(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0004693
(43) 공개일자 2011년01월14일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/15* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0062255
(22) 출원일자 2009년07월08일
심사청구일자 2009년07월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
유영도
서울특별시 강남구 대치2동 은마아파트 6-1401
김정진
서울특별시 광진구 구의3동 현대프라임아파트 1동 606호
(74) 대리인
한양특허법인

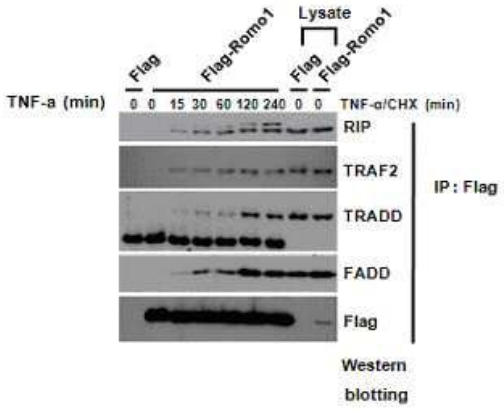
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 활성산소조절 유전자를 이용한 TNF-알파 유도 질병의 치료제 및 예방제의 스크리닝 방법

(57) 요 약

본 발명은 우리 몸에서 활성산소를 발생시키고 세포 사멸을 일으킴으로써 염증을 발생시키는 주요 인자인 TNF-알파에 의하여 발생하는 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법, 진단 방법 및 진단 키트를 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 TNF-알파가 활성산소를 생성하고 세포사멸을 유도할 때 신호 전달에 관여하는 활성산소조절 유전자(Romo1)을 조절하기 위하여 Romo1의 염기서열 또는 아미노산서열을 이용하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 M108KB01002008K020102010
부처명 한국과학재단
연구관리전문기관
연구사업명 21C뉴프론티어연구개발사업
연구과제명 신규 단백질 Romo1의 발암관련 기능 규명을 통한 신약 타겟 시스템 개발
기여율
주관기관 고려대학교 의무산학협력단
연구기간 2008-04-01 ~ 2009-03-31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 DNA 염기서열 또는 그의 변이체 염기서열로 이루어진 유전자에 특이적인 약제 화합물을 선별하는 단계를 포함하는, TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 TNF-알파 유도 질병은 패혈증(sepsis), 당뇨병(diabetes), 골다공증(osteoporosis), 이식 거부 반응(allograft rejection), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 염증성 장질환(inflammatory bowel diseases), 허혈성 질환(ischemia/reperfusion injury), 폐 섬유증(pulmonary fibrosis) 및 신경세포 퇴화 질환(ischemic stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease)으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법.

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그의 변이체 아미노산 서열로 이루어진 단백질에 특이적인 약제 화합물을 선별하는 것을 포함하는, TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 TNF-알파 유도 질병은 패혈증, 당뇨병, 골다공증, 이식 거부 반응, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 염증성 장질환, 허혈성 질환, 폐 섬유증 및 신경세포 퇴화 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법.

청구항 5

청구항 1 또는 청구항 3에 있어서, 상기 스크리닝 방법은 1) 실험군으로서 피검 화합물 및 세포 사멸을 유도할 수 있는 정도 양의 TNF-알파를 세포에 처리하고, 대조군으로서 항산화제 및 상기 실험군과 동일한 양의 TNF-알파를 상기 실험군과 동일한 양의 세포에 처리하는 단계 및

2) 상기 실험군과 대조군의 항산화 효과가 유사하면서도, 초기의 미토콘드리아 막 전압에 비해 상기 실험군의 미토콘드리아 막 전압을 높게 유지시킨 피검 화합물을 선별하는 단계

를 포함하는 것인, TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법.

청구항 6

청구항 3에 있어서, 상기 스크리닝 방법은 1) 실험군으로서 피검 화합물 및 세포 사멸을 유도할 수 있는 정도 양의 TNF-알파를 세포에 처리하고, 대조군으로서 상기 실험군과 동일한 양의 TNF-알파를 상기 실험군과 동일한 양의 세포에 처리하는 단계 및 2) 상기 대조군과 비교하여 complex II를 이루고 있는 단백질인 RIP1, TRAF2, TRADD 또는 FADD 단백질과 상기 단백질의 결합을 방해하거나, Bcl-xL과 상기 단백질의 결합을 방해하는 피검 화합물을 선별하는 단계를 포함하는 것인, TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법.

청구항 7

서열번호 1의 DNA 염기서열 또는 그와 동일한 기능을 하는 그의 변이체 염기서열로 이루어진 유전자에서 발현되는 mRNA의 양을 측정하는 것을 포함하는, TNF-알파 유도 질병의 진단 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 TNF-알파 유도 질병은 패혈증, 당뇨병, 골다공증, 이식 거부 반응, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 염증성 장질환, 허혈성 질환, 폐 섬유증 및 신경세포 퇴화 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, TNF-알파 유도 질병의 진단 방법.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 유전자의 적어도 일부와 결합하는 올리고뉴클레오티드의 양을 측정함으로써 상기 mRNA의 양을 측정하는 것인, TNF-알파 유도 질병의 진단 방법.

청구항 10

서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그와 동일한 기능을 하는 그의 변이체 아미노산 서열에서 발현되는 단백질 양을 계측하는 것을 포함하는, TNF-알파 유도 질병의 진단 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 TNF-알파 유도 질병은 패혈증, 당뇨병, 골다공증, 이식 거부 반응, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 염증성 장질환, 허혈성 질환, 폐 섬유증 및 신경세포 퇴화 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 것인, TNF-알파 유도 질병의 진단 방법.

청구항 12

청구항 7 내지 청구항 11 중 어느 한 항의 진단 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는, 패혈증, 당뇨병, 골다공증, 이식 거부 반응, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 염증성 장질환, 허혈성 질환, 폐 섬유증 및 신경세포 퇴화 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 TNF-알파 유도 질병의 진단 키트.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 TNF-알파에 의하여 발생하는 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법, 진단 방법 및 진단 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증은 감염 및 화학물질에 의한 상처에 반응하여 일차적으로 일어나는 생체 내 면역 방어 작용이다. 염증은 손상을 입은 부위를 치유하는 역할을 한다. 염증을 일으키는 주요 인자는 TNF-알파, 인터루킨-1(inteleukin-1), 인터루킨-6 등이 알려져 있다.

