



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0076673
(43) 공개일자 2021년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 67/0275 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0168114
(22) 출원일자 2019년12월16일
심사청구일자 2019년12월16일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
(72) 발명자
고영호
경기도 안양시 동안구 평촌대로40번길 100 301호
503호
김아영
인천광역시 남동구 호구포로739번길 82-1, 3동
202 (구월동, 롯데한타빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김남혁

전체 청구항 수 : 총 11 항

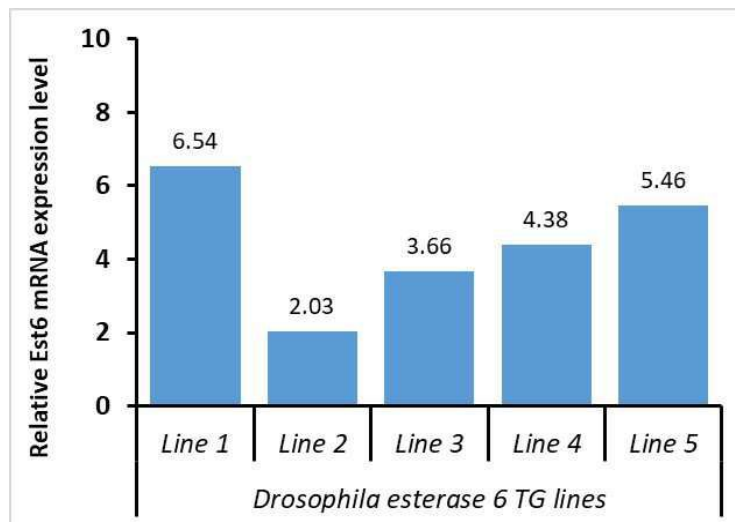
(54) 발명의 명칭 *Drosophila* esterase 6(Dest6) 유전자 발현 형질전환 초파리 및 이를 이용한 약제 내성 확인 방법

(57) 요약

본 발명은 에스테레이스 6(Esterase 6, Est-6)를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는, 약제 저항성 모델 제조용 조성물, 상기 조성물을 이용한 약제 저항성 모델 방법, 상기 방법으로 제조된 약제 저항성 모델 및 상기 약제 저항성 모델을 이용한 약제 저항성 억제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 약제 저항성 모델 제조용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 약제 저항성 모델 방법은 손쉽고 효율적으로 약제 저항성 모델을 제조할 수 있는 바, 약제 저항성 발달 기전을 연구하거나, 약제 저항성 억제제를 개발하는 데에 이용할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12N 9/18 (2013.01)
C12Y 301/01001 (2013.01)
A01K 2227/706 (2013.01)
A01K 2267/03 (2013.01)
C12N 2015/8527 (2013.01)

정인홍

전라북도 완주군 이서면 반교로 51, 302동 1805호
 (혁신도시 에코르 3단지 아파트)

(72) 발명자

누젠푸영

경기도 안양시 동안구 관평로 138번길 53, 712동
 405호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ01082103
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농업기후변화적응체계구축
연구과제명	초파리를 이용한 교차저항성 발달 모델 및 기작 구명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립농업과학원
연구기간	2015.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

에스테라이스 6(Esterase 6, Est-6)를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는, 약제 저항성 모델 제조용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 에스테라이스 6을 인코딩하는 DNA 서열은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것인, 약제 저항성 모델 제조용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약제 저항성 모델은 초파리(*Drosophila*) 또는 애벌레(*Laodelphax striatellus*)인 것인, 약제 저항성 모델 제조용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 에스테라이스 6은 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)에서 유래된 것인, 약제 저항성 모델 제조용 조성물.

청구항 5

제1항의 조성물을 개체에 도입하는 것을 포함하는, 약제 저항성 모델 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 방법은 상기 개체에 에스테라이스 6을 과발현시키거나 활성을 증가시키는 것을 포함하는 것인, 약제 저항성 모델 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 개체는 초파리(*Drosophila*) 또는 애벌레(*Laodelphax striatellus*)인 것인, 약제 저항성 모델 제조방법.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된, 약제 저항성 모델.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 약제 저항성 모델은 에스테레이스 6이 과발현되거나, 활성이 증가된 것인, 약제 저항성 모델.

청구항 10

(a) 제8항의 약제 저항성 모델에, 약제 저항성 억제제 후보물질을 투여하는 단계; 및

(b) 상기 후보물질의 투여에 따른 약제 저항성 감소 정도를 확인하는 단계

를 포함하는, 약제 저항성 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 약제 저항성 억제제 후보물질에 따라 약제 저항성이 감소되는 경우 상기 후보물질을 약제 저항성 억제제로 판단하는 것인, 약제 저항성 억제제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 에스테레이스 6(Esterase 6, Est-6)를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는, 약제 저항성 모델 제조용 조성물, 상기 조성물을 이용한 약제 저항성 모델 방법, 상기 방법으로 제조된 약제 저항성 모델 및 상기 약제 저항성 모델을 이용한 약제 저항성 억제제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 사회적으로 건강에 대한 욕구와 관심이 높아질수록 채소와 과일 등의 농산물 수요가 급격히 증가하여 이의 생산성을 높이는 방안에 대해 연구가 활발히 이루어지고 있다. 특히, 해충은 수많은 이유에서 이러한 작물의 생산성을 저해하여 이들을 예방하기 위해 매년 막대한 예산이 소모되고 있다. 따라서, 다양한 종류의 화학 농약이 개발되고 이용되고 있으나, 이러한 농약의 과다사용은 재배토양과 수질을 오염시키는 원인이 되었을 뿐만 아니라, 시설재배에서 재배환경을 오염시켜 생산자의 건강까지 위협하게 되었으며, 생산된 농산물에는 농약이 잔류하여 식품의 안전성에 대해 심각한 우려를 낳고 있다. 또한, 생태계 교란, 저항성 유해생물 증가 등의 문제도 야기되고 있다. 상기한 화학 농약을 대체하기 위한 천연 농약 및 천적 미생물 등 생물 농약의 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나 대부분의 천연 농약 및 천적 미생물들이 방제 효과가 미약하거나 효과가 극히 제한적이며, 가격 또한 고가인 관계로 실효성 및 경제성이 없어 농민들로부터 호응을 얻지 못함으로써 친환경 농업을 실현하기 위한 화학 농약의 대체 물질로서 성공하지 못하고 있다.

