



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0023183
(43) 공개일자 2021년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 33/00 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 33/00 (2013.01)
C12N 9/1029 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0103028
(22) 출원일자 2019년08월22일
심사청구일자 2019년08월22일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
이상협
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 104동 201호(대치동, 대치삼성아파트)
김영천
서울특별시 광진구 동일로56길 52
최다은
서울특별시 노원구 성북로 265, 14동 1003호(중계동, 경남,롯데,상아아파트)
(74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **탈아세틸화용 조성물 및 이를 이용한 탈아세틸화 방법**

(57) 요약

본 발명은 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체의 탈아세틸화용 조성물 및 탈아세틸화 방법에 관한 것이다. 상기 단백질 및 이를 포함하는 조성물은 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체의 특정 탄소에 결합된 아세틸기를 특이적으로 제거할 수 있는바, 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015K2A2A2001928
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	한중협력연구사업
연구과제명	Citrullus 속 에서의 쿠쿠비테신 생합성 경로 규명
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2015.07.01 ~ 2017.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 포함하는, 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 탈아세틸화용 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 25번 탄소에 위치하는 아세틸기를 탈아세틸화 하는 것인 탈아세틸화용 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신은 쿠쿠르비타신 A, 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 C, 쿠쿠르비타신 E, 쿠쿠르비타신 L 또는 쿠쿠르비타신 Q 인 탈아세틸화용 조성물.

청구항 4

청구항 1의 단백질을 포함하는 조성물을 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 화합물 유도체와 반응시키는 단계를 포함하는 탈아세틸화 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 25번 탄소에 위치하는 아세틸기를 탈아세틸화 하는 것인 탈아세틸화 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신은 쿠쿠르비타신 A, 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 C, 쿠쿠르비타신 E, 쿠쿠르비타신 L 또는 쿠쿠르비타신 Q 인 탈아세틸화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체에 포함된 아세틸기를 제거할 수 있는 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 화학적인 방법으로 화합물에 결합된 아세틸기를 탈아세틸화 시키는 방법은, 화학 반응을 통해서 아세틸기를 제거하기 때문에 한 번의 화학 반응을 통해서 다양한 유도체가 합성되며, 특정 유도체만을 선택적으로 합성하기 어렵다. 이 경우, 원하는 유도체를 얻기 위해서 분리 및 정제 과정이 추가적으로 더 필요하며, 이로 인해 비용

과 공정 측면에서 문제점이 있다. 이러한 실정에서 화합물의 특정 위치에 아세틸기를 붙이거나 떼 수 있는 방법의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Zhou et al (2016) Convergence and divergence of bitterness biosynthesis and regulation in Cucurbitaceae. Nature Plants

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체의 탈아세틸화용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 조성물을 이용해 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체를 탈아세틸화 시키는 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 1. 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 포함하는, 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 탈아세틸화용 조성물.
- [0010] 2. 위 1에 있어서, 상기 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 25번 탄소에 위치하는 아세틸기를 탈아세틸화 하는 것인 탈아세틸화용 조성물.
- [0011] 3. 위 1에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신은 쿠쿠르비타신 A, 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 C, 쿠쿠르비타신 E, 쿠쿠르비타신 L 또는 쿠쿠르비타신 Q 인 탈아세틸화용 조성물.
- [0012] 4. 위 1의 단백질을 포함하는 조성물을 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 화합물 유도체와 반응시키는 단계를 포함하는 탈아세틸화 방법.
- [0013] 5. 위 4에 있어서, 상기 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 25번 탄소에 위치하는 아세틸기를 탈아세틸화 하는 것인 탈아세틸화 방법.
- [0014] 6. 위 4에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신은 쿠쿠르비타신 A, 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 C, 쿠쿠르비타신 E, 쿠쿠르비타신 L 또는 쿠쿠르비타신 Q 인 탈아세틸화 방법.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 단백질은 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체를 탈아세틸화 할 수 있는바, 이를 포함하는 조성물은 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체의 탈아세틸화용 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 ACT1을 이용한 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체의 탈아세틸화 경로를 나타낸다.
- 도 2는 시료 1의 표준품 및 시료 1의 HPLC 데이터를 나타낸다.

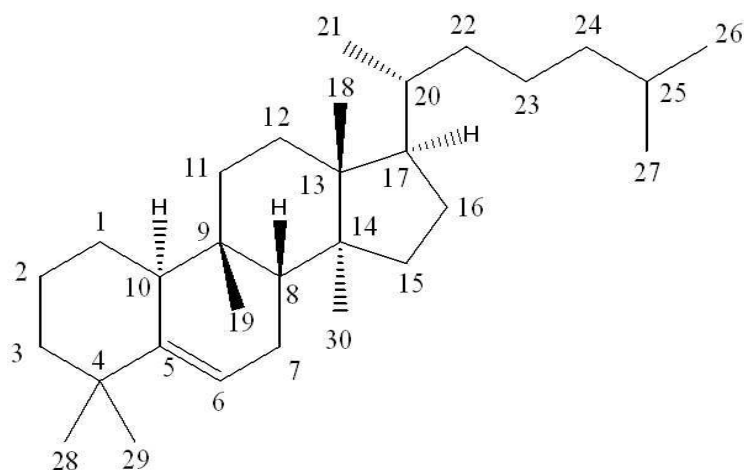
도 3은 시료 2의 표준품 및 시료 2의 HPLC 데이터를 나타낸다.
 도 4는 시료 3의 표준품 및 시료 3의 HPLC 데이터를 나타낸다.
 도 5는 시료 4의 표준품 및 시료 4의 HPLC 데이터를 나타낸다.
 도 6은 시료 5의 표준품 및 시료 5의 HPLC 데이터를 나타낸다.
 도 7은 시료 6의 표준품 및 시료 6의 HPLC 데이터를 나타낸다.
 도 8은 시료 7의 표준품 및 시료 7의 HPLC 데이터를 나타낸다.
 도 9는 시료 8의 표준품 및 시료 8의 HPLC 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 포함하는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체의 탈아세틸화용 조성물을 제공한다. 상기 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체는 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 화합물 일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.
- [0023] 서열번호 1의 아미노산 서열은 다음과 같다:
- [0024] MESALKVKI IHEENIKPSIPTPTQNHVKFSFLDQLALPVYVPLLLFYTPNHNPIPSKSHLLKSSLSKTLTLFYFPAGRVNDNLSISCTDQGAIIYVEAEAN
 SPLSNILTQLNVDLSLNLQLLPFPNASAHANKGCIVLIQTTFFPCGGITVGLLISHKIIDASSISSFVKTWTSIAISGNDLSLFPKPEFIGDSVLPAPKDFPVAT
 PTPDPSGIIHAKGVTKRIVFSASKIASLKAKAASTKVQPTRVEAVAGLLWKSASIAAKATSGISKASVLGQAVNLRKRLEPNLGDTSIGNSLGFVTPETAVA
 AEIDLQGTVGLLREAIEEFKESGYKKYQDTEAYLRHFKTLTDPDGPYSGEKNFYLCSSWSRFQFYEADFGWGLPVWF IGGISMFNSFFLLMDTRDGKGIEAL
 VTLSEEDMAVFQCDQDLLAFASFNPVNLQLQH(서열번호 1).
- [0025] 본 발명에 포함되는 단백질은 천연으로부터 유래될 수도 있고, 공지의 단백질 합성 방법을 이용하여 합성될 수도 있으며, 예를 들어, 유전공학적 방법 또는 화학적 합성 방법에 의해 합성될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 단백질은 전술한 아미노산 서열로 이루어진 단백질뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 본 발명의 변이체란, 본 발명의 아미노산 서열에서 적어도 하나의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환, 아미노산 유사체의 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 갖는 단백질을 의미한다. 경우에 따라서, 본 발명의 단백질은 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)된 것 일 수도 있다.
- [0027] 뿐만 아니라, 본 발명의 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 및 이들의 기능적 동등물을 포함한다.
- [0028] 용어 '기능적 동등물'이란, 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 80% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. '실질적으로 동질의 생리활성'이란 화합물을 아세틸화 및/또는 탈아세틸화 시키는 활성을 의미한다.
- [0029] 본 발명에 포함되는 단백질은 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 분자에 의해 암호화될 수 있다. 상기 핵산 분자 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA) 분자일 수 있다. 서열번호 2의 염기서열은 다음과 같다:
- [0030] ATGGAGTCAGCATTTGAAAGTAAAGATCATCCATGAGGAAAAACATCAACCTTCCATTCCAACGCCTCAAACCCAAAACCATGTGAAATTCTCCTTCTTAGAT
 CAACTAGCTTTGCGCTGTTTATGTTCATTACTTCTTTTCTACTCTCCCAACCAACCAATTCCTTCCAAATCCACCTTCTAAATCTTCATTATCCAAA
 ACTTTAACCTATTTTACCATTTGTCAGGTCGAGTTAACGATGACAATCTCTCCATTCTGTACTGACCAAGGCGCTATCTATGTGCAAGCTGAAGCCAAT
 TCCCCCTCTCTCCAATATTCTCACTCAACTCAACGTTGATTCCCTCAACCAACTCCTCCCTTTTCCCAACGCATCCGCCACGCTAACAAAGGCTGTATTGTG
 CTCATCCAAACTACGTTCTTTCCATGCGGTGGCATTACCGTTGGTTTACTCATTTTCGCACAAGATTGCCGACGCCTCCTCCATTAGTTCTTCGTCAAAC

