



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월10일

(11) 등록번호 10-1511394

(24) 등록일자 2015년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/43 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7017081

(22) 출원일자(국제) 2007년12월14일

심사청구일자 2012년12월14일

(85) 번역문제출일자 2009년08월17일

(65) 공개번호 10-2009-0112704

(43) 공개일자 2009년10월28일

(86) 국제출원번호 PCT/CH2007/000636

(87) 국제공개번호 WO 2008/086634

국제공개일자 2008년07월24일

(30) 우선권주장

60/880,981 2007년01월18일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2007147275 A1

(73) 특허권자

지보당 에스아

스위스 체하-1214 베르니에 슈맹 드 라 파르튀브리 5

(72) 발명자

슬랙 제이 패트릭

미국 오하이오주 45140 러브랜드 스톤브리지 드라이브 9925

(74) 대리인

제일특허법인, 장성구

전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 키메라 우마미 미각 수용체, 이를 코딩하는 핵산 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 우마미(umami) 미각자극 조절제의 스크리닝에 사용될 수 있는 신규 키메라 단백질, 상응하는 핵산 서열, 발현 벡터, 형질감염된 숙주 세포, 및 이들을 사용하여 우마미 미각 반응의 조절제 및 증강제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

명세서

청구범위

청구항 1

우마미(umami) 미각자극제(tastant), 우마미 미각자극 증강제 및 우마미 미각자극 억제제를 포함하는 우마미 미각자극 조절제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물에 결합할 수 있는 인간 칼슘-감지 수용체(hCaSR)-유래 단편(CSR)::T1R 키메라 단백질로서, 서열번호 2의 서열을 갖는 CSR::T1R1 폴리펩티드, 및 서열번호 4의 서열을 갖는 CSR::T1R3 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CSR::T1R을 포함하고, CSR::T1R1 동중체(homomeric) 키메라 단백질, CSR::T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질, CSR::T1R1/T1R3 이종이량체 키메라 단백질 및 T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질로 구성된 군으로부터 선택된 CSR::T1R 키메라 단백질.

청구항 2

제1항에 따른 CSR::T1R 키메라 단백질을 포함하는 이종이량체 단백질로서,

CSR::T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질, CSR::T1R1/T1R3 이종이량체 키메라 단백질 및 T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질로 구성된 군으로부터 선택되고, 이때 상기 이종이량체의 T1R1 서브유니트가 서열번호 8의 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 상기 이종이량체의 T1R3 서브유니트가 서열번호 10의 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함하는, 이종이량체 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서,

CSR::T1R1 동중체 키메라 단백질인, CSR::T1R 키메라 단백질.

청구항 4

제2항에 있어서,

CSR::T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질인, 두 폴리펩티드 서브유니트를 포함하는 CSR::T1R 키메라 단백질.

청구항 5

우마미 미각자극제, 우마미 미각자극 증강제 및 우마미 미각자극 억제제를 포함하는 우마미 미각자극 조절제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물에 결합할 수 있는 CSR::T1R1 키메라 단백질을 코딩하는 핵산으로서, 서열번호 1(CSR::T1R1)의 뉴클레오타이드 서열을 갖고, 상응하는 단백질의 C-말단을 형성하는 말단에서 또는 말단 근처에서 서열번호 6(허피스 심플렉스 바이러스(HSV) 태그)를 포함하거나 포함하지 않는 핵산.

청구항 6

제5항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 7

제6항의 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포.

청구항 8

제7항에 있어서,

제1항의 CSR::T1R 키메라 단백질 및 G-단백질을 안정하게 발현하는 숙주 세포.

청구항 9

제7항에 있어서,

제1항의 CSR::T1R 키메라 단백질을 일시적으로 발현하는 숙주 세포.

청구항 10

CSR::T1R 키메라 단백질을 코딩하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 발현에 충분한 조건 하에 배양하여 CSR::T1R 키메라 단백질을 형성하는 단계; 및

선택적으로, 상기 CSR::T1R 키메라 단백질을 상기 숙주 세포로부터 회수하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 CSR::T1R 키메라 단백질의 제조 방법.

청구항 11

(i) 우마미 미각 자극 및 칼슘 자극으로 구성된 군으로부터 선택된 자극에 반응하는 CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 세포와 시험 물질을 또 다른 물질의 존재 또는 부재 하에 접촉시켜 기능성 반응을 제공하는 단계; 및

(ii) 하나 이상의 시험 물질이 상기 세포에서 하나 이상의 기능성 반응을 통해 상기 세포 내의 상기 CSR::T1R 키메라 단백질의 기능성 반응에 영향을 미치는 지를 확인하는 단계

를 포함하고, 이때 상기 CSR::T1R 키메라 단백질이 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 CSR::T1R 키메라 단백질인, 미각 세포에서 우마미 미각 신호전달을 조절하는 물질의 동정 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

세포가 G-단백질도 발현하는, 제조 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

G-단백질이 Gαq-구스트딘신(Gαq-Gustducin)인, 제조 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

G-단백질이 키메라 G-단백질 Gα16-구스트딘신 44인, 제조 방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

단계 (ii)가 세포내 메신저의 변화 또는 세포내 메신저에 의한 변화를 측정함에 의해 수행되는, 동정 방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

기능성 반응이 이노시톨 트라이포스페이트(IP3) 및 칼슘 이온(Ca^{2+})으로 구성된 군으로부터 선택된 세포내 메신저의 변화를 측정함에 의해 확인되는, 제조 방법.