[0004] 또한, 농약 등의 살충기전이 동일하거나 비슷한 작물보호제에 반복적으로 노출된 해충들은 필연적으로 약제 저항성이나 내성을 가지게 될 수 있으며, 저항성의 경우 약제의 작용점에 돌연변이가 생김으로서 약제에 대한 저항성을 가지게 되는 경우가 많고, 내성의 경우는 약제를 분해하는 효소들의 활성이 증대됨으로써 나타날 가능성이 매우 높다.

[0006] 이에 본 발명자들은 약제 저항성 해충에 대한 연구를 효율적이고 손쉽게 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 약제 저항성을 유도하는 효소 및 이를 인코딩하는 유전자를 발굴하였으며, 이를 이용하여 약제 저항성 모

텔 제조용 조성물 및 제조 방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0024357호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본원의 제 1 측면은, 에스테레이스 6(Esterase 6, Est-6)를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는, 약제 저항성 모델 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본원의 제 2 측면은, 상기 약제 저항성 모델 제조용 조성물을 개체에 도입하는 것을 포함하는, 약제 저항성 모델 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본원의 제 3 측면은, 상기 약제 저항성 모델 제조방법으로 제조된 약제 저항성 모델을 제공하는 것이다.
- [0012] 본원의 제 4 측면은, (a) 상기 약제 저항성 모델에, 약제 저항성 억제제 후보물질을 투여하는 단계; 및 (b) 상기 후보물질의 투여에 따른 약제 저항성 감소 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 약제 저항성 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0014] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0016] 본원의 제 1 측면은, 에스테레이스 6(Esterase 6, Est-6)를 인코딩하는 DNA 서열을 포함하는, 약제 저항성 모델 제조용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "약제"는 식물, 농작물 등에 해가되는 해충, 곤충 및 벌레 등의 생장, 발육 등을 억제하거나 제거하는 것으로서, 해충에 대한 다양한 종류의 살충제, 농약 등을 의미하는 것일 수 있다.
- [0018] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약제는 이미다클로프리트(imidaclopride), 에토펜프록스(etofenprox), 클로란트라닐리프로(Chlorantraniliprole) 등일 수 있으나, 해충의 생장 및 발생을 억제하는 것이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "약제 저항성"은 약제를 반복적으로 사용하였을 때 대상에 대한 효과가 감소하거나, 대상이 약제 효과를 이겨내고 살아남는 것을 의미하는 것으로서, 예를 들어 과거에는 약제를 살포하면 잘 죽던 해충이 현재에는 같은 종류의 약제를 같은 양으로 똑같이 살포하여도 죽지 않게 되는 현상을 의미한다. 상기 약제 저항성의 용어는 약제 내성과 혼용하여 사용될 수 있다.
- [0020] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "약제 저항성 모델"이란, 상기에서 언급한 약제 저항성 증상이 발현될 수 있도록 제작된 모델을 의미하며, 상기 모델은 인간을 제외한 동물이라면 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0021] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약제 저항성 모델은 초파리(*Drosophila*) 또는 애벌레구(*Laodelphax striatellus*)일 수 있으며, 상기 초파리는 구체적으로 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)인 것일 수 있다.
- [0022] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "에스테레이스(esterase)"는, 에스테르 결합을 가수분해하여 산과 알코올을 생성하는 반응을 촉매하는 효소로서, 에스테레이즈, 에스테라아제 등과 혼용되어 사용될 수 있다. 초파리의

경우에는 18개의 에스테레이스 관련 유전자를 가지고 있으며, 상기 종류에 따라 에스테레이스가 명명될 수 있으며, 초파리 에스테레이스는 에스테레이스 6를 포함한다.

- [0023] 본원의 일 구현예에 있어서, 에스테레이스 6 (Esterase 6, Est-6)를 인코딩하는 DNA 서열은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0024] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 인코딩하는 것일 수 있다.
- [0025] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 1의 염기서열이 포함된 벡터를 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 에스테레이스 6는 초파리 또는 노랑초파리(*Drosophila melanogaster*)에서 유래된 것일 수 있으며, 본원 명세서에서 상기 초파리 또는 노랑초파리에서 유래된 에스테레이스 6는 Dest6 (*Drosophila esterase 6*)으로 불릴 수 있다.
- [0027] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 에스테레이스 6(Esterase 6, Est-6)를 인코딩하는 DNA 서열은 상기 약제 저항성 모델의 대상이 되는 개체에서 발현가능한 형태로 포함되는 것일 수 있으며, 구체적으로 벡터 또는 플라스미드 형태로 포함된 것일 수 있다.
- [0028] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "벡터"는 적합한 개체 내에서 목적 단백질을 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 벡터는 적당한 개체의 세포 내로 형질전환된 후, 숙주 계통과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 계통 그 자체에 통합될 수 있다.
- [0030] 본원의 제2측면은, 상기 약제 저항성 모델 제조용 조성물을 개체에 도입하는 것을 포함하는, 약제 저항성 모델 제조방법을 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 제조방법에도 공히 적용된다.
- [0031] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 개체는 약제 저항성이 발생할 수 있는 생명체라면 제한되지 않으며, 구체적으로 초파리(*Drosophila*) 또는 애벌레(*Laodelphax striatellus*)일 수 있으며, 상기 초파리는 보다 구체적으로 노랑초파리 (*Drosophila melanogaster*)일 수 있다.
- [0032] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 개체에 에스테레이스 6을 과발현시키거나 활성을 증가시키는 것을 포함하는 것일 수 있다.
- [0033] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 에스테레이스 6을 과발현시키는 것은 상기 에스테레이스 6 단백질의 발현 수준, 및/또는 이를 인코딩하는 DNA 또는 mRNA의 발현 수준을 증가시키는 것일 수 있고, 구체적으로 상기 개체의 내재적 발현 수준에 비해 발현 수준을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0034] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "내재적 발현 수준"이란, 개체가 천연의 상태 또는 해당 유전자의 발현수준을 변형하기 전의 상태에서 발현되는 mRNA 또는 단백질의 발현 수준을 의미한다. 이는 본질적으로 세포 및 조직 등에서 정상적인 상황 또는 특정 유전자의 발현을 조절하기 전 상황에서 주어진 mRNA 또는 단백질을 생산하는 정도이다. 내재적 발현 수준은 개체의 종류, 세포의 유형 및 조직 간에 비교될 수 있고, 또는 일부 자극에 의해 유발된 발현 수준과 비교될 수 있다. 구체적으로, 에스테레이스 6를 인코딩하는 유전자를 도입하지 않은 개체에서 발현되는 mRNA 또는 단백질 발현수준일 수 있다.
- [0035] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "내재적 발현 수준"이란, "발현 수준이 내재적 발현 수준에 비하여 증가"란, 해당 폴리펩티드를 암호화하는 유전자가 자연적 상태 또는 변형 전의 상태보다 많이 발현되어, 기능성 있는 해당 폴리펩티드를 많이 생산하는 것을 의미한다.
- [0036] 구체적으로, 본 발명에서 에스테레이스 6의 발현 수준의 증가는,
- [0037] 1) 상기 전사인자를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,
- [0038] 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,

