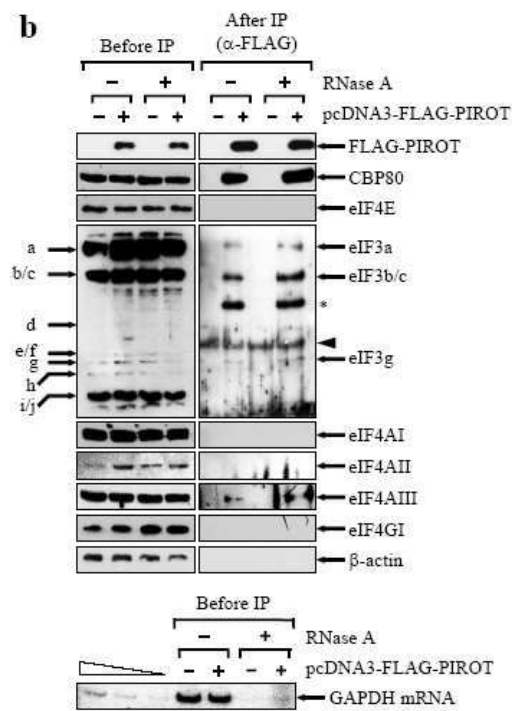
- <48> 도 1a는 본 발명에 의한 PIROT의 도메인 구성을 보인 모식도이다.
- <49> 도 1b는 본 발명에 의한 FLAG-PIROT을 과발현 한 후, FLAG 항체를 이용하여 면역침강(immunoprecipitation, IP)을 수행한 결과 여러 EJC 단백질들뿐만 아니라, CBP80과 결합하는 것을 보여주는 도면이다.
- <50> 도 1c 및 도 1d는 역으로 CBP80, eIF4E IP를 수행했을 경우에는 CBP80 IP에서만 본 발명에 의한 PIROT이 결합하는 것을 보여주는 도면이다.
- <51> 도 1e는 생체외 결합분석(in vitro binding assay)을 통해 본 발명에 의한 PIROT이 CBP80과 직접적으로 결합한다는 것을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.
- <52> 도 2a는 NMD 관련인자인 eIF4AIII로 IP를 수행했을 경우 본 발명에 의한 PIROT이 결합하는 것을 보여주는 도면이다.
- <53> 도 2b는 PIROT IP를 통해 PIROT과 결합하는 RNA를 보았을 경우, pre-mRNA, mRNA에 비슷한 효율로 결합하는 것을 보여주는 도면이다.
- <54> 도 2c 및 도 2d는 폴리솜 분획(polysome fractionation) 기법을 통해 본 발명에 의한 PIROT이 CBP80 complex에 선택적으로 결합해 있다는 것을 보여주는 도면이다.
- <55> 도 3a는 세포내의 PIROT의 발현을 siRNA로 저해시킨 것을 확인한 결과를 보여주는 도면이다.
- <56> 도 3b는 세포내의 PIROT의 발현을 siRNA로 저해시킨 결과 NMD의 효율이 특이적으로 저해된 것을 보여주는 도면이다.
- <57> 도 4a는 본 발명에 의한 PIROT이 핵막 주위에 집중적으로 존재하는 반면, eIF4E에 의한 단백질 번역 개시에 중요한 eIF4G1은 주로 세포질에 존재한다는 것을 공초점레이저주사현미경(confocal microscopy)으로 보여주는 도면이다.
- <58> 도 4b는 본 발명에 의한 PIROT이 핵막 주위에 집중적으로 존재하는 반면, 기존에 핵에 존재하는 것으로 알려진 CBP80은 핵에 존재한다는 것을 보여주는 도면이다.
- <59> 도 4c는 본 발명에 의한 PIROT이 핵막 주위에 집중적으로 존재하는 것으로 잘 알려진 Lamin A/C 단백질과 같은 분포를 보여주는 도면이다.
- <60> 도 4d는 상기 도 4c의 도면의 일부를 확대해서 보여주는 도면이다.
- <61> 도 4e는 본 발명에 의한 PIROT이 핵막뿐만 아니라 세포질에 스폿 (spot) 형태로 존재하며, 이 스폿은 기존에 알려진 Dcp1a가 위치하는 프로세싱바디(Processing body)와는 다른 분포 패턴을 보여주는 도면이다.
- <62> 도 4f는 본 발명에 의한 PIROT이 핵막뿐만 아니라 세포질에 스폿 (spot) 형태로 존재하며, 이 스폿은 r-tubulin의 분포와 정확히 일치하므로, PIROT이 세포질에서 중심체 (centrosome)에 위치한다는 것을 보여주는 도면이다.

