



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0141308
(43) 공개일자 2023년10월10일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/43572 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0040697
(22) 출원일자 2022년03월31일
심사청구일자 2022년03월31일
기술이전 희망 : 기술양도
- (71) 출원인
동아대학교 산학협력단
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
- (72) 발명자
진병래
전북 완주군 이서면 출판로 25 혁신도시 에르코1단지 101동 1905호
이광식
부산시 사하구 하신번영로 400 102동 2502호
김보연
부산시 사하구 하신번영로 400 102동 2502호
- (74) 대리인
위병갑

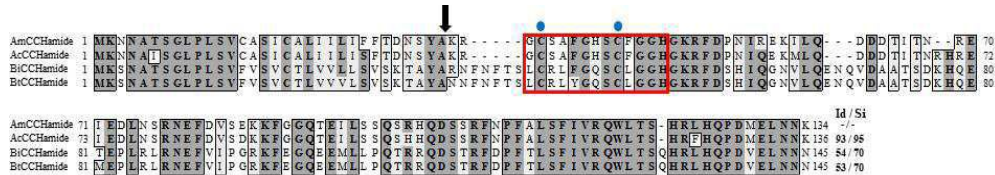
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 서양꿀벌 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서양꿀벌 유래 섭식촉진 신경 펩타이드 CCHamide-2 및 이의 용도를 제공하는 것으로서, 서양꿀벌 유래 섭식촉진 신경 펩타이드 CCHamide-2의 코딩하는 유전자 서열을 규명하여 이의 신규한 펩타이드를 발굴하였다. 본 발명의 서양꿀벌 유래 섭식촉진 신경 펩타이드 CCHamide-2는 섭식촉진 활성, 성장 및 몸무게 증가에 관여하는 것을 확인하여, 이와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)

A61P 43/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395074138
과제번호	PJ015755012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	공동연구사업/농업정책기술개발
연구과제명	꿀벌 분자유전육종 기반조성 및 유전체 기반 대체사료 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	동아대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는, 서열번호 2의 염기서열로 코딩되는 것인, 펩타이드.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 꿀벌 조직 유래인, 펩타이드.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 꿀벌 조직은 지방체, 근육, 중장, 외골격, 신경, 생식 기관 및 체액으로 이루어진 군에서 선택된 조직인 것인, 펩타이드.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 곤충의 섭식을 촉진하여 체중을 증가시켜 성장을 조절하는 것인, 펩타이드.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 곤충은 벌목(Hymenoptera)의 곤충인 것인, 펩타이드.

청구항 8

제 1항의 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 펩타이드를 코딩하는 유전자는, 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것인, 벡터.

청구항 10

제 8항의 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 형질전환체는 세포, 세균, 효모 또는 바이러스인 것인, 형질전환체.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 세포는 곤충 세포인 것인, 형질전환체.

청구항 13

서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장을 억제하는 억제제를 포함하는, 곤충 성장 억제용 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 억제제는 안티센스 뉴클레오티드, 앵타머, 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로 RNA (miRNA) 및 이중가닥 RNA(double stranded RNA, dsRNA)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 RNA 간섭 (RNAi) 기능을 수행하는 억제제인 것인, 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 이중가닥 RNA(double stranded RNA, dsRNA)는 서열번호 3을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 dsRNA는 서열번호 2의 서양꿀벌 유래의 성장 억제 AmGBP 펩타이드 서열 중 92번째 서열부터 405번째 염기서열에 결합하는 것인, 조성물.

청구항 17

제 10항의 형질전환체를 배양하는 단계;

상기 배양된 형질전환체로부터 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 분리하는 단계; 및

상기 분리된 펩타이드를 정제하는 단계;를 포함하는, 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드의 생산 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명의 목적은 서양꿀벌 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

배경 기술

[0002] CCHamide는 절지동물에서 발견된 신경 펩티드이다. 곤충에서 CCHamide는 두 개의 유전자 CCHamide-1 및 CCHamide-2에 의해 암호화되어 보존된 아미노산과 이황화 결합 시스테인 잔기를 포함하는 단백질의 합성이 일어난다. CCHamide-2 유전자는 누에 (*Bombyx mori*)에서 처음 발견되었다. 곤충의 CCHamide-2는 2개의 시스테인 잔기와 함께 13개의 보존된 아미노산(GCQ(또는 A, 또는 S)AFGHSCY(또는 F)GGHamide)을 포함한다. 또한 CCHamide-1과 CCHamide-2는 뇌와 중장에서 발현되기도 하며 CCHamide-2는 곤충의 지방체에서도 발현된다.

[0003] 이전 연구에 의하면 CCHamide-2의 기능은 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)에서 특성이 있으며, *D. melanogaster*에서 CCHamide-2와 그 수용체의 발현 패턴 연구는 CCHamide-2가 장에서 뇌로 가는 호르몬 신호의 조절을 통해 변경된 섭식 행동을 유도한다고 보고 되었다. *D. melanogaster*에 대한 이전 연구에서도 CCHamide-2가 인슐린 유사 펩티드의 생성을 조절함으로써 성장을 조절했으며 CCHamide-2는 성충 과실파리와 유충에 존재하는 식욕 촉진 신경 펩티드로 밝혀졌다. 또한 CCHamide-2는 영양소 의존적 발현 양상을 나타내는 것으로 보고되었다. 이전 연구에서는 CCHamide-2 발현과 인슐린 유사 펩티드(ILP) 발현 사이의 상관관계가 있음을 확인 하였다. 또한 *B. mori*의 CCHamide-2는 여러 생리적 과정에 관여하고 있으며, 진딧물의 CCHamide-2 수용체는 섭식 행동, 인슐린 생산 및 성장을 조절한다.

