(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C07K 14/47

(11) 공개번호 특2003-0004354
(43) 공개일자 2003년01월14일

(21) 출원번호 10-2002-7010913
(22) 출원일자 2002년08월21일
번역문 제출일자 2002년08월21일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2001/01354
(86) 국제출원출원일자 2001년02월23일
(87) 국제공개번호 WO 2001/62915
(87) 국제공개일자 2001년08월30일

(81) 지정국 국내특허 : 오스트레일리아, 캐나다, 중국, 헝가리, 일본, 대한민국, 노르웨이, 미국,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 네덜란드, 스웨덴,

(30) 우선권주장 JP-P-2000-00048727 2000년02월25일 일본(JP)

(71) 출원인 다이이치세이야꾸 가부시끼가이샤
일본국 도쿄도 츄오쿠 니혼바시 3-14-10

(72) 발명자 스즈키마코토
일본국도쿄도나카노쿠카미사기노미야1-6-9
이시바시켄이치
일본국도쿄도스기나미쿠혼아마누마3-1-4

(74) 대리인 이돈상

심사청구 : 없음

(54) 신규 단백질 및 그것을 코드하는 유전자

요약

신규 단백질 및 그것을 코드하는 유전자를 제공한다.

신장에 특이적으로 발현하고, 기계자극에 응답하여 비선택적으로 양이온을 세포내에 거두어 들이는 기능을 갖는, 마우스 혹은 사람 유래의 신규한 기계자극 응답 채널 단백질. 그 단백질을 코드하는 DNA. 그 단백질을 사용하여 양이온 채널 활성을 항진 또는 저해하는 물질의 스크리닝 방법. 그 단백질에 대한 항체.

고혈압증이나 당뇨병 등의 양이온 채널의 이상에 기초하는 질환의 진단약 혹은 치료제. 또는 그 질환에 대한 예방 및/또는 치료제 탐색을 위한 도구로써 유용.

대표도

도 1

색인어

기계적 자극 응답 채널 단백질

명세서

기술분야

본 발명은, 신장(腎臟)에 특이적으로 발현하고, 마우스 혹은 사람 유래의 신규한 기계자극 응답 채널 단백질(SAC1(마우스) 및 hSAC(사람)), 그것을 코드하는 DNA, 그 단백질을 사용하여 양이온 채널 활성을 항진 또는 저해하는 물질의 스크리닝 방법, 및 그 단백질에 대한 항체에 관한 것이다.

본 발명의 단백질, DNA, 및 단백질에 대한 항체는, 고혈압증이나 당뇨병 등의 양이온 채널의 이상에 기초하는 질환의 진단약 혹은 치료제, 또는 그 질환에 대한 예방 및/또는 치료제 탐색을 위한 도구로써 이용할 수 있다. 그리고, 본 발명에 있어서는, SAC1 및 hSAC 등의 기계자극 응답 채널 단백질을, 총칭하여 SAC라고 부른다.

배경기술

이온 채널은, 지질 이중층을 기본 구조로 하는 생체막을 관통하여 존재하는 막내 재성(在性) 단백질이고, 그 내부에 기공구조를 가지고 있다. 이온 채널은, 그 전기(電氣)생리학적 성질, 즉 게이팅, 컨덕턴스, 이온 선택성 등에 의해 분류된다. 이온 채널 분자는, 복수의 컨포메이션을 취하고, 어떤 상태(열린 상태)에서는 이온의 투과를 허용하지만, 다른 상태(닫힌 상태)에서는 그것을 허용하지 않는다. 이러한 컨포메이션 변화를 「게이트의 개폐(게이팅 ; gating)」라고 부른다. 이 게이팅을 제어하는 인자로서는, 막전위(膜電位), 저분자(리간드)의 결합, 막의 신장(伸張)의 3가지가 알려져 있다.

전위 의존성 채널에는 Na^+ 채널, Ca^{2+} 채널, K^+ 채널 등 많은 예가 있지만, 이러한 채널의 분자구조에는, 전하가 집합한 영역, 혹은 전위 센서가 있고, 이것이 막의 양쪽 전위차에 의해 힘을 받아 이동하는 것에 의해 컨포메이션 변화가 일어나는 것이라고 생각할 수 있다. 리간드 감수성 채널이란, 세포외에서 특이적인 리간드(agonist)가 결합하는 것에 의해 활성화되는 채널로, 수용체 내장 채널이라고 불린다. 이것에 대하여, 세포내에 어떤 세컨드 메신저 등의 저분자의 결합에 의해, 개폐가 제어되는 채널이 있다. 또, 세포내막에 존재하는 IP_3 (이노시톨3린산) 수용체(세포질쪽에서 IP_3가 결합하면 열리는 Ca^{2+} 채널)도 이 예이다. 기계자극 응답 채널은, 막의 신장에 의해 게이트 개폐가 제어되는 이온 채널로, 대부분은 신장에 의해 열리기 때문에 장력 감수성 채널이라고 불린다. 이 채널은, 침투압 조정이나 세포의 체적조절에 관여하고 있다고 생각되어지고 있다. 이 이온 채널은 근방추(筋紡錘)와 같은 신장(伸張) 수용기에 존재하는 것은 당연하지만, 지금까지 다종류의 세포로 발견되고 있다(Morris C. E. J. Membrane Biol., 113, 93-107(1990) ; Bear, C. E., Am. J. Physiol., 258, C421-8 (1990) ; Cemerik, D. & Sackin, H., Am. J. Physiol., 264, F697-714(1993) ; Lansman, J. B., et. al., Nature, 325, 811-3(1987) ; Sackin, H., Am. J. Physiol., 253, F1253-62(1987)).

또, 4개의 막 관통부위를 갖는 TWIK1(tandem of P domains in a weak inward rectifier K^+ channel) 관련 TASK(TWIK-1 related acid-sensitive K^+ channel)을 코드하는 포유동물의 K^+ 채널이, 기계자극에 의해 개폐하는 성질을 갖는 것이 나타나고 있다 (Duprat, F. et., al.,(1997) EMBO J., 16, 5464-71, Patel, A. J., et. al., (1998) EMBO J. 17, 4283-90).

본 발명자들은, 물리적 인자인 열에 감수성인 바닐로이드(Vanilloid) 수용체가 기계자극 응답 채널이라는 가정에 기초하여 유전자 클로닝을 행하고, 바닐로이드 리셉터(Caterina, M. J., et. al., (1997) Nature, 389, 816-24)에 유사하고, Ankyrin 반복과 6개의 막 관통부위를 갖는 장력에 의해 억제되는 비선택적 양이온 채널(SIC)을 코드하는 cDNA를 이미 보고하고 있다(Suzuki, M., et. al., (1999) J. Biol. Chem. 274, 6330-5). 기계자극 응답 채널은, 기계적 자극을 Ca^{2+} 유입으로 변환할 수 있기 때문에, 장력에 의해 활성화하는(stretch-activated ; SA) 비선택적 양이온 채널은 중요하다.

발명의 상세한 설명

발명의 개시

본 발명자들은, 상술의 상황에 감안하여 신규한 기계응답 채널 단백질을 예의 탐색한 결과, 신장에 특이적으로 발현하고, 기계자극에 응답하여 비선택적으로 양이온을 세포내에 거두어 들이는 기능을 갖는 단백질, 즉, 신규한 기계자극 응답 채널 단백질을 발견하였다. 따라서 본 발명은, 신장에 특이적으로 발현하고, 기계자극에 응답하여 비선택적으로 양이온을 세포내에 거두어 들이는 기능을 갖는 마우스 혹은 사람 유래의 신규한 기계자극 응답 채널 단백질(SAC1(마우스) (Stretch Activated Channel protein 1) 및 hSAC(사람)(human Strech Activated Channel protein)), 그것을 코드하는 DNA, 그 단백질을 사용하여 양이온 채널 활성을 항진 또는 저해하는 물질의 스크리닝 방법, 및 그 단백질에 대한 항체를 제공하는 것을 과제로 한다.