도면

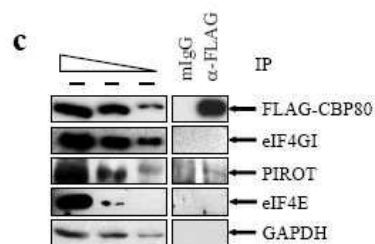
도면1a



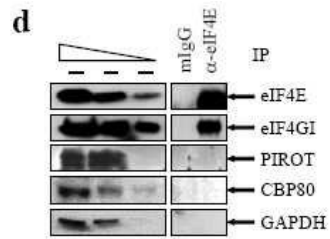
도면1b



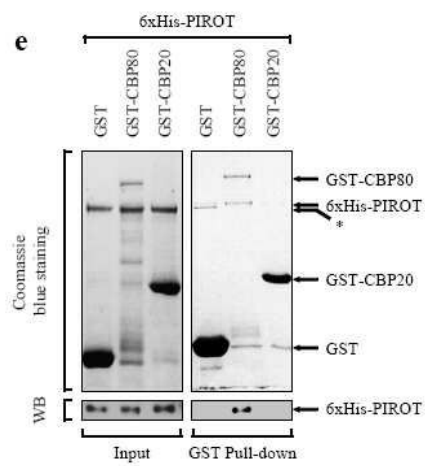
도면1c



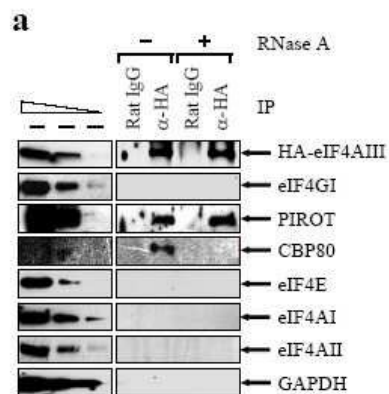
도면1d



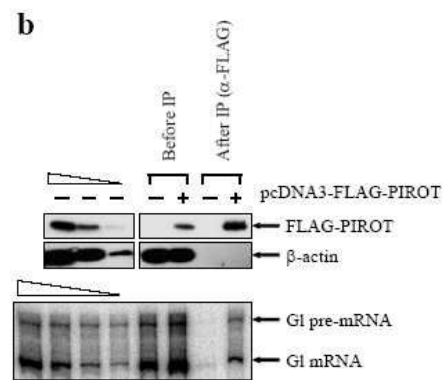
도면1e



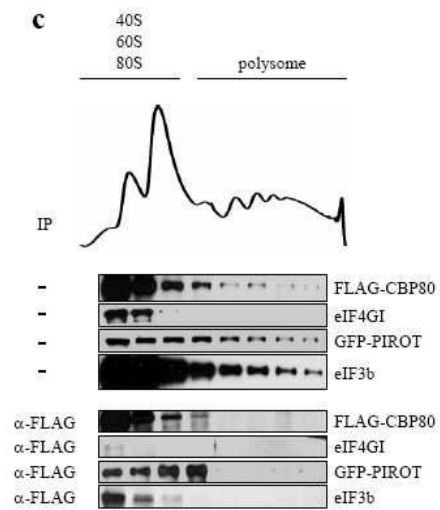
도면2a



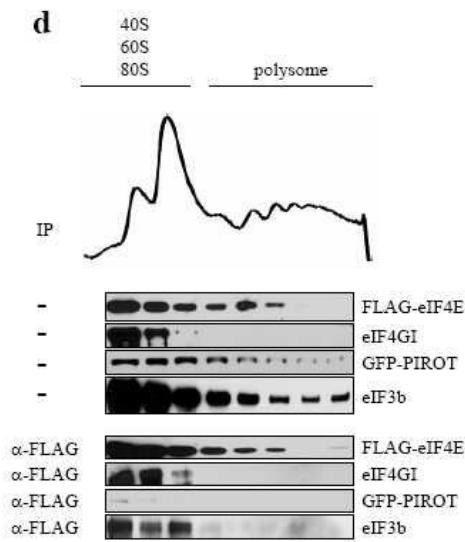
도면2b



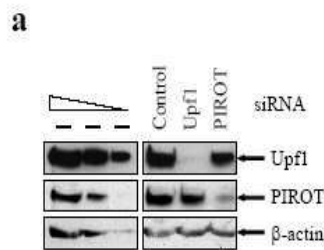
도면2c



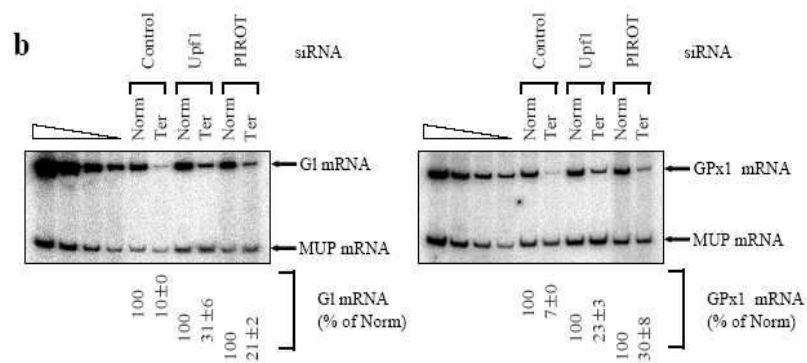
도면2d



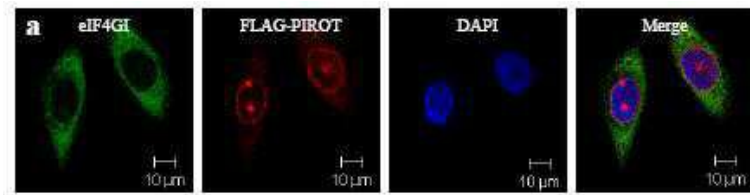
도면3a



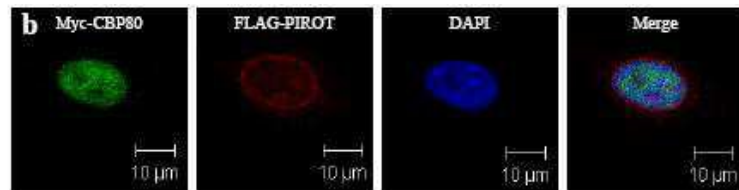
도면3b



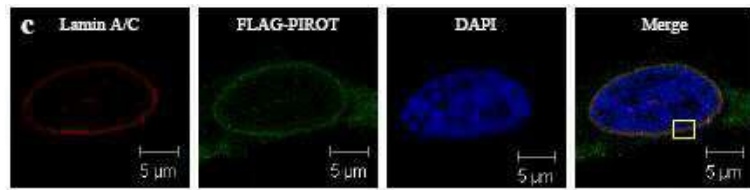
도면4a



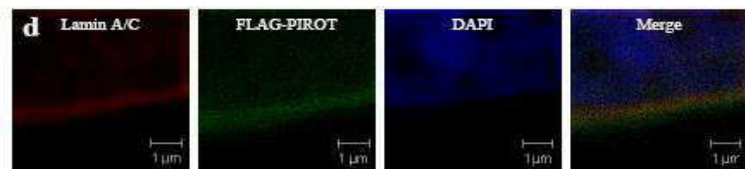
도면4b



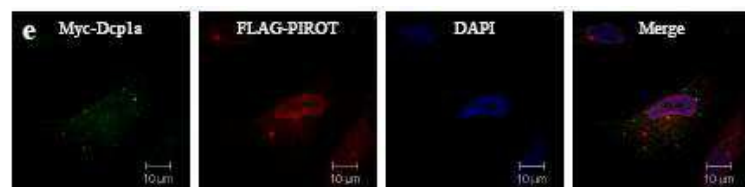
도면4c



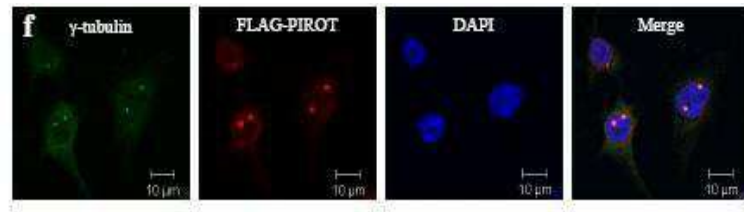
도면4d



도면4e



도면4f



서열 목록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
 <120> Control of nonsense-mediated mRNA decay using a new gene PIROT
 which contains MIF4G domain

<130> P11-070820-02

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1797

