



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0043971
(43) 공개일자 2022년04월06일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 14/435</i> (2006.01) <i>C07K 14/315</i> (2006.01)
 <i>C07K 14/39</i> (2006.01) <i>C12N 15/62</i> (2006.01)
 <i>C12N 15/70</i> (2006.01) <i>C12N 9/02</i> (2006.01)
 <i>G01N 21/64</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/58</i> (2006.01) <i>G01N 33/68</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C07K 14/43595</i> (2013.01)
 <i>C07K 14/315</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0126105
 (22) 출원일자 2020년09월28일
 심사청구일자 2020년09월28일</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 이병천
 서울특별시 성북구 고려대로17가길 64, 105동 1402호 (안암동1가, 래미안 안암)</p> <p>이해민
 서울특별시 성북구 개운사길 76-1, 202호 (안암동5가)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인 남앤남</p> |
|--|--|

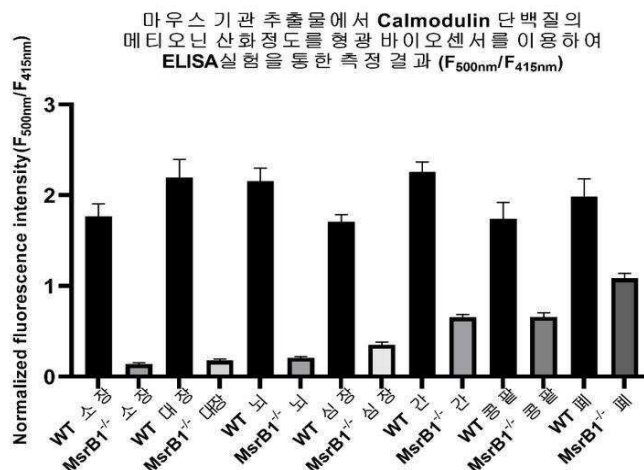
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **특정 단백질의 메티오닌 잔기의 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있는 형광단백질 센서 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 특정 단백질의 메티오닌 잔기의 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있는 형광단백질 센서 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 MsrB 단백질, cpYFP 단백질, thioredoxin 3 단백질, 링커 단백질 및 protein G 단백질이 순차적으로 연결된, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서용 재조합 단백질, 이를 포함하는 형광바이오 센서, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도 측정방법, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보제공방법 및 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 혼합된 생물학적 시료에서도 전체 단백질이 아닌 특정 단백질에서 메티오닌 잔기의 산화정도를 특이적 형광변화 검출을 통해 정확하게 정량적으로 측정할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C07K 14/39 (2013.01)
C12N 15/62 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
C12N 9/0051 (2013.01)
G01N 21/6428 (2013.01)
G01N 33/53 (2018.05)
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 33/6815 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711107286
과제번호	2018R1A1A1A05079386
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	MsrB1에 의한 항염증 사이토카인 조절 기전 및 염증 억제 치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

MsrB(methionine sulfoxide reductases B) 단백질; cpYFP(circularly permuted yellow fluorescence protein) 단백질; thioredoxin 3 단백질; 링커 단백질; 및 protein G 단백질이 순차적으로 연결된,

목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서용 재조합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서용 재조합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 MsrB 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 1~139번째의 아미노산로 이루어진 것이고,

상기 cpYFP 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 140~381번째의 아미노산로 이루어진 것이고,

상기 thioredoxin 3 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 382~488번째의 아미노산로 이루어진 것이고,

상기 링커 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 489~521번째의 아미노산로 이루어진 것이고,

상기 protein G 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 522~575번째의 아미노산로 이루어진 것을 특징으로 하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서용 재조합 단백질.

청구항 4

제1항의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 서열번호 1의 염기서열에서 MsrB 단백질을 코딩하는 염기서열은 1~417번째의 염기서열로 이루어진 것이고,

상기 cpYFP 단백질을 코딩하는 염기서열은 418~1143 번째의 염기서열로 이루어진 것이고,

상기 thioredoxin 3 단백질을 코딩하는 염기서열은 1144~1464 번째의 염기서열로 이루어진 것이고,

상기 링커 단백질을 코딩하는 염기서열은 1465~1563 번째의 염기서열로 이루어진 것이고,

상기 protein G 단백질을 코딩하는 염기서열은 1564~1725 번째의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

제4항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.

청구항 8

제7항의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 9

제1항의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 포함하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서.

청구항 10

제1항의 형광바이오 센서용 재조합 단백질 및 검출 목적 단백질에 대한 1차 항체를 포함하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도의 정량 검출용 조성물.

청구항 11

- (1) 메티오닌 잔기를 함유한 목적 단백질이 포함된 시료를 준비하는 단계;
- (2) 상기 시료에 상기 목적 단백질에 대한 1차 항체를 처리하여 상기 항체를 상기 목적단백질과 결합시키는 단계;
- (3) 제1항의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 처리하는 단계; 및
- (4) 상기 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대한 형광스펙트럼 값을 측정하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 형광스펙트럼 값을 측정하는 것은 하기 계산식으로 계산되는 것을 특징으로 하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정하는 방법;

$$\frac{\text{여기 스펙트럼(535nm방출파장고정시)의 500nm 값}}{\text{여기 스펙트럼(535nm방출파장고정시)의 415nm 값}} = F_{500nm}/F_{415nm}$$

계산식 :

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 목적 단백질에서 메티오닌 잔기에서의 산화가 많이 일어날수록 형광스펙트럼 값의 수치는 낮아지는 것을 특징으로 하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정하는 방법.

청구항 14

시험대상에서 분리된 생물학적 시료에 제10항의 조성물을 처리한 다음, 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대한 형광스펙트럼 값을 정상 대조군에 대한 형광스펙트럼 값과 비교하는 단계를 포함하되, 상기 형광스펙트럼 값은 하기 계산식으로 계산되는 것을 특징으로 하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법;

$$\frac{\text{여기 스펙트럼(535nm방출파장고정시)의 500nm 값}}{\text{여기 스펙트럼(535nm방출파장고정시)의 415nm 값}} = F_{500nm}/F_{415nm}$$

계산식 :

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 시료는 세포, 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 타액 또는 뇨인 것을 특징으로 하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 산화적 스트레스 관련 질환은 암, 뇌졸중, 심근경색증, 협심증, 동맥경화증, 불임, 간염, 골관절염, 백내장, 노화, 지질대사질환, 심부전증, 고혈압성 심장질환, 부정맥 및 노화로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 17

(1) 메티오닌 잔기를 함유하는 단백질을 포함하는 시료에 산화적 스트레스를 유도하는 단계;

(2) 상기 시료에 후보약물을 처리하는 단계; 및

(3) 상기 후보물질이 처리된 시료에 제10항의 조성물을 처리하고, 형광바이오 센서용 제조합 단백질에 대한 형광스펙트럼 값을 후보약물을 처리하지 않은 대조군에 대한 형광스펙트럼 값과 비교하는 단계를 포함하되, 상기 형광스펙트럼 값은 하기 계산식으로 계산되는 것을 특징으로 하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법;

$$\frac{\text{여기 스펙트럼(535nm방출파장고정시)의 500nm 값}}{\text{여기 스펙트럼(535nm방출파장고정시)의 415nm 값}} = F_{500nm}/F_{415nm}$$

계산식 :

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 후보약물을 처리한 형광스펙트럼 값이 대조군의 형광스펙트럼 값에 비해 높은 경우, 상기 후보약물은 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 산화적 스트레스 관련 질환은 암, 뇌졸중, 심근경색증, 협심증, 동맥경화증, 불임, 간염, 골관절염, 백내장, 노화, 지질대사질환, 심부전증, 고혈압성 심장질환, 부정맥 및 노화로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 특정 단백질의 메티오닌 잔기의 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있는 형광단백질 센서 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 살아있는 생물은 체내의 대사과정 혹은 외부의 환경 스트레스에 의해 발생하는 활성산소의 위협에 대해 항상 노출되어 있다. 이러한 활성산소의 문제점은 생체 내 거대분자(Macromolecule)들을 손상시킴으로써 병의 발생이나 노화의 촉진을 유발한다. 이러한 거대 분자 중 대표적으로 DNA, 지질, 단백질 등이 활성산소에 의한 직접적인 손상을 받는다.

[0003] 산화적 스트레스의 대표적인 원인물질 중 하나인 활성산소는 일반적인 세포 활동의 부산물로 여러 세포 소기관의 대사과정 및 효소 반응에서 자연적으로 생성된다. 일반적인 경우 생체는 그에 대응하는 항산화 기작을 가지고 있으며 활성산소의 생성과 균형을 이룬다. 하지만 노화나 질병 등의 발생하게 되면 활성산소의 발생이 급격히 증가하거나 체내의 항산화 기작이 정상적인 기능을 하지 못하여 활성산소에 의한 생체 내 물질의 손상이 축적되는 산화 스트레스가 발생한다. 산화 스트레스에 의해 DNA, 단백질, 지질 등 생체 내 물질이 손상되면 다시 노화나 질병을 악화시키는 결과를 초래하게 되며, 따라서 노화뿐만 아니라 암이나 심혈관계 질환 등 여러 질병

의 진단이나 추적에서 체내 활성산소의 수준은 매우 중요한 정보이다.

