



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년01월07일
(11) 등록번호 10-0877152
(24) 등록일자 2008년12월26일

(51) Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0068626

(22) 출원일자 2007년07월09일

심사청구일자 2007년07월09일

(56) 선행기술조사문헌

US7056684 B2

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

전병화

대전 서구 둔산동 목련아파트 105-101

이상기

대전 유성구 상대동 평화이지아파트 101-503

박진봉

대전 중구 태평동 버드네아파트 207-1503

(74) 대리인

김원준

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 홍성란

(54) 항암활성을 갖는 세포투과성 p66shc 융합단백질

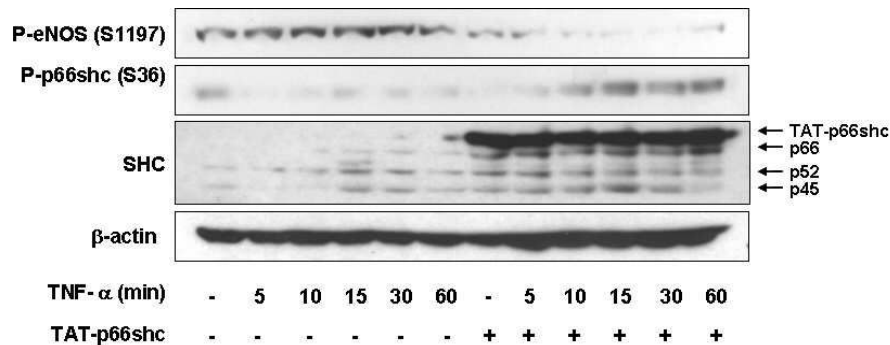
(57) 요약

본 발명은 활성산소의 생성 및 세포의 사멸을 유도하여 암세포의 발생을 억제하는 기능 및 세포 투과 기능을 함께 갖는 융합단백질에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인간의 p66shc 단백질과 Tat (transactivator of transcription) 단백질의 형질도입부위가 융합된 Tat-p66shc 융합단백질에 관한 것이다.

본 발명에 의한 Tat-p66shc 융합단백질은 활성산소의 생성 및 eNOS의 활성을 효율적으로 억제할 수 있어, 활성산소 및 eNOS와 관련한 혈관질환치료법 개발 및 항암제개발에 효과적으로 활용 및 응용될 수 있다.

또한 본 발명의 Tat-p66shc 융합단백질은 질병의 치료 이외에도 화장품 및 건강식품등의 제품개발에 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	R01-2004-000-10045
부처명	한국과학재단
연구사업명	특정기초연구지원사업
연구과제명	세포투과형 p66shc 단백질유도체, 그의 제조방법 및 용도
주관기관	충남대학교
연구기간	2006년 09월 01일 부터 2007년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

인간 p66shc 단백질과 Tat 단백질의 단백질 형질 도입부위가 융합된 서열번호 1의 세포 투과성 융합단백질 Tat-p66shc.

청구항 2

제 1 항의 융합단백질 Tat-p66shc을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 유전자의 서열이 서열번호 2인 것을 특징으로 하는 융합단백질 Tat-p66shc을 코딩하는 유전자.

청구항 4

제 1 항의 융합단백질을 발현시키는 제 2 항 또는 제 3 항의 유전자를 포함하는 발현벡터.

청구항 5

제 4 항의 발현벡터에 의해 형질전환된 대장균 형질전환체(기탁번호 KCTC 11138BP).

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

- <1> 본 발명은 활성산소의 생성 및 세포의 사멸을 유도하여 암세포의 발생을 억제하는 기능 및 세포 투과 기능을 함께 갖는 융합단백질에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인간의 p66shc 단백질과 Tat (transactivator of transcription) 단백질의 형질도입부위가 융합된 Tat-p66shc 융합단백질에 관한 것이다.

배경기술

- <2> p66shc 단백질은 어댑터 단백질의 일종인 ShcA족에 포함된 단백질로 포유동물의 수명을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. p66shc 단백질이 제거된 동물은 수명이 약 30%정도 길어지고, 산화적 자극에 저항한다고 알려져 있다(Migliaccio E et al, The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. Nature. 1999 Nov 18;402(6759):309-13.)
- <3> p66shc 단백질은 미토콘드리아의 활성산소 생성 증가를 유도하며(Trinei et al, A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. Oncogene. 2002 May 30;21(24):3872-8.), 이러한 활성산소의 생성 증가는 p66shc 단백질의 36번째 아미노산인 세린기의 인산화와 밀접한 관련이 있다(Nemoto S & Finkel T. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. Science. 2002 Mar 29;295(5564):2450-2).