[0004] CCHamide-2는 곤충에서 잘 보존된 신경 펩티드로써, *D. melanogaster* 이외의 곤충에서 CCHamide-2의 기능은 알

려지지 않았다. 또한 서양꿀벌에서 CCHamide-2의 기능은 아직 보고되지 않았으며 서양꿀벌 CCHamide-2의 역할이 *Drosophila* CCHamide-2의 역할과 유사한지는 알려지지 않았다.

- [0005] 따라서, 서양꿀벌 CCHamide-2의 분자적 특성을 밝히기 위하여 서양꿀벌로부터 CCHamide-2의 시기별 발현 양상을 분석하였다. 본 연구에서 *A. mellifera* CCHamide-2(AmCCHamide-2)의 cDNA 클로닝 및 특성을 밝히고자 서양꿀벌에서 AmCCHamide-2의 cDNA 서열, 발현 분석 및 RNA interference(RNAi)를 이용한 AmCCHamide-2 발현 감소 후 서양꿀벌에서 체중 변화와 *A. mellifera* ILP2(AmILP2) 발현을 조사함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장을 억제하는 억제제를 포함하는, 곤충 성장 억제용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2의 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 형질전환체를 배양하는 단계;
- [0011] 상기 배양된 형질전환체로부터 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 분리하는 단계; 및
- [0012] 상기 분리된 펩타이드를 정제하는 단계;를 포함하는, 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드의 생산 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장을 억제하는 억제제를 포함하는, 곤충 성장 억제용 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2의 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 형질전환체를 배양하는 단계;
- [0018] 상기 배양된 형질전환체로부터 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 분리하는 단계; 및
- [0019] 상기 분리된 펩타이드를 정제하는 단계;를 포함하는, 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드의 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 서양꿀벌 유래 섭식촉진 신경 펩타이드 CCHamide-2 및 이의 용도를 제공하는 것으로서, 서양꿀벌 유래 섭식촉진 신경 펩타이드 CCHamide-2의 코딩하는 유전자 서열을 규명하여 이의 신규한 펩타이드를 발굴하였다. 본 발명의 서양꿀벌 유래 섭식촉진 신경 펩타이드 CCHamide-2는 섭식촉진 활성, 성장 및 몸무게 증가에 관여하는 것을 확인하여, 이와 관련된 사업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 각각의 서양꿀벌, 토종벌, 호박벌 및 서양뒤영벌 유래 섭식촉진 펩티드의 상동성을 나타낸 도이다.
(화살표: 시그널 펩티드(signal peptide) 부위, 붉은색 박스(red box): CCHamide-2에서 보존된 아미노산 서열, 붉은 색(red circles): 보존된 이황화 결합을 이루는 시스테인 잔기)
- 도 2a는 RT-PCR 분석으로 서양꿀벌 내역봉(N) 및 외역봉(F)의 뇌, 지방체 및 중장의 섭식 촉진 펩타이드 AmCCHamide-2 발현을 나타낸 도이다.
- 도 2b는 서양꿀벌 내역봉(N) 및 외역봉(F)의 뇌, 지방체 및 중장의 mRNA를 비교한 도이다.
- 도 3a는 4시간 및 8시간 기아 상태의 서양꿀벌의 뇌, 지방체 및 중장에서 AmCCHamide-2 발현을 나타낸 도이다.
- 도 3b는 4시간 및 8시간 식이 또는 식이 없이 사육 후 서양꿀벌 내역봉의 뇌, 지방체 및 중장에서 RT-PCR을 나타낸 도이다.
- (+: 식이한 꿀벌, -: 식이 하지 않은 꿀벌)
- 도 4a는 RNA interference를 처리하여 서양꿀벌의 뇌, 지방체 및 중장에서 섭식촉진 펩티드 발현을 분석한 도이다.
- 도 4b는 내역봉에 CCHamide-2 dsRNA를 주사하고 24시간 후 CCHamide-2 및 ILP2의 발현을 RT-PCR 방법으로 분석한 도이다.
- 도 5는 서양꿀벌의 CCHamide-2 dsRNA를 처리한 후 서양꿀벌의 체중 변화를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 자명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다, 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0023] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 (terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 사료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [0026] 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 꿀벌은 전충(pre-pupa), 번데기(pupa) 또는 성충(imago)인 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 “전충(pre-pupa)”은 곤충에 있어서, 유충기간의 마지막으로서, 번데기가 되기 전 섭식도 하지 않는 부동영충의 기간을 의미한다.
- [0029] 본 발명의 “번데기”는 완전변태 곤충류에서 나타나는 유충기와 성충기 사이의 정지적 발육단계로, 섭식을 하지 못하고 운동 및 배설을 하지 않는 단계로서, 유충조직의 퇴화와 성충의 형질이 완성되어 가는 시기를 뜻한다.
- [0030] 본 발명의 “성충(imago)”은 곤충류 일생 중 최종적으로 성숙한 개체를 가리키며, 생식기가 발달되어 교미, 산란이 가능한 시기를 뜻한다.

