

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0032319 (43) 공개일자 2012년04월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 16/40 (2006.01) G01N 33/573 (2006.01) G01N 33/532 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0093910 (22) 출원일자 2010년09월28일 심사청구일자 2010년09월28일		(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원 춘천시 한림대학길 39 한림대학교 (72) 발명자 김윤중 경기도 안양시 동안구 관평로170번길 15, 일송생 명과학연구소 607호 (관양동) (74) 대리인 최규환

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 인간 전장 PINK1 단백질을 인지하는 다클론 항체 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 인간 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) 단백질의 아미노 말단으로부터 1번째 ? 21번째 아미노산 부위를 인지하는 다클론 항체 및 상기 PINK1 다클론 항체를 사용하여 생물학적 시료 내 PINK1을 정량하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0011158

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기본연구지원(유형1)

연구과제명 PINK1과 상호작용 하는 단백질 발굴을 통한 파킨슨병 연관 신규 유전자 발굴

주관기관 한림대학교

연구기간 2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 인간 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) 단백질의 아미노 말단으로부터 1번째 ? 21번째 아미노산 부위를 인지하는 다클론 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체는 전장 인간 PINK1 만을 특이적으로 인지하는 것을 특징으로 하는 다클론 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체는 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 검출 표지제가 결합된 것을 특징으로 하는 다클론 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 검출 표지제는 효소, 형광물질, 발광물질 또는 방사성 물질인 것을 특징으로 하는 다클론 항체.

청구항 5

i) 검출 표지제와 결합된 제1항의 PINK1 다클론 항체와 생물학적 시료를 접촉시키는 단계,

ii) 단계 i)에서 수득된 면역학적 복합체를 정량 검출하는 단계,

iii) 검출 표지제와 결합된 제1항의 PINK1 다클론 항체와 정제된 PINK1 항원을 접촉시켜 수득된 면역학적 복합체를 정량화하여 표준 곡선을 수득하는 단계, 및

iv) 단계 ii)에서 정량 검출된 단백질의 양을 단계 iii)에서 수득된 표준곡선과 비교하여 생물학적 시료 내에 존재하는 PINK1을 정량하는 단계

를 포함하는, PINK1 다클론 항체를 사용하여 생물학적 시료 내 PINK1을 정량하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 인간 전장 PINK1 단백질을 인지하는 다클론 항체 및 이의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 인간 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) 단백질의 아미노 말단으로부터 1번째 ? 21번째 아미노산 부위를 인지하는 다클론 항체 및 상기 PINK1 다클론 항체를 사용하여 생물학적 시료 내 PINK1을 정량하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 파킨슨병(PD)은 떨림(tremor), 강직(rigidity), 서동(bradykinesia) 및 자세의 불안정과 같은 임상 증상을 보이는 두 번째로 가장 흔한 퇴행성 신경질환이다. 파킨슨병의 원인은 아직 밝혀지지 않았지만, 산화 스트레스, 미토콘드리아 기능장애 및 단백질 응집이 가능성 있는 발병 기전으로 제안되었다(Valente *et al.* (2004) *Science* **304**, 1158-1160). 파킨슨병의 발병이 일반적으로는 산발적이지만, 발병 사례 중 약 15%가 가족력을 가진다. 지난 몇십 년 동안, 가족성 파킨슨병이 있는 환자에서 몇몇 유전자 돌연변이가 확인되었다(Lesage and Brice (2009) *Hum Mol Genet.* **18**, 48-59).

[0003] *PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)* 유전자의 돌연변이는 상염색체 열성형의 가족성 파킨슨병에서 발견되었다(Valente *et al.* (2004) *Science* **304**, 1158-1160). 인간 PINK1은 추정 N-말단 미토콘드리아 타겟팅 신호(MTS)를 포함하는 581개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드이다. PINK1은 Ca^{2+} /칼모둘린 패밀리의 세린/트레오닌 키나제와 상동성이 있는 고도로 보존된 키나제 도메인을 가지는 추정 미토콘드리아 단백질 키나제를 암호화한다(Valente *et al.* (2004) *Science* **304**, 1158-1160). 기능 연구는 미토콘드리아 막전위의 유지(MacKeigan *et*

al. (2005) *Nat Cell Biol.* **7**, 591-600), 세포의 스트레스 요인에 의한 아포토시스에 대한 보호(Petit *et al.* (2005) *J Biol Chem.* **280**, 34025-34032), 자가포식 형성(Cristofol *et al.* (2010) *Proc Natl Acad Sci USA.* **107**, 378-383), 그리고 미토콘드리아 분열 및 융합에 관여(Yang *et al.* (2008) *Proc Natl Acad Sci USA.* **19**, 7070-7075)를 포함하는 PINK1의 몇몇 중요한 역할을 밝혔다. 면역골드 전자현미경 및 생화학적 연구는 PINK1의 N-말단 부분은 미토콘드리아 내막에 위치하고 키나제 도메인을 포함하는 C-말단 부분은 세포질 쪽을 향한다는 것을 나타내었다(Muquit *et al.* (2006) *J Neurochem.* **98**, 156-169). 생화학적 분석은 전장 PINK1 단백질(약 68 kDa)이 N-말단적으로 분해된 55 kDa(ΔN 55) 또는 45 kDa(ΔN 45) 크기의 더 작은 단편을 생성하기 위한 미토콘드리아 막에 대한 타겟팅 후 분해된다는 것을 나타내었다(Muquit *et al.* (2006) *J Neurochem.* **98**, 156-169). 전장 PINK1 단백질은 미토콘드리아 분획 또는 세정제(Tween-20)-불용성 분획에 우선적으로 존재하는 반면, 상기 55-kDa PINK1 단백질은 세포질 분획에서 발견된다. PINK1의 3가지 이소폼(isoform) 중에서, ΔN 55는 프로테아좀(proteasome) 억제제가 있는 곳에 고도로 축적되었는데, 이는 ΔN 55가 유비퀴틴(ubiquitin)-프로테아좀 시스템에 의해 분해된다는 것을 나타낸다(Lin and Kang (2008) *J Neurochem.* **106**, 464-474). 최근, H^+ 에 대한 막투과성을 증가시킴으로써 미토콘드리아를 탈분극시키는 카르보닐 시아니드 m-클로로페닐히드라존(carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone, CCCP) 처리는 파킨슨(Parkin)을 안정적으로 발현하는 헬라 세포(Hela cell)에서 내인성 전장 PINK1을 증가시키는 것으로 보고되었다(Derek *et al.* (2010) *PLoS Biol.* **8**, 1-21). 세포질 및 미토콘드리아에서 복잡한 엔도프로테올리틱(endoproteolytic) 과정 및 다른 PINK1 이소폼의 분해를 조사하기 위해, 본 발명자들은 전장 또는 55-kDa PINK1 단편을 특이적으로 인식하는 2가지 항-PINK1 항체를 만들었다. 상기 PINK1-이소폼 특이 항체를 사용하여, 본 발명자들은 시험관내(*in vitro*)에서 세포내 위치 및 PINK1 이소폼의 대사에 대한 미토콘드리아 탈분극 또는 프로테아좀 억제의 효과를 조사하였다.