- <4> 최근 p66shc 단백질의 발현감소는 내피세포형 일산화질소생성단백의 활성화를 증가시키며 일산화질소의 생성을 증가시킨다는 보고가 있다(Yamamori et al, P66shc regulates endothelial NO production and endothelium-dependent vasorelaxation: implications for age-associated vascular dysfunction. J Mol Cell Cardiol. 2005 Dec;39(6):992-5). p66shc단백의 과발현은 T-세포에서 세포의 고사를 유도하고 발암신호전달을 억제한다는 사실이 보고되고 있다. (Pacini S et al, p66shc promotes apoptosis and antagonizes mitogenic signaling in T cells. Molecular and Cellular Biology, 24(4), 1747-1757, 2004)
- <5> 신호전달연구에 있어 단백질을 과발현시키는 방법으로 아데노바이러스 및 지방체를 이용한 유전인자의 과발현기법이 이용되고 있으나 발현시간이 장시간 필요한 단점이 있다. 최근에는 단백질을 세포내로 도입하는 단백질형질도입부위들이 알려지면서 이러한 도입부위에 단백질을 융합하여 세포내로 도입시킴으로서 생물학적 변화를 연구하고 있다.
- <6> 아직까지 정확한 세포내 도입기전이 밝혀져 있지는 않으나 Tat (transactivator of transcription) 단백질은 이 단백질 중 단백질 형질도입부위 (protein transduciton domain)가 존재하기 때문에 효율적으로 세포막을 통과하여 세포내로 이동하는 것으로 알려져 있다(Murriel CL, Dowdy SF. Influence of protein transduction domains on intracellular delivery of macromolecules. Expert Opin Drug Deliv. 2006 Nov;3(6):739-46). Tat 단백질의 단백질 형질도입부위를 이용하여 단백질을 융합시키는 경우 세포내로 단백질이 용이하게 도입되며 단백질의 기능 및 활성을 나타내는 것이 보고되고 있으며 최근 동물실험에서도 그 효과가 보고되고 있다 (Cai SR, Xu G, Becker-Hapak M, Ma M, Dowdy SF, McLeod HL. The kinetics and tissue distribution of protein transduction in mice. Eur J Pharm Sci. 2006 Mar;27(4):311-9).
- <7> p66shc 단백질은 활성산소의 생성 및 세포의 사멸을 유도하여 암세포의 발생을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 세포투과형 p66shc단백은 종양생성을 억제하는 데 활용될 수 있을 것으로 생각된다. 또한 세포의 성장을 억제하는 기능을 가진 p66shc 단백질의 특성을 이용하여 항암제 개발 및 활용물질로 의료산업적으로 유용하게 응용될 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 본 발명은 p66shc 단백질을 세포내로 도입하기 위하여 단백질형질도입부위인 tat과 인간의 p66shc 단백질을 융합시킨 융합단백질을 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.
- <9> 또한 본 발명의 또 다른 목적은 상기 Tat-p66shc 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 암세포 성장억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <10> 진술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 융합단백질은 p66shc 단백질과 Tat 단백질의 단백질 형질 도입부위가 융합된 서열번호 1의 세포 투과성 융합단백질 Tat-p66shc인 것을 특징으로 한다.
- <11> Tat-p66shc 융합단백질을 만들기 위하여 먼저 p66shc의 시작코돈에 EcoRI 제한효소 사이트를 연결한 primer와 정지코돈에 HindIII 제한효소 사이트를 연결한 primer를 제작하여 인간 p66shc cDNA를 분리하였다. 분리한 p66shc cDNA(1752bp)를 pTAT2.1에 삽입하여 pTat-p66shc 발현벡터(도 1)를 제작하고 대장균 BL21(DE3)에 형질 전환한 후 그 형질전환체 BL21(DE3)/pTat-p66shc를 2007년 6월 19일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KCTC 11138BP). 상기 형질전환체를 이용하여 Tat-p66shc 융합단백질을 과발현 시킨 후 변성 상태(denature condition)에서 분리하고 정제하였다. 상기 Tat-p66shc 융합단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다.
- <12> Tat-p66shc 융합단백질을 코딩하는 유전자는 단백질정제를 위한 6개의 히스티딘(histidine) 및 TAT형질도입부위의 9개 아미노산 RKKRRQRRR을 코딩하는 유전인자, 그리고 인간의 p66shc 유전인자를 포함하고 있는 것을 특징으로 한다. 상기 유전자는 특히 서열번호 2의 서열을 갖는 것이 바람직하다.
- <13> 본 발명에 의한 Tat-p66shc 융합단백질은 1nM 농도에서부터 세포내 투과가 일어나는 것을 관측할 수 있었다. 상기 세포내 투과는 혈관내피세포에서 Tat-p66shc 융합단백질을 1시간 배양액에 처리한 군에서 최대의 발현을 보였으며 그 이후 서서히 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 세포내로 유입한 Tat-p66shc는 세포내의 단백

질분해 효소에 의하여 서서히 제거된다는 사실을 암시하고 있다.