- [0039] 3) 상기 전사인자의 활성이 강화되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 또는
- [0040] 4) 이의 조합에 의해 강화되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 개체의 세포 내의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 구체적으로, 본원의 에스테레이즈 6을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된, 숙주와 무관하게 복제되고 기능할 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입됨으로써 수행될 수 있거나, 상기 폴리뉴클레오티드가 작동가능하게 연결된, 숙주세포 내의 염색체 내로 상기 폴리뉴클레오티드를 삽입시킬 수 있는 벡터가 숙주세포 내에 도입됨으로써 상기 숙주세포의 염색체 내 상기 폴리뉴클레오티드의 카피수를 증가하는 방법으로 수행될 수 있다.
- [0042] 본원에서 사용되는 벡터는 숙주세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 통상 사용되는 벡터의 예로는 천연 상태이거나 재조합된 상태의 플라스미드로 복제 개시점, 프로모터 및 터미네이터를 포함할 수 있으며, 상기 벡터는 선별 마커를 더 포함할 수 있다.
- [0043] 또한, 세포 내 염색체 삽입용 벡터를 통해 염색체 내에 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 변이된 폴리뉴클레오티드로 교체시킬 수 있다. 상기 폴리뉴클레오티드의 염색체 내로의 삽입은 당업계에 알려진 임의의 방법, 예를 들면, 상동재조합에 의하여 이루어질 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0044] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "형질전환"은 표적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현할 수 있도록 하는 것을 의미한다. 형질전환된 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내에서 발현될 수 있지만 한다면, 숙주세포의 염색체 내에 삽입되어 위치하거나 염색체 외에 위치하거나 상관없이 이들 모두를 포함한다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 표적 단백질을 코딩하는 DNA 및 RNA를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 숙주세포 내로 도입되어 발현될 수 있는 것이면, 어떠한 형태로 도입되는 것이든 상관없다. 예를 들면, 상기 폴리뉴클레오티드는 자체적으로 발현되는데 필요한 모든 요소를 포함하는 유전자 구조체인 발현 카세트(expression cassette)의 형태로 숙주세포에 도입될 수 있다. 상기 발현 카세트는 통상 상기 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결되어 있는 프로모터(promoter), 전사 종결신호, 리보솜 결합부위 및 번역 종결신호를 포함할 수 있다. 상기 발현 카세트는 자체 복제가 가능한 발현벡터 형태일 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드는 그 자체의 형태로 숙주세포에 도입되어 숙주세포에서 발현에 필요한 서열과 작동 가능하게 연결되어 있는 것일 수도 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전사를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열과 상기 유전자 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.
- [0046] 다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 발현조절 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖는 핵산 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이중 프로모터가 연결될 수 있으며, 상기 폴리뉴클레오티드의 발현율을 향상시킬 수 있으면, 이에 한정되지 않는다.
- [0048] 아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 활성을 더욱 강화하도록 핵산 서열을 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합으로 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [0049] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 에스테레이즈 6의 활성을 증가시키는 것은 효소 자체의 활성을 증가시키는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 개체의 내재적 수준에 비해 활성이 증가되는 것일 수 있다.
- [0051] 본원의 제3측면은, 상기 약제 저항성 동물모델 제조방법으로 제조된 약제 저항성 모델을 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제3측면의 약제 저항성 모델에도 공히 적용된다.
- [0052] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 약제 저항성 모델은 에스테레이즈 6이 과발현되거나, 활성이 증가된 것일 수

있다.

[0054] 본원의 제4측면은, (a) 본원의 약제 저항성 모델에, 약제 저항성 억제제 후보물질을 투여하는 단계; 및 (b) 상기 후보물질의 투여에 따른 약제 저항성 감소 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 약제 저항성 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다. 제1측면 내지 제3측면과 중복되는 내용은 제4측면의 약제 저항성 억제제의 스크리닝 방법에도 공히 적용된다.

[0055] 상기의 약제 저항성 감소 정도를 확인하는 단계란, 증상 또는 상태의 회복 또는 감소에 관해 확인하는 단계를 의미한다. 본원의 목적상 약제 저항성 감소 정도를 확인하는 단계는 개체에서 발생된 약제 저항성을 치료 또는 억제할 수 있는 후보물질을 본원의 약제 저항성 동물 모델에 투여한 후, 약제 저항성 감소에 대한 진행상황을 확인하여 상기 후보물질이 상기 약제 저항성을 치료 또는 감소할 수 있는지의 여부를 평가하는 일련의 과정으로 이해될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0056] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 약제 저항성 억제제 후보물질에 따라 약제 저항성이 감소되는 경우 상기 후보물질을 약제 저항성 억제제로 판단하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명의 약제 저항성 모델 제조용 조성물 및 상기 조성물을 이용한 약제 저항성 모델 방법은 손쉽고 효율적으로 약제 저항성 모델을 제조할 수 있는 바, 약제 저항성 발달 기전을 연구하거나, 약제 저항성 억제제를 개발하는 데에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 온도에 따른 약제 감수성 및 저항성 애벌과와 초파리에서의 활성산소종 변화량을 확인한 그래프이다.
 도 2는 온도에 따른 약제 감수성 및 저항성 애벌과와 초파리에서의 글루타티온 S-전이효소 활성 변화를 확인한 그래프이다.
 도 3은 온도에 따른 약제 감수성 및 저항성 애벌과와 초파리에서의 전체 에스테레이스 활성 변화를 확인한 그래프이다.
 도 4는 온도에 따른 약제 감수성 및 저항성 애벌과와 초파리에서의 아세틸콜린에스테레이스 활성 변화를 확인한 그래프이다.
 도 5는 Drosophila esterase 6 유전자의 조직에 따른 발현양을 나타낸 도면이다.
 도 6은 Drosophila esterase 6 유전자의 발생단계별 발현양을 나타낸 도면이다.
 도 7은 Drosophila esterase 6 유전자가 포함된 Puast 벡터를 나타낸 도면이다.
 도 8은 Drosophila esterase 6 형질전환 초파리 5개 라인간의 에스테레이스 6 mRNA 발현량을 비교한 도면이다.
 도 9는 Drosophila esterase 6 형질전환 초파리 5개 라인간의 에스테레이스 6 활성을 비교한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 실시예 1: 온도별 약제 저항성 애벌과 및 초파리 확보

