(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0148029
(43) 공개일자 2014년12월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/44 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0071370
(22) 출원일자 2013년06월21일
심사청구일자 2013년06월21일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김영완
서울 송파구 백제고분로22길 19-27, 301호 (삼전동)
(74) 대리인
특허법인충현

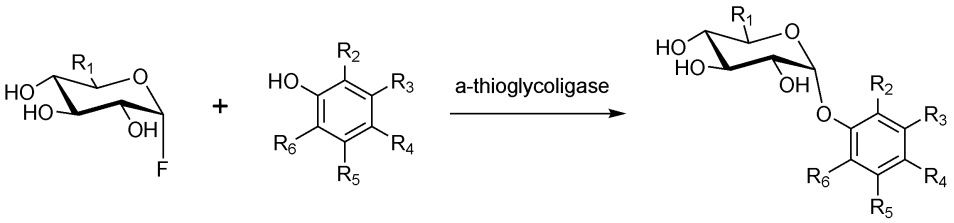
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **알파-티오글리콜리가제를 이용한 O-아릴 알파-글리코시드의 합성방법**

(57) 요 약

본 발명은 당공여체와 당수용체를 산/염기 촉매잔기가 비활성화된 아미노산 잔기로 바뀐 알파-글리코시다제 또는 알파-자일로시다제의 변이체인 알파-티오글리콜리가제의 존재하에서 반응시킴으로써 O-아릴 알파-글리코시드를 효소적 합성방법을 이용하여 우수한 효율로 합성할 수 있다.

대 표 도 - 도1



단, a-thioglycoligase는 YicI-D482A
Mal-D416A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20120001642
부처명 한국연구재단
연구관리전문기관 세종산학협력실
연구사업명 (이공)일반연구자-기본(유형I)
연구과제명 [2차년도] 당쇄분해효소 가공을 통한 비가역성 당전이 생물촉매 개발 기술 연구
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2012.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

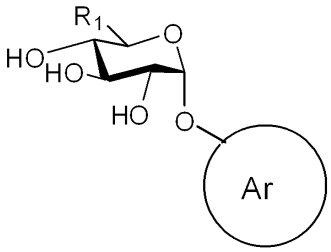
청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 O-아릴 알파-글리코시드의 제조방법에 있어서,

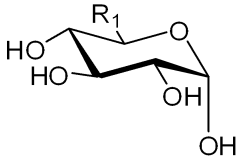
(1) 하기 [화학식 2]로 표시되는 단당체를 하기 [화학식 3]으로 표시되는 당공여체로 치환하는 단계; 및

(2) 하기 [화학식 3]으로 표시되는 당공여체와, 수산화기를 갖는 아릴화합물로서 상기 수산화기의 pK_a 값이 상기 단당체의 1번 탄소에 위치한 수산화기의 pK_a 값 보다 낮은 아릴화합물인 당수용체를 알파-티오글리콜리가제의 존재하에서 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 O-아릴 알파-글리코시드의 효소적 합성방법:

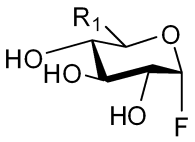
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



상기 [화학식 1] 내지 [화학식 3]에서,

R_1은 수소 또는 메틸알콜이며,

Ar은 아릴화합물이다.

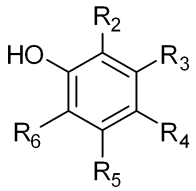
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 당수용체는 pK_a 값이 10 이하인 것을 특징으로 하는 O-아릴 알파-글리코시드의 효소적 합성방법.

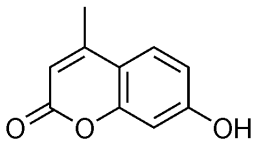
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 당수용체는 하기 [화학식 4] 또는 [화학식 5]로 표시되는 아릴 화합물인 것을 특징으로 하는 O-아릴 알파-글리코시드의 효소적 합성방법:

[화학식 4]



[화학식 5]



상기 [화학식 4]에서

상기 R_2 내지 R_6는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 니트로기, 시안기, 트리할로메틸기, 설포네이트기, C1-4의 카복실기, C1-4 에스터기, 히드록시기 및 폴리페놀기 중에서 선택된다.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 당수용체는 3-니트로페놀, 4-니트로페놀, 3,4-니트로페놀, 3,5-니트로페놀, 2-니트로페놀, 2,4-니트로페놀, 2,5-니트로페놀 및 4-메틸움벨리페론으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 O-아릴 알파-글리코시드의 효소적 합성방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 알파-티오글리콜리가제는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 O-아릴 알파 글리코시드의 효소적 합성방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 반응은 pH 7-10 범위에서 수행되는 것을 특징으로 하는 O-아릴 알파 글리코시드의 효소적 합성방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 반응은 10-50 ℃ 범위에서 수행되는 것을 특징으로 하는 O-아릴 알파 글리코시드의 효소적 합성방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알파-티오글리콜리가제를 이용하여 알파-글리코시다제의 발색기질인 O-아릴 알파-글리코시드를 합성하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항생물질이나 기능성 글리코시드와 같은 다양한 종류의 천연물질은 글리코시드 결합에 의해 연결된 페놀 및 당으로 구성되어 있으며, 발색성 또는 형광성 아글리콘을 갖는 합성 O-아릴 글리코시드는 효소 반응속도론 연구와 관련하여 매우 중요한 기질이므로 O-아릴 글리코시드의 화학적 합성은 탄수화물 분야에서 주목받고 있다.

[0003] 일반적으로 화학반응을 통해서 얻어진 화합물은 아노머 중심의 구조가 상이한 두 입체이성질체의 혼합물이 얻어지며, 두 입체이성질체 중 1,2-트랜스-글리코시드(예를 들어 β-글루코시드, β-자일로시드, α-만노시드 등)는 거의 2-O-아실기에 의해 이웃하는 기가 반응에 참여하는 글리코실화에 의해서만 얻어진다[G.J. Boons, Contemp. Org. Synth., 3 (1996) 173-200]. 반면, C-2 위치의 작용기의 도움 없이 활성화된 글리코실 공여체를 사용하여 1,2-시스-글리코시드 결합을 도입하면 아노머 혼합물이 형성되는 것으로 보고되었다[A.V. Demchenko, Synlett, (2003) 1225-1240].

[0004] 최근에, 예컨대 아릴 알파-글루코시드나 아릴 알파-갈락토시드와 같은 1,2-시스-글리코시드의 입체선택적 합성 방법이 개발되었으나, 이들 반응은 복잡한 보호/탈보호 과정을 필요로 하고 0° C 이하의 저온조건이나 여러 시간 동안의 환류와 같은 고비용 반응조건을 필요로 한다. 또한, 아릴 알파-자일로시드의 경우, 일반적인 합성경로는 보고된 바 없으며 단지 4-니트로페닐 알파-D-자일로피라노시드(4-NPαXyl)만이 상업적으로 얻을 수 있다[S.S. Chang, C.C. Lin, Y.K. Li, K.K. Mong, Carbohydr. Res., 344 (2009) 432-438].

[0005] 한편, 높은 입체선택성과 일반적으로 온화한 반응조건으로 인해 효소적 합성이 종래의 화학적 합성의 대안으로 대두되고 있다. 올리고당 및 글리코시드의 천연합성에는 글리코실트랜스퍼라제가 필요하지만, 글리코실트랜스퍼라제는 고가의 활성화된 핵산당을 기질로 이용하는 반면 글리코시다제는 보다 저렴한 기질을 이용하므로 글리코시다제를 이용한 올리고당의 합성이 주목받고 있다.

