



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0162646
(43) 공개일자 2022년12월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) A61K 38/45 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) C12N 15/52 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 9/104 (2013.01)
A61K 38/45 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0067134
(22) 출원일자 2022년05월31일
심사청구일자 2022년05월31일
- (30) 우선권주장
1020210070331 2021년05월31일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
- (72) 발명자
유권
대전광역시 유성구 과학로 125
류훈
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 12 항

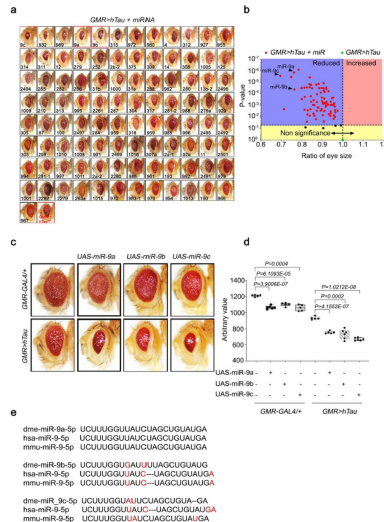
(54) 발명의 명칭 UBE4B 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 E3/E4 유비퀴틴 리가제인 UBE4B(Ubiquitin conjugation E4 B) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 타우(Tau) 단백질 제거, 및 타우 병증(Tauopathy)의 예방, 개선 또는 치료 용도에 관한 것이다.

본 발명의 UBE4B, 또는 UBE4B와 E3 유비퀴틴 라이게이즈인 STUB1(STIP1 homology and U-Box containing protein1)의 조합은 Tau 단백질 제거 효과를 갖는바, 타우 병증의 예방, 개선 또는 치료에 적용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

C12N 15/52 (2013.01)

C12Y 203/02 (2013.01)

(72) 발명자

송은주

서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 약학대학 (대현동)

이정수

대전광역시 유성구 은구비남로 56 910동 1302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711121937

과제번호 CRC-15-04-KIST

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 국가과학기술연구회

연구사업명 국가과학기술연구회연구운영비지원(R&D)(주요사업비)

연구과제명 고령세대 치매 조기예측, 치료제 및 환자케어 기술 개발

기 여 율 30/100

과제수행기관명 한국과학기술연구원

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711115382

과제번호 2019R1A2C2004149

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 인슐린 저항성 관련 microRNA와 목표 유전자들에 의한 타우 유래 알츠하이머 치매

제어 연구

기 여 율 30/100

과제수행기관명 한국생명공학연구원

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711131236

과제번호 2020M3E5D9079744

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 뇌질환극복연구사업(R&D)

연구과제명 외상성 뇌 손상 동물 및 시험관 모델 기반의 염증 및 혈관 손상 제어 기술 개발

기 여 율 30/100

과제수행기관명 한국과학기술연구원

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711119652

과제번호 2020R1A4A4079494

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원(R&D)

연구과제명 혁신 항암제 개발을 위한 탈유비퀴틴화 효소 제어 네트워크 연구실

기 여 율 10/100

과제수행기관명 이화여자대학교

연구기간 2020.07.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

UBE4B(Ubiquitin conjugation E4 B) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 타우(Tau) 단백질 제거용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 타우 단백질의 수준을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 타우 단백질의 인산화 수준을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 UBE4B 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 STUB1 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 STUB1 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 조성물.

청구항 7

UBE4B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 타우 병증(Tauopathy)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 STUB1 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 타우 병증은 알츠하이머 치매, 파킨슨병, 루이소체 치매, 다운증후군 및 진행성 핵상 마비(PSP)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 조성물.

청구항 10

UBE4B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 타우 병증의 예방 또는 치료 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 조성물은 STUB1 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 타우 병증은 알츠하이머 치매, 파킨슨병, 루이소체 치매, 다운증후군 및 진행성 핵상 마비(PSP)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 E3/E4 유비퀴틴 리가제인 UBE4B(Ubiquitin conjugation E4 B) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 타우(Tau) 단백질 제거, 및 타우 병증(Tauopathy)의 예방, 개선 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 타우(Tau)는 축삭 미세소관과 결합하고 안정화시키는 필수 가용성 세포내 단백질이다. Tau는 과인산화시 미세소관 불안정화 및 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles, NFT) 형성을 유발하여 신경퇴화 및 기억 손상을 강화한다. 이와 같이 Tau 또는 과인산화된 Tau가 관여하는 신경퇴행성 장애는 일반적으로 타우 병증(Tauopathies)이라고 명명되며(Lee, V. M., et al., Annu. Rev. Neurosci. 24, 1121-1159, 2001), 알츠하이머 치매(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루이소체 치매(Lewy body dementia), 다운증후군(Down syndrome) 및 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy, PSP) 등이 이에 포함된다.

[0004] 이 중 AD는 가장 흔한 연령(age) 관련 신경퇴행성 질환 중 하나로, 이는 뇌에서 비정상적으로 접힌 아밀로이드- β -42(A β -42)에 의한 세포외 아밀로이드 플라크(amyloid plaques) 및 Tau 과인산화에 의한 세포내 NFT의 병리학적 특징을 포함하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 한편, E3/E4 유비퀴틴 리가제인 UBE4B(Ubiquitin conjugation E4 B)는 3'-UTR에 *miR-9* 결합 서열을 포함하며, 뇌에서 광범위하게 발현되는 단백질로 알려져 있다(Kaneko, C. et al., Biochemical biophysical Res. Commun. 300, 297-304, 2003). 그러나, UBE4B가 Tau 수준에 어떠한 영향이 있는지에 대해서는 거의 알려진 바 없다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 UBE4B가 Tau 단백질 제거 효과가 있고, 상기 효과는 UBE4B와 E3 유비퀴틴 라이게이즈인 STUB1(STIP1 homology and U-Box containing protein1)의 조합에 의해 더욱 증대되며, 상기 Tau 단백질 제거 효과가 유비퀴틴-프로테아좀 경로가 아닌 자가포식작용 경로로 매개되는 것임을 규명하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 UBE4B(Ubiquitin conjugation E4 B) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 타우(Tau) 단백질 제거용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 UBE4B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 타

우 병증(Tauopathy)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 UBE4B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 타우 병증의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 UBE4B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 타우 병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 UBE4B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 타우 병증의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0016] 본 발명의 하나의 양태는 UBE4B(Ubiquitin conjugation E4 B) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 타우(Tau) 단백질 제거용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 용어, "타우(Tau)"는 축삭 미세소관과 결합하고 안정화시키는 필수 가용성 세포내 단백질로서, 과인산화시 미세소관 불안정화 및 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles, NFT) 형성을 유발하여 신경퇴화 및 기억 손상을 강화하는 것으로 알려져 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 Tau 단백질은 Tau 단백질 및/또는 Tau 단백질이 응집된 형태의 Tau 응집단백질을 모두 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명에서 용어, "UBE4B(Ubiquitin conjugation E4 B)"는 E3/E4 유비퀴틴 리가제로서, 3'-UTR에 *miR-9* 결합 서열을 포함하며, 뇌에서 광범위하게 발현되는 단백질로 알려져 있다. 본 발명에 있어서, UBE4B 단백질은 UBE4B와 혼용될 수 있다.

[0022] 일 예로, 상기 UBE4B 단백질은 동물로부터 유래하는 것일 수 있다. 상기 동물은, 구체적으로 포유동물일 수 있고, 보다 구체적으로 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소, 인간 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 상기 UBE4B 단백질은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다. 구체적으로, 상기 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 기재된 폴리펩티드로 이루어지는 것일 수 있다.

[0024] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스인 미국국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에서 얻을 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열은 상기 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.

[0025] 예를 들어, 상기 아미노산 서열 N-말단, C-말단 그리고/또는 내부에 본 발명의 단백질의 기능을 변경하지 않는 서열 추가 또는 결실, 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 잠재성 돌연변이(silent mutation) 또는 보존적 치환을 가지는 경우이다.

[0026] 상기 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 아미노산으로 치환시키는 것을 의미한다. 이러한 아미노산 치환은 일반적으로 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성(amphipathic nature)에서의 유사성에 근거하여 발생할 수 있다. 통상적으

로, 보존적 치환은 단백질 또는 폴리펩티드의 활성화에 거의 영향을 미치지 않거나 또는 영향을 미치지 않을 수 있다.

- [0028] 본 발명에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열 상호간 유사한 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [0029] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오타이드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오타이드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.
- [0030] 임의의 두 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는, 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지의 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는 바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다(GCG 프로그램 패키지(Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO ET AL/.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.
- [0031] 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드의 상동성, 유사성 또는 동일성은, 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482 에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol. 48:443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오타이드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의할 수 있다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 이진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL (NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 UBE4B 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 *UBE4B* 유전자일 수 있다. 본 발명에 있어서, *UBE4B* 유전자는 *UBE4B*와 혼용될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 UBE4B 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 예로, 본 발명의 UBE4B 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2의 서열을 가지거나 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 UBE4B 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2의 서열로 이루어지거나, 필수적으로 구성될 수 있다. 구체적으로, 상기 UBE4B 단백질은 서열번호 2의 염기서열로 기재된 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 UBE4B 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 발명의 UBE4B 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, UBE4B 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 UBE4B 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 2의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상인 염기서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 2의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상인 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0037] 본 발명에 있어서, 본 발명의 조성물은 STUB1(STIP1 homology and U-Box containing protein1) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 용어, "STUB1(STIP1 homology and U-Box containing protein1)"은 E3 유비퀴틴 라이게이즈로서, 테트라트리카펩티드 반복부(tetratricopeptide repeat)와 유비퀴틴 리가제/코샤페론(ubiquitin ligase/cochaperone)으로 기능하는 U-박스를 포함하며, Hspa8(shock cognate 71 kDa protein) 및 Polb(DNA polymerase beta)에 결합하여 유비퀴틴화하는 것으로 알려져 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, STUB1 단백질은 STUB1과 혼용될 수 있다.
- [0040] 일 예로, 상기 STUB1 단백질은 동물로부터 유래하는 것일 수 있다. 상기 동물은, 구체적으로 포유동물일 수 있고, 보다 구체적으로 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모로모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소, 인간 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 상기 STUB1 단백질은 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 가지거나, 포함하거나, 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질 수 있다. 구체적으로, 상기 단백질은 서열번호 3의 아미노산 서열로 기재된 폴리펩티드로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0042] 상기 서열번호 3의 아미노산 서열은 공지의 데이터 베이스인 미국국립보건원 진뱅크(NIH GenBank)에서 얻을 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열은 상기 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.7% 또는 99.9% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환, 보존적 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 자명하다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 STUB1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 *STUB1* 유전자일 수 있다. 본 발명에 있어서, *STUB1* 유전자는 *STUB1*과 혼용될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 STUB1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 3으로 기재된 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 예로, 본 발명의 STUB1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 서열을 가지거나 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 STUB1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 서열로 이루어지거나, 필수적으로 구성될 수 있다. 구체적으로, 상기 STUB1 단백질은 서열번호 4의 염기서열로 기재된 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 STUB1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 코돈의 축퇴성 또는 본 발명의 STUB1 단백질을 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, STUB1 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있으며, 구체적으로, 본 발명의 STUB1 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 4의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상인 염기서열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 4의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 76% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상인 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] 본 발명은 UBE4B이 Tau 단백질 제거 효과가 있고, 상기 효과는 UBE4B와 E3 유비퀴틴 라이게이즈인 STUB1의 조합에 의해 더욱 증대되며, 상기 Tau 단백질 제거 효과가 유비퀴틴-프로테아좀 경로가 아닌 자가포식작용 경로로 매개되는 것임을 최초로 규명하여, UBE4B, 또는 UBE4B와 STUB1의 조합을 타우 병증(Tauopathy)의 예방, 개선 또는 치료에 적용할 수 있음을 확인한 것에 의의가 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 본 발명의 조성물은 Tau 단백질 제거 효과를 갖는 것일 수 있다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 본 발명의 조성물은 Tau 단백질의 수준을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0053] 본 발명의 일 구현예에서, 포유류 신경모세포종 세포에서 *STUB1*(도 8b의 레인 f-i, 도 8c)과 *UBE4B* 과발현(도 8b의 레인 1-4, 도 8c)에 의해 Tau 분해가 증가함을 확인하였으며, *STUB1*과 *UBE4B*의 공동 발현에 의해 Tau 분해가 더욱 증가함을 확인하였다(도 8b의 레인 6-9, 도 8c).
- [0054] 본 발명의 다른 일 구현예에서, *Tau-BiFC* 마우스에서 *UBE4B* 또는 *STUB1*의 과발현에 의해 Tau 올리고머가 분해되어 대조군에 비해 감소된 Tau 형광을 나타내었으며(도 11e), *UBE4B*와 *STUB1*의 공동 과발현은 Tau 형광을 더욱 감소시켰다(도 11e-f).
- [0056] 본 발명에 있어서, 본 발명의 조성물은 인산화된 Tau 단백질의 수준을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 본 발명의 일 구현예에서, 마우스 모델의 치아 이랑에서 *UBE4B* 또는 *STUB1*의 과발현에 따른 인산화된 Tau 수준을 검출한 결과, *UBE4B* 또는 *STUB1*의 과발현에 의해 인산화된 Tau 수준이 감소되었으며, *UBE4B*와 *STUB1*의 공동 과발현에 의해 더욱 감소한 것을 확인하였다(도 11e, g).
- [0060] 본 발명에 있어서, 본 발명의 조성물은 자가포식 경로를 통해 Tau 단백질을 제거하거나, Tau 단백질 또는 인산화된 Tau 단백질의 수준을 감소시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 본 발명의 일 구현예에서, 신경모세포종 세포에서 *UBE4B* 및 *STUB1*을 Tau와 함께 과발현하고 세포를 UPS(ubiquitin-proteasome system) 경로 억제제인 MG132 또는 ALS(autophagylysosome system) 경로 억제제인 클로로퀸으로 처리한 결과, MG132 처리는 대조군 세포 대비 Tau 분해를 억제하지 않았으나(도 13a), 대조적으로 클로로퀸은 Tau 분해를 유의하게 억제하였다(도 13b). 또한, 자가포식 억제제인 PEPA(pepstatin A) 단독, E64D 및 PEPA(E64D + PEPA)는 Tau 분해를 유의하게 억제하였다(도 13c).
- [0063] 이로부터, ALS가 신경모세포종 세포에서 *UBE4B* 및 *STUB1* 매개 Tau 분해의 주요 경로이며, SH-SY5Y 세포에서 *UBE4B* 및 *STUB1*에 의한 단량체 Tau 분자의 전환이 프로테아좀 경로보다 자가포식 의존적 방식에 의해 우선적으로 매개됨을 확인하였다.
- [0065] 전술한 본 발명 조성물의 효과는 조성물 내에 포함된 i) *UBE4B*(Ubiquitin conjugation E4 B) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자; 또는 ii) *UBE4B*(Ubiquitin conjugation E4 B) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자; 및 *STUB1* 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자;의 조합에 의해 달성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명의 다른 하나의 양태는 *UBE4B* 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 타우 병증(Tauopathy)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0068] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 *STUB1* 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0072] 본 발명에서, 용어 "타우 병증(Tauopathy)"은 Tau 또는 과인산화된 Tau가 관여하는 신경퇴행성 장애를 의미한다.
- [0073] 본 발명에 있어서, 상기 타우 병증은 일 예로, 알츠하이머 치매(Alzheimer's disease, AD), 파킨슨병

(Parkinson's disease), 루이소체 치매(Lewy body dementia), 다운증후군(Down syndrome) 및 진행성 핵상 마비(progressive supranuclear palsy, PSP) 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, Tau 단백질, Tau 응집 단백질 또는 Tau 과인산화에 의한 병리학적 특징을 포함하는 질환이라면 모두 포함될 수 있다.

- [0075] 본 발명에서 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여에 의해 타우 병증을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하며, "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 타우 병증에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0076] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 약학적 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로, 구체적으로는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.
- [0077] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0079] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.
- [0080] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학적 조성물은 1일 0.0001 내지 500mg/kg으로, 구체적으로는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋을 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 다양한 포유동물에 다양한 경로로 투여할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한없이 포함하며, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0081] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 인간에 적용되는 의약품뿐만 아니라, 동물 의약품의 형태로도 사용될 수 있다. 여기에서, 동물이란 가축 및 반려동물을 포함하는 개념이다.
- [0083] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 UBE4B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 타우 병증의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

- [0084] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0086] 상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물일 수 있다.
- [0087] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 STUB1 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 상기 타우 병증은 일 예로, 알츠하이머 치매, 파킨슨병, 루이소체 치매, 다운증후군 및 진행성 핵상 마비 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0091] 본 발명에서 용어, "개체"는 타우 병증이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 제외한 모든 동물을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물을 타우 병증의 의심 개체에 투여함으로써, 개체를 효율적으로 치료할 수 있다.
- [0093] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 타우 병증의 의심 개체에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0095] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0096] 본 발명의 약학적 조성물은 타우 병증을 예방 또는 치료하는 것을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체에도 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물, 조류 및 어류 등 어느 것이나 사용할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내 및 비강 내로 투여될 수 있고, 국부적 치료를 위해, 필요하다면 병변 내 투여를 포함하는 적합한 방법에 의하여 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0098] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 UBE4B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 타우 병증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0099] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0101] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 STUB1 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0103] 본 발명에 있어서, 상기 타우 병증은 일 예로, 알츠하이머 치매, 파킨슨병, 루이소체 치매, 다운증후군 및 진행성 핵상 마비 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0105] 본 발명에서 용어, "개선"은 상기 조성물을 이용하여 타우 병증의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.
- [0107] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품

류 등이 있다.

