



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0129190

(43) 공개일자 2015년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/02 (2006.01) *A61K 31/712* (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0055121

(22) 출원일자 2014년05월08일

심사청구일자 2014년05월08일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김경진

서울 마포구 마포대로 109, 102동 1402호 (공덕동, 롯데캐슬프레지던트)

정수영

서울 성북구 장월로1길 28, 113동 903호 (상월곡동, 동아에코빌아파트)

손기훈

서울 성북구 장월로1길 28, 113동 903호 (상월곡동, 동아에코빌아파트)

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 17 항

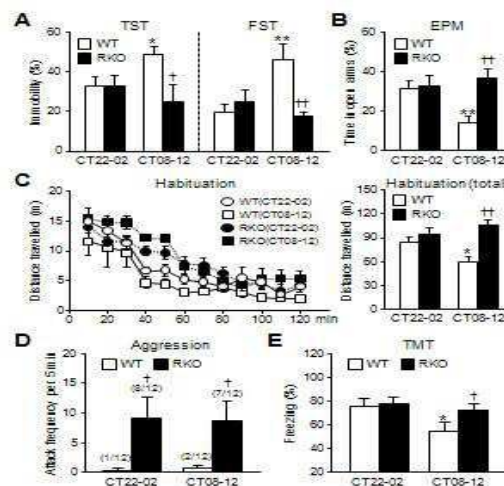
(54) 발명의 명칭 정서장애 및 중독질환 치료를 위한 REV-ERB α 유전자의 용도

(57) 요약

본 발명은 일주기적 조절 기작에 관여하는 생체시계 유전자와 중뇌 도파민 합성 시스템과의 관련성에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 생체시계 단백질인 REV-ERB α 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 이용하여 도파민 시스템 조절이상에서 기인하는 뇌질환을 예방 및/또는 치료하기 위한 신규한 약물후보물질을 스크리닝할 수 있다.

또한, 본 발명은 핵수용체인 REV-ERB α 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 억제하여, 도파민 시스템 조절이상에서 기인하는 뇌질환의 예방 및/또는 치료에 효과가 있는 약화조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009K001287
부처명	미래창조과학부(구, 교육과학기술부)
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	21세기 프론티어 연구개발사업 뇌기능활용및뇌질환치료기술개발연구사업
연구과제명	뇌연구 인프라-3: 신경세포 이미징 및 동역학 운영 서비스
기 여 율	1/4
주관기관	서울대학교
연구기간	2009.04.01 ~ 2013.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2013056731
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발사업
연구과제명	신경세포 이미징 및 동역학적 분석의 기술개발 및 서비스
기 여 율	1/4
주관기관	서울대학교
연구기간	2013.08.01 ~ 2016.07.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0019232
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	뇌과학원천기술개발사업
연구과제명	신규 분비성 신경조절 펩타이드의 포유류 고등 뇌기능 조절 연구
기 여 율	1/4
주관기관	고려대학교
연구기간	2011.06.01 ~ 2016.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2012M3A9C7050135
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발사업 줄기세포기반신약스크리닝시스템
연구과제명	역분화줄기세포를 이용한 신규 조울증 치료표적 발굴 및 약효 평가시스템 개발
기 여 율	1/4
주관기관	고려대학교
연구기간	2012.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 REV-ERB α 단백질 및 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 TH 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 REV-ERB α 단백질의 양 또는 활성이 감소하고 TH 단백질의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 단백질의 양 또는 활성이 증가하고 TH 단백질의 양 또는 활성이 감소하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 2

- (a) 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9로 표시되는 REV-ERB α 유전자 및 서열번호 10, 서열번호 11 또는 서열번호 12로 표시되는 TH 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 REV-ERB α 유전자의 발현량이 증가하고 상기 TH 유전자의 발현량이 감소하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 유전자의 발현량이 감소하고 TH 유전자의 발현량이 증가하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 3

- (a) 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9로 표시되는 REV-ERB α 유전자 및 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 TH 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 유전자의 발현량, 및 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 REV-ERB α 유전자의 발현량이 증가하고 상기 TH 단백질의 양 또는 활성이 감소하는 하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 유전자의 발현량이 감소하고 상기 TH 단백질의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 또는/및 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 4

- (a) 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 REV-ERB α 단백질, 서열번호 13, 서열번호 14 또는 서열번호 15로 표시되는 NURR1 단백질, 및 서열번호 16, 서열번호 17 또는 서열번호 18로 표시되는 TH 프로모터의 R/N1 부위 및 R/N2 부위를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 시료 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 REV-ERB α 단백질 및 NURR1 단백질의 상기 R/N1 및 R/N2 각 부위에 대한 결합력의 변화를 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 결합력의 변화가 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 또는/및 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 단계의 세포는 일차배양 도파민 신경세포, 유도분화 도파민 신경세포, PC12세포주(ATCC 입수, CRL-1721), Cath.a 세포주(ATCC 입수, 카탈로그 번호 CRL-11179), 또는 MN9D 세포주(ATCC 입수)인 것을 특징으로 하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 6

서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9로 표시되는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 가지는 안티센스 또는 siRNA(small interference RNA) 올리고뉴클레오타이드를 유효성분으로 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 7

REV-ERB α 의 작용제 또는 길항제를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, REV-ERB α 의 작용제가 GSK41122이고 길항제가 SR8278임을 특징으로 하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 9

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정서장애 및 중독질환은 우울증, 조울증, 계절성 기분장애 또는 공황장애임을 특징으로 하는, 정서장애 및 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 10

제 6항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 정서장애 및 중독질환은 우울증, 조울증, 계절성 기분장애 또는 공황장애임을 특징으로 하는, 정서장애 및 중독질환 예방 및/또는 치료용 억제학적 조성물.

청구항 11

(a) 서열번호 2와 90% 이상 상동성을 갖는 아미노산 서열로 표시되는 REV-ERB α 단백질 및 서열번호 5와 90% 이상 상동성을 갖는 아미노산 서열로 표시되는 TH 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 REV-ERB α 단백질의 양 또는 활성이 감소하고 TH 단백질의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 단백질의 양 또는 활성이 증가하고 TH 단백질의 양 또는 활성이 감소하는 것이 확인되는 경우,

상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 12

(a) REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체; 및 TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 감소하고, TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 증가하고, TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 감소하는 것이 확인되는 경우,

상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 13

(a) 서열번호 8과 90% 이상 상동성을 갖는 염기서열로 표시되는 REV-ERB α 유전자 및 서열번호 11과 90% 이상 상동성을 갖는 염기서열로 표시되는 TH 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 REV-ERB α 유전자의 발현량이 증가하고 상기 TH 유전자의 발현량이 감소하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 유전자의 발현량이 감소하고 TH 유전자의 발현량이 증가하는 것이 확인되는 경우,

상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 14

(a) 서열번호 8과 90% 이상 상동성을 갖는 염기서열로 표시되는 REV-ERB α 유전자, 및 TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 유전자의 발현량, 및 상기 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 REV-ERB α 유전자의 발현량이 증가하고 상기 TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 감소하는 하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 유전자의 발현량이 감소하고 상기 TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되는 경우,

상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 또는/및 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 15

(a) REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체, 및 TH 프로모터의 R/N1 부위 및 R/N2 부위를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 시료 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체 및 NURR1 단백질의 상기 R/N1 및 R/N2 각 부위에 대한 결합력의 변화를 측정하는 단계; 및

(c) 상기 결합력의 변화가 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 또는/및 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 16

제 11항 내지 15항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 단계의 세포는 일차배양 도파민 신경세포, 유도분화 도파민 신경세포, PC12세포주(ATCC 입수, CRL-1721), Cath.a 세포주(ATCC 입수, 카탈로그 번호 CRL-11179), 또는 MN9D 세포주(ATCC 입수)인 것을 특징으로 하는, 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법.

청구항 17

생체 외에서 수행하는 정서장애 또는 중독질환 진단 방법으로서,

(a) 정서장애 또는 중독질환의 진단이 필요한 환자로부터 분리된 신경세포에 대해, REV-ERB α 및 NURR1의 각 단백질의 TH 프로모터의 R/N1 부위 및 R/N2의 각 부위에 대한 결합력을 각각 CT00 및 CT12에서 측정하는 단계; 및
(b) 상기 (a)단계에서 측정한 결합력을, 분리된 정상인의 신경세포에 대해 CT00 및 CT12에서 측정한, REV-ERB α 및 NURR1의 각 단백질의 TH 프로모터의 R/N1 부위 및 R/N2의 각 부위에 대한 결합력과 비교하는 단계를 포함하여, NURR1과 R/N1의 결합력이 CT12에서 증가 된 결과를 보인 경우, 정서장애 또는 중독질환자로 판단하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 일주기적 조절 기작에 관여하는 생체시계 유전자와 중뇌 도파민 합성경로와의 관련성에 관한 것이다. 본 발명은 일주기적 조절 기작을 바탕으로 한 유용한 생체시계 분자 표적을 발굴하고, 이를 이용하여 도파민 시스템 제어를 통한 정서장애 및 중독질환을 치료하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

일주기 리듬(Circadian rhythm)은 생체에서 24시간을 주기로 나타나는 일체의 생물학적 리듬을 의미하며, 수면-각성 패턴, 섭식, 호르몬 분비, 체온의 변화 및 물질 대사를 비롯한 다양한 생리-행동 과정에 관련된다. 이러한 리듬은 외부로부터 시간에 대한 정보가 배제된 일정한 환경조건에서도 대략 하루의주기를 갖는 것으로 알려져 있다(비특허문헌 1 및 2). 인간을 포함한 포유동물에서, *CLOCK*, *BMAL1*, *PER1*, *PER2*, *PER3*, *CRY2*, 및 *REV-ERB α* 를 비롯한 다양한 생체 시계 유전자들이 확인되었으며, 이들은 전사, 전사후 공정, 번역, 번역후 공정, 핵으로의 이동, 및 DNA 또는 단백질간의 상호작용 등 일련의 과정을 통한 양성 또는 음성의 피드백 고리(feedback loop)를 이루면서 외부자극이 없는 상태에서도 대략 24시간에 가까운 유전자 발현의 리듬을 만들어 내는 분자 진동자(molecular oscillator)로 작동하는 것으로 여겨지고 있다. 인간을 포함한 포유동물의 중추시계(central clock; master clock)는 시상하부(hypothalamus)의 작은 영역인 시신경 교차상핵(suprachiasmatic nucleus, SCN)에 존재하는 것으로 알려졌다. 그러나 SCN을 제외한 다양한 뇌조직과 간, 폐, 근육 및 심장을 비롯한 대부분의 말초 조직이나 기관에서도 중추 생체시계와 동일한 일주기 유전자가 발현한다는 사실은 분자 진동자가 각 조직이나 기관에 존재할 뿐만 아니라 조직-기관 특이적인 생리-생화학적 리듬을 만드는 말초시계(peripheral clock) 혹은 국부시계(local clock)로 작동할 것임을 시사한다. 따라서 생체시계는 시신경 교차상핵에 존재하는 중추시계가 신경성(neural) 혹은 액성(humoral)의 출력(output)을 통해 말초시계를 주변 환경과 동기화시키면서 환경의 주기적 변화 및 조직-기관 간의 생리-생화학적 리듬의 조화를 꾀하는 위계구조(hierarchical organization)를 갖는 것으로 생각된다. 다양한 말초기관 및 SCN 외 뇌조직에서 발견되는 국부 분자 생체시계는 조직 특이적인 양상으로 다양한 유전자들의 일주기적 발현을 유도함으로써 각 조직의 특이적인 생리현상의 일주기적 구현에 기여한다. 예를 들어, 본 발명자들은 선행연구에서 부신의 생체시계 분자기구, 특히 생체시계 중추 회로의 핵심 전사인자인 *CLOCK:BMAL1* 이합체가 부신 피질에서 스테로이드 합성 유전자들의 일주기적 발현을 유도함으로써 부신 피질 글루코코르티코이드 호르몬의 일주기적 합성 및 분비에 중추적인 역할을 담당한다는 사실을 규명하여 보고한 바 있다(비특허문헌 3). 생체 시계 분자기구는 상기 1)*CLOCK:BMAL1* 이합체를 통한 전사조절, 생체시계의 보조회로를 구성하는 핵수용체인 2)*RORs*(REV-ERBs), 및 이들 생체시계 전사인자의 직접적인 조절을 받는 3)*DBP*와 같은 2차 전사인자들을 통해, 하위 유전자들의 일주기적 발현을 제어하는 것으로 알려

져 있다. 따라서 이들 생체시계 전사인자들과 조직 특이적인 전사인자들과의 상호작용이 국부 생체시계에 의한 일주기적 출력의 작용 기작의 근간을 이루는 것으로 믿어지고 있다.

[0003]

일주기 유전자의 돌연변이나 녹아웃(knockout)을 이용한 최근의 연구들은, 분자 진동자를 구성하는 일주기 유전자에 결함이 생겼을 경우 암, 비만, 2형 당뇨병은 물론 고혈압을 비롯한 각종 심혈관 질환이 일어날 뿐만 아니라 노화와 관련된 각종 병리적 현상들이 가속화되어 나타날 수 있음을 밝히고 있다. 또한, 다양한 형태의 일주기 리듬 장애가 우울증, 조울증, 계절성 기분장애 및 공황장애 등 다양한 정서장애(질환)와 각종 중독장애(질환)의 발병 초기 단계에서부터 동반되는 것으로 확인되었다. 특히 유전성이 높은 정서장애인 조울증 환자군에서 일주기 리듬의 이상이 두드러지게 관찰되는데, 예를 들면 급성 조증 상태의 환자는 극도의 혼란된 수면-각성주기를 보이며, 수면 부족이 조증 발생 전에 선행하는 경우가 매우 빈번하다. 또한 최근의 인간 유전체 연구결과 생체시계 유전자들의 다형성(polymorphism)이 우울증 및 조울증과 같은 정서장애 및/또는 중독질환들의 발병 위험성과 강한 상관성을 가지고 있다는 사실을 보고하고 있는데, 이는 뇌인지 기능에서 생체시계 분자기구의 중요성을 시사한다(비특허문헌 4 및 5).

[0004]

도파민(dopamine)은 카테콜아민계 신경전달물질로서 운동기능(motor activity), 인지(cognition), 감정(emotion), 기분(mood), 보상(reward), 중독(addiction), 동기부여(motivation) 등 다양한 신경기능의 조절에 관여하는데, 특히 중뇌 도파민 시스템의 이상은 많은 정신장애(질환) 및/또는 신경질환(장애)의 주요 원인이 되고 있다. 예를 들면, 중뇌 도파민 시스템의 이상 활성화는 정서장애 및 중독질환, 정신분열증, 주의력 결핍 과잉행동 증후군(ADHD), 파킨슨 병, 헌팅턴병 및 항정신성 약물 의존증 등의 증상에서 상당한 부분을 차지한다는 사실이 알려져 있다(비특허문헌 6). 포유류에서 공통된 해부학적 구조를 보이는 중뇌 도파민 시스템은 크게 중뇌 흑질(substantia nigra, SN)에서 선조체(striatum)으로 연결되는 1) 흑질 선조체 경로(Nigrostriatal pathway), 복측 복측영역(ventral tagmental area, VTA)에서 변연계 선조체를 거쳐 대뇌 변연계로 연결되는 2) 중뇌 변연계(Mesolimbic pathway) 및 전전두엽 피질로 연결되는 3) 중뇌 피질경로(Mesocortical pathway)로 구성된다. 도파민은 다른 카테콜아민계의 신경전달물질과 마찬가지로 일련의 효소 작용에 의해 티로신(tyrosine)으로부터 합성되는데, 그 속도결정 단계는 TH(tyrosine hydroxylase)에 의해 티로신이 L-DOPA로 전환되는 과정이다. TH에 의해 생성된 L-DOPA는 이후 DDC (DOPA decarboxylase)에 의해 도파민으로 신속히 전환되며, VMAT(vesicular monoamine transporter)에 의해 시냅스낭에 저장되었다가 시냅스로 분비된다.

[0005]

흥미롭게도 중뇌 도파민 시스템의 조절 이상으로 나타나는 대표적인 질환인 기분·정서장애, 파킨슨병(Parkinson's disease), 하지불안증후군(Restless leg syndrome), 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 및 약물중독 등에서 공통적으로 다양한 형태의 일주기적 양태가 관찰된다. 예를 들면 해당 질환 환자들의 경우 불면증을 비롯한 수면장애나 체온, 호르몬 분비 및 혈압 등에서 일주기 생체리듬의 교란이 매우 빈번하게 발견되며, 반대로 강제적인 수면-각성 주기의 교정이 정서장애 및 중독질환, ADHD 환자들의 증상 완화에 크게 도움이 된다는 사실이 밝혀졌다(비특허문헌 7, 8 및 9). 이러한 현상들과 더불어 중뇌 도파민 신경회로의 활성화가 일주기적으로 나타난다는 사실은 이미 알려져 있으나(비특허문헌 10, 11 및 12), 일주기성에 대한 근본 원인과 생체시계 분자 네트워크와의 연결 고리는 아직 규명되지 않은 상태이다. 최근의 연구에서 CLOCK 유전자가 손상된 돌연변이 마우스의 중뇌에서, TH 유전자 발현이 정상 마우스에 비해 유의하게 증가되어 있다는 사실 등이 알려지면서 도파민 합성경로의 TH가 생체시계와 연결될 수 있다는 주장이 제기된 바 있으나 그 분자적 기작을 규명하는 데에 실패한 바 있다(비특허문헌 13 및 14). 또한, 마우스를 이용한 연구는 Clock 유전자들의 손상된 발현이 인간의 감정 장애에서 관찰되는 현상과 유사한 행동학적 비정상성을 초래한다는 것을 보여 주었다. 예를 들어, Clock 유전자(Clock Δ 19)에 대한 손상된 대립형질을 가진 마우스는 광적인 행동, 완전한 코카인 민감성 및 중뇌 도파민에 의한 활성화의 증가를 나타내었다(비특허문헌 15 및 16). 복측 피개영역(VTA) 내 Clock 유전자 mRNA 발현의 녹다운은 불안-유사 행동이 감소하지만 우울증-유사 행동이 증가하는 것이 특징인 조울증과 유사한 증상을 유발하였다(비특허문헌 17). 다른 시계 유전자들의 변이 역시 행동학적 비정상성을 나타내었다. 예를 들어, Bmal1 또는 Per2 유전자가 결실된 마우스는 광적인 행동을 보인 반면, Cryptochrome 1 및 2 유전자가 결핍된 마우스는 변형된 불안-유사 행동을 보여 주었다(비특허문헌 18, 19 및 20). 이러한 사실들은 생체주기 시스템의 분자적 구성요소가 감정 조절에서 중요한 역할을 하고 있음을 제시한다. 한편, 인간 NR1D1 유전자의 다형성은 조울증의 발병 및 조울증의 주요 치료제인 리튬에 대한 반응성에 관련되어 있다(비특허문헌 21, 22 및 23).