TGGACTTCCATAGCCATTTCCGGAATGATTCTCTGTTTCCGAAACCAGAGTTCATTGGCGACTCTGTTTGC CGGCCCTAAGGATTTCCAGTTGCAACT
 CCAACAACCCAGATTTCAGGAATTCACGCAAAAGGCGTAACCAAGAGAATCGTTTTCTCCGCTTCCAAAATCGCTTCCCTCAAAGCTAAGGCTGCTAGTACA
 AAGGTAAAGCAACCGACACGTGTGGAAGCTGTAGCTGGTTGTTATGGAATCTGCCATATCTGCTGCCAAAGCAACGTCCGGGATTCAAAGGCGTCTGTG
 CTAGGCCAAGCCGTGAATCTACGGAAGATTGGAACCAACTTGGGCGATACATCCATCGGAATTCTCTCGGGTTCGTTACGCCGGAGACGGCGGTGCA
 GCGGAGATAGACCTGCAGGGAACAGTGGGGTGTGAGGGAAGCGATTGAAGAATTTAAGGAAAGTGGGTACAAGAAATATCAAGATACGGAGGCTTATTTG
 AGGCATTTTAAACTCTGACAGATCCAGATGGTCCGTACAGTGGGGAAGAATTTCTACTTGTGTAGTAGCTGGAGCAGATTCAATTTTATGAAGCGGAT
 TTTGGGTGGGATTGCCTGTTTGGTTTCATTGGAGGATTTCATGTTTTTCAATTTTCTTCTGCTGATGGATACAAGAGATGGAAGGGAATTGAAGCGTTG
 GTGACTTTGAGTGAAGAAGACATGGCTGTGTTCAATGTGATCAAGATTGCTTGCTTTCATTCAATCCCAATGTTCTTCAGCTCCAACACTAA
 (서열번호 2).

- [0031] 상기 핵산 분자의 서열은 이와 동등한 기능을 갖는 단백질을 암호화하는 한, 적어도 하나의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 또한, 상기 핵산 분자 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 상기 핵산 분자는 서열번호 2와 70 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 더 바람직하게는 90 % 이상, 가장 바람직하게는 95 % 이상의 서열 상동성을 갖는 염기 서열을 포함할 수 있다. 핵산 분자의 '서열 상동성의 %' 는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 핵산 분자 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열에 비해 추가 또는 삭제 즉, 겹(gap)을 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 상기 단백질을 암호화하는 핵산 분자 서열은 천연에서 분리되거나 인위적으로 합성 또는 유전적 재조합 방법을 통하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산 분자 서열은 수박 식물체로부터 유래된 것 일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 단백질은 상기 핵산 분자가 포함된 재조합 발현백터를 숙주세포에 형질전환 시켜 발현이 유도될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어, “재조합 발현백터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 백터로서, 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0035] 상기 숙주세포는 에스케리키아 콜라이(대장균, *Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)일 수 있으며, 진균, 효모, 사카로마이세스 세르비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 상기 에스케리키아 콜라이 균주로는 Rosetta2(DE3), C41(DE3), SoluBL21, BL21a1 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 포함하는 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 상기 단백질을 단독으로 포함하거나, 적어도 하나의 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 제공될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물은 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 화합물 유도체를 탈아세틸화 할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 쿠쿠르비타신 화합물 또는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체를 아세틸화 할 수 도 있다.
- [0039] 본 발명의 ‘화합물 유도체’는 특정 화합물을 모체로 하여 작용기의 도입, 산화, 환원, 원자의 치환 등 모체의 구조 등을 대폭 변화 시키지 않는 한도 내에서 변화된 화합물을 의미한다.
- [0040] 본 발명의 ‘쿠쿠르비타신 화합물 유도체’는 쿠쿠르비타신 화합물을 모체로 하여 작용기의 도입, 산화, 환원, 원자의 치환 등 모체의 구조 등을 대폭 변화 시키지 않는 한도 내에서 변화된 화합물을 의미한다.
- [0041] 쿠쿠르비타신 화합물은 하기 화학식 1의 구조를 백본(backbone)으로 포함하는 화합물로, 하기 화학식 1에 포함된 적어도 하나의 탄소들에 작용기 또는 치환기가 결합되어있을 수 있다:
- [0042] [화학식 1]



[0043]

[0044]

상기 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체는 적어도 하나의 아세틸기를 가질 수 있다.