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggaaaact cctctgcagc atcagcctcc tcggaggcag ggagcagccg ctcccaggag 60

atcgaggagc tggagcgctt catcgacagc tacgtgctgg agtaccaggt gcaggggctg 120

ctggctgaca agacggaggg tgatggcgag agcgagagga cccagtccca catctcccag 180

tggacagcgg actgcagcga accgctggac agcagctgtt ccttctcccg agggcgagcc 240

ccccacagc agaatggcag caaagacaac tctctggaca tgctgggcac ggacatctgg 300

gcggccaaca ccttcgattc cttcagtgtt gccacctggg acctgcagcc ggaaaagctg 360

gacttcaccc agttccaccg caaagtccga cacacgcca agcagcccct gccacacatc 420

gaccgcgaag ggtgtggcaa aggggaagctg gaagatgggg atggcatcaa cctgaatgac 480

atcgagaagg tccttcacgc ctggcagggc taccacccga tgcccatga agtggagatc	540
gcacacacca agaagctgtt ccgcaggagg agaaatgatc gaaggcggca gcagagacct	600
ccggggggca acaagcccca acagcatggt gaccaccagc caggcagtgc caaacacaac	660
agggaccacc agaaatccta ccaggggggc tcagcacccc acccctcagg gaggccact	720
cacatggct acagccagaa ccggcgctgg caccatggca acatgaagca cccaccaggc	780
gacaaggggg aggcaggcgc acaccgcaat gccaaagaga ccatgaccat cgagaacca	840