[0006] 지금까지 다양한 글리코시다제가 올리고당, 글리코시드 및 글리코컨주게이트의 합성에 적용되었으며, Hancock 등은 글리코시다제를 변형하여 야생형 글리코시다제에 의해 글리코실화된 생성물이 재가수분해되는 문제를 해결

한바 있다[S.M. Hancock, M.D. Vaughan, S.G. Withers, Curr. Opin. Chem. Biol., 10 (2006) 509-519].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 당공여체와 당수용체를 산/염기 촉매잔기가 비활성화된 아미노산 잔기로 바뀐 알파-글리코시다제 또는 알파-자일로시다제의 변이체인 알파-티오글리콜리가제의 존재하에서 반응시킴으로써 O-아릴 알파-글리코시드를 합성하는 효소적 합성방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

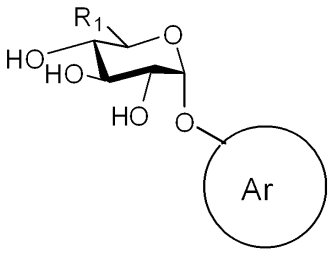
[0008] 본 발명은 상기 과제를 달성하기 위하여,

[0009] 하기 [화학식 1]로 표시되는 O-아릴 알파-글리코시드의 제조방법에 있어서,

[0010] (1) 하기 [화학식 2]로 표시되는 단당체를 하기 [화학식 3]으로 표시되는 당공여체로 치환하는 단계; 및

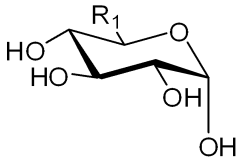
[0011] (2) 하기 [화학식 3]으로 표시되는 당공여체와, 수산화기를 갖는 아릴화합물로서 상기 수산화기의 pKa 값이 상기 단당체의 1번 탄소에 위치한 수산화기의 pKa 값 보다 낮은 아릴화합물인 당수용체를 알파-티오글리콜리가제의 존재하에서 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 O-아릴 알파-글리코시드의 효소적 합성방법을 제공한다:

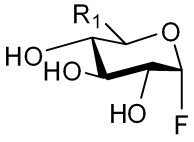
[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] [화학식 2] [화학식 3]





[0015]

[0016] 상기 [화학식 1] 내지 [화학식 3]에서,

[0017] R_1은 수소 또는 메틸알콜이며,

[0018] Ar은 아릴화합물이다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 당수용체는 수산화기를 갖는 아릴화합물로서 상기 수산화기의 pKa 값이 상기 [화학식 2]로 표시되는 단당체의 1번 탄소에 위치한 수산화기의 pKa 값 보다 낮은 아릴화합물일 수 있으며, 바람직하게는 상기 pKa 값이 10 이하, 더욱 바람직하게는 pKa 값이 8.5이하 일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 당수용체는 하기 [화학식 4] 또는 [화학식 5]로 표시될 수 있다:

[0021] [화학식 4] [화학식 5]

[0022] 

[0023] 상기 [화학식 4]에서

[0024] 상기 R_2 내지 R_6는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 니트로기, 시안기, 트리할로메틸기, 설포네이트기, C1-4의 카복실기, C1-4 에스터기, 히드록실기 및 폴리페놀기 중에서 선택된다.

[0025] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 당수용체는 3-니트로페놀, 4-니트로페놀, 3,4-니트로페놀, 3,5-니트로페놀, 2-니트로페놀, 2,4-니트로페놀, 2,5-니트로페놀 및 4-메틸움벨리페론으로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 명세서에 기록된 알파-티오글리콜리가제는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 중에서 선택되는 어느 하나 일 수 있는데,

[0027] 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은 E. coli K-12 유래 알파-자일로시다아제 유전자의 482번째의 아미노산 잔기를 아스파테이트에서 알라닌으로 변이시킨 것으로 알파-자일로시다제 돌연변이 효소(YicI-D482A)의 아미노산 서열이며, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열은 술폴로부스 솔파타리쿠스(Sulfolobus solfataricus) 유래 알파-글루코시다제 유전자의 416번째의 아미노산 잔기를 아스파테이트를 알라닌으로 변이시킨 것으로 알파-글루코시다제 돌연변이 효소(Mal-D416A)의 아미노산 서열이다.

[0028] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 반응은 pH 7-10 범위에서 수행될 수 있으며,

[0029] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 의하면, 상기 반응은 10-50 ℃ 범위에서 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 따른 알파-티오글리콜리가제를 이용한 O-아릴 알파-글리코시드의 합성방법은 당공여체와 당수용체를 산/염기 촉매잔기가 비활성화된 아미노산 잔기로 바뀐 알파-글리코시다제 또는 알파-자일로시다제의 변이체인 알파-티오글리콜리가제의 존재하에서 반응시킴으로써 O-아릴 알파-글리코시드를 우수한 효율로 합성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 알파-D-자일로실 플루오라이드(α-D-Xylosyl fluoride;α-XylF) 또는 알파-D-글루코실 플루오라이드(α-D-Gylosyl fluoride;α-GlcF)를 당공여체로, 아릴 화합물을 당수용체로 사용하여 알파-티오글리콜리가제를 이용하여 효소적으로 O-아릴 알파-글리코시드를 합성하는 메카니즘을 도식화한 것이다. 상기 알파-티오글리콜리가제는 알파-자일로시데이즈의 482번째 아미노산잔기인 아스파테이트를 알라닌으로 변이시킨 돌연변이 효소 (이하 YicI-D482A) 또는 알파-글루코시데이즈의 416번째 아스파테이트를 알라닌으로 변이시킨 돌연변이 효소(이하 Mal-D416A)이다.

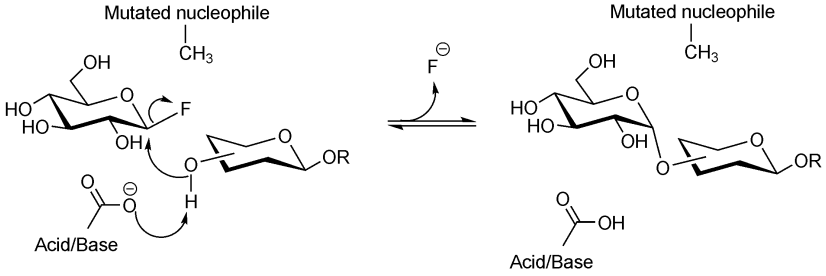
도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 알파-D-자일로실 플루오라이드(α-D-Xylosyl fluoride;α-XylF) 대 4-니트로페놀(4-nitrophenol; 4-NP)의 비율이 YicI D482A를 이용한 4-니트로페닐 알파-D-자일로피라노시드(4--nitrophenyl α-D-Xylopyranoside; 4-NPαXyl)의 합성수율에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따라 알파-글루코시다제 변이체(MalA-D416A)에 의해 촉매되는 반응의 박층크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC) 분석 결과를 나타낸 도이다. 왼쪽은 UV 254 nm로 가시화하여 촬영한 TLC plate의 이미지이며, 오른쪽은 황산 함유 발색시약을 이용하여 처리한 TLC plate의 이미지이다. 1-12에서 아릴 화합물로 1, 2 및 3은 3-니트로페놀(3-nitrophenol; 3-NP)를 사용하였으며, 4,5 및 6은 4-니트로페놀(4-nitrophenol; 4-NP)을 사용하였고, 7,8 및 9는 3,4-디니트로페놀(3,4-dinitrophenol; 3,4-DNP)을 사용하였으며, 10, 11 및 12는 4-메틸움벨리페론(4-methylumbelliferone; MU)을 사용하였다. S는 알파-D-글루코실 플루오라이드(α-D-glucosyl fluoride; α-GlcF) 및 글루코스를 포함하는 표준물질의 TLC 분석결과이며, 1, 4, 7 및 10은 알파-글루코시다제 변이체(MalA-D416A)을 사용하지 않은 블랭크 반응의 TLC 분석결과이고, 2, 5, 8 및 11은 반응혼합액에 α-글루코시다제 변이체(MalA-D416A)을 첨가한 반응의 TLC 분석결과이며, 3, 6, 9