[0045]

일 예로, 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체를 구성하는 적어도 하나의 탄소에 아세틸기가 결합되어있을 수 있다. 예를 들어, 상기 화학식 1 구조의 백본을 가지는 쿠쿠르비타신 화합물의 1번 탄소, 2번 탄소, 3번 탄소, 4번 탄소, 5번 탄소, 6번 탄소, 7번 탄소, 8번 탄소, 9번 탄소, 10번 탄소, 11번 탄소, 12번 탄소, 13번 탄소, 14번 탄소, 15번 탄소, 16번 탄소, 17번 탄소, 18번 탄소, 19번 탄소, 20번 탄소, 21번 탄소, 22번 탄소, 23번 탄소, 24번 탄소, 25번 탄소 및 26번 탄소 중 적어도 하나에 아세틸기가 결합되어있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0046]

다른 예로, 쿠쿠르비타신 화합물 또는 이의 유도체를 구성하는 적어도 하나의 탄소에 하이드록시기가 결합되어있을 수 있다. 예를 들어, 상기 화학식 1 구조의 백본을 가지는 쿠쿠르비타신 화합물의 1번 탄소, 2번 탄소, 3번 탄소, 4번 탄소, 5번 탄소, 6번 탄소, 7번 탄소, 8번 탄소, 9번 탄소, 10번 탄소, 11번 탄소, 12번 탄소, 13번 탄소, 14번 탄소, 15번 탄소, 16번 탄소, 17번 탄소, 18번 탄소, 19번 탄소, 20번 탄소, 21번 탄소, 22번 탄소, 23번 탄소, 24번 탄소, 25번 탄소 및 26번 탄소 중 적어도 하나에 하이드록시기가 결합되어있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0047]

상기 쿠쿠르비타신 화합물은 쿠쿠르비타신 A, 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 C, 쿠쿠르비타신 D, 쿠쿠르비타신 E, 쿠쿠르비타신 F, 쿠쿠르비타신 G, 쿠쿠르비타신 H, 쿠쿠르비타신 I, 쿠쿠르비타신 J, 쿠쿠르비타신 K, 쿠쿠르비타신 L, 쿠쿠르비타신 O, 쿠쿠르비타신 P, 쿠쿠르비타신 Q, 쿠쿠르비타신 R, 쿠쿠르비타신 S 또는 쿠쿠르비타신 T 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048]

본 발명 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물은 쿠쿠르비타신 A, 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 C, 쿠쿠르비타신 E, 쿠쿠르비타신 L 또는 쿠쿠르비타신 Q 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049]

적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체는 쿠쿠르비타신 A의 유도체, 쿠쿠르비타신 B의 유도체, 쿠쿠르비타신 C의 유도체, 쿠쿠르비타신 E의 유도체, 쿠쿠르비타신 L의 유도체 또는 쿠쿠르비타신 Q의 유도체 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0050]

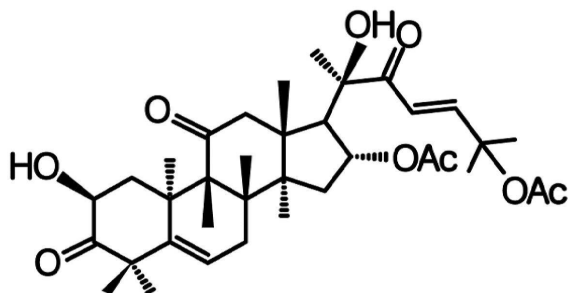
예를 들어, 쿠쿠르비타신 A의 유도체는 쿠쿠르비타신 A의 16번 탄소 자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물일 수 있다. 다른 예를 들어, 쿠쿠르비타신 B의 유도체는 쿠쿠르비타신 B의 16번 탄소 자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물일 수 있다. 또 다른 예를 들어, 쿠쿠르비타신 C의 유도체는 쿠쿠르비타신 C의 16번 탄소 자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물일 수 있다. 또 다른 예를 들어, 쿠쿠르비타신 E의 유도체는 쿠쿠르비타신 E의 16번 탄소자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물일 수 있다. 또 다른 예를 들어, 쿠쿠르비타신 L의 유도체는 쿠쿠르비타신 L의 16번 탄소자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물일 수 있다. 또 다른 예를 들어, 쿠쿠르비타신 Q의 유도체는 쿠쿠르비타신 Q의 16번 탄소자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물일 수 있다.

[0051]

구체적으로, 쿠쿠르비타신 B의 16번 탄소 자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물(이하, 쿠쿠르비타신 B-U)의 구조는 하기 화학식 2와 같다:

[0052]

[화학식 2]



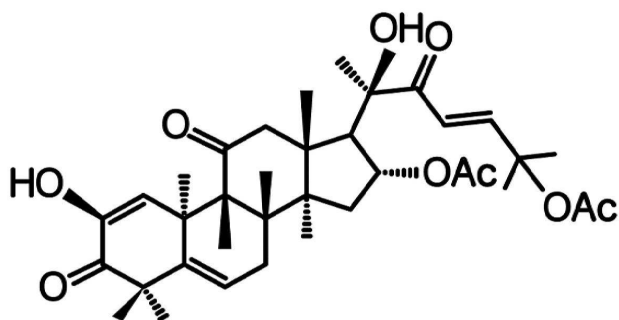
[0053]

[0054]

쿠쿠르비타신 E의 16번 탄소 자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물(이하, 쿠쿠르비타신 E-U)의 구조는 하기 화학식 3과 같다:

[0055]

[화학식 3]



[0056]

[0058]

본 발명의 단백질을 포함하는 조성물은 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체의 25번 탄소에 결합된 아세틸기를 특이적으로 탈아세틸화 할 수 있다.

[0059]

상기 조성물은 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물의 25번 탄소에 결합된 아세틸기를 특이적으로 탈아세틸화 할 수 있다.

[0060]

예를 들어, 상기 조성물은 쿠쿠르비타신 A의 25번 탄소에 결합된 아세틸기, 쿠쿠르비타신 B의 25번 탄소에 결합된 아세틸기, 쿠쿠르비타신 C의 25번 탄소에 결합된 아세틸기, 쿠쿠르비타신 E의 25번 탄소에 결합된 아세틸기, 쿠쿠르비타신 L의 25번 탄소에 결합된 아세틸기 또는 쿠쿠르비타신 Q의 25번 탄소에 결합된 아세틸기를 특이적으로 탈아세틸화 할 수 있다.

[0061]

상기 조성물은 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체의 25번 탄소에 결합된 아세틸기를 특이적으로 탈아세틸화 할 수 있다.

[0062]

예를 들어, 상기 조성물은 쿠쿠르비타신 B-U의 25번 탄소에 결합된 아세틸기 또는 쿠쿠르비타신 E-U의 25번 탄소에 결합된 아세틸기를 특이적으로 탈아세틸화 할 수 있다.