- [0032] 상기 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 상기 펩타이드는 서열번호 2의 염기서열로 코딩되는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 유전자 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 효소 외에도 상기 서열들의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 본다. 변이체는 염기서열 또는 아미노산 서열은 변화되지만, 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 1의 아미노산 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열로 이루어진 유전자 또는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드이다. 구체적으로, 본 발명에 따른 유전자는 서열번호 2의 염기서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있으며, 본 발명에 따른 효소는 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0035] 또한, 상기 본원 발명의 꿀벌 유래 지질분해 효소는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 효소에 대해 기능적 동등물일 수 있다. 상기 “기능적 동등물”이란, 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 효소와 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 폴리펩티드를 말한다. 여기서, “실질적으로 동질의 활성”이란 상기에서 기재한 효소의 활성을 의미한다. 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함될 수 있다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환일 수 있으며, 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 본 발명의 효소의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치할 수 있다. 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 효소의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함될 수 있다.
- [0037] 상기 펩타이드는 꿀벌 조직 유래인 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 상기 꿀벌 조직은 지방체, 근육, 중장, 외골격, 신경, 생식 기관 및 체액으로 이루어진 군에서 선택된 조직인 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 효소는 꿀벌 조직 유래인 것일 수 있으며, 상기 조직은 지방체, 근육, 중장, 외골격, 신경, 생식 기관 및 체액으로 이루어진 군에서 선택된 조직인 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0040] 상기 펩타이드는 곤충의 섭식을 촉진하여 체중을 증가시켜 성장을 조절하는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 상기 곤충은 벌목(Hymenoptera)의 곤충인 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0044] 본 발명에 있어서 “벡터(vector)”는 적합한 숙주 내에서 DNA를 발현시킬 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 DNA 서열을 보유하는 DNA 제조물을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있다. 적당한 숙주로 형질전환되면 벡터는 숙주 게놈과 무관하게 복제하고 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우에 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 벡터는 발현 벡터일 수 있으며, 본 발명에서 사용된 용어 “발현 벡터”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 제조물 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0046] 본 발명의 “프로모터”란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여

RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 뜻한다.

- [0047] 또한, 상기의 발현 벡터는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [0048] 상기 펩타이드를 코딩하는 유전자는, 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0049] 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0050] 본 발명에서 용어 "형질전환(transformation)"이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.
- [0051] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 형질전환체는 당업계에 공지된 어떠한 형질전환체도 이용할 수 있으며, 예컨대, E. coli JM109, E. coli BL21, E. coli RR1, E. coli LE392, E. coli B, E. coli X 1776, E. coli W3110와 같은 대장균; 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주; 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스; 슈도모나스 속과 같은 균주 등이 있다.
- [0052] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 형질전환체로서, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충세포(*Spodoptera frugiperda*, Sf9), 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 벡터를 형질전환체 내로 운반하는 방법은, 형질전환체가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc.Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 형질전환체 내로 주입할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 형질전환체는 세포, 세균, 효모 또는 바이러스인 것일 수 있다.
- [0055] 상기 세포는 곤충 세포인 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장을 억제하는 억제제를 포함하는, 곤충 성장 억제용 조성물을 제공한다.
- [0058] 상기 억제제는 안티센스 뉴클레오티드, 앵타머, 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로 RNA (miRNA), 이중가닥 RNA(double stranded RNA, dsRNA) 및 RNA 간섭 (RNAi)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종인 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 상기 이중가닥 RNA(double stranded RNA, dsRNA)는 서열번호 3을 포함하는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 상기 dsRNA는 서열번호 2의 서양꿀벌 유래의 성장 억제 AmGBP 펩타이드 서열 중 92번째 서열부터 405번째 염기 서열에 결합하는 것이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 본 발명은 서양 꿀벌(*Apis mellifera*) 유래의 성장 증진을 위한 CCHamide-2의 펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함하는 벡터의 형질전환체를 배양하는 단계;
- [0062] 상기 배양된 형질전환체로부터 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드를 분리하는 단계; 및
- [0063] 상기 분리된 펩타이드를 정제하는 단계;를 포함하는, 성장 증진을 위한 CCHamide-2 펩타이드의 생산 방법을 제

공한다.