청구항 17

제11항에 있어서,

세포가 박테리아 세포, 진핵 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 포유동물 세포, 양서류 세포, 벌레 세포 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는, 동정 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

세포가 포유동물 세포인, 동정 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

세포가 CHO 세포, COS 세포, HeLa 세포 및 HEK-293 세포로 구성된 군으로부터 선택된 포유동물 세포인, 동정 방법.

청구항 20

제11항에 있어서,

단계 (i)가 CSR::T1R 키메라 단백질과 시험 물질을 칼슘의 존재 하에 접촉시킴을 추가로 포함하는 동정 방법.

청구항 21

제20항에 있어서,

칼슘이 염화칼슘의 형태로 제공되는, 동정 방법.

청구항 22

(i) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포; 및

(ii) CSR::T1R 키메라 단백질의 작용제

를 포함하는, CSR::T1R 키메라 단백질의 조절제인 시험 물질을 동정하기 위해 조합 사용되는 키트.

청구항 23

(i) CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포를 생장시키는 단계;

(ii) 시험 물질을 작용제의 존재 하에 적절한 농도로 첨가하는 단계; 및

(iii) 상기 시험 물질의 존재 하의 반응을 상기 시험 물질의 부재 하의 반응과 비교하여 상기 재조합 세포의 기능성 반응의 변화를 측정함으로써, CSR::T1R 키메라 단백질의 조절제인 시험 물질을 동정하는 단계

를 포함하는, 제22항의 키트를 사용하는 방법.

청구항 24

(i) CSR::T1R 키메라 단백질에 결합하는 리간드에 반응하여 변하는 파라미터를 측정하는 단계; 및

(ii) 시험 물질에 반응한 파라미터의 변화를 리간드의 존재 또는 부재 하에 음성 대조군과 비교하여 측정함으로써, 리간드를 포함하는 조절제를 동정하는 단계

를 포함하는, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 CSR::T1R 키메라 단백질을 조절하는 물질의 동정 방법.

청구항 25

제24항에 있어서,

리간드가 칼슘, 칼슘 이온 및 염화칼슘으로 구성된 군으로부터 선택되는, 동정 방법.

청구항 26

제24항에 있어서,

단계 (i)가 형광 분광법, NMR 분광법, 흡광도 및 굴절 지수 중 하나 이상의 측정, 유체역학적 방법, 크로마토그래피, 용해도의 측정 및 생화학적 방법으로 구성된 군으로부터 선택된 방법에 의해 수행되고, 상기 방법이 용액 상태, 이중층 막 상태, 고체 상(phase)에 부착되어 있는 상태, 지질 단일층 내에 있는 상태, 막 상에 결합되어 있는 상태 및 소포체 내에 있는 상태로 구성된 군으로부터 선택된 적절한 상태로 존재하는 CSR::T1R 키메라 단백질의 성질을 측정하는, 동정 방법.

청구항 27

제8항에 있어서,

G-단백질이 Gaq-구스트덕신인, 숙주 세포.

청구항 28

제9항에 있어서,

G-단백질이 Gaq-구스트덕신인, 숙주 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 뉴클레오티드 및 단백질, 이들을 함유하는 구축물 및 세포, 및 상기 뉴클레오티드, 단백질, 구축물 및 세포를 사용하는 방법을 제공한다.

배경 기술

[0002] 우마미(umami) 미각은 글루타메이트 염, 특히 모노나트륨 글루타메이트(MSG) 및 다른 아미노산 또는 이의 염에 의해 발생되며, 방향성 식품의 향 속성에 중요하다. 우마미 미각은 인간의 영양적 건강에 중요한, 음식물 중의 아미노산의 존재를 검출하는 데 중요하다. 그러나, 일반적인 인간 집단의 일부는 가공된 식품 중의 첨가된 MSG에 의해 악영향을 받을 수 있으므로 천연 비-MSG 또는 비-아미노산인 우마미 미각자극제(tastant)를 선호한다. 현재, 글루타메이트의 우마미 미각은 천연 발생 퓨린 뉴클레오티드, 이노신 모노포스페이트(IMP) 및 구아노신 모노포스페이트(GMP)의 첨가에 의해 상승될 수 있지만, 이들은 정제하기 어렵거나 생산 비용이 비싸므로, 이들의 광범위한 사용이 제한된다. 글루타메이트, IMP 또는 GMP에 대한 대체물질로서 사용될 수 있는 덜 비싼 우마미 미각자극 조절제, 특히 우마미 미각자극제 또는 이의 증강제가 상업적 식품 분야에서 유용할 것이다. 가격을 감소시킬 뿐만 아니라 건강에 대한 임의의 잠재적인 악영향을 최소화할 만큼 매우 낮은 농도로 사용될 수 있는 우마미 미각자극제 또는 이의 증강제가 특히 흥미롭다.