aaactggagg acactgcagg ggacaccggg cacagcagcc tcgaggcccc ccgcagccct	900
gacaccctgg ccccggtggc ttctgagcgg ctccccccac agcagtcagg ggggccagag	960
gttgagacaa aacgtaaaga cagtattctt cccgagcgca tcggggagcg gcccaaaatt	1020
accctgctcc agtcttccaa agacagactg cggcgaaggc taaaggaaaa gcatgaagtg	1080
gccgtggaga cgaccactcc ccagcagaac aagatggaca agctgatcga gatcctgaac	1140
agcatgcgga acaacagcag cgacgtggac accaagctca ccaccttcat ggaggaggcc	1200
cagaactcca ccaactccga ggagatgctg ggcgagatcg tgcgcacaa ctaccagaag	1260
gctgtgtccg accgcagctt cgccttcacc gctgccaagc tctgcgacaa gatggcgctc	1320
tttatggtgg aggggaccaa gttccggagc ctgctctca acatgctgca gaaggacttc	1380
acggtgcgcg aggagctgca gcagcaggac gtggagcgct ggctgggctt catcaccttc	1440
ctgtgtgagg tcttcggcac catgcgcagc agcacaggcg agcccttcg tgtgctcgtg	1500
tgcccatct acacctgcct cagggagctc ttgcaatctc aggatgtgaa ggaagatgct	1560
gtcctttgct gctctatgga gctgcagagt acaggccggc tgctggagga acagctgcct	1620
gagatgatga cagagctcct ggccagcgca cgggacaaga tgctgtgccc ctcggagtcc	1680

