



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0024656
(43) 공개일자 2009년03월09일

(51) Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0087500

(22) 출원일자 2008년09월04일

심사청구일자 2008년09월04일

(30) 우선권주장

60/969,941 2007년09월04일 미국(US)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

고영규

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교
생명과학대학

이재성

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교
생명과학대학

이창석

서울특별시 성북구 안암동5가 1번지 고려대학교
생명과학대학

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 32 항

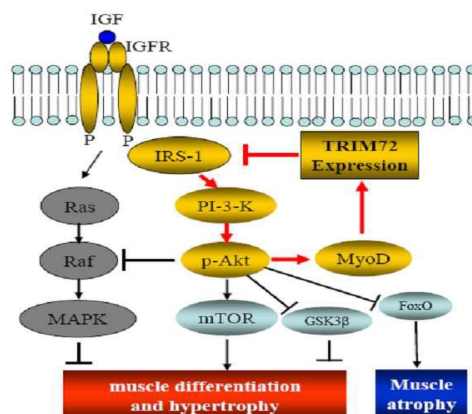
(54) 근육 및 심장 강화제의 타겟으로서 TRIM72의 용도

(57) 요약

본 발명은 근육강화제와 심장강화제의 타겟으로서 TRIM72의 새로운 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 포함하는 근육 또는 심장강화용 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 근육 분화와 비대를 촉진하는 활성을 갖는 새로운 TRIM 돌연변이 단백질 또는 그 유전자에 관한 것이다.

본 발명자들은 TRIM72의 과발현이 근육형성을 억제시키고 TRIM72의 발현억제가 근육형성을 촉진시킨다는 것을 확인함으로써, TRIM72가 골격근 분화의 음성적 조절자임을 처음으로 밝혀냈다. 따라서 TRIM72의 기능을 억제하면 골격근과 심장근에서만 작용하여 다른 조직의 IGF-I 신호전달경로에는 영향을 미치지 않기 때문에 암과 같은 부작용이 없을 것이다. 즉 TRIM72를 타겟으로 하는 약제 또는 유전자 치료는 골격근의 분화 및 비대를 촉진시켜 지방조직의 에너지를 소모시켜 비만과 제 2형 당뇨병을 부작용 없이 치료할 수 있을 뿐만 아니라 심장근의 생리적 비대를 촉진시켜 튼튼한 심장을 유도할 수 있을 것이다.

대표도 - 도15



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2007-02209

부처명

연구사업명 신약타겟디스커버리사업

연구과제명 CEMI와 IRS-1의 결합을 저해하는 근육강화제 개발

주관기관

연구기간 2006년 05월 - 2009년 04월

특허청구의 범위

청구항 1

TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 근육 또는 심장강화용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 TRIM72 유전자의 전사 또는 번역을 하향조절 하거나 TRIM72 단백질의 작용을 억제하는 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질의 발현 억제제는 TRIM72 유전자의 mRNA와 상보적인 염기서열을 갖는 TRIM72 siRNA(short interfering RNA) 또는 이를 전사하는 유전자인 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 TRIM72 siRNA는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질의 작용 억제제는 상기 TRIM72와 IRS-1 또는 M-Cadherin의 상호작용을 저해하는 물질인 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 IGF-1에 의한 PI3K/AKT 활성화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 IRS-1의 티로신 인산화를 증가시켜 IRS-1과 PI3K의 상호작용을 향상시키는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 상기 TRIM 72에 의한 IRS-1 또는 M-Cadherin의 유비퀴티네이션을 저해하는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 근육 또는 심장강화제의 스크리닝 방법:

(a) TRIM72 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및

(b) 상기 동물세포에서 약제를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 TRIM72 단백질을 발현이 감소되는지 여부를 결정하는 단계.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 근육 또는 심장강화제의 스크리닝 방법:

(a) TRIM72 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및

(b) 상기 동물세포에서 TRIM72과 IRS-1 또는 M-Cadherin의 상호작용이 저해되는지 여부를 결정하는 단계.

청구항 12

서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 갖는 TRIM72 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 근육분화 억제용 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 유전자는 동물세포 발현벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 동물세포 발현벡터는 아데노바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물.

청구항 15

제 12항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질은 IGF-1에 의한 PI3K/AKT 활성화를 억제시키는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물.

청구항 16

제 12항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질은 IRS-1에 결합하여 IRS-1의 티로신 인산화를 감소시켜 IRS-1과 PI3K의 상호작용을 억제하는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물.

청구항 17

제 12항에 있어서, 상기 TRIM72 단백질은 IRS-1 또는 M-Cadherin과 상호작용을 통하여 그들의 유비퀴티네이션을 촉진하는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물.

청구항 18

서열번호 3의 염기서열을 갖는 TRIM72 유전자에 대한 siRNA(short interfering RNA) 분자.

청구항 19

서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열중에서 RING 도메인을 결실된 것을 특징으로 하는 TRIM72 돌연변이 단백질 (Δ RING TRIM72).

청구항 20

제 19항에 있어서, 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 TRIM72 돌연변이 단백질.

청구항 21

제 19항의 TRIM72 돌연변이 단백질 (Δ RING TRIM72)을 코딩하는 염기서열을 갖는 TRIM72 돌연변이 유전자.

청구항 22

서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열중에서 14번째 아미노산인 시스틴이 알라닌으로 치환된 것을 특징으로 하는 TRIM72 돌연변이 단백질 (DN-TRIM72).

청구항 23

제 22항의 RIM72 돌연변이 단백질 (DN-TRIM72)을 코딩하는 염기서열을 갖는 TRIM72 돌연변이 유전자.

청구항 24

제 19항 내지 제 23항중 어느 한항에 따른 TRIM72 돌연변이 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 근육 또는 심장강화용 조성물.

청구항 25

제 24항에 있어서, 상기 유전자는 동물세포 발현백터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물.

청구항 26

제 25항에 있어서, 상기 동물세포 발현백터는 아데노바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장 강화용 조성물.

청구항 27

제 21항 또는 제 23항에 따른 TRIM72 돌연변이 유전자를 포함하는 동물세포 발현백터.

청구항 28

제 27항에 있어서, 상기 동물세포 발현백터는 아데노바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 동물세포 발현백터.

청구항 29

제 28항에 따른 아데노바이러스 벡터를 293T 세포에서 패키징시킨 바이러스 클론.

청구항 30

제 29항에 따른 동물세포 발현백터로 형질전환된 동물세포.

청구항 31

서열번호 6 내지 8 중 어느 하나의 염기서열중에서 E2 또는 E3 box가 상실되거나 돌연변이된 것을 특징으로 하는 TRIM72 프로모터.

청구항 32

제 31항에 있어서, 서열번호 9 또는 10의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 TRIM72 프로모터.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 근육강화제와 심장강화제의 타겟으로서 TRIM72의 새로운 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 포함하는 근육 또는 심장강화용 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 근육분화와 비대를 촉진하는 활성을 갖는 새로운 TRIM 돌연변이 단백질 또는 그 유전자에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 세포분화와 조직형성의 분자적 기작에 대한 지식이 매우 빠르게 축적되고 있음에도 불구하고 조직의 크기가 어떻게 조절되는 지에 대해서는 명확하지 않다. 캘론(chalone, 생리활동을 억제하는 내분비물질)이라고 하는 음성적 성장 조절자에 의해서 조직의 크기가 조절된다는 가설을 Bullough가 40년 전에 제안한 바가 있다(Bullough WS., Cancer Res., 25, 1683, 1965). 이 가설에 의하면 어느 정도 크기에 도달한 조직은 캘론을 분비하여 자신의 조직이 더 이상 자라지 않도록 한다. 지난 40 여 년 동안 광범위한 연구에도 불구하고 캘론을 발견하지 못하여 이 가설은 폐기된 듯 보였으나 최근에 골격근에서 마이오스타틴(myostatin)이라는 캘론을 발견하게 되었다.
- <3> 전환성장인자군(transforming growth factor- β superfamily)중 하나인 마이오스타틴(myo는 근육을 의미, statin을 멈춤을 의미)은 골격근에서 발현되는데, 마이오스타틴 결핍 생쥐에서 골격근의 양이 현저하게 증가되었다(Mcpherron AC. *et al.*, Nature, 387, 83, 1997). 정상적인 소에 비해서 근육이 현저히 발달한 Belgian blue와 Piedmontese 소는 물론(Mcpherron AC., *et al.*, PNAS, 94, 12457, 1997), 근육발달이 현저한 어린아이에서도 마이오스타틴 돌연변이가 발견되었다(Schuelke, M., *et al.*, New Eng. J. Med., 350, 2682, 2004). 이

러한 발견은 마이오스타틴이 실제로 근육의 크기를 조절하는 켈론이라는 것을 증명하는 것이다. 마이오스타틴^{-/-} 생쥐에서 근육량은 증가하지만 지방축적은 상당히 감소한다. 따라서 비만쥐(*ob/ob*) 생쥐와 마이오스타틴^{-/-} 생쥐를 교배하였을 때, 생쥐의 몸무게는 정상으로 회복될 뿐만 아니라 지방축적의 감소와 정상적인 혈당량을 보여 주었다(Mcpherrin AC., and Lee, SJ., J. Clin. Invest., 109, 595, 2002). 이는 마이오스타틴의 양을 감소시키거나 그 활성을 저해하면 비만과 제 2형 당뇨병을 치료할 수 있음을 보여주는 것이다. 이외에도 디스트로핀(dystrophin)결핍에 의하여 발병한 근육위축증 생쥐에 마이오스타틴 항체로 마이오스타틴을 중화시키면 근육직경, 근육길이가 정상 생쥐와 같아짐을 보여주었다(Bongdanovich S., Nature, 420, 416, 2002). 이는 마이오스타틴 항체를 근육위축증 환자에 적용할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 실제로 미국 와이어스사는 마이오스타틴을 임상적으로 적용하는 시도를 하고 있다. 그러나 마이오스타틴 결핍 생쥐와 마이오스타틴 돌연변이 가축들은 생식능력을 상실하기 때문에(Animal Genetics, 36, 1, 2004; J. Gene Med., 8, 1171, 2006) 마이오스타틴을 타겟으로 하는 약제는 심각한 부작용을 가질 수 있다.

<4> 마이오스타틴은 근육크기를 음성적으로 조절하지만 인슐린유사성장인자(insulin-like growth factor, IGF-I)는 양성적으로 근육크기를 조절한다. 예를 들면 근육 특이 프로모터를 이용하여 근육에서만 IGF-I을 과발현시킨 생쥐는 정상생쥐에 비해서 근육량이 두 배로 증가하였기 때문에(Masaro, A. *et al.*, Nature Genet., 28, 195, 2001) IGF-I을 근육강화제로 사용하려는 의학적 시도가 있었다. 그러나 이 시도는 아주 중대한 장애물을 가지고 있었다. 예를 들면 IGF 수용체는 거의 모든 세포들에서 발현되기 때문에 IGF-I의 체내주입은 근육 이외에도 다른 조직에 심각한 영향을 미칠 것이다. 게다가 IGF-I은 세포의 분열과 생존을 촉진시켜서 원하지 않는 조직의 과다증식을 일으킨다. 따라서 IGF-I이 선택적으로 근육에서만 발현되도록 하거나(유전자 치료를 통해서) IGF-I 신호전달이 근육에서만 선택적으로 일어나도록 유도하여야 할 것이다.

<5> 도 1은 IGF-I의 신호전달을 요약하여 보여주고 있다. IGF-I에 의하여 활성화되는 IRS-1 → PI3K → AKT-1 → mTOR → p70^{S6K}를 통한 신호전달 경로를 생쥐에서 차단하면(각각의 유전자가 결핍된 생쥐를 이용하여) 생쥐의 몸체가 작아질 뿐만 아니라 근육량이 급격하게 감소한다. 또한 PTEN과 SHIP₂가 결핍된 생쥐는 Ptd Ins(3,4,5)P₃의 양을 증가시켜 PI3K/AKT1의 과활성을 유발하여 근육량을 증가시킨다(Glass, DJ., Nat Cell Biol., 5, 87, 2003). 이러한 결과들은 근육강화제를 개발하기 위하여 PI3K, AKT-1, mTOR, p70^{S6K}, GSK3β 등이 좋은 타겟 단백질임을 보여준다. 그러나 이러한 단백질들은 근육이외의 다른 조직에서도 작용하기 때문에 이러한 단백질을 활성화시키거나(PI3K, AKT-1, mTOR, p70^{S6K}, GSK3β의 경우) 억제시키면(PTEN과 SHIP₂의 경우) 암과 같은 부작용이 일어날 수 있다. 따라서 이러한 단백질들은 근육강화제를 개발하기 위한 좋은 타겟이 아니다.

<6> 본 발명자들은 C2C12 근육모세포(myoblasts)와 근육대롱세포(myotubes)로부터 지질래프트를 분리한 후 비교 단백질체학으로 아직까지 그 기능이 전혀 알려지지 않은 TRIM72을 동정하였다. TRIM72는 유비퀴틴 E3 연결효소(ubiquitin E3 ligase) 활성화에 필요한 TRIM/RBCC 영역을 가지고 있다. TRIM72는 골격근과 심장근의 지질래프트에서 특이적으로 발현되었고 근육분화시 그 양이 증가하였다. TRIM72의 과발현은 근육형성을 억제시키고 TRIM72의 발현억제는 근육형성을 촉진시켰는데, 이는 TRIM72가 골격근 분화의 음성적 조절자임을 암시하는 것이다. TRIM72는 IRS-1과 상호작용을 통하여 IGF-I에 의한 IRS-1의 활성을 억제함으로써 IGF-I/IGFR/IRS-1 신호전달 경로를 조절하고 있었다. 따라서 TRIM72의 기능을 억제하면 골격근과 심장근에서만 작용하여 다른 조직의 IGF-I 신호전달경로에는 영향을 미치지 않기 때문에 암과 같은 부작용이 없을 것이다. 즉 TRIM72를 타겟으로 하는 약제 또는 유전자 치료는 골격근의 분화 및 비대를 촉진시켜 지방조직의 에너지를 소모시켜 비만과 제 2형 당뇨병을 부작용 없이 치료할 수 있을 뿐만 아니라 심장근의 생리적 비대를 촉진시켜 튼튼한 심장을 유도할 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 근육 및 심장 강화제의 타겟으로서 TRIM72의 새로운 용도를 제공하는 데 있다.
- <8> 본 발명의 다른 목적은 상기 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 포함하는 근육 또는 심장강화용 조성물을 제공하는 데 있다.
- <9> 본 발명의 다른 목적은 근육분화와 비대를 촉진하는 활성을 갖는 새로운 TRIM 돌연변이 단백질 또는 그 유전자

를 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

- <10> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제를 유효성분으로 포함하는 근육 또는 심장강화용 조성물을 제공한다. 본 발명에서는 TRIM72가 근육분화의 음성적 조절자임을 밝힘으로써 상기 TRIM72의 발현이나 작용을 억제하면 근육분화 및 비대를 촉진하여 근육 또는 심장을 강화할 수 있음을 처음으로 제시하였다.
- <11> 상기 TRIM72는 tripartite motif-containing 72의 약자로서 도 3C에서 보여지듯이 RINC 영역, B 박스, Coiled-coil 영역 및 SPRY 영역을 가지고 있다. 마우스 TRIM72 유전자의 염기서열 및 단백질의 아미노산 서열은 NCBI의 수탁번호 NM_001079932에서 얻을 수 있으며, 상기 마우스의 TRIM72 단백질의 아미노산 서열을 서열번호 1로 나타내었다. 인간 TRIM72 유전자의 염기서열 및 단백질의 아미노산 서열은 NCBI의 수탁번호 NM_001008274에서 얻을 수 있으며, 상기 인간 TRIM72 단백질의 아미노산 서열을 서열번호 2로 나타내었다. 상기 마우스와 인간 TRIM72의 아미노산 서열은 90%의 상동성(identities)를 가지고 있으므로 동일한 기능을 가질 것으로 추측되나, 아직까지 그 기능이 밝혀지지 않았다.
- <12> 본 발명에 있어서, 상기 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 기존에 단백질의 발현이나 작용을 억제하기 위해 알려진 어떤 물질이나 방법도 사용될 수 있으나, 바람직하게는 TRIM72 유전자의 전사 또는 번역을 하향조절하거나, TRIM72 단백질의 작용을 억제하는 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물을 제공한다. 여기서 TRIM72 유전자의 전사 또는 번역을 하향조절한다는 것은 TRIM72 유전자의 프로모터에 결합하여 전사를 하향조절하거나, 전사후 mRNA를 분해하거나, 번역을 저해하는 등의 모든 하향 조절을 포함한다. 또한, TRIM72 단백질의 작용을 억제한다는 것은 상기 단백질의 활성을 억제하거나, 상기 단백질과 상호작용하는 단백질의 결합 부위에 경쟁적으로 결합하여 작용을 방해하는 것 등을 포함한다.
- <13> 상기 TRIM72 단백질의 발현 억제제의 예로는 TRIM72 유전자의 RNA 간섭(RNA interference)을 이용한 siRNA (short interfering RNA) 또는 shRNA (short hairpin RNA)를 들 수 있다. RNA 간섭(이하 "RNAi"로 약칭함)은 많은 진핵생물에서 보존된 전사후 유전자 조절의 한 방법이다. RNAi는 세포에 존재하는 짧은 이중나선 RNA("dsRNA") 분자에 의해서 유도된다 (Fire A 등 (1998), Nature 391: 806-811). "siRNA"라고도 불리우는 이러한 짧은 dsRNA 분자는 단일가닥으로 분리된 후 "RNA-유도 침묵 복합체(RNA induced silencing, RISC)"에 결합하여 표적화된 mRNA를 절단하거나 번역을 저해한다 (Elbashir SM 등 (2001), Genes Dev, 15: 188-200).
- <14> 그러므로, 본 발명은 TRIM72 유전자의 mRNA를 표적화하는 약 17개의 뉴클레오티드 내지 약 25개의 뉴클레오티드로 이루어진 짧은 이중쇄 RNA를 포함하는 분리된 siRNA를 제공한다. 상기 siRNA는 센스 RNA 가닥과 상보적인 안티센스 RNA 가닥을 포함하고, 이들 두 가닥은 표준 왓슨-크릭 염기쌍 상호작용에 의해서 서로 결합(annealing)한다(이하 "염기쌍을 형성한(base-paired)"으로 표현함). 상기 센스가닥은 표적 mRNA 내의 표적서열에 동일한 핵산서열을 포함한다. siRNA의 표적서열을 선택할 수 있는 기술은 예를 들면 문헌 (Tuschl T 등, "The siRNA User Guide" revised Oct. 11, 2002)에 기술되어 있다. 본 발명의 siRNA를 제조하는데 사용된 TRIM72 표적 서열은 5'-AAGCACGCCUCAAGACACAG-3'이다.
- <15> 본 발명의 siRNA의 센스 및 안티센스 가닥은 두개의 상보적이고 단일쇄(single-stranded)의 RNA 분자를 포함하거나, 두 개의 상보적 부분이 염기쌍을 형성하고 단일쇄의 "머리핀(hairpin)" 영역에 의해서 공유결합된 단일 분자를 포함할 수 있다. 상기 후자의 경우를 shRNA(short hairpin RNA)라고 부르며, 상기 shRNA는 single strand로 약 50-70 nucleotide 길이이며, in vivo상에서 stem-loop 구조를 이루고 있다. 5-10 nucleotide의 loop 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29 nucleotide의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 stem을 형성한다. shRNA는 일반적으로 in vivo상에서 Pol III promoter로부터 상보적인 DNA sequence의 전사에 의해 합성된다. Pol-III로 유도된 전사는 well-defined start site에서 시작되어 4개 이상의 thymidine으로 이루고 있는 선상(-TTTT-)의 second residue에서 종결되어 non-poly(A) transcript 생성한다. Pol III promoter는 모든 세포에서 활성화되며 shRNA의 발현이 가능하다. 전사 후 shRNA는 Dicer에 의해 loop가 절단되고 siRNA처럼 RISC와 작용하게 된다 (참조, Tuschl, T. (2002), Cell 110(5): 563 - 74).
- <16> 본 발명의 siRNA는 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 알려진 많은 기술을 이용하여 획득될 수 있다. 예를 들면, siRNA는 본 발명이 속하는 분야에서 알려진 방법을 이용하여 화학적으로 합성되거나 재조합 방법에 의해서 생산될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 siRNA는 적절히 보호된 리보뉴클레오시드 포스포라미드트(ribonucleoside phosphoramidites)와 종래의 DNA/RNA 합성기를 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다.

siRNA는 상보적이고 분리된 두개의 RNA 분자 또는 두개의 상보적인 영역을 가지는 하나의 RNA 분자로서 합성될 수 있다. 다른 방법으로서, siRNA는 또한 적절한 프로모터를 이용하여 재조합 DNA 플라스미드로부터 발현될 수 있다. 플라스미드로부터 본 발명의 siRNA를 발현시키는 데 적절한 프로모터는 예를 들면 U6 또는 H1 RNA pol III 프로모터 서열 및 거대세포바이러스 프로모터를 포함한다. 또한, 본 발명의 재조합 플라스미드는 특정 조직 또는 특정 세포내 환경에서 siRNA를 발현시키기 위해서 유도성 또는 조절가능한 프로모터를 포함할 수 있다.

