(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0102066
(43) 공개일자 2021년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6816 (2018.01) *C12N 15/85* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6816 (2018.05)
C12N 15/85 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0009144
(22) 출원일자 2021년01월22일
심사청구일자 2021년01월22일
(30) 우선권주장
1020200015730 2020년02월10일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김은영
서울특별시 용산구 이촌로87길 21, 106동 1208호 (이촌동, 이촌아파트)
송우선
서울특별시 영등포구 영등포로 17, 101동 1208호 (양평동2가, 상록수아파트)
고동희
서울특별시 도봉구 해등로 81, 102동 203호 (창동, 동진빌리지)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

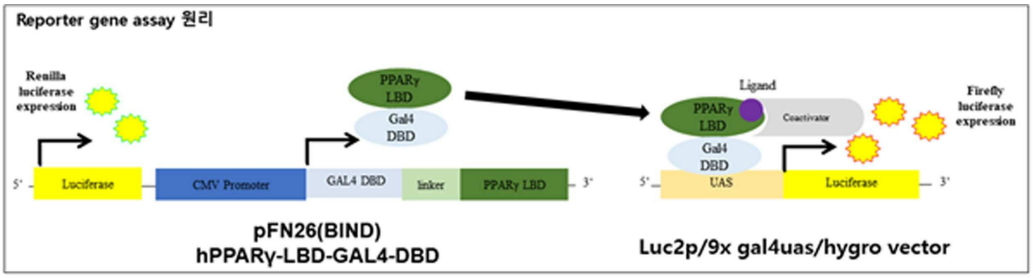
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **리포터 유전자 분석 시스템을 이용한 PPARγ 활성물질의 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 리포터 유전자 분석 시스템을 이용한 PPARγ 활성물질의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 CV-1 세포에서 PPARγ 단백질에 반응하는 물질을 스크리닝할 수 있는 PPARγ 리포터-유전자 분석 시스템 및 이를 이용한 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 PPARγ 리포터 유전자 분석 시스템은 종래 시스템과 비교해 PPARγ가 발현되지 않는 CV-1 세포를 이용하여 반응성이 보다 민감하게 나타나고 반응 프로파일에 있어서도 차이를 보이는바, 보다 정확한 PPARγ에 대한 활성물질 스크리닝이 가능하며, 나아가 상기 시스템을 활용해 유해 화학물질의 PPARγ 작용유해성 평가하기 위한 용도로써 *in vivo* 실험 전에 후보물질을 선별하는 사전 스크리닝 방법으로 활용이 가능할 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2563/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1485014630
과제번호	ARQ201703067001
부처명	환경부
과제관리(전문)기관명	한국환경산업기술원
연구사업명	생활공감 환경보건기술개발사업
연구과제명	흡입독성 AOP를 활용한 in-silico 및 in-vitro 대체시험법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.04.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(i) GAL4 DNA 결합 도메인-PPARγ(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 리간드 결합 도메인(GAL4 DBD-PPARγ LBD) 융합단백질을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 제 1 플라스미드 벡터 및 (ii) GAL4가 결합하는 UAS(upstream activation sequence) 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 제 2 플라스미드 벡터가 도입된 CV-1(Normal African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells) 세포를 포함하는, PPARγ 활성물질의 스크리닝 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 리포터 유전자는 각각 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(RFP), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP), 증강된 남색 형광 단백질(ECFP), DsRed, 레닐라 루시퍼라제(Renila luciferase) 및 파이어플라이 루시퍼라제(Firefly luciferase)로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서,

GAL4 DBD-PPARγ LBD 융합단백질을 암호화하는 뉴클레오티드는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 스크리닝 시스템.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 GAL4 DBD-PPARγ LBD에서 GAL4 DBD와 PPARγ LBD는 IgA 링커로 연결된 것을 특징으로 하는, 스크리닝 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 활성물질은 PPARγ에 작용하는 작용제(agonist) 또는 길항제(antagonist)인 것을 특징으로 하는, 스크리닝 시스템.

청구항 6

하기의 단계를 포함하는, PPARγ(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 활성물질의 스크리닝 방법:

(a) 제1항의 CV-1 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 시험물질이 처리된 세포로부터 형광 신호를 측정하는 단계.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 리포터 유전자 분석 시스템을 이용한 PPARγ에 작용하는 활성물질의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 CV-1 세포에서 PPARγ 단백질에 반응하는 물질을 스크리닝할 수 있는 PPARγ 리포터-유전자 분석 시스템 및 이를 이용한 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체(Peroxisome proliferator-activated receptor; PPARs)는 리간드(ligand)의 결합에 의해 유전자 발현을 조절하는 핵 수용체(nuclear receptors) 중 하나로서, 여러가지 지방산이 내인성 리간드로 작용한다. 보다 구체적으로, PPARs은 하나의 뉴클레오티드에 의해 분리되는 TGACCT-연관 직접 반복서열로 구성되는 퍼옥시좀 증식체 반응요소를 인식하고 결합하는 리간드-의존적 방식으로 유전자 발현을 활성화시킴으로써 유전자 발현의 조절 과정에 기여한다. 현재까지 밝혀진 PPAR은 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 알파(PPARα), 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 베타(PPARβ/δ) 및 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마(PPARγ) 세 가지이다.

[0003] PPARγ는 지방 조직에서 가장 많이 발견되고, 그 밖에 혈관 내피, 대식세포, 췌장의 β세포에서 발견되며, 지방세포의 분화를 조절하고 전신 지질 항상성에 결정적인 역할을 한다. 또한 PPARγ의 활성화는 에너지 대사뿐만 아니라 염증 및 종양 성장에 영향을 미친다. 이의 리간드는 인슐린 작용에 긍정적인 영향을 미치고 당뇨병 동물과 인간의 포도당 내성을 개선할뿐만 아니라 염증과 인지 기능의 향상을 가져온다고 알려져 있다. 따라서 PPARγ의 전체적 또는 부분적 활성화 화합물은 지방 세포의 분화를 억제하여 비만을 효과적으로 치료할 수 있으며, 부분적 활성화 화합물은 비만 치료뿐아니라 고혈당증의 치료에 효과적이다. 이와 관련하여, PPARγ에 대한 효능제 활성을 갖는 치환된 4-히드록시-페닐알카논산 유도체(대한민국특허 제474202호), PPAR 매개 질환의 치료에 유용한 신규 화합물, 키랄 옥사졸-아릴프로파이온산 유도체 및 PPAR 작용제로서 그의 용도, 체액 잔류, 부종 또는 울혈심부전증을 유발하지 않는 신규 PPAR 리간드, 당뇨병 치료에 유용한 PPAR 작용제로서 N-치환된-1H-인돌-5-프로파이온산 화합물 등이 PPARγ에 대한 신규 화합물로 공지되어 있다.