[0003] 이 중에서 TNF-알파는 염증 반응에서 중요한 인자이며 조직 재생(tissue regeneration/expansion and destruction)에 관여한다(Wajant H. et al. Cell Death and Differentiation 10: 45-65, 2003). 정상적인 상태에서는 염증이 일어났을 때 이러한 인자들에 의한 염증 유발이 잘 조절되고 있다. 즉 정상적인 상태에서는 염증이 일어나고 면역 반응이 수반된 후 이들 인자들의 양은 감소하게 된다.

[0004] 그러나 TNF-알파와 같은 인자의 양이 조절되지 않고 지속적으로 증가할 경우 만성 염증(chronic inflammation)을 유발하게 된다. 이러한 만성 염증은 관절염(arthritis), 경화(sclerosis), 알쯔하이머(Alzheimer's disease), 섬유증(fibrosis), 암(cancer), 당뇨(diabetes), 대장염(inflammatory bowel diseases)등 질병의 원인이다(Balkwill F. et al. Nature 431:405-406, 2004; Chen G and David V. G. Science 296: 1634, 2002).

[0005] TNF-알파의 증가가 만성 염증을 유발하는 원리는 다음과 같다.

[0006] TNF-알파의 세포 내 신호 전달 경로는 세포 생존 경로(cell survival pathway, NF-kB pathway)와 세포 사멸 경로(cell death pathway, ROS-JNK-Caspase pathway)로 나뉠 수 있다(Papa S. et al. Cell Death and Differentiation 13: 712-729, 2006). 이와 같은 TNF-알파의 신호 전달 경로에서 활성 산소가 유도되는데, 이러한 활성산소의 근원은 미토콘드리아(mitochondria)인 것으로 알려져 있지만, 그 생성 기전은 아직 규명되어 있지 않다(Chandel N.S. et al. J. Biol. Chem. 276: 42728-42736, 2001; Hennet T. et al. Cancer Res. 53: 1456-1460, 1993; Hennet T. et al. Biochem. J. 289: 587-592, 1993; Schulze-Osthoff K. et al. J. Biol. Chem. 267: 5317-5323, 1992).

[0007] 생체 내에서 적절한 양의 활성산소는 신호 전달에 중요한 역할을 하지만, 세포 내에서 외부 스트레스 자극에 의하여 활성 산소가 지나치게 증가하는 경우가 있다. 이렇게 증가된 활성산소는 암, 노화, 염증, 당뇨, 동맥경화,

간 섬유화 등 각종 질병의 원인이 되고 있다(Droge W., Physiol. Rev. 82: 47-95, 2002). 그렇기 때문에 활성산소의 생성을 차단하는 전략은 염증 질환을 치료하는 분자 타겟으로 보고되고 있다. 활성산소는 급성 염증, 만성 염증에서뿐만 아니라 염증성 고통에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(Salvemini D. et al. Biochem. Soc. Trans. 34: 965-970, 2006).

[0008] TNF-알파의 신호 전달 경로에서 생성되는 활성산소는 NF-kB의 활성화와 TNF-알파 유도 세포 사멸에서 기능을 하며, 이중에서 TNF-알파의 증가에 의해 지나치게 증가된 만성 활성산소가 TNF-알파 유도 염증과 밀접한 연관성이 있다(Sulciner D.J. et al. Mol. Cell Biol. 16: 7115-7121, 1996; Schulze-Osthoff K. et al. EMBO J. 12: 3095-3104, 1993) (Leist et al. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 589-598, 2001).

[0009] TNF-알파가 염증을 일으키는 중요한 인자라는 것은 동물 실험을 통하여 증명되었다. 즉, TNF-알파 유전자를 삽입한 형질전환 생쥐에서 관절염이 유발되었다(Keffer J. et al. EMBO J. 10: 4025-4031, 1991). 따라서, TNF-알파의 기능을 억제하는 방법을 이용하는 것은 관절염 치료법에서 현재까지 가장 효과적인 것으로 보고되고 있다(Olsen N.J. and Stein C.M. N Engl J Med. 350: 2167-2179, 2004).

[0010] 현재까지 개발된, TNF-알파를 표적으로 하는 약제로는 Infliximab(a chimeric monoclonal antibody against human TNF), Adalimumab(a fully human monoclonal antibody), Etanercept(a dimeric TNFRII (p75) fusion protein linked to the Fc portion of human IgG), Golimumab, CDP571, Thalidomide (Bongartz T. et al. JAMA. 295: 2275-2482, 2006) 등이 있다. 그러나, 이들 약제는 TNF-알파의 정상적인 기능도 차단하기 때문에 이에 따른 부작용이 보고되고 있으며(Andrei A. et al. Cytokine & Growth Factor Reviews 19: 231-244, 2008), 이러한 부작용으로는 종양 발생(lymphoma), 감염 등이 있다(Faubion W.A. et al. Clin Gastroenterol Hepatol 4: 1199-1213, 2006).

[0011] 따라서, TNF-알파의 정상적인 기능을 차단하지 않으면서도 TNF-알파에 의해 발생되는 과도한 활성산소 생성 및 세포사멸 유도를 억제하는 예방제 또는 치료제에 대한 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0012] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 TNF-알파의 정상적인 기능을 차단하지 않으면서도 TNF-알파에 의해 발생되는 과도한 활성산소 생성 및 세포사멸 유도를 억제할 수 있는 TNF-알파 유도 질병의 예방제, 치료제 또는 진통제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다. 특히 본 발명은 TNF-알파가 염증성 질병을 유도할 때, 중간 신호전달 경로에서 중요한 역할을 하는 활성산소 생성 유전자 및 이로부터 유래된 단백질을 표적으로 하여 선택적으로 조절함으로써, 중간 신호전달 경로를 조절하는 약제를 검색하는 시스템과, TNF-알파가 염증을 일으킬 때 작용하는 활성산소 생성 단백질(Romo1)로부터 이미 생성된 과도한 활성산소를 제거하는 약제가 아닌 생성 근원인 활성산소 생성 단백질(Romo1)을 조절하는 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 TNF-알파 유도 질병의 진단방법 및 진단키트를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 하기 서열번호 1의 DNA 염기서열 또는 그의 변이체 염기서열로 이루어진 유전자(이하 "Romo1"이라 한다)에 특이적인 약제 화합물을 선별하는 단계를 포함하는, TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0015] * 서열번호 1