- <17> 본 발명의 siRNA는 재조합 플라스미드로부터 상보적이고 분리된 두 개의 RNA 분자 또는 두개의 상보적인 영역을 가지는 하나의 RNA 분자로서 발현될 수 있다. 본 발명의 siRNA를 발현시키는 데 적절한 플라스미드의 선택, siRNA를 발현시키기 위한 핵산서열을 플라스미드 내로 삽입하는 방법, 및 재조합 플라스미드를 목적하는 세포로 전달하는 방법은 본 발명이 속하는 분야의 기술 범위 내에 있다. 예를 들면, 문헌 [Tuschl, T. (2002), Nat. Biotechnol, 20: 446-448]; [Brummelkamp TR 등 (2002), Science 296: 550- 553]; [Miyagishi M 등 (2002), Nat. Biotechnol . 20: 497-500]; [Paddison PJ 등 (2002), Genes Dev . 16: 948-958; Lee NS 등 (2002), Nat. Biotechnol . 20: 500-505]; 및 [Paul CP 등 (2002), Nat. Biotechnol . 20: 505-508]을 참고하면 되고, 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 기재되어 있다.
- <18> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 TRIM72 단백질의 발현 억제제는 TMRIM72 유전자의 mRNA와 상보적인 염기 서열, 더욱 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 TRIM72 siRNA(short interfering RNA) 또는 이를 전사하는 유전자인 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물을 제공한다.
- <19> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 TRIM72 단백질의 작용 억제제는 상기 TRIM72와 IRS-1 또는 M-Cadherin의 상호작용을 저해하는 물질인 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물을 제공한다. 본 명세서에서 TRIM72의 coiled-coil 영역이 IRS-1의 가운데와 뒷부분에 결합한다는 것을 밝혀냈으므로(도 9참조) 상기 결합부위와 특이적으로 결합하여 상기 상호작용을 경쟁적으로 저해할 수 있는 펩타이드를 디자인할 수 있다. 또한, 상기 상호작용을 저해하는 물질의 예로서 TRIM72에 대한 폴리클로날 또는 모노클로날 항체를 들 수 있다.
- <20> 폴리클로날 항체는 당업자에 알려진 종래방법에 따라 면역원인 TRIM72 단백질 또는 그 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조될 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 래트, 양, 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈액을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리정제한다.
- <21> 모노클로날 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술(Koeher and Milstein (1975) Nature, 256:495))에 의해 제조될 수 있다. 그 제조방법을 간단히 설명하면 다음과 같다. 먼저 순수한 TRIM72 단백질을 20 μ g을 얻어서 Balb/C 쥐에 면역화를 시키거나 펩타이드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 쥐에 면역화 시킨다. 그 후에 쥐에서 분리된 항원-생산 임파구를 인간 또는 마우스의 미엘로마와 융합하여 불멸화된 하이브리도마를 생성하며, 엘라이저(ELISA)방법을 사용하여 원하는 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포만을 선택하여 증식한 후 배양물로부터 모노클로날 항체를 분리 정제한다.
- <22> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 IGF-1에 의한 PI3K/AKT 활성화를 증가시키는 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물을 제공한다. 상기 억제제의 기능은 후술하는 결과 4에서 입증하였다.
- <23> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 IRS-1의 티로신 인산화를 증가시켜 IRS-1과 PI3K의 상호작용을 향상시키는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물을 제공한다. 상기 억제제의 기능은 후술하는 결과 5에서 입증하였다.
- <24> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 TRIM72 단백질의 발현 또는 작용 억제제는 상기 TRIM 72에 의한 IRS-1 또는 M-Cadherin의 유비퀴티네이션을 저해하는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물을 제공한다. 상기 억제제의 기능은 후술하는 결과 7, 8에서 입증하였다.
- <25> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 근육 또는 심장강화제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) TRIM72 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및 (b) 상기 동물세포에서 약제를 처리하지 않은 대조군과 비교하여 TRIM72 단백질을 발현이 감소되는지 여부를 결정하는 단계. 상기 (a) 단계에서, 상기 동물세포는 의도적으로 TRIM72를 과발현하는 플라스미드로 트랜스펙션시킬 수도 있다. 상기 (b) 단계에서, 발현 감소여부는 RT-PCR를 통해 RNA 레벨에서, 웨스턴 브로팅 등을 통해 단백질 레벨에서 측정할 수 있다.

- <26> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 근육 또는 심장강화제의 스크리닝 방법을 제공한다: (a) TRIM72 단백질을 발현하는 동물세포에 임의의 약제를 처리하는 단계; 및 (b) 상기 동물세포에서 TRIM72과 IRS-1 또는 M-Cadherin의 상호작용이 저해되는지 여부를 결정하는 단계. 상기 (a) 단계에서, 상기 동물세포는 의도적으로 TRIM72를 과발현하는 플라스미드로 트랜스펙션 시킬 수도 있다. 상기 (b) 단계에서, 상호작용 저해 여부는 면역침전법(immunoprecipitation), GST pull-down 어세이 등을 통해 측정할 수 있다.
- <27> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열을 갖는 TRIM72 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 근육분화 억제용 조성물을 제공한다. 본 발명에서는 TRIM72가 근육분화의 음성적 조절자임을 밝힘으로써 상기 TRIM72가 근육 분화를 조절하는 IGF-1 신호전달을 차단하여 근육분화를 억제할 수 있음을 처음으로 제시하였다.
- <28> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 유전자는 동물세포 발현벡터, 더욱 바람직하게는 아데노바이러스 벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물을 제공한다. 본 발명의 실시예에서는 플라스미드 벡터의 예로서 pCMV-Flag, pHM6-HA 벡터와 아데노바이러스 벡터의 예로서 pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen)를 사용하였다.
- <29> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 TRIM72 단백질은 IGF-1에 의한 PI3K/AKT 활성화를 억제시키는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물을 제공한다. 상기 TRIM72 단백질의 기능은 후술하는 결과 4에서 입증하였다.
- <30> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 TRIM72 단백질은 IRS-1에 결합하여 IRS-1의 티로신 인산화를 감소시켜 IRS-1과 PI3K의 상호작용을 억제하는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물을 제공한다. 상기 TRIM72 단백질의 기능은 후술하는 결과 5에서 입증하였다.
- <31> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 TRIM72 단백질은 IRS-1 또는 M-Cadherin과 상호작용을 통하여 그들의 유비퀴티네이션을 촉진하는 것을 특징으로 하는 근육분화 억제용 조성물을 제공한다. 상기 TRIM72 단백질의 기능은 후술하는 결과 7, 8에서 입증하였다.
- <32> 제 12항에 있어서, .
- <33> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 갖는 TRIM72 유전자에 대한 siRNA(short interfering RNA) 분자를 제공한다. 상기 siRNA는 TRIM72 mRNA의 5'-AAGCACGCCUCAAGACACAG-3'을 표적으로 하며, 이에 대한 상보적인 서열을 갖는다.
- <34> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열중에서 RING 도메인을 결실된 것을 특징으로 하는 TRIM72 돌연변이 단백질 (Δ RING TRIM72)을 제공한다. 상기 서열번호 1은 마우스 TRIM72의 아미노산 서열로서 이중 RING 도메인 (1 번째 - 60번째 아미노산)의 일부 또는 전부가 결실되어 있으며, 상기 서열번호 2는 인간 TRIM72의 아미노산 서열로서 이중 RING 도메인 (1 번째 - 60번째 아미노산)의 일부 또는 전부가 결실되어 있는 것을 특징으로 한다.
- <35> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 서열번호 4 또는 5의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 TRIM72 돌연변이 단백질을 제공한다. 서열번호 4는 마우스 Δ RING TRIM72의 아미노산 서열이고, 서열번호 5는 인간 Δ RING TRIM72의 아미노산 서열을 나타낸다.
- <36> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 TRIM72 돌연변이 단백질 (Δ RING TRIM72)을 코딩하는 염기서열을 갖는 TRIM72 돌연변이 유전자를 제공한다. 상기 염기서열은 NCBI의 마우스 또는 인간 TRIM 72 유전자의 염기서열에서 상기 RING 도메인 코딩 서열만을 삭제함으로써 쉽게 디자인할 수 있다.
- <37> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 또는 2의 아미노산 서열중에서 14번째 아미노산인 시스틴이 알라닌으로 치환된 것을 특징으로 하는 TRIM72 돌연변이 단백질 (DN-TRIM72)를 제공한다.
- <38> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 RIM72 돌연변이 단백질 (DN-TRIM72)을 코딩하는 염기서열을 갖는 TRIM72 돌연변이 유전자를 제공한다. 상기 염기서열은 NCBI의 마우스 또는 인간 TRIM 72 유전자의 염기서열에서 14번째 코돈을 시스틴 코돈에서 알라닌 코돈으로 치환함으로써 쉽게 디자인할 수 있다.
- <39> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 TRIM72 돌연변이 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 포함하는 근육 또는 심장강화용 조성물을 제공한다. 본 발명에서는 TRIM72 돌연변이가 TRIM72의 우성음성형태(dominant negative form)임을 밝힘으로써 상기 TRIM72 돌연변이가 근육 분화 및 비대를 촉진하여 근육 또는 심장을 강화할 수 있음을 처음으로 제시하였다.

- <40> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 유전자는 동물세포 발현벡터, 더욱 바람직하게는 아데노바이러스 벡터에 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 근육 또는 심장강화용 조성물을 제공한다. 본 발명의 실시예에서는 플라스미드 벡터의 예로서 pCMV-Flag, pHM6-HA 벡터와 아데노바이러스 벡터의 예로서 pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen)를 사용하였다.
- <41> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 TRIM72 돌연변이 유전자를 포함하는 동물세포 발현벡터를 제공한다.
- <42> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 상기 동물세포 발현벡터는 아데노바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 동물세포 발현벡터를 제공한다.
- <43> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 TRIM72 돌연변이 유전자를 포함하는 아데노바이러스 벡터를 293T 세포에서 패키징시킨 바이러스 클론을 제공한다.
- <44> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 TRIM72 돌연변이 유전자를 포함하는 동물세포 발현벡터로 형질전환된 동물세포를 제공한다.
- <45> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 6 내지 8중 어느 하나의 염기서열중에서 E2 또는 E3 box가 상실되거나 돌연변이된 것을 특징으로 하는 TRIM72 프로모터를 제공한다. 상기 서열번호 6 내지 8의 염기서열은 ATG 시작 코돈으로부터 1269 bp, 1144 bp 및 883 bp upstream 영역을 포함하는 TRIM72 프로모터이다. 본 발명의 돌연변이 TRIM72 프로모터는 상기 TRIM72 프로모터에서 시작코돈으로부터 557-562번째 upstream 영역인 E2 box 또는 시작코돈으로부터 580-585번째 upstream 영역인 E3 box가 상실되거나 돌연변이된 것을 특징으로 한다.
- <46> 본 발명에 있어서, 바람직하게는 서열번호 9 또는 10의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 TRIM72 프로모터를 제공한다. 상기 서열번호 9는 E2 box가 돌연변이된 883 bp TRIM72 프로모터이고, 서열번호 10은 E3 box가 돌연변이된 883bp TRIM72 프로모터이다.
- <47> 본 발명자들이 제안한 TRIM72는 근육의 발달을 음성적으로 조절하는 인자이므로 가축에서 TRIM72유전자를 적중(knockout)시키면 음성조절이 풀리면서 근육량이 많은 가축을 생산할 수 있을 것이다. 또한 TRIM72의 기능이 없는 돌연변이체인 Δ RING TRIM72나 C14A TRIM72를 과발현시키는 transgenic 가축을 유도한다면 역시 근육량이 증가한 가축을 얻을 수 있을 것이다.
- <48> 본 발명의 약제학적 조성물은 생리학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있으며, 경구 투여시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.
- <49> 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릴시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 이외의 본 발명 약제학적 조성물은 각종 제형의 형태로 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다.
- <50> 본 발명의 약제학적 조성물은 경구적으로 또는 정맥내, 피하, 비강내 또는 복강내 등에 비경구적으로 사람과 동물에게 투여된다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육내 주사 및 정맥주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다.
- <51> 본 발명의 약제학적 조성물에 함유되는 TRIM72 유전자, 단백질 또는 그 저해제의 유효 투여량의 범위는 성별, 중증도, 연령, 투여방법, 표적 세포, 발현 수준 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 하나의 예시로서, 약 0.01ug 내지 약 100ug/kg의 범위일 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <52> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<53> 실시예 1: 세포배양, 동물과 항체

- <54> C2C12 세포를 ATCC에서 구입하였고 2% penicillin/streptomycin (WelGene)과 10% fetal bovine serum (WelGene)가 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. Confluent C2C12 myoblasts를 상기 항생제와 2% 말 혈청이 보충된 DMEM 배지에서 배양하여 근섬유

(microtubes)로 분화시켰다. 48시간 경과 시 마다 근섬유에 2%의 말 혈청을 포함하는 신선한 DMEM을 공급하였다. 수컷 C57BL/Ksj 생쥐를 12시간의 암기를 갖는 조절된 광학 스케줄로 유지하였다. 본 연구의 모든 실험에서 20주령의 생쥐를 사용하였다.

<55> 항-TRIM72 토끼 폴리클로날(polyclonal) 항체와 항-TRIM72 생쥐 모노클로날(monoclonal) 항체를 AbFrontier (Korea)과 실험실 메뉴얼에 따라 각각 생산하였다. Anti-IRS-1 (Upstate and BD Transduction Laboratories), IGF-IRb (Santa Cruz), PI(3)K p85 (Upstate), Myc (Santa Cruz), Flag (Sigma and Santa Cruz), HA (Santa Cruz) 와 His (Amersham Biosciences) 항체를 면역침전반응(immunoprecipitation)에 사용하였다. Anti-myogenin (BD Transduction Laboratories), MyoD (BD Transduction Laboratories and Santa Cruz), caveolin-3 (Santa Cruz), myosin heavy chain (Sigma and Developmental Studies Hybridoma Bank), myostatin (R&D systems), Myf5 (Santa Cruz), Akt (Upstate), pAkt (S473, Cell Signaling Technology), MAPK (Santa Cruz), pMAPK (Santa Cruz), phosphotyrosine (BD Transduction Laboratories), ubiquitin (Santa Cruz) 과 b-actin (Sigma) 항체를 면역블롯팅(immunoblottings)에 사용하였다.

<56> 실시예 2: 세제(detergent)-내성 리프트 래프트(Lipid Raft)의 이차원 전기영동

<57> 4개의 150mm C2C12 myoblasts dish와 4개의 150 mm myotubes dish를 1 ml의 lysis buffer (25 mM HEPES pH 6.5, 1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 및 protease cocktail)에 혼합하고, tight Dounce homogenizer (Kontes) 에서 20번 균질화한 후 4℃에서 30분간 인큐베이트하였다. 추출물을 1 ml의 2.5 M sucrose 용액과 섞고 SW41 centrifuge tube로 옮긴 후 25 mM HEPES pH 6.5, 및 150 mM NaCl를 함유하는 4ml 의 5% sucrose 용액과 6 ml의 30% sucrose 용액을 첨가하였다. 이 불연속 sucrose 농도 구배를 4℃에서 39,000 rpm으로 18시간 동안 원심분리 하였다. 상기 농도 구배는 바닥부터 꼭대기까지 12개 분획들로 분획화되었다. 리 피드 래프트(lipid raft) 분획을 washing buffer (25 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl)로 초원심분리 (20,000 rpm, 30 min, 4℃)에 의해 세척하고, 100 ml의 resuspension buffer (9 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, protease cocktail 및 1 mM EDTA)로 현탁시켰다. 2-DE, in-gel protein digestion 과 electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS)는 전술한 것(Kim, K.B. et al. Proteomics 6, 2444-53 (2006).)과 같이 실시하였다.

<58> 실시예 3: 아데노바이러스(Adenovirus)의 준비와 감염

<59> TRIM72를 갖는 adenoviral vector를 cytomegalovirus(CMV)의 조절을 받는 ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen)을 사용하여 제작하였다. Full-length-TRIM72 ORF (open reading frame)를 적합한 제한효 소부위(SaI/I 과 NotI)를 사용하여 중간벡터인 pENTR(Invitrogen)에 클로닝한 후 CMV promotor가 달려있는 최종 adenoviral genome인 Destination vector(pAd/CMV/V5-DEST, Invitrogen)에 homologous recombination 하였다. 이렇게 클로닝된 TRIM72-adenoviral genome은 PacI 제한효소로 잘라 선형화 (linearization) 시킨 후 transfection시약 (GenePorter II)을 사용하여 293A 세포에 transfection 시켰다. Transfection 10-15일후 adenovirus를 포함하고 있는 상등액을 얻을 수 있으며 이것은 다시 293A 세포에 감염시켜서 증폭된 adenovirus 를 얻는다. 이렇게 얻어진 adenovirus 상등액은 cesium chloride를 이용하여 adenovirus입자만 정제하였다. 6 well plates 에서 키운 C2C12 myoblasts를 4×10^{10} VP/ml투여량의 adenovirus로 감염시켰다.

<60> 실시예 4: 플라스미드, 일시적 트랜스펙션과 루시퍼라제 실험

<61> IRS-1 구조체(full-length, 1-3729; PH-PTB domain, 1-900; Mid-region, 880-2608; Rear-region, 2581-3729)와 TRIM72 cDNA 구조체(full-length, 1-1431; ΔRING, 181-1431; coiled-coil, 367-1020; CCSPRY, 367-1431; SPRY, 687-1431; Δcoiled-coil)를 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR로 생성하고 pCMV-Tag2B 벡터와 pCMV-3Tag4a 벡터 (Stratagene) 에 각각 클로닝하였다. 또한 TRIM72과 TRIM72 C14A를 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR반응으로 생성하고 pHM6-HA벡터, pCMV-Tag2B 또는 pHM6 벡터(Roche) 에 클로닝하였다. TRIM72 promoter를 위해서는 ATG 시작 코돈으로 부터 1269 bp, 1144 bp 및 883 bp upstream 영역을 하기 표 1의 프 라이머를 이용하여 PCR반응으로 증폭시켰다. 883 bp 절편에서 E2 및 E3 boxes의 부위지정돌연변이(Site-directed mutagenesis)는 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 PCR반응으로 수행하였다. 이들 구조체를 pGL3basic벡터 (Promega)에 삽입하였다. 생쥐의 MyoD, Myf5, Myogenin과 Mrf4의 유전자 암호화 부위를 PCR에 의하여 증폭하였 고 pcDNA3 벡터(Invitrogen) 에 클로닝하였다. 유전자 트랜스펙션은 제조사 프로토콜에 따라 Genporter (Genlantis)와 Lipofectamin (Invitrogen)으로 수행하였다. 세포용해물(cell lysates)의 루시퍼라제 활성은 Luminoskan Ascent (Thermo Labssystem)에서 luciferase assay system (Promega)을 사용하여 측정하였다. 우리 는 상대적인 루시퍼라제의 활성을 같이 발현되는 β-갈락토시다제(β-galactosidase)의 활성으로 표준화

(normalize)하였다.