[0004] 이와 같이 다양한 용도를 위해 PPARγ에 결합하여 반응하는 물질을 발굴하는 연구들이 많이 이루어지고 있으며, 이러한 측면에서 *in vitro* 스크리닝 시스템은 후보물질을 사전에 스크리닝하는데 유용하게 이용될 수 있다. 종래 이러한 스크리닝 시스템은 일부 화학물질에 대하여 반응성이 떨어져 위양성의 문제가 나타날 수 있는바, 보다 민감하고 효율적으로 PPARγ 활성물질을 스크리닝할 수 있는 시스템의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 종래의 한계점을 극복하기 위해 안출된 것으로서, PPARγ를 발현하지 않는 CV-1 세포에 PPARγ 발현 플라스미드 벡터와 반응 리포터 유전자를 발현하는 벡터를 도입하여 PPARγ에 반응하는 화학물질을 스크리닝하는 시스템을 확립하였는바, 이로써 본 발명을 완성하였다.

[0006] 이에, 본 발명은 PPARγ 활성물질의 스크리닝 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 PPARγ 활성물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (i) GAL4 DNA 결합 도메인-PPARγ(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 리간드 결합 도메인(GAL4 DBD-PPARγ LBD) 융합단백질을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 제 1 플라스미드 벡터 및 (ii) GAL4가 결합하는 UAS(upstream activation sequence) 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 제 2 플라스미드 벡터가 도입된 CV-1(Normal African Green Monkey Kidney

Fibroblast Cells) 세포를 포함하는, PPARγ 활성물질의 스크리닝 시스템을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일구현예로, 상기 리포터 유전자는 각각 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(RFP), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP), 증강된 남색 형광 단백질(ECFP), DsRed, 레닐라 루시퍼라제(Renila luciferase) 및 파이어플라이 루시퍼라제(Firefly luciferase)로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 GAL4 DBD-PPARγ LBD는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 GAL4 DBD-PPARγ LBD에서 GAL4 DBD와 PPARγ LBD는 IgA 링커로 연결된 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 활성물질은 PPARγ에 작용하는 작용제(agonist) 또는 길항제(antagonist)인 것일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는, PPARγ(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 활성물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0015] (a) 상기 CV-1 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

[0016] (b) 상기 시험물질이 처리된 세포로부터 형광 신호를 측정하는 단계.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 PPARγ에 작용하는 활성물질을 스크리닝하기 위한 PPARγ 리포터 유전자 분석 시스템은 종래 시스템과 비교해 PPARγ가 발현되지 않는 CV-1 세포를 이용하여 반응성이 보다 민감하게 나타나고 반응 프로파일에 있어서도 차이를 보이는바, 보다 정확한 PPARγ에 대한 활성물질 스크리닝이 가능하며, 나아가 상기 시스템을 활용해 유해 화학물질의 PPARγ 작용유해성을 평가하기 위한 용도로써 *in vivo* 실험 전에 후보물질을 선별하는 사전 스크리닝 방법으로도 활용이 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명에서 제작된 hPPARγ-LBD-GAL4-DBD 벡터의 구조를 도시한 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 PPARγ-GAL4 리포터 유전자 분석 시스템의 원리를 그림으로 도시한 것이다.

도 3은 CV-1 세포에서 33개 화학물질에 대한 작용제 농도-반응 곡선을 나타낸 것으로, 도 3a는 CV-1 세포와 HEK293 세포 모두에서 유의한 증가를 보이는 화학 물질의 농도-반응 곡선을 나타낸 것이고, 도 3b는 CV-1 세포에서만 EC_{50}이 계산된 화학물질의 농도-반응 곡선이며, 도 3c는 CV-1 세포에서만 LOEC이 계산된 화학 물질의 농도-반응 곡선을 나타낸 결과이다.

도 4는 CV-1 세포에서 29개 화학물질에 대한 길항제 농도-반응 곡선을 나타낸 것으로, 도 4a는 CV-1 세포와 HEK293 세포 모두에서 유의한 활성 감소를 보이는 화학 물질의 농도-반응 곡선을 나타낸 것이고, 도 4b는 CV-1 세포에서만 유의한 활성 감소를 보인 화학 물질의 농도-반응 곡선이며, 도 4c는 CV-1 세포에서만 양성대조군의 유의한 증가를 보인 화학물질의 농도-반응 곡선을 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명자들은 PPARγ를 발현하지 않는 CV-1 세포에 PPARγ 발현 플라스미드 벡터와 반응 리포터 유전자를 발현하는 벡터를 도입하여 PPARγ에 반응하는 화학물질을 스크리닝하는 시스템을 확립하였는바, 이로써 본 발명을 완성하였다.

[0020] 이에, 본 발명은 (i) GAL4 DNA 결합 도메인-PPARγ(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 리간드 결합 도메인(GAL4 DBD-PPARγ LBD) 융합단백질을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함하는 제 1 플라스미드 벡터 및 (ii) GAL4가 결합하는 UAS(upstream activation sequence) 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 제 2 플라스미드 벡터가 도입된 CV-1(Normal African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells) 세포를 포함하는, PPARγ 활성물질의 스크리닝 시스템을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 사용되는 용어, "활성물질"이란 생체 내 수용체와 결합하여 수용체를 활성화시켜 생물학적인 반응을 유도하는 작용물질 또는 작용제(agonist), 또는 생체 내 수용체와 결합하여 생물학적 반응을 저해하여 기능을 억제하는 길항물질 또는 길항제(antagonist)일 수 있고, 상기 두 가지 물질 모두를 포함할 수 있다. 본 발명에서는 PPARγ에 반응하는 물질, 즉 PPARγ에 결합하는 리간드와 유사한 물질을 말한다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어, "플라스미드 벡터"란 대부분 세균에 존재하나 일부 진핵세포(효모 등)에도 존재하는 환상형의 이중가닥 DNA로 스스로 복제가 가능하다. 1970년대 초부터 유전공학의 도구로 사용되지 시작하여 형재까지 분자생물학 기반 연구에서 강력한 클로닝 수단으로 사용되고 있으며, 유전공학적 기술을 이용해 흥미로운 단백질의 대량 생산에도 이용될 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서 상기 스크리닝 시스템의 작동 원리는 도 2에 도시된 바와 같다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 제 1 플라스미드 벡터는 GAL4 DNA 결합 도메인-PPARγ(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 리간드 결합 도메인(GAL4 DBD-PPARγ LBD) 융합단백질을 암호화하는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, 상기 제 1 플라스미드 벡터는 PPARγ LBD를 암호화하는 뉴클레오티드를 GAL4 DNA 결합 도메인을 가지는 벡터로 클로닝하여 제조될 수 있으며, 바람직하게는 PPARγ LBD를 포함하는 벡터로부터 상기 PPARγ LBD를 추출하여 상기 GAL4 DNA 결합 도메인을 가지는 벡터로 삽입하여 제조할 수 있다. 또한 상기 GAL4 DNA 결합 도메인을 가지는 벡터는 레닐라 루시퍼라제(Renilla luciferase)를 암호화하는 유전자를 추가로 포함할 수 있다.