[0004] 이에 생체 내 활성산소의 양을 측정하기 위한 기술의 연구가 진행되었고, 그 결과 DCFDA, DHE 염색 등 형광 염색약을 이용하는 방법 등이 개발되었다. 하지만 활성산소는 순간적으로 발생하고 다른 생체 내 거대분자들과 즉각적으로 반응하기 때문에 살아있는 세포를 제외하고 일반적인 생체 샘플에서는 활성산소의 양을 직접적으로 측정하기에는 한계가 있다.

[0005] 또 다른 방법으로는 활성산소에 의해 산화되는 물질에 대한 측적을 측정하는 방법이 개발되고 있으며, 특히 메티오닌(Methionine)은 곁사슬(Side chain)에 황원자가 존재하기 때문에 다른 아미노산들에 비해 비교적 쉽게 산화가 이루어지는 아미노산이다. 이런 이유로 메티오닌(Methionine)은 항상 활성산소와의 전투에 있어서 최전선에 위치한 선봉장의 역할을 수행하고 있고, 활성산소에 의한 단백질 변형과 기능상실에 있어서 자유롭지 못하기에 활성산소의 양을 간접적으로 메티오닌 잔기의 산화정도 측정을 통해 확인하려는 연구가 개발되었다.

[0006] 그러나 종래 개발된 메티오닌 잔기의 산화정도 측정은 생체 내 전체 단백질에 대한 메티오닌 잔기의 산화정도를 측정하는 기술로서, 아직까지 특정 단백질에서의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 기술이 개발되지 못하고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 1. 일본등록특허 JP4900393
(특허문헌 0002) 2. 일본등록특허 JP4998230

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 활성산소에 의해 목적하는 특정 단백질에서 일어나는 메티오닌 잔기의 산화정도를 높은 특이도 및 민감도로 정확하게 측정할 수 있는 생체 단백질 기반의 새로운 형광단백질 센서를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 포함하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도의 정량 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용한 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용한 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용한 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 그러므로 본 발명은 MsrB 단백질; cpYFP 단백질; thioredoxin 3 단백질; 링커 단백질; 및 protein G 단백질이 순차적으로 연결된, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 MsrB 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 1~139번째의 아미노산로 이루어진 것이고, 상기 cpYFP 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 140~381번째의 아미노산로 이루어진 것이고, 상기 thioredoxin 3 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 382~488번째의 아미노산로 이루어진 것이고, 상기 링커 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 489~521번째의 아미노산로 이루어진 것이고, 상기 protein G 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열에서 522~575번째의 아미노산로 이루어진 것일 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열에서 MsrB 단백질을 코딩하는 염기서열은 1~417번째의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 cpYFP 단백질을 코딩하는 염기서열은 418~1143 번째의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 thioredoxin 3 단백질을 코딩하는 염기서열은 1144~1464 번째의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 링커 단백질을 코딩하는 염기서열은 1465~1563 번째의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 protein G 단백질을 코딩하는 염기서열은 1564~1725 번째의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0024] 또한 본 발명은 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터를 제공한다.
- [0025] 또한 본 발명은 본 발명의 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0026] 또한 본 발명은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 포함하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서를 제공한다.
- [0027] 또한 본 발명은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질 및 검출 목적 단백질에 대한 1차 항체를 포함하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도의 정량 검출용 조성물을 제공한다.
- [0028] 또한 본 발명은, (1) 메티오닌 잔기를 함유한 목적 단백질이 포함된 시료를 준비하는 단계; (2) 상기 시료에 상기 목적 단백질에 대한 1차 항체를 처리하여 상기 항체를 상기 목적단백질과 결합시키는 단계; (3) 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 처리하는 단계; 및 (4) 상기 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대한 형광 스펙트럼 값을 측정하는 단계를 포함하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정하는 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형광스펙트럼 값을 측정하는 것은 하기 계산식으로 계산되는 것일 수 있다.

$$\frac{\text{여기 스펙트럼(535nm방출파장고정시)의 500nm 값}}{\text{여기 스펙트럼(535nm방출파장고정시)의 415nm 값}} = F_{500nm}/F_{415nm}$$

- [0030] 계산식 :
- [0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 목적 단백질에서 메티오닌 잔기에서의 산화가 많이 일어날수록 형광스펙트럼 값의 수치는 낮아지는 것일 수 있다.
- [0032] 또한 본 발명은, 시험대상에서 분리된 생물학적 시료에 본 발명의 검출용 조성물을 처리한 다음, 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대한 형광스펙트럼 값을 정상 대조군에 대한 형광스펙트럼 값과 비교하는 단계를 포함하되, 상기 형광스펙트럼 값은 상기 계산식으로 계산되는 것을 특징으로 하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 시료는 세포, 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 타액 또는 뇨일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 산화적 스트레스 관련 질환은 암, 뇌졸중, 심근경색증, 협심증, 동맥경화증, 불임, 간염, 골관절염, 백내장, 노화, 지질대사질환, 심부전증, 고혈압성 심장질환, 부정맥 및 노화로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0035] 또한 본 발명은, (1) 메티오닌 잔기를 함유하는 단백질을 포함하는 시료에 산화적 스트레스를 유도하는 단계; (2) 상기 시료에 후보약물을 처리하는 단계; 및 (3) 상기 후보물질이 처리된 시료에 본 발명의 검출용 조성물을 처리하고, 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대한 형광스펙트럼 값을 후보약물을 처리하지 않은 대조군에 대한 형광스펙트럼 값과 비교하는 단계를 포함하되, 상기 형광스펙트럼 값은 상기 계산식으로 계산되는 것을 특징으로 하는, 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 후보약물을 처리한 형광스펙트럼 값이 대조군의 형광스펙트럼 값에 비해 높은 경우, 상기 후보약물은 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 산화적 스트레스 관련 질환은 암, 뇌졸중, 심근경색증, 협심증, 동맥경화증, 불임, 간염, 골관절염, 백내장, 노화, 지질대사질환, 심부전증, 고혈압성 심장질환, 부정맥 및 노화로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0038] 본 발명에 따른 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 혼합된 생물학적 시료에서도 전체 단백질이 아닌 특정 단백질에서 메티오닌 잔기의 산화정도를 특이적 형광변화 검출을 통해 정확하게 정량적으로 측정할 수 있다. 따라서 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 산화적 스트레스 질환의 진단을 위한 형광 바이오센서로 사용될 수 있고, 산화적 스트레스 질환의 치료제를 스크리닝 방법에도 사용될 수 있으며, 약물 처리 후 질환의 상태를 진단할 수 있는 방법에도 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 특정 단백질의 메티오닌 잔기의 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있는 본 발명의 형광바이오센서용 재조합 단백질의 유전자 구성을 나타낸 모식도와 이를 포함하는 재조합 발현벡터인 pBYTLG벡터의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 형광바이오센서용 재조합 단백질의 작동 원리를 나타낸 것으로, 2A는 목표 단백질과 그에 상응하는 항체가 존재할 때 본 발명의 형광바이오센서용 재조합 단백질이 항체의 Fc 영역에 결합하는 모습을 나타낸 모식도이고, 2B는 본 발명의 형광바이오센서용 재조합 단백질이 목표 단백질의 메티오닌 설펍사이드(MetO)를 메티오닌(Met)으로 환원시키면서 재조합 단백질 내부의 MsrB1과 Trx3사이에 이황화결합이 형성되고, 이로 인해 cpYFP의 구조에 영향을 미쳐 분광학적 특성 변화가 일어나는 과정을 나타낸 것이며, 2C는 본 발명의 형광바이오센서용 재조합 단백질의 특성을 이용하여 ELISA 실험을 수행하는 과정을 모식도로 나타낸 것이다.

도 3은 대장균에서 발현시킨 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대한 분광학적 특성인 흡광 스펙트럼, 발광 스펙트럼, 여기 스펙트럼 결과를 나타낸 것으로, 3A는 340nm부터 700nm 파장영역에 대한 흡광도 스펙트럼 결과이고, 3B는 각각 산화(빨간색 선) 및 환원(검정색 선)된 상태의 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대하여 410nm 파장의 빛을 여기파장으로 조사했을 때 측정되는 500nm부터 600nm 파장영역에 대한 방출 스펙트럼 결과이며, 3C는 각각 산화(빨간색 선) 및 환원(검정색 선)된 상태의 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 535nm 파장을 방출파장으로 고정하였을 때, 360nm부터 520nm 파장영역에 대한 여기 스펙트럼 결과이고, 3D는 3C의 결과를 바탕으로 산화 및 환원된 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대하여 여기 스펙트럼 값 중에서 가장 차이가 큰 값(F_{500nm})을 가장 차이가 적은 값(F_{415nm})으로 나누어주었을 때의 값을 나타낸 막대그래프이며, 3E는 여기스펙트럼의 결과값(F_{500nm}/F_{415nm})을 본 발명의 형광바이오 센서의 산화상태 검출 지표로 사용할 시, 계산방법에 관한 수식을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 메티오닌 함유 단백질을 대상으로, 혼합생물 시료에 존재하는 각각 특정 단백질에 대한 메티오닌 산화상태를 측정한 결과를 나타낸 것으로, 각각의 단백질에 대하여 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 활용하여 ELISA를 통해 측정된 여기 스펙트럼의 결과 값(F_{500nm}/F_{415nm})을 나타낸 것이다.