[0004] 한국등록특허 제10-0944636호에는 파킨슨병 병리유전자 마커를 탐색할 수 있는 DJ-1 상실 변이세포주가 개시되어 있으며, 한국등록특허 제10-0644364호에는 파킨슨병 유전자 마커 및 이를 이용한 파킨슨병 진단 키트가 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 인간 PINK1 단백질의 1번 내지 21번 아미노산으로 이루어진 펩티드로 토끼를 면역화시키고, 상기 면역화된 토끼의 혈청으로부터 정제된 다클론 항체를 전장 인간 PINK1 단백질을 특이적으로 인지하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 인간 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) 단백질의 아미노 말단으로부터 1번째 ? 21번째 아미노산 부위를 인지하는 다클론 항체를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 PINK1 다클론 항체를 사용하여 생물학적 시료 내 PINK1을 정량하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 인간 PINK1 다클론 항체는 인체 뇌 조직의 PINK1를 효과적으로 검출할 수 있으므로, 향후 파킨슨병이나 기타 퇴행성 신경질환의 발병에 PINK1 단백질이 관여하는 기전이 밝혀짐에 따라 질환 표식자(바이오마커)로 이용될 가능성이 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 PINK1 단백질에 있는 기능적 도메인을 나타내는 모식도이다. 항체(21A8 또는 MAV21)를 생산하기 위해 사용된 면역원은 아래쪽에 라인으로 표시하였다. 숫자는 아미노산 잔기를 나타낸다. MTS: N-말단 미토콘드리아 타겟팅 신호, TM: 트랜스메브레인 도메인, N: N-말단 및 C: C-말단.

도 2는 PINK1 단백질을 일시적으로 또는 안정적으로 발현하는 세포에서 생성된 PINK1의 이소폼을 나타낸다. 도 2a 및 2b는 pcDNA 빈 벡터 (mock), pcDNA-PINK1 (PINK1), pcDNA-PINK1-Myc-His (PINK1-Myc-His), 또는 pRK5-Myc-PINK1 (Myc-PINK1)으로 일시적으로 트랜스펙션시킨 HEK 293T 세포 유래의 세정제-가용성 분획의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. 항-c-Myc 항체는 발현된 PINK1을 검출하기 위해 사용되었고, 블롯은 다클론 항-PINK1 항체

(MAV21)로 리프로브(reprobe) 되었다. 전장 PINK1 단백질(화살표 머리)은 약 65 kDa이었고, N-말단적으로 분해된 PINK1 단편은 55 kDa (짧은 화살표) 및 45 kDa (긴 화살표)이었다. 45 kDa의 PINK1 단편은 이중으로 분리되었다(a). 표지와는 상관없이, MAV21 항체는 오직 전장 PINK1만을 인식하였다. 도 2c는 PINK-Myc-His를 안정적으로 발현하는 SHSY5Y 세포 유래 세포질-가용성 분획의 웨스턴 블롯 분석 결과이다. C-말단 표지에 대한 항-c-Myc 항체는 전장 PINK1 (화살표 머리) 및 N-말단적으로 분해된 PINK1 단백질(짧은 화살표 및 긴 화살표)의 2가지 이소폼을 나타낸다. MAV21 항체는 상기 안정적인 세포주에서 전장 PINK1-Myc-His 단백질을 인식한다. 도 2d는 MAV21 항체에 의한 전장 PINK1의 신호가 과량의 PINK1 펩티드 항원(107 내지 127번 아미노산) 첨가 후 사라진 것을 보여준다. 90 kDa의 밴드(별표)는 MAV21 항체와 교차반응한다. β -액틴의 발현은 도 2a 내지 2d에서 단백질 로딩에 대한 대조군으로서 나타내었다. 표준 분자량(kDa)은 오른쪽에 나타내었다.

도 3은 PINK1-Myc-His를 안정적으로 발현하는 SHSY-5Y 세포의 세포하 분획화 결과이다. 세포는 분별 원심분리법을 사용하여 세포질-(C) 및 미토콘드리아-풍부 분획(M)을 제조하기 위해 수확되었다. 도 3a는 항-c-Myc 항체로 프로브된 웨스턴 블롯이 전장 PINK1 (화살표 머리) 및 N-말단적으로 분해된 PINK1 단편의 2가지 이소폼(55 kDa (짧은 화살표) 및 45 kDa (긴 화살표))을 나타내는 결과이다. 전장 PINK1 단백질이 미토콘드리아-풍부 분획에 우선적으로 위치하는 반면, 55-kDa 및 45-kDa PINK1 단편은 세포질- 및 미토콘드리아-풍부 분획에 존재하였다. 도 3b는 MAV21 항체로 리프로브한 상기 동일한 블롯이 미토콘드리아-풍부 분획에서 전장 PINK1 단백질의 검출을 가능하게 한다는 것을 나타낸다. 더 긴 시간의 노출은 세포질 분획에서 전장 PINK1 단백질의 약한 신호를 나타내었다 (도 3b, 아래쪽).

도 4는 55-kDa PINK1 단편의 프로테아좀 분해를 나타낸다. 도 4a는 PINK1을 안정적으로 발현하는 SHSY-5Y 세포를 MG132 (5 μ M)로 0.5 내지 16시간 동안 처리한 다음, 항-c-Myc 항체 또는 MAV21 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. N-말단적으로 분해된 55-kDa PINK1 단백질은 MG132로 세포 처리 후 현저하게 축적되었다. 8시간보다 더 긴 시간 동안 MG132의 처리는 전장 PINK1의 축적을 야기하였다. 도 4b는 pcDNA-PINK1-Myc-His로 일시적으로 트랜스펙션된 HEK293T 세포에서, 3시간 동안 프로테아좀 억제제 처리가 55-kDa PINK1 단편의 축적을 야기하였지만, 전장 PINK1의 축적은 야기하지 않았다는 것을 나타낸다. 55-kDa PINK1 단편 위쪽의 추가적인 밴드[55kDa-PINK1-(Ub)_n]는 오직 프로테아좀 억제제 처리 후에만 나타났다. 도 4c는 3시간 동안의 프로테아좀 억제제 처리 후 PINK1-Myc-His를 안정적으로 발현하는 SHSY5Y 세포의 세포질-(C) 및 미토콘드리아-풍부 분획(M)을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸다. 55-kDa PINK1 단편은 프로테아좀 억제제 처리 후 세포질 및 미토콘드리아 분획에 축적된 반면, 전장 PINK1의 미토콘드리아 발현 수준은 프로테아좀 억제에 의해 변화되지 않았다. 55-kDa PINK1 단편 위쪽에 추가적인 밴드가 나타났다. 도 4d는 pcDNA 빈 벡터(mock) 또는 pcDNA용균액-His (PINK1-Myc-His)를 안정적으로 발현하는 SHSY5Y 세포 유래 세포 용균액(lysate)의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 또한 세포 용균액이 3시간 동안의 프로테아좀 억제제 처리 후 상기와 동일한 안정적인 세포주에서 제조되었다 (PINK1-Myc-His/MG132 처리). Ni-NTA 컬럼 (PINK1-Myc-His/Ni-NTA 정제)을 사용하여 상기와 동일한 안정적인 세포주로부터 정제된 PINK1 단백질은 PINK1의 3가지 이소폼에 대해 양성 대조군으로 사용되었다. 항-PINK1 단클론성 항체 (21A8)는 55-kDa PINK1 단편을 특이적으로 인식한다. 프로테아좀 억제제로 처리한 세포에서, 55-kDa PINK1 단편 위쪽에 몇몇 추가적인 밴드[55 kDa-PINK1-(Ub)_n]가 검출되었다. 도 4e는 21A8 항체에 의한 55-kDa PINK1의 신호가 과량의 PINK1 펩티드 항원 (98 내지 117번 아미노산) 첨가 후 사라진 것을 보여준다. β -액틴 (도 4a 및 4b) 또는 α -튜불린 (도 4c)의 발현 수준은 단백질 로딩에 대한 대조군으로 나타내었고, Tom-20은 미토콘드리아 마커로서 사용되었다. 표준 분자량 (kDa)은 오른쪽에 나타내었다.