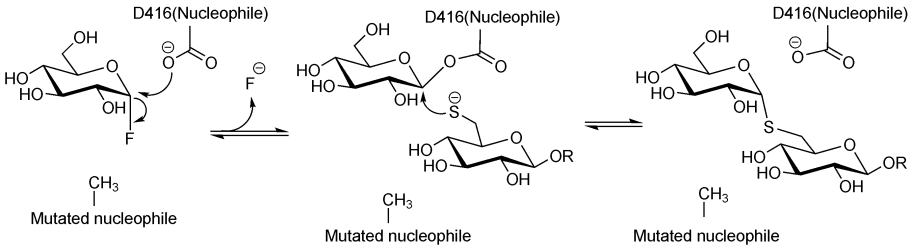
및 12는 반응혼합액에 알파-글루코시다제를 가한 반응의 TLC 분석결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 최초의 성공적인 글리코시다제 변이체는 글리코신타제라고 명명되었는데, 이는 촉매적 친핵체를 비친핵성 잔기로 전환시킨 글리코시다제 변이체이다. 이들 변이체는 천연 기질과 반대의 아노머 구조를 갖기 때문에 글리코실 효소 중간체를 모방하는 글리코실 플루오라이드가 공여체 기질로 사용되는 경우, 원래의 기질과 동일한 입체화학 특성을 갖는 새로운 O-글리코시드 결합을 형성한다[Okuyama, Mori, Watanabe, Kimura, Chiba, Biosci. Biotechnol. Biochem. 66 (2002) 928-933].

[0033] 

[0034] 이에 반해, 티오글리콜리가제는 S-글리코시드 결합을 형성하는 것으로, 일반적인 산/염기 촉매기가 비활성화된 아미노산 잔기로 변이된 글리코시다제 변이체는 디니트로페놀이나 플루오라이드와 같이 우수한 이탈기를 갖는 기질을 이용하여 글리코실 효소 중간체를 형성할 수 있으며, 수산화기보다 친핵성이 큰 티올기를 갖는 당수용체를 사용하면, 티오-당수용체의 친핵성 공격에 의해 중간체가 유리된 효소로 전환되면서 S-글리코시드 결합을 형성한다[Kim, Lovering, Chen, Kantner, McIntosh, Strynadka, Withers, J. Am. Chem. Soc. 128 (2006) 2202-2203].

[0035] 

[0036] 이에 본 발명자는 티오글리콜리가제의 트랜스글리코실화 메커니즘을 고려할때, pK_a 값이 당의 수산기(글루코스의 pKa = 12.25, 자일로스의 pka = 12.15)보다 낮은 수산화기를 갖는 아릴 화합물을 당수용체로 사용하면, 상기 S-글리코시드 결합이 아닌 O-아릴 글리코시드가 생성될 수 있을 것이라는 착안점에 대장균(Escherichia coli)의 α-자일로시다제(YicI)와 술폴로부스 솔파타리쿠스(Sulfolobus solfataricus)의 α-글루코시다제(MalA)로부터 유래된 α-티오글리콜리가제를 이용한 효소적 합성으로 본 발명을 완성하게 되었다. 이에 본 발명에서는 고비용 반응조건 및 장비를 사용하지 않고도 O-아릴 알파-글리코시드를 합성하는 방법을 제공하고자 한다.

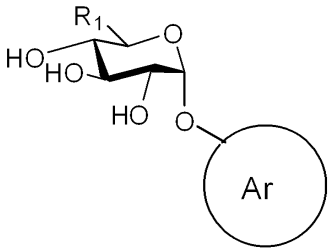
[0037] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[0038] 본 발명은 하기 [[화학식 1]로 표시되는 O-아릴 알파-글리코시드의 제조방법에 있어서,

[0039] (1) 하기 [화학식 2]로 표시되는 단당체를 하기 [화학식 3]으로 표시되는 당공여체로 치환하는 단계; 및

[0040] (2) 하기 [화학식 3]으로 표시되는 당공여체와, 수산화기를 갖는 아릴화합물로서 상기 수산화기의 pKa 값이 상기 단당체의 1번 탄소에 위치한 수산화기의 pKa 값 보다 낮은 아릴화합물인 당수용체를 알파-티오글리콜리가제의 존재하에서 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 O-아릴 알파-글리코시드의 효소적 합성방법을 제공한다:

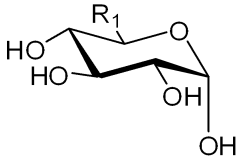
[0041] [화학식 1]

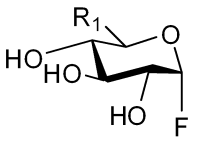


[0042]

[0043] [화학식 2] [화학식 3]

[0044]





[0045] 상기 [화학식 1] 내지 [화학식 3]에서,

[0046] R_1은 수소 또는 메틸알콜이며,

[0047] Ar은 아릴화합물이다.

[0048] 본 발명에 의하면, 상기 당수용체는 수산화기를 갖는 아릴화합물로서 상기 수산화기의 pKa 값이 상기 [화학식 2]로 표시되는 단당체의 1번 탄소에 위치한 수산화기의 pKa 값 보다 낮은 아릴화합물일 수 있는데, 바람직하게는 상기 수산화기의 pKa 값이 10 이하인 아릴화합물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 pKa 값이 8.5 이하인 아릴화합물일 수 있고, 상기 당공여체의 수산기가 해리되지 않는 것이 바람직하다.

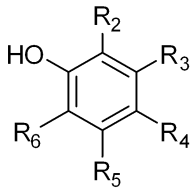
[0049] 상기 당수용체의 pKa 값이 10 이상이면, 당수용체의 친핵성이 약하므로 O-아릴 알파-글리코시드 결합을 형성하기 힘들며, 당공여체의 수산기가 해리될 수 있어 바람직하지 않으나,

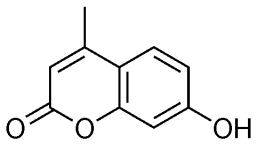
[0050] 상기 당수용체의 수산화기의 pKa 값이 10 이하, 보다 바람직하게는 pKa 값이 8.5 이하의 값을 가지는 아릴 화합물의 경우에는 pH 7에서 해리되어 -OH가 아닌 $-O^-$로 존재하며 친핵성이 강해져 O-글리코시드 결합을 형성하므로 바람직하다.

[0051] 본 발명에 의하면, 상기 당수용체는 하기 [화학식 4] 또는 [화학식 5]로 표시되는 아릴 화합물일 수 있다:

[0052] [화학식 4] [화학식 5]

[0053]





[0054] 상기 [화학식 4]에서

[0055] 상기 R_2 내지 R_6는 서로 동일하거나 상이하고, 각각 독립적으로 수소, 니트로기, 시안기, 트리할로메틸기, 설포네이트기, C1-4의 카복실기, C1-4 에스터기, 히드록실기 및 폴리페놀기 중에서 선택될 수 있으며,

[0056] 바람직하게는 3-니트로페놀, 4-니트로페놀, 3,4-니트로페놀, 3,5-니트로페놀, 2-니트로페놀, 2,4-니트로페놀, 2,5-니트로페놀 및 4-메틸움벨리페론으로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.

[0057] 본 발명에 의하면, 상기 O-아릴 알파-글리코시드는 당공여체 1 몰에 대하여 당수용체 1-3 몰을 반응시킴으로써 제조되는 것이 바람직한데, 상기 범위를 벗어나는 경우에는 알파-티오글리콜리가제에 의해 당공여체가 가수분해

되는 비율이 높아져, 상기 [화학식 1]로 표시되는 O-아릴 알파-글리코시드의 수율이 감소하며, 경제적이지 않으므로 바람직하지 않다.