- [0064] 여기서, dsRNA는 세포내에서 RNA 간섭(RNAi)에 의해 작용한다. RNA 간섭은 곤충과 식물을 포함한 진핵생물에서 폭넓게 존재하는 전사 후 유전자 발현 조절 기작이다 (Merkling, S.H., van Rij, R.P., 2013. Beyond RNAi: antiviral defense strategies in Drosophila and mosquito. J. Insect Physiol. 59, 159-170). 세포에 도입된 dsRNA는 RNase III 효소인 Dicer에 의해 처리되어, siRNA (small interference RNA)의 형태로 miRNP라 불리는 리보뉴클레오프합체를 형성하여 표적 부위에 상보적 결합을 통해 표적 유전자를 절단하거나, 단백질 합성을 억제한다. 이로 인해 세포에 도입된 dsRNA에 유도된 RNA 간섭은 표적 유전자의 발현 억제를 통하여 매개충의 생리를 교란함으로써 매개충의 치사를 유도하거나 또는 매개충의 증식을 직접적으로 감소시키는 방식으로 작용하며, 본 발명에서는 특히 매개충의 증식을 직접적으로 감소시킨다.
- [0066] 본 발명의 dsRNA는 폴리리보뉴클레오타이드 두 가닥이 상보적 결합을 하고 있으며, 상기 두 가닥 중 하나는 서열번호 3을 포함하는 염기서열이고, 다른 하나는 상기 서열번호 3에 상보적인 서열을 가질 수 있다. 이와 같이 본 발명에서 dsRNA의 두 가닥은 완전히 상보적으로 한 가닥의 서열이 결정되면, 다른 가닥의 서열은 상보성에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또는 부분적으로 상보적일 수도 있는데, 세포내 도입되어 RNAi 기작을 유발시키는 데 충분한 정도의 상보성으로, 당업자라면, 본 발명의 기제, RNAi의 기작 및 본 발명에 따른 표적 서열을 고려하여 적절한 상보성을 결정할 수 있을 것이다.
- [0068] 본 발명에 사용된 dsRNA 또는 "이중가닥 RNA"는 센스 및 안티센스가 결합된 것으로, 실질적으로 상보적인(하기 정의된 바와 같음) 2개의 핵산 가닥을 포함하는 이중체 구조를 갖는 리보핵산 분자의 복합체를 지칭한다. 이러한 이중가닥 RNA는 세포내로 도입시 단일가닥으로 분리되어, siRNA의 형태로 표적 전사 RNA에 결합하여, 이로부터 단백질이 합성되는 것을 방해한다. 따라서, 이중가닥을 형성할 수 있을 정도의 상보성을 가지는 한, 센스 및 안티센스 두 가닥이 완전히 상보적일 필요는 없고, 이런 의미에서 한 가닥의 서열만으로도, 다른 가닥의 서열은 적절하게 결정될 수 있을 것이다.
- [0070] 본 발명에 사용된 용어 "상보적"은, 두 가닥의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드가 특정 조건 하에 혼성 화하여 이중체(duplex) 구조를 형성할 수 있는 능력을 지칭한다. 본 발명에서는 dsRNA가 세포에 도입되어 본 발명에 따른 목적을 달성하는 한 다양한 상보성이 사용될 수 있다. 예를 들면, 두 가닥이 완전히 상보적이거나, 또는 실질적으로 상보적일 수 있다. 일 구현예로서, 최대 4개, 3개 또는 2개 또는 1개의 미스매치된 염기쌍을 포함할 수 있을 것이다.
- [0071] 본 발명에 따른 dsRNA는 다양한 형태로 사용될 수 있다. 예를 들면 dsRNA가 각각 합성되어, 이중체를 형성할 수 있다. 또는 이중체는 한 분자로 합성되어 이중체를 형성할 수도 있다. 예를 들면 2개의 가닥은 한 가닥의 3'-말단과 다른 가닥의 5'-말단이 공유결합으로 연결, 예를 들면 링커에 의해 연결될 수 있다.
- [0072] 또한 본 발명에 따른 dsRNA는 이를 코딩하는 DNA로 합성되고, 이는 적절한 발현 벡터에 클로닝되거나 또는 인비트로에서 RNA로 발현되어 사용될 수 있다. 예를 들면 본 발명에 따른 dsRNA는 센스 및 안티센스 방향을 동시에 발현하는 바이너리 형질전환용 벡터에 클로닝되어 사용될 수 있다.
- [0073] 또한, 본 발명의 dsRNA는 다수의 뉴클레오타이드에서의 실질적인 변형 및 당해 분야에 공지된 모든 다양한 유형의 화학적 변형을 포함할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 dsRNA는 당업계에 널리 확립된 방법에 의해 합성 및/또는 변형될 수 있다. 화학적 변형에는 2' 변형, 올리고뉴클레오타이드의 당 또는 염기의 다른 부위에서의 변형, 올리고뉴클레오타이드 쉘 내로의 비-천연 염기의 도입, 리간드 또는 화학적 부분에 대한 공유적 부착, 및 뉴클레오타이드간 포스페이트 연쇄를 대체 연쇄, 예를 들어 티오포스페이트로 대체시키는 것이 포함될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 변형 한 가지 이상을 이용할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 dsRNA는 당업계에 공지된 표준 방법에 의해, 예를 들어 자동화 DNA 합성기를 사용하여 합성할 수 있다.

