



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0025247
(43) 공개일자 2023년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/66 (2006.01) A61K 8/22 (2006.01)
A61K 8/34 (2006.01) A61K 8/44 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
C12N 9/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/66 (2013.01)
A61K 8/22 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0107538

(22) 출원일자 2021년08월13일

심사청구일자 2021년08월13일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

김용환

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

계혜령

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 13 항

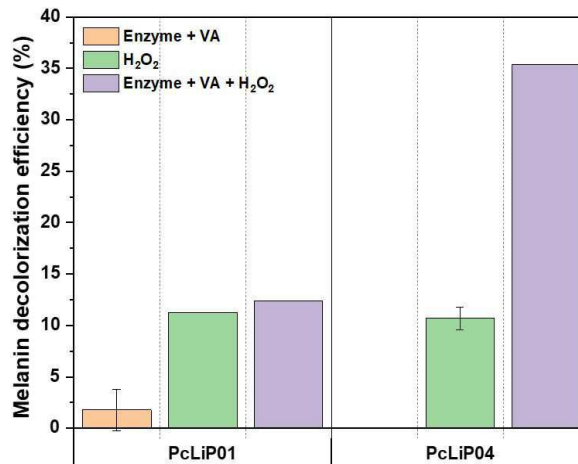
(54) 발명의 명칭 리그닌 과산화효소 동질효소를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 리그닌 과산화효소를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물 및 이를 이용한 피부 내 멜라닌의 탈색을 통한 미용 방법에 관한 것이다.

리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물은 피부 부작용이 매우 적으며, 멜라닌을 선택적으로 탈색할 뿐만 아니라 멜라닌 탈색 효율이 우수하여 적용된 개체의 피부 미백 효과를 달성할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 8/34 (2013.01)
A61K 8/44 (2013.01)
A61K 8/492 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
C12N 9/0065 (2013.01)
C12Y 111/01014 (2013.01)

백희연

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

한승현

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415178565
과제번호	20002810
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오산업기술개발
연구과제명	고안정성 멜라닌 분해탈색 효소 기반 저자극 미백 바이오 코스메틱 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2018.09.01 ~ 2022.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711132575
과제번호	2017M1A2A2087630
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	바이오 · 화학 융복합 기술을 이용한 리그닌의 선택적 해중합을 통한 분해 중간체 생

산 원천기술 개발

기 여 율	25/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2021.01.20 ~ 2022.01.19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711135278
과제번호	2020R1A5A1019631
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	미세플라스틱 대응 화공/바이오 융합 공정 연구센터
기 여 율	25/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.07.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물로서,
상기 리그닌 과산화효소는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 화장품 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 조성물의 pH는 4.5 내지 6.5인 것인, 화장품 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 과산화수소(H_2O_2)를 추가로 포함하는 것인, 화장품 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 과산화수소의 조성물 내 농도는 200 μM 내지 300 μM 인 것인, 화장품 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 베라트릴 알코올(Veratryl Alcohol), 페닐알라닌 (Phenyl alanine), 트립토판 (Tryptophan), 티로신 (Tyrosine) 및 이들의 유도체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 것인, 화장품 조성물.

청구항 6

개체의 피부에 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 적용하는 단계를 포함하는 피부 내 멜라닌의 탈색을 통한 미용 방법으로서,
상기 리그닌 과산화효소는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 미용 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 적용은 pH 4.5 내지 6.5의 조건에서 이루어지는 것인, 미용 방법.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 방법은 개체의 피부에 과산화수소(H_2O_2)를 적용하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 미용 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 80 μM 내지 300 μM 의 과산화수소 용액을 적용하는 것인, 미용 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 과산화수소 용액을 1회 내지 30회로 적용하는 것인, 미용 방법.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 과산화수소 용액을 1분 내지 90분의 간격으로 적용하는 것인, 미용 방법.

청구항 12

청구항 6에 있어서, 상기 방법은 상기 개체의 피부세포에서 유래하는 방향족 아미노산을 이용하여 피부 내 멜라닌의 탈색을 유도하는 것인, 미용 방법.

청구항 13

청구항 6에 있어서, 상기 방법은 개체의 피부에 베라트리알 알코올(Veratryl Alcohol), 페닐알라닌 (Phenyl alanine), 트립토판 (Tryptophan), 티로신 (Tyrosine) 및 이들의 유도체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 적용하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 미용 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리그닌 과산화효소를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물 및 이를 이용한 피부 내 멜라닌의 탈색을 통한 미용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 데 중요한 역할을 하는데, 이는 멜라닌이 자외선을 포함한 대부분의 파장의 빛을 여과하는 것이다. 이러한 이유로, 멜라닌의 대부분은 표피에 위치하고 피부의 색을 결정한다. 멜라닌에는 유멜라닌과 페오멜라닌 두 종류가 있으며, 유멜라닌은 검은색 또는 갈색을 나타내며, 페오멜라닌은 빨간색 또는 노란색을 나타낸다.

[0003] 한편, 피부에 존재하는 멜라닌은 멜라닌 합성 경로에서 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)는 도파 퀴논으로 전환되고, 티로시나아제에 의해 생성된다. 이에 따라, 현재까지 미백화장품에 다양한 종류의 티로시나아제 억제제가 세포에서 멜라닌 생성을 줄이기 위해 가장 활발히 연구되고 있다. 그러나 이러한 타이로시나제의 화학적 저해제는 백반증과 같은 많은 잠재적 부작용을 나타냈으며, 대표적으로 많은 사람들이 강력한 티로시나아제 억제제인 rhododenol로 인해 고통 받고 있다.

[0004] 이러한 이유로, 효소가 피부 표면에 존재하는 멜라닌을 선택적으로 탈색시키기 위해 화학 물질 대신 효소를 사용하여 멜라닌을 탈색시키는 연구가 진행되고 있다. 라카아제(laccase), dye-decolorizing peroxidase, 망간 과산화효소(manganese peroxidase) 및 리그닌 과산화효소(lignin peroxidase)와 같은 다른 과산화효소들은 이미 테스트를 거쳤으나, 망간 과산화효소는 효율적인 멜라닌 탈색을 위해 망간 중금속 이온 또는 합성 매개체를 필요로 하며, 이들은 인간의 피부에 독성을 나타낼 수 있다. 리그닌 과산화효소는 이러한 물질을 필요로 하지 않으며, 심지어 베라트리알 알코올을 산화시킬 수 있는 높은 산화 환원 전위를 나타내기 때문에 다른 효소보다 훨씬 효과적으로 멜라닌을 탈색시키는 유망한 촉매제이다. 그에 비하여 다른 효소는 멜라닌을 산화시키기에 덜 효과적인 산화 환원 전위를 나타낸다.

[0005] 그러나 멜라닌 탈색 효소로서 높은 잠재력을 지니고 있음에도 불구하고, 리그닌 과산화효소는 백색 부후균류(Phanerochaete chrysosporium)로부터 최대 17개의 다른 동종 효소를 생합성되기 때문에 발현 및 정제의 어려움으로 인해 정제되지 않은 미정제 효소로만 연구되고 사용되어 왔다. 또한, 리그닌 과산화효소는 과도한 양의 과산화수소(H_2O_2)에 의해 쉽게 불활성화 될 수 있는데, 이는 효소를 비활성화시켜 멜라닌 탈색 효율을 증가시키는 것을 억제하는 주요 장애물이었다.

[0006] 이에 따라, 정제된 리그닌 과산화효소를 이용하여 단시간 내에 선택적으로 피부 내 멜라닌을 탈색할 뿐만 아니라 멜라닌 탈색 효율을 증진시켜 미백화장품의 주요 소재 및 기술로 적용하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물로서, 상기 리그닌 과산화효소는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 화장품 조성물을 제공한다.

[0008] 다른 양상은 개체의 피부에 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 적용하는 단계를 포함하는 피부 내 멜라닌의 탈색을 통한 미용 방법으로서, 상기 리그닌 과산화효소는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 미용 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 일 양상은 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 명세서에서의 용어 "미백"은 피부의 과다 색소 침착을 억제, 저해 또는 완화시키는 것을 말한다. 피부의 과다 색소 침착은 주근깨, 기미, 자외선 노출 후 과다 색소 침착, 염증 후 과다 색소 침착, 노인흑색점, 갈색반점 또는 검버섯 등을 포함하는 것일 수 있다.
- [0011] 상기 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)는 베라트릴 알코올과 과산화수소(H_2O_2)가 반응하여 물(H_2O)과 베라트릴 알코올 양이온 라디칼을 생성하는 반응을 촉매하는 효소로서, 상기 생성된 베라트릴 알코올 양이온은 멜라닌과 반응하여 베라트릴 알코올 형성과 동시에 멜라닌을 탈색시켜 피부 미백 효과를 달성할 수 있다.
- [0012] 따라서, 상기 리그닌 과산화효소를 포함하는 상기 피부 미백용 화장품 조성물은 멜라닌을 선택적으로 탈색할 뿐만 아니라 멜라닌 탈색 효율이 매우 우수하여 피부 미백 효과가 우수하며, 피부 부작용이 매우 적다.
- [0013] 상기 리그닌 과산화효소는 리그닌 과산화효소 동질효소를 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 본 명세서에서 PclP01 내지 PclP10으로 명명된 10종의 리그닌 과산화효소 동질효소 중 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다. 상기 PclP01 내지 PclP10은 각각 서열번호 1 내지 10의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 서열번호 11 내지 20의 염기서열로 암호화된 것일 수 있다.
- [0014] 상기 리그닌 과산화효소는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.
- [0015] 상기 리그닌 과산화효소는 천연으로부터 유래될 수도 있고, 당해 분야에서 널리 공지된 다양한 단백질 합성 방법으로 획득할 수 있다. 일례로서, 폴리뉴클레오티드 재조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하거나 단백질 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법 및 무세포 단백질 합성법 등으로 제조될 수 있다. 또한, 일례로서, 상기 리그닌 과산화효소는 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다.
- [0016] 본 명세서에서의 용어 "단백질(Protein)"은 아마이드 결합 (또는 펩티드 결합)으로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리머를 의미한다.
- [0017] 상기 리그닌 과산화효소는 서열번호 4의 아미노산 서열과 각각 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 단백질을 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 리그닌 과산화효소는 백색부후균(*Phanerochaete chrysosporium*) 유래 리그닌 과산화효소일 수 있다.
- [0018] 본 명세서에서의 용어 "상동성(Homology)"은 야생형 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 이러한 상동성의 비교는 당업계에서 널리 알려진 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있으며, 2개 이상의 서열 간 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다.
- [0019] 또한, 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 상기 리그닌 과산화효소의 N- 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 상기 리그닌 과산화효소의 개질, 특히 리그닌 과산화효소의 안정성 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다.
- [0020] 본 명세서에서의 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단효소의 공격으로부터 상기 리그닌 과산화효소를 보호하는 인 비보(in vivo) 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미하는 것일 수 있다.
- [0021] 아울러, 상기 리그닌 과산화효소는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기를 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열도 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 리그닌 과산화효소의 조성물 내 농도는 0.04 U/ml 내지 0.08 U/ml, 0.05 U/ml 내지 0.08 U/ml, 0.04 U/ml 내지 0.07 U/ml, 0.05 U/ml 내지 0.07 U/ml일 수 있다.
- [0023] 상기 조성물의 pH는 4.5 내지 6.5의 범위일 수 있으며, 구체적으로, 4.5 내지 6.5, 4.5 내지 6.3, 4.5 내지 6.1, 4.5 내지 5.9, 4.5 내지 5.7, 4.7 내지 6.5, 4.7 내지 6.3, 4.7 내지 6.1, 4.7 내지 5.9, 4.7 내지 5.7, 4.9 내지 6.5, 4.9 내지 6.3, 4.9 내지 6.1, 4.9 내지 5.9, 4.9 내지 5.7, 5.1 내지 6.5, 5.1 내지 6.3, 5.1

내지 6.1, 5.1 내지 5.9, 5.1 내지 5.7, 5.3 내지 6.5, 5.3 내지 6.3, 5.3 내지 6.1, 5.3 내지 5.9, 또는 5.3 내지 5.7일 수 있다.