도 5는 혼합생물 시료를 대상으로 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용하여 ELISA를 통해, 메티오닌 함유 단백질 중 하나인 Calmodulin을 타겟단백질로 하여 측정된 형광바이오 센서용 재조합 단백질의 여기 스펙트럼 결과값(F_{500nm}/F_{415nm})을 나타낸 것으로, 5A는 Raw264.7 세포에 과산화수소를 처리한 실험군의 결과이고, 5B는 Raw264.7 세포에 NaOCl을 처리한 실험군의 결과이며, 5C는 U87MG 세포에 과산화수소를 처리한 실험군의 결

과이고, 5D는 U87MG세포에 NaOCl을 처리한 실험군의 결과이다.

도 6은 마우스 기관 추출물을 대상으로 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용하여 ELISA 실험을 수행한 결과를 나타낸 것으로, 메티오닌 포함 단백질중 하나인 Calmodulin을 타겟 단백질로 하였을 때 측정된 본 발명의 형광바이오센서의 여기스펙트럼의 결과값(F_{500nm}/F_{415nm})을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0040] 본 발명은 산화적 스트레스에 의해 생체 내 특정 단일 타겟 단백질에서 일어나는 메티오닌의 산화를 정량적으로 측정할 수 있는 새로운 형광단백질 센서를 제공한다는 점에 특징이 있으며, 구체적으로, MsrB 단백질; cpYFP 단백질; thioredoxin 3 단백질; 링커 단백질 및 protein G 단백질이 순차적으로 연결된, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 제공한다.
- [0041] 본 발명에 따른 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용한 목적 단백질, 즉 타겟 단백질에서의 메티오닌의 산화 측정은 형광변화 측정을 통해 정량적으로 측정할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서는 특정 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화 측정을 위해 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 제조하였는데, MsrB 단백질; cpYFP 단백질; thioredoxin 3 단백질; 링커 단백질 및 protein G 단백질이 순차적으로 융합된 재조합 단백질을 제조하였다.
- [0043] 상기 cpYFP(circularly permuted yellow fluorescence protein) 단백질은 일반적으로 알려진 형광단백질을 유전적으로 조작하여 만든 인위적인 단백질이며 cpYFP 단백질은 두 개의 fluorophore들이 거리가 멀어짐에 따라 서로간의 영향력 감소해 발광하는 원리인 FRET 방식과는 다르게 직접적인 구조변화를 통해 형광 값이 변하는 원리를 이용하여 다양한 바이오센서 개발에 이용되고 있다.
- [0044] 따라서 본 발명에서는 구조변화에 따라 형광 값이 변하는 cpYFP(circularly permuted yellow fluorescence protein) 단백질의 한쪽 말단에 메티오닌 설펡사이드(메티오닌의 산화를 통해 생성된 결과물)를 환원시킬 수 있는 효모 또는 세균유래 MsrA/MsrB를 결합시키고, 다른 한쪽 말단에 메티오닌 설펡사이드를 환원시킨 후 스스로 산화된 형태를 띠는 MsrA/MsrB를 다시 원래의 환원된 형태로 돌려줄 수 있는 thioredoxin 3 단백질을 결합시켰다. 여기서 다시 thioredoxin 3에 링커를 연결시킨 후 연쇄상구균 유래 protein G 단백질을 연결시켰다.
- [0045] 산화된 메티오닌을 갖고 있는 단백질들은 일차적으로 MsrA/MsrB에 의해 환원이 이루어지고, 이어서 cpYFP의 다른 쪽 말단에 붙어있던 thioredoxin 3과의 이황화 결합을 통한 MsrA/MsrB의 재생과정이 이루어진다. 이때 재생 과정에서 생성되는 MsrA/MsrB와 thioredoxin간의 이황화는 두 단백질간의 거리를 가깝게 하고 이를 통해 중간에 위치해 있던 cpYFP는 형광값이 변하게 된다. 이러한 형광값의 변화 측정을 통해 메티오닌 산화물, 즉 메티오닌 설펡사이드가 얼마나 존재하는지를 정량적으로 측정할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 MsrB 단백질은, 단백질 내 메티오닌 산화물인 메티오닌-R-설펡사이드(methionine-R-sulfoxide)를 환원시키는 활성이 있다. 이러한 환원이 일어난 후 MsrB 단백질 내 Cys69와 Cys129가 산화되어 이황화결합(disulfide bond)을 형성한다.
- [0047] 또한, 상기 Thioredoxin 3은 메티오닌-R-설펡사이드를 환원하는 과정에서 생긴 MsrB 단백질 내의 이황화결합을 다시 환원을 통해 끊는 작용을 한다. 이 과정을 보다 상세히 설명하면, thioredoxin 3 단백질 내 Cys417이 이황화결합을 공격하여 환원시키며 이후 MsrB의 Cys129와 thioredoxin 3의 Cys417 사이에 새로운 이황화결합이 형성된다. 이때 원래 thioredoxin 3의 또 다른 Cys129가 새롭게 형성된 MsrB와 thioredoxin 3 사이의 이황화결합을 끊음으로써 MsrB의 재생이 완료되는데 유전자 조작을 통해 Cys129를 Ser129로 치환하여 이러한 과정이 일어나지 않도록 하였다. 그 결과로서, MsrB와 thioredoxin 3 사이의 이황화결합은 계속 유지가 되고 중간에 위치한 cpYFP의 구조가 바뀐 상태로 유지될 수 있다. 이는 곧 cpYFP의 형광 값의 변화가 유지되도록 만들어주고, 이를 통해 메티오닌 산화물의 정량적 측정이 가능하게 된다.
- [0048] 또한, Thioredoxin 3과 protein G 사이의 링커 단백질의 역할은 protein G 와 MsrB-cpYFP-Trx3 사이의 거리를 충분히 유지하도록 하여 MsrB가 안정적으로 기질에 접근할 수 있도록 제조한 것이다. 이를 위해 연결부위 아미노산 서열은 단백질 접힘 과정을 거쳤을 때 2차 구조를 형성하지 않는 서열의 연속으로 삽입되어 있다.
- [0049] 또한, Protein G는 면역 글로불린-결합 단백질로써 항체에 대해 결합능력을 가지고 있다. 사람이나 쥐 등의 포유동물에 존재하는 항체(주로 IgG type)의 Fab 및 Fc 영역에 대한 결합을 통해 항체를 정제하는 데 주로 사용되는 단백질이다. 본 발명에서는 Protein G 단백질을 이용함으로써 검출하고자 하는 특정 단백질에 결합된 항체에

대하여 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질이 특이적으로 특정 단백질에만 결합하여 특이적으로 결합한 단백질의 메티오닌 산화물을 정량적으로 측정할 수 있도록 하였다.