- [0077] [실시예]
- [0078] 실시예 1. 서양꿀벌 준비
- [0079] 본 실험에 사용된 서양꿀벌(*Apis mellifera*; Hymenoptera: Apidae)은 동아대학교에서 사육하였다. 새로 부화한 서양꿀벌(1일령)을 표시하고 봉군에 도입했다.
- [0081] 실시예 2. CCHamide-2 펩티드를 코딩하는 유전자 클로닝.
- [0082] CCHamide-2 cDNA 클로닝은 서양꿀벌 cDNA 라이브러리를 사용하여 수행되었다. Wizard Mini-Prep Kit(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 플라스미드 DNA 추출을 수행했다. cDNA 서열은 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>)의 DNASIS 및 BLAST 프로그램을 사용하여 분석되었다. AmCCHamide-2의 예상되는 단백질 서열은 MacVector(ver. 6.5, Oxford Molecular Ltd., Oxford, UK)를 사용하여 정리되었다. AmCCHamide-2의 신호 서열은 SignalP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>)를 이용하여 분석하였다.
- [0084] 실시예 3. CCHamide-2를 인코딩하는 유전자의 발현
- [0085] 서양꿀벌(*A. mellifera*)은 얼음 위에서 실체현미경(Zeiss, Jena, Germany)으로 해부하여 조직 샘플을 수집하고 인산염 완충 식염수(PBS; 140mM NaCl, 27mM KCl, 8mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄, pH 7.4)로 2회 세척했다. 이후 Total RNA Extraction Kit(Promega)를 사용하여 뇌, 지방체 및 중장에서 total RNA를 분리했다.
- [0086] 서양꿀벌에서 CCHamide-2를 인코딩하는 유전자의 발현 양상을 조사하기 위해 RT-PCR을 사용하여 total RNA에서 CCHamide-2 cDNA를 증폭했다. AmCCHamide-2 증폭을 위해 다음과 같은 PCR 프라이머가 사용되었다: 정방향 프라이머(1-21), 5'-ATGAAGAACAATGCGACTTCC-3' 및 역방향 프라이머(385-405), 5'-TTATTTGTTATTAGTTCCAT-3'. 토종벌 섭식촉진 펩티드 cDNA, AcCCHamide-2 증폭을 위해 다음 PCR 프라이머가 사용되었다: 정방향 프라이머(1-21), 5'-ATGAAGAACAATGCGATTTC-3' 및 역방향 프라이머(391-411), 5'-TTATTTGTTATTAAGTTCCAT-3'. 호박벌(*B. ignitus*) 섭식촉진 펩티드 cDNA, BiCCHamide-2 및 서양뒤영벌(*B. terrestris*) 섭식촉진 펩티드 cDNA, BtCCHamide-2 증폭을 위해 다음 PCR 프라이머가 사용되었다: 정방향 프라이머(1-21), 5'-ATGAAGAGCAACGCGACTTCC-3' 및 역방향 프라이머(418-438), 5'-TTAATTTGTTATTAAGCTCCAC-3'. AmILP2 증폭을 위해 다음 PCR 프라이머가 사용되었다: 정방향 프라이머(1-21), 5'-ATGTTTCAAATAGATTATAC-3' 및 역방향 프라이머(373-393), 5'-TTAACGGGCACGCAATAGGA-3'. 대조군으로 사용된 β -액틴 유전자 증폭에 사용된 프라이머는 정방향, 5'-ATGTGTGACGACGAAGTA-3' 및 역방향 5'-GTACACGGTCTCGTGGAT-3'이었다. RT-PCR은 2분 동안 94°C, 35주기의 증폭(94°C에서 1분, 53°C에서 1분, 72°C에서 2분), 72°C에서 10분의 순서로 수행되었다(Park et al., 2018). 생성된 단편을 DNA 전기영동 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동으로 분석하였다.
- [0087] AmCCHamide-2 dsRNA는 MEGAscript RNAi 키트(Ambion, Austin, TX, USA)를 사용하여 합성하였다. AmCCHamide-2 dsRNA는 AmCCHamide-2 cDNA의 92번부터 398번까지의 뉴클레오티드에 해당한다. T7 프로모터 부위는 다음과 같이 PCR 프라이머에 추가되었다: AmCCHamide-2(Fi, 5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGCTAAACGTGGTTGTCT-3' 및 Ri, (5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAGATTATTAGTTCCATATCCGG-3')). 단일 PCR 프로모터 부위를 가진 상보적 가닥이 생성되었다. 각 DNA 주형의 단일 가닥 RNA(ssRNA)는 37°C에서 4시간 동안 T7 RNA 중합효소를 사용하여 전사되었다. AmCCHamide-2 dsRNA는 75°C에서 5분 동안 상보적인 ssRNA를 포함하는 용액과 함께 반응시켰다. 37°C에서 1시간 동안 DNase I과 RNase로 절단하여 DNA와 ssRNA를 제거하였으며, dsRNA 정제는 제조사에서 제공한 지침에 따라 수행하였으며, dsRNA는 2회의 연속 세척 후 1mM EDTA를 함유한 50 μ l의 예열된(95°C) 10mM Tris-HCl(pH 7.0)을 통해 용출되었다. 총 dsRNA 농도는 A₂₆₀ 값을 분석하여 측정했다. 우화 후 6일째 서양꿀벌을 냉동실에서 기절시킨 뒤, 체중을 측정하고 10- μ l Hamilton 주사기를 사용하여 배 5번째와 6번째 마디 사이에 CCHamide-2 dsRNA를 주사했다. 서양꿀벌(*A. mellifera*)에게 동일한 부피의 완충액(dsRNA 제외)을 주입하고 주사 대조군으로 사용되었다. RNAi의 경우, 서양꿀벌(*A. mellifera*)에게 AmCCHamide-2 dsRNA 2 μ l(1.54 μ g/*A. mellifera*)을 주사했다. 주사 후 *A. mellifera*을 40% 설탕 용액과 화분떡을 넣은 케이지(11.3 $\times$ 7 $\times$ 4.3 cm)에 넣었다. 케이지는 34°C, 80% 습도의 인큐베이터에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 24시간 후 서양꿀벌(*A. mellifera*)의 체중을 개별적으로 측정하였다. 서양꿀벌(*A. mellifera*)의 뇌, 지방체 및 중장 조직을 각각 채취하여 PBS로 2회 세척하고 total RNA를 상기 기재된 바와 같이 분리하였다.