[0026] 상기 GAL4 DNA 결합 도메인을 가지는 벡터는 pFN26A (BIND) hRluc-neo Flexi® 벡터를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며 GAL4 DNA 결합 도메인을 가지면서 PPARγ LBD를 삽입할 수 있는 다중 클로닝 부위(MCS)를 갖는 것이라면 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다.

[0027] 상기 GAL4는 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로서, galactose-induced genes의 발현을 양성적으로 조절하는 조절자이다. GAL4 단백질은 크게 DNA 결합 도메인(DNA binding domain) 및 Gal4 전사활성 도메인(Gal4 transactivation domain) 두 개로 구성된다. 이 중 DNA 결합 도메인은 N-말단 부위에 존재하며 Zn(2)-C6 fungal family에 속하는 징크 핑거(zinc finger) 도메인으로 Zn-시스테인 티올레이트 클러스터(cysteines thiolate cluster)를 형성하며 GAL1 프로모터에서 인핸서(enhancer)인 UAS(Upstream Activation Sequence)를 특이적으로 인식하여 결합한다. 이에 이를 이용한 GAL4-UAS 시스템은 유전자 발현과 기능을 연구하는데 사용되며, 또한 세포배양에서 시험관 내 수용체의 화학적 결합 기능을 연구하도록 개조되어 이용되고 있다.

[0028] 따라서 본 발명에 있어서, 제 2 플라스미드 벡터는 GAL4가 결합하는 UAS(upstream activation sequence) 영역 및 리포터 유전자를 포함할 수 있다.

[0029] 상기 제 2 플라스미드 벡터는 바람직하게는 luc2p/9x gal4uas/hygro 벡터를 이용할 수 있으나, UAS 영역 및 리포터 유전자를 포함하는 벡터라면 당업자가 적절히 선택하여 이용할 수 있다.

[0030] 상기 리포터 유전자는 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(RFP), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP), 증강된 남색 형광 단백질(ECFP), DsRed, 레닐라 루시퍼라제(Renila luciferase) 및 파이어플라이 루시퍼라제(Firefly luciferase)로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 바람직하게는 파이어플라이 루시퍼라제일 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 GAL4 DBD-PPARγ LBD 융합단백질은 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 뉴클레오티드에 의해 암호화될 수 있고, 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 GAL4 DBD와 PPARγ LBD는 IgA 링커로 연결되는 것일 수 있으나, 링커 종류가 이것으로 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에서 상기 "도입"은 CV-1 세포에 제 1 플라스미드 벡터 및 제 2 플라스미드 벡터를 공동 트랜스펙션(transfection)함으로써 이루어질 수 있으며, 상기 트랜스펙션은 바람직하게는 상기 벡터들을 LTX 리포좀 시약과 혼합하여 세포에 처리하고 1 내지 10시간, 더욱 바람직하게는 3 내지 7시간, 더더욱 바람직하게는 4 내지 6시간, 가장 바람직하게는 5시간 동안 배양함으로써 수행될 수 있으나, 상기 트랜스펙션 방법 및 조건은 이것으로 한정되는 것은 아니며, 당업자가 적절히 선택하여 수행할 수 있다.

[0033] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 PPARγ 활성물질의 스크리닝 시스템을 제작하고 이의 반

응성을 검증하였으며, 기존의 공지된 시스템과의 PPARɣ 활성물질 스크리닝 결과를 비교하였다.

[0034] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명에 따른 hPPARɣ-LBD-GAL-DBD 벡터를 제작하였다(실시예 1 참조).

[0035] 본 발명의 다른 실시예에서는, 제 1 플라스미드 벡터인 hPPARɣ-LBD-GAL-DBD 벡터 및 제 2 플라스미드 벡터를 CV-1 세포로 동시에 트랜스펙션하여 PPARɣ 작용물질의 스크리닝 시스템을 제작하고 상기 시스템의 반응성을 검증하기 위해 로지글리타존을 양성대조군으로 하고 테스트 화학물질을 이용해 양성대조군에 대한 테스트 화학물질의 반응성을 확인하였다(실시예 2 참조).

[0036] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 본 발명에 따른 PPARɣ-GAL4 리포터 유전자 분석 시스템과 기존 Tox21 10k library를 이용해 PPARɣ 작용제 및 길항제를 각각 스크리닝하였으며 그 결과를 비교하였다. 각각의 PPARɣ의 작용제 및 길항제 스크리닝 실험 결과로부터, 본 발명에서 구축한 리포터 유전자 분석 시스템을 이용한 PPARɣ 활성물질의 스크리닝 방법을 통해 인간 PPARɣ에 작용할 가능성이 높은 활성물질을 정확도를 높여 선별할 수 있음을 확인하였으며, 기존에 PPARɣ 활성제 혹은 비활성제로 위양성 결과를 보인 화학물질들을 구별하는데 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다(실시예 3 참조).

[0037] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 PPARɣ(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) 활성물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0038] (a) 상기 CV-1 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

[0039] (b) 상기 시험물질이 처리된 세포로부터 형광 신호를 측정하는 단계.

[0040] 상기 단계 (a)에서, 시험물질의 처리는 CV-1 세포가 분주된 각 웰에 상기 물질을 처리하고 12 내지 24시간 동안 반응시킴으로써 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 16시간 내지 20시간, 더욱 바람직하게는 18시간 동안 반응시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 상기 단계 (b)에서, 시험물질이 처리된 세포로부터 형광 신호를 측정하는 단계는 상기 세포를 용해 버퍼로 용해시키고 세포 용해물을 원심분리하여 상층액을 취한 후 리포터 유전자에 의해 발현되는 형광 신호를 측정하여 이루어질 수 있다. 상기 형광 신호의 측정은 바람직하게 제 2 플라스미드 벡터에서 발현되는 파이어플라이 루시퍼라제 수치를 제 1 플라스미드 벡터에서 발현되는 레닐라 루시퍼라제 수치로 보정하여 이루어질 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0045] **[실시예]**

[0046] **실시예 1. 실험재료 및 실험방법**

[0047] **1-1. 사용된 벡터 및 세포**

[0048] 인간 PPARɣ 리간드 결합 도메인(human PPARɣ Ligand binding domain; hPPARɣ LBD)을 가지고 있는 pCMV-SPORT6(1767bp)벡터는 한국 인간 유전자 은행에서 구입하였다. GAL4 DNA 결합 도메인(GAL4 DNA Bindng Domain; GAL4 DBD)과 레닐라(Renilla)를 발현하는 영역을 가지고 있으며 엠피실린 저항성을 보유하고 있는 pFN26A (BIND) hRluc-neo Flexi® 벡터(7070bp)는 다중 클로닝 부위(multiple cloning site; MCS)를 가지고 있어 상기 pCMV-SPORT6 벡터에서 추출한 hPPARɣ LBD를 삽입할 수 있다. luc2p/9x gal4uas/hygro 벡터(6184bp)는 GAL4 DBD와 결합할 수 있는 9x GAL4 UAS 영역을 가지며 엠피실린 저항성을 보유하고 있다. 또한 GAL4 DBD와 UAS 결합 시 파이어플라이 루시퍼레이즈(firefly luciferase)를 발현하는 기능을 가지고 있다. 상기 pFN26A (BIND) hRluc-neo Flexi® 벡터와 luc2p/9x gal4uas/hygro 벡터는 promega에서 구입하였다.