- [0050] 이러한 본 발명에 따른 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용한 특정 단백질의 메티오닌 산화물 정량방법에 대한 원리를 도 2의 A~C에 나타내었다.
- [0051] 그러므로 본 발명은 MsrB 단백질; cpYFP 단백질; thioredoxin 3 단백질; 링커 단백질 및 protein G 단백질이 순차적으로 연결된, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 제공할 수 있다.
- [0052] 바람직하게 상기 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 상기 MsrB 단백질은 1~139번째의 아미노산으로 이루어진 것이고, 상기 cpYFP 단백질은 140~381번째의 아미노산으로 이루어진 것이고, 상기 thioredoxin 3 단백질은 382~488번째의 아미노산으로 이루어진 것이고, 상기 링커 단백질은 489~521번째의 아미노산으로 이루어진 것이고, 상기 protein G 단백질은 522~575번째의 아미노산으로 이루어진 것일 수 있다.
- [0053] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공할 수 있으며, 바람직하게 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0054] 서열번호 1의 염기서열에서 MsrB 단백질을 코딩하는 염기서열은 1~417번째의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 cpYFP 단백질을 코딩하는 염기서열은 418~1143 번째의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 thioredoxin 3 단백질을 코딩하는 염기서열은 1144~1464 번째의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 링커 단백질을 코딩하는 염기서열은 1465~1563 번째의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 protein G 단백질을 코딩하는 염기서열은 1564~1725 번째의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0055] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드, 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 발현벡터를 제공할 수 있으며, 본 발명에서 상기 ‘발현벡터’는 본 발명의 재조합 단백질을 발현시키는 형질전환체를 만들기 위하여 숙주세포에 DNA를 도입하여 재조합 단백질을 발현시키기 위한 수단으로서, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터 등이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 플라스미드 벡터를 사용할 수 있다. 본 발명의 목적상 발현벡터는 프로모터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인헨서 같은 발현조절 엘리먼트를 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 일실시예에서는 서열번호 1의 재조합 폴리뉴클레오티드 서열을 pET His6 ProteinG TEV LIC 클로닝 벡터로 삽입하여 재조합 발현벡터인 “pBYTLG”을 제조하였다.
- [0057] 상기 본 발명의 발현벡터는 본 발명의 재조합 단백질을 발현할 수 있는 숙주세포, 예컨대 대장균(E.coli) 세포에 도입한 후, 대장균(E.coli) 등의 숙주세포에서 상기 단백질을 대량으로 발현시킬 수 있고, 발현된 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 당업계에 공지된 단백질 정제 방법을 통해 정제할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 His-tag을 이용한 컬럼크로마토그래피를 통해 본 발명의 재조합 단백질을 제조하였다.
- [0058] 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 앞서 기술한 원리에 의해 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 바, 본 발명은 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 포함하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정할 수 있는 형광바이오 센서를 제공할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 형광바이오 센서는 재조합 단백질을 이용하여 다른 생물학적 활성에는 영향을 주지 않으면서 강력하게 항체가 결합하고 있는 검출 목적 단백질에 결합할 수 있으며, 이때 상기 검출 목적 단백질 또는 검출 목적 단백질을 함유한 시료는 기관에 처리하여 기관 상에 고정시킨 후, 분석을 수행할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 재조합 단백질은 Protein G를 포함하고 있어, 목적 단백질에 결합된 1차 항체의 Fc 부위에 Protein G 영역이 결합하는 특성을 이용하여 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질이 특정 타겟 목적 단백질에 특이적으로 결합할 수 있고 목적 단백질 내의 메티오닌에 대한 산화정도를 측정할 수 있다.
- [0061] 또한 본 발명은 형광바이오 센서용 재조합 단백질 및 검출 목적 단백질에 대한 1차 항체를 포함하는, 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도의 정량 검출용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0062] 또한 본 발명은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용하여 목적 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정하는 방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은 바람직하게, (1) 메티오닌 잔기를 함유한 목적 단백질이 포함된 시료를 준비하는 단계; (2) 상기 시료에 상기 목적 단백질에 대한 1차 항체를 처리하여 상기 항

체를 상기 목적단백질과 결합시키는 단계; (3) 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 처리하는 단계; 및 (4) 상기 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대한 형광스펙트럼 값을 측정하는 단계를 포함한다.

[0063] 특히 본 발명은 종래 방법과 달리, 분석하고자 하는 단일 단백질에서의 산화정도를 측정할 수 있는 기술로서, 본 발명의 일실시예에서는 메티오닌 함량이 각기 다른 단백질들에 대해 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용할 경우, 각각의 단백질에서의 메티오닌 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있음을 실험을 통해 확인하였다.

[0064] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, MsrB1 유전자가 결여되어 야생형에 비해 높은 산화수준을 형성하도록 유도한 후, 상기 마우스로부터 다양한 조직(소장, 대장, 뇌, 심장, 간, 콩팥, 폐)을 각각 분리한 다음, 상기 조직의 추출물과 야생형 대조군 마우스의 조직 추출물에 목적 단백질로서 calmodulin을 임의적으로 선택한 후, calmodulin에 대한 1차 항체를 먼저 처리하여 상기 항체를 calmodulin 단백질에 결합시킨 후, 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 처리한 후, ELISA를 통해 형광스펙트럼 값의 측정으로 목적 단백질인 calmodulin 내의 메티오닌 산화 정도를 측정하였다.

[0065] 그 결과, 다수의 단백질들이 다량 함유된 조직 유래 추출물에서 목적 단백질에 대한 메티오닌의 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있음을 확인하였다.

[0066] 본 발명의 방법에서 상기 형광스펙트럼 값의 측정은 하기 계산식을 통해 계산될 수 있다.

$$\frac{\text{여기 스펙트럼(535nm발출파장고정시)의 500nm 값}}{\text{여기 스펙트럼(535nm발출파장고정시)의 415nm 값}} = F_{500nm}/F_{415nm}$$

[0067] 계산식 :

[0068] 상기 목적 단백질에서 메티오닌 잔기에서의 산화가 많이 일어날수록 형광스펙트럼 값의 수치는 낮아진다.

[0069] 본 발명의 일실시예에서는 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용하여 형광측정을 통해 특정 단백질의 메티오닌 산화정도를 정확하게 측정할 수 있는 최적의 조건으로, 상기 계산식을 통해 형광스펙트럼 값을 계산할 수 있음을 확인하였다.

[0070] 나아가 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 산화적 스트레스 관련 질환의 진단에도 사용될 수 있는 특징이 있다.

[0071] 활성산소와 같은 산화적 스트레스는 다양한 질병의 원인이 되고 있다. 따라서 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질은 타겟 단백질에서의 산화정도를 측정할 수 있으므로, 산화적 스트레스 관련 질환의 증상정도, 약물 처리 후의 예후 또는 치료제를 스크리닝 하는 방법 등에 유용하게 사용할 수 있다.

[0072] 따라서 본 발명은 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용한 산화적 스트레스 관련 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있으며, 상기 방법은, 시험대상에서 분리된 생물학적 시료에 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 처리한 다음, 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대한 형광스펙트럼 값을 대조군에 대한 형광스펙트럼 값과 비교하는 단계를 포함하며, 상기 형광스펙트럼 값은 상기 계산식을 통해 계산된다.

[0073] 이때 상기 형광스펙트럼 값이 대조군의 값에 비해 높아지는 경우, 산화적 스트레스 관련 질환의 증상이 개선되고 있다고 판단할 수 있으며, 반면, 상기 형광스펙트럼 값이 대조군의 값에 비해 낮아지는 경우, 이는 산화적 스트레스가 증가하여 목적 단백질에서의 메티오닌 산화정도가 증가한 것으로 산화적 스트레스 관련 질환의 증상이 악화되고 있다고 판단할 수 있다.

[0074] 상기 시료는 세포, 조직, 혈액, 혈장, 혈청, 타액 또는 뇨일 수 있다.

[0075] 상기 산화적 스트레스 관련 질환은 이에 제한되지는 않으나, 암, 뇌졸중, 심근경색증, 협심증, 동맥경화증, 불임, 간염, 골관절염, 백내장, 노화, 지질대사질환, 심부전증, 고혈압성 심장질환, 부정맥 및 노화로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0076] 또한 본 발명은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용하여 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은, (1) 메티오닌 잔기를 함유하는 단백질을 포함하는 시료에 산화적 스트레스를 유도하는 단계; (2) 상기 시료에 후보약물을 처리하는 단계; 및 (3) 상기 후보물질이 처리된 시료에 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 처리하고, 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대한 형광스펙트럼 값을 후보약물을 처리하지 않은 대조군에 대한 형광스펙트럼 값과 비교하는 단계를 포함하며, 상기 형광스펙트럼 값은 상기 계산식으로 계산된다.

[0077] 이때 상기 후보약물을 처리한 형광스펙트럼 값이 대조군의 형광스펙트럼 값에 비해 높은 경우, 상기 후보약물은 산화적 스트레스 관련 질환의 치료제로 판단할 수 있다. 이는 후보약물의 처리로 인해 대조군보다 목적 단백질에서의 메티오닌 산화 정도가 감소되었다는 것을 의미하므로 상기 후보물질이 산화적 스트레스의 증상을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 활성이 있다고 판단할 수 있다.

[0078]

[0079] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0081] <실시예 1>

[0082] 특정 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있는 형광단백질 센서용 재조합 DNA 구조물의 제조

[0084] <1-1> 형광단백질 센서용 재조합 DNA 구조물의 제조

[0085] 본 발명자들은 목적하는 타겟 단백질의 메티오닌 잔기에서의 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있는 형광단백질 센서용 재조합 DNA 구조물의 제조를 위해 다음과 같은 방법으로 클로닝을 수행하였다.

[0086] 먼저, 효모유래 MsrB 단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 1의 1~417 bp), cpYFP 단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 1의 418~1143 bp), 효모유래 thioredoxin 3을 코딩하는 염기서열(서열번호 1의 1144~1464 bp), 링커 단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 1의 1465~1563 bp), protein G 단백질을 코딩하는 염기서열(서열번호 1의 1564~1725 bp)의 DNA를 pET His6 ProteinG TEV LIC 클로닝 벡터로 클로닝하여, 도 1의 pBYTLG 재조합 벡터를 제조하였다.