- [0024] 상기 조성물은 과산화수소(H_2O_2)를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 상기 과산화수소의 조성물 내 농도는 200 μM 내지 300 μM , 200 μM 내지 275 μM , 225 μM 내지 300 μM , 225 μM 내지 275 μM , 240 μM 내지 300 μM , 240 μM 내지 275 μM , 240 μM 내지 260 μM , 200 μM 내지 260 μM , 또는 225 μM 내지 260 μM 일 수 있다.
- [0026] 상기 조성물은 조성물이 적용되는 개체의 피부세포에서 유래하는 방향족 아미노산을 이용하여 피부 내 멜라닌의 탈색을 유도하는 것일 수 있다.
- [0027] 일 실시예에 따르면, 상기 리그닌 과산화효소는 베라트릴 알코올과 구조적으로 유사한 방향족 아미노산을 산화-환원 매개체로 사용할 수 있음을 확인하였는 바, 베라트릴 알코올의 첨가 없이 피부세포에서 유래하는 방향족 아미노산을 이용하여서도 멜라닌 탈색 반응을 유도할 수 있다.
- [0028] 상기 조성물은 베라트릴 알코올(Veratryl Alcohol) 또는 방향족 아미노산 (aromatic amino acid)을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로, 베라트릴 알코올, 페닐알라닌 (Phenyl alanine), 트립토판 (Tryptophan), 티로신 (Tyrosine) 및 이들의 유도체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 상기 베라트릴 알코올 또는 방향족 아미노산의 조성물 내 농도는 1 mM 내지 3 mM, 1 mM 내지 2.5 mM, 1.5 mM 내지 3 mM, 1.5 mM 내지 2.5 mM, 1.75 mM 내지 3 mM, 1.75 mM 내지 2.5 mM, 1.75 mM 내지 2.25 mM, 1.5 mM 내지 2.25 mM, 또는 1 mM 내지 2.25 mM일 수 있다.
- [0030] 상기 화장품 조성물의 제형은 통상적인化粧료의 제형이라면 제한되지 않지만, 예컨대 유연화장수, 수렴화장수 또는 영양화장수 등의 스킨, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이 크림, 아이 에센스, 클렌징크림, 클렌징 폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일 또는 바디에센스일 수 있다.
- [0031] 상기 화장품 조성물은化粧료의 제형 또는 사용 목적에 맞게 임의로 선정한 물질을 첨가할 수 있으며, 예를 들어 보존제, 안정화제, 계면활성제, 용해제, 보습제, 에몰리언트제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한제 등을 더 포함할 수 있다. 상기 추가 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하다.
- [0032] 상기 화장품 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우, 담체 성분으로서 예를 들어 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등을 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 화장품 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우, 담체 성분으로서 예를 들어 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더를 포함할 수 있고, 특히, 스프레이인 경우, 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 화장품 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우, 담체 성분으로서 예를 들어 용매, 용해화제 또는 유탁화제를 포함할 수 있고, 예를 들어, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르를 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 화장품 조성물의 제형이 현탁액인 경우, 담체 성분으로서 예를 들어 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록사이드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등을 포함할 수 있다.
- [0036] 상기 화장품 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우, 담체 성분으로서 예를 들어 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸 타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등을 포함할 수 있다.
- [0037] 다른 양상은 개체의 피부에 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용化粧료 조성물을 적용하는 단계를 포함하는 피부 내 멜라닌의 탈색을 통한 미용 방법을 제공하는 것이다. 상기에서 설명한 내용과

동일한 부분은 상기 방법에도 공히 적용된다.

- [0038] 상기 방법은 리그닌 과산화효소를 이용하여 피부 내 멜라닌의 탈색을 유도하는 과정을 통해 피부를 미백하는 방법일 수 있다.
- [0039] 상기 "개체"란 멜라닌을 보유할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축, 세포 등의 모든 생물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있고, 인 비보(in vivo) 뿐만 아니라 인 비트로(in vitro)의 상태도 포함한다.
- [0040] 본 명세서에서의 용어 "적용"은 손가락, 브러쉬, 솜뭉치, 패드, 스프레이, 스폰지, 면봉, 롤-온(roll-on) 등에 의한 적용과 같이, 개체의 피부에 투여 또는 도포하는 방법을 포함한다. 해당 분야의 통상의 기술자는 적용하는 적절한 방법을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0041] 상기 리그닌 과산화효소는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.
- [0042] 상기 적용은 4.5 내지 6.5의 범위의 pH 조건에서 이루어지는 것일 수 있으며, 구체적으로, 상기 pH 조건은 4.5 내지 6.5, 4.5 내지 6.3, 4.5 내지 6.1, 4.5 내지 5.9, 4.5 내지 5.7, 4.7 내지 6.5, 4.7 내지 6.3, 4.7 내지 6.1, 4.7 내지 5.9, 4.7 내지 5.7, 4.9 내지 6.5, 4.9 내지 6.3, 4.9 내지 6.1, 4.9 내지 5.9, 4.9 내지 5.7, 5.1 내지 6.5, 5.1 내지 6.3, 5.1 내지 6.1, 5.1 내지 5.9, 5.1 내지 5.7, 5.3 내지 6.5, 5.3 내지 6.3, 5.3 내지 6.1, 5.3 내지 5.9, 또는 5.3 내지 5.7일 수 있다.
- [0043] 상기 방법은 개체의 피부에 과산화수소(H_2O_2)를 적용하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0044] 상기 과산화수소의 적용은 80 μM 내지 300 μM 의 과산화수소 용액을 적용하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 과산화수소의 용액의 농도는 80 μM 내지 300 μM , 100 μM 내지 300 μM , 80 μM 내지 250 μM , 100 μM 내지 250 μM , 80 μM 내지 200 μM , 100 μM 내지 200 μM , 150 μM 내지 200 μM , 150 μM 내지 300 μM , 150 μM 내지 250 μM 일 수 있다.
- [0045] 상기 과산화수소 용액은 용질로서 과산화수소를 포함하고 있는 용액을 의미하며, 상기 용액의 용매에는 제한되지 않으나, 예를 들어, 물일 수 있고, 구체적으로 증류수일 수 있고, 보다 구체적으로 3차 증류수일 수 있다.
- [0046] 상기 방법에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 과산화수소 용액을 1분 내지 90분의 간격으로 적용하는 것일 수 있고, 구체적으로 1분 내지 90분, 5분 내지 90분, 1분 내지 60분, 5분 내지 60분, 1분 내지 30분, 5분 내지 30분, 10분 내지 30분, 10분 내지 90분, 10분 내지 60분의 간격으로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0047] 상기 방법에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 상기 과산화수소의 적용은 과산화수소 용액을 1회 내지 30회로 적용하는 것일 수 있고, 구체적으로 1회 내지 30회, 1회 내지 25회, 5회 내지 30회, 5회 내지 25회, 1회 내지 20회, 5회 내지 20회, 10회 내지 20회, 10회 내지 30회, 10회 내지 25회로 적용되는 것일 수 있다.
- [0048] 상기 방법은 상기 개체의 피부에 베라트릴 알코올을 적용하지 않는 것일 수 있다. 구체적으로, 베라트릴 알코올의 추가 적용 없이 상기 적용되는 개체의 피부세포에서 유래하는 방향족 아미노산을 이용하여 피부 내 멜라닌의 탈색을 유도하는 것일 수 있다.
- [0049] 상기 방법은 적용되는 개체의 피부세포에서 유래하는 방향족 아미노산을 이용하여 피부 내 멜라닌의 탈색을 유도하는 것일 수 있으며, 구체적으로, 상기 리그닌 과산화효소는 피부 내 피부세포에서 유래된 방향족 아미노산과 반응하여 아미노산 양이온 라디칼을 생성시키는 반응을 촉매하며, 상기 아미노산 양이온 라디칼은 피부 내 멜라닌과 작용하여 멜라닌을 탈색시킴으로서 피부 미백 효과를 달성할 수 있다.
- [0050] 상기 방법은 개체의 피부에 베라트릴 알코올(Veratryl Alcohol), 페닐알라닌 (Phenyl alanine), 트립토판 (Tryptophan), 티로신 (Tyrosine) 및 이들의 유도체로 구성된 군에서 선택된 하나 이상을 적용하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0051] 일 양상에 따르면 따르면, 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물은 피부 부작용이 매우 적으며, 멜라닌을 선택적으로 탈색할 뿐만 아니라 멜라닌 탈색 효율이 우수하여 적용된 개체의 피부 미백 효과를 달성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0052]

도 1은 PcLiP 동질효소의 아미노산 서열 정렬 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 PcLiP 동질효소가 클로닝된 플라스미드 벡터 맵을 나타낸 도면이다.

도 3은 정제된 PcLiP 동질효소(PcLiP01-10)의 순도를 나타낸 도면이다. RZ 값(A_{409}/A_{280} 흡광도 비율)은 효소의 순도를 나타내는 PcLiP 동질효소의 헵 함량의 중요한 척도이다.

도 4의 A는 리그닌 과산화효소에 의한 멜라닌 탈색의 기전 설명에 관한 것으로서, 산화 환원 매개체인 VA 양이온 라디칼을 이용하여 리그닌 과산화효소가 촉매 작용을 하는 멜라닌 탈색 기전을 나타낸 도면이고, B는 10종의 PcLiP 동질효소(PcLiP01-10)의 반응속도론적 상수 (k_{cat} , K_m)를 추정하기 위한 Hanes-Woolf 플롯을 나타낸 도면이다.

도 5는 10종의 PcLiP 동질효소(PcLiP01-10)의 비활성화 상수 (k_d)를 추정하기 위한 그래프를 나타낸 도면이다.

도 6은 DSF (Differential Scanning Fluorimetry)를 사용하여 PcLiP 동질효소(PcLiP01-10)에 대한 형광 용융곡선을 나타낸 도면으로서, A는 Boltzmann Tm에 의한 플롯을 나타내고, B는 Derivative Tm에 의한 플롯을 나타낸다.

도 7은 10종의 PcLiP 동질효소(PcLiP01-10)의 용융 온도 (T_m) 측정 결과를 나타낸 도면이다.

도 8은 PcLiP01 및 PcLiP04에 의해 촉매된 멜라닌 탈색 효율을 나타낸 도면이다.

도 9는 PcLiP01 및 PcLiP04에 의해 촉매된 멜라닌 탈색에 대한 시간 프로파일을 나타낸 도면이다. 멜라닌 탈색율은 매시간 측정되었고, 두 번 반복하여 수행되었다.

도 10은 백색부후균(*Phanerochaete chrysosporium*)의 유전자에 의해 암호화된 PcLiP 동질효소의 계통수를 나타낸 도면이다.

도 11은 베라트릴 알코올 대신 다른 산화-환원 반응 매개체 (트립토판, 페닐알라닌)를 사용하여 멜라닌 탈색 효율을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0053]

이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054]

실시예 1: 재조합 리그닌 과산화효소의 생산 및 분리 정제

[0055]

10종의 백색부후균(*Phanerochaete chrysosporium*) 유래 리그닌 과산화효소 동질효소 (Lignin Peroxidase isozyme, LiP)는 각각 PcLiP01 내지 PcLiP10으로 명명하였으며, 이를 암호화하는 합성 유전자는 Bioneer 회사(한국)를 통해 준비하였다. 상기 PcLiP01 내지 PcLiP10의 아미노산 서열 및 이를 암호화하는 유전자의 염기 서열은 하기 표 1에 기재된 서열번호로 표시하였다. 또한, 상기 PcLiP01 내지 PcLiP10의 아미노산 서열을 상호비교하기 위해, Clustal Omega를 사용하여 정렬되었고 ESPript 3.0에서 시퀀스 유사성을 렌더링했다 (도 1). 붉은 색으로 표기된 부분은 서열이 동일한 부분을 나타낸다.

표 1

[0056]

리그닌 과산화효소 동질효소	아미노산 서열	유전자 서열
PcLiP01(LiPH8)	서열번호 1	서열번호 11
PcLiP02	서열번호 2	서열번호 12
PcLiP03	서열번호 3	서열번호 13
PcLiP04	서열번호 4	서열번호 14
PcLiP05	서열번호 5	서열번호 15
PcLiP06	서열번호 6	서열번호 16
PcLiP07	서열번호 7	서열번호 17
PcLiP08	서열번호 8	서열번호 18

PcLiP09	서열번호 9	서열번호 19
PcLiP10	서열번호 10	서열번호 20

[0057] 합성된 PcLiP 동질효소의 유전자 서열은 암피실린 내성 pET-21b(+) 벡터에 Nde I 제한 부위와 EcoR I 부위를 통해 클로닝 되었으며, 대장균 BL21 (DE3) 숙주 시스템으로 형질 전환되었다. 상기 벡터는 IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) 유도성을 띄는 T7 프로모터가 포함되어 있다 (도 2).