[0016] GAGCGCCCTCCCCGTCGTTTTCCGTGAGAGACGTAGAGCTGAGCGACCCAGCCCGCGAGCGAGGTGAGATGCCGGTGGCCGTGGGTCCCTACGGACAGTCCCAGCCAAGCTGCTTCGACCGTGTCAAAATGGGCTTCGTGATGGGTTGCGCCGTGGGCATGGCGGCCGGGGCGCTCTTCGGCACCTTTTCCTGTCTCAGGATCGGAATGCGGGGTCGAGAGCTGATGGGCGGCATTGGGAAAACCATGATGCAGAGTGGCGGCACCTTTGGCACATTCATGGCCATTGGGATGGGCATCCGATGCTAACCATGGTTGCCAACTACATCTGTCCCTTCCCATCAATCCCAGCCCATGTACTAATAAAAGAAAGTCTTTGAGTAAAAAAAAAA

[0017] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 두 번째 측면은 상기 Romo1에 의해 발현되는 단백질로서, 하기 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그의 변이체 아미노산 서열로 이루어진 단백질에 특이적인 약제 화합물을 선별하는 것을 포함하는 TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0018] * 서열번호 2

[0019] MPVAVGPYGQSQPSCFDRVKMGFVMGCAVGMAAGALFGTFSCLRIGMRGRELMGGIGKTMMQSGGTFGTFMAIGMGIRC

[0020] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 세 번째 측면은 상기 Romo1에서 발현되는 mRNA의 양을 측정하는 것을 포함하는, TNF-알파 유도 질병의 진단 방법을 제공한다.

[0021] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 네 번째 측면은 상기 Romo1에 의해 발현되는 단백질의 양을 계측하는 것을 포함하는, TNF-알파 유도 질병의 진단 방법을 제공한다.

[0022] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다섯 번째 측면은 상기 진단 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는, TNF-알파 유도 질병의 진단 키트를 제공한다.

효 과

[0023] 본 발명에 따른 TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법은, Romo1 또는 이에 의해 발현되는 단백질에 특이적인 검색 시스템으로서, TNF-알파를 표적으로 하는 항 염증제 개발에서 부작용이 적고 약효가 향상된 항 염증제를 개발할 수 있는 검색 시스템으로 이용될 수 있다. 또한, 상기 Romo1 또는 Romo1에 의해 발현되는 단백질은 TNF-알파에 의하여 유도되는 질병의 진단에서 키트, DNA 칩, 단백질 칩 등에서의 소재로 이용될 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 스크리닝 방법, 진단 방법 및 진단 키트는 TNF-알파를 표적으로 하는 것이 아니라 TNF-알파의 중간 매개체를 표적으로 하는 것이다. 즉, 본 발명에 따른 방법은 TNF-알파 유도 염증에서 이미 생성된 활성산소를 제거하는 것이 아니라 질병에 관여하는 활성산소 근원을 차단하고 부작용이 적은 약제 검색에 이용될 수 있다.

[0025] 따라서, 본 발명에 따르면, TNF-알파의 정상적인 기능을 차단하지 않으면서도 TNF-알파에 의해 발생되는 과도한 활성산소 생성 및 세포사멸 유도를 억제할 수 있는, 패혈증, 당뇨병, 골다공증, 이식 거부 반응, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 염증성 장질환, 허혈성 질환, 폐 섬유증 및 신경세포 퇴화 질환으로 이루어지는 군에서 선택되는 TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법, 질병의 진단 방법 및 진단 키트를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

[0027] 본 발명의 일 측면은, Romo1에 특이적인 약제 화합물을 선별하는 단계를 포함하는, TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0028] 또한 본 발명의 두 번째 측면은, 서열번호 2의 아미노산 서열 또는 그의 변이체 아미노산 서열로 이루어진 단백질(즉, Romo1에 의해 발현되는 단백질)에 특이적인 약제 화합물을 선별하는 것을 포함하는, TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에 있어서, 서열번호 1의 DNA 염기서열의 변이체 염기서열로 이루어진 유전자라 함은, 서열번호 1의 DNA 염기서열 중 적어도 일부가 결실, 치환 또는 부가되어도 이와 동일하게, TNF-알파 신호전달경로에서 세포사멸 경로의 중간 매개체 기능을 수행할 수 있는 소정의 변이체를 의미한다.

[0030] 본 발명에 있어서, "Romo1에 의해 발현되는 단백질의 아미노산 서열"은, 상기 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로서, 상기 서열번호 1의 cDNA 서열 중에서 번역되지 않는 부위, 즉, 5'- 및 3'-비번역 부위(Untranslational Regions; UTR)를 제외한 실제로 단백질로 번역되어 발현되는 부위이며, 서열번호 1의 제69번째부터 제305번째의 염기서열(즉, 상기 서열번호 1에서 밑줄친 부분의 염기서열)에 해당하는 아미노산 서열을 지칭한다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 TNF-알파 유도 질병은, 과도한 활성 산소를 중간 매개체로 하여 TNF-알파에 의하여 발생하는 질병을 의미하며, 그 중에서 특히 패혈증(sepsis), 당뇨병(diabetes), 골다공증(osteoporosis), 이식 거부 반응(allograft rejection), 다발성 경화증(multiple sclerosis), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 염증성 장질환(inflammatory bowel diseases), 허혈성 질환(ischemia/reperfusion injury), 폐 섬유증(pulmonary fibrosis), 신경세포 퇴화 질환(ischemic stroke, Alzheimer's disease, Parkinson's disease) 등을 의미한다.

[0032] TNF-알파는 우리 몸에서 염증을 일으키는 주요 인자이며 염증을 일으킬 때 활성산소가 중간 매개체의 역할을 한다. 기존에 개발된 TNF-알파 유도 질병의 치료제 등은 TNF-알파를 직접적인 표적으로 하는 약제이기 때문에, TNF-알파의 정상적인 기능도 차단하는 부작용이 보고되고 있다.

[0033] 그러나, 본 발명에서는 본 출원인의 연구실에서 세계 최초로 발견한 Romo1(reactive oxygen species 1)이 TNF-알파 신호전달경로에서 세포사멸 경로의 중간 매개체라는 점을 발견하였다. Romo1은 외부 스트레스에 의하여 양적으로 증가를 하며, 이는 TNF-알파에 의한 과도한 활성산소 생성 및 세포사멸 유도를 촉진시킨다. 이에 착안하여, Romo1의 양을 인위적으로 조절하였을 때 TNF-알파에 의하여 유도되는 활성 산소의 생성과 세포 사멸을 억제한다는 실험 결과를 도출하였다. 또한, 이를 바탕으로 Romo1의 기능을 조절하는 인자 또는 약제는 TNF-알파 유도 염증을 차단하는 약제에 이용할 수 있다는 점도 밝혀내었다.