[표 1] PCR 반응에 사용된 프라이머(Primers) 서열

증폭 대상		Primers 서열	제한효소
IRS-1 구조체	full-length, 1-3729	Forward:GAATTCATGGCGAGCCCTCCGGAGAGCGAT Reverse:GTCGACCTACTGACGGTCCTCTGGCTGGCTTCTG	<i>EcoRI</i> <i>SaII</i>
	PH-PTB domain, 1-900	Forward:GAATTCATGGCGAGCCCTCCGGAGAGCGAT Reverse:GTCGACGGTCAGCCACCTGGCTGGG	<i>EcoRI</i> <i>SaII</i>
	Mid-region, 880-2608	Forward:GAATTCCTCCAGCAGGTGGGGCTGACC Reverse:GTCGACTGTGGCCTTGGGATCCCCAGGGACAGCTTC	<i>EcoRI</i> <i>SaII</i>
	Rear-region, 2581-3729	Forward:GAATTCCTGTCCCTGGGGGATCCCAAGGCCAGCACCTT Reverse:GTCGACCTACTGACGGTCCTCTGGCTGGCTTCTG	<i>EcoRI</i> <i>SaII</i>
TRIM72 cDNA 구조체	full-length, 1-1431	Forward:GAATTCATGTCGGCTGCGCCCGGCCTC Reverse:GGATCCGGCCTCGGCGCCTTCGGGACC	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
	ΔRING, 181-1431	Forward:GAATTCGGCCGAGGCACTCAGCACC Reverse:GGATCCGGCCTCGGCGCCTTCGGGACC	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
	coiled-coil, 367-1020	Forward:GAATTCGCGAGGCCACGACGCCTC Reverse:GGATCCGAGCTGCTGGTGCGCCACCAC	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
	CCSPRY, 367-1431	Forward:GAATTCGCGAGGCCACGACGCCTC Reverse:GGATCCGGCCTCGGCGCCTTCGGGACC	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
	SPRY, 687-1431	Forward:GAATTCGCGAGCTGAGTTCCTCATG Reverse:GGATCCGGCCTCGGCGCCTTCGGGACC	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
	Δcoiled-coil (397-696제거)	Front_Foward:GAATTCATGTCGGCTGCGCCCGGCCTC Front_Reverse:CTCAGTCTGCGGCTGTGTCTTGAGGCGTGC Rear_Foward:CTCAAGACACAGCCGAGCTGAGTTCCTC Rear_Reverse:GGATCCGGCCTCGGCGCCTTCGGGACC	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
	TRIM72 C14A	Forward:GAATTCATGTCGGCTGCGCCCGGCCTCTGCACCAGGAG CTGTCCGCCCGCTGTGCCTG Reverse:GGATCCGGCCTCGGCGCCTTCGGGACC	<i>EcoRI</i> <i>BamHI</i>
TRIM72 promoter	1269 bp	Forward: AAAGGTACCAGCTTTGCAATATCTGG Reverse: CAGCAAGCTTGGTGAGCCTGGGAAGAGG	<i>KpnI</i> <i>HindIII</i>
	1144 bp	Forward: GCCGTACCAGGAATAAATTGTAGGTCA Reverse: CAGCAAGCTTGGTGAGCCTGGGAAGAG	<i>KpnI</i> <i>HindIII</i>
	883 bp	Forward: CCAGGTACCAGATTAGCACCATTAGCG Reverse: CAGCAAGCTTGGTGAGCCTGGGAAGAGG	<i>KpnI</i> <i>HindIII</i>
	E2 and E3 boxes Site-directed mutagenesis	E3mutant: Forward: CCACTATATGCCTATAACCTTTTGCATCCACCCACT Reverse: AGTGGGTGGATGCAAAAGGTTATAGGCATATAGTGG E2mutant: Forward: GCATCCACCCACTGCAATCTTGCCCTGAATCCC Reverse: GGGATTGAGGCAAGATTGCAGTGGGTGGATGC	<i>KpnI</i> <i>HindIII</i>

실시예 5: RNA 간섭(interference)

TRIM72를 표적으로 하는 siRNA oligomer를 Dharmacon에서 제작하였다. TRIM72의 표적서열은 5'-AAGCAGCCUCAAGACACAGC-3'이다. 상기 표적서열의 antisense를 갖는 서열의 duplex siRNA를 제작하여 사용하였다. 세포배양물(cell cultures)을 제조사의 지시에 따른 트랜스펙션 시약(TransIT[®]-TKO, Mirus)을 사용하여 대조군 RNAi와 TRIM72 특이적 siRNA로 트랜스펙트시켰다. 다음 트랜스펙트된 세포를 적어도 48시간동안 2% 말혈청을 포함하는 배지로 옮겨 배양하였다.

<66> **실시예 6: 웨스턴 블로팅, 면역침전 및 면역염색**

<67> 웨스턴 블로팅(Western blotting)과 면역염색(immunostaining)을 Kim, K.B. et al. Proteomics 6, 2444-53 (2006)에 기술된 바와 같이 수행하였다. 면역침전반응(immunoprecipitation)을 위해서, 세포를 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 20 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 1% NP-40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF 및 protease inhibitor cocktail (Roche)를 포함한 버퍼로 용해시켰다. 총 세포 용해물(cell lysates) (600 mg protein)을 90분간 특이적 항체들로 인큐베이트한 후 1시간동안 50 µl의 Protein A-sepharose 또는 G-agarose bead (50%) slurry로 인큐베이트하였다. 이 후 면역침전물(immunoprecipitates)을 웨스팅 블로팅으로 분석하였다.

<68> **실시예 7: 노던 블로팅(Northern blotting)**

<69> lane당 약 2 µg의 poly A+RNA를 함유하며 8개의 다른 생쥐 조직에서 유래한 Premade Northern blot (MTNTM)를 Clontech에서 구입하였다. 예비혼성화(Prehybridization)후에, 랜덤 프라이밍 (TaKaRa)으로 생산한 [³²P]-labeled TRIM72 probe (789-1419 bp fragment)를 키트에 있는 혼성화 용액에서 2시간동안 68℃에서 인큐베이트하였다. 혼성화된 블롯(Hybridized blot)을 세척하고 건조한 후 이미지 플레이트(image plate)에 노출시켰다. 기록된 신호를 BAS Reader (BAS-25000, Fuji Photo Film)로 영상화하였다.

<70> **실시예 8: RT-PCR**

<71> 총 RNA를 C2C12 myoblast와 myotubes로부터 추출하고 reverse transcriptase (MMLV, Invitrogen)와 random primers를 사용하여 단일가닥 cDNA를 합성하였다. 분화과정동안 다양한 조직에서 TRIM72의 발현 레벨을 semi-quantitative PCR로 분석하였다. 특정 증폭을 위해 아래의 포워드(forward)와 리버스(reverse) 프라이머 쌍을 사용하였다: TRIM72을 위해 5'-TCCCTGTTGT CAGGCATCTAC-3' 과 5'-TTCTCCACACCTGGAATTG-3', myogenin을 위해 5'-GCTCAGCTCCCTCAACCAG-3' 과 5'-ATGTGAATGGGAGTGGGA-3', MyoD을 위해 5'-CTCCTTTGAGACAGCAGACGACTT-3' 과 5'-AAATCGCATTGGGGTTTGAGCCTG-3',

<72> caveolin-3을 위해 5'-AGGACATTCAGTCAAGGAGA-3' 과 5'-CAGAAGGTGCGGATACACAGT-3', MHC을 위해 5'-AGAAGGAGGAGGCAACTTCTG-3'과 5'-ACATACTATTG CCGACCTTG-3', p21을 위해 5'-TGTCAGAGTCTAGGGGAATTGG-3' 과 5'-AGG TTTGGAGACTGGGAGAG-3', β-actin을 위해 5'-GAAGAGCTATGAGCTGCCTGA-3' 과 5'-CTCATCGTACTCTGCTTGCT-3'.

<73> **실시예 9: 염색질 면역침전(Chromatin immunoprecipitation)**

<74> 포르말데히드(Formaldehyde)로 고정된 C2C12 myoblasts 과 myotubes를 0.5% NP-40, 5 mM PIPES 및 85 mM KCl를 포함하는 pH 8.0의 버퍼로 용해시켰다. 5 분간 5,000 rpm에서 간단하게 원심분리(microcentrifugation)시킨 후, 펠렛을 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% SDS 및 10 mM EDTA를 포함하는 핵 용해 버퍼로 인큐베이트하고, 초음파 처리하고, 5분간 5,000 rpm에서 원심분리하였다. 상층액(Supernatant)을 Wilson, E.M., and Rotwein, P. J. Biol. Chem. 281, 29962-29971 (2006)에 기술된 대로 항-MyoD 항체를 사용하여 ChIP assay하였다. 면역침전물(immunoprecipitates)을 다음 프라이머를 가지고 PCR을 수행하여 증폭시켰다. 포워드(forward) 및 리버스(reverse) 프라이머 각각 5'-AGGGAGTGGGTAGGACAGCTAAATAT-3' 및 5'-CAGGCTCAATGCAAGGGCAGGGA-3'.

<75> **실시예 10: PI(3)K 활성의 측정**

<76> 항-p85 항체로 처리한 면역침전물(immunoprecipitates)을 버퍼 A (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 20 mM NaF, 10 mM Na₄P₂O₇, 1% NP-40, 3 mM benzamidine, 1 mM Na₃VO₄ 및 protease inhibitor cocktail)로 두번 세척하고 PI(3)K 반응 버퍼 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA 및 mM sodium vanadate)로 한번 세척한 후 60 mg의 phosphoinositide (PI, Sigma)와 20 mCi [γ-³²P]를 포함한 50 ml의 반응 버퍼로 현탁하였다. 인산화된 리피드는 Ueki, K., et al. Mol Cell Biol 20, 8035-46 (2000)에 기술된 대로 TLC에 의해 분리하였다.

<77> **실시예 11: IRS-1 유비퀴티네이션(ubiquitination)**

<78> Polyfect (Qiagen)을 사용하여 293T cells을 pCMV-HA-TRIM72 (1 µg), pCMV-HA-TRIM72 C14A (1 µg), pCMV-Flag-IRS-1 (3 µg), His-ubiquitin (3 µg)으로 트랜스펙트하였다. 트랜스펙트한지 24시간 후에 세포를 MG132 (5 µM)으로 12시간 동안 처리하였다. 세포 용해물을 항-Flag 항체로 2시간동안 면역침전시켰다. 면역침전물(immunoprecipitates)은 항-His 항체에 대한 웨스턴 브로팅으로 분석하였다.

<79> **결과 1: 골격근세포의 지질래프트에서 TRIM72의 발견**

<80> 인슐린유사 성장호르몬(Insulin-like growth factor I and II, IGF-I and IGF-II)은 골격근의 발달, 비대(hypertrophy), 재생에 필수적이다 (Glass, Trends Mol. Med., 9, 344, 2003; Glass, Nat. Cell Biol., 5, 87, 2003). 골격근 줄기세포인 위성세포(satellite cells)에 IGF-II 항체나 anti-sense IGF-II를 처리하면 근육분화능이 상실되고 IGF-I을 과발현시킨 생쥐는 근육양이 현저하게 증가하였을 뿐만 아니라 근육의 힘이 강화됨을 보여준다(Musaro, Nat. Genet., 27, 195, 2001; Erbay, J. Cell Biol., 163, 931, 2003; Wilson, 281, 29962, 2006; Wilson, 282, 5106, 2007). IGF-I과 IGF-II에 의하여 IGF-I 수용체(IGFR), 인슐린수용체기질(insulin receptor substrate-1, IRS-1)이 연달아 활성화된다. 이렇게 활성화된 IRS-1은 PI3K-AKT와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달경로의 활성을 이끈다(도 1). Ras-Raf-MEK-ERK 경로는 근육섬유의 유형을 결정짓는데 반해 PI3K-AKT 경로는 근육분화와 비대를 유도한다(Rommel, 286, 1738, 1999; Murgia, 2, 142, 2000). 활성화된 AKT는 mTOR, GSK3 β , FOXO의 인산화를 유도하여 근육분화를 촉진시키고 근육위축(muscular atrophy)을 방지하도록 한다(Bodine, Nat. Cell Biol., 3, 1014, 2001; Rommel, Nat. Cell Biol., 3, 1009, 2001; Hriba, J. Cell Biol., 162, 535, 2003; Sandri, Cell, 117, 399, 2004).

<81> 지질래프트는 IGFR, IRS-1, PI3K, AKT, GSK3 β 와 같은 IGF 신호전달물질들이 모이는 장소이기 때문에 골격근 분화와 비대를 관찰할 것으로 보여진다(Huo, J. Biol. Chem., 278, 11561, 2003; Panetta, Biochem. Biophys. Res. Commun., 316, 240, 2004; Arcaro, Cell Signal., 19, 1081, 2007; Hill, Curr. Biol., 12, 1251, 2002; Sui, Biochem. Biophys. Res. Commun., 345, 1645, 2006). 따라서 골격근 분화에 연관된 신규 신호전달물질들이 지질래프트의 단백질체학 연구에 의하여 발견될 수 있을 것이다. 본 연구단은 Triton X-100 불용해성과 저밀도의 성질을 이용하여 C2C12 근육모세포(myoblasts)와 근육대롱세포(myotubes)로부터 계면활성제 불용해성 지질래프트를 분리하였다. 이 때 단백질인 근육모세포 C2C12 세포를 2% 말형청(horse serum)을 2일동안 처리함으로써 다핵 근육대롱세포로 분화시켰다. 이러한 지질래프트 단백질들은 이차원 전기영동으로 분리되었고 은염색으로 가시화되었다. 이차원 전기영동 그림(도 2)에서 화살표로 표시된, 근육대롱세포 특이 지질래프트 단백질들은 Q-TOF/MS로 동정되었다. 이러한 단백질 스팟들 중에 네 개의 점들은 55 kDa의 분자량을 가지고 있었고 아직까지 그 기능이 전혀 알려지지 않은 TRIM72로 확인되었다(도 2A와 B). 생쥐 TRIM72의 ID 번호는 NM 001079932 또는 [gi|142370482]이고 인간 TRIM72의 ID 번호는 NM 001008274 또는 [gi|142378442]이다. 도 3A는 Q-TOF/MS로 동정된 TRIM72의 mass spectrum data를 보여주고 있고 도 3B는 TRIM72의 아미노산 서열을 보여주고 있다. TRIM72는 TRIM/RBCC (tripartite motif or N-terminal RING finger/B-box/coiled coil)와 SPRY (SplA and Ryanodine receptor) 영역을 가지고 있는데(도 3B와 C) 각각은 유비퀴틴 E3 연결효소(ubiquitin E3 ligase) 활성화와 단백질-단백질 상호작용에 필요한 것으로 알려져 있다.

<82> **결과 2: TRIM72는 골격근과 심장근의 지질래프트에서 발견된다.**

<83> TRIM72는 골격근과 심장에서만 특이적으로 발현되고 있음이 Western blot과 Northern blot으로 밝혀졌다(도 4A와 B). 게다가 TRIM72는 근육 분화하는 동안 마이오제닌(myogenin), 캐비올린-3(caveolin-3), MyHC(myosine heavy chain)과 같은 골격근 분화 마커와 함께 발현되기 시작함을 RT-PCR과 Western blot으로 확인하였다(도 4C와 D). 면역형광법으로 TRIM72가 근육대롱세포와 생쥐의 심장과 골격근의 원형질막에서 캐비올린-3와 함께 발현되었고(도 5A) 원형질막 또는 지질래프트 분획에서 과량 존재함을 발견하였다(도 5B와 C). 이는 TRIM72가 심장과 골격근에서 지질래프트 단백질임을 증명하는 것이다. 흥미롭게도 TRIM72는 생쥐의 배발생단계에서는 발현되지 않지만 생후에 심장과 골격근에서 발현되었는데(도 5D) 이는 TRIM72가 배발생 단계 동안 심장형성과 근육분화에는 관여하지 않는다는 것을 보여주는 것이다.

<84> **결과 3: TRIM72는 근육분화 억제 단백질이다.**

<85> 근육분화 과정에서 TRIM72의 기능을 이해하기 위해서 C2C12 근육모세포에서 아데노바이러스 시스템을 이용하여 TRIM72를 과발현시키거나 SiRNA를 이용하여 TRIM72의 발현을 억제한 후 근육분화시 근육대롱세포의 모양을 관찰하였다. 도 6A에서 보듯이 TRIM72가 과발현되면 근육형성이 억제되고 TRIM72의 발현억제는 근육형성을 촉진시켰다. 반복적으로 근육분화 정도는 MyHC의 염색정도로 확인할 수 있는데 TRIM72가 과발현되면 MyHC의 양이 감소하였고 TRIM72의 발현억제는 MyHC의 양을 급격하게 증가시켰다(도 6B). 또한 근육분화 마커단백질(미오제닌, 캐비올린-3, MyHC)의 발현 수준, 세포당 핵의 숫자 등으로 결정되었을 때(도 6C와 D) TRIM72의 과발현은 근육분화를 완전히 억제시켰고 TRIM72의 발현억제는 근육분화를 촉진시켰다. 이는 TRIM72가 근육분화의 음성적 조절자임을 암시하는 것이다.

<86> **결과 4: TRIM72는 IGF-I에 의한 PI3K/AKT 활성화를 억제한다.**

<87> IGF는 골격근 분화와 비대를 조절하는 주요한 성장인자 이기 때문에 TRIM72를 근육모세포와 근육대롱세포에서 과발현시키거나 발현억제시킨 후 IGF-I에 의한 IGFR/IRS-1/PI3K/AKT의 활성화에서 TRIM72의 역할을 조사하였다. TRIM72 과발현은 IGF-I에 의한 AKT 인산화를 감소시켰으나 TRIM72의 발현 억제는 IGF-I에 의한 AKT 인산화를 증가시켰는데(도 7A) 이는 TRIM72가 AKT의 상위 신호전달물질을 방해함으로써 AKT의 활성을 억제한다는 것을 의미한다. 대조적으로 IGF-I에 의한 ERK1/2의 인산화는 TRIM72의 과발현 또는 발현억제에 의하여 영향을 받지 않았는데 이는 IGF-I/IGFR/Raf/MAPK의 신호전달경로는 TRIM72에 의하여 변화가 없음을 보여주는 것이다. IGF에 의한 AKT 인산화가 TRIM72에 의하여 억제되었기 때문에 IGF에 의한 PI3K의 활성화도 TRIM72에 의해서 영향을 받을 것이다. 도 7B는 IGF-I에 의한 PI3K 활성화가 TRIM72 과발현에 의하여 감소되고 TRIM72 발현억제에 의하여 증가됨을 보여준다. 이는 TRIM72가 IGF-I/IGFR/IRS-1 신호전달 경로를 통하여 PI3K 활성화를 조절함을 보여주는 것이다.

<88> **결과 5: TRIM72는 IRS-1에 결합하여 IGF-I 신호전달을 차단한다.**

<89> 다음에 IGF-I에 의한 IGFR와 IRS-1의 티로신 인산화에 있어서 TRIM72의 효과를 조사하였다. IGF-I에 의한 IGFR의 티로신 자가인산화는 TRIM72 과발현 또는 발현억제에 의하여 영향을 받지 않았다(도 8). 그러나 도 8에서 보듯이 IRS-1의 티로신 인산화는 TRIM72의 과발현에 의하여 감소하였고 TRIM72의 발현 억제에 의하여 증가하였다. 게다가 IGF-I 자극 후 IRS-1과 PI3K의 상호작용은 TRIM72/TRIM72의 과발현에 의하여 약해졌고 TRIM72/TRIM72의 발현억제에 의하여 강화되었다. 이러한 결과는 TRIM72가 IGFR 또는 IRS-1과 결합하여 IGF-I에 의한 IRS-1의 활성화를 방해함을 보여주는 것이다. 이러한 사실을 증명하기 위해서 IGF-I을 0, 5, 30분 동안 처리한 C2C12 근육대롱세포에서 면역침전법으로 TRIM72와 IRS-1의 상호작용을 조사하였다. 도 9A에서 보듯이 IGF-I의 자극에 상관없이 TRIM72와 IRS-1은 서로 강하게 결합되어 있었다. TRIM72와 IRS-1의 어떤 영역이 두 분자간의 상호작용에 필요한지를 조사하기 위해서 IRS-1과 TRIM72의 다양한 돌연변이를 제작하여(도 9B), 이들을 293세포에 유전자 전달한 후 면역침전을 하였다. 도 9C와 D에서 보듯이 IRS-1 중간부분(300-870)과 뒷부분(871-1243)은 TRIM72의 coiled-coil 영역과 결합하는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 유도하기 위해서는 IRS-1과 TRIM72를 293세포에 유전자 전달한 후 MG132(프로테아좀 억제제)를 처리되었음이 강조되어야 한다.