[0058] 상기 형질전환된 각 세포는 암피실린과 함께 37 °C, 200rpm에서 종자 배양의 경우 6시간, 본 배양의 경우 1시간 동안 OD₆₀₀이 0.6이 되도록 배양하였다. 배양 부피는 각각 총 2.4L 또는 4.8L이었다. 25 °C에서 1mM IPTG로 밤새 유도된 배양 세포를 균질화기 (PandaPLUS 2000)를 이용하여 원심 분리하여 세포를 얻고, 그런 다음 세포를 15 분 동안 초음파 처리하여 봉입체와 세포 파편을 분해하고, 원심 분리 (11000rpm, 4 °C, 15 분)하여 정제된 봉입체를 얻었다. 상기 봉입체를 8M 요산에 용해시켰다. PcLiP 동질효소의 리폴딩은 1.8mM CaCl₂, 0.71mM L- 글루타티온 산화, 360M 구아니딘 하이드로클로라이드 및 25 μ M 헤민을 함유하는 0.1M 트리스-완충액 (pH 8.5)에서 수행되었다. 효소 용액을 4 °C에서 밤새 보관한 후 농축기 (VIVAFLOW 200)로 농축했다. 리폴딩된 PcLiP 동질효소는 100mM 아세트산 나트륨 완충액에 5mM CaCl₂를 첨가하여 pH 6, pH 4 그리고 pH 6의 순서로 투석 튜브 (SnakeSkin 제 Dialysis Tubing, 10K MWCO)를 사용하여 투석한 다음 10mM 아세트산 나트륨 완충액 (pH 6)에 보관하였다. 마지막으로 AKTA FPLC 크로마토 그래피 시스템 (GE Healthcare Life Sciences, USA)을 통해 HiTrap Q HP 컬럼을 사용하여 단백질을 정제했다. 또한, FPLC에서 얻은 각 분획의 농도와 RZ(Reinheitszahl) 값을 확인하여 높은 RZ 값 (> 2.5)을 나타내는 분획을 수집했다. 수집된 용액을 5mM CaCl₂가 포함된 10mM 아세트산 나트륨 완충액 (pH 6)에 투석 튜브를 사용하여 다시 보관했다. 상기의 과정으로 정제된 리그닌 과산화효소 동질효소에 대한 순도를 측정된 결과, PcLiP05, PcLi08 및 PcLi10의 경우 RZ가 높은 수준으로 발현/정제되지 않는 것을 확인하였는 바 (도 3), 이하에서는 상기 3종의 동질효소를 제외하고 실험을 수행하였다.

[0060] 실시예 2: 베라트리알 알코올에 대한 PcLiP 동질효소의 반응속도론적 상수 결정

[0061] 리그닌 과산화효소는 베라트리알 알코올(Veratryl Alcohol: VA)를 VA 양이온 라디칼(VA^{•+})로 산화시키고, 이는 멜라닌을 탈색시키는 산화 환원 매개체로서 작용한다(도 4A). VA는 백색부후균류에서 생산된 천연 화합물로서, 합성 매개체보다 잠재적인 부작용이 적다. 따라서, 제한 기질로서 사용된 VA에 대한 PcLiP01 내지 PcLiP10 동질효소의 반응속도론적 상수를 확인하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0062] 구체적으로, 효소 동역학 매개 변수는 0.2 μ M PcLiP 동질효소, 2mM VA 및 250 μ M H₂O₂를 포함하는 0.1M Britton-Robinson 완충액 (BR 완충액, pH 5.5)을 사용하여 결정되었으며, 이는 베라트리알 알데히드의 흡광계수 (ϵ 310nm = 9.3mM)를 사용하여 310nm에서 1분동안 측정하여 분석되었고, 1U의 효소활성은 1분에 1 μ l의 VA를 산화하는 활성으로 정의하였다.

[0063] 상기 실험 결과, PcLiP04는 가장 높은 k_{cat} 값 (3.24 s⁻¹)을 나타내 대사회전수가 가장 우수하였으며, PcLiP01(Lignin Peroxidase isozyme H8, LiPH8)보다 약 1.4배 우수함을 확인하였다. 또한, 상기 10종의 PcLiP 동질효소의 K_m 값은 300 ~ 500 μ M 범위인 것을 확인하였는 바, 멜라닌 탈색에 사용되는 베라트리알 알코올 농도 (2000 μ M)에 비해 현저히 낮아 적정량의 매개체가 사용됐다고 볼 수 있다 (도 4B 및 표 2).

표 2

리그닌 과산화효소 동질효소	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} /K _m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
PcLiP01	2.31±0.08	0.337±0.07	6.87±1.57
PcLiP02	2.53±0.07	0.429±0.05	6.78±0.88
PcLiP03	1.48±0.04	0.379±0.06	3.91±0.73
PcLiP04	3.24±0.11	0.438±0.07	7.41±1.46
PcLiP05	Nd [*]	Nd [*]	Nd [*]
PcLiP06	0.98±0.07	0.450±0.14	2.17±0.84

PcLiP07	2.19 ± 0.03	0.323 ± 0.03	6.80 ± 0.62
PcLiP08	Nd*	Nd*	Nd*
PcLiP09	1.24 ± 0.03	0.365 ± 0.05	3.40 ± 0.50
PcLiP10	Nd*	Nd*	Nd*

* Nd: pH 5.5 및 37 °C에서 매우 낮은 활성으로 인해 효소의 반응속도론적 상수 및 비활성화 상수를 추정할 수 없음.

실시예 3: PcLiP 동질효소의 동력학적 열안정성 상수 및 반감 수명기 결정

PcLiP01 내지 PcLiP10 동질효소의 동력학적 열 안정성을 평가하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

구체적으로, 0.1M BR 완충액 (pH 5.5, 37 °C)을 PcLiP 동질효소 보관에 사용하고, 일정 시간 후 각 PcLiP 동질효소의 잔류 활성을 0.1M BR 완충액 (pH 3.0, 25 °C), 2mM 베라트릴 알코올 및 250 μM 과산화수소를 사용하여 측정했다.

그 결과, pH 5.5 및 37 °C 조건하에서 PcLiP04는 가장 낮은 k_d 값을 가지는 것을 확인하였으며, PcLiP01의 1/4 정도의 k_d 값을 나타냈다. 비활성화 상수는 효소의 반감기 시간 ($t_{1/2}$)에 반비례하기 때문에 PcLiP04의 반감기는 10종의 PcLiP 동질효소 중 가장 높은 안정성을 가지며 PcLiP01 보다 4배 우수한 것을 알 수 있다 (도 5 및 표 3).

표 3

리그닌 과산화효소 동질효소	k_d (d^{-1})	반감기 ($t_{1/2}$) (d)
PcLiP01	0.008 ± 0.001	86.6
PcLiP02	0.015 ± 0.003	46.2
PcLiP03	0.032 ± 0.001	21.7
PcLiP04	0.002 ± 0.000	346.6
PcLiP05	Nd*	Nd*
PcLiP06	0.008 ± 0.002	86.6
PcLiP07	0.009 ± 0.001	77.0
PcLiP08	Nd*	Nd*
PcLiP09	0.008 ± 0.002	86.6
PcLiP10	Nd*	Nd*

* Nd: pH 5.5 및 37 °C에서 활성을 나타내지 않아 측정 불가

실시예 4: PcLiP 동질효소의 동력학적 열역학적 안정성 평가

PcLiP01 내지 PcLiP10 동질효소의 열역학적 안정성을 평가하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

구체적으로, PcLiP 동질효소를 SYPRO™ Orange 염료를 사용하여 표준 96 웰 플레이트 rT-PCR 시스템 (QuantStudio™5)에서 제조하고 분석했다. 266nm에서 샘플을 흥분시켰고, 형광 스펙트럼은 0.05 °C/s의 온도 상승속도를 가지고 25 ~ 99 °C에서 수집되었다. 얻어진 고유 형광 스펙트럼을 추가로 처리하여 형광 강도 대 온도의 그래프를 생성했다. 각 PcLiP 동질효소에 대한 T_m 값은 Protein Thermal Shift™ 소프트웨어 v1.4 (Applied Biosystems)를 사용하여 이러한 그래프의 최대 1차 도함수에서 결정되었다. 또한, 10종의 PcLiP 동질효소에 대한 용해온도는 DSF (Differential Scanning Fluorimetry)를 사용하여 pH 5.5에서 측정되었으며, (d(fluorescence)/dT vs temperature)을 기반으로 추정하였다.

[0077] 상기 실험 결과, PcLiP04는 가장 높은 T_m 값 (59.4 °C)을 나타냈으며, PcLiP01 (52.4 °C)보다 7 °C 높은 것을 확인하였다 (도 6 및 도 7). 이를 토대로 PcLiP04의 매우 긴 반감기와 더불어 높은 온도에서도 활성을 잃지 않음을 알 수 있으며, 이는 실제 제품에 적용할 경우 보관 및 실제적용 시 우수한 성능을 유지할 수 있다는 장점이 있다.

[0079] 실시예 5: 반응활성과 열안정성을 고려한 최적의 PcLiP 동질효소 결정

[0080] 상기 실시예 2 내지 4에서 확인한 PcLiP01 내지 PcLiP10 동질효소의 반응 활성 및 열 안정성으로 고려하여 최적의 동질효소를 결정하였다.

[0081] 구체적으로, 동일한 동질효소 농도에서 k_{cat}/k_d 값을 확인한 결과, PcLiP04가 다른 동질효소에 비해 현저히 높은 값을 나타냈으며, PcLiP01에 비해 7.1배 높은 것을 확인하였다 (표 4).

표 4

리그닌 과산화효소 동 질효소	k_{cat} (s^{-1})	K_d (d^{-1})	$k_{cat}/k_d(-) \times 10^{-6}$	Ratio
PcLiP01	2.31 ± 0.08	0.008 ± 0.001	24.7 ± 3.87	1.0
PcLiP02	2.53 ± 0.07	0.015 ± 0.003	16.3 ± 3.33	0.7
PcLiP03	1.48 ± 0.04	0.032 ± 0.001	4.00 ± 0.20	0.2
PcLiP04	3.24 ± 0.11	0.002 ± 0.000	175 ± 27.9	7.1
PcLiP05	Nd*	Nd*	Nd*	Nd*
PcLiP06	0.98 ± 0.07	0.008 ± 0.002	11.0 ± 21.8	0.4
PcLiP07	2.19 ± 0.03	0.009 ± 0.001	21.8 ± 2.54	0.9
PcLiP08	Nd*	Nd*	Nd*	Nd*
PcLiP09	1.24 ± 0.03	0.008 ± 0.002	13.3 ± 3.73	0.5
PcLiP10	Nd*	Nd*	Nd*	Nd*

[0083] * Nd: pH 5.5 및 37 °C에서 매우 낮은 활성으로 인해 효소의 반응속도론적 상수 및 비활성화 상수를 추정할 수 없음.

[0085] 따라서, PcLiP04는 인체 피부 조직과 유사한 조건 (pH 5.5, 37 °C)에서 효소의 반응 시간이 충분히 길다고 가정할 경우, PcLiP01보다 7.1배 더 높은 멜라닌 탈색율을 나타낼 것으로 예상되며, 이러한 결과를 토대로 백색부후균의 계능에 의해 암호화된 10 가지 다른 재조합 리그닌 과산화효소 중 PcLiP04는 멜라닌의 탈색을 위한 최고의 기능성 리그닌 과산화효소임을 알 수 있다.

[0087] 실시예 6: PcLiP04 동질효소에 의해 촉매된 멜라닌의 체외 탈색 평가

[0088] 상기 실시예 2 내지 5에서 우수한 효능을 확인한 PcLiP04 동질효소의 멜라닌 탈색 효능을 평가하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다. 한편, 미백 화장품에 효소를 적용할 때 k_{cat} 값은 피부에 사용되는 효소에 의해 촉진되는 탈색율에 비례한다고 볼 수 있으며, k_d 값은 화장품의 보관 시간에 반비례한다고 볼 수 있다. 그러나, 표 3에서 볼 수 있듯이 PcLiP01 및 PcLiP04의 k_d 값은 현저히 낮아 37 °C에서 두 효소의 반감기가 너무 길어, 어떤 효소가 열에 의한 영향을 더 잘 받아 비활성화되었는지 확인하기 어려웠다. 따라서, 효소 비활성화를 가속화하기 위해 온도를 높여 실험을 진행하였다.