[0065] 약제 내성 해충들이 약제 저항성을 획득하는 과정에서 발생한 돌연변이를 확인하기 위해, 먼저 온도 별 저항성 애벌과 및 초파리 계통을 확보하기 위해 다음의 실험을 수행하였다. 구체적으로, 약제 감수성 애벌과와 이미다

클로프리드 (imidaclopride) 또는 에토펙스(etofenprox) 저항성 애벌거를 25℃ 조건에서 사육하여 3령 유충까지 배양한 후, 100마리씩 나누어서 15℃, 20℃, 25℃, 30℃ 및 35℃에서 24시간 동안 사육하고, 바로 액체 질소를 이용하여 냉동을 시킨 후, -80℃에서 보관하였다.

[0066] 다음으로, 초파리의 경우, 감수성 계통과 저농도(Low Res) 및 고농도(High Res) 클로란트라닐리프롤 (Chlorantraniliprole) 저항성 계통을 24℃에서 배양하여, 성충을 확보한 후, 100마리씩을 각각 16℃, 24℃ 및 32℃에서 48시간동안 배양한 후, 뇌를 확보하여 냉동하여 -80℃에 보관하였다.

[0068] 실시예 2: 온도별 약제 저항성 애벌거 및 초파리의 활성 산소종 농도 측정

[0070] 상기 실시예 1에서 제작한 온도 별 약제 저항성 애벌거 및 초파리의 활성 산소종 농도를 측정하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0071] 구체적으로, 약제 감수성 및 저항성 애벌거와 초파리의 조직에 있는 활성 산소 종을 측정하기 위해, 먼저 1% Triton X-100를 포함한 0.1M PBS pH 7.2를 이용하여 조직을 균질화 시킨 후, 10분간 얼음에서 보관을 한 후, 13,000 rpm에서 원심분리시켜 조직 균질화 용액을 확보하였고, 확보된 용액의 단백질 농도를 BCA 방법으로 측정하였다. 다음으로, 상기에서 확보한 조직균질화 용액을 10 mM 2,7-디클로로플루오레세인 디아세테이트(2,7-dichlorofluorescein diacetate)와 혼합한 후, 37℃에서 30분간 보관한 후, VICTON Nivo multimode microplate reader를 이용하여 형광변화를 측정하였다. 또한, 확보된 조직 균질 용액을 5 mM 1-naphthyl acetate 및 100 mM MgCl₂와 혼합한 후, 320nm에서 10분 동안 30초 간격으로 흡광도의 변화를 측정한 후, 비교하였다(도 1).

[0072] 그 결과, 약제 저항성 애벌거 및 초파리의 경우, 감수성 애벌거 및 초파리보다 활성 산소종 양이 증가된 것이 확인되었다. 따라서, 이를 통해 활성 산소종 억제와 관련된 유전자의 돌연변이로 인해 약제 저항 특성이 획득되는 것을 알 수 있다.

[0074] 실시예 3: 온도별 약제 저항성 애벌거 및 초파리의 글루타티온 S-전달효소의 활성변화 측정

[0076] 상기 실시예 1에서 제작한 온도 별 약제 저항성 애벌거 및 초파리의 글루타티온 S-전달효소(Glutathione-S-transferase)를 측정하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0077] 구체적으로, 실시예 2에서 확보된 약제 감수성 및 저항성 애벌거와 초파리의 조직 균질 용액을 0.2M 글루타티온 (Glutathione) 및 0.1M 2,4-디니트로클로로벤젠(2,4-Dinitrochlorobenzene, CDNB)과 혼합한 후, 25℃에서 5분동안 30초간격으로 340nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 비교하였다(도 2).

[0078] 다양한 온도에 노출된 저항성과 감수성 계통 애벌거들에서 GST의 활성변화를 측정하여, 15℃ 노출 감수성 계통의 GST활성을 기준점으로 하여 분석한 결과, 감수성 계통의 경우 온도의 증가에 의존적인 변화를 보이지 않았다. 구체적으로, 20℃ 노출 감수성계통이 가장 높은 GST 활성을, 30℃ 노출 감수성 계통이 가장 낮은 GST활성을 보여주었다. 감수성 계통의 온도와 GST활성 사이의 상관계수와 결정계수는 각각 -0.4217과 0.1778로 상호연관성이 없는 것으로 나타났다.

[0079] 두 저항성 애벌거 계통의 GST활성도 감수성 계통의 GST활성과 커다란 차이가 없었고, 비슷한 경향성을 보여주었다. 20℃에서 가장 높은 GST활성을, 그리고 30℃에 가장 낮은 GST활성을 보여주었다. 상관계수 및 결정계수가 이미다클로프리드 계통의 경우 각각 -0.3031과 0.0919, 에토펙스의 경우 각각 -0.3725와 0.1388로서 감수성 계통과 비슷하게 온도와 GST활성 사이의 상관성은 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 온도 변화가 애벌거에서 GST의 발현에 미치는 영향은 매우 적은 것으로 사료되게 한다.

[0080] 저항성 초파리에서 온도에 따른 GST의 활성 변화를 측정한 결과, 대조군에서는 24℃에서 통계적으로 유의하게 높은 GST 활성을 보여주었고 두 저항성 계통에서는 온도에 따라서 GST 활성의 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 대조군에서의 온도와 GST활성간의 상관계수와 결정계수는 각각 -0.5676과 0.3722로 연관성이 낮게 나타났다. 두 저항성 계통의 경우도 상관계수는 0.7438과 -0.7068로 결정계수는 0.5599와 0.4995로 연관성이 낮게 나타났다. 이러한 결과는 초파리에서도 온도와 약제 저항성 여부와 GST 활성간에는 상관성이 매우 낮은 것으로

보인다.