- <14> 혈관내피세포내로 투과된 Tat-p66shc 융합단백질은 TNF- α 를 매개로 하는 eNOS의 인산화를 효과적으로 억제시키는 것을 알 수 있었다. 이러한 현상은 p66shc의 인산화(특히 36번째 세린기의 인산화) 증가가 중요한 매개체로 관여했다고 보여진다. Tat-p66shc의 이러한 효과는 혈관염증신호물질들로 인해 야기되는 혈관염증성 반응 및 혈관신생과 같은 혈관질환의 치료기술개발에 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다. 또한 p66shc의 발현은 종양발생을 억제할 수 있어 항암제개발에 활용될 수 있다.
- <15> Tat-p66shc 융합단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 피부도말제제, 경구투여제제, 정맥주사 및 근육주사형태로 제형화할 수 있다. Tat-p66shc 융합단백질을 유효성분으로하는 약제학적 조성물은 혈관질환의 치료기술개발 및 종양질환의 치료법에 응용될 수 있으며 그 기법은 향후 세포내 유전질환의 치료 및 새로운 질환치료법으로 활용될 수 있다.
- <16> 또한 본 발명에 의한 Tat-p66shc 융합단백질은 약제학적 조성물로서 뿐만 아니라, 상기 융합단백질을 유효성분으로 하는 화장료 조성물로서 사용될 수 있다. 상기 화장료 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않으며, 구체적으로 유연화장수, 영양화장수, 영양크림 또는 마사지크림 등의 제형을 가질 수 있다. 또한 그 구체적인 조성물의 성분은 제형에 따라, 목적하는 효과에 따라서 당업자가 적절하게 선정하여 배합할 수 있을 것이다.

효 과

- <17> 이상과 같이 본 발명에 의한 Tat-p66shc 융합단백질은 Tat와 인간 p66shc의 성질을 동시에 갖고 있으므로, 인간 p66shc를 단백질 수준에서 세포내로 직접 도입시키는 효과를 얻을 수 있어 단백질 치료에 활용될 수 있다.
- <18> 본 발명에 의한 Tat-p66shc 융합단백질은 활성산소의 생성 및 eNOS의 활성을 효율적으로 억제할 수 있어, 활성산소 및 eNOS와 관련한 혈관질환치료법 개발 및 항암제개발에 효과적으로 활용 및 응용될 수 있다.
- <19> 또한 본 발명의 Tat-p66shc 융합단백질은 질병의 치료 이외에도 화장품 및 건강식품등의 제품개발에 활용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <20> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적인 목적일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- <21> **실시예**
- <22> **실시예 1 : Tat-p66shc 발현벡터의 제조 및 형질전환**
- <23> Tat-p66shc 융합단백질을 과발현시키기 위하여 pTat2.1벡터를 이용하여 6개의 히스티딘의 유전인자와 Tat 형질도입부위(RKKRRQRRR)의 유전인자 및 인간의 p66shc cDNA가 포함되어 있는 Tat-p66shc 발현벡터를 제조하였다. 도 1은 Tat-p66shc 발현벡터의 개열지도(cleavage map)를 나타낸다.
- <24> 먼저, p66shc의 시작코돈에 *eco*RI 제한효소사이트를 연결한 하기 서열번호 3의 프라이머(primer)와 정지코돈에 *Hind*III 제한효소사이트를 연결한 하기 서열번호 4의 프라이머를 제작하여 인간의 p66shc 유전인자가 포함되어 있는 p66shc-pcDNA(피츠버그의대 Kaikobad Irani 교수로부터 기증받음)로부터 중합효소연쇄반응을 이용하여(중합효소연쇄반응조건; 95℃, 30초, 62℃ 1분, 72℃ 2분, 30사이클) 분리하였다. 분리한 p66shc cDNA는 1752bp로 그 서열은 서열번호 5로 서열목록에 기재된 바와 같다.
- <25> 서열번호 3 : 5'-CGG AAT TCG AAG GAT CTC CTG CCC CCC-3' (센스프라이머 (sense primer))
- <26> 서열번호 4 : 5'-CGA AGC TTT CAC AGT TTC CGC TCC ACA GG-3' (안티센스프라이머 (anti-sense primer))
- <27> *Eco*RI, *Hind*III 제한효소를 사용하여 pTAT-2.1 벡터(5343 bp, 미국 캘리포니아대학 Steven Dowdy 교수로부터 기증받음)를 절단한 다음, p66shc cDNA를 pTat2.1 벡터에 삽입하여 Tat-p66shc 벡터를 완성하였다. pTat-p66shc는 단백질정제를 위한 6개의 히스티딘(histidine) 유전인자와, TAT형질도입부위의 9개 아미노산 RKKRRQRRR의 유전인자, 그리고 인간의 p66shc 유전인자를 포함하고 있는 것을 특징으로 한다.
- <28> 상기 벡터를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환시켜 대장균 형질전환체 BL21(DE3)/pTat-p66shc를 제조하고, 2007년 6월 19일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KCTC 11138BP).

<29> **실시예 2 : 재조합 Tat-p66shc 융합단백질의 분리 및 정제**

<30> 실시예 1에서 제조한 대장균 형질전환체 BL21(DE3)/pTat-p66shc를 50mg/ml의 kanamycin이 첨가된 LB배지에 도말하여 37℃에서 200-250 rpm으로 교반하면서 18시간 배양하였다. 형질전환된 콜로니를 선택하여 배지 1 L에 첨가하여 37℃에서 200-250 rpm으로 교반하면서 O.D. 값이 0.4-0.6이 될 때까지 37℃에서 200-250rpm으로 배양하였다. O.D. 값이 0.4-0.6이 되면, IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside) 1 mM을 투여하고 37℃에서 4시간 동안 추가로 배양하여 Tat-p66shc의 발현을 유도하였다.

