

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
C12N 15/12

(11) 공개번호 특2000-0062345
(43) 공개일자 2000년 10월 25일

(21) 출원번호	10-1999-7005824	(87) 국제공개번호	WO 1998/29544
(22) 출원일자	1999년 06월 25일	(87) 국제공개일자	1998년 07월 09일
번역문제출일자	1999년 06월 25일		
(86) 국제출원번호	PCT/JP1997/04585		
(86) 국제출원출원일자	1997년 12월 12일		
(81) 지정국	EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 핀란드 국내특허 : 오스트레일리아 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 헝가리 이스라엘 일본 대한민국 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 우크라이나 미국 베트남 폴란드 루마니아 싱가포르		
(30) 우선권주장	96-347871 1996년 12월 26일 일본 (JP)		
	97-205815 1997년 07월 31일 일본 (JP)		
(71) 출원인	교와 핫코 고교 가부시끼가이샤 히라타 다다시		
(72) 발명자	일본 도쿄도 짜요다구 오테마찌 1쵸메 6-1 나베시마요우이치 일본사이타마켄요노시쓰야7-6-1-204 구로마코토 일본도쿄도히가시무라야마시하기야마초4-11-15-205 세키네스스무 일본가나가와켄요코하마시쓰즈키쿠에다히가시3-1-10-105 이이다아키히로 일본도쿄도마치다시나카마치3-9-9		
(74) 대리인	이병호		

심사청구 : 없음

(54) 신규 폴리펩타이드, 신규 DNA 및 신규 항체

요약

본 발명은 노화를 억제하는 활성을 갖는 폴리펩타이드, 당해 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA, 당해 DNA를 사용하는 가축의 개량법, 당해 DNA를 벡터에 삽입하여 수득되는 재조합체 DNA, 당해 재조합체를 함유하는 형질전환체, 당해 형질전환체를 사용한 본 발명의 폴리펩타이드의 생성법, 당해 폴리펩타이드를 인식하는 항체, 당해 폴리펩타이드에 대한 리간드, 당해 폴리펩타이드와 리간드와의 특이적인 결합을 억제하는 화합물, 당해 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 노화 억제 유전자의 발현을 증가시키는 화합물, 상기 DNA가 갖는 염기 서열중의 10 내지 50개 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드, 및 이들을 사용한 조기 노화증 치료제, 성인병 치료제 또는 노화 억제제에 관한 것이다.

대표도

도1

색인어

노화 억제 활성, 성인병 치료제, 노화 억제제, 가축의 개량법 및 유전자 치료,

명세서

기술분야

본 발명은 동물의 노화를 억제하는 신규한 폴리펩타이드, 당해 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA, 당해 폴리펩타이드를 인식하는 항체, 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 리간드, 본 발명의 폴리펩타이드와 리간드의 특이적인 결합을 억제하는 화합물, 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 노화 억제 유전자의 발현을 증가시키는 화합물에 관한 것이다.

배경기술

노화 현상은 통상적으로 나이를 먹음에 따라 진행되는 개체의 기능적, 외견적 변화에 있어서 개체의 약화를 의미하며, 노화에 따라 여러가지 성인병의 발병 빈도가 증가하는 것으로 공지되어 있다. 따라서 노화를 어떤 형태로 제어할 수 있는 약제는 성인병의 치료제, 예방제, 또한 기능적, 외견적 약화에 대한 보호제, 예방제로 될 것이 기대된다. 지금까지 과학적으로 당해 효과가 증명되어 있는 약제는 전혀 공지되어 있지 않다.

개체의 노화에 관한 유전자 레벨의 연구는 세계적으로 보아도 이제 막 개시되었을 뿐이며, 개체의 노화에 관한 분자 유전학적 정보는 지금까지 전무하다. 그러나 유전적 조기 노화증은 수 종류 공지되어 있으며 대표적인 것으로 웰나 증후군, 해턴슨·길포드 증후군(프로게리아), 다운 증후군, 타나 증후군, 루이·벌 증후군, 로스몬드·톰슨 증후군 등이 있다(참조: 후지모토 오자부로: 노화의 메커니즘과 제어, 아이피시 1993년).

웰나 증후군에 관해서는 원인 유전자의 동정이 이루어지고 있다[참조: Science, 272, 258(1996)]. 웰나 증후군의 원인 유전자는 헬리카제라고 생각되며 웰나 증후군 환자의 유전자에는 여러 가지의 변이가 확인되고 있다. 당해 환자에 있어서는 당해 유전자 변이에 의해 정상적인 리가제 단백질이 생성되지 않으며 그 기능이 발현되지 않음으로써 조기 노화 증상을 보이는 것으로 생각되고 있다.

상기한 점으로부터 노화에 관여하는 유전자가 존재하며 당해 유전자가 변이를 받음으로써 노화가 촉진된다는 생각이 나타났다. 다른 유전적 조기 노화증에도 원인 유전자가 존재하므로 노화에는 복수 유전자가 관여하고 있다고 생각된다.

노화에 관여하는 유전자가 기능을 잃어 조로 증상이 발병한다면 당해 유전자 기능을 보충하는, 즉 당해 유전자의 암호화된 단백질 생성물을 투여하거나 유전자 치료적으로 발현시키는 치료법이 유용하다고 생각된다. 또한 유전적 조로증 이외의 노화에서도 노화를 제어할 수 있으면 노화와 밀접하게 관련하여 나타나는 각종 성인병의 치료, 예방에 이용할 수 있다고 생각된다.

본 발명의 유전자는 히트웰나 증후군 원인 유전자와는 상이한 것이다.

발명의 개시

노화에 따라 발생 빈도가 증가하는 성인병의 치료, 예방, 진단, 노화에 따른 기능적, 외견적 약화에 대한 보호, 예방, 진단 및 조기 노화증의 치료, 진단 등은 지금까지 대응책이 공지되어 있지 않다. 본 발명은 이들 대응책에 대하여 유용하다.

본 발명은 사람을 포함하는 동물의 노화를 억제하는 활성을 갖는 폴리펩타이드, 당해 폴리펩타이드를 함유하는 조기 노화증 치료제, 성인병 치료제 또는 노화 억제제, 당해 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA, 당해 DNA를 함유하는 조기 노화증 치료제, 성인병 치료제 또는 노화 억제제, 당해 DNA를 사용하는 가축의 개량법, 당해 DNA를 벡터에 삽입하여 수득되는 재조합체 DNA, 당해 재조합체를 함유하는 형질전환체, 당해 형질전환체를 사용하는 본 발명의 폴리펩타이드의 생성법, 당해 폴리펩타이드를 인식하는 항체, 당해 항체를 사용하는 본 발명의 폴리펩타이드의 정량법 또는 노화 진단법, 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 리간드의 탐색방법, 당해 리간드, 본 발명의 폴리펩타이드와 리간드의 특이적인 결합을 억제하는 화합물의 스크리닝 방법 및 당해 스크리닝 방법에 따라 수득되는 화합물에 관한 것이다.

본 발명의 폴리펩타이드는 하기 공정 1 내지 7로부터 제조할 수 있다.

공정 1

공지된 히트 일롱게이션 팩터-1 알파 프로모터(EF1 알파 프로모터)에 Na^+/H^+ 역수송체를 연결하는 외래 유전자를 도입하는 형질전환 마우스(일본 공개특허공보 제(평)5-268856호) 등의 형질전환 마우스를 사용하여 당해 마우스의 호모 개체 중에서 현저한 조기 노화 증상을 보이는 마우스 개체를 발견해낸다. 하기에 형질전환 마우스에 도입한 마커로 되는 외래 유전자를 도입 유전자라고 부른다. 도입 유전자는 마우스 중에 도입하는 것을 검출할 수 있는 유전자이면 어느 것이나 사용할 수 있다.

조기 노화 증상을 보이는 마우스로서는 수명의 단축, 젊은 나이에에서의 동맥 경화, 골다공증, 선 조직의 위축, 신경 세포의 감소 등의 증상을 높게 발현하는 마우스를 들 수 있으며, 구체적으로는 제18회 일본분자생물학회 연회(참조: 나베시마 등, 2K-02, 1995년)에서 보고된 조기 노화형 증상을 보이는 마우스 개체를 들 수 있다.

당해 조기 노화형 증상을 보이는 마우스 개체는 하기에 기재하는 관찰 결과를 나타내는 특성을 갖는다.

[관찰예 1] 외견적 관찰 : 노화 마우스의 호모체(8에서 9주의 나이)는 몸 길이 약 4cm에서 같은 나이의 야생형 마우스(약 6cm)와 비교하여 상당히 작다. 또한 몸통 길이에 대하여 머리의 비율이 크다. 노화 마우스(8주의 나이, 수컷)에서는 체구가 왜소하지만 체모의 윤기, 사지의 발톱 등에 이상은 확인되지 않는다. 행동도 정상적이다.

수명에 관해서는 1) 생후 3주간 전후부터 성장이 정지하며 서서히 활동성이 저하된다.

2) 수명의 단축 : 평균 수명은 수컷이 8.0 ± 0.9 주($n=13$), 암컷이 9.3 ± 0.9 주($n=13$)이고 생후 15주까지 모든 예가 사망한다고 하는 조기 노화 증상을 특징으로 한다.

하기에 8주 나이 전후의 호모인 수컷, 암컷 각각 5마리씩 및 이들의 동배 형제인 야생형 마우스의 수컷, 암컷 각각 4마리씩을 해부하여 육안 관찰한 다음, 통상적인 방법에 따라(참조: 와타나베 게이치, 나카네 가즈호 편, 효소 항체법, 가쿠사이기가쿠, 1992년 개정 3판) 포르말린 고정, 파라핀 포위 매물, 얇게 절단하고 HE 염색을 실시하여 병리 관찰을 한다. (이하, 관찰에 12까지 동일한 수법으로 관찰을 한다.)

[관찰에 2] 하수체의 병리 관찰 : 호산성 세포의 감소가 확인된다. 하수체의 호산성 세포는 성장 호르몬(Growth Hormone: GH) 또는 프롤락틴(Prolactin=PRL)을 생성하는 세포이나 이들의 수가 감소하고 있다. 고령자에서는 GH 분비의 저하가 공지되어 있다.

[관찰에 3] 성선의 병리 관찰 : 성선이 현저하게 위축하고 있으며 불임인 것을 발견한다. 수컷에서는 정소가 육안으로 현저하게 위축되어 있다. 정세(精細)관의 직경은 야생형의 약 1/3정도에까지 위축되며 정자 성숙이 파키텐기 정도 세포까지밖에 진행하지 않으며 정자가 전혀 확인되지 않는다. 암컷에서는 난소·자궁이 역시 육안으로도 현저하게 위축되어 있다. 난자 성숙이 1차 난포까지밖에 진행하지 않으며 2차 난포나 황체는 확인되지 않는다.

[관찰에 4] 턱밑선의 병리 관찰 : 정상인 수컷에서는 선상부에 대량의 호산성 과립을 갖고 있지만, 호모체에서는 선상부의 세포는 높이가 낮으며 호산성 과립도 거의 확인되지 않는다.

[관찰에 5] 신장의 병리 관찰 : 소동맥 벽을 비롯하여 세뇨관 상피, 보우만씨 주머니 벽 등에 석회 침착이 확인된다. 보우만씨 주머니 벽은 편평 상피이다.

[관찰에 6] 혈관계의 병리 관찰 : 우선 호모 개체에서는 동맥 경화가 현저하다. 흉부 대동맥의 직경이 부정(不整)으로 고도의 중막 석회화가 존재하고 내막 비후도 확인된다. 이러한 중막 석회화와 내막 비후를 주체로 하는 동맥 경화는 신동맥 등의 중혈관이나 실질적인 장기내의 소혈관에 이르기까지 확인된다. 특히 신장 실질내의 혈관 속의 막 석회화는 현저하였지만 사구체·세뇨관은 거의 정상이다. 침착물이 확실히 Ca^{2+} 인 것은 Kossa 염색으로 확인된다. 대동맥 속의 막 석회화는 고령자에게 흔히 확인되는 사항이다.

[관찰에 7] 폐 조직의 병리 관찰 : 폐포벽의 파괴를 수반하는 폐포 구조의 파괴가 현저하다. 폐포벽에 석회 침착이 확인된다.

[관찰에 8] 연부조직·연골의 관찰 : 기관지 점막 고유층, 위점막 고유층·점막근판, 폐포 상피에 석회 침착이 확인된다. 위저선 세포 및 점막하 결합조직, 근육층에 석회 침착이 확인된다. 위점막의 석회화는 장기 사육한 래트·마우스에서 확인되는 사항과 유사하다. 또한 심장의 승모변류 석회화를 확인시키는 개체도

있다. 승모변류 석회화는 고령자에 특징적인 사항이다. 또한 관절연골, 기관지 연골, 근육 연골에도 석회 침착이 확인된다. 이들 유리연골의 석회화는 고령자에 흔히 확인되는 사항이다.

[관찰에 9] 골조직 병리 관찰 및 X선 관찰 : 대퇴골 원위치 말단의 골간 말단의 골 밀도의 상승, 골말단 연골의 비후가 확인된다. 관절연골에서는 연골세포에의 부정확한 석회 침착상이 확인된다. 대퇴골, 경골의 X선 소견에서는 X선 투과도가 항진하고 있으며 골염 밀도의 저하가 엿보인다. 실제 골염 밀도를 측정하면 골간부·경골 원위치 말단·대퇴골 근위치 말단에서는 야생형에 비하여 최고 약 절반으로까지 저하되어 있다. 조직학적으로도 피질골이 현저히 저하되어 있다. 단, 경골 근위치 말단과 대퇴골 원위치 말단의 골간 말단에서는 예외적으로 일차 해면골이 증생(增生)하고 있으며, 이 부분에서만 골염 밀도가 역으로 상승하고 있다.

[관찰에 10] 소뇌의 병리 관찰 : 소뇌 신경 세포층의 푸르키네 세포수의 감소 및 고재성 괴사·축색의 팽화가 확인된다. 소뇌에서는 노화에 따라 푸르키네 세포가 감소하고 이에 따라 축색돌기는 팽화하는 것이 공지되어 있다.

[관찰에 11] 간장의 병리 관찰 : 호산성에 염색되는 글리코겐 과립이 거의 확인되지 않는다. 간 세포의 세포질은 정상과 비교하면 약간 작다.

[관찰에 12] 흉선의 병리 관찰 : 흉선이 현저하게 위축되어 있으며 육안으로는 확인할 수 없는 개체도 있다.

공정 2

조기 노화형 증상을 보이는 마우스 개체에서 도입 유전자에 의해 파괴, 불활성화된 염색체 부분을 분리하여 해석하고 이의 염색체 영역에 존재하는 DNA를 클론화한다.

공정 3

당해 DNA의 정상 마우스 각 조직에서 발현 상태를 확인하며 조기 노화 증상을 나타내는 마우스 개체에서는 거의 발현이 확인되지 않는 조기 노화 증상의 원인 유전자(이하, 노화 억제 유전자라고 부른다)를 결정한다.

공정 4

또한 당해 마우스 노화 억제 유전자에 높은 상동성을 갖는 유전자를 사람 등의 cDNA 라이브러리로부터 클론화하여 사람 등에서 노화 억제 유전자를 결정한다.

공정 5

마우스, 사람 등의 노화 억제 유전자를 유전자 재조합 기술에서의 통상적인 방법에 따라 대장균, 곤충 세포, 포유류 세포 등으로 발현시켜 당해 유전자의 암호화된 폴리펩타이드를 생성·축적시킨다.

공정 6

당해 축적시킨 폴리펩타이드를 통상적인 방법에 따라 정제하여 당해 폴리펩타이드를 면역원으로서 사용하고 당해 폴리펩타이드에 대한 항체를 래트, 마우스, 토끼, 염소, 몰모트, 말, 소, 원숭이 등을 이용하여 취득한다.

공정 7

당해 항체가 대장균, 곤충 세포, 포유류 세포 등을 사용하여 생성·축적시킨 당해 폴리펩타이드를 인식하는 것을 확인한다.

하기에 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 DNA는 노화를 억제하는 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA이고 예를 들면, 서열 1, 2, 3, 4 및 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA, 서열 1, 2, 3, 4 및 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드의 아미노산 서열중 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 가지며 또한 노화를 억제하는 활성을 갖는 펩타이드를 암호화하는 DNA 또는 당해 DNA와 엄격한 조건하에서 하이브리드화하는 DNA를 들 수 있다.

당해 엄격한 조건하에서 하이브리드화 가능한 DNA란 노화를 억제하는 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 프로브로서 콜로니, 하이브리드화법, 플라크-하이브리드화법 또는 서던 블롯 하이브리드화법 등을 사용함으로써 수득되는 DNA를 의미하며, 구체적으로는 콜로니 또는 플라크 유래의 DNA를 고정화한 필터를 사용하고 0.7 내지 1.0M의 NaCl 존재하에 65℃에서 하이브리드화한 다음, 0.1배 내지 2배 농도의 SSC 용액(1배 농도의 SSC 용액의 조성은 150mM 염화나트륨, 15mM 시트르산나트륨으로 이루어진다)을 사용하여 65℃ 조건하에서 필터를 세정함으로써 동정할 수 있는 DNA를 들 수 있다. 하이브리드화는 몰레큘라·클로닝 : 어·래버러토리·매뉴얼(Molecular Cloning, A laboratory manual), 제2판[샘브록(Sambrook), 프리치(Fritsch), 매니아티스(Maniatis) 편집, 콜드 스프링 하버 래버러토리 프레스(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989년 간행(이하, 몰레큘라 클로닝 제2판으로 약칭한다)] 등에 기재되어 있는 방법에 준하여 실시할 수 있다. 하이브리드화할 수 있는 DNA로서 구체적으로는 서열 1, 2, 3, 4 및 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA의 염기 서열과 적어도 60% 이상의 상동성(相同性)을 갖는 DNA, 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖는 DNA, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 갖는 DNA를 들 수 있다.

본 발명의 올리고뉴클레오티드로서 상기 DNA가 갖는 염기 서열의 일부의 염기 서열과 동일한 염기 서열 또는 상보적인 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드를 들 수 있으며, 예를 들면 서열 6 내지 10으로부터 선택되는 DNA가 갖는 염기 서열중 연속한 5 내지 60잔기, 바람직하게는 10 내지 50잔기의 염기 서열과 동일한 염기 서열 또는 상보적인 염기 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 및 당해 올리고뉴클레오티드의 유도체를 들 수 있다.

본 발명의 폴리펩타이드로서 상기한 DNA에 의해 암호화되는 폴리펩타이드를 들 수 있으며, 구체적으로는 서열 1, 2, 3, 4 및 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드 또는 서열 1, 2, 3, 4 및 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드의 아미노산 서열중 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 가지며 또한 노화를 억제하는 활성을 갖는 펩타이드 등을 들 수 있다.

폴리펩타이드의 아미노산 서열중 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 가지며 또한 노화를 억제하는 활성을 갖는 펩타이드는 문헌[참조: Nucleic Acids Research, 10, 6487(1982), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409(1982), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 5662(1984), Science, 224, 1431(1984), PCT W085/00817(1985), Nature, 316, 601(1985), Gene, 34, 315(1985), Nucleic Acids Research, 13, 4431(1985), 커런트 프로토콜스 인 몰레큘라 바이올로지(Current Protocols in Molecular Biology), 8장 Mutagenesis of Cloned DNA, John Wiley & Sons, Inc.(1989)] 등에 기재된 방법에 준하여 조제할 수 있다.

본 발명의 항체는 상기한 폴리펩타이드를 인식하는 항체를 들 수 있다.

본 발명의 리간드는 본 발명의 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 분자인 것을 의미하며 본 발명의 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 분자이면 어느 것이나 본 발명의 리간드로서 사용할 수 있다.

하기에 본 발명의 노화를 억제하는 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA의 제조법을 나타낸다.

1) 유전자 도입부위에 인접하는 마우스 염색체 DNA의 클로닝

(i) 도입 유전자의 검출

형질전환 마우스에서는 도입 유전자는 다수 복제 삽입되어지나, 통상적으로 이들은 염색체 DNA 위의 1개소에 탄뎀(tandem)으로 연결되어 삽입된다.

상기한 조기 노화형 증상을 보이는 마우스에서도 도입 유전자의 삽입부위가 1개소인 것을 확인하기 위해 도입 유전자를 절단하지 않는 제한 효소(EcoRV, XbaI 등)로 야생형, 헤테로체, 호모체 각각의 간장으로부터 조제한 염색체 DNA를 소화하고 도입 유전자 전체 길이를 프로브로서 서던블로팅을 한다.

서던블로팅을 하여 헤테로체, 호모체로 단일의 시그널이 검출되는 것을 확인함으로써 도입 유전자가 마우스 염색체 위에 1개소에만 삽입되어 있는 것을 알 수 있다.

또한 도입 유전자를 프로브로 하는 형광 in situ 하이브리드화법 (Fluorescence in situ hybridization: FISH)에 의해 확인할 수 있다.

(ii) 유전자 도입부위에 인접하는 마우스 염색체 DNA의 클로닝은 아래와 같이 하여 수행할 수 있다.

형질전환 마우스로의 도입 유전자에 pUC 등의 플라스미드 벡터가 함유되어 있는 경우에는 플라스미드 레스큐법을 사용할 수 있다.

즉, 호모체의 염색체 DNA를 당해 플라스미드 벡터를 절단하지 않는 임의의 제한효소로 소화하여 자기 환상화시킨 후에 대장균으로 형질전환하면, 플라스미드 벡터 유래의 약제 내성 유전자(예를 들면, 암피실린 내성 유전자 등)를 갖는 플라스미드를 함유하여 자기 환상화한 것이 들어간 대장균만이 선택 배지에서 콜로니를 형성한다. 당해 대장균에서 수득되는 플라스미드는 도입 유전자 그 자체 및 당해 유전자에 인접하는 마우스 염색체 DNA의 단편을 함유할 가능성이 있다.

레스큐된 플라스미드에 함유되어 있는 마우스 염색체 DNA 부분의 단편을 프로브로서, 상기한 서던블로팅에서 사용하였을 때의 막과 같은 막을 사용하여 서던블로팅을 하고 도입 유전자에 인접하는 부분이 마우스 염색체 DNA의 단편 유래인 것을 확인한다. 즉, 야생형의 마우스에서는 야생형 대립 유전자(wild allele ; 이하, wild allele를 +로 표기하는 경우도 있다)만, 호모체에서는 변이형 대립 유전자(mutant allele ; 이하, mutant allele를 pg로 표기하는 경우도 있다)만, 헤테로체에서는 양쪽의 대립 유전자(allele) 유래의 시그널이 인식되는 것을 확인한다.

레스큐법 이외에 통상의 염색체 DNA 클론화법도 사용할 수 있다. 즉, 염색체 DNA를 제한효소로 소화하여 당해 절단 단편을 통상의 플라스미드 벡터 또는 파지 벡터를 사용하여 클로닝하고 라이브러리를 제작한다. 도입 유전자 단편을 프로브로서 사용하여, 상기한 레스큐법으로 사용하는 방법과 동일한 방법에 따라, 당해 라이브러리를 스크리닝함으로써 유전자 도입부위에 인접하는 마우스 염색체 DNA의 클로닝을 할 수 있다.

2) 마우스 유래의 노화 억제 유전자의 클로닝

염색체 DNA 클론화법 또는 레스큐법으로 취득한 플라스미드에 함유되어 있는 마우스 염색체 DNA 부분의 단편을 프로브로서 사용하고 야생형의 마우스 게놈성 라이브러리(Stratagene, 마우스 genomic library, λ FIXII)를 첨부한 매뉴얼에 따라 스크리닝하여 프로브와 하이브리드화하는 파지 클론을 취득한다.

노화 억제 유전자를 동정하기 위해 염색체 DNA 클론화법 또는 레스큐법으로 취득한 플라스미드에 함유되어 있는 마우스 염색체 DNA 부분을 중심으로 하여 통상적인 방법에 따라서 염기 서열을 순차적으로 결정한다.

염기 서열에서 CpG island에는 유전자의 제1 엑손이나 제2 엑손이 존재하는 경우가 많은 것이 공지되어 있으므로(참조: Bruce Alberts 등, Molecular Biology of the Cell 나카무라 게이코, 마쓰바라 겐이치 감역, 교이쿠샤, 쇼와 60년 4월 25일), 염기 서열 결정시에 CpG island 영역을 특정하여 염색체 DNA 클론화법 또는 레스큐법으로 취득한 플라스미드에 함유되어 있는 마우스 염색체 DNA 부분을 CpG island 영역을 함유하도록 적절한 제한효소, 예를 들면, Sac II 등으로 절단한다.

CpG island 영역이 확인되지 않는 경우에는 엑손 트래핑법[예를 들면, 엑손 트래핑 시스템(GIBCO BRL)]에 의해 또는 염기 서열을 근거로 엑손 부분을 예측하는 컴퓨터 소프트웨어(예를 들면, HEXON : 인터넷상 Human 게놈 Center, Baylor College of Medicine, Houston, TX의 유전자 구조 해석의 사이트인 <http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:933/gene-finder/gf.html>에서 이용 가능)로 엑손 부분을 예측하여 제한효소에 의해 엑손을 함유한다고 생각되는 DNA 단편을 분리할 수 있다.

당해 DNA 단편이 노화 억제 유전자에 관여하는 것을 하기 방법에 따라 확인할 수 있다.

당해 DNA 단편을 예를 들면, 메가프라임 DNA 라벨링 키트(Amersham사제) 등을 사용하여 α - [^{32} P]-dCTP로 표지한다.

당해 표지 DNA를 프로브로서 마우스 심장, 뇌, 태반, 폐, 간장, 골격근, 신장, 췌장의 poly(A)⁺ RNA 필터(Mouse Multiple Tissue Northern Blots의 필터(Clontech))를 사용하여 Hybond N⁺의 매뉴얼의 조건에 따라서 노던 하이브리드화를 한다.

당해 노던 하이브리드화에 의해 밴드가 수득된 조직을 특정한다.

야생형, 호모 개체 및 헤테로 개체의 마우스로부터 상기에서 특정된 조직을 취출하여 당해 조직으로부터 QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia) 등을 사용하여 poly(A)⁺ RNA를 조제한다.

각 마우스 조직에서 수득한 당해 RNA를 전기영동한 다음, Hybond N⁺ 필터로 통상적인 방법에 따라 전달하여 상기 표지 DNA 단편을 프로브로서 상기와 같이 노던 하이브리드화를 한다.

당해 노던 하이브리드화에 의해 수득한 밴드로부터 야생형 및 헤테로 개체와 비교하여 호모 개체에서 발현이 상이한 것을 확인한다. 발현이 상이한 예로서 밴드가 검출되지 않고 전혀 발현되지 않는 것 등을 들 수 있다. 당해 확인에 의해 당해 제한효소 절단 DNA 단편이 노화 억제 유전자에 관여하는 것을 확인할 수 있다.

이어서, 상기에서 특정된 조직을 야생형 마우스에서 추출하여 당해 조직으로부터 통상적인 방법에 따라 cDNA 라이브러리를 제작한다. 예를 들면, 야생형 마우스의 신장 poly(A)⁺ RNA에서 cDNA Synthesis 시스템(GIBCO BRL)을 사용하여 cDNA를 합성하고 그 양 말단에 EcoRI-NotI-SalI adaptor(SuperScript Choice 시스템 for cDNA Synthesis ; GIBCO BRL사제)를 부가한 다음, 클로닝 벡터 λ ZAP11[λ ZAP11 Cloning Kit(STRATAGENE사제)]의 EcoRI 부위에 삽입함으로써 cDNA 라이브러리를 제작할 수 있다.

cDNA 라이브러리를 제작하기 위한 클로닝 벡터로서는 대장균 K12주 중에서 자립 복제할 수 있는 것이면 파지, 벡터 플라스미드 벡터, 등 어느 것이라도 사용할 수 있으며, 구체적으로는 ZAPExpress[스트라타진 사제, Strategies, 5, 58(1992)], pBluescript II SK(+)[Nucleic Acids Research, 17, 9494(1989)], λ ZAP11(스트라타진사제), λ gt10, λ gt11[DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49(1985)], λ TriplEx(클론텍사제), λ ExCell(파마시아사제), pT7318U(파마시아사제), pcD2[H. Okayama and P. Berg ; Mol. Cell. Biol., 3, 280(1983)] 등을 들 수 있다.

숙주 미생물로서는 대장균에 속하는 미생물이면 어느 것이라도 사용할 수 있다. 적합하게는 Escherichia coli XL1-Blue 등을 들 수 있다.

구체적으로는 Escherichia coli XL2-Blue, Escherichia coli LX1-Blue MRF'[스트라타진사제, Strategies, 5, 81(1992)], Escherichia coli C600[R.K.Appleyard;Genetics, 39, 440(1954)], Escherichia coli Y1088[R.A.Young and R.W.Davis;Science, 222, 778(1983)], Escherichia coli Y1090[R.A.Young and R.W.Davis;Science, 222, 778(1983)], Escherichia coli NM522[J.A.Gough and N.E.Murray;J.Mol.Biol., 166, 1(1983)], Escherichia coli K802[W.B.Wood;J. Mol.Biol., 16, 118(1966)], Escherichia coli JM105[L.J. Reha - Krantz;Gene, 38, 275(1985)], Escherichia coli DH1, Escherichia coli MC1000 등이 사용된다.

cDNA 라이브러리의 제작에로서는 예를 들면, 야생형 마우스의 신장 poly(A)⁺ RNA에서 cDNA 합성 시스템(cDNA Synthesis 시스템 ; GIBCO BRL사제)를 사용하여 cDNA를 합성하고 그 양말단에 EcoRI-NotI-SalI adaptor(SuperScript Choice System for cDNA Synthesis ; GIBCO BRL사제)를 부가한 다음, 클로닝 벡터 λ ZAP11(λ ZAP11 Cloning Kit; STRATAGENE사제)의 EcoRI 부위에 삽입하여 제작된 cDNA 라이브러리를 들 수 있다.

상기 표지 DNA 단편을 프로브로서 사용하고 통상적인 방법에 따라 콜로니 또는 플라크-하이브리드화를 하여 당해 cDNA 라이브러리를 스크리닝한다.

당해 스크리닝에 의해 취득된 클론(형질전환체)로부터 노화 억제 유전자를 통상적인 방법에 따라 분리하고 유전자 서열을 통상적인 방법, 예를 들면, 생거(Sanger) 등의 디데옥시법[참조: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463(1977)] 등에 의해 결정한다. 염기 서열의 분석은 염기 서열 자동분석장치, 예를 들면, 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Bio system)사제 373A - DNA 시퀀서(Sequencer) 등을 사용하여 행할 수 있다.

이와 같이 결정된 노화 억제 유전자 서열로서 예를 들면, 서열 8에 기재된 서열을 갖는 DNA 등을 들 수 있다. 당해 DNA를 갖는 플라스미드 pNKM101을 함유하는 대장균 ENKM101은 FERM BP-5765로서 1996년 12월 5일자로 공업기술원 생명공학 공업기술연구소, 일본국 이바라기켄 츠쿠바시 히가시 1가 1번 3호(우편번호 305)에 기탁되어 있다.

또한 결정된 DNA의 염기 서열에 따라서 DNA 합성기로 화학합성함으로써 상기에서 취득된 DNA를 조제할 수도 있다.

DNA 합성기로서는 티오포스파이트법을 이용한 시마츠 세이사쿠쇼사제의 DNA 합성기, 포스포아미다이트법을 이용한 퍼킨 엘마사제의 DNA 합성기 모델 392 등을 들 수 있다. 하기에서도 서열 결정된 본 발명의 DNA를 동일한 수법에 의해 DNA 합성기로 합성할 수 있다.

또한 서열 6 내지 10 기재의 DNA에서 선택되는 DNA가 갖는 염기 서열중의 연속한 10 내지 50염기와 동일한 서열을 갖는 DNA를 센스 프라이머, 당해 DNA와 상보적인 서열을 갖는 DNA를 안티센스 프라이머로서 사용하고 당해 DNA에 상보적인 mRNA를 발현하고 있는 세포의 mRNA에서 조제한 cDNA를 주형으로서 PCR을 수행함으로써 목적하는 본 발명의 DNA를 조제할 수 있다. 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머로서는 양자의 용해 온도(T_m) 및 염기수가 극단적으로 변하는 일이 없는 상기 올리고뉴클레오타드가 바람직하다.

상기에서 취득된 노화 억제 유전자가 암호화하는 폴리펩타이드로서 예를 들면, 서열 3에 기재된 서열을 갖는 폴리펩타이드를 들 수 있다.

3) 마우스 유래 분비형 노화 억제 유전자 cDNA의 클로닝

상기 2) 또는 하기 4)에 있어서 취득되는 노화 억제 유전자를 사용하고 마우스 유래의 분비형 노화 억제 유전자를 취득할 수 있다. 구체적으로는 하기 방법에 따라 취득할 수 있다.

사람 신장 poly(A)⁺ RNA에서 수득된 서열 2에 기재된 아미노산 서열의 서열 1과 다른 535번째로부터 549번째의 아미노산 서열을 참고로 본 서열과 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 암호화하는 합성 DNA를 프라이머로서 사용하고 5' RACE법에 의해 마우스 신장 유래 cDNA 라이브러리에서 스크리닝을 한다. 수득한 cDNA 단편은 상기한 경우와 동일하게 유전자를 분리하여 염기 서열을 결정한다.

당해 염기 서열이 서열 2와 상동성이 높은 것을 목적하는 마우스 유래 분비형 노화 억제 유전자로서 들 수 있다. 예를 들면, 서열 9에 기재된 서열을 갖는 DNA 등을 들 수 있다. 또한 유전자가 암호화하는 폴리펩타이드로서는 예를 들면, 서열 4에 기재된 서열을 갖는 폴리펩타이드를 들 수 있다.

당해 DNA를 함유하는 플라스미드 pNKM112를 함유하는 대장균 ENKM112는 FERM BP-6184로서 1997년 11월 28일자로 공업기술원 생명공학 공업기술연구소, 일본국 이바라기켄 츠쿠바시 히가시 1가 1번 3호(우편번호 305)에 기탁되어 있다.

4) 사람 유래의 노화 억제 유전자 cDNA의 클로닝

(i) 상기에서 취득되는 마우스 유래의 노화 억제 유전자를 사용하여 하기에 나타내는 방법에 따라 다른 동물 유래, 예를 들면, 사람 유래의 노화 억제 유전자를 취득할 수 있다.

상기에서 취득되는 마우스 유래의 노화 억제 유전자를 함유하는 DNA 단편을 예를 들면, 메가프라임 DNA 라벨링 키트(Amersham사제) 등을 사용하여 α - [^{32} P]-dCTP로 표지한다.

목적하는 동물의 조직, 예를 들면, 사람 신장 또는 사람 해마 조직 등에서 상기한 마우스의 경우와 동일한 방법에 따라 cDNA 라이브러리를 제작한다.

상기 표지 DNA 단편을 프로브로서 사용하고 콜로니 또는 플라크-화이브리드화를 하여 당해 cDNA 라이브러리를 스크리닝한다.

당해 스크리닝에 의해 취득된 클론(형질전환체)에서 상기한 마우스의 경우와 동일하게 유전자를 분리하여 염기 서열을 결정한다.

당해 염기 서열이 마우스 노화 억제 유전자의 염기 서열과 상동성이 높은 것을 목적하는 동물의 노화 억제 유전자로서 들 수 있다.

당해 유전자 서열로서 예를 들면, 사람 신장에서 유래하는 서열 6 또는 7에 기재된 서열을 갖는 DNA 등을 들 수 있다. 당해 DNA를 갖는 플라스미드 pNKM103를 함유하는 대장균 ENKM103 및 플라스미드 pNKH106를 함유하는 대장균 ENKH106은 각각 FERM BP-5942, FERM BP-5767로서 1997년 5월 15일자 및 1996년 12월 5일자로 공업기술원 생명공학 공업기술연구소, 일본국 이바라기켄 츠쿠바시 히가시1가 1번 3호(우편번호 305)에 기탁되어 있다.

(ii) 상기한 바와 같이 하여 수득되는 동물 유래의 노화 억제 유전자를 사용하여 하기에 나타내는 방법에 따라 당해 동물의 다른 조직 유래 또는 다른 동물 유래의 노화 억제 유전자 cDNA를 취득할 수 있다.

상기에서 취득되는 노화 억제 유전자를 함유하는 DNA 단편을 예를 들면, 메가프라임 DNA 라벨링 키트(Amersham사제) 등을 사용하여 α - [^{32} P]-dCTP로 표지하여 프로브로 한다. 또는 적당한 프라이머 세트를 사용하여 목적하는 동물의 조직, 예를 들면, 사람 체장 등 유래의 RNA나 cDNA 라이브러리를 주형으로서 PCR 반응을 하여 증폭되는 DNA 단편을 상기한 바와 같이 아이소토프 표지하거나, 예를 들면 DIG DNA 라벨링 키트(베링거 만하임사제) 등을 사용하여 디곡시게닌(DIG) 등으로 표지하여 프로브로 한다. 프라이머 세트로서 구체적으로 적합하게는 예를 들면, 서열 19 및 서열 20의 염기 서열을 갖는 합성 DNA 등을 들 수 있다.

상기 표지 DNA 단편을 프로브로서 사용하고 목적하는 동물의 조직, 예를 들면, 사람 체장 등의 cDNA 라이브러리에 대하여 콜로니 또는 플라크-화이브리드화를 하여 당해 cDNA 라이브러리를 스크리닝한다.

당해 스크리닝에 의해 취득된 클론(형질전환체)으로부터 상기한 마우스, 사람의 경우와 동일하게 유전자를 분리하여 염기 서열을 결정한다.

당해 염기 서열이 마우스 또는 사람 노화 억제 유전자의 염기 서열과 상동성이 높은 것을 목적하는 동물의 노화 억제 유전자와 상동인 유전자로서 들 수 있다. 당해 유전자 서열로서 예를 들면, 사람 체장에서 유래하는 서열 10에 기재된 서열을 갖는 DNA 등을 들 수 있다. 당해 DNA를 갖는 플라스미드 pRYH02를 함유하는 대장균 XL1-Blue/pRYH02는 FERM BP-6193로서 1997년 12월 4일자로 공업기술원 생명공학 공업기술연구소, 일본국 이바라기켄 츠쿠바시 히가시1가 1번 3호(우편번호 305)에 기탁되어 있다.

5) 노화 억제 폴리펩타이드의 생성

상기한 바와 같이 하여 수득되는 노화 억제 유전자를 숙주세포 중에서 발현시키기 위해서는 우선, 노화 억제 유전자를 함유하는 DNA 단편을 제한효소류 또는 DNA 분해효소류로 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하는 적당한 길이의 DNA 단편으로 한 후에 발현 벡터중 프로모터의 하류에 삽입하고 이어서 상기 DNA를 삽입한 발현 벡터를 발현 벡터에 적합한 숙주세포 중에 도입한다.

숙주세포로서는 목적하는 유전자를 발현할 수 있는 것은 모두 사용할 수 있다. 예를 들면, 에스케리키아 속, 세라티아속, 코리네박테리움속, 브레비박테리움속, 슈도모나스속, 바실러스속, 미크로박테리움속 등에 속하는 원핵 생물, 클루이벨로미세스속, 사카로마이세스속, 시조사카로마이세스속, 트리코스포론속, 시와니오미세스속 등에 속하는 효모 균주나 동물세포 숙주 등을 들 수 있다.

발현 벡터로서는 상기 숙주세포에서 자립복제 가능 내지는 염색체 속으로 삽입할 수 있으며 노화 억제 유전자를 전사(傳寫)할 수 있는 위치에 프로모터를 함유하고 있는 것이 사용된다.

세균 등의 원핵 생물을 숙주세포로서 사용하는 경우는 노화 억제 유전자 발현 벡터는 원핵 생물 중에서 자립복제할 수 있는 동시에 프로모터, 리보솜 결합 서열, 노화 억제 유전자, 전사 종결 서열로 구성된 재조합 벡터인 것이 바람직하다. 프로모터를 제어하는 유전자가 함유될 수 있다.

발현 벡터로서는 예를 들면, pBTrp2, pBTac1, pBTac2(어느 것이나 베링거 만하임사에서 시판), pKK233-2(Pharmacia사제), pSE280(Invitrogen사제), pGEMEX-1(Promega사제), pQE-8(QIAGEN사제), pKYP10(일본국 공개특허공보 제(소)58-110600호), pKYP200[Agricultural Biological Chemistry, 48, 669(1984)], pLSA1[Agric. Biol., Chem., 53, 277(1989)], pGEL1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306(1985)], pBluescript II SK(-)(Stratagene사제), pGEX(Pharmacia사제), pET-3(Novagen사제), pTerm2(US4686191, US4939094, US5160735), pSupex, pUB110, pTP5, pC194 등을 예시할 수 있다.

프로모터로서는 대장균 등의 숙주세포 중에서 발현할 수 있는 것이면 어떠한 것이라도 된다. 예를 들면, trp 프로모터(P_{trp}), lac 프로모터(P_{lac}), P_L 프로모터, P_R 프로모터, P_{SE} 프로모터 등의 대장균이나 파지 등에서 유래하는 프로모터 SP01 프로모터, SP02 프로모터, penP 프로모터 등을 들 수 있다. 또한 P_{trp}를 2개 직렬시킨 프로모터(P_{trp} x2), tac 프로모터, letI 프로모터, lacT7 프로모터와 같이 인위적으로 설계 개변된 프로모터 등도 사용할 수 있다.

리보솜 결합 서열로서는 대장균 등의 숙주세포 중에서 발현할 수 있는 것이면 어떠한 것이라도 되지만 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열과 개시 코돈과의 사이를 적당한 거리(예를 들면, 6 내지 18염기)로 조절 한 플라스미드를 사용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 노화 억제 유전자의 발현에는 전사 종결 서열은 반드시 필요하지는 않지만, 적합하게는 구조 유전자 바로 아래에 전사 종결 서열을 배치하는 것이 바람직하다.

숙주세포로서는 에스케리키아속, 세라티아속, 코리넨박테리움속, 브레비박테리움속, 슈도모나스속, 바실러스속 등에 속하는 미생물, 예를 들면, Escherichia coli XL1-Blue, Escherichia coli XL2-Blue, Escherichia coli DH1, Escherichia coli MC1000, Escherichia coli KY3276, Escherichia coli W1485, Escherichia coli JM109, Escherichia coli HB101, Escherichia coli No.49, Escherichia coli W3110, Escherichia coli NY49, Bacillus subtilis, Bacillus amyloliquefaciens, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium immariophilum ATCC14068, Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066, Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Corynebacterium glutamicum ATCC14067, Corynebacterium glutamicum ATCC13869, Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870, Microbacterium ammoniaphilum ATCC15354 등을 들 수 있다.

재조합 벡터의 도입 방법으로서의 상기 숙주세포로 DNA를 도입하는 방법이면 어느 것도 사용할 수 있으며, 예를 들면 칼슘 이온을 사용하는 방법[참조: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110(1972)], 프로토플라스트법[참조: 일본국 공개특허공보 제(소)63-248394호] 또는 문헌[참조: Gene, 17, 107(1982) 나 Molecular & General Genetics, 168, 111(1979)]에 기재된 방법 등을 들 수 있다.

효모 균주를 숙주세포로서 사용하는 경우에는 발현 벡터로서 예를 들면, YEp13(ATCC37115), YEp24(ATCC37051), YCp50(ATCC37419), pHS19, pHS15 등을 예시할 수 있다.

프로모터로서는 효모균주 중에서 발현할 수 있는 것이면 어떠한 것이라도 되며, 예를 들면 PH05 프로모터, PGK 프로모터, GAP 프로모터, ADH 프로모터, gal 1 프로모터, gal 10 프로모터, 히트 쇼크 단백질 프로모터, MF α 1 프로모터, CUP 1 프로모터 등의 프로모터를 들 수 있다.

숙주세포로서는 사카로미세스 세레비사에(Saccharomyces cerevisiae), 시조사카로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe), 클루이베로미세스 락티스(Kluyveromyces lactis), 트리코스포론 폴룰란스(Trichosporon pullulans), 슈와니오미세스 알루비우스(Schwanniomyces alluvius) 등을 들 수 있다.

재조합 벡터의 도입 방법으로서의 효모에 DNA를 도입하는 방법이면 어느 것이나 사용할 수 있으며, 예를 들면 일렉트로포레이션법[Methods. Enzymol., 194, 182(1990)], 스페로플라스트법[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978)], 아세트산 리튬법[저널 오브 박테리올로지(J. Bacteriol.), 153, 163(1983)], 문헌[참조: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929(1978)]에 기재된 방법 등을 들 수 있다.

동물 세포를 숙주세포로서 사용하는 경우에는 발현 벡터로서 예를 들면, pcDNA1, pcDM8(프나코시사에서 시판), pAGE107[일본국 공개특허공보 제(평)3-22979; Cytotechnology, 3, 133, (1990)], pAS3-3(일본국 공개특허공보 제(평)2-227075), pCDM8[Nature, 329, 840, (1987)], pcDNA1/Amp(Invitrogen사제), pREP4(Invitrogen사제), pAGE103[J. Biochem., 101, 1307(1987)], pAGE210 등을 예시할 수 있다.

프로모터로서는 동물 세포 중에서 발현할 수 있는 것이면 어느 것이나 사용할 수 있으며, 예를 들면 사이토메갈로바이러스(사람 CMV)의 IE(immediate early) 유전자의 프로모터, SV40의 초기 프로모터, 레트로바이러스의 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 히트 쇼크 프로모터, SR α 프로모터 등을 들 수 있다. 또한 사람 CMV의 IE 유전자의 인핸서를 프로모터와 같이 사용하여도 된다.

숙주세포로서는 나말바 세포, HBT5637(일본국 공개특허공보 제(소)63-299), COS1 세포, COS7 세포, CHO 세포 등을 들 수 있다.

동물 세포에의 재조합 벡터의 도입법으로서의 동물 세포에 DNA를 도입할 수 있는 어떠한 방법도 사용할 수 있으며, 예를 들면 일렉트로포레이션법[Cytotechnology, 3, 133(1990), 인산칼슘법(일본국 공개특허공보 제(평)2-227075), 리포펙션법[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413(1987)], 문헌[참조: virology, 52, 456(1973)]에 기재된 방법 등을 사용할 수 있다. 형질전환체의 취득 및 배양은 일본국 공개특허공보 제(평)2-227075호 또는 일본국 공개특허공보 제(평)2-257891호에 기재되어 있는 방법에 준하여 할 수 있다.

곤충 세포를 숙주로서 사용하는 경우에는 예를 들면, 바큘로바이러스 익스프레스 벡터즈 어 래버러토리 매뉴얼(Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual), 커런트 프로토콜즈 인 몰레큘라 바이올로지 서플리먼트 1-38 (1987-1997), Bio/Technology, 6, 47(1988) 등에 기재된 방법에 따라서 단백질을 발현할 수 있다.

즉, 재조합 유전자 도입 벡터 및 바큘로바이러스를 곤충 세포에 함께 도입하여 곤충 세포 배양 상등액중

에서 재조합 바이러스를 얻은 다음, 또한 재조합 바이러스를 곤충 세포에 감염시켜 단백질을 발현시킬 수 있다.

당해 방법에 있어서 사용되는 유전자 도입 벡터로서는 예를 들면, pVL1392, pVL1393, pBlue BacIII(모두 인비트로젠사제) 등을 들 수 있다.

바쿨로바이러스로서는 예를 들면, 밤도둑나방과 곤충에게 감염하는 바이러스인 오토그래파 캘리포니카 뉴클리어 폴리헤드로시스 바이러스(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus) 등을 사용할 수 있다.

곤충 세포로서는 *Spodoptera frugiperda*의 난소세포인 Sf9, Sf21[바쿨로바이러스 익스프레스 벡터즈, 어 래버러토리 매뉴얼, 더블류 에이치 프리먼 앤드 캄퍼니(W.H. Freeman and Company), 뉴욕(New York), (1992)], *Trichoplusia ni*의 난소세포인 High5(인비트로젠사제) 등을 사용할 수 있다.

재조합 바이러스를 조제하기 위한 곤충 세포에의 상기 재조합 유전자 도입 벡터와 상기 바쿨로바이러스의 공(共)도입 방법으로서, 예를 들면 인산칼슘법(일본국 공개특허공보 제(평)2-227075), 리포펙션법[Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 84, 7413(1987)] 등을 들 수 있다.

유전자의 발현 방법으로서, 직접 발현 이외에 몰레클러 클로닝 제2판에 기재되어 있는 방법 등에 준하여 분비 생성, 융합단백질 발현 등을 할 수 있다.

효모, 동물 세포 또는 곤충 세포에 의해 발현시킨 경우에는 당 또는 당쇄가 부가된 폴리펩타이드를 얻을 수 있다.

노화 억제 유전자를 삽입한 재조합체 DNA를 보유하는 형질전환체를 배지에 배양하여 배양물 중에 노화 억제 폴리펩타이드를 생성 축적시켜 당해 배양물에서 노화 억제 폴리펩타이드를 채취함으로써 노화 억제 폴리펩타이드를 제조할 수 있다.

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드 제조용 형질전환체를 배지에서 배양하는 방법은 숙주의 배양에 사용되는 통상적인 방법에 따라서 할 수 있다.

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드 제조용 형질전환체가 대장균 등의 원핵 생물, 효모균 등의 진핵 생물인 경우, 이들 생물을 배양하는 배지는 당해 생물이 자화(資化)할 수 있는 탄소원, 질소원, 무기염류 등을 함유하여 형질전환체의 배양을 효율적으로 할 수 있는 배지이면 천연배지, 합성배지의 어느 것이라도 된다.

탄소원으로서, 각각의 미생물이 자화할 수 있는 것이면 되며, 글루코스, 푸룩토스, 슈크로스, 이들을 함유하는 당밀, 전분 또는 전분 가수분해물 등의 탄수화물, 아세트산, 프로피온산 등의 유기산, 에탄올, 프로판올 등의 알콜류가 사용된다.

질소원으로서, 암모니아 염화암모늄, 황산암모늄, 아세트산암모늄, 인산암모늄 등의 각종 무기산이나 유기산의 암모늄염, 그 밖의 질소함유 화합물 및 펩톤, 고기 추출물, 효모 추출물, 콘스텝리커, 카제인 가수분해물, 대두박 및 대두박 가수분해물, 각종 발효균체 및 이의 소화물 등이 사용된다.

무기물로서는 인산제일칼륨, 인산제2칼륨, 인산마그네슘, 황산마그네슘, 염화나트륨, 황산제일철, 황산망간, 황산구리, 탄산칼슘 등이 사용된다.

배양은 진탕배양 또는 심부 통기 교반배양 등의 호기적 조건하에서 한다. 배양 온도는 15 내지 40℃가 좋으며 배양 시간은 통상 16 내지 96시간이다. 배양중 pH는 3.0 내지 9.0으로 유지한다. pH의 조정은 무기 또는 유기산, 알칼리 용액, 요소, 탄산칼슘, 암모니아 등을 사용하여 한다.

또한 배양중 필요에 따라 암피실린이나 테트라사이클린 등의 항생 물질을 배지에 첨가할 수 있다.

프로모터로서 유도성의 프로모터를 사용한 발현 벡터로 형질전환한 미생물을 배양할 때에는 필요에 따라 인두서를 배지에 첨가할 수 있다. 예를 들면, lac 프로모터를 사용한 발현 벡터로 형질전환한 미생물을 배양할 때에는 이소프로필-β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG) 등을 trp 프로모터를 사용한 발현 벡터로 형질전환한 미생물을 배양할 때에는 인돌 아크릴산(IAA) 등을 배지에 첨가할 수 있다.