- [0108] 본 발명의 식품 조성물에 포함할 수 있는 성분으로는, 필수 성분으로 유효성분을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 식품 조성물에서 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로, 구체적으로는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.
- [0109] 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충진제, 안정화제 등을 포함할 수 있다.
- [0110] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0111] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0112] 본 발명에서 상기 건강보조식품은 건강기능식품 및 건강식품 등을 포함할 수 있다.
- [0113] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정 보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0114] 본 발명의 식품 조성물을 포함하는 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.
- [0116] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 UBE4B 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 타우 병증의 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.
- [0117] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.
- [0119] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 STUB1 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0121] 본 발명에 있어서, 상기 타우 병증은 일 예로, 알츠하이머 치매, 파킨슨병, 루이소체 치매, 다운증후군 및 진행성 핵상 마비 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0123] 본 발명의 조성물은 가축, 또는 반려동물과 같이 인간 이외의 개체에서 타우 병증의 예방 또는 개선을 위하여 사용될 수 있으며, 기능성 사료첨가제, 또는 사료용 조성물로 활용할 수 있다.
- [0124] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 적용 가축의 종류 및 연령, 적용 형태, 목적하는 효과 등에 따라서 적절하게 조절 가능하며, 예컨대 1 내지 99 중량%, 바람직하게는 10 내지

90 중량%, 더욱 바람직하게는 20 내지 80 중량%로 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0125] 본 발명의 사료 조성물은 투여를 위해서 조성물에 추가로 구연산, 푸마르산, 아디프산, 젖산 등의 유기산; 인산 칼륨, 인산나트륨, 중합 인산염 등의 인산염; 폴리페놀, 카테킨, 토코페롤, 비타민 C, 녹차 추출물, 키토산, 탄닌산 등의 천연 항산화제 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 또는 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0126] 또한, 본 발명의 사료 조성물은 보조성분으로 아미노산, 무기염류, 비타민, 항산화제, 항진균제, 항균제 등과 같은 각종 보조제 및 분쇄 또는 과쇄된 밀, 보리, 옥수수 등의 식물성 단백질 사료, 혈분, 육분, 생선분 등의 동물성 단백질 사료, 동물성 지방 및 식물성 지방 같은 주성분 이외에도 영양 보충제, 성장 촉진제, 소화 흡수 촉진제, 질병 예방제와 함께 사용될 수 있다.
- [0127] 본 발명의 사료 조성물을 사료 첨가물로 사용할 경우, 상기 사료 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 사료 조성물의 투여 형태는 비독성 제약상 허용 가능한 담체와 조합하여 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 프로필렌 글리콜일 수 있다. 고체형 담체의 경우에는 정제, 산제, 토로키제 등의 투여 형태일 수 있으며 액체형 담체의 경우에는 시럽제, 액체 현탁액제, 에멀전제, 용액제 등의 투여 형태일 수 있다. 또한, 투여제는 보존제, 윤화제, 용액 촉진제, 안정화제를 함유할 수 있으며 다른 염증 질환 개선제 및 바이러스 예방상 유용한 물질을 함유할 수도 있다.
- [0128] 일 예로, 본 발명의 사료 조성물은 포유류를 포함하는 다수의 동물 식이 즉, 사료에 적용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0129] 그 예로, 본 발명에 따른 사료 조성물은 가축사료에 건조 중량 기준으로 1 kg 당 약 10 내지 500 g, 바람직하기로는 10 내지 100 g의 양으로 혼합될 수 있고, 완전히 혼합한 후 매쉬로 공급하거나, 추가 가공 공정을 통하여 펠렛화, 팽창화, 압출 공정을 거치는 것이 바람직할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0131] 본 발명의 UBE4B(Ubiquitin conjugation E4 B), 또는 UBE4B와 STUB1(STIP1 homology and U-Box containing protein1)의 조합은 Tau 단백질 제거 효과를 갖는바, 타우 병증(Tauopathy)의 예방, 개선 또는 치료에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0133] 도 1은 초파리에서 게놈 차원의 miRNA 라이브러리 스크리닝을 통해 초파리 눈 유래 *miR-9* 패밀리 miRNA를 hTau의 변형체로 식별한 결과를 나타낸 도이다. (a) *GMR > hTau* 초파리 눈에서 miRNA 라이브러리의 스크리닝은 *GMR > hTau* 대조군 파리와 비교하여 *miR-9* 패밀리 miRNA를 과발현하는 파리에서 감소된 눈 크기로 표시되는 상당한 표현형 향상을 나타내었다. 눈 크기는 작은 것부터 큰 것 순으로 배열하였다. (b) *GMR > hTau* 배경에서 다양한 miRNA를 발현하는 파리의 평균 눈 크기 대 각각의 p-값에 대한 화산 플롯. *miR-9* 패밀리 miRNA를 과발현하는 파리가 감소된 눈 크기로 표시되는 심각한 타우 독성 표현형을 나타내었다. N = 3. (c, d) *GMR > hTau* 초파리 눈에서 *miR-9a*, *miR-9b* 또는 *miR-9c*의 과발현은 *GMR > hTau* 초파리에 비해 눈 크기를 크게 감소하였다. N = 5. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m으로 표시되었다. 상자 플롯의 표시는 5~95번째 백분위수 범위를 나타내었다. (e) 성숙한 초파리 *miR-9a*, *miR-9b* 및 *miR-9c* 서열과 인간 및 쥐 *miR-9* 서열의 정렬(위에서부터 서열번호 15~23으로 표시)로부터 *miR-9a*가 포유류 *miR-9* 서열과 100% 동일성을 가짐을 확인하였다.
- 도 2는 *GMR > hTau*에서 스크리닝한 초파리 miRNA 라이브러리의 눈 크기를 나타낸 도이다. (a) 초파리 miRNA 라이브러리 및 *GMR-GAL4*의 눈 크기. (b) 도 1A 및 B를 눈 크기가 증가하는 순서로 정량적으로 나타내었다. 막대는 *miR-9* 패밀리 miRNA인 *UAS-miR-9a*, *UAS-miR-9b*, *UAS-miR-9c*를 나타내며 각각 *GMR-GAL4/+* 및 *GMR > hTau*로 착색된 대조군과 비교되었다.
- 도 3은 *GMR > hTau*에서 스크리닝한 *miR-9a* 표적 RNAi의 초파리 눈 크기를 나타낸 도이다. (a) miRNA 표적 예측을 위한 세 가지 다른 프로그램(Targetscan, miR-base 및 Miranda)은 34개의 일반적인 *miR-9a* 표적을 식별하였

다. (b) *miR-9a* 표적 RNAi 및 GMR-GAL4의 눈 크기. (c) 도 4A 및 B를 눈 크기가 증가하는 순서로 정량적으로 나타내었다. 막대는 *UAS-miR-9a* 및 해당 대상 *UAS-CG11070-RNAi*를 나타내고 각각 *GMR-GAL4/+* 및 *GMR > hTau*로 착색된 대조군과 비교되었다.

도 4는 2차 스크리닝에서 *miR-9a* 표적인 CG11070을 확인하였으며, 초파리 눈에서 *hTau*가 변형됨을 확인한 도이다. (a) *miR-9a*를 표적으로 하는 RNAi 녹다운을 이용하여 *GMR > hTau* 초파리 눈을 스크리닝한 결과 대조군에 비해 CG11070 녹다운(CG11070-RNAi) 파리에서 눈 크기가 크게 감소하였다. (b) *GMR > hTau* 파리에서 다양한 *miR-9a* 표적 유전자 RNAis를 발현하는 파리의 평균 눈 크기 대 각각의 p-값에 대한 화산 플롯. CG11070-RNAi 파리는 감소된 눈 크기에 의해 확인되는 바와 같이 더 심각한 안구 타우 독성을 나타내었다. N = 3. (c, d) *GMR > hTau* 파리에서 CG11070 녹다운(CG11070-RNAi)은 *GMR > hTau* 대조군 대비 눈 크기를 감소시켰다. N = 5. 상자 플롯의 표시는 5~95번째 백분위수 범위를 나타내었다. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m으로 표시되었다. (e) 초파리 S2 세포에서 miRNA-mRNA-RISC 풀다운 분석 결과, *miR-9a*는 CG11070 mRNA에 결합하였다. *miR-9a* 풍부 CG11070 mRNA 수준의 형질감염은 *senseless* 및 *sNPFRI*를 표적으로 하였다. N = 4. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m으로 표시되었다. (f) *GMR-GAL4*를 사용한 *miR-9a*의 발현은 CG11070 발현을 유의하게 감소시켰다. N = 3. 데이터는 평균 $\pm$ s.e.m으로 표시되었다.

도 5는 초파리 CG11070 및 인간 UBE4B 간의 상동성을 확인하고 및 웨스턴 블로팅한 결과이다. (a) 초파리 CG11070 및 인간 UBE4B 단백질 간 상동 도메인. (b) 초파리 CG11070(서열번호 24) 및 인간 UBE4B(서열번호 25)의 3' UTR 서열에서 각 오르토로그의 3' UTR에 *miR-9a/miR-9* 결합 서열(빨간색)이 포함되어 있음을 확인하였다. (c-e) 웨스턴 블로팅 결과 AT180(p-T231) 및 PHF-1(p-S396/S404) 항체에 의해 검출된 바와 같이 *GMR > hTau* 파리에서 초파리 CG11070 또는 포유류 UBE4B의 과발현은 대조군 *GMR > hTau* 파리에 비해 인산화된 Tau를 감소시켰다.

도 6은 초파리 CG11070 및 포유동물 UBE4B 과발현 초파리에서 *hTau* 표현형 완화에 대한 영향을 나타낸 도이다. (a, b) *GMR > hTau* 파리에서 초파리 CG11070 또는 포유동물 UBE4B의 눈 특이적 과발현에 의해 *GMR > hTau* 대조군보다 눈 크기가 증가하였다. (c-f) *Elav > hTau* 파리에서 *Elav-Gal4*를 사용한 초파리 CG11070 또는 포유동물 UBE4B의 신경 과발현에 의해 유충 크롤링(larval crawling)이 증가하였다. (e, f) *Elav > hTau* 파리에서 *Elav-Gal4*를 사용한 초파리 CG11070 또는 포유동물 UBE4B의 신경 과발현은 대조군 *Elav > hTau* 파리에 비해 시냅스 부톤(bouton) 수를 상당히 증가시켰다. (g-i) 웨스턴 블로팅 결과 *GMR > hTau* 파리에서 초파리 CG11070 또는 포유동물 UBE4B의 안구 과발현에 의해 대조군 *GMR > hTau* 파리보다 총 Tau 단백질 및 인산화된 Tau 단백질 수준이 상당히 감소되었다.

도 7은 *miR-9a*의 녹다운의 초파리에서의 *hTau* 표현형 완화에 대한 영향을 나타낸 도이다. (a, b) 대조군 *GMR > hTau* 파리에 비해 눈 크기가 변경되지 않은 *miR-9a*-SP를 사용하는 초파리 *miR-9a*의 눈 특이적 녹다운. (c-f) *Elav > hTau* 파리에서 *Elav-Gal4*를 사용하는 *miR-9a*-SP를 사용하는 초파리 *miR-9a*의 신경 세포 녹다운은 유충 크롤링을 크게 증가시켰다. (e, f) *Elav > hTau* 파리에서 *Elav-Gal4*를 사용하는 *miR-9a*-SP를 사용하는 초파리 *miR-9a*의 신경 녹다운은 대조군 *Elav > hTau* 파리에 비해 시냅스 부톤 수를 상당히 증가시켰다.

도 8은 817 개의 포유류 신경 모세포종에서 UBE4B 및 STUB1에 의한 Tau 유비퀴틴화 및 분해 결과를 나타낸 결과이다. (a) Tau는 SH-SY5Y 신경 모세포종 세포에서 His-유비퀴틴, UBE4B 및 STUB1 야생형(WT) 또는 우성 음성 돌연변이 *STUB1*^{H260Q}와 공동 발현되었다. 유비퀴틴화된 Tau는 UBE4B 및 STUB1의 공동 발현(레인 5)에 의해 유의하게 증가했지만 UBE4B(레인 4) 또는 STUB1(레인 3) 단독 발현에 의해서는 증가하지 않았다. UBE4B 및 STUB1의 공동 발현에 의한 Tau 유비퀴틴화는 STUB1의 라이게이즈 활성을 필요로 하였다(레인 5 및 6). (b, c) Tau 단백질 분해는 UBE4B(레인 1-4) 또는 STUB1(레인 f-i) 단독 발현과 비교하여 UBE4B 및 STUB1의 공동 발현(레인 6-9)에서 향상되었다. Tau 수준의 정량화는 각 경우에서 β -액틴 단백질의 양으로 정규화되었다. (d) UBE4B는 SH-SY5Y 세포에서 HA-STUB1 및 Tau와 공동 발현되었고 항-HA-아گار로스 비드에서 면역 침전되었다. UBE4B는 Tau가 없을 때 STUB1과 직접 상호 작용하지 않았지만 Tau가 있을 때 STUB1과 간접적으로 상호 작용하였다. (e) HA-UBE4B는 SH-SY5Y 세포에서 Tau와 공동 발현되었고 항-HA-아گار로스 비드에서 면역 침전되었다. 공동 침전된 Tau를 웨스턴 블로팅으로 검출한 결과 Tau가 UBE4B와 직접 상호 작용했음을 확인하였다.

도 9는 STUB1 녹다운된 신경모세포종 세포의 Tau 분해에 대한 영향을 나타낸 도이다. (a) SH-SY5Y 세포에서 두 개의 다른 siRNA를 사용한 STUB1의 녹다운은 감소된 STUB1 단백질 수준을 나타내었다. (b) siSTUB1에 의해 Tau 분해가 억제되었다. (c) siSTUB1 발현 세포에서 Tau 분해의 정량화 결과이다.

도 10은 STUB1 녹다운된 초파리에서의 UBE4B 매개 완화된 *hTau* 표현형 감소 효과를 나타낸 도이다. (a, b) 초파

리 *STUB1*의 눈 특이적 녹다운은 *GMR > hTau + hUBE4B* 파리에 비해 눈 크기를 크게 감소시켰다. (c, d) *Elav > hTau + hUBE4B* 파리에서 *Elav-Gal4*를 사용한 초파리 *STUB1* 신경 녹다운은 애플레 크롤링을 크게 감소시켰다. (e, f) *Elav > hTau + hUBE4B* 파리에서 *Elav-Gal4*를 사용하는 초파리 *STUB1*의 신경 세포 녹다운은 대조군 *Elav > hTau* 파리에 비해 시냅스 부톤 수를 크게 감소시켰다.

도 11은 *Tau-BiFC* 마우스 모델에서 UBE4B 및 *STUB1*에 의한 Tau 올리고머의 분해를 나타낸 도이다. (a) *AAV-CMV-mCherry* 및 *AAV-UBE4B-mCherry* 바이러스 구축물의 개략도. (b) *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑(dentate gyrus)으로의 *AAV-CMV-mCherry* 또는 *AAV-UBE4B-mCherry* 바이러스 전달의 개략도. (c) *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑 및 해마에서 *AAV-CMV-mCherry* 또는 *AAV-UBE4B + STUB1-mCherry* 바이러스 전달의 foci(빨간색)를 나타내는 형광 염색 이미지. 스케일 바 (흰색), 1mm. (d) *Tau-BiFC* 마우스에서 바이러스 주입 및 병리학적 검사를 위한 작업 흐름의 개략도. (e) *AAV-UBE4B* 및 *AAV-STUB1*은 대조군과 비교하여 치아 이랑에서 올리고머 *Tau-BiFC* 및 pTau(S202/T205) 수준을 감소시켰다. GCL, 입상 세포층(granular cell layer); POL, 다형성 층(polymorphic layer). 스케일 바 (흰색), 80 μ m. (f, g) 밀도 측정 분석 결과, *AAV-UBE4B* 및 *STUB1*이 치아 이랑에서 각 대조군(*AAV-Cont* N = 4; *AAV-UBE4B* N = 4; *AAV-STUB1* N = 4; *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; N = 4 생물학적으로 독립된 동물)에 비해 *Tau-BiFC* 및 pTau(S202/T205) 수준을 모두 유의하게 감소시켰다.

도 12는 *Tau-BiFC* 마우스 모델에서 UBE4B 및 *STUB1*에 의한 Tau 인산화 감소를 나타낸 도이다. (a) *AAV-UBE4B* 및 *AAV-STUB1*은 *AAV*-대조군과 비교하여 치아 이랑에서 pTau 수준 AT180(p-T231) 및 PHF-1(pS396/S404)을 감소시켰다. 스케일 바 (흰색), 40 μ m. (b, c) 밀도 측정 분석 결과, *AAV-UBE4B* 및 *STUB1*이 *AAV*-대조군(*AAV-Cont* N = 4; *AAV-UBE4B* N = 4; *AAV-STUB1* N = 4; *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; N = 4 생물학적으로 독립된 동물)에 비해 치아 이랑에서 pTau 수준(AT180 및 PHF-1)의 현저한 감소를 나타내었다. *AAV-UBE4B* 및 *AAV-STUB1*의 공동 전달은 *AAV-UBE4B* 또는 *AAV-STUB1* 단독에 비해 치아 이랑에서 pTau 수준(AT180 및 PHF-1)의 추가 감소를 나타내었다. (d) 공동 지역화(Colocalization) 분석(주황색 선) 결과, *Tau-BiFC*(녹색) 및 AT8(S202/T205) (보라색) 수준이 *AAV-UBE4B* 및 *AAV-STUB1*-의존적으로 치아 이랑의 다형성 층(POL)에서 상관관계를 나타내며 감소함을 나타내었다. 스케일 바 (흰색), 20 μ m. (e) *Tau-BiFC* 및 AT8(S202/T205) 수준의 강도는 *AAV*-대조군에 비해 *AAV-UBE4B* 및 *AAV-STUB1* 의존적으로 상관관계를 나타내며 감소하였다.

도 13은 UBE4B 및 *STUB1*에 의한 자가포식을 통해 저하되는 Tau를 나타낸 도이다. (a) SH-SY5Y 세포에 대한 프로테아좀 억제제 MG132의 처리는 UBE4B/*STUB1*에 의해 매개되는 Tau 분해에 영향을 미치지 않았다. (b) 자가포식 억제제인 클로로퀸(CQ) 처리는 UBE4B/*STUB1*에 의한 Tau 분해에 영향을 미쳤다. (c) Pepstatin A(PEPA) 및 E64D, 자가포식 억제제는 UBE4B/*STUB1*에 의한 Tau 분해를 억제하였다. (d) *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑에 자가포식 억제제 주사의 개략도. (e) *Tau-BiFC* 마우스에서 자가 포식 억제제 주입 및 병리학적 검사를 위한 작업 흐름의 개략도. (f) CQ 및 E64D + PEPA는 식염수 주입 대조군에 비해 치아 이랑에서 pTau(S202/T205) 수준을 증가시켰다. GCL, 입상 세포층; POL, 다형성 층. (g, h) 밀도 측정 분석 결과, 클로로퀸 및 E64D + PEPA 투여군은 식염수(saline) 주입 대조군(*AAV-UBE4B + AAV-STUB1* (saline control), N = 4; CQ + *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; E64D/PEPA + *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; N = 4 생물학적으로 독립된 동물)에 비해 치아 이랑에서 pTau(S202/T205) 및 *Tau-BiFC* 수준 모두를 유의하게 증가시켰다. (i) *AAV-UBE4B* 및 *AAV-STUB1*은 대조군에 비해 치아 이랑에서 LC3 수준을 감소시켰다. (j) *AAV-UBE4B* 및 *AAV-STUB1*은 대조군에 비해 치아 이랑에서 p62 수준을 감소시켰다. (k) 밀도 측정 분석 결과, 자가포식 억제제는 대조군(*AAV-Control*, N = 4; *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; CQ + *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; E64D/PEPA + *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; N = 4 생물학적으로 독립된 동물)에 비해 치아 이랑에서 LC3 수준을 유의하게 증가시켰다. (i) 밀도 측정 분석 결과, 자가포식 억제제는 대조군(*AAV-Control*, N = 4; *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; CQ + *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; E64D/PEPA + *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; N = 4 생물학적으로 독립된 동물)에 비해 치아 이랑에서 p62 수준을 유의하게 증가시켰다.