[0049] 한편, 본 실시예에서 이용한 CV-1 세포(Green mokey kidney cell)는 PPARɣ를 발현하지 않는 세포로써 한국세포주 은행에서 구입하였다.

[0051] **1-2. 벡터 클로닝**

[0052] 본 발명에 따른 PPARɣ 리포터-유전자 분석 시스템을 제작하기 위해 하기 방법에 따라 도 1에 도시된 hPPARɣ-

LBD-GAL4-DBD 벡터를 제작하였다.

[0053] ① 먼저, hPPARγ LBD를 추출하기 위해 pCMV-SPORT6 벡터에 대하여 전방향 프라이머 5'-ACGATCGACCAGCTGAATCCAGAGTCCGCTGA-3'(서열번호 1)과 역방향 프라이머 5'-TCTAGACTAGTACAAGTCCTTGTAGATCTCCTGCAGGAGC-3'(서열번호 2)를 사용하여 PCR을 진행하였으며 전기영동으로 증폭된 hPPARγ LBD의 크기를 확인한 후 QIAGEN Gel Extraction kit를 이용하여 추출하였다.

[0054] ② 다음으로, hPPARγ LBD와 pFN26A (BIND) hRluc-neo Flexi® 벡터 각각에 제한효소 Xba1, Pvu1을 처리하여 절단하였으며, 전기영동으로 절단된 DNA 단편을 확인하였다.

[0055] ③ 절단된 hPPARγ LBD와 pFN26A (BIND) hRluc-neo Flexi® 벡터 단편에 T4 ligase 처리한 후 4℃에서 18시간 동안 접합시켰다.

[0056] ④ 이어서 접합이 제대로 진행되었는지 1차적으로 확인하기 위해 hPPARγ-LBD-GAL-DBD벡터를 Competent 세포인 DH-5α에 형질전환(transformation)시킨 다음 고체배지에서 콜로니가 자라는지 확인하였다.

[0057] ⑤ 상기 고체배지에서 자란 콜로니에 원하는 hPPARγ-LBD-GAL-DBD 벡터가 도입되어 있는지 2차적으로 확인하기 위해 전방향 프라이머 5'-CAAATGGGCGGTAG GCGTG-3'(서열번호 3)와 역방향 프라이머 5'-GTACAAGTCCTTGTAG ATCTCCTGCAG-3'(서열번호 4)를 사용하여 PCR을 진행하였으며 원하는 hPPARγ-LBD가 삽입된 벡터를 확인 할 수 있었다.

[0058] ⑥ 다음으로, hPPARγ-LBD-GAL-DBD 벡터를 가지는 콜로니를 액체배지에 배양한 후 mini prep을 이용하여 플라스미드만을 추출하였으며, 추출된 플라스미드 DNA의 서열을 확인하기 위해 서열분석을 진행하여 hPPARγ LBD 서열이 제대로 삽입된 것을 확인하였다. 또한 웨스턴 블롯을 통해 hPPARγ-LBD-GAL-DBD 벡터가 단백질을 제대로 생성하는지 확인하였다.

[0060] **실시예 2. Dual luciferase reporter gene assay**

[0061] 본 발명자들은 상기 실시예 1-2에서 제조된 hPPARγ-LBD-GAL-DBD 벡터와 luc2p/9x gal4uas/hygro 벡터를 이용해 도 2에 도시된 바와 같은 PPARγ-GAL4 리포터 유전자 분석 시스템을 확립하였으며, 이의 제작방법 및 이를 이용한 어세이 방법을 하기에 기재하였다.

[0062] 구체적으로, CV-1 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 37℃ 5% CO_2 조건하에 배양하였으며, 4회 이상 계대배양하여 안정화된 CV-1 세포를 5 x 10^4 cells/well로 24웰 플레이트에 분주한 후 동일한 조건에서 18시간 동안 배양하였다. 다음으로, OPTI-MEM 배지에 300 ng의 플라스미드 즉 상기 실시예 1-2에서 제작된 hPPARγ-LBD-GAL-DBD 벡터 5ng/ul 및 pgl4.35 luc2p/9x gal4uas/hygro 벡터 295ng/ul를 혼합하고 1ul/well의 LTX와 섞어준 다음 실온에서 30분간 안정화 시킨 후 50ul/well의 양으로 CV-1세포에 트랜스펙션하고 5시간 동안 배양하였다. 이어서 10% cd-FBS-DMEM에 대조군인 DMSO와 DMSO를 용매로하는 양성대조군 로지글리타존(Rosiglitazone), DMSO를 용매로하는 테스트 화학물질을 1/1000로 희석하여 500ul/well로 농도마다 4개의 웰에 처리한 후 37℃ 5% CO_2 조건하에 24시간 동안 반응시켰다. 다음으로 1x PBS 500 ul로 2회 세척하고 1x Passive lysis buffer(PLB) 150 ul를 넣은 뒤 실온에서 30분 동안 교반하여 세포를 용해시켰다. 세포 용해물을 1.5 ml 튜브에 모으고 4℃에서 13000 rpm으로 30초 동안 원심분리한 후 상층액 10 ul를 취하여 96웰 플레이트에 넣고 이중 루시퍼레이즈 리포터 어세이 시스템(Dual luciferase reporter assay system) 제품을 사용하여 Firefly luciferase와 Renilla 수준을 측정하였다. 결과 분석을 위하여 Firefly luciferase 수치를 Renilla 수치로 보정하여서 각 대조군 및 양성 대조군에 대한 테스트 화학물질의 반응성을 확인하였다.

[0064] **실시예 3. PPARγ-GAL4 리포터 유전자 분석 시스템의 스크리닝 효율성 검증**

[0065] 본 발명자들은 본 실시예에서 확립한 PPARγ-GAL4 리포터 유전자 분석 시스템 및 종래 공지된 다른 분석 시스템을 이용하여 PPARγ 활성물질을 스크리닝하고 그 결과를 비교하고자 하였다.

[0066] 본 실시예에서 PPARγ-GAL4 리포터 유전자 분석 시스템과의 비교를 위해 Tox21 10k library를 이용해 PPARγ 활성물질을 스크리닝하였으며, 보다 구체적으로 이를 위해 약 10,000여개 화학물질을 고속 처리량 스크리닝(High throughput screening; HTS) 방식으로 GeneBLAzer™ PPARγ-UAS-bla HEK293H 세포에서 진행하였다. 이후 본 발

명에 따른 리포터 유전자 분석 시스템의 결과와 Tox21 10k library의 실험결과를 비교하였다. 이때, PPARγ 활성물질로써 작용제 및 길항제를 각각 스크리닝 하기 위하여 화학물질을 본 발명에서 구축한 상기 *in vitro* 분석 시스템에 처리한 후 결과를 농도-반응 곡선을 이용하여 반수영향농도(Half maximal effective concentration; EC_{50})와 최소영향농도(lowest-observed-effect concentration; LOEC)로 각각 계산한 후 결과를 비교하였다.