동물 세포를 숙주세포로서 수득한 형질전환체를 배양하는 배지로서는 일반적으로 사용되고 있는 RPMI 1640 배지[The Journal of the American Medical Association, 199, 519(1967)], Eagle의 MEM 배지[Science, 122, 501(1952)], DMEM 배지[Virology, 8, 396(1959)], 199 배지[Proceeding of the Society for the Biological Medicine, 73, 1(1950)] 또는 이들 배지에 소 태아 혈청 등을 첨가한 배지 등이 사용된다.

배양은 통상적으로 pH 6 내지 8, 30 내지 40℃, 5% CO₂ 존재하 등의 조건하에서 1 내지 7일 동안 한다.

또한 배양중 필요에 따라 카나마이신, 페니실린 등의 항생 물질을 배지에 첨가할 수 있다.

곤충 세포를 숙주세포로서 수득한 형질전환체를 배양하는 배지로서는 일반적으로 사용되고 있는 TNM-FH 배지[Pharmingen사제], Sf-900 II SFM 배지(기브코 BRL사제), ExCell 400, ExCell 405[어느 것이나 JRH Biosciences사제], Grace's Insect Medium[Grace, T.C.C Nature, 195, 788(1962)] 등을 사용할 수 있다.

배양은 통상적으로 pH 6 내지 7, 25 내지 30℃ 등의 조건하에서 1 내지 5일 동안 한다.

또한 배양중 필요에 따라 겐타마이신 등의 항생 물질을 배지에 첨가할 수 있다.

노화 억제 폴리펩타이드 제조용 형질전환체의 배양물로부터 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 단리 정제하기 위해서는 통상의 효소의 단리 정제법을 사용하면 된다.

예를 들면, 본 발명의 폴리펩타이드가 세포내에 용해 상태로 발현한 경우에는 배양 종료후, 세포를 원심분리에 의해 회수하여 수계 완충액에 현탁후, 초음파 파쇄기, 프렌치 프레스, 맨튼칼럼호모게나이저, 다이노밀 등에 의해 세포를 파쇄하여 무세포 추출액을 얻는다. 당해 무세포 추출액을 원심분리함으로써 수

득한 상등액에서 통상의 효소의 분리 정제법, 즉, 용매 추출법, 유안 등에 의한 염석법, 탈염법, 유기용매에 의한 침전법, 디에틸아미노에틸(DEAE)-세파로스, DIAION HPA-75(미쓰비시카세이사제) 등 레진을 사용한 음이온 교환 크로마토그래피법, S-Sepharose FF(파마시아사제) 등의 레진을 사용한 양이온 교환 크로마토그래피법, 부틸세파로스, 페닐세파로스 등의 레진을 사용한 소수성 크로마토그래피법, 분자체를 사용하는 겔 여과법, 친화성 크로마토그래피법, 크로마토포커싱법, 등전점 전기영동 등의 전기영동법 등의 수법을 단독 또는 조합으로 사용하여 정제 표준품을 얻을 수 있다.

또한 당해 폴리펩타이드가 세포내에 불용체를 형성하여 발현하는 경우에는 동일하게 세포를 회수후 파쇄하여 원심분리를 함으로써 수득한 침전 분획에서 통상적인 방법에 따라 당해 폴리펩타이드를 회수한 다음, 당해 폴리펩타이드의 불용체를 폴리펩타이드 변성제로 가용화한다. 당해 가용화액을 폴리펩타이드 변성제를 함유하지 않은 또는 폴리펩타이드 변성제의 농도가 폴리펩타이드가 변성하지 않은 정도로 희박한 용액에 희석 또는 투석하여 당해 폴리펩타이드를 정상적인 입체 구조로 구성시킨 다음, 상기와 같은 분리 정제법에 의해 정제 표준품을 얻을 수 있다.

본 발명의 폴리펩타이드 또는 이의 당 변이체 등의 유도체가 세포 외에 분비된 경우에는 배양 상등액에 당해 폴리펩타이드 또는 이의 당쇄 부가체 등의 유도체를 회수할 수 있다. 즉, 당해 배양물을 상기와 같은 원심분리 등의 수법에 의해 처리함으로써 가용성 분획을 취득하고 당해 가용성 분획으로부터 상기와 같은 분리정제법을 사용함으로써 정제 표준품을 얻을 수 있다.

또한 상기 방법에 따라 발현시킨 폴리펩타이드를 Fmoc 법(플루오레닐메틸옥시카보닐법), tBoc법(t-부틸옥시카보닐법) 등의 화학 합성법에 의해서도 제조할 수 있다. 또한 소와보에키(미합중국 Advanced chemTech사제), 퍼킨엘머저팬(미합중국 Perkin-Elmer사제), 파마시아 바이오테크(스웨덴 Pharmacia Biotech사제), 알로카(미국 Protein Technology Instrument사제), 크라보우(미국 SyntheCell-Vega사제), 일본 퍼셉티브 리미티드(미국 PerSeptive사제), 시마츠세이사쿠쇼 등의 펩타이드 합성기를 이용하여 합성할 수 있다.

6) 노화 억제 폴리펩타이드를 인식하는 항체의 생성

(i) 폴리클로날 항체의 제작

상기한 4) 또는 5)로 취득한 노화 억제 폴리펩타이드 전체 길이 또는 부분 단편 정제 표준품(항원)을 50 내지 100 µg/마리 정도로 토끼, 염소 또는 3 내지 20주 나이의 래트, 마우스 또는 햄스터의 피하, 정맥내 또는 복강내에 적당한 아쥬반트[예를 들면, 프로인드의 완전 아쥬반트(Complete Freund's Adjuvant) 또는 수산화 알루미늄 겔과 백일해균 백신 등]과 함께 투여한다.

당해 항원의 투여는 1회째의 투여후 1 내지 2주간 간격으로 3 내지 10회 실시한다. 각 투여후, 3 내지 7 일째에 안저정맥총에서 채혈하여 당해 혈청이 면역에 사용하는 항원과 반응하는 것을 효소 면역 측정법 [효소 면역 측정법(ELISA법):이가쿠쇼인 출간 1976년, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)] 등으로 확인한다.

면역에 사용한 항원에 대하여 당해 혈청이 충분한 항체가를 나타내는 토끼, 염소, 마우스, 래트 또는 햄스터로부터 혈청을 취득하여 당해 혈청에서 40 내지 50% 포화 황산암모늄에 의한 염석법, 카프르산 침전법, DEAE-세파로스 칼럼, 프로테인A-칼럼 또는 겔 여과 칼럼 등을 사용한 크로마토법 등의 통상적인 방법을 사용하여 정제 항체를 취득한다.

(ii) 모노클로날 항체의 제작

(a) 항체생성 세포의 조제

면역에 사용한 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드에 대하여 그 혈청이 충분한 항체가를 나타낸 래트를 항체생성 세포의 공급원으로 한다.

당해 항체가를 나타낸 래트에 항원 물질을 최종 투여한 후에 3 내지 7일째에 비장을 적출한다.

당해 비장을 MEM 배지(닛수이세이야쿠사제) 중에서 세단(細斷)하여 핀셋으로 풀어 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음, 상등액을 버린다.

수득한 침전 분획의 비장 세포를 트리스-염화암모늄 완충액(pH 7.65)으로 1 내지 2분 동안 처리하여 적혈구를 제거한 다음, MEM 배지로 3회 세정하여 얻어진 비장 세포를 항체생성 세포로서 사용한다.

(b) 골수종 세포의 조제

골수종 세포로서는 마우스 또는 래트로부터 취득한 주화 세포를 사용한다. 예를 들면, 8-아자구아닌 내성 마우스(BALB/c 유래) 골수종 세포주 P3-X63Ag8-U1(이하, P3-U1이라 약칭한다)[참조: Curr. Topics Microbiol. Immunol., 81, 1(1978)], [Europ. J. Immunol., 6, 511(1976)], SP2/0-Ag14(SP-2) [Nature, 276, 269(1978)], P3-X63-Ag8653(653) [J. Immunol., 123, 1548(1979)], P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495(1975)] 등을 사용할 수 있다. 이들 세포주는 8-아자구아닌 배지[RPMI-1640 배지에 글루타민 (1.5mM), 2-머캅토에타놀(5×10^{-5} M), 겐타마이신(10 µg/ml) 및 소 태아 혈청(FCS)(CSL사제, 10%)을 가한 배지(이하, 정상 배지라 한다)에 다시 8-아자구아닌(15 µg/ml)을 가한 배지]에서 계대하고, 세포 융합의 3 내지 4일 전에 정상 배지로 배양하며, 융합에는 당해 세포를 2×10^7 개 이상 사용한다.

(c) 하이브리도마의 제작

(a)에서 취득한 항체생성 세포와 (b)에서 취득한 골수종 세포를 MEM 배지 또는 PBS(인산2나트륨 1.83g, 인산1칼륨 0.21g, 식염 7.65g, 증류수 1 리터, pH 7.2)로 잘 세정하여 세포수가 항체생성 세포:골수종 세포 = 5 내지 10:1이 되도록 혼합하여 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음, 상등액을 버린다.

얻어진 침전 분획의 세포군을 잘 풀어 당해 세포군에 교반하면서 37℃에서 10^8 항체생성 세포당, 폴리에틸렌글리콜-1000(PEG-1000) 2g, MEM 2ml 및 디메틸설폭사이드(DMSO) 0.7ml를 혼합한 용액을 0.2 내지 1ml 첨가한 다음, 1 내지 2분마다 MEM 배지 1 내지 2ml를 수회 첨가한다.

첨가후, MEM 배지를 가하고 전량이 50ml가 되도록 조제한다.

당해 조제액을 900rpm에서 5분 동안 원심분리한 후, 상등액을 버린다.

수득한 침전 분획의 세포를 완만하게 쪼은 다음, 메스 피펫에 의해 흡입 흡출하여 완만하게 HAT 배지[정상 배지에 하이포크산틴(10^{-4} M), 티미딘(1.5×10^{-5} M) 및 아미노프테린(4×10^{-7} M)을 가한 배지] 100ml 중에 현탁한다.

당해 현탁액을 96웰 배양용 플레이트에 100 μ l/웰씩 나누어 주입하여 5% CO₂ 인큐베이터 중, 37℃에서 7 내지 14일 동안 배양한다.

배양후, 배양 상등액의 일부를 위하여 앤티보디즈[Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Chapter 14(1988)] 등에 기재되어 있는 효소 면역 측정법에 의해 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드에 특이적으로 반응하는 하이브리도마를 선택한다.

효소 면역 측정법의 구체적 예로서 하기의 방법을 들 수 있다.

면역시, 항원으로 사용한 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드를 적당한 플레이트에 코팅하여 하이브리도마 배양 상등액 또는 하기의 (d)에서 수득되는 정제 항체를 제1 항체로서 반응시키고 또한 제2 항체로서 비오틴, 효소, 화학 발광물질 또는 방사선 화합물 등으로 표지한 항 래트 면역글로불린 항체를 반응시킨 후에 표지물질에 따른 반응을 행하고 노화 억제 폴리펩타이드에 특이적으로 반응하는 것을 항 노화 억제 폴리펩타이드 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마로서 선택한다.

해당 하이브리도마주의 구체적인 예로서 하이브리도마 KM1902주를 들 수 있다. 하이브리도마 KM1902주는 1997년 6월 17일자로 공업기술원 생명공학 공업기술연구소에 FERM BP-5983로서 기탁되어 있다.

당해 하이브리도마를 사용하여 한계 희석법에 의해 클로닝을 2회 반복하고 [1회째는 HT 배지(HAT 배지로부터 아미노프테린을 제거한 배지), 2회째는 정상 배지를 사용한다] 안정적으로 강한 항체가 확인되는 것을 항 노화 억제 폴리펩타이드 항체생성 하이브리도마주로서 선택한다.

(d) 모노클로날 항체의 조제

프리스탄 처리[2, 6, 10, 14-테트라메틸펜타데칸(Pristane) 0.5 ml를 복강내 투여하고 2주간 사육한다]한 8 내지 10주 나이의 마우스 또는 누드 마우스에 (c)에서 취득한 항 노화 억제 폴리펩타이드 모노클로날 항체생성 하이브리도마 세포 5 내지 20×10^6 세포/마리를 복강내에 주사한다. 10 내지 21일 동안에 하이브리도마는 복수암화한다.

당해 복수암화한 마우스로부터 복수를 채취하여 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 고형분을 제거한다.

수득한 상등액을 40 내지 50% 포화 황산암모늄에 의한 염석법, 카프르산 침전법[Antibodies, A Laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)], DEAE-세파로스 칼럼, 프로테인A-칼럼 또는 셀로파인 GSL2000(세이카가쿠교사제)을 사용한 칼럼 크로마토법 등을 사용하고 IgG 또는 IgM 분획을 수집하여 정제 모노클로날 항체로서 사용한다.

항체의 서브클래스의 결정은 마우스 모노클로날 항체 타이핑 키트 또는 래트 모노클로날 항체 타이핑 키트를 사용하여 한다. 단백질량은 롤리법 또는 280nm에서의 흡광도로부터 산출한다.

7) 모노클로날 항체를 사용하는 면역 세포 염색

부착 세포를 사용하여 면역 세포 염색을 하는 경우에는 미리 하기의 처리를 함으로써 배양 플라스크에서 떼어낸 세포를 사용하는 것이 바람직하다.

즉, 배양 부착 세포를 PBS 완충액으로 세정하고 0.05% 트립신, 0.02% EDTA(에틸렌디아민4아세트산)를 함유하는 PBS 완충액 3ml를 가하고 여분의 용액을 제거한 다음, 37℃, 5분 동안 항온처리함으로써 플라스크에서 세포를 떼어낸다(이하, 이 조작을 트립신-EDTA 처리라고 부른다).

부유 세포에 관해서는 배양 세포를 그대로 사용할 수 있다.

면역 세포 염색을 하는 세포를 면역 세포 염색용 완충액(1% BSA, 0.02% EDTA, 0.05% 아지화나트륨을 함유하는 PBS) 등에 현탁하고 1 내지 20×10^5 개씩 한자 96웰 플레이트에 나누어 주입한다.

당해 플레이트에 (c)에서 취득한 항 노화 억제 폴리펩타이드 모노클로날 항체 생성 하이브리도마의 배양 상등액, (d)에서 취득한 정제 모노클로날 항체 또는 당해 모노클로날 항체를 공지 방법(효소항체법:가쿠사이키카쿠 출판 1985년)으로 비오틴 표지한 항체를 0.1 내지 50 μ g/ml의 농도가 되도록 면역 세포 염색용 완충액 또는 10% 동물 혈청을 함유하는 면역 세포 염색용 완충액을 사용하여 희석한 것을 20 내지 500 μ l/웰이 되도록 나누어 주입하여 빙냉하에서 30분 동안 방치한다.

상기에서 (c)에서 취득한 항 노화 억제 폴리펩타이드 모노클로날 항체생성 하이브리도마의 배양 상등액 또는 (d)에서 취득한 정제 모노클로날 항체를 사용하는 경우에는 상기 플레이트에 면역 세포 염색용 완충액을 첨가하여 세포를 세정한 다음, FITC 또는 피코에리스린 등의 형광색소로 표지한 항 마우스 면역글로불린 항체 또는 항 래트 면역글로불린 항체를 0.1 내지 50 μ g/ml 정도의 농도로 함유하는 면역 세포 염색용 완충액을 50 내지 500 μ l/웰만큼 나누어 주입하고 빙냉하에서 30분 동안 차광하여 방치한다.

비오틴 표지한 당해 모노클로날 항체를 사용한 경우에는 상기 플레이트에 스트렙토아비딘을 50 내지 500 μ l/웰만큼 나누어 주입하고 빙냉하에서 30분 동안 차광하여 방치한다.

양 케이스 모두를 방치한 후, 플레이트에 면역 세포 염색용 완충액을 첨가하고 세포를 잘 세정하여 셀 소터에 의해 해석한다.

8) 노화 억제 폴리펩타이드의 면역 침강

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 발현하는 CHO 세포 또는 곤충 세포를 살려 등의 배양 용기 속에서 배양한다.

당해 배양 용기에 PBS를 첨가하여 세포를 세정한다.

당해 배양 용기에 빙냉한 1% Triton X100, 20mM Tris-HCl, 150mM NaCl로 이루어지는 완충액(이후, 완충액 (1)이라 부른다) 등의 세포막을 가용화하는 완충액을 100 내지 500 μ l 첨가하여 빙상에서 30분 동안 정치한 다음, 5분 간격으로 천천히 진동시켜 가용화 처리한다.

또한, 배양 상등액으로부터 시료를 조제하는 때에는 상등액을 한외(限外) 여과막이나 동결건조 등의 방법으로 농축후, 그 시료를 사용하여 하기와 같은 방법으로 면역 침강 반응을 한다.

상기 가용화 처리액을 1.5ml용 원심 튜브에 회수하여 14,000rpm에서 30분 동안 원심분리한다.

수득한 상등액에 상기에서 사용한 완충액으로 평형화시킨 프로테인G-세파로스 또는 프로테인A-세파로스를 10 내지 50 μ l 첨가하여 4℃에서 1시간 이상 진탕한 다음, 5,000rpm에서 2분 동안 원심분리하여 상등액을 회수한다.

당해 상등액에 (c)에서 취득한 항 노화 억제 폴리펩타이드 모노클로날 항체 생성 하이브리도마의 배양 상등액 또는 (d)에서 취득한 정제 모노클로날 항체를 0.01 내지 50 μ g/ml로 되도록 첨가하여 4℃에서 1시간 이상 진탕한다.

당해 진탕액에 프로테인G-세파로스 또는 프로테인A-세파로스를 10 내지 50 μ l 첨가하여 4℃에서 1시간 이상 진탕한 후, 5,000rpm에서 2분 동안 원심분리한다.

수득한 침전 분획에 200 μ l의 상기의 세포막을 가용화하는 완충액을 첨가하여 침전을 현탁시킨다. 같은 조작을 3번 이상 반복하여 침전 분획을 세정한다.

당해 침전에 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동용 샘플 버퍼를 첨가하여 히트 블록을 사용하여 가열한 다음, SDS-PAGE를 한다.

SDS-PAGE 종료후, 수득한 겔 중의 폴리펩타이드를 PVDF막 등으로 전사하여 본 발명의 항 노화 억제 부분 단편 펩타이드 폴리클로날 항체 등을 사용한 웨스턴블로팅법 등에 의해 노화 억제 폴리펩타이드를 검출한다.

또한, 검출된 노화 억제 폴리펩타이드를 PVDF 막으로부터 절단 인출함으로써 당해 단백질을 정제할 수 있다. 정제한 본 발명의 폴리펩타이드의 구조 해석은 단백질 화학에서 통상 사용되는 방법, 예를 들면, 유전자 클로닝을 위한 단백질 구조 해석(참조: 히라노 히사시 저, 도코카가쿠도진 발행, 1993년)에 기재된 방법에 준하여 할 수 있다.

9) 마우스 유래의 노화 억제 유전자를 사용하는 조기 노화형 증상을 보이는 마우스로부터 당해 증상이 개선된 마우스의 취득(노화 억제 유전자의 도입에 의해 조기 노화 증상이 개선되고 치료에 효과적인 것의 증명)

상기에서 취득한 노화 억제 유전자를 과잉 발현하는 형질전환 마우스를 제작하기 위해서 마우스에게 도입·발현시키기 위한 노화 억제 유전자를 함유하는 DNA(이하, 도입 노화 억제 DNA라고 부른다)를 구축한다. 당해 도입 노화 억제 DNA를 야생형 마우스의 수정란의 수컷 전핵에 주입하여 가짜 임신을 유발시켜 높은 암컷 마우스에게 이식한다.

생성된 노화 억제 유전자를 과잉 발현하는 형질전환 마우스(+/+)를 조기 노화형 증상을 보이는 마우스로부터 얻어진 헤테로 개체(pg/+)와 교배하고 노화 억제 유전자를 발현하여 pg/+를 나타내는 마우스를 취득한다.

당해 마우스끼리 또는 당해 마우스와 pg/+를 나타내는 마우스를 교배하고 노화 억제 유전자를 발현하여 pg/pg를 나타내는 마우스를 취득한다.

당해 마우스가 조기 노화형 증상을 나타내지 않는 것을 확인함으로써 상기에서 취득한 노화 억제 유전자가 치료에 효과적이라는 것을 확인한다.

예를 들면, 하기에 나타내는 방법에 따라 조기 노화형 증상을 보이는 마우스로부터 당해 증상이 개선된 마우스를 취득할 수 있다.

(i) 도입 노화 억제 DNA의 구축

도입 노화 억제 DNA는 프로모터, 노화 억제 유전자 및 SV40 early splicing region & poly adenylation signal의 카세트(이하, SV40 카세트라 약칭한다)로 구성되어 있는 것이 바람직하다.

프로모터로서는 마우스 중에서 발현시킬 수 있는 것이라면 어느 것이나 사용할 수 있지만 강한 프로모터를 사용하는 것이 바람직하고, 예를 들면 human elongation factor 1 α [pEF321CAT(Kim DW et al. Gene, 91, 217, 1990)의 Hind III 처리 단편(5'UTR의 1st exon과 2nd exon의 일부를 함유하는 2.5kb의 프로모터 부분] 등을 들 수 있다.

노화 억제 유전자로서는 상기 2)에서 취득한 유전자이면 어느 것이나 사용할 수 있으며, 구체적으로는 서열 3에 기재된 아미노산 서열을 암호화하는 DNA를 들 수 있다.

SV40 카세트는 Clontech에서 시판하는 발현 벡터 pMAMneo의 염기 번호 1551-2427을 이용할 수 있다.

통상적인 방법에 따라 프로모터, 노화 억제 유전자, SV40 카세트의 순서로 되도록 연결하여 적당한 제한 효소, 예를 들면, Not I 등으로 절단하여 약 500 카피/ml의 농도가 되도록 PBS 완충액에 용해하여 도입용 노화 억제 DNA로서 사용한다.

(ii) 형질전환 마우스의 제작

형질전환 마우스는 통상의 마이크로인젝션(microinjection)법으로 제작할 수 있다(참조: 발생공학 실험 매뉴얼-형질전환 마우스를 만드는 방법, 노무라다츠지 감수, 가츠키 모토야 편, 고단샤 사이언티픽, 1987).

구체적으로는 C57BL/6과 C3H의 F1(BCF1)의 암컷(8-16주의 나이)에 7단위의 셀로트로핀(데이코쿠조키사제)을 복강내 투여한다. 그 48시간후에 7단위의 고나도트로핀(데이코쿠조키사제)을 복강내 투여하여 C3H의 수컷과 교배한다.

다음 날, 교미한 암컷의 난관 팽대부로부터 수정란을 채취한다. 정립 현미경하에서 마이크로 매니플레이터(나루모사제)를 사용하여 DNA 액을 당해 수정란의 수컷 전핵에 주입한다.

전날에 정관 결찰 수컷(ICR)과 교배하여 가짜 임신을 유발하여 높은 암컷 (ICR, 8-16주의 나이)의 난관에 당해 수정란을 이식한다.

이식후 20일째에 탄생한 새끼 마우스의 꼬리를 4 내지 5주의 나이가 된 시점에서 절단하여 염색체 DNA를 추출하고 PCR을 사용하여 아래와 같이 유전자형을 해석한다.

(iii) 유전자형의 해석

상기에서 취득한 마우스의 꼬리에 리시스 완충액[lysis buffer ; 50mM Tris-HCl(pH 8.0), 100mM NaCl, 20mM EDTA, 1% SDS, Proteinase K(SIGMA사제) 0.15mg/ml, Pronase E(SIGMA사제) 1mg/ml를 함유하는 완충액] 2ml를 가하여 50℃에서 밤새 방치한다.

당해 완충액을 등량의 페놀로 추출하여 그 상등액 1ml를 PCR의 주형으로서 사용한다.

PCR의 프라이머로서는 하기 5종류의 프라이머를 제작, 혼합하여 사용한다.

2)에서 취득한 노화 억제 유전자 유래의 염기 서열이고 게놈성 DNA에서는 그 서열 중에 인트론이 삽입되어 있는 영역에 상당하는 곳으로부터 2종류의 프라이머를(프라이머(1, 2)), 변이형 대립 유전자 및 야생형 대립 유전자에 공통으로 존재하는 영역(프라이머(3)), 변이형 대립 유전자에만 존재하는 영역(프라이머(4)), 야생형 대립 유전자에만 존재하는 영역(프라이머(5))으로부터 각각 1종류씩의 프라이머를 제작한다.

프라이머(1, 2)로서는 예를 들면, 서열 25 또는 26에 기재된 서열을 갖는 DNA를 들 수 있다.

프라이머(3)로서는 예를 들면, 서열 27에 기재된 서열을 갖는 DNA를 들 수 있다.

프라이머(4)로서는 예를 들면, 서열 28에 기재된 서열을 갖는 DNA를 들 수 있다.

프라이머(5)로서는 예를 들면, 서열 29에 기재된 서열을 갖는 DNA를 들 수 있다.

마우스에서 2)에서 취득한 노화 억제 유전자가 존재하면 프라이머(1 및 2)에 의해 PCR로 증폭되는 단편이 생성되며, 호모 개체(pg/pg)에서는 프라이머(3 및 4)에 의해 증폭되는 단편이, 야생형(+/+)에서는 프라이머(3 및 5)에 의해 증폭되는 단편이, 헤테로 개체(pg/+) 프라이머(3 및 4), 프라이머(3 및 5)에 의해 증폭되는 2단편이 생성됨으로써 마우스의 유전자형을 해석할 수 있다.

PCR은 통상적인 방법에 따라 행할 수 있다. 구체적으로는 50μl의 계[1x LA PCR 완충액 II(Mg plus), dNTP 혼합액 각 성분 각각 400mM, 프라이머 각각 0.2mM, TaKaRa LATaq 2.5U]에서 TaKaRa PCR Thermal Cycler 480 및 LA PCR 키트(다카라슈조사제)를 사용하여 94℃에서 1.5분 동안 가열후, 94℃에서 30초간, 56℃에서 30초간, 72℃에서 1.5분 동안의 공정을 1 사이클로 하여 30 사이클 수행하고 또한 72℃에서 10분 동안 가열한다.

(iv) 형질전환 마우스와 pg/+를 나타내는 마우스와의 교배

(ii)에서 취득한 형질전환 마우스와 pg/+를 나타내는 마우스를 교배함으로써 취득한 새끼 마우스의 유전자형을 (iii) 기재 방법에 따라 해석하여 노화 억제 유전자를 발현하여 Pg/Pg를 나타내는 마우스가 조기 노화형 증상을 나타내지 않는 것을 확인한다.

10) 마우스 유래의 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 아데노바이러스를 사용한 조기 노화 증상을 보이는 마우스로부터 당해 증상이 개선된 마우스의 취득

상기에서 취득한 노화 억제 유전자를 마우스에게 도입, 발현시키기 위해서 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 아데노바이러스를 구축하여 당해 재조합 바이러스를 조기 노화 증상을 보이는 마우스에게 투여하고 당해 마우스가 조기 노화 증상을 나타내지 않는 것을 확인함으로써 상기에서 취득한 노화 억제 유전자가 치료에 효과적이라는 것을 확인한다.

예를 들면, 하기에 나타내는 방법에 따라 조기 노화 증상을 보이는 마우스로부터 당해 증상이 개선된 마우스를 취득할 수 있다.

(i) 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 코스미드의 구축

도입 노화 억제 유전자 DNA는 프로모터, 노화 억제 유전자, 및 스플라이싱 영역, 및 폴리A 부가 시그널을 함유하여 E1A, E1B 및 E3을 결실한 5형 아데노바이러스 게놈 DNA를 함유하는 것이 바람직하다.

노화 억제 유전자를 제거하는 각 구성요소가 함유된 코스미드로서 pAxCawt[Nucl. Acids. Res., 23, 3816(1995)] 등을 들 수 있다.

노화 억제 유전자로서는 상기 2)에서 취득한 유전자이면 어느 것이나 사용할 수 있으며 구체적으로는 서열 3 기재의 아미노산을 암호화하는 DNA를 들 수 있다.

통상적인 방법에 따라 코스미드를 적당한 제한효소, 예를 들면, SmaI 등으로 절단하여 노화 억제 유전자를 접속함으로써 재조합 코스미드를 제작한다.

(ii) 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 아데노바이러스의 제작

재조합 바이러스의 제작은 이미 보고가 있는 미야케 등의 방법[Proc.Natl Acad.Sci.USA, 93, 1320(1996)]으로 제작할 수 있다.

구체적으로는 (i)에서 제작한 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 코스미드와 예를 들면, EcoT22I에 의해 절단된 E3, E1A, E1B를 결손한 5형 아데노바이러스(Ad5dIXDNA[J.Virology, 54, 711(1985)])를 혼합하여 예를 들면, 인산칼슘법(일본국 공개특허공보 제(평)2-227075)을 사용하여 E1A, E1B 유전자를 함유하는 세포주, 예를 들면, 사람 태아 신장 유래 293 세포에 도입한다. 세포내에서 코스미드와 아데노바이러스 DNA의 재조합이 발생하면 재조합 아데노바이러스가 생성하여 세포의 사멸이 일어나기 때문에 당해 세포의 사멸을 지표로 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 아데노바이러스의 생성을 확인한다. 사멸한 세포를 회수하여 예를 들면, 동결 용해를 반복하여 행하거나 세포 파쇄기를 사용하여 세포를 파괴함으로써 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 아데노바이러스 용액을 얻는다.

또한 수득한 재조합 바이러스는 그 DNA를 통상적인 방법에 따라 추출하여 제한효소, 예를 들면, XhoI로 절단함으로써 그 구조의 확인을 할 수 있다.

(iii) 재조합 아데노바이러스의 정제

수득한 재조합 바이러스는 예를 들면, 가네가에 등의 방법[참조: Jpn. J. Med. Sci. Biol., 47, 157(1994)]에 따라서 2회의 염화세슘 밀도 구배에 의해 정제하여 10% 글리세롤을 함유하는 PBS, 10% 글리세롤을 함유하는 HEPES-MgCl₂, 10% 글리세롤을 함유하는 HEPES-EDTA 등의 용액으로 현탁후, -80℃에 보존하여 적절히 사용할 수 있다.

(iv) 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 아데노바이러스의 조기 노화형 증상을 보이는 마우스에의 투여

이와 같이 수득한 재조합 바이러스를 10⁸ 내지 10¹⁰ 플라크 형성 단위(PFU)을 조기 노화형 증상을 보이는 마우스, 바람직하게는 3 내지 4주 나이 정도인 것의 꼬리 정맥에 투여하고 투여후의 경과에 있어서 조기 노화형 증상이 해소되었는가를 확인한다.

11) 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 리간드의 검색 및 동정

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드와 피시험 시료를 접촉함으로써 리간드를 탐색, 동정할 수 있다.

피시험 시료로서 예를 들면, 포유동물(예를 들면, 마우스, 래트, 몰모트, 햄스터, 돼지, 양, 소, 말, 개, 고양이, 원숭이, 사람 등)의 오줌, 체액, 조직 추출물, 세포배양 상등액, 세포 추출물 등을 사용할 수 있다.

예를 들면, 오줌, 체액, 조직 추출물, 세포배양 상등액, 세포 추출물 등을 적당한 희석, 농축, 분획 등을 하여 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드에 접촉시켜 세포 자극 활성 등을 지표로 다시 분획함으로써 최종적으로 단일의 리간드를 분리할 수 있다.

구체적으로는 원래 본 노화 억제 유전자를 발현하지 않는 세포와 당해 세포에 본 노화 억제 유전자를 도입 발현시킨 세포의 양쪽 세포에 피시험 시료를 접촉시켜 예를 들면, 세포내 칼슘, cAMP, cGMP 등의 세포내 정보전달 분자 농도의 변화, 세포내 단백질의 인산화, 초기 전사인자 유전자의 발현 변화, 세포막 전위의 변화, 세포내 pH의 변화, 세포외 정보전달 분자의 유리, 세포의 형태 변화 등, 여러 가지의 세포 자극 활성을 양쪽 세포에서 측정하고 양쪽 세포에서의 차이를 상세히 비교, 해석함으로써 리간드를 탐색하여 동정할 수 있다.

합성 화합물, 천연적으로 존재하거나 인공적으로 합성된 단백질, 당질, 지방질 및 그것들의 변형체, 유도체를 방사능 등에 의해 표지하고 당해 표지 화합물의 본 노화 억제 폴리펩타이드 발현 세포, 당해 세포막 분획 또는 마이크로티터 플레이트 등에 고층(固層)화한 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드에의 결합량을 측정함으로써 본 발명의 리간드인가를 동정할 수 있다.

또한 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드 또는 이의 부분 개변체나 부분 펩타이드를 BIAcore(Pharmacia Biotech사제)의 센서 칩에 공유결합시켜 피시험 시료를 접촉시킨다고 하는 공지된 방법[Nature, 368, 558(1994)]에 의해 리간드를 탐색하여 동정할 수 있다.

또한 표지된 본 노화 억제 유전자 폴리펩타이드 또는 비표지의 당해 폴리펩타이드와 당해 폴리펩타이드에 대한 표지 항체를 사용하여 당해 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 리간드를 하기 방법으로 탐색하여 동정할 수 있다.

즉, 오줌, 체액, 조직 추출물, 세포 배양 상등액, 세포 추출물 등을 적당하게 분획을 한 다음, 폴리아크릴아미드 전기영동, 아갈로스 전기영동, 이차원 전기영동 등의 전기영동이나 HPLC 등의 칼럼 크로마토그

래피, 박층 크로마토그래피 등의 수법에 의해 더욱 분획하고 본 노화 억제 유전자를 발현하고 있는 개체와 발현하지 않고 있는 개체 또는 본 노화 억제 유전자를 발현하고 있는 세포와 발현하지 않고 있는 세포 등의 사이에서 차이를 상세히 비교, 해석함으로써 본 노화 억제 유전자의 발현과 특이적으로 상관하여 확인되는(또는 소실하는) 밴드나 스팟, 피크를 특정한다.

당해 밴드, 스팟, 피크로부터 블로팅 수법을 사용하여 겔 또는 박층 플레이트로부터 니트로셀룰로소막, 나일론막, PVDF막 등의 지지체에 찍어 낸 다음, 표지한 본 노화 억제 유전자 폴리펩타이드 또는 비표지의 당해 폴리펩타이드와 당해 폴리펩타이드에 대한 표지 항체를 사용하여 당해 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 밴드, 스팟을 탐색하고 당해 밴드, 스팟으로부터 리간드를 추출하여 동정할 수 있다.

12) 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드와 본 발명의 리간드와의 특이적 결합을 억제하는 화합물의 탐색 및 동정

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드와 본 발명의 리간드를 접촉시킨 경우와 본 노화 억제 폴리펩타이드, 본 발명의 리간드 및 시험 화합물을 접촉시킨 경우와의 비교를 수행함으로써 피시험 시료로부터 본 노화 억제 폴리펩타이드와 리간드의 특이적 결합을 억제하는 화합물(예를 들면, 단백질, 펩타이드, 당질, 지질, 비펩타이드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생성물, 생체 성분 등)을 스크리닝할 수 있다. 당해 스크리닝에 의해 수득되는 화합물에는 리간드의 노화 억제 폴리펩타이드로의 특이적 결합을 억제하여 노화 억제 폴리펩타이드가 갖는 활성을 억제하는 활성을 갖는 화합물(길항제), 및 특이적 결합을 억제하지만 리간드와 동일한 기능을 갖는 또는 대체하는 활성을 갖는 화합물(효능제)이 함유된다.

피시험 시료로서 합성 화합물, 천연적으로 존재하는 또는 인공적으로 합성된 단백질, 당질, 지질 및 그것들의 변형체, 유도체 등 외에 예를 들면, 포유동물(예를 들면, 마우스, 래트, 몰모트, 햄스터, 돼지, 양, 소, 말, 개, 고양이, 원숭이, 사람 등)의 오줌, 체액, 조직 추출물, 세포배양 상등액, 세포 추출물, 또한 발효 생성물, 식물 그 밖의 생물의 추출물 등을 들 수 있다.

당해 화합물의 스크리닝 방법으로서 예를 들면, 하기 방법을 들 수 있다.

본 노화 억제 유전자를 도입 발현시킨 세포 또는 원래 본 노화 억제 유전자를 발현하고 있는 세포에 본 발명의 리간드 단독 또는 본 발명의 리간드와 피시험 시료를 접촉시켜 예를 들면, 세포내 칼슘, cAMP, cGMP 등의 세포내 정보전달 분자농도의 변화, 세포내 단백질의 인산화, 초기 전사인자 유전자의 발현 변화, 세포막 전위의 변화, 세포내 pH의 변화, 세포의 정보전달 분자의 유리, 세포의 형태 변화 등, 각종 세포 자극 활성을 리간드 단독인 경우와 리간드와 피시험 시료를 접촉시킨 경우로 비교함으로써 본 발명의 노화 억제 유전자 폴리펩타이드와 본 발명의 리간드의 특이적 결합을 억제하는 화합물을 탐색하여 동정하는 방법을 들 수 있다.

또한 본 발명의 리간드를 방사능 등에 의해서 표지하여 당해 표지 리간드의 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드 발현 세포, 당해 세포막 분획 또는 마이크로티터 플레이트 등으로 고층화한 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드에의 결합량을 당해 표지를 이용하여 측정하고 리간드 단독인 경우와 리간드와 피시험 시료를 접촉시킨 경우로 비교함으로써 본 노화 억제 유전자 폴리펩타이드와 리간드와의 결합을 억제하는 화합물을 탐색하여 동정할 수 있다.

13) 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드와 본 발명의 리간드가 결합한 결과 유도되는 화합물의 탐색 및 동정

본 발명의 폴리펩타이드를 발현시킨 세포와 당해 폴리펩타이드를 발현하지 않는 세포의 각각에 본 발명의 리간드를 접촉시킨 경우와 접촉시키지 않는 경우에 이의 배양 상등액, 세포, 세포질 분획, 세포막 분획 등에 대하여 폴리아크릴아미드 전기영동, 아가로스 전기영동, 이차원 전기영동 등의 전기영동이나 HPLC 등의 칼럼 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피 등을 수행하여 각 성분을 분획하고 각 성분과 관해서 비교를 함으로써 리간드를 접촉시킨 경우에 특이적, 또한 당해 폴리펩타이드 발현에 상관하여 특이적으로 나타나거나 소실하는 밴드, 스팟, 피크 등을 동정하고 당해 밴드, 스팟, 피크에서 목적하는 분자를 취득할 수 있다.

또한 본 발명의 폴리펩타이드를 발현하고 있는 개체로서는 당해 폴리펩타이드와 리간드의 특이적 결합이 항상적으로 발생하고 있다고 생각되며, 발현하지 않는 개체(구체적으로 적합한 예로서는 본 특허 기재의 초기 노화 마우스)에서는 이러한 상호 작용이 발생하지 않는다고 생각된다. 따라서 정상적인 마우스와 본 특허 기재의 초기 노화 마우스의 여러 가지 장기, 조직, 체액, 혈액, 오줌 등을 적당하게 분획을 한 다음, 폴리아크릴아미드 전기영동, 아가로스 전기영동, 이차원 전기영동 등의 전기영동이나 HPLC 등의 칼럼 크로마토그래피, 박층 크로마토그래피 등의 수법에 의해 분획하여 비교를 함으로써 양자에서 다른 거동을 나타내는 밴드, 스팟, 피크 등을 탐색하고 당해 밴드, 스팟, 피크에서 분자를 회수하여 당해 밴드, 스팟, 피크로부터 목적하는 화합물을 동정할 수 있다.

14) 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드의 발현을 증강시키는 화합물(이하, 발현 증강 화합물로 약칭한다)의 탐색 및 동정

(i) 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 인식하는 항체를 사용한 탐색 및 동정

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 피시험 시료와 접촉시킨 다음, 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 인식하는 항체를 사용함으로써 그 세포 중, 세포배양 상등액 중에 존재하는 발현 증강 화합물을 탐색, 동정할 수 있다.

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 발현하는 세포로서 예를 들면, 마우스 신장 유래 세뇨관 세포를 들 수 있으며, 농도 구배법, 침투압 내성 분리법, 세뇨관 분리법 등의 공지된 방법[참조: 신장과 투석, 임시

증간호, 588(1991)]을 이용하여 조제한 것을 사용할 수 있다.

피시험 시료로서 합성 화합물, 천연적으로 존재하거나 인공적으로 합성된 단백질, 펩타이드, 비펩타이드 성 화합물, 당질, 지질 및 이들의 변형체, 유도체 등 외에 예를 들면, 포유동물(예를 들면, 마우스, 래트, 몰모트, 햄스터, 돼지, 양, 소, 말, 개, 고양이, 원숭이, 사람 등)의 오줌, 체액, 조직 추출물, 세포배양 상등액, 세포 추출물, 또한 발효 생성물, 식물 그 밖의 생물의 추출물 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 예를 들면, 당해 세포가 증식할 수 있는 배지에 현탁하여 피시험 시료를 당해 배지에 첨가하여 당해 세포를 접촉시킨 다음, 당해 세포가 발현하는 노화 억제 폴리펩타이드 함량을 상기 6) 기재의 폴리클로날 항체 또는 모노클로날 항체를 사용하여 상기 7) 기재 방법에 준하여 정량한다.

피시험 시료를 첨가하지 않은 시스템과 비교하여 노화 억제 폴리펩타이드 함량을 증가시킬 수 있는 피시험 시료를 탐색함으로써 발현 증강 화합물을 동정할 수 있다.

(ii) 본 발명의 노화 억제 유전자의 전사 생성물의 정량계를 이용한 탐색 및 동정

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 피시험 시료와 접촉시킨 다음, 본 발명의 노화 억제 유전자의 전사 생성물을 정량함으로써 발현 증강 화합물을 탐색, 동정할 수 있다.

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 발현하는 세포 및 피시험 시료로서 상기 (i) 기재의 것을 사용할 수 있다.

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 발현하는 세포를 예를 들면, 당해 세포가 증식할 수 있는 배지에 현탁하고 피시험 시료를 당해 배지에 첨가하여 당해 세포를 접촉시킨 다음, 당해 세포가 발현한 노화 억제 유전자의 전사 생성물의 양을 통상의 노던 블롯 하이브리드화법, RNA의 도트 블롯 하이브리드화법, RT-PCR 법 등을 사용하여 정량할 수 있다.

하이브리드화법 등에 사용할 수 있는 프로브 및 RT-PCR 법 등에 사용할 수 있는 프라이머로서 본 발명의 노화 억제 유전자 단편을 들 수 있으며, 구체적으로는 서열 6, 7, 8, 9 및 10 기재의 DNA 서열로부터 선택되는 서열을 갖는 DNA 단편을 적합하게 사용할 수 있다.

피시험 시료를 첨가하지 않은 계와 비교하여 본 발명의 노화 억제 유전자의 전사 생성물 함량을 증가시킬 수 있는 피시험 시료를 탐색함으로써 발현 증강 화합물을 동정할 수 있다.

(iii) 리porter 유전자를 이용한 탐색 및 동정

본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 전사를 제어하는 영역(이하, 전사 제어 영역으로 약칭한다)의 하류에 리porter 유전자가 연결된 DNA를 함유하는 플라스미드로 형질전환된 형질전환체와 피시험 시료를 접촉시킨 다음, 리porter 유전자에 의해 암호화된 폴리펩타이드의 발현량을 정량함으로써 발현 증강 화합물을 탐색, 동정할 수 있다.

전사 제어 영역으로서 하기 실시예 2에 기재되어 있는 호모체에 있어서 결실이 확인되고 있는 노화 억제 유전자의 상류 약 6kb의 곳에 존재하는 약 8kb의 영역을 들 수 있다. 또한 당해 영역을 적당한 제한 효소를 사용하여 적절한 길이로 절단한 단편을 전사 제어 영역으로서 사용할 수 있다.

리porter 유전자로서는 당해 유전자의 번역 생성물이 세포내에서 안정적이며 당해 번역 생성물의 존재량을 용이하게 정량할 수 있는 것이면 어떠한 것이라도 사용할 수 있으며, 예를 들면 클로람페니콜아세틸트랜스페라제(CAT), β -갈락토시다제(β -gal), 루시페라제(luc), 그린플루오레센트프로테인(GFP) 등을 들 수 있다.

피시험 시료로서 상기 (i) 기재의 것을 사용할 수 있다.

전사 제어 영역의 하류에 통상적인 방법에 따라 리porter 유전자를 연결하여 제작한 플라스미드를 사용하고 통상적인 방법에 따라 숙주세포를 형질전환한다.

당해 형질전환체를 예를 들면, 당해 세포가 증식할 수 있는 배지에 현탁하여 피시험 시료를 당해 배지에 첨가하고 당해 세포를 접촉시킨 다음, 당해 세포가 발현한 리porter 유전자의 전사 생성물의 양을 당해 전사 생성물에 적합한 방법으로 검출, 정량한다.

검출, 정량법으로서 CAT의 경우에는 예를 들면, 몰레큘러 클로닝 제2판, 16장, 60페이지에 기재된 방법을, β -gal의 경우에는 예를 들면, 몰레큘러 클로닝 제2판, 16장, 66페이지에 기재된 방법을, luc의 경우에는 예를 들면, 실험의학 별책 바이오 매뉴얼 시리즈 4의 유전자 도입과 발현·해석법, 81(1994)에 기재된 방법을, GFP의 경우에는 예를 들면, 문헌[참조: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 4653(1997)]에 기재된 방법 등을 들 수 있다.

피시험 시료를 첨가하지 않은 계와 비교하여 본 발명의 노화 억제 유전자의 전사 생성물 함량을 증가시킬 수 있는 피시험 시료를 탐색함으로써 발현 증강 화합물을 동정할 수 있다.

15) 본 발명의 올리고뉴클레오타이드의 조제

본 발명의 DNA 및 당해 DNA 단편을 사용하여 통상적인 방법 또는 DNA 합성기에 의해 본 발명의 DNA의 일부 서열을 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 센스 올리고뉴클레오타이드 등의 올리고뉴클레오타이드를 조제할 수 있다.

당해 올리고뉴클레오타이드로서는 상기 DNA가 갖는 염기 서열 중 연속한 10 내지 50염기와 동일한 서열을 갖는 DNA 또는 당해 DNA와 상보적인 서열을 갖는 DNA를 들 수 있으며, 구체적으로는 서열 6 내지 10 기재의 DNA에서 선택되는 DNA가 갖는 염기 서열 중의 연속한 10 내지 50염기와 같은 서열을 갖는 DNA 또는 당

해 DNA와 상보적인 서열을 갖는 DNA를 들 수 있다.

상기 올리고뉴클레오타이드를 본 발명의 올리고뉴클레오타이드로서 들 수 있지만, 또한 이들 올리고뉴클레오타이드의 유도체도 본 발명의 올리고뉴클레오타이드로서 들 수 있다. 당해 유도체 DNA로서는 DNA 중의 인산디에스테르 결합이 포스포로티오에이트 결합으로 변환된 유도체 DNA, DNA 중의 인산디에스테르 결합이 N 3'-P5' 포스포아미데이트 결합으로 변환된 유도체 DNA, DNA 중의 리보스와 인산디에스테르 결합이 펩타이드 핵산 결합으로 변환된 유도체 DNA, DNA 중의 우라실이 C-5 프로피닐우라실로 치환된 유도체 DNA, DNA 중의 우라실이 C-5 티아졸우라실로 치환된 유도체 DNA, DNA 중의 시토신이 C-5 프로피닐시토신으로 치환된 유도체 DNA, DNA 중의 시토신이 페녹사진 변형 시토신(phenoxazine-modified cytosine)으로 치환된 유도체 DNA, DNA 중의 리보스가 2'-O-프로필리보스로 치환된 유도체 DNA, 또는 DNA 중의 리보스가 2'-메톡시에톡시리보스로 치환된 유도체 DNA 등을 들 수 있다[세포공학, 16, 1463(1997)].

16) 노화 억제 폴리펩타이드, 당해 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA, 당해 폴리펩타이드를 인식하는 항체, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드, 본 발명의 리간드 및 발현 증강 화합물의 이용

(i) 본 발명의 항 노화 억제 폴리펩타이드 항체를 사용함으로써 혈액, 장기의 일부, 세포 등의 샘플에서의 노화 억제 폴리펩타이드의 검출, 정량을 할 수 있다. 구체적으로 적합한 수법으로서는 마이크로티터 플레이트를 사용하는 ELISA 법·형광항체법, 웨스턴 블롯법 등을 들 수 있으며, 또한 병리조직 절편을 사용한 면역 조직 염색에도 이용할 수 있다. 따라서 당해 항체는 노화 억제 폴리펩타이드 발현의 저하를 수반하는 조기 노화증이나 여러 가지 성인병의 발생 가능성의 진단에 유용하다. 동일하게 당해 펩타이드를 대상으로 한 연구에 있어서의 연구용 시약으로서도 유용하다.

(ii) 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드의 전체 길이 또는 부분 단편을 생체에 투여함으로써 노화의 억제가 가능하다. 따라서 노화의 진행에 밀접하게 관련하여 생기는 여러 가지의 성인병, 예를 들면, 동맥경화, 고혈압, 골다공증 등의 치료제, 예방제로서 유용하다. 또한 노화의 억제에 근거하는 수명의 연장의 효과에도 유용하다.

(iii) 본 발명의 노화 억제 유전자를 레트로바이러스, 아데노바이러스 등의 바이러스 벡터나 그 밖의 벡터에 집어 넣어 유전자 치료방법에 의한 치료에 사용할 수 있다.

(iv) 본 발명의 노화 억제 유전자 또는 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 노년 하이브리드화법 또는 PCR 법에 의해 당해 유전자의 발현량을 측정하여 노화, 성인병을 진단함과 동시에 당해 노화 억제 유전자 또는 올리고뉴클레오타이드를 노화 억제, 성인병 발병 억제에 이용할 수 있다. 또한 당해 노화 억제 유전자가 선천적인 결손에 의해 노화가 촉진되어 성인병을 발생하기 쉽게 된 개체를 당해 노화 억제 유전자 또는 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 서던 블롯 하이브리드화나 PCR 법에 의해 검출하여 당해 검출된 개체의 핵산 서열 정보를 근거로 유전자 진단을 할 수 있다. 또한 당해 노화 억제 유전자 또는 올리고뉴클레오타이드는 유전자 연구용 시약으로서도 극히 유용하다.

(v) 또한 본 발명에 의해 제공되는 목적하는 가축 동물, 예를 들면, 소, 양, 염소, 돼지, 말, 닭 등 유래의 노화 억제 유전자 생성물을 상응하는 동물에게 투여하거나 당해 유전자를 유전자 치료적으로 적당한 바이러스 등의 벡터를 사용하여 개체에서 발현시킴으로써 목적하는 가축의 수명을 연장하고 또한 노화를 억제할 있다. 이에 따라 장기간에 걸쳐 상태가 좋은 사육과 젖이나 달걀이나 새끼의 장기간에 걸친 채취를 할 수 있다. 또는 수정란에 당해 유전자를 도입하여 체내 모든 세포의 염색체에 당해 유전자를 삽입하여 발현시키는 소위 형질전환 동물을 제작함으로써 같은 효과를 기대할 수 있으며 축산 분야에서도 육종의 면에서 유용성이 높다고 생각된다.

또한 당해 유전자를 함유하는 벡터를 사용하여 배성 간세포(embryonic stem cell)에서 염색체상의 노화 억제 유전자를 공지된 상동 재조합의 수법[예를 들면, Nature, 326, 6110, 295(1987), Cell, 51, 3, 503(1987) 등]에 의해 불활성화 또는 임의의 서열과 치환한 변이 클론을 제작할 수 있다[예를 들면, Nature, 350, 6315, 243(1991)]. 이와 같이 하여 제작한 배성 간세포 클론을 사용하여 동물 수정란의 배반포(blastocyst)에의 주입 키메라법 또는 집합 키메라법 등의 수법에 의해 배성 간세포 클론과 정상 세포로 이루어지는 키메라 개체를 제작할 수 있다. 이 키메라 개체와 정상 개체가 교배에 의해 전신 세포의 노화 억제 유전자에 임의의 변이를 갖는 개체를 얻을 수 있으며, 또한 그 개체의 교배에 의해 상동 염색체의 쌍방에 변이가 들어간 호모 개체를 얻을 수 있다.