[0089] 구체적으로, BR 완충액(pH 5.5)로 55 °C에서 1 시간 배양한 후, 37 °C에서 5 시간 동안 100rpm으로 교반하면서 BR 완충액 (pH 5.5)에 0.2 μ M PcLiP 동질효소, 2mM 베라트릴 알코올, 총 700 μ M 과산화수소 및 40mg/L 합성 멜라닌을 사용하여 멜라닌 탈색 반응을 수행하였으며, 반응 혼합물에 매시간 140 μ M 과산화수소를 첨가하여 반응을 시작하였다. 멜라닌의 탈색율은 분광 광도계로 매시간 540nm에서 하기의 식을 이용하여 얻었습니다. 대조군 실험은 과산화수소를 첨가하지 않고 멜라닌 탈색 반응과 동일한 조건에서 수행하였으며, 모든 실험은 평균±표

준편차로 표시되고 중복으로 수행하였다.

$$\text{멜라닌 탈색률 (\%)} = \frac{A_{540 \text{ 반응 전}} - A_{540 \text{ 반응 후}}}{A_{540 \text{ 반응 전}}} \times 100$$

[0090]

[0092]

상기 실험 결과, PcLiP04가 PcLiP01에 비해 훨씬 높은 탈색율을 보이는 것으로 나타났으며 (도 8), 구체적으로 PcLiP04는 5 시간 반응 후 약 35.4 %의 탈색율을 보였고, PcLiP01은 약 11.2 %의 탈색율을 보였습니다. 그러나, 과산화수소만 첨가된 대조군에서 과산화수소에 의한 탈색율이 약 10 % 수준으로 나타났는 바, 과산화수소에 의한 효율을 빼고 비교한다면 PcLiP01이 약 1 % 정도만의 탈색율을 보일 때, PcLiP04는 약 25.4 %의 멜라닌을 탈색했음을 알 수 있다. 따라서, 상기 결과를 토대로 55 °C에서 1 시간 동안의 효소 보관과정 동안 PcLiP01는 대부분의 활성을 잃었음을 알 수 있다.

[0093]

또한, 시간에 따른 멜라닌 탈색율을 확인한 결과, 탈색율이 일정하게 유지되다가 PcLiP01의 경우 1시간 후, PcLiP04의 경우 3시간 후에 탈색 속도가 감소하는 경향을 나타냈는바 (도 9), 55 °C에서 1 시간 동안 보관하는 중에 발생한 효소의 비활성화가 멜라닌 탈색 반응이 시작된 이후까지 영향을 미치는 것으로 파악된다. 또한, 상기 결과는 상기 도 6 및 도 7에서 확인한 PcLiP01의 용융 온도 (52.4 °C) 및 PcLiP04의 용융 온도 (59.4 °C)와의 동일한 경향성을 나타낸다.

[0095]

실시예 7: PcLiP04 동질효소의 계통수 분석

[0096]

MEGA X 프로그램을 이용하여 PcLiP01 내지 PcLiP10 동질효소의 계통수 분석을 수행한 결과, PcLiP04와 PcLiP01의 상대적 진화 거리는 0.41인 것을 확인하였으며, 이는 P01과 다른 PcLiP 동질효소 간의 진화 거리보다 가장 큰 값이다 (도 10). 따라서, PcLiP04는 PcLiP01과 평균적으로 100개의 아미노산 서열 중 41개의 아미노산 서열이 다른 것으로 확인된다.

[0098]

실시예 8: 베라트릴 알코올 대체 물질 발굴

[0099]

상기 PcLiP 동질효소가 베라트릴 알코올의 첨가없이 멜라닌 탈색을 유도할 수 있는 지 확인하기 위해, 베라트릴 알코올과의 구조적 유사성을 고려하여 후보군을 발굴하고자 하였고, 아미노산 중 비슷한 방향족 고리 구조를 갖는 트립토판(Trp)과 페닐알라닌(Phe)을 후보로 선정하였다.

[0100]

트립토판과 페닐알라닌을 베라트릴 알코올의 대체제로 하여 산화-환원 반응의 매개체로 사용하여 실험한 결과, 멜라닌의 탈색을 유도할 수 있음을 확인하였다 (도 11). 상기 결과를 토대로, 피부에 있는 아미노산 또는 그 유도체가 인간 피부 조직에서 산화-환원 반응의 매개체로 작용할 수 있음을 뒷받침할 수 있다. 따라서, 인체 피부에 적용하여 멜라닌을 탈색하려고 할 경우 별도의 산화-환원 매개체 없이 인체피부세포에서 유래하는 방향족계 아미노산을 이용하여 상당한 수준으로 멜라닌 탈색이 가능함을 알 수 있다.

[0102]

전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1

PeLiP01 MAAVLEKRAATCSNGKTVGDASCCAWFVDFVLDIQNLFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT
 PeLiP08 MAVVVEKRAATCANGVTVGDASCCAWFVDFVLDIQNLFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT
 PeLiP02 MAVVVEKRAATCANGVTVGDASCCAWFVDFVLDIQNLFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT
 PeLiP05 MAVVVEKRAATCANGKTVGDASCCAWFVDFVLDIQANMFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT
 PeLiP07 MAVVVEKRAATCSNGATVGDASCCAWFVDFVLDIQNLFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT
 PeLiP09 MAVVVEKRAATCSNGATVGDSECCAWFVDFVLDIQNLFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT
 PeLiP06 MAVVVEKRAATCSNGATVGDASCCAWFVDFVLDIQNLFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT
 PeLiP03 .MAAVLEKRAATCSNGKVVPAASCCWFNVDFVLDIQNLFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT
 PeLiP10 .MAALEKRAATCSNGKTVSSAACCCWFVDFVLDIQNLFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT
 PeLiP04 ...MVACPDGVHTASNAACCCWFFVDFVLDIQNLFFHGGCCGGAEAHESIRLVFHDSTAT

PeLiP01 SPAMEAQGKFGGGGADGSIIFDDIETAHHPNIGLDEIVKLQKPFVQKHGVTPGDFIAFA
 PeLiP08 SPAMEAQGKFGGGGADGSIIFDDIETAHHPNIGLDEIVKLQKPFVQKHGVTPGDFIAFA
 PeLiP02 SPAMEAQGKFGGGGADGSIIFDDIETAHHPNIGLDEIVKLQKPFVQKHGVTPGDFIAFA
 PeLiP05 SPAMEAQGKFGGGGADGSIIFDDIETAHHPNIGLDEIVVAMQKPFVQKHGVTPGDFIAFA
 PeLiP07 SPAMEAQGKFGGGGADGSIIFDTIETAHHPNIGLDEIVNLQKPFIAKHGVTPGDFIAFA
 PeLiP09 SPAMEAQGKFGGGGADGSIIFDTIETAHHPNIGLDEIVNLQKPFIAKHGVTPGDFIAFA
 PeLiP06 SPALASGKFGGGGADGSIIFDDIETAHHPNIGLDEIVNLQKPFIAKHGVTPGDFIAFA
 PeLiP03 SPAMEAQGKFGGGGADGSIIFDDIETAHHPNIGLDEIVRLQKPFVQKHGVTPGDFIAFA
 PeLiP10 SPALASGKFGGGGADGSIIMVDFDIETAHHPNIGLDEIVRLQKPFVQKHGVTPGDFIAFA
 PeLiP04 SPKLGQSCKFGGGGADGSIIFESSIETAHHPNIGLDEIVVAMQKPFIAKHGVTPGDFIAFA

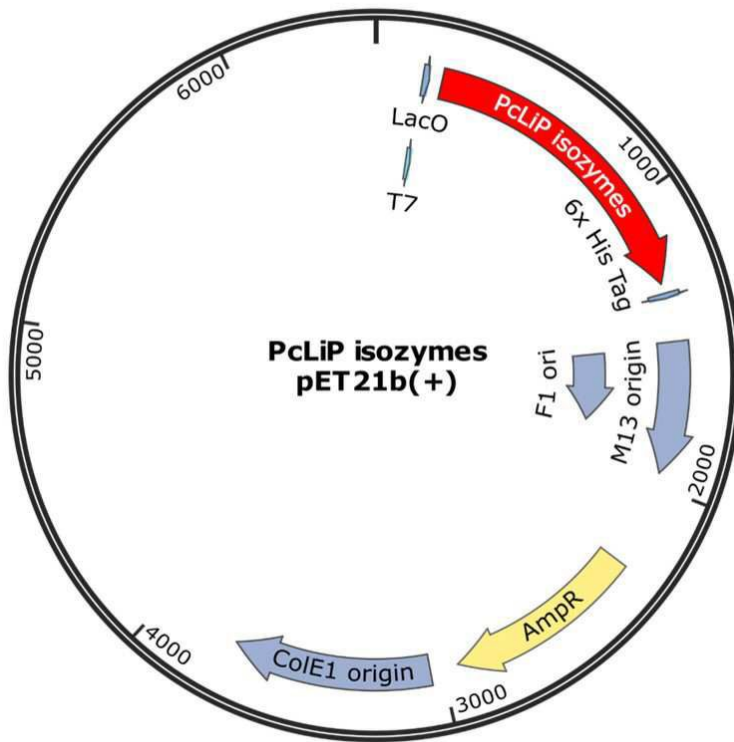
PeLiP01 GAVALISNCPGAPQMNFFICRAPATQAPADGLVPEFFHVTVDQIIRVRNDAGEFDELELVWMM
 PeLiP08 GAVALISNCPGAPQMNFFICRAPATQAPADGLVPEFFHVTVDQIIRVRNDAGEFDELELVWMM
 PeLiP02 GAVALISNCPGAPQMNFFICRAPATQAPADGLVPEFFHVTVDQIIRVRNDAGEFDELELVWMM
 PeLiP05 GAVALISNCPGAPQMNFFICRAKPAQAPADGLVPEFFHVTVDQIIRVRNDAGEFDELELVWMM
 PeLiP07 GAVALISNCPGAPQMNFFICRAPATQAPADGLVPEFFHVTVDQLIRVRNDAGEFDELELVWMM
 PeLiP09 GAVALISNCPGTQMNFFICRAPATQAPADGLVPEFFHVTVDQLINVRNDAGEFDELELVWMM
 PeLiP06 GAVAMISNCPGAPQMNFFICRAPATQAPADGLVPEFFHVTVDQIIRVRNDAGEFDELELVWMM
 PeLiP03 GAVALISNCPGAPQMNFFICRAPATQAPADGLVPEFFHVTVDQIDRVNDAGEFDELELVWMM
 PeLiP10 GAVGLISNCPGAPQMNFFICRAPATQAPADGLVPEFFHVTVDQIIRARMNDAGEFDELELVWMM
 PeLiP04 GAVGLISNCPGAPQMNFFICRAPEATQAPADGLVPEFFHVTVDQIIRARMLDAGGFDELELVWMM

PeLiP01 LSAHSVAANDVDVFVQGLFFDSTPGIFDSOFFVETQLRGTAFFGSGGNQGEVESPLPGE
 PeLiP08 LSAHSVAANDVDVFVQGLFFDSTPGIFDSOFFVETQLRGTAFFGSGGNQGEVESPLPGE
 PeLiP02 LSAHSVAANDVDVFVQGLFFDSTPGIFDSOFFVETQFRGLTFGSGGNQGEVESPMAGE
 PeLiP05 LSAHSVAANDVDVFVQGLFFDSTPGIFDSOFFVETQFRGLTFGSGGNQGEVESPMAGE
 PeLiP07 LSAHSVAANDVDVFVQGLFFDSTPGIFDSOFFVETQLRGTAFFGSGGNQGEVESPLPGE
 PeLiP09 LSAHSVAANDVDVFVQGLFFDSTPGIFDSOFFVETQLRGTAFFGSGGNQGEVESPLPGE
 PeLiP06 LSAHSVAANDVDVFVQGLFFDSTPGIFDSOFFVETQLRGTAFFGSGGNQGEVESPLPGE
 PeLiP03 LSAHSVAANDVDVNIQGLFFDSTPGIFDSOFFVETQLAGTFFGSGNNQGEVESPLPGE
 PeLiP10 LSAHSVAANDVDVFRNGLFFDSTPGIFDSOFFVETQLAGTFFGSGGNQGEVESPLPGE
 PeLiP04 LSAHSVAANDVDVFRNGLFFDSTPGIFDSOFFVETQLRGTAFFGKTGTGTVMSELKGE

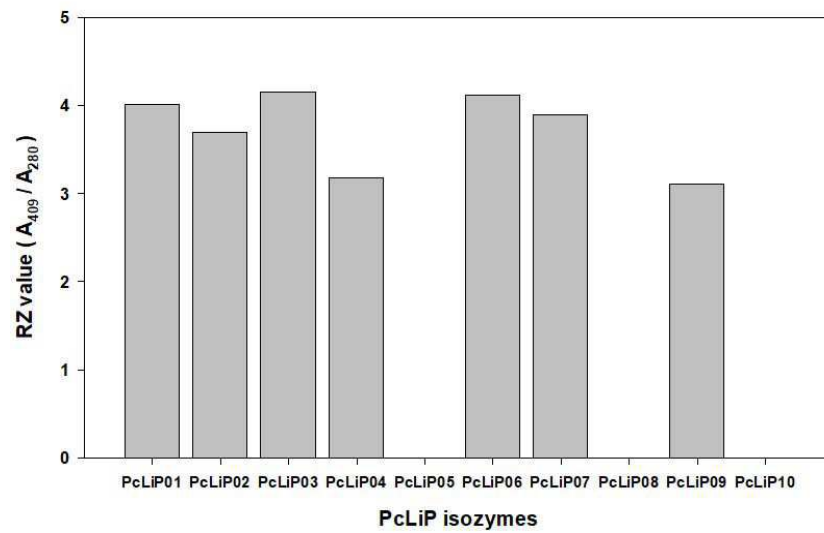
PeLiP01 IRIQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS
 PeLiP08 IRIQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS
 PeLiP02 IRIQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS
 PeLiP05 IRIQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS
 PeLiP07 IRIQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS
 PeLiP09 IRIQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS
 PeLiP06 MRLQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS
 PeLiP03 MRLQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS
 PeLiP10 MRLQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS
 PeLiP04 MRLQSDHTIARDSTRACEQSFVNQSKIVSDDFQIFLALTLQGDNDNMTDCSSVIPQS