<31> Tat-p66shc 단백질의 발현이 유도되면, 4℃에서 5,000rpm으로 5분 동안 원심분리한 후 인산완충생리식염수로 세척하고 다시 원심분리하여 침전분획을 얻는다. 상기 침전 분획에 10 ml의 완충용액 Z (8M Urea, 100mM NaCl, 20mM HEPES pH8.0)을 첨가한 후 초음파 처리하였다. 상기 혼합물을 다시 원심분리한 후 상층액을 취해서 2~3ml의 Ni-NTA (Qiagen, Cat No : 30210)가 첨가된 단백질컬럼 (Bio-rad, Cat No : 731-1550)에 부하하였다. 10 mM 이미다졸(Imidazole)이 포함되어 있는 완충용액 Z로 세척한 다음 각 용출완충액(Imidazole이 100mM, 250mM, 500mM 또는 1M이 포함되어 있는 완충용액 Z)으로 융합단백질을 각각 용출하였다. 도 2는 각 용출완충액을 사용하여 발현된 Tat-p66shc 융합단백질을 정제한 결과를 보여주는 전기영동 사진으로, 이미다졸 250mM이 포함되어 있는 완충용액 Z에서 가장 많은 Tat-p66shc 융합단백질이 용출되어 이미다졸 농도 250mM인 완충용액 Z가 본 융합단백질의 용출에 가장 적합한 용출완충액인 것을 확인할 수 있었다. 또한 Tat-p66shc 융합단백질의 분자량은 약 71 kDa인 것을 알 수 있었다.

<32> 용출된 융합단백질은 PD10 column kit (GE Healthcare Bio Sciences AB, Cat No : 17-0851-01)를 이용하여 염분을 제거하였다. 염분이 제거된 정제된 융합단백질은 10% 글리세롤을 첨가하여 -70℃에 보관하여 사용하였으며, SDS-PAGE를 이용하여 코마씨 블루 염색(coomassie blue staining)을 하여 우혈청 알부민과 비교함으로써 단백질의 농도를 계산한 후 하기 실시예에 사용되는 농도에 따라 희석하여 사용하였다.

<33> **실시예 3 : 혈관내피세포에서 Tat-p66shc 융합단백질의 세포내 투과**

<34> 본 발명의 하기 실시예에서 웨스턴블롯 분석(western blot analysis)은 다음같이 행하였다. 세포균질액은 10% SDS폴리아크릴아마이드 겔 전기영동법으로 분리하여 겔에 니크로셀룰로스막으로 전기이동시켰다. 단백질을 이동된 막을 5% 스킵우유로 처리한 후 인간 Shc항체(1:1000희석), phospho-eNOS(1:1000희석), 또는 phospho-p66shc(1:1000희석)로 18시간 처리하였다. Horseradish peroxidase- conjugated 2차항체(1:2000희석)로 1시간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence kit를 이용하여 단백질의 발현량을 확인하였다.

<35> **1) Tat-p66shc 융합단백질의 혈관내피세포 투과**

<36> 혈관내피세포에서 Tat-p66shc단백이 세포내로 유입되는 정도를 고찰하였다. 혈관내피세포로는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)에서 분주받은 쥐의 내피세포주 MS(MILE SVEN)-1을 사용하였다. 쥐의 체장 내피세포주인 MS-1 세포주를 5%의 이산화탄소와 95%의 공기가 혼합된 37℃ 수분 공급형 인큐베이터 환경에서 유지·배양하였다. 배양액으로는 10% Fetal Bovine Serum, Penicillin 100U/ml을 보충한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Gibco, Grand Island, NY)을 사용하였다.

<37> 배양된 세포는 10⁵개 세포/ml의 농도로 배양액에 희석하여 사용하였다.

<38> 상기 희석된 배양세포를 2 ml씩 6 well에 분주하고, Tat-p66shc를 0, 1, 5, 10 및 20nM 농도로 각각 추가하여 2시간 동안 37℃ 수분공급형 배양기에서 배양하였다. 이후 인산완충생리식염수로 3회 세척하고 세포분쇄기로 분쇄하였으며 12000rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 획득하였다. 단백질량은 Bio-rad assay를 이용하여 정량하였다. 정량된 단백질 30 μg을 sampling하여 100℃에서 5분간 열을 가한 후 10분 동안 급랭시켰다. 세포내로 투과된 Tat-p66shc 융합단백질의 양을 ShcA 단일클론항체를 이용한 웨스턴블롯으로 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 확인할 수 있듯이 Tat-p66shc 융합단백질은 1nM 농도부터 세포내 투과가 일어나고, 농도가 전해짐에 따라 농도의존적으로 세포내로 유입되는 것을 알 수 있었다.