도 14는 *Tau-BiFC* 마우스 모델에서 자가포식 억제제에 의한 pTau 축적 증가를 나타낸 도이다. (a) 클로로퀸(CQ) 및 E64D + PEPA 처리는 치아 이랑에서 대조군에 비해 pTau(PHF-1: S396/S404) 수준을 증가시켰다. GCL, 입상 세포층; POL, 다형성 층. 스케일 바 (흰색), 40 μ m. (b) 밀도 측정 분석 결과, 자가포식 억제제가 치아 이랑에서 대조군(*AAV-UBE4B + AAV-STUB1* (saline control), N = 4; CQ + *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; E64D/PEPA + *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; N = 4 생물학적으로 독립된 동물)에 비해 pTau(PHF-1: S396/S404) 수준을 유의하게 증가시켰다. (c) CQ 및 E64D + PEPA 처리는 치아 이랑에서 대조군에 비해 pTau(AT180: T231) 수준을 증가시켰다. 스케일 바 (흰색), 40 μ m. (d) 밀도 측정 분석 결과, 자가포식 억제제가 치아 이랑에서 대조군(*AAV-UBE4B + AAV-STUB1* (saline control), N = 4; CQ + *AAV-UBE4B + AAV-STUB1*, N = 4; E64D/PEPA + *AAV-UBE4B +*

AAV-STUB1, N = 4; N = 4 생물학적으로 독립된 동물)에 비해 pTau(AT180: T231)를 유의하게 증가시켰다.

도 15는 *TauBiFC* 마우스 모델에서 자가포식 억제제에 의한 베클린(BECN1) 축적을 나타낸 도이다. (a) 클로로퀸(CQ) 및 E64D + PEPA 처리는 치아 이랑에서 대조군에 비해 BECN1 수준을 증가시켰다. 스케일 바 (흰색), 40 μm. (b) 밀도 측정 분석 결과, 자가포식 억제제가 치아 이랑에서 대조군(*AAV-UBE4B* + *AAV-STUB1* (saline control), N = 4; CQ + *AAV-UBE4B* + *AAV-STUB1*, N = 4; E64D/PEPA + *AAV-UBE4B* + *AAV-STUB1*, N = 4; N = 4 생물학적으로 독립된 동물)에 비해 BECN1 수준을 유의하게 증가시켰다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

실험예

<실험예 1> 초파리 배양 및 스톡

노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)는 표준 옥수수 가루, 효모, 설탕 및 한천을 포함하는 배지에서 25℃로 배양하였다.

UAS-hTau, *GMR-GAL4* 및 *ElavGAL4* 파리종은 Bloomington Stock Center(Bloomington, USA)에서 입수하였다.

miR-9a 표적 RNAi 스톡은 Bloomington Stock Center(Bloomington, USA) 및 Vienna Drosophila Research Center(Vienna, Austria)에서 입수하였다.

pUAS-CG11070 및 *pUAS-UBE4B* 파리는 *CG11070* 또는 *UBE4B*(Ubiquitin conjugation E4 B)의 코딩 영역을 포함하는 cDNA를 사용하여 p-요소 매개 생식선 형질전환법(p-element-mediated germline transformation method)에 의해 제작하였다.

<실험예 2> 세포 배양 및 형질감염

SH-SY5y 신경모세포종 세포(neuroblastoma cells)는 10% 열 불활성화 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린(10 U/mL) 및 스트렙토마이신(100 μg/mL)이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 배양하였다. 세포를 5% CO₂에서 37℃로 배양하였다.

플라스미드는 제조업체의 지침에 따라 Effectene 형질감염 시약(Qiagen)을 사용하여 세포에 형질감염시켰다.

siRNA는 플라스미드 리포펙타민 2000 형질감염 시약(lipofectamine 2000 transfection reagent)을 사용하여 세포에 형질감염시켰다.

<실험예 3> 마우스 모델 제작 및 바이러스 주입

수컷 *TauP301L-BiFC*(Bimolecular Fluorescence Complementation) 마우스 및 이의 뇌 표본은 이전 연구(Shin, S. et al., Progress in neurobiology, 101782, 2020)에서 설명한 대로 준비하였다. *AAV-CMV-UBE4B* 및 *AAV-CMV-STUB1*(STIP1 homology and U-Box containing protein1) 바이러스(도 11a)는 정위 마이크로 인젝터(stereotaxic micro-injector, Stoelting Co.)를 사용하여 주입하였다. 대조군에는 *AAV-CMV*를 주입하였다. 신경병리학적 실험은 주사 후 2주에 수행되었다. 마우스는 12시 12분의 명암 주기로 사육되었고 무병원체 시설에서 18-23℃의 온도와 40-60%의 습도를 유지하였다.

<실험예 4> 초파리 화면에서 눈 표현형의 정량화

[0153] *GMR > hTau* 파리는 *UAS-miRNAs23* 또는 *miR-9a* 표적 *UAS-RNAi* 파리와 교배되었고, 자손의 눈에서 관찰되는 Tau 독성에 대해 점수화하였다. 눈 이미지는 Digiretina 16 카메라를 사용하여 촬영하였고 눈 크기는 Image J v1.44 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, USA)를 사용하여 측정하였다. 측정값은 Graphpad Prism 9.1.0의 화산 플롯을 사용하여 표시되었다.

[0155] **<실험예 5> 유충 크롤링(crawling) 어세이**

[0156] 3령 유충을 PBS(Phosphate-Buffered Saline)로 간단히 세척하여 잔류 먹이를 제거하였다. 유충을 깨끗한 여과지에서 짧은 시간 동안 건조시키고 2% 한천 포도즙이 코팅된 페트리 접시에 놓았다. 90 초 동안 자유롭게 크롤링하도록 한 후, 크롤링 거리를 정량화하기 위해 크롤링 유충을 추적하는 선을 그린 뒤 Image J v1.44 소프트웨어를 사용하여 총 거리를 측정하였다. 각 유전자형별 약 10-20마리의 유충을 동일한 방법으로 테스트하였다.

[0158] **<실험예 6> 신경근 접합부(neuromuscular junctions, NMJ) 정량**

[0159] 3령 유충을 PBS에서 해부하고 PBS 중 4% 포름알데히드에 15분 동안 고정한 후 PBS 중 0.1% Triton X-100으로 3회 세척하였다. FITC(Fluorescein)-컨쥬게이션된 항-HRP(horseradish peroxidase) (1:100)와 실온에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다. 유충은 Slow Fade Antifade 배지 위에 올려놓았다. Zeiss 공초점 현미경을 사용하여 공초점 이미지를 촬영하였다. NMJ는 세포 카운터 플러그인(cell counter plugin)이 있는 Image J v1.44 소프트웨어를 사용하여 각 유전자형의 부톤(bouton) 수를 계산하여 정량하였다.

[0161] **<실험예 7> 정량 PCR(Quantitative PCR)**

[0162] 그룹당 20마리의 성체 초파리의 머리를 수집하고 이로부터 전체 RNA를 트리졸(Trizol) 시약을 이용하여 분리하였다. RNA 샘플을 RNase-free DNase I로 처리한 후 SuperScript III First-Strand Synthesis System(TAKARA, Japan)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 하여 SYBR Green PCR Core 시약(BioRAD)과 함께 StepOnePlus Sequence Detection System(BioRAD, USA)을 사용하여 qRT-PCR(Quantitative reverse transcription-PCR) 분석하였다. 상대 주기 임계값은 *rp49* 수준으로 정규화한 후 각 특정 mRNA의 배수 변화를 정량화하였다.

[0164] **<실험예 8> miRNA-mRNA 풀다운(pull-down) 분석**

[0165] 세포를 형질감염 24시간 후에 수확하고 20X 프로테아제 억제제(Roche) 및 60 U RNaseOUT(Invitrogen)을 함유하는 용해 완충액(Cell Signaling, USA)에서 용해시켰다. Protein A Dynabeads(Invitrogen, USA) 및 2 µg AGO-1-특이적 항체를 면역침전에 사용하였다. 면역침전물을 37℃에서 10 분 동안 20 µg/ml의 proteinase K로 처리하였다. easy-BLUE kit(iNTRON, Korea)를 이용하여 RNA를 추출하고 SuperScript III First-Strand Synthesis System(Invitrogen)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. *miR-9a*가 *CG11070*에 직접 결합하는지 확인하기 위해 예측된 *miR-9a* 시드 서열 매치((seed sequence matches)를 포함하는 3'-UTR(untranslated region)의 단편을 증폭하는 프라이머를 설계하였다(하기 표 1). *senseless* 및 *sNPF1*은 양성 대조군으로 사용되었고 튜불린(tubulin)은 음성 대조군으로 사용되었다.

표 1

서열번호	서열명	서열(5' -> 3')
5	RP49 F	AGGGTATCGACAACAGAGTG
6	RP49 R	CACCAGGAACCTCTTGAATC
7	CG11070 F	GTAGCAGCGAACCCGCAG
8	CG11070 R	AATTCGGTTGACAGGAAAAA
9	senseless F	TGGCAGCTAAACGTACCAAA
10	senseless R	GATCGTATAAATAAATGTGG
11	sNPF1 F	GGGCCATTTCGCATATTTAC

12	sNPF1 R	ATTTAATTCGGTGCAGCTGG
13	tubulin F	ACTGCAGCATCCTGTGAACC
14	tubulin R	TGGGAACATTTCCGTTTGAT

[0169] <실험예 9> 웨스턴 블롯

[0170] 각 유전자형에 대한 부화 후 30일된 파리 머리 20개를 RIPA 완충액에서 균질화하고, 용해물을 10% SDS 겔의 각 레인에 로딩하고 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 막을 5% BSA(Bovine serum albumin)에서 차단하고 4℃에서 1차 항체와 함께 밤새 인큐베이션하였다. TBS-T 용액(Tris Buffered Saline with Tween 20)으로 막을 세척한 후, 2차 항체와 함께 인큐베이션하였다. ECL 웨스턴 블로팅 검출 시약을 사용하여 막을 현상하고 FluorChem E 이미지 프로세서를 사용하여 이미지를 촬영하였다. 사용된 항체는 항-Tau(1:1000, T46, Cat no. 13-6400, Invitrogen), 항-AT180(1:1000, Cat no. MN1040, Invitrogen), 항-PHF-1(1:1000, Cat MN1050, Invitrogen), 항-AT8(1:1000, 카탈로그 번호 MN1020, Invitrogen) 및 항-β-액틴(1:1000, 카탈로그 번호 JLA20, DSHB)이며, β-액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. 신호 강도는 ImageJ(NIH) 소프트웨어를 사용하여 정량하였다.

[0171] SH-SY5y 세포의 웨스턴 블롯 분석을 위해 항-Tau(Cat no. ab64193, Abcam), 항-β-액틴(Cat no. LF-PA0207, AB Frontier), 항-Myc(Cat no. C3956, Sigma), 항-HA(Cat no. H6908, Sigma) 및 항-CHIP(Cat no. sc-133066, Santa Cruz Biotechnology) 항체를 사용하였다.

[0173] <실험예 10> 면역 침전(Immunoprecipitation)

[0174] 세포를 플라스미드로 24시간 동안 형질감염시킨 후, 세포를 수확하고 IP 완충액(50 mM HEPES(Hydroxyethyl piperazine Ethane Sulfonic acid) pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 0.1% Tween-20, 2 mM DTT 및 프로테아제 억제제 카테일(Roche))으로 용해시켰다. 용해물을 4℃에서 30분 동안 9700 X g에서 원심분리하고, 수집된 상층액을 항-HA 아가로스 비드(Sigma)와 함께 4℃에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 비드를 50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 0.1% Tween-20 및 2 mM DTT를 포함하는 완충액으로 세척하고 결합된 단백질을 완충액 2X SDS 샘플 버퍼로 용리하였다. 샘플을 95℃에서 10분 동안 가열한 후 웨스턴 블롯으로 정량하였다.

[0176] <실험예 11> His-유비퀴틴(His-ubiquitin) 풀다운 분석

[0177] 세포를 PCS2-His-ubiquitin으로 표시된 플라스미드로 공동 형질감염시키고, 형질감염 24시간 뒤 세포를 6시간 동안 10 μM MG132로 처리하였다. 세포를 요소(urea) 용해 버퍼(8M Urea, 0.3M NaCl, 0.5M Na₂HPO₄, 0.05M Tris, 0.001M PMSF(Phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.01M 이미다졸(imidazole), pH 8.0)에서 용해한 후 4분간 초음파처리하였다(sonicated). 세포 용해물을 평형 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid) 아가로스 비드로 옮기고 실온에서 4 시간 동안 인큐베이션하였다. 비드(beads)를 요소 세척 버퍼(8M Urea, 0.3M NaCl, 0.5M Na₂HPO₄, 0.05M Tris, 0.001M PMSF, 0.02M 이미다졸, pH 6.5)로 5회 세척하고, 접합된 단백질을 40 μL 2X 라엠리/이미다졸(Laemmli/Imidazole) (200mM imidazole)로 용리하였다. 용리된 단백질 샘플을 95℃에서 10 분 동안 가열한 후 웨스턴 블로팅으로 분석하였다.

[0179] <실험예 12> 단백질 안정성 분석

[0180] SH-SY5y 세포를 표시된 플라스미드 또는 siRNA로 형질감염시키고 형질감염 24시간 후 100 μg/mL CHX(cycloheximide) 또는 비히클로 처리하였다. CHX 처리 후 특정 시점에 세포를 수집하고 특정 단백질에 대한 항체를 이용하여 면역블롯팅하였다. 자가포식 분해를 평가하기 위해, *Tau*는 24시간 동안 *STUB1* 및 *UBE4B*로 공동 형질감염되었고, 세포는 8시간 동안 50 μM 클로로퀸(Chloroquine, CQ) 또는 비히클로 처리되었다. 세포를 수집하고 용해한 후 용해물을 특정 단백질에 대한 항체로 면역블롯팅하였다.

[0182] <실험예 13> In vivo 공초점 현미경 및 이미지 분석

[0183] Tau-BiFC 마우스 모델에서 항-Tau 5(1:200, ab3931, Abcam), 항-인산화된 Tau(pTau) AT8(1:200, Cat no. MN1020, Invitrogen), 항-pTau AT180(1:200, Cat no. MN1040, Invitrogen), 항-pTau PHF-1(1:200, Cat no. MN1050, Invitrogen), 항-LC3(1:200, Cat no. M152-3, MBL), 항-P62(1:200, Cat no. PM045, MBL) 및 항-Beclin(1:200, Cat no. PD017, MBL)에 대한 면역형광 염색을 수행하였다. 형광은 공초점 현미경(Nikon A1R, JAPAN)으로 관찰되었으며, NIH Image J v1.44 소프트웨어를 사용하여 이미지의 공국 소화(Colocalization) 및 정량적 평가를 수행하였다.

[0185] 실시예

[0187] <실시예 1> 초파리에서 *hTau*의 수정자로서의 *miR-9a* 식별

[0188] 초파리 눈에서 눈 특이적 *GMR-GAL4* 프로모터를 사용하여 인간 Tau(human *tau*, *hTau*)를 과발현한 결과, 거친(rough) 눈 표현형에서 감소된 눈 크기를 특징으로 하는 눈 신경변성이 유도되었다. 이 표현형은 144개의 초파리 *miRNA*를 커버하는 131개의 UAS-*miRNA* 라인을 스크리닝하는데 사용되었다. 각 라인의 눈 형태를 분석하고 눈 크기를 정량적으로 측정 한 후 눈 크기가 증가하는 순서로 라이브러리를 배열하였다(도 1a, 도 2a-b).

[0189] 그 결과, *hTau* 파리(*GMR > hTau*)에서 많은 *miRNA*의 눈 특이적 과발현은 눈 크기에 영향을 미쳤다. 눈 크기의 정량화는 대조군 *GMR > hTau* 라인에 대한 *miRNA* 과발현 라인의 *p*-값에 대한 눈 크기의 비율에 의해 화산 플롯(volcano plot)에 플롯되었다(도 1b). 눈 크기의 가장 중요한 감소는 진화적으로 보존된 *miR-9* 패밀리의 구성원인 *miR-9a*, *miR-9b* 및 *miR-9c*(도 1c-d)의 과발현에 의해 유도되었다(도 1e).

[0190] *hTau* 발현이 없을 때 *miR-9a*, *miR-9b* 또는 *miR-9c*의 감소된 눈 크기(도 1c-d 및 도 2)는 상기 *miRNA*가 있는 눈 발달 동안 *miRNA*가 다른 표적 유전자를 조절하고 형태와 눈 크기 발달에 영향을 미침으로써 관여하기 때문일 수 있다. 그러나 이러한 *miRNA*가 *hTau*의 존재 하에 발현되었을 때, 눈 크기의 감소는 크게 향상되었다. 이는 초파리 Tau 독성에서 *miR-9* 패밀리에 대한 중요한 조절 역할을 나타내었다.

[0191] 초파리 *miR-9a*는 포유류 *miR-9a*와 100% 상동성을 가지므로, *miR-9a*를 중심으로 다음 실험을 수행하였다(도 1e).

[0193] <실시예 2> *miR-9a* 표적인 *CG11070*에 의한 *hTau*의 조절

[0194] *miR-9a*가 Tau 독성을 개선하는 것을 확인하였는바, 개별 microRNA 표적 예측 프로그램인 TargetScan(www.targetscan.org), miRanda(www.microRNA.org) 및 miRbase(www.mirbase.org)를 사용하여 *miR-9a* 표적 유전자를 검색하였다. 3개의 플랫폼 모두에서 공통적인 34개의 *miR-9a* 표적을 탐지하고(도 3a), *GMR > hTau* 배경에서 안정적으로 발현된 RNAi 녹다운을 사용하여 *hTau* 과발현(*GMR > hTau*)의 눈 표현형에 대해 34개의 추정 대상 유전자를 스크리닝한 후, 눈 크기가 증가하는 순서로 RNAi 라인을 배열하였다(도 4a, 도 3b-c). 화산 플롯 분석은 대조군 *GMR > hTau* 파리에 대한 34개의 RNAi 라인의 *p*-값에 대한 눈 크기의 비율로 수행되었다.