본 발명은, 신장에 특이적으로 발현하고, 기계자극에 응답하여 비선택적으로 양이온을 세포내에 거두어 들이는 기능을 갖는 마우스 혹은 사람 유래의 신규한 기계자극 응답 채널 단백질(SAC1(마우스) 및 hSAC(사람))에 관한 것이다. 또, 그 단백질을 코드하는 DNA에 관한 것이다. 또, 그 단백질을 이용하여 양이온 채널 활성을 항진 또는 저해하는 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 또, 그 단백질에 대한 항체에 관한 것이다. 그 단백질, 그 DNA, 및 그 단백질에 대한 항체는, 고혈압증이나 당뇨병 등의 양이온 채널의 이상에 기초하는 질환의 진단약 혹은 치료제, 또는 그 질환에 대한 예방 및/또는 치료제 탐색을 위한 도구로써 이용할 수 있다.

신규한 막 채널의 단리(單利), 동정(同定) 및 기능해석을 행하기 위해서는, 분자생리학적 기술, 세포생물학적 기술이나 전기(電氣)생리학적 기술 등의 고도한 기술을 필요로 한다. 그리고, 본 발명자들은 이러한 기술을 구사하여, 마우스 신장에서 SA 양이온 채널(SAC1)의 cDNA를 단리하고, 그 아미노산 배열을 결정하였다. 이것은 Vanilloid 리셉터의 슈퍼패밀리에 속하고, 신장의 뇨세관에 국재(局在)하고 있었다. 이 SAC1을 포유동물 세포계로 발현시켰다. 또, 마우스 유래의 SAC1 유전자를 사용하여, 사람에 상당하는 채널 유전자를 얻었다.

전기생리학적 해석의 결과, 세포내의 유리 칼슘은 SAC1을 발현하는 형질전환한 세포를 기계적 자극하는 것에 의해서 증가하였다. 또, 이것은 음압(陰壓)에 의해 활성화되는 단일 채널로, $Gd3^{3+}$ 에 의해 블록되고, 양이온의 통과에 관해서는 비선택적이고, SAC1에서 이온 투과성은 $Na^{+} > K^{+}$ 었다. 세포의 역전변위는 세포를 팽창시키는 것에 의해 플러스쪽에 편위(偏位)하였다. 게다가, 결실 변이체를 발현시키면, 신장(伸張)에 대하여 이 채널이 불응답성이 되기 때문에, SAC1이 SA 채널이 될 수 있음이 시사되었다.

상술한 바와 같이, 본 발명은, 신장에 특이적으로 발현하고, 기계자극에 응답하여 비선택적으로 양이온을 세포내로 거두어 들이는 기능을 가지는 마우스 혹은 사람 유래의 신규한 기계자극 응답 채널 단백질(SAC1(마우스) 및 hSAC(사람)), 및 그 단백질을 코드하는 DNA에 관한 것이다. 본 발명 단백질은, 이하와 같이 하여 얻을 수 있다. 즉, 마우스 신장 cDNA 라이브러리를 준비하고, 적당한 프라이마를 이용하여 PCR법에 의해 증폭하는 것에 의해, SAC1 cDNA를 얻을 수 있다. 또, 이 SAC1 cDNA를 프로브로서 사람 신장 cDNA 라이브러리를 클로닝하는 것에 의해, hSAC cDNA를 얻을

수 있다. 마우스 유래 SAC1은 871 아미노산 잔기로 이루어지는 단백질이고, 사람 유래의 hSAC도 871 아미노산 잔기로 이루어지는 단백질이었다. 이러한 것들은 아미노산 배열에 있어서 94.4%의 동일성을 나타내고, 이 현저한 호몰로지는 SAC1이 포유동물의 세포이고 구조적으로도 기능적으로도 공통한 기능을 행하고 있다고 생각할 수 있다. hSAC를 코드하고 있는 DNA는, 약 18Kb의 길이이고, 14개의 엑손으로 구성되고, 염색체 상의 12q24.1에 존재한다.

얻어진 마우스 혹은 사람의 SAC 유전자를 적당한 벡터에 도입하고, 그 벡터를 사용하여 숙주(宿主)를 형질전환하는 것에 의해, 마우스 혹은 사람의 SAC 단백질을 얻을 수 있다. 숙주세포로서는, 세균, 효모, 혹은 동물세포 등을 들 수 있다. 특히 동물세포로서는, HeLa 세포, Chinese hamster ovary (CHO) 세포, 혹은 COS-7 세포 등을 사용하는 것이 바람직하다. 또, 세포계의 발현 플라스미드의 제어기능으로서, 바이러스의 Polyoma, Adenovirus, Cytomegalovirus, Simian virus 40의 프로모터가 사용된다. 특히, 동물세포의 발현계로 이용성이 높은 플라스미드로서, pCMV가 바람직하다 (Thomsen, et. al., PNAS, (1984) 81,659). 얻어진 단백질은, 기계자극에 응답하는 막 결합 단백질이고, 고혈압 혹은 당뇨병 등의 양이온 채널의 이상에 기초하는 질환의 진단약 혹은 치료제, 또는 그 질환에 대한 예방 및/또는 치료제 탐색을 위한 도구로써 이용할 수 있다.

또, 본 발명 단백질 혹은 그 프래그먼트는, 결손 hSAC의 DNA 하이브리다이제이션 진단에 유용하고, hSAC의 변이체는 고혈압증이나 당뇨병 연구에 유용하다. 또, SAC의 DNA 및 그 변이체의 5' 및 3' 말단부에 다른 단백질이나 합성 폴리펩티드를 코드하는 뉴클레오티드 배열을 결합하여 융합 단백질을 제작하는 것도, 공지의 기술로 용이하다. 예컨대, 융합 단백질이, 전동 단백질로서 제작되고, in vitro 및 in vivo 로 절단되어 기능하거나, 본래의 기능에 더해 표적 조직 등으로의 지향성을 갖게 하는 것도 가능하다.

또, 발현한 단백질이나 변이체 및 그것들의 프래그먼트를 동물에 면역하여 폴리크로널 항체를 얻을 수 있다. 또, 면역동물의 림파구를 미에로머 세포와 융합한 하이브리도마 세포를 사용하여 모노크로널 항체를 조제할 수 있다.

또, 본 발명 단백질 혹은 그 변이체 및 유연체(類緣體)를 사용하여, 채널 단백질이 관련하는 질환의 진단약 혹은 치료약 등, SAC에 아고니스트적 및 안타고니스트적으로 작용하는 물질의 탐색에 사용할 수 있다. 또, SAC의 DNA 배열정보가 얻어진 것으로, 부분배열 DNA나 RNA를 조제하는 것이 용이해졌다. 이러한 부분 DNA는, 선택되어야 하는 유전자에 하이브리다이즈하는 능력을 갖는 것이어서, 핵산의 프로브로서 이용된다. 각종 조직에서의 cDNA 배열의 검출에, 이러한 프로브가 유효하다. SAC 를 사용하여 제작한 프로브로, 다양한 생물이나 그러한 것들의 조직으로 부터 하이브리다이즈하는 핵산을 얻을 수 있다. 얻어진 핵산은, SAC와 같은 아이소타입, 또는 신규성을 나타내는 단백질을 코드하는 핵산도 포함한다. 또, 제작된 프로브는, 질환의 유전자 진단에 이용할 수 있다. 프로브로 하이브리다이즈한 환자의 뉴클레오티드 배열을 조사하는 것으로, 질환 유전자의 검출이 가능하다. 게다가, 본질적인 치료법에 사용하는 유전자 치료약의 제작도 포함된다. SAC나, 그 변이체, 그러한 것들의 유도체의 뉴클레오티드 배열을 플라스미드나 간(幹)세포에 짜넣고, 투여하는 것으로, 유전자 치료제로서 사용할 수 있다.