PeLiP01 KPPIPGNLPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP08 KPPIPGNLPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP02 KPPIPGNLPFSFFFPBGKSKMDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP05 KPPIPGNLPFSFFFPBGKSKMDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP07 KPPIPGNLPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP09 KPPIPGNLPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP06 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP03 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP10 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP04 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP05 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP06 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP07 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP08 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP09 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP10 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP04 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP05 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP06 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP07 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP08 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP09 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP10 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP04 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP05 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP06 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP07 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP08 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP09 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP10 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP04 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP05 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP06 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP07 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP08 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP09 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP10 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP04 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP05 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP06 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP07 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP08 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP09 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP10 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP04 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP05 KPPIPNVNPFSFFFPAGKTIKDVDEACAEFPFFPITTLPGPETSQVRIPEPPFGA..
 PeLiP06 KPPI

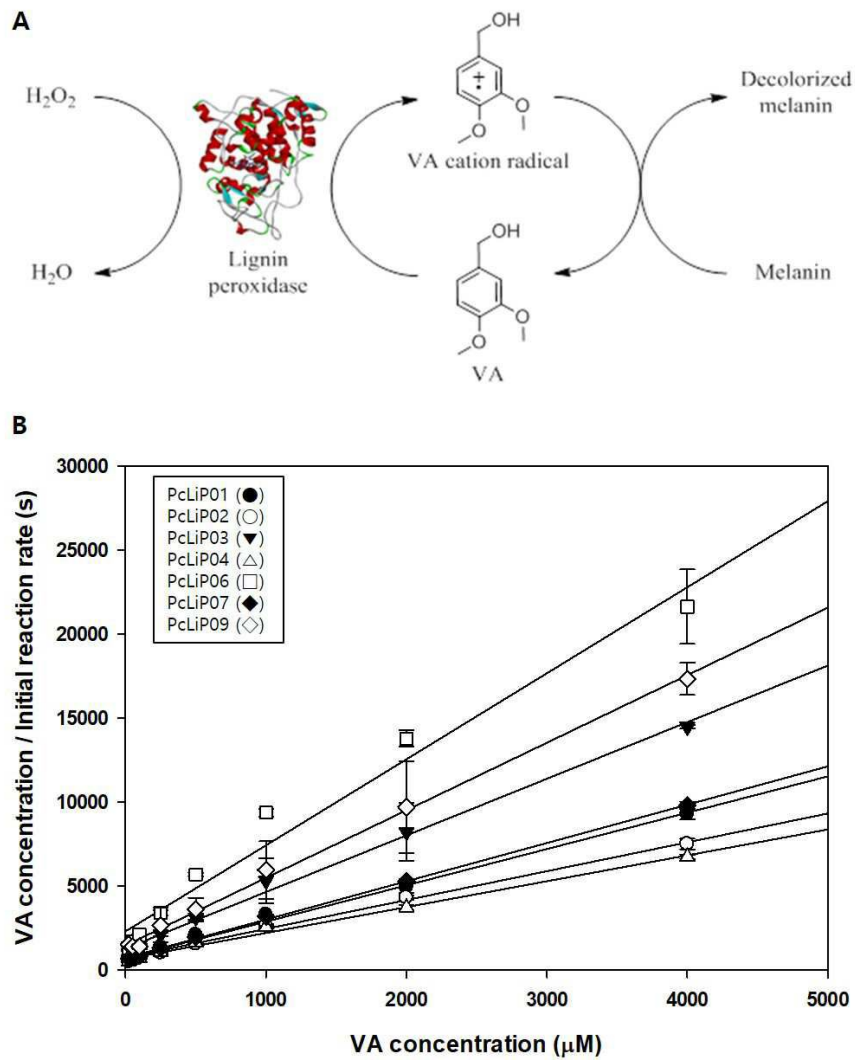
도면2



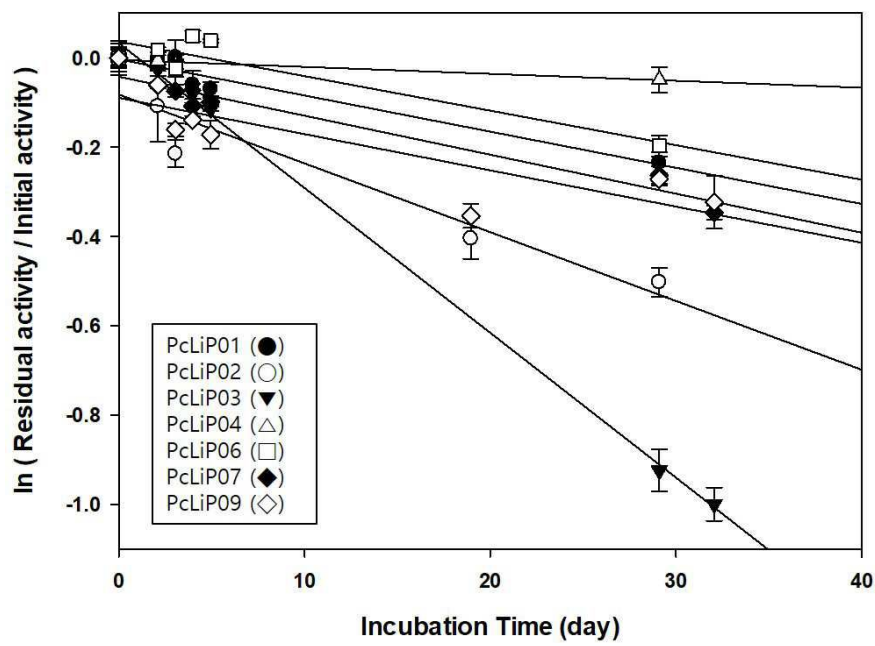
도면3



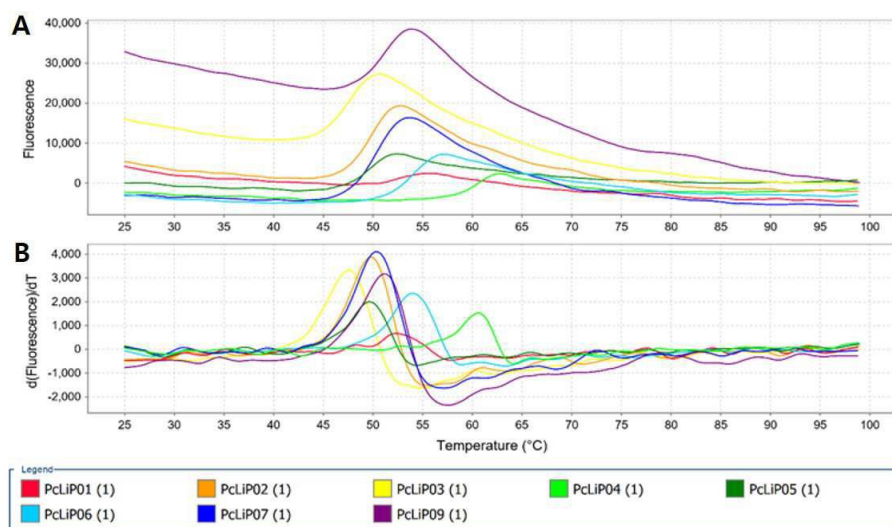
도면4



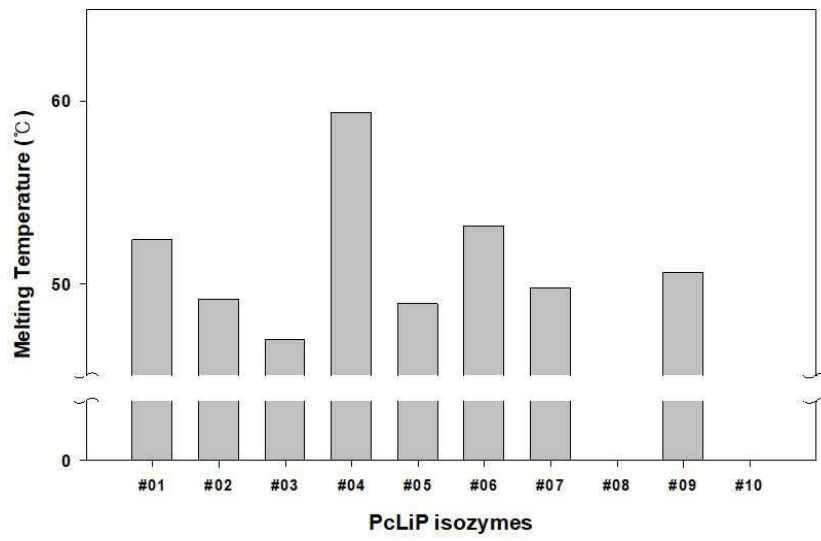
도면5



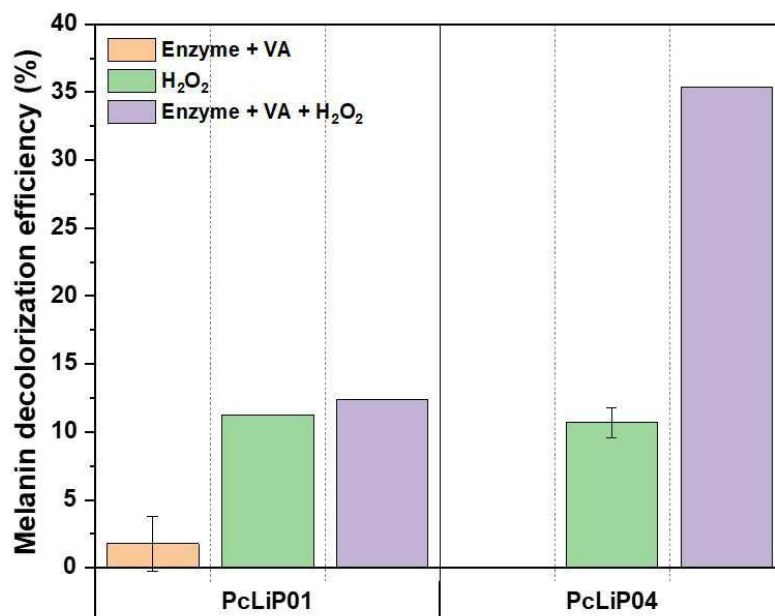
도면6



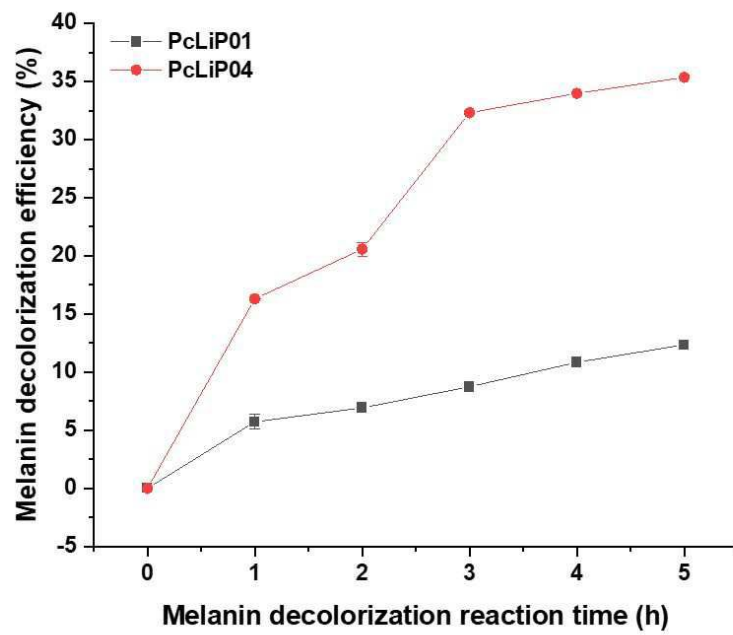
도면7



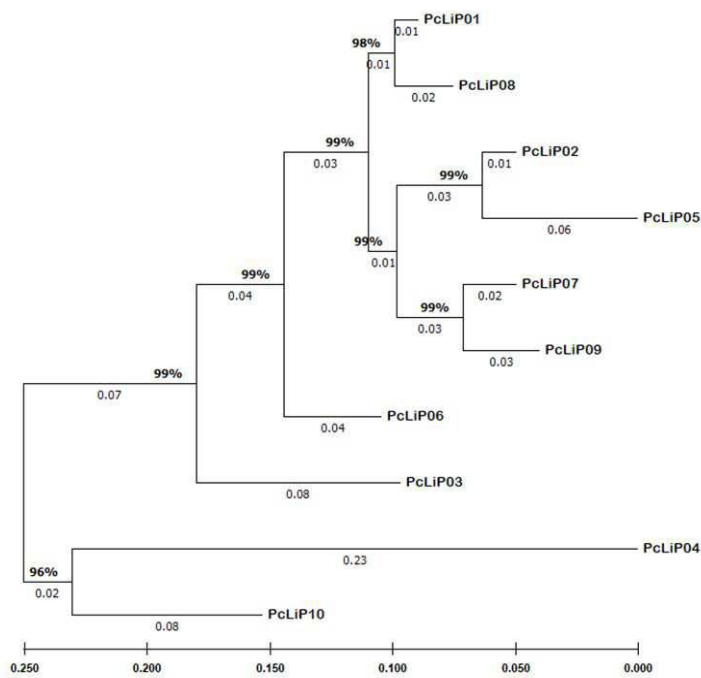
도면8



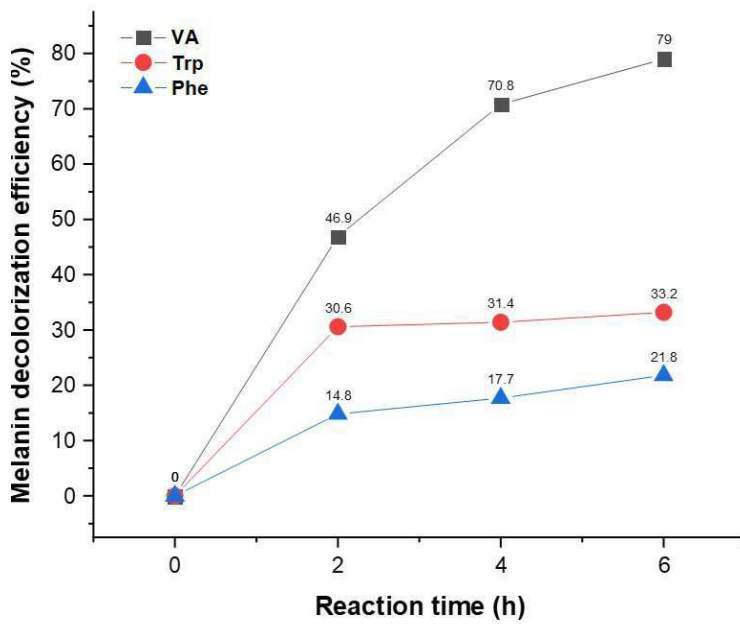
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
- <120> Costmetic composition for skin whitening comprising lignin peroxidase isozyme and use thereof
- <130> PN139968KR
- <160> 20
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 352
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PcLiP01_AA
- <400> 1

Met Ala Ala Val Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys Thr

1 5 10 15

Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp Ile

20 25 30

Gln Gln Asn Leu Phe His Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His Glu

35 40 45

Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ser Ile Ala Ile Ser Pro Ala Met
50 55 60

Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile Met
65 70 75 80

Ile Phe Asp Asp Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Gly Leu Asp
85 90 95

Glu Ile Val Lys Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val Thr
100 105 110

Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn Cys
115 120 125

Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala Thr
130 135 140

Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val Asp
145 150 155 160

Gln Ile Ile Asn Arg Val Asn Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu Glu
165 170 175

Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp Val
180 185 190

Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe Pro
210 215 220

Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro Leu Pro Gly Glu
225 230 235 240

Ile Arg Ile Gln Ser Asp His Thr Ile Ala Arg Asp Ser Arg Thr Ala
245 250 255

Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Asn Asn Gln Ser Lys Leu Val Asp Asp
260 265 270

Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro Asn
275 280 285

Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser Lys Pro Ile Pro
290 295 300

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

305 310 315 320

Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr Leu

325 330 335

Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly Ala

340 345 350

<210> 2

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP02_AA

<400> 2

Met Ala Val Val Lys Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Ala Thr

1 5 10 15

Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp Ile

20 25 30

Gln Gln Asn Leu Phe Gln Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His Glu

35 40 45

Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ala Ile Ala Ile Ser Pro Ala Met

50 55 60

Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile Met

65 70 75 80

Ile Phe Asp Asp Ile Glu Pro Asn Phe His Pro Asn Ile Gly Leu Asp

85 90 95

Glu Ile Ile Asn Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val Thr

100 105 110

Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn Cys

115 120 125

Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala Thr

130 135 140

Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val Asp

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

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

 Gly Asn Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Pro Gly Lys Ser Met Lys Asp
 305 310 315 320
 Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Ser Leu Val Thr Leu
 325 330 335
 Pro Gly Pro Ala Thr Ser Val Ala Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly Ala
 340 345 350
 <210> 3
 <211> 352
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PcLiP03_AA
 <400> 3

Met Ala Ala Val Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys Val Val

1 5 10 15

Pro Ala Ala Ser Cys Cys Thr Trp Phe Asn Val Leu Ser Asp Ile Gln

20 25 30

Glu Asn Leu Phe Asn Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His Glu Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ala Ala Gly Gln Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile Met Ile

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Val Arg Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val Thr Pro