이와 같이 하여 동물 개체에 있어서 노화 억제 유전자의 임의의 위치로 변이의 도입을 할 수 있다. 예를 들면, 노화 억제 유전자의 번역 영역 중의 임의의 염기 치환, 결실, 삽입 등의 변이를 도입함으로써 그 생성물의 활성을 변화시킬 수 있다. 또한 그 발현 제어 영역에의 동일한 변이의 도입에 의해 발현의 정도, 시기, 조직 특이성 등을 개변시킬 수 있다. 또한 Cre-loxP계와의 조합에 의해 보다 적극적으로 발현 시기, 발현 부위, 발현량 등을 제어할 수 있다. 이러한 예로서는 뇌가 있는 특정한 영역에서 발현되는 프로모터를 이용하여 그 영역에서만 목적 유전자를 결실시킨 예[Cell, 87, 7, 1317(1996)]나 Cre를 발현하는 아데노바이러스를 사용하여 목적 시기에 장기 특이적으로 목적 유전자를 결실시킨 예[Science, 278, 5335, (1997)]가 공지되어 있다. 따라서 본 발명의 노화 억제 유전자에 관해서도 이와 같이 임의의 시기나 조직으로 발현을 제어할 수 있는, 또는 임의의 삽입, 결실, 치환을 그 번역 영역이나 발현 제어 영역에 갖는 동물 개체를 제작할 수 있다. 이러한 동물은 임의의 시기, 임의의 정도 또는 임의의 부위에서 노화와 노화와 함께 생기는 성인병 등 여러 가지 질환의 증상을 유도할 수 있다. 따라서 노화나 성인병 등의 여러 가지 질환의 치료나 예방에 있어서 극히 유용한 동물 모델이 된다. 특히 그 치료제, 예방제, 또한 기능성 식품, 건강 식품 등의 평가용 모델로서 대단히 유용하다.

(vi) 본 발명의 본 노화 억제 폴리펩타이드는 당해 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 리간드를 탐색하여 결정하기 위한 시약으로서 유용하다.

(vii) 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드와 본 발명의 리간드를 사용하여 당해 폴리펩타이드와 리간드의 특이적 결합을 억제하는 화합물의 탐색 및 동정에 사용할 수 있다.

(Viii) 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드와 본 발명의 리간드를 이용하여 당해 폴리펩타이드와 리간드가 결합한 결과 유도되는 분자를 탐색, 동정할 수 있다.

(ix) 본 발명의 리간드, 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드와 본 발명의 리간드와의 특이적 결합을 억제하는 화합물, 본 발명의 폴리펩타이드와 리간드가 결합한 결과 유도되는 분자는 본 노화 억제 유전자 폴리펩타이드의 노화 억제 기능을 대체 또는 보조한다고 생각되어 이들 분자를 함유하는 약제는 조기 노화 증 치료제, 성인병 치료제, 노화 억제제로서 유용하다.

(X) 조기 노화증 치료제, 성인병 치료제, 노화 억제제로서 유용한 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 노화 억제 유전자의 발현을 증가시키는 화합물(발현 증강 화합물)은 노화 억제 폴리펩타이드와 같이 노화의 억제, 성인병의 치료, 예방에 유용하다.

도면의 간단한 설명

도면 중에서 사용한 부호의 설명은 이하와 같다.

bp: 염기 쌍(base pairs)

kb: 킬로염기 쌍(kilobase pairs)

IFN- γ : 인터페론 γ 유전자

Amp, Ap 또는 Ap^r: pBR322 유래 암피실린 내성 유전자

rop⁺: rop 유전자

PletI: let I 프로모터

Ptrp: trp 프로모터

P_{SE}: 시미안 바이러스(Simian Virus)40(SV40) 초기 유전자 프로모터

P_{MO}: 몰로니 마우스 백혈병 바이러스의 롱 터미널 리피트(long terminal repeat:LTR) 프로모터

Hyg: 하이글로마이신 내성 유전자

G418^r: G418 내성 유전자

dhfr=디하이드로 엽산 환원 효소 유전자

P1: pBR322 유래 P1 프로모터

Ptk: 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus:HSV) 티미딘 키나제(tk) 유전자의 프로모터

Sp. β G: 래빗 β 글로빈 유전자 스플라이싱 시그널

A. β G: 래빗 β 글로빈 유전자 폴리A 부가 시그널

A. SE: 시미안 바이러스(simian virus)40(SV40) 초기유전자 폴리A 부가 시그널

Atk: 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus: HSV) 티미딘 키나제(tk) 유전자의 폴리A 부가 시그널

하기에 도면을 간단히 설명한다.

도 1은 도입 유전자 전체 길이를 프로브로 하는 염색체 서던 블롯 하이브리드화의 결과를 나타낸 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 호모 개체, 레인(2)은 헤테로 개체, 레인(3)은 야생형 마우스 유래의 것이다.

도 2는 도입 유전자와 실제로 구조되어 온 플라스미드의 제한효소 지도를 나타낸 도면이다.

도 3은 구조된 플라스미드에 함유되는 염색체 단편을 프로브로 한 염색체 서던 블롯 하이브리드화의 결과를 나타낸 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 호모 개체, 레인(2)은 헤테로 개체, 레인(3)은 야생형 마우스 유래의 것이다.

도 4는 도입 유전자가 삽입되어 있던 근방의 염색체 DNA를 갖는 파지 클론의 제한효소 지도를 나타낸 도면이다.

도 5는 SacII 450bp를 프로브로 한 마우스 각 장기 poly(A)⁺ RNA에 대한 노던 블롯 하이브리드화의 결과를 나타낸 전기영동의 도면이다.

도 6은 야생형, 헤테로 개체, 호모 개체(조기 노화형 증상을 보이는 마우스), 및 출생시(0W)부터 7주(7W)까지의 각 시기의 야생형 마우스의 각각의 신장에서 조제한 poly(A)⁺ RNA 및 프로브로서 SacII 450bp를 사용한 노던 블롯 하이브리드화의 결과를 나타낸 전기영동의 도면이다.

도 7은 사람 전체 길이(상), 사람 분비형(중), 마우스 전체 길이(하)의 노화 억제 폴리펩타이드의 cDNA 및 당해 cDNA 암호화되어 있는 단백질의 간단한 모식도이다.

도 8은 플라스미드 pNKM101의 제한효소 지도를 나타낸 도면이다. 긴 화살표는 마우스 유래의 노화 억제 유전자 및 전사의 방향을 나타낸다.

도 9는 플라스미드 pNKM112의 제한효소 지도를 나타낸 도면이다. 긴 화살표는 마우스 유래의 분비형 노화 억제 유전자 및 전사의 방향을 나타낸다.

도 10은 마우스 각 장기 poly(A)⁺ RNA에 대한 RT-PCR에 의한 마우스 분비형 노화 억제 유전자 발현의 검토 결과를 나타낸 전기영동의 도면이다.

도 11은 플라스미드 pNKM103의 제한효소 지도를 나타낸 도면이다. 긴 화살표는 사람 유래의 노화 억제 유전자 및 전사의 방향을 나타낸다.

도 12는 플라스미드 pNKH106의 제한효소 지도를 나타낸 도면이다. 긴 화살표는 사람 유래 분비형의 노화 억제 유전자 및 전사의 방향을 나타낸다.

도 13은 플라스미드 pSupex의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 14는 플라스미드 pYT102의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 15는 pYT102를 보유하는 대장균에 의해 생성된 노화 억제 폴리펩타이드 단편을 확인한 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 IAA 무첨가시 및 레인(2)은 IAA 첨가시의 pYT102를 보유하는 대장균 NY49에 의한 노화 억제 폴리펩타이드 단편의 생성을 나타내고 있다.

도 16은 노화 억제 폴리펩타이드 단편에 대한 폴리클로날 항체를 사용한 웨스턴 블롯법에 의한 대장균에서의 노화 억제 폴리펩타이드 단편의 발현을 확인한 전기영동의 도면이다.

도 17은 pAGE210의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 18은 pYT103의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 19는 노화 억제 폴리펩타이드 단편에 대한 폴리클로날 항체를 사용한 웨스턴 블롯법에 의한 동물 세포에서의 노화 억제 폴리펩타이드 전체 길이의 발현을 확인한 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 CHO dhfr⁻ 세포(숙주만의 컨트롤), 레인(2)은 CHO dhfr⁻/pYT103 MTX 증폭 세포를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 20은 pAS104의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 21은 곤충 세포에서의 노화 억제 폴리펩타이드 전체 길이의 발현을 확인한 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 분자량 마커이고 레인(2)은 Sf9 세포, 레인(3)은 노화 억제 폴리펩타이드 발현 바이러스 감염 Sf9 세포를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 22는 노화 억제 폴리펩타이드 단편에 대한 폴리클로날 항체를 사용한 웨스턴 블롯법에 의한 곤충 세포에서의 노화 억제 폴리펩타이드 전체 길이의 발현을 확인한 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 Sf9 세포, 레인(2)은 노화 억제 폴리펩타이드 발현 바이러스 감염 Sf9 세포를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 23은 플라스미드 pYS110의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 24는 노화 억제 폴리펩타이드 단편에 대한 모노클로날 항체(KM1902)를 사용한 웨스턴 블롯법에 의한 CHO 세포(CHOdhfr⁻)에서의 노화 억제 폴리펩타이드 전체 길이의 발현을 확인한 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 CHO 세포, 레인(2)은 사람 유래 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포(CHOdhfr⁻/pYS110), 레인(3)은 마우스 유래 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포(CHOdhfr⁻/pYT103)에 의한 웨스턴 반응의 결과를 나타낸다.

도 25는 플라스미드 pYS111의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 26은 노화 억제 폴리펩타이드 단편에 대한 모노클로날 항체(KM1902)를 사용한 웨스턴 블롯법에 의한 CHO 세포(CHOdhfr⁻)에서의 사람 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 전체 길이의 발현을 확인한 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 CHO 세포, 레인(2)은 사람 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포(CHOdhfr⁻/pYS111)에 의한 웨스턴 반응의 결과를 나타낸다.

도 27은 플라스미드 pYS150의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 28은 노화 억제 폴리펩타이드 단편에 대한 모노클로날 항체(KM1902)를 사용한 웨스턴 블롯법에 의한 곤충 세포에서의 사람 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 전체 길이의 발현을 확인한 전기영동의 도면이다. 사람 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현 바이러스 감염 Sf21 세포를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 29는 플라스미드 pYS112의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 30은 노화 억제 폴리펩타이드 단편에 대한 모노클로날 항체(KM1902)를 사용한 면역침강법에 의한 CHO 세포(CHOdhfr⁻)에서의 마우스 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 전체 길이의 발현을 확인한 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 CHO 세포, 레인(2)은 마우스 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포(CHOdhfr⁻/pYS112)에 의한 웨스턴 반응의 결과를 나타낸다.

도 31은 플라스미드 pYS151의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 32는 노화 억제 폴리펩타이드 단편에 대한 모노클로날 항체(KM1902)를 사용한 면역침강법에 의한 곤충 세포에서의 마우스 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 전체 길이의 발현을 확인한 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 Sf 21 세포, 레인(2)은 마우스 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현 바이러스 감염 Sf21 세포를 사용했을 때의 결과를 나타낸다.

도 33은 플로 사이트미터에 의한 모노클로날 항체(KM1902)의 반응성의 해석을 나타낸 도면이다. (A)에

CHO 세포(CH0dhfr⁻)에 모노클로날 항체(KM1902)를 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때에서의 비교 결과를 나타내고 (B)에 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포(CH0dhfr⁻/pYT103)에 모노클로날 항체(KM1902)를 첨가하였을 때와 첨가하지 않았을 때에서의 비교 결과를 나타낸다.

도 34는 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포(CH0dhfr⁻/pYT103)를 사용한 모노클로날 항체(KM1902)에 의한 면역침강 결과를 나타낸 웨스턴 블로팅의 도면이다. 레인(1)에 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포(CH0dhfr⁻/pYT103)를 사용한 모노클로날 항체(KM1902)에 의한 면역침강 결과를 나타내고 레인(2)에 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포(CH0dhfr⁻/pYT103)를 사용하여 모노클로날 항체(KM1902)를 첨가하는 일없이 면역침강을 수행한 결과를 나타낸다.

도 35는 플라스미드 pEFSa의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 36은 플라스미드 pRES의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 37은 마우스 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 아데노바이러스를 투여하였을 때의 결과를 나타낸다. A는 야생형, 무투여; B는 야생형, 바이러스 투여; C는 호모 개체(조기 노화형 증상을 보이는 마우스), 바이러스 투여; D는 호모 개체(조기 노화형 증상을 보이는 마우스), 무투여.

도 38은 플라스미드 pYS201의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 39는 pYS201을 보유하는 대장균에 의해 생성된 사람 유래 노화 억제 폴리펩타이드 N 말단 영역(펩타이드 SUHN)의 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동의 도면이다.

도 40은 플라스미드 pYS202의 구축 과정을 나타낸 도면이다.

도 41은 pYS202를 보유하는 대장균에 의해 생성된 사람 유래 노화 억제 폴리펩타이드 C 말단 영역(펩타이드 SUHC)의 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동의 도면이다.

도 42는 KM2076을 사용한 마우스 조직 및 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포 추출액의 웨스턴 블롯 하이브리드화의 결과를 나타낸 전기영동의 도면이다. 마우스 신장, 간의 막 분획과 세포질 분획, 및 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포의 추출액을 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동으로 분리한다.

KM2076으로 웨스턴 블롯을 하여 화학발광 시약에 의한 X선 필름에의 감광에 의해 검출한다.

도 43은 KM2119, KM2116을 사용한 마우스 조직 및 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포의 추출액의 웨스턴 블롯 하이브리드화의 결과를 나타낸 전기영동의 도면이다. 마우스 신장, 간의 막 분획과 세포질 분획, 및 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포의 추출액을 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동으로 분리한다. KM2119 또는 KM2116으로 웨스턴 블롯을 하여 화학발광 시약에 의한 X선 필름에의 감광에 의해 검출한다.

도 44는 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포에서 세포 추출액을 조정하고 KM2076, KM2119 및 Protein G-Sepharose 4 FF를 사용하여 면역 침강한 다음, SDS-폴리아크릴아미드 전기영동으로 분리하여 웨스턴 블롯을 수행한 웨스턴 블롯 하이브리드화의 결과를 나타낸 전기영동의 도면이다.

도 45는 사람 분비형 발현 CHO 세포의 배양 상등액을 KM2076 및 Protein G-Sepharose 4FF를 사용하여 면역 침강한 다음, SDS-폴리아크릴아미드 전기영동으로 분리하여 KM2076을 사용한 웨스턴 블롯을 하였을 때의 웨스턴 블롯 하이브리드화의 결과를 나타낸 전기영동의 도면이다. 레인(1)은 사람 분비형 발현 CHO 세포의 배양 상등액을 KM2076 및 Protein G-Sepharose 4FF를 사용하여 면역침강시킨 것으로 레인(2)은 혈청 프리 배지를 KM2076을 사용하여 면역침강시킨 것이고 레인(3)은 사람 분비형 발현 CHO 세포의 배양 상등액을 NR1g를 사용하여 면역침강시킨 것이다.

[발명을 실시하기 위한 최선의 양태]

실시예

하기에 실시예를 기재한다. 유전자 조작적 수법은 특별히 양해를 구하지 않는 한 공지된 몰레큘러 클로닝 제2판에 기재되어 있는 방법에 따라 실시한다.

실시예 1: 유전자 도입부위에 인접하는 마우스 염색체 DNA의 클로닝

(1) 도입 유전자의 검출

사람 일종계이션 팩터 1 α 프로모터(EF1알파 프로모터)에 Na⁺/H⁺ 역수송체를 연결한 외래 유전자를 도입한 형질전환 마우스(일본 공개특허공보 제(평)5-268856)를 제작하고 얻어진 헤테로 개체를 교배하여 조기 노화형 증상을 보이는 호모 개체를 취득한다. 당해 호모 개체 중 보다 현저한 조기 노화형 증상을 나타내는 마우스 개체[제18회 일본 분자생물학회 연회(나베시마 등, 2K-02, 1995년)], 및 당해 호모 개체를 취득하기 위해서 사용한 헤테로 개체를 이후의 실험에 사용한다.

상기 헤테로 개체, 호모 개체 및 야생형의 마우스, 각각의 간장에서 염색체 DNA를 조제한다. 당해 염색체 DNA 각각 10 μ g씩을 EcoRV 또는 XbaI로 완전히 소화한다.

당해 소화 DNA 단편 각각을 0.8% 아가로스 겔 전기영동시킨 다음, Hybond N⁺ 필터(Amersham사제)에 블로팅한다.

형질전환 마우스 제작에 사용한 플라스미드 pEFNaH(일본 공개특허공보 제(평)5-268856)를 메가프라임 DNA

라벨링 키트(Amersham사제)를 사용하여 α - [^{32} P]-dCTP로 표지하고 당해 표지 플라스미드를 프로브로서 사용하여 Hybond N⁺ 필터의 첨부 매뉴얼에 따라서 상기 블로팅한 Hybond N⁺ 필터와 하이브리드화를 한다.

결과를 도 1에 나타낸다. 헤테로 개체, 호모 개체에서는 약 150kb 부근에 단일 밴드가 검출된 것으로부터 도입 유전자는 마우스 염색체상 1개소에만 삽입되어 있다고 생각된다. 당해 결과는 도입 유전자를 프로브로 한 FISH에서도 확인할 수 있다. 즉, 제6 염색체 긴 팔의 테로메아(6G2-3)로 단일 시그널을 검출한다.

(2) 유전자 도입부위에 인접하는 마우스 염색체 DNA의 클로닝

(1) 기재의 호모 개체 마우스의 염색체 DNA 10 μ g을 EcoRI 또는 KpnI에서 완전히 소화하고 DNA Ligation Kit(다카라슈조사제)를 사용하여 10ng/ml의 농도로 16°C, 30분 동안 결합반응을 한다.

당해 반응액 10 μ l를 사용하여 대장균 XL1-BlueMRF⁺(Epicurian Coli, STRATAGENE사제)를 형질전환하여 37°C에서 18시간 배양후, 얻어진 콜로니에서 플라스미드를 회수한다.

상기에 있어서 염색체를 EcoRI에서 소화한 경우에는 E50, E70의 2종류의 플라스미드가, KpnI에서 소화한 경우에는 K8 플라스미드가 마우스 게놈성 DNA의 단편을 함유하는 플라스미드로서 구조된다.

도입 유전자와 실제로 구조되어 온 플라스미드의 제한효소 지도를 도 2에 나타낸다. 3종의 플라스미드 어느 것이나 도입 유전자와는 다른 DNA 단편을 함유하고 있으며 이들 DNA 단편은 도입 유전자에 인접하는 염색체 단편이라고 생각된다.

다음에 구조된 플라스미드 E50에 함유되어 있는 마우스 염색체 DNA 부분의 EcoRI-PvuII 단편을 조제한 후 (1)와 동일한 방법에 따라 방사 표지하고 이것을 프로브로서 (1)에서 사용한 필터의 디하이브리드화한 것을 사용하여 서던 블로팅(Southern blotting)을 한다.

결과를 도 3에 나타낸다. 야생형 마우스에서는 야생형 대립유전자(wild allele)만, 호모 개체에서는 변이형 대립유전자(mutant allele)만, 헤테로 개체에서는 양쪽의 대립유전자(allele) 유래의 밴드가 확인되며 구조된 플라스미드에 함유되는 염색체 유래 DNA 단편이 도입 유전자에 인접하고 있는 부분이라는 것을 확인한다.

실시에 2:마우스 노화 억제 유전자의 클로닝

실시에 1의 (2)의 프로브를 사용하여 야생형의 마우스 게놈성 라이브러리(Stratagene사제, mouse genomic library, λ FIXII)를 첨부한 매뉴얼에 따라서 스크리닝하여 프로브와 하이브리드화하는 3개의 독립한 파지 클론(E8.5, E2.6, E11.1)을 얻는다(도 4).

실시에 1의 (2)에서 호모 개체로부터 구조된 게놈성 DNA와 비교하면 호모 개체에 있어서의 노화 억제 유전자내의 영역에는 약 8kb에 걸친 결실이 존재하고 있다(도 4).

당해 영역로부터 전사되는 유전자를 동정하기 위해서 결실 부분을 중심으로하여 염기 서열을 Li-Cor사 모델 4000L 시퀀서(이하 같음)에 의해 순차적으로 결정한 바, 결실 부분로부터 약 6kb 떨어진 곳에 CpG island가 존재하는 것이 분명하다.

당해 결실 부분로부터 SacII에 의해 450bp의 단편을 잘라내어 실시에 1의 (1)과 동일한 방법으로 표지하고 이것을 프로브로서 마우스 심장, 뇌, 태반, 폐, 간장, 골격근, 신장, 체장의 poly(A)⁺ RNA 필터(Mouse Multiple Tissue Northern Blots의 필터(Clontech))를 사용하여 Hybond N⁺의 매뉴얼의 조건에 따라서 노던 하이브리드화를 한다.

결과를 도 5에 나타낸다. 신장에 있어서 약 5.3kb의 밴드가 확인되고 당해 450bp의 SacII 절단 단편에 엑손이 함유되어 있는 것을 확인한다.

야생형, 호모 개체, 헤테로 개체의 마우스 신장으로부터 QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia사제)를 사용하여 각각 poly(A)⁺ RNA를 조제하고 그 5 μ g을 0.8% 아가로스 겔 전기영동한 다음, Hybond N⁺ 필터(Amersham사제)로 전달한다.

상기 450bp의 SacII 절단 단편을 프로브로서 상기와 동일하게 노던 하이브리드화를 한다.

결과를 도 6에 나타낸다. 야생형, 헤테로 개체에서는 밴드가 확인되고 노화 억제 유전자의 발현이 확인되지만, 호모 개체에서는 밴드가 검출되지 않으며 당해 유전자가 전혀 발현되어 있지 않는 것이 분명하다.

동일하게 출생후 각 시기에서 마우스 신장으로부터 poly(A)⁺ RNA를 조제하여 상기 450bp의 SacII 절단 단편을 프로브로서 노던 하이브리드화를 한다. 도 6에 나타낸 바와 같이 생후 1, 2주간에서는 노화 억제 유전자가 거의 발현하지 않으며 신생아기에서 서서히 발현량이 증가하지만 생후 3, 4주간째에 발현이 강하게 되는 경향이 있다.

실시에 3:마우스 노화 억제 유전자 cDNA의 클로닝

야생형 마우스 신장의 poly(A)⁺ RNA로부터 cDNA 합성 시스템(cDNA Synthesis System, GIBCO BRL사제)을 사용하여 cDNA를 합성하고 그 양 말단에 EcoRI-NotI-SalI adaptor(SuperScript Choice System for cDNA

Synthesis;GIBCO BRL사제)를 부가한 다음, 클로닝 벡터 λ ZAPII(λ ZAPII Cloning Kit, STRATAGENE사제)의 EcoRI 부위에 삽입하여 in vitro packaging(Stratagene사제 Gigapack II Gold)을 함으로써 cDNA 라이브러리를 제작한다.

실시에 2의 450bp의 SacII 절단 단편을 프로브로서 사용하고 당해 cDNA 라이브러리 5×10^5 클론에 관해서 플라크-화이브리드화를 한다. 당해 하이브리드화에 있어서 필터를 2배 농도의 SSPE[1배 농도의 SSPE의 조성은 180mM 염화나트륨, 10mM 인산이수소나트륨, 1mM 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)으로 이루어진 다(pH 7.4)], 0.1% SDS로 이루어지는 완충액 속에서 65℃, 10분 동안 침지하는 조건에서 2회, 1배 농도의 SSPE, 0.1% SDS로 이루어지는 완충액 속에서 65℃, 15분 동안 침지하는 조건에서 1회, 0.2 x SSPE, 0.1% SDS로 이루어지는 완충액 속에서 65℃, 10분 동안 침지하는 조건에서 2회 세정한다.

당해 하이브리드화에 의해 하이브리드화하는 40개의 독립한 클론이 얻어진다. 당해 클론에서 in vivo 분해에 의해 플라스미드를 회수하여 제한효소 해석, 염기 서열 결정을 한다.

당해 염기 서열의 결정에 의해 플라스미드 pNKM101에는 서열 8에 기재된 약 5kb의 cDNA가 함유되고 당해 cDNA에는 3,042bp의 오픈 리딩 프레임(이하, ORF라고 약칭한다)이 존재하는 것을 알 수 있다. 당해 ORF에는 서열 3에 기재된 N 말단에 35개 아미노산으로 이루어지는 시그널 시퀀스와 C 말단에 19개 아미노산으로 이루어지는 막 관통 영역을 갖는 1014개 아미노산 잔기로 이루어지는 신규한 단백질이 암호화되어 있다(도 7). pNKM101의 구조를 도 8에 나타낸다.

실시에 4: 마우스 유래 분비형 노화 억제 유전자의 분리

마우스 게놈성 DNA를 함유하는 라이브러리(Bacterial artificial chromosome, BAC)로부터 마우스 노화 억제 유전자의 게놈 영역을 함유하는 클론을 분리하기 위해 실시에 3에서 수득한 마우스 노화 억제 유전자 cDNA 중, 서열 11와 서열 12의 2개소 영역의 서열을 프라이머로 사용하고 마우스 염색체 DNA를 주형으로 하였을 때에 PCR 법에 의해 127bp의 DNA 단편이 증폭되는 것을 확인한다.

PCR 반응은 PERKIN ELMER사제의 DNA Thermal Cycler 480를 사용하고 94℃에서 1분 동안, 56℃에서 1분 동안, 72℃에서 1분 동안의 공정을 1 사이클로 하여 30 사이클 실시한다.

평균하여 100kb의 마우스 염색체 DNA를 함유하는 BAC 라이브러리(Research Genetics사제)로부터 상기한 프라이머 및 증폭 조건을 사용하여 PCR 법에 의해 127bp의 DNA 단편이 증폭되는 BAC 클론을 선택한다.

수득한 BAC 클론 10 μ g의 시료를 50 μ l의 완충액(B)에 첨가한 후, 3단위의 Sau3 AI를 가하여 37℃에서 10분 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA 단편을 약 5 μ g 회수한다.

코스미드 벡터 pWE15(Clontech사제)는 5 μ g을 30 μ l의 완충액(C)에 첨가한 후, 30단위의 BamHI를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다. 당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA 단편을 약 2 μ g 회수한다.

상기 Sau3AI 처리 BAC 클론 단편 1 μ g과 BamHI 처리 pWE15 단편 100ng을 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해하고 당해 용액에 T4 DNA 리가제를 1단위 가하여 16℃에서 18시간 동안 결합 반응을 한다. 당해 반응액을 GigapackII Gold Extract(Stratagene사제)를 사용하여 in vitro packaging 처리를 하여 코스미드 라이브러리를 제작한다.

당해 라이브러리로부터 상기한 BAC 클론 선택시의 프라이머 및 증폭 조건을 사용하여 PCR 법에 의해 127bp 단편이 증폭되는 클론을 얻는다.

하기의 실시에 5에서 취득된 사람 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드의 C 말단에 상당하는 염기 서열과 코스미드에 서브클론화되어 있는 마우스 노화 억제 유전자의 상당 영역의 DNA 서열을 비교한 결과, 사람 유래 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 서열 2의 535아미노산에서 549아미노산까지의 폴리펩타이드 서열과 상동성을 나타내는 서열을 암호화하는 DNA 서열이 발견된다.

Mouse Kidney Marathon Ready cDNA kit(Clontech사제)를 주형으로 하여 서열 13으로 나타내는 라이브러리 유래 어댑터 프라이머와 서열 14로 나타내는 상기한 마우스 유래의 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 C 말단측 상동 영역에 상당하는 프라이머를 첨가한 후, PCR 법에 의한 유전자 증폭을 한다.

PCR 반응은 PERKIN ELMER사제의 DNA Thermal Cycler 480를 사용하여 94℃에서 1분 동안, 55℃에서 30초 동안, 72℃에서 1분 동안의 공정을 1 사이클로 하여 30 사이클 실시한다.

수득한 반응물을 아가로스 겔 전기영동으로 해석한 바, 약 2kb의 증폭 단편이 확인되고 당해 단편을 pCR2.1 벡터(Invitrogen사제)에 삽입한다.

염기 서열을 결정한 바, 서열 9에 기재된 서열이 수득된 것으로부터 본 cDNA는 1650bp로 이루어지는 550 아미노산 잔기를 암호화하는 ORF를 함유하는 마우스 분비형 노화 억제 유전자인 것을 알 수 있다.

본 유전자는 또한 서열 15와 서열 16의 합성 DNA를 사용하여 PCR 반응을 하고 유전자의 양말단에 HindIII, BamHI 절단 부위를 부가한 다음, 플라스미드 벡터 pUC118의 HindIII, BamHI 절단 부위에 삽입하여 pNKM112를 제작한다(도 9).

당해 유전자의 마우스 조직에서의 발현을 조사하기 위해서 서열 17과 서열 18에 나타내는 프라이머를 사용하고 각종 장기로부터 QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia사제)를 사용하여 조제한 poly(A)⁺ mRNA 500ng을 주형으로서 TakaRa RNA LA PCR kit(AMV) Ver.1.1(다카라슈조사제)를 사용하여 랜덤 9mer를 프라이머로 하여 전사 반응을 한 다음, LA-Taq DNA 폴리머라제(다카라슈조사제)를 사용하여 PCR 반응을 한다.

PCR 반응은 PERKIN ELMER사제의 DNA Thermal Cycler 480를 사용하고 94℃에서 20초간, 60℃에서 30초간, 72℃에서 1분 동안의 공정을 1 사이클로 하여 30 사이클 실시한다.

수득한 반응물을 아가로스 겔 전기영동으로 해석한 결과를 도 10에 나타낸다. 신장, 뇌, 뇌하수체, 난소, 정소, 체장에서 발현이 확인된다.

실시에 5:사람 노화 억제 유전자 cDNA의 클론화

(1) 사람 신장 유래의 노화 억제 유전자의 취득

사람 신장 poly(A)⁺ RNA(Clontech사제)를 사용하여 실시예 3과 동일하게 사람 신장 cDNA 라이브러리를 구축한다. 당해 라이브러리 약 100만 클론에 대하여 실시예 2의 마우스 cDNA 중 5'단(端) 어댑터 유래의 NotI 부위와 cDNA 중에 존재하는 NotI 부위에서 절단되는 4.2kb 단편을 프로브로서 사용하고 실시예 3과 동일한 방법으로 플라크-화이브리드화를 한다.

당해 하이브리드화에 의해 강하게 하이브리드화하는 6개의 독립한 클론이 얻어진다. 당해 클론에서 in vivo 분해에 의해 플라스미드를 회수하여 제한효소 해석, 염기 서열 결정을 한다.

당해 염기 서열의 결정에 의해 2 클론으로부터 수득한 플라스미드에는 서열 6에 기재된 전체에 걸쳐 마우스의 서열과 높은 상동성을 나타내는 약 3.2kb의 cDNA가 함유되고, 당해 cDNA에는 3,036bp로 이루어지는 서열 10에 기재된 1,012 아미노산 잔기를 암호화하는 ORF가 존재하는 것을 알 수 있다.

당해 아미노산 서열은 마우스와 86%의 높은 상동성을 갖는 것으로부터 사람 호모로그(human homologue)라고 결론짓는다(도 7).

당해 cDNA를 함유하는 플라스미드 pNKM103의 구조를 도 11에 나타낸다.

나머지 클론으로부터 수득한 플라스미드에는 서열 7에 기재된 약 3.4kb의 cDNA가 함유되며, 당해 cDNA에는 1,647bp로 이루어지는 서열 2에 기재된 폴리펩타이드를 암호화하는 ORF가 존재하는 것을 알 수 있다. 서열 10에 기재된 폴리펩타이드와 비교하여 서열 2에 기재된 폴리펩타이드에는 C 말단 부근의 막 관통 영역이 함유되지 않기 때문에 당해 폴리펩타이드는 분비 단백질이라고 생각된다(도 7).

당해 cDNA를 함유하는 플라스미드 pNKH106의 구조를 도 12에 나타낸다.

(2) 사람 체장 유래의 노화 억제 유전자

사람 체장 cDNA 라이브러리(Clontech사제)의 파지액 1μl(1 × 10⁸ 개의 파지를 함유한다)를 주형으로서 서열 19에 나타난 10μM의 센스 프라이머(RYHH-02-5'), 10μM의 서열 20에 나타난 안티센스 프라이머(RYHH-02-3'-2)의 각각 1μl와 10×PCR용 완충액(효소에 첨부되어 있는 것을 사용) 4μl, 2.5mM dNTP 3.2μl를 혼합하여 서열 사이클러에 세트한다. 97℃에서 5분 동안 반응시킨 다음, 방사에서 5분 동안 급냉하고 Taq DNA 폴리머라제(다카라슈조사제, 5단위/μl) 0.5μl를 혼합한 후, 95℃에서 60초간, 65℃에서 1분 동안, 72℃에서 1분 동안으로 이루어지는 공정을 1 사이클로서 30 사이클의 PCR을 하여 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 확인한 바, 약 400bp의 밴드의 증폭이 나타났다.

이러한 0.2kb의 증폭 단편을 아가로스 겔로부터 정제하고 pT7Blue T-vector(노바젠사)에 DNA 연결 키트 ver.2(다카라슈조사제)를 사용하여 삽입한다. 방법은 키트의 지시에 따른다. 이 용액에서 대장균 XL1-Blue주를 형질전환하여 암피실린 내성주를 얻는다. 당해 형질전환주로부터 플라스미드 추출기 PI-100(크라보사제)을 사용하여 플라스미드를 회수하고 2 클론의 염기 서열을 DNA 시퀀서 377[파킨 엘마사제]을 사용하여 결정한 바, 노화 억제 유전자와 상동성을 나타내는 서열을 갖는 pT7-02를 발견한다.

이러한 플라스미드 pT7-02의 삽입 단편을 DIG DNA 표지 키트(베링거 만하임사제)를 사용하여 디곡시게닌(DIG) 표지하여 프로브로 한다. 표지 방법은 키트의 지시에 따른다.

사람 체장 cDNA 라이브러리를 1장에 대하여 약 2 × 10⁵ 플라크가 출현하도록 지름 15cm의 플레이트 5장에 배양하여 나일론 멤브레인 필터 Hybond N⁺[아머샴(Amersham)사제]에 블로팅한다. 베링거 만하임사의 프로토콜(DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids)에 따라서 DNA의 변성, 고정화, 프로브와의 하이브리드화, 필터의 세정을 한다. 하이브리드화 용액은 5 × SSC, 1% Blocking solution[DIG Luminescent Detection Kit for Nucleic Acids(베링거 만하임사제)], 0.1% Sacrcosyl, 0.02% SDS를 함유하는 것을 사용하여 68℃에서 방배 실시한다. 또한 세정은 진탕하면서 0.1% SDS를 함유하는 2×SSC 중 실온에서 10분 동안을 2회 실시한 다음, 0.1% SDS를 함유하는 0.1×SSC 중에서 68℃로 15분 동안을 2회 실시한 다음, 항 DIG 항체를 사용한 DIG 검출 키트(베링거 만하임사제)를 사용하여 포지티브 플라크를 검출한다. 당해 플라크를 한천(寒天) 배지마다 도려내어 SM 완충액(0.1M NaCl, 0.008M MgSO₄ · 7H₂O) 500μl에 넣어 실온에서 방배 파지를 완충액 중에 용출한다. 이 완충액 1μl을 주형으로 하여 상기와 같은 PCR을 하고 0.4kb의 단편이 증폭함으로써 확실하게 목적하는 cDNA를 함유하고 있는 것을 확인한 다음, 당해 포지티브 클론으로부터 EcoRI에 의해 약 3.5kb의 삽입 서열을 잘라내어 pBluescript SKII+의 EcoRI 부위에 서브 클론화한다. 당해 형질전환주로부터 플라스미드 추출기 PI-100(크라보사제)를 사용하여 플라스미드를 회수하고 1 클론의 염기 서열을 DNA 시퀀서 377[파킨 엘마사제]를 사용하여 결정한 바, 서열 10 기재의 염기 서열을 함유하는 플라스미드 pRYHH02를 발견한다. 당해 유전자에는 서열 5 기재의 1015 아미노산의 단백을 암호화할 수 있는 ORF가 존재하는 것이 분명하여졌다. 이 염기 서열로부터 예측할 수 있는 아미노산 서열은 전역에 걸쳐 노화 억제 유전자와 약 45%의 상동성을 나타낸 것으로부터 당해 유전자가 노화 억제 유전자 패밀리의 1개인 것이 분명하다.

또한 서열 10 기재의 아미노산 서열에 대하여 N 말단으로부터 100아미노산을 대상으로 시그널 서열 절단

부위 예측 소프트웨어인 SignalP ver1.2[Protein Engineering, 10, 1(1997)] 및 SPScan(Genetics Computer Group, Inc.)를 사용하여 해석을 한다. 그 결과 양 소프트웨어가 예측하는 시그널 서열 절단 위치는 23번째의 Gly와 24번째의 Phe의 사이라는 것으로 일치한다. 따라서 본 폴리펩타이드로서는 아미노산 서열의 1번째에서 23번째까지가 시그널 서열을 형성하며 24번째 이후가 성숙형 펩타이드라고 결론된다.

실시에 6:대장균에 의한 마우스 노화 억제 폴리펩타이드 부분 단편의 발현용 플라스미드 pYT102의 구축

대장균에 의한 마우스 노화 억제 폴리펩타이드 부분 단편의 발현은 하기에 나타내는 대장균용 발현 벡터(pSupex)에 마우스 노화 억제 폴리펩타이드 단편을 암호화하는 cDNA를 함유하는 DNA 단편을 삽입하여 pYT102를 제작하고 pYT102를 대장균에 도입함으로써 실시한다.

pSupex의 제작은 도 13에 나타내는 바와 같이 이미 보고가 있는 pGHA2(일본 공개특허공보 제(소)60-221091호), pTerm2(일본 공개특허공보 제(평)3-22979호), pGKA2(일본국 공개특허공보 제(소)60-221091호)을 조합함으로써 하기에 기재하는 5단계의 공정을 거쳐 제작한다.

공정 1 플라스미드 pTerm4의 구축

3 μ g의 플라스미드 pGHA2를 30 μ l의 10mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘, 50mM 염화나트륨 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액(이하, 트리스A 완충액으로 약칭한다)에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 HindIII를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 30 μ l의 10mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘, 100mM 염화나트륨 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액(이하, 트리스B 완충액으로 약칭한다)에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 PstI를 가하여 37°C로 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 letI 프로모터를 함유하는 약 0.94kb의 pGHA2의 PstI/±HindIII 처리 단편을 약 0.3 μ g 회수한다.

3 μ g의 플라스미드 pTerm2를 30 μ l의 트리스A 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 HindIII를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액에서 에탄올 침전에 의해 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 30 μ l의 트리스B 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 PstI를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 복제 개시 영역, 번역 종결 코돈을 함유하는 약 1.1kb의 pTerm2의 PstI/±HindIII 처리 단편을 약 0.8 μ g 회수한다.

상기한 pGHA2의 PstI/±HindIII 처리 단편 100ng 및 pTerm2의 PstI/±HindIII 처리 단편 50ng을 20 μ l의 T4 DNA 리가제 완충액에 용해시킨 후, 당해 용해액에 T4 DNA 리가제(다카라슈조사제, 이하 동일) 100단위를 가하여 16°C에서 18시간 동안 결합 반응을 한다.

당해 반응에 의해 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM109주를 형질전환하여 도 13에 나타난 플라스미드 pTerm4를 얻는다.

공정 2 플라스미드 pGBZ2의 구축

3 μ g의 pGKA2를 30 μ l의 10mM 트리스-염산(pH 7.5), 70mM 염화마그네슘, 150mM 염화칼륨, 0.01% 소 혈청 알부민 및 7mM 2-머캅토에탄올로 이루어지는 완충액(이하, 트리스C 완충액으로 약칭한다)에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 NruI를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 pGKA2의 NruI 처리 단편을 회수한다.

BglII 링커(5'-pCAGATCTG-3')를 합성하여 당해 링커 50ng 및 상기 pGKA2의 NruI 처리 단편을 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해시킨 후, 당해 용해액에 T4 DNA 리가제 100단위를 가하여 16°C에서 18시간 결합 반응을 한다.

당해 반응에 의해 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM109주를 형질전환하여 도 13에 나타난 플라스미드 pGBZ2를 얻는다.

공정 3 플라스미드 pTerm5의 구축

3 μ g의 플라스미드 pTerm4를 30 μ l의 트리스B 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 PstI와 10단위의 BglII를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 letI 프로모터와 번역 종지 코돈을 함유하는 1.15kb의 pTerm4의 PstI/BglII 처리 단편을 약 0.8 μ g 회수한다.

3 μ g의 플라스미드 pGBZ2를 30 μ l의 트리스B 완충액에 첨가후, 당해 완충액에 10단위의 PstI와 BglII를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 복제 개시점, 암피실린 내성 유전자 및 rop 유전자를 함유하는 약 2.63kb의 pGBZ2의 PstI와 BglII 처리 단편을 약 0.3 μ g 회수한다.

상기한 pTerm4의 PstI/BglII 처리 단편 100ng 및 pGBZ2의 PstI/BglII의 처리 단편 50ng을 20 μ l의 T4 DNA 리가제 완충액에 용해한 후, 당해 용해액에 T4 DNA 리가제 100단위를 가하여 16°C에서 18시간 동안 결합 반응을 한다.

당해 반응에 의해 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM109주를 형질전환하여 도 13에 나타낸 플라스미드 pTerm5을 얻는다.

공정 4 플라스미드 pTerm6의 구축

3 μ g의 플라스미드 pTerm5를 30 μ l의 트리스C 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 NruI를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 30 μ l의 트리스A 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 ClaI를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 복제 개시점, 암피실린 내성 유전자, letI 프로모터 및 rop 유전자를 함유하는 약 3.7kb의 pTerm5의 NruI/ClaI 처리 단편을 약 0.3 μ g 회수한다.

서열 21 및 22에 나타낸 염기 서열을 갖는 합성 DNA 각각 1 μ g을 10 μ l의 증류수에 용해하여 95°C로 5분 동안 가열한 다음, 30분에 걸쳐 실온까지 냉각하여 어닐링을 한다 (이하, 합성 DNA-1이라 부른다).

상기한 pTerm5의 NruI/ClaI 처리 단편 50ng 및 50ng의 합성 DNA-1을 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해시킨 후, T4 DNA 리가제를 100단위 가하여 16°C로 18시간 결합 반응을 한다.

당해 반응에 의해 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM109주를 형질전환하여 도 13에 나타낸 플라스미드 pTerm6을 얻는다.

공정 5 플라스미드 pSupex의 구축

3 μ g의 플라스미드 pTerm6을 30 μ l의 50mM 아세트산칼륨, 20mM 트리스-아세트산염(pH 7.9), 10mM 아세트산마그네슘 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 NsiI를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 30 μ l의 트리스A 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 HindIII를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 복제 개시점, 암피실린 내성 유전자, letI 프로모터 및 rop 유전자를 함유하는 약 3.7kb의 pTerm6의 NsiI/HindIII 처리 단편을 약 0.3 μ g 회수한다.

서열 23 및 24에 나타낸 염기 서열을 갖는 합성 DNA 각각 1 μ g을 10 μ l의 증류수에 용해하여 95°C로 5분 동안 가열한 다음, 30분에 걸쳐 실온까지 냉각하여 어닐링을 한다(이하, 합성 DNA-2라고 부른다).

상기한 pTerm6의 NsiI/HindIII 처리 단편 50ng 및 50ng의 합성 DNA-2를 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해시킨 후, T4 DNA 리가제 100단위를 가하여 16°C로 18시간 동안 결합 반응을 한다.

당해 반응에 의해 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM109주를 형질전환하여 도 13에 나타낸 플라스미드 pSupex를 얻는다.

공정 6 플라스미드 pYT102의 구축

실시에 3에서 취득한 pNKM101 3 μ g을 30 μ l의 50mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘, 100mM 염화나트륨 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 Eco47III를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 30 μ l의 10mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 KpnI을 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 서열 3에 나타낸 노화 억제 폴리펩타이드의 Ala³⁵로부터 Tyr²⁶⁷의 아미노산 잔기를 함유하는 단편을 암호화하는 DNA를 함유하는 약 0.7kb의 pNKM101의 Eco47III/KpnI 처리 단편(도 14)을 약 0.3 μ g 회수한다.

공정 5에서 수득한 대장균용 발현 벡터(pSupex) 3 μ g을 30 μ l의 트리스A 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 StuI을 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 30 μ l의 10mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 KpnI을 가하여 37°C로 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 약 3.8kb의 pSupex의 StuI/KpnI 처리 단편을 약 0.3 μ g 회수한다.

상기한 pNKM101의 Eco47111/KpnI 처리 단편 50ng 및 pSupex의 StuI/KpnI 처리 단편 100ng을 20 μ l의 T4 DNA 리가제 완충액에 용해시킨 후, T4 DNA 리가제(다카라슈조사제) 100단위를 가하여 16℃로 18시간 결합 반응을 한다.

당해 반응에 의해 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM109주를 형질전환하여 도 14에 나타난 플라스미드 pYT102를 얻는다.

실시에 7: 대장균에서의 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드의 발현

실시에 6에서 취득한 pYT102를 대장균 NY49주에 도입한다. 당해 균주를 75 μ g/ml 암피실린 및 2mg/ml 카자미노산을 첨가한 400ml의 M9 최소 배지(Molecular Cloning, A laboratory manual에 기재된 배지) 속에서 37℃, 2시간 배양후, 50 μ g/ml의 인돌아크릴산을 첨가하고 추가로 37℃에서 18시간 동안 배양한다.

당해 배양액 400ml를 3,000xg에서 15분 동안 원심분리하여 대장균을 함유하는 침전을 7ml의 완충액1[10mM Tris-염산(pH 8.0), 1mM EDTA, 150mM 염화나트륨으로 이루어지는 완충액] 중에 현탁하여 초음파 처리함으로써 균체를 파괴한다.

당해 처리액을 10,000xg에서 30분 동안 원심분리하여 수득한 침전을 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동용 샘플 버퍼[6mM 트리스-염산(pH 6.8), 2% SDS, 10% 글리세롤, 5% 2-머캅토에탄올로 이루어지는 완충액]에 용해한다. 당해 용액을 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동에 의해 분획하고 당해 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색한다. 결과를 도 15에 나타낸다. 분자량 약 27kD의 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드의 생성이 확인된다. 당해 전기영동에 있어서 분자량 마커로서 phosphorylase b(97,400), 소 혈청 알부민(66,200), ovalbumin(45,000), carbonic anhydrase(31,000), soybean trypsin inhibitor(21,500), lysozyme(14,400)을 사용한다.

실시에 8:마우스 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드와 반응하는 항 마우스 노화 억제 폴리펩타이드 항체의 생성

(1) 실시에 7에서 대장균을 숙주로 하여 발현된 마우스 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드를 2mm 두께의 겔을 사용하여 환원 조건에서 통상적인 방법에 따라 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동에 의해 분획한다.

당해 겔을 0.1% 쿠마시 브릴리언트 블루 수용액으로 염색한 후, 물로 탈색하여 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드에 상당하는 약 27kD의 밴드를 잘라낸다.

당해 겔을 갈고 으개서 0.1% SDS-PBS를 사용하여 노화 억제 폴리펩타이드 부분 단편을 4℃로 밤새 추출한 다음, 회수한다. 단백질 농도는 BSA를 단백질 농도 측정용 스탠드드로서 사용하고 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동을 함으로써 구한다.

(2) (1)에서 취득한 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드를 사용하여 통상적인 방법에 따라서 래트를 면역한다.

즉, 첫회만 아주벤트(수산화알루미늄겔 2mg, 백일해 백신 1×10^9 cells/마리)를 가하여 50 μ g/마리의 농도로 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드를 복강내에 투여하고 첫회로부터 2주간째, 3주간째에 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드만을 복강내에 투여한다.

최종 면역의 3일 후에 부분 채혈하여 이하에 기술하는 ELISA법에 의해 혈중항체가의 측정을 한다.

[ELISA법]

상기한 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드를 PBS 완충액[인산수소이나트륨 1.83g, 인산이수소칼륨 0.21g 및 염화나트륨 7.65g을 증류수에 용해시켜 1 리터로 한 완충액, pH 7.2]으로 10 μ g/ml의 농도로 조제한다. 당해 조제액을 96웰의 EIA용 플레이트(글라이너사제)에 50 μ l/웰만큼 나누어 주입하여 4℃로 밤새 방치한다.

당해 플레이트를 PBS 완충액으로 세정한 후, 1% BSA를 함유하는 PBS 완충액(이하, BSA-PBS라 약칭한다)을 100 내지 200 μ l/웰로 나누어 주입하고 실온에서 1 내지 2시간 또는 4℃에서 하루 내지 이틀 밤 방치한다. 방치후, BSA-PBS를 버리고 당해 플레이트를 PBS 완충액으로 잘 세정한다.

당해 플레이트에 채취한 항 혈청을 BSA-PBS에서 희석한 후, 20 내지 100 μ l/웰씩 가하여 실온으로 2시간 방치한다.

방치후, 당해 플레이트를 0.05% Tween 20을 함유하는 PBS 완충액(이하, PBS-0.05 Tween으로 약칭한다)으로 세정하고 퍼옥시다제 표지 항 래트 면역글로불린 또는 퍼옥시다제 표지 항 마우스 면역글로불린(DAKO 사제)을 50 내지 100 μ l/웰씩 첨가하여 실온으로 1시간 동안 방치한다.

방치후, 당해 플레이트를 PBS-0.05 Tween으로 세정하고 당해 플레이트에 ABTS 기질액[2,2-아디노비스(3-에틸벤조티아졸-6-설폰산)암모늄 550mg을 0.1M 시트르산 완충액(pH 4.2) 1 리터에 용해시킨 용액에 사용 직전에 과산화수소 1 μ l/ml를 가한 용액]을 사용하여 발색시키고 OD_{415nm}의 흡광도를 측정한다(NJ2001;일본 인터메드사).

(3) 웨스턴 블롯에 의해 당해 혈청이 상기한 마우스 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드와 반응하는 것을 확인한다.

실시에 7에 기재된 방법에 준하여 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드 단편의 발현이 확인된 대장균의 균

체 단백질을 폴리아크릴아미드겔 전기영동에 의해 분획 한다.

당해 겔에 분획된 단백질을 세미드라이 블롯법에 의해 전사막(Immobilon Transfer Membranes, Millipore 사제)에 전사한다. 전사는 100% 메탄올에 20초, 10mM CAPS(3-사이클로헥실아미노프로판설폰산), 10% 메탄올 및 0.03% SDS를 함유하는 용액에(pH 11.0) 30분 이상 침지시킨 전사막을 사용하여 $2\text{mA}/\text{cm}^2$ 정전류의 조건에서 2시간 실시한다.

당해 전사막을 200ml의 BSA-PBS 속에서 1시간 진탕시킨 다음, PBS 완충액으로 한번 세정한다.

당해 전사막 및 PBS 완충액으로 1/2500으로 희석한 래트로부터 채취한 혈청 2ml를 비닐 백에 넣어 밀봉하여 4℃로 밤새 천천히 진탕시킨다.

당해 전사막을 두 번 PBS-0.05 Tween에 5분 동안 침지하여 세정한 다음, PBS 완충액으로 5분 동안 침지하여 세정한다.

당해 전사막 및 PBS 완충액에 용해시킨 0.5mg/ml의 퍼옥시다제 표지된 항 래트 IgG 항체(anti-rat immunoglobulin, Amersham사제) 3ml를 비닐 백에 넣어 밀봉한 다음, 실온으로 1시간 동안 진탕시킨다.