[0087] 보다 구체적으로, 상기 재조합 벡터에 포함된 MsrB-cpYFP-Thioredoxin 3의 유전자 클로닝을 위해, pGEX4T-1 플라스미드의 MetROx를 주형으로 이용하여 PCR(Polymerase chain reaction) 과정을 통해 증폭하였는데, 이 과정은 0.2ml PCR 튜브에 무균물, 10X PCR 버퍼, dNTPs, MgSO₄, MetROx_정방향 프라이머, MetROx_역방향 프라이머, 주형 DNA, KOD FX Neo polymerase를 순서대로 첨가하고 혼합한 후, 원심분리기를 통해 튜브 벽에 용액에 묻어있지 않도록 100xg로 3초간 스핀 다운시켰다. KOD FX Neo polymerase을 이용하여 PCR을 수행하였는데, PCR 반응 조건은 94℃ 2분 반응 후 94℃ 20초, 59℃ 30초, 68℃ 2분30초 조건에서 30 cycle 실시 후 68℃에서 5분 연장(elongation) 반응을 수행하였다. PCR 증폭 후, 증폭 결과물에 링커 단백질의 유전자와 연쇄상구균유래 protein G의 유전자를 클로닝으로 차례대로 연결시킨 후, pET His6 TEV LIC 클로닝 벡터의 MCS(Multiple cloning site)에 클로닝과정을 이용하여 재조합 플라스미드를 제조하였고, 삽입하고자 하는 DNA가 잘 도입되었는지를 염기서열 분석을 통해 확인하였으며, 이러한 방법으로 제조된 재조합 벡터를 “pBYTLG” 벡터라고 명명하였다.

[0089] <1-2> 형광바이오 센서용 재조합 단백질의 정제

[0090] 상기 <1-1>에서 제조된 “pBYTLG” 발현벡터를 이용하여 본 발명에 따른 특정 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있는 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 다음과 같은 방법을 통해 정제하였다.

[0091] 이를 위해, 상기 <1-1>에서 제조된 “pBYTLG” 발현벡터를 대장균에 도입하여 형질전환시키고, 상기 대장균에서 단백질의 발현을 유도시킨 후, His-tag을 이용한 affinity chromatography를 수행하여 단백질을 정제하였는데, 구체적으로 설명하면, pBYTLG 벡터를 준비된 대장균에 형질전환(transformation)한 후, 6L의 대장균 배양세포 용액을 원심분리하여 침전시킨 대장균체를 100ml의 용해버퍼(lysis buffer: 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2mM beta mercaptoethanol, pH8)를 첨가하여 용해한 후, 4℃에서 초음파처리한 다음, 14000xg에서 원심분리하여 상층액을 수득하였고, 이후 0.45um 필터를 통과시킨 후, Ni-NTA 수지(resin)에 분당 3ml의 속도로 반응시켜 분리하고자 하는 단백질을 레진에 결합시켰다. 이후 용출버퍼(Elution buffer: 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 2mM beta mercaptoethanol, 500mM Imidazole pH8)를 사용하여 0~500mM imidazole을 농도구배로 흘려보내 주면서 단백질을 용출시켰다. 용출된 단백질을 50ml centrifugal filter를 사용하여 농축시킨 후, 12% 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 SDS-PAGE를 수행하여 단백질의 유무를 확인하였고, 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질

의 아미노산 서열을 서열목록 2에 나타내었다.

[0093] <실시예 2>

[0094] 본 발명의 형광바이오센서 작동확인 및 형광특성 분석

[0095] 상기 실시예 1에서 정제된 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 10 μ M 농도로 희석한 다음, 이황화 결합을 환원시켜 주는 물질인 DTT(dithiothreitol)를 10mM 농도(최종 농도)가 되도록 처리한 후 상온에서 30분간 반응시켜 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 완전한 환원상태로 만들어 주었다. 그런 뒤, 형광바이오 센서용 재조합 단백질만 남기고 나머지 이황화결합에 영향을 주는 물질을 제거하여 주기 위하여 탈염화 컬럼(desalting columns)을 이용하여 탈염과정을 수행하였다. 환원된 상태의 재조합 단백질을 다시 1 μ M 농도로 희석한 다음, 흡광도 스펙트럼(absorbance spectrum)을 측정하였다.

[0096] 이후, 환원된 상태의 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 각각 산화된 메티오닌 함유 단백질과 산화되지 않은 메티오닌 함유 단백질을 기질로 처리하였고, 30분간 상온에서 반응시켜준 후 형광 스펙트럼을 측정하였다. 방출 스펙트럼(emission spectrum)을 측정하기 위하여 가장 높은 흡광도 파장 값인 410nm로 여기해주면서 방출 스펙트럼을 측정하였다. 방출 스펙트럼 결과를 바탕으로 535nm를 방출 값으로 정한 다음 여기 스펙트럼(excitation spectrum)을 측정하였다.

[0098] 그 결과, 도 3은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질의 흡광도 스펙트럼(3A), 방출스펙트럼(3B), 여기 스펙트럼(3C)의 결과이다. 흡광도 스펙트럼의 분석결과, 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질이 가시광선영역 중에서 410nm 및 500nm 파장대의 빛을 가장 높은 비율로 흡수하는 것으로 나타났고(3A 참조), 이는 형광바이오 센서용 재조합 단백질 내부에 존재하는 발색단(chromophore)이 에너지 준위상태로 보았을 때 2가지 안정한 형태를 가지고 있음을 알 수 있다. 가장 높은 흡수율을 보이는 410nm 파장의 빛을 여기파장으로 하여 확인한 방출 스펙트럼의 분석 결과, 535nm 파장에서 가장 높은 빛을 방출하는 것으로 나타났으며(3B 참조), 이는 육안으로 보았을 때 노란색을 띄는 형광 바이오센서의 특성을 뒷받침한다.

[0099] 또한, MsrB1과 Trx3사이의 이황화결합에 의해 형광바이오 센서용 재조합 단백질 내부에 존재하는 발색단이 어떠한 영향을 받는지 확인하기 위하여 각각 이황화결합이 형성된 상태의 산화된 형광바이오 센서용 재조합 단백질과, 이황화결합이 형성되지 않은 상태의 환원된 형광바이오 센서용 재조합 단백질에 대하여 여기 스펙트럼을 측정하였다.

[0100] 그 결과, 445nm 파장보다 짧은 빛에 대해서는(특히 415nm, 442nm 에서) 산화 및 환원된 상태에서 여기 스펙트럼에 변화가 없었지만 445nm 파장보다 긴 파장대의 빛에 대해서는 환원된 형광바이오 센서용 재조합 단백질에서 여기 스펙트럼의 값이 산화된 형광바이오 센서용 재조합 단백질에서 보다 더 높게 나타났다(3C 참조).

[0101] 이러한 결과는 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질의 내부에 존재하는 발색단의 2가지 안정한 상태에서, 410nm를 흡수하는 상태는 MsrB1과 Trx3 단백질 사이의 이황화결합에 영향을 받지 않지만, 500nm를 흡수하는 발색단의 상태(state)에서는 MsrB1과 Trx3 단백질 사이의 이황화결합에 영향을 받는다는 사실을 의미한다. 이를 통하여 535nm 파장을 방출파장으로 지정한 다음 여기스펙트럼을 측정하였을 때 500nm 파장의 값을 415nm로 정규화 한 값(F_{500nm}/F_{415nm})을 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 포함하는 형광바이오센서의 산화정도를 나타내는 측정지표로서 사용할 수 있음을 알 수 있었다(3D 및 3E 참조). 또한 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질 내부의 MsrB1과 Trx3사이에 이황화결합이 형성이 많을수록 F_{500nm}/F_{415nm} 는 감소하는 특성을 갖는다는 것을 알 수 있었다.