[0082] 실시예 4: 온도별 약제 저항성 애벌레 및 초파리의 전체 에스테레이스의 활성변화 측정

- [0084] 상기 실시예 1에서 제작한 온도 별 약제 저항성 애벌레 및 초파리의 전체 에스테레이스(esterase)의 활성변화를 측정하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0085] 구체적으로, 실시예 2에서 확보된 약제 감수성 및 저항성 애벌레와 초파리의 조직 균질 용액을 5 mM 1-naphthyl acetate 및 100 mM $MgCl_2$ 와 혼합한 후, 320nm에서 10분동안 30초간격으로 흡광도의 변화를 측정한 후, 비교하였다(도 3).
- [0086] 다양한 온도에 노출된 감수성과 저항성 애벌레 계통들에서의 에스테레이스의 활성 변화를 확인한 결과, 감수성 계통에서의 에스테레이스의 활성은 온도가 증가함에 따라서 감소하였다. 특히, 30℃와 35℃에서는 15℃와 비교하여 통계적으로 유의하게 낮은 활성을 보여주었다. 감수성 계통에서의 온도와 에스테레이스 활성 사이에는 상관계수와 결정계수가 각각 -0.9369와 0.8777로서 부의 상관관계가 있음을 보여주고 있다.
- [0087] 두 저항성 계통의 경우는 에스테레이스의 활성이 감수성 계통에 비하여 1.8~2.7배 증가되어 있었다. 하지만, 이 미다클로프리드 저항성 계통에서는 에스테레이스의 활성과 온도 간의 상관계수와 결정계수가 각각 0.5957과 0.3537로 양의 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 이에 반하여 에토펜프록스 저항성 계통에서는 온도와 에스테레이스의 활성 사이의 상관계수 및 결정계수가 각각 0.2912 및 0.0848로 연관성이 낮게 나타났다.
- [0088] 대조군과 두 저항성 초파리 계통에서의 에스테레이스의 활성을 비교분석 한 결과, 대조군 초파리의 경우는 24℃ 배양 초파리의 경우 유의하게 활성이 증가한 후, 32℃에서는 유의하게 감소를 하였다. 에스테레이스의 활성과 온도간의 상관계수와 결정계수는 각각 -0.7467과 0.5575로 부의 연관성을 보여주고 있다. 이에 반하여 Low-Res.와 High-Res. 군은 온도가 증가함에 따라서 에스테레이스의 활성이 감소함을 보여주고 있다. Low-Res 계통의 상관계수와 결정계수가 각각 -0.8976과 0.8056이었고, High-Res. 계통의 경우는 상관계수와 결정계수가 각각 -0.9610과 0.9235로 높은 부의 연관성을 보여주었다.
- [0089] 상기 결과를 종합해보면, 약제 저항성 애벌레 및 초파리의 경우, 약제 감수성 개체보다 전체 에스테레이스 효소 활성이 향상된 것이 확인되었는 바, 이를 토대로 약제 저항성 개체는 전체 에스테레이스 효소 활성의 증가로 저항성을 획득하는 것을 알 수 있다.
- [0090] 또한, 애벌레와 초파리의 연구 결과는 에스테레이스의 경우는 약제저항성에 의하여 발현이 증가되는 효소이지만, 온도와 연관성은 처리되는 약제와 곤충 종에 따라서 달라질 수 있음을 보여주고 있다.

[0092] 실시예 5: 온도별 약제 저항성 애벌레 및 초파리의 아세틸콜린에스테레이스 (AChE)의 활성변화 측정

- [0094] 상기 실시예 1에서 제작한 온도 별 약제 저항성 애벌레 및 초파리의 아세틸콜린에스테레이스 (Acetylcholinesterase, AChE)의 활성변화를 측정하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0095] 구체적으로, 실시예 2에서 확보된 약제 감수성 및 저항성 애벌레와 초파리의 조직 균질 용액을 10 mM 5,5'-디티오스(2-나이트로벤조산)[5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)] 및 75 mM 아세틸콜린 요오드(acetylthiocholine iodide)와 혼합한 후, AChE의 활성을 25℃에서 10분간 30초간격으로 412nm에서의 흡광도 변화를 측정하여 비교하였다(도 4).
- [0096] 온도변화에 따른 AChE 활성변화를 측정한 결과, 감수성 애벌레 계통의 경우는 25℃에서 가장 높은 AChE 활성이 측정되었고, 35℃에서 가장 낮은 활성이 측정되었다. 온도와 AChE 간의 상관계수와 결정계수가 각각 0.0467과 0.0022로 상관관계가 없었다. 두 저항성 애벌레 계통의 경우 감수성에 비하여 AChE의 활성이 모든 온도에서 1.28~1.98배 통계적으로 유의하게 증가하였다. 특히 에토펜프록스 저항성 계통이 더 높은 AChE 활성을 보여주었다. 두 애벌레 저항성 계통 모두 25℃에서 활성이 가장 높았고 35℃에서 가장 낮았다.
- [0097] 대조군 초파리의 경우는 감수성 애벌레 계통과 비슷하게 24도시에서 높은 AChE 활성을 보였다. 하지만 온도와

AChE 활성간의 상관계수와 결정계수는 각각 0.3766과 0.1418로 연관성이 없었다. Low-Res 와 High-Res 계통들의 경우는 대조군 초파리에 비하여 AChE의 활성이 16℃와 32℃에서는 유의하게 증가가 되었지만, 24℃에는 차이가 없었다. Low-Res 초파리 계통의 온도와 AChE 활성 간의 상관계수와 결정계수는 각각 0.5544와 0.3074로 낮은 상관성을 보여주었다. 그리고 High Res 계통의 경우도 상관계수와 결정계수가 각각 -0.6768과 0.4581로 낮은 부의 연관성을 보여주었다.

[0098] 상기 결과를 종합해보면, 약제 저항성 애벌레 및 초파리의 경우, 약제 감수성 개체보다 아세틸콜린에스테레이스 효소 활성이 향상된 것이 확인되었는 바, 이를 토대로 약제 저항성 개체는 아세틸콜린에스테레이스 효소 활성의 증가로 저항성을 획득하는 것을 알 수 있다.

[0099] 또한, 이러한 결과는 저항성 계통에서 AChE의 활성이 증가는 되지만, AChE의 활성과 온도와는 상관관계가 없음을 보여주고 있다.

[0101] 실시예 6: 형질전환 초파리 제작

[0103] 상기 실시예 2 내지 5의 결과를 토대로, 약제 내성 해충의 경우 에스테레이스 효소의 활성이 약제 감수성 또는 대조군에 비해 증가된 것이 확인되었는 바, 이를 토대로 에스테레이스 효소가 약제 내성과 연관이 있음을 알 수 있다.