[0068] **3-1. PPARγ 작용제 스크리닝**

[0069] 본 실시예에서는 PPARγ 작용제 스크리닝을 평가하기 위하여 33개의 화학물질을 사용하여 스크리닝을 진행하였고, CV-1 세포에서 33개 화학물질에 대한 작용제 농도-반응 곡선은 도 3a 내지 도 3c에 나타내었다.

[0070] 스크리닝 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이 33개의 화학물질 중에서 13개 물질 (39.39%)이 CV-1 세포와 HEK293 세포 모두에서 PPARγ 활성을 유의하게 증가시키거나 유의한 변화를 나타내지 않은 유사한 결과를 나타내는 것을 확인하였다. 이러한 화학물질들은 2개 세포주에서 유사한 결과를 보였으므로 PPARγ 활성을 유의한 증가시킨 화학물질은 PPARγ에 대한 작용제, 유의한 변화를 나타내지 않은 화학물질들은 비활성제로서의 가능성이 높음을 알 수 있었다.

표 1

[0071]

Chemical name	LOEC (uM)		EC_{50} (uM)	
	CV-1 cell	HEK293 cell	CV-1 cell	HEK293 cell
Rosiglitazone	-	-	0.038	0.014
Troglitazone	-	-	4.3	0.075
Disulfiram	-	-	1.01	15.5
Sumilizer WX	-	-	0.244	31.7
Benzo[a]pyrene	3.96	7.079	N.A	4.28
3-Iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate	10	56.99	N.A.	58.1
Deltamethrin	70	56.99	N.A.	72.9
Methyl salicylate	-	-	N.S.	0
Decanoic acid	-	-	N.S.	0
1,2-Benzenediol	-	-	N.S.	0
2,3,5,6-Tetrachlorophenol	-	-	N.S.	0
Isoxaben	-	-	N.S.	0
Tolylfluanid	-	-	N.S	0

[0072] 이에 반해, 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 33개의 화학물질 중 15개 화학물질 (45.45%)은 CV-1 세포에서만 작용제 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[0073] 결론적으로, 상기 PPARγ 작용제 스크리닝 결과는 본 발명에서 사용한 CV-1 세포기반의 PPARγ 작용제 스크리닝 방법이 기존 HEK293 세포에서의 스크리닝 방법보다 작용제를 더 민감하게 스크리닝 할 수 있다는 것을 시사하는 것이다.

표 2

[0074]

Chemical name	LOEC (uM)		EC_{50} (uM)	
	CV-1 cell	HEK293 cell	CV-1 cell	HEK293 cell
Ethylene dimethacrylate	-	-	11.2	0
Tributyl phosphate	-	-	14.8	0
Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate	-	-	10.3	0
Acetochlor	-	-	2.27	0
GW9662	-	-	24.7	0
Tetradifon	35	N.S.	N.A	0
Piperonyl butoxide	19.7	N.S.	N.A	0
3-Aminofluoranthene	4	N.S.	N.A	0
Lapachol	16.3	N.S.	N.A	0
Alachlor	3.26	N.S.	N.A	0

(Z)-9-octadecenoic acid	354	N.S.	N.A.	0
Hexyl cinnamic aldehyde	97	N.S.	N.A.	0
1,2-Dinitrobenzene	1	N.S.	N.A.	0
Bronopol	19.5	N.S	N.A.	0
3,3',5,5'-Tetrabromobisphenol A	20	N.S	N.A.	0
2-Octyl-3(2H)-isothiazolone	Inconclusive			
Dichlorvos				
Chlorothalonil				
Dactinomycin				
Rotenone				

[0075] (N.S. : 유의미한 차이 없음 (No significant)., N.A. : EC50 또는 LOEC 계산되지 않음 (Not available)., Inconclusive : 세포 생존율 감소 범위에서 활성이 변경되어 결과가 불명확함.)

[0077] **3-2. PPARγ 길항제 스크리닝**

[0078] 다음으로, PPARγ 길항제 스크리닝을 평가하기 위하여 29개 화학물질을 사용하여 CV-1 세포와 HEK293 세포에서 스크리닝을 진행하였으며, 최소영향농도로 계산 후 비교하였다. 이때, CV-1 세포 기반의 길항제 스크리닝에 사용된 모든 화학물질들은 Tox21 10k library에서 PPARγ 길항제를 스크리닝하기 위해 사용한 Rosilgitazone 0.21μM을 양성 대조군으로 공동 처리 하였다. CV-1 세포에서 29개 화학물질에 대한 길항제 농도-반응 곡선은 도 4a 내지 도 4c에 나타내었다.

[0079] 스크리닝 결과, 하기 표 3에 나타낸 바와 같이 29개의 화학물질 중에서 13개 물질 (39.39%)이 CV-1 세포와 HEK293 세포 모두에서 PPARγ 활성을 유의하게 감소시키거나 유의한 변화를 나타내지 않은 유사한 결과를 나타낸 것을 확인하였다. 이러한 화학물질들은 2개 세포주에서 유사한 결과를 보였으므로 PPARγ에 대한 길항제 또는 비활성제로서의 가능성이 높음을 알 수 있었다.

표 3

[0080]

Chemical name	LOEC (uM)	
	CV-1 cell	HEK293 cell
Tetradifon	35	13.2
Isoxaben	84	81.1
Tolylfluanid	4	5.95
GW9662	0.0048	0.0011
Alachlor	16.3	0.55
Acetochlor	16.3	2.70
Dactinomycin	0.316	0.026
Dichlorvos	N.S.	N.S.
Ethylene dimethacrylate	N.S.	N.S.
1,2-Benzenediol	N.S.	N.S.
Tributyl phosphate	N.S.	N.S.
Bis(2-Ethylhexyl) Phthalate	N.S.	N.S.
Methyl salicylate	N.S.	N.S.