[0103] <실시예 3>

[0104] 본 발명의 형광바이오센서를 이용하여 정제된 메티오닌 함유 특정 단백질에 대한 메티오닌의 산화상태 검출능 분석

[0105] 본 발명에서 제조한 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용하여 메티오닌을 함유한 특정 단백질에 대해서 메티오닌의 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있는지 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 메티오닌

의 함량이 각기 다른 하기 표 1의 단백질 5종에 대하여 순수하게 정제된 단백질을 각각 준비한 다음, 각 단백질에 대하여 과산화수소의 농도를 0, 40mM로 다르게 처리하여 단백질에 포함된 메티오닌의 산화정도가 달라지도록 준비하였다. 과산화수소를 통한 단백질의 산화과정은 교반기에서 5종의 각 단백질과(10uM, 100ul) 과산화수소(0, 60mM, 200ul)를 하나의 튜브에 각각 담아 섞어준 다음, 상온에서 2시간동안 교반과정을 통하여 산화되도록 하였고, 산화반응 종료 후 잔여 과산화수소는 Amicon Ultra 0.5 centrifugal filter with 10K cutoffs(Millipore, USA)를 이용한 원심분리를 통해 제거하였다. 각 단백질은 BCA 정량법을 통하여 정량한 후 동일한 농도로 희석해주었고, 희석버퍼는 단백질이 음의 전하를 띄게 하기 위하여 코팅버퍼(200mM sodium carbonate/bicarbonate pH9.4)를 사용하였다. 희석된 단백질 샘플을 Black immunoplate(SPL, Korea)에 넣어주고 상온에서 2시간동안 교반하여 단백질 샘플이 양전하로 코팅되어있는 플레이트바닥에 부착되도록 하였다. 코팅된 플레이트에 2% BSA를 포함하는 세척버퍼(2%(w/v)BSA, 20mM Phosphate, 150mM NaCl, 0.05%(v/v) Tween 20, pH7.4)를 200ul 첨가한 다음, 상온에서 1시간 동안 반응시켜 단백질이 코팅되지 않은 플레이트 부분을 반응성 없는 BSA 단백질로 코팅되도록 하였다(도 2C 참조). 그 다음 각각의 단백질에 1차 항체를 2% BSA를 포함하는 세척버퍼에 첨가하고 100ul씩 각각의 단백질에 첨가한 다음, 상온에서 2시간동안 반응시켜 항체가 단백질에 결합하도록 하였다. 이후 세척과정을 통하여 결합하지 않은 항체를 제거해 주었고, 본 발명의 메티오닌 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 1uM 농도로 모든 샘플에 100ul씩 처리한 다음, 18℃에서 2시간동안 반응시켜 주어, 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질의 protein G 부분이 1차 항체의 Fc 영역에 결합하도록 하였다. 이후 세척과정을 통하여 결합하지 않은 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 제거해 주었고, 37℃에서 30분간 반응시켜준 다음, 방출 파장을 535nm로 고정한 후, 여기 스펙트럼을 측정하였다.

표 1

Protein	Organism	Accession number	Total amino acids	# of Met residues	% of Met
Calmodulin-2 isoform 1(Calmodulin)	Mus musculus	NP_031615.1	149	10	7
Hypothetical protein(IDLO)	Idiomarina loihiensis	WP_011234467.1	147	32	22
Hypothetical protein(LegP)	Legionella pneumophila	WP_010946790.1	146	37	25
Hypothetical protein(Sacde)	Saccharophagus degradans	WP_011468416.1	146	36	25
Serum albumin precursor(BSA)	Bos Taurus	NP_851335.1	607	5	1

그 결과, 도 4는 상기 기술한 샘플에 대한 여기스펙트럼 결과를 바탕으로 500nm의 여기스펙트럼 값을 415nm의 여기스펙트럼으로 정규화한 값으로 분석된 결과로서, 분석결과 각각의 메티오닌 함량이 다른 5종류의 단백질 중에서 메티오닌 함량이 높은 단백질 4종에 대해 40mM의 과산화수소를 통하여 산화시킨 샘플에서 F_{500nm}/F_{415nm} 값이 낮은 것으로 측정되었다. 반면에 메티오닌 함량이 낮은 단백질인 BSA에 대해서는 40mM의 과산화수소를 통하여 산화시킨 샘플과 산화과정을 거치지 않은 단백질에서 F_{500nm}/F_{415nm} 값의 차이가 나타나지 않았다.

이러한 결과는 기질로 사용된 단백질에 포함된 메티오닌 잔기가 산화되었을 때, 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질이 이를 환원시키면서 자신은 산화되고 재조합 단백질 내부의 MsrB1과 Trx3사이에 이황화결합이 형성되면서 F_{500nm}/F_{415nm} 는 감소한다는 사실을 보여준다(도 2B). 따라서 특정 단백질 내부의 메티오닌 잔기가 산화된 특정 단백질에 대하여 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용한 경우, 개별적인 특정 단백질에서의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 정량적으로 측정 가능하다는 것을 알 수 있었다.

<실시예 4>

마우스 기관(organ) 추출물을 대상으로 본 발명의 형광바이오센서를 이용한 특정 단백질의 메티오닌 산화상태 검출능 분석

나아가 본 발명자들은 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용하여 체내 기관 내 추출물 중에서 개별적인 특정 단백질에 대한 메티오닌 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

MsrB1은 단백질의 메티오닌 잔기가 산화되어 메티오닌 설폭사이드 형태로 존재할 때 이를 환원시켜 메티오닌 환

원 역할 효소이다. MsrB1 효소에 대한 유전자가 결여된 마우스인 MsrB1 knock-out ($\text{MsrB1}^{-/-}$) 마우스는 일반적으로 단백질의 메티오닌 잔기가 야생형 마우스(WT)에 비하여 높은 수준으로 산화되어 있다. 따라서 $\text{MsrB1}^{-/-}$ 마우스와 야생형 마우스(WT)의 기관(organ)들을 대상으로 특정 단백질(calmodulin)의 메티오닌 잔기의 산화상태를 본 발명의 형광바이오센서가 측정할 수 있는지를 분석하였다.

[0114] 이를 위해, 10주령의 MsrB1 knock-out ($\text{MsrB1}^{-/-}$) 마우스와 야생형 마우스 (WT)를 각각 C57BL/6J 마우스 종으로 준비한 다음, 메티오닌 산화정도를 측정할 목표 단백질로서 mouse Calmodulin을 선정한 후, Calmodulin 단백질의 발현량이 높은 7개의 장기(소장, 대장, 뇌, 심장, 간, 콩팥, 폐)를 분리하였다. 각각의 장기를 PBS 용액으로 세척한 다음, 0.2% Tween/50mM Tris-base saline 용액 2ml을 첨가하고, 균질화분쇄기(homogenizer)를 이용하여 조직 및 세포를 용혈한 다음, 원심분리로 각 기관별 추출물을 수득하였다. 이후 상기 실시예에 기재된 동일한 방법을 이용하여 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용한 ELISA 실험을 통해 Calmodulin 단백질의 메티오닌 잔기에 대한 산화정도를 측정하였다.

[0116] 그 결과, 도 5는 상기 샘플에 대한 여기 스펙트럼 결과를 바탕으로 500nm의 여기스펙트럼 값을 415nm의 여기스펙트럼으로 정규화한 값을 나타낸 것이다. 본 발명에서 실험한 7개의 장기 모두, 야생형 마우스에 비해 $\text{MsrB1}^{-/-}$ 마우스에서 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질의 F_{500nm}/F_{415nm} 값이 낮은 것으로 나타났다(도 7 참조).

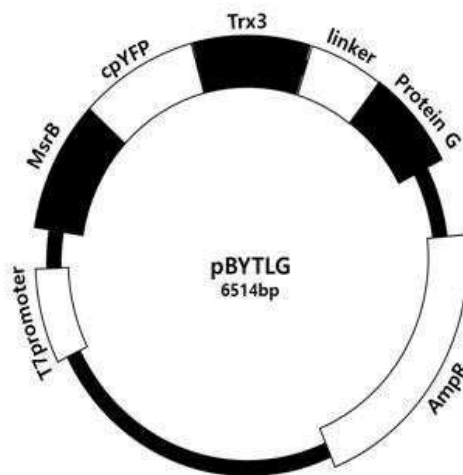
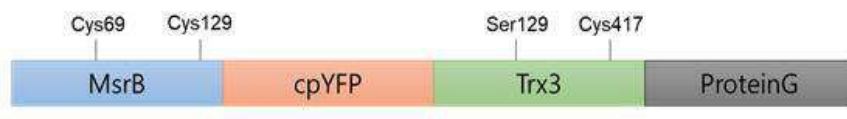
[0117] 이는 $\text{MsrB1}^{-/-}$ 마우스에서 야생형 마우스 보다 Calmodulin 단백질의 산화 상태가 높다는 것을 의미하며 단백질의 메티오닌 잔기를 환원시켜주는 효소인 MsrB1이 결여된 환경에서 단백질의 메티오닌 잔기가 더 높은 수준으로 산화되어 있다는 것을 나타낸다.