<90> **결과 6: RING domain이 없는 TRIM72 돌연변이는 TRIM72의 우성음성형태(dominant negative form)이다.**

<91> TRIM72의 RING domain은 Zn^{2+} 에 결합하는 시스틴과 히스티딘으로 구성된 서열을 가지고 있고 이 Zn^{2+} 결합서열은 유비퀴틴 E3 연결효소의 기능을 가지고 있다(도 10A). 따라서 RING domain이 없거나(Δ RING TRIM72) 14번째 아미노산인 시스틴을 알라닌으로 치환한 DN-TRIM72 돌연변이 유전자들을 제작하였다. 야생형 TRIM72, Δ RING TRIM72, DN-TRIM72를 근육모세포에 발현시킨 후 근육분화를 유도하였을 때 야생형 TRIM72는 근육분화를 억제시켰으나 Δ RING TRIM72와 DN-TRIM72는 근육분화를 촉진시켰다(도 10B). 이는 Δ RING TRIM72와 C14A TRIM72가 TRIM72의 우성음성형태로 작용하여 근육분화를 촉진시킨 것으로 보여 진다.

<92> **결과 7: IRS-1 단백질은 TRIM72에 의하여 분해된다.**

<93> 도 9에서 보듯이 TRIM72와 IRS-1 유전자를 발현시키기 위해서는 유비퀴티네이션에 의한 단백질의 분해를 억제시키는 약제인 MG132(프로테아좀 억제제)를 처리하여야만 한다. 이는 E3 연결효소의 기능을 가지고 있는 TRIM72가 IRS-1을 타겟으로 하여 IRS-1의 유비퀴티네이션을 촉진할 수 있음을 보여주는 것이다. 이를 확인하기 위하여 TRIM72유전자의 존재 여부에 따라서 IRS-1의 발현양이 변화하는 지를 살펴보았다. 도 11A에서 보듯이 TRIM72가 없을 때에는 IRS-1이 정상적으로 발현되나 TRIM72가 존재하게 되면 IRS-1의 발현이 감소함을 보여주고 있다. 또한 TRIM72의 발현양이 증가함에 따라서 IRS-1의 발현양이 감소하였다(도 11B). 그로나 MG132를 처리하게 되면 TRIM72의 여부에 상관없이 IRS-1은 정상적으로 발현되었다. 이러한 결과는 TRIM72가 IRS-1에 유비퀴틴을 전달시키는 E3 연결효소임을 보여주는 것이다. TRIM72가 실제로 IRS-1의 유비퀴티네이션을 촉진시킴을 확인하기 위해서 TRIM72, IRS-1, ubiquitine을 293세포에 동시에 발현시킨 후 IRS-1의 유비퀴티네이션을 조사하였다. 도 11C에서 보듯이 TRIM72는 IRS-1의 유비퀴티네이션을 증가시켰으나 TRIM72 C14A는 IRS-1의 유비퀴티네이션을 완벽하게 방해하였다.

<94> **결과 8: TRIM72는 M-Cadherin과 상호작용을 통하여 M-Cadherin의 유비퀴티네이션을 촉진시킨다.**

<95> 근육세포의 분화에서 첫 번째 일어나야 하는 사건은 근육모세포 사이의 융합이다. 근육모세포간의 융합이 일어나기 위해서는 세포결합단백질인 N-Cadherin, M-Cadherin의 역할이 필수적인데 이러한 Cadherin들은 β -Catenin과 p120을 통하여 세포주기 정지(cell cycle arrest)를 유도하는 것으로 알려져 왔다. 흥미롭게도 근육

모세포에 TRIM72를 과량발현시키면 세포융합이 완벽히 억제되는데(도 6), 이는 TRIM72가 N-Cadherin 또는 M-Cadherin의 활성을 조절하는 음성적 단백질일 수 있음을 보여준다. 이를 증명하기 위해서 먼저 근육분화 과정에서 N-Cadherin, M-Cadherin의 mRNA 양을 RT-PCR로 측정하였더니 이들의 양은 근육분화가 시작된 이후로 변화가 없었다(도 12A). 그러나 그들의 단백질 양을 측정하였을 때 M-Cadherin과 β -Catenin의 양은 근육분화 4일 후에 감소하기 시작하였다(도 12B). 이는 근육분화 동안 M-Cadherin의 mRNA 양은 일정하게 유지되는 반면 그 단백질 양은 감소하였기 때문에 M-Cadherin의 단백질 분해에 의해서 세포융합이 조절됨을 보여주는 것이다. 흥미롭게도 근육분화동안 M-Cadherin 단백질의 양은 TRIM72 발현에 의하여 감소하기 때문에 M-Cadherin 발현은 TRIM72에 의하여 조절될 수 있을 것이다. 이를 증명하기 위해서 근육모세포에서 TRIM72를 과량발현시킨 후 M-Cadherin의 발현양을 조사하였다. 도 12C와 D에서 보듯이 TRIM72가 과발현된 근육모세포에서 M-Cadherin의 발현양이 감소하였다. 역으로 근육모세포에서 Si-RNA로 TRIM72의 발현을 억제시키면 M-Cadherin의 양이 증가하였다(도 12E). 이러한 결과는 E3 연결효소의 기능을 가지고 있는 TRIM72가 M-Cadherin의 분해를 촉진시킬 수 있음을 강력하게 암시하는 것이다. 이를 증명하기 위해서 근육대롱세포에서 TRIM72의 양을 억제시킨 후 M-Cadherin의 유비퀴티네이션을 조사하였다. 도 12F에서 보듯이 Si-Control을 처리한 세포에서는 얼룩이 진 밴드 유형(이 유형은 유비퀴티네이션을 지시함)을 가지고 있는 반면 Si-TRIM72의 경우 이 유형을 가지고 있지 않았다. 이는 TRIM72가 없으면 M-Cadherin의 유비퀴티네이션이 억제됨을 강력하게 보여주는 것이다. 또한 Si-RNA에 의한 TRIM72의 발현 억제는 M-cadherin과 catenins (β -Catenin과 p120 catenin)간의 결합을 증가시키는 결과를 초래하였다.

<96> E3 활성화효소의 기능을 가지고 있는 TRIM72가 M-Cadherin에 유비퀴틴을 넘겨주는 작용을 하기 위해서는 TRIM72와 M-Cadherin의 단백질 상호작용을 가지고 있어야 한다. 이를 증명하기 위해서 근육대롱세포의 세포단백질을 TRIM72 항체 또는 M-Cadherin 항체로 면역침전을 수행한 후 각각의 면역침전물에서 M-Cadherin 또는 TRIM72가 존재하는 지 조사하였다. 도 12G와 H에서 보듯이 TRIM72와 M-Cadherin은 강력하게 결합됨을 알 수 있었다. 이러한 결과는 TRIM72가 M-Cadherin과 결합하여 M-Cadherin의 유비퀴티네이션을 촉진함으로써 M-Cadherin의 단백질 양을 줄이게 함으로서 과량의 근육모세포의 세포융합을 억제시키는 기능을 가짐을 보여주는 것이다.

<97> **결과 9: TRIM72의 프로모터는 MyoD가 결합하는 E-box를 포함한다.**

<98> 근육분화시 TRIM72의 발현이 점차적으로 증가하기 때문에(도 4) TRIM72의 프로모터는 활성화된 MyoD와 결합할 수 있는 E-box를 포함하고 있을 것이다. 실제로 TRIM72의 프로모터를 분석하였을 때 총 여섯 개의 E-box가 있었다(도 13A). MyoD에 의하여 TRIM72가 발현되기 위해서는 어떤 E-box가 필요한 지를 알기위해서 다양한 TRIM72프로모터 돌연변이를 제작한 후 이 돌연변이 프로모터들에 루시퍼레이즈(luciferase) 유전자를 융합시켰다. 이러한 TRIM72프로모터 돌연변이-루시퍼레이즈 유전자를 C2C12 근육모세포에 유전자전달 후 근육대롱세포로 2일 동안 분화시킨 후 루시퍼레이즈 활성도를 측정하였다. 도 13A에서 보듯이 E2와 E3 box가 상실되거나 돌연변이가 되면 TRIM72프로모터 활성도는 감소하였기 때문에 E2와 E3 box가 TRIM72의 전사에 필수적임을 알 수 있었다. 또한 TRIM72프로모터 활성은 MyoD와 Mrf4를 발현시켰을 때 급격하게 증가됨이 C2C12 근육모세포, NIH3T3 세포, 293T세포에서 증명되었다(도 13B-D). 게다가 근육대롱세포에서 MyoD의 TRIM72프로모터에의 결합을 크로마틴 면역침전(chromatin immunoprecipitation, ChIP)으로 확인하였는데(도 13E), 이는 TRIM72전사는 근육분화동안 활성화되는 MyoD에 의하여 이루어짐을 보여주는 것이다.

<99> 또한 약리학적 접근으로 TRIM72전사를 유도하는 IGF 신호전달과정을 분석하였다. 도 14A에서 보듯이 IGF-I에 의한 근육분화 동안 TRIM72전사는 LY294002로 PI3K를 억제하였을 때 4배 감소하였으나 라파마이신(rapamycin)으로 mTOR를 억제하거나 LiCl로 GSK3 β 를 억제하였을 때에는 변화가 없었다. 게다가 근육모세포에서도 MyoD 의존성 TRIM72전사 역시 LY292002에 의해서는 감소하였으나 라파마이신 또는 LiCl에 의해서는 변화가 없었다(도 14B). 아울러 유전학적 접근으로 TRIM72전사를 유도하는 IGF 신호전달과정을 분석하였다. 근육대롱세포에서 TRIM72프로모터 활성도는 constant active한 AKT가 발현되면 2배 증가하였으나 constant active한 FOXO1과 GSK3 β 에 의해서는 변화가 없었다(도 14C). 또한 AKT를 knock-down하게 되면 근육대롱세포에서의 TRIM72프로모터 활성도는 감소하였다(도 14D). 이러한 약리학적, 유전학적 접근으로 TRIM72전사는 PI3K-AKT 경로를 통하여 활성화되는 MyoD를 필요로하지만 mTOR, FOXO, GSK3 β 경로는 필요 없다고 결론지을 수 있었다.

<100> **결과 10: TRIM72의 작동 모델; TRIM72는 IRS-1을 타겟으로 하여 IGF-I 신호전달을 차단하는 근육분화 억제 단백질이다.**

<101> 이러한 실험의 결과를 토대로 도 15의 모델과 같이 TRIM72가 근육분화를 억제하는 기작을 제시할 수 있다. 즉 TRIM72 근육분화와 더불어 발현되기 시작하면서(TRIM72의 발현은 PI3K/AKT 신호전달에 의하여 의존함을 본 실험실의 다른 연구 주제로 밝혀낸 바 있음) 양이 축적되기 시작하면 IRS-1과의 결합을 통하여 IGF-I에 의한 IRS-1

티로신 인산화를 차단함으로써 IGF-I 신호전달을 억제할 수 있다. 이는 TRIM72가 근육발달 또는 비대를 너무 과대하게 되는 것을 조절하는 음성적 되먹임 조절자(negative feedback regulator)임을 명확하게 증명하는 것이다.

산업이용 가능성

<102> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명자들은 TRIM72의 과발현이 근육형성을 억제시키고 TRIM72의 발현억제가 근육형성을 촉진시킨다는 것을 확인함으로써, TRIM72가 골격근 분화의 음성적 조절자임을 처음으로 밝혀냈다. 따라서 TRIM72의 기능을 억제하면 골격근과 심장근에서만 작용하여 다른 조직의 IGF-I 신호전달경로에는 영향을 미치지 않기 때문에 암과 같은 부작용이 없을 것이다. 즉 TRIM72를 타겟으로 하는 약제 또는 유전자 치료는 골격근의 분화 및 비대를 촉진시켜 지방조직의 에너지를 소모시켜 비만과 제 2형 당뇨병을 부작용 없이 치료할 수 있을 뿐만 아니라 심장근의 생리적 비대를 촉진시켜 튼튼한 심장을 유도할 수 있을 것이다. 또한, TRIM72 유전자의 발현을 조절하거나 TRIM72 유전자 조작 동물을 제작함으로써 근육양이 많은 가축을 개발할 수 있다. 또한, TRIM72와 M-Cadherin(또는 IRS-1)의 상호작용을 저해하는 신약 후보물질을 도출하여 근육강화제 및 심장강화제로 사용할 수 있다. 또한, 이러한 근육강화제를 비만, 제 2형 당뇨병, 근육병, 심장비대증의 치료제로 개발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

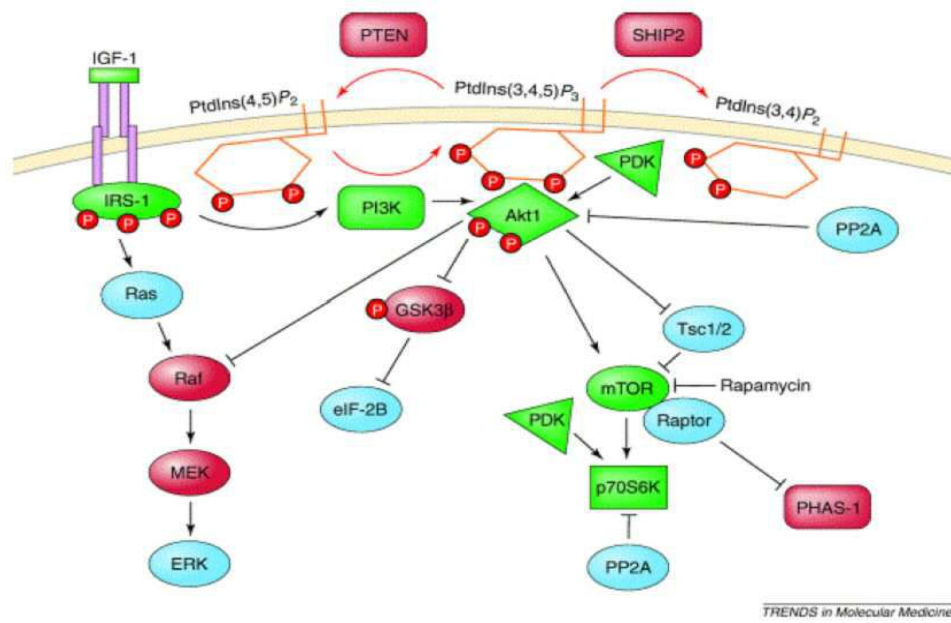
- <103> 도 1은 근육분화와 비대에 있어서 IGF에 의한 PI3K-AKT와 Ras-Raf-MEK-ERK 신호전달경로를 도시한 것이다.
- <104> 도 2는 근육대롱세포(myotube)의 지질래프트에서 발현되는 단백질들을 보여준다. A. 근육모세포(myoblasts)와 근육대롱세포에서 지질래프트의 분리. 각각의 세포에서 지질래프트를 계면활성제 불용해성과 낮은 밀도의 성질을 이용하여 지질래프트를 분리하였다. 설탕구배 초원심분리후 각각의 분획을 immunoblot하였다. Cav-1, Caveolin-1; Cav-3, Caveolin-3. B. 근육모세포(myoblast)와 근육대롱세포의 지질래프트 단백질을 이차원 전기영동법으로 비교 분석하였다. 근육대롱세포의 지질래프트에서 많이 발현되는 단백질 스팟들은 원으로 표시하였고 이 단백질 스팟들은 Q-TOF를 통하여 동정되었다. C. 근육모세포와 근육대롱세포에서 TRIM72에 해당되는 부분을 (그림 B에서의 박스부분) 비교하였다.
- <105> 도 3은 근육대롱세포의 지질래프트에 특이적으로 발현되는 TRIM72의 동정 결과를 나타낸다. A. 그림 2B의 박스 부분에 해당되는 단백질을 Q-TOF/MS로 분석했을 때 나타나는 질량분석기 패턴과 그 아미노산 서열. B. TRIM72의 전체 아미노산 서열. 굵은 글자는 Q-TOF/MS에서 분석된 아미노산 서열 적색선은 RING 영역, 청색선은 B 박스, 녹색선은 Coiled-coil 영역, 흑색선은 SPRY 영역을 지시한다. C. TRIM72는 하나의 RING 영역, 하나의 B-box, 하나의 Coiled-coil 영역, 하나의 SPRY 영역을 가지고 있다.
- <106> 도 4는 TRIM72가 골격근과 심장근에서만 특이적으로 발현된다는 것을 보여준다. A. 생쥐의 각종 장기의 mRNA를 추출한 후 TRIM72 유전자에 대한 Northern blot 하였다. B. 생쥐의 각종 장기의 단백질을 추출한 후 TRIM72 항체로 Western blot 하였다. C. C2C12 근육모세포를 근육대롱세포로 분화시킨 후 RT-PCR을 수행하였다. TRIM72의 mRNA양은 근육분화 마커유전자인 caveolin-3 (Cav-3), myogenin, MyoD, myosin heavy chain (MyHC)와 함께 증가하였다. D. C2C12 세포를 분화시킨 후 western blot을 수행하였다. 근육분화 동안 TRIM72 단백질양은 다른 분화마커 단백질과 함께 증가하였다. IRS-1, insulin receptor substrate-1.
- <107> 도 5는 TRIM72가 근형질막의 지질래프트에 존재한다는 것을 보여준다. A. 생쥐의 골격근, 심장근, C2C12 근육대롱세포에서 TRIM72와 Cav-3의 위치를 면역형광법으로 확인하였다. B. 생쥐의 골격근과 C2C12 근육대롱세포로부터 세포질과 원형질막(PM)을 분리한 후 TRIM72 항체로 Western blot 하였다. C. 생쥐의 골격근과 C2C12 근육대롱세포로부터 지질래프트를 분리한 후 TRIM72와 Cav-3 항체로 Western blot 하였다. D. 배발생단계(E)과 출생후(P) 심장과 골격근으로부터 TRIM72와 Cav-3의 양을 Western blot으로 확인하였다.
- <108> 도 6은 TRIM72가 근육분화의 음성적 조절자임을 보여주는 실험 결과이다. C2C12 근육모세포에서 아데노 바이러스 시스템을 이용하여 TRIM72를 과발현 시키거나 C2C12 근육대롱세포에서 SiRNA를 이용하여 TRIM72의 발현을 억제시킨 후 세포의 모양을 H&E 염색(A), MyHC 형광염색법(B), TRIM72, Myogenin, Cav-3에 대한 wetern blot(C), 세포당 핵의 숫자(D)를 측정함으로써 근육분화 정도를 측정하였다.
- <109> 도 7은 TRIM72가 IGF-I에 의한 PI3K/AKT 활성화를 억제한다는 것을 보여준다. C2C12 근육모세포에서 TRIM72를 과발현시키거나 C2C12 근육대롱세포에서 TRIM72의 발현을 억제시킨 후 IGF에 의한 AKT와 MAPK의 인산화(A)와 PI3K의 활성정도(B)를 조사하였다.