[0034] 즉, 본 발명에 따른 기술은 이미 생성된 활성 산소를 제거하는 것이 아니라 질병에 관여하는 과도한 활성 산소 근원을 차단 또는 조절하는 기술이다. 이를 위하여 이미 생성된 활성 산소를 제거하는 약제 검색 시스템이 아니라 Romo1에 특이적인 검색 시스템을 개발하게 되었다.

[0035] 본 발명에 따른 스크리닝 방법을 보다 구체적으로 설명하면, 하기 2 단계를 포함할 수 있다:

[0036] 1) 실험군으로서 피검 화합물 및 세포 사멸을 유도할 수 있는 정도 양의 TNF-알파를 세포에 처리하고, 대조군으로서 항산화제 및 상기 실험군과 동일한 양의 TNF-알파를 상기 실험군과 동일한 양의 세포에 처리하는 단계

[0037] 2) 상기 실험군과 대조군의 항산화 효과가 유사하면서도, 초기의 미토콘드리아 막 전압에 비해 상기 실험군의 미토콘드리아 막 전압을 높게 유지시킨 피검 화합물을 선별하는 단계.

[0038] 상기 세포는 인간의 세포 및 돼지, 소, 토끼, 쥐 등의 동물의 세포를 포함한다.

[0039] 상기에서 항산화 효과는 활성 산소의 양을 측정함으로써 비교할 수 있다. 즉, 항산화제 및 TNF-알파가 처리된 대조군의 활성 산소의 양을 b라 하고, 피검 화합물 및 TNF-알파가 처리된 실험군의 활성 산소의 양을 a라 하면, a와 b를 비교하여 그 수치가 유사할 경우 상기 2) 단계에서 항산화 효과가 유사하다고 판정할 수 있다. 여기서, a와 b가 '$a \times 0.8 \leq b \leq a \times 1.2$'를 만족하는 경우(즉, b가 a±20% 범위 내인 경우)에 실험군과 대조군의 항산화 효과가 유사한 것으로 보는 것이 바람직하다.

[0040] 또한, 상기에서 미토콘드리아 막 전압은, Romo1이 위치하는 미토콘드리아의 막 전압을 의미하며, 초기 미토콘드리아의 막 전압을 c라 하고, 실험군의 미토콘드리아의 막 전압을 d라 하면, '$c \leq d$'를 만족하는 경우에 상기 2) 단계에서 미토콘드리아의 막 전압이 높게 유지된 것으로 보는 것이 바람직하다.

[0041] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 특히 Romo1에 의해 발현되는 단백질에 특이적인 약제 화합물을 선별하는 스크리닝 방법의 경우에는, 하기 2단계를 포함할 수 있다:

[0042] 1) 실험군으로서 피검 화합물 및 세포 사멸을 유도할 수 있는 정도 양의 TNF-알파를 세포에 처리하고, 대조군으로서 상기 실험군과 동일한 양의 TNF-알파를 상기 실험군과 동일한 양의 세포에 처리하는 단계; 및

[0043] 2) 상기 대조군과 비교하여 complex II를 이루고 있는 단백질인 RIP1, TRAF2, TRADD 또는 FADD 단백질과 상기 단백질의 결합을 방해하거나, Bcl-xL과 상기 단백질의 결합을 방해하는 피검 화합물을 선별하는 단계.

[0044] 상기와 같은 스크리닝 방법이 도출된 근거는 하기와 같다.

[0045] TNF-알파의 신호전달경로는 세포 생존경로와 세포 사멸 경로로 구분된다. 이중 세포 사멸 경로에서는 미토콘드리아를 통하여 활성산소가 생성 되고 동시에 세포 생존 경로를 통하여 발현되는 황 산화 효소인 FHC, MnSOD에 의하여 활성산소가 제거된다(Papa S. et al. Cell Death and Differentiation 13: 712-729, 2006).

[0046] 이때, 실험적으로 FHC, MnSOD의 발현을 억제하기 위하여 단백질 합성을 막는 역할을 하는 화합물인 cycloheximide(CHX)를 처리하면, 항 산화효소의 합성이 안 되기 때문에 TNF-알파에 의하여 생성되는 활성산소는 제거되지 않고 시간이 지날수록 계속 증가하게 된다(실시예의 표 1과 표 2에서 control siRNA).

[0047] 상기와 같이 처리한 후, Romo1 siRNA를 이용하여 Romo1 발현을 감소시킬 경우 TNF-알파에 의하여 생성되는 활성산소의 증가는 차단되는 것을 확인할 수 있다(표 1과 표 2의 Romo1 siRNA). 이 실험에서는 양성 대조군으로써 항 산화제인 BHA를 이용하였다(실시예의 표 1과 표 2에서 BHA).

[0048] 이러한 실험 결과는 Romo1이 TNF-알파에 의하여 생성되는 활성 산소에서 중요한 매개체라는 것을 보여 준다. TNF-알파에 의하여 유도되는 세포 사멸은 TNF-알파에 의해 유도되는 염증성 질병과 직접적으로 연관되어 있으며(Leist M and Jaattela M. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 589-598, 2001), 이러한 질병의 예로는 패혈증, 당뇨병, 골다공증, 이식 거부 반응, 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 염증성 장질환, 허혈성 질환, 폐 섬유증 및 신경세포 퇴화 질환 등이 있다.

[0049] TNF-알파에 의하여 유도되는 세포 사멸에서 Romo1의 연관성을 보여 주기 위하여 CHX와 TNF-알파를 처리한 후 세포 사멸을 세포 계수로 측정한 결과, CHX와 TNF-알파를 처리하고 9 시간 후에 약 89%의 세포 사멸이 발생하는 것을 알 수 있다. 그러나 Romo1 siRNA를 이용하여 Romo1 발현을 감소시킬 경우에는 TNF-알파에 의한 세포 사멸이 약 50% 정도만 일어나고(실시예의 표 3의 Romo1 siRNA), 항산화제인 BHA를 처리하는 경우에는 TNF-알파에 의한 세포 사멸이 약 48% 정도만 일어나는 것을 알 수 있다(실시예의 표 3의 BHA).

[0050] 이러한 사실은 Romo1의 기능을 저해하는 약제를 개발할 경우 이 약제는 TNF-알파에 의하여 유도되는 염증을 차단하는 항 염증제로써 이용될 수 있다는 것을 의미한다.

[0051] 그러나 Romo1은 활성 산소를 생성하기 때문에, 단순히 세포 사멸율을 측정하는 것(즉, 항산화 효과를 측정하는 것)과 같은, 활성 산소를 제거하는 검색 시스템은 기존의 항 산화제 검색 시스템과 차별이 없어서 Romo1 특이적 검색 시스템이라고 할 수 없다.