[0118] 따라서 본 발명자들은 이러한 결과를 통해, 본 발명의 형광바이오 센서용 재조합 단백질 및 형광바이오 센서용 재조합 단백질을 이용한 형광바이오센서를 사용할 경우, 목적하는 특정 단백질의 메티오닌에 대한 산화정도를 정량적으로 측정할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

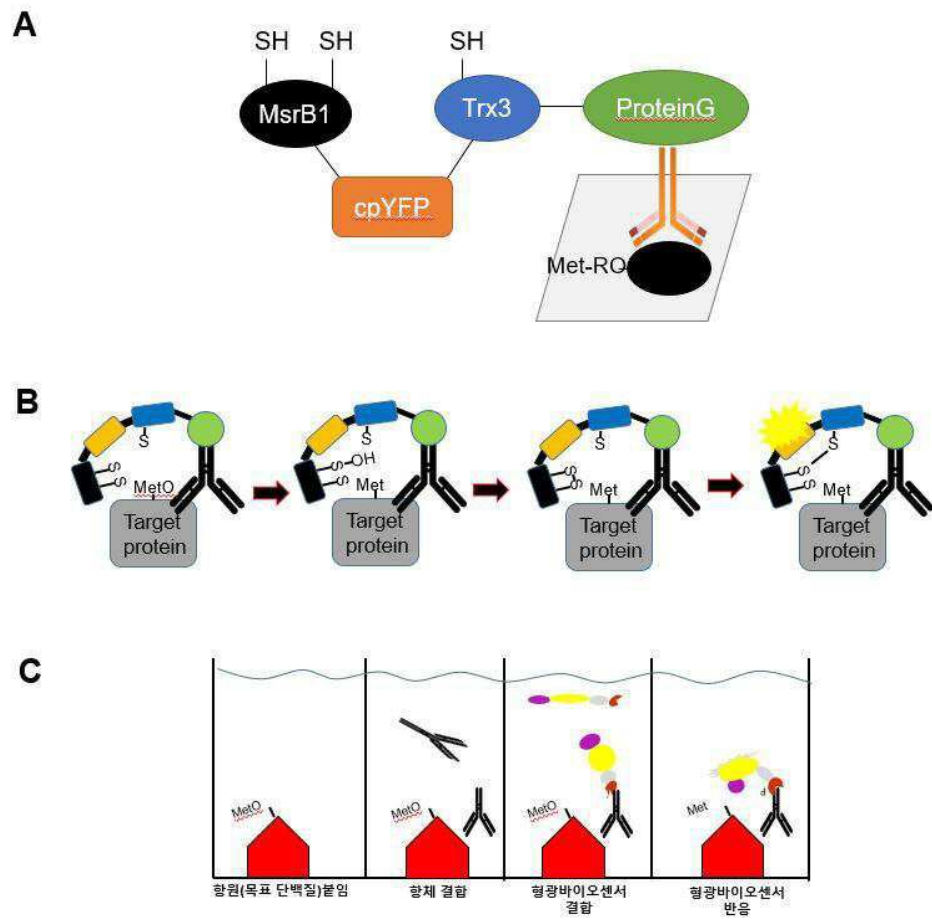
[0120] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