[0058] 또한, 상기 알파-티오글리콜리가제는 알파-D-자일로실 플루오라이드의 자일로스를 글루코시드와 만노시드의 6-OH 기로 전달시킬 수 있으며, 6-OH 기가 없는 갈락토시드와 자일로시드로는 전달시키지 않는다.

[0059] 본 발명에 의하면, 상기 O-아릴 알파-글리코시드의 효소적 합성방법은 pH 7-10 범위에서 수행될 수 있는데, 상기 범위인 것이 상기 [화학식 4]에 존재하는 수산화기의 친핵성을 강화시켜 O-아릴 알파-글리코시드의 수율이 향상됨으로 바람직하며,

[0060] 또한, 상기 O-아릴 알파-글리코시드의 효소적 합성방법은 10-50℃ 범위에서 수행될 수 있는데, 10 ℃ 미만의 온도는 너무 낮아 알파-티오글리콜리가제의 활성이 일어나기 힘들어 O-아릴 알파-글리코시드의 수율 향상을 기대하기 힘들며, 50℃를 초과하는 온도에서는 알파-D-자일로실 플루오라이드 또는 알파-D-글루코실 플루오라이드의 가수분해가 일어나므로 바람직하지 않다.

[0061] 본 발명에 의하면, 상기 알파-티오글리콜리가제는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열 중에서 선택되는 어느 하나 일 수 있는데,

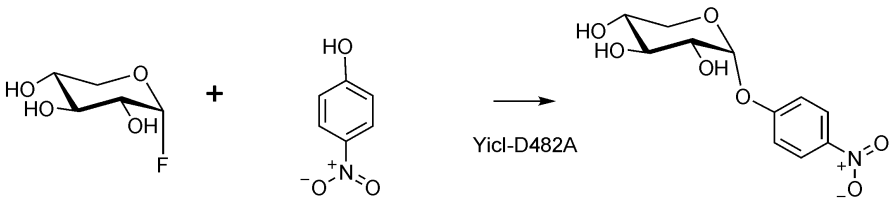
[0062] 상기 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열은 E. coli K-12 유래 알파-자일로시다아제 유전자의 482번째의 아미노산 잔기를 아스파테이트에서 알라닌으로 변이시킨 것으로 알파-자일로시다제 돌연변이 효소(YicI-D482A)의 아미노산 서열이며, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열은 술폴로부스 솔파타리쿠스(Sulfolobus solfataricus) 유래 알파-글루코시다제 유전자의 416번째의 아미노산 잔기를 아스파테이트를 알라닌으로 변이시킨 것으로 알파-글루코시다제 돌연변이 효소(Mal-D416A)의 아미노산 서열이다.

[0063] 상기 당공여체는 상기 알파-티오글리콜리가제에 의해 가수분해될 수 있으며, 상기 알파-티오글리콜리가제는 야생형 알파-글루코시다제 또는 야생형 알파-자일로시다제에 비하여 10^2 내지 10^4 배 낮은 촉매효율(K_{cat}/K_M)로 당공여체를 가수분해하여 트랜스글리코실화 생성물을 제조할 수 있다.

[0064] 이하, 본 발명을 바람직한 실시예를 참고하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0065] **실시예**

[0066] **실시예 1. 4-니트로페닐-알파-D-자일로피라노사이드의 합성**



[0067]

[0068] **실시예 1.1**

[0069] 가. 당공여체로 1 mM 알파-D-자일로실 플루오라이드 용액 1mL와 당수용체로 1 mM 4-니트로페놀 용액 1 mL를 넣고, 서열번호 1로 표시되는 482번째의 아미노산 잔기를 아스파테이트에서 알라닌으로 돌연변이시킨 알파-자일로시다제 돌연변이 효소(이하 YicI-D482A)를 최종농도가 5 mg/mL가 되도록 첨가한 후, pH가 7.0인 200 mM 인산나트륨 완충액의 첨가하고 25 ℃에서 4 시간 동안 트랜스글리코실화 반응을 수행하였다. 박층크로마토그래피(Thin layer chromatogtaphy)를 이용하여 반응여부를 모니터링 한 후, 19배 부피량(v/v)의 아세토니트리를 첨가하여 반응을 종료시키고, 얻어진 혼합액을 10,000 rmpm에서 15 분 동안 원심분리하여 침전된 효소와 완충염을 제거하고 HPLC로 분석하였다.

[0070] 나. pH가 7.0인 인산나트륨 완충액 대신 pH가 6.0인 인산나트륨 완충액을 사용한 것을 제외하고는 (가)의 방법으로 수행하였다.

[0071] 다. pH가 7.0인 인산나트륨 완충액 대신 pH가 8.0인 인산나트륨 완충액을 사용한 것을 제외하고는 (가)의 방법으로 수행하였다.

[0072] 실시예 1.2

[0073] 당수용체로 2 mM 4-니트로페놀을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1.1의 방법으로 수행하였다.

[0074] 실시예 1.3

[0075] 당수용체로 3 mM 4-니트로페놀을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1.1의 방법으로 수행하였다.

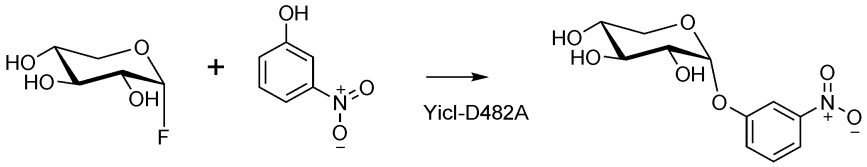
[0076] 실시예 1.4

[0077] 반응혼합액을 Nova-Pac® C18 SEP PAK 카트리지(waters 사)에 장입하여 유리된 당, 효소 및 염을 제거하고, 이어서 감압하에 용매를 증발시켰다. 농축액을 200-425 mesh의 실리카겔을 이용하여, 실리카겔 프래시크로마토그래피(용매조건 EtOAc/MeOH/H2O=17.5:2:0.5)으로 정제하였으며, NMR과 ESI-MS로 분석하였다.

[0078] Yellow powder (38.2 mg, 96%). ^{1}H NMR (CD_3OD, 300 MHz): 7.73 (m, 1H, Ph-H), 7.15 (m, 1 H, Ph-H), 7.11 (m, 1H, Ph-H), 5.60 (d, 1H, J = 3.9Hz, H-1), 3.70~3.60 (m, 5H, the rest protons of sugar ring).

[0079] ESI-MS: calc. for $C_{15}H_{16}O_7 + Na^+$ = 331.2; Found 331.2.

[0080] **실시예 2. 3-니트로페닐-알파-D-자일로피라노사이드의 합성**

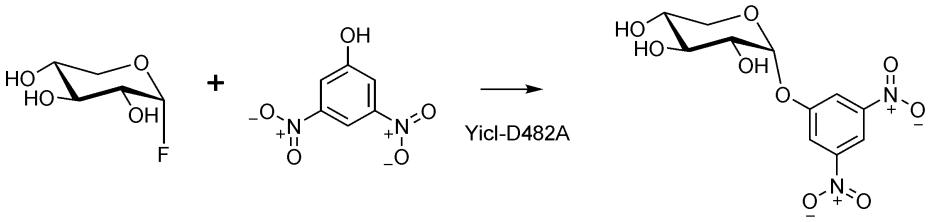
[0081] 

[0082] 당수용체로 4-니트로페놀 대신 3-니트로페놀을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 트랜스글리코실화 반응을 수행하였으며, 산물을 분석하였다.