[0104] 이와 관련하여, 초파리의 경우 18개의 에스테레이스 효소 유전자를 가지고 있으며, 특히 에스테레이스 6(Esterase 6)이 신경계 및 소화기관 등에서 높은 발현양을 보인다고 알려져 있다(도 5 및 도 6). 따라서, 초파리의 에스테레이스 6 유전자가 약제 내성과 관련이 있을 것이라고 추론하였으며, *Drosophila* esterase 6 (Dest6) 유전자가 과발현된 형질전환 초파리를 제작하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0105] 먼저, Dest6 유전자를 클로닝하기 위해, 정상 초파리의 genomic DNA에서 2개의 프라이머를 이용하여 PCR로 Dest6 유전자를 증폭한 후, pGEMT-easy TA cloning kit를 이용하여 상기 유전자의 클로닝을 수행하였다. 상기 클로닝된 양 DNA 가닥을 capillary 시퀀싱을 수행하여, 기존에 보고된 Dest6의 유전자 염기 서열 및 단백질의 아미노산 서열과 비교하여 100% 동일함을 확인하였으며, 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시하였다. 다음으로, 클로닝된 Dest6 유전자를 pUAST germ line transformation vector로 이동을 시킨 후, 기존에 알려진 표준 germ line transformation 방법에 따라서 형질전환 초파리를 제작하였으며, 총 5개의 독립적인 Dest6 TG line들을 확립하였다(도 7).

표 1

프라이머 이름	서열(5'- 3')	생성물 크기	서열번호
Dest6 Start EcoRI F+5	ATA GCG AAT TCA TGA ACT ACG TGG G	1.7 k bp	서열번호 3
Dest6 Stop XhoI R +5	TTC AAC TCG AGT TAC GGA AAT TCC A		서열번호 4

[0109] 실시예 7: Dest6 형질전환 초파리에서 Dest6 mRNA 발현 확인

[0111] 상기 실시예 1에서 제작된 5개의 Dest6 TG line에서 Dest6 mRNA의 발현양을 확인하기 위하여 Dest6 유전자를 Tubulin-Gal4 driver를 이용하여 모든 조직에서 발현시킨 후, 3령 유충에서 total RNA를 Trizol을 이용하여 추출하고, Total RNA에 DNaseI을 처리한 후, oligo DT를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 이용하여 실시간 정량적 중합효소 연쇄반응(quantitative real time PCR)을 위한 프라이머 세트를 이용하여 5개의 라인에서의 Dest6 mRNA의 발현양을 확인하였다(도 8).

[0112] 그 결과, 실시예 1에서 제작한 5개의 Dest6 TG 라인에서 모두 Dest6 mRNA가 발현됨을 확인하였다.

표 2

[0114]

프라이머 이름	서열(5'-3')	생성물 크기	서열번호
Dest6 F1-52	TGG GAC TGG GAC TTA TCA TTG T	103 bp	서열번호 5
Dest6 R-1 154	CTG CAC CAA CAG AGG GTC ATC		서열번호 6
RP49 F	CAG TCG GAT CGA TAT GCT AAG CTG T	164 bp	서열번호 7
RP49 R	TAA CCG ATG TTG GGC ATC AGA TACT		서열번호 8

[0116] 실시예 8: Dest6 형질전환 초파리에서의 전체 에스테레이스의 활성 확인

[0118] 상기 실시예 1에서 제작된 5개의 Dest6 TG 라인에서 전체 에스테레이스 활성을 확인하기 위해, 대조군 초파리 w1118과 5개의 Dest6 TG 라인 초파리를 1% Triton X-100를 포함한 0.1M PBS pH 7.2를 이용하여 조직을 균질화시킨 후, 10분간 얼음에서 보관을 한 후, 13,000 rpm에서 원심분리를 시켜서 용액을 확보하였고, 확보된 용액의 단백질 농도를 BCA방법으로 측정하였다.

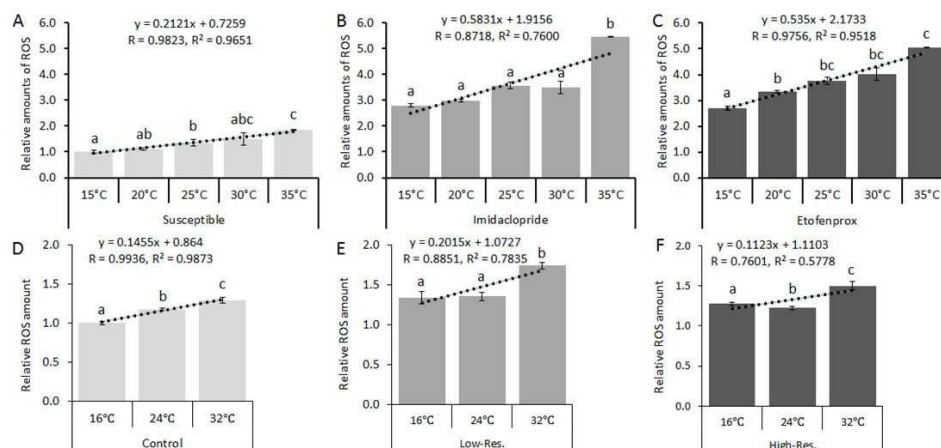
[0119] 다음으로, 상기 균질화시킨 조직 용액을 5 mM 1-naphthyl acetate과 100 mM MgCl₂을 섞어 준 후, 320nm에서 10분동안 30초간격으로 흡광도의 변화를 측정한 후, 비교함.

[0120] 그 결과, 상기 실시예 1에서 제작된 5개의 Dest6 TG 라인 모두 대조군 초파리인 w1118 보다 증가된 활성도를 나타내는 것을 확인하였다(도 9).

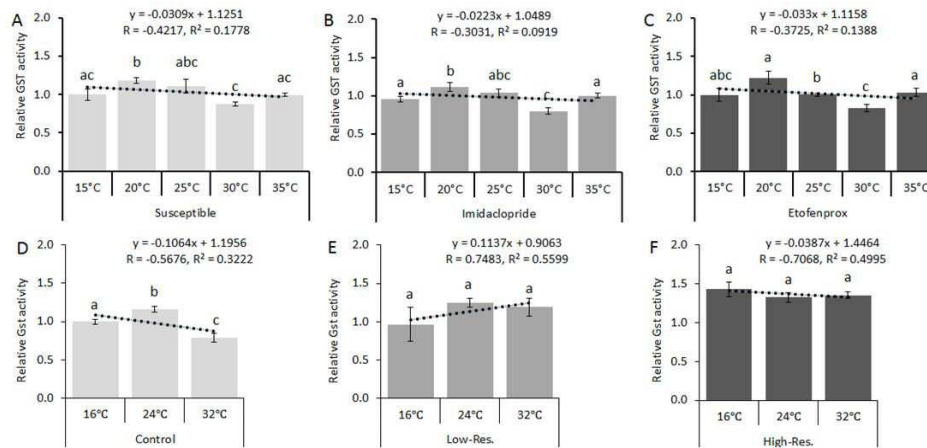
[0122] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