[0195] 그 결과, *CG11070-RNAi* 파리는 눈 크기에서 가장 두드러진 감소를 나타내었다(도 4b, 도 3c). *GMR > hTau* 배경(*GMR > hTau + CG11070-RNAi*)에서 *CG11070-RNAi* 파리의 눈 크기는 대조군 *GMR > hTau* 파리의 눈 크기에 비해 상당히 감소하였다(도 4c-d).

[0197] microRNA는 번역 또는 mRNA 안정성을 억제하기 위해 표적 mRNA의 3'-UTR 영역에 결합하기 때문에, miRNA-mRNA 풀다운 분석을 사용하여 *miR-9a*와 *CG11070*의 결합을 분석하였다.

[0198] 그 결과, *miR-9a/miR-97a* senseless 및 sNPF1을 표적으로 하는 것과 유사하게, *miR-9a*가 대조군 스크램블된 miRNA와 비교하여 초파리 S2 세포에서 *CG11070* mRNA에 결합하고 풍부화(enriched)시키는 것을 확인하였다(도 4e). 또한, *GMR-GAL4* 파리를 사용한 *miR-9a*의 눈 특이적 과발현은 *CG11070* mRNA 수준을 감소시켰다(도 4f).

[0199] 이로부터, *CG11070*이 *miR-9a*의 표적임을 확인하였다.

- [0201] <실시예 3> 초파리 *CG11070* 및 이의 포유류 오르토로그(orthologue) *UBE4B*의 과발현
- [0202] *CG11070* 및 *UBE4B* 단백질은 26%의 아미노산 동일성과 유사한 기능적 도메인을 가지며(도 5a), *UBE4B* mRNA의 3'-UTR 영역에는 *CG11070* mRNA의 3'-UTR 영역과 유사한 *miR-9* 결합 서열도 포함되어 있다(도 5b). *miR-9a* 외에도 *UBE4B*는 *miR-26*, *miR-148/miR-152* 및 *miR-15/16/195/424/497*에 의해 조절된다. 그러나 초파리에서만, *CG11070*은 *miR-9a*에 의해 조절된다. 따라서 *CG11070/UBE4B*는 *miR-9*에 의한 조절의 유사성으로 인해 추가 분석을 위해 선택되었다. *GMR > hTau* 파리에서 *CG11070*의 녹다운이 대조군 *GMR > hTau* 파리에 비해 눈 크기를 감소시켰기 때문에, *CG11070*과 이의 포유류 오르토로그인 *UBE4B*의 과발현이 *GMR > hTau* 파리에서 *hTau* 표현형을 완화할 수 있는지를 확인하였다.
- [0203] 그 결과, *GMR > hTau* 파리에서 *CG11070(GMR > hTau + GC11070)* 및 *UBE4B(GMR > hTau + UBE4B)*의 과발현은 눈 크기를 증가시켜 거친 눈 신경형을 완화하였다(도 6a-b). 뉴런 특이적 이소성(ectopic) *hTau* 발현(*Elav > hTau*)은 초파리 유충의 운동을 감소시켰으며, 이는 *CG11070* 및 *UBE4B* 과발현에 의해 완화되었다(도 6c-d). 초파리 유충에서 신경근 접합부(neuromuscular junctions, NMJ)의 부턴(bouton) 수는 운동과 직접적으로 연관되며, 이는 초파리 AD 모델에서 감소하는 것으로 알려져 있다. 신경 세포에서 *hTau*를 발현하는 유충은 대조군에 비해 부턴 수가 크게 감소했으며, 이는 *CG11070* 및 *UBE4B*의 과발현에 의해 완화되었다(도 6e-f).
- [0204] *miR-9a-sponge(miR-9a-SP)*에 의한 *miR-9a*의 녹다운은 *GMR > hTau* 파리와 비교할 때 눈 크기의 변화를 나타내지 않았다(도 7a-b). 그러나 *Elav > hTau*의 뉴런에서 *miR-9a-SP*에 의한 녹다운은 *CG11070* 및 *hUBE4B*의 과발현과 유사한 유충 운동 표현형을 나타내었으며(도 7c-d), 뉴런에서 *miR-9a-SP*에 의한 녹다운은 뉴런에서 *CG11070* 및 *hUBE4B*의 과발현과 비교할 때 NMJ 부턴 수를 개선하였다(도 7e-f).
- [0205] 이로부터, *miR-9a*와 *CG11070/UBE4B*가 초파리에서 *Tau* 독성 조절과 관련된 공통 축을 형성함을 알 수 있다.
- [0207] *CG11070* 및 *UBE4B*의 과발현이 *hTau* 표현형을 완화시켰기 때문에, 이러한 유전자의 과발현이 *Tau* 분해에 영향을 미치는지 여부를 추가로 조사하였다.
- [0208] 눈 특이적 *hTau* 발현(*GMR > hTau*)을 나타내는 30일된 파리 머리 유래 단백질에 대해 웨스턴 블롯을 수행한 결과, 총 *hTau* 단백질이 *CG11070(GMR > hTau + GC11070)* 및 *UBE4B(GMR > hTau + UBE4B)*(도 6g-h)의 과발현에 의해 현저히 감소한 것을 확인하였다. AT8(p-S202/T205) 항체에 의해 검출된 인산화된 *Tau*도 *CG11070* 및 *UBE4B*의 과발현에 의해 유의하게 감소하였다(도 6g, i). AT180(p-T231) 및 PHF-1(p-S396/S404) 항체에 의해 검출된 다른 *Tau* 인산화 형태도 상기 유전자형에서 감소하였다(도 5c-e).
- [0209] 이로부터, 초파리 *CG11070* 또는 인간 *UBE4B*의 과발현이 *Tau* 분해를 증가시켜 *hTau* 과발현 초파리에서 유충 운동, NMJ 결합 및 성체 눈 표현형을 모두 개선함을 알 수 있다.
- [0211] <실시예 4> 포유류 신경모세포종 세포에서 *UBE4B* 및 *STUB1*에 의한 *Tau*의 유비퀴틴화(Ubiquitination) 및 분해
- [0212] *UBE4B* 및 *STUB1*가 *Tau*를 분해하는 메커니즘을 조사하기 위해, SH-SY5Y 신경모세포종 세포에서 *UBE4B* 및 *STUB1*가 *Tau* 유비퀴틴화에 영향을 미치는지를 확인하였다. *STUB1*은 *Tau* 단백질에 대해 유비퀴틴화를 나타내어 선택되었으며, 이는 *miR-9*에 의해 조절되지 않았다.
- [0213] 그 결과, *STUB1* 단독 발현, *UBE4B* 단독 발현 및 *UBE4B*와 우성-음성(dominant-negative) 돌연변이체(*STUB1^{H260Q}*)와의 공동 과발현은 *Tau* 유비퀴틴화에 유의한 영향을 미치지 않았으나(도 8a의 레인 3-4, 6), *UBE4B*와 *STUB1* 공동 과발현은 유비퀴틴화된 *Tau*를 유의하게 증가시켰다(도 8a의 레인 5).
- [0214] 이로부터, *UBE4B*와 *STUB1*이 *Tau* 유비퀴틴화를 공동으로 조절함을 확인하였다.
- [0216] 단백질 분해에 있어서, 유비퀴틴 리가제의 조절 역할이 필수적임을 확인함에 따라, *UBE4B* 및 *STUB1* 매개 *Tau* 분해를 CHX(cycloheximide)로 단백질 합성을 억제하여 조사하였다.
- [0217] 그 결과, *STUB1*(도 8b의 레인 f-i, 도 8c)과 *UBE4B* 과발현(도 8b의 레인 1-4, 도 8c)에 의해 *Tau* 분해가 증가함을 확인하였으며, *STUB1*과 *UBE4B*의 공동 발현에 의해 *Tau* 분해가 더욱 증가함을 확인하였다(도 8b의 레인 6-

9, 도 8c).

[0218]

[0219] *UBE4B* 과발현만으로도 *Tau*가 분해되기 때문에(도 8b-c), siRNA로 내인성 *STUB1*을 녹다운하고(도 9a), *UBE4B* 매개 *Tau* 분해를 조사하였다.

[0220] 그 결과, *STUB1* 녹다운시 *UBE4B* 과발현은 *Tau* 분해를 나타내지 않았다(도 9b, 라인 1-4 대비 라인 6-9). 또한, *STUB1*의 녹다운은 siControl과 비교시 *Tau* 분해에 변화가 없었다(도 9c).

[0221] 이로부터, *UBE4B*가 *STUB1*의 유비퀴틴화 활성을 향상시켜 *Tau*를 유비퀴틴화하고 분해하는 중요한 요인임을 확인하였다.

[0223] *STUB1* 및 *Tau*와 *UBE4B*의 생화학적 상호 작용을 평가하기 위해 면역 침전 분석을 수행하였다.

[0224] 그 결과, *Tau*가 *UBE4B* 및 *STUB1*과 공동 발현되었을 때 *UBE4B*는 *STUB1*과 공동 침전되었다(도 8d). 그러나 *UBE4B*는 *Tau*가 없을 때 *STUB1*과 공동 침전하지 않아, *UBE4B*는 *STUB1*과 직접 상호 작용하지 않고, *Tau* 단백질과 직접 상호작용함을 확인하였다(도 8e).

[0225] 이로부터 *UBE4B*는 *STUB1*과 직접 상호작용하지 않고, *Tau*가 *STUB1*과 *UBE4B* 사이의 상호작용을 매개함을 알 수 있다.

[0227] **<실시예 5> 초파리에서 *STUB1* 녹다운에 의한 *UBE4B* 매개에 의해 완화된 *hTau* 표현형의 감소**

[0228] 신경모세포종 세포에서 *STUB1*의 녹다운은 *UBE4B*의 존재 하에서 *Tau* 수준의 변화를 나타내지 않았기 때문에(도 9b-c), In vivo 초파리 모델 시스템에서 *STUB1*의 중요성을 추가로 조사하였다.

[0229] 그 결과, *GMR > hTau + hUBE4B*를 발현하는 파리의 눈에서 *STUB1* 유전자를 녹다운할 경우, *GMR > hTau + hUBE4B* 파리 대비 눈 표현형이 현저히 감소하였다(도 10a-b). 또한, *Elav > hTau + hUBE4B*를 발현하는 뉴런에서 *STUB1* 유전자의 녹다운은 *Elav > hTau + hUBE4B* 대비 유충 운동 표현형을 유의하게 감소시켰다(도 10c-d). 그러나, *Elav > hTau + hUBE4B*를 발현하는 유충에서 *STUB1* 유전자의 녹다운은 *Elav > hTau + hUBE4B* 유충 대비 NMJ 표현형에 변화가 없었다(도 10e-f).

[0230] 이로부터, *hUBE4B* 과발현에 의한 완화된 *hTau* 표현형이 *STUB1* 기능에 의존함을 알 수 있다.

[0232] **<실시예 6> *Tau-BiFC* 마우스 모델에서 *UBE4B* 및 *STUB1*에 의한 *Tau* 분해**

[0233] BiFC 기술을 적용하여 마우스 모델에서 *Tau* 올리고머화를 시각화하였다. 이 시스템에서 전장 인간 *Tau* 단백질은 Venus 형광성 단백질의 비형광성 N- 및 C-말단에 융합되었다. 형질전환 *TauP301L-BiFC* 마우스 모델에서 금성 형광은 *Tau*가 응집된 경우에만 활성화되었다.

[0234] *UBE4B* 및 *STUB1*의 In vivo 과발현이 *Tau* 분해에 영향을 미치는지 여부를 결정하기 위해 *AAV-CMV-UBE4B* 및 *AAV-CMV-STUB1*를 제작하였다(도 11a). AAV를 정위 주입에 의해 *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑(dentate gyri)에 전달한 후(도 11b-c), 병리학적 검사를 수행하였다(도 11d). *Tau-BiFC* 마우스 모델 시스템에서 *Tau* 올리고머화는 BiFC 형광에 의해 시각화되었다.

[0235] 그 결과, *Tau-BiFC* 마우스에서 *UBE4B* 또는 *STUB1*의 과발현에 의해 *Tau* 올리고머가 분해되어 대조군에 비해 감소된 *Tau* 형광을 나타내었으며(도 11e), *UBE4B*와 *STUB1*의 공동 과발현은 *Tau* 형광을 더욱 감소시켰다(도 11e-f).

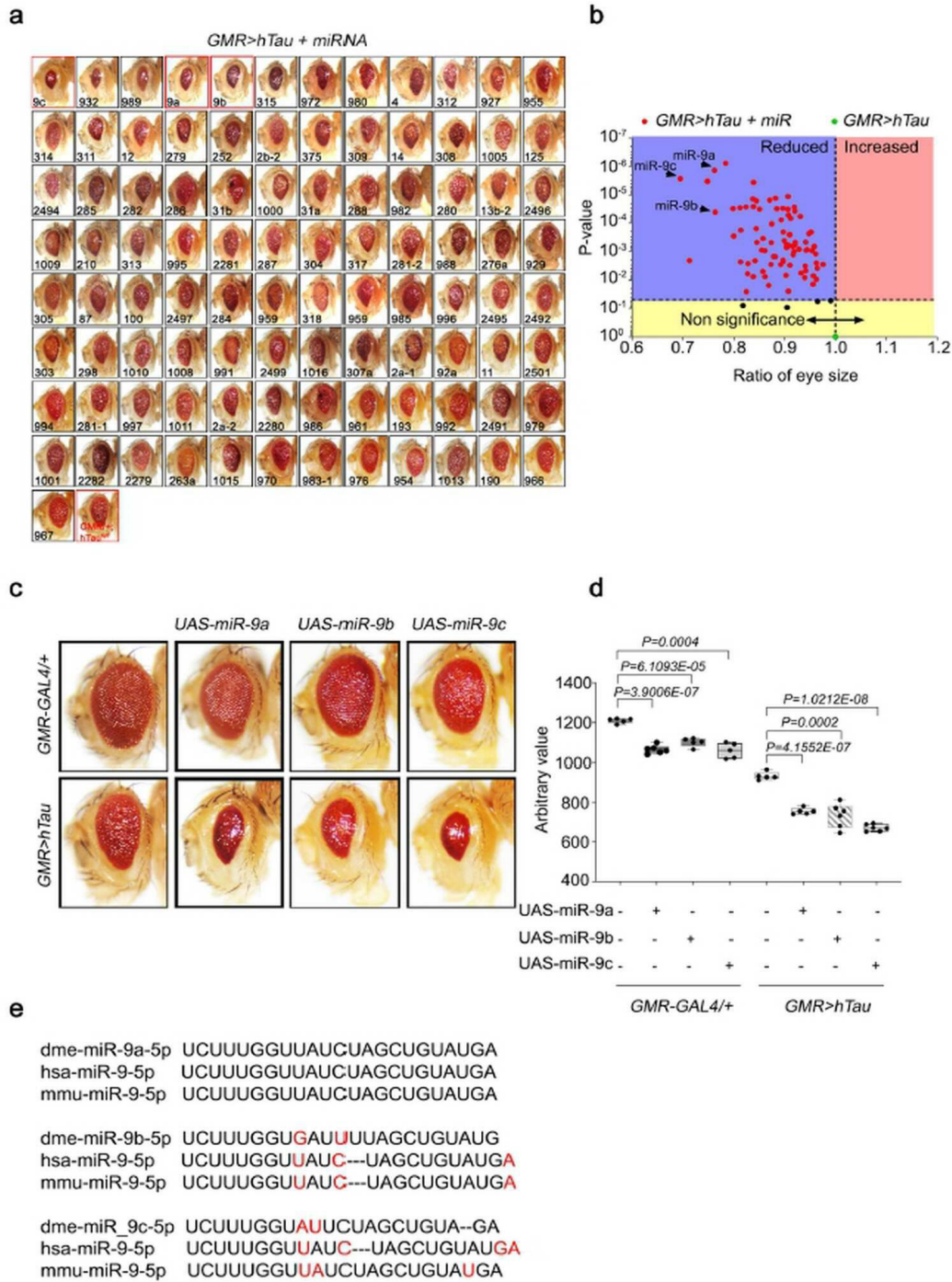
[0236] *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑에서 인산화된 *Tau* 수준을 AT8(p-S202/T205) 항체를 이용하여 검출한 결과, *UBE4B* 또는 *STUB1*의 과발현에 의해 인산화된 *Tau* 수준이 감소되었으며, *UBE4B*와 *STUB1*의 공동 과발현에 의해 더욱 감소하였다(도 11e, g).

[0237] *Tau*의 추가 인산화된 형태를 AT180(p-T231) 및 PHF-1(p-S396/S404) 항체를 이용하여 검출한 결과, *UBE4B* 또는 *STUB1*의 과발현에 의해 p-T231 및 p-S396/S404 *Tau* 수준은 감소되었으며, *UBE4B*와 *STUB1*의 공동 과발현에 의해 더욱 감소하였다(도 12a-c).