[0083] White powder (31.5 mg, 89%). ^{1}H NMR (CD_3OD, 300 MHz): 7.98 (m, 1H, Ph-H), 7.90 (m, 1H, Ph-H), 7.58 (m, 1H, Ph-H), 7.53 (m, 1H, Ph-H), 5.58 (d, 1H, J = 3.9Hz, H-1), 3.70~3.50 (m, 5H, the rest protons of sugar ring).

[0084] ESI-MS: calc. for $C_{11}H_{13}NO_7 + Na^+$ = 294.2; Found 294.2.

[0085] **실시예 3. 3,4-디니트로페닐-알파-D-자일로피라노사이드의 합성**



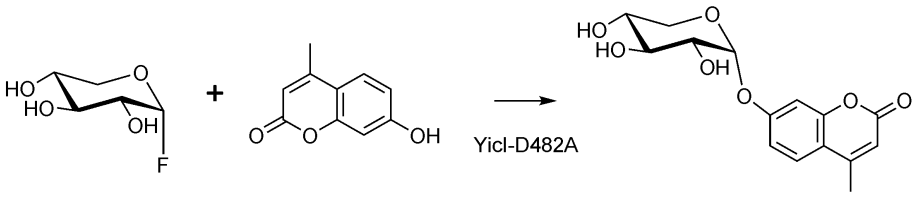
[0086]

[0087] 당수용체로 4-니트로페놀 대신 3,4-디니트로페놀을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 트랜스글리코실화 반응을 수행하였으며, 산물을 분석하였다.

[0088] Yellow powder (36.4 mg, 89%). ^{1}H NMR (CD_3OD, 300 MHz): 8.14 (d, 1H, J = 9.0Hz, Ph-H), 7.66 (d, 1H, J = 2.4Hz, Ph-H), 7.49 (dd, 1H, J = 2.7Hz, J = 9.0Hz, Ph-H), 5.70 (d, 1H, J = 3.9Hz, H-1), 3.80~3.60 (m, 5H, the rest protons of sugar ring).

[0089] ESI-MS: calc. for $C_{11}H_{12}N_2O_9$ + Na^+ = 339.2; Found 339.2.

[0090] **실시예 4. 4-메틸움벨리페로닐-알파-D-자일로피라노사이드의 합성**



[0091]

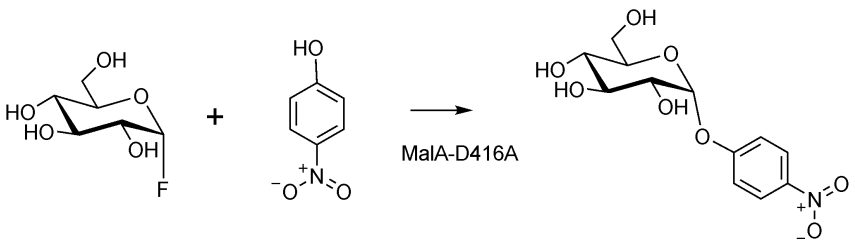
[0092] 당수용체로 4-니트로페놀 대신 4-메틸움벨리페론을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1의 방법으로 트랜스글리코실화 반응을 수행하였으며, 산물을 분석하였다.

[0093] Yellow powder (38.2 mg, 96%). ^{1}H NMR (CD_3OD, 300 MHz): 7.73 (m, 1H, Ph-H), 7.15 (m, 1 H, Ph-H), 7.11 (m, 1H, Ph-H), 5.60 (d, 1H, J = 3.9Hz, H-1), 3.70~3.60 (m, 5H, the rest protons of sugar ring).

[0094] ESI-MS: calc. for $C_{15}H_{16}O_7$ + Na^+ = 331.2; Found 331.2

[0095] **실시예 5. 4-니트로페닐-알파-D-글루코피라노사이드의 합성**

[0096] 실시예 5.1



[0097]

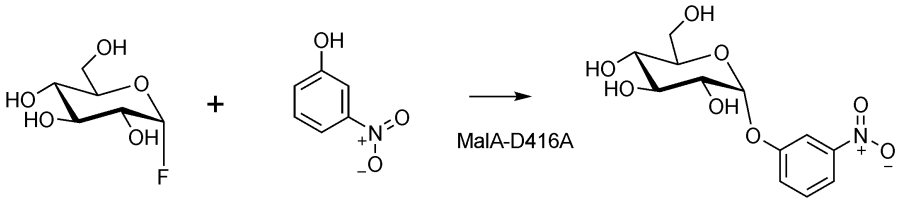
[0098] 당공여체로 1mM 알파-D-글루코실 플로오라이드 1 mL와 당수용체로 2 mM 4-니트로페놀을 1 mL에 서열번호 2로 표시되는 416번째의 아미노산 잔기를 아스파테이트에서 알라닌으로 돌연변이시킨 알파-글루코시다제 돌연변이 효소(이하 MalA-D416A)를 최종농도가 5 mg/mL가 되도록 첨가한 후, pH가 8.0인 200 mM 인산나트륨 완충액의 첨가하고 25 ℃에서 4 시간 동안 트랜스글리코실화 반응을 수행하였다. 박층크로마토그래피(Thin layer chromatogtaphy)를 이용하여 반응여부를 모니터링 한 후, 19배 부피량(v/v)의 아세토니트리를 첨가하여 반응을

종료시키고, 얻어진 혼합액을 10,000 rmpm에서 15 분 동안 원심분리하여 침전된 효소와 완충염을 제거하고 HPLC로 분석하였다.

[0099] 실시예 5.2

[0100] 생성된 아릴 글루코시드의 아노머 구조분석을 위해 상기 실시예 5.1의 트랜스글리코실화 반응액에 사카로미세스 세레비시아 유래의 알파-글루코시다제(시그마알드리치 사, 미국)를 반응 혼합액에 최종농도가 2 U/ml가 되도록 첨가한 후, 37 ℃에서 2 시간 동안 인큐베이션 한 후, 박층크로마토그래피(Thin layer chromatogtaphy)를 이용하여 분석하였다.

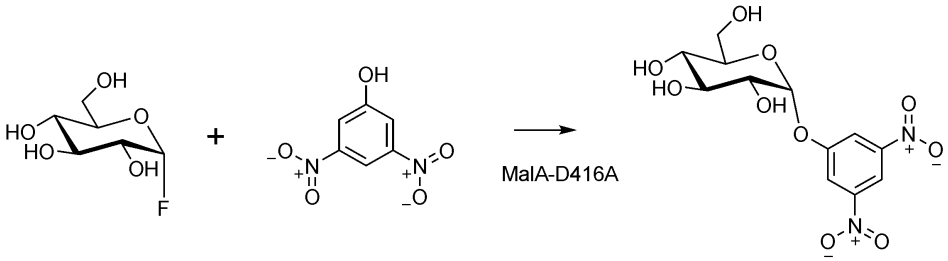
[0101] **실시예 6. 3-니트로페닐-알파-D-글루코피라노사이드의 합성**



[0102]

[0103] 당수용체로 4-니트로페놀 대신 3-니트로페닐을 사용한 것을 제외하고는 실시예 5의 방법으로 트랜스글리코실화 반응을 수행하였다.

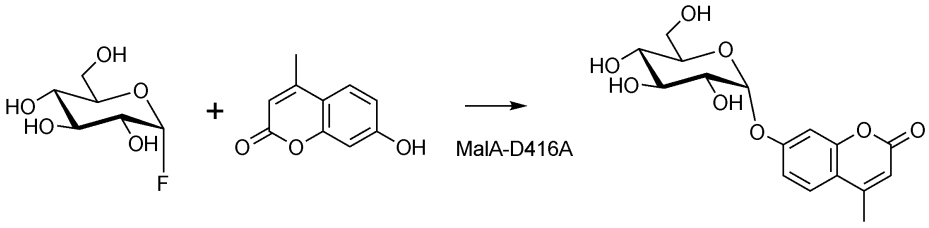
[0104] **실시예 7. 3,4-니트로페닐-알파-D-글루코피라노사이드의 합성**



[0105]

[0106] 당수용체로 4-니트로페놀 대신 3,4-디니트로페닐을 사용한 것을 제외하고는 실시예 5의 방법으로 트랜스글리코실화 반응을 수행하였다.