[0052] 이 문제를 해결하기 위하여 TNF-알파가 Romo1을 통하여 미토콘드리아에서 활성 산소를 생성하는 작용 기전을 규명해 보았다.

[0053] TNF-알파를 처리할 경우, 세포 사멸 경로에서 complex II(RIP, TRADD, TRAF2, FADD 단백질들의 결합체)가 형성되고, 이 complex II는 세포 사멸을 유도하게 된다.

[0054] 본 발명에서는 실험을 통하여 상기 complex II가 미토콘드리아에 위치하는 Romo1과 결합을 하여 TNF-알파의 신호를 전달하는 것을 발견하였다.

[0055] 즉, TNF-알파를 처리할 경우 Romo1과 RIP, TRADD, TRAF2, FADD 단백질의 결합이 증가하는 것을 관찰할 수 있다(도 1). 동시에 Romo1은 미토콘드리아 막 전압을 안정화시키고 세포 사멸을 억제하는 역할을 수행하는 Bcl-xL과 결합을 한다는 점도 알 수 있다(도 2). 그 결과 Bcl-xL의 기능이 방해되어서, 미토콘드리아 막 전압이 0.84에서 0.59로 감소되는 것을 관찰할 수 있다(도 3의 control siRNA). 이 때 초기의 활성 산소가 생성되게 되는데, 만약 CHX를 처리하여 FHC, MnSOD에 의하여 활성 산소가 제거되지 못하면 초기 활성 산소는 다시 미토콘드리아 막 전압을 감소시키게 되어 더 많은 활성 산소를 생성시키게 된다.

[0056] 도3에서 알 수 있듯이, Romo1 siRNA를 이용하여 Romo1 발현을 감소시킬 경우, TNF-알파 처리 15분 후 미토콘드리아 막 전압의 감소가 차단되지만(1.34에서 1.44), 항 산화제인 BHA는 미토콘드리아 막 전압의 감소를 차단하지 못한다(1.17에서 0.74).

[0057] 상기 실험 결과에 따르면, 대조군과 비교하여 항산화 효과가 유사하면서도 미토콘드리아 막 전압을 높게 유지시킨 피검 화합물을 선별하는 방법이 기존의 항산화제 검색 시스템과는 구별이 되는 Romo1 저해제(inhibitor)의 특이적 검색 시스템으로 이용될 수 있다는 점을 알 수 있다. 이는, 바꾸어 말하면, 대조군과 비교하여 complex II를 이루고 있는 단백질인 RIP1, TRAF2, TRADD 또는 FADD 단백질과 상기 단백질의 결합을 방해하거나, Bcl-xL과 상기 단백질의 결합을 방해하는 피검 화합물을 선별하는 방법과도 같은 원리로 볼 수 있다.

[0058] 본 발명의 세 번째 측면은, Romo1에서 발현되는 mRNA의 양을 측정하는 것을 포함하는, 상기 TNF-알파 유도 질병의 진단 방법에 관한 것이다.

[0059] 또한, 본 발명의 네 번째 측면은, Romo1에 의해 발현되는 단백질 양을 계측하는 것을 포함하는, 상기 TNF-알파 유도 질병의 진단 방법에 관한 것이다.

[0060] 상기와 같이, 본 발명에 따른 상기 TNF-알파 유도 질병의 치료제, 예방제 또는 진통제의 스크리닝 방법의 개념을 응용할 경우, 당업자라면 이의 진단 방법을 용이하게 도출할 수 있음은 자명하다.

[0061] 구체적으로는, 상기 Romo1에서 발현되는 mRNA의 양을 측정함으로써, 상기 TNF-알파 유도 질병을 진단할 수 있다.

[0062] 상기 mRNA의 양의 측정은 상기 Romo1의 적어도 일부와 결합하는 올리고뉴클레오티드의 양을 측정함으로써 가능하다.

[0063] 또한, 상기 Romo1에 의해 발현되는 단백질의 양을 계측함으로써, 동일한 결과를 얻을 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명에 따른 진단 방법을 이용하여, 상기 질병의 진단 키트를 제공할 수도 있다.

[0065] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0066] <실시예>

[0067] 실시예 1: 세포 배양

[0068] 자궁경부암세포(HeLa)와 인간 배아신장세포(HEK 293)는 미국세포주은행(ATCC)에서 구입하였으며 10% 태아송아지 혈청, 페니실린 100 units/ml, 및 스트렙토마이신 100 ㎍/ml을 함유하는 DMEM/F12 배양 배지(GIBCO/BRL, Grand Island, NY)에서 배양시켰다.

[0069] 실시예 2: Romo1 siRNA의 세포 내 주입

[0070] 세포를 6 well plate에 1 x 10^5씩 분주한 후 배양하여 24 시간 후에 항생제가 들어 있지 않은 무혈청 배지로 1회 세포를 세척한 후 control siRNA, Romo1 siRNA(100 nM)를, lipofectamine 5 ㎕를 넣어 세포에 첨가하였다. 6시간 후 무혈청 배지로 2 회 세척한 후 혈청 배지를 첨가하여 세포를 배양하였다.

[0071] Romo1 siRNA 염기 서열은 다음과 같다: 5'-CUA CGG ACA GUC CCA GCC A (dTdT)-3'(sense) and 5'-UGG CUG GGA CUG UCC GUA G (dTdT)-3'(antisense).

[0072] 실시예 3: 활성산소 계측

[0073] 0.1% 젤라틴(gelatin)으로 코팅된 커버글래스(cover glass)를 준비하여 6 well plate에 놓는다. 세포를 well 당 2 x 10^4 개 분주하였다. 24 시간 배양한 후 CHX와 TNF-알파를 처리하였다. 활성산소의 정량을 위하여 활성산소 probe인 DCF-DA(2,7-dichlorofluorescein diacetate)를 10 μM의 농도로 30분간 호일로 빛을 차단시키고 37 ℃ 항온기에서 세포에 처리 한 후, 상기 세포를 PBS로 2번 씻어주었다. Slide glass위에 mounting medium(H-1000, Vector shield, Vector Laboratories, CA) 20 ㎕를 놓고 세포가 고정되어 있는 cover glass를 덮었다. Cover glass를 slide glass 위에 투명 매니큐어로 mounting시키고 건조한 후 형광 현미경(Olympus LX71 microscope)으로 관찰하였다. 활성산소는 Metamorph software를(Universal Imaging, Westchester, PA) 이용하여 계측하였다.