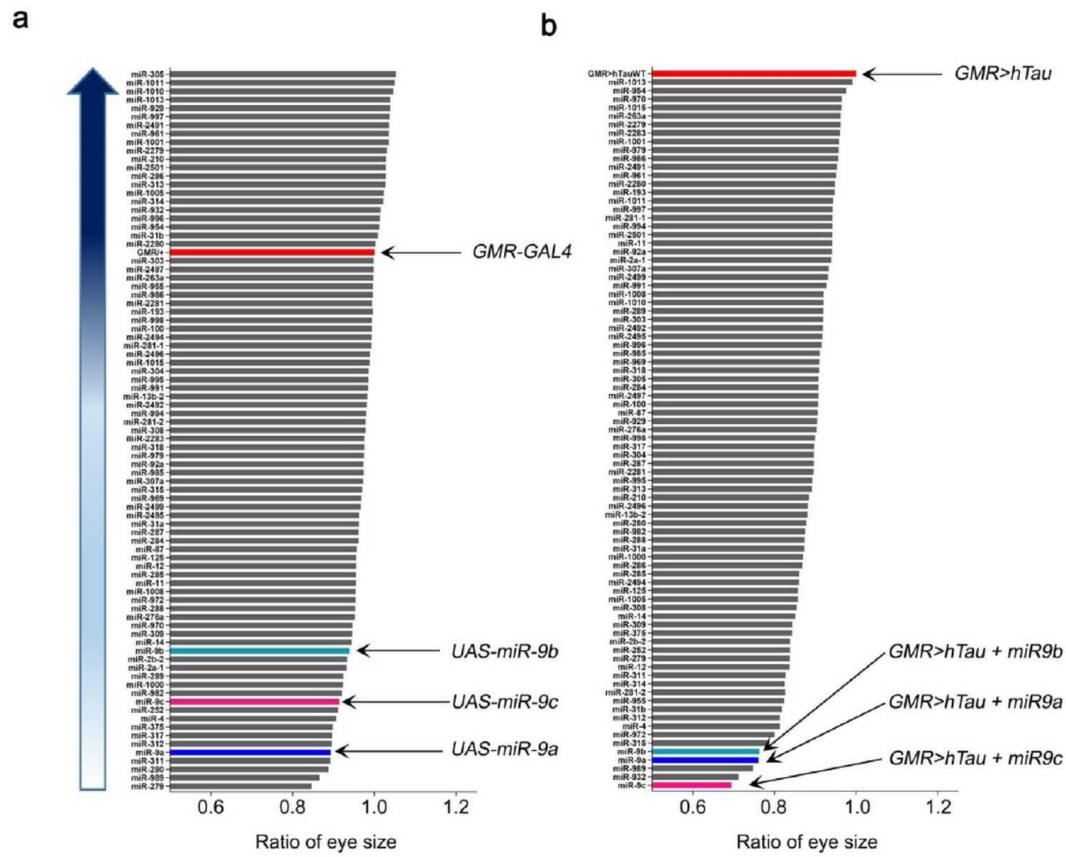
- [0238] 이로부터, *UBE4B* 및 *STUB1*이 In vivo에서 Tau를 부가적으로 분해함을 확인하였다.
- [0240] <실시예 7> *UBE4B* 및 *STUB1* 매개 자가포식 Tau 분해
- [0241] *UBE4B* 및 *STUB1*에 의한 Tau 분해가 어떤 경로로 이루어지는지 확인하기 위해, 신경모세포종 세포에서 *UBE4B* 및 *STUB1*을 Tau와 함께 과발현하고 세포를 UPS(ubiquitin-proteasome system) 경로 억제제인 MG132 또는 ALS(autophagylysosome system) 경로 억제제인 클로로퀸으로 처리하였다.
- [0242] 그 결과, MG132 처리는 대조군 세포 대비 Tau 분해를 억제하지 않았으나(도 13a), 대조적으로 클로로퀸은 Tau 분해를 유의하게 억제하였다(도 13b). 또한, 자가포식 억제제인 PEPA(pepstatin A) 단독, E64D 및 PEPA(E64D + PEPA)는 Tau 분해를 유의하게 억제하였다(도 13c).
- [0243] 이로부터, ALS가 신경모세포종 세포에서 *UBE4B* 및 *STUB1* 매개 Tau 분해의 주요 경로이며, SH-SY5Y 세포에서 *UBE4B* 및 *STUB1*에 의한 단량체 Tau 분자의 전환이 프로테아좀 경로보다 자가포식 의존적 방식에 의해 우선적으로 매개됨을 확인하였다.
- [0245] 자가포식 억제제 처리가 Tau 분해를 억제하는 것을 확인한바, *UBE4B*와 *STUB1*가 공동 발현된 *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑에 자가포식 억제제를 주입하여 In vivo에서도 동일한 결과가 나타나는지를 확인하였다(도 13d-e). *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑에서 AT8 항체(S202/T205)를 이용하여 올리고머성 Tau 및 인산화된 Tau 수준을 측정하였다.
- [0246] 그 결과, 클로로퀸과 E64D + PEPA에 의한 ALS 억제는 올리고머 및 인산화된 Tau(S202/T205)를 유의하게 증가시켰으며(도 13f-h), Tau p-S396/S404(PHF-1) 및 p-T231(AT180)의 인산화된 형태도 클로로퀸 및 E64D + PEPA 처리된 *Tau-BiFC* 마우스에서 유의하게 증가하였다(도 14a-d).
- [0248] ALS 파괴는 LC3 및 p62/SQSTM1 수준을 변경하기 때문에 자가포식의 효율성과 역 상관관계가 있다. 이에, 동물 모델 시스템에서 LC3 및 p62 수준을 측정하였다.
- [0249] 그 결과, *UBE4B* 및 *STUB1*가 동시 과발현된 *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑에서 대조군에 비해 LC3 및 p62 수준이 유의하게 감소된 반면, 자가포식 억제제를 처리한 *UBE4B* 및 *STUB1*가 동시 과발현된 *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑에서는 대조군 대비 LC3 및 p62 수준이 증가하였다(도 13i-j).
- [0250] 또한, 자가포식 억제제는 *UBE4B* 및 *STUB1*가 동시 과발현된 *Tau-BiFC* 마우스의 치아 이랑에서 대조군과 비교하여 베클린(BECN1) 수준을 조절하였다(도 15).
- [0251] 이로부터, *STUB1* 및 *UBE4B*에 의한 단량체 및 올리고머 Tau 분해가 유비퀴틴-프로테아좀 시스템보다는 자가포식 경로를 통해 매개됨을 확인하였다.
- [0253] 상기 실시예의 결과로부터, E3/E4 유비퀴틴 리가제인 *UBE4B*이 Tau 단백질 제거 효과가 있고, 상기 효과는 E3 유비퀴틴 라이게이즈인 *STUB1*와의 조합에 의해 더욱 증대되는 것을 확인하였다. 또한, 상기 Tau 단백질 제거 효과가 유비퀴틴-프로테아좀 경로가 아닌 자가포식작용 경로로 매개되는 것임을 규명한 바, *UBE4B*, 또는 *UBE4B*와 *STUB1*의 조합은 알츠하이머 치매 등을 포함하는 타우 병증(Tauopathy)의 예방, 개선 또는 치료에 적용할 수 있다.
- [0255] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 다른 당 업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