atgctgaccc ggctcgtgct cctagaggtc atcgagctcc acgctaacag ctggaaccct 1740

ctgacgcccc ccatcacgca gtactacaac agaaccatcc agaaactgac agcctga 1797

<210> 2
<211> 598
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Glu Asn Ser Ser Ala Ala Ser Ala Ser Ser Glu Ala Gly Ser Ser
1 5 10 15

Arg Ser Gln Glu Ile Glu Glu Leu Glu Arg Phe Ile Asp Ser Tyr Val
20 25 30

Leu Glu Tyr Gln Val Gln Gly Leu Leu Ala Asp Lys Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Gly Glu Ser Glu Arg Thr Gln Ser His Ile Ser Gln Trp Thr Ala Asp
50 55 60

Cys Ser Glu Pro Leu Asp Ser Ser Cys Ser Phe Ser Arg Gly Arg Ala
65 70 75 80

Pro Pro Gln Gln Asn Gly Ser Lys Asp Asn Ser Leu Asp Met Leu Gly
85 90 95

Thr Asp Ile Trp Ala Ala Asn Thr Phe Asp Ser Phe Ser Gly Ala Thr
100 105 110

Trp Asp Leu Gln Pro Glu Lys Leu Asp Phe Thr Gln Phe His Arg Lys
115 120 125

Val Arg His Thr Pro Lys Gln Pro Leu Pro His Ile Asp Arg Glu Gly
130 135 140

Cys Gly Lys Gly Lys Leu Glu Asp Gly Asp Gly Ile Asn Leu Asn Asp
145 150 155 160

Ile Glu Lys Val Leu Pro Ala Trp Gln Gly Tyr His Pro Met Pro His

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

Gln Asn Ser Thr Asn Ser Glu Glu Met Leu Gly Glu Ile Val Arg Thr
405 410 415

Ile Tyr Gln Lys Ala Val Ser Asp Arg Ser Phe Ala Phe Thr Ala Ala
420 425 430

Lys Leu Cys Asp Lys Met Ala Leu Phe Met Val Glu Gly Thr Lys Phe
435 440 445

Arg Ser Leu Leu Leu Asn Met Leu Gln Lys Asp Phe Thr Val Arg Glu
450 455 460

Glu Leu Gln Gln Gln Asp Val Glu Arg Trp Leu Gly Phe Ile Thr Phe
465 470 475 480

Leu Cys Glu Val Phe Gly Thr Met Arg Ser Ser Thr Gly Glu Pro Phe
485 490 495

Arg Val Leu Val Cys Pro Ile Tyr Thr Cys Leu Arg Glu Leu Leu Gln
500 505 510

Ser Gln Asp Val Lys Glu Asp Ala Val Leu Cys Cys Ser Met Glu Leu
515 520 525

Gln Ser Thr Gly Arg Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Glu Met Met Thr
530 535 540

Glu Leu Leu Ala Ser Ala Arg Asp Lys Met Leu Cys Pro Ser Glu Ser
545 550 555 560

Met Leu Thr Arg Ser Leu Leu Leu Glu Val Ile Glu Leu His Ala Asn
565 570 575

Ser Trp Asn Pro Leu Thr Pro Pro Ile Thr Gln Tyr Tyr Asn Arg Thr
580 585 590

Ile Gln Lys Leu Thr Ala
595

<210> 3
<211> 19
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> small interfering double-stranded RNA
 5'-r(GCAUCAACCUGAAUGACAU)d(TT)-3'

<400> 3
 gcaucaaccu gaugacau

19

<210> 4
 <211> 2
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> small interfering double-stranded RNA
 5'-r(GCAUCAACCUGAAUGACAU)d(TT)-3'

<400> 4
 tt

2