본 발명 단백질 혹은 그것에 대한 항체는, 사람 및 영장동물에 대하여 안전하게 투여되는 것이다. 본 발명 단백질은, 제제화하여 경구적 혹은 비경구적으로 투여할 수 있다. 의약 조성물의 형태로서는, 주사용 조성물, 점적용 조성물, 좌제, 경비제, 설하(舌下)제, 경피(經皮) 흡수제 등을 들 수 있다. 이러한 제제는, 공지의 제제학적 제법에 준하고, 제제로서 약리학적으로 허용될 수 있는 담체(擔體), 부형제, 안정제, 착색제, 계면활성제, 및/또는 그 외의 첨가제 등을 사용하는 것에 의해, 목적으로 하는 제제로 할 수 있다. 주사용 조성물의 경우는, 본 발명 단백질의 약리학적 유효량, 및 제제학적으로 허용할 수 있는 부형제/부활제, 예컨대 아미노산, 당류, 셀루로스 유도체, 및 그 외의 유기/무기화합물 등의 혼합물로서도 좋다. 또, 본 발명 항체와 이러한 것들의 부형제/부활제를 시용하여 주사제를 조제하는 경우는, 필요에 따라 pH 조정제, 완충제, 안정화제, 가용화제 등을 첨가하여 상법에 의해 각종 주사제로 할 수 있다.

또, 본 발명의 DNA는, 단독, 리포솜에 봉입, 혹은 레트로바이러스나 아데노바이러스 등의 유전자 치료용 벡터에 짜넣고, 유전자 치료에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도1(a)는, SAC1 mRNA 발현을 전체의 길이 cDNA를 사용하여 행한 노던 브로트 해석결과를 나타낸다. 마우스 조직으로부터 조제한 전체 RNA(2μg)를 각 레인에 어플라이하였다.

도1(b)는, 신장조직을 사용한 면역염색의 결과를 나타낸다. 염색된 부분은 하얗게 나타나고 있다.

도2는, SAC1 발현세포(GFP 양성)의 touch 스트레스에 대한 영향을 조사한 결과를 나타낸다.

도 중,◯ 는 380nm에서의 형광강도를,◢ 는, 형광강도의 비율(360nm/380nm)을,◖ 는, 360nm에서의 형광강도를 각각 나타낸다.

도3은, SAC 싱글 채널의 신장(伸張)에 대한 응답결과를 나타낸다.

(A)는, 단계적인 음압을 걸었을 때의 SAC1 채널의 대표적인 결과를 나타낸다.

(B)는, 서서히 음압을 걸었을 때의 결과를 나타낸다.

(C)는, $GdCl_3$ 첨가 및 비첨가시에 SAC1에 건 압력과 Po와의 관계를 각각 나타낸다.

도 중,◯ 는 대조($GdCl_3$ 비첨가시의 압력)를,◿ 는 $GdCl_3$ 0.5M 첨가시의 압력을 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 최량의 형태

실시예

본 발명을 다음의 실시예에 의해 보다 상세하게 설명하지만, 이러한 것들은 단순히 예시할 뿐이고, 본 발명은 이러한 것들에 의해 어떠한 한정을 받는 것은 아니다.

실시예1

SAC1을 코드하는 cDNA의 단리

RNA는 Trizol(기브코 BRL사)를 사용한 구아니딘 티오시아네이트법에 의해 단리하였다. mRNA는 polyA 칼럼(팔마시아사)을 사용하여 정제하였다. 마우스 신장(腎臟)의 cDNA 라이브러리는, Marathon cDNA construction kit(클론테크사)를 사용하여 조제하였다. cDNA를, 프라이머 세트1(AA13f2(배열표 배열번호5) 및 mA13end1(배열번호6)로 ExTaq 폴리메라제(타카라 주조사)를 사용하여 PCR 증폭하였다(94℃ 30초, 70℃ 4분의 1 싸이클로서 30싸이클 실시). 네스트 프라이머(AA13r2 (배열번호7))를 합성하고, 5' RACE법에 의해 5' 말단을 결정하였다. 프라이머 세트2(A13st1(배열번호8) 및 AA13rl(배열번호9))로 ExTaq 폴로메라제(타카라 주조사)를 사용하여 동조건으로 PCR 증폭하였다. 2종류의 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭하여 얻어진 각각의 프래그먼트를 사용하여, 완전한 길이를 함유하는

영역을 프라이머 세트(A13st1 및 mA13end1)를 사용하여 PCR 증폭하였다. cDNA 라이브러리로부터 약 3.2Kb의 SAC1 cDNA를 재클로닝하였다. 클로닝한 cDNA를 TA 클로닝 벡터(TOPO-XL ; 인비트로젠사)에 라이게이트하고, 그 BamH I -HindIII 프래그먼트를 동물세포 발현벡터(pCMV-SPORT ; 기브코 BRL사)에 라이게이트하였다. Thermo Sequenase dye terminator cycle sequencing premix를 사용하여, 자동 시퀀서(모델 373-S ; 어플라이드 바이오 인스트루멘츠사)로 시퀀스하였다. SAC1 cDNA는 871 아미노산을 코드하는 2616 뉴클레오티드였었다. 배열을 배열표 배열번호 1(아미노산 배열) 및 배열번호 2(염기 배열)로 나타낸다. SAC1의 cDNA를 삽입한 플라스미드를 pmSAC1 TOPO로 명명하고, 경제산업성산업기술총합연구소 생명공학공업기술연구소(일본국 이바라키켕 츠쿠바시 히가시 1쵸메 1방 3고(우편번호 305-8566))에 헤이세이 11년(1999) 11월 30일에 원기탁하고, 헤이세이 12년(2000) 11월 1일에 원기탁에서 부다페스트 조약에 근거한 기탁으로 이관청구를 하고, FERM BP-7345로서 수령되어 있다.

이어서,^{32} P 표지한 SAC1 cDNA를 프로브로 한 노던 하이브리다이제이션(65℃)에 의해, SAC1의 각 조직으로의 발현을 확인하였다. 그 결과, 약 3Kb의 SAC 1mRNA는, 신장에만 발현하고 있는 것이 확인되었다(도1(a)).

또, 사람 유래의 SAC(hSAC)를 코드하고 있는 cDNA를 단리하기 위해서, 사람 신장 cDNA 라이브러리를 ^{32} P 표지 SAC1 cDNA를 프로브로 사용하여 검색하였다. 얻어진 클론을 벡터 M13mp1, M13mp19(타카라 주조사), 및 pGEM3Z(프로메가사)로 각각 서브클로닝한 후, 상술과 같은 방법으로 염기 배열을 결정하였다. 배열을 배열표 배열번호 3(아미노산 배열) 및 배열번호 4(염기 배열)에 나타낸다.

실시예2

항체의 조제와 면역염색

폴리에틸렌 글리콜과 결합한, SAC1 단백질의 C 말단부(844-853번째)의 특이 펩티드(이하, C단 펩티드라고 한다)(배열표 배열번호 10)에 대한 항체를 제작하였다. 마우스 SAC1 단백질의 C단 펩티드의 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에의 결합은, Maeda 등의 방법(Biochem. Biophys. Res. Comm. (1998) 248,485-489)에 따라서 행하였다. 즉, 디클로로메탄에 용해한 산화 PEG (와코 퓨레 케미칼사)에, 1당량의 디씨클로헥실칼보디이미드를 첨가하고 0℃에서 교반한 후, 10당량의 에틸렌디아민을 첨가하여 하룻밤 교반하였다. 여액을 용매유거(留去)하여, 얻어진 생성물을 50% 초산에 용해하였다. 이것으로부터 아미노산형 PEG(aaPEG)를 Sephadex G-25 칼럼으로 정제하고, N 말단 아미노기를 Fmoc화하여 Fmoc-aaPEG를 조제하였다. 이것을 Rink 수지(300mg ; 와타나베 케미칼사)에, 디이소프로필 칼보디이미드/1-히드록시벤조트리아졸법(Konig and Geiger, Chem. Ber. (1970) 103, 788-798, 2024-2033)을 사용하여, Fmoc-aaPEG, 이어서 Boc-PLD(Pmc)NLGNPNC-OH의 순으로 도입하였다. 탈 Fmoc화 후, 수지를 트리플루오로초산/티오아니솔/아니솔/에탄디티올(94/2/2/2)으로 3시간 처리하는 것에 의해서, C단 펩티드-aaPEG를 잘라내었다. 여액에 에테르를 첨가하여 침전시킨 조펩티드를 역상(逆相) HPLC로 정제하고, C단 펩티드-aa PEG를 43mg 얻었다.