진탕후, 당해 전사막을 두 번 PBS-0.05 Tween에 5분 동안 침지하여 세정한 다음, PBS 완충액에 5분 동안 침지하여 세정한다.

발광법(ECL Western blotting detection reagents, Amersham사제)에 의해 래트 혈청중의 항체와 교차가 보이는 당해 전사막상의 단백질의 검출을 한다. 결과를 도 16에 나타낸다.

실시에 7에서 얻어진 약 27kD의 밴드와 동일한 위치에서 밴드가 검출되고 실시예 8 (2)에서 채취한 래트 혈청중의 항체가 항원인 마우스 노화 억제 폴리펩타이드 단편을 인식하여 웨스턴 블롯법에 사용가능한 것이 나타내어졌다.

이하, 당해 래트 혈청중의 항체를 항 노화 억제 폴리펩타이드 항체라고 부른다.

실시에 9: 항 노화 억제 폴리펩타이드 모노클로날 항체의 제작

(1) 항체 생성 세포의 조제

실시에 8 (2)에서 취득한 혈청이 충분한 항체가를 나타낸 래트 3마리에서 비장을 적출한다.

당해 비장을 MEM 배지(닛스이세이아쿠사제) 속에서 세단(細斷)하여 핀셋으로 풀고 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음, 상등액을 버린다.

얻어진 침전 분획의 비장 세포를 트리스-염화암모늄 완충액(pH 7.65)으로 1 내지 2분 동안 처리하여 적혈구를 제거한 다음, MEM 배지로 3회 세정하여 얻어진 비장 세포를 항체 생성 세포로서 사용한다.

(2) 마우스 골수종 세포의 조제

8-아자구아닌 배지로 계대하여 놓은 8-아자구아닌 내성 마우스 골수종 세포주 P3-U1을 정상 배지로 배양하여 세포 융합용의 골수종 세포로서 사용한다. 세포 융합에는 2×10^7 개 이상의 세포를 사용한다.

(3) 하이브리도마의 제작

(1)에서 취득한 항체 생성 세포와 (2)에서 취득한 골수종 세포를 MEM 배지로 잘 세정하고 세포수가 항체 생성 세포:골수종 세포=10:1이 되도록 혼합하고 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음, 상등액을 버린다.

얻어진 침전 분획의 세포군을 잘 풀어 당해 세포군에 교반하면서 37℃에서 10^8 항체 생성 세포당, 폴리에틸렌글리콜-1000(PEG-1000) 2g, MEM 2ml 및 디메틸설폭사이드(DMSO) 0.7ml를 혼합한 용액을 0.2 내지 1ml 첨가하고, 또한 1 내지 2분 동안마다 MEM 배지 1 내지 2ml를 수회 첨가한다.

첨가후, MEM 배지를 가하여 전량이 50ml가 되도록 조제한다.

당해 조제액을 900rpm에서 5분 동안 원심분리한 후, 상등액을 버린다.

수득한 침전 분획의 세포를 완만히 푼 다음, 암컷 피펫에 의한 흡입, 흡출로 완만히 HAT 배지 100ml 중에 현탁한다.

당해 현탁액을 96웰 배양용 플레이트에 $100 \mu\text{l}$ /웰씩 나누어 주입하여 5% CO₂ 인큐베이터 중, 37℃에서 7 내지 14일 동안 배양한다.

배양후, 배양 상등액의 일부를 취하여 실시예 8 (2)에 기술한 효소 면역 측정법에 준하여 대장균에 의해 생성된 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드에 특이적으로 반응하는 하이브리도마 약 1,000주를 선택한다.

당해 하이브리도마를 사용하여 1회째는 HT 배지, 2회째는 정상 배지를 사용한 한계 희석법에 의한 클로닝을 하여 항 노화 억제 폴리펩타이드 항체를 생성하는 하이브리도마 KM1902주를 취득한다.

하이브리도마 KM1902주가 생성하는 모노클로날 항체 KM1902의 항체 클래스가 IgG2a인 것을 서브타입 타이핑 키트를 사용한 효소 면역 측정법에 의해 결정한다.

(4) 모노클로날 항체의 정제

프리스탄 처리한 8주 나이의 누드 암컷 마우스(Balb/c)에 (3)에서 취득한 하이브리도마주를 5 내지 20×10^6 세포/마리로 복강내에 주사함으로써 10 내지 21일 동안에서 하이브리도마는 복수암화한다.

당해 복수암화한 마우스로부터 복수(復水)를 채취(1 내지 8ml/마리)하여 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 고형분을 제거한다.

수득한 상등액을 카프르산 침전법[Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988)]를 사용하여 정제함으로써 IgG를 취득하여 정제 모노클로날 항체로서 사용한다.

실시에 10:동물 세포에서의 마우스 노화 억제 폴리펩타이드의 발현용 플라스미드 pYT103의 구축

공정 1: 동물 세포용 발현 벡터 pAGE210 구축(도 17)

동물 세포용 발현 벡터 pAGE207(일본 공개특허공보 제(평)6-46841) 및 pAGE148(일본 공개특허공보 제(평)6-205694)을 사용하여 동물 세포용 발현 벡터 pAGE210의 구축을 아래와 같이 실시한다.

pAGE207 또는 pAGE148 3 μ g을 30 μ l의 트리스A 완충액에 용해시킨 후, 당해 용해액에 10단위의 ClaI 및 KpnI를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 pAGE207로부터 SV40의 초기 프로모터와 인헨서(이하, P_{sc}라고 한다), 하이글로마이신 내성 유전자 및 암피실린 내성 유전자(이하, A_r라고 한다)를 함유하는 4.7kb의 pAGE207의 ClaI/KpnI 처리 단편을 약 0.5 μ g, pAGE148로부터 디하이드로엽산 환원효소 유전자(이하, dhfr이라 한다)를 함유하는 약 4.3kb의 pAGE148의 ClaI/KpnI 처리 단편을 약 0.5 μ g 회수한다.

상기한 pAGE207의 ClaI/KpnI 처리 단편 50ng 및 pAGE148의 ClaI/KpnI 처리 단편 50ng을 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해시킨 후, T4 DNA 리가제를 200단위 가하여 12°C로 16시간 결합 반응을 한다.

당해 반응에 의해 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM109주를 형질전환하여 도 17에 나타난 플라스미드 pAGE210를 얻는다.

공정 2

공정 1에서 취득한 pAGE210의 XbaI 단편과 실시에 6(공정 6) 기재의 pNKM101의 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하는 XbaI 단편을 연결함으로써 마우스 노화 억제 폴리펩타이드 발현 벡터 pYT103의 구축을 아래와 같이 실시한다(도 18).

3 μ g의 pAGE210을 30 μ l의 트리스A 완충액에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 XbaI을 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 50 μ l의 1M 트리스-염산(pH 8.0) 완충액에 용해시킨 후, 당해 용해액에 1단위의 알칼리포스파타제를 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하고 당해 추출액으로부터 pAGE210의 XbaI-탈인산 처리 단편을 약 0.5 μ g 회수한다.

3 μ g의 pNKM101을 0.01%의 BSA를 첨가한 트리스A 완충액 30 μ l에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 XbaI을 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 아가로스 전기영동에 의해 분획한 후, 3.2kb의 pNKM101의 XbaI 처리 단편을 약 0.3 μ g 회수한다.

당해 pNKM101의 XbaI 처리 단편 50ng과 상기 pAGE210의 XbaI-탈인산 처리 단편 300ng을 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해하고 당해 용액에 T4 DNA 리가제를 1단위 가하여 16°C로 18시간 결합 반응을 실시한다.

당해 반응에 의해 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM109주를 형질전환하여 도 18에 나타난 플라스미드 pYT103를 얻는다.

실시에 11:동물 세포에 있어서의 마우스 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

동물 세포에의 플라스미드의 도입은 미야지 등의 방법에 따라서 일렉트로포레이션법[Cytotechnology, 3, 133(1990)]을 사용하여 실시한다.

실시에 10(공정 2)에서 수득한 pYT103을 dhfr 유전자를 결손한 CHO 세포[Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4216(1980)] 4×10^6 개당 4 μ g 도입한 후, 10ml의 MEM α 2000-dFCS(5)[dFCS를 5%, 7.5% NaHCO₃를 1/40량, 200mM L-글루타민 용액(기브코사제)를 3%, 페니실린 스트렙토마이신 용액(기브코사제, 5000 units/ml 페니실린 및 5000 μ g/ml 스트렙토마이신 함유)을 0.5% 함유하는 MEM α 2000 배지(기브코사제)]에 현탁하여 10cm 플레이트(이와키가라스사제)에 넣는다.

37°C의 5% CO₂ 인큐베이터 속에서 24시간 배양한 다음, 하이글로마이신(GIBCO사제)을 0.3mg/ml이 되도록

첨가하여 1 내지 2주간 배양한다.

당해 배양에 의해 생육하여 온 형질전환주가 컨플루언트가 된 상태로 당해 형질전환주의 세포를 회수한다.

당해 세포를 하이글로마이신을 0.3mg/ml, 메소트렉세이트(이하, MTX라고 약기한다)를 50nM 함유하는 MEM α 2000-dFCS(5) 배지에 1 내지 2×10^5 세포/ml가 되도록 현탁하여 F75 플라스크(글라이너사제)에 2 ml 나누어 주입한 다음, 37℃의 CO₂ 인큐베이터속에서 1 내지 2주간 배양하여 50nM MTX 내성 클론을 유도한다.

당해 클론을 하이글로마이신을 0.3mg/ml, MTX를 100nM 함유하는 MEM α 2000-dFCS(5) 배지에 1 내지 2×10^5 세포/ml가 되도록 현탁하여 F75 플라스크에 2ml 나누어 주입한 후, 37℃의 CO₂ 인큐베이터 속에서 1 내지 2주간 배양하여 100nM MTX 내성 클론을 유도한다.

당해 클론을 하이글로마이신을 0.3mg/ml, MTX를 500nM 함유하는 MEM α 2000-dFCS(5) 배지에 1 내지 2×10^5 세포/ml가 되도록 현탁하여 F75 플라스크에 2ml 나누어 주입한 다음, 37℃의 CO₂ 인큐베이터 속에서 1 내지 2주간 배양하여 500nM MTX 내성 클론을 유도한다.

당해 500nM MTX 내성 클론을 MTX를 500nM 함유하는 MEM α 2000-dFCS(5) 배지에 1 내지 2×10^5 세포/ml가 되도록 현탁하여 F75 플라스크에 15ml 나누어 주입한 다음, 37℃의 CO₂ 인큐베이터 속에서 5 내지 7일 동안 배양하여 내성 클론이 80 내지 100% 컨플루언트가 된 시점에서 CHO 세포용 무혈청 배지 CHO-S-SFMII 배지(기브코사제) 15ml와 교환하고 추가로 3일 배양한다.

배양에 의해 수득한 세포를 트립신-EDTA 처리하여 10 ml MEM α 2000 배지에 현탁한다.

당해 현탁액을 1,500xg로 5분 동안 원심분리하여 세포를 모은다.

당해 세포에 7ml의 PBS 완충액을 가하여 세정한 다음, 1,500 x g로 5분 동안 원심분리함으로써 세포를 모은다.

당해 세포는 -20℃에서 보존하는 것이 가능하여 필요에 따라서 해동하여 사용할 수 있다.

실시에 8 (3)과 같은 방법에 따라 당해 세포의 전단백질(1레인당 1×10^5 세포)을 사용하여 웨스턴 블롯을 한다.

결과를 도 19에 나타낸다. 항 노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 밴드가 확인되어 노화 억제 폴리펩타이드가 동물 세포를 사용하여 현저한 양으로 발현되는 것을 알 수 있다.

또한 마우스 막 결합형 노화 억제 폴리펩타이드의 N말단 아미노산 서열을 단백질 화학의 통상적인 방법에 따라서 결정한다.

즉, 컨플루언트가 될 때까지 생육시킨 10cm 살레 20장분의 실시에 10에 기재된 노화 억제 폴리펩타이드를 발현한 CHO 세포(CHO dhfr - /pYT103)으로부터 하기하는 실시에 25 기재의 면역 침강법으로 정제한 약 140kDa 노화 억제 폴리펩타이드를 기상(氣相) 프로테인 시퀀서(PPSQ-10, 시마츠세이사쿠쇼)를 사용하여 제작자가 권장하는 방법에 따라 N말단 9아미노산 잔기의 서열을 해석한다.

당해 해석의 결과 서열 3에 기재된 아미노산 서열의 N말단 36잔기째로부터의 9아미노산 잔기의 서열과 일치한다.

실시에 12:곤충 세포에 의한 노화 억제 폴리펩타이드 발현용 재조합 바이러스의 작제

곤충 세포에 의한 단백질의 생성에는 목적 유전자를 삽입한 재조합 바이러스의 제작이 필요하지만 그 제작에는(공정 1) 전달 벡터라고 불리는 목적 단백질을 암호화하는 DNA를 특수한 플라스미드에 삽입하는 공정과(공정 2) 야생형 바이러스와 전달 벡터를 곤충 세포에 공형질감염하여 상동 재조합에 의해 재조합 바이러스를 취득하는 공정이 필요하다.

당해 공정을 하기 위해서 파민젠사제 바쿨로 골드 스타터 키트(제품번호 PM-21001K)를 사용하여 당해 키트의 매뉴얼에 따라서 하기의 순서로 실시한다.

공정 1: 전달 벡터의 제작(도 20)

3 μ g의 pNKM101을 30 μ l의 0.01% 소 혈청 알부민 및 0.01% Triton X-100을 첨가한 트리스B 완충액(이하, 트리스D 완충액이라고 부른다)에 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 NotI을 가하여 37℃에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA에 30 μ l의 10mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘, 0.01% 소 혈청 알부민 및 1mM DTT으로 이루어지는 완충액(이하, 트리스E 완충액이라고 부른다)을 첨가한 후, 10단위의 XbaI을 가하여 37℃에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 마우스 노화 억제 폴리펩타이드 단편을 암호화하는 DNA를 함유하는 약 3.2kb의 pNKM101의 NotI-XbaI 처리 단편을 약 0.3 μ g 회수한다.

파민젠사제 바쿨로골드 스타터 키트에 함유되는 플라스미드 pVL1392를 3 μ g, 트리스D 완충액에 첨가한

후, 10단위의 NotI을 가하여 37℃에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 하여 DNA를 회수한다. 당해 DNA에 30 μ l의 트리스E 완충액을 첨가한 후, 당해 완충액에 10단위의 XbaI을 가하여 37℃에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액 중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 분획하고 약 9.6kb의 pVL1392의 NotI-XbaI 처리 단편을 약 0.9 μ g 회수한다.

당해 pVL1392의 NotI-XbaI 처리 단편 200ng과 상기 pNKM101의 NotI-XbaI 처리 단편 50ng을 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해하여 T4 DNA 리가제 1단위를 가하여 16℃로 18시간 동안 결합 반응을 한다.

당해 반응에 의해 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM109주를 형질전환하여 플라스미드 pAS104를 얻는다(도 20).

공정 2: 재조합 바이러스의 제작

TMN-FH 인섹트메디움(파민젠사제)를 사용하여 배양한 곤충 세포 Sf9(파민젠사제)에 선 형상 바쿨로바이러스 DNA[바쿨로골드 바쿨로바이러스 DNA(BaculoGold baculovirus DNA), 파민젠사제] 및 상기 플라스미드 pAS104를 리포펙션법에 의해 도입하는 것[단백질 핵산 효소, 37, 2701(1992)]에 의해 아래와 같이 하여 재조합 바쿨로바이러스를 제작한다.

1 μ g의 pAS104 및 20ng의 선 형상 바쿨로바이러스 DNA를 12 μ l의 증류수에 용해한 후, 리보펙틴 6 μ l 및 증류수 6 μ l를 혼합한 것을 첨가하여 실온에서 15분 동안 방치한다.

Sf9 세포 1×10^6 개를 2ml의 Sf900-II 배지(Gibco사제)에 현탁하여 지름 35mm의 세포 배양용 플라스틱 살레에 넣은 다음, 상기의 플라스미드 DNA, 선 형상 바쿨로바이러스 DNA 및 리포펙틴 혼합 용액 전량을 첨가하여 27℃로 3일 동안 배양한다.

당해 배양액으로부터 재조합 바이러스를 함유하는 배양 상등액 1ml를 채취한다. 당해 배양 상등액을 취득한 살레에는 새롭게 Sf900-II 배지 1ml를 가하여 추가로 27℃에서 3일 동안 배양하고 동일하게 하여 재조합 바이러스를 함유하는 배양 상등액을 추가로 1.5ml 취득한다.

실시에 13:곤충 세포에 있어서의 마우스 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

공정 1: 재조합 바이러스의 증식

Sf9 세포 2×10^7 개를 10ml의 Sf900-II 배지에 현탁하여 175cm² 플라스크(그라이나사제)에 넣어 실온에서 1시간 동안 방치하여 세포를 플라스크에 부착시킨다.

방치후, 상등액을 제거하고 당해 플라스크에 15 ml의 TMN-FH 인섹트메디움 및 실시에 12에서 취득한 재조합 바이러스를 함유하는 배양 상등액 1ml를 첨가하여 27℃에서 3일 동안 배양한다.

배양후, 상등액을 1,500xg에서 10분 동안 원심분리함으로써 Sf9 세포가 제거된 재조합 바이러스 용액을 얻는다.

당해 재조합 바이러스 용액의 바이러스의 역가(力價)를 이하 방법으로 산정한다[파민젠사제 바쿨로골드 스타터 키트 매뉴얼].

Sf9 세포 6×10^6 개를 4ml의 Sf900-II 배지에 현탁하여 지름 60mm의 세포 배양용 플라스틱 살레에 넣어 실온에서 1시간 방치하여 세포를 살레에 부착시킨다.

방치한 다음, 상등액을 제거하고 당해 살레에 Sf 900-II 배지 400 μ l 및 Sf 900-II 배지에서 10,000배로 희석한 상기한 재조합 바이러스 용액을 첨가하고 실온에서 1시간 동안 방치한다.

방치한 다음, 배지를 제거하고 5ml의 1% 저용점 아가로스[아가플라크·아가로스(Agarplaque Agarose), 파민젠사제]를 함유하는 배지[멸균한 1ml의 5% 아가플라크플러스·아가로스 수용액과 4ml의 TMN-FH 인섹트메디움을 혼합하고 42℃에서 보온한 것]를 당해 살레에 흘러 넣고 실온에서 15분 동안 방치한다.

방치한 다음, 건조를 막기 위해 비닐 테이프를 살레에 감고 밀폐할 수 있는 플라스틱제 용기에 당해 살레를 넣고 27℃에서 6일 동안 배양한다.

당해 살레에 0.01% 뉴트럴 레드를 함유하는 PBS 완충액 1ml를 가한 다음, 1일 동안 배양한 후에 출현한 플라크의 수를 계수한다.

상기한 조작으로부터 당해 재조합 바이러스 용액은 약 1×10^8 플라크 형성 단위(PFU)/ml의 바이러스를 함유하는 것을 알았다.

공정 2: 곤충 세포에 의한 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

파민젠사제 바쿨로골드 스타터 키트에 첨부되어 있는 매뉴얼에 따라 하기의 순서에 의해 마우스 노화 억제 폴리펩타이드의 발현을 실시한다.

Sf 9 세포 6×10^6 개를 225cm² 플라스크(글라이너사제)에 10% FCS를 함유하는 그레이스·인섹트·메디움(Grace's Insect Medium, 기브코사제) 45ml에 현탁하고 27℃에서 3 내지 4일 동안 배양한다.

배양한 다음, 배양 상등액을 제거하고 당해 플라스크에 새롭게 30ml의 10% FCS를 함유하는 그레이스·인

섹트·미디엄 및 (공정 1)에서 취득한 pAS104 유래의 재조합 바이러스를 약 1×10^8 PFU/ml의 농도로 함유하는 용액을 1ml 첨가하여 27℃에서 1일 동안 배양한다.

배양한 다음, 상등액을 제거하고 당해 플라스크에 새롭게 Sf 900-II 배지 45 ml를 가하고 2 내지 3일 동안 배양한다.

배양한 다음, 상등액을 1,500 x g에서 5분 동안 원심분리함으로써 제거하고 수득한 세포를 트립신-EDTA 처리에 의해 박리한다.

수득한 세포 분획을 10ml의 Sf 900-II 배지에 현탁한 다음, 1,500 x g에서 5분 동안 원심분리함으로써 세포를 수집한다.

당해 세포 분획에 7ml의 PBS 완충액을 첨가하여 세정한 다음, 1,500 x g에서 5분 동안 원심분리함으로써 세포를 수집한다.

당해 세포는 -20℃에서 보존할 수 있으며 필요에 따라 해동하여 사용한다.

공정 3: 발현의 확인

실시에 7과 동일한 방법에 따라 공정 2에서 취득한 세포의 전체 단백질(1레인당 1×10^5 세포)을 사용하여 SDS-PAGE를 실시한다.

결과를 제21도에 도시한다. 120kD 부근에서 특이적인 밴드가 확인된다.

또한 실시에 8(3)와 동일한 방법에 따라 공정 2에서 취득한 세포의 전체 단백질(1레인당 1×10^5 세포)을 사용하여 웨스턴 블롯을 실시한다.

결과를 제22도에 도시한다. 웨스턴 블롯에서도 SDS-PAGE와 동일한 위치에 항노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 특이적인 밴드가 확인된다.

상기한 점으로부터 곤충 세포를 사용하여 항노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 노화 억제 폴리펩타이드를 현저한 양으로 발현시킬 수 있는 것을 알았다.

또한 당해 곤충 세포로부터 실시에 8(1)의 방법에 준하여 노화 억제 폴리펩타이드를 취득한다.

실시에 14: 동물세포에서 사람 막결합형 노화 억제 폴리펩타이드의 발현용 플라스미드 pYS 110의 구축

실시에 10(공정1)에서 취득한 pAGE 210의 (KpnI 평활 말단화 처리)-BamHI 단편과 실시에 5에 기재된 pNKM 103의 사람 막결합형 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하는 BamHI-HpaI 단편을 연결함으로써 사람 막결합형 노화 억제 폴리펩타이드 발현 벡터 pYS 110의 구축을 아래와 같이 실시한다(도 23).

5 μ g의 pAGE 210을 30 μ l의 10mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 다음, 당해 완충액에 20단위의 KpnI를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 DNA 단편을 약 3 μ g 회수한다. 당해 DNA를 DNA blunting kit(다카라슈조사제)에 의해 평활 말단화 처리를 실시한 다음, 페놀-클로로포름 추출, 에탄올 침전을 실시하고 50 μ l의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화 칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 용해액에 20단위의 BamHI를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 아가로스겔 전기영동으로 분획한 다음, 9.0kb의 pAGE 210의 BamHI-(KpnI 평활 말단화 처리) 단편을 겔로부터 절단하고 유리 파우더법[Gene Clean(Bio101사제)]에 의해 정제하여 약 1 μ g 회수한다.

10 μ g의 pNKM 103을 50 μ l의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화칼륨 완충액에 첨가한 다음, 당해 완충액에 30단위의 BamHI와 30단위의 HpaI를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 아가로스 전기영동으로 분획한 다음, 3.2kb의 pNKM 103의 BamHI-HpaI 처리 단편을 약 0.5 μ g 회수한다.

당해 pNKM 103의 BamHI-HpaI 처리 단편 100ng와 상기 pAGE 210의 BamHI-(KpnI 평활 말단화 처리) 단편 100ng를 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해하고 당해 용액에 T4 DNA 리가제를 1단위 가하고 16℃에서 18시간 동안 결합 반응을 실시한다.

당해 반응에 따라 수득하는 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM 109주를 형질전환하여 도 23에 도시한 플라스미드 pYS 110을 얻는다.

실시에 15: 동물세포에서 사람 막결합형 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

동물세포로의 플라스미드의 도입은 미야지 등의 방법에 따라 일렉트로포레이션법[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]을 사용하여 실시한다.

실시에 14에서 수득하는 pYS 110을 dhfr 유전자를 결손시킨 CHO 세포[참조: Proc.Natl.Acad.Sci., 77, 4216(1980)] 4×10^6 개당 4 μ g 도입한 다음, 10ml의 MEMa 2000-dFCS(5)[dFCS를 5%, 7.5% NaHCO₃를 1/40량, 200mM L-글루타민 용액(기브코사제)을 3%, 페니실린·스트렙토마이신 용액(기브코사제, 5000units/ml 페

니실린 및 5000 µg/ml 스트렙토마이신 함유)을 0.5% 함유하는 MEMa 2000배지(기브코사제)]에 현탁하여 10cm 플레이트(이와키가라스사제)에 투입한다. 이후의 조작은 실시예 11과 동일하게 실시하여 500nM MTX 내성 클론을 유도한다.

당해 500nM MTX 내성 클론을 MTX를 500nM 함유하는 MEMa 2000 - dFCS(5) 배지에 1 내지 2×10^5 세포/ml로 되도록 현탁하고 F75 플라스크에 15ml 나누어 주입한 다음, 37°C의 CO₂ 인큐베이터 속에서 5 내지 7일 동안 배양하고 내성 클론이 80 내지 100% 컨플루언트로 되는 시점에서 배양을 종료하여 당해 배양액을 제거하고 트립신-EDTA 처리에 의해 세포를 취득한다.

수득한 세포를 10ml MEMa 2000 배지에 현탁한 다음, 당해 현탁액을 1,500 x g에서 5분 동안 원심분리함으로써 세포를 수집한다.

당해 세포에 7ml의 PBS 완충액을 가하여 세정한 다음, 1,500 x g에서 5분 동안 원심분리함으로써 세포를 수집한다.

당해 세포는 -20°C에서 보존할 수 있으며 필요에 따라 해동하여 사용할 수 있다.

실시에 8(3)와 동일한 방법에 따라 당해 세포의 전체 단백질(1레인당 1×10^5 세포)을 사용하여 웨스턴 블롯을 실시한다. 단, 일차 항체에는 실시예 9에 기재된 모노클로날 항체 KM 1902를 사용한다.

결과를 도 24에 도시한다. 항노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 밴드가 확인되며 사람 막결합형 노화 억제 폴리펩타이드가 동물세포를 사용하여 현저한 양이 발현되는 것을 알았다.

또한 사람 막결합형 노화 억제 폴리펩타이드의 N 말단 아미노산 서열을 단백질 화학의 통상적인 방법에 따라 결정한다.

즉, 컨플루언트로 될 때까지 생육시킨 10cm 살레 20장분의 실시예 14에 기재된 사람 막결합형 노화 억제 폴리펩타이드를 발현하는 CHO 세포(CH0dhfr⁻/pYS 110)로부터 면역침강법으로 정제한 약 140kDa 사람 막결합형 노화 억제 폴리펩타이드를 2 - 머캅토에탄올 환원하에 SDS-PAGE를 실시한 다음, P.Matsudaira의 방법 [참조: J.B.C., 262, 10035(1987)]에 따라 PVDF막(ProBlott, PERKIN ELMER사제)에서 전기적으로 전사한다.

당해 전사된 막을 쿠마디 블루 염색하고 본 실시예에 기재된 웨스턴 블로팅으로 양성인 140kDa 부근의 밴드를 절단하고 기상 플로팅 시퀀서(PPSQ-10, 시마쓰세이사쿠쇼)를 사용하여 제작자가 추천하는 방법에 따라 N 말단 10아미노산 잔기의 서열을 해석한다.

당해 해석의 결과 서열 1에 기재된 아미노산 서열의 N 말단 34잔기째로부터 10아미노산 잔기의 서열과 일치한다.

또한 당해 동물 세포로부터 실시예 8(1)방법에 준하여 사람 막결합형 노화 억제 폴리펩타이드를 취득한다.

실시에 16: 동물세포에서 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드의 발현용 플라스미드 pYS 111의 구축

실시에 10(공정1)에서 취득하는 pAGE 210의 BamHI-(KpnI 평활 말단화) 단편과 실시예 5에 기재된 pNKH 106의 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하는 BamHI-MscI 단편을 연결함으로써 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현 벡터 pYS 111의 구축을 아래와 같이 실시한다(도 25).

5 µg의 pAGE 210을 30 µl의 10mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 다음, 당해 완충액에 20단위의 KpnI를 가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 DNA 단편을 약 3 µg 회수한다.

당해 DNA를 DNA blunting kit(다카라슈조사제)에 의해 평활 말단화 처리를 실시한 다음, 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 50 µl의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 용해액에 20단위의 BamHI를 가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨다. 당해 반응액은 아가로스겔 전기영동으로 분획한 다음, 9.0kb의 pAGE 210의 BamHI-(KpnI 평활 말단화) 단편을 겔로부터 절단하고 유리 파우더법에 의해 정제하여 약 1 µg 회수한다.

10 µg의 pNKH 106을 50 µl의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 완충액에 30단위의 BamHI를 가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하고 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시한 다음, 50 µl의 50mM 아세트산칼륨, 20mM 트리스-아세트산(pH 7.9), 10mM 아세트산마그네슘, 1mM DTT 완충액에 용해한 다음, 30단위의 MscI를 가하여 37°C에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 아가로스 전기영동으로 분획한 다음, 1.9kb의 pNKH 106의 BamHI-MscI 처리 단편을 약 0.5 µg 회수한다.

당해 pNKH 106의 BamHI-MscI 처리 단편 100ng와 pAGE 210의 BamHI-(KpnI 평활 말단화) 단편 100ng를 T4 DNA 리가제 완충액 20 µl에 용해하고, 당해 용액에 T4 DNA 리가제를 1단위 가하여 16°C에서 18시간 동안 결합반응을 실시한다.

당해 반응으로 수득하는 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM 109주를 형질전환하고 도 25에 도시하는 플라스미드 pYS 111을 얻는다.

실시에 17: 동물세포에서 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

동물세포로의 플라스미드의 도입은 미야지 등의 방법에 따라 일렉트로포레이션법[참조: Cytotechnology, 3, 133(1990)]을 사용하여 실시한다.

실시에 16에서 수득하는 pYS 111을 dhfr 유전자를 결손시킨 CHO 세포[참조: Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4216(1980)] 4×10^6 개당 4 μ g을 도입한 다음, 10ml의 MEMa 2000 - dFCS(5)[dFCS를 5%, 7.5% NaHCO₃를 1/40 량, 200mM L-글루타민 용액(기브코사제)를 3%, 페니실린 · 스트렙토마이신 용액(기브코사제, 5000units/ml 페니실린 및 5000 μ g/ml 스트렙토마이신 함유)을 0.5% 함유하는 MEMa 2000배지(기브코사제)]에 현탁하여 10cm 플레이트(이와키가라스사제)에 투입한다.

이후의 조작은 실시에 11과 동일하게 실시하고 500nM MTX 내성 클론을 유도한다.

당해 500nM MTX 내성 클론을 MTX를 500nM 함유하는 MEMa 2000 - dFCS(5) 배지에 1 내지 2×10^5 세포/ml로 되도록 현탁하고 F 75 플라스크에 15ml 나누어 주입한 다음, 37℃의 CO₂ 인큐베이터 속에서 5 내지 7일 동안 배양하고 내성 클론이 80 내지 100% 컨플루언트로 되는 시점에서 CHO 세포용 무혈청 배지 CHO - S - SFM II 배지(기브코사제) 15ml와 교환하고 다시 3일 동안 배양한다.

배양을 종료한 다음, 당해 배양액 0.5ml에 아세톤 1.5ml를 첨가하고 20℃에서 30분 동안 정치한다. 시료는 -10℃, 15,000 x g, 10분 동안의 조건으로 원심분리하여 침전 분획을 취득한 다음, 당해 침전 분획에 2ml의 70% 에탄올을 첨가하여 4℃에서 5분 동안 원심처리를 실시한다.

수득된 침전은 다음에 건조시켜 배양 상등액의 아세톤 농축 시료를 얻는다.

상기한 배양 상등액은 -20℃에서 보존할 수 있으며 필요에 따라 해동하여 사용할 수 있다.

상기한 아세톤 농축 시료를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 생성물의 해석을 실시한다.

결과를 도 26에 나타낸다.

항노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 밴드가 확인되며 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드가 동물 세포를 사용하여 현저한 양으로 발현되는 것을 알았다.

또한 배양 상등액 300ml로부터 면역침강법에 의해 농축한 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드를 실시에 15에 기재된 방법에 따라 N 말단 아미노산 서열을 결정한다. 수득된 아미노산 서열은 서열 2에 기재된 아미노산 서열의 N 말단 34잔기째로부터 9아미노산 잔기의 서열과 일치한다.

또한 당해 동물세포 배양 상등액으로부터 실시에 8(1)의 방법에 준하여 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드를 취득한다.

실시에 18: 곤충세포에 의한 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현용 재조합 바이러스의 제조

곤충세포에 의한 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현용 재조합 바이러스의 제조는 실시에 12에 기재하는 방법에 준하여 조제한다.

구체적으로는 10 μ g의 pNKH 106을 50 μ l의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 완충액에 30단위의 BamHI를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다. 반응액은 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전후에 50 μ l의 50mM 아세트산칼륨, 20mM 트리스-아세트산(pH 7.9), 10mM 아세트산마그네슘, 1mM DTT 완충액에 용해한 다음, 30단위의 MscI를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 아가로스겔 전기영동으로 분획한 다음, 1.9kb의 pNKH 106의 BamHI-MscI 단편을 겔로부터 절단하고 유리 파우더법에 의해 정제하고 약 0.5 μ g을 회수한다.

파인젠사제 바클로골드 스타터 키트에 함유되는 플라스미드 pVL 1393을 5 μ g, 50 μ l의 트리스 B완충액에 첨가한 다음, 30단위의 EcoRI를 가하여 37℃에서 4시간동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 DNA blunting kit(다카라슈조사제)에 의해 평활 말단화 처리를 실시한 다음, 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 50 μ l의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 용해액에 20단위의 BamHI를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 아가로스겔 전기영동으로 분획한 다음, 9.6kb의 pVL 1393의(EcoRI 평활 말단처리)-BamHI 단편을 겔로부터 절단하고 유리 파우더법에 의해 정제하여 약 1 μ g을 회수한다.

당해 pVL 1393의(EcoRI 평활 말단처리)-BamHI 단편 200ng과 상기한 pNKH 106의 BamHI-MscI 처리 단편 50ng를 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해하고 T4 DNA 리가제 1단위를 가하여 16℃에서 18시간 동안 결합반응을 실시한다.

당해 반응에 따라 수득하는 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM 109주를 형질전환하고 플라스미드 pYS 150을 얻는다(도 27).

재조합 바이러스의 제조는 1 μ g의 pYS 150을 사용하고 20ng의 선 모양 바클로바이러스와 함께 리포펙틴법으로 Sf 21 세포에 도입하여 27℃에서 3일 동안 배양한다. 당해 배양액으로부터 재조합 바이러스를 함유하는 배양 상등액 1.0ml를 채취한다.

실시에 19: 곤충세포에서 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

공정 1: 재조합 바이러스의 증식

Sf 21 세포 2×10^7 개를 10ml의 Sf 900-II 배지에 현탁하여 175cm² 플라스크(글라이너사제)에 투입하고 실온에서 1시간 동안 방치하여 세포를 플라스크에 부착시킨다. 방치한 다음, 상등액을 제거하고 당해 플라스크에 15ml의 TMN-FH 인섹트미디엄 및 실시예 17에서 취득한 재조합 바이러스를 함유하는 배양 상등액 1ml를 첨가하여 27℃에서 3일 동안 배양한다.

배양한 다음, 상등액을 1,500 x g에서 10분 동안 원심분리함으로써 Sf 21 세포가 제거된 재조합 바이러스 용액을 얻는다.

당해 재조합 바이러스 용액의 바이러스의 역가는 실시예 13에 기재된 방법으로 산정하고 재조합 바이러스 용액은 약 2×10^8 플라크 형성 단위(PFU)/ml의 바이러스를 함유하는 것을 알았다.

공정 2: 곤충 세포에 의한 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

파민젠사제 바쿨로골드 스타터 키트에 첨부되어 있는 매뉴얼에 따라 하기의 순서에 따라 마우스 노화 억제 폴리펩타이드의 발현을 실시한다.

Sf 21 세포 6×10^6 개를 225cm² 플라스크(글라이너사제)에 10% FCS를 함유하는 그레이스·인섹트·미디엄(Grace's Insect Medium, 기브코사제) 45ml에 현탁하여 27℃에서 3 내지 4일 동안 배양한다.

배양한 다음, 배양 상등액을 제거하고 당해 플라스크에 새롭게 30ml의 10% FCS를 함유하는 그레이스·인섹트·미디엄 및 (공정1)에서 취득한 pSY 150 유래의 재조합 바이러스를 약 2×10^8 PFU/ml의 농도로 함유하는 용액을 0.5ml 첨가하여 27℃에서 1일 동안 배양한다.

배양한 다음, 상등액을 제거하고 당해 플라스크에 새롭게 Sf 900-II 배지 45 ml를 가하여 2 내지 3일 동안 배양한다.

배양한 다음, 1,500 x g에서 5분 동안 원심분리함으로써 배양 상등액을 얻는다. 당해 배양 상등액은 -20℃에서 보존할 수 있으며 필요에 따라 해동하여 사용한다.

공정 3: 발현의 확인

실시에 17과 동일한 방법에 따라 배양 상등액 0.5ml를 사용하고 아세톤에 의한 농축을 하여 SDS-PAGE에 의해 영동후에 웨스턴 블롯을 실시한다.

결과를 도 28에 도시한다. 웨스턴 블롯에서 항노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 특이적인 밴드가 확인된다.

상기한 점으로부터 곤충 세포를 사용하여 항노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드를 현저한 양으로 발현시킬 수 있는 것을 알았다.

또한 당해 곤충 세포 배양 상등액으로부터 실시예 8(1)의 방법에 준하여 사람 분비형 노화 억제 폴리펩타이드를 취득한다.

실시에 20: 동물세포에서 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드의 발현용 플라스미드 pYS 112의 구축

실시에 10(공정1)에서 취득한 pAGE 210 Hind III-BamHI 단편과 실시예 4에 기재된 pNKM 112의 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하는 Hind III-BamHI 단편을 연결함으로써 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현 벡터 pYS 112의 구축을 아래와 같이 실시한다(도 29).

5 μg의 pAGE 210을 30 μl의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 용해액에 20단위의 BamHI와 20단위의 Hind III를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액은 아가로스겔 전기영동으로 분획한 다음, 9.0kb의 pAGE 210의 Hind III-BamHI 단편을 겔로부터 절단하고 유리 파우더법에 의해 정제하여 약 1 μg을 회수한다.

10 μg의 pNKM 112를 50 μl의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 용해액에 30단위의 BamHI와 30단위의 Hind III를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 아가로스 전기영동으로 분획한 다음, 1.6kb의 pNKM 112의 Hind III-BamHI 처리 단편을 약 0.5 μg 회수한다.

당해 pNKM 112의 Hind III-BamHI 처리 단편 100ng과 상기 pAGE 210의 Hind III-BamHI 단편 100ng을 T4 DNA 리가제 완충액 20 μl에 용해하여 당해 용액에 T4 DNA 리가제를 1단위 가하고 16℃에서 18시간 동안 결합반응을 실시한다.

당해 반응에 따라 수득하는 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM 109주를 형질전환하고 도 29에 도시한 플라스미드 pYS 112를 얻는다.

실시에 21: 동물세포에서 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

동물세포로의 플라스미드의 도입은 미야지 등의 방법에 따라 일렉트로포레이션법[참조: Cytotechnology, 3, 133(1990)]을 사용하여 실시한다.

실시에 20에서 수득하는 pYS 112를 dhfr 유전자를 결손시킨 CHO 세포[참조: Proc. Natl. Acad. Sci., 77, 4216(1980)] 4×10^6 개당 4 μ g 도입한 다음, 10ml의 MEMa 2000 - dFCS(5)[dFCS를 5%, 7.5% NaHCO₃를 1/40량, 200mM L-글루타민 용액(기브코사제)를 3%, 페니실린·스트렙토마이신 용액(기브코사제, 5000units/ml 페니실린 및 5000 μ g/ml 스트렙토마이신 함유)을 0.5% 함유하는 MEMa 2000배지(기브코사제)]에 현탁하여 10cm 플레이트(이와키가라스사제)에 투입한다.

이후의 조작은 실시예 11과 동일하게 하여 500nM MTX 내성 클론을 유도한다.

당해 500nM MTX 내성 클론을 MTX를 500nM 함유하는 MEMa 2000 - dFCS(5) 배지에 1 내지 2×10^5 세포/ml로 되도록 현탁하여 F75 플라스크에 15ml를 나누어 주입한 다음, 37℃의 CO₂ 인큐베이터 속에서 5 내지 7일 동안 배양하고 내성 클론이 80 내지 100% 컨플루언트로 되는 시점에서 CHO 세포용 무혈청 배지 CHO-S - SFM 11 배지(기브코사제) 15ml와 교환하고 다시 3일 동안 배양한다.

당해 배양 상등액은 -20℃로 보존할 수 있으며 필요에 따라 해동하여 사용할 수 있다.

당해 배양 상등액 1ml를 사용하고 하기 실시예 25에 기재된 면역침강법에 의해 생성물의 농축을 실시한 다음, 웨스턴법으로 생성물의 해석을 한다.

결과를 도 30에 도시한다. 항노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 밴드가 확인되며 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드가 동물세포를 사용하여 현저한 양으로 발현되는 것을 알았다.

당해 동물세포 배양 상등액 45ml로부터 면역침강법에 의해 농축한 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드를 실시예 15에 기재된 방법에 따라 N 말단 아미노산 서열을 결정한다. 수득된 아미노산 서열은 서열 4에 기재된 아미노산 서열의 N 말단 36잔기째로부터 13아미노산 잔기의 서열과 일치한다.

또한 당해 동물세포 배양 상등액으로부터 실시예 8(1)의 방법에 준하여 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드를 취득한다.

실시에 22: 곤충 세포에 의한 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현용 재조합 바이러스의 제조

곤충세포에 의한 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드 발현용 재조합 바이러스의 제조는 실시예 12에 기재된 방법에 준하여 조제한다.

구체적으로는 10 μ g의 pNKM 112의 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 50 μ l의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화 칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 용해액에 30단위의 Hind III를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 DNA blunting kit(다카라슈조사제)에 의해 평활 말단화 처리를 실시한 다음, 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 50 μ l의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화 칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 용해액에 20단위의 BamHI를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 아가로스 전기영동으로 분획한 다음, 1.6kb의 pNKM 112의(Hind III 평활 말단처리)-BamHI 단편을 겔로부터 절단하고 유리 파우더법에 의해 정제하고 약 0.5 μ g 회수한다.

파인젠사제 바콜로골드 스타터 키트에 함유되는 플라스미드 pVL 1392 5 μ g를 50 μ l의 트리스B 완충액에 첨가한 다음, 30단위의 EcoRI를 가하여 37℃에서 4시간동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하여 DNA 단편을 회수한다. 당해 DNA를 DNA blunting kit(다카라슈조사제)에 의해 평활 말단화 처리를 실시한 다음, 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 50 μ l의 20mM 트리스-염산(pH 8.5), 10mM 염산마그네슘, 1mM DTT, 100mM 염화 칼륨 완충액에 용해한 다음, 당해 용해액에 20단위의 BamHI를 가하여 37℃에서 2시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액은 아가로스겔 전기영동으로 분획한 다음, 9.6kb의 pVL 1393의(EcoRI 평활 말단처리)-BamHI 단편을 겔로부터 절단하고 유리 파우더법에 의해 정제하여 약 1 μ g를 회수한다.

당해 pVL 1392의(EcoRI 평활 말단처리)-BamHI 단편 100ng와 상기 pNKM 112의(Hind III 평활 말단처리)-BamHI 단편 100ng를 T4 DNA 리가제 완충액 20 μ l에 용해하여 T4 DNA 리가제 1단위를 가하고 16℃에서 18시간 동안 결합반응을 실시한다.

당해 반응에 의해 수득된 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM 109주를 형질전환하여 플라스미드 pYS 151을 얻는다(도 31).

재조합 바이러스의 제조는 1 μ g의 pYS 151을 사용하여 20ng의 선 모양 바콜로바이러스와 함께 리포펙틴법으로 Sf 21 세포에 도입하여 27℃에서 3일 동안 배양한다. 당해 배양액으로부터 재조합 바이러스를 함유하는 배양 상등액 1.0ml를 채취한다.

실시에 23: 곤충 세포에서 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

공정 1: 재조합 바이러스의 증식

Sf 21 세포 2×10^7 개를 10ml의 Sf 900-II 배지에 현탁하여 175cm^2 플라스크 (글라이너사제)에 투입하고 실온에서 1시간 동안 방치하여 세포를 플라스크에 부착시킨다.

방치한 다음, 상등액을 제거하고 당해 플라스크에 15ml의 TMN-FH 인섹트미디엄 및 실시예 22에서 취득한 재조합 바이러스를 함유하는 배양 상등액 1ml를 첨가하여 27°C 에서 3일 동안 배양한다.

배양한 다음, 상등액을 $1,500 \times g$ 에서 10분 동안 원심분리함으로써 Sf 21 세포가 제거된 재조합 바이러스 용액을 얻는다.

당해 재조합 바이러스 용액의 바이러스의 역가는 실시예 13에 기재된 방법으로 산정하고 재조합 바이러스 용액은 약 1×10^8 플라크 형성 단위(PFU)/ml의 바이러스를 함유하는 것을 알았다.

공정 2: 곤충 세포에 의한 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드의 발현

파인젠사제 바쿨로골드 스타터 키트에 첨부되어 있는 매뉴얼에 따라 하기의 순서에 따라 마우스 노화 억제 폴리펩타이드의 발현을 실시한다.

Sf 21 세포 6×10^6 개를 225cm^2 플라스크(글라이너사제)에 10% FCS를 함유하는 그레이스·인섹트·미디엄 (Grace's Insect Medium, 기브코사제) 45ml에 현탁하여 27°C 에서 3 내지 4일 동안 배양한다.

배양한 다음, 배양 상등액을 제거하고 당해 플라스크에 새롭게 30ml의 10% FCS를 함유하는 그레이스·인섹트·미디엄 및 (공정1)에서 취득한 pSY 151 유래의 재조합 바이러스를 약 1×10^8 PFU/ml의 농도로 함유하는 용액을 1ml 첨가하여 27°C 에서 1일 동안 배양한다.

배양한 다음, 상등액을 제거하고 당해 플라스크에 새롭게 Sf 900-II 배지 45 ml를 가하여 2 내지 3일 동안 배양한다.

배양한 다음, $1,500 \times g$ 에서 5분 동안 원심분리함으로써 배양 상등액을 얻는다. 당해 배양 상등액은 -20°C 에서 보존할 수 있으며 필요에 따라 해동하여 사용한다.

공정 3: 발현의 확인

실시예 21과 동일한 방법에 따라 배양 상등액 1ml를 사용하여 면역 침강을 실시한 다음, 생성물의 해석을 웨스턴법에 의해 실시한다.

결과를 도 32에 도시한다.

웨스턴법에서 항노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 특이적인 밴드가 확인된다.

상기한 점으로부터 곤충 세포를 사용하여 항노화 억제 폴리펩타이드 항체와 교차하는 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드를 현저한 양으로 발현시킬 수 있는 것을 알았다.

또한 당해 곤충세포 배양 상등액으로부터 실시예 8(1)의 방법에 준하여 마우스 분비형 노화 억제 폴리펩타이드를 취득한다.

실시예 24: 모노클로날 항체를 사용한 면역 세포 염색

실시예 11에서 제조한 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포(CHO dhfr⁻/pYT 103)를 면역 세포 염색용 완충액에 5×10^6 개/ml로 되도록 현탁하여 환자 96웰 플레이트에 $100 \mu\text{l}$ /웰 정도 나누어 주입한다.

대조로서 실시예 11에서 숙주로서 사용하는 CHO 세포(CHO dhfr⁻)를 동일하게 조작한다.

당해 플레이트를 4°C , $350 \times g$ 에서 1분 동안 원심분리한 다음, 상등액을 제거한다.

실시예 9(3)에서 취득한 항노화 억제 폴리펩타이드 모노클로날 항체 생성 하이브리도마 KM 1902주의 배양 상등액 5ml를 Mab Trap GII (파마시아바이오테크사제)를 사용하여 20배 농축하고 상기한 플레이트에 $50 \mu\text{l}$ /웰 정도 첨가하여 4°C 에서 30분 동안 방치한다.

방치한 다음, 당해 플레이트에 면역 세포 염색용 완충액을 $200 \mu\text{l}$ /웰 정도 첨가하여 4°C , $350 \times g$ 에서 1분 동안 원심분리한 다음, 상등액을 제거하고 세포의 세정을 실시한다.

당해 세정 조작을 다시 2회 실시한 다음, 당해 플레이트에 염색 버퍼로 30배희석한 FITC 표지 항래트 면역글로불린 항체(와코준야쿠사제)를 함유하는 면역 세포 염색용 완충액을 $50 \mu\text{l}$ /웰 정도 첨가하여 방냉하에서 30분 동안 차광하여 방치한다. 방치한 다음, 상기과 같은 세정 조작을 3회 실시하고 플로우 사이토미터(콜터사제)를 사용하여 해석을 한다.

결과를 도 33에 도시한다.

모노클로날 항체 KM 1902는 CHO 세포에는 반응하지 않으며 노화 억제 폴리펩타이드 발현 CHO 세포를 특이적으로 인식한다.

실시예 25: 노화 억제 폴리펩타이드의 면역 침강

면역 침강용 노화 억제 폴리펩타이드의 시료로서 실시예 11에 기재된 노화 억제 폴리펩타이드를 발현하는 CHO 세포(CHO dhfr⁻/pYT 103)를 사용한다.

컨플루언트로 될 때까지 CHO 세포를 생육시킨 6cm 살레에 PBS를 첨가하여 CHO 세포를 1회 세정한다.

당해 살레에 병냉한 완충액1을 360 μ l 첨가하여 병상에서 30분 동안 정치한 다음, 5분 간격으로 천천히 진동시켜 가용화 처리한다.

당해 처리액을 1.5ml용 원심 튜브에 회수하여 14,000rpm에서 30분 동안 원심분리한다.

수득된 상등액에 완충액1로 평형화된 프로테인G-세파로스(50%v/v) 25 μ l를 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 진탕한 다음, 5,000rpm에서 2분 동안 원심분리하여 상등액을 회수한다.

당해 상등액에 실시예 9(4)에서 취득한 정제 모노클로날 항체를 10 μ g/ml로 되도록 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 진탕한다.

당해 진탕액에 프로테인G-세파로스(50%v/v) 25 μ l를 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 진탕한 다음, 5,000rpm에서 2분 동안 원심분리한다.

수득된 침전 분획에 200 μ l의 완충액1을 첨가하여 침전을 현탁시킨다. 동일한 조작을 3번 반복하여 침전 분획을 세정한다.

당해 침전에 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동용 샘플 버퍼[6mM 트리스-염산(pH 6.8), 2% SDS, 10% 글리세롤, 5% 2-머캅토에탄올로 이루어지는 완충액] 15 μ l를 첨가하여 열 블록을 사용하여 가열한 다음, 시판하는 SDS-PAGE용 구배 겔(아토사제)을 사용하여 전기영동을 실시한다. 전기영동을 종료한 다음, 수득한 겔중의 폴리펩타이드를 PVDF막(밀리포어사제)에 전사한다.

당해 PVDF막을 사용하고 실시예 8에 준한 방법에 따라 항노화 억제 부분 단편 펩타이드 폴리클로날 항체를 사용하는 웨스턴 블로팅을 실시하고 약 140kDa의 위치에서 노화 억제 폴리펩타이드를 검출한다.

결과를 도 34에 도시한다.

모노클로날 항체 KM 1902는 노화 억제 폴리펩타이드를 면역 침강한다.