- <110> 도 8은 TRIM72가 IRS-1과 결합함으로써 IGF-I에 의한 IRS-1의 티로신 인산화를 억제한다는 것을 보여준다. C2C12 근육모세포에 TRIM72를 과량발현시키거나 C2C12 근육대롱세포에 TRIM72의 발현을 억제시킨 후 IGF-I 자극 후 IGFR과 IRS-1의 티로신 인산화와 IGFR과 IRS-1의 상호작용을 면역침전법으로 조사하였다.
- <111> 도 9는 TRIM72와 IRS-1의 결합부위를 나타내는 실험 결과이다. IRS-1의 가운데와 뒷부분이 TRIM72의 coiled-coil 영역이 그 결합부위이다. A. C2C12 근육대롱세포에 IGF-I을 처리한 후 IRS-1과 TRIM72의 결합을 면역침전법으로 조사하였다. B. 다양한 TRIM72와 IRS-1 돌연변이체. C. IRS-1의 Mid와 Rear 영역은 TRIM72와 결합한다. Myc-TRIM72와 Flag-IRS-1 돌연변이 유전자를 293 세포에 30시간동안 유전자 전달한 후 MG132(프로테아좀 억제제)를 12시간동안 처리하였다. TRIM72와 IRS-1 돌연변이 단백질과의 상호작용을 면역침전법으로 조사하였다. D. IRS-1과 TRIM72의 coiled-coil 영역이 상호작용한다. Flag-IRS-1과 Myc-TRIM72 돌연변이 유전자를 293 세포에 30시간 동안 유전자 전달한 후 MG132(프로테아좀 억제제)를 12시간동안 처리하였다. IRS-1과 TRIM72 돌연변이 단백질과의 상호작용을 면역침전법으로 조사하였다.
- <112> 도 10은 RING domain이 결여되거나 RING domain의 시스템을 알라닌으로 치환한 돌연변이 우성음성적으로 작용하여 근육분화를 촉진시킨다는 것을 보여준다. A. TRIM72의 RING domain에는 Zn²⁺에 결합하는 공통서열(consensus sequence)을 가지고 있다. B. C2C12 근육모세포에 야생형 TRIM72, ΔRING TRIM72, C14A TRIM72를 유전자 전달한 후 근육대롱세포로 분화를 유도하였다. 야생형 TRIM72는 근육분화를 억제시키나 C14A TRIM72와 ΔRING TRIM72는 주변의 다른 세포에 비해서 근육분화를 더욱 촉진시켰다.
- <113> 도 11은 TRIM72가 IRS-1의 분해를 촉진시키는 E3 연결효소라는 것을 보여준다. A. IRS-1(6 μg)와 TRIM72(2 μg)를 HEK 293 세포에 30 시간 동안 유전자전달한 후 단백질분해 억제제인 MG132를 10 시간 동안 처리한 후 IRS-1과 TRIM72의 발현양을 조사하였다. B. IRS-1(3 μg)과 다양한 농도의 TRIM72(0, 0.5, 1, 2 μg)를 293 세포에 30 시간 동안 유전자 전달한 후 IRS-1의 발현양을 조사하였다. C. 293 세포에 HA-TRIM72(또는 HA-TRIM72 C14A), Flag-IRS-1, His-ubiquitin을 30시간 동안 유전자 전달한 후 MG132를 10시간 처리하였다. IRS-1의 유비퀴티네이션은 Flag 항체로 면역침전한 후 His로 immunoblot함으로써 확인하였다. 적색의 괄호는 IRS-1의 유비퀴티네이션을 표시한다.
- <114> 도 12는 TRIM72가 M-Cadherin의 유비퀴티네이션을 촉진시킨다는 것을 보여준다. A-B. 근육분화 과정동안 M-Cadherin, N-Cadherin의 mRNA 양과 단백질 양 변화. C-D. TRIM72를 근육모세포에 과량발현시키면 M-Cadherin의 양이 감소한다. E. TRIM72의 발현을 근육대롱세포에서 억제시키면 M-Cadherin의 양이 증가한다. F. 근육대롱세포에서 TRIM72의 발현 억제에 의해 M-Cadherin의 유비퀴티네이션이 감소하고 M-Cadherin과 결합하는 β-Catenin과 p120 catenin의 결합량은 증가한다.
- <115> 도 13은 TRIM72의 프로모터에는 MyoD가 결합하는 E-box를 가지고 있다는 것을 보여준다. A. CEMI의 전사에는 E2와 E3가 필수적이다. 다양한 CEMI 프로모터 돌연변이-루시퍼레이즈 융합 유전자를 C2C12 근육모세포에서 16시간 발현시킨 후 48시간 동안 근육분화를 유도하였다. 최종적으로 루시퍼레이즈 활성을 측정하여 CEMI 프로모터 돌연변이의 전사 능력을 조사하였다. B-D. MyoD는 CEMI 프로모터 활성화에 필수적인 전사인자이다. E1, E2, E3를 포함하고 있는 CEMI 프로모터 유전자와 MyoD, Myf5, Myogenin, 또는 Mrf4 유전자를 C2C12 근육모세포(B), NIH 3T3 세포(C), 293 세포(D)에서 48시간 동안 발현시킨 후 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. E. MyoD는 CEMI의 E2와 E3에 결합함을 CHIP assay로 확인하였다. B, myoblast(근육모세포); T, myotube(근육대롱세포)
- <116> 도 14는 CEMI 프로모터 활성화는 AKT의 활성화가 필수적이라는 것을 보여준다. A. E2-E3를 포함하고 있는 CEMI 프로모터-루시퍼레이즈 융합 유전자를 C2C12 근육모세포에 24 시간 발현시킨 후 근육대롱세포로 근육분화를 24 시간 동안 유도하였다. 근육분화를 유도할 때 PI3K 억제제(LY294002, 10 μM), mTOR 억제제(rapamycin, 100 nM), GSK3β 억제제(LiCl, 5 mM), MAPK 억제제(PD98059, 10 μM)를 처리한 후 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. B. E2-E3를 포함하고 있는 CEMI 프로모터-루시퍼레이즈 융합 유전자와 MyoD 유전자를 C2C12 근육모세포에 24 시간 동안 동시에 발현시킨 후 다양한 약제를 24시간 처리한 후 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. C. E2-E3를 포함하고 있는 CEMI 프로모터-루시퍼레이즈 융합 유전자와 constant active-(CA)-AKT, CA-Foxo1, 또는 CA-GSK3β를 C2C12 근육모세포에 24시간 발현시킨 후 근육대롱세포로 근육분화를 24 시간 동안 유도한 후 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 아래 판넬은 각각의 CA-AKT, CA-Foxo1, CA-GSK3β의 발현양을 western으로 확인한 것이다. D. E2-E3를 포함하고 있는 CEMI 프로모터-루시퍼레이즈 융합 유전자와 SiRNA (Control-SiRNA 또는 AKT1-SiRNA)를 동시에 근육모세포에 24시간 동안 처리한 후 분화를 24시간 동안 유도한 후 루시퍼레이즈 활성을 측정하였다. 아래 판넬은 AKT1의 발현양을 western으로 확인한 것이다.

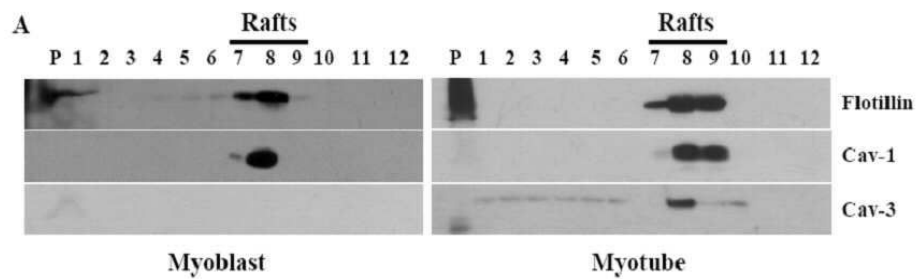
<117> 도 15는 TRIM72가 근육분화 또는 비대를 억제하는 음성적 되먹임 조절자임을 설명하는 모델을 도시한 것이다.

도면

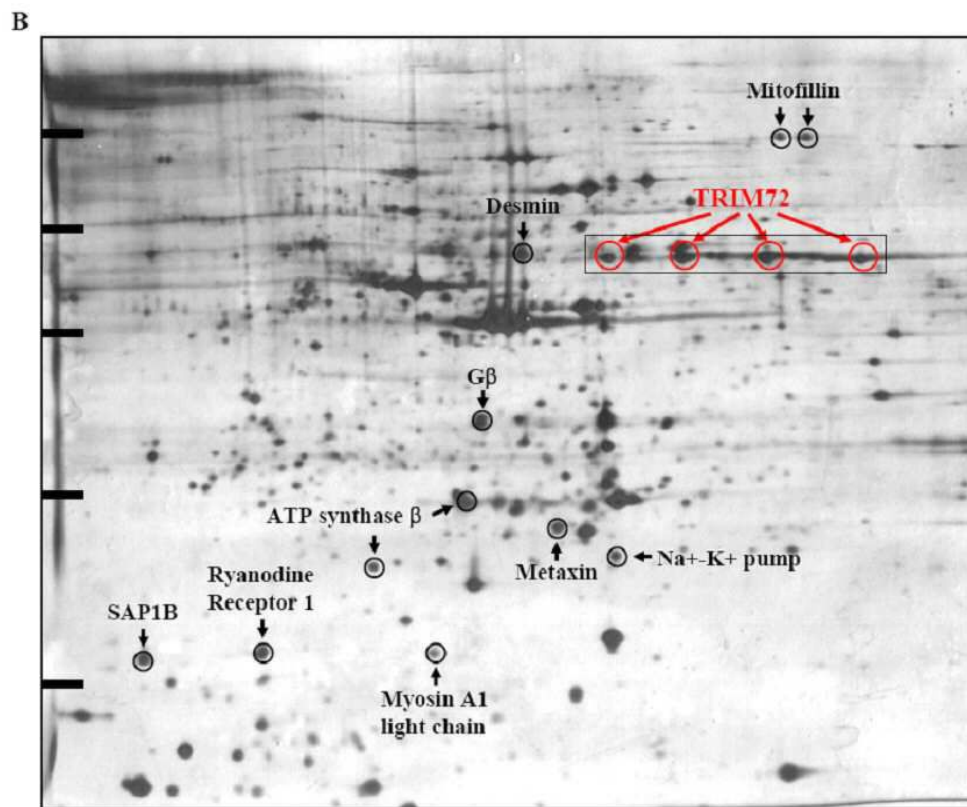
도면1



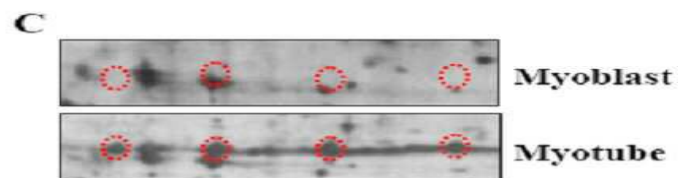
도면2a



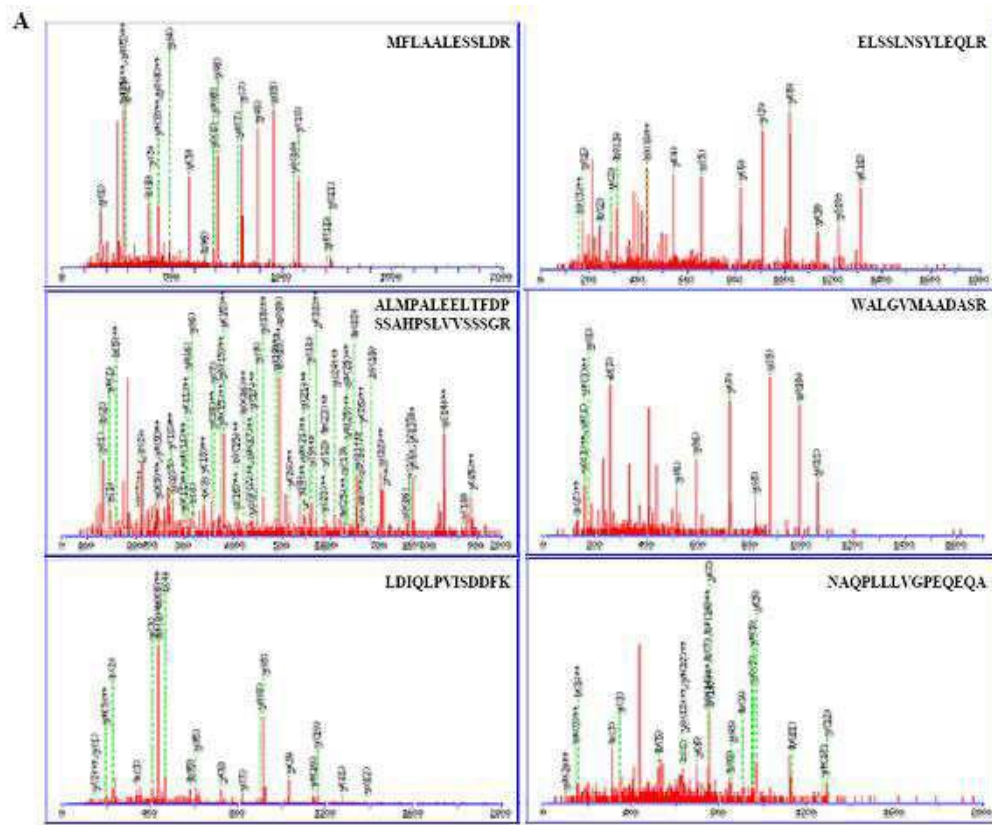
도면2b



도면2c



도면3a

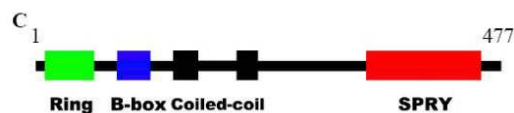


도면3b

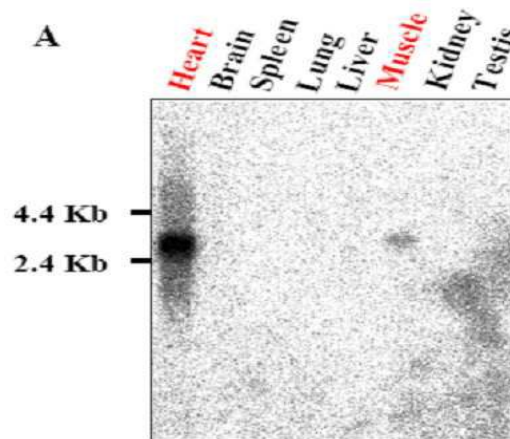
B

MSAAPGLLRQELSCPLCLQLFDPVTAECGHSFCRACLIRVAGEPAADGTVACPCCQAPTRPQ
 ALSTNLQLSRLVEGLAQVPOGHCEEHLDPISYCEQDRTLVCGVCSLGSRHGRLLPAEAQ
 ARLKTQLPQQKMLQEQEACMRKEKTVAVLEHQLVEEETVRQFRGAVGEQLGKMR**MFLAAL**
ESSLDREAERVGRDAGVALRR**ELSSLNSYLEQL**ROMEKVI EEVADKPQTEFLMKFCLVTSRL
 QKILSESPPPAR**LDIQLPVISDDFK**FQVWKKMFRAL**MPALEELTFDPSSAHPSLVSSSGRRV**
 ECSQKAPPAGEDTRQFDKAVAVVAQQLSQGEHYWEVEVGDKPR**WALGVMAADASRRG**
 RLHAVPSQGLWLLGLRDGKILEAHVEAKEPRALRTPERPPARIGLYLSFADGVLAFYDASNP
 VLTPIFSHERLPGPVYPIFDVCWHDKGK**NAQPLLLVGPEQEQA**