[0107] **실시예 8. 4-메틸움벨리페로닐-알파-D-글루코피라노사이드의 합성**



[0108]

[0109] 당수용체로 4-니트로페놀 대신 4-메틸움벨리페론을 사용한 것을 제외하고는 실시예 5의 방법으로 트랜스글리코실화 반응을 수행하였다.

[0110] 비교예 1

[0111] 알파-자일로시다제 돌연변이 효소(YicI-D482A) 대신에 야생형 알파-자일로시다제 효소(YicI)를 사용한 것을 제

외하고는 실시예 2의 방법으로 트랜스 글리코실화 반응을 수행하였다.

[0112] **시험예 1. 농도에 따른 트랜스글리코실화 활성비교**

[0113] 실시예 1 및 비교예 1에 따른 트랜스글리코실화 활성 반응을 비교하기 위하여 박층크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC; 이하 TLC)분석을 실시하였다.

[0114] 알파-D-자일로실 플루오라이드는 야생형 YicI에 의해 촉매되는 반응에 의해 빠르게 사라졌으며, 트랜스글리코실화 생성물은 TLC 분석에서 거의 검출되지 않았다. 반면에 YicI-D482A에 의해 촉매되는 반응의 경우, 트랜스글리코실화 생성물(4-니트로페닐-알파-D-자일로피라노사이드)이 생성되었으며, TLC 분석을 통해 검출되었다.

[0115] 알파-D-자일로실 플루오라이드는 YicI-D482A에 의해 촉매되는 반응에서 야생형 YicI에 의해 촉매되는 반응에 비해 10^3 배 낮은 촉매효율(k_{cat}/K_M)로 가수분해되었다. YicI-D482A은 알파-D-자일로실 플루오라이드를 기질로 사용하였을 때 촉매적 친핵체 잔기에 의한 알파-D-자일로실 플루오라이드의 아노머 중심에 대한 친핵성 공격에 의해 좋은 이탈기인 플루오라이드는 이탈하고 자일로스와 효소가 공유결합된 중간체를 형성하였다. 이후 4-니트로페놀의 수산화기가 중간체의 아노머 중심에 친핵성 공격을 수행함으로써 자일로스가 4-니트로페놀의 수산화기로 전이되고, 그 생성물이 효소에 의해 가수분해되지 않은 상태로 반응혼합액 내에 축적되었고, 4-니트로페닐-알파-D-자일로피라노사이드는 YicI-D482A에 대하여 비활성을 나타내었다.

[0116] 알파-D-자일로실 플루오라이드는 자발적으로 효소에 의해 가수분해되는 특정을 가지므로, 이러한 가수분해를 극복하고 트랜스글리코실화의 수율을 향상시키기 위하여 실시예 2의 4-니트로페놀의 몰비에 따라 변화되는 반응 수율을 측정하였다.

[0117] 알파-D-자일로실 플루오라이드 1몰에 대하여 4-니트로페놀 2몰을 사용하였을 때는 생성물의 수율이 개선되었으나, 알파-D-자일로실 플루오라이드 1몰에 대하여 4-니트로페놀 3몰을 사용하였을 때는 생성물의 수율이 감소하였고 이를 도 1에 나타내었다.

[0118] **시험예 2. TLC 및 NMR 분석**

[0119] 실시예 1-4 및 비교예 1에 따라 제조된 전이 생성물을 TLC 및 HPLC로 확인하였으며, 플래시 컬럼크로마토 그래피로 정제하고 세부구조를 ^{1}H NMR(Verian, 300MHz)로 분석하였다.

[0120] 야생형 당전이 효소를 이용한 당전이 반응의 경우, 생성된 당전이 생성물이 다시 당수용체로 사용되는 2차 당전이 반응이 발생하였으며, 부산물이 생성되었다. 반면, 본 발명의 실시예 1-4에 따라 제조된 전이 생성물을 TLC 및 HPLC로 분석하였으며, 다른 전이 생성물이 생성되지 않은 것을 확인하였다. 이러한 결과는 알파-D-자일로피라노사이드의 수산기의 pKa값이 아릴 화합물의 pKa값 보다 높기 때문에 티오글리콜리가제의 당수용체로 적합하지 않기 때문으로 판단된다.

[0121] 알파-D-자일로실 플루오라이드의 ^{1}H NMR 결과와 비교하여, 9 ppm에서 7 ppm으로 화학적 이동이 관찰되었는데, 이는 페놀기가 있음을 의미하는 것이며, 자일로스에서 나타나는 6 ppm은 3 ppm으로 화학적이동이 관찰되었다. 또한, 4-니트로페닐-알파-D-자일로피라노사이드에 의해 포획된 H-1의 화학적 이동은 5.63 ppm 근처에서 전형적인 이중피크를 나타내었다. 또한 작은 커플링상수(J=4.5)가 관찰되었는데, 이로서 아릴 생성물이 1,2-시스-자일로시드임을 알 수 있다.

[0122] **시험예 3. 아릴 자일로시드 합성에 대한 수용체 특이성**

[0123] 당수용체의 특이성 조사를 위하여, 실시예 1-4을 pH 7에서 시험하였다. 시험예 1에 결과에 근거하여, 알파-D-자일로실 플루오라이드 1 몰에 대하여 실시예 1-4의 아릴화합물의 비율을 2 몰로 고정하여 실시하였다. TLC 분석 결과, 3,4-디니트로페놀과, 4-니트로페놀 및 구조적으로 상이한 수용체인 4-메틸움벨리페놀의 전환수율(%)은 각각 95 %, 93 % 및 97 %였으나, 3-니트로페놀의 전환수율은 28 %를 나타내었다.

[0124] **시험예 4. 아릴 자일로시드 합성에 대한 pH 영향**

[0125] 알파-D-자일로실 플루오라이드 1 몰에 대하여 실시예 1-4의 아릴화합물의 비율을 2 몰로 고정하고 최적 pH 조건을 조사하기 위하여 pH 6.0, 7.0 및 8.0에서 반응을 수행하였다. HPLC 분석 결과, 3,4-디니트로페놀, 4-니트로페놀, 및 4-메틸움벨리페놀을 아릴화합물로 사용한 반응의 전이 생성물 수율은 pH가 증가함에 따라 약간 증가하였으며, 3-니트로페닐을 사용한 반응의 전이 생성물수율은 pH 8.0에서 크게 향상되었다. 전이 생성물이 얻어진 아릴 화합물들 중 3-니트로페놀의 pKa 값이 8.39로 가장 높았는데, 이는 pH 8.0에서 3-니트로페닐-알파-D-자일로피라노사이드의 수율이 높게 나타난 것은 염기성 pH 조건에서 3-니트로페닐의 수산화기의 친핵성이 강화되었기 때문이다. 이를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0126]

	아릴화합물의 pKa	아릴-알파-D-자일로시드의 전환수율 (%)		
		pH 6	pH 7	pH 8
실시예 1	7.15	92	93	99
실시예 2	8.39	23	28	94
실시예 3	5.36	95	95	97
실시예 4	7.79	95	97	99

[0127] **시험예 5. MalA-D416A를 이용한 O-아릴-알파-글루코시드의 합성.**

[0128] 실시예 5-8에 따라 트렌스글리코실화 반응을 수행하였으며, 상기 결과를 TLC로 확인하였으며 이를 도 3에 나타내었다.