[0063]

도 1은 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물이 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체의 25번 탄소에 결합된 아세틸기를 특이적으로 탈아세틸화시키는 경로를 나타낸다. 이와 같이, 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물을 이용하면, 화학적인 방법으로 아세틸기를 제거하는 방법으로 유도체를 합성하는 경우와 달리, 원하는 위치에서 탈아세틸화된 생성물만 고효율로 합성할 수 있다는 장점이 있다. 즉, 원하는 화합물을 얻기 위해 분리 및 정제 과정을 거칠 필요가 없기 때문에 비용과 공정 측면에서 장점이 있다.

[0064]

또한, 본 발명의 조성물은 전술한 바와 같이 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체를 탈아세틸화 할 수 있을 뿐만 아니라, 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 쿠쿠르비타신 화합물 유도체의 25번 탄소에 결합된 하이드록시기 또는 25번 탄소를 특이적으로 아세틸화 할 수 있다.

[0065]

보다 구체적으로, 상기 조성물은 쿠쿠르비타신 화합물의 25번 탄소에 결합된 하이드록시기에 특이적으로 아세틸화할 수 있으며, 예를 들어, 상기 조성물은 쿠쿠르비타신 D의 25번 탄소에 결합된 하이드록시기 또는 쿠쿠르비타신 I의 25번 탄소에 결합된 하이드록시기를 특이적으로 아세틸화 할 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 조성물

은 쿠쿠르비타신 화합물 유도체의 25번 탄소에 결합된 하이드록시기에 특이적으로 아세틸화 할 수 있으며, 예를 들어, 상기 조성물은 쿠쿠르비타신 D-U의 25번 탄소에 결합된 하이드록시기 또는 쿠쿠르비타신 I-U의 25번 탄소에 결합된 하이드록시기를 특이적으로 아세틸화 할 수 있다.

[0066] 이와 같이, 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물을 이용하면, 화학적인 방법으로 아세틸기를 붙이는 방법으로 유도체를 합성하는 경우와 달리, 원하는 위치에서 아세틸화된 생성물만 고효율로 합성할 수 있다는 장점이 있다.

[0068] 나아가, 본 발명은 전술한 단백질을 또는 이를 포함하는 조성물을 이용하여 적어도 하나의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체의 탈아세틸화 방법을 제공한다.

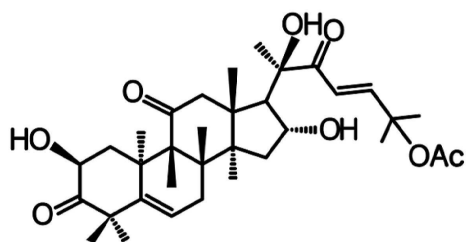
[0069] 예를 들어, 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체의 탈아세틸화 방법은, 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물을 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 또는 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체와 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.

[0070] 전술한 바와 같이, 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물은 쿠쿠르비타신 A, 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 C, 쿠쿠르비타신 E, 쿠쿠르비타신 L 또는 쿠쿠르비타신 Q 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 또한, 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체는 쿠쿠르비타신 A의 유도체, 쿠쿠르비타신 B의 유도체, 쿠쿠르비타신 C의 유도체, 쿠쿠르비타신 E의 유도체, 쿠쿠르비타신 L의 유도체 또는 쿠쿠르비타신 Q의 유도체 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0072] 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물은 쿠쿠르비타신 B일 수 있고, 그 구조는 하기 화학식 5와 같다:

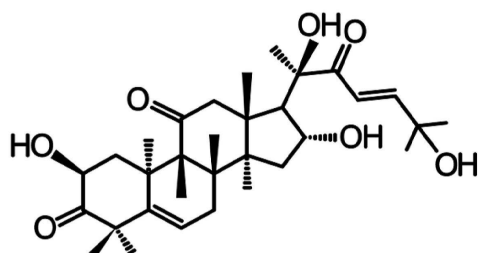
[0073] [화학식 5]



[0074]

[0075] 상기 반응을 통해 상기 쿠쿠르비타신 B가 탈아세틸화된 생성물의 구조는 하기 화학식 6과 같다:

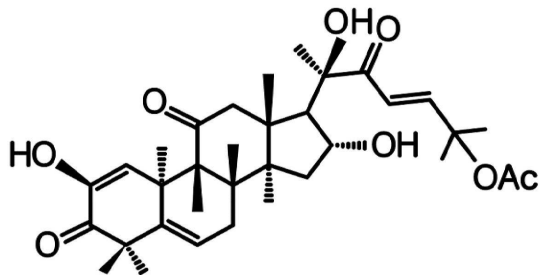
[0076] [화학식 6]



[0077]

[0079] 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물은 쿠쿠르비타신 E일 수 있고, 그 구조는 하기 화학식 7과 같다:

[0080] [화학식 7]



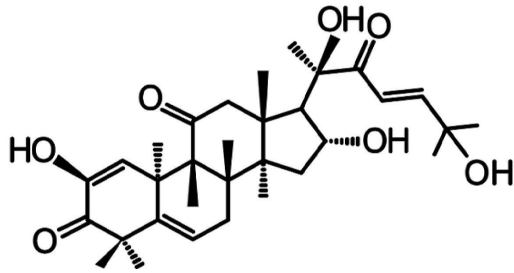
[0081]

[0082]

상기 반응을 통해 상기 쿠쿠르비타신 E가 탈아세틸화된 생성물의 구조는 하기 화학식 8과 같다:

[0083]

[화학식 8]



[0084]

[0086]

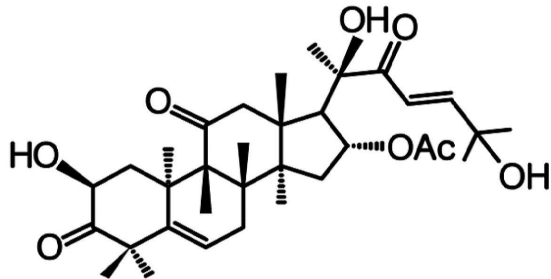
상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체는 쿠쿠르비타신 B-U일 수 있고, 그 구조는 상기 화학식 2와 같다.

[0087]

상기 반응을 통해 상기 쿠쿠르비타신 B-U가 탈아세틸화된 생성물의 구조는 하기 화학식 9와 같다:

[0088]

[화학식 9]



[0089]

[0091]

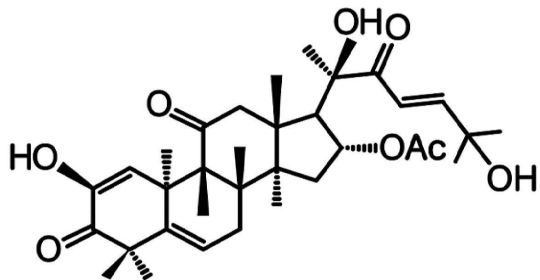
상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 유도체는 쿠쿠르비타신 E-U일 수 있고, 그 구조는 상기 화학식 3과 같다.