100 105 110

Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn Cys Pro

115 120 125

Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala Thr Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Ile Ile Asp Arg Val Phe Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu Glu Leu

165 170 175

Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Ala Asn Asp Ile Asp

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gly Ser Asn Asn Gln Gly Glu Val Ser Ser Pro Leu Pro Gly Glu Met

225 230 235 240

Arg Leu Gln Ser Asp Phe Leu Ile Ala Arg Asp Ala Arg Thr Ala Cys

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

290 295 300
 Asn Thr Pro Gly Phe Ser Phe Phe Pro Pro Gly Met Thr Met Asp Asp
 305 310 315 320
 Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Ser Thr Leu
 325 330 335
 Pro Gly Pro Ala Thr Ser Val Ala Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly Ala
 340 345 350

<210> 4

<211> 346

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PcLiP04_AA

<400> 4

Met Val Ala Cys Pro Asp Gly Val His Thr Ala Ser Asn Ala Ala Cys
 1 5 10 15
 Cys Ala Trp Phe Pro Val Leu Asp Asp Ile Gln Gln Asn Leu Phe His
 20 25 30
 Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His Glu Ala Leu Arg Met Val Phe
 35 40 45
 His Asp Ser Ile Ala Ile Ser Pro Lys Leu Gln Ser Gln Gly Lys Phe
 50 55 60

Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile Ile Thr Phe Ser Ser Ile Glu
 65 70 75 80
 Thr Thr Tyr His Pro Asn Ile Gly Leu Asp Glu Val Val Ala Ile Gln
 85 90 95
 Lys Pro Phe Ile Ala Lys His Gly Val Thr Pro Gly Asp Phe Ile Ala

100	105	110	
Phe Ala Gly Ala Val Gly Val Ser Asn Cys Pro Gly Ala Pro Gln Met			
115	120	125	
Gln Phe Phe Leu Gly Arg Pro Glu Ala Thr Gln Ala Ala Pro Asp Gly			
130	135	140	
Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Ile Asp Gln Val Leu Ala Arg Met			
145	150	155	160
Leu Asp Ala Gly Gly Phe Asp Glu Ile Glu Thr Val Trp Leu Leu Ser			
165	170	175	
Ala His Ser Ile Ala Ala Ala Asn Asp Val Asp Pro Thr Ile Ser Gly			
180	185	190	
Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Gln Phe Asp Ser Gln Phe Phe Val			
195	200	205	
Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe Pro Gly Lys Thr Gly Ile Gln			
210	215	220	
Gly Thr Val Met Ser Pro Leu Lys Gly Glu Met Arg Leu Gln Thr Asp			
225	230	235	240
His Leu Phe Ala Arg Asp Ser Arg Thr Ala Cys Glu Trp Gln Ser Phe			
245	250	255	
Val Asn Asn Gln Thr Lys Leu Gln Glu Asp Phe Gln Phe Ile Phe Thr			
260	265	270	
Ala Leu Ser Thr Leu Gly His Asp Met Asn Ala Met Ile Asp Cys Ser			
275	280	285	
Glu Val Ile Pro Ala Pro Lys Pro Val Asn Phe Gly Pro Ser Phe Phe			
290	295	300	
Pro Ala Gly Lys Thr His Ala Asp Ile Glu Gln Ala Cys Ala Ser Thr			
305	310	315	320
Pro Phe Pro Thr Leu Ile Thr Ala Pro Gly Pro Ser Ala Ser Val Ala			
325	330	335	
Arg Ile Pro Pro Pro Pro Ser Pro Asn Trp			
340	345		

<210> 5
 <211> 351
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP05_AA

<400> 5

Met Ala Val Val Lys Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ala Asn Gly Lys Thr

1 5 10 15

Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp Ile

20 25 30

Gln Ala Asn Met Phe His Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His Glu

35 40 45

Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ser Ile Ala Ile Ser Pro Ala Met

50 55 60

Glu Ala Lys Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile Met

65 70 75 80

Ile Phe Asp Thr Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Gly Leu Asp

85 90 95

Glu Val Val Ala Met Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val Thr

100 105 110

Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn Cys

115 120 125

Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Lys Pro Ala Thr

130 135 140

Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val Asp

145 150 155 160

Gln Ile Ile Ala Arg Val Asn Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu Glu

165 170 175

Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp Val

180 185 190

Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile Phe

195 200 205

Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Phe Arg Gly Thr Leu Phe Pro
210 215 220

Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Gly Met Ala Gly Glu
225 230 235 240

Ile Arg Ile Gln Thr Asp His Thr Leu Ala Arg Asp Ser Arg Thr Ala
245 250 255

Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Gly Asn Gln Ser Lys Leu Val Asp Asp
260 265 270

Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro Asn
275 280 285

Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Leu Ser Lys Pro Ile Pro
290 295 300

Gly Asn Gly Pro Phe Ser Phe Phe Pro Pro Gly Lys Ser His Ser Asp
305 310 315 320

Ile Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Ser Leu Val Thr Leu
325 330 335

Pro Gly Pro Ala Thr Ser Val Ala Arg Ile Pro Pro His Lys Ala
340 345 350

<210> 6
<211> 352
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> PcLiP06_AA
<400> 6

Met Ala Ala Val Lys Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Ala Thr
1 5 10 15

Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp Ile
20 25 30

Gln Gln Asn Leu Phe Asn Gly Ala Gln Cys Gly Ala Glu Ala His Glu
35 40 45

Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ala Ile Ala Ile Ser Pro Ala Leu
50 55 60

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

Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr Leu
325 330 335

Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Gln Pro Pro Pro Gly Ala
340 345 350

<210> 7

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP07_AA

<400> 7

Met Ala Val Val Lys Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Ala Thr
1 5 10 15

Val Ser Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp Ile
20 25 30

Gln Gln Asn Leu Phe Gln Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His Glu

35 40 45

Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ser Ile Ala Ile Ser Pro Ala Met
50 55 60

Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile Ile
65 70 75 80

Ile Phe Asp Thr Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Gly Leu Asp
85 90 95

Glu Ile Val Asn Leu Gln Lys Pro Phe Ile Ala Lys His Gly Val Thr
100 105 110

Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn Cys
115 120 125

Pro Gly Ser Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala Thr
130 135 140

Lys Ala Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val Asp
145 150 155 160

Gln Leu Ile Glu Arg Val Asn Asp Ala Gly Gln Phe Asp Glu Leu Glu
165 170 175

Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp Val

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

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

325 330 335
Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly Ala
340 345 350

<210> 8
<211> 348
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> PcLiP08_AA
<400> 8

Met Val Ala Val Lys Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ala Asn Gly Val Thr
1 5 10 15
Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp Ile