도 5는 PINK1 이소폼의 안정성에 대한 PINK1의 돌연변이 효과를 나타낸다. 자리 지정 돌연변이 유발을 이용하여, pcDNA-PINK1-Myc-His의 98번 및 101번 잔기 사이의 아미노산 측쇄가 반대의 특성(소수성에서 친수성, 및 이와 반대로)으로 돌연변이화 되었다. 야생형 또는 돌연변이 PINK1 구축물을 일시적으로 발현하는 SHSY-5Y 세포 유래 세포 용균액은 웨스턴 블롯에 의해 분석되었다. 전장 PINK1의 발현 수준은 PINK1-R98L을 제외하고 돌연변이 PINK1을 발현하는 세포에서 감소되었다. 대조적으로, 55-kDa PINK1 단편의 발현 수준은 돌연변이의 위치와는 상관없이 증가되었다. β -액틴의 발현은 단백질 로딩에 대한 대조군으로서 사용되었다. 표준 분자량(kDa)은 오른쪽에 나타내었다. pcDNA 빈 벡터 (Mock), 야생형 PINK1 (PINK1 WT), PINK1 돌연변이체 R98(Ψ +) > L(Φ) (PINK1-R98L); A99(Φ) > E(Ψ) (PINK1-A99E); V100(Φ) > D(Ψ -) (PINK1-V100D); F101(Φ) > C(Ψ) (PINK1-F101C).

도 6은 미토콘드리아 탈분극 후 다른 세포 구역에서 전장 및 55-kDa PINK1 단편의 축적을 나타낸다. 도 6a는 PINK1을 안정적으로 발현하는 SHSY-5Y 세포를 DMEM + 혈청에서 0 내지 3시간 동안 10 μ M CCCP로 처리한 결과를 나타낸다. 총 세포 용균액은 SDS-PAGE에 의해 분리되었고, 전장 PINK1에 대한 MAV21 항체 및 55-kDa PINK1 단편에 대한 21A8 항체를 이용하여 웨스턴 블롯에 의해 분석되었다. 전장 PINK1 발현 수준의 큰 증가가 30분째에

관찰되었고 적어도 3시간 동안 지속되었다. 55-kDa PINK1 단편의 발현 수준 증가는 CCCP 처리 후 또한 나타났다. 도 6b는 10 μ M CCCP 및/또는 5 μ M MG132로 3시간 동안 처리한 PINK1을 안정적으로 발현하는 SHSY-5Y 세포 유래 총 세포 용균액의 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸다. 전장 및 55-kDa PINK1의 발현 수준은 CCCP 처리 후 증가한 반면, 55-kDa PINK1 단편의 축적은 프로테아좀 억제제 처리 후 나타났다. 도 6c는 10 μ M CCCP 및/또는 5 μ M MG132로 3시간 동안 처리 후 상기 동일한 세포의 세포질 분획화를 나타낸다. CCCP 처리 후, 전장 PINK1은 미토콘드리아 분획(M)에 축적한 반면, 55-kDa PINK1 단편의 발현 수준은 세포질 분획(C)에서 증가하였다. 도 6d는 미토콘드리아 탈분극 후 내인성 PINK1(화살표 머리)의 발현을 나타낸다. β -액틴의 발현은 단백질 로딩에 대한 대조군으로서 사용되었다. 표준 분자량(kDa)은 오른쪽에 나타내었다. Tom-20은 미토콘드리아 마커로서 사용되었다.

도 7은 PINK1을 발현하는 SHSY-5Y 세포의 미토콘드리아 및 세포질에서 PINK1 이소폼의 세포질 분포를 나타낸다. 도 7a는 pcDNA-PINK1-Myc-His로 트랜스펙션된 SHSY-5Y 세포를 나타낸다. 이중 면역 형광이 전장 PINK1 (도 7a, 위쪽 열) 및 55-kDa PINK1 단편 (도 7b, 아래쪽 열)에 대해 보여졌다. 전장 PINK1은 미토타커(mitotracker)로 라벨링된 미토콘드리아에 공위치한다. 미토타커-라벨링 미토콘드리아에 공분포하지 않는 PINK1-양성 점(puncta)들이 소수 나타났다(도 7a, 화살표). 55-kDa PINK1 단편은 미토콘드리아에 공위치할 뿐만 아니라 세포질에도 축적된다 (도 7a, 아래쪽 열). 도 7b는 전장 PINK1이 55-kDa PINK1 단편과 함께 핵주변에 공분포한다는 것을 보여준다. 전장 PINK1에 비해, 55-kDa PINK1 단편은 세포질 및 세포의 주변부에 더 풍부하였다. 또한 내인성 전장 PINK1은 MAV21 항체를 사용하여 검출되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 인간 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) 단백질의 아미노 말단으로부터 1번째 ? 21번째 아미노산 부위를 인지하는 다클론 항체를 제공한다. 상기 다클론 항체는 전장 인간 PINK1 만을 특이적으로 인지할 수 있다. 상기 다클론 항체는 바람직하게는 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 검출 표지체가 결합될 수 있으며, 상기 검출 표지체는 효소, 형광물질, 발광물질 또는 방사성 물질일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0011] 본 발명의 다클론 항체는 면역원(항원)으로 면역시킨 포유동물의 혈청에서 분리하여 얻을 수 있다. 상기 포유동물은 바람직하게는 마우스, 토끼 또는 염소일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 항체의 제조에 이용되는 포유동물은 더 많은 항체를 분리할 수 있는 더 많은 양의 혈청을 가지는 비교적 큰 포유동물이 우선적으로 선택될 수 있다. 상기 포유동물에 면역원이 주입되면, 면역계의 B 세포를 자극하여 면역원에 대해 특이적인 면역글로불린(Ig, immunoglobulin)이 생산된다. 상기 면역글로불린은 여과, 투석, 이온 교환 크로마토그래피, 크기배제 크로마토그래피 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 혈청으로부터 정제될 수 있다. 상기 항체의 제조에 있어서, 주사되는 면역원에 대한 포유동물의 면역 반응을 증강시킬 목적으로 Freund's, Alum, the Ribi Adjuvant System 또는 Titermax와 같은 면역 보강제(adjuvant)가 주입될 수 있다. 상기 면역 보강제는 항원과 혼합하였을 때 항원성을 높여 항체가 많이 생성되도록 도와주는 역할을 한다.
- [0012] 상기 용어 "항체"는 당업계에 공지된 용어이며 공지된 항원에 결합하는 분자 또는 분자의 활성 단편을 의미한다. 공지된 항원에 결합하는 활성 단편의 예는 Fab 및 F(ab)₂ 단편을 포함한다. 상기 활성 단편은 수많은 기술에 의해서 본 발명의 항체로부터 유도될 수 있다. 예를 들면, 정제된 단클론성 항체는 펩신 같은 효소에 의해 절단되어 HPLC 겔 여과시킬 수 있다. Fab 단편을 함유하는 적합한 분획을 수집하여 막 여과 등에 의해 농축시킬 수 있다. 항체의 활성 단편 분리에 대한 일반적인 기술들에 대한 설명은 문헌[예를 들면, Khaw, B.A. et al., J. Nucl. Med. 23: 1011-1019 (1982)]을 참조한다. 용어 "항체"는 또한 이특이적(bispecific) 및 키메라(chimeric) 항체를 포함한다.
- [0013] 본 발명의 항체는 검출 가능한 물질, 즉 검출 표지체와 커플링시켜 검출을 용이하게 할 수 있다. 검출 표지체의 예는 다양한 효소, 보결분자족, 형광 물질, 발광 물질, 생물 발광 물질 또는 방사성 물질 등을 포함한다. 검출 표지체는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 본 발명의 PINK1 다클론 항체에 직접적으로 커플링 또는 결합 되거나, 중간체(예를 들면, 당해 분야에 공지된 링커)를 통해 간접적으로 커플링 또는 결합 되거나, PINK1 단백질을 인식하는 또 다른 다클론 항체 또는 PINK1 항체를 인식하는 항체인 2차 항체에 커플링 또는 결합될 수 있다. 적합한 효소의 예는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 아세틸콜린 에스테라제, 퍼옥시다아제, 알칼라인 포스파타아제, β -D-갈락토시다아제, 글루코스 옥시다아제, 말레이트 디하이드로게나아제, 글루코스-6-인산 디하이드로게나아제 또는 인버타제 등을 포함하고; 적합한 보결분자족 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 또는 아비딘/비오틴을