[0082] 이에 반해, 하기 표 4에서 볼 수 있는 바와 같이 14개 화학물질 (55.19%)은 상기 두 세포주에서 서로 다른 경향성을 나타내었다. 구체적으로, 1개 세포주에서만 12개 화학물질들이 PPARγ의 길항제로 작용하는 결과를 나타내었고, 2개 화학물질은 길항제로 확실하게 작용을 하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 본 발명에 따른 리포터 유전자 분석 시스템은 위양성 결과를 나타내는 물질들을 구별하는데 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

표 4

[0083]

Chemical name	LOEC (uM)	
	CV-1 cell	HEK293 cell
2-Octyl-3(2H)-isothiazolone	1	N.S.
(Z)-9-octadecenoic acid	354	I.T.
Decanoic acid	N.S.	5.94
Rotenone	N.S.	2.70
2,3,5,6-Tetrachlorophenol	N.S.	2.70
3,3',5,5'-Tetrabromobisphenol A	N.S.	13.2
Chlorothalonil	N.S.	1.23
1,2-Dinitrobenzene	I.T.	2.70
3-Aminofluoranthene	I.T.	0.55
Sumilizer WX	I.T.	29.4
Lapachol	I.T.	1.23
Decamethrin	I.T.	0.00238
Bronopol	I.T.	N.S.
Hexyl cinnamic aldehyde	I.T.	N.S.
3-Iodo-2-propynyl-N-butylcarbamate	Inconclusive	
Piperonyl butoxide		

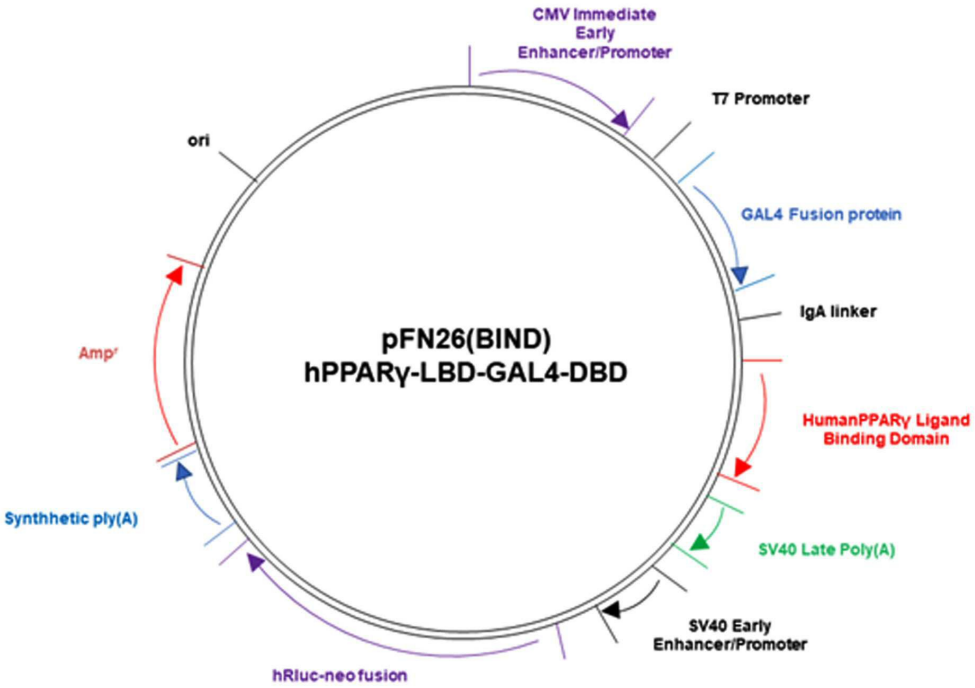
[0084] (N.S. : 유의미한 차이 없음 (No significant)., I.T. : 양성대조군의 활성을 증가시키는 경향을 보임 (Increased trend). , Inconclusive : 세포 생존율 감소 범위에서 활성이 변경되어 결과가 불명확함)

[0086] 결론적으로, 상기와 같은 PPARγ의 작용제 및 길항제 스크리닝 실험 결과로부터, 본 발명에서 구축한 리포터 유전자 분석 시스템을 이용한 PPARγ 활성물질의 스크리닝 방법을 통해 인간 PPARγ에 작용할 가능성이 높은 활성물질을 정확도를 높여 선별 할 수 있음을 확인하였으며, 기존에 PPARγ 활성제 혹은 비활성제로 위양성 결과를 보인 화학물질들을 구별하는데 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

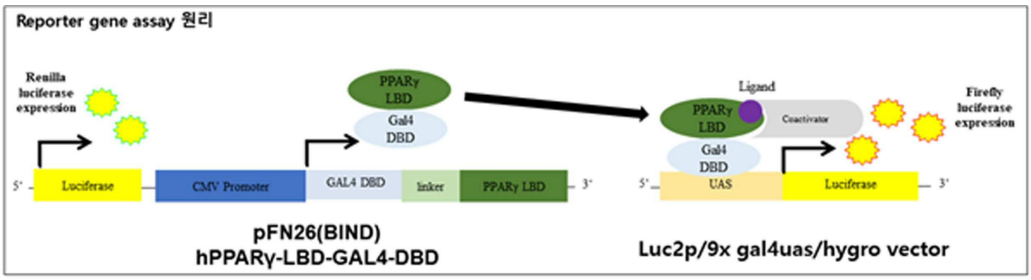
[0088] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

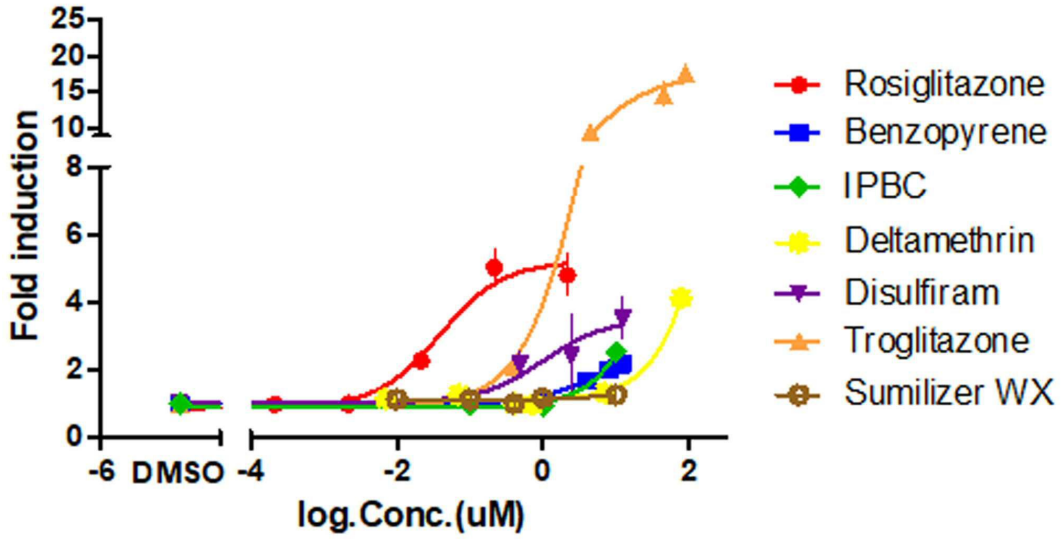
도면1


CMV Immediate Early Enhancer/Promoter
T7 Promoter
GAL4 Fusion protein
IgA linker
HumanPPARγ Ligand Binding Domain
SV40 Late Poly(A)
SV40 Early Enhancer/Promoter
hRluc-neo fusion
Synthhetic ply(A)
Amp
ori
pFN26(BIND)
hPPARγ-LBD-GAL4-DBD