실시예 26: 마우스 유래의 노화 억제 유전자를 사용하는 조기 노화형 증상을 보이는 마우스로부터 당해 증상이 개선된 마우스의 취득

(1) 도입 노화 억제 DNA의 구축

프로모터를 함유하는 DNA 단편으로서 히트 일롱게이션 팩터 1 α 의 프로모터를 함유하는 pEF 321 CAT[참조: Gene, 91, 217(1990)]의 Hind III 단편을 이용한다. 당해 2.5kb의 Hind III 단편에는 히트 일롱게이션 팩터 1 α 의 5' 비번역 영역의 제1 엑손과 제2 엑손의 일부, 프로모터 5' 말단측에서의 Hind III 링커 및 3' 말단측에서의 EcoRI와 Hind III 링커가 존재한다.

당해 Hind III 단편의 하류에 노화 억제 유전자를 함유하는 pNKM 101의 NotI 단편(4.2kb) 및 SV40 early splicing region & polyadenylation signal의 카세트[플라스미드 pMAMneo(Clontech)의 염기번호 1551-2427]를 연결하여 도입 노화 억제 DNA로서 사용한다.

당해 도입 노화 억제 DNA의 조성법을 도 35 및 도 36에 도시한다.

구체적으로는

(i) pEF 321 CAT를 Hind III로 절단하고 수득된 2.5kb의 Hind III 단편을 DNA Blunting Kit(다카라슈조사제)를 사용하여 말단 평활화한다. 당해 평활화 단편에 DNA Ligation Kit(다카라슈조사제)를 사용하여 XbaI 링커(다카라슈조사제, 4693P)를 부가한 다음, XbaI로 절단하여 XbaI 절단 단편을 취득한다.

(ii) pMAMneo(Clontech사제)를 BamHI 및 SmaI로 절단하여 수득한 polyA 카세트를 함유하는 870bp의 BamHI/SmaI 단편을 pBluescript II SK(-)(STRATAGENE사제)의 BamHI/EcoRV 부위에 서브클로닝한다.

서브클로닝한 다음, BamHI로 절단하여 XhoI 링커(다카라슈조사제, 4694P)를 부가하고 XhoI 및 Hind III로 절단하여 polyA 카세트(양쪽 말단이 XhoI와 Hind III의 말단으로 된다)를 절단한다.

(iii) (ii)에서 수득하는 polyA 카세트를 pBluescript II SK(-)의 Hind III/ XhoI 부위에 서브클로닝하여 polyA 카세트를 함유하는 플라스미드를 취득한다.

(iv) (iii)에서 수득한 플라스미드의 XbaI 부위에 (i)에서 수득한 XbaI 절단 단편을 서브클로닝한다. 수득된 플라스미드를 이하 pEFSA라고 부른다.

(v) pNKM 101을 NotI로 절단하여 수득된 4.2kb의 NotI 단편을 평활 말단화한 다음, pBluescript II SK(-)의 EcoRV 부위에 서브클로닝한다.

서브클로닝한 다음, EcoRI 및 Hind III로 절단하고 4.2kb의 EcoRI/Hind III 단편을 절단한다.

(vi) (v)에서 수득한 단편을 pEFSA의 EcoRI/Hind III 부위에 서브클로닝하여 플라스미드 pRES를 얻는다.

당해 pRES를 NotI로 절단하여 선상화한 다음, 5.7ng/ml(약 500카피/ml)의 농도로 되도록 PBS에 용해하여 마이크로인젝션용 DNA액으로서 사용한다.

(2) 형질전환 마우스의 제조

형질전환 마우스는 통상적인 마이크로인젝션법으로 제조한다(참조: 핫세이코가쿠쥬켄매뉴얼-형질전환 마우스노츠쿠리가타, 노무라 다쓰지 감수, 가쓰키 모토야편, 고단샤 사이언티픽, 1987).

구체적으로는

(i) C57BL/6과 C3H의 F1(BCF1)의 암컷(8 내지 16주 나이)에 7단위의 셀로트로핀(데이코쿠조우키사제)를 복강내 투여한다. 투여 48시간 후에 7단위의 고티도트로핀(데이코쿠조우키사제)를 복강내 투여하여 C3H의 수컷과 교배한다.

(ii) 다음날, 교미한 암컷의 난관 팽대부로부터 수정란을 채취한다. 정립 현미경 하에서 마이크로매니퓰레이터(나루모사제)를 사용하여 (i)에서 조제한 마이크로인젝션용 DNA액을 수정란의 수컷 전핵에 주입한다.

(iii) (i)를 실시하기 전날에 정관 결찰 수컷(ICR)과 교배하여 가짜 임신을 유발하여 놓은 암컷(ICR, 8 내지 16주 나이)의 난관에 (ii)에서 조제한 수정란을 이식한다.

(iv) 이식후 20일째에 탄생한 아기 마우스의 꼬리를 4 내지 5주의 나이로 된 시점에서 절단하여 염색체 DNA를 추출하고 PCR을 사용하여 하기(3)에 기재된 방법으로 유전자형을 해석한다.

(3) 유전자형의 해석

(i) 상기에서 취득한 마우스의 꼬리에 리시스 완충액 2ml를 가하여 50℃에서 방제 방치한다.

(ii) (i)의 방치액에 등량의 페놀을 첨가하여 페놀 추출을 실시하고 이의 상등액 1ml를 PCR의 주형으로서 사용한다.

PCR의 프라이머로서 서열 25 내지 29에 기재된 5종류의 DNA를 사용한다.

서열 25 및 26에 기재된 염기 서열을 갖는 DNA는 pNKM 101의 cDNA 부분의 염기 서열로부터 합성된 것이며, 당해 cDNA가 존재하면 339bp의 단편이 증폭된다. 염색체 유래의 DNA에서는 양쪽 프라이머간에 인트론이 존재하므로 염색체 DNA 유래의 DNA 단편은 증폭되지 않는다.

서열 27에 기재된 염기 서열을 갖는 DNA는 변이형 대립 유전자(pg) 및 야생형 대립 유전자(+)에 공통되게 존재하는 부분, 서열 28에 기재된 염기 서열을 갖는 DNA는 변이형 대립유전자에게만 존재하는 부분, 서열 29에 기재된 염기 서열을 갖는 DNA는 야생형 대립 유전자에만 존재하는 부분으로부터 합성한다.

따라서 pg/pg에서는 서열 27에 기재된 염기 서열을 갖는 DNA와 서열 28에 기재된 염기 서열을 갖는 DNA 간에 증폭되는 920bp의 단편이, +/+에서는 서열 27에 기재된 염기 서열을 갖는 DNA와 서열 29에 기재된 염기 서열을 갖는 DNA 간에 증폭되는 458bp의 단편이 생기며, pg/+에서는 이의 양쪽이 생긴다.

LA PCR 키트(다카라슈조사제)를 사용하고 전체 50μl의 시스템[1 x LA PCR 완충액 II(Mg plus), dNTP의 각 성분의 각각 400mM을 함유하는 혼합액, 프라이머 각각 0.2mM, TaKaRa LA Taq 2.5U]에서 하기 조건하에 PCR을 실시한다.

즉, TaKaRa PCR Thermal Cycler 480을 사용하고 94℃에서 1.5분 동안 가열한 다음, 94℃에서 30초 동안, 56℃에서 30초 동안, 72℃에서 1.5분 동안의 공정을 1 사이클로 하여 30사이클을 실시한 다음, 72℃에서 10분 동안 가열한다.

(4) 형질전환 마우스와 pg/+를 나타내는 마우스의 교배

(2)에서 취득한 새끼 마우스 161마리를 (3)의 방법으로 스크리닝한 바, 37마리가 노화 억제 유전자를 갖는 형질전환 마우스이다.

당해 형질전환 마우스를 pg/+를 나타내는 마우스와 교배하여 F1에서 pg/+의 유전자형으로 노화 억제 유전자를 갖는 형질전환 마우스를 얻는다.

당해 F1에 노화 억제 유전자를 전달할 수 있는 것은 31계통이다.

노화 억제 유전자를 갖는 pg/+끼리 또는 pg/+와 노화 억제 유전자를 갖는 pg/+를 교배하여 F2에서 3계통의 노화 억제 유전자를 갖는 pg/pg를 취득한다.

결과를 표 1 및 표 2에 기재한다.

[표 1]

개체 번호	성별	유전자형	노화 억제 유전자	표현형 ^{*1}
1	수컷	pg/+	-	-
2	수컷	+/+	-	-
3	수컷	pg/+	-	-
4	수컷	pg/+	-	-
5	암컷	+/+	+	-
6	수컷	pg/pg	+	- ^{*2}
7	수컷	pg/+	+	-
8	수컷	pg/pg	+	- ^{*2}

9	수컷	pg/pg	+	- ^{*2}
10	암컷	pg/+	+	-
11	암컷	pg/+	+	-
12	암컷	pg/pg	-	+

*¹: 조기 노화형 증상을 나타내는 경우를 +, 나타내지 않는 경우를 -로 표기한다.

*²: 조기 노화형 증상이 해소된 마우스.

[표 2]

개체번호	성별	유전자형	노화 억제 유전자	표현형 ^{*1}
13	수컷	+/+	+	-
14	수컷	+/+	+	-
15	암컷	pg/+	+	-
16	암컷	+/+	+	-
17	수컷	pg/pg	+	- ^{*2}
18	암컷	pg/+	-	-

*¹: 조기 노화형 증상을 나타내는 경우를 +, 나타내지 않는 경우를 -로 표기한다.

*²: 조기 노화형 증상이 해소된 마우스.

조기 노화형 증상을 나타내고 있는 pg/pg 마우스가 노화 억제 유전자를 가짐으로써 당해 증상을 나타내지 않는 것으로 확인된다.

따라서 당해 유전자가 조기 노화 마우스에서 조로 증상의 원인 유전자인 것이 명백하게 되는 동시에 조기 노화형 증상을 보이는 개체에서 당해 유전자를 발현시킴으로써 조기 노화 증상이 억제되는 것으로 나타난다.

실시에 27: 마우스 유래의 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 아데노바이러스를 사용하는 조기 노화형 증상을 보이는 마우스로부터 당해 증상이 개선된 마우스의 취득

마우스 유래 노화 억제 유전자를 함유하는 재조합 아데노바이러스의 제조는 기본적으로는 미야케 등의 방법[참조: Proc. Natl Acad. Sci. USA., 93, 1320 (1996)]에 따른다.

구체적으로는 마우스 유래 노화 억제 유전자를 함유하는 플라스미드 pNKM 101을 NotI 및 XbaI로 절단하여 수득된 당해 유전자를 함유하는 3.1kb 단편을 DNA Blunting kit(다카라슈조사제)에 의해 양쪽 말단을 평활화한다.

당해 단편 3μg과 E3, E1A, E1B 영역을 결실한 5형 아데노바이러스 게놈 및 사이토메갈로바이러스 인핸서, 치킨 β 액틴 프로모터의 키메라 프로모터(CAG 프로모터)를 함유하는 코스미드 pAxCAwt[참조: 가네가에 등 Nuc1. Acids. Res., 23 3816 (1995)]의 SmaI 단편 1μg을 T4 DNA 리가제 완충액 20μl에 용해하여 당해 용액에 T4 DNA 리가제를 1단위 가하고 16℃에서 18시간 동안 결합반응을 한다.

당해 리가제 반응액 및 Gigapack II XL Packaging Extract(Stratagene사제)를 사용하여 in vitro packaging을 실시하여 수득된 파지를 대장균 DH5α에서 감염시키고 재조합 코스미드를 취득한다.

또한 재조합 코스미드에서 마우스 유래 노화 억제 유전자의 프로모터에 대한 방향의 확인은 코스미드를 BamHI로 절단한 다음, 1.6kb의 단편을 검출함으로써 실시한다.

이와 같이 하여 수득되는 코스미드 8μg과 EcoT 22I에 의해 절단된 E3, E 1A, E1B를 결손한 5형 아데노바이러스 Ad5d IX DNA[참조: J.Virology., 54, 711(1985)] 1μg을 혼합하고 CellPfect Transfection Kit(Pharmacia Biotech사제)를 사용하여 6cm 살레에 인산칼슘법으로 293세포로 형질감염을 실시한다.

이후에 가네가에 등의 방법[참조: 바이오매뉴얼 시리즈, 4, 43 - 58, 요도사(1994)]에 따라 재조합 바이러스를 취득한다.

당해 재조합 바이러스를 가네가에 등의 방법[참조: Jpn. J. Med. Sci. Biol., 47, 157 (1994)]에 따라 2회의 염화세슘 밀도 구배에 의해 정제하며 10% 글리세롤을 함유하는 PBS에 현탁한 다음, -80℃에서 보존하여 적절하게 사용한다.

당해 재조합 바이러스 용액의 바이러스의 역가는 가네가에 등의 방법[참조: Jpn. J. Med. Sci. Biol., 47, 157 (1994)]에 따라 산정한 바, 1×10^{10} pfu/ml의 바이러스를 함유하는 것을 알았다.

이와 같이 하여 수득하는 재조합 바이러스 5×10^8 pfu를 3 내지 4주 나이의 조기 노화형 증상을 보이는 마우스의 꼬리 정맥에 접종하고 그 경과를 관찰한다.

결과를 도 37에 도시한다.

당해 바이러스를 접종한 마우스에서 체중 증가 및 연명이 확인되고 조기 노화형 증상의 해소를 볼 수 있다.

실시에 28: 대장균에 의한 사람 노화 억제 폴리펩타이드 N 말단 영역 발현용 플라스미드 pYS 201의 구축

실시에 6에서 제조한 pSupex의 (KpnI 평활 말단화 처리)-EcoRV 단편과 실시에 5에 기재된 pNKM 103의 사람 유래 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하는 SacII의 623bp 단편을 연결함으로써 사람 노화 억제 폴리펩타이드 N 말단영역 발현 벡터 pYS 201의 구축을 아래와 같이 실시한다(도 38).

실시에 5에서 취득한 pNKM 103 10 µg를 30 µl의 33mM 트리스-아세트산(pH 7.9), 10mM 아세트산마그네슘, 66mM 아세트산칼륨, 0.01% BSA 및 0.5mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 다음, 당해 완충액에 20단위의 SacII를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다. 당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 DNA 단편을 회수하여 DNA blunting kit(다카라슈조사제)에 의해 평활 말단화 처리를 한다.

당해 반응액중의 상기 처리한 DNA 단편을 아가로스겔 전기영동을 사용하여 분획하고 서열 1에 기재된 노화 억제 폴리펩타이드의 Gly⁵⁵ 내지 Pro²⁶¹의 아미노산 잔기를 함유하는 단편을 암호화하는 DNA를 함유하는 약 0.6kb의 pNKM 103의 평활화 처리 SacII 단편을 약 0.3 µg 회수한다.

실시에 6, 공정 5에서 수득한 대장균용 발현 벡터 pSupex 3 µg를 30 µl의 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 다음, 당해 완충액에 10단위의 KpnI를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다. 당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 DNA 단편을 회수하여 DNA blunting kit(다카라슈조사제)에 의해 평활 말단화 처리를 한다.

다시 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 당해 DNA를 30 µl의 50mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘, 100mM 염화나트륨 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 다음, 당해 완충액에 10단위의 EcoRV를 가하여 37°C에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액중의 상기 처리 DNA 단편을 아가로스겔 전기영동을 사용하여 분획하고 약 3.8kb의 pSupex의 (평활화 처리 KpnI)-EcoRV 처리 단편을 약 2 µg 회수한다.

수득한 단편을 44 µl의 H₂O에 용해시킨 다음, 5 µl의 0.5M 트리스-염산(pH 8.5), 1mM EDTA 및 1유니트의 알칼리포스파타제(베링거 만하임사제)를 첨가하여 37°C에서 30분 동안 정치한다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하고 DNA 단편을 회수한다.

상기한 pNKM 103의 평활화 처리 SacII 단편 50ng 및 pSupex의 알칼리포스파타제 처리를 실시한 (평활화 처리 KpnI)-EcoRV 처리 단편 100ng를 20 µl의 T4 DNA 리가제 완충액에 용해한 다음, T4 DNA 리가제(다카라슈조사제) 100단위를 가하여 16°C에서 18시간 동안 결합반응을 실시한다.

당해 반응에 따라 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM 109주를 형질전환하고 플라스미드 pYS 201을 얻는다(도 38).

실시에 29: 대장균에서의 사람 유래 노화 억제 폴리펩타이드 N 말단 영역의 발현

실시에 28에서 취득한 pYS 201을 대장균 NY 49주에 도입한다. 당해 균주를 실시에 7에 기재된 방법과 동일하게 하여 사람 유래 노화 억제 폴리펩타이드 N 말단영역의 발현을 실시한다.

즉, 75 µg/ml 암피실린 및 2mg/ml 카자미노산을 첨가한 400ml의 M9 최소 배지(Molecular Cloning, A laboratory manual에 기재된 배지) 속에서 상기한 균주를 37°C에서 2시간 동안 배양한 다음, 50 µg/ml의 인돌 아크릴산을 첨가하고 다시 37°C에서 18시간 동안 배양한다.

수득한 배양액 400ml를 3,000 x g에서 15분 동안 원심분리하여 대장균을 함유하는 침전을 7ml의 완충액 1[10mM Tris-염산(pH 8.0), 1mM EDTA, 150mM 염화나트륨으로 이루어지는 완충액] 중에 현탁하고 초음파 처리함으로써 균체를 파괴한다.

당해 처리액을 10,000 x g에서 30분 동안 원심분리하여 수득하는 침전을 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동용 샘플 버퍼[6mM 트리스-염산(pH 6.8), 2% SDS, 10% 글리세롤, 5% 2-머캅토에탄올로 이루어지는 완충액]에 용해한다.

당해 용액을 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동을 사용하여 분획하고 당해 겔을 쿠마시브릴리언트블루로 염색한다.

결과를 도 39에 나타낸다.

분자량 약 26kD의 사람 유래 노화 억제 폴리펩타이드 N 말단 영역(이하, 펩타이드 SUHN이라고 부른다)의 생성이 확인된다. 당해 전기영동에서 분자량 마커로서 phosphorylase b (94,000), 소 혈청 알부민 (67,000), ovalbumin(43,000), carbonic anhydrase(30,000), soybean trypsin inhibitor(20,000), lysozyme(14,400)을 사용한다.

실시에 30: 사람 노화 억제 폴리펩타이드 C 말단 영역 발현 벡터 pYS 202의 구축

실시에 28에서 제조한 pSupex의 (KpnI 평활 말단화 처리)-EcoRV 단편과 실시에 5에 기재된 pNKM 103의 사

람 유래 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA를 함유하는 KpnI-ApaI의 467bp 단편을 연결함으로써 사람 노화 억제 폴리펩타이드 C 말단 영역 발현 벡터 pYS 202의 구축을 아래와 같이 실시한다(도 40).

실시에 5에서 취득한 pNKM 103 10 µg을 30 µl의 10mM 트리스-염산(pH 7.5), 10mM 염화마그네슘 및 1mM DTT로 이루어지는 완충액에 첨가한 다음, 당해 완충액에 20단위의 ApaI와 KpnI를 가하여 37℃에서 4시간 동안 반응시킨다.

당해 반응액을 사용하여 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전을 실시하여 DNA 단편을 회수하고 DNA blunting kit(다카라슈조사제)에 의해 평활 말단화 처리를 실시한다.

당해 반응액중의 상기에서 처리된 DNA 단편을 아가로스겔 전기영동을 사용하여 분획하고 서열 1에 기재된 노화 억제 폴리펩타이드의 Phe⁸⁰¹ 내지 Pro⁹⁵⁴의 아미노산 잔기를 함유하는 단편을 암호화하는 DNA를 함유하는 약 0.5kb의 pNKM 103의 평활화 처리 ApaI-KpnI 단편을 약 0.3 µg 회수한다.

상기한 pNKM 103가 평활화 처리 ApaI-KpnI 단편 50ng 및 실시에 28에 기재된 pSupex의 알칼리포스파타제 처리를 실시한(평활화 처리 KpnI)-EcoRV 처리 단편 100ng를 20 µl의 T4 DNA 리가제 완충액에 용해한 다음, T4 DNA 리가제(다카라슈조사제) 100단위를 가하여 16℃에서 18시간 동안 결합반응을 실시한다.

당해 반응에 따라 수득한 재조합 플라스미드 DNA를 사용하여 대장균 JM 109주를 형질전환하고 플라스미드 pYS 202를 얻는다(도 40).

실시에 31: 대장균에서의 사람 유래 노화 억제 폴리펩타이드 C 말단 영역의 발현

실시에 30에서 취득한 pYS 202를 대장균 NY49주에 도입한다. 당해 균주를 실시에 7에 기재된 방법과 동일하게 하여 사람 유래 노화 억제 부분 단편 폴리펩타이드 C 말단 영역의 발현을 실시한다.

즉, 75 µg/ml 암피실린 및 2mg/ml 카자미노산을 첨가한 400ml의 M9 최소 배지 중에서 상기 균주를 37℃에서 2시간 동안 배양한 다음, 50 µg/ml의 인돌 아크릴산을 첨가하고 다시 37℃에서 18시간 동안 배양한다.

수득한 배양액 400ml를 3,000 x g에서 15분 동안 원심분리하여 대장균을 함유하는 침전을 7ml의 완충액 1 중에서 현탁하고 초음파 처리함으로써 균체를 파괴한다.

당해 처리액을 10,000 x g에서 30분 동안 원심분리하여 수득된 침전을 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동용 샘플 버퍼에 용해한다. 당해 용액을 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동으로 분획하여 당해 겔을 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색한다.

결과를 도 41에 나타낸다.

분자량 약 18kD의 사람 유래 노화 억제 폴리펩타이드 C 말단 영역(이하, 펩타이드 SUHC라고 부른다)의 생성이 확인된다. 당해 전기영동에서 실시에 29에서 사용된 분자량 마커와 동일한 것을 사용한다.

실시에 32: 사람 노화 억제 폴리펩타이드 부분 단편과 반응하는 모노클로날 항체의 생성

실시에 29 및 실시에 31에서 대장균을 숙주로 하여 생성된 펩타이드 SUHN 및 펩타이드 SUHC를 실시에 8과 동일하게 정제한다.

정제된 펩타이드 SUHN 및 펩타이드 SUHC의 분자량은 각각 약 26kD, 약 18kD 이다.

실시에 8에 기재된 방법에 준하여 래트를 면역하여 실시에 9와 동일하게 모노클로날 항체를 제조한다.

표 3에 제조된 모노클로날 항체의 일람을 기재한다.

하이브리도마 KM 2070주, KM 2076주, KM 2105주, KM 2116주, KM 2119주는 각각 FERM BP-6196, FERM BP-6197, FERM BP-6198, FERM BP-6199, FERM BP-6200으로서 평성 9년 12월 9일자로 공업기술원생명공학공업기술연구소, 일본국 이바라키켄 츠쿠바시 히가시 1초메 1번 3고(우편번호 305)에 기탁되어 있다.

[표 3]

면역원	모노클로날 항체	동물종	아부류
사람 N말단영역(SUHN)	KM2070	래트	IgM
사람 N말단영역(SUHN)	KM2076	래트	IgG2a
사람 막외 C 말단 영역(SUHN)	KM2105	래트	IgG1
사람 막외 C 말단 영역(SUHN)	KM2116	래트	IgG2b
사람 막외 C 말단 영역(SUHN)	KM2119	래트	IgG2B

실시에 33: 사람 노화 억제 폴리펩타이드 부분 단편과 반응하는 모노클로날 항체를 사용하는 노화 억제 폴리펩타이드의 검출

(1) CHO 발현 마우스 완전 길이 단백질 및 마우스 조직의 웨스턴 블롯

야생형 ICR 마우스의 신장, 간, 호모형 ICR 마우스(노화 마우스)의 신장, 간을 호모게나이징용 완충액 [20mM Tris-염산(pH 7.5), 0.25M Sucrose, 1mM EDTA, 10 mM EGTA, 10mM 2-mercaptoethanol] 속에서 분쇄하여 초원심분리(100,000 x g, 4℃, 1시간)를 실시하고 막 분획(침전)과 세포질 분획(상등액)으로 나누어

회수한다.

수득된 막 분획을 용해용 완충액[1% Triton-X100, 20mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl]에 용해시킨다. 또한 실시예 11에 기재된 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포를 PBS로 세정한 다음, 용해용 완충액으로 가용화한다. 각 조직의 막분획과 세포질 분획(20 µg) 및 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포 용해질(2 µg) 및 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포의 배양 상등액(15 µl)을 사용하여 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동을 실시하고 겔로부터 PVDF막에 단백질을 전사한다.

전사후에 5% 스킴 밀크를 함유하는 PBS-Tween 속에서 20분 동안 블로킹을 실시하고 KM 2076, KM 2116, KM 2119의 각 하이브리도마 배양 상등액과 각각 실온에서 1시간 동안 반응시킨다. PBS-Tween에서 1시간 동안 세정한 다음, 제2 항체로서 퍼옥시다제 표지 항래트 면역글로불린 항체(아머삼사, 4000배 희석)를 실온에서 30분 동안 반응시킨다.

반응후에 PBS-Tween에서 1시간 동안 세정한 다음, ECL 웨스턴 블로팅 검출시약(아머삼사)을 반응시켜 X 선 필름에 감광시키고 밴드를 검출한다.

결과를 도 42 및 도 43에 도시한다.

KM 2076은 신장 막 분획에서 야생형 특이적으로 약 130kDa의 밴드를 인식한다. 이러한 약 130kDa의 밴드는 아미노산 서열로부터 추정되는 분자량에 가까우며 CHO 세포에서 발현되는 마우스 막형 완전 길이 단백질의 크기와 거의 일치하므로 막형 완전 길이 단백질이라고 생각된다. 또한 KM 2076은 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포의 배양 상등액 중에 약 70kDa의 밴드를 인식한다.

KM 2119는 신장 막 분획에서 야생형 특이적으로 약 130kDa의 막형 완전 길이의 밴드와 약 60kDa의 밴드를 인식한다. 약 60kDa의 밴드는 KM 2076(사람 N 말단인식 항체)에서는 검출되지 않으며 KM 2119(사람 C 말단 인식 항체)에서만 검출되므로 완전 길이 단백질의 N 말단측이 절단되어 잔류하는 C 말단측 단편이라고 생각된다. 그리고 KM 2076이 인식하는 마우스 막형 완전 길이 발현 CHO 세포의 배양 상등액 중의 약 70kDa의 밴드는 N 말단측의 절단 단편이라고 생각된다. 또한 KM 2119는 신장 및 간의 세포질 분획에 야생형·호모형이 함께 반응하는 비특이적인 약 66kDa의 밴드를 인식한다. 한편, KM 2116은 신장 막 분획에 야생형 특이적으로 완전 길이 단백질을 인식하지만 약 70kDa의 비특이적인 밴드도 검출된다.

(2) CHO 발현 마우스 완전 길이 단백질 및 CHO 발현 사람 분비형 단백질의 면역 침강

실시에 11에 기재된 마우스 막형 완전 길이 단백질 발현 CHO 세포 및 CHO 세

포를 용해용 완충액[1% Triton-X100, 20mM Tris-염산(pH 7.5), 150mM NaCl]으로 가용화한다. 이러한 용액을 200 µl에 면역 침강용 완충액[20mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl] 800 µl를 가하여 전량을 1ml로 하고 Protein G-Sepharose 4FF(파마시아사) 25 µl를 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 원심분리(10000 x g, 4℃, 5분)에 의해 상등액을 회수하고 KM 2076 또는 KM 2119 정제 항체 1 µg를 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 다시 Protein G-sepharose 4FF를 25 µl 첨가하여 4℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 또한 실시예 17에 기재된 사람 분비형 단백질 발현 CHO 세포의 배양 상등액 1ml를 Protein G-sepharose에 KM 2076을 미리 결합시킨 것과 동일하게 4℃에서 1시간 동안 반응시킨다. 이들 반응물을 면역 침강용 완충액으로 세정한 다음, 원심분리(10,000 x g, 4℃, 5분)에 의해 침전물을 회수하여 SDS-폴리아크릴아미드겔 전기영동으로 분리한 후에 겔로부터 PVDF 막에 단백질을 전사한다. 5% 스킴 밀크를 함유하는 PBS-Tween 속에서 20분 동안 블로킹을 실시하고 KM 2076, KM 2119를 사용하여 웨스턴 블로팅을 한다. 그 결과 도 44에 도시된 바와 같이 KM 2076을 사용하는 면역 침강에 의해 막형 완전 길이 단백질이 회수되어 KM 2119를 사용한 면역 침강에서는 막형 완전 길이 단백질과 C 말단측 단편 단백질이 회수된다. 도 45에 도시된 바와 같이 사람 분비형 단백질도 KM 2076을 사용하는 면역 침강에 의해 동일하게 회수된다.

(3) 사람 조직 절편을 사용하는 면역 조직 염색

사람 신장 2검체, 사람 간 2검체의 포르말린 고정 파라핀 포위 매몰 조직을 4 mm로 얇게 절단하여 슬라이드 유리 위에 고정한다. 크실렌으로 탈파라핀한 후에 알콜-물로 단계적으로 친수화한 다음, 1% 과산화수소수를 함유하는 메탄올 속에서 15분 동안 처리하여 내재성 퍼옥시다제를 블로킹한다. 절편을 PBS에서 세정한 다음, 희석한 정상적인 말 혈청 속에서 20분 동안 블로킹하여 KM 2070, KM 2116(10mg/ml)을 각각 실온에서 30분 동안 반응시킨다. 잘 세정한 다음, 제2항체로서 바이오틴 표지 항래트 면역글로불린 항체(벡터사, 200배 희석)를 실온에서 30분 동안 반응시켜 세정한 다음, ABC 래디언트(벡터사제)를 실온에서 30분 동안 반응시킨다. PBS에서 세정한 다음, 디아미노벤지딘 기질 용액[디아미노벤지딘 50mg을 150ml의 0.1 M 트리스-염산 완충액(pH 7.2)에 용해한 다음, 여과하여 과산화수소 50ml를 가한다] 속에서 약 1분 동안 발색시키고 빙냉중에 반응을 정지시킨다. 헤마토크실렌으로 핵 염색하여 알콜-물 및 크실렌으로 탈수한 다음, 엔테란뉴로 밀봉하여 현미경으로 본다. 그 결과 표 4에 기재된 바와 같이 KM 2070은 사람 신장의 신장 세뇨관 및 혈관 평활근에 반응하지만 KM 2116은 사람 신장의 원위치 세뇨관에 특이적으로 반응한다. 사람 간에 대해서는 KM 2070, KM 2116이 함께 간세포에 반응한다. KM 2116에 의한 웨스턴 블로팅으로 야생형 ICR 마우스 신장의 막 분획에서 검출되며 호모형 마우스(노화 마우스)의 신장의 막 분획에서는 검출되지 않는 밴드가 있는 도 43으로부터도 KM 2116이 사람의 병리 절편의 해석에 유용한 것으로 나타난다.

(4) 마우스 조직 절편을 사용하는 면역 조직 염색

야생형 ICR 마우스의 신장, 간 각각의 2검체, 호모형 ICR 마우스(노화 마우스)의 신장, 간 각각의 2검체의 포르말린 고정 파라핀 포위 매몰 조직을 4mm로 얇게 절단하여 슬라이드 유리 위에 고정한다. KM 2070,

KM 2105(10mg/ml)에 대해서 (1)의 KM 2070 및 KM 2116과 동일하게 면역조직 염색을 한다. 그 결과 표 4에 기재된 바와 같이 KM 2070, KM 2105는 야생형 특이적으로 신장 세뇨관에서 반응한다. 그러나 KM 2070은 야생형·호모형 모두 혈관 평활근에서 반응한다. 또한 KM 2070, KM 2105는 야생형·호모형 양쪽의 간세포에서 반응한다.

[표 4]

모노클로날 항체	KM2070	KM2105	KM2116
사람 신장	요세관, 혈관평활근	-	원위요세관
사람 간장	간세포	-	간세포
야생형 마우스 신장	요세관, 혈관평활근	요세관	-
야생형 마우스 간장	간세포	간세포	-
호모형 마우스 신장	혈관평활근	-	-
호모형 마우스 간장	간세포	간세포	-

산업상이용가능성

본 발명에 따르면 노화를 억제하는 활성을 갖는 폴리펩타이드, 당해 폴리펩타이드를 함유하는 조기 노화증 치료제, 성인병 치료제 또는 노화 억제제, 당해 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA, 당해 DNA를 함유하는 조기 노화증 치료제, 성인병 치료제 또는 노화 억제제, 당해 DNA를 사용하는 가축의 개량법, 당해 DNA를 벡터에 삽입하여 수득되는 재조합체 DNA, 당해 재조합체를 함유하는 형질전환체, 당해 형질전환체를 사용하는 본 발명의 폴리펩타이드의 생성법, 당해 폴리펩타이드를 인식하는 항체, 당해 항체를 사용하는 본 발명의 폴리펩타이드의 정량법 또는 노화 진단법, 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 리간드의 탐색 방법, 당해 리간드, 본 발명의 폴리펩타이드와 리간드의 특이적인 결합을 억제하는 화합물의 스크리닝 방법, 당해 스크리닝 방법에 따라 수득하는 화합물, 본 발명의 노화 억제 폴리펩타이드를 암호화하는 노화 억제 유전자의 발현을 증가시키는 화합물의 스크리닝 방법 및 당해 스크리닝 방법에 따라 수득하는 화합물을 제공할 수 있다.

서열 목록

서열: 1

서열의 길이: 1,012

서열형: 아미노산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 펩타이드

기원:

생물명: 사람

장기: 신장

서열 1

Met	Pro	Ala	Ser	Ala	Pro	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser
1				5					10					15	
Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Gly	Arg	Arg	Leu	Arg
			20					25						30	
Ala	Glu	Pro	Gly	Asp	Gly	Ala	Gln	Thr	Trp	Ala	Arg	Phe	Ser	Arg	Pro
		35					40					45			
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Leu	Phe	Gln	Gly	Thr	Phe	Pro	Asp	Gly
	50					55					60				
Phe	Leu	Trp	Ala	Val	Gly	Ser	Ala	Ala	Tyr	Gln	Thr	Glu	Gly	Gly	Trp
65				70						75				80	
Gln	Gln	His	Gly	Lys	Gly	Ala	Ser	Ile	Trp	Asp	Thr	Phe	Thr	His	His
			85					90					95		
Pro	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Arg	Asn	Ala	Ser	Leu	Pro	Leu	Gly
		100						105					110		

Ala Pro Ser Pro Leu Gln Pro Ala Thr Gly Asp Val Ala Ser Asp Ser			
115	120	125	
Tyr Asn Asn Val Phe Arg Asp Thr Glu Ala Leu Arg Glu Leu Gly Val			
130	135	140	
Thr His Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly			
145	150	155	160
Ser Ala Gly Val Pro Asn Arg Glu Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg Arg Leu			
165	170	175	
Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Gly Val Gln Pro Val Val Thr Leu Tyr			
180	185	190	
His Trp Asp Leu Pro Gln Arg Leu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly Trp Ala			
195	200	205	
Asn Arg Ala Leu Ala Asp His Phe Arg Asp Tyr Ala Glu Leu Cys Phe			
210	215	220	
Arg His Phe Gly Gly Gln Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Asp Asn Pro			
225	230	235	240
Tyr Val Val Ala Trp His Gly Tyr Ala Thr Gly Arg Leu Ala Pro Gly			
245	250	255	
Ile Arg Gly Ser Pro Arg Leu Gly Tyr Leu Val Ala His Asn Leu Leu			
260	265	270	
Leu Ala His Ala Lys Val Trp His Leu Tyr Asn Thr Ser Phe Arg Pro			
275	280	285	
Thr Gln Gly Gly Gln Val Ser Ile Ala Leu Ser Ser His Trp Ile Asn			
290	295	300	
Pro Arg Arg Met Thr Asp His Ser Ile Lys Glu Cys Gln Lys Ser Leu			
305	310	315	320

Asp Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys Pro Val Phe Ile Asp Gly Asp			
	325	330	335
Tyr Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Ile Leu Pro Asp Phe			
	340	345	350
Thr Glu Ser Glu Lys Lys Phe Ile Lys Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala			
	355	360	365
Leu Cys Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro His Met			
	370	375	380
Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu Ser Trp			
385	390	395	400
Ile Asp Leu Glu Phe Asn His Pro Gln Ile Phe Ile Val Glu Asn Gly			
	405	410	415
Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr Met Tyr			
	420	425	430
Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Lys Leu Asp			
	435	440	445
Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp Gly Phe			
	450	455	460
Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp			
465	470	475	480
Phe Leu Ser Gln Asp Lys Met Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala Leu Phe			
	485	490	495
Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro Glu Asn			
	500	505	510
Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly Val Val			
	515	520	525

Asp Asn Tyr Ile Gln Val	Asp Thr Thr Leu Ser Gln Phe Thr Asp Leu
530	535 540
Asn Val Tyr Leu Trp Asp Val His His Ser Lys Arg Leu Ile Lys Val	
545	550 555 560
Asp Gly Val Val Thr Lys Lys Arg Lys Ser Tyr Cys Val Asp Phe Ala	
565	570 575
Ala Ile Gln Pro Gln Ile Ala Leu Leu Gln Glu Met His Val Thr His	
580	585 590
Phe Arg Phe Ser Leu Asp Trp Ala Leu Ile Leu Pro Leu Gly Asn Gln	
595	600 605
Ser Gln Val Asn His Thr Ile Leu Gln Tyr Tyr Arg Cys Met Ala Ser	
610	615 620
Glu Leu Val Arg Val Asn Ile Thr Pro Val Val Ala Leu Trp Gln Pro	
625	630 635 640
Met Ala Pro Asn Gln Gly Leu Pro Arg Leu Leu Ala Arg Gln Gly Ala	
645	650 655
Trp Glu Asn Pro Tyr Thr Ala Leu Ala Phe Ala Glu Tyr Ala Arg Leu	
660	665 670
Cys Phe Gln Glu Leu Gly His His Val Lys Leu Trp Ile Thr Met Asn	
675	680 685
Glu Pro Tyr Thr Arg Asn Met Thr Tyr Ser Ala Gly His Asn Leu Leu	
690	695 700
Lys Ala His Ala Leu Ala Trp His Val Tyr Asn Glu Lys Phe Arg His	
705	710 715 720
Ala Gln Asn Gly Lys Ile Ser Ile Ala Leu Gln Ala Asp Trp Ile Glu	
725	730 735

Pro Ala Cys Pro Phe Ser Gln Lys Asp Lys Glu Val Ala Glu Arg Val
 740 745 750
 Leu Glu Phe Asp Ile Gly Trp Leu Ala Glu Pro Ile Phe Gly Ser Gly
 755 760 765
 Asp Tyr Pro Trp Val Met Arg Asp Trp Leu Asn Gln Arg Asn Asn Phe
 770 775 780
 Leu Leu Pro Tyr Phe Thr Glu Asp Glu Lys Lys Leu Ile Gln Gly Thr
 785 790 795 800
 Phe Asp Phe Leu Ala Leu Ser His Tyr Thr Thr Ile Leu Val Asp Ser
 805 810 815
 Glu Lys Glu Asp Pro Ile Lys Tyr Asn Asp Tyr Leu Glu Val Gln Glu
 820 825 830
 Met Thr Asp Ile Thr Trp Leu Asn Ser Pro Ser Gln Val Ala Val Val
 835 840 845
 Pro Trp Gly Leu Arg Lys Val Leu Asn Trp Leu Lys Phe Lys Tyr Gly
 850 855 860
 Asp Leu Pro Met Tyr Ile Ile Ser Asn Gly Ile Asp Asp Gly Leu His
 865 870 875 880
 Ala Glu Asp Asp Gln Leu Arg Val Tyr Tyr Met Gln Asn Tyr Ile Asn
 885 890 895
 Glu Ala Leu Lys Ala His Ile Leu Asp Gly Ile Asn Leu Cys Gly Tyr
 900 905 910
 Phe Ala Tyr Ser Phe Asn Asp Arg Thr Ala Pro Arg Phe Gly Leu Tyr
 915 920 925
 Arg Tyr Ala Ala Asp Gln Phe Glu Pro Lys Ala Ser Met Lys His Tyr
 930 935 940

 Arg Lys Ile Ile Asp Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Glu Thr Leu Glu
 945 950 955 960
 Arg Phe Cys Pro Glu Glu Phe Thr Val Cys Thr Glu Cys Ser Phe Phe
 965 970 975
 His Thr Arg Lys Ser Leu Leu Ala Phe Ile Ala Phe Leu Phe Phe Ala
 980 985 990
 Ser Ile Ile Ser Leu Ser Leu Ile Phe Tyr Tyr Ser Lys Lys Gly Arg
 995 1000 1005
 Arg Ser Tyr Lys
 1010

서열: 2

서열의 길이: 549

서열 형: 아미노산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 단백질

기원:

생물명: 사람

장기: 신장

서열 2

```

Met Pro Ala Ser Ala Pro Pro Arg Arg Pro Arg Pro Pro Pro Pro Ser
 1           5           10           15
Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Leu Gly Gly Arg Arg Leu Arg
      20           25           30
Ala Glu Pro Gly Asp Gly Ala Gln Thr Trp Ala Arg Phe Ser Arg Pro

```

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

	245	250	255
Ile Arg Gly Ser Pro Arg Leu Gly Tyr Leu Val Ala His Asn Leu Leu			
	260	265	270
Leu Ala His Ala Lys Val Trp His Leu Tyr Asn Thr Ser Phe Arg Pro			
	275	280	285
Thr Gln Gly Gly Gln Val Ser Ile Ala Leu Ser Ser His Trp Ile Asn			
	290	295	300
Pro Arg Arg Met Thr Asp His Ser Ile Lys Glu Cys Gln Lys Ser Leu			
305	310	315	320
Asp Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys Pro Val Phe Ile Asp Gly Asp			
	325	330	335
Tyr Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Ile Leu Pro Asp Phe			
	340	345	350
Thr Glu Ser Glu Lys Lys Phe Ile Lys Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala			
	355	360	365
Leu Cys Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro His Met			
	370	375	380
Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu Ser Trp			
385	390	395	400
Ile Asp Leu Glu Phe Asn His Pro Gln Ile Phe Ile Val Glu Asn Gly			
	405	410	415
Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr Met Tyr			
	420	425	430
Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Lys Leu Asp			
	435	440	445
Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp Gly Phe			

450 455 460
 Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp
 465 470 475 480
 Phe Leu Ser Gln Asp Lys Met Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala Leu Phe
 485 490 495
 Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro Glu Asn
 500 505 510
 Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly Val Val
 515 520 525
 Asp Asn Tyr Ile Gln Val Ser Gln Leu Thr Lys Pro Ile Ser Ser Leu
 530 535 540
 Thr Lys Pro Tyr His
 545

서열: 3

서열의 길이: 1,014

서열 형: 아미노산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 단백질

기원:

생물명: 마우스

장기: 신장

서열 3

Met Leu Ala Arg Ala Pro Pro Arg Arg Pro Pro Arg Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg Leu Leu Leu Leu His Leu Leu Leu Leu Ala Leu Arg Ala Arg Cys
 20 25 30
 Leu Ser Ala Glu Pro Gly Gln Gly Ala Gln Thr Trp Ala Arg Phe Ala
 35 40 45
 Arg Ala Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Leu Leu His Asp Thr Phe Pro
 50 55 60
 Asp Gly Phe Leu Trp Ala Val Gly Ser Ala Ala Tyr Gln Thr Glu Gly
 65 70 75 80
 Gly Trp Arg Gln His Gly Lys Gly Ala Ser Ile Trp Asp Thr Phe Thr
 85 90 95
 His His Ser Gly Ala Ala Pro Ser Asp Ser Pro Ile Val Val Ala Pro
 100 105 110
 Ser Gly Ala Pro Ser Pro Pro Leu Ser Ser Thr Gly Asp Val Ala Ser
 115 120 125
 Asp Ser Tyr Asn Asn Val Tyr Arg Asp Thr Glu Gly Leu Arg Glu Leu
 130 135 140
 Gly Val Thr His Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp Ala Arg Val Leu Pro
 145 150 155 160
 Asn Gly Thr Ala Gly Thr Pro Asn Arg Glu Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg
 165 170 175
 Arg Leu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Gly Val Gln Pro Val Val Thr
 180 185 190
 Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Gln Arg Leu Gln Asp Thr Tyr Gly Gly
 195 200 205
 Trp Ala Asn Arg Ala Leu Ala Asp His Phe Arg Asp Tyr Ala Glu Leu
 210 215 220

Cys Phe Arg His Phe Gly Gly Gln Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Asp			
225	230	235	240
Asn Pro Tyr Val Val Ala Trp His Gly Tyr Ala Thr Gly Arg Leu Ala			
	245	250	255
Pro Gly Val Arg Gly Ser Ser Arg Leu Gly Tyr Leu Val Ala His Asn			
	260	265	270
Leu Leu Leu Ala His Ala Lys Val Trp His Leu Tyr Asn Thr Ser Phe			
	275	280	285
Arg Pro Thr Gln Gly Gly Arg Val Ser Ile Ala Leu Ser Ser His Trp			
	290	295	300
Ile Asn Pro Arg Arg Met Thr Asp Tyr Asn Ile Arg Glu Cys Gln Lys			
305	310	315	320
Ser Leu Asp Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys Pro Ile Phe Ile Asp			
	325	330	335
Gly Asp Tyr Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Leu Leu Pro			
	340	345	350
Asp Phe Thr Glu Ser Glu Lys Arg Leu Ile Arg Gly Thr Ala Asp Phe			
	355	360	365
Phe Ala Leu Ser Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro			
	370	375	380
Asn Met Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu			
385	390	395	400
Ser Trp Ile Asp Leu Glu Tyr Asn His Pro Pro Ile Phe Ile Val Glu			
	405	410	415
Asn Gly Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr			
	420	425	430

Met Tyr Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Arg
 435 440 445
 Leu Asp Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp
 450 455 460
 Gly Phe Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr
 465 470 475 480
 Val Asp Phe Leu Ser Gln Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala
 485 490 495
 Leu Phe Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Asp Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro
 500 505 510
 Glu Asn Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly
 515 520 525
 Val Val Asp Asn Tyr Val Gln Val Asp Thr Thr Leu Ser Gln Phe Thr
 530 535 540
 Asp Pro Asn Val Tyr Leu Trp Asp Val His His Ser Lys Arg Leu Ile
 545 550 555 560
 Lys Val Asp Gly Val Val Ala Lys Lys Arg Lys Pro Tyr Cys Val Asp
 565 570 575
 Phe Ser Ala Ile Arg Pro Gln Ile Thr Leu Leu Arg Glu Met Arg Val
 580 585 590
 Thr His Phe Arg Phe Ser Leu Asp Trp Ala Leu Ile Leu Pro Leu Gly
 595 600 605
 Asn Gln Thr Gln Val Asn His Thr Val Leu His Phe Tyr Arg Cys Met
 610 615 620
 Ile Ser Glu Leu Val His Ala Asn Ile Thr Pro Val Val Ala Leu Trp
 625 630 635 640

Gln Pro Ala Ala Pro His Gln Gly Leu Pro His Ala Leu Ala Lys His			
645	650	655	
Gly Ala Trp Glu Asn Pro His Thr Ala Leu Ala Phe Ala Asp Tyr Ala			
660	665	670	
Asn Leu Cys Phe Lys Glu Leu Gly His Trp Val Asn Leu Trp Ile Thr			
675	680	685	
Met Asn Glu Pro Asn Thr Arg Asn Met Thr Tyr Arg Ala Gly His His			
690	695	700	
Leu Leu Arg Ala His Ala Leu Ala Trp His Leu Tyr Asp Asp Lys Phe			
705	710	715	720
Arg Ala Ala Gln Lys Gly Lys Ile Ser Ile Ala Leu Gln Ala Asp Trp			
725	730	735	
Ile Glu Pro Ala Cys Pro Phe Ser Gln Asn Asp Lys Glu Val Ala Glu			
740	745	750	
Arg Val Leu Glu Phe Asp Ile Gly Trp Leu Ala Glu Pro Ile Phe Gly			
755	760	765	
Ser Gly Asp Tyr Pro Arg Val Met Arg Asp Trp Leu Asn Gln Lys Asn			
770	775	780	
Asn Phe Leu Leu Pro Tyr Phe Thr Glu Asp Glu Lys Lys Leu Val Arg			
785	790	795	800
Gly Ser Phe Asp Phe Leu Ala Val Ser His Tyr Thr Thr Ile Leu Val			
805	810	815	
Asp Trp Glu Lys Glu Asp Pro Met Lys Tyr Asn Asp Tyr Leu Glu Val			
820	825	830	
Gln Glu Met Thr Asp Ile Thr Trp Leu Asn Ser Pro Ser Gln Val Ala			
835	840	845	

Val Val Pro Trp Gly Leu Arg Lys Val Leu Asn Trp Leu Arg Phe Lys
 850 855 860
 Tyr Gly Asp Leu Pro Met Tyr Val Thr Ala Asn Gly Ile Asp Asp Asp
 865 870 875 880
 Pro His Ala Glu Gln Asp Ser Leu Arg Ile Tyr Tyr Ile Lys Asn Tyr
 885 890 895
 Val Asn Glu Ala Leu Lys Ala Tyr Val Leu Asp Asp Ile Asn Leu Cys
 900 905 910
 Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser Leu Ser Asp Arg Ser Ala Pro Lys Ser Gly
 915 920 925
 Phe Tyr Arg Tyr Ala Ala Asn Gln Phe Glu Pro Lys Pro Ser Met Lys
 930 935 940
 His Tyr Arg Arg Ile Ile Asp Ser Asn Gly Phe Leu Gly Ser Gly Thr
 945 950 955 960
 Leu Gly Arg Phe Cys Pro Glu Glu Tyr Thr Val Cys Thr Glu Cys Gly
 965 970 975
 Phe Phe Gln Thr Arg Lys Ser Leu Leu Val Phe Ile Ser Phe Leu Val
 980 985 990
 Phe Thr Phe Ile Ile Ser Leu Ala Leu Ile Phe His Tyr Ser Lys Lys
 995 1000 1005
 Gly Gln Arg Ser Tyr Lys
 1010

서열: 4

서열의 길이: 550

서열 형: 아미노산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 단백질

기원:

생물명: 마우스

장기: 신장

서열 4

Met Leu Ala Arg Ala Pro Pro Arg Arg Pro Pro Arg Leu Val Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg Leu Leu Leu Leu His Leu Leu Leu Leu Ala Leu Arg Ala Arg Cys
 20 25 30
 Leu Ser Ala Glu Pro Gly Gln Gly Ala Gln Thr Trp Ala Arg Phe Ala
 35 40 45
 Arg Ala Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Leu Leu His Asp Thr Phe Pro
 50 55 60
 Asp Gly Phe Leu Trp Ala Val Gly Ser Ala Ala Tyr Gln Thr Glu Gly
 65 70 75 80
 Gly Trp Arg Gln His Gly Lys Gly Ala Ser Ile Trp Asp Thr Phe Thr
 85 90 95
 His His Ser Gly Ala Ala Pro Ser Asp Ser Pro Ile Val Val Ala Pro
 100 105 110
 Ser Gly Ala Pro Ser Pro Pro Leu Ser Ser Thr Gly Asp Val Ala Ser
 115 120 125
 Asp Ser Tyr Asn Asn Val Tyr Arg Asp Thr Glu Gly Leu Arg Glu Leu
 130 135 140
 Gly Val Thr His Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp Ala Arg Val Leu Pro

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

355	360	365
Phe Ala Leu Cys Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro		
370	375	380
Asn Met Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu		
385	390	395
Ser Trp Ile Asp Leu Glu Tyr Asn His Pro Pro Ile Phe Ile Val Glu		
405	410	415
Asn Gly Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr		
420	425	430
Met Tyr Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Arg		
435	440	445
Leu Asp Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp		
450	455	460
Gly Phe Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr		
465	470	475
Val Asp Phe Leu Ser Gln Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala		
485	490	495
Leu Phe Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Asp Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro		
500	505	510
Glu Asn Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly		
515	520	525
Val Val Asp Asn Tyr Val Gln Val Ser Pro Leu Thr Lys Pro Ser Val		
530	535	540
Gly Leu Leu Leu Pro His		
545	550	