포함하고; 적합한 형광 물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 댄실 클로라이드, 피코에리트린 또는 피코빌리프로테인 등을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀, 이소루시놀 또는 루시제닌을 포함하고; 생물 발광 물질의 예는 루시페라제, 루시페린 또는 아에쿠오린을 포함하며; 적합한 방사선 물질의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In , ^{99}Tc , ^{14}C 또는 ^3H 등을 포함할 수 있으나, 이제 제한되지는 않는다.

[0014] 또한, 본 발명은

[0015] i) 검출 표지제와 결합된 본 발명의 PINK1 다클론 항체와 생물학적 시료를 접촉시키는 단계,

[0016] ii) 단계 i)에서 수득된 면역학적 복합체를 정량 검출하는 단계,

[0017] iii) 검출 표지제와 결합된 제1항의 PINK1 다클론 항체와 정제된 PINK1 항원을 접촉시켜 수득된 면역학적 복합체를 정량화하여 표준 곡선을 수득하는 단계, 및

[0018] iv) 단계 ii)에서 정량 검출된 단백질의 양을 단계 iii)에서 수득된 표준곡선과 비교하여 생물학적 시료 내에 존재하는 PINK1을 정량하는 단계

[0019] 를 포함하는, PINK1 다클론 항체를 사용하여 생물학적 시료 내 PINK1을 정량하는 방법을 제공한다. 상기 생물학적 시료는 세포, 조직 또는 생물학적 유체를 포함하는 생물학적 물질을 포함할 수 있다. 본 발명에 있어서, 항원을 검출하고/하거나 정량하는데 사용되는 수많은 면역분석법들이 당업자에게 공지되어 있으며, 문헌[Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988, 556-612]을 참조한다.

[0020] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0021] **재료 및 방법**

[0022] **분자적 클로닝**

[0023] 전장 인간 PINK1 cDNA는 *Hind*III 및 *Xho*I (New England Biolabs)을 이용한 pcDNA3.1-PINK1(+) 구축물(Nakamura 박사에 의해 제공)의 제한효소 분해에 의해 pcDNA3.1-Myc-His (Invitrogen)내로 서브클로닝되었다. 상기 원래의 구축물에서 종결코돈은 PINK1의 C-말단에 myc 에피토프(epitope) 표지 및 폴리-히스티딘 표지의 융합을 가능하게 하는 종결코돈을 결핍시키는 역(reverse) ATACTCGAGCAGGGCTGCCCTCCATGAGCAG(서열번호 2) 서열에 의해 생성된 PCR 산물로 대체되면서 제거되었다. pRK5-Myc-PINK1 구축물은 Nick Wood 박사로부터 제공받았다. 모든 구축물은 시퀀싱에 의해 확인되었다.

[0024] **PINK1 다클론 항체 생산**

[0025] 토끼 항-PINK1 항체 (MAV21)는 성숙 인간 PINK1의 아미노산 1 내지 21에 해당하는 펩티드 MAVRQALGRGLQLFRALLRF로부터 생성되었다. 펩티드는 제조자의 설명에 따라 BSA 단백질로 컨쥬게이션되었고, 펩티드 컨쥬게이트의 동일한 양은 3주 마다, 총 4회로 피하 및 근내 주사되었다. 펩티드 항혈청은 제조자의 설명에 따라 protein-A-agarose (Pierce)를 사용하여 정제되었다.

[0026] **PINK1 단클론성 항체 생산**

[0027] 마우스 항-PINK1 단클론성 항체 (21A8)는 성숙 인간 PINK1의 아미노산 98 내지 117에 해당하는 펩티드 RAVFLAFGLGLIEEKQAE로부터 생성되었다. 마우스는 Freund's complete adjuvant에 유화된 100 μg 의 단백질로 초기 피하주사 되었고, 이어서 21일 및 42일째에 Freund's incomplete adjuvant에 유화된 50 μg 의 단백질로 추가 피하주사 되었다. 그리고, 109일째에 PBS에 용해된 50 μg 의 단백질로 복강주사 되었다. 112일째에 비장이 제거되었고, 림프구는 폴리에틸렌 글리콜 1500을 사용하여 골수종 세포 (line Sp2/0-Ag14)로 융합되었다. IgG는 Hitrap Protein G Sepharose column (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)을 사용하여 정제되었다.

[0028] 세포 배양 및 PINK1을 안정적으로 과발현하는 세포주의 생성

[0029] 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 및 인간 배아 신장 HEK 293T 세포 (ATCC)는 37℃, 95%의 습도 및 5% 이산화탄소 조건에서, 10% FBS 및 1% (vol/vol) 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 DMEM (Invitrogen)에서 유지되었다. PINK1-Myc-His를 발현하는 안정적인 트랜스펙탄트(transfectant)는 제조자의 설명에 따라 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 사용하여 SH-SY5Y 인간 신경모세포종 세포에서 각각의 발현 벡터의 트랜스펙션 후 획득되었다. 트랜스펙션된 세포는 500 µg/mL G418 (Invitrogen)을 포함하는 선택 배지에서 20일 동안 대량으로 배양되었고, 그 후 각 콜로니는 확대되었고 웨스턴 블로팅으로 단백질 발현에 대해 스크리닝 되었다. 대조군으로서, pcDNA3.1 빈(empty) 벡터를 안정적으로 발현하는 세포주가 유사한 프로토콜에 따라 또한 만들어졌다.

[0030] 면역 세포 화학 및 공초점 현미경

[0031] Superfect (Qiagen) 또는 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 사용하여 다양한 구축물과 일시적으로 트랜스펙션되고, 제조자의 설명에 따라 처리된 세포는 유리 커버슬립(coverlip)에서 배양되었다. 1차 항체는 토끼 항-PINK1 항체 (MAV21), 마우스 항-PINK1 항체 (21A8), 마우스 항-Myc 항체 (Santa Cruz) 및 토끼 항-Tom20 항체 (Santa Cruz)였다. 2차 항체는 Alexa Fluor 594 또는 Alexa Fluor 488 (Invitrogen)으로 컨쥬게이션된 적절한 종의 IgG 였다. 미토콘드리아 라벨링을 위해, 세포는 Mito-Tracker Red CMXRos (Invitrogen)로 제조자의 설명에 따라 45분 동안 배양되었다. 디지털 이미지는 Laser Scanning Microscope (LSM) 700 (Zeiss, Germany)을 이용하여 획득되었다. 이미지는 LSM image browser 및 Adobe Photoshop CS3 프로그램 (Adobe Inc., CA)을 사용하여 처리되었다.