[0006]

따라서 일주기 리듬과 관련된 다양한 뇌질환 및/또는 신경질환의 예방 및 치료를 위해, 일주기 리듬과 생체시계 분자 네트워크의 연관성을 분자적 수준에서 규명하고, 관련된 유전자 및 단백질을 확인하여 이에 기초한 약물을 개발하는 것이 필요한 상황이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 핵수용체인 REV-ERB α 의 활성제어가 정서장애 및 중독질환 치료에 직접적으로 이용될 수 있을 뿐만 아니라, REV-ERB α 의 활성제어를 통해 도파민 합성의 속도 결정단계인 TH(tyrosine hydroxylase)의 발현을 제어함으로써 파킨슨병을 포함한 다양한 도파민 시스템 조절이상에 기인한 뇌질환 및/또는 신경질환의 예방 및 치료에 이용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 미국특허등록 제5,138,045호
(특허문헌 0002) 미국특허등록 제5,218,105호
(특허문헌 0003) 미국특허등록 제5,459,255호
(특허문헌 0004) 국제공개공보 WO 00/44895
(특허문헌 0005) 국제공개공보 WO 01/36646
(특허문헌 0006) 국제공개공보 WO 99/32619
(특허문헌 0007) 국제공개공보 WO 01/29058
(특허문헌 0008) 국제공개공보 WO 99/07409
(특허문헌 0009) 국제공개공보 WO 00/44914

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Ko and Takahashi, 2006, Hum Mol Genet 15:R271.
(비특허문헌 0002) Stratmann and Schibler, 2006, J Biol Rhythms 21:494.
(비특허문헌 0003) Son et al., 2008, Proc Natl Acad Sci USA 105: 20970.
(비특허문헌 0004) EBenca et al., 2009, Brain Res Rev 62:57.
(비특허문헌 0005) Severino et al., Bipolar Disord 11:215;
(비특허문헌 0006) McClung, 2007, Pharmacogenomics 8:1097.
(비특허문헌 0007) Nieoullon, 2002, Prog Neurobiol 67:53.
(비특허문헌 0008) Leibenluft and Suppes, 1999, Am J Psychiatry 156:1976.
(비특허문헌 0009) Van der Heijden et al., 2005, Chronobiol Int 22:559.
(비특허문헌 0010) Whitehead et al., 2008, Mov Disord 23:1137.
(비특허문헌 0011) Aston-Jones et al., 2001, Nat Neurosci 4:732.
(비특허문헌 0012) Akhisaroglu et al., 2005, Pharmacol Biochem Behav 80:371.
(비특허문헌 0013) McClung et al., 2005, Proc Natl Acad Sci USA 102:9377.
(비특허문헌 0014) Lemos et al., 2007, Endocrinology 148:5811.
(비특허문헌 0015) Roybal et al., 2007, Natl. Acad. Sci. USA 104:6406.
(비특허문헌 0016) Mukherjee et al., 2010, Biol. Psychiatry 68:503.
(비특허문헌 0017) Hampp et al., 2008, Curr. Biol. 18:678.
(비특허문헌 0018) Kondratova et al., 2010, Aging (Albany NY): 285.

- (비특허문헌 0019) De Bundel et al., 2013, *Front. Behav. Neurosci.* 7:152.
- (비특허문헌 0020) Kripke et al., 2009, *J. Circadian Rhythms* 7:2.
- (비특허문헌 0021) Severino et al., 2009, *Bipolar Disord.* 11:215-220.
- (비특허문헌 0022) Etain et al., 2011, *Neuropsychopharmacol.* 21 Suppl 4:S676-S682.
- (비특허문헌 0023) Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed.
- (비특허문헌 0024) Peter B. Kaufman et al., *Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 102-108, CRCpress.
- (비특허문헌 0025) *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980.
- (비특허문헌 0026) Gastra, W., Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984.
- (비특허문헌 0027) Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.
- (비특허문헌 0028) De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995.
- (비특허문헌 0029) Chopin-Delannoy et al., A specific and unusual nuclear localization signal in the DNA binding domain of the Rev-erb orphan receptors. *J. Mol. Endocrinol.* 30, 197-211, 2003.
- (비특허문헌 0030) Kim et al., Orphan nuclear receptor Nurrl directly transactivate the promoter activity of the tyrosine hydroxylase gene in a cell-specific manner. *J. Neurochem.* 85, 622-624, 2003.
- (비특허문헌 0031) Guez-Barber, D., Fanous, S., Harvey, B.K. Zhang, Y., Lehrmann, E., Becker, K.G., Picciotto, M.R., and Hope, B.T., FACS purification of immunolabeled cell types from adult rat brain. *J. Neurosci. Methods* 203, 10-18, 2012.
- (비특허문헌 0032) Chung et al., Differential adaptive responses to chronic stress of maternally stressed male mice offspring. *Endocrinology* 146, 3202-3210, 2005.
- (비특허문헌 0033) Son et al., Hyperactivity and alteration of the midbrain dopaminergic system in maternally stressed male mice offspring. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 352, 823-829, 2007.
- (비특허문헌 0034) Lee et al., Impairment of fear memory consolidation in maternally stressed male mouse offspring: evidence for nongenomic glucocorticoid action on the amygdala. *J. Neurosci.* 31, 7131-7140, 2011.
- (비특허문헌 0035) Chamero et al., Identification of protein pheromones that promote aggressive behaviour. *Nature* 450, 899-902, 2007.
- (비특허문헌 0036) Kojetin et al., Identification of SR8278, a synthetic antagonist of the nuclear heme receptor REV-ERB. *ACS Chem. Biol.* 6, 131-134, 2011.
- (비특허문헌 0037) Woldt et al., Rev-erbamodulates skeletal muscle oxidative capacity by regulating mitochondrial biogenesis and autophagy. *Nat. Med.* 19, 1039-1046, 2013.
- (비특허문헌 0038) Suri et al., Catecholaminergic cell lines from the brain and adrenal glands of tyrosine hydroxylase-SV40 T antigen transgenic mice. *J. Neurosci.* 13, 1280-1291, 1993.
- (비특허문헌 0039) Zetterstrom et al., Dopamine neuron agenesis in Nurrl-deficient mice. *Science* 276, 248-250, 1997.
- (비특허문헌 0040) Yin et al., The orphan nuclear receptor Rev-erb α recruits the N-CoR/histone deacetylase 3 corepressor to regulate the circadian Bmal1 gene. *Mol. Endocrinol.* 19, 1452-1459, 2005.
- (비특허문헌 0041) Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S.E., Alenghat, T., Liu, X.S., and Lazar, M.A. 2011.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 핵수용체인 REV-ERB α 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 이용하여 도파민 시스템 조절이상에서 기인하는 신경질환 및/또는 뇌질환을 예방 및/또는 치료하기 위한 신규한 약물후보물질을 스크리닝하는 방법을 제공하는 데 목적이 있다.
- [0011] 또한, 본 발명은 기존의 신경질환 및/또는 뇌질환 치료제와 병용투여 시 상승효과를 가질 수 있는 신규한 약물 후보물질을 스크리닝 방법을 제공하는 데 목적이 있다.
- [0012] 또한, 본 발명은 핵수용체인 REV-ERB α 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 억제하여, 도파민 시스템 조절이상에서 기인하는 신경질환 및/또는 뇌질환의 예방 및/또는 치료에 효과가 있는 약학조성물을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 일주기적 TH 유전자 발현의 분자기전을 확인하였다. 구체적으로, 도파민 신경세포의 상위조절 전사인자인 NURR1과 분자 생체시계 보조고리의 핵심 전사 억제인자인 REV-ERB α 의 경쟁적 전사조절 기전을 밝히고, 이들의 길항적 작용이 TH 유전자 발현 및 중뇌 도파민 시스템이 보이는 일주기성의 핵심 기전이라는 사실을 입증하였다. NURR1과 REV-ERB α 의 경쟁적 전사조절은 TH 프로모터에 존재하는 R/N1과 R/N2라는 특정 *cis*-엘리먼트를 통해 이루어지는데, 이와 같은 프로모터 구조 및 R/N *cis*-엘리먼트는 마우스, 흰쥐 등 설치류에서 뿐만 아니라 인간의 TH 프로모터에서도 진화적으로 보존되어 있다. 상기 조절기전은 분자 생체시계의 작동 과정에 핵심적인 *Bmal1* 유전자의 일주기적 발현 조절 과정에서 알려진 REV-ERB α 와 ROR과 경쟁적 전사 조절기전과는 차별적인 도파민 신경세포 특이적 조절 기전으로서 REV-ERB α 의 새로운 작용기전을 제시한다.
- [0014] 또한, 본 발명자들은 동물모델을 확립하였다. 본 발명자들은 REV-ERB α 녹아웃 마우스를 대상으로 꼬리 매달리기 테스트, 새로운 서식처 테스트, 십자형 높은 미로 테스트 등 7종의 조증, 우울증, 강박증, 불안증 및 공포 관련 동물행동 검사를 수행함으로써, 녹아웃 마우스에서 인간의 조울증과 유사한 표현형이 나타난다는 사실을 확인하였다. 본 발명에서 확인된 REV-ERB α 녹아웃 마우스의 표현형은 다음과 같다: 1) 꼬리 매달리기 테스트 및 강제 수영 테스트: 우울도가 정상치보다 낮은 조증 유사형질이 관찰됨; 2) 십자형 높은 미로 테스트 및 새로움에 대한 반응: 운동 활성 측면에서 과활성이 관찰되며 불안도가 정상마우스에 비해 유의한 수준으로 낮게 관찰되며, 이 역시 조증 유사행동으로 볼 수 있음; 3) 공격성 테스트: 거세된 수컷 마우스에 대한 공격성을 비교한 결과 REV-ERB α 녹아웃 마우스의 비정상적인 공격성을 입증함. 인간의 조증에서도 높은 공격성이 관찰됨; 4) 두려움 관련 테스트: 이상과 같은 조증 유사행동 및 높은 공격성에도 불구하고 포식자의 냄새에 대한 본능적인 두려움 반응(*innate fear response*)이나 조건화 학습을 통한 조건 두려움 반응(*conditioned fear response*)은 오히려 더 높게 나타남.
- [0015] 특히 REV-ERB α 녹아웃 마우스에서는 도파민의 과합성과 더불어 중뇌 도파민 신경회로의 과활성이 관찰되는데, 본 발명은 상기 이상 행동이 일차적으로 도파민 과활성에서 기인함을 제시한다.
- [0016] 본 발명은 중뇌 도파민 시스템 신규 제어기술을 제시한다. 구체적으로, 본 발명에서 REV-ERB α 의 작용제(GSK4112(CAS 1216744-19-2)) 및 길항제(SR8278(ISSN:1554-8929))를 이용한 실시예는, 분자 생체시계를 경유하는 새로운 TH 유전자 발현 및 도파민 합성 제어기술을 제공한다. 도파민 배양세포를 이용한 *in vitro* 실험 결과는, 상기 REV-ERB α 조절 약물의 처리가 본 발명에서 최초로 동정한 TH 프로모터 상의 R/N1 및 R/N2 *cis*-엘리먼트를 통해 TH 유전자의 전사 활성을 조절함을 뒷받침한다. 구체적으로, 마우스의 복측 중뇌에 REV-ERB α 의 길항제를 투여할 경우, 국부적인 저해만으로도 TH 유전자의 과발현이 유도될 뿐만 아니라 조증 유사행동이 즉각적으로 나타남이 확인되었으며, 이는 기분/정서 조절에 있어서, 중뇌 도파민 신경세포가 자체적으로 발현하는 REV-ERB α 의 기능적 중요성을 입증한다.
- [0017] 본 발명은 일주기성 핵수용체인 rev-ERB α 와 도파민 시스템의 핵심 전사인자인 NURR1의 기능적 상호작용을 규명하며, 이를 통해 생체시계 분자기구와 일주기적 활성을 보이는 중뇌 도파민 시스템의 분자적 연결 고리를 확인

한다. 또한, 본 발명은 도파민 합성의 핵심인자인 TH 유전자의 일주기적 발현 조절 기전을 확인한다. 또한, 본 발명은 조울증 및 우울증의 동물행동 실험모델을 통해 중뇌 도파민 신경세포가 국부적으로 발현하는 rev-ERB α 의 생리적 기능성을 규명한다.

[0018] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시료"는 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 양 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 용어 “장애”와 “질환”은 동일한 의미를 갖는 것으로 이해된다.

[0020] 또한, 본 명세서에서 사용된 용어, 단백질 또는 폴리펩티드의 “단편”, “유도체” 및 “유사체”는, 본 발명의 단백질 또는 폴리펩티드와 실질적으로 같은 기능 또는 활성을 보유하는 단백질 또는 폴리펩티드로 이해되며, 본 발명에서 단백질 또는 폴리펩티드는 재조합 단백질 또는 폴리펩티드를 포함함은 물론이다.

[0021] 유전자의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR(비특허문헌 23), 노던블롯팅(비특허문헌 24), cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응(비특허문헌 23) 또는 인시투(in situ) 혼성화 반응(비특허문헌 23)을 이용하여 실시할 수 있다. 일례로 SyBR green법을 이용한 RT-PCR 프로토콜에 따라 실시하는 경우에는 우선, 시료를 처리한 세포에서 총 RNA를 분리한 다음, Random Hexamer 혹은 oligo-dT 등 프라이머 및 역전사효소를 이용하여 단일가닥 cDNA를 제조한다. 이어, 단일가닥 cDNA를 주형으로 이용하고, 유전자-특이적 프라이머 세트를 이용하여 실시간 정량 PCR 반응(real time quantitative PCR)을 실시함으로써 유전자 발현량의 변화를 측정한다. 실시간 PCR에 대한 결과는 표준 곡선을 사용하지 않는 상대정량법인 Comparative Ct(concentration of target) 방법에 따라 분석하고, 대조군에 대하여 표준화하며, 대조군 RNA에 대한 결함의 배수 차이로서 나타낸다. 유전자-특이적 프라이머 세트는 하기 [표 2]에서 제시되어 있다. 하기 [표 1]은 본 발명에서 사용되는 단백질 및 유전자에 대한 서열을 나타낸다.

표 1

서열목록	서열 내용
서열번호 1	인간(human) REV-ERB α 단백질 아미노산 서열
서열번호 2	생쥐(mouse) REV-ERB α 단백질 아미노산 서열
서열번호 3	흰쥐(rat) REV-ERB α 단백질 아미노산 서열
서열번호 4	인간(human) TH 단백질 아미노산 서열
서열번호 5	생쥐(mouse) TH 단백질 아미노산 서열
서열번호 6	흰쥐(rat) TH 단백질 아미노산 서열
서열번호 7	인간(human) REV-ERB α 유전자(mRNA/cDNA) 염기 서열
서열번호 8	생쥐(mouse) REV-ERB α 유전자(mRNA/cDNA) 염기 서열
서열번호 9	흰쥐(rat) REV-ERB α 유전자(mRNA/cDNA) 염기 서열
서열번호 10	인간(human) TH 유전자(mRNA/cDNA) 염기 서열
서열번호 11	생쥐(mouse) TH 유전자(mRNA/cDNA) 염기 서열
서열번호 12	흰쥐(rat) TH 유전자(mRNA/cDNA) 염기 서열
서열번호 13	인간(human) NURR1 단백질 아미노산 서열
서열번호 14	생쥐(mouse) NURR1 단백질 아미노산 서열
서열번호 15	흰쥐(rat) NURR1 단백질 아미노산 서열
서열번호 16	인간(human) TH 프로모터 염기 서열
서열번호 17	생쥐(mouse) TH 프로모터 염기 서열
서열번호 18	흰쥐(rat) TH 프로모터 염기 서열

표 2

서열이름	서열번호	서열
TH up	19	5'- AGT GAT GCC AAG GAC AAG CTC - 3'
TH dn	20	5'- GCT AAT GGC ACT CAG TGC TT - 3'
Rev-erb α up	21	5'- AGG GCA CAA GCA ACA TTA CC - 3'
Rev-erb α dn	22	5'- CAC AGG CGT GCA CTC CAT AG - 3'
Bmal1 up	23	5'- CAA GCA CCT TCC TTC CAA TG - 3'
Bmal1 dn	24	5'- GAT TGC AGT CCA CAC CAC TG - 3'

Per2 up	25	5'- ATG CTC GCC ATC CAC AAG A - 3'
Per2 dn	26	5'- GCG GAA TCG AAT GGG AGA AT - 3'
Nurr1 up	27	5'- TGA AGA GAG CGG ACA AGG AGA TC - 3'
Nurr1 dn	28	5'- TCT GGA GTT AAG AAA TCG GAG CTG - 3'
TBP up	29	5'- GGG AGA ATC ATG GAC CAG AA - 3'
TBP dn	30	5'-CCG TAA GGC ATC ATT GGA CT - 3'

[0024]

단백질의 양의 변화는 당업계에 공지된 다양한 면역분석 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, 방사능면역 분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 그리고 샌드위치 분석을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석 또는 면역염색의 방법은 문헌(비특허문헌 25, 26 및 27)에 기재되어 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 표지된 단백질-특이 항체가 이용될 수 있다. 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 시료가 처리된 세포로부터 추출물을 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계 (ii) 표적 단백질-특이 항체와 상기 세포 추출물을 반응시키는 단계 (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다. 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다. 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시 페라아제 및 사이토크롬 P450을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모 클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-ASB1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), TMB(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]) 및 o-페닐렌디아민(OPD)과 같은 기질이 이용될 수 있다. 상기 ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

[0025]

본 발명의 약제학적 조성물은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 항진균용 의약 조성물 또는 항진균 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 항진균용 의약 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, MackPublishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁액, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 저해제는 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1 ng/kg ~ 10 g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1 ng/kg ~ 10 g/kg, 안티센스올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일

경우 0.01 ng/kg ~ 10 g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0026]

본 발명에서 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다. 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(비특허문헌 28). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아톰릭, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-Me 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨주게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오펜, 지방성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 핵실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(특허문헌 1 내지 3). 상기 변형된 핵산은 뉴클레아제에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 한 예는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.

[0027]

본 발명에서 용어 "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(특허문헌 4 내지 9). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다. siRNA는 식물, 벌레, 조파리 및 기생충에서 처음으로 발견되었으나, 최근에 siRNA를 개발/이용하여 포유류 세포 연구에 응용되었다(8-10). 본 발명의 siRNA 분자는, 센스 가닥(mRNA 서열에 상응하는 서열)과 안티센스 가닥(mRNA 서열에 상보적인 서열)이 서로 반대쪽에 위치하여 이중체를 이루는 구조를 가질 수 있다. 또한, 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥을 가지는 단일체 구조를 가질 수 있다. siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음) 등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 더욱 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3'-말단 돌출 구조와 5'-말단 돌출 구조 모두 가능하다. 본 발명의 siRNA 분자는, 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열(예컨대, 약 5-15 nt)이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-앤드-루프 구조는 in vitro 또는 in vivo에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다.

[0028]

한편, 본 발명에서 용어 "shRNA(small hairpin RNA)"는 목적유전자 siRNA 염기서열의 센스(sense)와 상보적인 넌센스(nonsense) 사이에 3 ~ 10개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후 프라스미드 벡터에 클로닝하거나 또는 shRNA를 레트로바이러스인 렌티바이러스(lentivirus) 및 아데노바이러스(adenovirus)에 삽입하여 발현시키면 루프(loop)가 있는 헤어핀 구조의 shRNA (short hairpin RNA)가 만들어지고 세포 내의 Dicer에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타내는 것을 말한다. 상기 shRNA는 siRNA에 비해 비교적 장기간 RNAi 효과를 나타낸다.