서열: 5

서열의 길이: 1,015

서열 형: 아미노산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 단백질

기원:

생물명: 사람

장기: 췌장

서열 5

Met Ser Asn Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Leu Arg Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp
 20 25 30
 Ser Lys Asn Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu
 35 40 45
 Tyr Gly Thr Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala
 50 55 60
 Leu Gln Val Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile
 65 70 75 80
 Trp Asp His Phe Ile His Thr His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn
 85 90 95
 Gly Ser Ser Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu
 100 105 110
 Asp Phe Ile Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg
 115 120 125

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

Ala Gln Cys Thr Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met Leu			
545	550	555	560
Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala Ser			
	565	570	575
Val Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu Arg			
	580	585	590
Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala			
	595	600	605
Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu			
	610	615	620
Pro Leu Leu His Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala			
625	630	635	640
Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp Leu Val			
	645	650	655
Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Ile Tyr			
	660	665	670
Asn Arg Ser Gly Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala His Asn Leu Leu Val			
	675	680	685
Ala His Ala Leu Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Gln Gln Phe Arg Pro Ser			
	690	695	700
Gln Arg Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro			
705	710	715	720
Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe Leu			
	725	730	735
Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp			
	740	745	750

Tyr Pro Ala Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly
 755 760 765
 Leu Ser Ser Ser Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu
 770 775 780
 Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg
 785 790 795 800
 Phe Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg
 805 810 815
 Asp Ile Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg
 820 825 830
 Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg
 835 840 845
 Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp
 850 855 860
 Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys
 865 870 875 880
 Tyr Leu Gln Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile
 885 890 895
 Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg
 900 905 910
 Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe
 915 920 925
 Tyr Asn Lys Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser
 930 935 940
 Ser Arg Cys Ser Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu
 945 950 955 960
 Phe Leu Val Gln Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe
 965 970 975
 Ser Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys
 980 985 990
 Arg Arg Lys Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys
 995 1000 1005
 Lys Gly Lys Arg Val Val Ser
 1010 1015

서열: 6

서열의 길이: 3,163

서열 형: 핵산

쇄의 수: 이본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: mRNA에 대한 cDNA

기원:

생물명: 사람

장기: 신장

서열의 특징:

특징을 나타내는 기호: CDS

존재위치: 9..3047

특징을 결정하는 방법: E

서열 6

CGCGCAGC ATG CCC GCC AGC GCC CCG CCG CGC CGC CCG CGG CCG CCG CCG 50

Met Pro Ala Ser Ala Pro Pro Arg Arg Pro Arg Pro Pro Pro

1

5

10

145	150	155	
AAT GGC AGC GCG GGC GTC CCC AAC CGC GAG GGG CTG CGC TAC TAC CGG			530
Asn Gly Ser Ala Gly Val Pro Asn Arg Glu Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg			
160	165	170	
CGC CTG CTG GAG CGG CTG CGG GAG CTG GGC GTG CAG CCC GTG GTC ACC			578
Arg Leu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Gly Val Gln Pro Val Val Thr			
175	180	185	190
CTG TAC CAC TGG GAC CTG CCC CAG CGC CTG CAG GAC GCC TAC GGC GGC			626
Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Gln Arg Leu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly			
195	200	205	
TGG GCC AAC CGC GCC CTG GCC GAC CAC TTC AGG GAT TAC GCG GAG CTC			674
Trp Ala Asn Arg Ala Leu Ala Asp His Phe Arg Asp Tyr Ala Glu Leu			
210	215	220	
TGC TTC CGC CAC TTC GGC GGT CAG GTC AAG TAC TGG ATC ACC ATC GAC			722
Cys Phe Arg His Phe Gly Gly Gln Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Asp			
225	230	235	
AAC CCC TAC GTG GTG GCC TGG CAC GGC TAC GCC ACC GGG CGC CTG GCC			770
Asn Pro Tyr Val Val Ala Trp His Gly Tyr Ala Thr Gly Arg Leu Ala			
240	245	250	
CCC GGC ATC CGG GGC AGC CCG CGG CTC GGG TAC CTG GTG GCG CAC AAC			818
Pro Gly Ile Arg Gly Ser Pro Arg Leu Gly Tyr Leu Val Ala His Asn			
255	260	265	270
CTC CTC CTG GCT CAT GCC AAA GTC TGG CAT CTC TAC AAT ACT TCT TTC			866
Leu Leu Leu Ala His Ala Lys Val Trp His Leu Tyr Asn Thr Ser Phe			
275	280	285	
CGT CCC ACT CAG GGA GGT CAG GTG TCC ATT GCC CTA AGC TCT CAC TGG			914

Arg	Pro	Thr	Gln	Gly	Gly	Gln	Val	Ser	Ile	Ala	Leu	Ser	Ser	His	Trp			
				290						295						300		
ATC	AAT	CCT	CGA	AGA	ATG	ACC	GAC	CAC	AGC	ATC	AAA	GAA	TGT	CAA	AAA	962		
Ile	Asn	Pro	Arg	Arg	Met	Thr	Asp	His	Ser	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln	Lys			
				305						310						315		
TCT	CTG	GAC	TTT	GTA	CTA	GGT	TGG	TTT	GCC	AAA	CCC	GTA	TTT	ATT	GAT	1010		
Ser	Leu	Asp	Phe	Val	Leu	Gly	Trp	Phe	Ala	Lys	Pro	Val	Phe	Ile	Asp			
				320						325						330		
GGT	GAC	TAT	CCC	GAG	AGC	ATG	AAG	AAT	AAC	CTT	TCA	TCT	ATT	CTG	CCT	1058		
Gly	Asp	Tyr	Pro	Glu	Ser	Met	Lys	Asn	Asn	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	Pro			
				335						340						345		
GAT	TTT	ACT	GAA	TCT	GAG	AAA	AAG	TTC	ATC	AAA	GGA	ACT	GCT	GAC	TTT	1106		
Asp	Phe	Thr	Glu	Ser	Glu	Lys	Lys	Phe	Ile	Lys	Gly	Thr	Ala	Asp	Phe			
				355						360						365		
TTT	GCT	CTT	TGC	TTT	GGA	CCC	ACC	TTG	AGT	TTT	CAA	CTT	TTG	GAC	CCT	1154		
Phe	Ala	Leu	Cys	Phe	Gly	Pro	Thr	Leu	Ser	Phe	Gln	Leu	Leu	Asp	Pro			
				370						375						380		
CAC	ATG	AAG	TTC	CGC	CAA	TTG	GAA	TCT	CCC	AAC	CTG	AGG	CAA	CTG	CTT	1202		
His	Met	Lys	Phe	Arg	Gln	Leu	Glu	Ser	Pro	Asn	Leu	Arg	Gln	Leu	Leu			
				385						390						395		
TCC	TGG	ATT	GAC	CTT	GAA	TTT	AAC	CAT	CCT	CAA	ATA	TTT	ATT	GTG	GAA	1250		
Ser	Trp	Ile	Asp	Leu	Glu	Phe	Asn	His	Pro	Gln	Ile	Phe	Ile	Val	Glu			
				400						405						410		
AAT	GGC	TGG	TTT	GTC	TCA	GGG	ACC	ACC	AAG	AGA	GAT	GAT	GCC	AAA	TAT	1298		
Asn	Gly	Trp	Phe	Val	Ser	Gly	Thr	Thr	Lys	Arg	Asp	Asp	Ala	Lys	Tyr			
				415						420						425		
																430		

ATG TAT TAC CTC AAA AAG TTC ATC ATG GAA ACC TTA AAA GCC ATC AAG	1346
Met Tyr Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Lys	
435 440 445	
CTG GAT GGG GTG GAT GTC ATC GGG TAT ACC GCA TGG TCC CTC ATG GAT	1394
Leu Asp Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp	
450 455 460	
GGT TTC GAG TGG CAC AGA GGT TAC AGC ATC AGG CGT GGA CTC TTC TAT	1442
Gly Phe Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr	
465 470 475	
GTT GAC TTT CTA AGC CAG GAC AAG ATG TTG TTG CCA AAG TCT TCA GCC	1490
Val Asp Phe Leu Ser Gln Asp Lys Met Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala	
480 485 490	
TTG TTC TAC CAA AAG CTG ATA GAG AAA AAT GGC TTC CCT CCT TTA CCT	1538
Leu Phe Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro	
495 500 - 505 510	
GAA AAT CAG CCC CTA GAA GGG ACA TTT CCC TGT GAC TTT GCT TGG GGA	1586
Glu Asn Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly	
515 520 525	
GTT GTT GAC AAC TAC ATT CAA GTA GAT ACC ACT CTG TCT CAG TTT ACC	1634
Val Val Asp Asn Tyr Ile Gln Val Asp Thr Thr Leu Ser Gln Phe Thr	
530 535 540	
GAC CTG AAT GTT TAC CTG TGG GAT GTC CAC CAC AGT AAA AGG CTT ATT	1682
Asp Leu Asn Val Tyr Leu Trp Asp Val His His Ser Lys Arg Leu Ile	
545 550 555	
AAA GTG GAT GGG GTT GTG ACC AAG AAG AGG AAA TCC TAC TGT GTT GAC	1730
Lys Val Asp Gly Val Val Thr Lys Lys Arg Lys Ser Tyr Cys Val Asp	

560	565	570	
TTT GCT GCC ATC CAG CCC CAG ATC GCT TTA CTC CAG GAA ATG CAC GTT			1778
Phe Ala Ala Ile Gln Pro Gln Ile Ala Leu Leu Gln Glu Met His Val			
575	580	585	590
ACA CAT TTT CGC TTC TCC CTG GAC TGG GCC CTG ATT CTC CCT CTG GGT			1826
Thr His Phe Arg Phe Ser Leu Asp Trp Ala Leu Ile Leu Pro Leu Gly			
595	600	605	
AAC CAG TCC CAG GTG AAC CAC ACC ATC CTG CAG TAC TAT CGC TGC ATG			1874
Asn Gln Ser Gln Val Asn His Thr Ile Leu Gln Tyr Tyr Arg Cys Met			
610	615	620	
GCC AGC GAG CTT GTC CGT GTC AAC ATC ACC CCA GTG GTG GCC CTG TGG			1922
Ala Ser Glu Leu Val Arg Val Asn Ile Thr Pro Val Val Ala Leu Trp			
625	630	635	
CAG CCT ATG GCC CCG AAC CAA GGA CTG CCG CGC CTC CTG GCC AGG CAG			1970
Gln Pro Met Ala Pro Asn Gln Gly Leu Pro Arg Leu Leu Ala Arg Gln			
640	645	650	
GGC GCC TGG GAG AAC CCC TAC ACT GCC CTG GCC TTT GCA GAG TAT GCC			2018
Gly Ala Trp Glu Asn Pro Tyr Thr Ala Leu Ala Phe Ala Glu Tyr Ala			
655	660	665	670
CGA CTG TGC TTT CAA GAG CTC GGC CAT CAC GTC AAG CTT TGG ATA ACG			2066
Arg Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly His His Val Lys Leu Trp Ile Thr			
675	680	685	
ATG AAT GAG CCG TAT ACA AGG AAT ATG ACA TAC ACT GCT GGC CAC AAC			2114
Met Asn Glu Pro Tyr Thr Arg Asn Met Thr Tyr Ser Ala Gly His Asn			
690	695	700	
CTT CTG AAG GCC CAT GCC CTG GCT TGG CAT GTG TAC AAT GAA AAG TTT			2162

Leu Leu Lys Ala His Ala Leu Ala Trp His Val Tyr Asn Glu Lys Phe	
705	710
715	
AGG CAT GCT CAG AAT GGG AAA ATA TCC ATA GCC TTG CAG GCT GAT TGG	2210
Arg His Ala Gln Asn Gly Lys Ile Ser Ile Ala Leu Gln Ala Asp Trp	
720	725
730	
ATA GAA CCT GCC TGC CCT TTC TCC CAA AAG GAC AAA GAG GTG GCC GAG	2258
Ile Glu Pro Ala Cys Pro Phe Ser Gln Lys Asp Lys Glu Val Ala Glu	
735	740
745	750
AGA GTT TTG GAA TTT GAC ATT GGC TGG CTG GCT GAG CCC ATT TTC GGC	2306
Arg Val Leu Glu Phe Asp Ile Gly Trp Leu Ala Glu Pro Ile Phe Gly	
755	760
765	
TCT GGA GAT TAT CCA TGG GTG ATG AGG GAC TGG CTG AAC CAA AGA AAC	2354
Ser Gly Asp Tyr Pro Trp Val Met Arg Asp Trp Leu Asn Gln Arg Asn	
770	775
780	
AAT TTT CTT CTT CCT TAT TTC ACT GAA GAT GAA AAA AAG CTA ATC CAG	2402
Asn Phe Leu Leu Pro Tyr Phe Thr Glu Asp Glu Lys Lys Leu Ile Gln	
785	790
795	
GGT ACC TTT GAC TTT TTG GCT TTA AGC CAT TAT ACC ACC ATC CTT GTA	2450
Gly Thr Phe Asp Phe Leu Ala Leu Ser His Tyr Thr Thr Ile Leu Val	
800	805
810	
GAC TCA GAA AAA GAA GAT CCA ATA AAA TAC AAT GAT TAC CTA GAA GTG	2498
Asp Ser Glu Lys Glu Asp Pro Ile Lys Tyr Asn Asp Tyr Leu Glu Val	
815	820
825	830
CAA GAA ATG ACC GAC ATC ACG TGG CTC AAC TCC CCC AGT CAG GTG GCG	2546
Gln Glu Met Thr Asp Ile Thr Trp Leu Asn Ser Pro Ser Gln Val Ala	
835	840
845	

GTA GTG CCC TGG GGG TTG CGC AAA GTG CTG AAC TGG CTG AAG TTC AAG 2594
 Val Val Pro Trp Gly Leu Arg Lys Val Leu Asn Trp Leu Lys Phe Lys
 850 855 860
 TAC GGA GAC CTC CCC ATG TAC ATA ATA TCC AAC GGA ATC GAT GAC GGG 2642
 Tyr Gly Asp Leu Pro Met Tyr Ile Ile Ser Asn Gly Ile Asp Asp Gly
 865 870 875
 CTG CAT GCT GAG GAC GAC CAG CTG AGG GTG TAT TAT ATG CAG AAT TAC 2690
 Leu His Ala Glu Asp Asp Gln Leu Arg Val Tyr Tyr Met Gln Asn Tyr
 880 885 890
 ATA AAC GAA GCT CTC AAA GCC CAC ATA CTG GAT GGT ATC AAT CTT TGC 2738
 Ile Asn Glu Ala Leu Lys Ala His Ile Leu Asp Gly Ile Asn Leu Cys
 895 900 905 910
 GGA TAC TTT GCT TAT TCG TTT AAC GAC CGC ACA GCT CCG AGG TTT GGC 2786
 Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser Phe Asn Asp Arg Thr Ala Pro Arg Phe Gly
 915 920 925
 CTC TAT CGT TAT GCT GCA GAT CAG TTT GAG CCC AAG GCA TCC ATG AAA 2834
 Leu Tyr Arg Tyr Ala Ala Asp Gln Phe Glu Pro Lys Ala Ser Met Lys
 930 935 940
 CAT TAC AGG AAA ATT ATT GAC AGC AAT GGT TTC CCG GGC CCA GAA ACT 2882
 His Tyr Arg Lys Ile Ile Asp Ser Asn Gly Phe Pro Gly Pro Glu Thr
 945 950 955
 CTG GAA AGA TTT TGT CCA GAA GAA TTC ACC GTG TGT ACT GAG TGC AGT 2930
 Leu Glu Arg Phe Cys Pro Glu Glu Phe Thr Val Cys Thr Glu Cys Ser
 960 965 970
 TTT TTT CAC ACC CGA AAG TCT TTA CTG GCT TTC ATA GCT TTT CTA TTT 2978
 Phe Phe His Thr Arg Lys Ser Leu Leu Ala Phe Ile Ala Phe Leu Phe
 975 980 985 990
 TTT GCT TCT ATT ATT TCT CTC TCC CTT ATA TTT TAC TAC TCG AAG AAA 3026
 Phe Ala Ser Ile Ile Ser Leu Ser Leu Ile Phe Tyr Tyr Ser Lys Lys
 995 1000 1005
 GGC AGA AGA AGT TAC AAA TAGTTCTGAA CATTTTCTA TTCATTCATT 3074
 Gly Arg Arg Ser Tyr Lys
 1010
 TTGAAATAAT TATGCAGACA CATCAGCTGT TAACCATTTG CACCTCTAAG TGTTGTGAAA 3134
 CTGTAAATTT CATACATTTG ACTTCTAGA 3163

서열: 7

서열의 길이: 3,435

서열 형: 핵산

쇄의 수: 이본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: mRNA에 대한 cDNA

기원:

생물명: 사람

장기: 신장

서열의 특징:

특징을 나타내는 기호: CDS

존재위치: 9..1655

특징을 결정하는 방법: E

서열 7

CGCGCAGC ATG CCC GCC AGC GCC CCG CCG CGC CGC CCG CGG CCG CCG CCG 50

Met Pro Ala Ser Ala Pro Pro Arg Arg Pro Arg Pro Pro Pro

1	5	10	
CCG TCG CTG TCG CTG CTG CTG GTG CTG CTG GGC CTG GGC GGC CGC CGC			98
Pro Ser Leu Ser Leu Leu Leu Val Leu Leu Gly Leu Gly Gly Arg Arg			
15	20	25	30
CTG CGT GCG GAG CCG GGC GAC GGC GCG CAG ACC TGG GCC CGT GTC TCG			146
Leu Arg Ala Glu Pro Gly Asp Gly Ala Gln Thr Trp Ala Arg Val Ser			
35	40	45	
CGG CCT CCT GCC CCC GAG GCC GCG GGC CTC TTC CAG GGC ACC TTC CCC			194
Arg Pro Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Leu Phe Gln Gly Thr Phe Pro			
50	55	60	
GAC GGC TTC CTC TGG GCC GTG GGC AGC GCC GCC TAC CAG ACC GAG GGC			242
Asp Gly Phe Leu Trp Ala Val Gly Ser Ala Ala Tyr Gln Thr Glu Gly			
65	70	75	
GGC TGG CAG CAG CAC GGC AAG GGT GCG TCC ATC TGG GAC ACG TTC ACC			290
Gly Trp Gln Gln His Gly Lys Gly Ala Ser Ile Trp Asp Thr Phe Thr			
80	85	90	
CAC CAC CCC CTG GCA CCC CCG GGA GAC TCC CGG AAC GCC AGT CTG CCG			338
His His Pro Leu Ala Pro Pro Gly Asp Ser Arg Asn Ala Ser Leu Pro			
95	100	105	110
TTG GGC GCC CCG TCG CCG CTG CAG CCC GCC ACC GGG GAC GTA GCC AGC			386
Leu Gly Ala Pro Ser Pro Leu Gln Pro Ala Thr Gly Asp Val Ala Ser			
115	120	125	
GAC AGC TAC AAC AAC GTC TTC CGC GAC ACG GAG GCG CTG CGC GAG CTC			434
Asp Ser Tyr Asn Asn Val Phe Arg Asp Thr Glu Ala Leu Arg Glu Leu			
130	135	140	
GGG GTC ACT CAC TAC CGC TTC TCC ATC TCG TGG GCG CGA GTG CTC CCC			482

Gly Val Thr His Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp Ala Arg Val Leu Pro	
145	150
AAT GGC AGC GCG GGC GTC CCC AAC CGC GAG GGG CTG CGC TAC TAC CGG	530
Asn Gly Ser Ala Gly Val Pro Asn Arg Glu Gly Leu Arg Tyr Tyr Arg	
160	170
CGC CTG CTG GAG CGG CTG CGG GAG CTG GGC GTG CAG CCC GTG GTC ACC	578
Arg Leu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Gly Val Gln Pro Val Val Thr	
175	180
CTG TAC CAC TGG GAC CTG CCC CAG CGC CTG CAG GAC GCC TAC GGC GGC	626
Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Gln Arg Leu Gln Asp Ala Tyr Gly Gly	
195	200
TGG GCC AAC CGC GCC CTG GCC GAC CAC TTC AGG GAT TAC GCG GAG CTC	674
Trp Ala Asn Arg Ala Leu Ala Asp His Phe Arg Asp Tyr Ala Glu Leu	
210	215
TGC TTC CGC CAC TTC GGC GGT CAG GTC AAG TAC TGG ATC ACC ATC GAC	722
Cys Phe Arg His Phe Gly Gly Gln Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Asp	
225	230
AAC CCC TAC GTG GTG GCC TGG CAC GGC TAC GCC ACC GGG CGC CTG GCC	770
Asn Pro Tyr Val Val Ala Trp His Gly Tyr Ala Thr Gly Arg Leu Ala	
240	245
CCC GGC ATC CGG GGC AGC CCG CGG CTC GGG TAC CTG GTG GCG CAC AAC	818
Pro Gly Ile Arg Gly Ser Pro Arg Leu Gly Tyr Leu Val Ala His Asn	
255	260
CTC CTC CTG GCT CAT GCC AAA GTC TGG CAT CTC TAC AAT ACT TCT TTC	866
Leu Leu Leu Ala His Ala Lys Val Trp His Leu Tyr Asn Thr Ser Phe	
275	280
	285

CGT CCC ACT CAG GGA GGT CAG GTG TCC ATT GCC CTA AGC TCT CAC TGG	914
Arg Pro Thr Gln Gly Gly Gln Val Ser Ile Ala Leu Ser Ser His Trp	
290 295 300	
ATC AAT CCT CGA AGA ATG ACC GAC CAC AGC ATC AAA GAA TGT CAA AAA	962
Ile Asn Pro Arg Arg Met Thr Asp His Ser Ile Lys Glu Cys Gln Lys	
305 310 315	
TCT CTG GAC TTT GTA CTA GGT TGG TTT GCC AAA CCC GTA TTT ATT GAT	1010
Ser Leu Asp Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys Pro Val Phe Ile Asp	
320 325 330	
GGT GAC TAT CCC GAG AGC ATG AAG AAT AAC CTT TCA TCT ATT CTG CCT	1058
Gly Asp Tyr Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Ile Leu Pro	
335 340 345 350	
GAT TTT ACT GAA TCT GAG AAA AAG TTC ATC AAA GGA ACT GCT GAC TTT	1106
Asp Phe Thr Glu Ser Glu Lys Lys Phe Ile Lys Gly Thr Ala Asp Phe	
355 360 365	
TTT GCT CTT TGC TTT GGA CCC ACC TTG AGT TTT CAA CTT TTG GAC CCT	1154
Phe Ala Leu Cys Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro	
370 375 380	
CAC ATG AAG TTC CGC CAA TTG GAA TCT CCC AAC CTG AGG CAA CTG CTT	1202
His Met Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu	
385 390 395	
TCC TGG ATT GAC CTT GAA TTT AAC CAT CCT CAA ATA TTT ATT GTG GAA	1250
Ser Trp Ile Asp Leu Glu Phe Asn His Pro Gln Ile Phe Ile Val Glu	
400 405 410	
AAT GGC TGG TTT GTC TCA GGG ACC ACC AAG AGA GAT GAT GCC AAA TAT	1298
Asn Gly Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr	

415	420	425	430	
ATG TAT TAC CTC AAA AAG TTC ATC ATG GAA ACC TTA AAA GCC ATC AAG	1346			
Met Tyr Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Lys				
435	440	445		
CTG GAT GGG GTG GAT GTC ATC GGG TAT ACC GCA TGG TCC CTC ATG GAT	1394			
Leu Asp Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp				
450	455	460		
GGT TTC GAG TGG CAC AGA GGT TAC AGC ATC AGG CGT GGA CTC TTC TAT	1442			
Gly Phe Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr				
465	470	475		
GTT GAC TTT CTA AGC CAG GAC AAG ATG TTG TTG CCA AAG TCT TCA GCC	1490			
Val Asp Phe Leu Ser Gln Asp Lys Met Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala				
480	485	490		
TTG TTC TAC CAA AAG CTG ATA GAG AAA AAT GGC TTC CCT CCT TTA CCT	1538			
Leu Phe Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro				
495	500	505	510	
GAA AAT CAG CCC CTA GAA GGG ACA TTT CCC TGT GAC TTT GCT TGG GGA	1586			
Glu Asn Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly				
515	520	525		
GTT GTT GAC AAC TAC ATT CAA GTA AGT CAG CTG ACA AAA CCA ATC AGC	1634			
Val Val Asp Asn Tyr Ile Gln Val Ser Gln Leu Thr Lys Pro Ile Ser				
530	535	540		
AGT CTC ACC AAG CCC TAT CAC TAGTAGATAC CACTCTGTCT CAGTTTACCG	1685			
Ser Leu Thr Lys Pro Tyr His				
545				
ACCTGAATGT TTACCTGTGG GATGTCCACC ACAGTAAAAG GCTTATTAAA GTGGATGGGG	1745			

TTGTGACCAA GAAGAGGAAA TCCTACTGTG TTGACTTTGC TGCCATCCAG CCCAGATCG 1805
 CTTTACTCCA GGAAATGCAC GTTACACATT TTCGCTTCTC CCTGGACTGG GCCCTGATTC 1865
 TCCCTCTGGG TAACCAGTCC CAGGTGAACC ACACCATCCT GCAGTACTAT CGCTGCATGG 1925
 CCAGCGAGCT TGTCCGTGTC AACATCACCC CAGTGGTGGC CCTGTGGCAG CCTATGGCCC 1985
 CGAACCAAGG ACTGCCGCGC CTCCTGGCCA GGCAGGGCGC CTGGGAGAAC CCCTACACTG 2045
 CCCTGGCCTT TGCAGAGTAT GCCCGACTGT GCTTTCAAGA GCTCGGCCAT CACGTCAAGC 2105
 TTTGGATAAC GATGAATGAG CCGTATACAA GGAATATGAC ATACAGTGCT GGCCACAACC 2165
 TTCTGAAGGC CCATGCCCTG GCTTGGCATG TGTACAATGA AAAGTTTAGG CATGCTCAGA 2225
 ATGGGAAAAT ATCCATAGCC TTGCAGGCTG ATTGGATAGA ACCTGCCTGC CCTTTCTCCC 2285
 AAAAGGACAA AGAGGTGGCC GAGAGAGTTT TGGAATTTGA CATTGGCTGG CTGGCTGAGC 2345
 CCATTTTCGG CTCTGGAGAT TATCCATGGG TGATGAGGGA CTGGCTGAAC CAAAGAAACA 2405
 ATTTTCTTCT TCCTATTTTC ACTGAAGATG AAAAAAGCT AATCCAGGT ACCTTTGACT 2465
 TTTTGGCTTT AAGCCATTAT ACCACCATCC TTGTAGACTC AGAAAAAGAA GATCCAATAA 2525
 AATACAATGA TTACCTAGAA GTGCAAGAAA TGACCGACAT CACGTGGCTC AACTCCCCCA 2585
 GTCAGGTGGC GGTAGTGCCC TGGGGGTGTC GCAAAGTGCT GAACTGGCTG AAGTTCAAGT 2645
 ACGGAGACCT CCCCATGTAC ATAATATCCA ACGGAATCGA TGACGGGCTG CATGCTGAGG 2705
 ACGACCAGCT GAGGGTGTAT TATATGCAGA ATTACATAAA CGAAGCTCTC AAAGCCCACA 2765
 TACTGGATGG TATCAATCTT TGGCGTACT TTGCTTATTC GTTTAACGAC CGCACAGCTC 2825
 CGAGGTTTGG CCTCTATCGT TATGCTGCAG ATCAGTTTGA GCCCAAGGCA TCCATGAAAC 2885
 ATTACAGGAA AATTATTGAC AGCAATGGTT TCCCGGGCCC AGAAACTCTG GAAAGATTTT 2945
 GTCCAGAAGA ATTCACCGTG TGTACTGAGT GCAGTTTTTT TCACACCCGA AAGTCTTTAC 3005
 TGGCTTTCAT AGCTTTTCTA TTTTTTGCTT CTATTATTTT TCTCTCCCTT ATATTTTACT 3065
 ACTCGAAGAA AGGCAGAAGA AGTTACAAAT AGTTCTGAAC ATTTTCTAT TCATTCATTT 3125
 TGAAATAATT ATGCAGACAC ATCAGCTGTT AACCATTTCG ACCTCTAAGT GTTGTGAAAC 3185
 TGTAAATTTT ATACATTTGA CTTCTAGAAA ACATTTTGT GGCTTATGAC AGAGGTTTTG 3245
 AAATGGGCAT AGGTGATCGT AAAATATTGA ATAATGCGAA TAGTGCCTGA ATTTGTTCTC 3305

 TTTTGGGTG ATTA AAAAAC TGACAGGCAC TATAATTTCT GTAACACACT AACAAAAGCA 3365
 TGAAAAATAG GAACCACACC AATGCAACAT TTGTGCAGAA ATTTGAATGA CAAGATTAGG 3425
 AATATTTTCT 3435

서열: 8

서열의 길이: 5,032

서열 형: 핵산

쇄의 수: 이본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: mRNA에 대한 cDNA

기원:

생물명: 마우스

장기: 신장

서열의 특징:

특징을 나타내는 기호: CDS

존재위치: 19..3060

특징을 결정하는 방법: E

서열 8

CCTCCCGGCT CCCGCAGC ATG CTA GCC CGC GCC CCT CCT CGC CGC CCG CCG	51
Met Leu Ala Arg Ala Pro Pro Arg Arg Pro Pro	
1 5 10	
CGG CTG GTG CTG CTC CGT TTG CTG TTG CTG CAT CTG CTG CTG CTC GCC	99
Arg Leu Val Leu Leu Arg Leu Leu Leu Leu His Leu Leu Leu Leu Ala	
15 20 25	
CTG CGC GCC CGC TGC CTG AGC GCT GAG CCG GGT CAG GGC GCG CAG ACC	147
Leu Arg Ala Arg Cys Leu Ser Ala Glu Pro Gly Gln Gly Ala Gln Thr	

30	35	40	
TGG GCT CGC TTC GCG CGC GCT CCT GCC CCA GAG GCC GCT GGC CTC CTC	195		
Trp Ala Arg Phe Ala Arg Ala Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Leu Leu			
45	50	55	
CAC GAC ACC TTC CCC GAC GGT TTC CTC TGG GCG GTA GGC AGC GCC GCC	243		
His Asp Thr Phe Pro Asp Gly Phe Leu Trp Ala Val Gly Ser Ala Ala			
60	65	70	75
TAT CAG ACC GAG GGC GGC TGG CGA CAG CAC GGC AAA GGC GCG TCC ATC	291		
Tyr Gln Thr Glu Gly Gly Trp Arg Gln His Gly Lys Gly Ala Ser Ile			
80	85	90	
TGG GAC ACT TTC ACC CAT CAC TCT GGG GCG GCC CCG TCC GAC TCC CCG	339		
Trp Asp Thr Phe Thr His His Ser Gly Ala Ala Pro Ser Asp Ser Pro			
95	100	105	
ATC GTC GTG GCG CCG TCG GGT GCC CCG TCG CCT CCC CTG TCC TCC ACT	387		
Ile Val Val Ala Pro Ser Gly Ala Pro Ser Pro Pro Leu Ser Ser Thr			
110	115	120	
GGA GAT GTG GCC AGC GAT AGT TAC AAC AAC GTC TAC CGC GAC ACA GAG	435		
Gly Asp Val Ala Ser Asp Ser Tyr Asn Asn Val Tyr Arg Asp Thr Glu			
125	130	135	
GGG CTG CGC GAA CTG GGG GTC ACC CAC TAC CGC TTC TCC ATA TCG TGG	483		
Gly Leu Arg Glu Leu Gly Val Thr His Tyr Arg Phe Ser Ile Ser Trp			
140	145	150	155
GCG CGG GTG CTC CCC AAT GGC ACC GCG GGC ACT CCC AAC CGC GAG GGC	531		
Ala Arg Val Leu Pro Asn Gly Thr Ala Gly Thr Pro Asn Arg Glu Gly			
160	165	170	
CTG CGC TAC TAC CGG CGG CTG CTG GAG CGG CTG CGG GAG CTG GGC GTG	579		

Leu Arg Tyr Tyr Arg Arg Leu Leu Glu Arg Leu Arg Glu Leu Gly Val	
175 180 185	
CAG CCG GTG GTT ACC CTG TAC CAT TGG GAC CTG CCA CAG CGC CTG CAG	627
Gln Pro Val Val Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Gln Arg Leu Gln	
190 195 200	
GAC ACC TAT GGC GGA TGG GCC AAT CGC GCC CTG GCC GAC CAT TTC AGG	675
Asp Thr Tyr Gly Gly Trp Ala Asn Arg Ala Leu Ala Asp His Phe Arg	
205 210 215	
GAT TAT GCC GAG CTC TGC TTC CGC CAC TTC GGT GGT CAG GTC AAG TAC	723
Asp Tyr Ala Glu Leu Cys Phe Arg His Phe Gly Gly Gln Val Lys Tyr	
220 225 230 235	
TGG ATC ACC ATT GAC AAC CCC TAC GTG GTG GCC TGG CAC GGG TAT GCC	771
Trp Ile Thr Ile Asp Asn Pro Tyr Val Val Ala Trp His Gly Tyr Ala	
240 245 250	
ACC GGG CGC CTG GCC CCG GGC GTG AGG GGC AGC TCC AGG CTC GGG TAC	819
Thr Gly Arg Leu Ala Pro Gly Val Arg Gly Ser Ser Arg Leu Gly Tyr	
255 260 265	
CTG GTT GCC CAC AAC CTA CTT TTG GCT CAT GCC AAA GTC TGG CAT CTC	867
Leu Val Ala His Asn Leu Leu Leu Ala His Ala Lys Val Trp His Leu	
270 275 280	
TAC AAC ACC TCT TTC CGC CCC ACA CAG GGA GGC CGG GTG TCT ATC GCC	915
Tyr Asn Thr Ser Phe Arg Pro Thr Gln Gly Gly Arg Val Ser Ile Ala	
285 290 295	
TTA AGC TCC CAT TGG ATC AAT CCT CGA AGA ATG ACT GAC TAT AAT ATC	963
Leu Ser Ser His Trp Ile Asn Pro Arg Arg Met Thr Asp Tyr Asn Ile	
300 305 310 315	

AGA GAA TGC CAG AAG TCT CTT GAC TTT GTG CTA GGC TGG TTT GCC AAA	1011
Arg Glu Cys Gln Lys Ser Leu Asp Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys	
320 325 330	
CCC ATA TTT ATT GAT GGC GAC TAC CCA GAG AGT ATG AAG AAC AAC CTC	1059
Pro Ile Phe Ile Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu	
335 340 345	
TCG TCT CTT CTG CCT GAT TTT ACT GAA TCT GAG AAG AGG CTC ATC AGA	1107
Ser Ser Leu Leu Pro Asp Phe Thr Glu Ser Glu Lys Arg Leu Ile Arg	
350 355 360	
GGA ACT GCT GAC TTT TTT GCT CTC TCC TTC GGA CCA ACC TTG AGC TTT	1155
Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala Leu Ser Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe	
365 370 375	
CAG CTA TTG GAC CCT AAC ATG AAG TTC CGC CAA TTG GAG TCT CCC AAC	1203
Gln Leu Leu Asp Pro Asn Met Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn	
380 385 390 395	
CTG AGG CAG CTT CTG TCT TGG ATA GAT CTG GAA TAT AAC CAC CCT CCA	1251
Leu Arg Gln Leu Leu Ser Trp Ile Asp Leu Glu Tyr Asn His Pro Pro	
400 405 410	
ATA TTT ATT GTG GAA AAT GGC TGG TTT GTC TCG GGA ACC ACC AAA AGG	1299
Ile Phe Ile Val Glu Asn Gly Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg	
415 420 425	
GAT GAT GCC AAA TAT ATG TAT TAT CTC AAG AAG TTC ATA ATG GAA ACC	1347
Asp Asp Ala Lys Tyr Met Tyr Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr	
430 435 440	
TTA AAA GCA ATC AGA CTG GAT GGG GTC GAC GTC ATT GGG TAC ACC GCG	1395
Leu Lys Ala Ile Arg Leu Asp Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala	

445	450	455	
TGG TCG CTC ATG GAC GGT TTC GAG TGG CAT AGG GGC TAC AGC ATC CGG			1443
Trp Ser Leu Met Asp Gly Phe Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg			
460	465	470	475
CGA GGA CTC TTC TAC GTT GAC TTT CTG AGT CAG GAC AAG GAG CTG TTG			1491
Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp Phe Leu Ser Gln Asp Lys Glu Leu Leu			
480	485	490	
CCA AAG TCT TCG GCC TTG TTC TAC CAA AAG CTG ATA GAG GAC AAT GGC			1539
Pro Lys Ser Ser Ala Leu Phe Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Asp Asn Gly			
495	500	505	
TTT CCT CCT TTA CCT GAA AAC CAG CCC CTT GAA GGG ACA TTT CCC TGT			1587
Phe Pro Pro Leu Pro Glu Asn Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys			
510	515	520	
GAC TTT GCT TGG GGA GTT GTT GAC AAC TAC GTT CAA GTG GAC ACT ACT			1635
Asp Phe Ala Trp Gly Val Val Asp Asn Tyr Val Gln Val Asp Thr Thr			
525	530	535	
CTC TCT CAG TTT ACT GAC CCG AAT GTC TAT CTG TGG GAT GTG CAT CAC			1683
Leu Ser Gln Phe Thr Asp Pro Asn Val Tyr Leu Trp Asp Val His His			
540	545	550	555
AGT AAG AGG CTT ATT AAA GTA GAC GGG GTT GTA GCC AAG AAG AGA AAA			1731
Ser Lys Arg Leu Ile Lys Val Asp Gly Val Val Ala Lys Lys Arg Lys			
560	565	570	
CCT TAC TGT GTT GAT TTC TCT GCC ATC CGG CCT CAG ATA ACC TTA CTT			1779
Pro Tyr Cys Val Asp Phe Ser Ala Ile Arg Pro Gln Ile Thr Leu Leu			
575	580	585	
CGA GAA ATG CGG GTC ACC CAC TTT CGC TTC TCC CTG GAC TGG GCC CTG			1827

Arg Glu Met Arg Val Thr His Phe Arg Phe Ser Leu Asp Trp Ala Leu	
590	595
600	
ATC TTG CCT CTG GGT AAC CAG ACC CAA GTG AAC CAC ACG GTT CTG CAC	1875
Ile Leu Pro Leu Gly Asn Gln Thr Gln Val Asn His Thr Val Leu His	
605	610
615	
TTC TAC CGC TGC ATG ATC AGC GAG CTG GTG CAC GCC AAC ATC ACT CCA	1923
Phe Tyr Arg Cys Met Ile Ser Glu Leu Val His Ala Asn Ile Thr Pro	
620	625
630	635
GTG GTG GCC CTG TGG CAG CCA GCA GCC CCG CAC CAA GGC CTG CCA CAT	1971
Val Val Ala Leu Trp Gln Pro Ala Ala Pro His Gln Gly Leu Pro His	
640	645
650	
GCC CTT GCA AAA CAT GGG GCC TGG GAG AAC CCG CAC ACT GCT CTG GCG	2019
Ala Leu Ala Lys His Gly Ala Trp Glu Asn Pro His Thr Ala Leu Ala	
655	660
665	
TTT GCA GAC TAC GCA AAC CTG TGT TTT AAA GAG TTG GGT CAC TGG GTC	2067
Phe Ala Asp Tyr Ala Asn Leu Cys Phe Lys Glu Leu Gly His Trp Val	
670	675
680	
AAT CTC TGG ATC ACC ATG AAC GAG CCA AAC ACA CGG AAC ATG ACC TAT	2115
Asn Leu Trp Ile Thr Met Asn Glu Pro Asn Thr Arg Asn Met Thr Tyr	
685	690
695	
CGT GCC GGG CAC CAC CTC CTG AGA GCC CAT GCC TTG GCT TGG CAT CTG	2163
Arg Ala Gly His His Leu Leu Arg Ala His Ala Leu Ala Trp His Leu	
700	705
710	715
TAC GAT GAC AAG TTT AGG GCG GCT CAG AAA GGC AAA ATA TCC ATC GCC	2211
Tyr Asp Asp Lys Phe Arg Ala Ala Gln Lys Gly Lys Ile Ser Ile Ala	
720	725
730	

TTG CAG GCT GAC TGG ATA GAA CCG GCC TGC CCT TTC TCT CAA AAT GAC	2259
Leu Gln Ala Asp Trp Ile Glu Pro Ala Cys Pro Phe Ser Gln Asn Asp	
735 740 745	
AAA GAA GTG GCC GAG AGA GTT TTG GAA TTT GAT ATA GGC TGG CTG GCA	2307
Lys Glu Val Ala Glu Arg Val Leu Glu Phe Asp Ile Gly Trp Leu Ala	
750 755 760	
GAG CCT ATT TTT GGT TCC GGA GAT TAT CCA CGT GTG ATG AGG GAC TGG	2355
Glu Pro Ile Phe Gly Ser Gly Asp Tyr Pro Arg Val Met Arg Asp Trp	
765 770 775	
CTG AAC CAA AAA AAC AAT TTT CTT TTG CCC TAT TTC ACC GAA GAT GAA	2403
Leu Asn Gln Lys Asn Asn Phe Leu Leu Pro Tyr Phe Thr Glu Asp Glu	
780 785 790 795	
AAA AAG CTA GTC CGG GGT TCC TTT GAC TTC CTG GCG GTG AGT CAT TAC	2451
Lys Lys Leu Val Arg Gly Ser Phe Asp Phe Leu Ala Val Ser His Tyr	
800 805 810	
ACC ACC ATT CTG GTA GAC TGG GAA AAG GAG GAT CCG ATG AAA TAC AAC	2499
Thr Thr Ile Leu Val Asp Trp Glu Lys Glu Asp Pro Met Lys Tyr Asn	
815 820 825	
GAT TAC TTG GAG GTA CAG GAG ATG ACT GAC ATC ACA TGG CTC AAC TCT	2547
Asp Tyr Leu Glu Val Gln Glu Met Thr Asp Ile Thr Trp Leu Asn Ser	
830 835 840	
CCC AGT CAG GTG GCA GTG GTG CCT TGG GGG CTG CGC AAA GTG CTC AAC	2595
Pro Ser Gln Val Ala Val Val Pro Trp Gly Leu Arg Lys Val Leu Asn	
845 850 855	
TGG CTA AGG TTC AAG TAC GGA GAC CTC CCG ATG TAT GTG ACA GCC AAT	2643
Trp Leu Arg Phe Lys Tyr Gly Asp Leu Pro Met Tyr Val Thr Ala Asn	

860	865	870	875	
GGA ATC GAT GAT GAC CCC CAC GCC GAG CAA GAC TCA CTG AGG ATC TAT				2691
Gly Ile Asp Asp Asp Pro His Ala Glu Gln Asp Ser Leu Arg Ile Tyr				
880	885	890		
TAT ATT AAG AAT TAT GTG AAT GAG GCT CTG AAA GCC TAC GTG TTG GAC				2739
Tyr Ile Lys Asn Tyr Val Asn Glu Ala Leu Lys Ala Tyr Val Leu Asp				
895	900	905		
GAC ATC AAC CTT TGT GGC TAC TTT GCG TAT TCA CTT AGT GAT CGC TCA				2787
Asp Ile Asn Leu Cys Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser Leu Ser Asp Arg Ser				
910	915	920		
GCT CCC AAG TCT GGC TTT TAT CGA TAT GCT GCG AAT CAG TTT GAG CCC				2835
Ala Pro Lys Ser Gly Phe Tyr Arg Tyr Ala Ala Asn Gln Phe Glu Pro				
925	930	935		
AAA CCA TCT ATG AAA CAT TAC AGG AGA ATT ATT GAC AGC AAT GGC TTC				2883
Lys Pro Ser Met Lys His Tyr Arg Arg Ile Ile Asp Ser Asn Gly Phe				
940	945	950	955	
CTG GGT TCT GGA ACA CTG GGA AGG TTT TGT CCA GAA GAA TAC ACT GTG				2931
Leu Gly Ser Gly Thr Leu Gly Arg Phe Cys Pro Glu Glu Tyr Thr Val				
960	965	970		
TGC ACC GAA TGT GGA TTT TTT CAA ACC CGG AAG TCT TTG CTG GTC TTC				2979
Cys Thr Glu Cys Gly Phe Phe Gln Thr Arg Lys Ser Leu Leu Val Phe				
975	980	985		
ATC TCG TTT CTT GTT TTT ACT TTT ATT ATT TCT CTT GCT CTC ATT TTT				3027
Ile Ser Phe Leu Val Phe Thr Phe Ile Ile Ser Leu Ala Leu Ile Phe				
990	995	1000		
CAC TAC TCC AAG AAA GGC CAG AGA AGT TAT AAG TAATGTGAAC GTCTGCCTGG				3080

His Tyr Ser Lys Lys Gly Gln Arg Ser Tyr Lys

1005

1010

CCATTTCGCTT TGGGATCAAG ATGTACACGC CGTCAGCCGT TTGCACCTCT CTGTGTTGTG 3140
 AGCCGCATTC CACACATTTT GATTCTAGAA AACCCTTTTT GTCATGGGTG GTAGAGGTTT 3200
 TAAACAGGAA TTGGTGAGAA TAAATATTG CAGGGTGAAT GGTATCTGAA TCTGCTCTCT 3260
 TTGGTGGCAA TTACGGAATT ATACTACCA CAGTTTCTAC AGTGCCCCGG AATGGAAGGC 3320
 ATAGAATACG GTAGGGATAA CAGTGCCAAG CAGACAGAAG TTAAAGAAG AACTTTAGGG 3380
 ACTTGTTTAT CCATGGCCAT TTTAAATTC ACTCCTGTTG GGGAGTAACA CTCTCTCAAT 3440
 TACCATCTTA ACACCTGGAC TTTACCTGAT CCAGTTTAC AAGGTGAAGT AGAAAAATAT 3500
 CCAGTAAAGG TGGCCAAGAG CCCTGAGTCC AGAGCAGCCC ATTAAGAAGC ACTATTCCTA 3560
 CCAAATGCTG CTAATGTCAA TTTACAAATA TACTTAGAAA GCACATTATG GACATTTGTA 3620
 TTCTTGTAAG TGTTTTTGAG GTGTGCCCTA AACCCAGAT CCTTGAGGGC TTTCTCTTAC 3680
 CAACTTTCCT TTCAGAGCCT GCTTGTGGA GATTCTTCCC CAGCCCCCTT CCCCTTCCC 3740
 TCTTGCTCTG CCCACCTCG CTCCACCCAG CTGCTCCAG CCCAAAGATT CTTTATTTGT 3800
 TTCTCATTAC CGAAGGTTGT GAGCCACCAT GTGGTTTCTG GGATTTGAAC TCATGACCTC 3860
 CGGAGGAGCT GTCATGCTCT TAACCAGCCC ATGTTGAAGA TTCTTTTGAT AAATATTCAC 3920
 AAAAAATAAA GATGAGCCAT GAGCTGTTGG CCTCTTCGGA AGCGGAAACT GAGTGATTGT 3980
 ATTGAACATC CTTTTATCTT TGACCAGACC TTGGAATGAA TGCAATGACC TTTCCACAG 4040
 GAAGAAGGAG GAGCTCTCAG TCAAACGTGA AAGAATGCCT CTTCAGAATA TGCTGTCAGT 4100
 GCTTGGAATG CATGATGTTT AACTTTCTTA GTCGATCCGG CAGCAATCAC AGTGTGAGCA 4160
 CACTGGGAAC CTGTCCTTGC GGCCGCCGAG ATCTACCGTG TGCTTCTGTG AAGAGGCTTT 4220
 GACGTAGCCC CTCTTTGAGC TCTTACACCA TGCTACTGAC TTCTAGAAAG GCTAATTAGG 4280
 TCTTCTTCTA CACCTAATAC CCTAAGTCTT ACTGACTCTC ACGGAGAAG TCTCTGTGCT 4340
 ACACCTGAGT GGTCTTATTG ATAACCCTGA TACCAGATCA GGCAAGATAA ATCCGTCATA 4400
 GCAGGCATGG CTACCCTTGC TGCCACAGGG TCACAGACA TAGCTCATCA CCCTGTTATT 4460
 CTTTCATCTG CAATGTGGTA TGGTTTTCCT GGTGAATGAT CAGCTTTTGC TGTGGTATTC 4520

 TTTATACATC TGGACTTATT ATTGAAATCA AATGCTATAG AATCAATAGT TTATTTTATG 4580
 TCTATTTTTC TTGATCGCAG AGTAATATAT ATTAATTGTA AAAAATTTAA GAAACAAAAA 4640
 CTATATGTAA AGAAAAAATT ATAATATAAT ACAGAGATGC TGCTGACAGT TCCTATGTGT 4700
 TGTGTTTTGT ATACTGAGAT CATGTGATAC GTAGGCATAC ATCTTCTTGG GTTTTTTTGT 4760
 TTTTGTTTTT TGTTTTGTTT TGTTTTGTTT TGGTTTTTTG AGATAGGGTT TCTCTGTATA 4820
 GCCCTGGCTG TCCTGGAAC CACTTTCAG ACCAGGCTAG CCTCAAACTC TTATTCATTT 4880
 TTAAGTGAAGT AATTTTCTG TCATTAGTCT TCAAGAGCAA AACTTTAATA GTTATGGAGA 4940
 ATATTGCCAG AACAGCTCAA AACTGTTTTA TTTGTTGGTC CAATTTCCCA TTAATTAGTT 5000
 CAATAATAAA TATCATTTAG AAATAAAAAA AA 5032

서열: 9

서열의 길이: 1650

서열 형: 핵산

쇄의 수: 이본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: mRNA에 대한 cDNA

기원:

생물명: 마우스

장기: 신장

서열의 특징:

특징을 나타내는 기호: CDS

존재위치: 1..1650

특징을 결정하는 방법: E

서열 9

ATG CTA GCC CGC GCC CCT CCT CGC CGC CCG CCG CGG CTG GTG CTG CTC

48

Met Leu Ala Arg Ala Pro Pro Arg Arg Pro Pro Arg Leu Val Leu Leu

1	5	10	15	
CGT TTG CTG TTG CTG CAT CTG CTG CTG CTC GCC CTG CGC GCC CGC TGC				96
Arg Leu Leu Leu Leu His Leu Leu Leu Leu Ala Leu Arg Ala Arg Cys				
20	25	30		
CTG AGC GCT GAG CCG GGT CAG GGC GCG CAG ACC TGG GCT CGC TTC GCG				144
Leu Ser Ala Glu Pro Gly Gln Gly Ala Gln Thr Trp Ala Arg Phe Ala				
35	40	45		
CGC GCT CCT GCC CCA GAG GCC GCT GGC CTC CTC CAC GAC ACC TTC CCC				192
Arg Ala Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Leu Leu His Asp Thr Phe Pro				
50	55	60		
GAC GGT TTC CTC TGG GCG GTA GGC AGC GCC GCC TAT CAG ACC GAG GGC				240
Asp Gly Phe Leu Trp Ala Val Gly Ser Ala Ala Tyr Gln Thr Glu Gly				
65	70	75	80	
GGC TGG CGA CAG CAC GGC AAA GGC GCG TCC ATC TGG GAC ACT TTC ACC				288
Gly Trp Arg Gln His Gly Lys Gly Ala Ser Ile Trp Asp Thr Phe Thr				
85	90	95		
CAT CAC TCT GGG GCG GCC CCG TCC GAC TCC CCG ATC GTC GTG GCG CCG				336
His His Ser Gly Ala Ala Pro Ser Asp Ser Pro Ile Val Val Ala Pro				
100	105	110		
TCG GGT GCC CCG TCG CCT CCC CTG TCC TCC ACT GGA GAT GTG GCC AGC				384
Ser Gly Ala Pro Ser Pro Pro Leu Ser Ser Thr Gly Asp Val Ala Ser				
115	120	125		
GAT AGT TAC AAC AAC GTC TAC CGC GAC ACA GAG GGG CTG CGC GAA CTG				432
Asp Ser Tyr Asn Asn Val Tyr Arg Asp Thr Glu Gly Leu Arg Glu Leu				
130	135	140		
GGG GTC ACC CAC TAC CGC TTC TCC ATA TCG TGG GCG CGG GTG CTC CCC				480