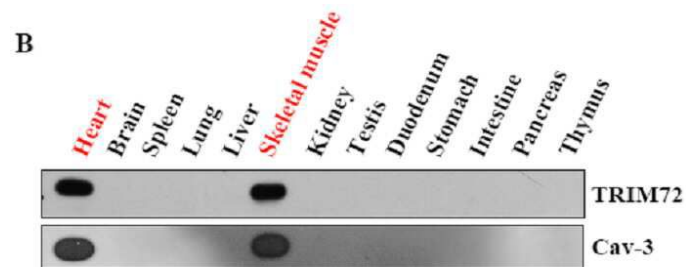
도면3c



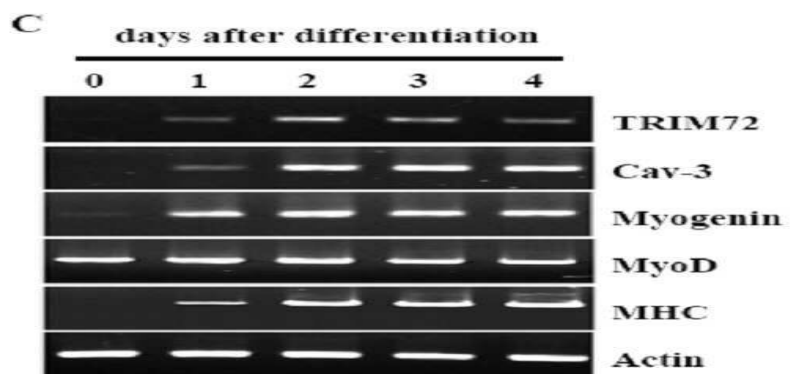
도면4a



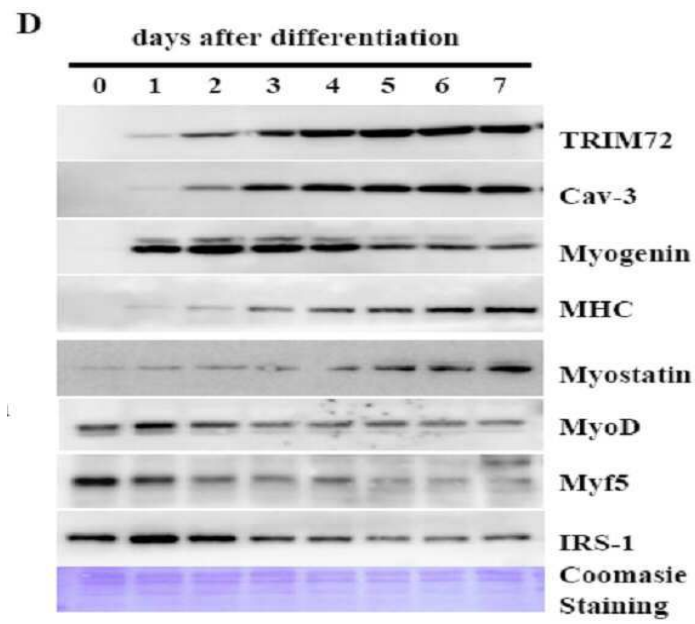
도면4b



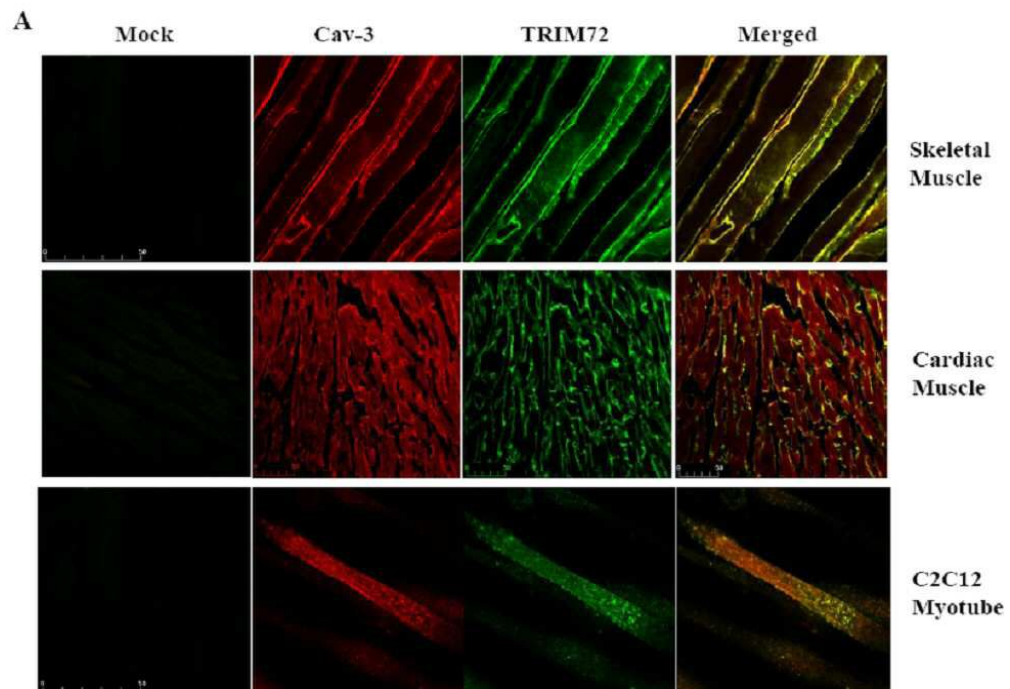
도면4c



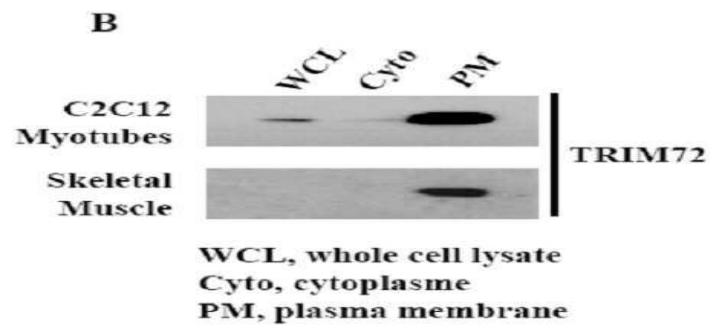
도면4d



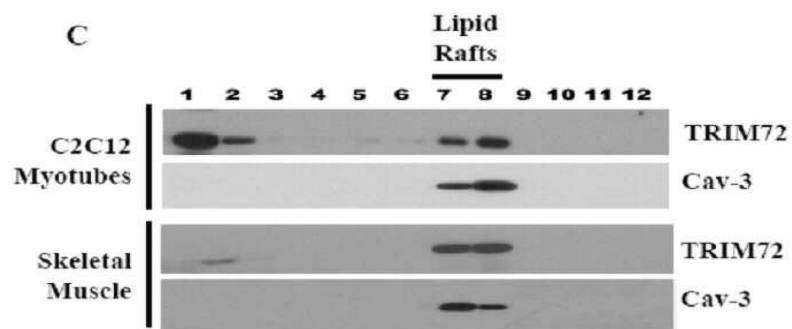
도면5a



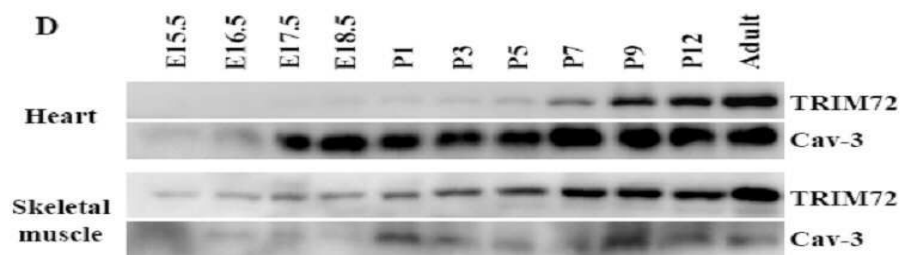
도면5b



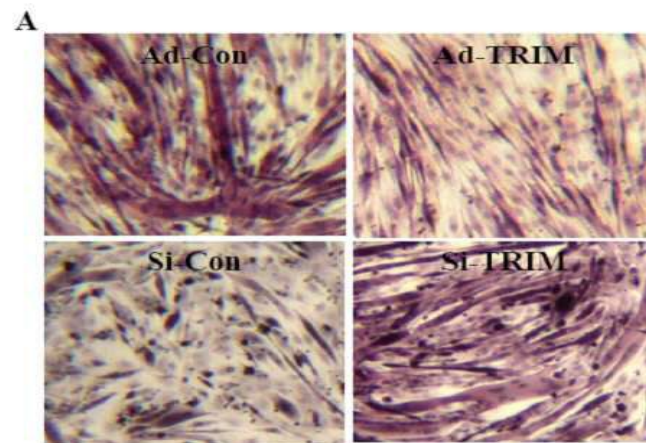
도면5c



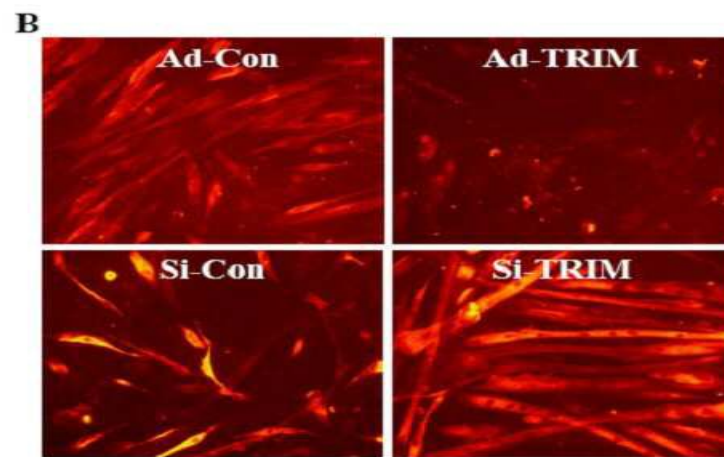
도면5d



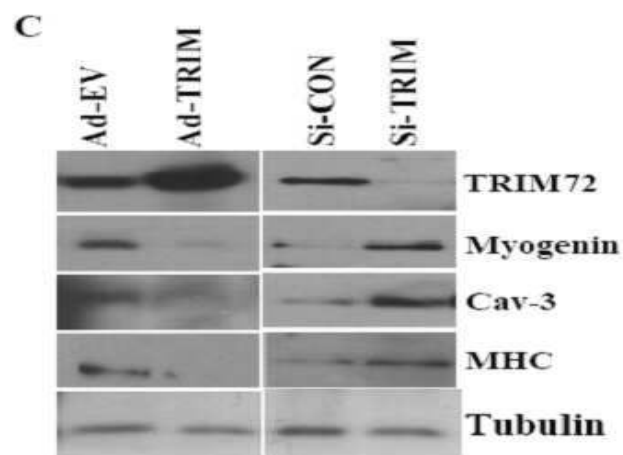
도면6a



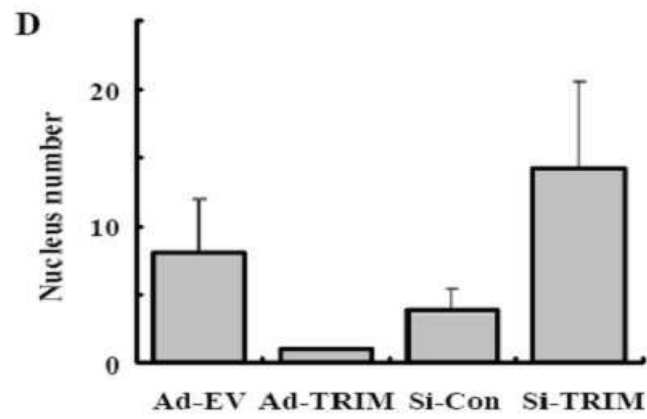
도면6b



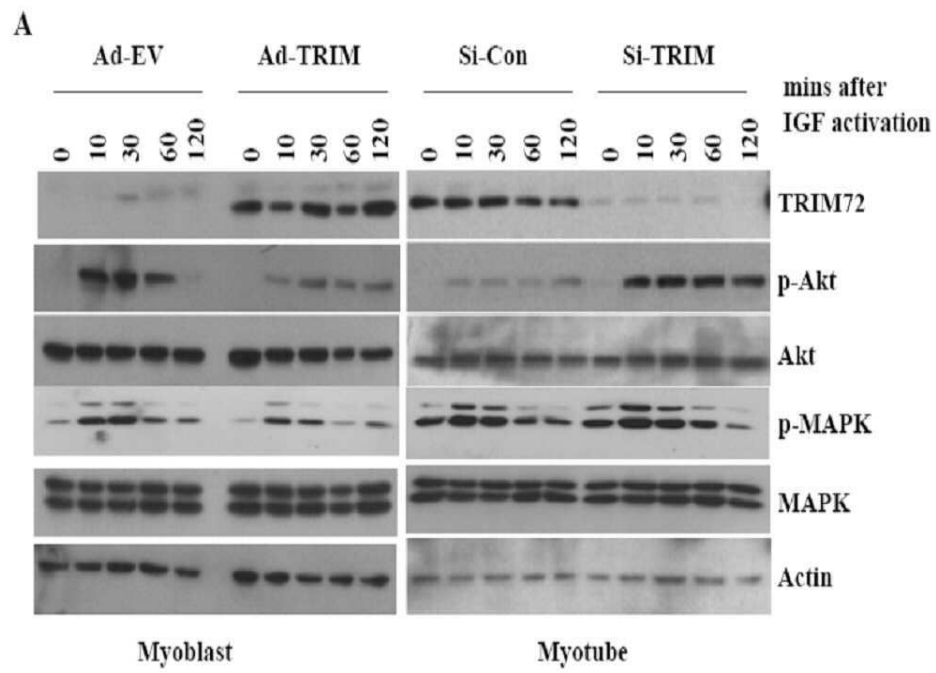
도면6c



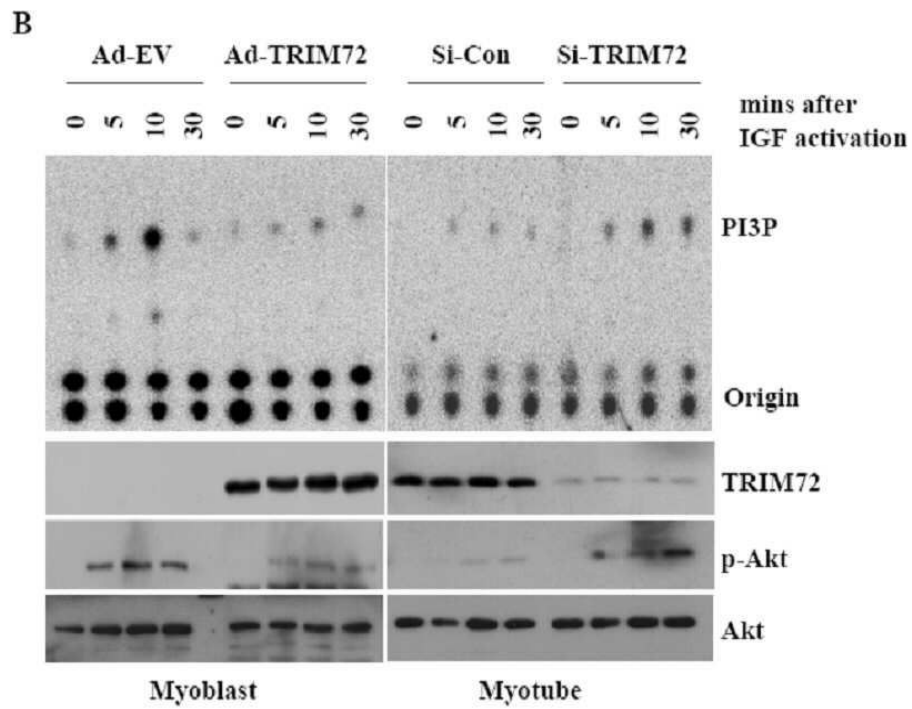
도면6d



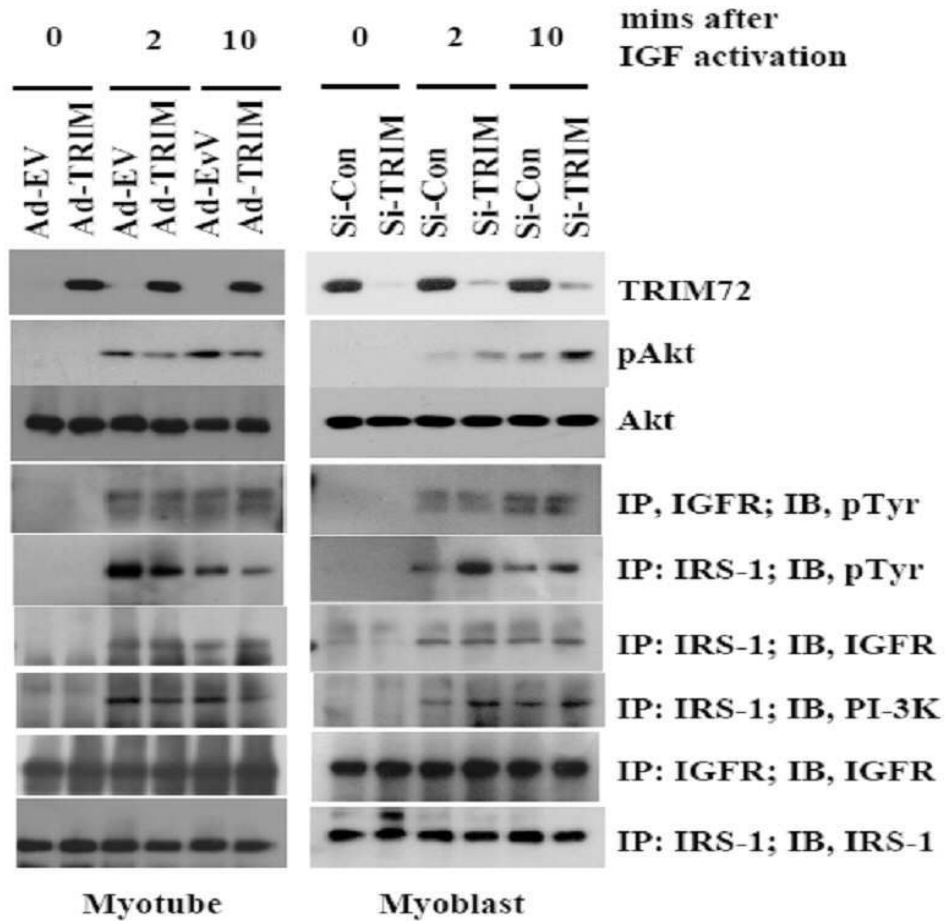
도면7a



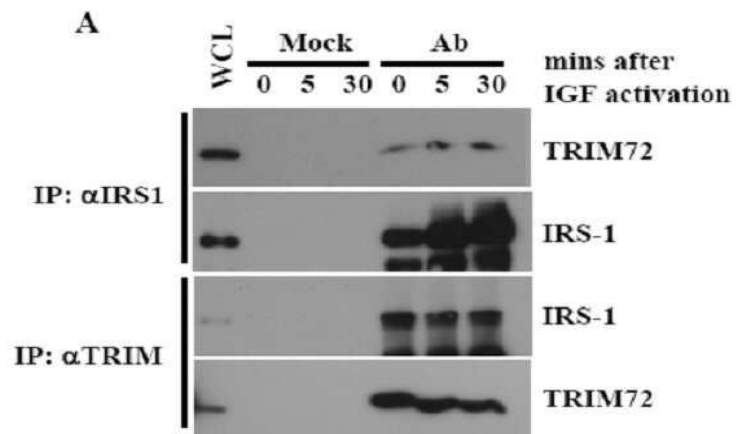
도면7b



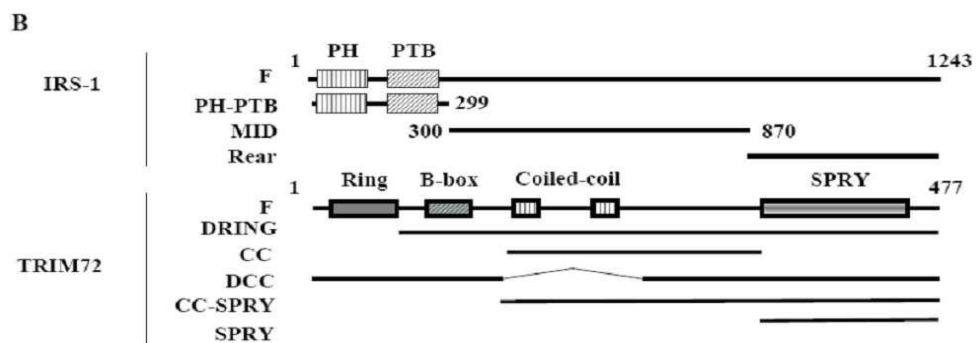
도면8



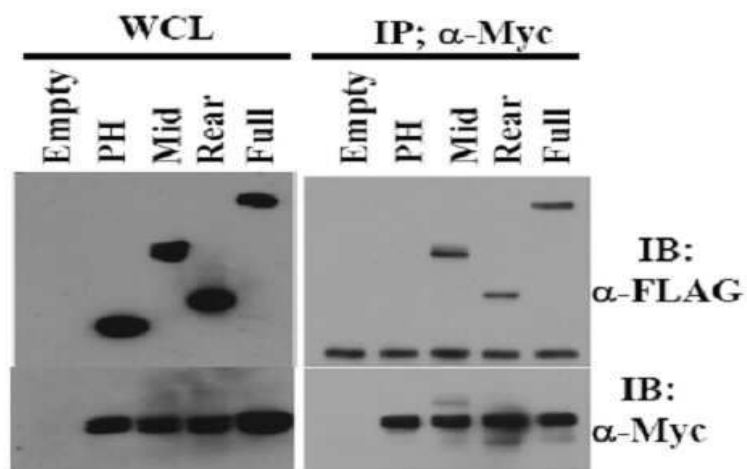
도면9a



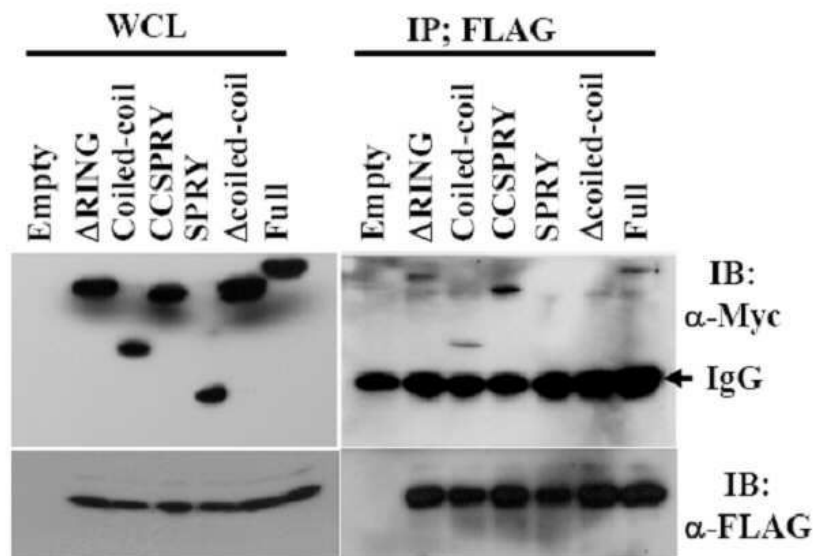
도면9b



도면9c



도면9d

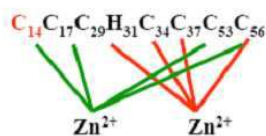


도면10a

A
Consensus Sequence of Ring Finger Domain, Zn^{2+} binding site
CX2CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)C/HX2CX(4-48)CX2C

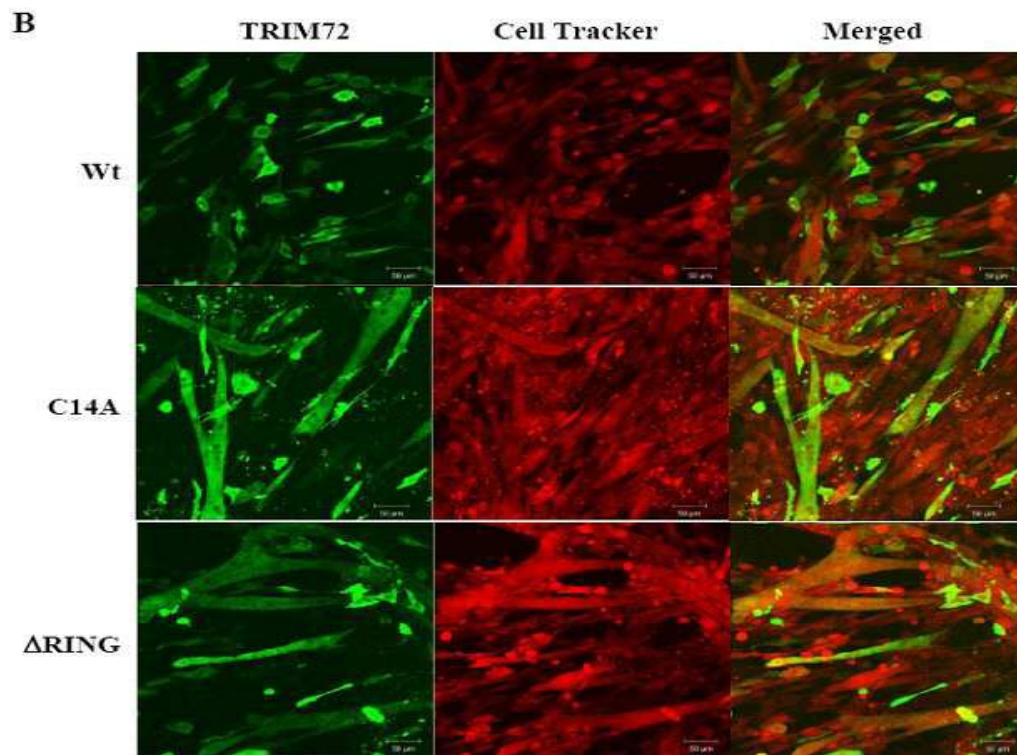
TRIM72 sequence

MSAAPGLLHQELSCLCLQLFDAPVTAECHHSFCRACLGRVAGEPAADGTVLCPCQCAPT
RPQALSTNLQLARLVEGLAQVPQGHCEEHLDPISYCEQDRALVCGVCASLGSHRGHRLLP
AAEAHARLKTQLPQQKLQLQEACMRKEKSVAVLEHQLVVEETVRQFRGAVGEQLGKMR
VFLAALEGLSDCEAERVGEAGVALRRELGSLSYQLRQMEKVLEEVADKPQTEFLMK
YCLVTSRLQKILAESPPPARLDIQLPIISDDFKFQVWRKMFRLMPALEELTFDPSSAHPSLV
VSSSGRRVECEQKAPPAGEDPRQFDKAVAVVAHQQLSEGEHYWEVDVGDKPRWALGVI
AAEAPRRGRRLHAVPSQGLWLLGLREGKILEAHVEAKEPRALRSPERRPTRIGLYLSFGDGV
LSFYDASDADALVPLFAFHERLPRPVYPFFDVCWHDKGKNAQPLLLVGPEGAEA

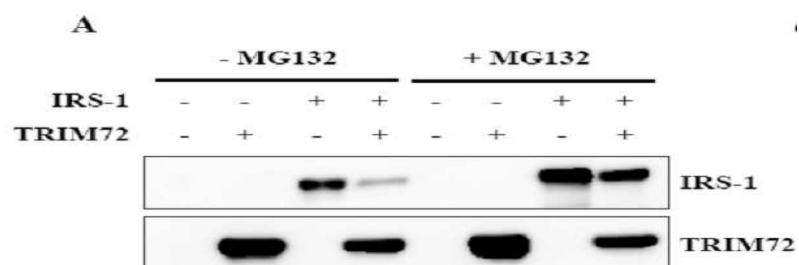


Cellular phenotype of ΔRING or
C14A TRIM72 mutant in myogenesis?