[0092]

상기 반응을 통해 상기 쿠쿠르비타신 E-U가 탈아세틸화된 생성물의 구조는 하기 화학식 10과 같다:

[0093]

[화학식 10]



[0094]

[0096] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[실시예]

[0099] **1. 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 재조합단백질 (아세틸전이효소 1; ACT1)의 생산**

[0100] 수박(citrullus spp.) 식물체로부터 total RNA를 추출하였고, oligo-dT prime 및 reverse transcription enzyme을 이용하여 complementary DNA(cDNA)를 제작하였다. 상기 제작된 cDNA를 주형(template)으로 하여 forward primer, reverse primer 및 pfu DNA polymerase를 이용해서 polymerase chain reaction(PCR)법으로 ACT1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭하였고, gel 전기영동법으로 상기 폴리뉴클레오타이드를 분리 및 정제하였다. 상기 forward primer의 서열은 서열번호 3(CAAATGGGTCGCGGATCCATGGGACGATGAATTAC)과 같고, 이는 ACT1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 개시코돈과 BamHI 제한효소 염기서열 (GGATCC)이 포함된 서열이다. 상기 reverse primer의 서열은 서열번호 4(GTGGTGGTGGTCTCGAGATTGGCACTTGGGTTCAA)와 같고, 이는 종결코돈이 제외되고 XhoI 제한효소 염기서열(CTCGAG)이 포함된 서열이다. 상기 정제된 ACT1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 infusion cloning법으로 pET28a(+) 재조합 발현벡터에 클로닝 하였다.

[0101] 상기 클로닝된 ACT1 재조합 발현벡터를 단백질 발현 *E. coli*인 BL21a1에 형질전환 시킨 후, LB(lysogeny broth) 배양액에서 1mM IPTG(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)로 16℃에서 180rpm으로 mixing 시켜 ACT1의 발현을 유도하였다.

[0102] ACT1이 유도된 배양액(2 리터)을 원심분리기를 이용하여 원심 분리하여 BL21a1 cell을 침전 시킨 후, 침전된 BL21a1 cell을 binding buffer(20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, pH7.4)에 현탁 시켰으며, sonicator를 이용하여 BL21a1 cell을 파쇄하였다. 파쇄된 BL21a1 cell을 원심분리하여 상층액을 회수한 후, Ni sepharose를 이용하여 His-tag된 ACT1을 분리하였고, binding buffer로 washing 후 Elution buffer(350~500mM imidazole, 20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, pH7.4)로 ACT1 용액을 회수 하였다.

[0103] 회수된 ACT1 용액을 30KDa cut off centricon을 이용하여 농축하였고, storage buffer(10% glycerol, 50mM sodium phosphate, 0.1M sodium citrate, pH 7.4)로 교환 후 -80℃에 보관 하여 사용하였다.

[0105] **2. ACT1 효소 반응**

[0106] 200 μ M의 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 또는 이의 유도체, 400 μ M의 acetyl-CoA(aceryl coenzyme A) 및 40 μ g의 ACT1을 효소반응 buffer(50mM sodium phosphate buffer, pH7.4)에 넣고 30℃에서 1시간 동안 효소 반응 시켰다.

[0107] 상기 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 또는 이의 유도체로 쿠쿠르비타신 B(이하, CuB), 쿠쿠르비타신 D(이하, CuD), 쿠쿠르비타신 E(이하, CuE), 쿠쿠르비타신 I(이하, CuI), 쿠쿠르비타신 B의 16번 탄소 자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물(이하, CuB-U), 쿠쿠르비타신 D의 16번 탄소 자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물(이하, CuD-U), 쿠쿠르비타신 E의 16번 탄소 자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물(이하, CuE-U) 및 쿠쿠르비타신 I의 16번 탄소 자리에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물 (이하, CuI-U)을 이용하였다.

[0108] 각 반응의 결과물을 100% etyl acetate로 분획 하였으며, 분획 용액을 centrifugal vacuum concentrator로 건조 시켰고, 각각을 120 μ l의 100% 메탄올에 녹여 분석용 시료로 사용하였다.

[0109] 각 기질(CuB, CuD, CuE, CuI, CuB-U, CuD-U, CuE-U, CuI-U)과 ACT1의 반응으로 얻어진 결과물로부터 얻어진 분석용 시료는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0110]

시료 1	시료 2	시료 3	시료 4
CuB+ACT1 효소반응 생성물	CuD+ACT1 효소반응 생성물	CuE+ACT1 효소반응 생성물	CuI+ACT1 효소반응 생성물
시료 5	시료 6	시료 7	시료 8

CuB-U+ACT1 효소반응 생성물	CuD-U+ACT1 효소반응 생 성물	CuE-U+ACT1 효소반응 생성물	CuI-U+ACT1 효소반응 생성물
------------------------	-------------------------	------------------------	------------------------

3. 효소 반응 결과물의 HPLC (high performance liquid chromatography) 분석

ACT1 효소 반응 결과를 확인하기 위해, HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하여 표 1의 각 시료를 분석하였다.

시료의 분석에 앞서, 각 시료의 표준품에 대한 retention time을 확인하였다. 상기 표준품은 각 시료의 기질로 사용된 물질이며, 구체적으로 시료 1의 표준품은 CuB, 시료 2의 표준품은 CuD, 시료 3의 표준품은 CuE, 시료 4의 표준품은 CuI, 시료 5의 표준품은 CuB-U, 시료 6의 표준품은 CuD-U, 시료 7의 표준품은 CuE-U, 시료 8의 표준품은 CuI-U 이다.

효소 반응 생성물 분석에 사용한 HPLC의 조건은 하기 표 2와 같다.

표 2

	조 건
장비	Pump, autosampler, UV detector(Shimadzu, Japan)
column	Synchronis C18, 250×4.6mm(Thermo Scientific, USA)
용매조건	A용매: 100% acetonitrile, 0.1% formic acid B용매: water, 0.1% formic acid Linear gradient: 30% A용매, 70% B용매(5min) 70% A용매, 30% B용매(20~30min) 30% A용매, 70% B용매(40~45min) Flow rate: 1ml/min
검출 파장	230nm

HPLC를 통해 시료 1 내지 시료 8을 각각 분석하였고, 각 시료의 표준품에 대한 retention time과 같은 peak 의 에, 다른 retention time의 peak가 검출되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 ACT1에 의해 효소 반응이 일어난 것 을 알 수 있었다.

각 시료의 표준품 및 시료에 대한 HPLC 결과는 도 2 내지 도 9에 나타나있다.

4. 효소 반응 결과물의 LC-MS(liquid chromatography-mass spectrometry) 분석

HPLC 분석에 따른 새롭게 검출된 물질의 분자량을 알아내기 위해 LC-MS 분석을 실시하였다.

효소 반응 생성물의 분자량 분석에 사용한 LC-MS의 조건은 하기 표 3과 같다.