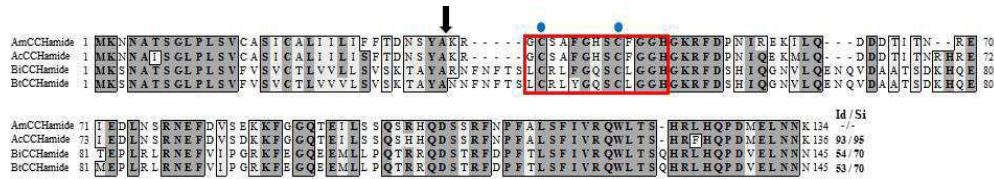
- [0088] 결과는 평균 $\pm$ 표준 편차(SD)로 표시하고 < 0.05 및 < 0.01 의 P-값에서 통계적 유의성을 결정하기 위해 t-검정과 통계 소프트웨어 SPSS 버전 22.0(IBM Inc., Chicago, IL, USA)을 사용했다.
- [0090] **실시예 4. 서양꿀벌 유래 섭식촉진 펩티드 CCHamide-2 cDNA 클로닝 및 서열 분석.**
- [0091] 본 발명의 서양꿀벌 유래 섭식촉진 펩티드 CCHamide-2 cDNA 클로닝 및 서열 분석을 하기 위해서, 서양꿀벌 및 뒤영벌류로부터 AmCCHamide-2, AcCCHamide-2, BiCCHamide-2 및 BtCCHamide-2 cDNA를 클로닝하였고, 전체 ORF(open reading frame)를 포함한 cDNA의 염기서열을 밝히고 분석하였다.
- [0092] AmCCHamide-2는 전체 402-bp의 cDNA 서열은 134개 아미노산을 포함하는 단백질을 암호화한다. 또한, AcCCHamide-2는 136개의 아미노산을 포함하는 단백질을 코딩하고, BiCCHamide-2와 BtCCHamide-2는 모두 145개의 아미노산을 포함하는 단백질을 코딩 하였고, AmCCHamide-2 cDNA의 추론된 아미노산 서열과 서양꿀벌 CCHamide-2 서열의 비교 하였다(도 1).
- [0093] 도 1과 같이 서양꿀벌 CCHamide-2 서열 중 AmCCHamide-2의 서열은 AcCCHamide-2(단백질 서열 상동성 93%)와 가장 유사하였고 BiCCHamide-2(단백질 서열 상동성 54%)와 BtCCHamide-2(단백질 서열 상동성 53%)가 유사하였다. 비교 분석에 따르면 서양꿀벌의 CCHamide-2는 13개의 보존된 아미노산과 2개의 이황화 결합 시스테인 잔기를 포함하는 것으로 나타났으며, 이는 다른 곤충의 CCHamide-2와 구조적 및 기능적 유사성을 나타낸다.
- [0095] **실시예 5. AmCCHamide-2의 발현 양상**
- [0096] 서양꿀벌 *A. mellifera*의 조직에서 AmCCHamide-2 분포를 전사 수준을 확인 하기위해서, AmCCHamide-2의 mRNA 발현은 RT-PCR로 분석 하였고, AmCCHamide-2 전사체가 서양꿀벌의 뇌, 지방체 및 중장에서 단일 밴드로 증폭됨을 확인 하였다. 또한, 서양꿀벌에서 AmCCHamide-2의 발현 양상을 조사하기 위해 내역봉과 외역봉 서양꿀벌의 뇌, 지방체, 중장에서 total RNA를 추출한 결과, AmCCHamide-2의 발현이 외역봉 보다 내역봉에서 더 높다는 것을 확인 하였다(도 2).
- [0097] 또한, 서양꿀벌을 굶긴 후 AmCCHamide-2의 발현 양상을 확인하기 위해, 굶주린 *A. mellifera* 서양꿀벌과 굶기지 않은 서양꿀벌의 중장, 지방체 및 뇌에서 AmCCHamide-2 전사체를 비교하였다 그 결과, 수준이 굶기지 않은 대조군 서양꿀벌에 비해 굶주린 서양꿀벌의 AmCCHamide-2 전사체가 증가한다는 것을 확인 하였다(도 3).
- [0099] **실시예 6. AmCCHamide-2의 성장 조절**
- [0100] AmCCHamide-2 전사체 수준의 RNAi에 의한 감소가 서양꿀벌의 성장에 영향을 미치는 것을 확인하기 위해, RNAi를 사용하여 *A. mellifera* 서양꿀벌의 중장, 지방체 및 뇌에서 AmCCHamide-2 mRNA 수준을 감소시킨 다음 RT-PCR 분석을 통해 AmILP2의 발현 양상을 분석했다.
- [0101] 그 결과, AmCCHamide-2 RNAi(dsRNA, 서열번호3)를 처리한 *A. mellifera* 서양꿀벌의 중장, 지방체 및 뇌의 AmCCHamide-2 mRNA 수치는 AmCCHamide-2 RNAi(dsRNA, 서열번호3)를 처리하지 않은 대조군 서양꿀벌에 비해 유의하게 감소함을 확인 하였다(도 4).
- [0103] **실시예 7. AmCCHamide-2의 체중 조절**
- [0104] AmCCHamide-2 RNAi가 서양꿀벌의 체중 증가에 영향을 미치는지 알아보기 위해 AmCCHamide-2 RNAi 처리 전과 24 시간 후에 서양꿀벌의 체중을 측정하였다.
- [0105] 그 결과, AmCCHamide-2 dsRNA를 서양꿀벌에 주사했을 때 체중 증가는 무처리 및 주사 대조군에 비해 현저히 감소함을 확인 하였고(도 5), AmCCHamide-2가 서양꿀벌의 AmILP2 발현 및 체중 증가에 영향을 미친다는 것을 확인 하였다.