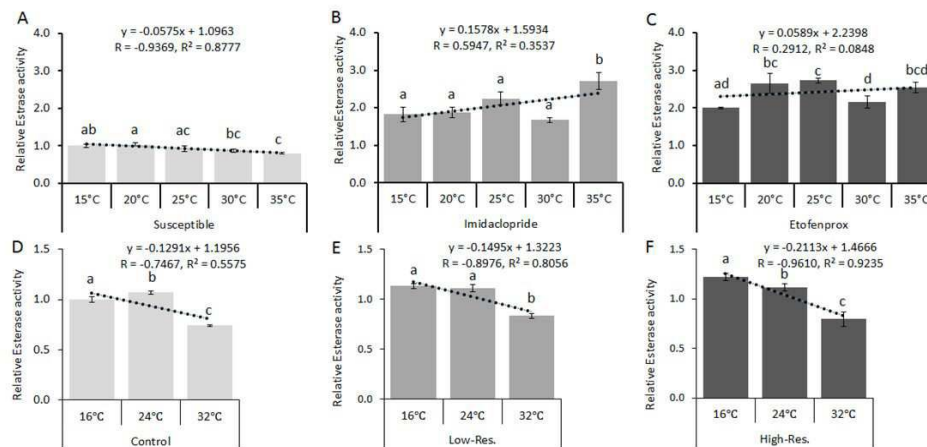
도면1



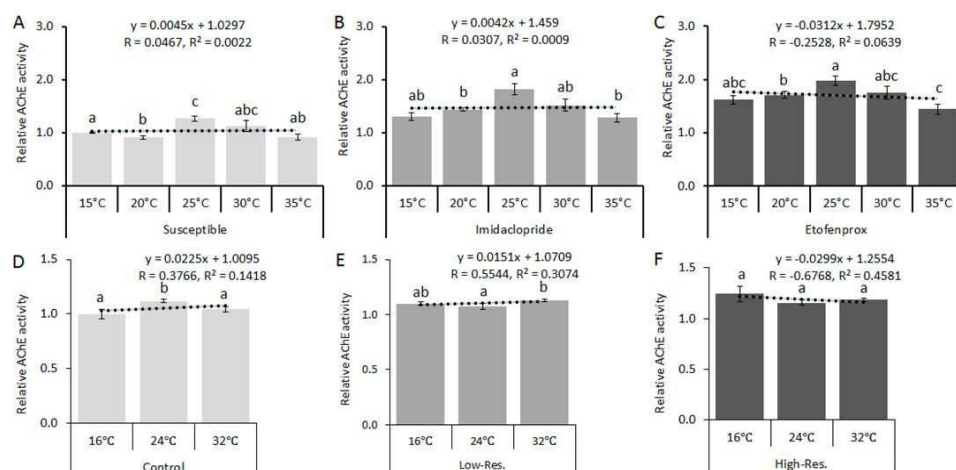
도면2



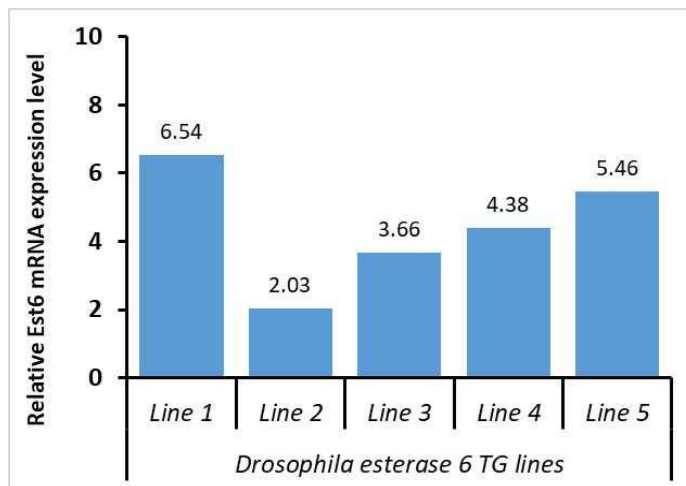
도면3



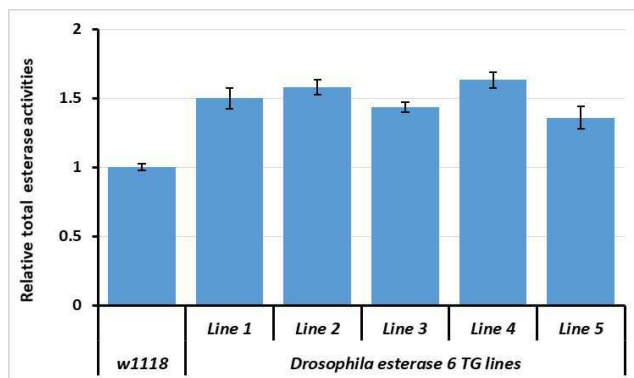
도면4



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Drosophila esterase 6 gene expressing-transgenic drosophila and method of identifying drug tolerance
- <130> a
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1680
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Drosophila melanogaster Esterase 6
- <400> 1