[0003] 우마미 미각자극제(우마미 수용체의 작용제), 우마미 미각자극 증강제 및 우마미 미각자극 억제제를 비롯한 우마미 미각자극 조절제에 대한 공지된 스크리닝은 야생형 T1R1/T1R3 이중이량체성 우마미 수용체를 사용한다. T1R1/T1R3 우마미 미각 수용체 이중이량체를 기초로 한 기능성 분석은 예를 들어, 미국 특허출원 공개 제 2004/0175793호에 기재되어 있다.

[0004] 그러나, 공지된 스크리닝의 단점은 야생형 T1R1/T1R3 수용체가 여러 결합 도메인, 특히 글루타메이트, MSG, 아미노산 및 잠재적인 다른 우마미 미각자극제에 결합하는 파리지옥(Venus Fly Trap: VFT) 도메인을 비롯한 세포 외 N-말단 도메인을 포함한다는 점이다. 따라서, 특정 리간드, 특히 T1R1 및/또는 T1R3의 경막 도메인("TMD")의 리간드(VFT 리간드 제외)의 특정 조절제(MSG를 포함하나 이로 한정되지 않음)에 대한 스크리닝은 공지된 스크리닝 방법으로 달성할 수 없다. 공지된 T1R1/T1R3 이중이량체의 사용은 글루타메이트와의 결합에 대해 경쟁할 수 있는 VFT에도 결합하는 물질의 동정을 가능하게 함으로써 추후에 식품 분야에서 우마미 미각자극 증강제로서 비효과적인 것으로 입증될 수 있는 물질이 동정되게 할 수 있다.

[0005] 따라서, 상기 문제점이 없는, 특히 수용체와의 결합에 대해 글루타메이트와 경쟁할 수 있는 물질이 동정되지 않고 VFT 도메인, 특히 TMD와 물리적으로 구별되는 부위에서 결합하는 우마미 수용체 조절제(작용제, 증강제 및 억제제를 포함함)를 동정할 수 있게 하는 대안적 스크리닝 방법이 필요하다.

[0006] 본 발명이 제공하는 스크리닝 방법 및 결합 분석은 상기 문제점이 없고 신규 인간 칼슘-감지 수용체(hCaSR)-유래 단편(CSR)::T1R 키메라 단백질의 사용을 통해 개선된 결과를 제공한다.

[0007] 또한, 본 명세서에 기재된 CSR::T1R 키메라 단백질은 수용체 활성화를 위한 리간드/작용제로서 우마미 미각자극제, 예컨대, 글루타메이트/MSG 대신에 칼슘의 사용을 가능하게 함으로써, MSG 결합 부위의 외부에 결합하는 조절제(작용제, 증강제 및 억제제를 포함함)의 동정을 가능하게 한다.

발명의 상세한 설명

발명의 개요

제1 측면에서, 우마미 미각자극제, 우마미 미각자극 증강제 및 우마미 미각자극 억제제를 포함하는 우마미 미각자극 조절제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물에 결합할 수 있고 90% 이상의 서열 동일성으로 서열번호 2와 실질적으로 상동성인 CSR::T1R1 폴리펩티드, 및 90% 이상의 서열 동일성으로 서열번호 4와 실질적으로 상동성인 CSR::T1R3 폴리펩티드로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 CSR::T1R을 포함하는 CSR::T1R 키메라 단백질을 제공한다.

이러한 CSR::T1R 키메라 단백질은 우마미 미각자극제, 우마미 미각자극 증강제 및 우마미 미각자극 억제제를 포함하는 우마미 미각자극 조절제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물에 결합할 수 있고 특히 CSR::T1R1 동중체(homomeric) 키메라 단백질, CSR::T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질, CSR::T1R1/T1R3 이종이량체 키메라 단백질 및 T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질이다.

또 다른 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 CSR::T1R 키메라 단백질을 포함하는 이종이량체 단백질로서, CSR::T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질, CSR::T1R1/T1R3 이종이량체 키메라 단백질 및 T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질로 구성된 군으로부터 선택되고, 이때 상기 이종이량체의 T1R1 서브유니트가 90% 이상의 서열 동일성으로 서열번호 8과 본질적으로 상동성인 폴리펩티드를 포함하고, 상기 이종이량체의 T1R3 서브유니트가 90% 이상의 서열 동일성으로 서열번호 10과 본질적으로 상동성인 폴리펩티드를 포함하는, 이종이량체 단백질을 제공한다.

또 다른 측면에서, CSR::T1R1 동중체 키메라 단백질인, 상기 정의된 바와 같은 CSR::T1R 키메라 단백질을 제공한다.

또 다른 측면에서, CSR::T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 키메라 단백질인, 상기 정의된 바와 같은 두 폴리펩티드 서브유니트를 포함하는 CSR::T1R 키메라 단백질을 제공한다.