[0032] 미토콘드리아 분획법

[0033] 미토콘드리아 분획의 분리는 미토콘드리아 분리 키트(Pierce)에 기재된 바와 같이 수행되었다. 각 분획의 순도는 항-Tom20 및 항-β-액틴 항체를 사용하여 결정되었다. 세포질 분획은 제조자의 설명에 따라 centricon YM-10 장치 (Millipore)를 사용하여 농축되었다. 또한, 세포질(cytosolic) 분획은 Kegel 등(2000, *J Neurosci.* **20**, 7268-7278)이 기재한 바와 같이 분별 원심분리법을 사용하여 제조되었다.

[0034] 트랜스펙션된 세포로부터 세포 용균액의 제조 및 웨스턴 블롯 분석

[0035] SHSY-5Y 및 HEK 293T 세포는 6-cm 조직 배양 플레이트에서 컨플루언스(confluence)로 배양되었다. 배지는 제거되었고, 세포는 얼음-냉각된 PBS로 2번 세척된 후 protease inhibitor cocktail (complete, mini-EDTA-free; Boehringer Mannheim)을 포함하는 용균 완충액 (20 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% NP-40, 2 mM EDTA)을 첨가하여 용균되었고 얼음에서 15분 동안 인큐베이션 되었다. 용균액은 수확되어 4℃, 16,000×g에서 15분 동안 원심분리되었다. 상등액은 저장되었고, 불용성 펠렛은 세정제를 포함하는 동일한 완충액에 재현탁되어 초음파 처리되었다. 단백질 농도는 BCA 방법(Pierce)에 의해 결정되었다.

[0036] 샘플은 10% 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 SDS-PAGE에 의해 분리되었고, 니트로셀룰로오스로 이동되었다. 웨스턴 블롯 분석에 사용된 항체 농도는 토끼 항-PINK1 항체(MAV21)는 1:500, 마우스 항-PINK1 항체(21A8)는 1:100, c-Myc (9E10) 항체(Santa Cruz)는 1:1,000, β-액틴(Santa Cruz), α-튜불린(Santa Cruz) 및 Tom20 (Santa Cruz) 항체는 1:2,000 이었다. 블로킹 완충액은 TBST (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl 및 0.01% Tween 20)에 용해시킨 5% 밀크가 사용되었다.

[0037] 실시예 1: 세포에서 PINK1 단백질의 전장 및 분해 형태의 세포하 위치

[0038] 인간 PINK1은 N-말단에 추정 MTS, 상기 MTS 바로 뒤에 위치하는 트랜스멤브레인 도메인, 및 C-말단에 세린-트레오닌 키나제 도메인을 포함하는 581개의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드이다(도 1) (Valente *et al.* (2004) *Science* **304**, 1158-1160). Zhou 등(2008, *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**, 12022-12027)은 PINK1이 미토콘드리아 외막에 걸쳐있으며, N-말단의 끝은 미토콘드리아 내부에, 키나제 도메인은 세포질을 향한다고 제안하였다.

PINK1은 N-말단 영역 내부에서 세포에서 분해된다고 보고되었다 (Takatori *et al.* (2008) *Neurosci Lett.* **430**, 13-17). 상기의 발견을 확인하기 위해, 본 발명자들은 표지를 하지 않았거나 또는 C-말단 영역에 myc-His 표지를 한 PINK1 단백질을 HEK 293T 세포에서 발현시켰다. 본 발명자들은 65-kDa 전장 PINK 단백질뿐만 아니라 55 kDa 및 45 kDa의 PINK1 분해 단편도 확인하였다(도 2a 및 2b). 45-kDa PINK1 단편은 이중 밴드로 분석되었다. 또한, SHSY-5Y 신경세포에서 PINK1 단백질의 발현은 전장 PINK1 및 2개의 분해 단편을 나타내었다(도 2c). 본 발명자들은 PINK1의 에피토프에 대한 다클론 항체(MAV21)를 만들었고, 이는 인간 PINK1 단백질을 발현하는 HEK 293T 또는 SHSY-5Y 세포 유래 세포 용균액의 웨스턴 블롯에서 오직 전장 PINK1 단백질을 인식하였다(도 2d).

[0039] 면역 형광 및 공초점 현미경을 이용한 연구는, PINK1 단백질이 미토콘드리아에 위치한다는 것을 발견하였다 (Beilina *et al.* (2005) *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**, 5703-5708). 다른 연구자들은 PINK1 단백질의 N-말단적으로 분해된 형태가 세포질에 위치하고, 프로테아좀에 의해 분해된다는 것을 보고하였다. 전장 또는 N-말단적으로 분해된 PINK1 단백질의 세포하 위치를 조사하기 위해, 인간 PINK1 단백질을 안정적으로 발현하는 세포의 세포하 분획이 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 조사되었다(도 3). 전장 PINK1 단백질은 주로 미토콘드리아에 위치한 반면(도 3b), N-말단적으로 분해된 2개의 PINK1 단백질(55 kDa 및 45 kDa)은 세포질 및 미토콘드리아 분획에 존재하였다(도 3a). 상기 결과는 55-kDa 및 45-kDa PINK1 단백질이 미토콘드리아에 위치한 후 전장 PINK1의 분해에 의해 생성된다는 것을 제안한다.

[0040] 프로테아좀에 의해 분해된 PINK1 단백질의 이소폼을 조사하기 위해, PINK1 단백질을 발현하는 세포는 MG132로 처리되었다(도 4). N-말단적으로 분해된 55-kDa의 PINK1 단백질은 SHSY-5Y 세포(PINK1-Myc-His 단백질을 안정적으로 발현하는)를 MG132로 2시간 동안 처리한 후, 현저하게 축적된 반면(도 4a), 전장 PINK1은 프로테아좀 억제제 처리 후 축적되지 않았다. MG132로 8시간 이상 동안 상기 세포의 장기간 처리는 전장 PINK1 단백질의 축적을 야기하였고, 이는 아마도 세포에서 프로테아좀 억제제로 인한 신호 변화의 간접적 효과일 것이다. 유사하게도, PINK1-Myc-His 단백질을 일시적으로 발현하는 HEK 293 세포는 3시간 동안 프로테아좀 억제제 처리 후 55-kDa PINK1 단백질은 축적하였지만, 전장 PINK1 단백질은 축적하지 않았다(도 4b). 흥미롭게도, PINK1-발현 세포가 MG132로 처리되었을 때, 55-kDa PINK1 단백질 위쪽에 몇몇 밴드가 나타났는데, 이는 항-c-Myc 항체에 대해 면역 반응성이었다(도 4b). 프로테아좀 억제제 55-kDa PINK1 단백질이 축적된 세포하 구역을 조사하기 위해, PINK1-Myc-His 단백질을 안정적으로 발현하는 세포는 분획화되었고, 세포 용균액은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 조사되었다(도 4c). 프로테아좀 억제제 처리에 의한 55-kDa 단백질의 축적은 미토콘드리아 및 세포질 분획에서 발견되었다. 프로테아좀 처리 후에 존재하는 상기 55 kDa 밴드는 미토콘드리아 분획에서만 발견되었다. 종합해 보면, 상기 데이터는 미토콘드리아 및 세포질에 존재하는 55-kDa PINK1 단백질이 유비퀴틴 프로테아좀 시스템에 의해 분해된다는 것을 나타낸다.