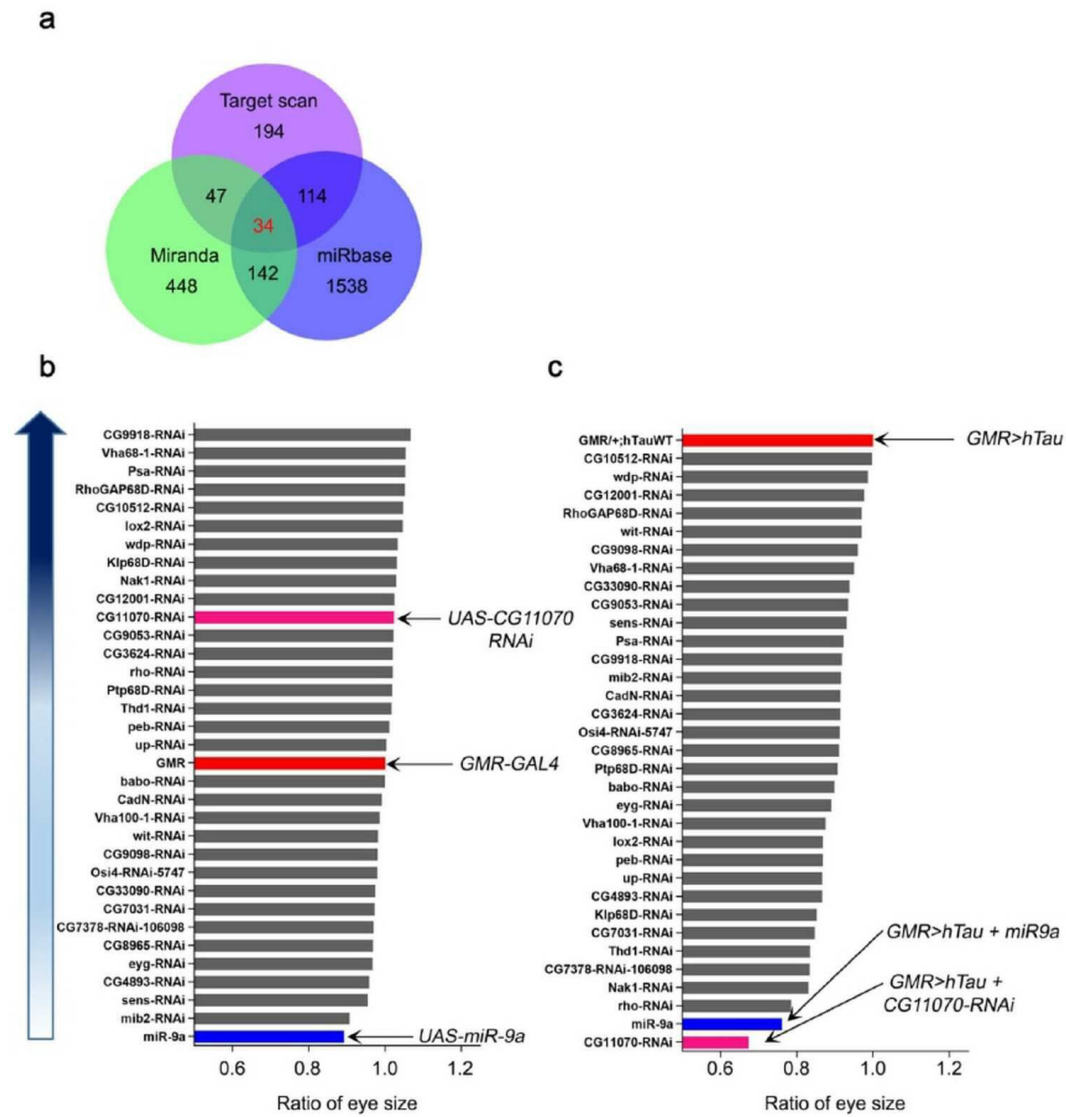
도면1



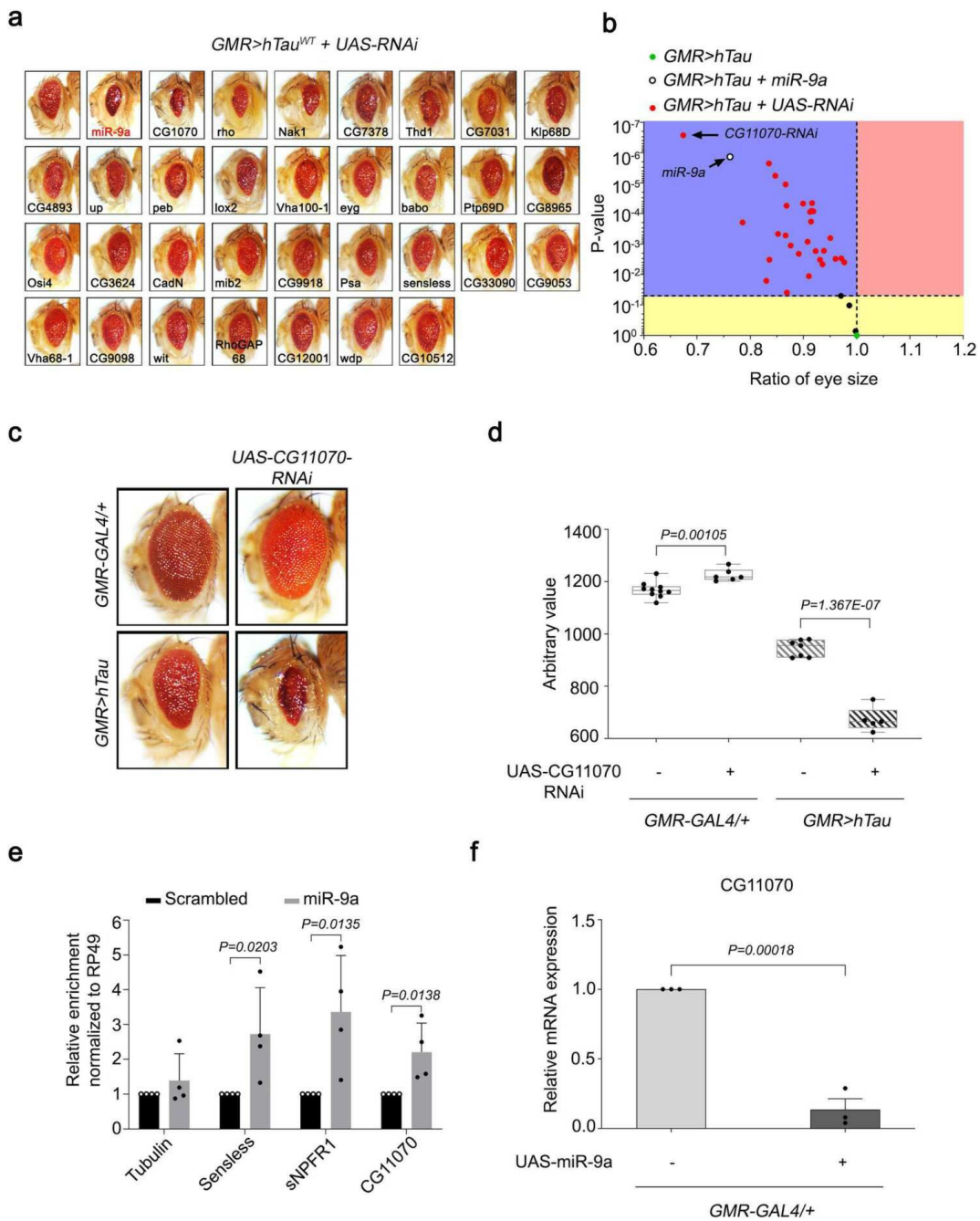
도면2



도면3



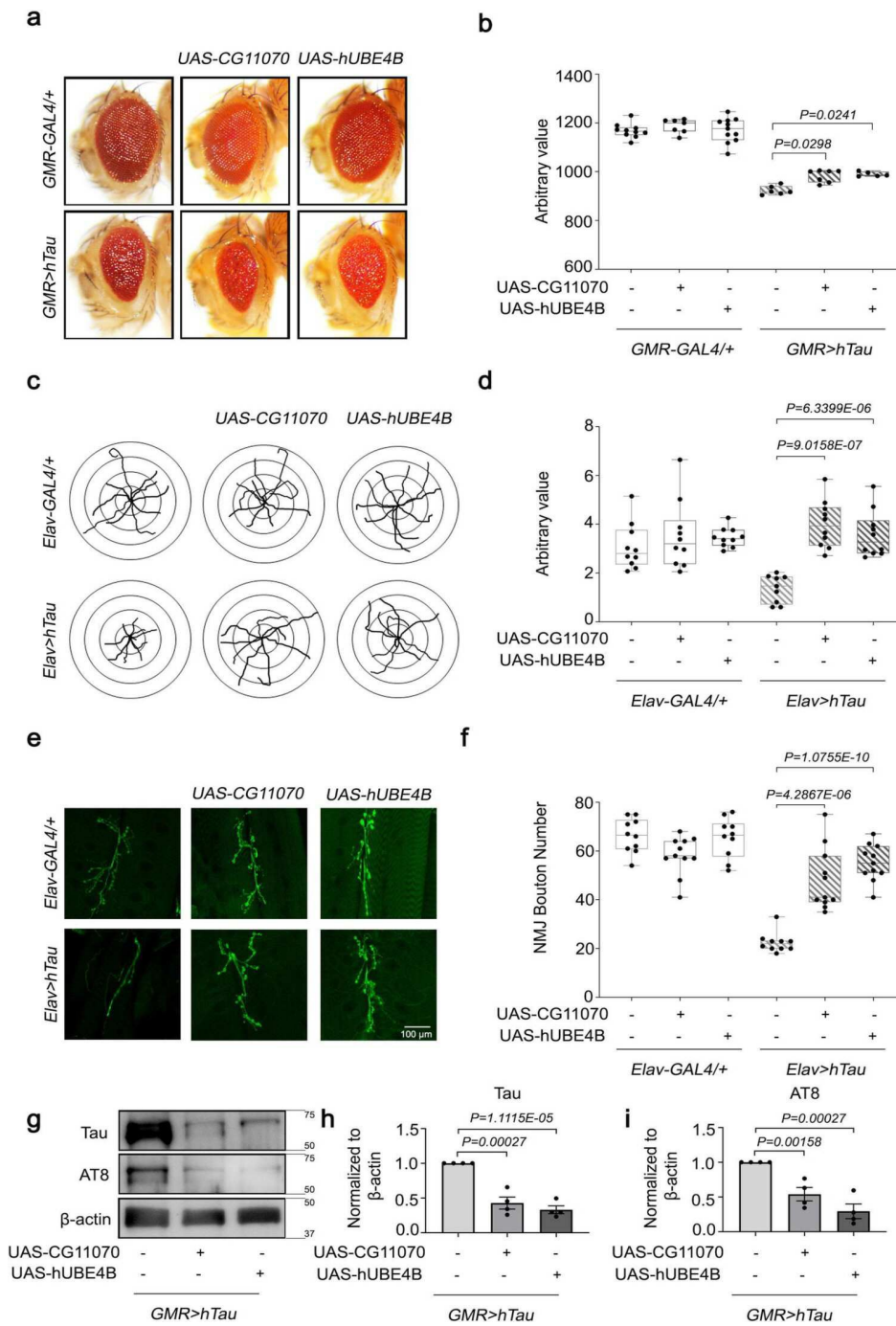
도면4



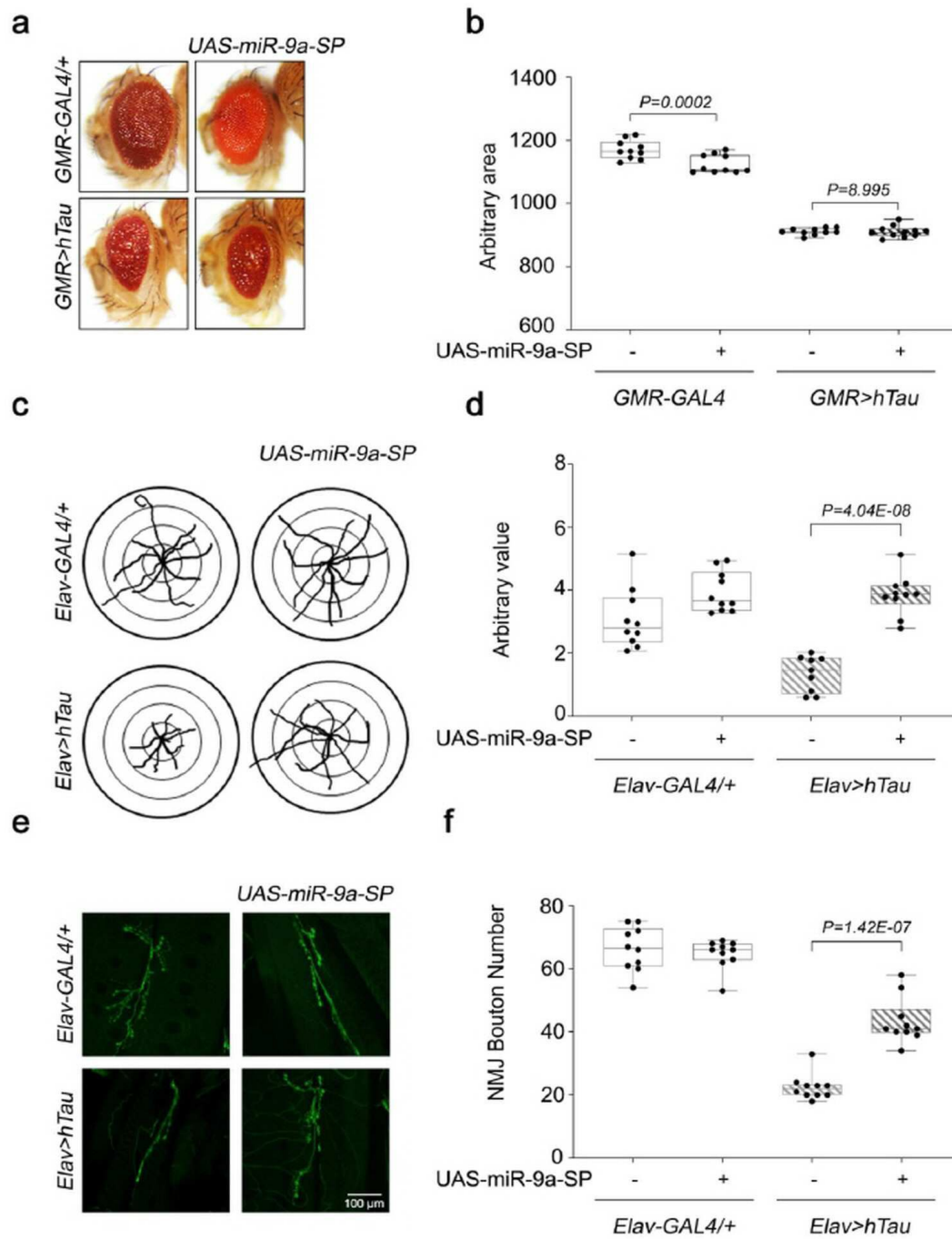
도면5



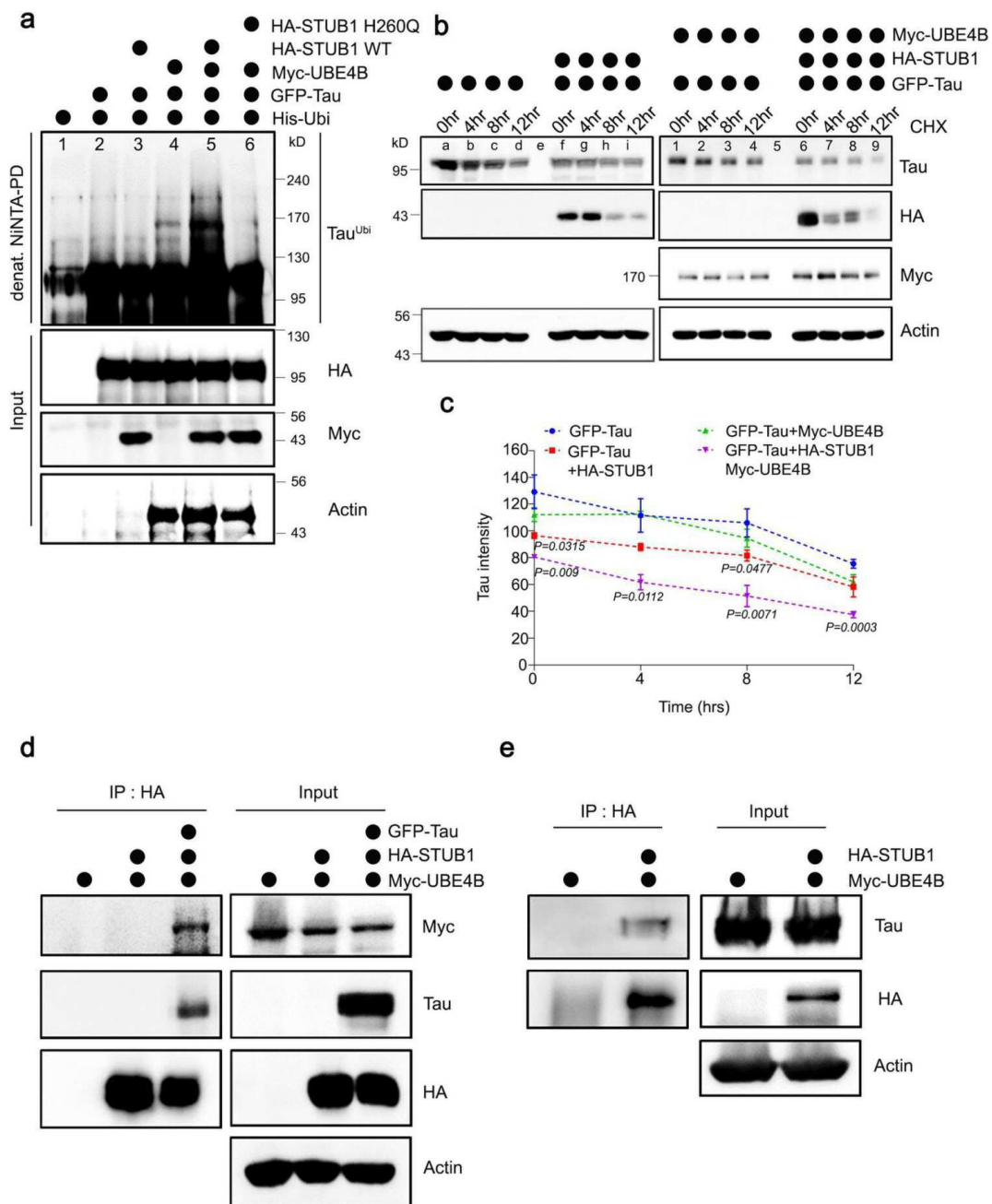
도면6



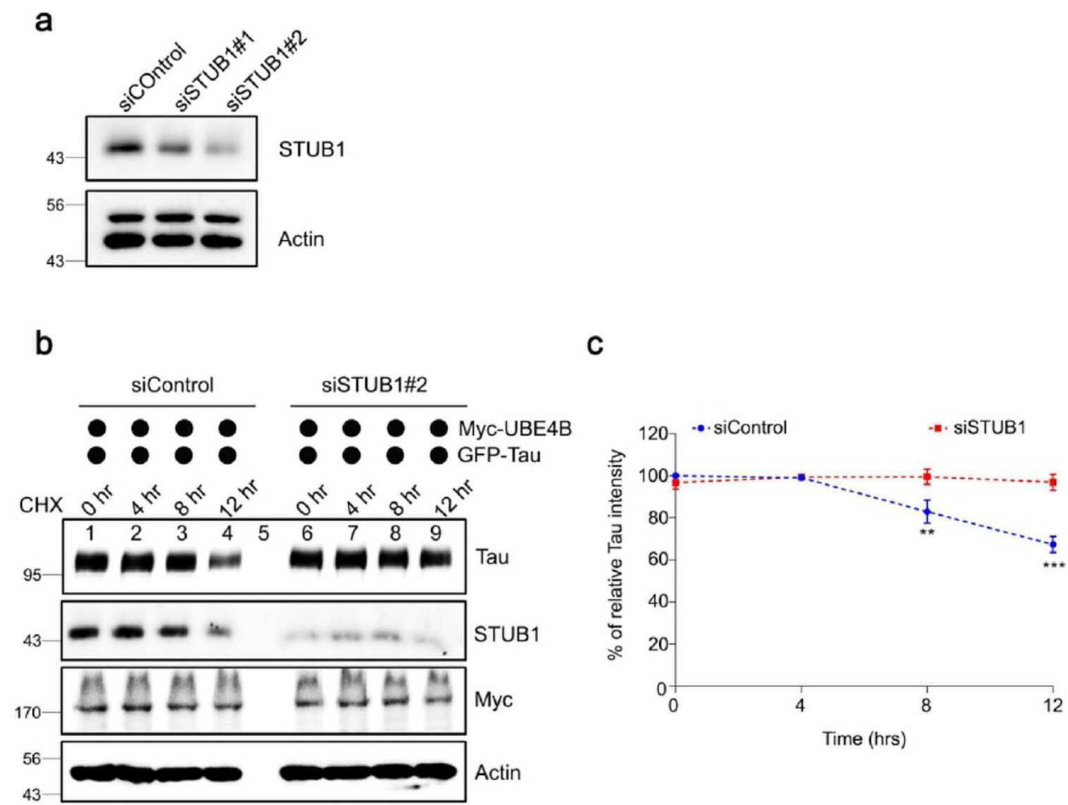
도면7



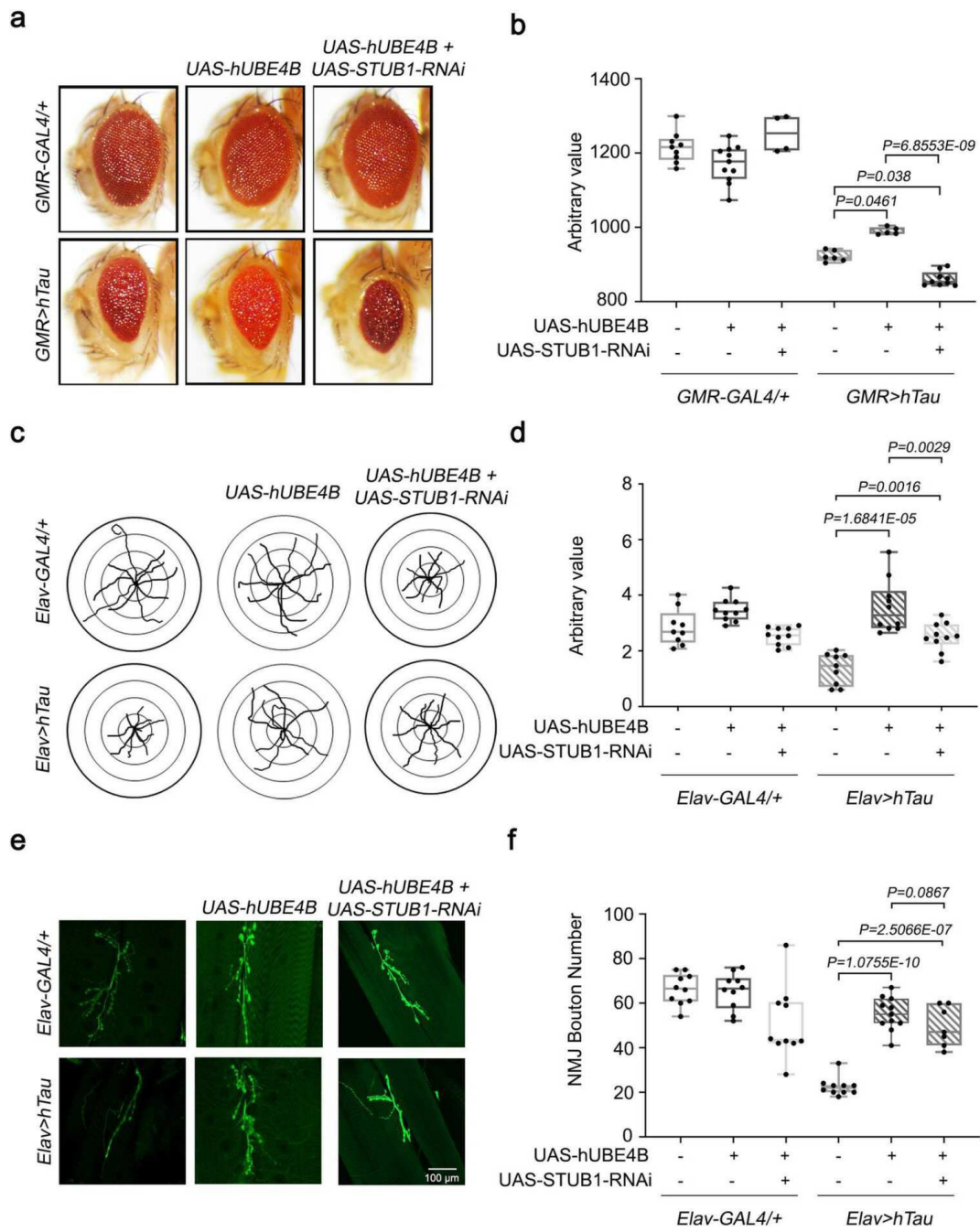
도면8



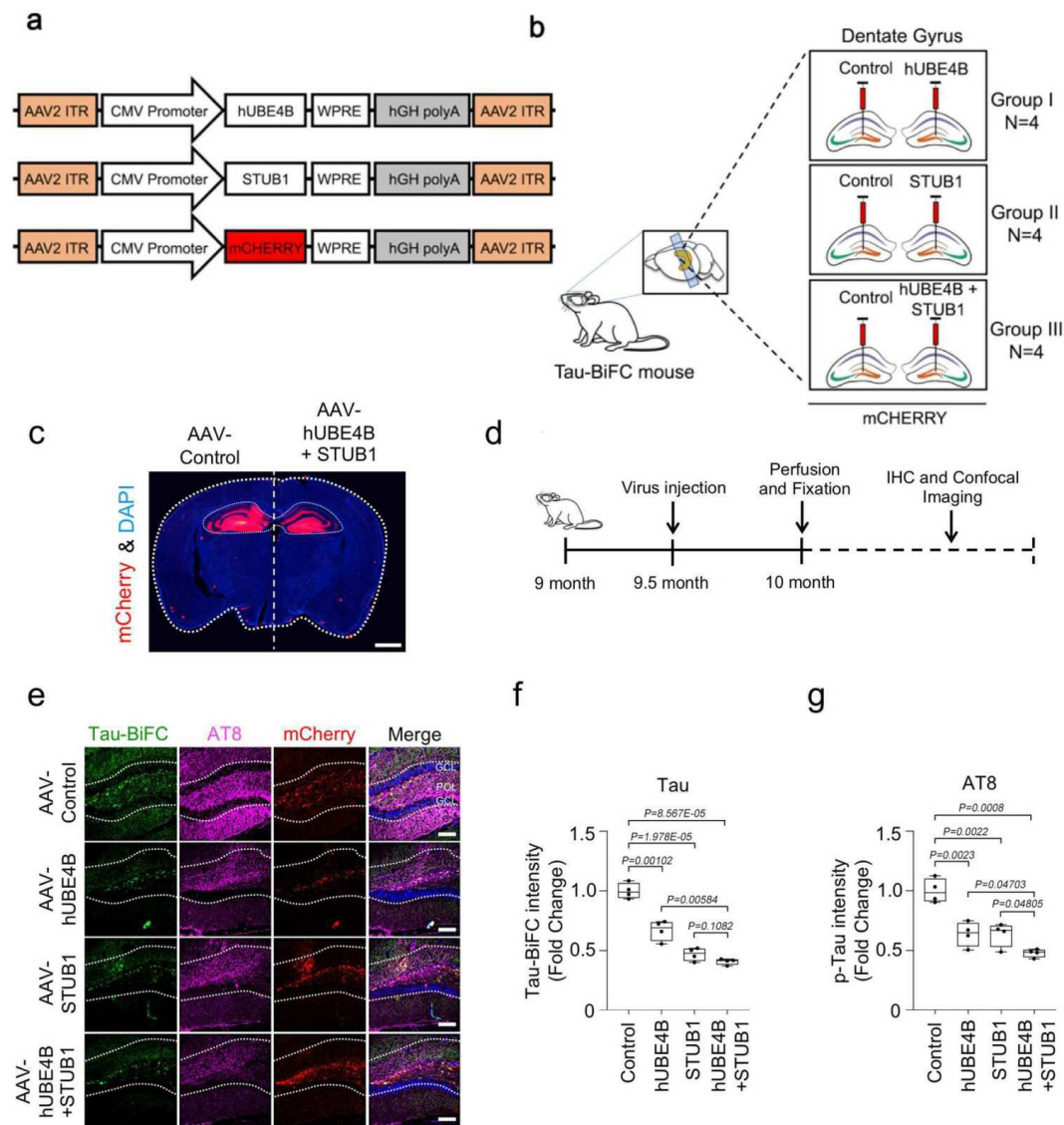
도면9



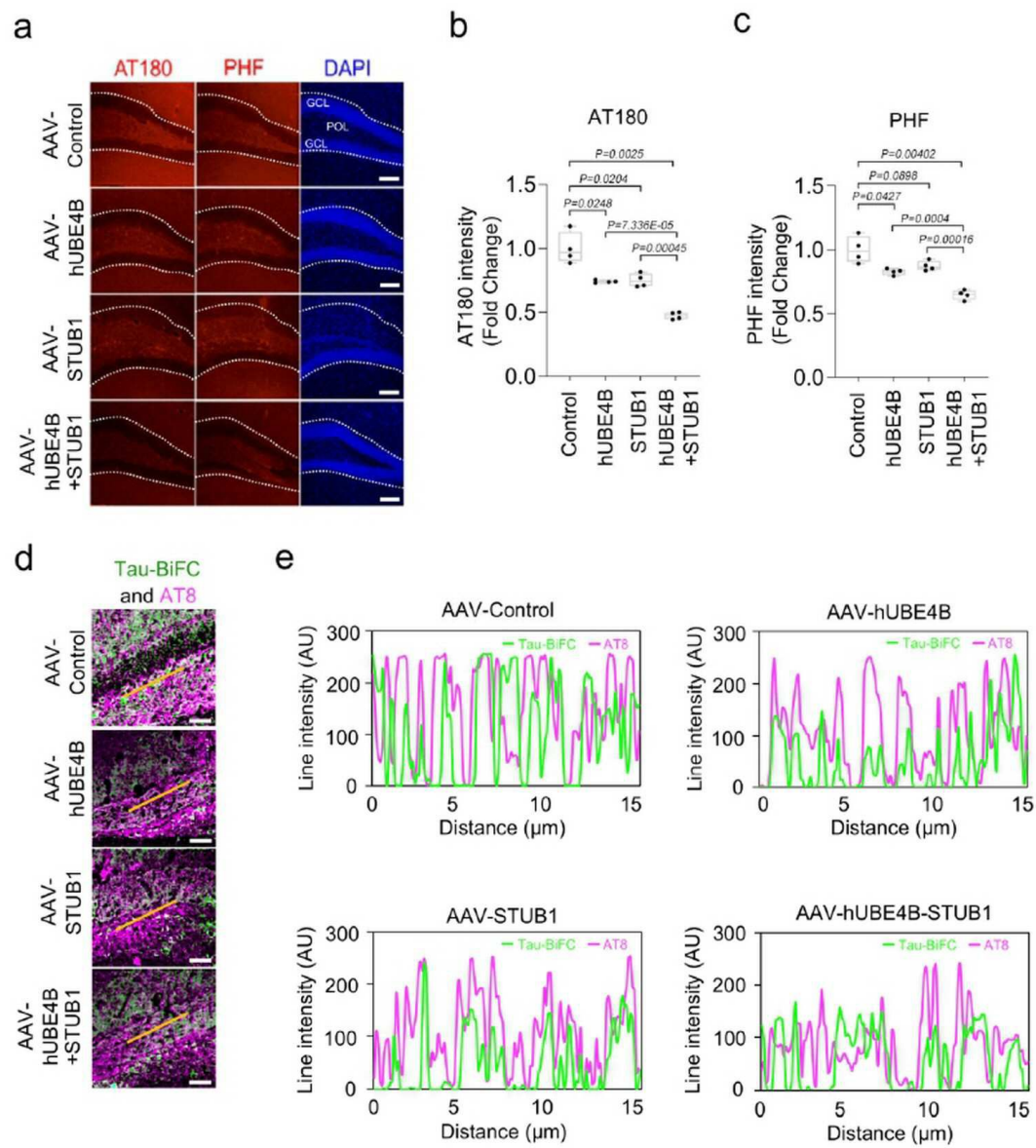
도면10



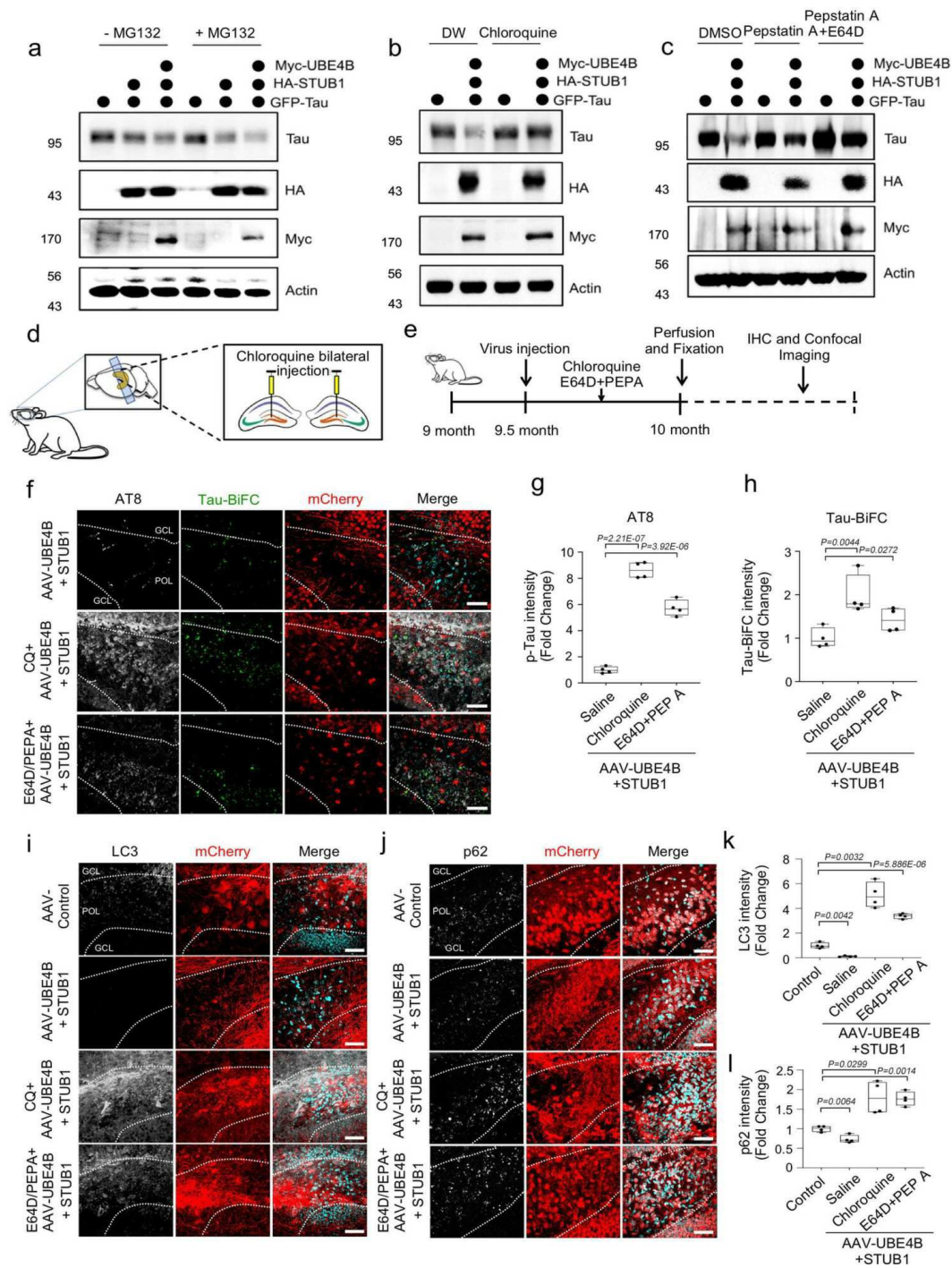
도면11



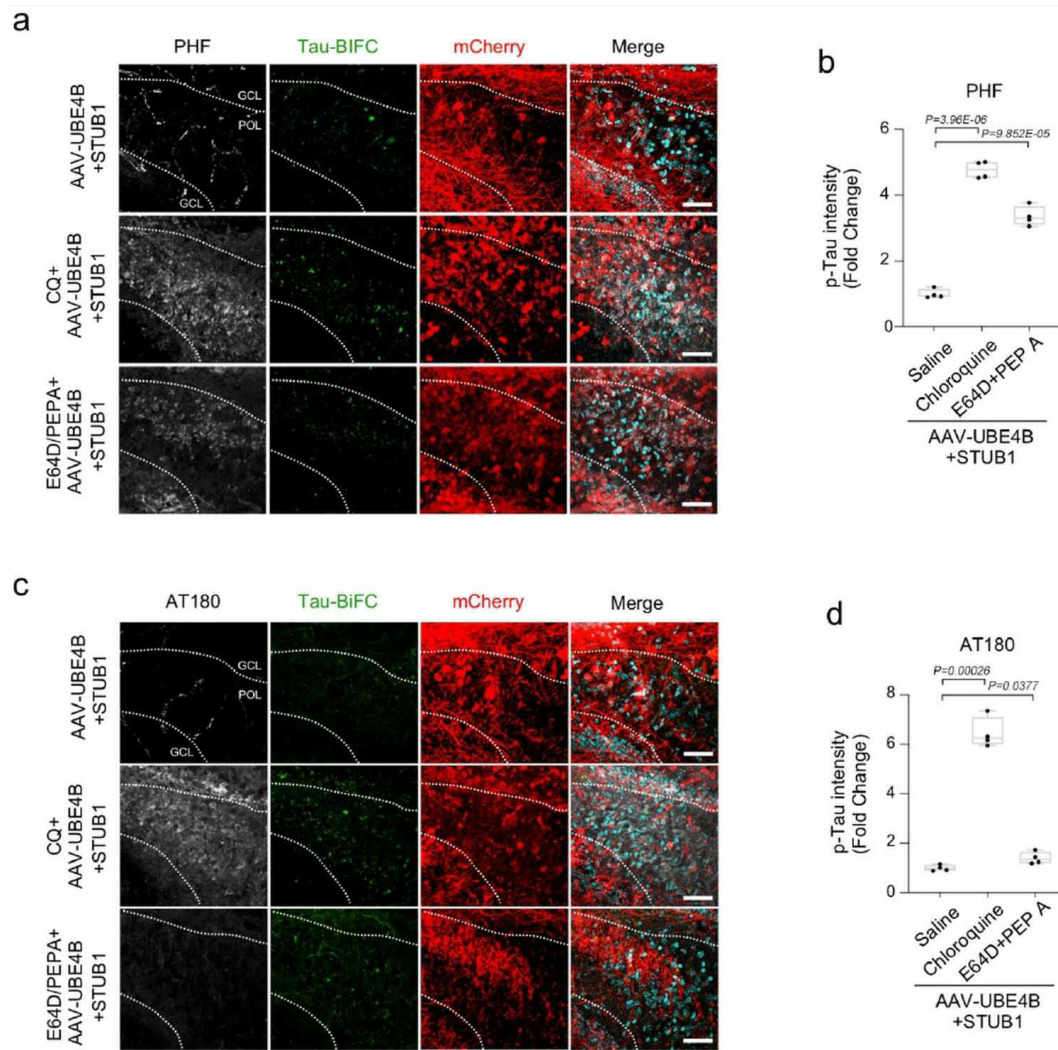
도면12



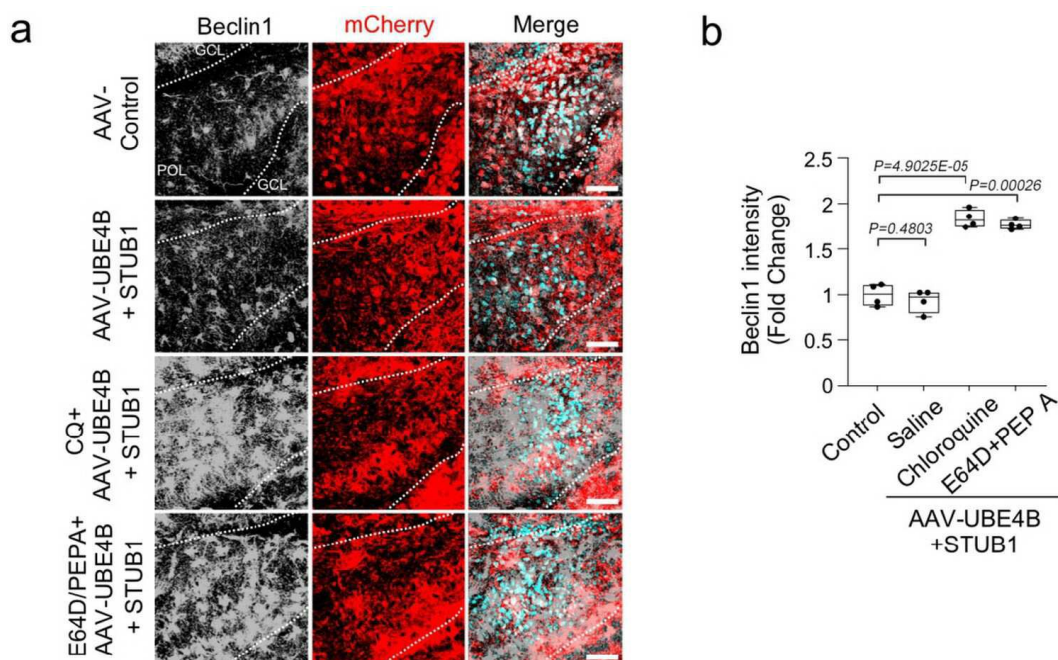
도면13



도면14



도면15



서열 목록

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> UBE4B protein and uses thereof

<130> KPA210750-KR-P1

<150> KR 10-2021-0070331

<151> 2021-05-31

<160> 25

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1302

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> UBE4B protein

<400> 1

Met Glu Glu Leu Ser Ala Asp Glu Ile Arg Arg Arg Arg Leu Ala Arg

1	5	10	15
Leu	Ala	Gly	Gly
Gln	Thr	Ser	Gln
Pro	Thr	Thr	Pro
Leu	Thr	Ser	Pro
20	25	30	
Gln	Arg	Glu	Asn
Pro	Pro	Gly	Pro
Pro	Ile	Ala	Ala
Ser	Ala	Pro	Gly
35	40	45	
Pro	Ser	Gln	Ser
Leu	Gly	Leu	Asn
Val	His	Asn	Met
Thr	Pro	Ala	Thr
50	55	60	
Ser	Pro	Ile	Gly
Ala	Ser	Gly	Val
Ala	His	Arg	Ser
Gln	Ser	Ser	Glu
65	70	75	80

Gly	Val	Ser	Ser
Leu	Ser	Ser	Ser
Pro	Ser	Asn	Ser
Leu	Glu	Thr	Gln
85	90	95	
Ser	Gln	Ser	Leu
Ser	Arg	Ser	Gln
Ser	Met	Asp	Ile
Asp	Gly	Val	Ser
100	105	110	
Cys	Glu	Lys	Ser
Met	Ser	Gln	Val
Asp	Val	Asp	Ser
Gly	Ile	Glu	Asn
115	120	125	
Met	Glu	Val	Asp
Glu	Asn	Asp	Arg
Arg	Glu	Lys	Arg
Ser	Leu	Ser	Asp

130 135 140
 Lys Glu Pro Ser Ser Gly Pro Glu Val Ser Glu Glu Gln Ala Leu Gln

 145 150 155 160
 Leu Val Cys Lys Ile Phe Arg Val Ser Trp Lys Asp Arg Asp Arg Asp

 165 170 175
 Val Ile Phe Leu Ser Ser Leu Ser Ala Gln Phe Lys Gln Asn Pro Lys

 180 185 190
 Glu Val Phe Ser Asp Phe Lys Asp Leu Ile Gly Gln Ile Leu Met Glu

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

 210 215 220

 Leu Thr Ala Thr Ser Gln Pro Ile Ala Ala Ala Ala Arg Ser Pro Asp
 225 230 235 240
 Arg Asn Leu Leu Leu Asn Thr Gly Ser Asn Pro Gly Thr Ser Pro Met

 245 250 255
 Phe Cys Ser Val Ala Ser Phe Gly Ala Ser Ser Leu Ser Ser Leu Tyr

 260 265 270
 Glu Ser Ser Pro Ala Pro Thr Pro Ser Phe Trp Ser Ser Val Pro Val

 275 280 285
 Met Gly Pro Ser Leu Ala Ser Pro Ser Arg Ala Ala Ser Gln Leu Ala

 290 295 300
 Val Pro Ser Thr Pro Leu Ser Pro His Ser Ala Ala Ser Gly Thr Ala
 305 310 315 320
 Ala Gly Ser Gln Pro Ser Ser Pro Arg Tyr Arg Pro Tyr Thr Val Thr

 325 330 335
 His Pro Trp Ala Ser Ser Gly Val Ser Ile Leu Ser Ser Ser Pro Ser

 340 345 350
 Pro Pro Ala Leu Ala Ser Ser Pro Gln Ala Val Pro Ala Ser Ser Ser