20					25					30						
Gln	Glu	Asn	Leu	Phe	His	Gly	Gly	Gln	Cys	Gly	Ala	Glu	Ala	His	Glu	
35					40					45						
Ser	Ile	Arg	Leu	Val	Phe	His	Asp	Ser	Ile	Ala	Ile	Ser	Pro	Ala	Met	
50					55					60						
Glu	Ala	Gln	Gly	Lys	Phe	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Ile	Met	
65					70					75					80	
Ile	Phe	Asp	Asp	Ile	Glu	Thr	Ala	Phe	His	Pro	Asn	Ile	Gly	Leu	Asp	
85					90					95						
Glu	Ile	Val	Lys	Leu	Gln	Lys	Pro	Phe	Val	Gln	Lys	His	Asn	Val	Thr	
100					105					110						
Pro	Gly	Asp	Phe	Ile	Ala	Phe	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Asn	Cys	
115					120					125						
Pro	Gly	Ala	Pro	Gln	Met	Asn	Phe	Phe	Thr	Gly	Arg	Ala	Pro	Ala	Pro	
130					135					140						
Asp	Gly	Leu	Val	Pro	Glu	Pro	Phe	His	Thr	Val	Asp	Gln	Ile	Ile	Ser	
145					150					155					160	
Arg	Val	Asn	Asp	Ala	Gly	Gln	Phe	Asp	Glu	Leu	Glu	Leu	Val	Trp	Met	
165					170					175						
Leu	Ser	Ala	His	Ser	Val	Ala	Ala	Val	Asn	Asp	Val	Asp	Pro	Thr	Val	
180					185					190						
Gln	Gly	Leu	Pro	Phe	Asp	Ser	Thr	Pro	Gly	Ile	Phe	Asp	Ser	Gln	Phe	
195					200					205						
Phe	Val	Glu	Thr	Gln	Leu	Arg	Gly	Thr	Ala	Phe	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	
210					215					220						
Asn	Gln	Gly	Glu	Val	Glu	Ser	Pro	Leu	Pro	Gly	Glu	Phe	Arg	Ile	Gln	
225					230					235					240	
Ser	Asp	His	Thr	Ile	Ala	Arg	Asp	Ser	Arg	Thr	Ala	Cys	Glu	Trp	Gln	
245					250					255						
Ser	Phe	Val	Asn	Asn	Gln	Ser	Lys	Leu	Val	Ser	Asp	Phe	Gln	Phe	Ile	
260					265					270						

Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro Asn Ala Met Thr Asp
275 280 285

Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser Lys Pro Ile Pro Gly Asn Leu Pro
290 295 300

Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys Thr Ile Asn Asp Val Glu Gln Ala
305 310 315 320

Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Thr Thr Leu Pro Gly Pro Glu
325 330 335

Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly Ala
340 345

<210> 9

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP09_AA

<400> 9

Met Ala Ala Val Lys Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Ala Thr
1 5 10 15

Val Gly Asp Glu Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val Leu Asp Asp Ile
20 25 30

Gln Glu Asn Leu Phe Gln Gly Ala Gln Cys Gly Ala Glu Ala His Glu
35 40 45

Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ala Ile Ala Ile Ser Pro Ala Met
50 55 60

Glu Ala Gln Gly Gln Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile Ile
65 70 75 80

Ile Phe Asp Thr Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn Ile Gly Leu Asp
85 90 95

Glu Ile Val Asn Leu Gln Lys Pro Phe Ile Ala Lys His Gly Val Thr
100 105 110

Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Ala Leu Ser Asn Cys
115 120 125

Pro Gly Thr Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg Ala Pro Ala Thr
130 135 140

Gln Ala Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe His Thr Val Asp
145 150 155 160

Gln Leu Ile Asn Arg Val Asn Asp Ala Gly Gln Phe Asp Glu Leu Glu
165 170 175

Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Val Asn Asp Val
180 185 190

Asp Pro Thr Ile Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile Phe
195 200 205

Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly Thr Ala Phe Pro
210 215 220

Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro Leu Pro Gly Glu
225 230 235 240

Ile Arg Ile Gln Thr Asp His Thr Leu Ala Arg Asp Pro Arg Thr Ala
245 250 255

Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Ala Asn Gln Ser Lys Leu Val Ser Asp
260 265 270

Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly Gln Asp Pro Asn
275 280 285

Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Ile Ser Lys Pro Ile Pro
290 295 300

Gly Asp Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys Thr Ala Ala Asp
305 310 315 320

Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Ser Leu Thr Thr Leu
325 330 335

Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro Pro Pro Gly Ala
340 345 350

<210> 10
<211> 349
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP10_AA

<400> 10

Met Ala Ala Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser Asn Gly Lys Thr Val

1 5 10 15

Ser Ser Ala Ala Cys Cys Ala Trp Phe Pro Ile Leu Gln Asp Ile Gln

20 25 30

Glu Asn Leu Phe Asn Gly Gly Gln Cys Gly Ala Glu Ala His Glu Ser

35 40 45

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

50 55 60

Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp Gly Ser Ile Met Val

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile Val Arg Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys His Gly Val Thr Pro

100 105 110

Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Ala Val Gly Leu Ser Asn Cys Pro

115 120 125

Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Leu Gly Arg Pro Ala Pro Thr Lys

130 135 140

Ala Ala Pro Asp Gly Leu Val Thr Glu Pro Phe His Ser Val Asp Gln

145 150 155 160

Ile Leu Ala Arg Met Ala Asp Ala Gly Glu Phe Asp Glu Leu Glu Thr

165 170 175

Val Trp Leu Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala Ala Asn Asp Val Asp

180 185 190

Pro Thr Arg Asn Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr Pro Gly Ile Phe Asp

195 200 205

Thr Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Ala Gly Thr Thr Phe Pro Gly

210 215 220

Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Met Ser Pro Leu Ala Gly Glu Met

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

Asp Ser Ala Arg Phe Pro Ala Gly Lys Ser Met Lys Asp Val Glu Pro
 305 310 315 320
 Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr Leu Ala Thr Ala Pro Gly Pro
 325 330 335
 Ala Thr Ser Val Ala Arg Val Pro Pro Pro Pro Gly Ala
 340 345

<210> 11
 <211> 1059
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PcLiP01_NT
 <400> 11

atggcggcgg tgattgaaaa acgtgcgacc ttagcaatg gtaaacggt tggatgatgcg	60
agctgttgtg cgigggttca gtgtctggat gatattcagc aaaacctgtt tcatggcgggt	120
caatgcgggtg cagaagctca tgaagtatc cgtctggttt tccacgatag tattgcaatc	180
tccccggcaa tggaagcaca gggtaaattt ggcggtggcg gtgcagatgg tagcattatg	240
atcttcgatg acattgaaac cgcttttcat ccgaatatg gcctggatga aatcgttaaa	300
ctgcagaaac cgtttgtgca aaaacacggc gttacgccgg gtgacttcat cgcgtttgcc	360
ggcgagtcg ctctgtctaa ctgtccgggt gccccgcaga tgaactttt caccggtcgt	420
gcaccggcaa cgcaaccggc accggatggt ctggtcccgg aaccgttcca taccgtggac	480
cagattatca accgcgttaa tgatgcaggc gaatttgacg aactggaact ggtttggatg	540
ctgagcgcac actctgtggc agcagttaac gatgtcgacc cgaccgtcca gggtctgccg	600
ttcgatagta cgccgggtat ttttgactcc cagtttttcg tggaaacca actgcgtggt	660

acggcattcc cgggtagcgg cggtaatcag ggcgaagtgg aatctccgct gccgggtgaa 720
attcgcatcc aatcagatca caccattgca cgtgactcgc gcacggcttg cgaatggcag 780
tcatttgtca acaatcaatc gaaactggtg gatgactttc agttcatctt tctggcgctg 840
accagctgg gtcaagatcc gaacgccatg acggattgca gcgacgttat tccgcagtct 900

aaaccgatcc cgggtaatct gccgttcagc tttttcccg cggcaaaac cattaaagat 960
gtggaacaag catgtgctga aaccccggtt ccgacgtga cgacgtgcc gggtccggaa 1020
acctcggtcc aacgcattccc gccgccgccg ggtgcctga 1059

<210> 12
<211> 1059
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PcLiP02_NT
<400> 12

atggcgggtg tgaagaaaa acgcgcgacc tgcagcaacg gcgcgaccgt gggcgatgcg 60
agctgctgcg cgtggtttga tgtgctggat gatattcagc agaacctgtt tcaggcgggc 120
cagtgcggcg cggaagcgca tgaagcatt cgcttggtgt ttcatgatgc gattgcgatt 180

agccccggga tggaagcgca gggcaaattt ggcgcgggcg gcgcggatgg cagcattatg 240
atttttgatg atattgaacc gaactttcat ccgaacattg gcctggatga aattattaac 300
ctgcagaaac cgtttgtgca gaaacatggc gtgaccccg gcgattttat tgcgtttgcg 360
ggcgcggttg cgtgagcaa ctgcccgggc gcgccgcaga tgaacttttt taccggccgc 420
gcgccggcga ccagccggc gccggatggc ctggtgccgg aaccgtttca taccgtggat 480
cagattattg cgcgctgaa cgatcgggc gaatttgatg aactggaact ggtgtggatg 540
ctgagcgcg atagcgtggc ggcgttgaac gatgtggatc cgaccgtgca gggcctgccg 600

tttgatagca ccccgggcat tttgatagc cagttttttg tggaaacca gtttcgcggc 660
attctgtttc cgggcagcgg cggcaaccag ggcgaagtgg aaagcggcat ggcgggcgaa 720
attcgcatc agaccgatca taccctggcg cgcgatagcc gcaccgctg cgaatggcag 780
agctttgtga acaaccagag caaactggtg agcgattttc agtttatttt tctggcgctg 840
accagctgg gccaggatcc gaacgcgatg accgattgca gcgatgtgat tccgattagc 900
aaaccgattc cgggcaacct gccgtttagc tttttccgc cgggcaaaag catgaaagat 960
gtggaacagg cgtgcgcgga aaccccggtt ccgagcctgg tgaccctgcc gggccccggc 1020

accagctgg cgcgcatcc gccgccgccg ggcgctga 1059

<210> 13

<211> 1059

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP03_NT

<400> 13

```
atggcggcgg tggaaaaacg cgcgacctgc agcaacggca aagtgggtgcc ggcggcgagc      60
tgctgcacct ggtttaacgt gctgagcgat attcaggaaa acctgtttta cggcggccag      120
tgcggcgagg aagcgcatga aagcattcgc ctggtgtttc atgatgcgat tgcgattagc      180
ccggcgatgg aagcggcgagg ccagtttggc ggcggcgagg cggatggcag cattatgatt      240
tttgatgaaa ttgaaaccaa ctttcatccg aacattggcc tggatgaaat tgtgcgcctg      300
```

```
cagaaaccgt ttgtgcagaa acatggcgtg acccggggcg attttattgc gtttgcgggc      360
gcggtggcgc tgagcaactg cccggggcgc cgcagatga acttttttac cggccgcgcg      420
ccggcgaccc agccggcgcc ggatggcctg gtgccggaac cgtttcatag cgtggatcag      480
attattgatc gcgtgtttga tgcggcgcaa tttgatgaac tggaactggt gtggatgctg      540
agcgcgcata gcgtggcgcc ggcgaacgat attgatccga acattcaggg cctgccgttt      600
gatagcacc cgggcatttt tgatagccag ttttttgg aaaccagct ggcgggcacc      660
ggctttaccg gcggcagcaa caaccagggc gaagttagca gcccgtgcc gggcgaaatg      720
```

```
gcctgcaga gcgattttct gattgcgcgc gatgcgcgca ccgctgcga atggcagagc      780
tttgtgaaca accagagcaa actggtgagc gattttcagt ttatttttct ggcgctgacc      840
cagctgggcc aggatccgga tgcgatgacc gattgcagcg cggtgattcc gattagcaaa      900
ccggcgccga acaacacccc gggcttttagc tttttccgc cgggcatgac catggatgat      960
gtggaacagg cgtgcgcgga aaccccggtt ccgaccctga gcaccctgcc gggcccggcg      1020
accagcgtgg cgcgcattcc gccgcgcg cgcgctga      1059
```

<210> 14

<211> 1041

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP04_NT

<400> 14

```
atggttgctg gcccgacgg tgttcacacc gcgtctaacg cggcgtgctg cgcgtggttc      60
ccggttctgg acgacatcca gcagaacctg ttccacggtg gtcagtgcgg tgcggaagcg      120
```

cacgaagcgc tgcgtatggt ttccacgac tctatcgca tctctccgaa actgcagtct 180
cagggtaaat tccgtggtgg tgggtcggac ggttctatca tcaccttctc ttctatcgaa 240
accacctacc acccgaacat cgggtctggac gaagtgttg cgatccagaa accgttcac 300
gcgaaacacg gtgttacccc ggggtgacttc atcgcggtcg cgggtcgggt tgggttttct 360

aactgcccgg gtgcgccgca gatgcagttc ttcttgggtc gtccggaagc gaccagggcg 420
gcgccggacg gtctggttcc ggaaccgttc cacaccatcg accaggttct ggcgcgtatg 480
ctggacgcgg gtggttttca cgaaatcgaa accgtttggc tgctgtctgc gcactctatc 540
gcggcggcga acgacgttga cccgaccatc tctggtctgc cgttcgactc taccgggt 600
cagttcgact ctgatttctt cgttgaaacc cagctgcgtg gtaccggtt cccgggtaaa 660
accggtatcc agggtagcgt tatgtctccg ctgaaagggt aaatgcgtct gcagaccgac 720
cacctgttcg cgcgtgactc tcgtaccgcg tgcgaatggc agtctttcgt taacaaccag 780

accaaactgc aggaggattt tcaattcatc ttaccgcgc tgtctaccct gggtcacgac 840
atgaacgcga tgatcgactg ctctgaagtt atcccgccgc cgaaaccggt taacttcggt 900
ccgtctttct tcccgccggg taaaaccac gcggacatcg aacaggcgtg cgcgtctacc 960
ccgttccga cctgatcac cgcgcgggt ccgtctcgt ctgttcgcgc tatccgccg 1020
ccgcgtctc cgaactggtg a 1041