[0074] 실시예 4: TNF-알파 처리 후 세포 사멸율 계측

[0075] 세포를 6 well plate에 1 x 10^5씩 분주한 후 배양하여 24 시간 후에 항생제가 들어 있지 않은 무혈청 배지로 1회 정도 세포를 세척한 후 control siRNA, Romo1 siRNA(100 nM)를, lipofectamine 5 ㎕를 넣어 세포에 첨가하였다. 6시간 후 무혈청 배지로 2 회 세척한 후 혈청 배지를 첨가하여 세포를 배양하였다. 24 시간 후 trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 떼어낸 후 6 well plate에, 배지 2 ml에 세포 수가 2 x 10^4 수가 되도록 하여 분주하였다. TNF-알파와 CHX를 처리한 후 trypan blue(0.4%)와 섞어서 살아있는 세포수를 측정하였다.

[0076] 실시예 5: Immunoprecipitation assay 및 면역블롯팅

[0077] 암세포를 수확하여 인산염 억제제(1 mM 소듐 오르도 바나데이트, NaF 30 mM, 페닐 메틸술포닐 플루오리드 1 mM,

NaPPi 30 mM)을 포함하는 RIPA 완충액(NaCl 150 mM, 1 % Nonidet P-40, 0.5 % 데옥시콜린산, 0.1 % SDS, Tris 50 mM, pH 8.0)으로 가용화시켰다. 단백질 농도를 바이로라드 단백질 에세이 킷트(BioRad, Hercules, CA)에 의해 결정하였다. Flag 항체를 첨가하여 Romo1-Flag 단백질과 결합시켰다. Romo1-Flag에 결합한 Flag 항체에 protein A agarose를 첨가하여 Romo1-Flag 단백질, Romo1-Flag 항체, protein A agarose의 복합체를 형성하게 하였다. 원심분리(4℃ 1min, 5,000rpm)를 수행하여 이 복합체를 침전시켰다. PBS(phosphate-buffered saline) 완충 용액으로 3회 세척한 후, SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리한 후에, 단백질들을 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 옮기고 RIP, TRADD, TRAF2, FADD, Bcl-xL, Flag 단백질을 각각의 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅을 실시하였다.

[0078] 실시예 6: 미토콘드리아 막 전압 (Mitochondrial Membrane Potential) 측정

[0079] 세포를 6 well plate에 1 x 10^5씩 분주한 후 배양하여 24 시간 후에 항생제가 들어 있지 않은 무혈청 배지로 1회 정도 세포를 세척한 후 control siRNA, Romo1 siRNA(100 nM)를, lipofectamine 5 ㎕를 넣어 세포에 첨가하였다. 6시간 후 무혈청 배지로 2 회 세척한 후 혈청 배지를 첨가하여 세포를 배양하였다. JC-1을 5 μM이 되도록 시험군에 처리하여 15분간 반응시킨 후 PBS로 두 번 세척한 다음 곧바로 flow cytometry로 그 값을 측정하였다. Red JC-1 aggregates는 FL2 channel로 측정하고, green JC-1 monomers는 FL1 channel에서 측정하여 그 값을 red/green 값 비율로서 조정하여 미토콘드리아 막 전압의 변화를 조사하였다.

[0080] 상기 실시예 1 내지 6에서 평가된 결과는 하기와 같다.

[0081] 표 1은 자궁경부암세포(HeLa)에서 Romo1 siRNA를 이용하여 Romo1 발현을 감소시켰을 경우 TNF-알파(20 ng/ml)에 의하여 증가하는 활성산소가 차단된다는 것을 보여주는 결과이다. 이는, TNF-알파를 처리한 후, 형광현미경을 이용하여 관찰한 후, 활성 산소의 양을 계측한 결과이다. 표 1에서는 TNF-알파를 처리하지 않은 활성 산소의 양을 1로 정하고 TNF-알파를 처리 후 시간에 따른 활성 산소 생성 양을 상대적으로 나타내었다. BHA(butylated hydroxyanisole)는 항 산화제로서 양성대조군(positive control)으로 사용되었다.

[0082] Control siRNA: 대조군(control siRNA 100 nM)을 세포에 주입한 실험 결과치.

[0083] Romo1 siRNA: Romo1 siRNA(100 nM)를 세포에 주입한 실험 결과치.

[0084] BHA: BHA 100 uM 농도로 TNF-알파를 처리 30 분전에 세포에 처리한 실험 결과치.

[0085] Cycloheximide(CHX)는 TNF-알파를 처리 30 분전에 10 μg/ml 농도로 세포에 처리하였다.

[0086] [표 1]

[0087]

시간	Control siRNA	Romo1 siRNA	BHA
0	1.0	1.0	1.0
15 분	1.0	1.1	1.1
30 분	1.2	1.3	1.1
1 시간	1.4	1.3	1.1
2 시간	1.5	1.1	1.2
4 시간	2.1	1.2	1.0
6 시간	2.5	1.3	1.0

[0088] 표 2는 인간 배아신장세포(HEK 293)에서 Romo1 siRNA를 이용하여 Romo1의 발현을 감소시켰을 경우 TNF-알파(20 ng/ml)에 의하여 증가하는 활성 산소가 차단된다는 것을 보여주는 결과이다. TNF-알파를 처리한 후 형광 현미경을 이용하여 관찰한 후 활성 산소의 양을 계측하였다. 표 2에서는 TNF-알파를 처리하지 않은 활성산소의 양을 1로 정하고 TNF-알파를 처리 후 시간에 따른 활성 산소 생성 양의 상대적 변화를 나타냈다. BHA는 항 산화제로서 양성대조군으로 사용되었다.

[0089] Control siRNA: 대조군(control siRNA 100 nM)을 세포에 주입한 실험 결과치.

[0090] Romo1 siRNA: Romo1 siRNA(100 nM)를 세포에 주입한 실험 결과치.

[0091] BHA: BHA 100 μM 농도로 TNF-알파를 처리 30 분전에 세포에 처리한 실험 결과치.

[0092] Cycloheximide(CHX)는 TNF-알파를 처리 30 분전에 10 μg/ml 농도로 세포에 처리하였다.