프로인트 완전 애주번트로 에멀젼으로 한 항원(C단 펩티드-aa PEG) 1mg을 2마리의 NZW 토끼의 근육내에 주사하여 면역하고, 그 후 프로인트 불완전 애주번트로 에멀젼으로 한 동량의 항원을 2주간 마다 마찬가지로 면역하였다. 투여한 4에서 8주간 후의 혈청에 대하여, 그 항체력가(力價)를 ELISA로 측정하였다. 컨트롤 혈청보다도 10000배 높은 역가를 나타낸 혈청을 분리하였다. 이러한 것으로부터 항체를 Protein A 칼럼(팔마시아사)으로 정제하고, ProtOn 키트(멀티플 펩티드 시스템사)로 어피너티 정제하였다. 신선한 신장 슬라이스를 500배 희석한 항체로 염색한 후, FITC 라벨한 항토끼 IgG 항체(다코사)로 검출하였다. 그 결과, 뇨세관의 기저막이 염색되고, 이 부위에 SAC1 단백질이 국재하는 것이 명확해졌다(도1(b) 참조).

실시예3

cDNA 발현

녹색 형광 단백질을 발현하는 플라스미드(pEGFP-N1 ; 클론테크사)를 트랜스펙션의 마커로서 사용하였다. 일과성(一過性) 발현을 위하여, CHO 세포를 10% 소 태아혈청, 100U/ml 페니실린, 100μg/ml 스트렙토마이신을 첨가한 HamF-12 배지(기브코 BRL사)로 배양하였다. 형질전환 전일에, CHO 세포 10^5개를 래트 꼬리 부위 콜라겐으로 코트한 커버 슬립을 넣은 35mm 디쉬에 첨가하였다. 다음날, 실온에서 5분간 인큐베이트한 FuGENE6(로슈사 3μℓ)과 무혈청 배지(97μℓ)의 혼합액에, 1회의 트랜스펙션당, pCMV-SPORT(기브코 BRL사)에 넣은 SAC1 플라스미드(1μg)와 pEGFP-N1(1μg)을 첨가하였다. 실온에서 15분간 인큐베이트한 후에, 이것을 3ml의 혈청 첨가배지를 넣은 디쉬에 가하였다. 커버 슬립 상에서 배양시킨 세포를, 패치 크램프 샘플로서 사용하였다. 증식과 트랜스펙션에는 10% FCS 함유배지를 사용하였다. 전기생리학적 시험은 24시간째에 개시하고, 형광측정은, 트랜스펙션 후 48시간에 실시하였다.

실시예4

SAC1 발현세포에서의 형광측정

형질전환 세포는, 실험개시 전의 2 내지 3시간내에, 무혈청 배지에 용해한 10μM의 fura-2AM(도진사)과 인큐베이트하였다. 480nm의 GFP 형광과 360/380nm의 fura-2 형광을 다이크로익 올림푸스 시스템 미러(멜린사)를 메뉴얼로 교환하여 시각화하였다. 480nm의 형광과 360nm 및 380nm의 형광의 이미지를 2초마다 얻었다. 해석을 위해 목적의 에리아의 형광강도를 산출하였다. 세포는 125mM NaCl, 5mM KCl, 1.2mM $MgSO_4$, 1mM Na_2HPO_4, 1mM $CaCl_2$, 3mM HEPES(pH7.4) 용액 중에 34℃에서 담그었다. 세포에 직접 기계적인 스트레스를 일으키기 위해, 둥근 선단의 글라스 피펫을 세포에 전기제어 미크로마니퓨레이터(모델 5170 ; 에펜돌프사)를 사용하여 접촉시켰다. 밝은 세포(GFP 양성)에 글라스 피펫을 사용한 기계 자극을 준 결과를, 도2 및 표1에 나타낸다. fura-2 형광비는, 대조세포와 비교하면 SAC1 발현세포로 변화가 인정된 것이어서, 본 발명 단백질은 분명한 $[Ca^{2+}]i$(세포내의 칼슘 이온 농도)의 변동을 초래하는 채널 단백질로서 기능하고 있는 것이 나타났다.

(표1)

[표 1]

	Gd^{3+} 비첨가	Gd^{3+} 첨가
대조세포	4.5 ±3.8(8)	
SAC1 발현세포	12.8 ±1.4** (8)	4.8 ±1.4(10)

(괄호내의 수자는 실험예 수를, **은 대조와의 비교에 있어서 1% 유의를, *는 Gd^{3+} 비첨가시와의 비교에 있어서 5% 유의를 나타낸다.)

실시예5

SAC1 발현세포의 싱글 채널 해석

패치 크램프의 기록은, 기보(旣報)(Suzuki, M., Sato, J., Kutsuwada, K., Ooki, G. and Imai, M.(1999) J. Biol. Chem. 274, 6330-5)에 따라서 행하였다. GFP 양성세포는, 490nm에서의 형광측정(CAM2000 시스템 ; 쟈스코사)로 검출하였다. 1ml/1ml의 용액 유속으로 환류되는 마운트에 세포를 세트하였다. 마운트하기 전에 온도를 제어하기 위하여 용액을 DC supply(키쿠스이전자공업사 ; 모델 LPD)로 34℃에서 가온하였다. 침지용액에는, 3mM 헤페스 완충액(140mM NaCl, 5mM KCl, 1.2mM $MgSO_4$, 1mM Na_2HPO_4, 1mM $CaCl_2$, 3mM HEPES)을 사용하였다. 싱글 채널 해석에 있어서, 전류는 EPC-7 패치 크램프 증폭기(리스트 일렉트로닉사)로 기록하고, 10KHz로 DAT 기록계(DAT-200 ; 소니사)로 보존하였다. 해석에는, 5KHz의 필터를 걸었다. 개구확률을 해석하기 위하여, 기록을 Fetchex(소프트웨어 Axon 버전 6.0)에 의해 샘플링하였다. 데이터를 Igor ver 2.01과 Patch Analysist ver 1.21로 해석하였다. 디지털 필터를 2KHz로 사용하고, 개구확률을 전류 분포 해석으로 계산하였다. $GdCl_3$ 첨가시의 개구확률을 해석하기 위하여, 싱글 채널 진폭을 시약 비첨가시에 세트하고, 평균 개구확률(Po)을 10초간의 기록으로부터 결정하였다. 피펫압은 마노미터로 조절하고, 음압은 메뉴얼로 변화시켰다. 또, 채널 개구를 조사하기 위하여, 150mM NaCl 용액을 사용한 셀 어태치 피펫을 통하여 음압을 걸었다. 그 결과, 발현 세포상의 반수 이상의 패치가 음압으로 하는 것에 의해 채널 활성을 나타내었다. 도 3A와 같이, SAC1 채널은 30mmHg 음압으로 갑자기 열린다. 개구확률은 돌연히 완전 개구상태에 달하였지만, 이 현상을 확인하기 위하여 서서히 흡인을 행하였지만 (도3B), 개구에 역치가 존재하는가와 같이 채널이 갑자기 열렸다. 이 역치는 일정하고 (33±2.3mmHg), 재현적(再現的)이었다. 전류-전압을 다양한 용액(염화나트륨, 글루콘산나트륨 또는 염화칼륨)을 사용하여 피펫으로 측정하였지만, 큰 편위는 관찰되지 않았다. 싱글 채널 컨덕턴스를 셀 어태치 모드로 컨덕턴스 경사도로 측정하였다. 염화나트륨을 글루콘산나트륨 또는 염화칼륨으로 치환하여도, 이러한 것들의 파라메터에 거의 영향을 주지 않았던 것이기 때문에, 이 채널은 양이온에는 비선택적인 것이 분명해졌다. 압력에 대한 다른 감수성을 갖는 개개의 채널에서의 all-or-none 개구의 축적은, 신장(伸張)에 수반하는 S자형의 개구응답을 나타냈지만, 압력 Po는 Bolzmann 함수에 피트되지 않았다. 피펫에 0.5μM $GdCl_3$를 넣었을 때에 응답은 영향을 받지 않았던 것이어서, 기계자극 응답 채널 단백질로서의 기능을 갖음이 나타났다(도3C).