[0108]

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.

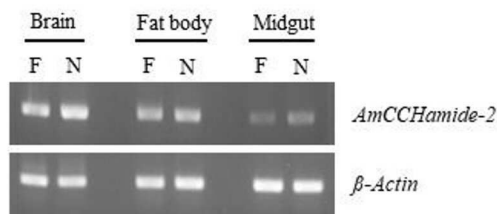
도면

도면1



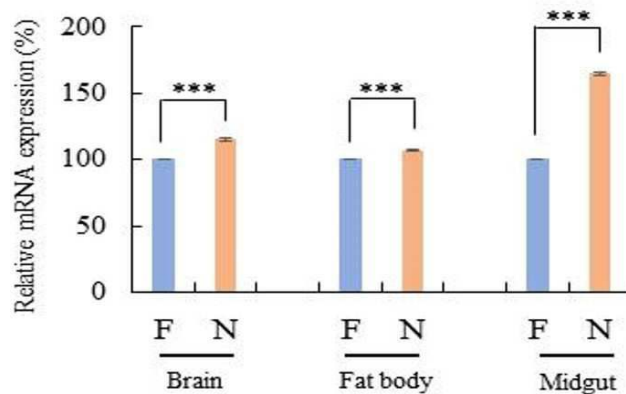
도면2a

(A)



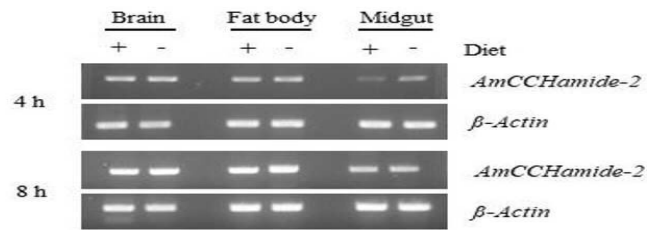
도면2b

(B)



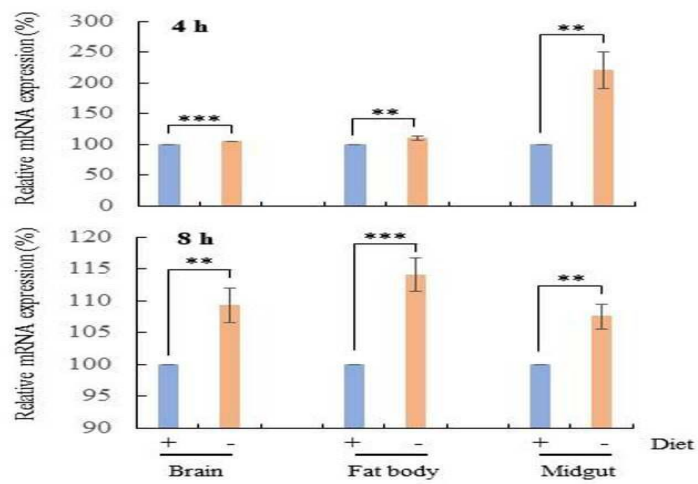
도면3a

(A)