[0029]

일 구체예에서, 본 발명은 (a) 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 REV-ERB α 단백질 및 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 TH 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 REV-ERB α 단백질의 양 또는 활성이 감소

하고 TH 단백질의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 단백질의 양 또는 활성이 증가하고 TH 단백질의 양 또는 활성이 감소하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0030]

다른 일구체예에서 본 발명은 (a) 서열번호 2와 90% 이상 상동성을 갖는 아미노산 서열로 표시되는 REV-ERB α 단백질 및 서열번호 5와 90% 이상 상동성을 갖는 아미노산 서열로 표시되는 TH 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 REV-ERB α 단백질의 양 또는 활성이 감소하고 TH 단백질의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 단백질의 양 또는 활성이 증가하고 TH 단백질의 양 또는 활성이 감소하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0031]

다른 일구체예에서 본 발명은 (a) REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체; 및 TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 감소하고, TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 증가하고, TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 감소하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0032]

또한, 일 구체예에서, 본 발명은 (a) 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9로 표시되는 *REV-ERB a* 유전자 및 서열번호 10, 서열번호 11 또는 서열번호 12로 표시되는 *TH* 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 *REV-ERB a* 유전자의 발현량이 증가하고 상기 *TH* 유전자의 발현량이 감소하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 유전자의 발현량이 감소하고 *TH* 유전자의 발현량이 증가하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0033]

또한, 일 구체예에서, 본 발명은 (a) 서열번호 8과 90% 이상 상동성을 갖는 염기서열로 표시되는 *REV-ERB a* 유전자 및 서열번호 11과 90% 이상 상동성을 갖는 염기서열로 표시되는 *TH* 유전자를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 유전자의 발현량을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 *REV-ERB a* 유전자의 발현량이 증가하고 상기 *TH* 유전자의 발현량이 감소하는 것이 확인되거나; 또는 REV-ERB α 유전자의 발현량이 감소하고 *TH* 유전자의 발현량이 증가하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0034]

다른 일구체예에서, 본 발명은 (a) 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9로 표시되는 *REV-ERB a* 유전자 및 서열번호 4, 서열번호 5 또는 서열번호 6으로 표시되는 TH 단백질을 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 유전자의 발현량, 및 상기 단백질의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 *REV-ERB a* 유전자의 발현량이 증가하고 상기 TH 단백질의 양 또는 활성이 감소하는 하는 것이 확인되거나; 또는 *REV-ERB a* 유전자의 발현량이 감소하고 상기 TH 단백질의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 또는/및 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0035]

다른 일구체예에서, 본 발명은 (a) 서열번호 8과 90% 이상 상동성을 갖는 염기서열로 표시되는 *REV-ERB a* 유전자, 및 TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 유전자의 발현량, 및 상기 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 *REV-ERB a* 유전자의 발현량이 증가하고 상기 TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 감소하는 하는 것이 확인되거나; 또는 *REV-ERB a* 유전자의 발현량이 감소하고 상기 TH 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체의 양 또는 활성이 증가하는 하는 것이 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 또는/및 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0036]

다른 일구체예에서, 본 발명은 (a) 서열번호 1, 서열번호 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 REV-ERB α 단백질,

서열번호 13, 서열번호 14 또는 서열번호 15로 표시되는 NURR1 단백질, 및 서열번호 16, 서열번호 17 또는 서열번호 18로 표시되는 TH 프로모터의 R/N1 부위 및 R/N2 부위를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 시료 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 REV-ERB α 단백질 및 NURR1 단백질의 상기 R/N1 및 R/N2 각 부위에 대한 결합력의 변화를 측정하는 단계; 및 (c) 상기 결합력의 변화가 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 또는/및 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 여기서 R/N1 및 R/N2 각 부위에 대한 상기 단백질들의 결합력의 변화 측정은 일정 기간의 CT(생체주기시간) 예를 들어, CT00 내지 CT12 또는 일정 시점의 생체주기시간 예를 들어, CT00 및 CT12에서 수행될 수 있다.

[0037] 다른 일구체예에서, 본 발명은 (a) REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체, 및 TH 프로모터의 R/N1 부위 및 R/N2 부위를 포함하는 세포에 분석할 시료를 접촉시키는 단계; (b) 시료 접촉 전과 접촉 후에 있어서, 상기 각 REV-ERB α 단백질, 또는 이의 활성 단편, 유도체 또는 유사체 및 NURR1 단백질의 상기 R/N1 및 R/N2 각 부위에 대한 결합력의 변화를 측정하는 단계; 및 (c) 상기 결합력의 변화가 확인되는 경우, 상기 시료가 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제임을 판별하는 단계를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환의 예방 및/또는 치료제 스크리닝 방법을 제공한다. 여기서 R/N1 및 R/N2 각 부위에 대한 상기 단백질들의 결합력의 변화측정은 일정 기간의 CT 예를 들어, CT00 내지 CT12 또는 일정 시점, CT00 및 CT12에서 수행될 수 있다.

[0038] 상기 구체예에서, (a) 단계의 세포는 시판중인 일차배양 도파민 신경세포, 유도분화 도파민 신경세포, PC12 세포주(ATCC 입수가능, 카탈로그 번호 CRL-1721), 도파민 과발현성 불멸의 세포주인 Cath.a 세포주(ATCC 입수가능, 카탈로그 번호 CRL-11179, 비특허문헌 38) 또는/및 MN9D 세포주(ATCC 입수가능, 비특허문헌 38)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 또 다른 일구체예에서, 본 발명은 REV-ERB α 의 작용제 또는 길항제를 포함하는, 정서장애 및/또는 중독질환 예방 및/또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하며, 여기서 REV-ERB α 의 작용제가 GSK41122이고, 길항제가 SR8278일 수 있다.

[0040] 또 다른 일구체에서, (a) 도파민 의존성 신경질환의 진단이 필요한 환자로부터 분리된 신경세포에 대해, REV-ERB α 및 NURR1의 각 단백질의 TH 프로모터의 R/N1 부위 및 R/N2의 각 부위에 대한 결합력을 CT00 및 CT12에서 측정하는 단계; 및

[0041] (b) 상기 (a)단계에서 측정한 결합력을, 분리된 정상인의 신경세포에 대해 CT00 및 CT12에서 측정한, REV-ERB α 및 NURR1의 각 단백질의 TH 프로모터의 R/N1 부위 및 R/N2의 각 부위에 대한 결합력과 비교하는 단계를 포함하여, NURR1과 R/N1의 결합력이 CT12에서 증가 된 결과를 보인 경우, 도파민 의존성 신경질환자로 판단하는 방법을 제공한다.

[0042] 본 발명에서 뇌질환 및 신경장애(질환)은, 정서장애 및 중독질환, 및 도파민 의존성 신경질환을 포함한다. 또한, 정서장애 및 중독질환은 우울증, 조울증, 계절성 기분장애, 주의력결핍 과잉행동장애(attention deficit hyperactivity disorder, ADHD) 및 공황장애 등 다양한 정서장애(질환)와 중독장애(질환)를 포함하는 것으로 이해되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 도파민 의존성 신경질환은 파킨슨병, 헌팅턴병 및 하지불안증후군(Restless leg syndrome) 등을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0043] 본 발명에 따르면, 핵수용체 REV-ERB α 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 조절하여 도파민 시스템 조절이상으로 기인하는 신경질환에 대해 예방 및/또는 치료효과를 갖는 효과적인 후보물질들을 탐색할 수 있다. 또한, 본 발명은 기존의 신경질환 치료제와 병용투여시 상승효과를 가질 수 있는 후보물질들을 스크리닝 방법을 제공한다.

본 발명에서 확인된 TH 유전자의 일주기적 전사조절 기전은, 조울증, 우울증, 계절성 신경질환을 비롯하여 ADHD(Attention deficit hyperactivity disorder), 약물중독 등 다양한 중뇌 도파민 의존적인 질환에 대한 치료기술 개발의 새로운 분자표적을 제시한다. 또한, 본 발명의 세포 기반 분석 모델과 REV-ERB α 녹아웃 마우스의 신경생리학·행동학적 특성은 이를 대상으로 하는 후보 화합물에 대한 평가 모델로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044]

도 1에서 (A)는 우울증 유사행동의 일일 변화, (B)는 EPM 테스트 결과, (C)는 이동 습성 테스트 결과, (D)는 공격성 테스트 결과, 및 (E) 두려움 테스트 결과를 각각 나타낸다.

도 2는 RKO 마우스 및 야생형 마우스에서 차별적으로 발현되는 mRNA에 대한 마이크로 어레이 분석 결과이다.

도 3A 상단은 *Bmal1* mRNA의 일중 발현 패턴을 나타내며, 3A 하단은 *Rev-erba* 및 *Per2* mRNA 수준의 생체주기 진동을 나타낸다.

도 4a 및 도 4b는 REV-ERB α 의 손상과 *Nurr1* mRNA 발현량, 및 도파민 작동성 기능에 관련된 다른 mRNA의 발현량을 분석한 결과이다.

도 3C 및 도 5는 TH-면역 반응성 세포의 비율을 나타낸다.

도 3E는 아테노바이러스 벡터 감염시킨 마우스 뇌 단면을 항-TH 또는 항-Myc 표지 항체를 사용하여 면역염색한 결과를 나타내고, 도 3F는 Myc 표지된 hTH를 발현하는 마우스에서 절망-유사 행동 테스트 결과, 도 3G는 불안-유사 행동, 도 2H는 두려움 테스트 결과, 및 도 3I는 새로운 것에 의해 유발되는 행동 테스트 결과를 각각 나타낸다.

도 6A, 6B, 7C 및 7D는 REV-ERB α 결핍 마우스 내 중뇌 도파민 작동성 활성을 나타낸다.

도 6C 및 도 8은 REV-ERB α 가 복측 중뇌(VMB)의 전기생리학적 특성에 미치는 영향을 나타낸다.

도 6D 내지 6E, 도 9A, 9B 및 9C는 도파민 작동성 활성이 RKO 마우스 내 변화된 감정-관련 행동과 관련되어 있는지 여부를 검사한 결과이다.

도 10A는 생체시계 단백질들의 공동-발현을 보여준다.

도 10B는 야생형 마우스와 RKO 마우스에서 SR8278 미세주입에 의한 REV-ERB α 의 국지적인 저해에 의한 TH 및 *Bmal1* mRNA 발현변화를 나타낸 것이다.

도 10C 내지 10G. 및 도 11은 SR8278의 미세주입에 따른 마우스의 행동 변화를 관찰한 결과이다.

도 12 내지 14는 TH 유전자 전사조절에서 REV-ERB α 와 NURR1 사이의 길항적 크로스트로크를 실험한 결과이다.

도 15는 REV-ERB α 및 NURR1이 생체 내(*in vivo*)에서 R/N1 및 R/N2에 대하여 경쟁적으로 결합하는지를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0046]

실험재료 및 연구방법

[0047]

(1) 실험동물 및 발현 벡터

[0048]

수컷 RKO 마우스(REV-ERB α 녹아웃 마우스) 및 야생형 마우스(10 내지 15주령)는 C57BL/6J 유전적 배경에서 보존하였다. 마우스는 12시간 낮-밤 광주기(오전 8시 점등) 환경에서 22 내지 23 °C로 온도가 조절되는 구역에서 사육하였다. 광주기 조절 하에 10일 이상 동반 사육한 후, 마우스는 조명을 끈 시간부터 2일 동안 지속적인 암 환경에 방치하였다. 3일째, 마우스는 경추 탈골에 의해 지정된 시간에 희생시켰다. 지속적인 암 조건에서 모든 행동학적 테스트는 3일 또는 4일에 실시하였다. 모든 과정은 서울대학교 실험동물 위원회에 의해 승인 받았다.

[0049]

발현 벡터는 기존 논문(비특허문헌 29: Chopin-Delannoy et al., 2003, J. Mol. Endocrinol. 30, 197-211; 비특허문헌 30: Kim et al., 2003, J. Neurochem. 85, 622-634; 비특허문헌 3: Son et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 20970-20975)에서 기술된 것과 같이 제조하였다. 래트 5.2Kb TH 프로모터 및 이의 순차적으로 결실된 유도체들은 기존 논문(비특허문헌 30: Kim et al., 2003, J. Neurochem. 85, 622-634)에서 상세히 기술된 바와 같이 제조하였다. 야생형 및 위치-특이적으로 변이된 2.4Kb 래트 TH 프로모터(번역 시작 위치

로부터 - 2491 내지 - 9 위치), 마우스 TH 프로모터 (번역 시작 위치로부터 -2306 내지 -1) 및 인간 TH 프로모터(번역 시작 위치로부터 -2523 내지 +76)은 PCR을 이용하여 제조하였다.

[0050] (2) 사용 약제 및 투여 경로

[0051] HALO (0.2 mg/kg; Sigma Aldrich) 또는 AMPT (100 mg/kg; Sigma-Aldrich)를 테스트 1 내지 2시간 전에 마우스에 복강 내 주사하였다. SR8278은 전기생리학 기록을 시작하기 6시간 전에 마우스당 64 ug을 정맥 주사하였다(I.C.V). 행동 연구와 유전자 발현 분석을 위해, SR8278은 실험 4시간 전에 복측 중뇌(VMB) 또는 뇌실 주위 회색질(PVG)에 직접 미세주입하였다.

[0052] (3) 행동 연구 내용 및 방법

[0053] 모든 행동 테스트는 희미한 적색 조명하에서 지정된 시간에 실시하였다.

[0054] (4) RNA 및 단백질 분석

[0055] 조직을 신속하게 채취하여 액체 질소에서 냉동시켰다. 전체 RNA는 단일 단계 산 구아니디늄 티오시아네이트-페놀 클로로포름 방법으로 분리하였다. 면역블롯 분석에 사용할 시료는 SDS 용해 완충액 내에 조직을 균질화하여 제조하였다.

[0056] (5) FACS 분석

[0057] 도파민에 의해 활성화되는 신경세포의 개체군수를 측정하기 위해 기존 논문(비특허문헌 31: Guez-Barber et al., 2012, J. Neurosci. Methods 203, 10-18)에 기재된 방법에 따라 유세포 분석기를 사용하였다. 복측 중뇌 조직은 2 mm 두께의 뇌 단면으로부터 얼음으로 냉각시킨 뇌 기질에 대하여 신속하게 절단하였고 (마우스 2두 분석), 절단한 조직을 얼음으로 냉각시킨 하이버네이트 A 용액 (제조사: Invitrogen) 내로 옮기고, Accutase (제조사: Millipore)로 배양하여 분해한 후 유세포 분석기를 이용한 분석을 실시하였다.

[0058] (6) 도파민(DA) 측정

[0059] 생체 외에서 도파민 및 대사산물의 과용해 및 측정은 기존 논문(비특허문헌 31: Geldenhuys et al., 2009, Eur. J. Pharmacol. 619, 38-43)에 기재된 방법에 따라 실시하였다. 정적 배양을 위해, 절단되어 신선한 선조 조직은 60분 간 평형화시켰고, 용출된 시료는 20분 간격으로 3회 수집하였다. 생체 조건에서 도파민과 도파민 대사산물의 세포 외 수준을 측정하기 위해, 1 mm 막 길이를 갖춘 미세투석 (CMA 미세투석) 탐침을 복측 선조에 삽입하였다. 탐침은 살균된 인조 뇌척수액을 사용하여 1.5 μ l/min 속도로 관류하였다. 미량투석물 (microdialysate)은 관류 전 2시간 이후로 2시간 간격으로 수집하였다. 도파민(DA), DOPAC 및 HVA는 전기화학적 탐지를 갖춘 역상 고성능 액체 크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

[0060] (7) 전기 생리학 기록

[0061] 8 내지 9개의 진공관 및 1개의 기준 전극으로 구성된 마이크로드라이브 배열은(즉, 하이퍼드라이브)는 자유롭게 이동하는 마우스의 복측 피개부(VTA) 내 전기생리학 기록에 사용하였다. 신경세포 스파이킹(spiking) 자료는 디지털 Lynx 자료 수집 시스템(Neuralynx)를 이용하여 증폭 및 수치화하였다.

[0062] (8) 세포 배양

[0063] 세포 배양 재료는 Invitrogen 사로부터 구입하였다. CATH.a 세포는 4 mM 글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신 및 10% 우태아혈청을 보충한 RPMI1640 배지에서 배양하였다. 형질도입 및 루시퍼라아제-리포터 실험을 실시하였다.

[0064] (9) ChIP 분석 실험

[0065] ChIP 분석 실험은 상용화된 키트(제조사: Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 실시하였다.

[0066] (10) 통계분석

[0067] 실험 그룹 간 차이점은 스튜던트 t-테스트(t-test) 또는 일원 변량분석(ANOVA)를 사용하고 Newman-Keuls 비교를 통해 측정하였다. 이동 및 신경세포 점화 속도는 변량분석(ANOVA)에 이은 본페로니 테스트를 실시하여 반복적으로 측정함으로써 계산하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

[0068] 실시예

실시예 1

[0069] 비정상적인 감정에 관련된 REV-ERB α 결핍 마우스의 표현형

[0070] 우울증 유사행동에 대한 테스트로서 절망(despair)-기반의 꼬리 매달기 테스트(TST) 및 강제 수영 테스트(FST)는 기존 논문(비특허문헌 15: Roybal et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 6406-6411; 비특허문헌 17: Hampf et al., 2008, Curr. Biol. 18, 678-683)에 기재된 방법을 약간 변형하여 실시하였다. TST에 대하여, 각각의 마우스는 흰색 상자(36.5 × 30.5 × 30.5 cm) 내에서 6분 동안 꼬리로 매달리게 하였다. 마우스는 불안 및 탈출시도가 중지되면 움직이지 않는 것으로 간주되었다. FST 테스트에서, 마우스를 15 cm 깊이의 물(21 ~ 25℃)를 포함하는 투명한 비이커(직경 10 cm) 내에 6분 동안 방치하였다. 의도적인 몸체 또는 다리의 움직임이 없는 것으로 정의되는 부동성은 최종 4분 동안 움직이지 않는데 소요된 시간의 백분율로 계산하였다. 불안 행동 테스트는 기존 논문(비특허문헌 32: Chung et al., 2005, Endocrinology 146, 3202-3210)에 기재된 바에 따라 실시하였다. 미로는 20 cm 높은 벽을 갖춘 2개의 개방 암과 2개의 폐쇄 암으로 구성되었다. 이 장치는 지면으로부터 50 cm 위쪽에 설치하였다. 각 마우스를 개방 암을 보는 장치의 중심부에 두고 10분간 관찰하였다. 암 출입의 빈도 및 시간을 기록하였다. 출입은 암을 향해 마우스가 4발을 이동하는 것으로 정의하였다. 개방 암에서 소요된 시간의 백분율을 계산하였다. 운동성 습관화 테스트는 기존 논문(비특허문헌 33: Son et al., 2007, Biochem. Biophys. Res. Commun. 352, 823-829)에 기재된 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 마우스는 2시간 동안 깔짚이 있는 안전유리 상자(217 × 268 × 104 mm)에 1두씩 옮겼다. 마우스 행동은 추적 소프트웨어(Ethovision 3.1, Noldus)가 설치된 컴퓨터와 연결시킨 높이 세운 비디오 카메라를 이용하여 기록하였다. 공포 반응 테스트는 기존 논문에 기재된 방법에 따랐다(비특허문헌 34: Lee et al., 2011, J. Neurosci. 31, 7131-7140). 마우스를 30 μ l 트리메틸티아졸린(TMT, PheroTech)이 담긴 비이커가 있는 챔버에 두었다. 포식자 냄새에 대한 반응에서의 본능적인 두려움에 대한 행동을 10분간 측정하고, 최종 4분 동안 두려움을 보이는 시간의 백분율로 계산하였다. 공격성은 기존 논문(비특허문헌 35: Chamero et al., 2007, Nature 450, 899-902)에 기재된 방법을 일부 변형하여 실시하였다. 수컷 마우스는 테스트 전에 1주일간 고립시켰고, 거세시킨 수컷 BALB/C 침입자 마우스(8 내지 9주령)를 고립되었던 수컷 마우스의 케이지에 5분간 방치하였다. 꼬리 떨기, 물기, 추적 및 코너링(cornering) 같은 공격성 접촉 행동의 수를 측정하였다.

[0071] 상기 표현형 관찰 결과, 절망-기반 꼬리 매달기 테스트(TST) 및 강제 수영 테스트에서, 야생형(WT) 마우스는 주관적인 일출 전(subjective dawn, CT(circadian time) 22-02) 보다 주관적인 일몰 후(subjective dusk, 생체주기 시간 08 내지 12시간; CT08-12)에서 부동성의 간격이 더 커진 우울증 유사행동의 일일 변화(도 1A)를 나타내었다. 이와 달리 RKO 마우스는 상기한 행동 변화를 전혀 나타내지 않았고, 일몰 후에서의 우울증 유사행동이 보다 덜 나타났다. 야생형 마우스는 일몰 후에 EPM 내에서 불안-유사 행동을 더 나타내었으나, RKO 마우스는 하루 중 시간대에 관계없이 유사한 정도의 불안도를 나타내었다(도 1B). 야생형 마우스는 새로운 환경에 대한 보다 더 신속한 습관화 반응을 보여주었고(도 1C 좌측), 일출 전보다는 일몰 후에서 짧은 거리를 이동하였다(도 1C 우측). 반면에 RKO 마우스는 이동에서의 일주기적인 변화를 나타내지 않았다. 수컷 RKO 마우스는 야생형 마우스에 비해 보다 더 강한 공격성을 나타냈다. 야생형 마우스 중 20% 미만이 거세된 수컷 침입자를 공격하였지만, RKO 마우스는 50% 이상이 침입자를 공격하였다(도 1D). 공격성의 일일 변화는 야생형 마우스 또는 RKO 마우스에서 관찰되지 않았다.