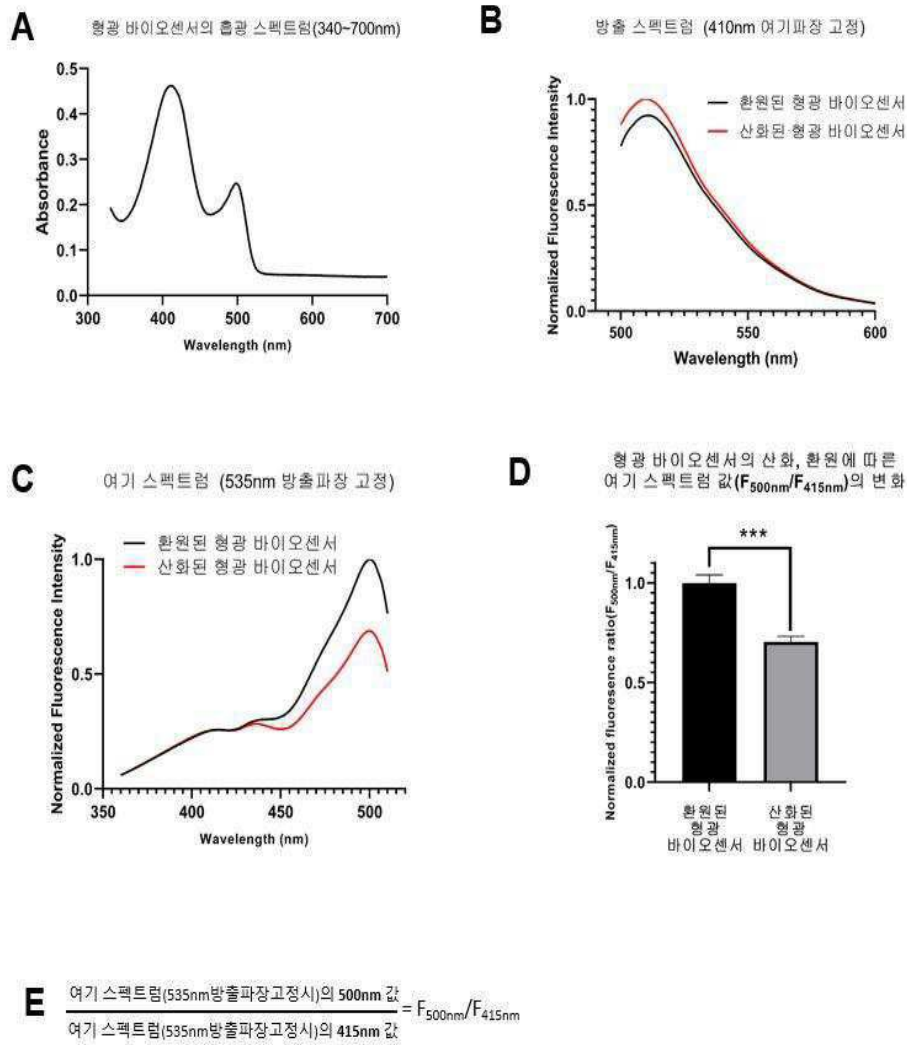
도면1



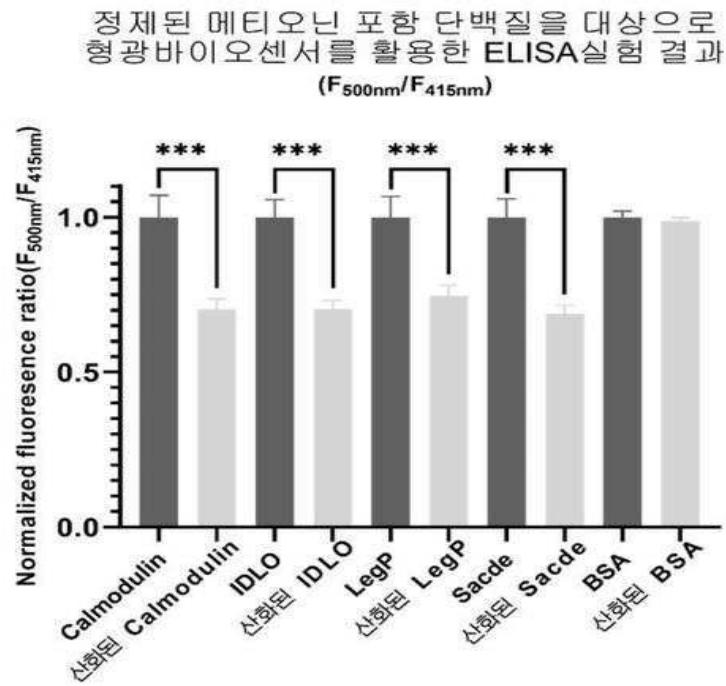
도면2



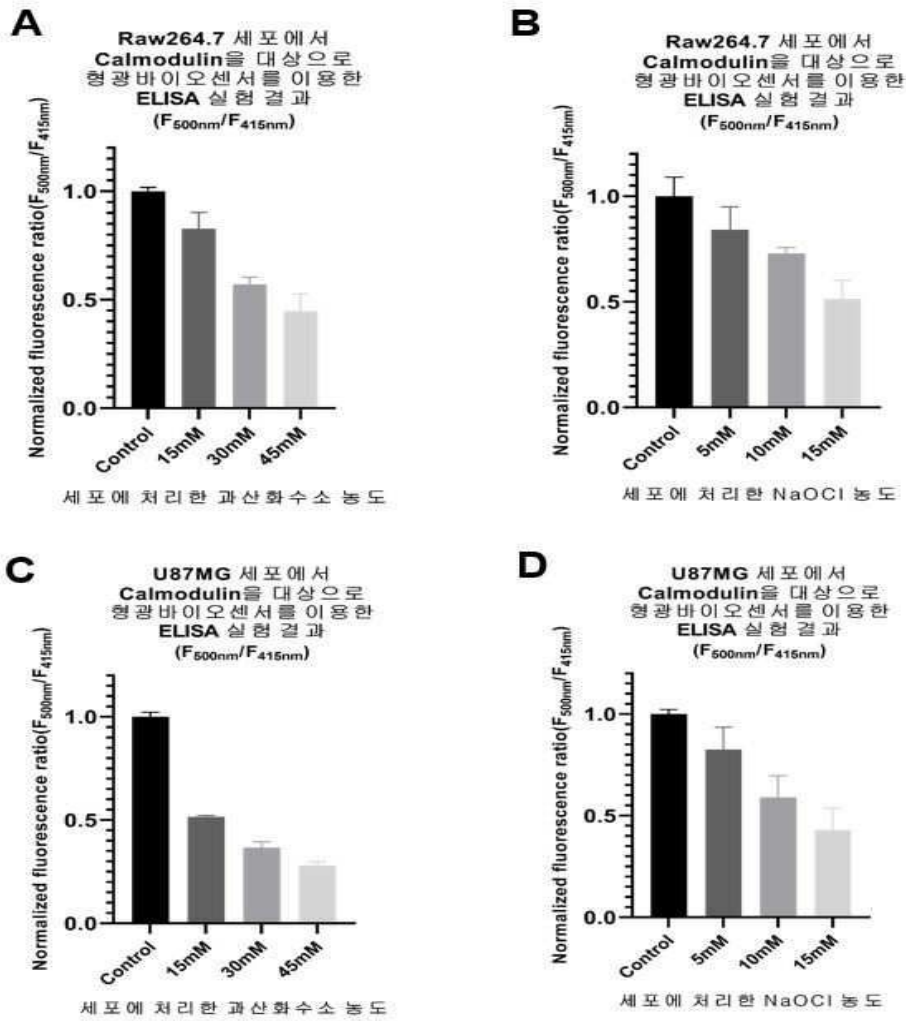
도면3



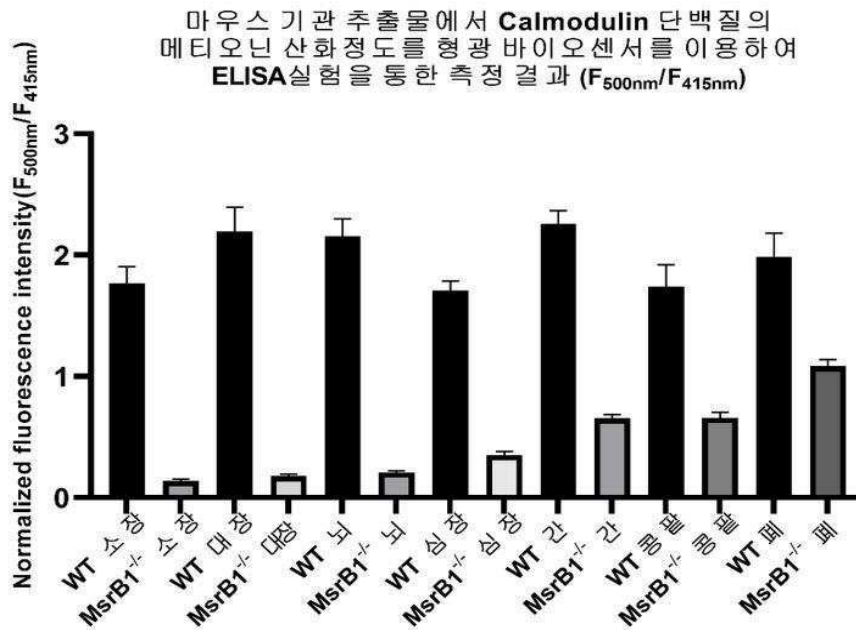
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of Korea University
- <120> Fluorescent protein sensor capable of quantitatively measuring the degree of oxidation of methionine residues of specific proteins and use thereof
- <130> NPDC88756
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1725
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Recombinant protein sequence for fluorescent biosensor of the present invention
- <400> 1

aagagcaaga aaatgagtga cgaatcgaat gacgtgaagt ggaacgatgc cctgacacca 60

ttgcagctga tgggtgctgag agataaggcc actgaaaggc ccaacaccgg tgcgtattta 120

cacaccaacg agtccggtgt ctaccattgt gccaaactgcg acagaccgtt gtattcgagc 180

aaggccaagt tcgacgctcg ttgtggatgg cccgcattct acgaagaggt atcccctgga 240
gccatcacat atcatcgtga caattcttta atgcctgcga ggggtggagat atgttgtgca 300
aggtgtggtg gacacttggg acatgtgttt gaaggtgaag gctggaaaca gttgctaaac 360
ttgccaagg acaccagaca ctgtgtgaac agtgcgtctt taaacctcaa gaaggataac 420
gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac ggcatcaagg ccaacttcaa gatccgccac 480

aacgtcgagg acggcagcgt gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc 540
gacggccccc tgctgtgcc cgacaaccac tacctgagct tccagtccgt cctgagcaaa 600
gacccaacg agaagcgca tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggac 660
actctcgga tggacgagct gtacaacgtg gatggcggta gcggtggcac cggcagcaag 720
ggcgaggagc tggtcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac 780
ggccacaagt tcagcgtgct cgccgagggc gagggcgatg ccacctacgg caagctgacc 840
ctgaagctga tctgaccac cggaagctg cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc 900

ctcggctacg gcctgaagtg cttcgcccgcc taccgacc acatgaagca gcacgacttc 960
ttcaagtccg ccatgccga aggctacgtc caggagcgca ccattctctt caaggacgac 1020
ggcaactaca agaccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acacctggt gaaccgcatc 1080
gagctgaagg gcatcggtt caaggaggac ggcaacatcc tggggcaca gctggagtac 1140
aacatgtcct catacaccag tattactaaa ttgacgaacc taacagaatt taggaatttg 1200
atcaagcaaa atgataaact agtcatcgat ttttatgcta cttggtgtgg ccctctaag 1260
atgatgcaac cacacttaac gaaattaatt caggcttacc cagatgtaag atttgtcaag 1320

tgcgacgtgg acgaatcacc agatattgcc aaagagtgtg aagtgcggc tatgccacc 1380
tttgttcttg gcaaggatgg ccaactcatc ggcaagatca ttggagctaa ccctactgct 1440
ttagagaagg gaatcaaaga tctactggca gaggcagccg ccaaggaagc ggctgctaaa 1500
gaagcagcag ctaaagaagc ggccgcgaaa gcggcggtg gccatggttc ttctatgact 1560
acttacaat taatccttaa tggtaaaaca ttgaaaggcg aaacaactac tgaagctgtt 1620
gatgctgcta ctgcagaaaa agtcttcaaa caatacgcta acgacaacgg tgttgacggt 1680
gaatggactt acgacgatgc gactaagacc ttacagtta ctgaa 1725

<210> 2

<211> 575

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polynucleotide sequence encoding the recombinant protein for

fluorescent biosensor of the present invention

<400> 2

Lys Ser Lys Lys Met Ser Asp Glu Ser Asn Asp Val Lys Trp Asn Asp

1 5 10 15

Ala Leu Thr Pro Leu Gln Leu Met Val Leu Arg Asp Lys Ala Thr Glu

20 25 30

Arg Pro Asn Thr Gly Ala Tyr Leu His Thr Asn Glu Ser Gly Val Tyr

35 40 45

His Cys Ala Asn Cys Asp Arg Pro Leu Tyr Ser Ser Lys Ala Lys Phe

50 55 60

Asp Ala Arg Cys Gly Trp Pro Ala Phe Tyr Glu Glu Val Ser Pro Gly

65 70 75 80

Ala Ile Thr Tyr His Arg Asp Asn Ser Leu Met Pro Ala Arg Val Glu

85 90 95

Ile Cys Cys Ala Arg Cys Gly Gly His Leu Gly His Val Phe Glu Gly

100 105 110

Glu Gly Trp Lys Gln Leu Leu Asn Leu Pro Lys Asp Thr Arg His Cys

115 120 125

Val Asn Ser Ala Ser Leu Asn Leu Lys Lys Asp Asn Val Tyr Ile Met

130 135 140

Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His

145 150 155 160

Asn Val Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn

165 170 175

Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu

180 185 190

Ser Phe Gln Ser Val Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His

195 200 205

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

210 215 220

Asp Glu Leu Tyr Asn Val Asp Gly Gly Ser Gly Gly Thr Gly Ser Lys

225 230 235 240

Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp
245 250 255

Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly
260 265 270

Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Leu Ile Cys Thr Thr Gly
275 280 285

Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Gly Tyr Gly
290 295 300

Leu Lys Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe
305 310 315 320

Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe
325 330 335

Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu
340 345 350

Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Gly Phe Lys
355 360 365

Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Met Ser Ser
370 375 380

Tyr Thr Ser Ile Thr Lys Leu Thr Asn Leu Thr Glu Phe Arg Asn Leu
385 390 395 400

Ile Lys Gln Asn Asp Lys Leu Val Ile Asp Phe Tyr Ala Thr Trp Cys
405 410 415

Gly Pro Ser Lys Met Met Gln Pro His Leu Thr Lys Leu Ile Gln Ala
420 425 430

Tyr Pro Asp Val Arg Phe Val Lys Cys Asp Val Asp Glu Ser Pro Asp
435 440 445

Ile Ala Lys Glu Cys Glu Val Thr Ala Met Pro Thr Phe Val Leu Gly
450 455 460

Lys Asp Gly Gln Leu Ile Gly Lys Ile Ile Gly Ala Asn Pro Thr Ala
465 470 475 480

Leu Glu Lys Gly Ile Lys Asp Leu Leu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu

485 490 495
 Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala
 500 505 510
 Ala Gly His Gly Ser Ser Met Thr Thr Tyr Lys Leu Ile Leu Asn Gly
 515 520 525
 Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr
 530 535 540

 Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly
 545 550 555 560
 Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu
 565 570 575