 355 360 365

 Arg Gln Arg Pro Ser Ser Thr Gly Pro Pro Leu Pro Pro Ala Ser Pro
 370 375 380

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

Phe Lys Ile Leu His Ser Ile Leu Leu Asn Gly Glu Thr Arg Glu Ala
 645 650 655

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

 725 730 735
 Trp Leu Thr Glu Leu Tyr Gly Asp Gln Pro Pro Phe Ser Glu Pro Lys
 740 745 750
 Phe Pro Thr Glu Cys Phe Phe Leu Thr Leu His Ala His His Leu Ser
 755 760 765
 Ile Leu Pro Ser Cys Arg Arg Tyr Ile Arg Arg Leu Arg Ala Ile Arg
 770 775 780
 Glu Leu Asn Arg Thr Val Glu Asp Leu Lys Asn Asn Glu Ser Gln Trp
 785 790 795 800

 Lys Asp Ser Pro Leu Ala Thr Arg His Arg Glu Met Leu Lys Arg Cys
 805 810 815
 Lys Thr Gln Leu Lys Lys Leu Val Arg Cys Lys Ala Cys Ala Asp Ala
 820 825 830
 Gly Leu Leu Asp Glu Ser Phe Leu Arg Arg Cys Leu Asn Phe Tyr Gly
 835 840 845
 Leu Leu Ile Gln Leu Leu Leu Arg Ile Leu Asp Pro Ala Tyr Pro Asp
 850 855 860
 Ile Thr Leu Pro Leu Asn Ser Asp Val Pro Lys Val Phe Ala Ala Leu

 865 870 875 880
 Pro Glu Phe Tyr Val Glu Asp Val Ala Glu Phe Leu Phe Phe Ile Val

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

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

 1010 1015 1020
 Arg Tyr Ile Asn Met Leu Ile Asn Asp Thr Thr Phe Leu Leu Asp Glu
 1025 1030 1035 1040
 Ser Leu Glu Ser Leu Lys Arg Ile His Glu Val Gln Glu Glu Met Lys
 1045 1050 1055
 Asn Lys Glu Gln Trp Asp Gln Leu Pro Arg Asp Gln Gln Gln Ala Arg
 1060 1065 1070
 Gln Ser Gln Leu Ala Gln Asp Glu Arg Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
 1075 1080 1085

 Leu Ala Thr Glu Thr Val Asp Met Phe His Ile Leu Thr Lys Gln Val
 1090 1095 1100
 Gln Lys Pro Phe Leu Arg Pro Glu Leu Gly Pro Arg Leu Ala Ala Met
 1105 1110 1115 1120
 Leu Asn Phe Asn Leu Gln Gln Leu Cys Gly Pro Lys Cys Arg Asp Leu
 1125 1130 1135
 Lys Val Glu Asn Pro Glu Lys Tyr Gly Phe Glu Pro Lys Lys Leu Leu

1140 1145 1150
Asp Gln Leu Thr Asp Ile Tyr Leu Gln Leu Asp Cys Ala Arg Phe Ala

1155 1160 1165
Lys Ala Ile Ala Asp Asp Gln Arg Ser Tyr Ser Lys Glu Leu Phe Glu

1170 1175 1180
Glu Val Ile Ser Lys Met Arg Lys Ala Gly Ile Lys Ser Thr Ile Ala

1185 1190 1195 1200
Ile Glu Lys Phe Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Glu Glu Ile Val Ala

1205 1210 1215
Lys Asn Ala Arg Ala Glu Ile Asp Tyr Ser Asp Ala Pro Asp Glu Phe

1220 1225 1230
Arg Asp Pro Leu Met Asp Thr Leu Met Thr Asp Pro Val Arg Leu Pro

1235 1240 1245
Ser Gly Thr Ile Met Asp Arg Ser Ile Ile Leu Arg His Leu Leu Asn

1250 1255 1260
Ser Pro Thr Asp Pro Phe Asn Arg Gln Thr Leu Thr Glu Ser Met Leu

1265 1270 1275 1280
Glu Pro Val Pro Glu Leu Lys Glu Gln Ile Gln Ala Trp Met Arg Glu