<39> **2) Tat-p66shc 융합단백질의 혈관내피세포 투과 후 지속 시간**

<40> 혈관내피세포에서 유입된 Tat-p66shc가 어느 시간 동안 세포 내에 존재하는지를 알기 위하여 20 nM의 Tat-p66shc 융합단백질을 시간별로 배양액에 처리하여 세포 내의 지속시간을 조사하였다. 세포내의 유입된 Tat-p66shc의 지속정도는 웨스턴블롯 분석방법을 이용하였으며 그 결과를 도 4에 나타내었다. 단 sampling과정은 실시예 3의 1)과 동일하다.

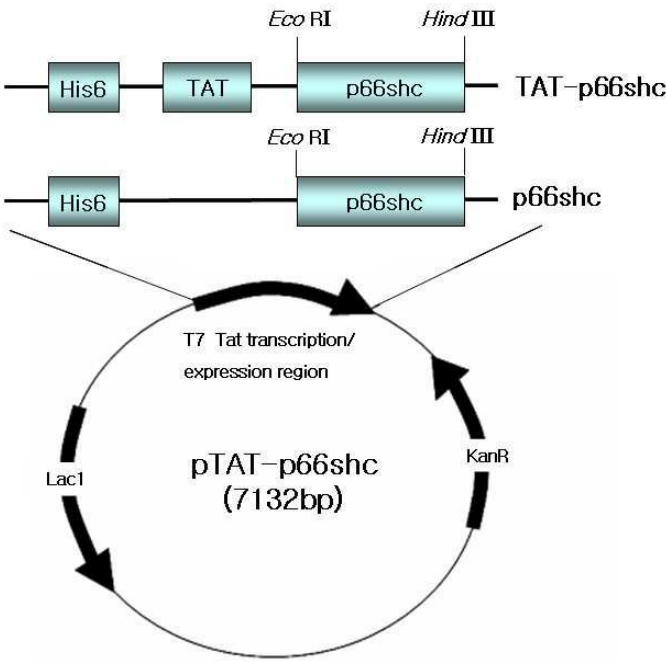
- <41> 도 4에서 확인할 수 있듯이, 혈관내피세포에서 Tat-p66shc를 1시간 배양액에 처리한 군에서 최대의 발현을 보였으며 그 이후 서서히 감소하는 경향을 보였다. 이러한 결과는 세포내로 유입한 Tat-p66shc는 세포내의 단백질분해 효소에 의하여 서서히 제거된다는 사실을 암시하고 있다.
- <42> 본 실시예를 통해 본 발명에 의한 Tat-p66shc 융합단백질이 성공적으로 혈관내피세포에 도입됨을 확인 할 수 있었다.
- <43> **실시예 4 : Tat-p66shc 융합단백질의 eNOS 단백질 인산화 억제 효과 측정**
- <44> 세포내로 유입된 Tat-p66shc 단백질이 정상적인 생리학적 기능을 갖는지를 조사하기 위하여 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의해 유도되는 eNOS단백의 인산화에 미치는 영향을 측정하였다.
- <45> 실시예 3의 1) 내피세포 배양 희석액에 20nM의 Tat-p66shc를 2시간동안 전처리한 군과 처리하지 않은 대조군에서, 15 ng/ml의 TNF- α 를 5 ~ 60분동안 처리한 후 eNOS의 인산화 및 p66shc의 인산화의 정도를 웨스턴블롯분석으로 측정하여 그 결과를 도 5에 도시하였다. 단 sampling과정은 실시예 3의 1)과 동일하다.
- <46> 도 5로부터 Tat-p66shc 융합단백질 20 nM을 2시간 동안 세포배양액에 처리하는 경우 Tat-p66shc 융합단백질이 세포 내에서 안정적으로 과발현됨을 확인하였다. 유입된 Tat-p66shc 융합단백질은 세포내에서 TNF- α 에 의하여 증가되는 eNOS 인산화를 효과적으로 억제시키는 것을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

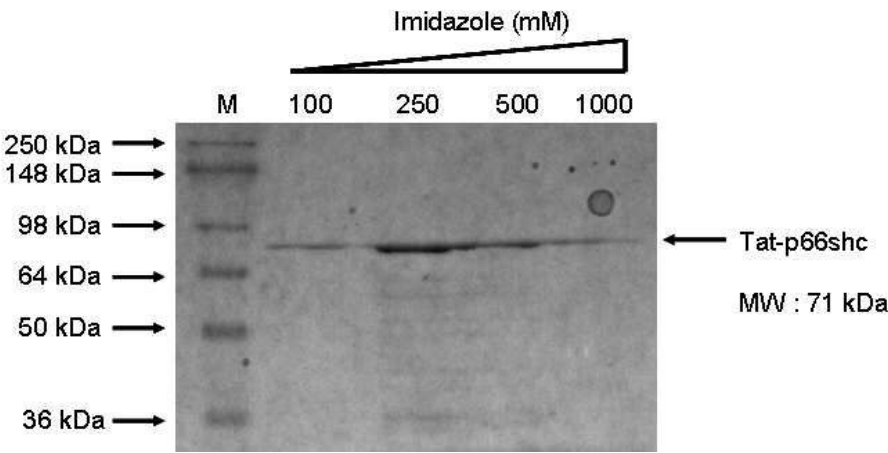
- <47> 도 1은 Tat-p66shc 발현벡터의 개열지도.
- <48> 도 2는 여러 가지 농도의 imidazole을 포함한 용출완충액에 의해 Tat-p66shc 융합단백질을 정제한 결과를 보여주는 전기영동 사진.
- <49> 도 3은 Tat-p66shc 융합단백질의 농도별 혈관내피 세포내 투과 정도를 웨스턴블롯으로 확인한 결과를 보여주는 사진.
- <50> 도 4는 Tat-p66shc 융합단백질의 혈관내피 세포내 투과 후 지속 시간을 웨스턴블롯으로 확인한 결과를 보여주는 사진.
- <51> 도 5는 Tat-p66shc를 농도별로 혈관내피세포에 처리한 후 혈관내피세포에서 eNOS의 인산화정도를 웨스턴블롯을 이용하여 확인한 결과를 보여주는 사진.