또 다른 측면에서, 우마미 미각자극제, 우마미 미각자극 증강제 및 우마미 미각자극 억제제를 포함하는 우마미 미각자극 조절제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물에 결합할 수 있는 CSR::T1R 키메라 단백질을 코딩하고, 서열 동일성에 의한 측정 시 서열번호 1(CSR::T1R1) 및 서열번호 3(CSR::T1R3)으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 실질적으로 상동성인 핵산, 혼성화에 의한 측정 시 서열번호 1(CSR::T1R1) 및 서열번호 3(CSR::T1R3)으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 실질적으로 상동성인 핵산, 및 상기 정의된 바와 같은 CSR::T1R 키메라 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 실질적으로 상동성인 핵산 중 하나 이상의 핵산을 포함하는 핵산을 제공하는데, 이때 서열 동일성에 의한 측정 시 실질적으로 상동성인 핵산은 90% 이상의 서열 동일성을 나타내고, 혼성화에 의한 측정 시 실질적으로 상동성인 핵산은 42℃에서 50% 포름아마이드, 5xSSC 및 1% SDS로 구성된 용액 중에서 혼성화시키고 65℃에서 0.2xSSC 및 0.1% SDS로 구성된 용액 중에서 세척하는 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화시키고, 핵산은 상응하는 단백질에서 C-말단을 형성하는 말단에서 또는 말단 근처에서 서열번호 6(허피스 심플렉스 바이러스(HSV) 태그)을 포함하거나 포함하지 않는다.

또 다른 측면에서, 우마미 미각자극제, 우마미 미각자극 증강제 및 우마미 미각자극 억제제를 포함하는 우마미 미각자극 조절제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물에 결합할 수 있는 CSR::T1R1 키메라 단백질을 코딩하고, 서열 동일성에 의한 측정 시 서열번호 1(CSR::T1R1)의 뉴클레오타이드 서열과 실질적으로 상동성인 핵산, 혼성화에 의한 측정 시 서열번호 1(CSR::T1R1)의 뉴클레오타이드 서열과 실질적으로 상동성인 핵산, 및 청구 범위 제1항에 정의된 CSR::T1R1 키메라 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 실질적으로 상동성인 핵산 중 하나 이상의 핵산을 포함하는 핵산을 제공하는데, 이때 서열 동일성에 의한 측정 시 실질적으로 상동성인 핵산은 90% 이상의 서열 동일성을 나타내고, 혼성화에 의한 측정 시 실질적으로 상동성인 핵산은 42℃에서 50% 포름아마이드, 5xSSC 및 1% SDS로 구성된 용액 중에서 혼성화시키고 65℃에서 0.2xSSC 및 0.1% SDS로 구성된 용액 중에서 세척하는 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화시키고, 핵산은 상응하는 단백질에서 C-말단을 형성하는 말단에서 또는 말단 근처에서 서열번호 6(HSV 태그)을 포함하거나 포함하지 않는다.

또 다른 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

또 다른 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 발현 벡터로 형질감염된 숙주 세포를 제공한다.

또 다른 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 CSR::T1R 키메라 단백질 및 G-단백질(선택적으로, Gαq-구스트덕신(Gustducin)과 실질적으로 상동성인 G-단백질)을 안정하게 발현하는, 상기 정의된 바와 같은 숙주 세포를 제공한다.

한다.