산업상 이용 가능성

본 발명에 의해, 신장에 특이적으로 발현하고, 기계자극에 응답하여 비선택적으로 양이온을 세포내에 거두어 들이는 기능을 갖는 마우스 혹은 사람 유래의 신규한 기계자극 응답 채널 단백질(SAC1(마우스) 및 hSAC(사람)), 및 그것을 코드하는 DNA, 그 단백질을 사용한 양이온 채널 활성을 항진 또는 저해하는 물질의 스크리닝 방법, 및 그 단백질에 대한 항체가 제공된다. 그 단백질, 그 DNA, 및 그 단백질에 대한 항체는, 고혈압증이나 당뇨병 등의 양이온 채널의 이상에 기초하는 질환의 진단약 혹은 치료제, 또는 그 질환에 대한 예방 및/또는 치료제 탐색을 위한 도구로써 이용할 수 있다.

기탁된 생물재료에의 언급

가. 당해 생물재료를 기탁한 기탁기관의 명칭 및 주소

명칭 : 경제산업성 산업기술총합연구소 생명공학공업기술연구소

주소 : 일본국 이바라기껭 츠쿠바시 히가시 1쵸메 1방 3고

(우편번호 305-3566)

나. 가의 기관에 기탁한 날짜 헤이세이 11년(1999년) 11월 30일(원기탁일)

다. 가의 기관에 기탁에 대하여 붙은 수탁번호 FERM BP-7345

SEQUENCE LISTING

<110> SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO., LTD.

<120> NOVEL PROTEIN AND DNA CORDING THEREOF

<130> SNOW-135

<150> JP48727-2000
<151> 2000-2-25

<160> 10

<170> Patentin Ver. 2.1

<210> 1
<211> 871
<212> PRT
<213> MOUSE

<400> 1

```
Met Ala Asp Pro Gly Asp Gly Pro Arg Ala Ala Pro Gly Glu Val Ala
 1               5                  10                  15
Glu Pro Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Ser Gly Gly Glu Ala Phe Pro
            20                  25                  30
Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Glu Gly Ser Ser Ser
        35                  40                  45
Leu Ser Pro Val Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg
    50                  55                  60
Pro Asn Leu Arg Met Lys Phe Gln Gly Ala Phe Arg Lys Gly Val Pro
65                  70                  75                  80
Asn Pro Ile Asp Leu Leu Glu Ser Thr Leu Tyr Glu Ser Ser Val Val
                85                  90                  95
Pro Gly Pro Lys Lys Ala Pro Met Asp Ser Leu Phe Asp Tyr Gly Thr
            100                 105                 110
Tyr Arg His His Pro Ser Asp Asn Lys Arg Trp Arg Arg Lys Val Val
```

```
        115                 120                 125
Glu Lys Gln Pro Gln Ser Pro Lys Thr Pro Ala Pro Gln Pro Pro Pro
    130                 135                 140
Ile Leu Lys Val Phe Asn Arg Pro Ile Leu Phe Asp Ile Val Ser Arg
145                 150                 155                 160
Gly Ser Thr Ala Asp Leu Asp Gly Leu Leu Ser Phe Leu Leu Thr His
                165                 170                 175
Lys Lys Arg Leu Thr Asp Glu Glu Phe Arg Glu Pro Ser Thr Gly Lys
            180                 185                 190
Thr Cys Leu Pro Lys Ala Leu Leu Asn Leu Ser Asn Gly Arg Asn Asp
        195                 200                 205
Thr Leu Gln Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Arg Thr Gly Asn Met Arg
    210                 215                 220
Glu Phe Ile Asn Ser Pro Phe Arg Asp Ile Tyr Tyr Arg Gly Gln Thr
225                 230                 235                 240
Ser Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Cys Lys His Tyr Val Glu Leu
                245                 250                 255
Leu Val Ala Gln Gly Ala Asp Val His Ala Gln Ala Arg Gly Arg Phe
            260                 265                 270
Phe Gln Pro Lys Asp Glu Gly Gly Tyr Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro
        275                 280                 285
Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Pro His Ile Val Asn Tyr Leu
    290                 295                 300
Thr Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met Arg Arg Gln Asp Ser Arg
305                 310                 315                 320
Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala Ile Ala Asp Asn Thr Arg
                325                 330                 335
Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asp Leu Leu Leu Leu Lys
            340                 345                 350
Cys Ser Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu Glu Thr Val Leu Asn Asn
        355                 360                 365
Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala Lys Thr Gly Lys Ile Gly
    370                 375                 380
Val Phe Gln His Ile Ile Arg Arg Glu Val Thr Asp Glu Asp Thr Arg
385                 390                 395                 400
His Leu Ser Arg Lys Phe Lys Asp Trp Ala Tyr Gly Pro Val Tyr Ser
```

405 410 415

Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Asp Thr Cys Gly Glu Glu Val Ser

420 425 430

Val Leu Glu Ile Leu Val Tyr Asn Ser Lys Ile Glu Asn Arg His Glu

435 440 445

Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu Arg Asp Lys Trp Arg

450 455 460

Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn Val Val Ser Tyr Leu Cys

465 470 475 480

Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr Tyr Gln Pro Leu Glu Gly

485 490 495

Thr Pro Pro Tyr Pro Tyr Arg Thr Thr Val Asp Tyr Leu Arg Leu Ala

500 505 510

Gly Glu Val Ile Thr Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Phe Phe Thr Ser

515 520 525

Ile Lys Asp Leu Phe Thr Lys Lys Cys Pro Gly Val Asn Ser Leu Phe

530 535 540

Val Asp Gly Ser Phe Gln Leu Leu Tyr Phe Ile Tyr Ser Val Leu Val

545 550 555 560

Val Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile Glu Ala Tyr Leu Ala

565 570 575

Val Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met Asn Ala Leu Tyr Phe

580 585 590

Thr Arg Gly Leu Lys Leu Thr Gly Thr Tyr Ser Ile Met Ile Gln Lys

595 600 605

Ile Leu Phe Lys Asp Leu Phe Arg Phe Leu Leu Val Tyr Leu Leu Phe

610 615 620

Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Thr Leu Leu Asn Pro Cys Thr

625 630 635 640

Asn Met Lys Val Cys Asp Glu Asp Gln Ser Asn Cys Thr Val Pro Thr

645 650 655

Tyr Pro Ala Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe Ser Ala Phe Leu Leu Asp

660 665 670

Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Met Leu Ser Ser

675 680 685

Ala Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Leu Leu Leu Val Thr Tyr Ile Ile

690 695 700

Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu
705 710 715 720
Thr Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys His Ile Trp Lys Leu Gln
725 730 735
Trp Ala Thr Thr Ile Leu Asp Ile Glu Arg Ser Phe Pro Val Phe Leu
740 745 750
Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Glu Met Val Thr Val Gly Lys Ser Ser
755 760 765
Asp Gly Thr Pro Asp Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val Asp Glu Val Ser
770 775 780
Trp Ser His Trp Asn Gln Asn Leu Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly
785 790 795 800
Lys Ser Glu Ile Tyr Gln Tyr Tyr Gly Phe Ser His Thr Val Gly Arg
805 810 815
Leu Arg Arg Asp Arg Trp Ser Ser Val Val Pro Arg Val Val Glu Leu
820 825 830
Asn Lys Asn Ser Ser Ala Asp Glu Val Val Val Pro Leu Asp Asn Leu
835 840 845
Gly Asn Pro Asn Cys Asp Gly His Gln Gln Gly Tyr Ala Pro Lys Trp
850 855 860
Arg Thr Asp Asp Ala Pro Leu
865 870