[0072] 두려움 테스트에서, RKO 마우스가 일몰 후에 포식자 배설물 냄새(트리메틸티아졸린, 도 1E)에 대해 노출 된 경우, 보다 더 큰 두려움을 느꼈으며, 두려움에 대한 본능적인 반응성은 야생형 마우스보다 RKO 마우스에서 더 급격히 변화였다. 이러한 결과는 RKO 마우스가 감정의 불안정성, 모방, 최소한 인간 조울증 환자에서 관찰된 증상과 일부 유사한 증상을 보여 준다는 점을 제시한다.

실시예 2

[0073] 감정 관련 행동에 대한 타이로신 가수분해 효소(TH)의 매개 기능

[0074] REV-ERB α 의 전사적 억제 활성을 고려하여, 본 발명자들은 도파민 작동성 뉴런이 풍부한 복측 중뇌 조직 내 전-유전체 유전자 발현을 분석하였다. 마이크로 어레이 분석은 RKO 마우스 및 야생형 마우스 사이에 차별적으로 발현되는 일부의 mRNA를 확인하였다(도 2). 도파민 생합성에 대한 속도 결정단계의 효소를 암호화하는 TH mRNA

의 발현 수준은 야생형 마우스보다 RKO 마우스에서 높았다. 야생형 마우스 내 도파민의 일증 발현 패턴은 REV-ERB α 의 주요 표적인 *Bmal1* mRNA의 일증 발현 패턴과 유사하였다(도 3a, 상단). *TH* 및 *Bmal1* mRNA 수준은 야간에 증가하였고, 이는 *Rev-erba* 및 *Per2* mRNA 수준의 생체주기 진동과 달랐다(도 3a, 하단). *TH* 및 다른 도파민 관련 유전자의 주요 전사 활성인자인 *Nurr1* mRNA 발현량, 및 도파민 기능에 관련된 다른 mRNA 종의 발현량은 일주기성 또는 기능성 REV-ERB α 의 손실에 의한 영향을 적게 받았다(도 4a 및 4b).

[0075]

면역조직화학 결과는 *TH* 단백질 발현이 야생형 마우스의 중뇌 흑질(substantia nigra, SN) 및 복측 피개영역 내 유사한 생체주기 변화를 나타냄을 검증하였다. FACS에 기반한 정량적 분석은 이러한 사실을 뒷받침하였고, NeuN-양성 뉴런 개체군에 관련된 *TH*-면역 반응성 세포의 비율이 CT12에서보다는 CT00에서 높다는 것을 보여주었다(도 3c 및 도 5). 이러한 일주기적 변화는 RKO 마우스 내 중뇌 흑질 및 복측 피개영역 모두에서 비정상적으로 높은 *TH* 발현 때문에 나타나지 않았다. 이러한 결과는 REV-ERB α 가 억제 기작에 의해 *TH* 발현을 조절한다는 점을 제시한다. 변화된 *TH* 발현이 감정 관련 행동의 변화를 유발하는지 시험하기 위해서, 본 발명자들은 CMV 프로모터의 조절 하에서 C-말단에 Myc 표지시킨 인간 *TH*(hTH-Myc)를 아테노바이러스(AAV) 벡터 시스템으로 지속적으로 발현시켰다. AAV-감염시킨 마우스 뇌 단면을 항-*TH* 또는 항-Myc 표지 항체를 사용하여 면역염색한 결과는 복측 피개영역 내 *TH*-양성 세포의 약 1/3이 Myc 표지된 *TH*를 공동-발현한다는 것을 보여주었다(도 3E; $41.11 \pm 5.14\%$, $n = 6$, 주사 부위로부터 ± 0.5 mm 이내 마우스 각각에 대하여 무작위로 선별한 3-4 단면으로부터 계산하였음). 예상한 대로, 형질전환시킨 세포는 복측 피개부(VTA)에서 대부분 관찰되었고, 중뇌 흑질(SN)에서는 거의 관찰되지 않았다.

[0076]

또한 본 발명자들은 CT08-12에서 hTH-Myc 발현 마우스 및 GFP 형질전환 대조군 마우스에 대한 행동 테스트를 실시하였다. RKO 마우스와 유사하게, Myc 표지된 hTH를 발현하는 마우스는 절망-유사 행동(도 3F), 불안-유사 행동(도 3G)이 감소하였고 본능적인 두려움(도 3H)은 더 증가하였다. 그러나, 새로운 환경에 대한 운동성 습관화 반응은 hTH-발현 마우스 및 대조군 마우스에서 동등하였는데(도 3I), 이것은 hTH가 도입된 뉴런이 중뇌 흑질 보다는 복측 피개부에 집중되는데 바이러스에 의해 발현된 hTH와는 두드러지게 공동으로 국한되지만 도파민 작동성 뉴런은 운동 기능에 더 많이 관련되어 있기 때문으로 추정된다(Nieouillon, 2002, Prog. Neurobiol. 67, 53-83). 이러한 결과는 불규칙적이고 증가된 *TH* 발현이 RKO 마우스의 조증 표현형에 관련됨을 시사한다.

실시예 3

[0077]

REV-ERB α 결핍 마우스 내 중뇌 도파민 작동성 활성

[0078]

본 발명자들은 RKO 마우스와 야생형 마우스 사이의 중추신경계 도파민 작동성 활성을 비교하였다. 본 발명자들은 생체 외(ex vivo) 정적으로 배양되는 피각(CPu, caudate putamen) 및 측좌핵(NAc, nucleus accumbens)을 포함하는 선조체로부터 자연적인 도파민 방출을 검사하였다. CT00에서의 야생형 선조체 배양(striatal cultures)은 CT12에서의 배양에 비해 더 많은 도파민을 방출하지만, 이러한 변화는 CT12에서 증가된 도파민 방출 때문에 RKO 마우스 조직에서는 나타나지 않는다(도 6 a). 선조체 도파민 함량 및 증가된 대사산물의 유사한 패턴과 마찬가지로, 이러한 결과는 RKO 마우스가 도파민 생산의 변화를 나타낸다는 것을 제시한다. 또한 미세투석을 통해 살아있는 생쥐에서 도파민과 도파민 대사산물의 세포 외 수준을 측정된 결과, 야생형 마우스에 비해 RKO 마우스의 측좌핵에서 더 많은 양이 측정되었다(도 6b 및 도 7c 및 7d). 세포의 도파민 수준의 증가와 더불어, REV-ERB α 는 복측 중뇌(VMB)의 전기생리학적 특성에 큰 영향을 미치는 것이 확인되었다(도 6C 및 도 8). 복측 피개부 내의 전기생리학적 활성은 강력한 REV-ERB α 길항제인 SR8278(비특허문헌 36: Kojetin et al., 2011)의 뇌실 내 투여에 의한 REV-ERB α 의 신속한 억제가, 하루 중 시간대에 관계없이 용매를 주입한 마우스(대조군 마우스)에 비해 이동이 자유로운 마우스에서의 전체적인 활동전위율(firing rate)을 증가시킨다(도 6C)는 것을 확인하였는데, 이는 빠른 스파이킹 뉴런의 비율이 증가함에 기인하는 것으로 추정된다(도 8). 이러한 복측 중뇌(VMB) 내 도파민 합성 및 분비의 증가는 RKO 마우스에서 도파민 시스템의 과활성 상태를 나타내었다.

[0079]

본 발명자들은 증가된 도파민 작동성 활성이 RKO 마우스 내 변화된 감정-관련 행동과 관련되어 있는지를 분석하였다. 도파민 수용체 길항제인 할로페리돌(HALO) 또는 *TH* 저해제인 알파-메틸-파라-타이로신(AMPT)의 전반적인 투여는, 특히 늦은 밤시간(CT20-24) 동안, 우울 및 불안-유사 행동의 증가에 의해 야생형 마우스에서 감정에 관련된 행동의 일일 변화를 약화시켰다. 보다 중요한 것은, 일몰 후(dusk)에 관찰된 RKO 마우스의 비정상적인 행동이, 상기 저해제 중 어느 하나의 투여 후 야생형 마우스 내에서 관찰된 행동과 유사한 수준으로 완화되었다(도 6D 내지 6E). 또한 두 가지 저해제는 야간에 야생형 마우스의 이동성을 감소시켰고 낮 시간에 RKO 마우스의 과다활성을 감소시켰으며(도 9A 및 도 9B), 야생형 및 RKO 마우스의 공격성을 완벽하게 저해하였다(결과는

나타내지 않음). 본 발명자들은 이러한 저해제들이 일몰 후 시험한 야생형 마우스의 경직된 운동의 증가를 증가시키기 때문에(도 9C) 변화된 운동활성이 행동 반응에 영향을 줄 것이라는 가능성을 완전하게 배제할 수 없었다. 이와 같은 결과는 hTH-Myc 발현(도 3E-I)과 함께, 수면 중 과도한 도파민 작동성 활성화에 필요한 특정 기작이 RKO 마우스 내 감소된 우울 및 불안-유사 행동의 바탕이 될 수 있다는 것을 제시한다.

실시예 4

광적 행동 유발과 복측 중뇌(VMB) 내 REV-ERB α 활성의 저해

대부분의 TH-면역반응성 도파민 뉴런은 REV-ERB α , BMAL1 및 PER1 같은 기본적인 생체시계 단백질을 공동-발현하기 때문에(도 10A), 본 발명자들은 복측 중뇌 내 국지적으로 발현된 REV-ERB α 가 TH 발현을 조절하고 감정 조절에 영향을 주는지에 대한 의문을 갖게 되었다. 야생형 마우스 복측 중뇌로의 SR8278 미세주입에 의한 REV-ERB α 의 국지적인 저해는, RKO 마우스와 비교했을 때, CT12에서의 TH 및 *Bmal1* mRNA 발현이 증가하였지만, SR8278은 RKO 마우스 내 TH 발현을 변화시키지 못하였으며(도 10B), 복측 중뇌 내 REV-ERB α 가 직접적으로 TH mRNA 발현을 조절한다는 가능성을 증가시켰다. 대조군 구역(즉, 뇌실 주위 회색, PVG)이 아닌 복측 중뇌로의 SR8278의 미세주입은 RKO 마우스에서 확인된 결과와 비슷한 비정상적인 행동을 유발하였다. SR8278은 낮 기간(CT08-12 또는 자이트게버 시간 08-12, ZT08-12) 중에 야생형 마우스에서 RKO 마우스에서와 유사한 수준으로 절망-유사 부동성을 감소시켰으나, 활동 시간대(CT 또는 ZT20-24, 도 10C)의 절망-유사 행동에는 거의 영향을 주지 않았다. 또한, SR8278을 주입한 마우스는 일몰 후에 불안-유사 행동이 감소하였고(도 10D 및 도 11), 본능적인 두려움이 증가하였으며(도 10E), 운반체만 주입한 마우스 또는 뇌실주위회색(PVG)를 표적으로 하는 마우스에 비해 공격성이 증가하였다(도 10F).

새로운 상황에 노출되었을 때, SR8278 주입한 야생형 마우스는 일정한 암 조건에서 RKO 마우스에 비해 보다 더 과도한 활성을 보였으며, CT20-24에서 야생형 마우스에 비해 2 ~ 3배 더 긴 거리를 이동하였는데, RKO 마우스와 야생형 마우스의 이동한 전체 거리가 새벽에는 균등하였다(도 1C). 이러한 관점에서, RKO 마우스가 감소된 미토콘드리아 함량 및 골격근의 산화적 기능에 의해 손상된 운동 능력을 보여준다는 것은 주목해야 한다(비특허문헌 37: Woldt et al., 2013). 복측 중뇌로의 SR8278 미세주입은 REV-ERB α 의 근육에 대한 활성화에 영향을 주지 않으므로, 좀 더 활발한 이동 반응이 관찰될 수 있다는 점은 신뢰성이 있다. 또한 SR8278을 주입한 마우스는 LD 사이클의 암 시기 중에 새로운 상황에 대한 반응에서 과도한 활성을 보여 주었다. 그러나, 마우스는 희미한 적색 조명 하에서 실시한 테스트일지라도 낮 기간 중에는 활동성이 적었다. SR8278을 주입한 마우스가 같은 조명 조건하에 ZT08-12에서의 대조군 마우스에 비해 보다 더 먼 거리를 이동한다는 점을 고려하면, 테스트 전에 빛에 노출시키는 것이 일시적으로 이동 활성을 저해하는 것으로 판단된다.

이러한 결과는 복측 중뇌 내 REV-ERB α 활성이 감정 조절 및 TH mRNA 발현에서 주요한 역할을 한다는 점을 제시한다.

실시예 5

TH 유전자 전사조절에서 REV-ERB α 와 NURR1 사이의 길항적 크로스토크(crosstalk)

복측 중뇌 내 국소적인 REV-ERB α 활성이 TH mRNA 발현을 조절하므로, 본 발명자들은 REV-ERB α 가 TH 유전자의 프로모터에 작용하여 TH 유전자 전사의 직접적인 조절 여부를 불명확화시킨 도파민 작동성 세포주를 이용하여 시험하였다(CATH.a; 비특허문헌 38: Suri et al., 1993). 서열 분석은 E-박스 구성요소뿐만 아니라 여러 가지 잠재적인 REV-ERBs/레티놀 산 수용체에 관련된 핵 수용체(ROR) 반응성 구성요소(RRE)를 제시하였는데, 이러한 요소들은 암호화된 서열의 상류 ~ 5Kb 이내에 위치한 래트 TH 프로모터 구역의 CLOCK:BMAL1 이합체에 의해 인식되었다. 이러한 요소들 중 일부는 래트, 마우스 및 인간에 잘 보존되어 있다(도 12A). REV-ERB α 는 래트 TH 프로모터에 의한 루시퍼라아제 전달체 활성(rTH-LUC)을 저해하였지만, ROR α 및 CLOCK:BMAL1 이합체는 거의 영향이 없었다(도 12B). 흥미롭게도, TH 프로모터 내 잠재적인 RRE는 핵 수용체 NURR1(NBRE:NGFI-B 반응성 구성요소; 도 13A)에 의해 인식되어 기존에 확인된 cis-엘리먼트들과 겹치는데, 이는 도파민 작동성 뉴런의 적절한 발달과 기능에 필요하였다(비특허문헌 39: Zetterstrom et al., 1997; 비특허문헌 30: Kim et al., 2003). REV-ERB α 는 TH 프로모터의 NURR1 매개성 활성화에 대한 길항작용을 하나, *Bmal1* 프로모터는 NURR1 과발현에 의한 영향을 거의 받지 않는다(도 12B). 또한 REV-ERB α 와 NURR1 사이의 이러한 길항적 크로스토크는 마우스와 인간

의 TH 프로모터에 의한 리포터에 대해서도 제시되었는데(각각 *mTH-LUC* 및 *hTH-LUC*), 이는 진화적 보존성을 나타내는 것이다(도 12C).

[0086]

순차적으로 결실시킨 TH 프로모터들 및 위치-특이적으로 결실시킨 2.4Kb 프로모터는 TH 프로모터의 2.6Kb 및 1.2Kb 사이의 영역 내 2가지 잠재적인 RRE/NBRE(각각 R/N1 및 R/N2로 명시되었음)가 이러한 신규한 크로스토크의 주요한 cis-활성 부위에 작용한다는 것을 나타내었다(도 13A-B 및 도 14). REV-ERB α 작용제 GSK4112 또는 길항제 SR8278 처리에 의한 내생적인 REV-ERB α 활성의 조절은 R/N1(서열번호 16 내 1023-1224, 서열번호 17 내 766-777, 또는 서열번호 18 내 921-932) 및 R/N2(서열번호 16 내 150-161, 서열번호 17 내 154-165, 또는 서열번호 18 내 327-338)-의존적 방식으로 TH 프로모터 활성화에 대한 차별적인 영향을 주었다(도 13C). 이와 마찬가지로, 염색질 면역침전법(ChIP) 실험은 R/N1 및 R/N2에 직접 결합된 REV-ERB α 및 NURR1이 TH 프로모터 상의 인접한 NBRE 또는 Bmal1 프로모터 상의 RRE 구성요소를 각각 인식하지 못한다는 점을 검증하였다.

[0087]

이러한 사실로 인해 본 발명자들은 상기 핵 수용체들이 TH 프로모터 상에서 인식 부위에서 어떻게 공동작용을 하는지에 대한 의문이 생겼다.

[0088]

본 발명자들은 GFP-표지된 REV-ERB α 의 증가량이 FLAG-결합시킨 NURR1에 의해 유발되는 투여량 의존적 방식의 TH 프로모터 활성화를 억제한다는 점을 발견하였다. 그리하여, 다른 몰 비율에서 GFP-REV-ERB α 및 Flag-NURR1의 발현에 이은 정량적 ChIP 시험은 이러한 핵수용체들이 R/N1 및 R/N2 구성요소를 인식하기 위해 경쟁한다는 사실을 나타내었다(도 13F). 따라서 본 발명자들은 2가지 핵수용체들 간 표적-의존적인 길항적 크로스토크가 생체시계 내 TH 발현의 기반이 된다는 것을 추측하였다.

실시예 6

[0089]

TH 프로모터에서 히스톤 아세틸화에 대한 REV-ERB α -의존적 조절

[0090]

다음 본 발명자들은 REV-ERB α 및 NURR1이 생체 내(*in vivo*)에서 R/N1 및 R/N2에 대하여 경쟁적으로 결합하는지를 확인하였다. 야생형 복측 중뇌 용해물 내에서 R/N1 및 R/N2에 대한 REV-ERB α 의 결합은 CT00 보다 CT12에서 더 강하였고 (REV-ERB α 와 R/N1 및 R/N2의 결합력: CT12 > CT00), R/N1 및 R/N2에 대한 NURR1의 결합력은 CT12 보다 CT00에서 보다 더 강하게 결합하는 것 (NURR1과 R/N1 및 R/N2의 결합력: CT00 > CT12)으로 관찰되었다(도 15A). REV-ERB α 결합의 일변화는 인접한 R/N1 구성요소에 대해 보다 더 활발한 것으로 보인 반면, NURR1은 R/N2 위치에서 보다 더 효과적으로 결합하였다. CT12에서, R/N 구성요소에 대한 NURR1의 결합은 야생형 마우스 보다 RKO 마우스에서 보다 더 크고(도 15A), NURR1-R/N1 결합은 CT00에서의 야생형 마우스 내에 비해 CT12에서의 RKO 마우스 내에서 더 강하였다 (하기 표 3 내지 5 참조).

표 3

[0091]

결합 대상		결합력의 강도		
R/N1 및 R/N2	REV-ERB α	CT12	>	CT00
	NURR1	CT00		CT12

표 4

[0092]

결합 대상		시기	결합력의 강도		
R/N1 및 R/N2	NURR1	CT12	RKO	>	야생형

표 5

[0093]

결합 대상		결합력의 강도		
R/N1	NURR1	RKO (at CT12)	>	야생형 (at CT00)

[0094]

이러한 결과들은 이러한 핵 수용체들 간의 표적-의존적인 길항적 크로스토크가 생체 내 R/N 구성요소들에 대한 경쟁적인 결합을 통해서 발생할 수 있다는 것을 나타내었다. REV-ERB α 은 프로모터 영역으로 히스톤 탈아세틸화 효소 3(HDAC3) 복합체를 유도(recruitment)함으로써 표적 유전자의 전사를 억제한다(비특허문헌 40: Yin et

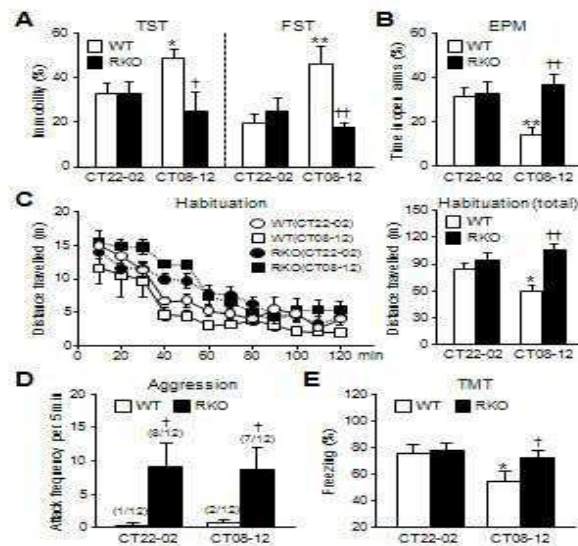
al., 2005; 비특허문헌 41: Feng et al., 2011). 따라서, 본 발명자들은 TH 프로모터 영역으로의 HDAC3 유도 및 이에 의한 히스톤 아세틸화 상태를 확인하였다. R/N1 부위로의 HDAC3 유도는 야생형 마우스의 복측 중뇌 내 생체시계 리듬에 의해 발생하였다. 그러나, 이러한 리듬은 RKO 복측 중뇌에서는 나타나지 않았다(도 15B). 반면, 좀 더 먼 R/N2 위치에 대한 HDAC3 유도의 일일 변화는 거의 나타나지 않았는데, 이는 도 16A에 나타난 바와 같이 생체 내에서 R/N2는 REV-ERB α 에 대하여 R/N1 부위에 비해 덜 효율적으로 결합된다(occupied)는 것을 제시하였다. 히스톤 H3의 라이신 9에서의 아세틸화(H3-K9)는 REV-ERB α -의존적 방식으로 시험된 모든 3가지 TH 프로모터 영역에서의 생체 주기 리듬을 보여주었다. 히스톤 아세틸화의 생체주기 패턴은 TH mRNA 발현 패턴과 매우 비슷하지만 REV-ERB α 또는 HDAC3에 의한 결과와는 반대의 결과이다. H3-K9 아세틸화 및 인접한 프로모터 영역 (PROX)로의 HDAC3 유도는 R/N1을 포함하는 구역 내에서 확인되는 결과와 유사한 일일 진동을 야기하였다.