[0129] 이는 글리코시드 가수분해효소군에 속하는 YicI와 MalA의 구조가 유사하므로 이들 변이체 또한 비슷한 수용체 특이성을 나타내는 것으로 추측할 수 있다. 이를 확인하기 위하여, 야생형 알파-글루코시다제 2 U/mL을 반응혼합액에 가한 후, TLC로 분석하였다. 도 3의 3, 6, 9 및 12에서 알 수 있듯이, 각 생성물의 스팟이 사라진 반면, 글루코스의 스팟은 검출되었다. 이러한 결과로부터 실시예 5-8에 의해 합성된 아릴글루코시드의 아노머 구조가 알파-아노머임을 확인할 수 있다.

[0130] 시그마 사에서 구입한 글루코시드의 표준곡선을 이용하여, 4-니트로페닐글루코피라노사이드와, 4-메틸움벨리페닐글루코피라노사이드의 수율을 HPLC로 측정하였으며, 측정된 전환수율(%)은 각각 사용한 공여체 당의 83% 및 75%였다.

[0131] MalA-D416A를 사용한 O-아릴-알파-글루코시드의 합성 반응물의 조성을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0132]

-	S	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
B	-	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
C	-	-	o	o	-	o	o	-	o	o	-	o	o
D	-	-	-	o	-	-	o	-	-	o	-	-	o
E	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0133] A.알파-D-글루코실 플루오라이드

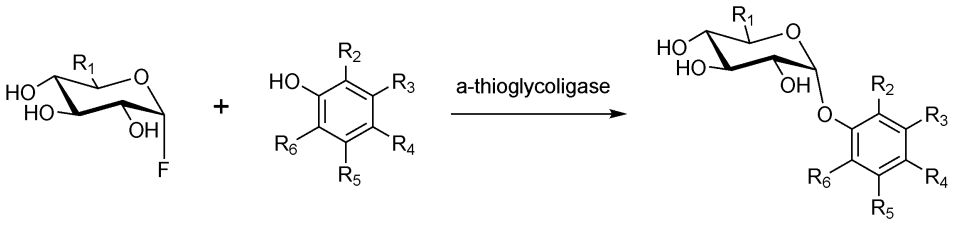
[0134] B. 아릴화합물: 1-3은 3-니트로페놀(3-NP), 4-6은 4-니트로페놀(4-NP), 7-9는 3,4-디니트로페놀(3,4-DNP) 및 10-12은 4-메틸움벨리페놀(MU)

[0135] C. MalA-D416A

[0136] D. 알파-글리코시다제

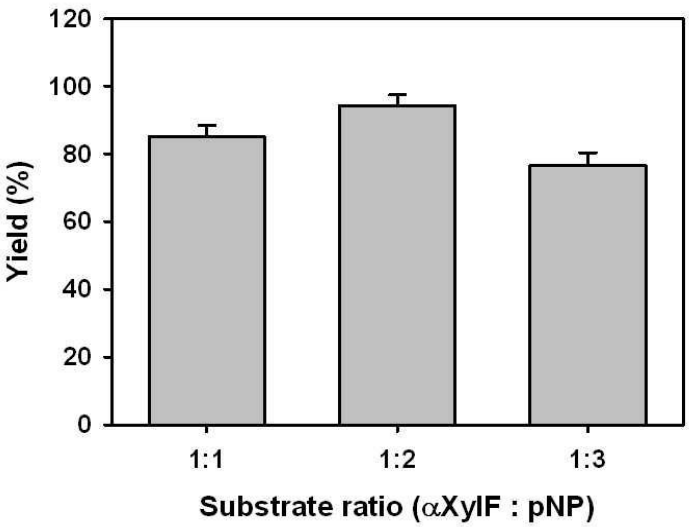
도면

도면1

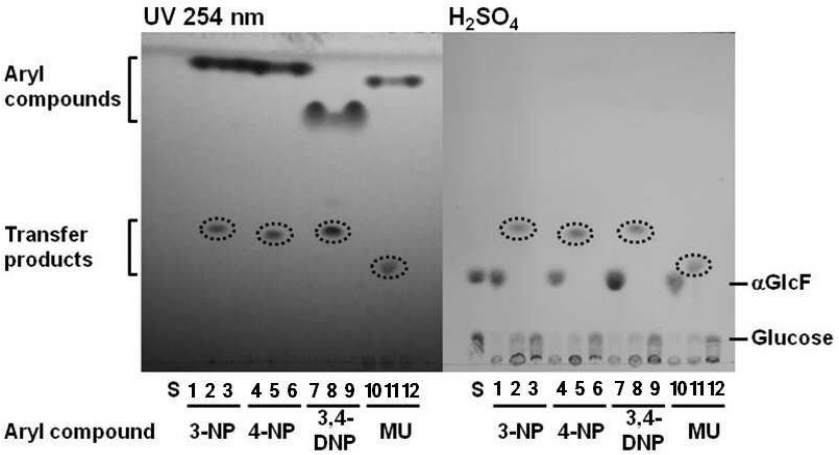


단, a-thioglycoligase는 YicI-D482A
Mal-D416A

도면2



도면3



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Alpha-Thioglycoligase-based Synthesis of O-Aryl alpha-Glycosides

<130> HPC-3701

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 771

<212> PRT

<213> E.coil

<400> 1

Met Lys Ile Ser Asp Gly Asn Trp Leu Ile Gln Pro Gly Leu Asn Leu
1 5 10 15

Ile His Pro Leu Gln Val Phe Glu Val Glu Gln Gln Asp Asn Glu Met
20 25 30

Val Val Tyr Ala Ala Pro Arg Asp Val Arg Glu Arg Thr Trp Gln Leu
35 40 45

Asp Thr Pro Leu Phe Thr Leu Arg Phe Phe Ser Pro Gln Glu Gly Ile
50 55 60

Val Gly Val Arg Ile Glu His Phe Gln Gly Ala Leu Asn Asn Gly Pro
65 70 75 80

His Tyr Pro Leu Asn Ile Leu Gln Asp Val Lys Val Thr Ile Glu Asn
85 90 95

Thr Glu Arg Tyr Ala Glu Phe Lys Ser Gly Asn Leu Ser Ala Arg Val
100 105 110

Ser Lys Gly Glu Phe Trp Ser Leu Asp Phe Leu Arg Asn Gly Glu Arg
115 120 125

Ile Thr Gly Ser Gln Val Lys Asn Asn Gly Tyr Val Gln Asp Thr Asn
130 135 140

Asn Gln Arg Asn Tyr Met Phe Glu Arg Leu Asp Leu Gly Val Gly Glu
145 150 155 160

Thr Val Tyr Gly Leu Gly Glu Arg Phe Thr Ala Leu Val Arg Asn Gly

165 170 175

Gln Thr Val Glu Thr Trp Asn Arg Asp Gly Gly Thr Ser Thr Glu Gln
180 185 190
Ala Tyr Lys Asn Ile Pro Phe Tyr Met Thr Asn Arg Gly Tyr Gly Val
195 200 205
Leu Val Asn His Pro Gln Cys Val Ser Phe Glu Val Gly Ser Glu Lys
210 215 220
Val Ser Lys Val Gln Phe Ser Val Glu Ser Glu Tyr Leu Glu Tyr Phe
225 230 235 240
Val Ile Asp Gly Pro Thr Pro Lys Ala Val Leu Asp Arg Tyr Thr Arg

245 250 255
Phe Thr Gly Arg Pro Ala Leu Pro Pro Ala Trp Ser Phe Gly Leu Trp
260 265 270
Leu Thr Thr Ser Phe Thr Thr Asn Tyr Asp Glu Ala Thr Val Asn Ser
275 280 285
Phe Ile Asp Gly Met Ala Glu Arg Asn Leu Pro Leu His Val Phe His
290 295 300
Phe Asp Cys Phe Trp Met Lys Ala Phe Gln Trp Cys Asp Phe Glu Trp
305 310 315 320