- [0019] 또 다른 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 CSR::T1R 키메라 단백질 및 G-단백질(선택적으로, Gaq-구스트덕신과 실질적으로 상동성인 G-단백질)을 일시적으로 발현하는, 상기 정의된 바와 같은 숙주 세포를 제공한다.
- [0020] 또 다른 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 CSR:T1R 키메라 단백질의 제조 방법으로서, 상기 CSR:T1R 키메라 단백질을 코딩하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 발현에 충분한 조건 하에 배양하여 상기 CSR:T1R 키메라 단백질을 형성하는 단계, 및 선택적으로 상기 CSR::T1R 키메라 단백질을 상기 숙주 세포로부터 회수하는 단계를 포함하는 제조 방법을 제공한다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 미각 세포에서 우마미 미각 신호전달을 조절하는 물질의 동정 방법으로서,
- [0022] (i) 우마미 미각 자극 및 칼슘 자극으로 구성된 군으로부터 선택된 자극에 반응하는 CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 세포와 시험 물질을 또 다른 물질의 존재 또는 부재 하에 접촉시켜 기능성 반응을 제공하는 단계; 및
- [0023] (ii) 하나 이상의 시험 물질이 상기 세포 내에서 하나 이상의 기능성 반응을 통해 상기 세포 내의 상기 CSR::T1R 키메라 단백질의 기능성 반응에 영향을 미치는 지를 확인하는 단계
- [0024] 를 포함하는 동정 방법을 제공하는데, 이때 상기 CSR::T1R 키메라 단백질은 상기 정의된 바와 같다.
- [0025] 또 다른 측면에서, 세포가 G-단백질도 발현하는, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0026] 또 다른 측면에서, G-단백질이 Gaq-구스트덕신과 실질적으로 상동성인 키메라 G-단백질인, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0027] 또 다른 측면에서, G-단백질이 키메라 G-단백질 Ga16-구스트덕신 44인, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0028] 또 다른 측면에서, 단계 (ii)를, 세포내 메신저의 변화 또는 세포내 메신저에 의한 변화를 측정함으로써 수행하는, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0029] 또 다른 측면에서, 기능성 반응을, 이노시톨 트라이포스페이트(IP3) 및 칼슘 이온으로 구성된 군으로부터 선택된 세포내 메신저의 변화를 측정함으로써 확인하는, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0030] 또 다른 측면에서, 세포가 박테리아 세포, 진핵 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 포유동물 세포, 양서류 세포, 벌레 세포 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 세포가 포유동물 세포인, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 세포가 CHO 세포, COS 세포, HeLa 세포, HEK-293 세포 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0033] 또 다른 측면에서, 단계 (i)가 CSR::T1R 키메라 단백질과 시험 물질을 칼슘의 존재 하에 접촉시킴을 추가로 포함하는, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 칼슘이 염화칼슘의 형태로 제공되는, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0035] 또 다른 측면에서, CSR::T1R 키메라 단백질의 조절제인 시험 물질을 동정하기 위해 조합 사용되는 (i) 상기 정의된 바와 같은 CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포, 및 (ii) CSR::T1R 키메라 단백질의 작용제를 포함하는 키트를 제공한다.
- [0036] 또 다른 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 키트의 사용 방법으로서,
- [0037] (i) CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포를 생장시키는 단계;
- [0038] (ii) 시험 물질을 작용제의 존재 하에 적절한 농도로 첨가하는 단계; 및
- [0039] (iii) 시험 물질의 존재 하의 반응과 시험 물질의 부재 하의 반응을 비교하여 세포의 기능성 반응의 변화를 확인함으로써 상기 정의된 바와 같은 CSR::T1R 키메라 단백질의 조절제인 시험 물질을 동정하는 단계
- [0040] 를 포함하는 사용 방법을 제공한다.
- [0041] 시험 물질은 적절한 농도, 예를 들어, 약 1 nM 내지 100 mM 이상의 농도로 첨가될 수 있다.