[0041] 실시예 2: 55-kDa PINK 단백질에 대한 분해 부위(cleavage site)의 추정 및 55-kDa PINK1 단백질을 특이적으로 인식하는 항체의 생성

[0042] 대부분의 미토콘드리아 전서열(presequence)은 분해 부위로부터 -2 위치에 아르기닌 잔기("R - 2 법칙") 및 +1 위치에 방향족 측쇄를 갖는 잔기를 포함하는 것으로 알려졌다(Kitada *et al.* (2003) *J Biol Chem.* **278**, 1879-1885). 본 발명자들은 전장 PINK1 단백질이 55-kDa PINK1 단백질을 생성하기 위해 N-말단 트랜스메브레인 도메인 내에 있는 아르기닌(98번 잔기)으로부터 1 또는 2 아미노산 위치인 가능성 있는 분해 부위에서 미토콘드리아 펩티다제에 의해 처리된다고 예상하였다. PINK1 단백질의 55-kDa 단편을 특이적으로 인식하는 단클론성 항체를 만들기 위해, 본 발명자들은 98 내지 117번 아미노산에 해당하는 PINK1 펩티드를 면역원으로 사용하였다. 항-PINK1 단클론성 항체(클론 21A8)는 55-kDa PINK1 단백질 단편을 특이적으로 인식하였지만(도 4d 및 4e), 총 세포 용균액 또는 Ni-NTA 아가로스에 의해 정제된 PINK1 단백질에 존재하는 전장 PINK1은 인식하지 못했다(도 4d). 프로테아좀 억제제 처리로 인해, 항체 21A8은 축적된 PINK1 단백질 및 55-kDa PINK1 단백질 위에 추가적인 사다리-유사(ladder-like) 밴드를 인식하였다. 상기 추가적인 밴드가 프로테아좀 억제제 처리 후 오직 2개의 다른 항체에서만 일관성 있게 관찰되었으므로, 본 발명자들은 상기 밴드가 55-kDa PINK1 단백질의 유비퀴틴화 형태와 같은 55-kDa PINK1 단백질의 변형된 형태라고 가정하였다.

[0043] PINK1의 분해가 트랜스메브레인 도메인의 인접 부위에서 발생한다고 가정하고, 본 발명자들은 N-말단에서 PINK1의 분해를 변형시키기 위한 일련의 돌연변이 PINK1 구축물을 만들었다. 자리 지정 돌연변이유발(site-directed mutagenesis)을 이용하여, 본 발명자들은 98 및 101번 잔기 사이에 아미노산 측쇄의 특성을 소수성에서 친수성으로, 또는 그 반대로 전환하였다. 야생형 또는 돌연변이 PINK1 구축물을 일시적으로 발현하는 세포 유래의 총

세포 용균액은 SDS-PAGE에 의해 분리되었고, 웨스턴 블롯이 수행되었다(도 5). 돌연변이 PINK1 단백질을 발현하는 세포에서, 전장 PINK1의 발현 수준은 R98L 돌연변이체를 제외하고, 야생형에 비해 감소하였다. 대조적으로, 55-kDa PINK1 단편의 발현은 돌연변이의 위치에 상관없이 야생형 단백질에 비해 약간 증가하였다. 종합해보면, 상기 데이터는 트랜스멤브레인 도메인 인접 부위에 단 하나의 아미노산 변화가 전장 PINK1 단백질의 안정성에 영향을 줄 수 있는 반면, 55-kDa PINK1 단편을 생성하기 위해 전장 PINK1을 처리하는 프로테아제에 대한 민감도에는 영향을 주지 않는다는 것을 나타낸다.

[0044] 실시예 3: PINK1 단백질 이소폼의 세포화 위치 및 분해에 대한 미토콘드리아 탈분극의 영향

[0045] PINK1 단백질의 C-말단 부분은 미토콘드리아의 표면에서 세포질 쪽을 향한다 (Zhou *et al.* (2008) *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**, 12022-12027). Narendra 등(2010)은 탈분극된 미토콘드리아에서 PINK1의 축적 및 오직 PINK1이 있는 곳에서 Parkin의 전위를 최근 보고하였다. 미토콘드리아 탈분극 후 PINK1의 이소폼이 축적하는 것을 조사하기 위해, PINK1-Myc-His 단백질을 안정적으로 발현하는 SHSY-5Y 세포가 CCCP로 처리되었고, 전장 또는 55-kDa PINK1 단백질의 발현 수준이 측정되었다 (도 6). 전장 PINK1 수준의 큰 증가는 30분째에 관찰되었고, 상기 수준은 적어도 3시간 동안 계속해서 증가하였다. CCCP 처리 후, 55-kDa PINK1 단편의 수준 또한 증가하였다 (도 6a). 55-kDa PINK1 단편의 축적 증가는 프로테아좀 억제제 처리 후 발생하였고, 이는 CCCP 처리 후 55-kDa PINK1 단백질의 축적이 미토콘드리아 탈분극에 대해 2차적인 유비퀴틴 프로테아좀 시스템의 기능 장애에 기인한 것이 아니라는 것을 제안한다. 본 발명자들은 PINK1을 일시적으로 발현하는 HEK 293T 세포에 CCCP 처리를 하는 유사한 실험을 수행하였고, 전장 및 55-kDa PINK1 단백질 수준의 증가를 확인하였다(데이터 미제시). 축적된 전장 또는 55-kDa PINK1 단백질의 세포화 위치를 조사하기 위해, 세포는 10 μ M CCCP 및/또는 5 μ M MG132로 3시간 동안 처리 후 미토콘드리아-풍부 및 세포질 분획으로 분획화되었다. CCCP 처리 후, 전장 PINK1은 미토콘드리아-풍부 분획에 축적된 반면, 55-kDa PINK1 단편은 세포질 분획에서 우선적으로 증가하였다(도 6c). 상기 결과는 탈분극된 미토콘드리아에 축적된 전장 PINK1 단백질이 세포질로 전위하는 55-kDa PINK1 단편을 생성하기 위해 처리된다는 것을 제안한다. 대조적으로, 프로테아좀 억제제 처리는 세포질에 전장 PINK1 단백질 및 미토콘드리아-풍부 분획에 55-kDa PINK1 단편의 발현 수준을 증가시킨다. 종합해보면, 상기 데이터는 미토콘드리아의 표면에 남아있는 55-kDa PINK1 단편 및 세포질에 있는 전장 PINK1 단백질이 유비퀴틴 프로테아좀 시스템에 의해 분해된다는 것을 나타낸다.

[0046] MAV21 항체가 내인성 PINK1 단백질을 인식하는지를 조사하기 위해, 본 발명자들은 야생형 SHSY-5Y 세포를 미토콘드리아 및 세포질 분획으로 분획화하였고, 세포 용균액은 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해 조사되었다 (도 6d). 적은 양의 내인성 전장 PINK1 단백질이 미토콘드리아 분획에서 확인되었지만 세포질 분획에서는 확인되지 않았다.