[0093] [표 2]

[0094]

시간	Control siRNA	Romo1 siRNA	BHA
0	1.0	1.0	1.0
15 분	1.2	1.2	1.3
30 분	1.3	1.3	1.4
1 시간	1.4	1.1	1.1
2 시간	2.1	1.2	1.2
4 시간	2.4	1.2	1.1
6 시간	2.8	1.2	0.8

[0095] 표 3은 HeLa 세포에서 Romo1 siRNA를 이용하여 Romo1 발현을 감소시켰을 경우 TNF-알파에 의하여 유도되는 세포 사멸이 차단된다는 것을 세포 계수(cell counting) 실험 기법을 이용하여 보여주는 결과이다. 표 3에서는 TNF-알파를 처리하지 않은 세포의 수를 1로 정하고 TNF-알파를 처리 후 시간에 따른 세포 수의 상대적 변화를 나타내었다. BHA는 항 산화제로서 양성대조군으로 사용되었다.

[0096] Control siRNA: 대조군(control siRNA 100 nM)을 세포에 주입한 실험 결과치.

[0097] Romo1 siRNA: Romo1 siRNA(100 nM)를 세포에 주입한 실험 결과치.

[0098] BHA: BHA 100 μM 농도로 TNF-알파를 처리 30 분전에 세포에 처리한 실험 결과치.

[0099] Cycloheximide(CHX)는 TNF-알파를 처리 30 분전에 10 μg/ml 농도로 세포에 처리하였다.

[0100] [표 3]

[0101]

시간	Control siRNA	Romo1 siRNA	BHA
0	1.00	1.00	1.00
3 시간	0.65	0.92	0.90
6 시간	0.29	0.63	0.68
9 시간	0.11	0.50	0.52

[0102] 도 1은 HEK 293 세포에서 TNF-알파를 처리하여 TNF-알파 신호를 주었을 경우 Romo1이 TNF-알파 신호전달경로에서 세포 사멸 신호를 전달하는 complex II 구성 단백질인 RIP, TRADD, TRAF2, FADD 단백질과 결합한다는 것을 웨스턴 불로팅(Western blotting) 실험 기법을 이용하여 보여 주는 결과도이다. Romo1에 Flag DNA를 연결한 Romo1-Flag 혼성 유전자를 세포에 주입한 후 Flag 항체를 이용하여 Romo1-Flag 단백질을 침전(immunoprecipitation)시켰다. TNF-알파 신호에 반응하여 Romo1과 결합하는 단백질을 확인하기 위하여 RIP, TRADD, TRAF2, FADD 항체를 이용하여 TNF-알파 처리 후 시간에 따른 웨스턴 불로팅을 수행하였다. Lystae는 침전하지 않고 세포 추출액을 웨스턴 불로팅을 수행한 결과도이다. β-actin은 웨스턴 블로팅에서 동일한 양의 단백질을 사용하였다는 것을 보여준다.

[0103] 도 2는 HEK 293 세포에서 TNF-알파를 처리하여 TNF-알파 신호를 주었을 경우 Romo1이 미토콘드리아 막 전압(mitochondrial membrane potential)을 안정화하는데 기능을 하는 Bcl-xL 단백질과 결합한다는 것을 보여준다는 것을 웨스턴 불로팅 실험 기법을 이용하여 보여 주는 결과도이다. Romo1에 Flag DNA를 연결한 Romo1-Flag 혼성 유전자를 세포에 주입한 후 Flag 항체를 이용하여 Romo1-Flag 단백질을 침전시켰다. TNF-알파 신호에 반응하여 Romo1과 Bcl-xL의 결합을 확인하기 위하여 Bcl-xL 항체를 이용하여 TNF-알파 처리 후 시간에 따른 웨스턴 불로팅을 수행하였다. Lystae는 침전하지 않고 세포 추출액을 웨스턴 불로팅을 수행하였다. β-actin은 웨스턴 블로팅에서 동일한 양의 단백질을 사용하였다는 것을 보여준다.

[0104] 도 3은 HeLa 세포에서 TNF-알파를 처리하여 TNF-알파 신호를 주었을 경우 Romo1이 미토콘드리아 막 전압을 낮추는 역할을 한다는 결과를 보여주는 결과도이다. 미토콘드리아 막 전압 계측은 미토콘드리아 막 전압 probe인 JC-1(5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) 5 μM을 세포에 처리한 다음 15분간 반응시킨 후 인산완충용액(PBS, phosphate-buffered saline)로 두 번 washing 한 다음 곧바로 flow cytometry로 그 값을 측정하였다. Romo1 siRNA(100 nM)를 이용하여 Romo1 발현을 감소시켰을 경우 TNF-알파에

의하여 유도되는 미토콘드리아 막 전압 감소가 차단되었다. 그렇지만 항 산화제인 BHA를 처리하였을 경우 TNF-알파에 의하여 유도되는 미토콘드리아 막 전압 감소를 차단하지 못하였다. Red JC-1 aggregates는 FL2 channel로 측정하고, green JC-1 monomers는 FL1 channel에서 측정하여 그 값을 red/green 비율로서 표시하였다. red/green 값 비율이 줄어들 경우 미토콘드리아 막 전압 감소를 의미한다.

도면의 간단한 설명

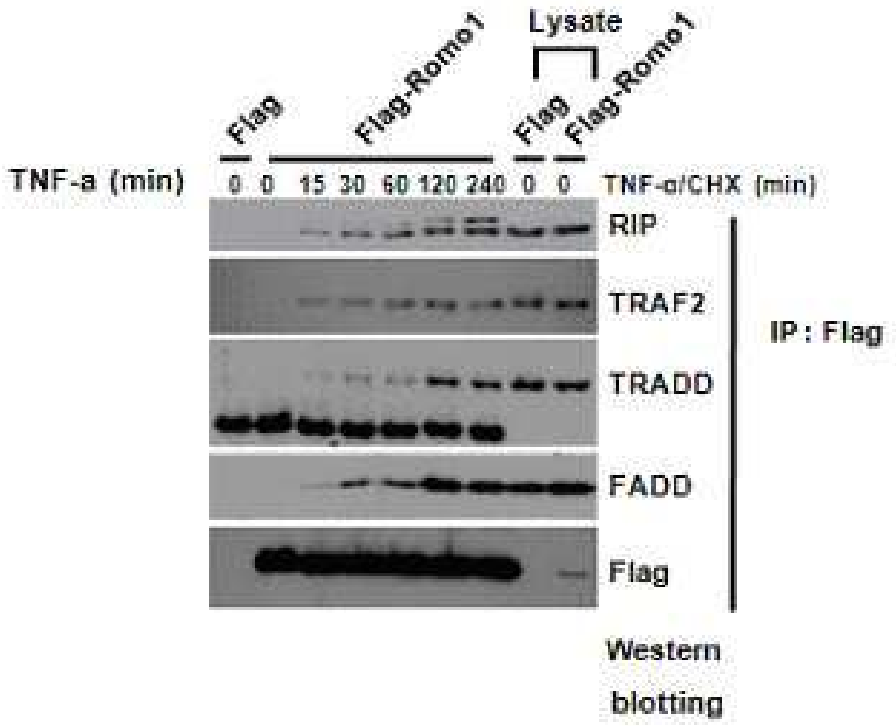
[0105] 도 1은 HEK 293 세포에서 TNF-알파를 처리하여 TNF-알파 신호를 주었을 경우 Romo1이 TNF-알파 신호전달경로에서 세포 사멸 신호를 전달하는 complex II 구성 단백질인 RIP, TRADD, TRAF2, FADD 단백질과 결합한다는 것을 웨스턴 불로팅(Western blotting) 실험 기법을 이용하여 보여 주는 결과도이다.