[0095]

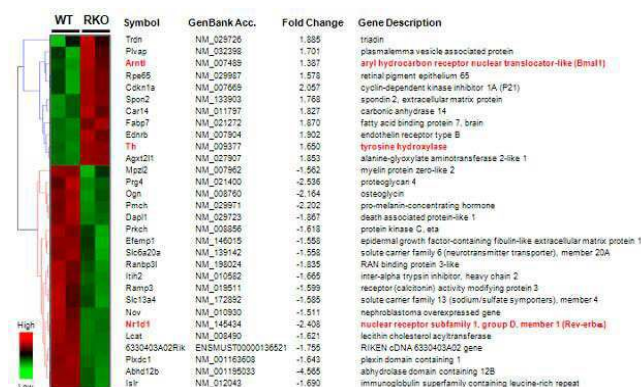
이러한 결과들은 REV-ERB α 는 HDAC3 복합체를 유도함으로써 TH 유전자 발현을 조절하는데, TH 유전자 프로모터의 전사적 활성화를 억제하는 히스톤 아세틸화를 음성적으로 조절한다는 것을 제시한다.

도면

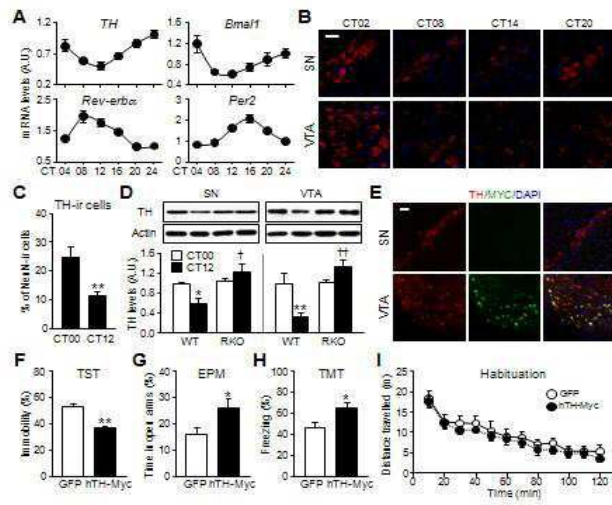
도면1



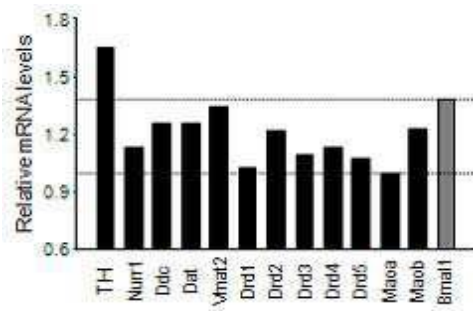
도면2



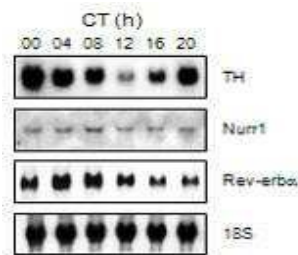
도면3



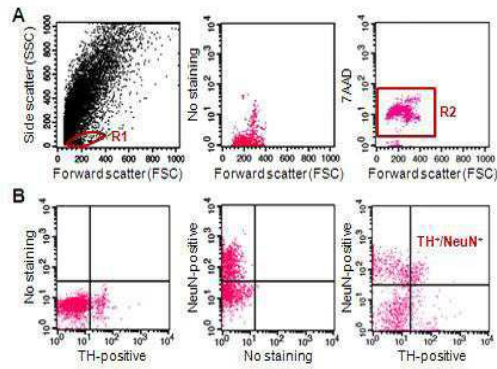
도면4a



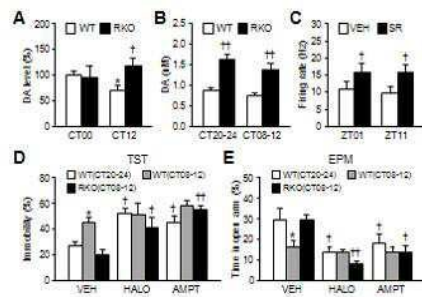
도면4b



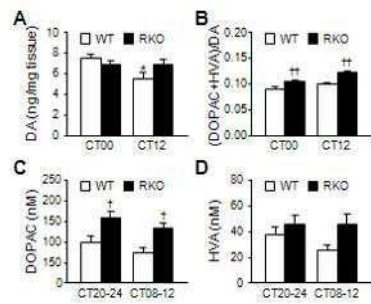
도면5



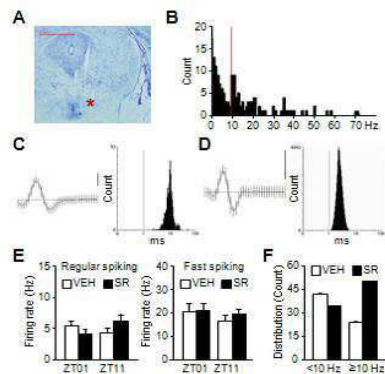
도면6



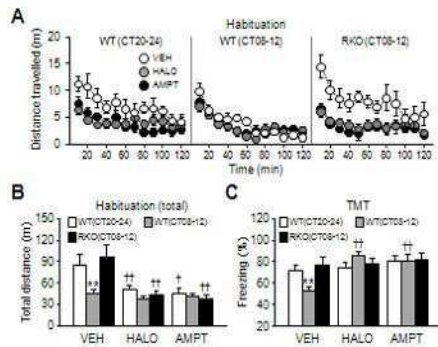
도면7



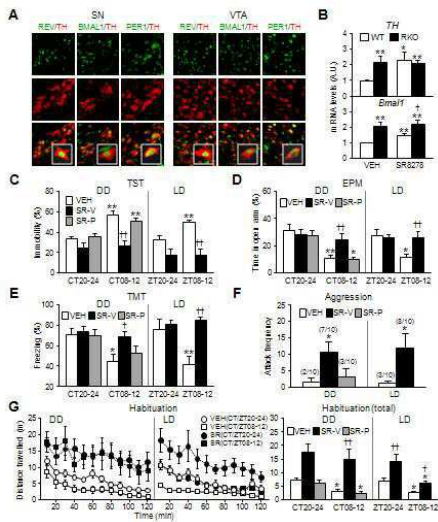
도면8



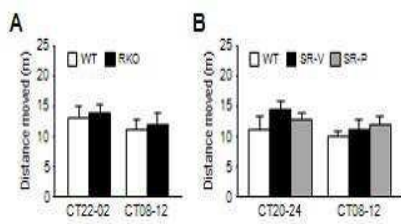
도면9



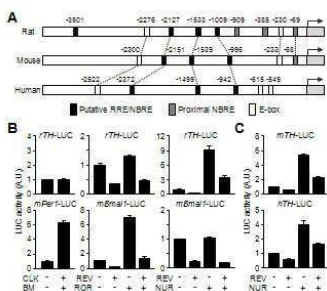
도면10



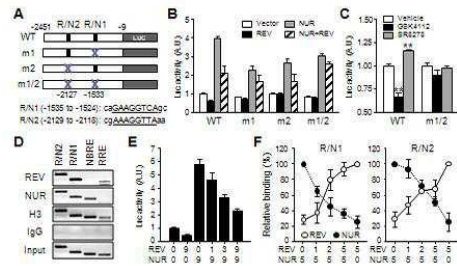
도면11



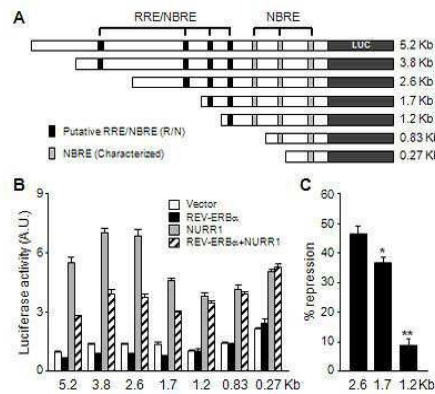
도면12



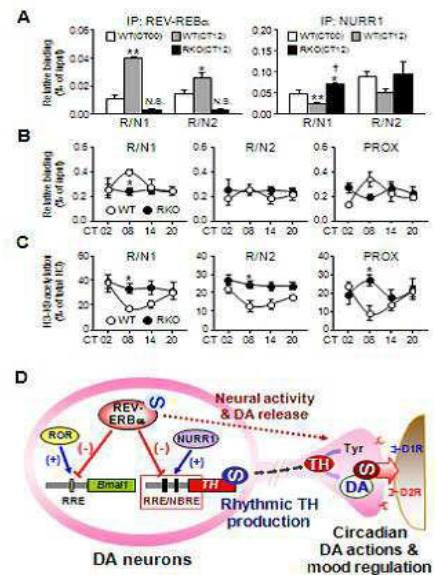
도면13



도면14



도면15



서열목록

<110> Seoul National University

Korea University

<120> Use of REV-ERB α for treating dopamine-dependent disorders

<130> IPDC52701

<160> 30
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 614
 <212> PRT
 <213> human
 <400> 1
 Met Thr Thr Leu Asp Ser Asn Asn Asn Thr Gly Gly Val Ile Thr Tyr
 1 5 10 15
 Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Thr Ser Pro Glu Ser Leu
 20 25 30
 Tyr Ser Asp Asn Ser Asn Gly Ser Phe Gln Ser Leu Thr Gln Gly Cys
 35 40 45
 Pro Thr Tyr Phe Pro Pro Ser Pro Thr Gly Ser Leu Thr Gln Asp Pro
 50 55 60
 Ala Arg Ser Phe Gly Ser Ile Pro Pro Ser Leu Ser Asp Asp Gly Ser
 65 70 75 80
 Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Tyr Asn
 85 90 95
 Gly Ser Pro Pro Gly Ser Leu Gln Val Ala Met Glu Asp Ser Ser Arg
 100 105 110
 Val Ser Pro Ser Lys Ser Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Asn Gly Met
 115 120 125
 Val Leu Leu Cys Lys Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Phe His Tyr
 130 135 140
 Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser Ile
 145 150 155 160
 Gln Gln Asn Ile Gln Tyr Lys Arg Cys Leu Lys Asn Glu Asn Cys Ser
 165 170 175
 Ile Val Arg Ile Asn Arg Asn Arg Cys Gln Gln Cys Arg Phe Lys Lys
 180 185 190
 Cys Leu Ser Val Gly Met Ser Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Arg Ile

195	200	205	
Pro Lys Arg Glu Lys Gln Arg Met Leu Ala Glu Met Gln Ser Ala Met			
210	215	220	
Asn Leu Ala Asn Asn Gln Leu Ser Ser Gln Cys Pro Leu Glu Thr Ser			
225	230	235	240
Pro Thr Gln His Pro Thr Pro Gly Pro Met Gly Pro Ser Pro Pro Pro			
	245	250	255
Ala Pro Val Pro Ser Pro Leu Val Gly Phe Ser Gln Phe Pro Gln Gln			
260	265	270	
Leu Thr Pro Pro Arg Ser Pro Ser Pro Glu Pro Thr Val Glu Asp Val			
275	280	285	
Ile Ser Gln Val Ala Arg Ala His Arg Glu Ile Phe Thr Tyr Ala His			
290	295	300	
Asp Lys Leu Gly Ser Ser Pro Gly Asn Phe Asn Ala Asn His Ala Ser			
305	310	315	320
Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Pro His Arg Trp Glu Asn Gln Gly Cys			
325	330	335	
Pro Pro Ala Pro Asn Asp Asn Asn Thr Leu Ala Ala Gln Arg His Asn			
340	345	350	
Glu Ala Leu Asn Gly Leu Arg Gln Ala Pro Ser Ser Tyr Pro Pro Thr			
355	360	365	
Trp Pro Pro Gly Pro Ala His His Ser Cys His Gln Ser Asn Ser Asn			
370	375	380	
Gly His Arg Leu Cys Pro Thr His Val Tyr Ala Ala Pro Glu Gly Lys			
385	390	395	400
Ala Pro Ala Asn Ser Pro Arg Gln Gly Asn Ser Lys Asn Val Leu Leu			
405	410	415	
Ala Cys Pro Met Asn Met Tyr Pro His Gly Arg Ser Gly Arg Thr Val			
420	425	430	
Gln Glu Ile Trp Glu Asp Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val Arg			
435	440	445	
Glu Val Val Glu Phe Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu Ser			

450 455 460

Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val Leu

465 470 475 480

Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val Met

 485 490 495

Phe Leu Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met Gly

 500 505 510

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

 515 520 525

Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val Val

530 535 540

Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val Glu

545 550 555 560

Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu Lys

 565 570 575

Asn Arg Pro Leu Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys Leu

 580 585 590

Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu Ser

 595 600 605

Phe Arg Val Asp Ala Gln

610

<210> 2

<211> 615

<212> PRT

<213> mouse

<400> 2

Met Thr Thr Leu Asp Ser Asn Asn Asn Thr Gly Gly Val Ile Thr Tyr

1 5 10 15

Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Thr Ser Pro Glu Ser Leu

 20 25 30

Tyr Ser Asp Ser Ser Asn Gly Ser Phe Gln Ser Leu Thr Gln Gly Cys

 35 40 45

Pro Thr Tyr Phe Pro Pro Ser Pro Thr Gly Ser Leu Thr Gln Asp Pro

50 55 60
Ala Arg Ser Phe Gly Ser Ala Pro Pro Ser Leu Ser Asp Asp Ser Ser
65 70 75 80
Pro Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Tyr
85 90 95
Asn Gly Ser Pro Pro Gly Ser Leu Gln Val Ala Met Glu Asp Ser Ser
100 105 110
Arg Val Ser Pro Ser Lys Gly Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Asn Gly
115 120 125

Met Val Leu Leu Cys Lys Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Phe His
130 135 140
Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser
145 150 155 160
Ile Gln Gln Asn Ile Gln Tyr Lys Arg Cys Leu Lys Asn Glu Asn Cys
165 170 175
Ser Ile Val Arg Ile Asn Arg Asn Arg Cys Gln Gln Cys Arg Phe Lys
180 185 190
Lys Cys Leu Ser Val Gly Met Ser Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Arg

195 200 205
Ile Pro Lys Arg Glu Lys Gln Arg Met Leu Ala Glu Met Gln Ser Ala
210 215 220
Met Asn Leu Ala Asn Asn Gln Leu Ser Ser Leu Cys Pro Leu Glu Thr
225 230 235 240
Ser Pro Thr Pro His Pro Thr Ser Gly Ser Met Gly Pro Ser Pro Pro
245 250 255
Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Leu Val Gly Phe Ser Gln Phe Pro Gln
260 265 270

Gln Leu Thr Pro Pro Arg Ser Pro Ser Pro Glu Pro Thr Met Glu Asp
275 280 285
Val Ile Ser Gln Val Ala Arg Ala His Arg Glu Ile Phe Thr Tyr Ala

290 295 300
 His Asp Lys Leu Gly Thr Ser Pro Gly Asn Phe Asn Ala Asn His Ala
 305 310 315 320
 Ser Gly Ser Pro Ser Ala Thr Thr Pro His Arg Trp Glu Ser Gln Gly
 325 330 335
 Cys Pro Ser Ala Pro Asn Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Gln Arg His

 340 345 350
 Asn Glu Ala Leu Asn Gly Leu Arg Gln Gly Pro Ser Ser Tyr Pro Pro
 355 360 365
 Thr Trp Pro Ser Gly Pro Thr His His Ser Cys His Gln Pro Asn Ser
 370 375 380
 Asn Gly His Arg Leu Cys Pro Thr His Val Tyr Ser Ala Pro Glu Gly
 385 390 395 400
 Glu Ala Pro Ala Asn Ser Leu Arg Gln Gly Asn Thr Lys Asn Val Leu
 405 410 415

 Leu Ala Cys Pro Met Asn Met Tyr Pro His Gly Arg Ser Gly Arg Thr
 420 425 430
 Val Gln Glu Ile Trp Glu Asp Phe Ser Met Ser Phe Thr Pro Ala Val
 435 440 445
 Arg Glu Val Val Glu Phe Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu
 450 455 460
 Ser Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val
 465 470 475 480
 Leu Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val

 485 490 495
 Met Phe Leu Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met
 500 505 510
 Gly Met Gly Asp Leu Leu Asn Ala Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu
 515 520 525
 Asn Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val
 530 535 540
 Val Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val

545 550 555 560

Glu Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu

565 570 575

Lys Asn Arg Pro Ser Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys

580 585 590

Leu Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu

595 600 605

Ser Phe Arg Val Asp Ala Gln

610 615

<210> 3

<211> 615

<212> PRT

<213> rat

<400> 3

Met Thr Thr Leu Asp Ser Asn Asn Asn Thr Gly Gly Val Ile Thr Tyr

1 5 10 15

Ile Gly Ser Ser Gly Ser Ser Pro Ser Arg Thr Ser Pro Glu Ser Leu

20 25 30

Tyr Ser Asp Ser Ser Asn Gly Ser Phe Gln Ser Leu Thr Gln Gly Cys

35 40 45

Pro Thr Tyr Phe Pro Pro Ser Pro Thr Gly Ser Leu Thr Gln Asp Pro

50 55 60

Ala Arg Ser Phe Gly Thr Val Pro Pro Ser Leu Ser Asp Asp Ser Ser

65 70 75 80

Pro Ser Ser Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Phe Tyr

85 90 95

Asn Gly Ser Pro Pro Gly Ser Leu Gln Val Ala Met Glu Asp Ser Ser

100 105 110

Arg Val Ser Pro Ser Lys Gly Thr Ser Asn Ile Thr Lys Leu Asn Gly

115 120 125

Met Val Leu Leu Cys Lys Val Cys Gly Asp Val Ala Ser Gly Phe His

130 135 140

Tyr Gly Val His Ala Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Arg Arg Ser

145 150 155 160

Ile Gln Gln Asn Ile Gln Tyr Lys Arg Cys Leu Lys Asn Glu Asn Cys

165 170 175

Ser Ile Val Arg Ile Asn Arg Asn Arg Cys Gln Gln Cys Arg Phe Lys

180 185 190

Lys Cys Leu Ser Val Gly Met Ser Arg Asp Ala Val Arg Phe Gly Arg

195 200 205

Ile Pro Lys Arg Glu Lys Gln Arg Met Leu Ala Glu Met Gln Asn Ala

210 215 220

Met Asn Leu Ala Asn Asn Gln Leu Ser Ser Leu Cys Pro Leu Glu Thr

225 230 235 240

Ser Pro Ala Pro His Pro Thr Ser Gly Ser Val Gly Pro Ser Pro Pro

245 250 255

Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Leu Val Gly Phe Ser Gln Phe Pro Gln