CGC CCC ACA CAG GGA GGC CGG GTG TCT ATC GCC TTA AGC TCC CAT TGG	912
Arg Pro Thr Gln Gly Gly Arg Val Ser Ile Ala Leu Ser Ser His Trp	
290 295 300	
ATC AAT CCT CGA AGA ATG ACT GAC TAT AAT ATC AGA GAA TGC CAG AAG	960
Ile Asn Pro Arg Arg Met Thr Asp Tyr Asn Ile Arg Glu Cys Gln Lys	
305 310 315 320	
TCT CTT GAC TTT GTG CTA GGC TGG TTT GCC AAA CCC ATA TTT ATT GAT	1008
Ser Leu Asp Phe Val Leu Gly Trp Phe Ala Lys Pro Ile Phe Ile Asp	
325 330 335	
GGC GAC TAC CCA GAG AGT ATG AAG AAC AAC CTC TCG TCT CTT CTG CCT	1056
Gly Asp Tyr Pro Glu Ser Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Leu Leu Pro	
340 345 350	
GAT TTT ACT GAA TCT GAG AAG AGG CTC ATC AGA GGA ACT GCT GAC TTT	1104
Asp Phe Thr Glu Ser Glu Lys Arg Leu Ile Arg Gly Thr Ala Asp Phe	
355 360 365	
TTT GCT CTC TGC TTC GGA CCA ACC TTG AGC TTT CAG CTA TTG GAC CCT	1152
Phe Ala Leu Cys Phe Gly Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro	
370 375 380	
AAC ATG AAG TTC CGC CAA TTG GAG TCT CCC AAC CTG AGG CAG CTT CTs	1200
Asn Met Lys Phe Arg Gln Leu Glu Ser Pro Asn Leu Arg Gln Leu Leu	
385 390 395 400	
TCT TGG ATA GAT CTG GAA TAT AAC CAC CCT CCA ATA TTT ATT GTG GAA	1248
Ser Trp Ile Asp Leu Glu Tyr Asn His Pro Pro Ile Phe Ile Val Glu	
405 410 415	
AAT GGC TGG TTT GTC TCG GGA ACC ACC AAA AGG GAT GAT GCC AAA TAT	1296
Asn Gly Trp Phe Val Ser Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr	

420	425	430	
ATG TAT TAT CTC AAG AAG TTC ATA ATG GAA ACC TTA AAA GCA ATC AGA			1344
Met Tyr Tyr Leu Lys Lys Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Arg			
435	440	445	
CTG GAT GGG GTC GAC GTC ATT GGG TAC ACC GCG TGG TCG CTC ATG GAC			1392
Leu Asp Gly Val Asp Val Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp			
450	455	460	
GGT TTC GAG TGG CAT AGG GGC TAC AGC ATC CGG CGA GGA CTC TTC TAC			1440
Gly Phe Glu Trp His Arg Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr			
465	470	475	480
GTT GAC TTT CTG AGT CAG GAC AAG GAG CTG TTG CCA AAG TCT TCG GCC			1488
Val Asp Phe Leu Ser Gln Asp Lys Glu Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala			
485	490	495	
TTG TTC TAC CAA AAG CTG ATA GAG GAC AAT GGC TTT CCT CCT TTA CCT			1536
Leu Phe Tyr Gln Lys Leu Ile Glu Asp Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro			
500	505	510	
GAA AAC CAG CCC CTT GAA GGG ACA TTT CCC TGT GAC TTT GCT TGG GGA			1584
Glu Asn Gln Pro Leu Glu Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly			
515	520	525	
GTT GTT GAC AAC TAC GTA CAA GTA AGT CCT TTG ACA AAA CCC AGT GTC			1632
Val Val Asp Asn Tyr Val Gln Val Ser Pro Leu Thr Lys Pro Ser Val			
530	535	540	
GGC CTC TTG CTT CCT CAC			1650
Gly Leu Leu Leu Pro His			
545	550		

서열: 10

서열의 길이: 3460

서열 형: 핵산

쇄의 수: 이본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: mRNA에 대한 cDNA

기원:

생물명: 사람

장기: 췌장

서열의 특징:

특징을 나타내는 기호: CDS

존재위치: 60..3107

특징을 결정하는 방법: E

서열 10

CAGGGAATGA ATGGATTTTC TTCAGCACTG ATGAAATAAC CACACGCTAT AGGAATACA	59
ATG TCC AAC GGG GGA TTG CAA AGA TCT GTC ATC CTG TCA GCA CTT ATT	107
Met Ser Asn Gly Gly Leu Gln Arg Ser Val Ile Leu Ser Ala Leu Ile	
1 5 10 15	
CTG CTA CGA GCT GTT ACT GGA TTC TCT GGA GAT GGA AGA GCT ATA TGG	155
Leu Leu Arg Ala Val Thr Gly Phe Ser Gly Asp Gly Arg Ala Ile Trp	
20 25 30	
TCT AAA AAT CCT AAT TTT ACT CCG GTA AAT GAA AGT CAG CTG TTT CTC	203
Ser Lys Asn Pro Asn Phe Thr Pro Val Asn Glu Ser Gln Leu Phe Leu	
35 40 45	
TAT GGC ACT TTC CCT AAA AAC TTT TTC TGG GGT ATT GGG ACT GGA GCA	251
Tyr Gly Thr Phe Pro Lys Asn Phe Phe Trp Gly Ile Gly Thr Gly Ala	

50	55	60	
TTG CAA GTG GAA GGG AGT TGG AAG AAG GAT GGA AAA GGA CCT TCT ATA			299
Leu Gln Val Glu Gly Ser Trp Lys Lys Asp Gly Lys Gly Pro Ser Ile			
65	70	75	80
TGG GAT CAT TTC ATC CAC ACA CAC CTT AAA AAT GTC AGC AGC ACG AAT			347
Trp Asp His Phe Ile His Thr His Leu Lys Asn Val Ser Ser Thr Asn			
85	90	95	
GGT TCC AGT GAC AGT TAT ATT TTT CTG GAA AAA GAC TTA TCA GCC CTG			395
Gly Ser Ser Asp Ser Tyr Ile Phe Leu Glu Lys Asp Leu Ser Ala Leu			
100	105	110	
GAT TTT ATA GGA GTT TCT TTT TAT CAA TTT TCA ATT TCC TGG CCA AGG			443
Asp Phe Ile Gly Val Ser Phe Tyr Gln Phe Ser Ile Ser Trp Pro Arg			
115	120	125	
CTT TTC CCC GAT GGA ATA GTA ACA GTT GCC AAC GCA AAA GGT CTG CAG			491
Leu Phe Pro Asp Gly Ile Val Thr Val Ala Asn Ala Lys Gly Leu Gln			
130	135	140	
TAC TAC AGT ACT CTT CTG GAC GCT CTA GTG CTT AGA AAC ATT GAA CCT			539
Tyr Tyr Ser Thr Leu Leu Asp Ala Leu Val Leu Arg Asn Ile Glu Pro			
145	150	155	160
ATA GTT ACT TTA TAC CAC TGG GAT TTG CCT TTG GCA CTA CAA GAA AAA			587
Ile Val Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu Pro Leu Ala Leu Gln Glu Lys			
165	170	175	
TAT GGG GGG TGG AAA AAT GAT ACC ATA ATA GAT ATC TTC AAT GAC TAT			635
Tyr Gly Gly Trp Lys Asn Asp Thr Ile Ile Asp Ile Phe Asn Asp Tyr			
180	185	190	
GCC ACA TAC TGT TTC CAG ATG TTT GGG GAC CGT GTC AAA TAT TGG ATT			683

ACA GCT GAT TTC TTT GCC TTT TCT TTT GGA CCC AAC AAC TTC AAG CCC	1115
Thr Ala Asp Phe Phe Ala Phe Ser Phe Gly Pro Asn Asn Phe Lys Pro	
340 345 350	
CTA AAC ACC ATG GCT AAA ATG GGA CAA AAT GTT TCA CTT AAT TTA AGA	1163
Leu Asn Thr Met Ala Lys Met Gly Gln Asn Val Ser Leu Asn Leu Arg	
355 360 365	
GAA GCG CTG AAC TGG ATT AAA CTG GAA TAC AAC AAC CCT CGA ATC TTG	1211
Glu Ala Leu Asn Trp Ile Lys Leu Glu Tyr Asn Asn Pro Arg Ile Leu	
370 375 380	
ATT GCT GAG AAT GGC TGG TTC ACA GAC AGT CGT GTG AAA ACA GAA GAC	1259
Ile Ala Glu Asn Gly Trp Phe Thr Asp Ser Arg Val Lys Thr Glu Asp	
385 390 395 400	
ACC ACG GCC ATC TAC ATG ATG AAG AAT TTC CTC AGC CAG GTG CTT CAA	1307
Thr Thr Ala Ile Tyr Met Met Lys Asn Phe Leu Ser Gln Val Leu Gln	
405 410 415	
GCA ATA AGG TTA GAT GAA ATA CGA GTG TTT GGT TAT ACT GCC TGG TCT	1355
Ala Ile Arg Leu Asp Glu Ile Arg Val Phe Gly Tyr Thr Ala Trp Ser	
420 425 430	
CTC CTG GAT GGC TTT GAA TGG CAG GAT GCT TAC ACC ATC CGC CGA GGA	1403
Leu Leu Asp Gly Phe Glu Trp Gln Asp Ala Tyr Thr Ile Arg Arg Gly	
435 440 445	
TTA TTT TAT GTG GAT TTT AAC AGT AAA CAG AAA GAG CGG AAA CCT AAG	1451
Leu Phe Tyr Val Asp Phe Asn Ser Lys Gln Lys Glu Arg Lys Pro Lys	
450 455 460	
TCT TCA GCA CAC TAC TAC AAA CAG ATC ATA CGA GAA AAT GGT TTT TCT	1499
Ser Ser Ala His Tyr Tyr Lys Gln Ile Ile Arg Glu Asn Gly Phe Ser	

465	470	475	480	
TTA AAA GAG TCC ACG CCA GAT GTG CAG GGC CAG TTT CCC TGT GAC TTC				1547
Leu Lys Glu Ser Thr Pro Asp Val Gln Gly Gln Phe Pro Cys Asp Phe				
	485	490	495	
TCC TGG GGT GTC ACT GAA TCT GTT CTT AAG CCC GAG TCT GTG GCT TCG				1595
Ser Trp Gly Val Thr Glu Ser Val Leu Lys Pro Glu Ser Val Ala Ser				
	500	505	510	
TCC CCA CAG TTC AGC GAT CCT CAT CTG TAC GTG TGG AAC GCC ACT GGC				1643
Ser Pro Gln Phe Ser Asp Pro His Leu Tyr Val Trp Asn Ala Thr Gly				
	515	520	525	
AAC AGA CTG TTG CAC CGA GTG GAA GGG GTG AGG CTG AAA ACA CGA CCC				1691
Asn Arg Leu Leu His Arg Val Glu Gly Val Arg Leu Lys Thr Arg Pro				
	530	535	540	
GCT CAA TGC ACA GAT TTT GTA AAC ATC AAA AAA CAA CTT GAG ATG TTG				1739
Ala Gln Cys Thr Asp Phe Val Asn Ile Lys Lys Gln Leu Glu Met Leu				
	545	550	555	560
GCA AGA ATG AAA GTC ACC CAC TAC CGG TTT GCT CTG GAT TGG GCC TCG				1787
Ala Arg Met Lys Val Thr His Tyr Arg Phe Ala Leu Asp Trp Ala Ser				
	565	570	575	
GTC CTT CCC ACT GGC AAC CTG TCC GCG GTG AAC CGA CAG GCC CTG AGG				1835
Val Leu Pro Thr Gly Asn Leu Ser Ala Val Asn Arg Gln Ala Leu Arg				
	580	585	590	
TAC TAC AGG TGC GTG GTC AGT GAG GGG CTG AAG CTT GGC ATC TCC GCG				1883
Tyr Tyr Arg Cys Val Val Ser Glu Gly Leu Lys Leu Gly Ile Ser Ala				
	595	600	605	
ATG GTC ACC CTG TAT TAT CCG ACC CAC GCC CAC CTA GGC CTC CCC GAG				1931

Met Val Thr Leu Tyr Tyr Pro Thr His Ala His Leu Gly Leu Pro Glu	
610 615 620	
CCT CTG TTG CAT GCC GAC GGG TGG CTG AAC CCA TCG ACG GCC GAG GCC	1979
Pro Leu Leu His Ala Asp Gly Trp Leu Asn Pro Ser Thr Ala Glu Ala	
625 630 635 640	
TTC CAG GCC TAC GCT GGG CTG TGC TTC CAG GAG CTG GGG GAC CTG GTG	2027
Phe Gln Ala Tyr Ala Gly Leu Cys Phe Gln Glu Leu Gly Asp Leu Val	
645 650 655	
AAG CTC TGG ATC ACC ATC AAC GAG CCT AAC CGG CTA AGT GAC ATC TAC	2075
Lys Leu Trp Ile Thr Ile Asn Glu Pro Asn Arg Leu Ser Asp Ile Tyr	
660 665 670	
AAC CGC TCT GGC AAC GAC ACC TAC GGG GCG GCG CAC AAC CTG CTG GTG	2123
Asn Arg Ser Gly Asn Asp Thr Tyr Gly Ala Ala His Asn Leu Leu Val	
675 680 685	
GCC CAC GCC CTG GCC TGG CGC CTC TAC GAC CAG CAG TTC AGG CCG TCA	2171
Ala His Ala Leu Ala Trp Arg Leu Tyr Asp Gln Gln Phe Arg Pro Ser	
690 695 700	
CAG CGC GGG GCC GTG TCG CTG TCG CTG CAC GCG GAC TGG GCG GAA CCC	2219
Gln Arg Gly Ala Val Ser Leu Ser Leu His Ala Asp Trp Ala Glu Pro	
705 710 715 720	
GCC AAC CCC TAT GCT GAC TCG CAC TGG AGG GCG GCC GAG CGC TTC CTG	2267
Ala Asn Pro Tyr Ala Asp Ser His Trp Arg Ala Ala Glu Arg Phe Leu	
725 730 735	
CAG TTC GAG ATC GCC TGG TTC GCC GAG CCG CTC TTC AAG ACC GGG GAC	2315
Gln Phe Glu Ile Ala Trp Phe Ala Glu Pro Leu Phe Lys Thr Gly Asp	
740 745 750	

TAC CCC GCG GCC ATG AGG GAA TAC ATT GCC TCC AAG CAC CGA CGG GGG	2363
Tyr Pro Ala Ala Met Arg Glu Tyr Ile Ala Ser Lys His Arg Arg Gly	
755 760 765	
CTT TCC AGC TCG GCC CTG CCG CGC CTC ACC GAG GCC GAA AGG AGG CTG	2411
Leu Ser Ser Ser Ala Leu Pro Arg Leu Thr Glu Ala Glu Arg Arg Leu	
770 775 780	
CTC AAG GGC ACG GTC GAC TTC TGC GCG CTC AAC CAC TTC ACC ACT AGG	2459
Leu Lys Gly Thr Val Asp Phe Cys Ala Leu Asn His Phe Thr Thr Arg	
785 790 795 800	
TTC GTG ATG CAC GAG CAG CTG GCC GGC AGC CGC TAC GAC TCG GAC AGG	2507
Phe Val Met His Glu Gln Leu Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Ser Asp Arg	
805 810 815	
GAC ATC CAG TTT CTG CAG GAC ATC ACC CGC CTG AGC TCC CCC ACG CGC	2555
Asp Ile Gln Phe Leu Gln Asp Ile Thr Arg Leu Ser Ser Pro Thr Arg	
820 825 830	
CTG GCT GTG ATT CCC TGG GGG GTG CGC AAG CTG CTG CGG TGG GTC CGG	2603
Leu Ala Val Ile Pro Trp Gly Val Arg Lys Leu Leu Arg Trp Val Arg	
835 840 845	
AGG AAC TAC GGC GAC ATG GAC ATT TAC ATC ACC GCC AGT GGC ATC GAC	2651
Arg Asn Tyr Gly Asp Met Asp Ile Tyr Ile Thr Ala Ser Gly Ile Asp	
850 855 860	
GAC CAG GCT CTG GAG GAT GAC CGG CTC CGG AAG TAC TAC CTA GGG AAG	2699
Asp Gln Ala Leu Glu Asp Asp Arg Leu Arg Lys Tyr Tyr Leu Gly Lys	
865 870 875 880	
TAC CTT CAG GAG GTG CTG AAA GCA TAC CTG ATT GAT AAA GTC AGA ATC	2747
Tyr Leu Gln Glu Val Leu Lys Ala Tyr Leu Ile Asp Lys Val Arg Ile	

885	890	895	
AAA GGC TAT TAT GCA TTC AAA CTG GCT GAA GAG AAA TCT AAA CCC AGA			2795
Lys Gly Tyr Tyr Ala Phe Lys Leu Ala Glu Glu Lys Ser Lys Pro Arg			
900	905	910	
TTT GGA TTC TTC ACA TCT GAT TTT AAA GCT AAA TCC TCA ATA CAA TTT			2843
Phe Gly Phe Phe Thr Ser Asp Phe Lys Ala Lys Ser Ser Ile Gln Phe			
915	920	925	
TAC AAC AAA GTG ATC AGC AGC AGG GGC TTC CCT TTT GAG AAC AGT AGT			2891
Tyr Asn Lys Val Ile Ser Ser Arg Gly Phe Pro Phe Glu Asn Ser Ser			
930	935	940	
TCT AGA TGC AGT CAG ACC CAA GAA AAT ACA GAG TGC ACT GTC TGC TTA			2939
Ser Arg Cys Ser Gln Thr Gln Glu Asn Thr Glu Cys Thr Val Cys Leu			
945	950	955	960
TTC CTT GTG CAG AAG AAA CCA CTG ATA TTC CTG GGT TGT TGC TTC TTC			2987
Phe Leu Val Gln Lys Lys Pro Leu Ile Phe Leu Gly Cys Cys Phe Phe			
965	970	975	
TCC ACC CTG GTT CTA CTC TTA TCA ATT GCC ATT TTT CAA AGG CAG AAG			3035
Ser Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln Lys			
980	985	990	
AGA AGA AAG TTT TGG AAA GCA AAA AAC TTA CAA CAC ATA CCA TTA AAG			3083
Arg Arg Lys Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro Leu Lys			
995	1000	1005	
AAA GGC AAG AGA GTT GTT AGC TAAACTGATC TGTCTGCATG ATAGACAGTT			3134
Lys Gly Lys Arg Val Val Ser			
1010	1015		
TAAAAATTCA TCCCAGTTCC ATATGCTGGT AACTTACAGG AGATATACCT GTATTATAGA			3194
AAGACAATCT GAGATACAGC TGTAACCAAG GTGATGACAA TTGTCTCTGC TGTGTGGTTC			3254
AAAGAACATT CCCTTAGGTG TTGACATCAG TGAAGTCAGT TCTTGGATGT AAACATAAAG			3314
GCTTCATCCT GACAGTAAGC TATGAGGATT ACATGCTACA TTGCTTCTTA AAGTTTCATC			3374
AACTGTATTC CATCATTCTG CTTTAGCTTT CATCTCTACC AATAGCTACT TGTGGTACAA			3434
TAAATTATTT TTAAGAAGAA AAAAAA			3460

서열: 11

서열의 길이: 20

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 11

AGGCTCATCA GAGGAACTGC

20

서열: 12

서열의 길이: 20

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 12

AAGACAGAAG CTGCCTCAGG

20

서열: 13

서열의 길이: 27

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 13

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

서열: 14

서열의 길이: 21

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 14

TTAGTGAGGA AGCAAGAGGC C

21

서열: 15

서열의 길이: 34

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 15

CAAAGCTTCC ACCATGCTAG CCCGCGCCCC TCCT

34

서열: 16

서열의 길이: 34

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 16

CAGGATCCTT AGTGAGGAAG CAAGAGGCCG ACAC

34

서열: 17

서열의 길이: 21

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 17

GGGTTTTGTC AAAGGACTTA C

21

서열: 18

서열의 길이: 20

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 18

AGGCTCATCA GAGGAACTGC

20

서열: 19

서열의 길이: 22

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 19

GACCAGGCTC TGGACGATGA CC

22

서열: 20

서열의 길이: 24

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 20

GTCTGACTGC ATCTAGAACT ACTG

24

서열: 21

서열의 길이: 43

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 21

CGATAAGCTA TGAAAACTAC AGCCTTGGAG GAAGCTTAAA TGG**43**

서열: 22

서열의 길이: 41

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 22

CCATTTAAGC TTCCTCCAAG GCTGTAGTTT TCATAGCTTA T**41**

서열: 23

서열의 길이: 44

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 23

AGCTTAAATG AGCTCGATAT CAAGGCCTAC CCGGGCGCCA TGCA**44**

서열: 24

서열의 길이: 36

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: DNA

기원: 합성 DNA

서열 24

TGGCGCCCGG GTAGGCCTTG ATATCGAGCT CATTTA**36**

서열: 25

서열의 길이: 18

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 25

CCTGGTCGAC CATTTACG**18**

서열: 26

서열의 길이: 25

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 26

AGCACAAAGT CGACAGACTT CTGGC

25

서열: 27

서열의 길이: 19

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 27

TGGAGATTGG AAGTGGACG

19

서열: 28

서열의 길이: 20

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 28

CAAGGACCAG TTCATCATCG

20

서열: 29

서열의 길이: 20

서열 형: 핵산

쇄의 수: 일본쇄

위상: 직쇄상

서열의 종류: 합성 DNA

서열 29

TTAAGGACTC CTGCATCTGC

20

(57) 청구의 범위

청구항 1

노화를 억제하는 활성을 갖는 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 폴리펩타이드가 서열 1, 2, 3, 4 및 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드, 또는 서열 1, 2, 3, 4 및 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드의 아미노산 서열에서 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드인 폴리펩타이드.

청구항 3

노화를 억제하는 활성을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA.

청구항 4

제3항에 있어서, DNA가 (a) 서열 1, 2, 3, 4 및 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA, (b) 서열 1, 2, 3, 4 및 5의 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드의 아미노산 서열에서 1개 이상의 아미노산이 결실, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 동시에 노화를 억제하는 활성을 갖는 펩타이드를 암호화하는 DNA 또는 (c) (a) 또는 (b)에 기재된 DNA와 엄격한 조건하에서 하이브리드화하는 DNA인 DNA.

청구항 5

제3항에 있어서, DNA가 서열 6, 7, 8, 9 및 10의 DNA 서열로부터 선택되는 DNA 서열을 갖는 DNA 또는 당해 DNA와 엄격한 조건하에서 하이브리드화하는 DNA인 DNA.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따른 DNA를 벡터에 삽입하여 수득되는 재조합체 DNA.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드를 인식하는 항체.

청구항 8

제7항에 따른 항체를 생성하는 하이브리도마.

청구항 9

제8항에 있어서, 하이브리도마가 KM 1902(FERM BP-5983), KM 2070(FERM BP-6 196), KM 2076(FERM BP-6197), KM 2105(FERM BP-6198), KM 2116(FERM BP-6199), KM 2119(FERM BP-6200)으로부터 선택되는 하이브리도마.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드를 함유하는 조기 노화증 치료제.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드를 함유하는 성인병 치료제.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드를 함유하는 노화 억제제.

청구항 13

제7항에 따른 항체를 사용하는 제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드의 면역학적 정량법.

청구항 14

제13항에 따른 정량법을 사용하는 노화 진단법.

청구항 15

제3항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따른 DNA를 함유하는 조기 노화증 치료용의 유전자 치료용 벡터.

청구항 16

제3항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따른 DNA를 함유하는 성인병 치료용의 유전자 치료용 벡터.

청구항 17

제3항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따른 DNA를 함유하는 노화 억제용의 유전자 치료용 벡터.

청구항 18

제6항에 따른 재조합체 DNA를 보유하는 형질전환체.

청구항 19

제18항에 있어서, 형질전환체가 *Escherichia coli* ENKM 101(FERM BP-5765), *Escherichia coli* ENKM 112(FERM BP-6184), *Escherichia coli* ENKM 103(FERM BP-5942), *Escherichia coli* ENKM 106(FERM BP-5767) 및 *Escherichia coli* XL1-Blue/pRYHH 02(FERM BP-6193)로부터 선택되는 형질전환체인 형질전환체.

청구항 20

제6항에 따른 재조합체 DNA를 보유하는 형질전환체를 배양액 속에서 배양하여 당해 재조합체 DNA가 암호화하는 노화 억제 폴리펩타이드를 당해 배양중에 생성축적시키고 당해 배양액으로부터 당해 폴리펩타이드를 채취하는 것을 특징으로 하는 노화 억제 폴리펩타이드의 제조법.

청구항 21

제3항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따른 DNA를 사용하는 가축의 개량법.

청구항 22

제21항에 있어서, 제3항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따른 DNA를 과잉으로 발현시키는 것을 특징으로 하는 가축의 개량법.

청구항 23

제3항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따른 DNA를 사용하여 제조되는 유전자결실 동물.

청구항 24

제3항 내지 제5항 중의 어느 한 항에 따른 DNA를 사용하여 제조되는 유전자치환 동물.

청구항 25

제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드와 피시험 시료를 접촉시키는 것을 특징으로 하는 제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드에 대한 리간드의 탐색법.

청구항 26

제25항에 따른 방법으로 수득되는 리간드.

청구항 27

(a) 제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드와 제26항에 따른 리간드를 접촉시키는 경우와 (b) 제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드와 제26항에 따른 리간드 및 시험 화합물을 접촉시킨 경우와의 비교를 수행하는 것을 특징으로 하는 제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드와 제26항에 따른 리간드의 특이적인 결합을 억제하는 화합물의 스크리닝법.

청구항 28

제27항에 따른 방법으로 수득되는 화합물.

청구항 29

제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드를 발현하는 세포와 피시험 시료를 접촉시키는 것을 특징으로 하는 제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 발현을 증강시키는 화합물의 스크리닝법.

청구항 30

제29항에 있어서, 발현의 증강을 제13항에 따른 정량법을 사용하여 검출하는 것을 특징으로 하는 스크리닝법.

청구항 31

제29항에 있어서, 발현의 증강을 제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는 mRNA량을 측정함으로써 검출하는 것을 특징으로 하는 스크리닝법.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중의 어느 한 항에 따른 스크리닝법에 의해 수득되는 화합물.

청구항 33

제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 전사를 제어하는 영역의 하류에 리포터 유전자가 연결된 DNA를 함유하는 플라스미드로 형질전환된 형질전환체와 피시험 시료를 접촉시키는 것을 특징으로 하는 제1항 또는 제2항에 따른 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자의 발현을 증강시키는 화합물의 스크리닝법.

청구항 34

제33항에 따른 스크리닝법에 의해 수득되는 화합물.

청구항 35

제26항, 제28항, 제32항 또는 제34항에 따른 화합물을 함유하는 조기 노화증 치료제.

청구항 36

제26항, 제28항, 제32항 또는 제34항에 따른 화합물을 함유하는 성인병 치료제.

청구항 37

제26항, 제28항, 제32항 또는 제34항에 따른 화합물을 함유하는 노화 억제제.

청구항 38

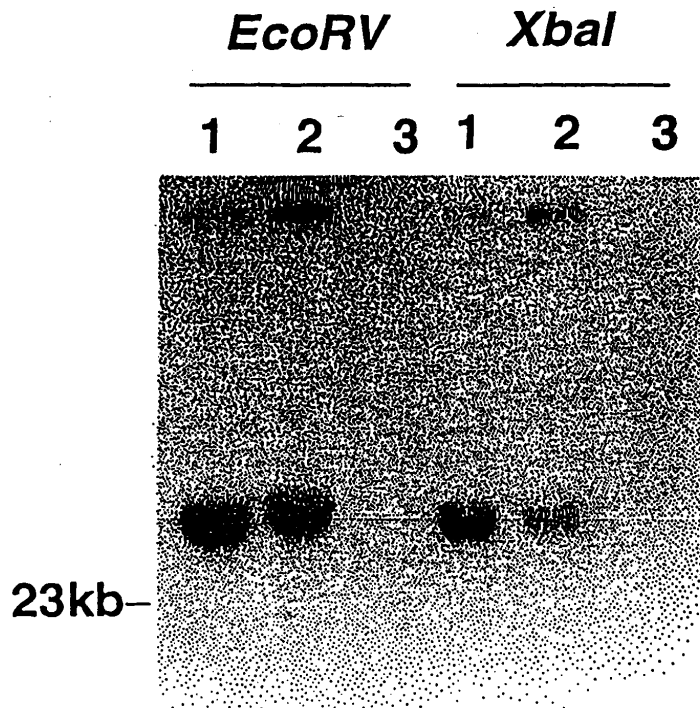
서열 6 내지 10에 기재된 염기 서열 중에서 선택되는 염기 서열 내의 연속하는 10 내지 50개 염기와 동일한 서열 또는 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 39

제38항에 따른 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 진단용 시약.