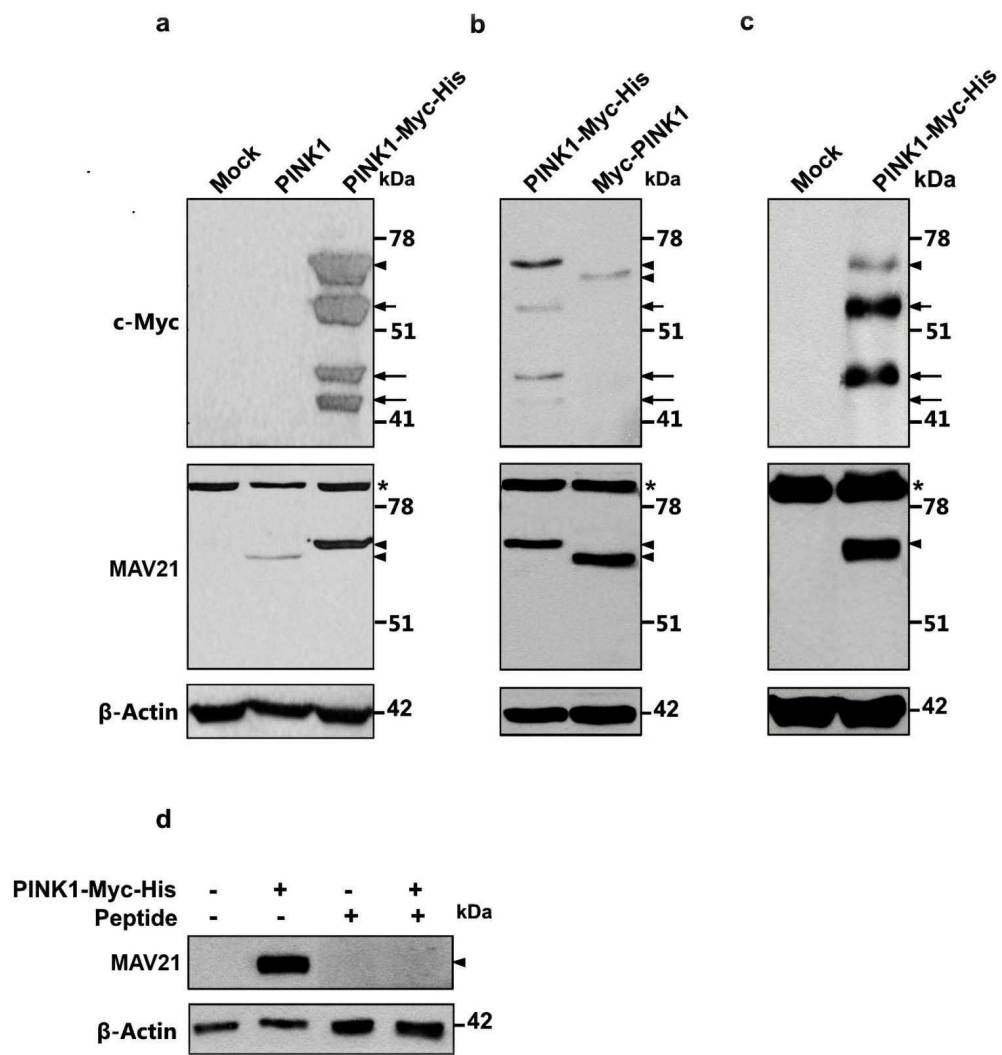
[0047] 대부분의 이전의 연구들은 세포질에서 55-kDa PINK1 단백질의 존재에 중점을 둔 반면 (Lin *et al.* (2008) *J Neurochem*. **106**, 464-474), 본 발명자들은 상기 단편이 미토콘드리아 및 세포질 분획에 존재하는 것을 관찰하였다. 55kDa PINK1 단백질의 미토콘드리아 위치를 확인하기 위해, 본 발명자들은 2가지 항-PINK1 항체를 사용하여 면역 형광 및 공초점 현미경 실험을 수행하였다. 상기 항체 중 하나는 전장 PINK1 단백질(MAV21)을 특이적으로 인식하고, 또 다른 하나는 55-kDa PINK1 단백질(21A8)을 특이적으로 인식한다. 전장 PINK1은 미토콘드리아에 주로 위치하는 반면, 55-kDa PINK1 단백질은 세포질 및 미토콘드리아에 위치하였다 (도 7).