<210> 2
<211> 2616
<212> DNA
<213> MOUSE

<400> 2
atggcagatc ctggtgatgg tccccgtgca gcgcctgggg aggtggctga gccccctgga 60
gatgagagtg gtacctctgg tggggaggcc ttccccctct cttccctggc caatctgttt 120
gaggggggag aaggctcctc ttctctttcc ccggtggatg ctagccgccc tgctggccct 180
ggcgatggac gtccaaacct gcgtatgaag ttccagggcg ctttccgcaa gggggttccc 240
aaccccattg acctgttgga gtccaccctg tacgagtcct cagtagtgcc tgggcccaag 300
aaagcgccca tggattcctt gttcgactac ggcacttacc gtcaccaccc cagtgacaac 360

aagagatgga ggagaaaggt cgtggagaag cagccacaga gccccaaaac tcctgcaccc 420
cagccacccc ccatcctcaa agtcttcaat cggcccatcc tctttgacat tgtgtcccgg 480
ggctccactg cggacctaga tggactgctc tccttcttgt tgacccacaa gaagcgcctg 540
actgatgagg agttccggga gccgtccacg gggaagacct gcctgcccaa ggcgctgctg 600
aacctaagca acgggcgcaa cgacaccctc caggtgttgc tggacattgc ggagcgcacc 660
ggcaacatgc gtgaattcat caactcgccc ttcagagaca tctactaccg aggccagaca 720
tccctgcaca ttgccatcga acggcgctgc aagcactacg tggagctgct ggtggcccag 780
ggagccgacg tgcacgccca ggcccgcggc cgcttcttcc agcccaagga tgagggaggc 840
tacttctact ttggggagct gcccttgtcc ctggcagcct gcaccaacca gccgcacatc 900
gtcaactacc tgacagagaa ccctcacaag aaagctgaca tgaggcgaca ggactcgagg 960
gggaacacgg tgctgcacgc gctggtggcc atcgccgaca acacccgaga gaacaccaag 1020
tttgtcacca agatgtacga cctgctgctt ctcaagtgtt cacgcctctt ccccgacagc 1080
aacctggaga cagttctcaa caatgatggc ctttcgcctc tcatgatggc tgccaagaca 1140
ggcaagatcg gggtctttca gcacatcatc cgacgtgagg tgacagatga ggacacccgg 1200
catctgtctc gcaagttcaa ggactgggcc tatgggcctg tgtattcttc tctctacgac 1260
ctctcctccc tggacacatg cggggaggag gtgtccgtgc tggagatcct ggtgtacaac 1320
agcaagatcg agaaccgcca tgagatgctg gctgtagagc ccattaacga actgttgaga 1380
gacaagtggc gtaagtttgg ggctgtgtcc ttctacatca acgtggtctc ctatctgtgt 1440
gccatggtca tcttcaccct caccgcctac tatcagccac tggagggcac gccaccctac 1500
ccttaccgga ccacagtgga ctacctgagg ctggctggcg aggtcatcac gctcttcaca 1560
ggagtcctgt tcttctttac cagtatcaaa gacttgttca cgaagaaatg ccctggagtg 1620
aattctctct tcgtcgatgg ctccttccag ttactctact tcatctactc tgtgctggtg 1680
gttgtctctg cggcgctcta cctggctggg atcgaggcct acctggctgt gatggtcttt 1740
gccctggtcc tgggctggat gaatgcgctg tacttcacgc gcgggttgaa gctgacgggg 1800
acctacagca tcatgattca gaagatcctc ttcaaagacc tcttccgctt cctgcttgtg 1860
tacctgctct tcatgatcgg ctatgcctca gccctggtca ccctcctgaa tccgtgcacc 1920
aacatgaagg tctgtgacga ggaccagagc aactgcacgg tgcccacgta tcctgcgtgc 1980
cgcgacagcg agaccttcag cgccttcctc ctggacctct tcaagctcac catcggcatg 2040
ggagacctgg agatgctgag cagcgccaag taccccgtgg tcttcatcct cctgctggtc 2100
acctacatca tcctcacctt cgtgctcctg ttgaacatgc ttatcgccct catgggtgag 2160
accgtgggcc aggtgtccaa ggagagcaag cacatctgga agttgcagtg ggccaccacc 2220
atcctggaca tcgagcgttc cttccctgtg ttcctgagga aggccttccg ctccggagag 2280
atggtgactg tgggcaagag ctcagatggc actccggacc gcaggtggtg cttcagggtg 2340
gacgaggtga gctggtctca ctggaaccag aacttgggca tcattaacga ggaccctggc 2400
aagagtgaaa tctaccagta ctatggcttc tcccacaccg tggggcgcct tcgtagggat 2460
cgttggtcct cggtggtgcc ccgcgtagtg gagctgaaca agaactcaag cgcagatgaa 2520

gtggtggtac ccctggataa cctagggaac cccaactgtg acggccacca gcagggctac 2580
gctcccaagt ggaggacgga cgatgcccca ctgtag 2616

<210> 3
<211> 871
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Met Ala Asp Ser Ser Glu Gly Pro Arg Ala Gly Pro Gly Glu Val Ala
  1               5                  10                  15
Glu Leu Pro Gly Asp Glu Ser Gly Thr Pro Gly Gly Glu Ala Phe Pro
             20                  25                  30
Leu Ser Ser Leu Ala Asn Leu Phe Glu Gly Glu Asp Gly Ser Leu Ser
         35                  40                  45
Pro Ser Pro Ala Asp Ala Ser Arg Pro Ala Gly Pro Gly Asp Gly Arg
     50                  55                  60
Pro Asn Leu Arg Met Lys Phe Gln Gly Ala Phe Arg Lys Gly Val Pro
 65                  70                  75                  80
Asn Pro Ile Asp Leu Leu Glu Ser Thr Leu Tyr Glu Ser Ser Val Val
                 85                  90                  95
Pro Gly Pro Lys Lys Ala Pro Met Asp Ser Leu Phe Asp Tyr Gly Thr
            100                 105                 110
Tyr Arg His His Ser Ser Asp Asn Lys Arg Trp Arg Lys Lys Ile Ile
        115                 120                 125
Glu Lys Gln Pro Gln Ser Pro Lys Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Pro
    130                 135                 140
Ile Leu Lys Val Phe Asn Arg Pro Ile Leu Phe Asp Ile Val Ser Arg
145                 150                 155                 160
Gly Ser Thr Ala Asp Leu Asp Gly Leu Leu Pro Phe Leu Leu Thr His
                165                 170                 175
Lys Lys Arg Leu Thr Asp Glu Glu Phe Arg Glu Pro Ser Thr Gly Lys
            180                 185                 190
Thr Cys Leu Pro Lys Ala Leu Leu Asn Leu Ser Asn Gly Arg Asn Asp
        195                 200                 205
Thr Ile Pro Val Leu Leu Asp Ile Ala Glu Arg Thr Gly Asn Met Arg
```