atgaactacg tgggactggg acttatcatt gtgctgagct gcctttggct cggttcgaac

60

gcgagtata cagatgaccc tctgttggc cagctgcccc agggcaagct acgtggcgc	120
gataatggaa gctactacag ctacgaatcg attccctacg ccgaaccgcc cactggcgat	180
ctacgattcg aggtccaga gccgtacaaa caaaagtggc cggatatatt cgatgccacc	240
aaaaccccg tgccgtgcct gcagtgggat cagttcacgc ctggggccaa caaattggta	300
ggagaggagg attgcctaac cgtcagcgtc tacaagccga agaatagcaa gaggaatagc	360
tttccggtgg tggcccatc tcacggaggt gcctttatgt tcggtgcagc atggcaaat	420
ggacacgaga acgtgatcg tgagggcaaa ttattcttgg tgaagataag ctatgcctg	480
gggccattgg gtttcgtgag caccggcgat agggatcttc ccgaaacta tggactgaaa	540
gatcaacggc tggctctcaa atggattaag cagaatatag ccagttttgg tggagaaccg	600
cagaacgtac tgttggttgg tcaactccgt ggaggagctt cggtcctct gcagatgctt	660
cgtgaagatt tcggccagct ggccagggcg gcattctcgt ttagtggaat tgctctagat	720
ccatgggtta tacagaagg agcaagagga cgagccttg aactgggacg caacgtggga	780
tgtgaatcgg ctgaagactc gaccagcctg aagaaatgcc taaagtcaa gccagccagt	840
gaattagtca ccgccgtccg taaattcctt atattttcct atgtgccctt tgctccattt	900
agtcctgtat tggagccatc ggatgctcca gacgccatta tcaccagga tcccaggat	960
gtcattaaga gcggaaagt cggacagggt ccgtgggctg tttctatgt cacagaggat	1020
ggtggctaca atgccgcctt gcttttgaag gaacggaaat ctggaatagt tatcgatgat	1080
ctaaacgagc gttggcttga gttggcacca tatttactat tctaccgga cacgaagacc	1140
aaaaaggata tggacgacta ctgcggaaa attagcagg agtatatagg caatcagaga	1200
tttgacatcg aaagctattc agaattgcag cggctattca cggatattct cttcaagaat	1260
agcacgcagg agtcattgga tcttcacgc aaatatggaa agagtcctgc ctacgcttat	1320
gtctatgaca atccagccga aaaaggaatc gcacagggtc tggccaatcg aaccgattat	1380
gattttggta aggaaatcgt acttttaaat ggacttagtt aaatcattac ttttatagga	1440
actgtacacg gtgacgacta ctttttgata ttcgaaaatt tcgtacgaga tgtggaaatg	1500
cgtccggatg agcagataat ttcgagaaat tttatcaata tgctggcaga ttttgcttcg	1560
agtgataatg gctctctaaa atatggtgaa tgcgatttca aagataatgt aggtagttag	1620
aaattccaat tattagctat ttatattgat ggctgccaga ataggcagca tgtggaattt	1680
<210> 2	
<211> 544	

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dest6

<400> 2

Met Asn Tyr Val Gly Leu Gly Leu Ile Ile Val Leu Ser Cys Leu Trp

1 5 10 15

Leu Gly Ser Asn Ala Ser Asp Thr Asp Asp Pro Leu Leu Val Gln Leu

20 25 30

Pro Gln Gly Lys Leu Arg Gly Arg Asp Asn Gly Ser Tyr Tyr Ser Tyr

35 40 45

Glu Ser Ile Pro Tyr Ala Glu Pro Pro Thr Gly Asp Leu Arg Phe Glu

50 55 60

Ala Pro Glu Pro Tyr Lys Gln Lys Trp Ser Asp Ile Phe Asp Ala Thr

65 70 75 80

Lys Thr Pro Val Ala Cys Leu Gln Trp Asp Gln Phe Thr Pro Gly Ala

85 90 95

Asn Lys Leu Val Gly Glu Glu Asp Cys Leu Thr Val Ser Val Tyr Lys

100 105 110

Pro Lys Asn Ser Lys Arg Asn Ser Phe Pro Val Val Ala His Ile His

115 120 125

Gly Gly Ala Phe Met Phe Gly Ala Ala Trp Gln Asn Gly His Glu Asn

130 135 140

Val Met Arg Glu Gly Lys Phe Ile Leu Val Lys Ile Ser Tyr Arg Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Gly Leu Lys Asp Gln Arg Leu Ala Leu Lys Trp Ile Lys Gln Asn

180 185 190

Ile Ala Ser Phe Gly Gly Glu Pro Gln Asn Val Leu Leu Val Gly His

195 200 205

Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val His Leu Gln Met Leu Arg Glu Asp Phe

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

 275 280 285
 Phe Leu Ile Phe Ser Tyr Val Pro Phe Ala Pro Phe Ser Pro Val Leu
 290 295 300
 Glu Pro Ser Asp Ala Pro Asp Ala Ile Ile Thr Gln Asp Pro Arg Asp
 305 310 315 320
 Val Ile Lys Ser Gly Lys Phe Gly Gln Val Pro Trp Ala Val Ser Tyr
 325 330 335
 Val Thr Glu Asp Gly Gly Tyr Asn Ala Ala Leu Leu Leu Lys Glu Arg
 340 345 350

 Lys Ser Gly Ile Val Ile Asp Asp Leu Asn Glu Arg Trp Leu Glu Leu
 355 360 365
 Ala Pro Tyr Leu Leu Phe Tyr Arg Asp Thr Lys Thr Lys Lys Asp Met
 370 375 380
 Asp Asp Tyr Ser Arg Lys Ile Lys Gln Glu Tyr Ile Gly Asn Gln Arg
 385 390 395 400
 Phe Asp Ile Glu Ser Tyr Ser Glu Leu Gln Arg Leu Phe Thr Asp Ile
 405 410 415
 Leu Phe Lys Asn Ser Thr Gln Glu Ser Leu Asp Leu His Arg Lys Tyr

 420 425 430
 Gly Lys Ser Pro Ala Tyr Ala Tyr Val Tyr Asp Asn Pro Ala Glu Lys
 435 440 445
 Gly Ile Ala Gln Val Leu Ala Asn Arg Thr Asp Tyr Asp Phe Gly Thr
 450 455 460
 Val His Gly Asp Asp Tyr Phe Leu Ile Phe Glu Asn Phe Val Arg Asp

465 470 475 480
Val Glu Met Arg Pro Asp Glu Gln Ile Ile Ser Arg Asn Phe Ile Asn
 485 490 495

Met Leu Ala Asp Phe Ala Ser Ser Asp Asn Gly Ser Leu Lys Tyr Gly
 500 505 510
Glu Cys Asp Phe Lys Asp Asn Val Gly Ser Glu Lys Phe Gln Leu Leu
 515 520 525
Ala Ile Tyr Ile Asp Gly Cys Gln Asn Arg Gln His Val Glu Phe Pro
 530 535 540

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Dest6 Start EcoRI F+5
<400> 3
atagcgaatt catgaactac gtggg

25

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Dest6 Stop XhoI R+5
<400> 4
ttcaactcga gttacggaaa ttcca

25

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Dest6 F1-52
<400> 5
tgggactggg acttatcatt gt

22

<210> 6
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dest6 R-1 154

<400> 6

ctgcaccaac agagggtcat c

21

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RP49 F

<400> 7

cagtcggatc gatatgctaa gctgt

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RP49 R

<400> 8

taaccgatgt tgggcatcag atact

25