1285 1290 1295
Lys Gln Asn Ser Asp His

1300

<210> 2

<211> 5905

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> UBE4B nucleotide

<400> 2

ccctttcaaa gatggccgcc ctgttgTTTT gatgaataat acttggtggg gcgaggggga 60

aagagtaggg gtggaggggt aggaggattt actcttcag cgagagctac gcgcattcca 120

tcctccccct cccccctacc cgggctccgg cgtggaggcg gggcgtggcc ggctgtcttt 180

gggaggggag gggcttcctt tacagtgtgt ggctctgcca ggacggctgt ggggtcgcct 240

tacctcgggg tatccactct gcagtcgacc agttcccgcc aggagcaaag gtaggaagg	300
agagcaggat ctgctgtagg aacgcagcta ccgcgccact atcacgaaga aacagcaggc	360
tcggggcacg agacgaactg gagaccgcgc tgcctagctg ggtaacctgg gaagcagagg	420
glaataagtg gcgccttaag acaaccctgt agcagcagca gtggcggcca aaggaggctg	480
ctcagggaac aagcggctgt agtagtctgt ggggcgactg gagtaccga agccaaggca	540
gtttagtgcc tctcgtgttc ttatttttta acctctgact atgcaattct gaaacctccc	600
ccattcgggg gaccagacag cctgatagac accttcact ctccttcctc ccgccgtggt	660
ctcgagaaca gaaggatctc tccttaacgc ctttcacat taagaggaaa gcgatggagg	720
agctgagcgc tgatgagatt cgacggaggc gccttgacag acttgctggt ggacagacct	780
ctcagccaac caccctactc acctctccc agaggagaa ccctccgggg cctcccatag	840
cggcatcagc cccaggacc tctcagagtc ttggtctcaa tgtccacaac atgacccag	900
ctacctccc aatagggtca tcaggagtag cccatcgaag ccagagcagt gaaggagtca	960
gttctctcag cagctcgccc tctaatagcc ttgaaacgca atctcagtct ctctcacgtt	1020
cccagagcat ggatatcat ggtgtctcat gtgagaaaag catgtcccag gtggatgtgg	1080
attcaggaat tgaaaacatg gaggttgatg aaaatgatcg aagagaaaag cggagcctca	1140
gtgataagga gccttcctcg ggccctgaag tgtctgaaga gcaggcctta cagctggtct	1200
glaagatctt ccgtgtctct tggaaggacc gggacagaga tgtcatcttt ctttctctc	1260
tttctgcaca gttaagcag aacccaaaag aagtattctc cgattttaag gacttgattg	1320
gccagatttt aatggaagtg ctaatgatgt ccactcagac cagagatgaa aacctattg	1380
ccagtctgac agccacatca cagccaattg ctgcagcagc acggtcacca gacagaaatc	1440
tcttgctaaa cactggctcc aatccaggaa caagcccat gttctgcagc gtggcttct	1500
ttggtgccag ctctttgtct agcctctatg aaagtagtcc ggctcccact cccagttct	1560
ggagctctgt tcccgtgatg ggcccgtctc ttccctcacc tcccgtgca gccagccagt	1620
tggtctgtcc ttccactccc ctacgtctc acagtgcagc ctctggaact gctgcgggaa	1680
gccagccttc atccccgcgg tatcggccct aactgtcac tcacccatgg gcgtctcag	1740
gcgtctccat tctgtcagc tcccaagtc ccctgcct cgccagtagc cccaagcag	1800
tgccgccag cagtccaga cagaggcca gcagcaggg tccacctta ccaccgcct	1860
caccagtgc cagagcaga cggccctcct cctgaggat ctctcctagt ttgggagcct	1920
ctggtggagc aagtaattgg gattcctaca gtgaccattt caccattgaa acctgcaaag	1980

agacagatat gctgaactac ctcatcgagt gtttcgaccg agttggaata gaggaaaaaa	2040
aagcaccaaa gatgtgcagc cagccagcag tcagccagct tctgagcaac atccgctcac	2100
agtgcataat ccatactgct ttagtactac aaggtccct aacacagccc aggtccttgc	2160
agcagccgtc cticctagtg ccgtatatgc tgtgtaggaa tctcccatat ggcttcattc	2220
aggaactggt gagaaccact caccaggatg aagaagtgtt caagcagata tttatcccca	2280
ttttacaagg cctggctctt gctgccaaag agtgcctcct cgacagtgc tacttttaat	2340
acccctcat ggactaggt gagctctgtg aaaccaagtt tgggaagaca caccctgtgt	2400
gcaatttgggt tgcttctttg cggttgtggt tgccgaaatc cttaatcct ggctgtgggc	2460
gggagctgca gagactctct tacttagggg ctttcttttag cttctcagtc ttgacagaag	2520
atgatgttaa agtgggtgaa aaatacttct cagggcctgc cattaccctg gaaaacactc	2580
gtgtggttag ccaatcattg cagcattact tagagctcgg aaggcaagag ctttttaaga	2640
ttctgcatag tattttgtta aatggcgaaa cccgtgaggc tgctctcagt tacatggcgg	2700
ctgtcgtcaa tgccaatatg aagaaagcac agatgcagac agatgataga ttggtgtcta	2760
cagatggatt tatgtgaaat ttcttttggg tactgcagca gctaagtaca aaaatcaagt	2820
tagaaacagt tgatcccacg tataattttc acccaagatg tcggattact cttcccaatg	2880
atgagacgcg tgtgaatgca acgatggaag atgtgaatga ctggctgact gaactctatg	2940
gcgatcagcc tccatcttct gagecgaaat tcctacgga gtgcttcttt ctacacctgc	3000
atgtcacca cctctctatt ctgcctagt tccgtcgcta tatccgcaga ctccgggcta	3060
tccgggagct caatagaact gtagaagatt tgaaaaataa tgaaagcaa tggaaagatt	3120
ccccactggc aactagacac cgcgaaatgc tgaagcgctg taaaactcag cttagaagac	3180
tggtagggtg caaggcctgt gctgatgctg gcctacttga cgagagcttc ctgagaagat	3240
gtctgaattt ttatggcctt ctcatcagc tgtgctccg catcctggac cccgcataatc	3300
ccgatataac actgccttta aattcagatg tcccaaggt atttcagcg ttgcctgagt	3360
tttatgtaga agatgttgca gaatttttat tttttattgt acaatactct cccagggcgc	3420
tttatgagcc ctgtactcag gatattgtga tgttcttgt tgtgatgttg tgcaaccaga	3480
actacatccg aaacctatat ttgggtggcca aactggtaga agtcatgttt atgaccaacc	3540
ctgctgttca gccacgaacc cagaagtttt ttgaaatgat tgagaacat cctctctcca	3600
ccaagtgtgt ggtaccttcc ctgatgaagt ttatacaga tgttagcat accggagcca	3660
ccagtgagtt ttatgacaag ttcacaattc gctatcatat tagcaccatt tttaaaagcc	3720
tttggcaaaa catagctcac catggcacct ttatggagga gttcaactcc gggaagcagt	3780
ttgttcgcta tataaacatg ttgataaacg acacgacgtt tttgctcgat gaaagtctgg	3840

agttctctgaa gcgaatccat gaagtgcagg aagagatgaa gaacaaagaa cagtgggacc	3900
agttgcccc ggatcagcag caggctcgtc agtctcagct tgctcaggat gagcgtgtgt	3960
cccgtcttta cctcgccctg gccaccgaaa ccgtggacat gttccacatc ctcacgaagc	4020
aggtccagaa gcccttcctc agaccggagc ttggaccccg attggctgca atgctgaact	4080
ttaatcttca gcaactttgt ggccccaagt gccgtgacct gaaagttgaa aaccctgaga	4140
aatacggctt tgaaccaaag aagctgttgg accaactgac ggatatttac ttacagctgg	4200
actgtgctcg gttcgcgaaa gccattgctg acgaccagag atcctacagt aaggaattgt	4260
ttgaagaagt tatttcaaag atgcggaagg cagggatcaa atccacaata gcaatagaaa	4320
aatttaagct gctcgccgag aaagtggagg agatagtggc caagaacgca cgcgagaaaa	4380
tcgactacag cgacgtcct gatgagttca gagaccctct gatggacacc ctcacgacag	4440
accccgctgc gctgccctct ggcacccatca tggaccgtc catcatctg cggcacctgc	4500
tcaactcccc cacggacccc ttcaaccggc agacgctgac agagagcatg ctggaaccag	4560
tgccagaact gaaagagcag attcaggcgt ggatgagaga gaaacagaac agcgatcact	4620
aaaccgttcc gccgcccacc ctctgctaga cacagccaag gccaacgagg caagcagaag	4680
cagcgcccg agcgaagctg ccgttcattgt gttggaggcc aaatgtggca aaccaacccc	4740
aggccacccc agagcgagca aacgtgaga cctgaaagga catggatgag aagaggagcc	4800
cgcttctgt acatataatt aagtacaaa cagggtcaaa agcttaaggg acaggtttta	4860
tggttgcttg tgtaataaag catgtccttc gtatgtcaca gtttggggca acggaagtct	4920
tttagtgatg gctaattgggt ctgggcagca tcccttcattg aattttttt taatccaata	4980
tccgttgatt tgatttgat tagagaacct tggacatttt gctgctaaag aatcttttt	5040
cccctctccc cttctctgac cctacttgca ctgctgtgga tttttttaag agaagcaaaa	5100
acaaaagtaa actcctttcc ctggccctcc aaacatatat tctgtgagat aactgtgcct	5160
gctaccaagt gttaatcctg ggatcgtatt ttatatcat attcacatat ttgtttttt	5220
aattgggtgt agatgacatg attaataaaa aaggcaagat atttcagaa ttggaatttc	5280
agttttttt ttcttttgaa atgtcccttt aagattttt tattctaaac aaaataaaga	5340
aaatcctgct gctctgggcc ttgtgataag cctctcttcg gcactgagg agcagctgca	5400
gcaaaatcta ggggtgtaag tgtatcagga ctatgtgac ttatatattg gggagatgag	5460
ggttgggttt ttttttaat gctacgtgac agtttgaac cttcacagtt atcctctggg	5520
ggtaaatcaa ttcttcaacc cttgggtgtg tgagtttgag gcagggtcat ttgtgtgatg	5580
tgtttggcct taccaaagca aaagaggttg caagaatgtg ggagtatgtc tgccggtttc	5640
aacacacaca gacaaacaca gccacacgcg cacacaagta taagactttt tgtattactg	5700

ctccctactt aacatacttg aattctcaaa tttcctttgg ggtaaaaaaa aaaaaaggat 5760

ttgaaaccat aaagtgttct gaagaaatta agtctataaa aagcatactt tcttttttct 5820

tttccctttt tccctccaca gacaatgtcc tctgttcaat tcttaacgca aactacaata 5880

aatggtgaca cacgttcaga agaaa 5905

<210> 3

<211> 303

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> STUB1 protein

<400> 3

Met Lys Gly Lys Glu Glu Lys Gly Gly Ala Arg Leu Gly Ala Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Pro Glu Lys Ser Pro Ser Ala Gln Glu Leu Lys Glu Gln

20 25 30

Gly Asn Arg Leu Phe Val Gly Arg Lys Tyr Pro Glu Ala Ala Ala Cys

35 40 45

Tyr Gly Arg Ala Ile Thr Arg Asn Pro Leu Val Ala Val Tyr Tyr Thr

50 55 60

Asn Arg Ala Leu Cys Tyr Leu Lys Met Gln Gln His Glu Gln Ala Leu

65 70 75 80

Ala Asp Cys Arg Arg Ala Leu Glu Leu Asp Gly Gln Ser Val Lys Ala

85 90 95

His Phe Phe Leu Gly Gln Cys Gln Leu Glu Met Glu Ser Tyr Asp Glu

100 105 110

Ala Ile Ala Asn Leu Gln Arg Ala Tyr Ser Leu Ala Lys Glu Gln Arg

115 120 125

Leu Asn Phe Gly Asp Asp Ile Pro Ser Ala Leu Arg Ile Ala Lys Lys

130 135 140

Lys Arg Trp Asn Ser Ile Glu Glu Arg Arg Ile His Gln Glu Ser Glu

145 150 155 160

Leu His Ser Tyr Leu Ser Arg Leu Ile Ala Ala Glu Arg Glu Arg Glu

165 170 175
 Leu Glu Glu Cys Gln Arg Asn His Glu Gly Asp Glu Asp Asp Ser His
 180 185 190
 Val Arg Ala Gln Gln Ala Cys Ile Glu Ala Lys His Asp Lys Tyr Met
 195 200 205
 Ala Asp Met Asp Glu Leu Phe Ser Gln Val Asp Glu Lys Arg Lys Lys
 210 215 220
 Arg Asp Ile Pro Asp Tyr Leu Cys Gly Lys Ile Ser Phe Glu Leu Met
 225 230 235 240

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

<210> 4

<211> 1340

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> STUB1 nucleotide

<400> 4

ggagctgggc cggcccgag cggatcgcg gctcggctg cggggtccg gctgcgggcg 60
 ctgggccgcg aggcgcggag cttgggagcg gagcccaggc cgtgccgcgc ggcgccatga 120
 agggcaagga ggagaaggag ggcggcgcac ggctgggcgc tggcggcgga agccccgaga 180
 agagcccag cgcgcaggag ctcaaggagc agggcaatcg tctgttcgtg gcccgaagt 240
 acccgaggc ggcggcctgc tacggccgcg cgatcacccg gaaccgctg gtggccgtgt 300
 attaccaa ccgggccttg tgctacctga agatgcagca gcacgagcag gccctggccg 360

 actgccggcg cgccttgag ctggacgggc agtctgtgaa ggcgcacttc ttctggggc 420
 agtgccagct ggagatggag agctatgatg agccatcgc caatctgcag cgagcttaca 480
 gcctggccaa ggagcagcgg ctgaacttcg gggacgacat cccagcgct cttcgaatcg 540

cgaagaagaa gcgctggaac agcattgagg agcggcgcat ccaccaggag agcgagctgc	600
actcctacct ctccaggctc attgccgcgg agcgtgagag ggagctggaa gagtgccagc	660
gaaaccacga gggatgatgag gacgacagcc acgtccgggc ccagcaggcc tgcattgagg	720
ccaagcacga caagtacatg gcggacatgg acgagctttt ttctcagggtg gatgagaaga	780
ggaagaagcg agacatcccc gactacctgt gtggcaagat cagctttgag ctgatgcggg	840
agccgtgcat cagccccagt ggcatcacct acgaccgcaa ggacatcgag gagcacctgc	900
agcgtgtggg tcattttgac cccgtgacct ggagccccct gaccaggaa cagctcatcc	960
ccaacttggc tatgaaggag gttattgacg cattcatctc tgagaatggc tgggtggagg	1020
actactgagg ttccctgccc tacctggcgt cctgggtccag gggagccctg ggcagaagcc	1080
cccggcccc atacatagtt tatgttctg gccacccga ccgcttcccc caagtctgc	1140
tgttggaactc tggactgttt cccctctcag catcgctttt gctgggccgt gatcgcccc	1200
ctttgtgggc tggaaaagca ggtgagggtg ggctgggctg aggccattgc cgccactatc	1260
tgtgtaataa aatccgtgag cagcaggtgg gacgtgctgg tgtgtgaccg gcagtcctgc	1320
cagctgtttt ggctagccga	1340
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RP49 F	
<400> 5	
agggtatcga caacagagtg	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RP49 R	
<400> 6	
caccaggaac ttcttgaatc	20
<210> 7	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> CG11070 F

<400> 7

gtagcagcga acccgcag 18

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CG11070 R

<400> 8

aattcggttg acaggaaaaa 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> senseless F

<400> 9

tggcagctaa acgtacaaa 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> senseless R

<400> 10

gatcgtataa ataatgtgg 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sNPFR1 F

<400> 11

gggccatttc gcatatttac 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sNPFR1 R
 <400> 12
 atttaattcc gtgcgactgg 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tubulin F
 <400> 13
 actgcagcat cctgtgaacc 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tubulin R
 <400> 14
 tgggaacatt tccgtttgat 20

 <210> 15
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> dme-miR-9a-5p
 <400> 15
 uuuuugguua ucuagcugua uga 23
 <210> 16
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hsa-miR-9-5p
 <400> 16
 uuuuugguua ucuagcugua uga 23
 <210> 17

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mmu-miR-9-5p
 <400> 17
 ucuuuggguu ucuagcugua uga 23

<210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> dme-miR-9b-5p
 <400> 18
 ucuuuggguga uuuuagcugu aug 23

<210> 19
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hsa-miR-9-5p
 <400> 19
 ucuuuggguu ucuagcugua uga 23

<210> 20
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mmu-miR-9-5p
 <400> 20
 ucuuuggguu ucuagcugua uga 23

<210> 21
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> dme-miR_9c-5p
 <400> 21

ucuuugguau ucuagcugua ga	22
<210> 22	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> hsa-miR-9-5p	
<400> 22	
ucuuugguua ucuagcugua uga	23
<210> 23	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mmu-miR-9-5p	
<400> 23	
ucuuugguua ucuagcugua uga	23
<210> 24	
<211> 334	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Drosophila mir-9a binding sequence	
<400> 24	
ggtagcagcg aacccgcagc tgctggctca gttgcccaac caaagagtta gtcacacggg	60
gattcggttg ttagggcaat aatcaatgtt tttttgttca taagaattcc agtcatacat	120
ggtggtatgt gtatgtgcag ttttataatt agtggttttt aaaatgtatt cttaatccat	180
tttttcctgt caaccgaatt aattaacaaa caatgtgtac gaataacatg caaaggataa	240
attattgtag tcatatttgg ttttgtgttc acaatatgtt tacatatatg tttaaataaa	300
cggcgtttcg ctgaaaaaat gtgtatattc aatt	334
<210> 25	
<211> 839	
<212> DNA	
<213> Unknown	
<220><223> Human E4B mir-9 binding sequence	
<400> 25	

gacggggtgg gacggaggcg gggagaggac gcaggcgaga ggaactcggc ggcgcggcgc	60
ccgcggccta ttggctgcca cgtcccggcg ccagaagccc cgcctccctg acgggggtca	120
cgtgatccct ttcaaagatg gccgccctgt tgttttgatg aataatactt ggtggggcga	180
gggggaaaga gtaggggtgg aggggtagga ggatttactc ttccagcgag agctacgcgc	240
atcccatcct cccctcccc cctaccggg ctccggcgtg gaggcggggc gtggccggcc	300
tgctttggga ggggaggggc ttcccttaca gtgctgggct ctgccaggac ggctgtgggg	360
tcgccttacc tcgggtatc cactctgcag tcgaccagtt cccgccagga gcaaagggtg	420
ggaaggagag caggatctgc ttaggaacg cagctaccgc gccactatca cgaagaaaca	480
gcaggctcgg ggcacgagac gaactggaga ccgcgctgcc tagctgggta acctgggaag	540
cagagggtaa taagtggcg ctttaagaca ccctgtagca gcagcagtgg cggccaaagg	600
aggctgctca gggaacaagc ggctgtagta gtctgtgggg cgactggagt gaccgaagcc	660
aaggcagttt agtgcctctc gtgttcttat ttttaacct ctgactatgc aattctgaaa	720
cctcccccat tcgggggacc agacagcctg atagacacct tccactctcc ttctcccgc	780
cgtggtctcg agaacagaag gatctctctt taacgccttt caccattaag aggaaagcg	839