도면

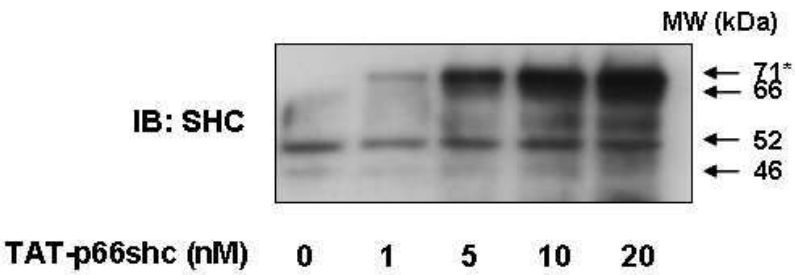
도면1



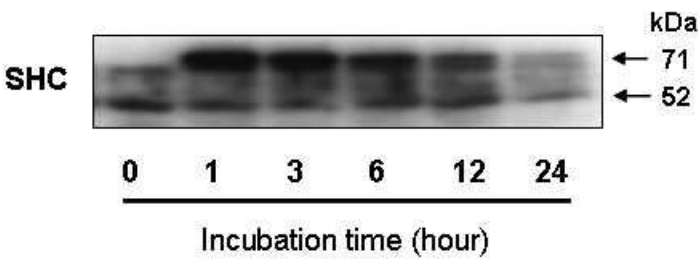
도면2



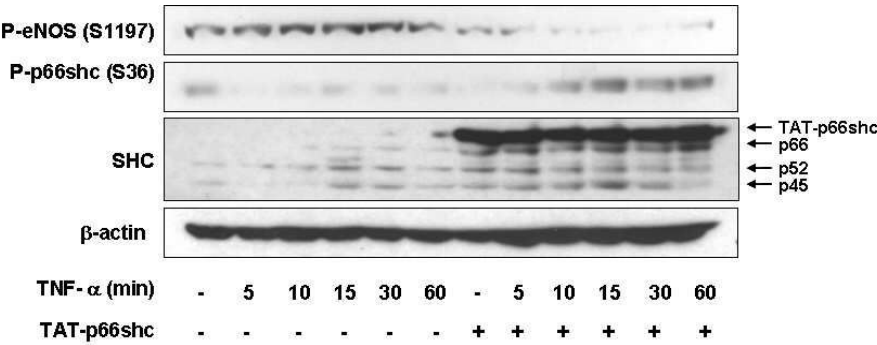
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Cell permeable p66shc fusion protein having anti-cancer activity
- <160> 5
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 619
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Tat-p66shc
- <400> 1
- Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro

1	5	10	15
Arg Gly Ser His Met Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Ser	20	25	30
Asp Pro Asn Ser Met Asp Leu Leu Pro Pro Lys Pro Lys Tyr Asn Pro	35	40	45
Leu Arg Asn Glu Ser Leu Ser Ser Met Glu Glu Gly Ala Ser Gly Ser	50	55	60
Thr Pro Pro Glu Glu Leu Pro Ser Pro Pro Ala Ser Ser Leu Gly Pro	65	70	75
Ile Leu Pro Pro Leu Pro Gly Asp Asp Ser Pro Thr Thr Leu Cys Ser	85	90	95
Phe Phe Pro Arg Met Ser Asn Leu Arg Leu Ala Asn Pro Ala Gly Gly	100	105	110
Arg Pro Gly Ser Lys Gly Glu Pro Gly Arg Ala Ala Asp Asp Gly Glu	115	120	125
Gly Ile Val Gly Ala Ala Met Pro Asp Ser Gly Pro Leu Pro Leu Leu	130	135	140
Gln Asp Met Asn Lys Leu Ser Gly Gly Gly Gly Arg Arg Thr Arg Val	145	150	155
Glu Gly Gly Gln Leu Gly Gly Glu Glu Trp Thr Arg His Gly Ser Phe	165	170	175
Val Asn Lys Pro Thr Arg Gly Trp Leu His Pro Asn Asp Lys Val Met	180	185	190
Gly Pro Gly Val Ser Tyr Leu Val Arg Tyr Met Gly Cys Val Glu Val	195	200	205
Leu Gln Ser Met Arg Ala Leu Asp Phe Asn Thr Arg Thr Gln Val Thr	210	215	220
Arg Glu Ala Ile Ser Leu Val Cys Glu Ala Val Pro Gly Ala Lys Gly	225	230	235
			240