표 3

	조 건
장 비	ACQUITY UPLC system, SYNAPT G2-Si HDMS (Waters)
Column	Waters Acquity BEH C18 1.7 μm (2.1 x 100mm) column temp.:40℃

용매조건	A용매: water, 0.1% formic acid B용매: 100% acetonitrile, 0.1% formic acid Linear gradient: 95% A용매, 5% B용매(initial) 95% A용매, 5% B용매(2.5min) 30% A용매, 70% B용매(5.0min) 30% A용매, 70% B용매(9.0min) 0% A용매, 100% B용매(9.5min) 0% A용매, 100% B용매(10.5min) 95% A용매, 5% B용매(11min) 95% A용매, 5% B용매(12min) Flow rate: 0.3ml/min
검출과장	230nm
질량분석 조건	Mode : ESI(-) Capillary voltage : 2 kV Source temp : 400 °C Sampling cone : 10 Desolvation Gas Flow (L/hr): 900.0

[0124] 하기 표 4는 각 시료의 표준품 및 효소 반응 생성물의 LS-MS 값을 나타낸다.

표 4

[0125]

	시료 1의 표준품 (CuB)	시료 2의 표준품 (CuD)	시료 3의 표준품 (CuE)	시료 4의 표준품 (CuI)
LC-MS 값	603.3170	561.3064	601.3013	559.2908
	시료 1 (CuD)	시료 2 (CuB)	시료 3 (CuI)	시료 4 (CuE)
LC-MS 값	561.3057	603.3229	559.2921	601.3026
	시료 5 표준품 (CuB-U)	시료 6의 표준품 (CuD-U)	시료 7의 표준품 (CuE-U)	시료 8의 표준품 (CuI-U)
LC-MS 값	645.3275	603.3170	643.3119	601.3013
	시료 5 (CuD-U)	시료 6 (CuB-U)	시료 7 (CuI-U)	시료 8 (CuE-U)
LC-MS 값	603.3169	645.3334	601.3020	643.3136

[0127]

LC-MS분석을 통해, 시료 1에 포함된 CuB+ACT1 효소반응 생성물은 CuB 가 탈아세틸화된 CuD(화학식 6의 구조)이고, 시료 2에 포함된 CuD+ACT1 효소반응 생성물은 CuD가 아세틸화된 CuB(화학식 5의 구조)이고, 시료 3에 포함된 CuE+ACT1 효소반응 생성물은 CuE가 탈아세틸화된 CuI(화학식 8의 구조)이며, 시료 4에 포함된 CuI+ACT1 효소반응 생성물은 CuI가 아세틸화된 CuE(화학식 7의 구조)이고, 시료 5에 포함된 CuB-U+ACT1 효소반응 생성물은 CuB-U가 탈아세틸화된 CuD-U(화학식 9의 구조)이고, 시료 6에 포함된 CuD-U+ACT1 효소반응 생성물은 CuD-U가 아세틸화된 CuB-U(화학식 2의 구조)이고, 시료 7에 포함된 CuE-U+ACT1 효소반응 생성물은 CuE-U가 탈아세틸화된 CuI-U(화학식 10의 구조)이며, 시료 8에 포함된 CuI-U+ACT1 효소반응 생성물은 CuI-U가 아세틸화된 CuE-U(화학식 3의 구조) 인 것이 확인되었다.

[0128]

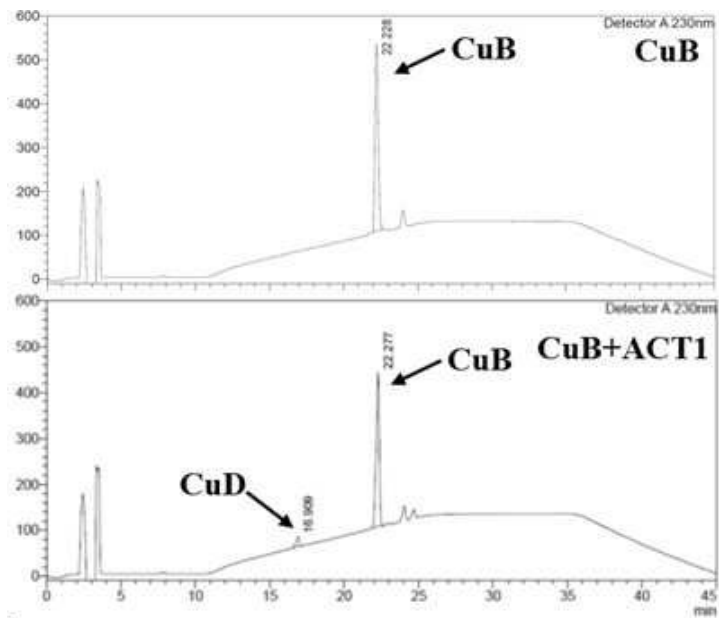
상기 분석 결과에 따라, 본 발명의 ACT1과 반응을 통해 아세틸기를 갖는 쿠쿠르비타신 화합물 및 이의 유도체의 25번 탄소에 결합된 아세틸기가 특이적으로 탈아세틸화 되거나, 쿠쿠르비타신 화합물 및 이의 유도체의 25번 탄소에 결합된 하이드록시기가 특이적으로 아세틸화 되는 것을 확인하였다.

도면

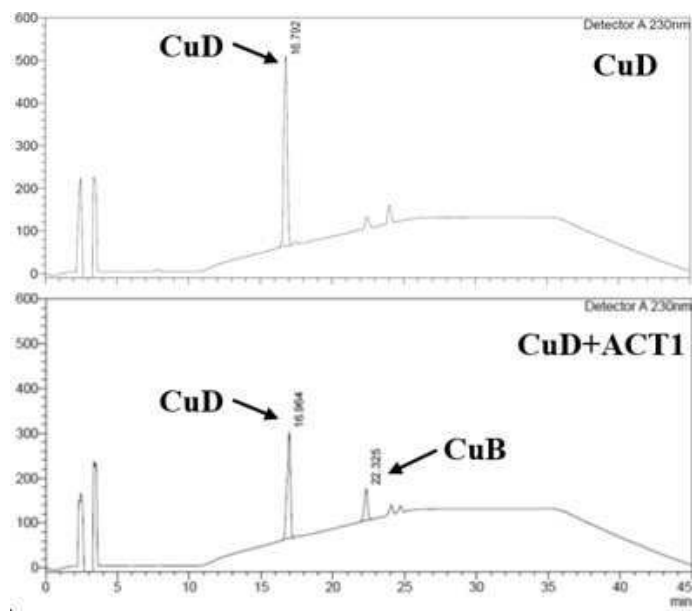
도면1

쿠쿠르비타신 D $\xleftarrow{\text{De-acetylation}}$ 쿠쿠르비타신 B	쿠쿠르비타신 I $\xleftarrow{\text{De-acetylation}}$ 쿠쿠르비타신 E
쿠쿠르비타신 D-U $\xleftarrow{\text{De-acetylation}}$ 쿠쿠르비타신 B-U	쿠쿠르비타신 I-U $\xleftarrow{\text{De-acetylation}}$ 쿠쿠르비타신 E-U