```
    210                 215                 220
Glu Phe Ile Asn Ser Pro Phe Arg Asp Ile Tyr Tyr Arg Gly Gln Thr
225                 230                 235                 240
Ala Leu His Ile Ala Ile Glu Arg Arg Cys Lys His Tyr Val Glu Leu
                245                 250                 255
Leu Val Ala Gln Gly Ala Asp Val His Ala Gln Ala Arg Gly Arg Phe
            260                 265                 270
Phe Gln Pro Lys Asp Glu Gly Gly Tyr Phe Tyr Phe Gly Glu Leu Pro
        275                 280                 285
Leu Ser Leu Ala Ala Cys Thr Asn Gln Pro His Ile Val Asn Tyr Leu
    290                 295                 300
Thr Glu Asn Pro His Lys Lys Ala Asp Met Arg Arg Gln Asp Ser Arg
305                 310                 315                 320
Gly Asn Thr Val Leu His Ala Leu Val Ala Ile Ala Asp Asn Thr Arg
                325                 330                 335
Glu Asn Thr Lys Phe Val Thr Lys Met Tyr Asp Leu Leu Leu Leu Lys
            340                 345                 350
Cys Ala Arg Leu Phe Pro Asp Ser Asn Leu Glu Ala Val Leu Asn Asn
        355                 360                 365
Asp Gly Leu Ser Pro Leu Met Met Ala Ala Lys Thr Gly Lys Ile Gly
    370                 375                 380
Val Phe Gln His Ile Ile Arg Arg Glu Val Thr Asp Glu Asp Thr Arg
385                 390                 395                 400
His Leu Ser Arg Lys Phe Lys Asp Trp Ala Tyr Gly Pro Val Tyr Ser
                405                 410                 415
Ser Leu Tyr Asp Leu Ser Ser Leu Asp Thr Cys Gly Glu Glu Ala Ser
            420                 425                 430
Val Leu Glu Ile Leu Val Tyr Asn Ser Lys Ile Glu Asn Arg His Glu
        435                 440                 445
Met Leu Ala Val Glu Pro Ile Asn Glu Leu Leu Arg Asp Lys Trp Arg
    450                 455                 460
Lys Phe Gly Ala Val Ser Phe Tyr Ile Asn Val Val Ser Tyr Leu Cys
465                 470                 475                 480
Ala Met Val Ile Phe Thr Leu Thr Ala Tyr Tyr Gln Pro Leu Glu Gly
                485                 490                 495
Thr Val Pro Tyr Pro Tyr Arg Thr Thr Val Asp Tyr Leu Arg Leu Ala
```

500 505 510

Gly Glu Val Ile Thr Leu Phe Thr Gly Val Leu Phe Phe Phe Thr Asn

515 520 525

Ile Lys Asp Leu Phe Met Lys Lys Cys Pro Gly Val Asn Ser Leu Phe

530 535 540

Ile Asp Gly Ser Phe Gln Leu Leu Ser Phe Ile Tyr Ser Val Leu Val

545 550 555 560

Ile Val Ser Ala Ala Leu Tyr Leu Ala Gly Ile Glu Ala Tyr Leu Ala

565 570 575

Val Met Val Phe Ala Leu Val Leu Gly Trp Met Asn Ala Leu Tyr Phe

580 585 590

Thr Arg Gly Leu Lys Leu Thr Gly Thr Tyr Ser Ile Met Ile Gln Lys

595 600 605

Val Leu Phe Lys Asp Leu Phe Arg Phe Leu Leu Val Tyr Leu Leu Phe

610 615 620

Met Ile Gly Tyr Ala Ser Ala Leu Val Ser Leu Leu Asn Pro Cys Ala

625 630 635 640

Asn Met Lys Val Cys Asn Glu Asp Gln Thr Asn Cys Thr Val Pro Thr

645 650 655

Tyr Pro Ser Cys Arg Asp Ser Glu Thr Phe Ser Thr Phe Leu Leu Asp

660 665 670

Leu Phe Lys Leu Thr Ile Gly Met Gly Asp Leu Glu Met Leu Ser Ser

675 680 685

Thr Lys Tyr Pro Val Val Phe Ile Ile Leu Leu Val Thr Tyr Ile Ile

690 695 700

Leu Thr Phe Val Leu Leu Leu Asn Met Leu Ile Ala Leu Met Gly Glu

705 710 715 720

Thr Val Gly Gln Val Ser Lys Glu Ser Lys His Ile Trp Lys Leu Gln

725 730 735

Trp Ala Thr Thr Ile Leu Asp Ile Glu Arg Ser Phe Pro Val Phe Leu

740 745 750

Arg Lys Ala Phe Arg Ser Gly Glu Met Val Thr Val Gly Lys Ser Ser

755 760 765

Asp Gly Thr Pro Asp Arg Arg Trp Cys Phe Arg Val Asn Glu Val Asn

770 775 780

Trp Ser His Trp Asn Gln Asn Leu Gly Ile Ile Asn Glu Asp Pro Gly

785 790 795 800

Lys Asn Glu Thr Tyr Gln Tyr Tyr Gly Phe Ser His Thr Val Gly Arg

805 810 815

Leu Arg Met Asp Arg Trp Ser Ser Val Val Pro Arg Val Val Glu Leu

820 825 830

Asn Lys Asn Ser Asn Pro Asp Glu Val Val Val Pro Leu Asp Ser Met

835 840 845

Gly Asn Pro Arg Cys Asp Gly His Gln Gln Gly Tyr Pro Arg Lys Trp

850 855 860

Arg Thr Asp Asp Ala Pro Leu

865 870

<210> 4

<211> 2616

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

atggcggatt ccagcgaagg cccccgcgcg gggcccgggg aggtggctga gctccccggg 60

gatgagagtg gcaccccagg tggggaggct tttcctctct cctccctggc caatctgttt 120

gaggggggagg atggctccct ttcgccctca ccggctgatg ccagtcgccc tgctggccca 180

ggcgatgggc gaccaaatct gcgcatgaag ttccagggcg ccttccgcaa gggggtgccc 240

aaccccatcg atctgctgga gtccacccta tatgagtcct cggtggtgcc tgggcccaag 300

aaagcaccca tggactcact gtttgactac ggcacctatc gtcaccactc cagtgacaac 360

aagaggtgga ggaagaagat catagagaag cagccgcaga gccccaaagc ccctgccct 420