- [0042] 또 다른 측면에서, 상기 정의된 바와 같은 CSR::T1R 키메라 단백질을 조절하는 물질의 동정 방법으로서,
- [0043] (i) CSR::T1R 키메라 단백질에 결합하는 리간드에 반응하여 변화하는 파라미터를 측정하는 단계; 및
- [0044] (ii) 시험 물질에 반응하는 파라미터의 변화를 리간드의 존재 또는 부재 하에 음성 대조군과 비교하여 측정함으로써 리간드를 포함하는 조절제를 동정하는 단계
- [0045] 를 포함하는 동정 방법을 제공한다.
- [0046] 또 다른 측면에서, 리간드가 칼슘, 칼슘 이온, 염화칼슘 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택되는, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0047] 또 다른 측면에서, 단계 (i)가 형광 분광법, NMR 분광법, 흡광도 및 굴절 지수 중 하나 이상의 측정, 유체역학적 방법, 크로마토그래피, 용해도의 측정, 및 생화학적 방법으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법에 의해 수행되고, 이때 상기 방법이 용액 상태, 이중층 막 상태, 고체 상에 부착되어 있는 상태, 지질 단일층 내에 있는 상태, 막에 결합되어 있는 상태 및 소포체 내에 있는 상태로 구성된 군으로부터 선택된 적절한 상태로 존재하는 CSR::T1R 키메라 단백질의 성질을 측정하는 방법인, 상기 정의된 바와 같은 동정 방법을 제공한다.
- [0048] **발명의 상세한 설명**
- [0049] 본원에서 사용된 용어 CSR::T1R 또는 CSR::T1R 키메라 단백질은 CSR::T1R1 동중체(즉, 임의의 T1R3의 부재); CSR::T1R1과 CSR::T1R3 또는 야생형 T1R3의 이종이량체성 결합체(CSR::T1R1/CSR::T1R3 또는 CSR::T1R1/T1R3); 또는 CSR::T1R3과 CSR::T1R1 또는 야생형 T1R1의 이종이량체성 결합체(CSR::T1R1/CSR::T1R3 또는 T1R1/CSR::T1R3)를 지칭한다.
- [0050] 보다 일반적으로, 수용체는 생체 내에서 및 많은 시험관내 방법에서 G-단백질에 커플링되기 때문에, CSR::T1R은 "G-단백질에 커플링된 수용체(GPCR)"로도 지칭된다.
- [0051] "동중체/동중체성"은 다른 서브유니트가 없는 관련 서브유니트, 즉 T1R3이 없는 T1R1, 또는 T1R1이 없는 T1R3을 의미하지만, 각 서브유니트는 아마도 동중체/동중-올리고머를 형성하는 것으로 생각되며, 이것은 상기 서브유니트가 예를 들어, 단량체로서 작용할 수 있는 경우로만 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 유사하게, "이종이량체"는 조합물 형태의 두 관련 서브유니트, 즉 임의의 형태의 T1R3과 T1R1의 조합물을 의미하지만, 실제 이종이량체가 형성될 수 있고, 이것은 예를 들어, 수용체가 결합체를 포함하는 이종-올리고머의 형태로 작용할 수 있는 경우로만 한정되는 것은 아니며, 상기 두 서브유니트는 한 카피보다 많은 카피수로 존재한다.
- [0053] 키메라 단백질은 종종 원하는 성질을 조합하거나 원치 않는 성질을 제거할 수 있는 둘 이상의 원단백질(original protein)로 구성된 연결된 단편이다. 3차원적 공간에서 단백질의 폴딩이 핵심적이고 아미노산의 위치가 폴딩에 영향을 미칠 것이기 때문에, 임의의 두 단편이 연결될 수 있는 것은 아니다. 핵심적인 도메인 및 아미노산이 공지되어 있다 하더라도, 성공적인 발현, 정확한 폴딩 및 원하는 성질의 온전한 기능성은 매우 예측 불가능하다. 예를 들어, 본 발명자들은 다양한 GABA::T1R 키메라 단백질 변이체가 작동하지 못함을 발견하였다.
- [0054] 신규 키메라 동중체 CSR::T1R1 및 CSR::T1R3은 기능성을 갖는 것으로 밝혀졌지만 기능성 반응을 제공하는 기능성 CSR::T1R1/CSR::T1R3 이종이량체를 형성할 수 있다.
- [0055] "기능성 반응"은 CSR::T1R이 (예를 들어, 보조 단백질을 통해) 조절제(예를 들어, 작용제, 길항제, 리간드, 증강제 또는 억제제)에 직접적으로 또는 간접적으로 결합할 수 있고 우마미 수용체에 대한 천연 세포 반응 또는 상기 반응의 시험관내 또는 생체내 대응 반응의 조절제에 의한 조절(예를 들어, 상기 리간드에 의한 활성화)을 보임을 의미한다. 물론, 이것은 이용된 방법에 달려 있을 것이다. 이것이 칼슘 신호의 변화인 예에서, 다른 방법에서 이것은 활성화된 맵(map) 카이네이즈 신호 또는 어레스틴(arrestin) 전위 또는 수용체 내부이입화(internalisation)일 것이다. 기능성 반응의 측정은 생리학적, 물리적 및 화학적 파라미터를 비롯한 파라미터의 임의의 변화의 측정을 포함한다. 측정될 수 있는 이러한 파라미터들은 선택된 방법에 달려 있을 것이고 예를 들어, 방사성, 형광성, 효소-활성, 이온 유동의 변화, 막 전위, 전류, 전사, 농도, 특히 제2 메신저 농도(예를 들어, cAMP, cGMP, IP3 또는 세포내 칼슘), 신경전달물질 또는 호르몬 방출의 변화를 포함한다. 기능성 반응은 당업자에게 공지된 임의의 적절한 수단, 예를 들어, 분광학적 특징(예컨대, 형광도, 흡광도, 굴절 지수)의 변화, 유체역학적(예를 들어, 형태), 크로마토그래피 또는 용해도, 패치 클램핑(patch clamping), 전압 감수성

안료, 전체 세포 전류, 방사성동위원소 유출, 유동성 마커 또는 난모세포 유전자 발현의 변화; 조직 배양 세포 유전자 발현; 유전자의 전사 활성; 리간드-결합 분석; 전압, 막 전위 및 전도성의 변화; 이온 유동 분석; 세포 내 제2 메신저, 예컨대, cAMP, cGMP 및 IP3의 변화; 세포내 칼슘 농도의 변화; 신경전달물질의 방출; 또는 입체 구조 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0056] 기능성 반응의 추가 예 및 기능성 반응을 측정하는 방법은 이하에 기재된 방법에 포함되어 있다.

[0057] 본 발명자들의 실험은 CSR::T1R1 동중체 서브유니트가 이중이량체를 형성하지 않고 그 자체로 기능성 우마미 수용체로서 작용할 수도 있음을 보여준다.

[0058] 예비 실험은 동중체성 CSR::T1R3 서브유니트가 일부 G-단백질을 참가시키고/시키거나 활성화시키는 데 있어서 곤란함을 가질 수 있지만, CSR::T1R3은 G-단백질을 활성화시키는 능력을 필요로 하지 않는 결합 분석에서 여전히 유용하다. 야생형 단백질과 함께 발현된 키메라 단백질을 포함하는 이중이량체(CSR::T1R1/T1R3 및 T1R1/CSR::T1R3)도 작용할 수 있다.

[0059] CSR::T1R1/CSR::T1R3 이중이량체의 경우, 상기 이중이량체의 CSR::T1R 서브유니트는 두 공급원 단백질로부터 유래된 서열을 포함한다. 상기 두 공급원 단백질은 hCaSR 및 T1R 단백질(T1R1 또는 T1R3)이다. 상기 두 서브유니트에 공동된 CSR은 hCaSR의 세포외 도메인(ECD)을 포함한다. T1R-유래의 단편은 T1R 서열의 경막 도메인(TMD)을 포함하고 T1R1 또는 T1R3으로부터 유래되었기 때문에 상이하다.