260 265 270

Gln Leu Thr Pro Pro Arg Ser Pro Ser Pro Glu Pro Thr Val Glu Asp

275 280 285

Val Ile Ser Gln Val Ala Arg Ala His Arg Glu Ile Phe Thr Tyr Ala

290 295 300

His Asp Lys Leu Gly Thr Ser Pro Gly Asn Phe Asn Ala Asn His Ala

305 310 315 320

Ser Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Pro Gln Cys Trp Glu Ser Gln Gly

325 330 335

Cys Pro Ser Thr Pro Asn Asp Asn Asn Leu Leu Ala Ala Gln Arg His

340 345 350

Asn Glu Ala Leu Asn Gly Leu Arg Gln Gly Pro Ser Ser Tyr Pro Pro

355 360 365

Thr Trp Pro Ser Gly Pro Ala His His Ser Cys His Gln Pro Asn Ser

370 375 380

Asn Gly His Arg Leu Cys Pro Thr His Val Tyr Ser Ala Pro Glu Gly

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

 435 440 445
 Arg Glu Val Val Glu Phe Ala Lys His Ile Pro Gly Phe Arg Asp Leu
 450 455 460
 Ser Gln His Asp Gln Val Thr Leu Leu Lys Ala Gly Thr Phe Glu Val
 465 470 475 480
 Leu Met Val Arg Phe Ala Ser Leu Phe Asn Val Lys Asp Gln Thr Val
 485 490 495
 Met Phe Leu Ser Arg Thr Thr Tyr Ser Leu Gln Glu Leu Gly Ala Met
 500 505 510

 Gly Met Gly Asp Leu Leu Asn Ala Met Phe Asp Phe Ser Glu Lys Leu
 515 520 525
 Asn Ser Leu Ala Leu Thr Glu Glu Glu Leu Gly Leu Phe Thr Ala Val
 530 535 540
 Val Leu Val Ser Ala Asp Arg Ser Gly Met Glu Asn Ser Ala Ser Val
 545 550 555 560
 Glu Gln Leu Gln Glu Thr Leu Leu Arg Ala Leu Arg Ala Leu Val Leu
 565 570 575
 Lys Asn Arg Pro Ser Glu Thr Ser Arg Phe Thr Lys Leu Leu Leu Lys

 580 585 590
 Leu Pro Asp Leu Arg Thr Leu Asn Asn Met His Ser Glu Lys Leu Leu
 595 600 605
 Ser Phe Arg Val Asp Ala Gln
 610 615
 <210> 4
 <211> 497
 <212> PRT

<213> human

<400> 4

Met Pro Thr Pro Asp Ala Thr Thr Pro Gln Ala Lys Gly Phe Arg Arg

1 5 10 15

Ala Val Ser Glu Leu Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Ile Met Ser Pro

20 25 30

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

35 40 45

Arg Glu Ala Ala Val Ala Ala Ala Ala Ala Val Pro Ser Glu Pro

50 55 60

Gly Asp Pro Leu Glu Ala Val Ala Phe Glu Glu Lys Glu Gly Lys Ala

65 70 75 80

Val Leu Asn Leu Leu Phe Ser Pro Arg Ala Thr Lys Pro Ser Ala Leu

85 90 95

Ser Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His His

100 105 110

Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Arg Ala Gly Gly Pro His Leu

115 120 125

Glu Tyr Phe Val Arg Leu Glu Val Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ala Leu

130 135 140

Leu Ser Gly Val Arg Gln Val Ser Glu Asp Val Arg Ser Pro Ala Gly

145 150 155 160

Pro Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys Cys

165 170 175

His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His Pro

180 185 190

Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala Glu

195 200 205

Ile Ala Phe Gln Tyr Arg His Gly Asp Pro Ile Pro Arg Val Glu Tyr

210 215 220

Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Thr Thr Leu Lys

225 230 235 240

Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Gly Glu His Leu Glu Ala Phe Ala

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

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

385	390	395	400
His Cys Leu Ser Glu Glu Pro Glu Ile Arg Ala Phe Asp Pro Glu Ala			
405	410	415	
Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Ser Val Tyr Phe			
420	425	430	
Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Ser Tyr Ala			
435	440	445	
Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr Leu			
450	455	460	

Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro Gln Ala Val Arg Arg Ser Leu Glu			
465	470	475	480
Gly Val Gln Asp Glu Leu Asp Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala Ile			

485 490 495

Gly

<210> 5

<211> 498

<212> PRT

<213> mouse

<400> 5

Met Pro Thr Pro Ser Ala Ser Ser Pro Gln Pro Lys Gly Phe Arg Arg

1 5 10 15

Ala Val Ser Glu Gln Asp Thr Lys Gln Ala Glu Ala Val Thr Ser Pro

20 25 30

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

35 40 45

Arg Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Ala Ser Ala Glu

50 55 60

Pro Gly Asn Pro Leu Glu Ala Val Val Phe Glu Glu Arg Asp Gly Asn

65 70 75 80

Ala Val Leu Asn Leu Leu Phe Ser Leu Arg Gly Thr Lys Pro Ser Ser

85 90 95

Leu Ser Arg Ala Leu Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His

100 105 110

His Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Leu Ala Gly Ser Pro His

115 120 125

Leu Glu Tyr Phe Val Arg Phe Glu Val Pro Ser Gly Asp Leu Ala Ala

130 135 140

Leu Leu Ser Ser Val Arg Arg Val Ser Asp Asp Val Arg Ser Ala Arg

145 150 155 160

Glu Asp Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys

165 170 175

Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His

180 185 190

Pro Gly Phe Ser Asp Gln Ala Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala
195 200 205

Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Lys Gln Gly Glu Pro Ile Pro His Val Glu
210 215 220

Tyr Thr Lys Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Ala Thr Leu
225 230 235 240

Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Arg Glu His Leu Glu Ala Phe
245 250 255

Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Cys Gly Tyr Arg Glu Asp Ser Ile Pro Gln
260 265 270

Leu Glu Asp Val Ser His Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu
275 280 285

Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu
290 295 300

Ala Phe Arg Val Phe Gln Cys Thr Gln Tyr Ile Arg His Ala Ser Ser
305 310 315 320

Pro Met His Ser Pro Glu Pro Asp Cys Cys His Glu Leu Leu Gly His
325 330 335

Val Pro Met Leu Ala Asp Arg Thr Phe Ala Gln Phe Ser Gln Asp Ile
340 345 350

Gly Leu Ala Ser Leu Gly Ala Ser Asp Glu Glu Ile Glu Lys Leu Ser
355 360 365

Thr Val Tyr Trp Phe Thr Val Glu Phe Gly Leu Cys Lys Gln Asn Gly
370 375 380

Glu Leu Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu
385 390 395 400

Leu His Ser Leu Ser Glu Glu Pro Glu Val Arg Ala Phe Asp Pro Asp
405 410 415

Thr Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Val Tyr
420 425 430

Phe Val Ser Glu Ser Phe Ser Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Asn Tyr
435 440 445

Ala Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr

450 455 460
 Leu Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro His Thr Ile Arg Arg Ser Leu
 465 470 475 480
 Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu His Thr Leu Thr Gln Ala Leu Ser Ala
 485 490 495
 Ile Ser

<210> 6
 <211> 498
 <212> PRT
 <213> rat
 <400> 6

Met Pro Thr Pro Ser Ala Pro Ser Pro Gln Pro Lys Gly Phe Arg Arg
 1 5 10 15

Ala Val Ser Glu Gln Asp Ala Lys Gln Ala Glu Ala Val Thr Ser Pro
 20 25 30
 Arg Phe Ile Gly Arg Arg Gln Ser Leu Ile Glu Asp Ala Arg Lys Glu
 35 40 45
 Arg Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Val Ala Ser Ser Glu
 50 55 60
 Pro Gly Asn Pro Leu Glu Ala Val Val Phe Glu Glu Arg Asp Gly Asn
 65 70 75 80
 Ala Val Leu Asn Leu Leu Phe Ser Leu Arg Gly Thr Lys Pro Ser Ser

85 90 95
 Leu Ser Arg Ala Val Lys Val Phe Glu Thr Phe Glu Ala Lys Ile His
 100 105 110
 His Leu Glu Thr Arg Pro Ala Gln Arg Pro Leu Ala Gly Ser Pro His
 115 120 125
 Leu Glu Tyr Phe Val Arg Phe Glu Val Pro Ser Gly Asp Leu Ala Ala
 130 135 140
 Leu Leu Ser Ser Val Arg Arg Val Ser Asp Asp Val Arg Ser Ala Arg

145 150 155 160

 Glu Asp Lys Val Pro Trp Phe Pro Arg Lys Val Ser Glu Leu Asp Lys
 165 170 175
 Cys His His Leu Val Thr Lys Phe Asp Pro Asp Leu Asp Leu Asp His
 180 185 190
 Pro Gly Phe Ser Asp Gln Val Tyr Arg Gln Arg Arg Lys Leu Ile Ala
 195 200 205
 Glu Ile Ala Phe Gln Tyr Lys His Gly Glu Pro Ile Pro His Val Glu
 210 215 220
 Tyr Thr Ala Glu Glu Ile Ala Thr Trp Lys Glu Val Tyr Val Thr Leu

 225 230 235 240
 Lys Gly Leu Tyr Ala Thr His Ala Cys Arg Glu His Leu Glu Gly Phe
 245 250 255
 Gln Leu Leu Glu Arg Tyr Cys Gly Tyr Arg Glu Asp Ser Ile Pro Gln
 260 265 270
 Leu Glu Asp Val Ser Arg Phe Leu Lys Glu Arg Thr Gly Phe Gln Leu
 275 280 285
 Arg Pro Val Ala Gly Leu Leu Ser Ala Arg Asp Phe Leu Ala Ser Leu
 290 295 300

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

 370 375 380
 Glu Leu Lys Ala Tyr Gly Ala Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Gly Glu Leu
 385 390 395 400

Leu His Ser Leu Ser Glu Glu Pro Glu Val Arg Ala Phe Asp Pro Asp

405 410 415

Thr Ala Ala Val Gln Pro Tyr Gln Asp Gln Thr Tyr Gln Pro Val Tyr

420 425 430

Phe Val Ser Glu Ser Phe Asn Asp Ala Lys Asp Lys Leu Arg Asn Tyr

435 440 445

Ala Ser Arg Ile Gln Arg Pro Phe Ser Val Lys Phe Asp Pro Tyr Thr

450 455 460

Leu Ala Ile Asp Val Leu Asp Ser Pro His Thr Ile Gln Arg Ser Leu

465 470 475 480

Glu Gly Val Gln Asp Glu Leu His Thr Leu Ala His Ala Leu Ser Ala

485 490 495

Ile Ser

<210> 7

<211> 2793

<212> DNA

<213> human

<400> 7

gggcacgagg cgctccctgg gatcatatgg tacctgctcc agtgccgcgt gcggcccggg 60

aacctggggc tgctggcgcc tgcgcagagc cctctgtccc agggaaaggc tcgggcaaaa 120

ggcggctgag attggcagag tgaaatatta ctgccgaggg aacgtagcag ggcacacgtc 180

tcgcctcttt gcgactcggg gcccgtttc tccccatcac ctacttactt cctggttgca 240

acctctcttc ctctgggact ttgacaccgg gagctccaga ttcgccaccc cgcagcgtg 300

cggagccggc aggcagaggc accccgtaca ctgcagagac ccgacctcc ttgtacatt 360

ctagccagaa ctactgcagg ctgattcccc ctacacactc tctctgctct tcccatgcaa 420

agcagaactc cgttgcctca acgtccaacc cttctgcagg gctgcagtcc ggccacccca 480

agaccttgct gcagggtgct tcggatcctg atcgtgagtc gcggggtcca ctccccgcc 540

ttagccagtgc cccagggggc aacagcggcg atcgcaacct ctagtgtgag tcaagggtcca 600

gtttgaatga ccgctctcag ctggtgaaga catgacgacc ctggactcca acaacaacac 660

aggtggcgtc atcacctaca ttggtccag tggtctctcc ccaagccgca ccagccctga 720

atccctctat agtgacaact ccaatggcag cttccagtcc ctgacccaag gctgtccac 780

ctacttccca ccatccccc ctggtccct caccgaagac ccggtcgtc ctttgggag	840
cattccaccc agcctgagtg atgacggctc cccttcttcc tcattctcct cgtcgtcatc	900
ctctctctcc ttctataatg ggagccccc tgggagtcta caagtggcca tggaggacag	960
cagccgagtg tccccagca agagcaccag caacatcacc aagctgaatg gcatgggttt	1020
actgtgtaaa gtgtgtgggg acgttgctc tgggttcac tacggtgtgc acgctgcga	1080
gggctgcaag ggcttttcc gtcggagcat ccagcagaac atccagtaca aaaggtgtct	1140
gaagaatgag aattgtcca tcgtccgcat caatcgcaac cgctgccagc aatgtcgtt	1200
caagaagtgt ctctctgtgg gcatgtctcg agacgtgtg cgttttgggc gcatcccaa	1260
acgagagaag cagcggatgc ttgtctgagat gcagagtgcc atgaacctgg ccaacaacca	1320
gttgagcagc cagtgcctgc tggagacttc acccaccag caccacccc caggcccat	1380
gggcccctcg ccacccctg ctccggctcc ctacccctg gtgggttct cccagtttcc	1440
acaacagctg acgctccca gatcccaag ccctgagccc acagtggagg atgtgatatc	1500
ccaggtggcc cgggcccac gagagatctt cactacgcc catgacaagc tgggcagctc	1560
acctggcaac ttcaatgcca accatgcatc aggtagccct ccagccacca ccccatcgc	1620
ctgggaaaat cagggctgcc cactgcccc caatgacaac aacaccttgg ctgcccagcg	1680
tcataacgag gccctaaatg gtctgcgcca ggctccctcc tcctaccctc ccacctggcc	1740
tcctggccct gcacaccaca gctgccacca gtccaacagc aacgggcacc gtctatgcc	1800
caccacgtg tatgcagccc cagaaggcaa ggacactgcc aacagtcccc ggccaggcaa	1860
ctcaaagaat gttctgtctg catgtctat gaacatgtac ccgcatggac gcagtggcg	1920
aacggtgcag gagatctggg aggatttct catgagcttc acgcccgtg tgcgggaggt	1980
ggtagagttt gccaaacaca tcccgggtt ccgtgacctt tctcagcatg accaagtcac	2040
cctgcttaag gctggcacct ttgaggtgct gatgggtgcg tttgcttctg tgttcaacgt	2100
gaaggaccag acagtgatgt tcctaagccg caccacctac agcctgcagg agcttggtgc	2160
catgggcatg ggagacctgc tcagtccat gttcgacttc agcgagaagc tcaactcct	2220
ggcgcttacc gaggaggagc tgggcctctt caccgcggtg gtgcttgtct ctgcagaccg	2280
ctcgggcatg gagaattccg cttcgggtgga gcagctccag gagacgtgc tgcgggctct	2340
tcgggctctg gtgtgaaga accggccctt ggagacttcc cgcttcacca agctgtgtct	2400
caagctgccg gacctgcgga ccctgaacaa catgcattcc gagaagctgc tgtccttcg	2460
ggtggacgcc cagtgacctg cccggccggc cttctgccgc tgcccccttg tacagaatcg	2520

aactctgcac ttctctctcc ttacagagac gaaaaggaaa agcaaaccag aatcttattt	2580
atattgttat aaaatatcc aagatgagcc tctggccccc tgagccttct tgtaaatacc	2640
tgctccctc ccccatcacc gaacttcccc tctccccctt tttaaaccac tctgtctccc	2700
ccacaacct cccctggccc tctgatttgt tctgttcttg tctcaaatcc aatagttcac	2760
agctgagctg gcttcaaaaa aaaaaaaaaa aaa	2793
<210> 8	
<211> 2782	
<212> DNA	
<213> mouse	
<400> 8	
actggggcac gaggcgctcc ctggaatcac atggtacctg ctccagtgcc gcgtgcggcc	60
cgggaacctt gggctgctgg cgctgcgca gagccctctg tcccagggaaggc	120
aaaaggcggg tgagattggc agagtgaat attactgctg aggaacgta gcagggcaca	180
cgtctctctt tgcgtcctgg tgcctcattt ctccatcacc tacttacttc ctggttgag	240
cttctcttcc ttgggactt ttgcaccgg agctccagat tcattaccct gcttcaactgc	300
ggagccttca ggagtggcat ccggtgcact gcagagaccc gactctcctt gctacattat	360
agccagaact gctgcaggct gattcttcac acacacactc tctgctcttc ccatgcaaat	420
cagatctcag gtgcctcagc gtcctaccct tctggagggc tgcagtatag ccacccaag	480
accttactgc tcagtgcctg gaatcctgat tgcgaactgc ggggctcact cgtctccctc	540
agccattgcc cagggggcga gagaggccat cacaacctcc agtttgtgtc aaggtccagt	600
ttgaatgacc gctttcagct ggtgaagaca tgacgacctt ggactccaat aacaacacag	660
gtggtgttat cacctacatt ggctctagtg gctcctcccc gagecggacc agcccggagt	720
ccctctacag tgacagctcc aatggcagct tccagtcctt gactcaaggt tgtccacat	780
acttcccacc atcacctact ggctccctca ccaggaccc tgcccgtctt ttggcagtg	840
cgccaccag tctcagtgat gatagctccc cttcttctgc atcatcgta tctcttcat	900
cctcctctc cttctataac gggagccccc caggaagtct acaagtggcc atggaagaca	960
gcagccgagt gteccccagc aagggcacaa gcaacattac caagctgaat ggcatggtgc	1020
tactgtgtaa ggtgtgtggg gacgtggcct caggcttcca ctatggagtg cagcctgtg	1080
agggtgcaa gggctttttt cgccggagca tccaacagaa tatccagtac aaacgggtgc	1140
tgaaaaacga aaactgctcc atcgttcgca tcaatcgcaa ccgctgccag cagtgtcgt	1200
tcaagaagtg tctctccgtt ggcatgtcta gagatgctgt gcgttttggg cgcatcccca	1260

agagagagaa gcaacggatg cttgccgaga tgcagagcgc catgaacttg gccacaacc 1320
aactgagcag cctgtgccct ctagagacct cacctactcc acatcccacc tctggctcca 1380

tgggcccctc acctcctcct gcaccagccc ccacaccttt ggtgggcttc tctcagttcc 1440
cacaacagct gacaccaccc aggtctccca gccctgagcc caccatggag gatgtgatat 1500
cccaggctgc cggggcccat cgagaaatct tcacctatgc ccatgacaag ttaggcacct 1560
cacctggtaa cttcaatgcc aatcatgcat caggtagccc ttcagctaca actccacacc 1620
gctgggagag tcagggatgc ccgtctgccc ccaacgacaa caaccttttg gcggtcagc 1680
gtcataatga agcgtgaat ggtctacgcc agggcccttc ctctaccgc cctacctggc 1740
cttctggccc caccaccac agctgccacc aacctaacag caatgggcac cgtctgtgcc 1800

ccaccacgt atattcgccc ccagaagggg aggcacctgc caacagtcta cggcaaggca 1860
acaccaagaa tgttctgctg gcatgtccca tgaacatgta tccccatgga cgcagcggcc 1920
ggactgtgca ggagatctgg gaagacttct ctatgagctt cagcctgcc gttcgggagg 1980
tggtagagtt tgccaaacac atcccagct tccgtgacct ttctcagcac gaccaggtga 2040
ccctgcttaa ggctggcacc tttgaggtgc tgatggtgcg ctttgcatcg ttgttcaacg 2100
tgaaggacca gacagtgatg ttctgagcc gcacaacctc cagtctgcag gagctcggtg 2160
ccatgggcat gggcgacctg ctcaatgcca tgtttgactt cagegagaag ctcaactccc 2220

tggcacttac cgaggaggag ctgggcctat tcaccgcggt ggtgcttgtc tctgcagacc 2280
gctcgggaat ggagaattcc gcttcggtgg agcagctcca ggagacgctg ctgcgggctc 2340
ttcgggctct ggtgctgaag aaccggccct cggagacttc ccgcttcacc aagctgctgc 2400
tcaagctgcc ggacctgcgg acctgaaca acatgcattc cgagaagctg ctgtccttcc 2460
gggtggacgc ccagtgacct gcccgccgg ctttctgccg ctgccccctt gtacagaatc 2520
gaactctgca cttctctctc ctttacgaga cgaaaaggaa aagcaaacca gaatcttatt 2580
tatattgta taaatatc caagatgagc cttggcccc ctgagccttc ttgtaataa 2640

ctcttcccc accccaccg ccagtctccc atcctccct atttaaacca ctcttctct 2700
ctccaccctc ctctggcccc tcgatttggt ctgttctgt ctcaaatcca atagttcaca 2760
gctgaaaaaa aaaaaaaaaa aa 2782