<210> 15
<211> 1056
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PcLiP05_NT
<400> 15

atggcgggtg tgaagaaaa acgcgcgacc tgcgcgaac gcaaaaccgt gggcgatgcg 60

agctgtcgc cgtggtttga tgtctggat gatattcagg cgaacatgtt tcatggcggc 120
cagtgcggcg cggaagcgca tgaagcatt cgcctggtgt tcatgatag cattgcgatt 180
agcccgcgca tgaagcgaa aggcaaattt ggcggcggcg gcgcggatgg cagcattatg 240
atttttgata ccattgaac cgcgtttcat ccgaacattg gcctggatga agtgggtggcg 300
atgcagaaac cgtttgtca gaaacatggc gtgaccccg gcgattttat tgcgtttgcg 360
ggcgcgggtg cgctgagcaa ctgcccgggc gcgccgaga tgaacttttt taccggccgc 420
aaaccggcga cccagccggc gccggatggc ctggtgccgg aaccgtttca taccgtggat 480

cagattattg cgcgcgtgaa cgatgcgggc gaatttgatg aactggaact ggtgtggatg 540

ctgagcgcgc atagcgtggc ggcggtgaac gatgtggatc cgaccgtgca gggcctgccg	600
tttgatagca ccccgggcat ttttgatagc cagttttttg tggaaaccca gtttcgcggc	660
accctgtttc cgggcagcgg cggcaaccag ggcgaagtgg aaagcggcat ggcgggcgaa	720
attcgcattc agaccgatca taccctggcg cgcgatagcc gcaccgcgtg cgaatggcag	780
agctttgtgg gcaaccagag caaactggtg gatgattttc agtttatatt tctggcgctg	840
accagctgg gccaggatcc gaacgcgatg accgattgca gcgatgtgat tccgctgagc	900
aaaccgattc cgggcaacgg cccgttttagc tttttccgc cgggcaaaag ccatagcgat	960
attgaacagg cgtgcgcgga aaccccggtt ccgagcctgg tgaccctgcc gggcccgcg	1020
accagcgtgg cgcgcattcc gccgcataaa gcgtga	1056
<210> 16	
<211> 1059	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PcLiP06_NT	
<400> 16	
atggcggcgg tgaagaaaa acgcgcgacc tgcagcaacg gcgcgaccgt gggcgatgcg	60
agctgctgcg cgtggtttga tgtgctggat gatattcagc agaacctgtt taacggcgcg	120
cagtgcggcg cggaagcgca tgaagcatt cgcctggtgt ttcatgatgc gattgcgatt	180
agcccggcgc tggaagacca gggcaaattt ggcggcggcg gcgcggatgg cagcattatt	240
ctgtttgatg atattgaac caactttcat ccgaacattg gcctggatga aattgtgaac	300
ctgcagaaac cgtttattca gaaacatggc gtgaccccg gcgattttat tgcgtttgcg	360
ggcgcggtgg cgatgagcaa ctgcccgggc gcgccgcaga tgaacttttt taccggccgc	420
gcgccggcga cccaggcggc gccggatggc ctggtgccgg aaccgtttca taccgtggat	480
cagattatta gccgcgtgaa cgatgcgggc gaatttgatg aactggaact ggtgtggatg	540
ctgagcgcgc atagcgtggc ggcggcgaac gatgtggatc cgaccattca gggcctgccg	600
tttgatagca ccccgggcgt gtttgatagc cagttttttg tggaaaccca gctgcgcggc	660
accgctttc cgggcagcgg cggcaaccag ggcgaagtgg aaagcccgt gccgggcgaa	720
atgcgcctgc agagcgatag cagcattgcg cgcgatagcc gcaccgcgtg cgaatggcag	780
agctttgtga acaaccagag caaactggtg agcgattttc agtttatatt tctggcgctg	840
accagctgg gccagaacct ggatgcgatg accgattgca gcgatgtgat tccgattagc	900
aaaccggtgc cgaacaactg gccgttttagc tttttccgg cgggcaaaac catggcggat	960

gtggaacagg cgtgcgcgga aaccccgttt ccgacctga ccacctgcc gggcccgaa 1020

accagcgtgc agcgattca gccgccgccc ggcgcgta 1059

<210> 17

<211> 1059

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP07_NT

<400> 17

atggcggtag tgaagaaaa acgcgcgacc tgcagcaacg gcgcgaccgt gagcgtgcg 60

agctgctgcg cgtggtttga tgtgctgat gatattcagc agaacctgtt tcaggcgccg 120

cagtgcggcg cggaagcgca tgaagcatt cgcctggtgt ttcattgatg cattgcgatt 180

agcccgcgca tgaagcgca gggcaaat tggcgccggcg gcgcggatgg cagcattatt 240

atttttgata ccattgaaac cgcgtttcat ccgaacattg gcctggatga aattgtgaac 300

ctgcagaaac cgtttattgc gaaacatggc gtgaccccg gcgattttat tgcgtttgcg 360

ggcgcgtagg cgtgagcaa ctgcccgccg agcccgaga tgaacttttt taccggccgc 420

gcgcggcgca ccaagcgcc gccgtaggct ctggtgcccg aaccgtttca taccgtggat 480

cagctgattg aacgcgtgaa cgatgcggcg cagtttgatg aactggaact ggtgtggatg 540

ctgagcgcg atagcgtggc ggcggtgaac gatgtggatc cgaccgtgca gggcctgccg 600

tttgatagca ccccgggcat tttgatagc cagttttttg tggaaacca gctgcgcggc 660

ctgacctttc cggcgagcgg cggaaccag ggcgaagtga ccagcccgt gccggcgcaa 720

attcgattc agaccgatca taccctggcg cgcgatagcc gcaccgcgtg cgaatggcag 780

agctttgtgg cgaaccagag caaactggtg agcgattttc agttttttt tctggcgctg 840

accagctgg gccagatcc gaacgcgatg accgattgca gcgatgtgat tccgattagc 900

aaaccgattc cgggcaacct gccgtttagc tttttccgg cgggcaaac catgaaagat 960

gtggaacagg cgtgcgcgga aaccccgttt ccgacctga ccacctgcc gggcccgaa 1020

accagcgtgc agcgattcc gccgccgccc ggcgcgta 1059

<210> 18

<211> 1047

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP08_NT

<400> 18

atggtggcgg tgaagaaaa acgcgcgacc tgcgcgaacg gcgtgaccgt gggcgatgcg 60
agctgctgcg cgtggtttga tgtgctggat gatattcagg aaaacctgtt tcatggcggc 120
cagtgcggcg cggaagcgca tgaagcatt cgcctggtgt ttcatgatag cattgcgatt 180
agcccgcgca tggaagcgca gggcaaattt ggccggcgcg gcgcggatgg cagcattatg 240
atTTTTgatg atattgaaac cgcgtttcat ccgaacattg gcctggatga aattgtgaaa 300
ctgcagaaac cgtttgtgca gaaacataac gtgaccccg gcatTTTTat tgcgtttgcg 360

ggcgcggtgg cgctgagcaa ctgcccgggc gcgccgcaga tgaactTTTT taccggccgc 420
gcgccggcgc cggatggcct ggtgccggaa ccgtttcata ccgtggatca gattattagc 480
cgcgtgaacg atgcgggcca gtttgatgaa ctggaactgg tgtggatgct gagcgcgcac 540
agcgtggcgg cggatgaacga tgtggatccg accgtgcagg gcctgccgtt tgatagcacc 600
ccgggcattt ttgatagcca gttttttgtg gaaaccagc tgcgcggcac cgcgtttccg 660
ggcagcgcg gcaaccaggc cgaagtggaa agcccgtgc cgggcgaatt tcgcattcag 720
agcgtacata ccattgcgcg cgatagccgc accgcgtgcg aatggcagag ctttgtgaac 780

aaccagagca aactggtgag cgattttcag tttatttttc tggcgtgac ccagctgggc 840
caggatccga acgcgatgac cgattgcagc gatgtgattc cgcagagcaa accgattccg 900
ggcaacctgc cgtttagctt tttccggcg ggcaaaacca ttaacgatgt ggaacaggcg 960
tgcgcggaaa cccgtttcc gacctgacc accctgccgg gcccggaac cagcgtgcag 1020
cgattccgc ccccgccggg cgcgtga 1047

<210> 19

<211> 1059

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP09_NT

<400> 19

atggcgcgcg tgaagaaaa acgcgcgacc tgcagcaacg gcgcgaccgt gggcgatgaa 60

agctgctgcg cgtggtttga tgtgctggat gatattcagg aaaacctgtt tcaggcgcg 120
cagtgcggcg cggaagcgca tgaagcatt cgcctggtgt ttcatgatgc gattgcgatt 180
agcccgcgca tggaagcgca gggccagttt ggccggcgcg gcgcggatgg cagcattatt 240
atTTTTgata ccattgaaac cgcgtttcat ccgaacattg gcctggatga aattgtgaac 300
ctgcagaaac cgtttattgc gaaacatggc gtgaccccg gcatTTTTat tgcgtttgcg 360
ggcgcggtgg cgctgagcaa ctgcccgggc accccgcaga tgaactTTTT taccggccgc 420

gcgccggcga cccaggcggc gccggatggc ctggtgccgg aaccgtttca taccgtggat 480

cagctgatta accgcgtgaa cgatgcgggc cagtttgatg aactggaact ggtgtggatg 540

ctgagcgcgc atagcgtggc ggcggtgaac gatgtggatc cgaccattca gggcctgccg 600

tttgatagca ccccgggcat ttttgatagc cagttttttg tggaaacca gctgcgcggc 660

accgcgtttc cgggcagcgg cggcaaccag ggcgaagtgg aaagcccgt gcccggcgaa 720

attcgattc agaccgatca taccctggcg cgcgatccgc gcaccgcgtg cgaatggcag 780

agctttgtgg cgaaccagag caaactggtg agcgattttc agtttatatt tctggcgtg 840

accagctgg gccaggatcc gaacgcgatg accgattgca gcgatgtgat tccgattagc 900

aaaccgattc cgggcgatct gccgttttagc tttttccgg cgggcaaac cgcggcggat 960

gtggaacagg cgtgcgcgga aaccctgtt ccgagcctga ccaccctgcc gggcccggaa 1020

accagcgtgc agcgcatcc gccgccgcg ggcgcgtga 1059

<210> 20

<211> 1050

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PcLiP10_NT

<400> 20

atggcggcga ttgaaaaacg cgcgacctgc agcaacggca aaaccgtgag cagcgcggcg 60

tgtcgcgcgt ggtttccgat tctgcaggat attcaggaaa acctgtttaa cggcggccag 120

tgcggcgcgg aagcgcataa aagcctgcgc ctggtgtttc atgatgcgat tgcgattagc 180

ccggcgtctg aagcgcaggc caaatgtggc ggccggcggc cgcatggcag cattatggtg 240

tttgatacca ttgaaaccaa ctttcacccg aacattggcc tggatgaaat tgtgcgcctg 300

cagaaaccgt ttgtgcagaa acatggcgtg acccggggcg attttattgc gtttgcgggc 360

gcggtgggccc tgagcaactg cccgggcgcg ccgcagatga acttttttct gggccgcccg 420

gcgccgacca aagcggcgcc ggatggcctg gtgaccgaac cgtttcatag cgtggatcag 480

attctggcgc gcatggcgga tgcgggcgaa tttgatgaac tggaaaccgt gtggctgctg 540

agcgcgcata gcgtggcgcc ggcgaacgat gtggatccga cccgcaacgg cctgccgttt 600

gatagcacc cgggcatttt tgataccag tttttgtgg aaaccagct ggccggcacc 660

acctttccgg gcagcggcgg caaccagggc gaagtgatga gcccgctggc gggcgaaatg 720

gcctgcaga gcgattttct gattgcgcgc gataccgca ccgcgtgcga atggcagagc 780

tttgtgaaca accagagcaa actgaccagc gattttcagt ttatttttgc ggcgctgagc 840

accctgggcc atgatatgac caccatgacc gattgcagcg atgtgattcc gattagcaaa	900
ccgctgcgcg gcgatatgcg gcgctttccg gcgggcaaaa gcatgaaaga tgtggaaccg	960
gcgtgcgcgg aaaccccggt tccgaccctg gcgaccgcgc cgggcccggc gaccagcgtg	1020
 gcgcgcgtgc cgccgccgcc gggcgcgtga	 1050