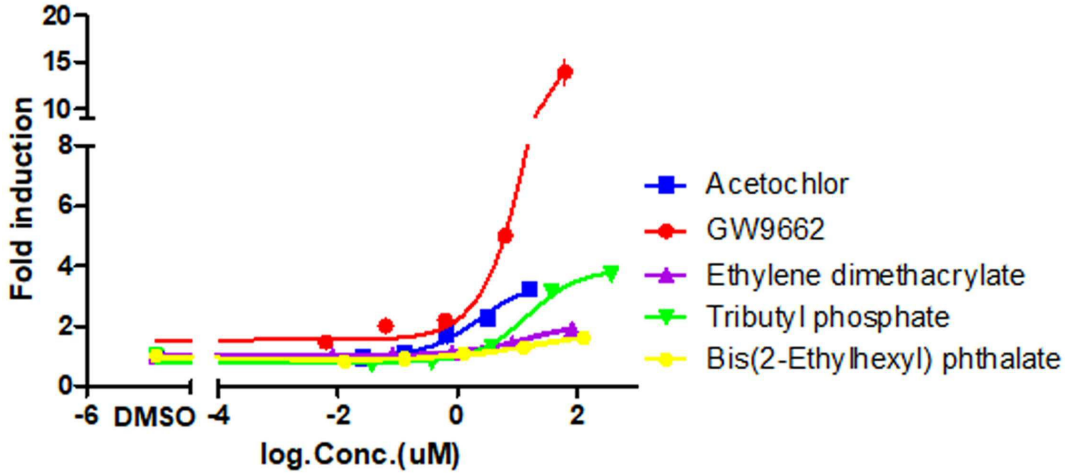
도면2


Reporter gene assay 원리
Renilla luciferase expression
PPARγ LBD
Gal4 DBD
Ligand
PPARγ LBD
Coactivator
Gal4 DBD
Firefly luciferase expression
5'
Luciferase
CMV Promoter
GAL4 DBD
linker
PPARγ LBD
3'
5'
UAS
Luciferase
3'
pFN26(BIND)
hPPARγ-LBD-GAL4-DBD
Luc2p/9x gal4uas/hygro vector