<210> 9
<211> 2344
<212> DNA
<213> rat
<400> 9

tcagatctcg gttgectcag catcctaccc ttctggaggg ctgcagtata gccaccccaa	60
gaccttactg ctcgggtgctt agaatcctga ttgtgaactg cgggcttcac tcgtctctct	120
cagccattgc ccacggggcg agagagggca ccacaacctc cacttttgtt caaggtccag	180
tttgaatgac cgctttcagc tgggtgaagac atgacgaccc tagactccaa caacaacaca	240
ggtgggtgta tcacctacat tggctccagc ggatcctccc ccagccggac cagcccagag	300
tccctctata gtgacagctc caatggcagc ttccagtccc tgactcaagg ttgtcccaca	360
tacttccac catcacctac tggctccctc acccaggacc ctgcccgtc atttggcact	420
gtgccaccca gcctcagtga tgatagctcc ccttctcttg cttcatcacc atcatcatct	480
tcctcctcct ccttctataa tgggagcccc cccggaagtc tacaagtggc catggaagac	540
agcagccgag tgtcccccag caagggcacc agcaacatta ccaagcttaa cggcatgggtg	600
ctactgtgta aagtgtgtgg ggacgtggcc tcaggcttcc actatggcgt gcatgcctgc	660
gagggctgca agggcttttt ccgccggagc atccagcaga acatccagta caagcgggtg	720
ttgaaaaacg agaactgtc cattgtccgt atcaatcga accgctgcca gcagtgtcgc	780
ttcaagaagt gtctctccgt tggcatgtct agagacgtg tgcgttttgg acgtatcccc	840
aagagagaga agcaacgaat gcttgctgag atgcagaacg ccatgaactt ggccaacaac	900
caactgagca gcctgtgccc tctagagacc tcacctgccc cgcacccac ctcaggctcc	960
gtgggcccct caccacctcc tgcaccagcc ccgacacctt tgggtgggctt ctctcagttc	1020
ccacaacagc tgacaccacc cagatccccg agtcctgagc ccaccgtgga ggatgtgata	1080
tcccagggtg ccaggggcca tcgagaaatc ttacatgatg cccatgacaa attaggcacc	1140
tcacctggca acttcaatgc caatcatgca tcaggtagcc ctccggctac cactccacag	1200
tgctgggaga gtcagggtatg cccgtctacc cccaacgaca acaacctttt ggccggctcag	1260
cgtcataatg aagcactgaa tgggtctacgc cagggccctt cctctaccc tcctacctgg	1320
ccttctggcc ctgcccacca cagctgccac cagcctaaca gcaatgggca tcgcctgtgc	1380
cccaccacg tatactcggc cccagaaggc aaggcacctg ccaacggtct acggcaaggc	1440
aacaccaaga atgttctgct ggcatgtccc atgaacatgt atcccatgg acgtagtggc	1500
cggactgtgc aggagatctg ggaagacttc tctatgagct tcacaccgc tgtgcgggag	1560
gtggtagaat ttgccaaaca catccccggc ttccgtgacc tttctcagca cgaccaggtg	1620
accctgctta aggetggcac ctttgagggtg ctgatgggtg gctttgcgtc attgttcaac	1680
gtgaaggacc agacagtcat gttcctgagc cgcacaacct acagcctgca ggagctcgggt	1740
gcatgggca tgggtgacct gctcaatgcc atgtttgact tcagcgagaa gctcaactct	1800

ctggcgctta ctgaggagga gctgggcctt ttcacggcag tggctactgt ctctgcagac	1860
cgctcgggaa tggagaattc cgcttcgggtg gagcagctcc aggagacgct gctgcgggct	1920
cttcgggctc tgggtctgaa gaaccggccc tcggagactt cccgcttcac caaactgctg	1980
ctcaagctgc cggacctgcg gacctgaac aacatgcatt ccgagaagct gctgtccttc	2040
cgggtggacg cccagtgacc cgcccggccg gccttctgcc gctgccccct tgtacagaat	2100
cgaactctgc acttctctct cctttacgag acgaaaagga aaagcaaacc agaatttat	2160
ttatatgtt ataaaatatt ccaagatgag cctctggccc cctgagcctt cttgtaaata	2220
actcttcccc cccaccccc tgetcccttc ctcccgatt taaaccactc ttgtctcccc	2280
acctctctct ggccccctga ttgtttctgt tctgtctca aatccaatag ttcacagctg	2340
aaaa	2344
<210> 10	
<211> 1817	
<212> DNA	
<213> human	
<400> 10	
cggacctcca cactgagcca tgcccacccc cgacgccacc acgccacagg ccaagggctt	60
ccgcagggcc gtgtctgagc tggacgcaa gcaggcagag gccatcatgt ccccgcggtt	120
cattgggctc aggagagcc tcctcgagga cgcccgaag gagcgggagg cggcggtggc	180
agcagcgccc gctgcagtc cctcggagcc cggggacccc ctggaggctg tggccttga	240
ggagaaggag gggaaggccg tgctaaacct gctcttctcc ccgagggcca ccaagccctc	300
ggcgtgtcc cgagctgtga aggtgtttga gacgtttgaa gccaaaatcc accatctaga	360
gacccggccc gccagagggc cgcgagctgg gggcccccac ctggagtact tcgtgcgctt	420
cgaggctgcg cgaggggacc tggccgcctt gctcagtggt gtgcgccagg tgtcagagga	480
cgtgcgcagc ccccgggggc ccaaggtccc ctggttccca agaaaagtgt cagagctgga	540
caagtgtcat cacctgttca ccaagttcga ccctgacctg gacttggacc acccgggctt	600
ctcggaccag gtgtaccgcc agcgcaggaa gctgattgct gagatcgctt tccagtacag	660
gcacggcgac ccgattcccc gtgtggagta caccgccgag gagattgcca cctggaagga	720
ggtctacacc acgtgaagg gcctctacgc cagcacgcc tcgggggagc acctggaggc	780
ctttgctttg ctggagcgct tcagcggcta ccgggaagac aatatcccc agctggagga	840
cgtctcccgc ttctgaagg agcgcacggg cttccagctg cggcctgtgg ccggcctgct	900
gtccgccgg gacttcttgg ccagcctggc cttcccgctg ttccagtga cccagtatat	960

ccgccacgcg tcctcgccca tgcactcccc tgagccggac tgctgccacg agctgctggg	1020
gcacgtgccc atgtctggccg accgcacctt cgcgcagttc tcgcaggaca ttggcctggc	1080
gtccctgggg gcctcggatg aggaaattga gaagctgtcc acgtgtact ggttcacggt	1140
ggagttcggg ctgtgtaagc agaacgggga ggtgaaggcc tatggtgccg ggctgctgtc	1200
ctctacggg gagtcctgc actgcctgtc tgaggagcct gagattcggg ctttcgaccc	1260
tgaggctcgc gccgtgcagc cctaccaaga ccagacgtac cagtcagtct acttcgtgtc	1320
tgagagcttc agtgacgcca aggacaagct caggagctat gcctcacgca tccagcgccc	1380
cttctccgtg aagttcgacc cgtacacgt ggccatcgac gtgtctggaca gccccaggc	1440
cgtcgggcgc tccctggagg gtgtccagga tgagctggac acccttgccc atgcgtgag	1500
tgccattggc taggtgcacg gcgtccctga gggcccttcc caacctcccc tggtcctgca	1560
ctgtcccgga gctcaggccc tggtagggg ctgggtcccg ggtgcccccc atgccctccc	1620
tgctgccagg ctccactgc ccctgcacct gcttctcagc gcaacagctg tgtgtgcccg	1680
tggtaggtt gtgtcctcg tggtaggtc ctgtcctggc tcccagggtc ctgggggctg	1740
ctgcactgcc ctccgccctt ccctgacact gtctgtgcc ccaatcacg tcacaataaa	1800
agaaactgtg gtctcta	1817
<210> 11	
<211> 1757	
<212> DNA	
<213> mouse	
<400> 11	
gcactatgcc cacccccagc gcctcctcgc cacagcccaa gggttcaga agagccgtct	60
cagagcagga taccaagcag gccgaggtg tcacgtcccc aaggttcatt ggacggcggc	120
agagtctcat cgaggatgcc cgcaaggagc gggaggcagc agcagctgca gcagcggctg	180
cggtagcctc cgcggaacct gggaacctat tggaggctgt ggtattcgag gagaggatg	240
gaaatgctgt tctcaacctg ctcttctcct tgaggggtac aaaacctcc tctgtctc	300
gggctttgaa agtgtttgag acatttgaag ccaaaatcca ccacttagag acccggcctg	360
cccagaggcc actggcagga agccccacc tggagtactt tgtgcgttc gaggtgcca	420
gtggcgacct ggctgccctc ctcagttctg tgcgtcgggt gtctgacgat gtgcgcagtg	480
ccagagagga caaggttccc tggttcccaa ggaaagtgtc agagttggat aaggttcacc	540
acctggtcac caagtttgac cctgacctgg acctggacca tccgggcttc tctgaccagg	600
cgtatcgcca gcgccggaag ctgattgcag agattgcctt ccaatacaag cagggtgagc	660

caattcccca cgtggaatac acaaaggagg aaattgctac ctggaaggag gtatacgcca	720
cgtgaaggg cctctatgct acccatgcct gccgggaaca cctggaggct ttccagcttc	780
tggaacggtat ctgtggctac cgagaggaca gcattccaca gctggaggat gtgtctcact	840
tcttgaagga acggactggc ttccagctgc gaccctggc cggctactg tctgcccgtg	900
attttctggc cagictggcc ttccgtgtgt ttccagtgcac acagtacatc cgtcatgcct	960
cctcacctat gcactcacc gagccagact gctgccacga gctgctggga cacgtacca	1020
tgttggtga cgcacattt gccagtctt cccaggacat tggacttga tctctggggg	1080
cttcagatga agaaattgaa aaactctcca cgggtgactg gttcactgtg gagtttgggc	1140
tgtgtaaaca gaatggggag ctgaaggctt acggtgcagg gctgctgtct tcctatggag	1200
agctcctgca ctccctgtca gaggagcccg aggtccgggc ctttgacca gacacagcag	1260
ccgtgcagcc ctaccaagat caaacctacc agccggtgta cttcgtgtca gagagcttca	1320
gtgatgcaa ggacaagctc aggaactatg cctctcgtat ccagcgccca ttctctgtga	1380
agtttgacc gtacacctg gccattgatg tactggacag tcctcacacc atccggcgct	1440
ccttagaggg ggtccaggat gagctgcaca ccctgaccca agcactgagt gccattagct	1500
aatgcatag ggtaccacc acaggtgcca ggggccttcc ccaaagtcc cagccccttc	1560
tccaaccttt cctggcccag aggctttccc atgtgtgtgg ctggacctt tgatgggctg	1620
ctcttggctc ccctctcca ctgcttctca accacatctt actactgcat gcgctccagg	1680
atggtcctgc attcctcctg ccttcatgc tgtattctac cctgattatt atctcaataa	1740
aggaaggaaa ggtctcc	1757
<210> 12	
<211> 1770	
<212> DNA	
<213> rat	
<400> 12	
cagcttgca tatgccacc ccagcgccc cctcgccaca gccaagggc ttcagaagg	60
ccgtctcaga gcaggatgcc aagcaggccg aggcgtgcac gtecccaagg ttcacggac	120
ggcgacagag tctcatcgag gatccccga aggagcggga ggccggcgga gctgcagcag	180
cagcagcggg agcctcctcg gaacctggga acccactgga ggctgtggta tttgaggaga	240
gggatgggaa tgctgttctc aacctgctct tctccctgag gggtacaaaa ccctcctct	300
tgtctcgggc tgtaaaagta tttgagacat ttgaagccaa aattcaccac ttagagacc	360
ggcctgccc gaggccactg gcaggaagcc cccacctgga gtattttgtg cgcttcgagg	420

tgcccagtgg agacctggct gccctctca gctctgtcgc tcgggtgtct gacgacgtgc 480
 gcagtgccag agaggacaag gtcacctggt tcccaagaaa agtgtcgaa ttggacaagt 540
 gtcaccacct ggtcaccaag ttgacctg atctggacct ggaccacccg ggcttctctg 600
 accaggtgta tcgccagcgt cggaagctga ttgcagagat tgccttcag tacaagcacg 660

 gtgaaccaat tcccatgtg gaatacacag cggaagagat tgctacctgg aaggaggtat 720
 atgtcacgct gaagggcctc tatgtaccc atgctgccc ggagcacctg gagggtttcc 780
 agcttctgga acggtactgt ggctaccgag aggacagcat cccacagctg gaggacgtgt 840
 cccgttctt gaaggagcgg actggcttcc agctgcgacc cgtggccggt ctactgtccg 900
 cccgtgattt tctggccagt ctggccttcc gcgtgtttca atgcaccag tatatccgcc 960
 atgctctc acctatgcat tcacctgagc cggactgctg ccatgagctg ttgggacatg 1020
 taccatgtt ggctgaccgc acatttgcgc agttctccca ggacattgga cttgcatctc 1080

 tgggggcctc agatgaagaa attgaaaaac tctccacggt gtactggttc actgtggaat 1140
 tcgggctatg taaacagaat ggggagctga aggttatgg tgcagggtg ctgtcttct 1200
 acggagagct cctgcactcc ctgtcagagg agcctgaggt ccgagcctt gaccagaca 1260
 cagcagctgt gcagccctac caagatcaaa cctaccagcc tgtgtacttt gtgtccgaga 1320
 gcttcaatga cgccaaggac aagctcagga actatgcctc tcgtatccag cgccattct 1380
 ctgtgaagtt tgacccgtac aactggcca ttgacgtact ggacagccct cacaccatcc 1440
 agcgtcctt ggagggggtc caggatgagc tgcacaccct ggcccacgca ctgagtcca 1500

 ttagctaaat gcatagggtg ccaccacag gtgccagggc ctttccaaa gtctccatcc 1560
 cctttccaa cctttctgg ccagaggct tcccatgtg tgtggctggg cctttgatg 1620
 ggctcctctt ggaccccat cctcccaaca ctgttctca accatgtctt actactgcat 1680
 gcactccagg gtgtctctgc attctctg cctccatgc tctatactac cctgattatt 1740
 ctctcaataa aggaaggaaa gaatctaacc 1770

 <210> 13
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> human
 <400> 13

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Gly Ala Ser

1 5 10 15

Pro Ala Ser Gln Ser Tyr Ser Tyr His Ser Ser Gly Glu Tyr Ser Ser

20	25	30	
Asp Phe Leu Thr Pro Glu Phe Val Lys Phe Ser Met Asp Leu Thr Asn			
35	40	45	
Thr Glu Ile Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met			
50	55	60	
Asp Asn Tyr Ser Thr Gly Tyr Asp Val Lys Pro Pro Cys Leu Tyr Gln			
65	70	75	80
Met Pro Leu Ser Gly Gln Gln Ser Ser Ile Lys Val Glu Asp Ile Gln			
85	90	95	
Met His Asn Tyr Gln Gln His Ser His Leu Pro Pro Gln Ser Glu Glu			
100	105	110	
Met Met Pro His Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Lys Pro Ser Ser Pro Pro			
115	120	125	
Thr Pro Thr Thr Pro Gly Phe Gln Val Gln His Ser Pro Met Trp Asp			
130	135	140	
Asp Pro Gly Ser Leu His Asn Phe His Gln Asn Tyr Val Ala Thr Thr			
145	150	155	160
His Met Ile Glu Gln Arg Lys Thr Pro Val Ser Arg Leu Ser Leu Phe			
165	170	175	
Ser Phe Lys Gln Ser Pro Pro Gly Thr Pro Val Ser Ser Cys Gln Met			
180	185	190	
Arg Phe Asp Gly Pro Leu His Val Pro Met Asn Pro Glu Pro Ala Gly			
195	200	205	
Ser His His Val Val Asp Gly Gln Thr Phe Ala Val Pro Asn Pro Ile			
210	215	220	
Arg Lys Pro Ala Ser Met Gly Phe Pro Gly Leu Gln Ile Gly His Ala			
225	230	235	240
Ser Gln Leu Leu Asp Thr Gln Val Pro Ser Pro Pro Ser Arg Gly Ser			
245	250	255	
Pro Ser Asn Glu Gly Leu Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys			
260	265	270	
Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys			

275	280	285	
Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn			
290	295	300	
Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe			
305	310	315	320
Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp			
325	330	335	
Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro			
340	345	350	
Gln Glu Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Val Ser Leu Ile Ser Ala Leu			
355	360	365	
Val Arg Ala His Val Asp Ser Asn Pro Ala Met Thr Ser Leu Asp Tyr			
370	375	380	
Ser Arg Phe Gln Ala Asn Pro Asp Tyr Gln Met Ser Gly Asp Asp Thr			
385	390	395	400
Gln His Ile Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Thr Gly Ser Met Glu Ile			
405	410	415	
Ile Arg Gly Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Asp Leu Pro Lys			
420	425	430	
Ala Asp Gln Asp Leu Leu Phe Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Val			
435	440	445	
Leu Arg Leu Ala Tyr Arg Ser Asn Pro Val Glu Gly Lys Leu Ile Phe			
450	455	460	
Cys Asn Gly Val Val Leu His Arg Leu Gln Cys Val Arg Gly Phe Gly			
465	470	475	480
Glu Trp Ile Asp Ser Ile Val Glu Phe Ser Ser Asn Leu Gln Asn Met			
485	490	495	
Asn Ile Asp Ile Ser Ala Phe Ser Cys Ile Ala Ala Leu Ala Met Val			
500	505	510	
Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Gln			
515	520	525	

Asn Lys Ile Val Asn Cys Leu Lys Asp His Val Thr Phe Asn Asn Gly
 530 535 540
 Gly Leu Asn Arg Pro Asn Tyr Leu Ser Lys Leu Leu Gly Lys Leu Pro
 545 550 555 560
 Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu
 565 570 575
 Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Ala Ile Ile Asp Lys Leu Phe

580 585 590
 Leu Asp Thr Leu Pro Phe

595

<210> 14

<211> 598

<212> PRT

<213> mouse

<400> 14

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Pro Ala Ser Gln Ser Tyr Ser Tyr His Ser Ser Gly Glu Tyr Ser Ser
 20 25 30
 Asp Phe Leu Thr Pro Glu Phe Val Lys Phe Ser Met Asp Leu Thr Asn
 35 40 45

Thr Glu Ile Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met
 50 55 60
 Asp Asn Tyr Ser Thr Gly Tyr Asp Val Lys Pro Pro Cys Leu Tyr Gln
 65 70 75 80
 Met Pro Leu Ser Gly Gln Gln Ser Ser Ile Lys Val Glu Asp Ile Gln
 85 90 95
 Met His Asn Tyr Gln Gln His Ser His Leu Pro Pro Gln Ser Glu Glu
 100 105 110
 Met Met Pro His Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Lys Pro Ser Ser Pro Pro

115 120 125
 Thr Pro Ser Thr Pro Ser Phe Gln Val Gln His Ser Pro Met Trp Asp

130 135 140
 Asp Pro Gly Ser Leu His Asn Phe His Gln Asn Tyr Val Ala Thr Thr
 145 150 155 160
 His Met Ile Glu Gln Arg Lys Thr Pro Val Ser Arg Leu Ser Leu Phe
 165 170 175
 Ser Phe Lys Gln Ser Pro Pro Gly Thr Pro Val Ser Ser Cys Gln Met
 180 185 190