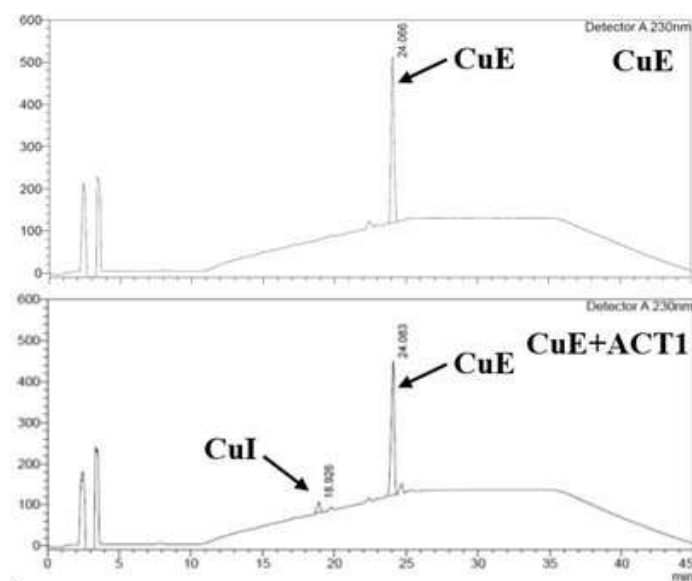
도면2



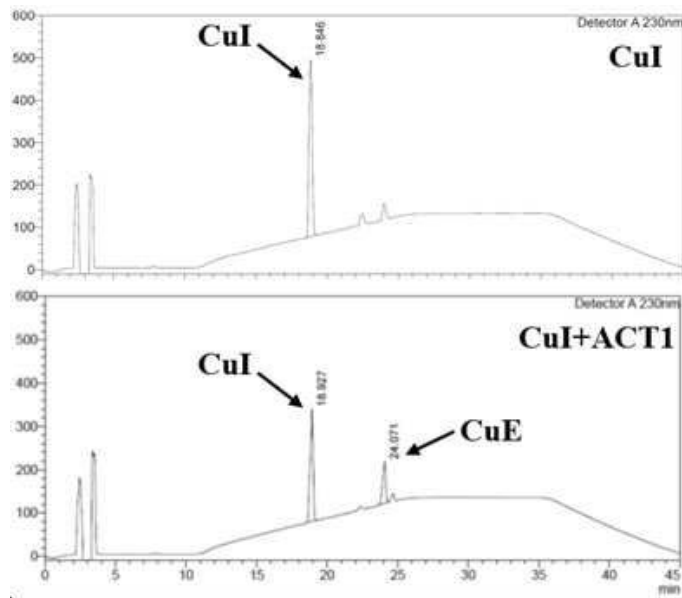
도면3



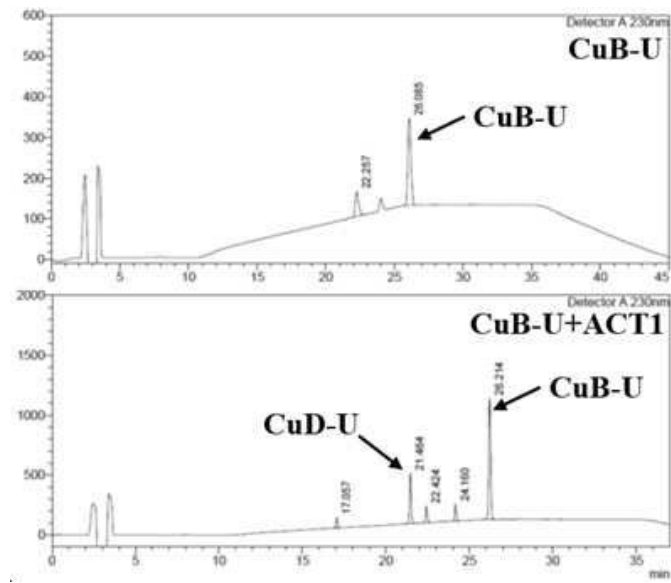
도면4



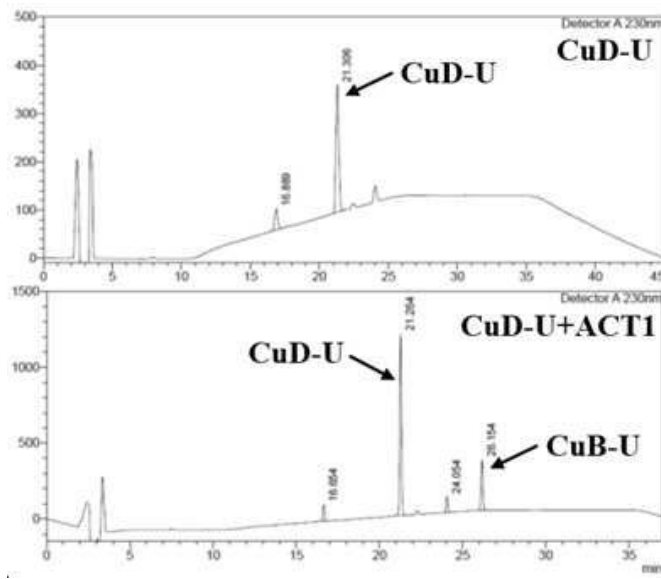
도면5



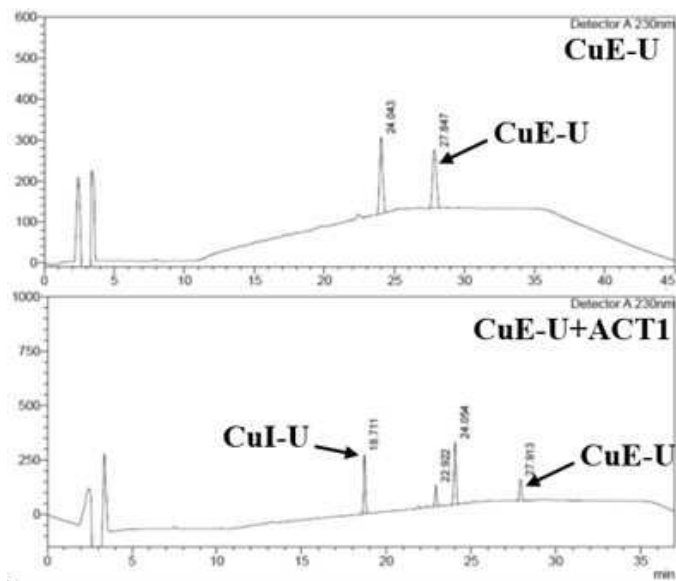
도면6



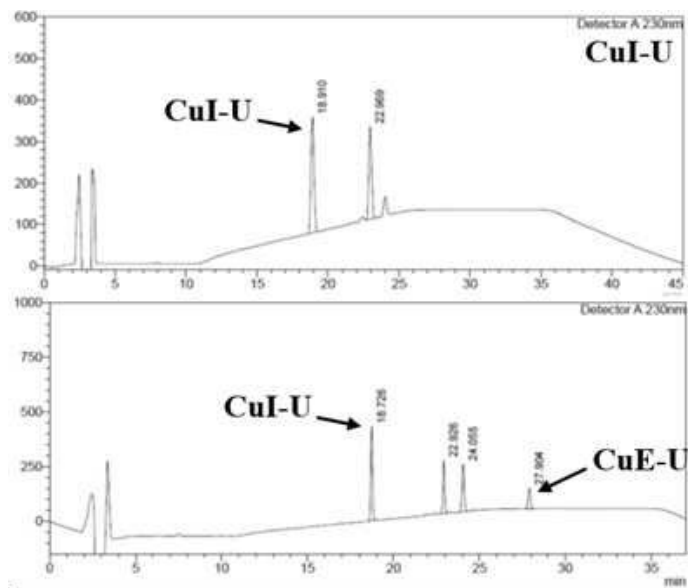
도면7



도면8



도면9



서열목록

<110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION

<120> Composition for deacetylation and method using the same

<130> 19P01031

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 440

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACT1

<400> 1

Met Glu Ser Ala Leu Lys Val Lys Ile Ile His Glu Glu Asn Ile Lys

1 5 10 15

Pro Ser Ile Pro Thr Pro Gln Thr Gln Asn His Val Lys Phe Ser Phe

20 25 30

Leu Asp Gln Leu Ala Leu Pro Val Tyr Val Pro Leu Leu Leu Phe Tyr

35 40 45

Thr Pro Asn His Asn Pro Ile Pro Ser Lys Ser His Leu Leu Lys Ser

50 55 60

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

65						70									75								80
Asn	Asp	Asp	Asn	Leu	Ser	Ile	Ser	Cys	Thr	Asp	Gln	Gly	Ala	Ile	Tyr								
					85									90								95	
Val	Glu	Ala	Glu	Ala	Asn	Ser	Pro	Leu	Ser	Asn	Ile	Leu	Thr	Gln	Leu								
					100									105								110	
Asn	Val	Asp	Ser	Leu	Asn	Gln	Leu	Leu	Pro	Phe	Pro	Asn	Ala	Ser	Ala								
					115									120								125	
His	Ala	Asn	Lys	Gly	Cys	Ile	Val	Leu	Ile	Gln	Thr	Thr	Phe	Phe	Pro								
					130									135								140	
Cys	Gly	Gly	Ile	Thr	Val	Gly	Leu	Leu	Ile	Ser	His	Lys	Ile	Ala	Asp								
					145									150								160	
Ala	Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Phe	Val	Lys	Thr	Trp	Thr	Ser	Ile	Ala	Ile								
					165									170								175	
Ser	Gly	Asn	Asp	Ser	Leu	Phe	Pro	Lys	Pro	Glu	Phe	Ile	Gly	Asp	Ser								
					180									185								190	
Val	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asp	Phe	Pro	Val	Ala	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro								
					195									200								205	
Asp	Ser	Gly	Ile	His	Ala	Lys	Gly	Val	Thr	Lys	Arg	Ile	Val	Phe	Ser								
					210									215								220	
Ala	Ser	Lys	Ile	Ala	Ser	Leu	Lys	Ala	Lys	Ala	Ala	Ser	Thr	Lys	Val								
					225									230								240	
Lys	Gln	Pro	Thr	Arg	Val	Glu	Ala	Val	Ala	Gly	Leu	Leu	Trp	Lys	Ser								
					245									250								255	
Ala	Ile	Ser	Ala	Ala	Lys	Ala	Thr	Ser	Gly	Ile	Ser	Lys	Ala	Ser	Val								
					260									265								270	
Leu	Gly	Gln	Ala	Val	Asn	Leu	Arg	Lys	Arg	Leu	Glu	Pro	Asn	Leu	Gly								
					275									280								285	