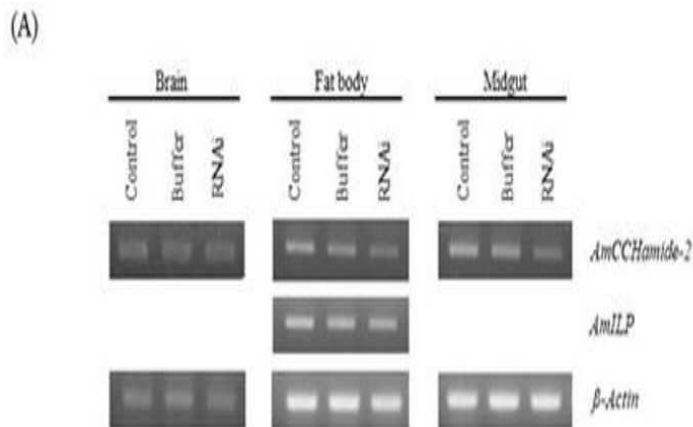


도면3b

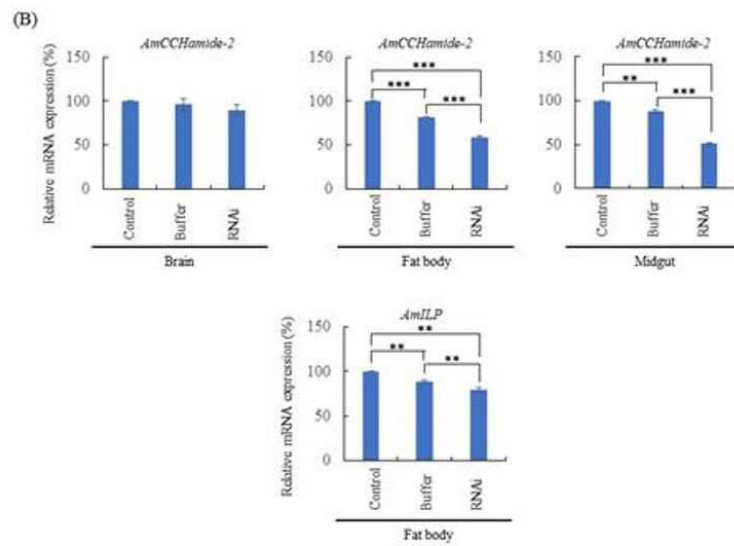
(B)



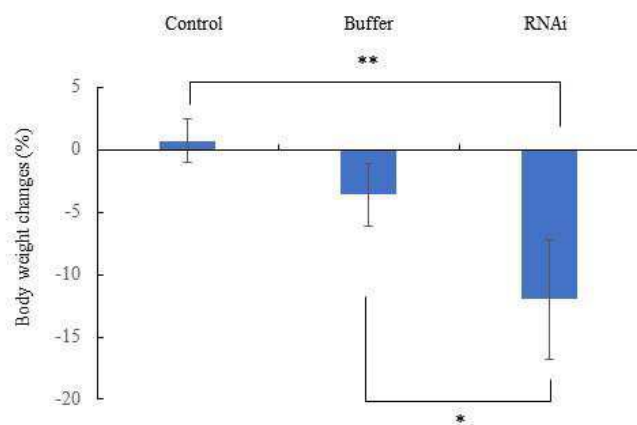
도면4a



도면4b



도면5



서열 목록

<110> Dong-A University Research Foundation For Industry-Academy Cooperation

<120> CCHamide-2 and use thereof for promoting growth derived from *Apis mellifera*

<130> PN2202-114

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> *Apis mellifera* CCHamide-2 peptide

<400> 1

Met Lys Asn Asn Ala Thr Ser Gly Leu Pro Leu Ser Val Cys Ala Ser

1 5 10 15

Ile Cys Ala Leu Ile Ile Leu Ile Phe Phe Thr Asp Asn Ser Tyr Ala

20 25 30

Lys Arg Gly Cys Ser Ala Phe Gly His Ser Cys Phe Gly Gly His Gly

35 40 45

Lys Arg Phe Asp Pro Asn Ile Arg Glu Lys Ile Leu Gln Asp Asp Asp

50 55 60

Thr Ile Thr Asn Arg Glu Ile Glu Asp Leu Asn Ser Arg Asn Glu Phe

65 70 75 80

Asp Val Ser Glu Lys Lys Phe Gly Gly Gln Thr Glu Ile Leu Ser Ser

85 90 95

Gln Ser Arg His Gln Asp Ser Ser Arg Phe Asn Pro Phe Ala Leu Ser

100 105 110

Phe Ile Val Arg Gln Trp Leu Thr Ser His Arg Leu His Gln Pro Asp

115 120 125

Met Glu Leu Asn Asn Lys

130

<210> 2

<211> 405

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apis mellifera CCHamide-2 peptide gene

<400> 2

atgaagaaca atgcgacttc cggctctcca ctatctgtct gtgcgtctat ttgcgcgcta 60

ataatcctga ttttcttcac cgataattct tatgctaaac gtggttggtc tgcatttgga 120

cattcctggt tcggtgggtc tggcaagaga ttcgatccaa atatacggga gaaaatactt 180

caagatgatg atacgattac caatcgagaa atagaagatt taaactcgcg taatgaattc 240

gatgtttctg aaaaaaagtt tggaggacaa acagagatac tttcttctca gagtcgtcat 300

caagattctt caagattcaa tccttttgca ttatccttca tcgttcgaca atggttgaca 360

tcgcatcgtc ttcatcaacc ggatatggaa ctaaataaca aataa 405

<210> 3

<211> 366

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Apis mellifera CCHamide-2 peptide dsRNA

<400> 3

gcgtaatacg actcactata gggagaatgc taaacgtggt tgttctgcat ttggacattc 60

ctgtttcggt ggtcatggca agagattcga tccaaatata cgggagaaaa tacttcaaga 120

tgatgatacg attaccaatc gagaaataga agatttaaac tcgcgtaatg aattcgatgt 180

ttctgaaaaa aagtttgag gacaaacaga gatactttct tctcagagtc gtcacatcaaga 240

ttcttcaaga ttcaatcctt ttgcattatc cttcatcggt cgacaatggt tgacatcgca 300

tcgtcttcat caaccggata tggaactaaa taacaaataa tctccctata gtgagtcgta 360

ttacgc 366