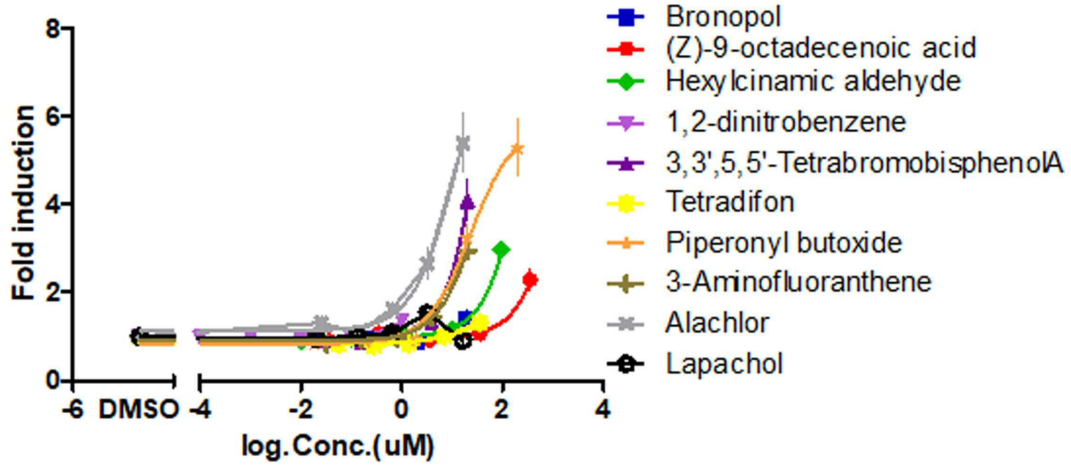
도면3a



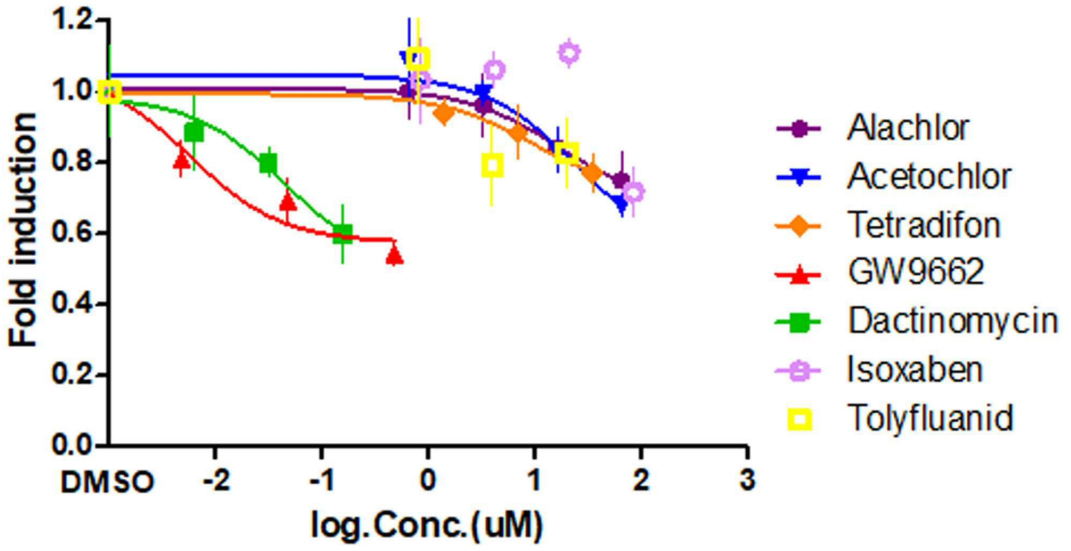
도면3b



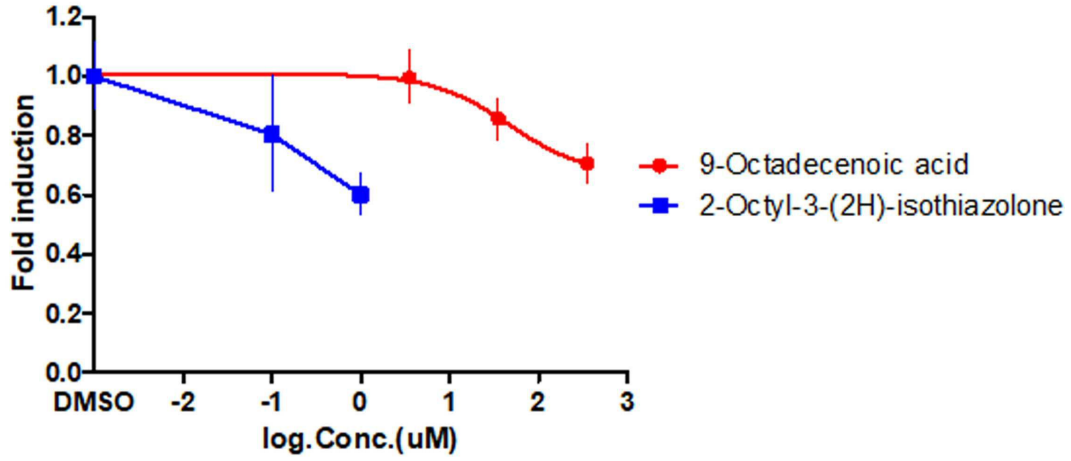
도면3c



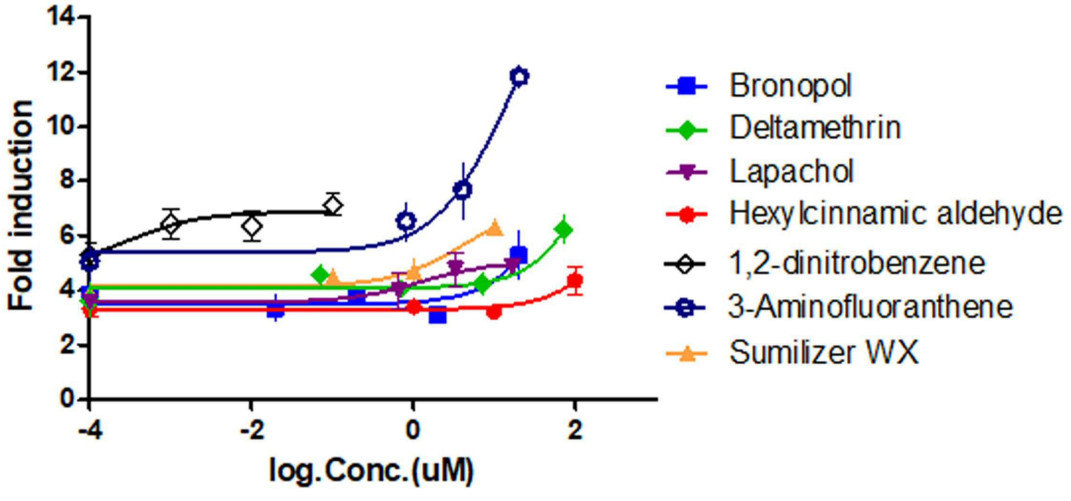
도면4a



도면4b



도면4c



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Method of screening for reagents activating PPARr using reporter

<130> PD19-258-P1

<150> KR 10-2020-0015730

<151> 2020-02-10

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCMV-SPORT6_Forward

<400> 1

acgatcgacc agctgaatcc agagtccgct ga 32

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCMV-SPORT6_Reverse

<400> 2

tctagactag tacaagtcct tgtagatctc ctgcaggagc 40

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAL4 DBD-PPARr LBD_Forward

<400> 3

caaatgggcg gtaggcgtg 19

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAL4 DBD-PPARr LBD_Reverse

<400> 4

gtacaagtcc ttgtagatct cctgcag 27

<210> 5

<211> 1308

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAL4 DBD-PPARr LBD

<400> 5

atgaagctac tgtcttctat cgaacaagca tgcgatattt gccgacttaa aaagctcaag 60

tgctccaaag aaaaaccgaa gtgcgccaag tgtctgaaga acaactggga gtgtcgctac 120

tctcccaaaa ccaaaaggtc tccgctgact agggcacatc tgacagaagt ggaatcaagg 180

ctagaaagac tggaacagct atttctactg atttttcctc gagaagacct tgacatgatt 240

ttgaaaatgg attctttaca ggatataaaa gcattgttaa caggattatt tgtacaagat 300

aatgtgaata aagatgccgt cacagataga ttggcttcag tggagactga tatgcctcta 360

acattgagac agcatagaat aagtgcgaca tcatcatcgg aagagagtag taacaaaggt 420

caaagacagt tgactgtagc gattccgtcg acaccaccta ctccctctcc agcgatcgac 480

cagctgaatc cagagtccgc tgacctccgg gccctggcaa aacatttgta tgactcatac 540

ataaagtcct tcccgctgac caaagcaaag gcgagggcga tcttgacagg aaagacaaca 600

gacaaatcac cattcgttat ctatgacatg aattccttaa tgatgggaga agataaaatc 660

aagttcaaac acatcacccc cctgcaggag cagagcaaag aggtggccat ccgcatcttt 720

cagggctgcc agtttcgctc cgtggaggct gtgcaggaga tcacagagta tgccaaaagc 780

attcctggtt ttgtaaatct tgacttgaac gaccaagtaa ctctcctcaa atatggagtc 840

cacgagatca tttacacaat gctggcctcc ttgatgaata aagatggggt tctcatatcc 900

gagggccaag gcttcatgac aagggagttt ctaaagagcc tgcgaaagcc ttttggtgac 960

tttatggagc ccaagtttga gtttgctgtg aagttcaatg cactggaatt agatgacagc 1020

gacttggcaa tatttattgc tgtcattatt ctcagtggag accgcccagg tttgctgaat 1080

gtgaagccca ttgaagacat tcaagacaac ctgctacaag ccctggagct ccagctgaag 1140

ctgaaccacc ctgagtcctc acagctgttt gccaagctgc tccagaaaat gacagacctc 1200

agacagattg tcacggaaca cgtgcagcta ctgcaggtga tcaagaagac ggagacagac 1260

atgagtcttc acccgctcct gcaggagatc tacaaggact tgtactag 1308

<210> 6

<211> 435

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAL4 DBD-PPARr LBD

<400> 6

Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
1 5 10 15

Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
20 25 30

Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
35 40 45

Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
50 55 60

Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
65 70 75 80

Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
85 90 95

Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
100 105 110

Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
115 120 125

Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
130 135 140

Thr Val Ala Ile Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ala Ile Asp
145 150 155 160

Gln Leu Asn Pro Glu Ser Ala Asp Leu Arg Ala Leu Ala Lys His Leu
165 170 175

Tyr Asp Ser Tyr Ile Lys Ser Phe Pro Leu Thr Lys Ala Lys Ala Arg
180 185 190

Ala Ile Leu Thr Gly Lys Thr Thr Asp Lys Ser Pro Phe Val Ile Tyr
195 200 205

Asp Met Asn Ser Leu Met Met Gly Glu Asp Lys Ile Lys Phe Lys His
210 215 220

Ile Thr Pro Leu Gln Glu Gln Ser Lys Glu Val Ala Ile Arg Ile Phe
225 230 235 240

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

305 310 315 320
Phe Met Glu Pro Lys Phe Glu Phe Ala Val Lys Phe Asn Ala Leu Glu
325 330 335
Leu Asp Asp Ser Asp Leu Ala Ile Phe Ile Ala Val Ile Ile Leu Ser
340 345 350
Gly Asp Arg Pro Gly Leu Leu Asn Val Lys Pro Ile Glu Asp Ile Gln
355 360 365
Asp Asn Leu Leu Gln Ala Leu Glu Leu Gln Leu Lys Leu Asn His Pro
370 375 380

Glu Ser Ser Gln Leu Phe Ala Lys Leu Leu Gln Lys Met Thr Asp Leu
385 390 395 400
Arg Gln Ile Val Thr Glu His Val Gln Leu Leu Gln Val Ile Lys Lys
405 410 415
Thr Glu Thr Asp Met Ser Leu His Pro Leu Leu Gln Glu Ile Tyr Lys
420 425 430
Asp Leu Tyr
435