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

385 390 395 400
Lys Leu Lys Gly Leu Val Ala Met Gly Val Asp Cys Phe Lys Thr Asp
405 410 415

Phe Gly Glu Arg Ile Pro Thr Asp Val Gln Trp Phe Asp Gly Ser Asp
420 425 430
Pro Gln Lys Met His Asn His Tyr Ala Tyr Ile Tyr Asn Glu Leu Val
435 440 445
Trp Asn Val Leu Lys Asp Thr Val Gly Glu Glu Glu Ala Val Leu Phe
450 455 460

Ala Arg Ser Ala Ser Val Gly Ala Gln Lys Phe Pro Val His Trp Gly
465 470 475 480
Gly Ala Cys Tyr Ala Asn Tyr Glu Ser Met Ala Glu Ser Leu Arg Gly
485 490 495
Gly Leu Ser Ile Gly Leu Ser Gly Phe Gly Phe Trp Ser His Asp Ile
500 505 510
Gly Gly Phe Glu Asn Thr Ala Pro Ala His Val Tyr Lys Arg Trp Cys
515 520 525
Ala Phe Gly Leu Leu Ser Ser His Ser Arg Leu His Gly Ser Lys Ser

530 535 540
Tyr Arg Val Pro Trp Ala Tyr Asp Asp Glu Ser Cys Asp Val Val Arg
545 550 555 560
Phe Phe Thr Gln Leu Lys Cys Arg Met Met Pro Tyr Leu Tyr Arg Glu
565 570 575
Ala Ala Arg Ala Asn Ala Arg Gly Thr Pro Met Met Arg Ala Met Met
580 585 590
Met Glu Phe Pro Asp Asp Pro Ala Cys Asp Tyr Leu Asp Arg Gln Tyr
595 600 605

Met Leu Gly Asp Asn Val Met Val Ala Pro Val Phe Thr Glu Ala Gly
610 615 620
Asp Val Gln Phe Tyr Leu Pro Glu Gly Arg Trp Thr His Leu Trp His
625 630 635 640
Asn Asp Glu Leu Asp Gly Ser Arg Trp His Lys Gln Gln His Gly Phe
645 650 655
Leu Ser Leu Pro Val Tyr Val Arg Asp Asn Thr Leu Leu Ala Leu Gly
660 665 670

Asn Asn Asp Gln Arg Pro Asp Tyr Val Trp His Glu Gly Thr Ala Phe

675 680 685

His Leu Phe Asn Leu Gln Asp Gly His Glu Ala Val Cys Glu Val Pro

690 695 700

Ala Ala Asp Gly Ser Val Ile Phe Thr Leu Lys Ala Ala Arg Thr Gly

705 710 715 720

Asn Thr Ile Thr Val Thr Gly Ala Gly Glu Ala Lys Asn Trp Thr Leu

725 730 735

Cys Leu Arg Asn Val Val Lys Val Asn Gly Leu Gln Asp Gly Ser Gln

740 745 750

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

755 760 765

Thr Ile Thr

770

<210> 2

<211> 693

<212> PRT

<213> Sulfolobus solfataricus

<400> 2

Met Gln Thr Ile Lys Ile Tyr Glu Asn Lys Gly Val Tyr Lys Val Val

1 5 10 15

Ile Gly Glu Pro Phe Pro Pro Ile Glu Phe Pro Leu Glu Gln Lys Ile

20 25 30

Ser Ser Asn Lys Ser Leu Ser Glu Leu Gly Leu Thr Ile Val Gln Gln

35 40 45

Gly Asn Lys Val Ile Val Glu Lys Ser Leu Asp Leu Lys Glu His Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Val Met Tyr Asn Val Asp Ala Gly Ala Tyr Lys Lys Tyr Gln Asp

85 90 95

Pro Leu Tyr Val Ser Ile Pro Leu Phe Ile Ser Val Lys Asp Gly Val

100 105 110

Ala Thr Gly Tyr Phe Phe Asn Ser Ala Ser Lys Val Ile Phe Asp Val
115 120 125
Gly Leu Glu Glu Tyr Asp Lys Val Ile Val Thr Ile Pro Glu Asp Ser
130 135 140
Val Glu Phe Tyr Val Ile Glu Gly Pro Arg Ile Glu Asp Val Leu Glu
145 150 155 160
Lys Tyr Thr Glu Leu Thr Gly Lys Pro Phe Leu Pro Pro Met Trp Ala
165 170 175
Phe Gly Tyr Met Ile Ser Arg Tyr Ser Tyr Tyr Pro Gln Asp Lys Val

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

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

325 330 335
Leu Ser Ser Leu Pro Val Gln Phe Arg Asp Asp Arg Leu Val Thr Thr
340 345 350

Phe Pro Asp Asn Val Val His Tyr Leu Arg Gly Lys Arg Val Lys His
355 360 365
Glu Lys Val Arg Asn Ala Tyr Pro Leu Tyr Glu Ala Met Ala Thr Phe
370 375 380
Lys Gly Phe Arg Thr Ser His Arg Asn Glu Ile Phe Ile Leu Ser Arg
385 390 395 400

Ala Gly Tyr Ala Gly Ile Gln Arg Tyr Ala Phe Ile Trp Thr Gly Ala
405 410 415
Asn Thr Pro Ser Trp Asp Asp Leu Lys Leu Gln Leu Gln Leu Val Leu
420 425 430
Gly Leu Ser Ile Ser Gly Val Pro Phe Val Gly Cys Asp Ile Gly Gly
435 440 445
Phe Gln Gly Arg Asn Phe Ala Glu Ile Asp Asn Ser Met Asp Leu Leu
450 455 460
Val Lys Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Phe Phe Pro Phe Tyr Arg Ser His

465 470 475 480
Lys Ala Thr Asp Gly Ile Asp Thr Glu Pro Val Phe Leu Pro Asp Tyr
485 490 495
Tyr Lys Glu Lys Val Lys Glu Ile Val Glu Leu Arg Tyr Lys Phe Leu
500 505 510
Pro Tyr Ile Tyr Ser Leu Ala Leu Glu Ala Ser Glu Lys Gly His Pro
515 520 525
Val Ile Arg Pro Leu Phe Tyr Glu Phe Gln Asp Asp Asp Asp Met Tyr
530 535 540

Arg Ile Glu Asp Glu Tyr Met Val Gly Lys Tyr Leu Leu Tyr Ala Pro
545 550 555 560
Ile Val Ser Lys Glu Glu Ser Arg Leu Val Thr Leu Pro Arg Gly Lys
565 570 575
Trp Tyr Asn Tyr Trp Asn Gly Glu Ile Ile Asn Gly Lys Ser Val Val
580 585 590
Lys Ser Thr His Glu Leu Pro Ile Tyr Leu Arg Glu Gly Ser Ile Ile
595 600 605

Pro Leu Glu Gly Asp Glu Leu Ile Val Tyr Gly Glu Thr Ser Phe Lys

610 615 620

Arg Tyr Asp Asn Ala Glu Ile Thr Ser Ser Ser Asn Glu Ile Lys Phe

625 630 635 640

Ser Arg Glu Ile Tyr Val Ser Lys Leu Thr Ile Thr Ser Glu Lys Pro

645 650 655

Val Ser Lys Ile Ile Val Asp Asp Ser Lys Glu Ile Gln Val Glu Lys

660 665 670

Thr Met Gln Asn Thr Tyr Val Ala Lys Ile Asn Gln Lys Ile Arg Gly

675 680 685

Lys Ile Asn Leu Glu

690