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

 260 265 270
 Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys
 275 280 285
 Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn
 290 295 300
 Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe
 305 310 315 320
 Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp
 325 330 335

 Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro
 340 345 350
 Gln Asp Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Val Ser Leu Ile Ser Ala Leu
 355 360 365
 Val Arg Ala His Val Asp Ser Asn Pro Ala Met Thr Ser Leu Asp Tyr
 370 375 380
 Ser Arg Phe Gln Ala Asn Pro Asp Tyr Gln Met Ser Gly Asp Asp Thr

385 390 395 400
Gln His Ile Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Thr Gly Ser Met Glu Ile

 405 410 415
Ile Arg Gly Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Asp Leu Pro Lys

 420 425 430
Ala Asp Gln Asp Leu Leu Phe Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Val

 435 440 445
Leu Arg Leu Ala Tyr Arg Ser Asn Pro Val Glu Gly Lys Leu Ile Phe

 450 455 460
Cys Asn Gly Val Val Leu His Arg Leu Gln Cys Val Arg Gly Phe Gly

465 470 475 480

Glu Trp Ile Asp Ser Ile Val Glu Phe Ser Ser Asn Leu Gln Asn Met

 485 490 495
Asn Ile Asp Ile Ser Ala Phe Ser Cys Ile Ala Ala Leu Ala Met Val

 500 505 510
Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Gln

 515 520 525
Asn Lys Ile Val Asn Cys Leu Lys Asp His Val Thr Phe Asn Asn Gly

 530 535 540
Gly Leu Asn Arg Pro Asn Tyr Leu Ser Lys Leu Leu Gly Lys Leu Pro

545 550 555 560
Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu

 565 570 575
Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Ala Ile Ile Asp Lys Leu Phe

 580 585 590
Leu Asp Thr Leu Pro Phe

 595

<210> 15

<211> 598

<212> PRT

<213> rat

<400> 15

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Gln Gly Ala Ser
1 5 10 15

Pro Ala Ser Gln Ser Tyr Ser Tyr His Ser Ser Gly Glu Tyr Ser Ser
20 25 30

Asp Phe Leu Thr Pro Glu Phe Val Lys Phe Ser Met Asp Leu Thr Asn
35 40 45

Thr Glu Ile Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Phe Ser Thr Phe Met
50 55 60

Asp Asn Tyr Ser Thr Gly Tyr Asp Val Lys Pro Pro Cys Leu Tyr Gln
65 70 75 80

Met Pro Leu Ser Gly Gln Gln Ser Ser Ile Lys Val Glu Asp Ile Gln
85 90 95

Met His Asn Tyr Gln Gln His Ser His Leu Pro Pro Gln Ser Glu Glu
100 105 110

Met Met Pro His Ser Gly Ser Val Tyr Tyr Lys Pro Ser Ser Pro Pro
115 120 125

Thr Pro Ser Thr Pro Gly Phe Gln Val Gln His Ser Pro Met Trp Asp
130 135 140

Asp Pro Gly Ser Leu His Asn Phe His Gln Asn Tyr Val Ala Thr Thr
145 150 155 160

His Met Ile Glu Gln Arg Lys Thr Pro Val Ser Arg Leu Ser Leu Phe
165 170 175

Ser Phe Lys Gln Ser Pro Pro Gly Thr Pro Val Ser Ser Cys Gln Met
180 185 190

Arg Phe Asp Gly Pro Leu His Val Pro Met Asn Pro Glu Pro Ala Gly
195 200 205

Ser His His Val Val Asp Gly Gln Thr Phe Ala Val Pro Asn Pro Ile
210 215 220

Arg Lys Pro Ala Ser Met Gly Phe Pro Gly Leu Gln Ile Gly His Ala
225 230 235 240

Ser Gln Leu Leu Asp Thr Gln Val Pro Ser Pro Pro Ser Arg Gly Ser

245	250	255
Pro Ser Asn Glu Gly Leu Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys		
260	265	270
Gln His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys		
275	280	285
Arg Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn		
290	295	300
Cys Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe		
305	310	315
Gln Lys Cys Leu Ala Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp		
325	330	335
Ser Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro		
340	345	350
Gln Asp Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Val Ser Leu Ile Ser Ala Leu		
355	360	365
Val Arg Ala His Val Asp Ser Asn Pro Ala Met Thr Ser Leu Asp Tyr		
370	375	380
Ser Arg Phe Gln Ala Asn Pro Asp Tyr Gln Met Ser Gly Asp Asp Thr		
385	390	395
Gln His Ile Gln Gln Phe Tyr Asp Leu Leu Thr Gly Ser Met Glu Ile		
405	410	415
Ile Arg Gly Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Ala Asp Leu Pro Lys		
420	425	430
Ala Asp Gln Asp Leu Leu Phe Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Val		
435	440	445
Leu Arg Leu Ala Tyr Arg Ser Asn Pro Val Glu Gly Lys Leu Ile Phe		
450	455	460
Cys Asn Gly Val Val Leu His Arg Leu Gln Cys Val Arg Gly Phe Gly		
465	470	475
Glu Trp Ile Asp Ser Ile Val Glu Phe Ser Ser Asn Leu Gln Asn Met		
485	490	495
Asn Ile Asp Ile Ser Ala Phe Ser Cys Ile Ala Ala Leu Ala Met Val		

500 505 510
Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Gln

515 520 525
Asn Lys Ile Val Asn Cys Leu Lys Asp His Val Thr Phe Asn Asn Gly

530 535 540
Gly Leu Asn Arg Pro Asn Tyr Leu Ser Lys Leu Leu Gly Lys Leu Pro

545 550 555 560
Glu Leu Arg Thr Leu Cys Thr Gln Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu

565 570 575
Lys Leu Glu Asp Leu Val Pro Pro Pro Ala Ile Ile Asp Lys Leu Phe

580 585 590

Leu Asp Thr Leu Pro Phe

595

<210> 16

<211> 2599

<212> DNA

<213> human

<400> 16

gcacctggcc tgggctcctg cctccagaga gcctggcccc aaggaagagt ctagtaagct 60

tagttcccat cgggcttcca tgaaagcaca actggcccg caggaaaccg aattaaaaag 120

caatatttgt atcagtggaa gacatttct gaaagggtta atccacatcc ggcagtgtgg 180

gccatgagcc tccggcgtgg tgttcacag gcatgtctct cctcctggcc tgggcacctg 240

agcactgggg ccgcctggg cagagctggg gcggggtgct ggggggcctg gagctgcctc 300

accgagggat cctcagcagc cgacctggg ggaggcaaat gagactcttt ctggggacct 360

tgaggggagc tcgggggagc catgcagagc ttcaccaggc ctggacactg ggcatggagg 420

ctgggccacc caaggccat caccagggac tcagggtggg gggcctcagc cctgggtgac 480

agaagctcac gggccgcagg gcgaggccag aggctgagcc ttcaggctga ggtcttggag 540

gcaaatccct ccaacgcct tctgagcagg caccagacc tactgtgggc aggaccaca 600

ggaggtggag gcctttggg aactgttg aggggcatag catctccgag agaggacagg 660

gtctgactg ggtgctgaga gacagcagg gccgagcgg aggttcctt gccccagg 720

atgttccaga ggagcgcaag ggaggggcat taatatcgtg gcaagaaagg gcaggcattg 780

cagagtgagc agcgacggaa ctgggttttg tgggatgcat aggagttcac ccggataaga	840
ggtgggtgag gaatgacact gcaaaccggg gatcacggag ccccaaatcc ttctgggcca	900
ggaagtggga aggggtgggg ggtcttcctt ttgctttgac tgagcactca gcctgcctgc	960
agagggcagc gaggagccac ggaggggtgt gggacaggga tgccatggct gaagcagttt	1020
taggaaaggt cccaggggct attgttgaag agagaacggg gagcggggag tcccacagct	1080
gacaggagca gagtgggccc tgagagatgc cagctctggc tgccacagtg accagccggg	1140
gtaggccttc gagaagtcag ggagcgtcta gggcttctgg ctctgctgg gccagggtg	1200
tcattcttgg ctgccaacac cagaaagccc agcagataca ggaagcccca agccctgtcg	1260
gaaacggttc ttctccagga gggacagcgg tggcagcgtt cagccgcagg ccatgcactc	1320
tggggccacg tccttccttc tgtacagtcc agcattgtca aggcaggctc tggccatctc	1380
tgctgacccc agagggatgg ggaggcctcc cttccacca gaaggccag aagccacct	1440
gggcaggggc atcactctcc ctgggtgggg cagcggctgg gagcaggagg tgccagtggg	1500
cgtgggctgg atgcgggtgc ctgcggggcg gacatggaac ttgggggagg ctctaggctg	1560
gggttgtcct caaggagatt ctcaggtcac cccagggtca ccctcaacce ggggcctggt	1620
ggggttagagg agaaactgca aaggtctctc caagggaag gcatcagggc cctcagcact	1680
gaggacgtg cgtgctcttt aaagaagggg ccacaggacc ccgagggaag ccaggagcta	1740
gcagtgggcc atagaggggc tgagtgggtt gggtggaagc cgtccctggc cctggtcgcc	1800
ctggcaacce tgggtgggac tgtgatgcag gaggtggcag ccatttgga acgcgtggcg	1860
tctccttaga gatgtcttct tcagcctccc aggtctctcc aacttgaca ggtgggcct	1920
cctgggacat tctggacccc acggggcgag cttgggaagc cgctgcaagg gccacacctg	1980
caggcccg gggtgtggg cagatggcac tcctaggaac cacgtctatg agacacacgg	2040
cctggaatct tctggagaag caaacaatt gcctcctgac atctgaggct ggaggctgga	2100
ttccccgtct tggggcttct tgggtcggtc tgccacagg ttctggtgtt cattaaaagt	2160
gtccccctgg gctgccagaa agccctccc tgtgtgctct cttgagggt gtggggccaa	2220
ggggaccctg gctgtctcag ccccccgcag agcacagacc cctggteccc gcaagcccgc	2280
gggctgagga tgattcagac agggctgggg agtgaaggca attagattcc acggacgagc	2340
cctttctct gcgcctcct ccttcctcac ccaccccgc ctecatcagg cacagcaggc	2400
aggggtgggg gatgtaagga ggggaagggt ggggaccag agggggcttt gacgtcagct	2460
cagcttataa gaggtgctg ggccagggt gtggagacgg agcccgacc tccacactga	2520
gcatgccca ccccgacgc caccagcca caggccaagg gcttccgcag ggccgtgtct	2580
gagctggacg ccaagcagg	2599

<210> 17
 <211> 2306
 <212> DNA
 <213> mouse
 <400> 17

ttaggccagg tgctacttga gagagctcag acacagacaa aggtctggag agcacatgtc	60
ctccaccccc acctagcttc tgttgcaagc acctccagcc gagacaagag aacgaattaa	120
aaagcaatat ttgtgtcagt gtaagacatt tgccgaaagg ttaaatccac attcgtgttg	180
ctgcagagca gccccctatg caggatttgt tagatacagc tccgtcctac cctgtgccag	240
ctgagcaaac gccaggctgg gtggggtgga acccagcctg ggtttgcctc accctgcaat	300
ccccccagca ccttctaag gaggaccctg tgggtggcat gcagacctag ggactgggca	360
tagataacct ttgggttttg gcaacagccc ccactcctca ggattgaagg ctaaggtgca	420
gccagctctg ccttcattgt gggaatgtct ccacgtgacc cctttctggg ctgtggagaa	480
cactcagaga agagtcttgg gatgccaggc aggccaggga tgtgctgggc atgttgagac	540
aggagtgggc taagccagca gatttgctga cccaggaaga gttcagaaag gggcatggaa	600
catggggagg ggtccatagt gagagagagc aggcagtgca gagtaaatag tccctgagct	660
gggggttatg ggatttgtag gagcttgctc agagaaggca gaggagagat gctgcgcaa	720
gctgggtatc acagagcctc agactcctgg aacaggaact gtgggggtca ggtcagcagg	780
ggaggttagg gattgttccc ttgtactga cttagcattt atcctgcttc taggggggaa	840
ggggggccag tgggggatgc acagcaaggc agtgatgtgg caggcagcct gcgggagctc	900
ctggttcttg gtgtgaaaaa gctgggaagg aagagggtct ggctctggtaa gtacagcagg	960
cagttggctc ctgagagtcc aagccctgtc tagagggtgg agtgagattt cagagggaga	1020
gctaaacggg gtgggggctg gggagtccag gcttctggct cctgctaata ctgagtgtgc	1080
tgggtcctca gaacctcagg gtggccattt tcagggtgag agctctgtcc tttggcactt	1140
ctgcagactc cagtatccag aggaataaag atggtactct tcctcagttc ccttagtgag	1200
aggacacatt tctctgaagg gcttgggcag ttgtcctgaa ccattgcctg aaggaaggac	1260
ttgactccag ggacatagaa tgggctcagc ataagtcccc tgtagtagag aaaggtcccc	1320
tctctggtct ccttagagat cctgtttcct tggctgagga agctagggtg gatctttgtg	1380
taagtgggtg tggatgctca ctggaaatca aaaggccctt tgggtttaga ccttggggtg	1440
ccatgggaga gttgatcact gattgcgccc ttacatgggg gccagctgag aatggggctg	1500
cctctagctc gagacatga tgcaggaggt gattggggga gttcaggata ctcttaacta	1560

aagcagaggt ctgtccccc agggagggga ggtcagaaga ccctagggag atgccaaagg 1620

ctagggttgg caccatgttg caggctgtgt cttcaaggag atgataatca gaggaatcga 1680

acctgcaaaa gtgggccagt cttagatata ctatagagga ataattctct gaaacattct 1740

gtgtctcata ggacctgcct gaggaccag cccagtgcc agcacatata ctggggcagt 1800

gagtagatag tatactttgt tacatgggct ggggggacat ggcctgtgcc ctggagggga 1860

cttgaagaca tccaaaaagc tagtgagagg gctcctagat ttatttgtct ccaagggcta 1920

tatatagcct tcctaacatg aacccttggg taatccagca tggcgctcc catatgcct 1980

ggtttgatta gagagctcta gatgtctct gtcccagaac accagccagc cctgtcttc 2040

atgtcgtgtc tagggcgag ggtgattcag aggcaggtgc ctgcgacagt ggatgcaatt 2100

agatctaag ggacggaggc ctctctgtc cgtcgccctc gctctgtgcc caccgccgcc 2160

tcctcaggc acagcaggcg tggagaggat gcgcaggagg taggaggtgg gggaccaga 2220

ggggctttga cgtcagcctg gccittaaaga ggccgcctgc ctggcaaggg ctgtggagac 2280

agaactcggg accaccagct tgcact 2306

<210> 18

<211> 2462

<212> DNA

<213> rat

<400> 18

ctagcacaga tgccttagat cttggcacia ttagtcagc cagctccgtg tgtgtgtgtg 60

tgtgtttgca tgtatctcac agacagtga caatggcctg gatgtgaaca gaggaagag 120

tctgggccag cagtgtctc ccaggagggt ccaaagacat cgtattttca agtttaggcc 180

agggtctcac ttgggtgagc tcagacacag acaaaggctt ggagagcaca cattccccac 240

ccccaccag ctctatgca agcacctcca gccgagacaa gaaaacgaat taaaagcaa 300

tatttgtgtc agcgtaaagc atttgccgaa aggttaaata cactctgtg gtgtgcaca 360

gcagccccct gtgcaggatt ttttaggcac agtccctcc taccctgtg cactgagca 420

aatgccaggc tgggtgggct ggaaccagcc tgggcttgcc tcacctgga atccccagca 480

ccctccaaag gaggacctg ggagtgggca tagacgcctc tcagggtgtg gcaacagccc 540

ccagtcctca ggatgaaagg ctaagggtga gccagctctg ccttcacggt gggaatgtct 600

ctatgtgagc cttttctggg ctgtgaagaa cgctctgaga agggctctgg gacctggat 660

agggcagagc tgtgtgggc atgtagagac aggagtgggc taaagcagca aaggcactga 720

ccaaggaaga gttcagagag gagcgtggaa tatggggagg ggttcatagt aagagagagc 780

aggcagtga gagtaaatag tactgagcc ggggtttatg gggttttag gagcttactc 840
agagaaagta gatgagagat gccatgccag tctgagtatc acagagcccc aggtctctct 900
gggaacggaa ctgtgagggc cagaaggta gcaagggagg ttagggagag ttctttttgt 960
actgactcag catttatcct gctcccaggg ggcaatgggg gccagtgagg gatgcagagc 1020
aaggcagtga tgtggcaggc agttcctgtt gtgaaagagc tgggaaggga gcgggctggg 1080

cctggtacgt acagcaggcc atttctgagg gtccgagtgc tgtctaggag gtgcagtgag 1140
acttcagtga tcagccagaa cagaagctaa gcggggtggg gactgagagt tcaggcttct 1200
gggtcttgca aatatccaga atgctaaatc ctccagaccc cagggtggcc atttccagag 1260
tgggttttgt cctttgggca cttgtgcaga ctccaatatc cagagggata aggatggtac 1320
tcttcagtac cttagttag aggcacttt tctctgaagg gcttgaatgt gccgagccat 1380
tacctgaagg aaggaaatga ctccaggagc ataggatggg cccagcaca ctcacctgct 1440
acagagaaag gtccctccc tggctctctt agagatcctg tttccctggc tgaggaagct 1500

agggtggatc tttgtgaag tgggtgtgga tgctaactgg aaaacaaaag gtcacttact 1560
gttagacctc ggggtacat ggaagagatg atcactgagt gtgcccttac atggggacca 1620
gctgagaatg gggctaccac tagctcgaga ccatgataca gggaataagt gtgcatttgg 1680
gggtaggagag tggtcagaa tactctaac caaagcagag gtttgcctcc acaggaaggt 1740
gaggtcagaa ggccttaggg agctgccagg ggctagggtt ggcacatct cccaggctgt 1800
gtctttaagg agatgataat cagagggata gaaccttgca aaagtgggcc agtcttgga 1860
atactataga ggaatagcct tctggaacat tctgtgtctc ataggacctg cctggggatc 1920

cagccccagt gccagcat ataccactg gggcagtga tagatagtag actttgttac 1980
atgggctggg gggaacatgg ccatgtcct ggaggggact ttatgacaga catccaaaaa 2040
tccagtgaga gggcttctag atttgtctcc aaagggtata gttctaact gagcccttag 2100
gaaatccagc atggttctcc ctgtgtgccc tggtttggtt agagagctct agcggctctcc 2160
tgtccacag aataccagcc agccctgcc ctacgtctg cctcgggctg aggggtgattc 2220
agaggcaggt gcctgtgaca gtggatgcaa ttagatctaa tgggacggag gcctttctcg 2280
tcgccctcgc tccatgccc ccccgctc cctcaggcac agcaggcgtg gagaggatgc 2340

gcaggagta ggagggtggg gaccagagg ggctttgacg tcagcctggc ctttaaagag 2400
ggcgctgcc tggcgagggc tgtggagaca gaactcggga ccaccagagg aattcgatat 2460
ca 2462

<210> 19

<211> 21

<212>	DNA	
<213>	human	
<400>	19	
agtgatgccca aggacaagct c		21
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	human	
<400>	20	
gctaattggca ctcagtgtt		20
<210>	21	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	human	
<400>	21	
agggcacaag caacattacc		20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	human	
<400>	22	
cacaggcgtg cactccatag		20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	human	
<400>	23	
caagcacctt ccttccaatg		20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	human	
<400>	24	

gattgcagtc cacaccactg	20
<210> 25	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> human	
<400> 25	
atgctcgcca tccacaaga	19
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> human	
<400> 26	
gcggaatcga atgggagaat	20
<210> 27	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> human	
<400> 27	
tgaagagagc ggacaaggag atc	23
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> human	
<400> 28	
tctggagtta agaaatcgga gctg	24
<210> 29	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> human	
<400> 29	
gggagaatca tggaccagaa	20
<210> 30	
<211> 20	
<212> DNA	

<213> human

<400> 30

ccgtaaggca tcattggact

20