Asp	Thr	Ser	Ile	Gly	Asn	Ser	Leu	Gly	Phe	Val	Thr	Pro	Glu	Thr	Ala								
					290									295								300	
Val	Ala	Ala	Glu	Ile	Asp	Leu	Gln	Gly	Thr	Val	Gly	Leu	Leu	Arg	Glu								
					305									310								315	
																						320	

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

385 390 395 400
 Asp Gly Lys Gly Ile Glu Ala Leu Val Thr Leu Ser Glu Glu Asp Met
 405 410 415
 Ala Val Phe Gln Cys Asp Gln Asp Leu Leu Ala Phe Ala Ser Phe Asn
 420 425 430
 Pro Asn Val Leu Gln Leu Gln His
 435 440

<210> 2
 <211> 1323
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ACT1
 <400> 2

atggagtcag cattgaaagt aaagatcatc catgaggaaa acatcaaacc ttccattcca 60

 acgcctcaaa cccaaaacca tgtgaaattc tccttcttag atcaactagc ttgcctgtt 120
 tatgttccat tacttctttt ctacactccc aaccacaatc caattccttc caaatccac 180
 ctctctaaat cticattatc caaaacttta accctatfff acccatttgc aggtcgagtt 240
 aacgatgaca atctctccat ttcttgtact gaccaaggcg ctatctatgt cgaagctgaa 300
 gccaatccc ctctctccaa tattctcact caactcaacg ttgattccct caaccaactc 360
 ctcccttttc ccaacgcac cgcccacgct aacaaaggct gtattgtgct catccaaact 420
 acgttctttc catgcggtgg cattaccgtt gggtttactca ttctgcacaa gattgccgac 480

 gcctctccca ttagttcctt cgtcaaaacc tggacttcca tagccatttc cggaatgat 540
 tctctgtttc cgaaccaga gttcattggc gactctgttt tgccggcccc taaggatttc 600

ccagttgcaa ctccaacaac cccagattca ggaattcacg caaaaggcgt aaccaagaga 660
atcgttttct ccgcttccaa aatcgcttcc ctcaaagcta aggctgctag tacaaaggta 720
aagcaaccga cagtggtgga agctgtagct ggtttgttat ggaaatctgc catatctgct 780
gccaaagcaa cgiccgggat ttcaaaggcg tctgtgctag gccaaagccgt gaatctacgg 840
aaaagattgg aacccaactt gggcgataca tccatcggga attctctcgg gttcgttacg 900

ccggagacgg cggtggcagc ggagatagac ctgcagggaa cagtggggtt gttgagggaa 960
gcgattgaag aatttaagga aagtgggtac aagaaatata aagatacgga ggcttatttg 1020
aggcatttta aaactctgac agatccagat ggtccgtaca gtggggagaa gaatttctac 1080
ttgtgtagta gctggagcag atttcaattt tatgaagcgg attttgggtg gggattgcct 1140
gtttggttca ttggagggat ttcaatgttt tccaattttt tcttgctgat ggatacaaga 1200
gatggaagg gaattgaagc gttggtgact ttgagtgaag aagacatggc tgtgtttcaa 1260
tgtgatcaag atttgcttgc atttgcttca ttcaatccca atgttcttca gctccaacac 1320

taa 1323

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACT1_forward primer

<400> 3

caaatgggtc gcggatccat ggggacgatg aattac 36

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACT1_reverse primer

<400> 4

gtggtggtgg tgctcgagat tggcacttgg gttcaa 36