[0060] 본원에 기재된 CSR::T1R 키메라 단백질은 T1R1 또는 T1R3의 VFT 도메인 또는 T1R1 및 T1R3 둘다의 VFT 도메인을 보유하지 않으므로, T1R1 및/또는 T1R3의 TMD 도메인 및/또는 시스테인-풍부 도메인에 결합하는 화합물(우마미 미각자극제, 우마미 미각자극 증강제 및 우마미 미각자극 억제제를 포함하는 우마미 미각자극 조절제)을 특이적으로 동정할 수 있게 한다.

[0061] 이 우마미 미각자극 조절제들은 이들이 우마미 미각 수용체의 VFT 부위에 결합하는 것으로 생각되는 아미노산 또는 이의 염, 예컨대, MSG와 경쟁하는 화합물을 포함하지 않으므로 CSR::T1R을 사용한 스크리닝이 보다 흥미로운 잠재적인 상승작용적 화합물의 동정을 가능하게 하는 경향이 있기 때문에 특히 흥미롭다.

[0062] 본원에 의해 제공된 신규 키메라 CSR::T1R 구축물(DNA, 벡터, 형질감염된 세포, 단백질)은 우마미 미각 반응의 조절제(우마미 수용체 작용제, 우마미 미각자극 증강제 및 우마미 미각자극 억제제를 포함함)를 스크리닝할 때 제한 없이 유용하다. 종래 스크리닝 방법 및 결합 분석은 조절제 및 증강제에 대하여 신규 키메라 CSR::T1R 단백질을 스크리닝하는 데 이용될 수 있다. 이러한 스크리닝 방법은 당업계에 잘 공지되어 있고, 이하에 요약되어 있다. 우마미 미각자극제를 동정하기 위해, 본원에 기재된 CSR::T1R 수용체 단백질의 결합 및/또는 활성화와 관련된 신호를 후보 우마미 미각자극제의 존재 및 부재 하에 모니터링한다.

[0063] 우마미 미각자극 증강제 또는 억제제를 동정하거나 특징규명하기 위해, 통상적으로 잠재적 증강제/억제제를 갖는 샘플의 결과를 잠재적 증강제/억제제를 갖지 않는 샘플의 결과와 비교한다(상기 샘플 둘다가 칼슘, 글루타메이트, MSG 또는 또 다른 우마미 미각자극제, 예를 들어, 또 다른 아미노산(수용체에 결합하여 활성화킴) 중 하나 이상을 추가로 함유함).

[0064] 리간드, 예컨대, MSG 대신에 칼슘(예를 들어, 제한 없이 염화칼슘의 형태)의 사용은 (예를 들어, 높은 염으로 인한) 임의의 부정적 영향/오류 또는 실제 리간드/작용제(MSG)와 시험 화합물 사이의 경쟁을 피하는 추가 이점을 갖는다.

[0065] **분석에 사용되는 세포**

[0066] 형질감염된 또는 내재성 T1R3 및 T1R1은 CSR::T1R1 및/또는 CSR::T1R3의 작용제 반응, 또는 또 다른 조절제에 의존하는 상기 반응의 변화를 측정하는 방법을 부정적으로 방해할 수 있다. T1R3 및 T1R1의 부재는 관찰된 신호가 CSR::T1R1 및/또는 CSR::T1R3 활성화에 직접적으로 기인할 수 있도록 CSR::T1R1 및/또는 CSR::T1R3 활성화의 측정을 위한 널 배경(null background)을 제공한다. 이것은 CSR::T1R1 및/또는 CSR::T1R3을 특이적으로 조절하는 물질의 동정을 가능하게 하고 야생형 T1R1 및 T1R3을 활성화시키는 물질(T1R3의 경우 이 T1R3이 단맛 자극제 및 우마미 이중이량체 둘다의 일부이기 때문에 단맛 자극제도 포함할 수 있음)을 배제시킨다.

[0067] 내재성 야생형 T1R1 및/또는 T1R3의 존재는 바람직하지 않은 일부 배경 신호를 야기할 것이다. 내재성 T1R1 및/또는 T1R3을 갖는 세포는 충분히 낮은 배경으로 결과를 수득하는 데 여전히 유용할 수 있지만, 내재성 T1R1 및 T1R3 수용체를 함유하지 않는 세포를 선택하는 것이 더 바람직하다. 배경에 대한 악영향을 나타내지 않으면서 야생형 T1R3을 함유할 수 있는 CSR::T1R1/T1R3 키메라 단백질을 사용하는 경우, 또는 배경에 대한 악영향을 나

타내지 않으면서 야생형 T1R1을 함유할 수 있는 T1R1/CSR::T1R3 키메라 단백질을 사용하는 경우가 예외이다.