[0106] 도 2는 HEK 293 세포에서 TNF-알파를 처리하여 TNF-알파 신호를 주었을 경우 Romo1이 미토콘드리아 막 전압(mitochondrial membrane potential)을 안정화하는데 기능을 하는 Bcl-xL 단백질과의 결합이 증가한다는 것을 보여준다는 것을 웨스턴 불로팅 실험 기법을 이용하여 보여 주는 결과도이다.

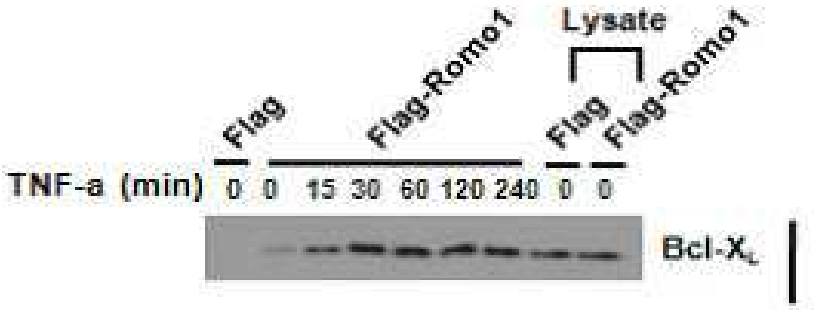
[0107] 도 3은 HeLa 세포에서 TNF-알파를 처리하여 TNF-알파 신호를 주었을 경우 Romo1이 미토콘드리아 막 전압을 낮추는 역할을 한다는 결과를 보여주는 결과도이다. Romo1 siRNA(100 nM)를 이용하여 Romo1 발현을 감소시켰을 경우 TNF-알파에 의하여 유도되는 미토콘드리아 막 전압 감소가 차단되었다.

도면

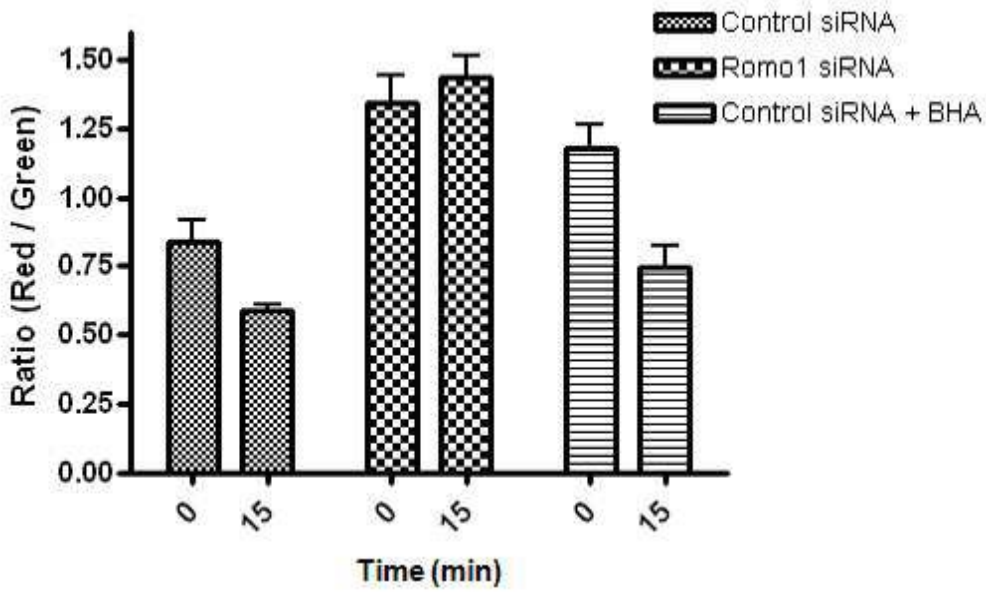
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> SCREENING METHOD OF THERAPEUTIC AND DIAGNOSTIC AGENTS FOR TNF-ALPHA-INDUCED DISEASES USING REACTIVE OXYGEN SPECIES MODULATOR 1

<130> HY090562

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 391
<212> DNA
<213> Unknown

<220>
<223> REACTIVE OXYGEN SPECIES MODULATOR 1

<400> 1
gagcgccctc cccgtcgttt tccgtgagag acgtagagct gagcgaccca gcccgcgagc 60

gaggtgagat gccggtggcc gtgggtccct acggacagtc ccagccaagc tgcttcgacc 120

gtgtcaaaat gggcttcgtg atgggttgcg ccgtgggcat ggcggccggg gcgctcttcg 180

gcacctttc ctgtctcagg atcggaatgc ggggtcgaga gctgatgggc ggcattggga 240

aaaccatgat gcagagtggc ggcacctttg gcacattcat ggccattggg atgggcatcc 300

gatgctaacc atggttgcca actacatctg tcccttccca tcaatcccag cccatgtact 360

aataaaagaa agtctttgag taaaaaaaaa a 391

<210> 2
<211> 79
<212> PRT
<213> Unknown

<220>
<223> PROTEIN of REACTIVE OXYGEN SPECIES MODULATOR 1

<400> 2
Met Pro Val Ala Val Gly Pro Tyr Gly Gln Ser Gln Pro Ser Cys Phe
1 5 10 15

Asp Arg Val Lys Met Gly Phe Val Met Gly Cys Ala Val Gly Met Ala
20 25 30

Ala Gly Ala Leu Phe Gly Thr Phe Ser Cys Leu Arg Ile Gly Met Arg

35 40 45

Gly Arg Glu Leu Met Gly Gly Ile Gly Lys Thr Met Met Gln Ser Gly
50 55 60

Gly Thr Phe Gly Thr Phe Met Ala Ile Gly Met Gly Ile Arg Cys
65 70 75