도면

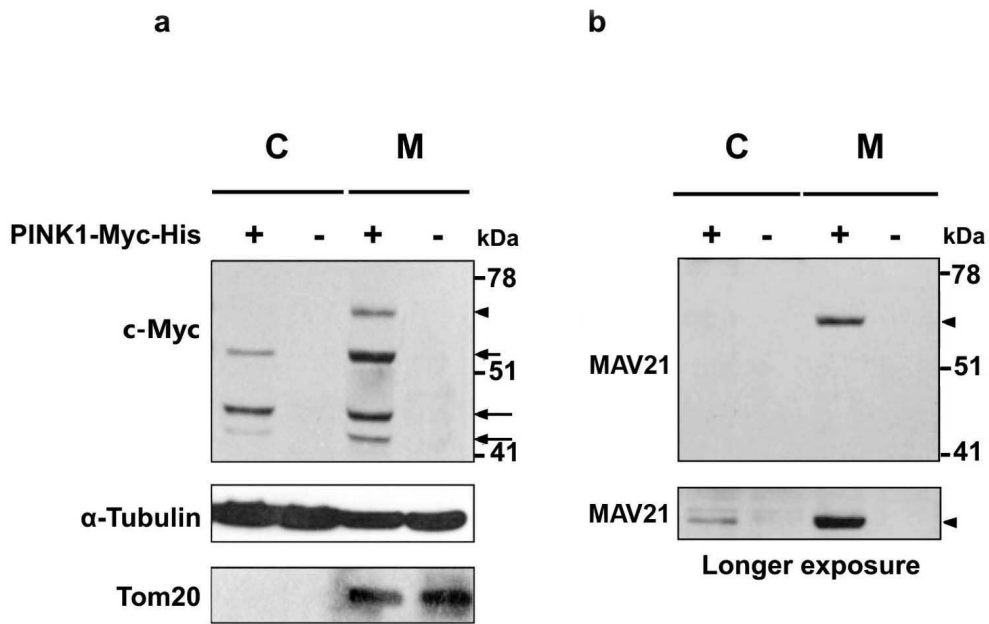
도면1



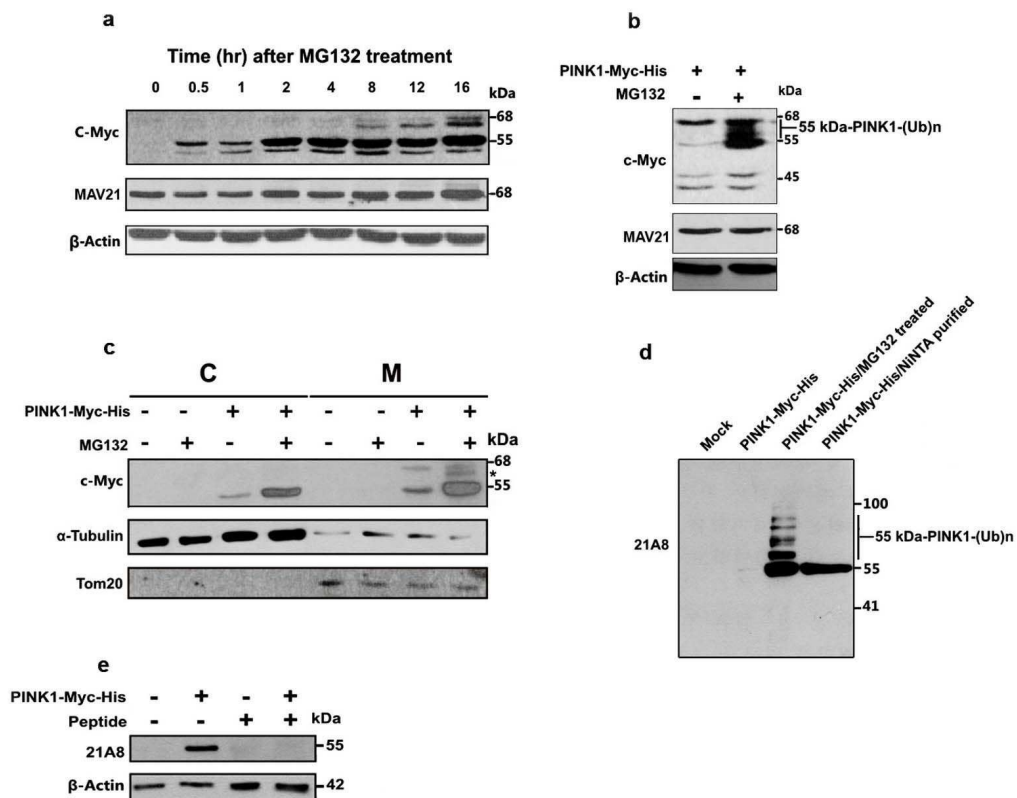
도면2



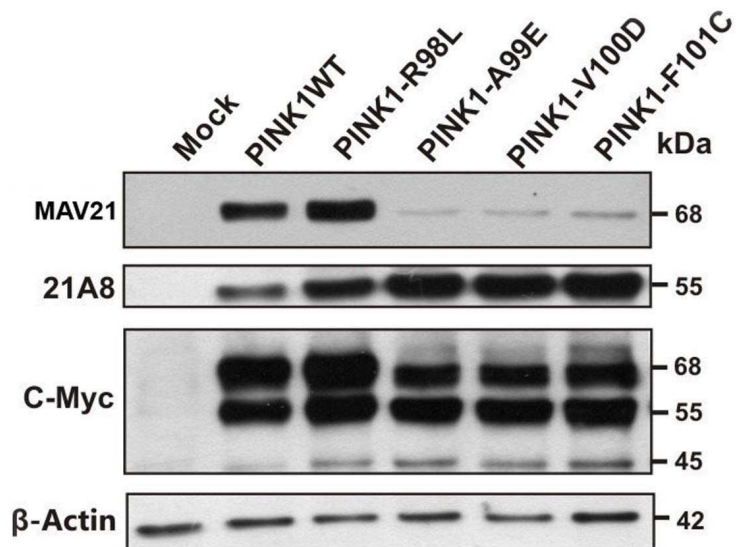
도면3



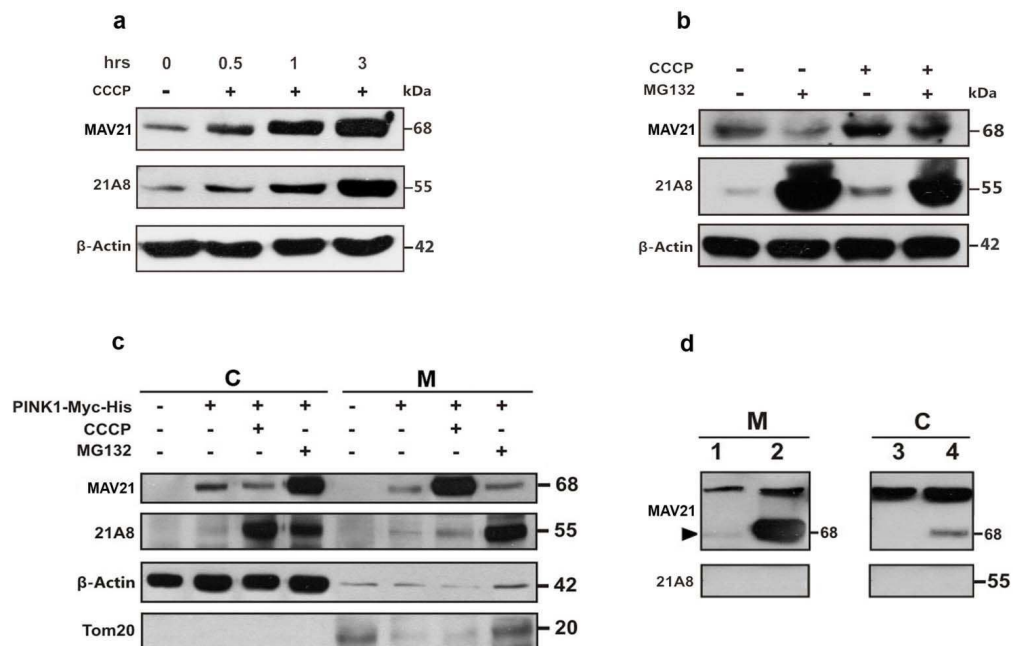
도면4



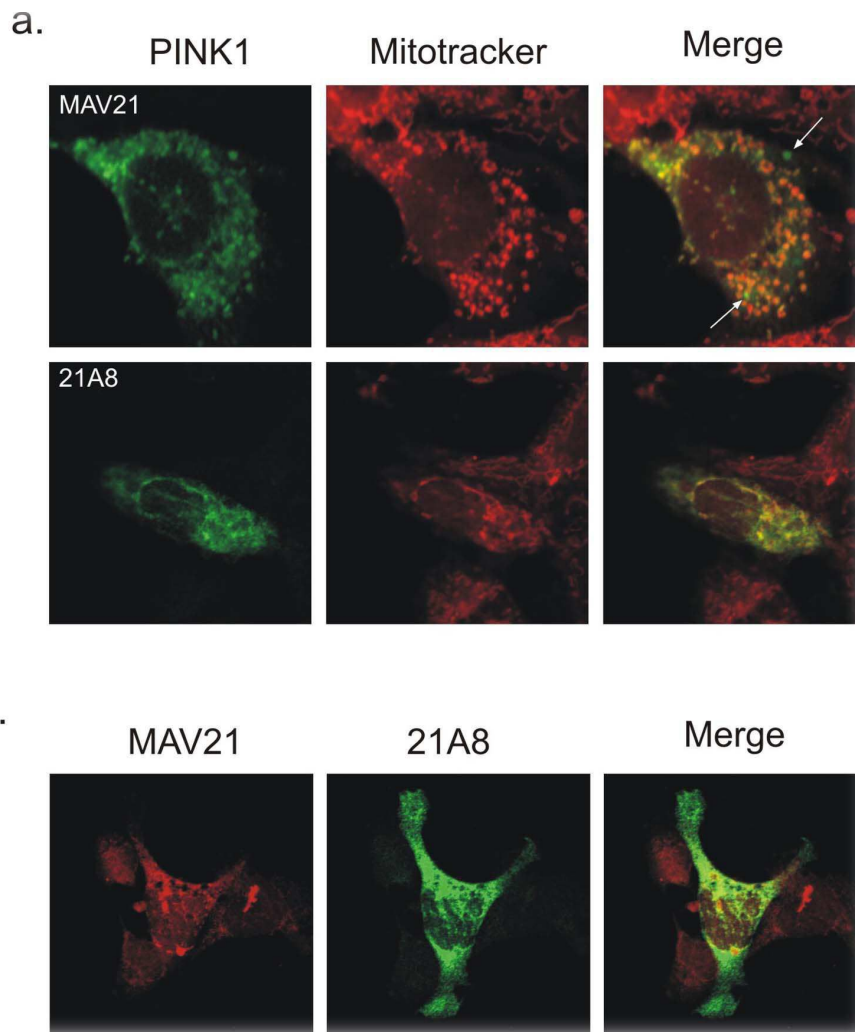
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Polyclonal antibody recognizing human full-length PTEN-induced putative kinase 1 protein and uses thereof
- <130> PN10161
- <160> 2
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 581
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Ala Val Arg Gln Ala Leu Gly Arg Gly Leu Gln Leu Gly Arg Ala

1 5 10 15

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

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

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

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

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

	515		520		525	
Gly Trp Leu Leu Gln Gln Ser Ala Ala Thr Leu Leu Ala Asn Arg Leu						
	530		535		540	
Thr Glu Lys Cys Cys Val Glu Thr Lys Met Lys Met Leu Phe Leu Ala						
545		550		555		560
Asn Leu Glu Cys Glu Thr Leu Cys Gln Ala Ala Leu Leu Leu Cys Ser						
		565		570		575
Trp Arg Ala Ala Leu						
	580					
<210>	2					
<211>	31					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220><223>	primer					
<400>	2					
atactcgagc agggctgcc tccatgagca g						