Ala Thr Arg Arg Arg Lys Pro Cys Ser Arg Pro Leu Ser Ser Ile Leu
245 250 255

Gly Arg Ser Asn Leu Lys Phe Ala Gly Met Pro Ile Thr Leu Thr Val
260 265 270

Ser Thr Ser Ser Leu Asn Leu Met Ala Ala Asp Cys Lys Gln Ile Ile
275 280 285

Ala Asn His His Met Gln Ser Ile Ser Phe Ala Ser Gly Gly Asp Pro
290 295 300

Asp Thr Ala Glu Tyr Val Ala Tyr Val Ala Lys Asp Pro Val Asn Gln
305 310 315 320

Arg Ala Cys His Ile Leu Glu Cys Pro Glu Gly Leu Ala Gln Asp Val
325 330 335

Ile Ser Thr Ile Gly Gln Ala Phe Glu Leu Arg Phe Lys Gln Tyr Leu
340 345 350

Arg Asn Pro Pro Lys Leu Val Thr Pro His Asp Arg Met Ala Gly Phe
355 360 365

Asp Gly Ser Ala Trp Asp Glu Glu Glu Glu Glu Pro Pro Asp His Gln
370 375 380

Tyr Tyr Asn Asp Phe Pro Gly Lys Glu Pro Pro Leu Gly Gly Val Val
385 390 395 400

Asp Met Arg Leu Arg Glu Gly Ala Ala Pro Gly Ala Ala Arg Pro Thr
405 410 415

Ala Pro Asn Ala Gln Thr Pro Ser His Leu Gly Ala Thr Leu Pro Val
420 425 430

Gly Gln Pro Val Gly Gly Asp Pro Glu Val Arg Lys Gln Met Pro Pro
435 440 445

Pro Pro Pro Cys Pro Gly Arg Glu Leu Phe Asp Asp Pro Ser Tyr Val
450 455 460

Asn Val Gln Asn Leu Asp Lys Ala Arg Gln Ala Val Gly Gly Ala Gly
465 470 475 480

Pro Pro Asn Pro Ala Ile Asn Gly Ser Ala Pro Arg Asp Leu Phe Asp
485 490 495

Met Lys Pro Phe Glu Asp Ala Leu Arg Val Pro Pro Pro Pro Gln Ser
500 505 510

Val Ser Met Ala Glu Gln Leu Arg Gly Glu Pro Trp Phe His Gly Lys
515 520 525

Leu Ser Arg Arg Glu Ala Glu Ala Leu Leu Gln Leu Asn Gly Asp Phe
530 535 540

Leu Val Arg Glu Ser Thr Thr Thr Pro Gly Gln Tyr Val Leu Thr Gly
545 550 555 560

Leu Gln Ser Gly Gln Pro Lys His Leu Leu Leu Val Asp Pro Glu Gly
565 570 575

Val Val Arg Thr Lys Asp His Arg Phe Glu Ser Val Ser His Leu Ile
580 585 590

Ser Tyr His Met Asp Asn His Leu Pro Ile Ile Ser Ala Gly Ser Glu
595 600 605

Leu Cys Leu Gln Gln Pro Val Glu Arg Lys Leu
610 615

<210> 2
<211> 1800
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> gene coding Tat-p66shc

<400> 2
atgaggaaga agcggagaca gcgacgaaga ggctcggatc cgaattcgat ggatctcctg 60

cccccaagc ccaagtacaa tccactccgg aatgagtctc tgtcatcgat ggaggaaggg 120

gtttctgggt ccaccccc ggaggagctg cttccccac cagcttcatc cctggggccc	180
atcctgcctc ctctgcctgg ggacgatagt ccactaccc tgtgtcctt cttccccgg	240
atgagcaacc tgaggctggc caaccggct gggggcgcc cagggtctaa gggggagcca	300
ggaagggcag ctgatgatgg ggaggggatc gtagggcag ccatgccaga ctcaggcccc	360
ctaccctcc tccaggacat gaacaagctg agtggaggcg gcgggcgcag gactcgggtg	420
gaagggggcc agcttggggg cgaggagtgg acccgccacg ggagctttgt caataagccc	480
acgcggggct ggtcgcaccc caacgacaaa gtcattggac ccggggtttc ctacttggtt	540
cgttacatgg gttgtgtgga ggtcctccag tcaatgcgtg ccctggactt caacaccgg	600
actcaggtea ccaggaggc catcagtctg gtgtgtgagg ctgtgccggg tgctaagggg	660
gcgacaagga ggagaaagcc ctgtagccgc ccgtcagct ctatcctggg gaggagtaac	720
ctgaaatttg ctggaatgcc aatcactctc accgtctcca ccagcagcct caacctcatg	780
gccgcagact gcaaacagat catcgccaac caccacatgc aatctatctc atttgcaccc	840
ggcggggatc cggacacagc cgagtatgtc gcctatgtt ccaaagacc tgtgaatcag	900
agagcctgcc acattctgga gtgtcccgaa gggcttggc aggatgtcat cagcaccatt	960
ggccaggcct tcgagttgcg cttcaacaa tacctcagga acccaccac actggtcacc	1020
cctcatgaca ggatggctgg ctttgatggc tcagcatggg atgaggagga ggaagagcca	1080
cctgaccatc agtactataa tgacttcccg gggaaggaac ccccttggg gggggtggtg	1140
gacatgaggc ttcgggaagg agccgtcca ggggtgctc gaccactgc acccaatgcc	1200
cagaccccca gccacttggg agctacattg cctgtaggac agcctgttgg gggagatcca	1260
gaagtccga aacagatgcc acctccacca cctgtccag gcagagagct ttttgatgat	1320