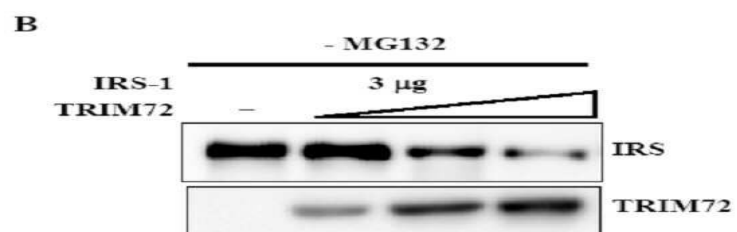
도면10b



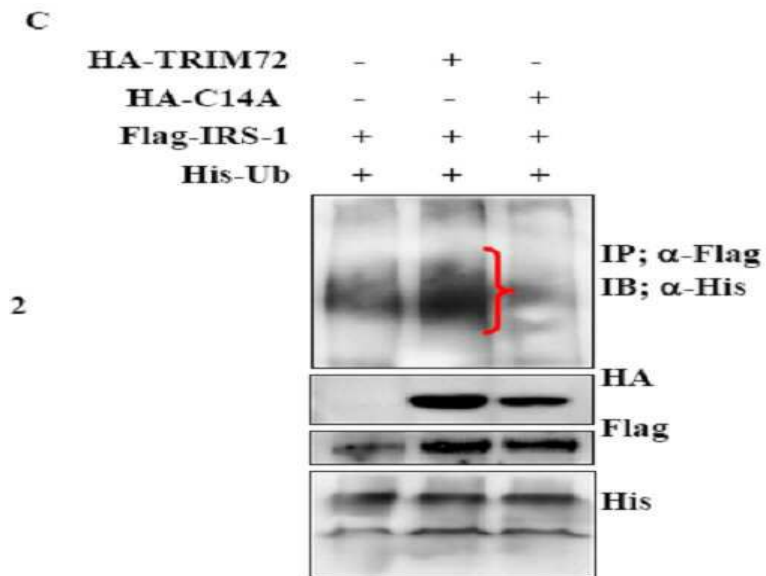
도면11a



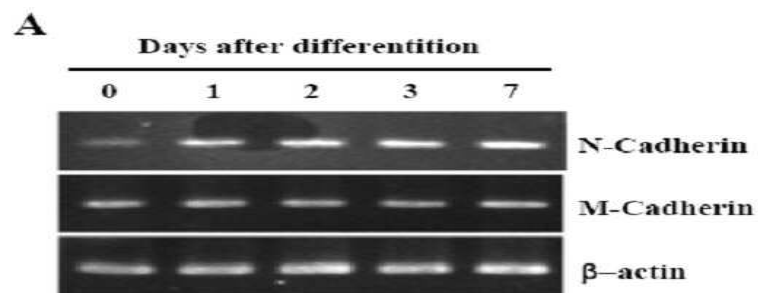
도면11b



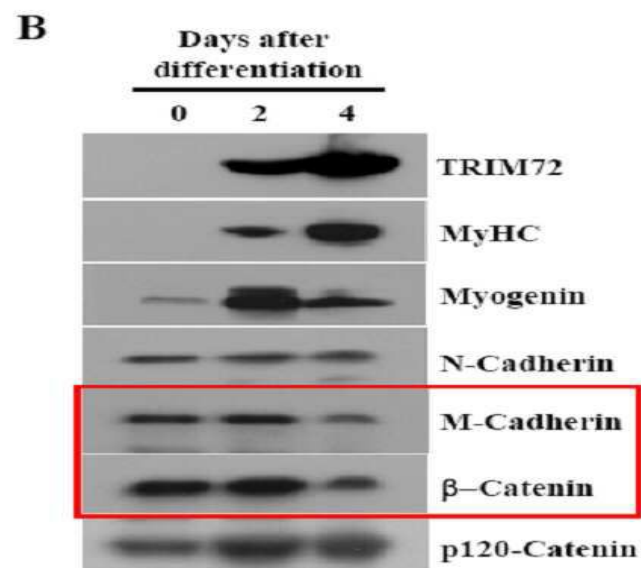
도면11c



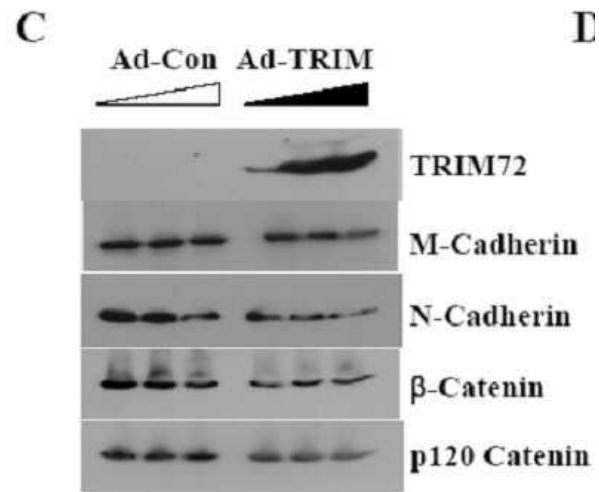
도면12a



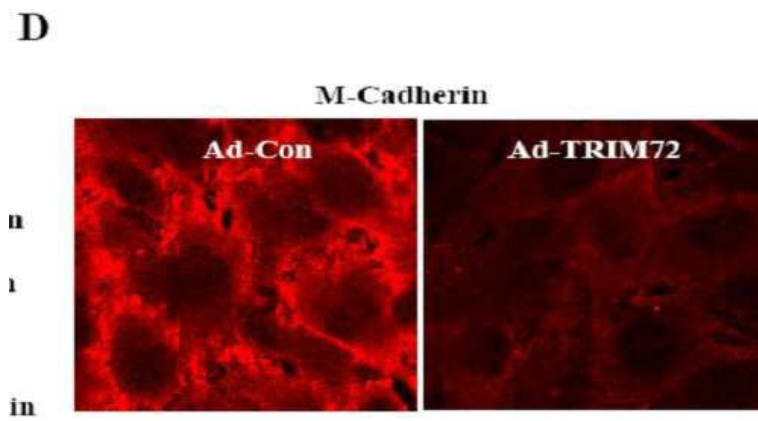
도면12b



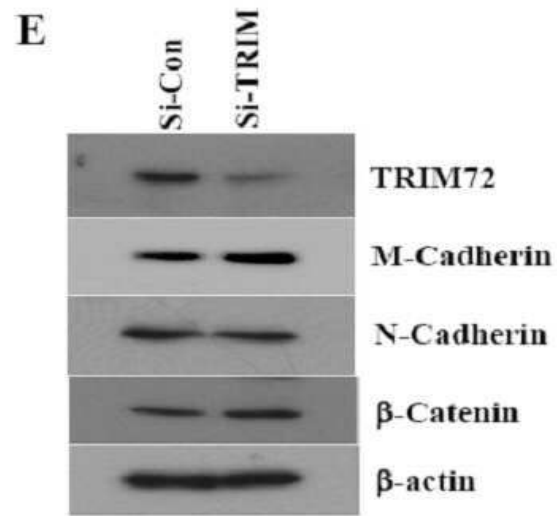
도면12c



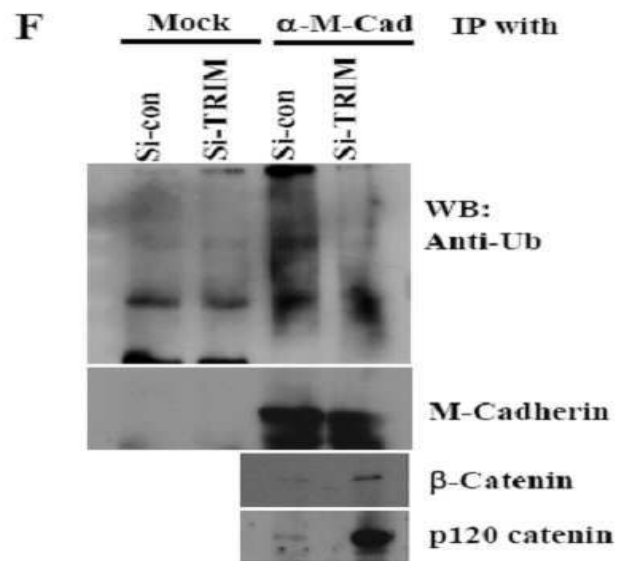
도면12d



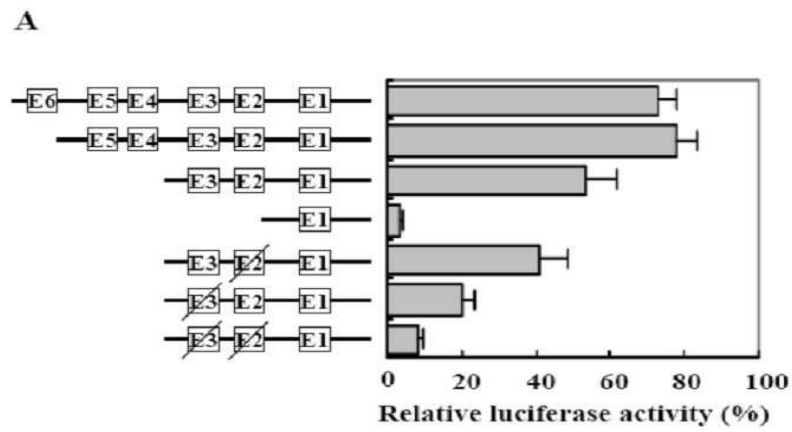
도면12e



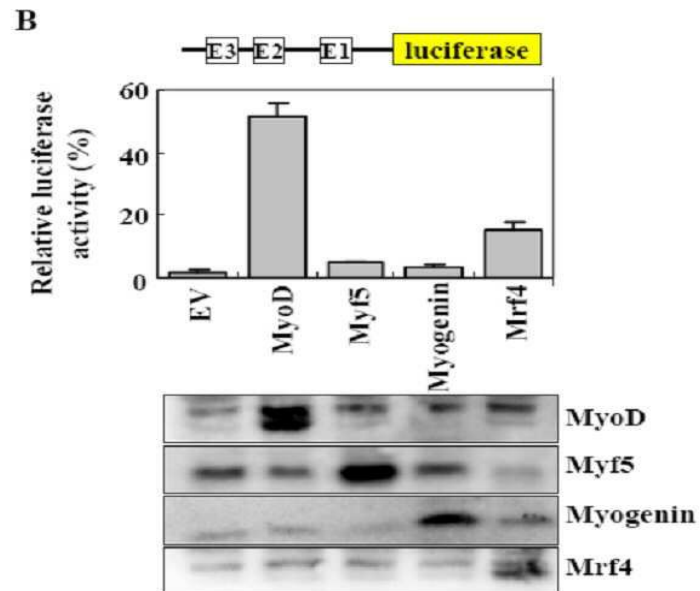
도면12f



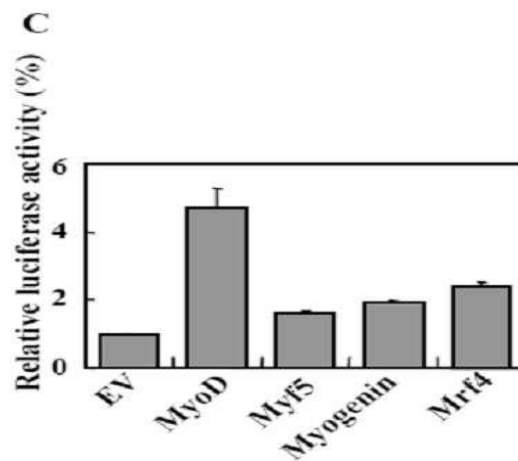
도면13a



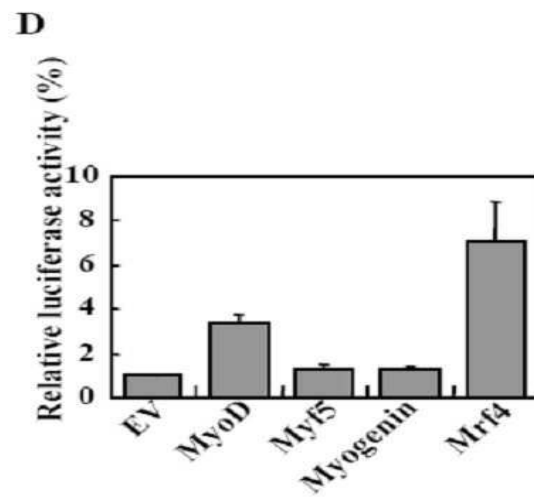
도면13b



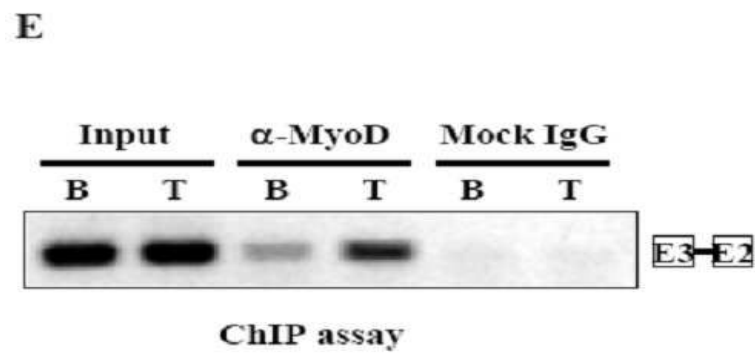
도면13c



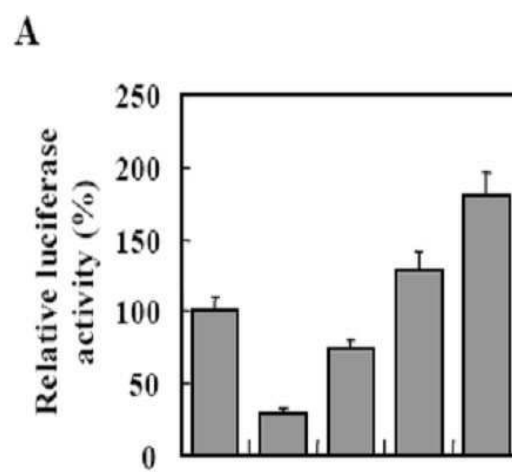
도면13d



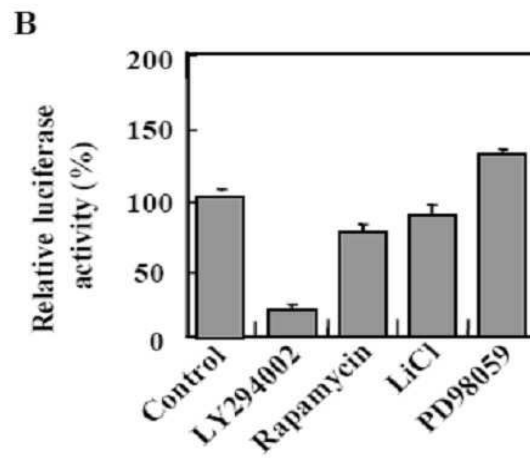
도면13e



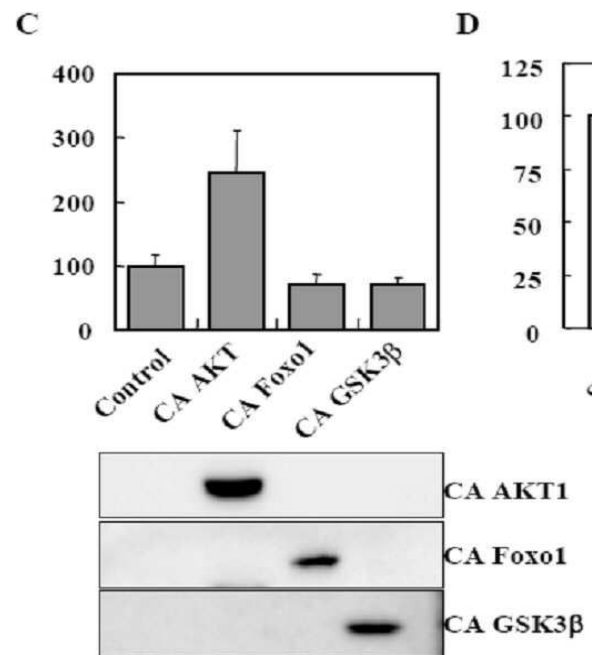
도면14a



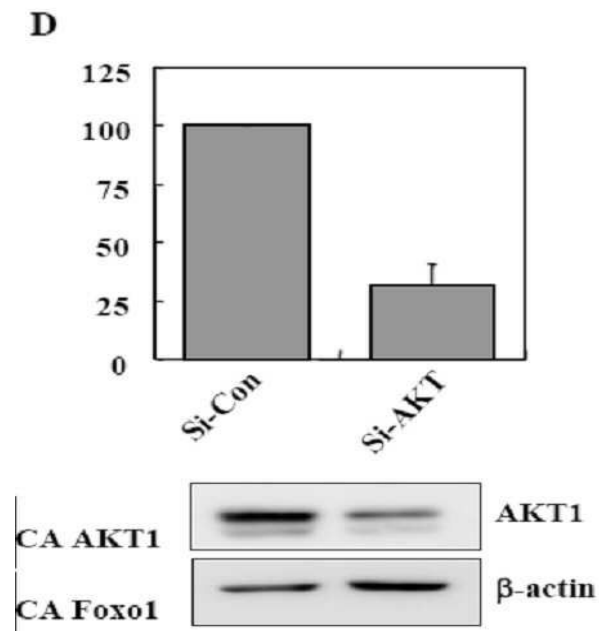
도면14b



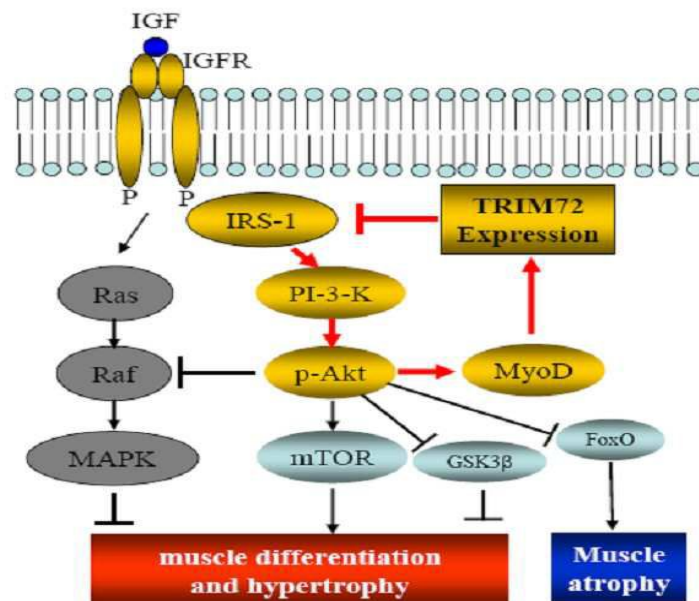
도면14c



도면14d



도면15



서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
- <120> Use of TRIM72 as a target for muscle and heart enhancer