도면

도면1

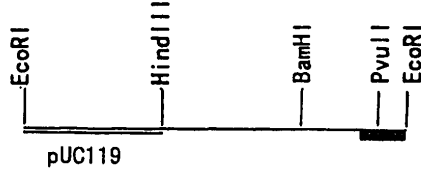


도면2

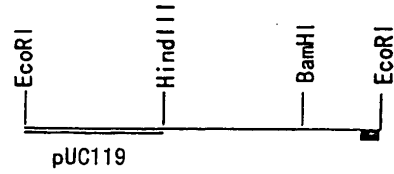
도입유전자



플라스미드 50



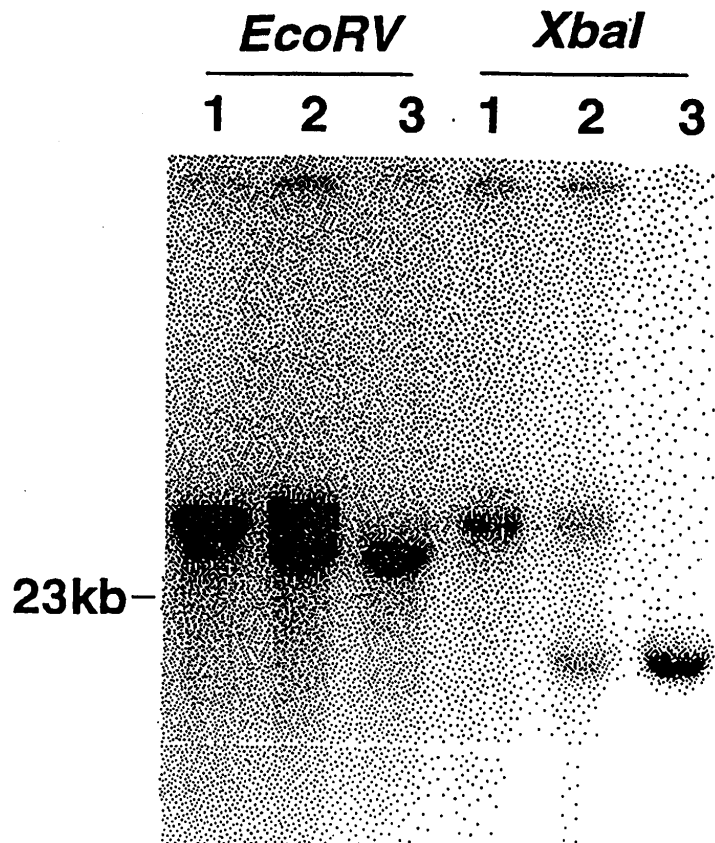
플라스미드 E70



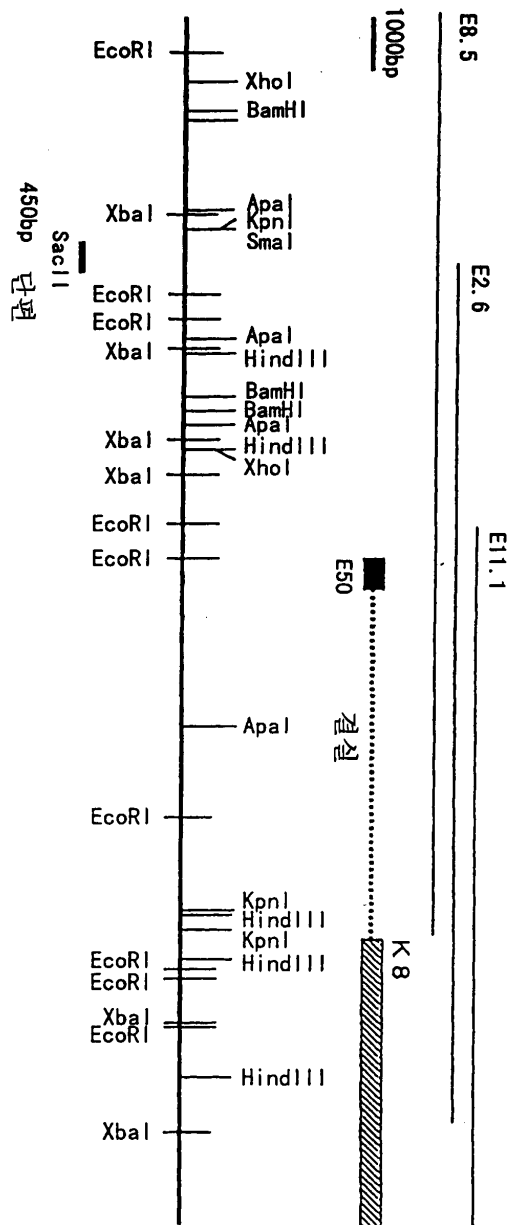
플라스미드 K8



도면3

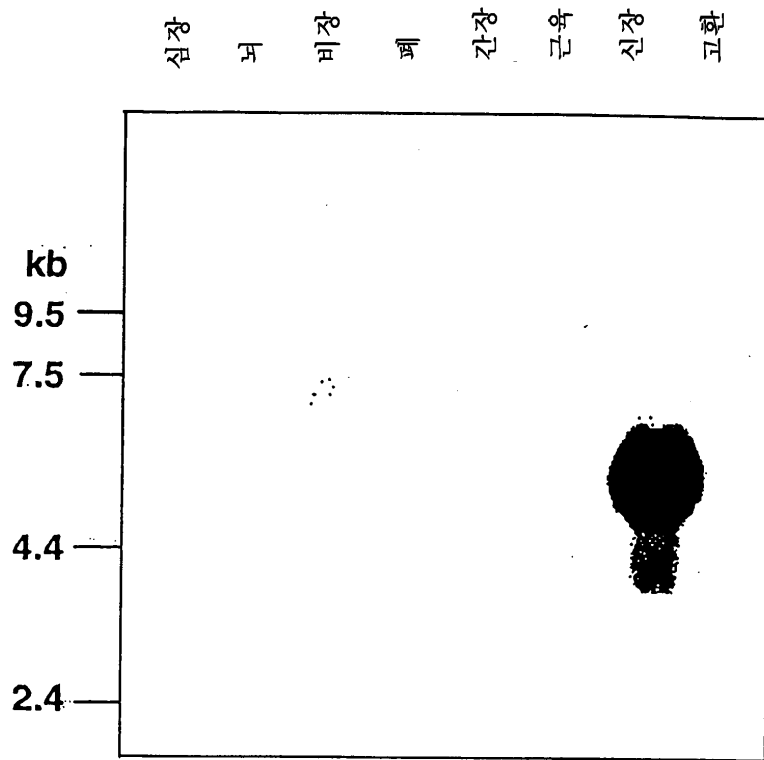


도면4



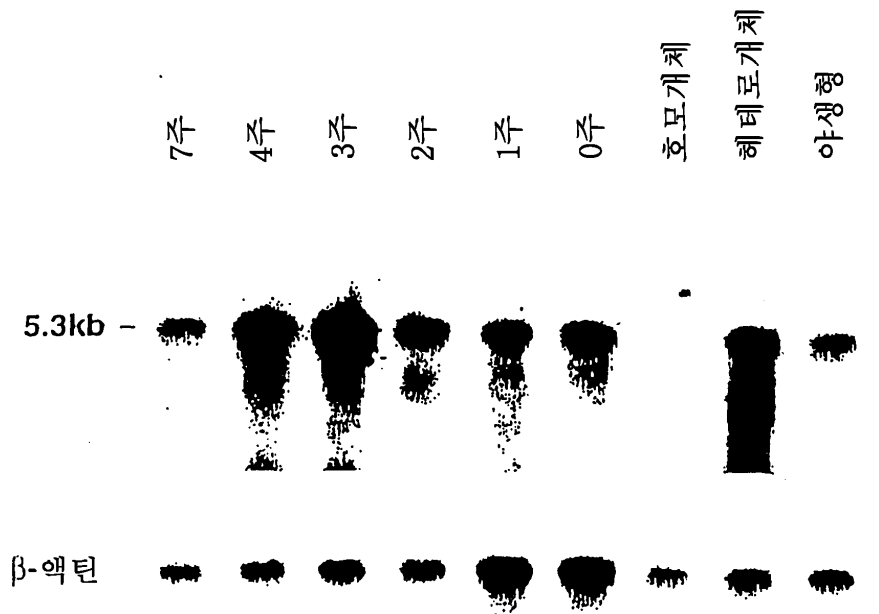
도면5

노던 블롯팅

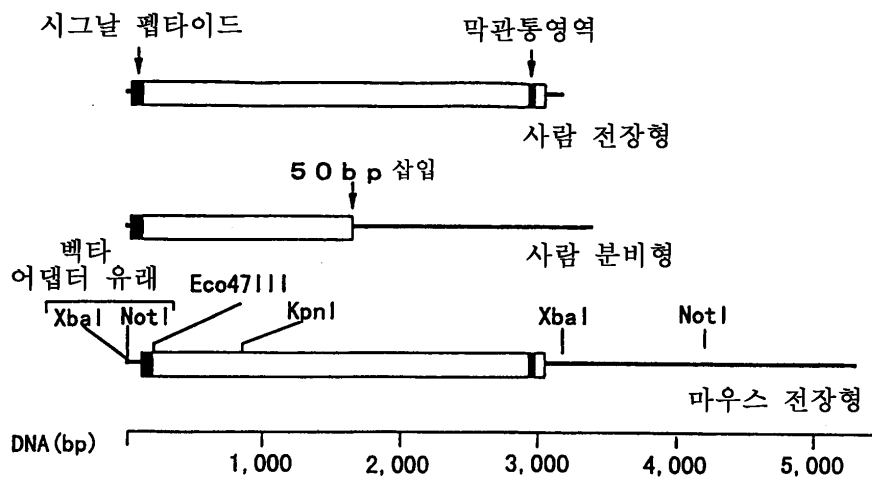


도면6

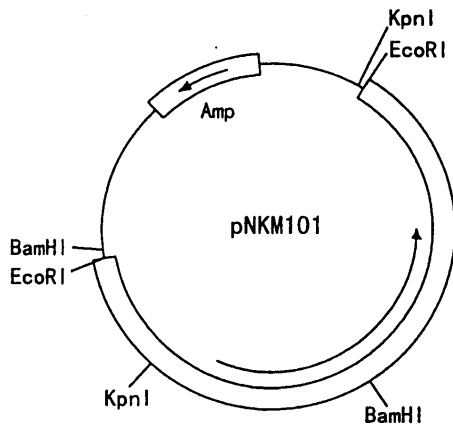
노던 블롯팅



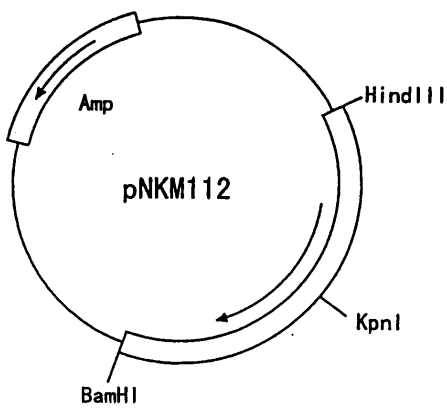
도면7



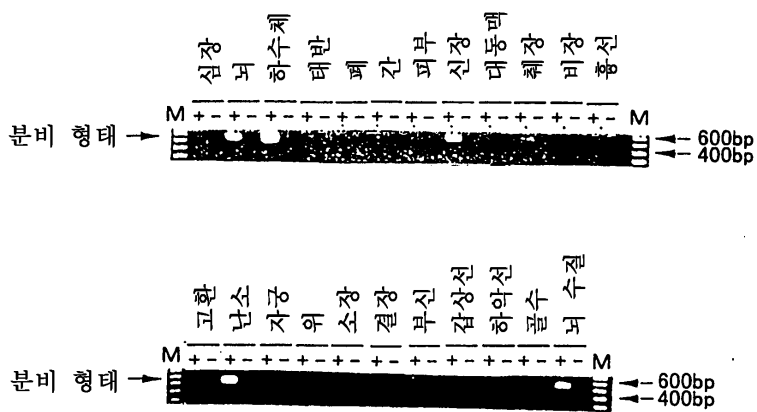
도면8



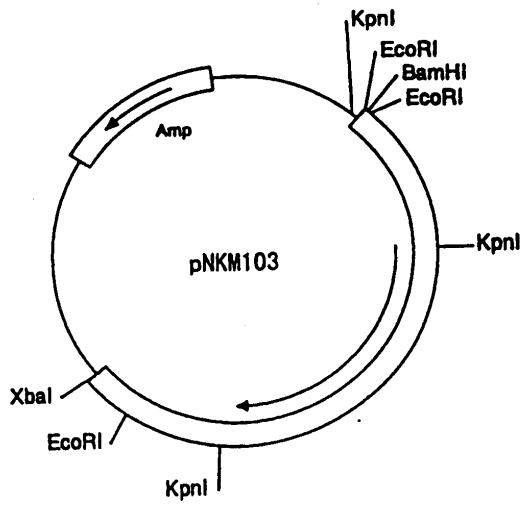
도면9



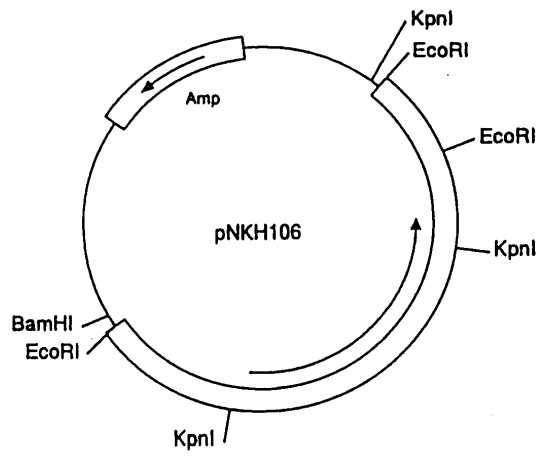
도면10



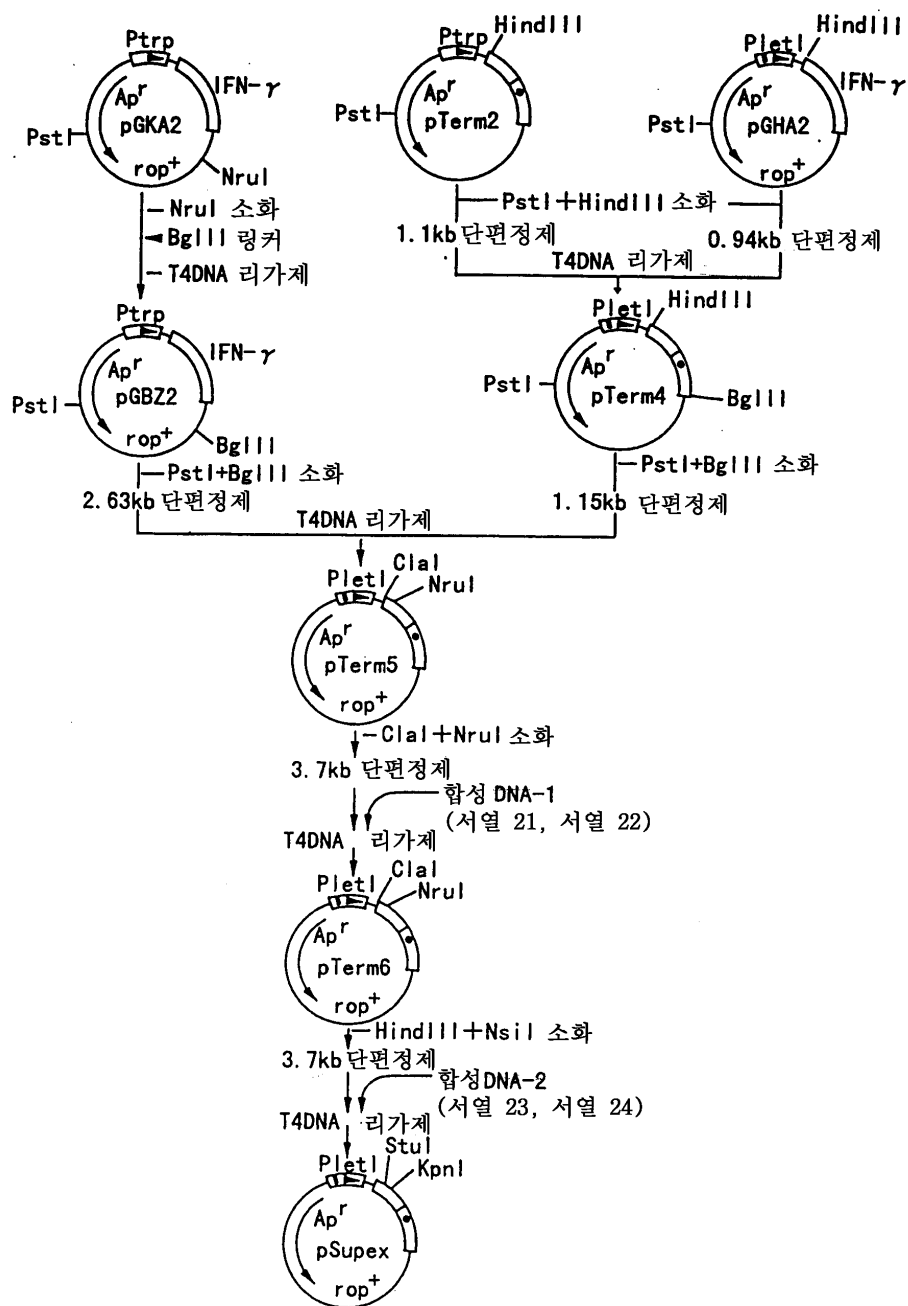
도면 11



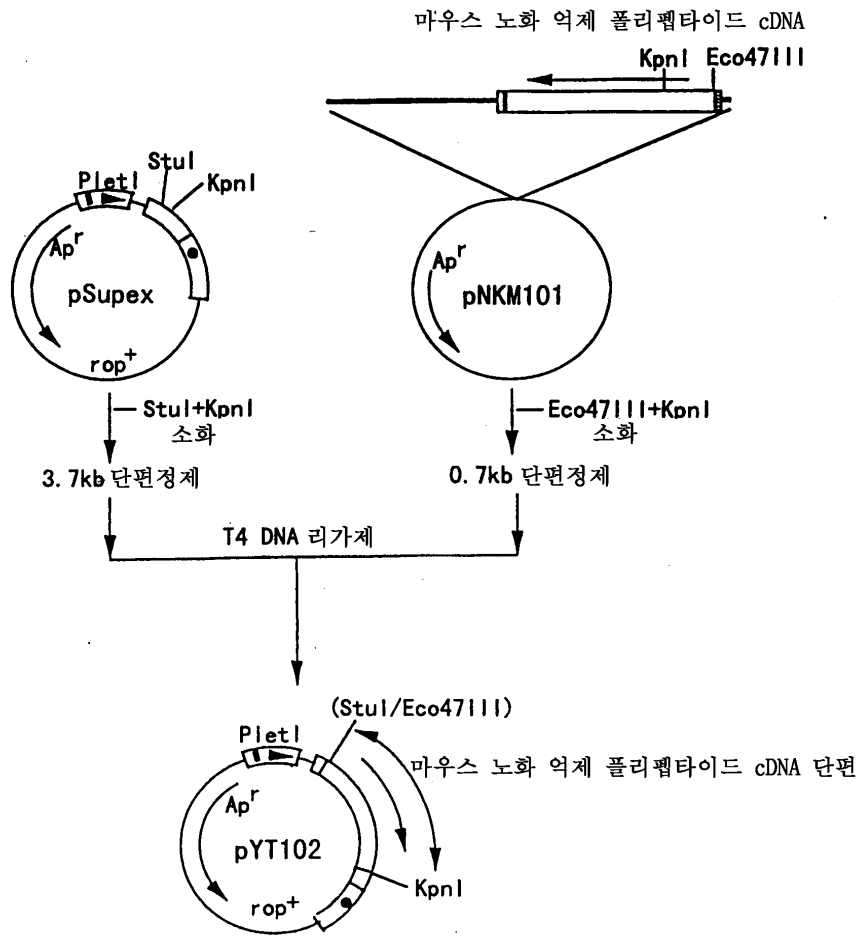
도면 12



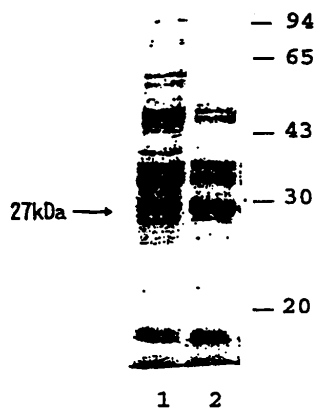
도면 13



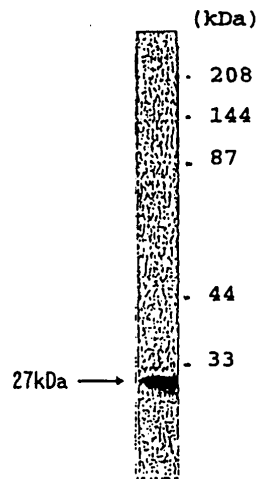
도면 14



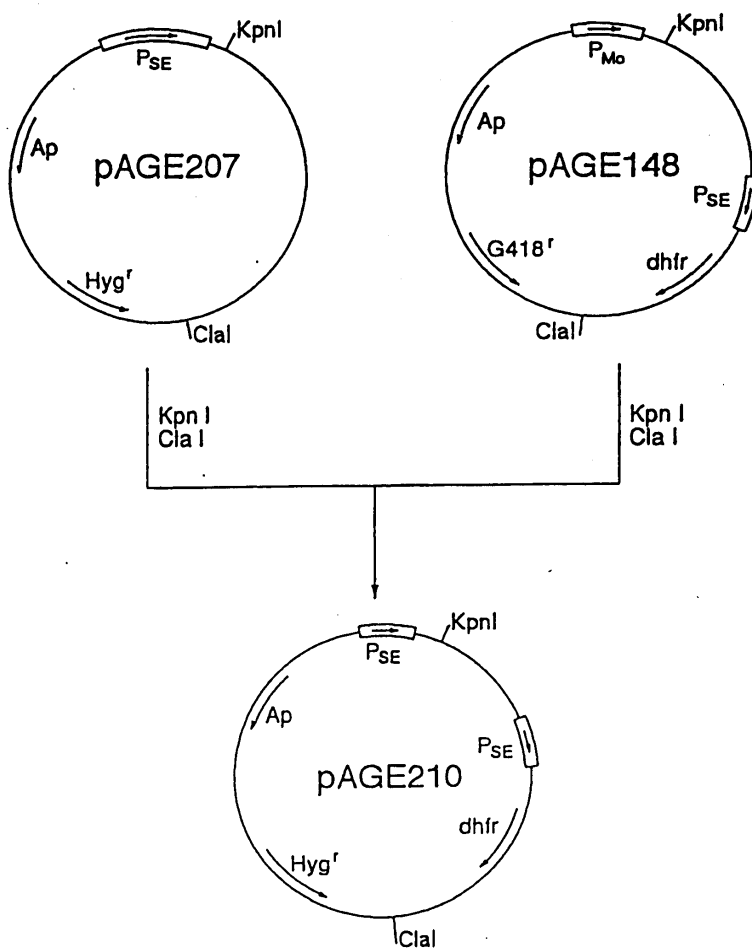
도면 15



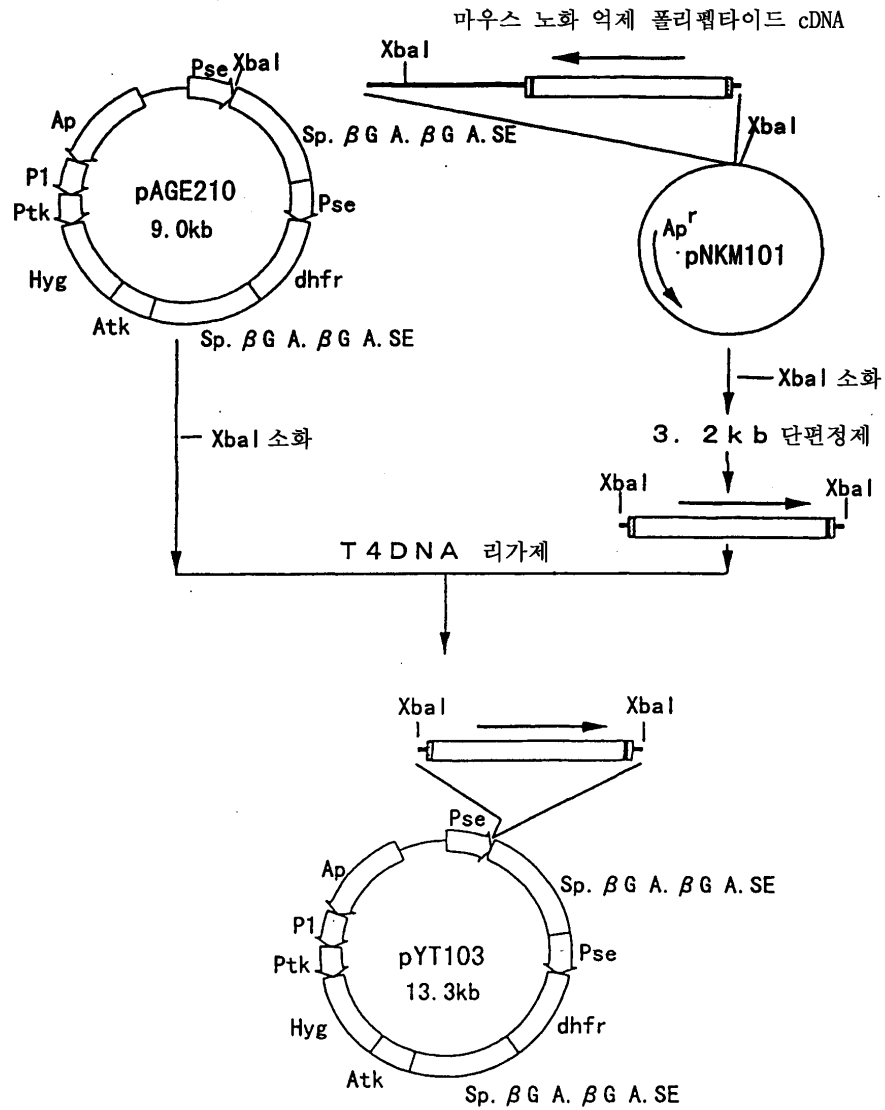
도면 16



도면 17



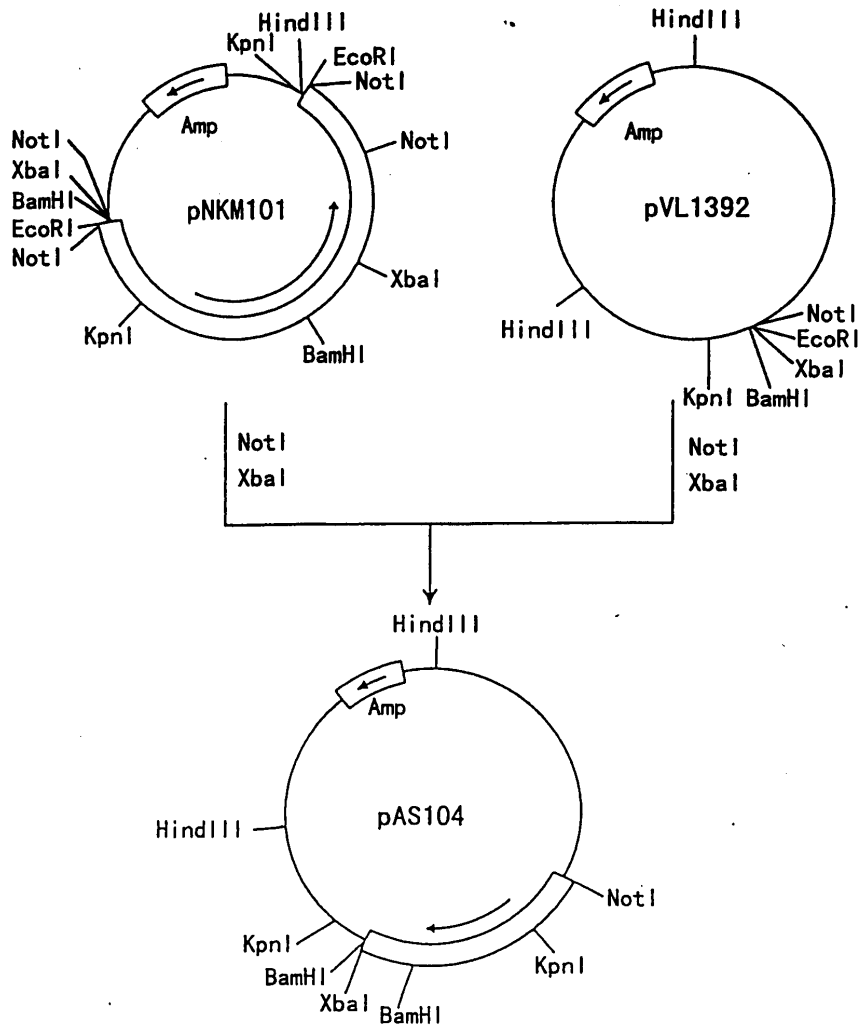
도면 18



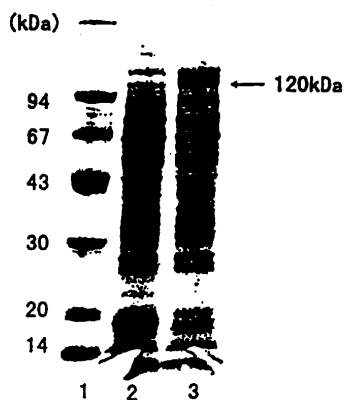
도면 19



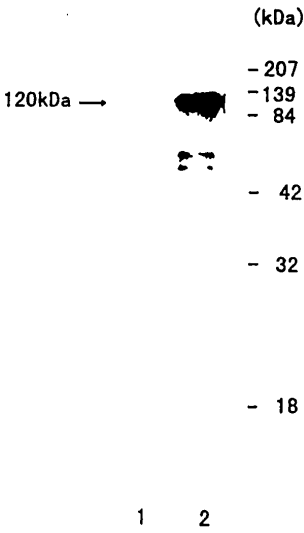
도면20



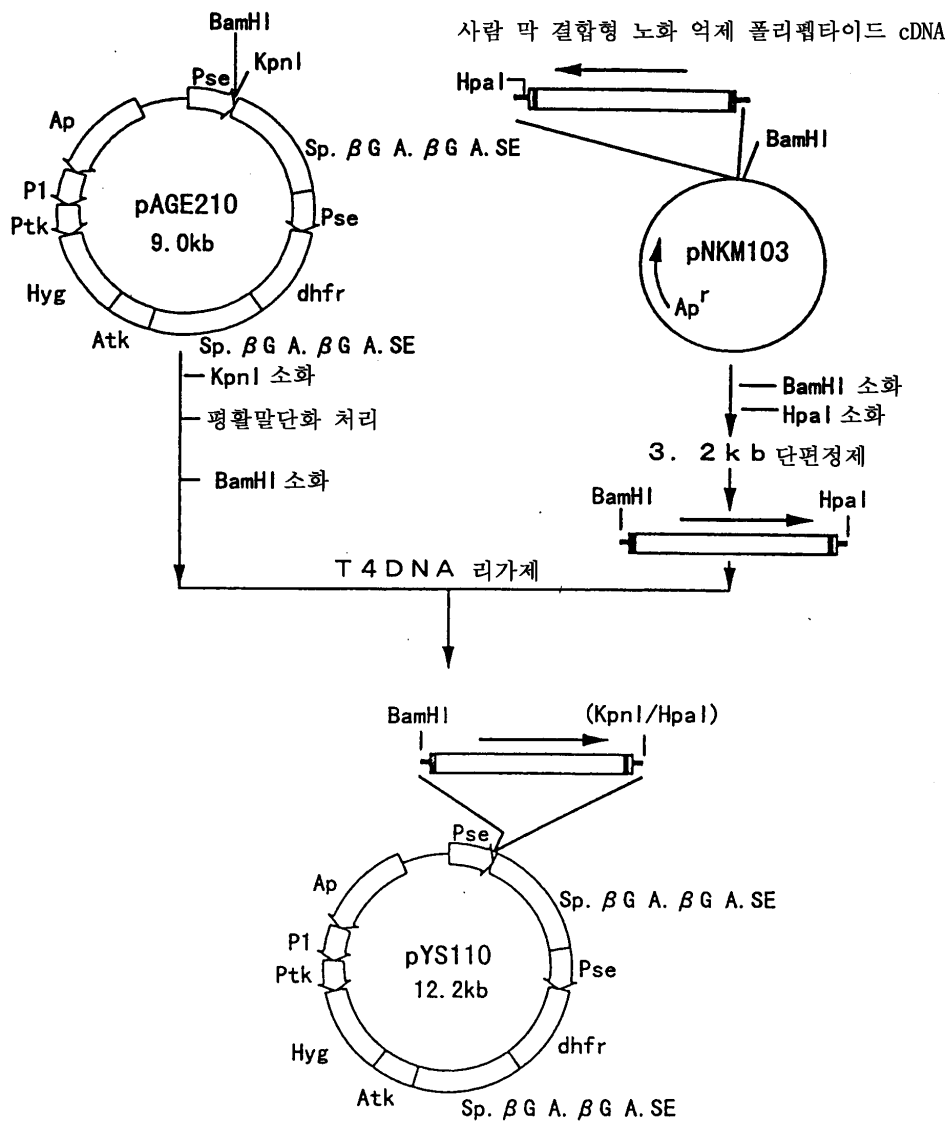
도면21



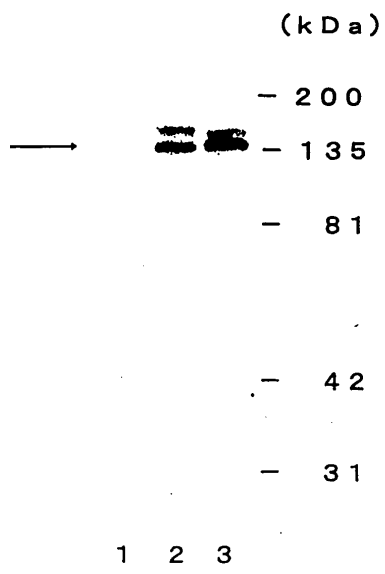
도면22



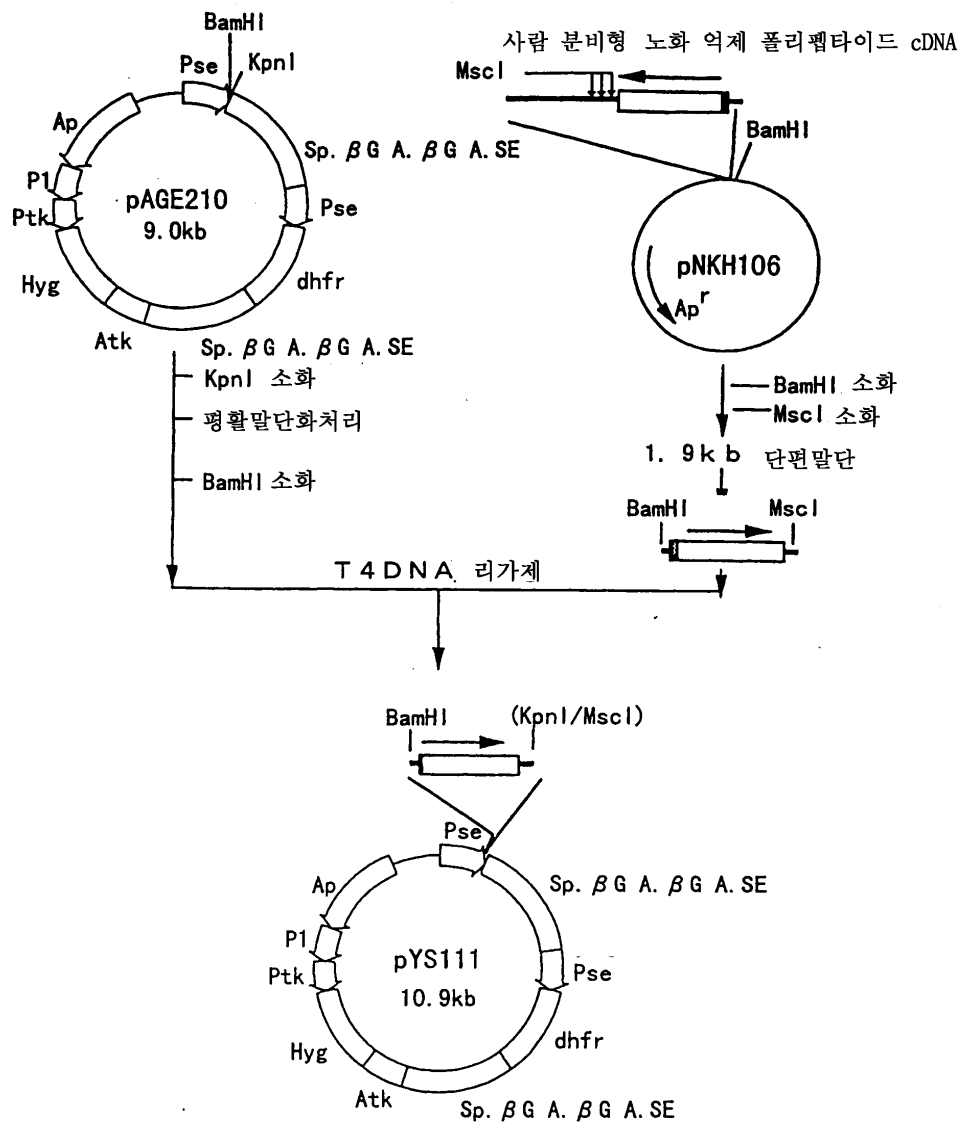
도면23



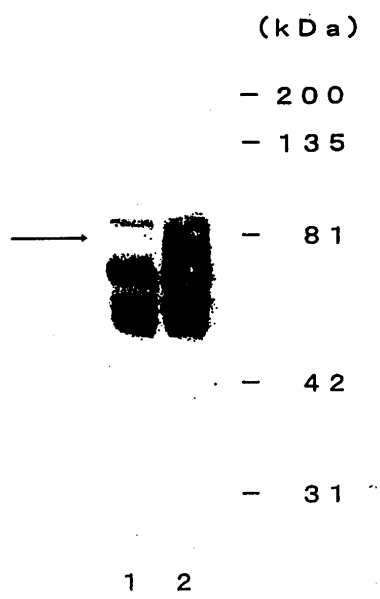
도면24



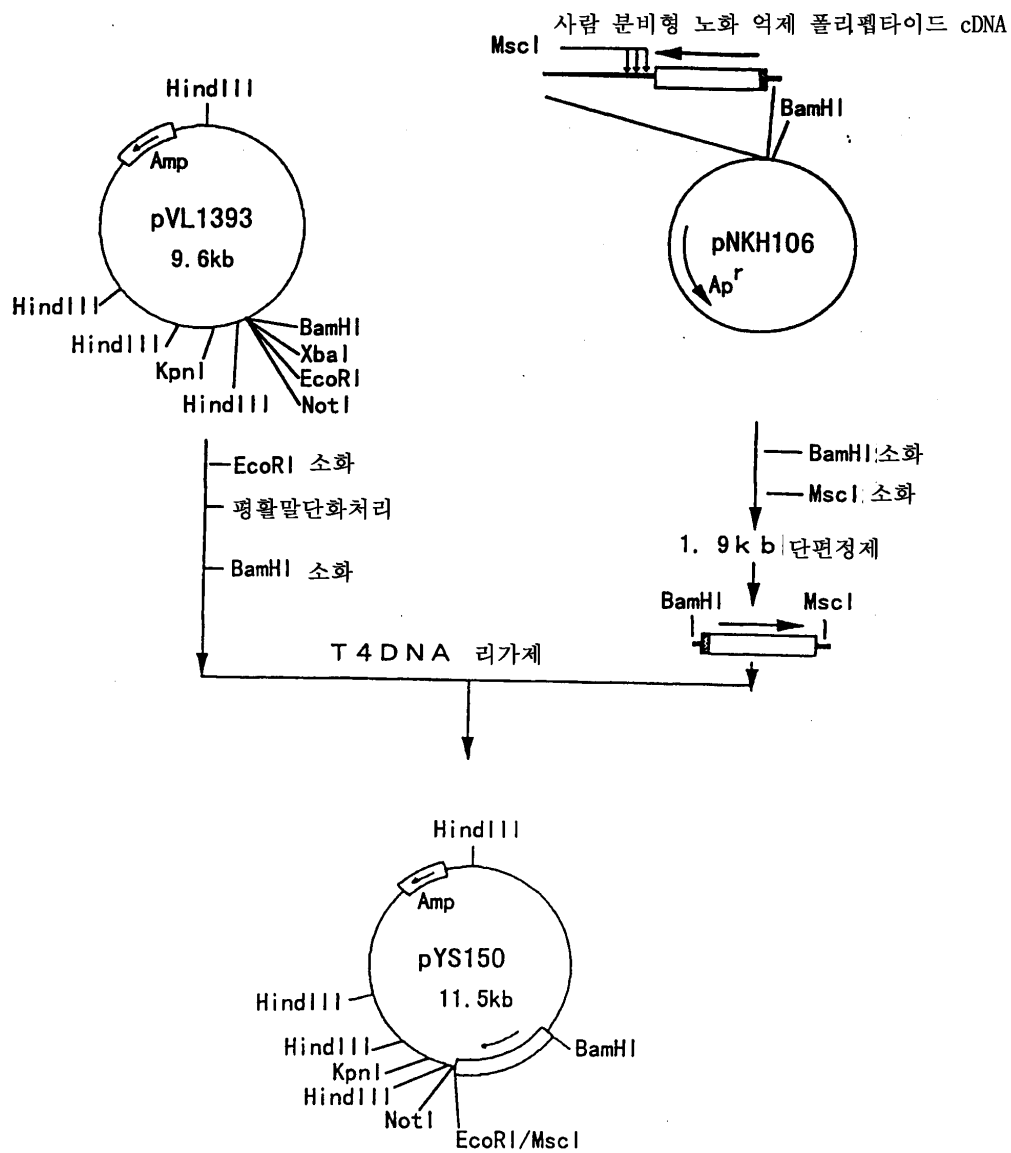
도면25



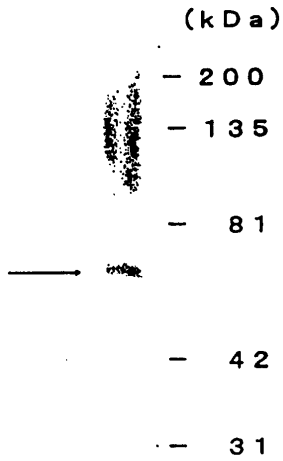
도면26



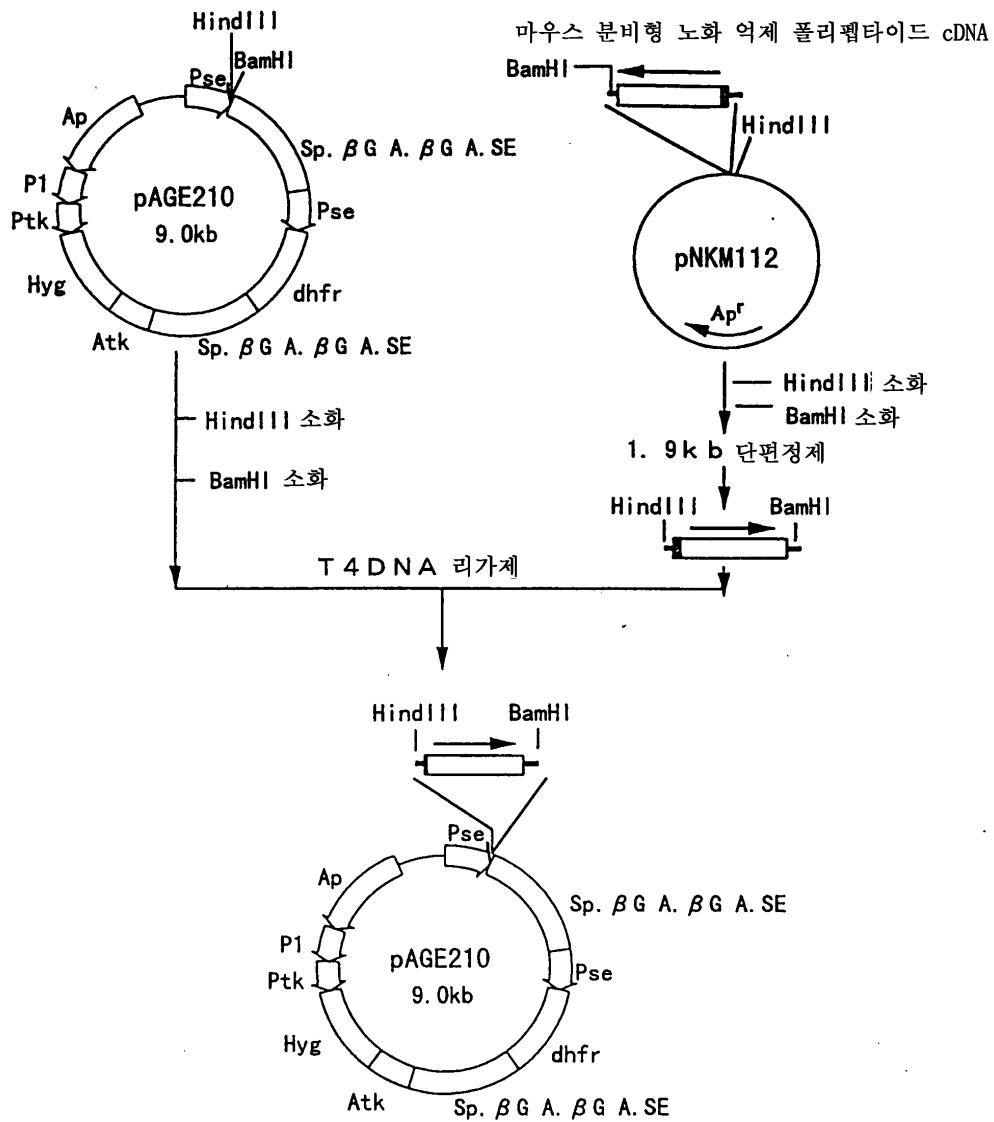
도면27



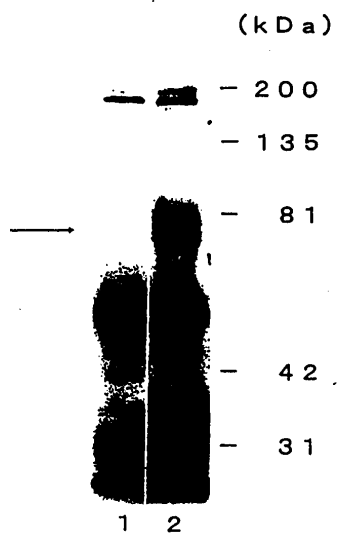
도면28



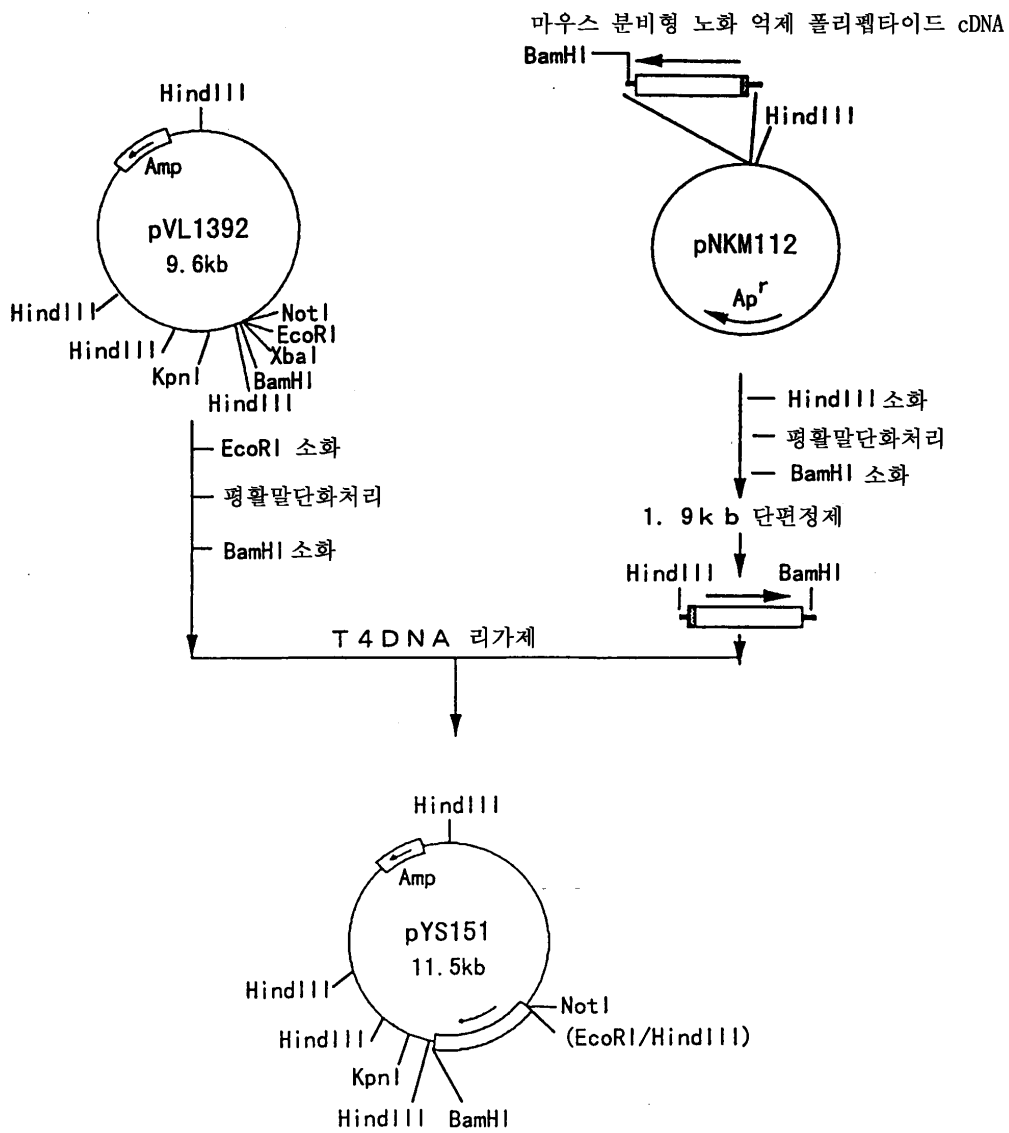
도면29



도면30



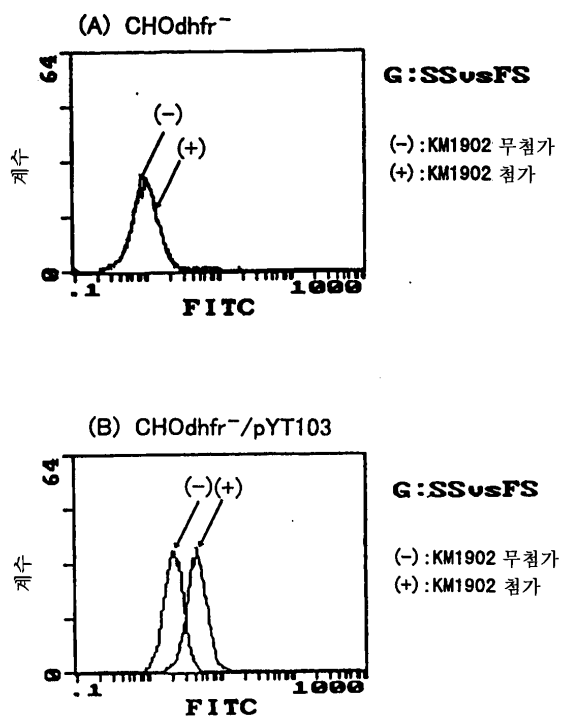
도면31



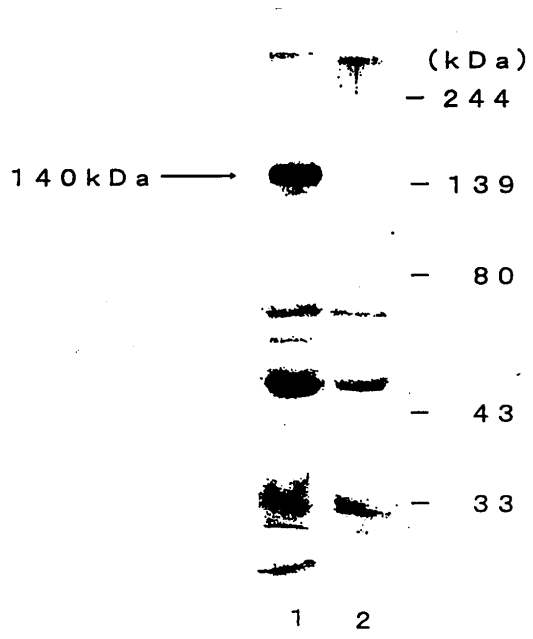
도면32



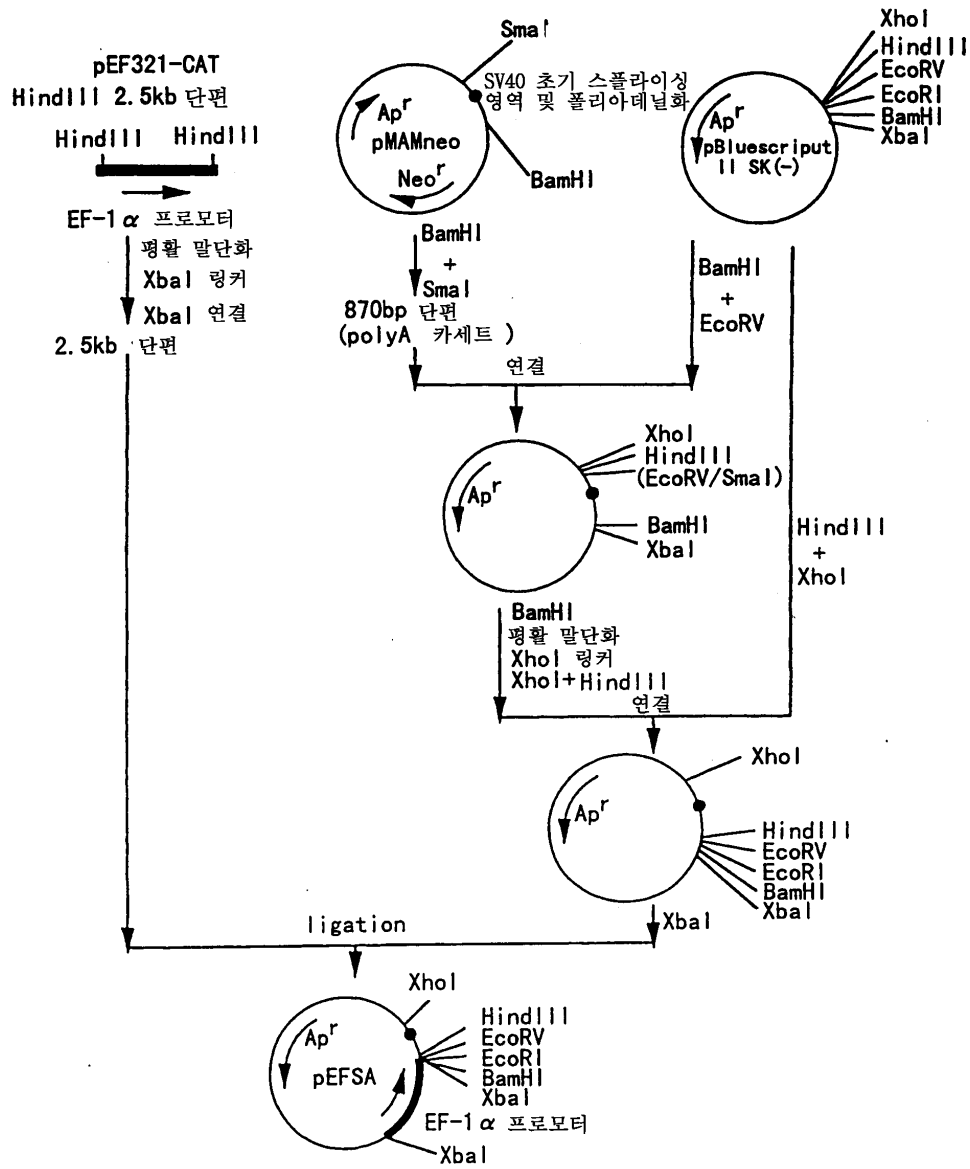
도면33



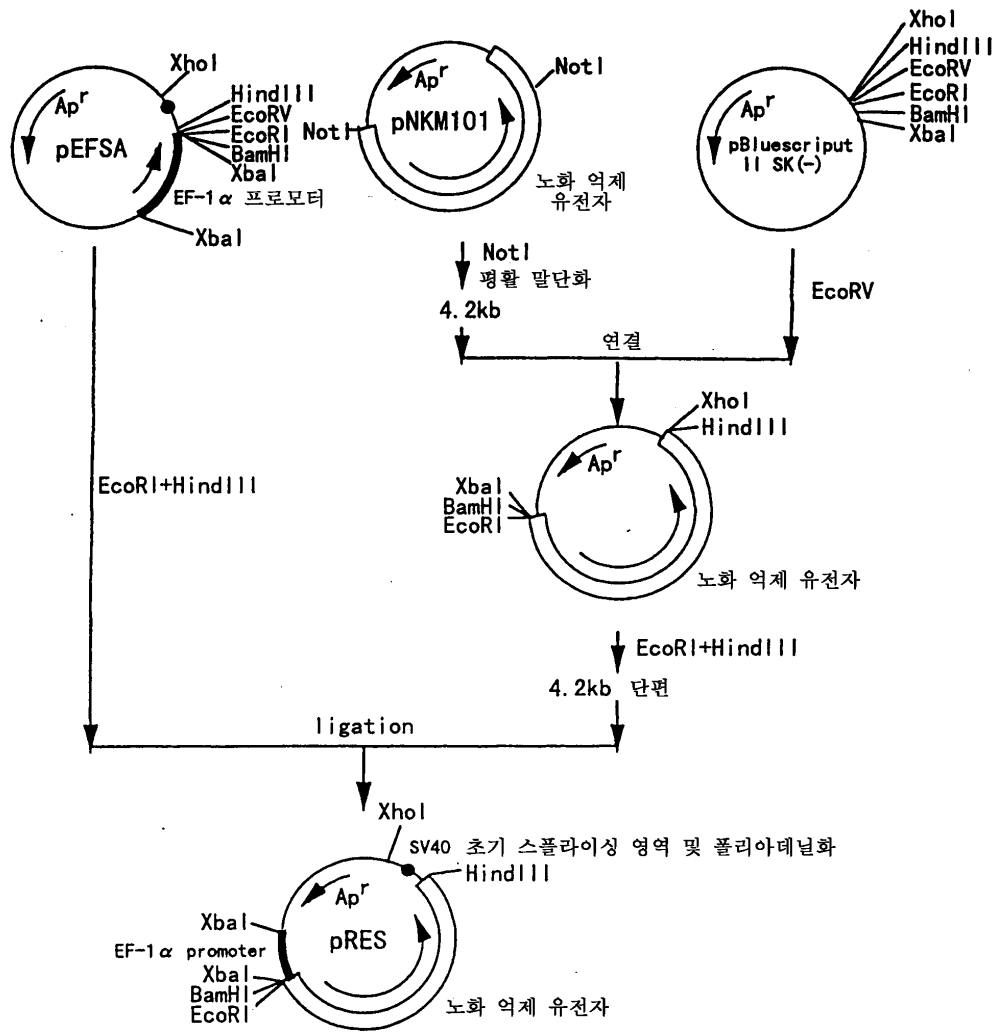
도면34



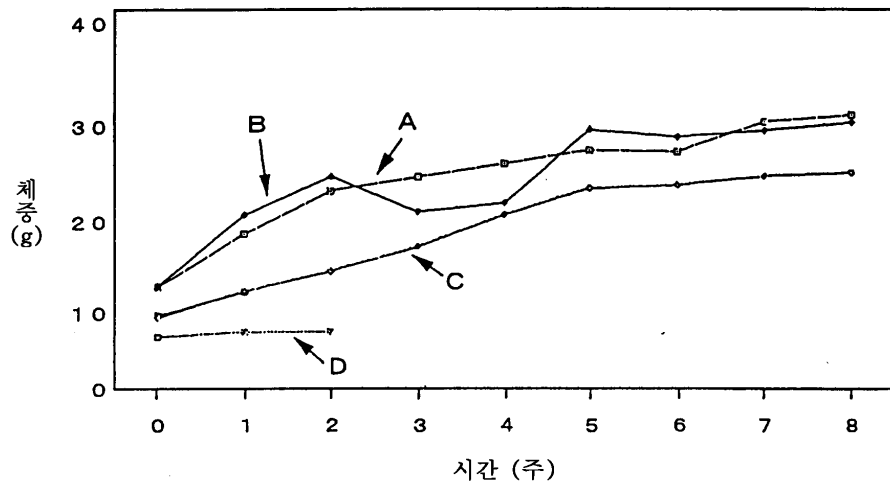
도면35



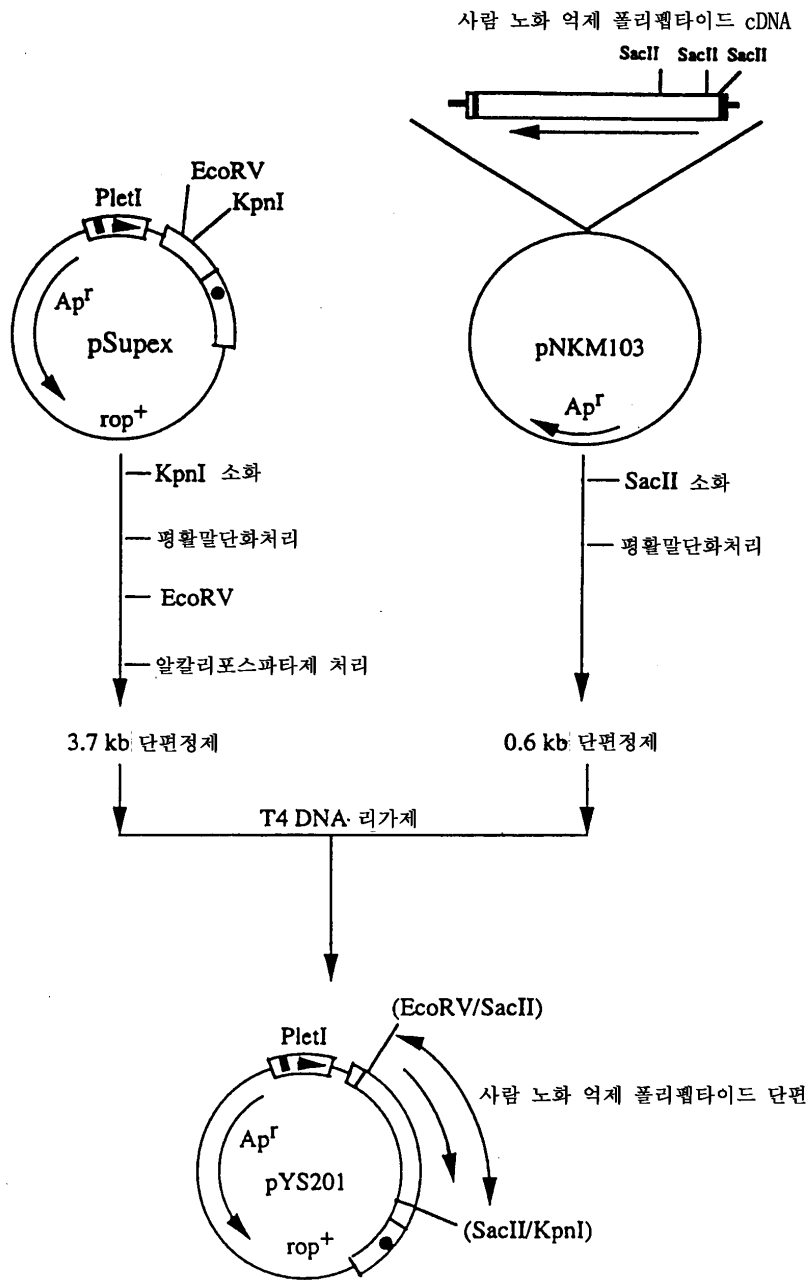
도면36



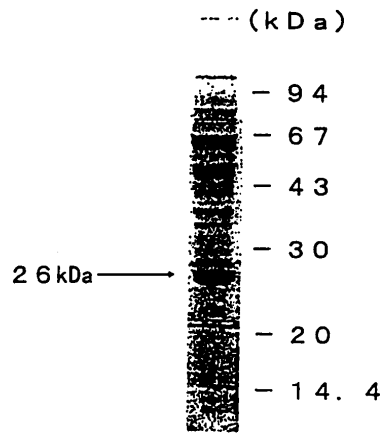
도면37



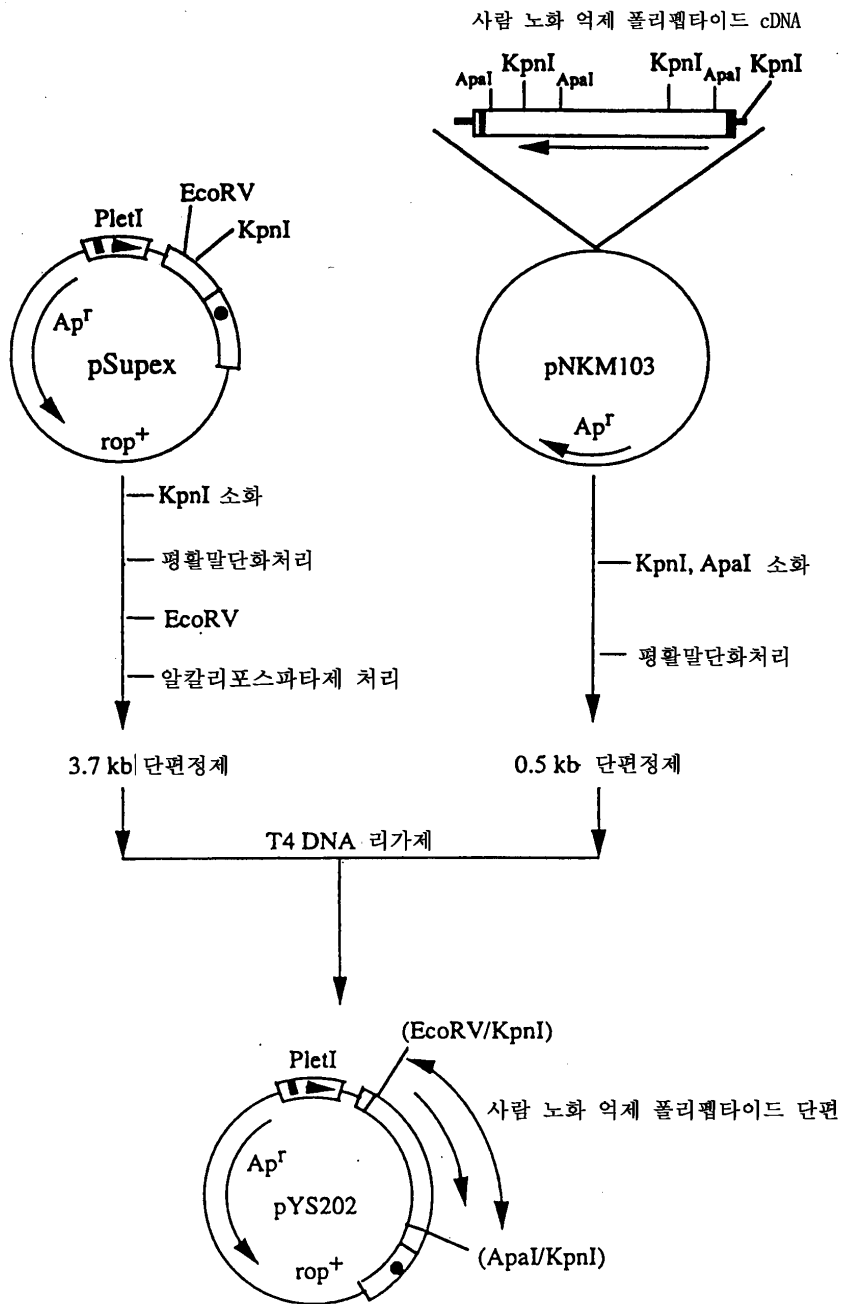
- A : 야생형 마우스-무 투여
 B : 야생형 마우스-바이러스 투여
 C : 조기 노화 형 증상을 나타내는 호모 개체 마우스-바이러스 투여
 D : 조기 노화 형 증상을 나타내는 호모 개체 마우스-무 투여



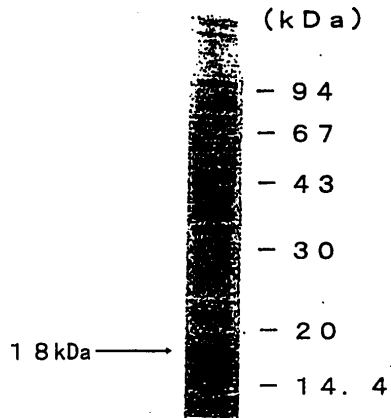
도면39



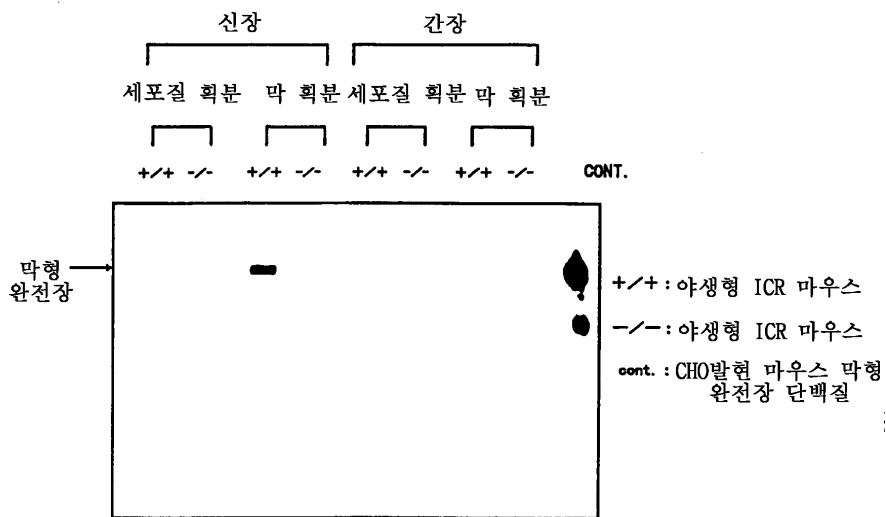
도면40



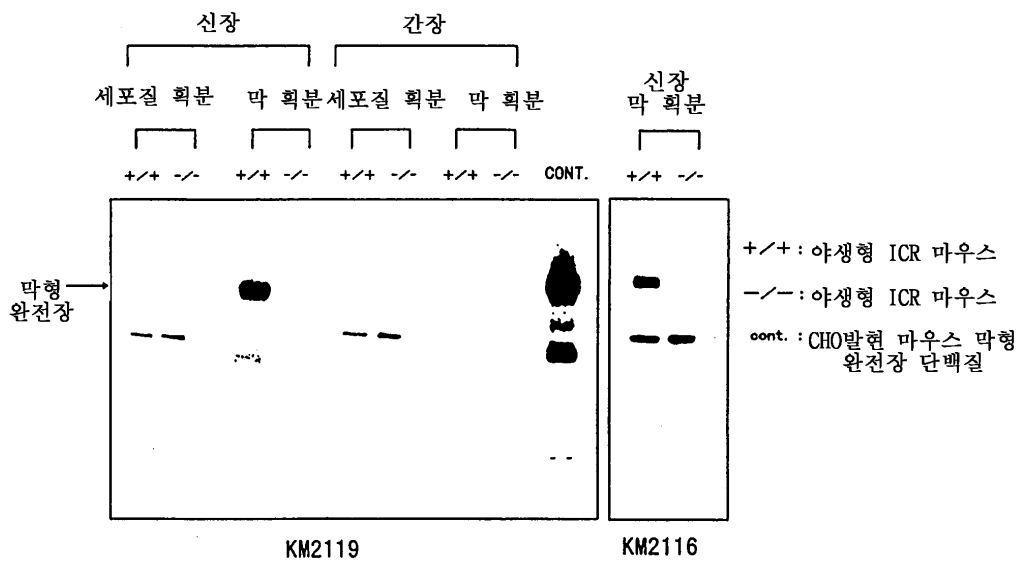
도면41



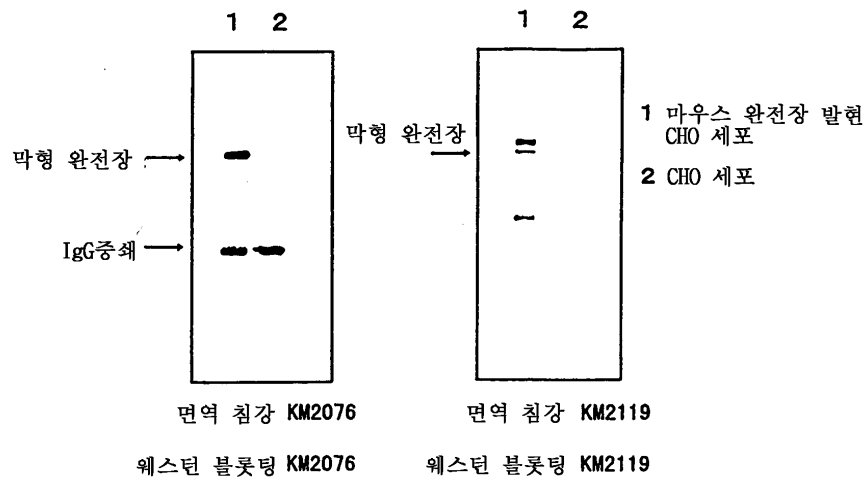
도면42



도면43



도면44



도면45