cagccgcccc ccatcctcaa agtcttcaac cggcctatcc tctttgacat cgtgtcccgg 480

ggctccactg ctgacctgga cgggctgctc ccattcttgc tgacccacaa gaaacgccta 540

actgatgagg agtttagaga gccatctacg gggaagacct gcctgcccaa ggccttgctg 600

aacctgagca atggccgcaa cgacaccatc cctgtgctgc tggacatcgc ggagcgcacc 660

ggcaacatga gggagttcat taactcgccc ttccgtgaca tctactatcg aggtcagaca 720

gccctgcaca tcgccattga gcgtcgctgc aaacactacg tggaacttct cgtggcccag 780

ggagctgatg tccacgccca ggcccgtggg cgcttcttcc agcccaagga tgaggggggc 840

tacttctact ttggtgagct gcccctgtcg ctggctgcct gcaccaacca gccccacatt 900

gtcaactacc tgacggagaa cccccacaag aaggcggaca tgcggcgcca ggactcgcga 960

ggcaacacag tgctgcatgc gctggtggcc attgctgaca acacccgtga gaacaccaag 1020

tttgttacca agatgtacga cctgctgctg ctcaagtgtg cccgcctctt ccccgacagc 1080

aacctggagg ccgtgctcaa caacgacggc ctctcgcccc tcatgatggc tgccaagacg 1140
ggcaagattg gggtgtttca gcacatcatc cggcgggagg tgacggatga ggacacacgg 1200
cacctgtccc gcaagttcaa ggactgggcc tatgggccag tgtattcctc gctttatgac 1260
ctctcctccc tggacacgtg tggggaagag gcctccgtgc tggagatcct ggtgtacaac 1320
agcaagattg agaaccgcca cgagatgctg gctgtggagc ccatcaatga actgctgcgg 1380
gacaagtggc gcaagttcgg ggccgtctcc ttctacatca acgtggtctc ctacctgtgt 1440
gccatggtca tcttcactct caccgcctac taccagccgc tggagggcac agtgccgtac 1500
ccttaccgca ccacggtgga ctacctgcgg ctggctggcg aggtcattac gctcttcact 1560
ggggtcctgt tcttcttcac caacatcaaa gacttgttca tgaagaaatg ccctggagtg 1620
aattctctct tcattgatgg ctccttccag ctgctcagct tcatctactc tgtcctggtg 1680
atcgtctcag cagccctcta cctggcaggg atcgaggcct acctggccgt gatggtcttt 1740
gccctggtcc tgggctggat gaatgccctt tacttcaccc gtgggctgaa gctgacgggg 1800
acctatagca tcatgatcca gaaggtactc ttcaaggacc ttttccgatt cctgctcgtc 1860
tacttgctct tcatgatcgg ctacgcttca gccctggtct ccctcctgaa cccgtgtgcc 1920
aacatgaagg tgtgcaatga ggaccagacc aactgcacag tgcccactta cccctcgtgc 1980
cgtgacagcg agaccttcag caccttcctc ctggacctgt ttaagctgac catcggcatg 2040
ggcgacctgg agatgctgag cagcaccaag taccccgtgg tcttcatcat cctgctggtg 2100
acctacatca tcctcacctt tgtgctgctc ctcaacatgc tcattgccct catgggcgag 2160
acagtgggcc aggtctccaa ggagagcaag cacatctgga agctgcagtg ggccaccacc 2220
atcctggaca ttgagcgctc cttccccgta ttcctgagga aggccttccg ctctggggag 2280
atggtcaccg tgggcaagag ctcggacggc actcctgacc gcaggtggtg cttcagggtg 2340
aatgaggtga actggtctca ctggaaccag aacttgggca tcatcaacga ggacccgggc 2400
aagaatgaga cctaccagta ttatggcttc tcgcataccg tgggccgcct ccgaatggat 2460
cgctggtcct cggtggtacc ccgcgtggtg gaactgaaca agaactcgaa cccggacgag 2520
gtggtggtgc ctctggacag catggggaac ccccgctgcg atggccacca gcagggttac 2580
ccccgcaagt ggaggactga tgacgccccg ctctag 2616

<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA

<400> 5

gagagaacac caagtttgt 19

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA

<400> 6
cagcggcccc aatctcttca aagtac 26

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA

<400> 7
ctacagccag catctcatgg 20

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA

<400> 8
tcagggtcca gtatggcaga tcctggtgat 30

<210> 9

<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized DNA

<400> 9
gttaatgggc tctacagcca gc 22

<210> 10
<211>
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Pro Leu Asp Asn Leu Gly Asn Pro Asn Cys
1 5 10

(57) 청구의 범위

청구항 1.

신장에 특이적으로 발현하고, 기계자극에 응답하여 비선택적으로 양이온을 세포내에 거두어 들이는 기능을 갖는 단백질.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 마우스 유래인 단백질

청구항 3.

제 2 항에 있어서, 배열표 배열번호 1기재의 아미노산 배열로 나타내는 단백질.

청구항 4.

제 3 항의 기재의, 아미노산 배열을 코드하는 DNA.

청구항 5.

제 4 항에 있어서, 배열표 배열번호 2기재의 염기 배열로 나타내는 DNA.

청구항 6.

제 1 항에 있어서, 사람 유래인 단백질.

청구항 7.

제 6 항에 있어서, 배열표 배열번호 3기재의 아미노산 배열로 나타내는 단백질.

청구항 8.

제 7 항의 기재의, 아미노산 배열을 코드하는 DNA.

청구항 9.

제 8 항에 있어서, 배열표 배열번호 4기재의 염기 배열로 나타내는 DNA.

청구항 10.

제 3 항 또는 제 7 항의 기재의, 단백질의 아미노산 배열에 있어서, 1 이상의 아미노산이 결실, 치환, 혹은 부가된 아미노산 배열을 갖는 단백질.

청구항 11.

제 4 항, 제 5 항, 제 8 항 또는 제 9 항의 기재의, DNA와 하이브리다이즈하는 DNA.

청구항 12.

제 1 항, 제 2 항, 제 3 항, 제 6 항, 또는 제 7 항의 기재의, 단백질을 사용하여, 양이온 채널을 항진 또는 저해하는 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 13.

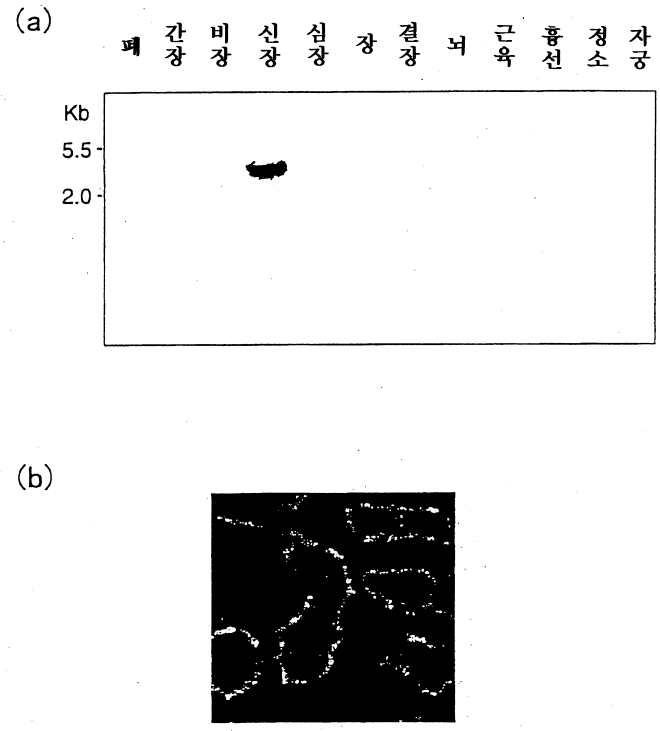
제 1 항, 제 2 항, 제 3 항, 제 6 항 또는 제 7 항의 기재의, 단백질에 대한 항체.

청구항 14.

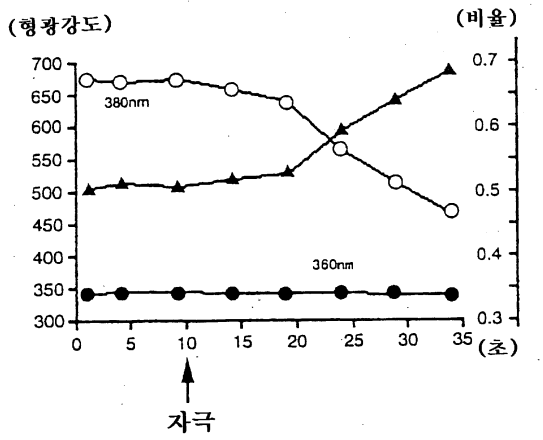
제 13 항에 있어서, 모노크로널 항체인 항체.

도면

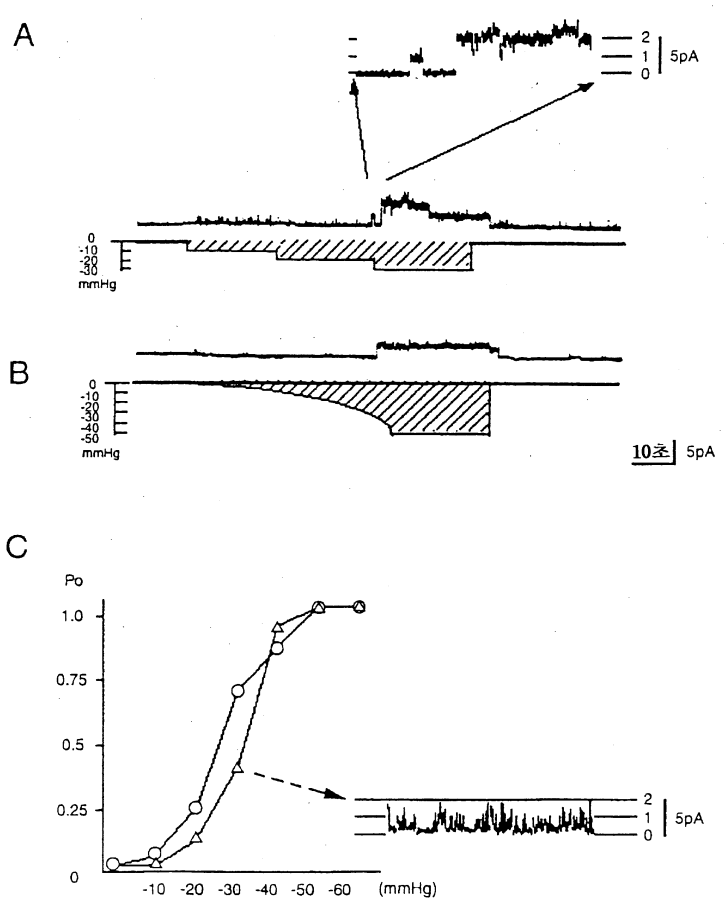
도면 1


(a)
폐
간장
비장
신장
심장
장
결장
뇌
근육
흉선
정소
자궁
Kb
5.5
2.0
(b)

도면 2


(형광강도)
(비율)
700
650
600
550
500
450
400
350
300
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
380nm
360nm
0
5
10
15
20
25
30
35
(초)
자극

도면 3


A
2
1
0
5pA
0
-10
-20
-30
mmHg
B
0
-10
-20
-30
-40
-50
mmHg
10초
5pA
C
Po
1.0
0.75
0.5
0.25
0
-10 -20 -30 -40 -50 -60 (mmHg)
2
1
0
5pA