<160> 10

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 477

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met Ser Ala Ala Pro Gly Leu Leu Arg Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
1 5 10 15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Cys Gly His Ser
20 25 30

Phe Cys Arg Ala Cys Leu Ile Arg Val Ala Gly Glu Pro Ala Ala Asp
35 40 45

Gly Thr Val Ala Cys Pro Cys Cys Gln Ala Pro Thr Arg Pro Gln Ala
50 55 60

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Leu Ser Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
65 70 75 80

Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
85 90 95

Cys Glu Gln Asp Arg Thr Leu Val Cys Gly Val Cys Ala Ser Leu Gly
100 105 110

Ser His Arg Gly His Arg Leu Leu Pro Ala Ala Glu Ala Gln Ala Arg
115 120 125

Leu Lys Thr Gln Leu Pro Gln Gln Lys Met Gln Leu Gln Glu Ala Cys
130 135 140

Met Arg Lys Glu Lys Thr Val Ala Val Leu Glu His Gln Leu Val Glu
145 150 155 160

Val Glu Glu Thr Val Arg Gln Phe Arg Gly Ala Val Gly Glu Gln Leu
165 170 175

Gly Lys Met Arg Met Phe Leu Ala Ala Leu Glu Ser Ser Leu Asp Arg

180	185	190
Glu Ala Glu Arg Val Arg Gly Asp Ala Gly Val Ala Leu Arg Arg Glu		
195	200	205
Leu Ser Ser Leu Asn Ser Tyr Leu Glu Gln Leu Arg Gln Met Glu Lys		
210	215	220
Val Leu Glu Glu Val Ala Asp Lys Pro Gln Thr Glu Phe Leu Met Lys		
225	230	235
Phe Cys Leu Val Thr Ser Arg Leu Gln Lys Ile Leu Ser Glu Ser Pro		
245	250	255
Pro Pro Ala Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Val Ile Ser Asp Asp Phe		
260	265	270
Lys Phe Gln Val Trp Lys Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro Ala Leu		
275	280	285
Glu Glu Leu Thr Phe Asp Pro Ser Ser Ala His Pro Ser Leu Val Val		
290	295	300
Ser Ser Ser Gly Arg Arg Val Glu Cys Ser Asp Gln Lys Ala Pro Pro		
305	310	315
Ala Gly Glu Asp Thr Arg Gln Phe Asp Lys Ala Val Ala Val Val Ala		
325	330	335
Gln Gln Leu Leu Ser Gln Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly		
340	345	350
Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Met Ala Ala Asp Ala Ser Arg		
355	360	365
Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly		
370	375	380
Leu Arg Asp Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro		
385	390	395
Arg Ala Leu Arg Thr Pro Glu Arg Pro Pro Ala Arg Ile Gly Leu Tyr		
405	410	415

Leu Ser Phe Ala Asp Gly Val Leu Ala Phe Tyr Asp Ala Ser Asn Pro
420 425 430

Asp Val Leu Thr Pro Ile Phe Ser Phe His Glu Arg Leu Pro Gly Pro
435 440 445

Val Tyr Pro Ile Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
450 455 460

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Glu Gln Glu Gln Ala
465 470 475

<210> 2
<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ser Ala Ala Pro Gly Leu Leu His Gln Glu Leu Ser Cys Pro Leu
1 5 10 15

Cys Leu Gln Leu Phe Asp Ala Pro Val Thr Ala Glu Cys Gly His Ser
20 25 30

Phe Cys Arg Ala Cys Leu Gly Arg Val Ala Gly Glu Pro Ala Ala Asp
35 40 45

Gly Thr Val Leu Cys Pro Cys Cys Gln Ala Pro Thr Arg Pro Gln Ala
50 55 60

Leu Ser Thr Asn Leu Gln Leu Ala Arg Leu Val Glu Gly Leu Ala Gln
65 70 75 80

Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
85 90 95

Cys Glu Gln Asp Arg Ala Leu Val Cys Gly Val Cys Ala Ser Leu Gly
100 105 110

Ser His Arg Gly His Arg Leu Leu Pro Ala Ala Glu Ala His Ala Arg
115 120 125

Leu Lys Thr Gln Leu Pro Gln Gln Lys Leu Gln Leu Gln Glu Ala Cys

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

Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly
370 375 380

Leu Arg Glu Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
385 390 395 400

Arg Ala Leu Arg Ser Pro Glu Arg Arg Pro Thr Arg Ile Gly Leu Tyr
405 410 415

Leu Ser Phe Gly Asp Gly Val Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Asp Ala
420 425 430

Asp Ala Leu Val Pro Leu Phe Ala Phe His Glu Arg Leu Pro Arg Pro
435 440 445

Val Tyr Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
450 455 460

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Glu Gly Ala Glu Ala
465 470 475

<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TRIM72 siRNA

<400> 3
uucgugcgga guucuguguc g

21

<210> 4
<211> 397
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
1 5 10 15

Cys Glu Gln Asp Arg Thr Leu Val Cys Gly Val Cys Ala Ser Leu Gly

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

Gln Gln Leu Leu Ser Gln Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly
260 265 270

Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Met Ala Ala Asp Ala Ser Arg
275 280 285

Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly
290 295 300

Leu Arg Asp Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
305 310 315 320

Arg Ala Leu Arg Thr Pro Glu Arg Pro Pro Ala Arg Ile Gly Leu Tyr
325 330 335

Leu Ser Phe Ala Asp Gly Val Leu Ala Phe Tyr Asp Ala Ser Asn Pro
340 345 350

Asp Val Leu Thr Pro Ile Phe Ser Phe His Glu Arg Leu Pro Gly Pro
355 360 365

Val Tyr Pro Ile Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
370 375 380

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Glu Gln Glu Gln Ala
385 390 395

<210> 5
<211> 397
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Val Pro Gln Gly His Cys Glu Glu His Leu Asp Pro Leu Ser Ile Tyr
1 5 10 15

Cys Glu Gln Asp Arg Ala Leu Val Cys Gly Val Cys Ala Ser Leu Gly
20 25 30

Ser His Arg Gly His Arg Leu Leu Pro Ala Ala Glu Ala His Ala Arg
35 40 45

Leu Lys Thr Gln Leu Pro Gln Gln Lys Leu Gln Leu Gln Glu Ala Cys

50	55	60
Met Arg Lys Glu Lys Ser Val Ala Val Leu Glu His Gln Leu Val Glu		
65	70	75 80
Val Glu Glu Thr Val Arg Gln Phe Arg Gly Ala Val Gly Glu Gln Leu		
	85	90 95
Gly Lys Met Arg Val Phe Leu Ala Ala Leu Glu Gly Ser Leu Asp Cys		
	100	105 110
Glu Ala Glu Arg Val Arg Gly Glu Ala Gly Val Ala Leu Arg Arg Glu		
	115	120 125
Leu Gly Ser Leu Asn Ser Tyr Leu Glu Gln Leu Arg Gln Met Glu Lys		
	130	135 140
Val Leu Glu Glu Val Ala Asp Lys Pro Gln Thr Glu Phe Leu Met Lys		
	145	150 155 160
Tyr Cys Leu Val Thr Ser Arg Leu Gln Lys Ile Leu Ala Glu Ser Pro		
	165	170 175
Pro Pro Ala Arg Leu Asp Ile Gln Leu Pro Ile Ile Ser Asp Asp Phe		
	180	185 190
Lys Phe Gln Val Trp Arg Lys Met Phe Arg Ala Leu Met Pro Ala Leu		
	195	200 205
Glu Glu Leu Thr Phe Asp Pro Ser Ser Ala His Pro Ser Leu Val Val		
	210	215 220
Ser Ser Ser Gly Arg Arg Val Glu Cys Ser Glu Gln Lys Ala Pro Pro		
	225	230 235 240
Ala Gly Glu Asp Pro Arg Gln Phe Asp Lys Ala Val Ala Val Val Ala		
	245	250 255
His Gln Gln Leu Ser Glu Gly Glu His Tyr Trp Glu Val Asp Val Gly		
	260	265 270
Asp Lys Pro Arg Trp Ala Leu Gly Val Ile Ala Ala Glu Ala Pro Arg		
	275	280 285

Arg Gly Arg Leu His Ala Val Pro Ser Gln Gly Leu Trp Leu Leu Gly
290 295 300

Leu Arg Glu Gly Lys Ile Leu Glu Ala His Val Glu Ala Lys Glu Pro
305 310 315 320

Arg Ala Leu Arg Ser Pro Glu Arg Arg Pro Thr Arg Ile Gly Leu Tyr
325 330 335

Leu Ser Phe Gly Asp Gly Val Leu Ser Phe Tyr Asp Ala Ser Asp Ala
340 345 350

Asp Ala Leu Val Pro Leu Phe Ala Phe His Glu Arg Leu Pro Arg Pro
355 360 365

Val Tyr Pro Phe Phe Asp Val Cys Trp His Asp Lys Gly Lys Asn Ala
370 375 380

Gln Pro Leu Leu Leu Val Gly Pro Glu Gly Ala Glu Ala
385 390 395

<210> 6
<211> 1269
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TRIM 72 promoter

<400> 6
gagctttgca atatctggga ctgcaagaat gttctagata gaggggtggc aaggacaaag 60

tcctcgaggg gccagggcgg ggggaagggt gaggtacagg tcagggcagt gaatggggcc 120

agatgggaat aaattgtagg tcataaggaa gactttgatt tttattctga ttaaaattta 180

tattaacat cgaagataa gctattaaga aagcctggtg cttccagcgg ggcaagctcc 240

agttctgagc ttagactct ggtttcagtt cattcattta actacttacc attcattctc 300

caagcatttg gggggacggg gtgcattgtt tcagggccta tgctagaaaa tagggggaaa 360

taccctcacc tgccttccca caggtaggagt tagcaccatt agcgtaaagt gttgggaaat	420
gaataggtta accaacaatg tcaaggagga aggaagccag agtggaagt ctgtaggag	480
aggggcagcc atgcttgccc actgattcta agctctagcc tggcctgagg aaaggactag	540
gccaggccag gatgtctcct actgactgct cacactccac attagaaca gtttcccgaa	600
agctgtggga gggagtgggt aggacagcta aatatagttc ttgggccact gaactatctg	660
ggagggtgtc cactataatgc ctatcacctg ttgcatccac ccactgccat ctggccctga	720
atccctgccc ttgcattgag cctgtctgctt gcttcttgct tgtcttgac acaactccga	780
tcacctgct gttagacctg aacctgactg gtctctctgg gactcttttt tggcctaagt	840
tctcccacca gacttgtgag tctgtgggc cttagatat gggggaggag agggctgggt	900
atttgagaga ggtcagtggg aggtcaattg gagaggggat tctagtaaat tccagaagag	960
tgaaggtcca gacctaggtc acagactgaa gcctgggcta aatcagtagc aaggagtgtg	1020
tggagtgggt aaccggggct gataaatgcc tagttgggtc acatttggtt ttatctgggc	1080
tgagaatggc gatatactg cccactctgg gacgacacca catctcttt accagatggt	1140
caaaaccaga ttctcttcca gtgtgggatg tgaggtagtt acaggatggg gctctgactg	1200
cggggccaca gaccagtggt aggattgagc tggaattctt gtaatggac tctcttccc	1260
aggctcacc	1269

<210> 7
 <211> 1144
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> TRIM 72 promoter

<400> 7

ggaataaatt gtaggtcata aggaagacit tgatTTTTat tctgattaaa atttatatta	60
accatcgaaa gataagctat taagaaagcc tggTgcttcc agcggggcaa gctccagttc	120
tgagctgtag actctggttt cagttcattc atttaactac ttaccattca ttctccaagc	180
atttgggggg acggggtgca ttgtttcagg gcctatgcta gaaaataggg ggaaataccc	240
tcacctgcct tcccacaggt ggagttagca ccattagcgt aagtggttgg gaaatgaata	300
ggttaaccaa caatgtcaag gaggaaggaa gccagagtgg aagtgctgta gggagagggg	360
cagccatgct tgccactga ttctaagctc tagcctggcc tgaggaaagg actaggccag	420
gccaggatgt ctctactga ctgtcacac tccacattta gaacagtttc ccgaaagctg	480
tgggagggag tgggtaggac agctaaatat agttcttggg ccactgaact atctgggagg	540
gtgtccacta tatgcctatc acctgttgca tccaccact gccatctggc cctgaatccc	600
tgcccttgca ttgagcctgc tgettgttc ttgettgtct tggacacaac tccgatcacc	660
ctgctgttag acctgaacct gactggctct cctgggagtc tttttggcc taagtctcc	720
caccagactt gtgagtcctg tgggccttga gatatggggg aggagagggc tgggtatttg	780
agagaggta gtgggaggtc aattggagag gggattctag taaattccag aagagtgaag	840
gtccagacct aggtcacaga ctgaagcctg ggctaaatca gtagcaagga gtttgggag	900
tgggtaaccg gggctgataa atgcctagtt ggttcacatt tgtttttatc tgggctgaga	960
atggcgatat acgtgccac tctgggacga caccacatcc tctttaccag atggtcaaaa	1020
ccagattctc ttccagtgtg ggatgtgagg tagttacagg atggggctct gactgcgggg	1080

ccacagacc	agttaggat	tgagctggaa	ttcttgtaat	gggactcctc	ttcccaggt	1140
cacc						1144
<210>	8					
<211>	883					
<212>	DNA					
<213>	Artificial Sequence					
<220>						
<223>	TRIM 72 promoter					
<400>	8					
gagttagcac	cattagcgta	agtggttggg	aaatgaatag	gttaaccaac	aatgtcaagg	60
aggaaggaag	ccagagtgga	agtgcctgtag	ggagaggggc	agccatgctt	gccactgat	120
tctaagctct	agcctggcct	gaggaaagga	ctaggccagg	ccaggatgtc	tctactgac	180
tgctcacact	ccacatttag	aacagtttcc	cgaagctgt	gggagggagt	gggtaggaca	240
gctaaatata	gttcttgggc	cactgaacta	tctgggaggg	tgtccactat	atgcctatca	300
cctgttgcat	ccaccactg	ccatctggcc	ctgaatccct	gcccttgcat	tgagcctgct	360
gcttgcttct	tgcttgctt	ggacacaact	ccgatcacc	tgctgttaga	cctgaacctg	420
actggctcct	ctgggagct	ttttggcct	aagttctccc	accagacttg	tgagtcctgt	480
gggccttgag	atatggggga	ggagagggct	gggtatttga	gagaggtcag	tgggaggtca	540
attggagagg	ggattctagt	aaattccaga	agagtgaagg	tccagaccta	gttcacagac	600
tgaagcctgg	gctaaatcag	tagcaaggag	tttgtggagt	gggtaaccgg	ggctgataaa	660
tgcttagttg	ggtcacattt	gtttttatct	gggctgagaa	tggcgatata	cgtgccact	720
ctgggacgac	accacatcct	ctttaccaga	tgggtcaaac	cagattctct	tccagtgtgg	780

gatgtgaggt agttacagga tggggctctg actgcggggc cacagacca gtgtaggatt	840
gagctggaat tcttgtaatg ggactcctct tcccaggctc acc	883
<210> 9	
<211> 883	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> E2 mutant TRIM72 promoter	
<400> 9	
gagttagcac cattagcgtg agtggttggg aaatgaatag gttaccaac aatgtcaagg	60
aggaaggaag ccagagtgga agtgctgtag ggagaggggc agccatgctt gccactgat	120
tctaagctct agcctggcct gaggaagga ctaggccagg ccaggatgtc tctactgac	180
tgctcacact ccacatttag aacagtttcc cgaaagctgt gggagggagt gggtaggaca	240
gctaaatata gtctttgggc cactgaacta tctgggaggg tgtccactat atgcctatca	300
cctgttgcac ccaccactg caatcttgcc ctgaatccct gcccttgcac tgagcctgct	360
gcttgcttct tgcttgcttt ggacacaact ccgatcacc tgctgttaga cctgaacctg	420
actggctctc ctgggagctt tttttggcct aagttctccc accagacttg tgagtcctgt	480
gggccttgag atatggggga ggagagggtt gggtatttga gagaggtcag tgggaggcca	540
attggagagg ggattctagt aaattccaga agagtgaagg tccagaccta ggtcacagac	600
tgaagcctgg gctaaatcag tagcaaggag tttgtggagt gggtaacgg ggctgataaa	660
tgcttagttg ggtcacattt gtttttatct gggtgagaa tggcgatata cgtgccact	720
ctgggacgac accacatcct ctttaccaga tggtaaaaac cagattctct tccagtgtgg	780

gatgtgaggt agttacagga tggggctctg actgcggggc cacagacca gtgtaggatt	840
gagctggaat tcttgtaatg ggactcctct tcccaggctc acc	883
<210> 10	
<211> 883	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> E3 mutant TRIM72 promoter	
<400> 10	
gagttagcac cattagcgtg agtggttggg aaatgaatag gttaccaac aatgtcaagg	60
aggaaggaag ccagagtgga agtgctgtag ggagaggggc agccatgctt gccactgat	120
tctaagctct agcctggcct gaggaagga ctaggccagg ccaggatgtc tctactgac	180
tgctcacact ccacatttag aacagtttcc cgaaagctgt gggagggagt gggtaggaca	240
gctaaatata gtctttgggc cactgaacta tctgggaggg tgtccactat atgcctataa	300
ccttttgcac ccaccactg caatcttgcc ctgaatccct gcccttgcac tgagcctgct	360
gcttgcttct tgcttgcttt ggacacaact ccgatcacc tgctgttaga cctgaacctg	420
actggctctc ctgggagctt tttttggcct aagttctccc accagacttg tgagtcctgt	480
gggccttgag atatggggga ggagagggct gggtatttga gagaggtcag tgggaggtca	540
attggagagg ggattctagt aaattccaga agagtgaagg tccagaccta ggtcacagac	600
tgaagcctgg gctaaatcag tagcaaggag tttgtggagt gggtaacgg ggctgataaa	660
tgcttagttg ggtcacattt gtttttatct gggtgagaa tggcgatata cgtgccact	720
ctgggacgac accacatcct ctttaccaga tggtaaaaac cagattctct tccagtgtgg	780

gatgtgaggt agttacagga tggggctctg actgcggggc cacagacca gtgtaggatt 840

gagctggaat tcttgtaatg ggactcctct tcccaggctc acc 883