ccctcctatg tcaacgtcca gaacctagac aaggcccggc aagcagtggg tggctgctggg	1380
cccccaatc ctgctatcaa tggcagtgcg ccccgaggacc tgtttgacat gaagcccttc	1440
gaagatgctc ttcgggtgcc tccacctccc cagtcggtgt ccatggctga gcagctccga	1500
ggggagccct ggttccatgg gaagctgagc cggcgggagg ctgaggcact gctgcagctc	1560
aatggggact tcttggtagc ggagagcacg accacacctg gccagtatgt gctcactggc	1620
ttgcagagtg ggcagcctaa gcatttgcta ctggtggacc ctgagggtgt ggttcggact	1680
aaggatcacc gctttgaaag tgtcagtcac cttatcagct accacatgga caatcacttg	1740
cccatcatct ctgcgggcag cgaactgtgt ctacagcaac ctgtggagcg gaaactgtga	1800
	1800

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> sense primer

<400> 3	
cggaattcga aggatctcct gcccccc	27

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> anti-sense primer

<400> 4

cgaagctttc acagtttccg ctccacagg	29
<210> 5	
<211> 1752	
<212> DNA	
<213> human	
<400> 5	
atggatctcc tgcccccaa gcccaagtac aatccactcc ggaatgagtc tctgtcatcg	60
atggaggaag gggcttctgg gtccaccccc ccggaggagc tgccttcccc accagcttca	120
tccttggggc ccattctgcc tctctgcct ggggacgata gtccactac cctgtgtccc	180
ttcttcccc ggatgagcaa cctgaggctg gccaacccgg ctggggggcg cccagggtct	240
aagggggagc caggaagggc agctgatgat ggggagggga tcgtaggggc agccatgcca	300
gactcaggcc ccctaccct cctccaggac atgaacaagc tgagtggagg cggcggggcg	360
aggactcggg tggaaggggg ccagcttggg ggcgaggagt ggacccgcca cgggagcttt	420
gtcaataagc ccacgcgggg ctggctgcat cccaacgaca aagtcatggg acccggggtt	480
tcctacttgg ttcggtacat gggttgtgtg gaggtcctcc agtcaatgcg tgccctggac	540
ttcaacaccc ggactcaggt caccaggag gccatcagtc tgggtgtga ggctgtgccg	600
ggtgctaagg gggcgacaag gaggagaaag cctgttagcc gcccgctcag ctctatcctg	660
gggaggagta acctgaaatt tgctggaatg ccaatcactc tcaccgtctc caccagcagc	720
ctcaacctca tggccgcaga ctgcaaacag atcatcgcca accaccacat gcaatctatc	780
tcatttgcac ccggcgggga tccggacaca gccgagtatg tcgcctatgt tgccaaagac	840
cctgtgaatc agagagcctg ccacattctg gagtgtcccg aagggttgc ccaggatgtc	900
atcagcacca ttggccaggc cttcgagttg cgcttcaaac aatacctcag gaaccacccc	960

aaactggtca cccctcatga caggatggct ggctttgatg gctcagcatg ggatgaggag	1020
gaggaagagc cacctgacca tcagtactat aatgacttcc cggggaagga accccccttg	1080
gggggggttg tagacatgag gcttcgggaa ggagccgctc caggggctgc tcgaccact	1140
gcaccaatg ccagacccc cagccacttg ggagctacat tgcctgtagg acagcctgtt	1200
gggggagatc cagaagtccg caaacagatg ccacctccac caccctgtcc aggagagag	1260
ctttttgatg atccctccta tgtcaacgtc cagaacctag acaaggcccg gcaagcagtg	1320
ggtggtgctg ggcccccaa tcttctatc aatggcagtg caccgcggga cctgtttgac	1380
atgaagccct tcgaagatgc tcttcgggtg cctccacctc ccagtcggt gtccatggct	1440
gagcagctcc gaggggagcc ctggttccat gggaagctga gccggcgga ggctgaggca	1500
ctgctgcagc tcaatggga ctctttgta cgggagagca cgaccacacc tggccagtat	1560
gtgctcactg gcttgcagag tgggcagcct aagcatttgc tactggtgga ccctgagggt	1620
gtggttcgga ctaaggatca ccgctttgaa agtgtcagtc acctatcag ctaccacatg	1680
gacaatcact tgcccatcat ctctgcgggc agcgaactgt gtctacagca acctgtggag	1740
cggaaactgt ga	1752