[0068] 하기 세포들이 특히 유용한데, 이는 하기 세포들이 내재성/야생형 T1R3 또는 내재성 야생형 T1R1을 함유하지 않기 때문이다. 그러나, 다른 대안적 세포도 본원에 기재된 방법에서 유용하다.

[0069] 적절한 진핵 세포는 진핵 세포, 예를 들어, 제한 없이 포유동물 세포, 효모 세포, 곤충 세포(Sf9를 포함함), 양서류 세포(멜라닌 세포를 포함함), 또는 케노르하브디티스(*Caenorhabditis*) 세포(케노르하브디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans*)를 포함함)를 포함하는 벌레 세포를 포함한다.

[0070] 적절한 포유동물 세포는 예를 들어, 제한 없이 COS 세포(COS-1 세포 및 COS-7 세포를 포함함), CHO 세포, HEK293 세포, HEK293T 세포, HEK293 T-RexTM 세포, 또는 다른 형질감염가능한 진핵 세포주를 포함한다.

[0071] 적절한 박테리아 세포는 제한 없이 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)를 포함한다.

[0072] 세포는 당업계에 잘 공지되어 있는 바와 같이 GPCR 및 G-단백질(수용체를 포스포리파제 C 신호 전달도입 경로에 연결시킴)로 일시적으로 또는 안정적으로 형질감염시킨다. 미각 GPCR에의 증강된 커플링을 제공하는 키메라 G 단백질 Gα16-구스트딘 44(G.서브. α.16구스트(딘)44, G.서브. α.16구스트(딘)44, Gα16구스트(딘)44, Ga16구스트(딘)44, Gα16-구스트딘 44 또는 이하에서 사용되는 바와 같이 "G16구스트44"로도 공지되어 있음)를 사용하는 훌륭한 이중 발현 시스템은 국제특허출원 공개 제2004/055048호에 상세히 기재되어 있다. 별법으로, 국제특허출원 공개 제2004/055048호에 기재된, Gaq-구스트딘을 기초로 한 다른 키메라 G-단백질 또는 다른 G-단백질, 예컨대, G16 또는 G15도 사용될 수 있다.

[0073] CSR::T1R은 수용체를 신호 전달도입 경로, 예를 들어, 포스포리파제 C 신호 전달도입 경로; 또는 예컨대, 아데닐레이트 사이클레이즈, 구아닐레이트 사이클레이즈, 포스포리파제 C, IP3, GTPase/GTP 결합, 아라키노이드산, cAMP/cGMP, 다이아실글리세롤(DAG), 단백질 카이네이즈 C(PKC), MAP 카이네이즈 티로신 카이네이즈 또는 ERK 카이네이즈를 포함하는 신호 전달도입 경로에 연결시키는 G-단백질을 사용하여 세포 내에서 발현시킬 수 있다.

[0074] 별법으로, 임의의 적절한 레포트 유전자는 이하에 더 상세히 기재되어 있는 바와 같이 CSR::T1R-활성화 반응성 프로모터에 연결되어 CSR::T1R 활성을 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0075] **전술된 세포에서 사용되는 벡터 구축물**

[0076] 상기 세포에서 GPCR 및/또는 G-단백질을 발현시키기 위한 벡터 구축물은 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 이용하여 그 자체로 공지된 방식으로 제조할 수 있다. 서열을 확인한 후, cDNA 단편을 적절한 벡터, 예를 들어, 포유동물 세포의 경우 pcDNA 3.1 포유동물 발현 벡터 내로 서브클로닝하고 상응하는 숙주 세포를 서브클로닝된 벡터로 일시적으로 형질감염시켜 유전자를 정확하게 발현시킬 수 있다.

[0077] 형질감염으로부터 일정 기간, 예컨대, 48시간이 경과된 후, 세포 용해물을 준비하고 웨스턴 블롯 분석으로 분석하여 단백질의 정확한 발현을 확인할 수 있다. 일단 정확한 단백질 발현이 확인되면, 적절한 세포, 예컨대, HEK293T 세포 및 HEK T-RexTM 세포를 비롯한 포유동물 세포를 당업계에 잘 공지되어 있는 기법에 따라 형질감염시켜 단백질을 안정하게 발현하는 세포를 발생시킬 수 있다.

[0078] 별법으로, GPCR 형태로 CSR::T1R을 코딩하는 서열을 함유하고 발현하는 다양한 비-포유동물 발현 벡터/숙주 시스템을 사용할 수 있다. 이 시스템은 예를 들어, 재조합 박테리오파지, 플라스미드 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질감염된 박테리아; 효모 발현 벡터로 형질감염된 효모; 또는 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바쿨로바이러스) 또는 박테리아 발현 벡터(예를 들어, pBR322 플라스미드)로 감염된 곤충 세포 시스템을 포함하는 미생물을 포함한다.

[0079] 전술한 시스템과 함께 사용될 수 있는 특정 벡터의 예는 문헌("G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)"; Editors: Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 1st ed., CRC Press - Boca Raton FL; September 1999)에 기재되어 있다.

[0080] 박테리아 시스템에서, 다수의 클로닝 및 발현 벡터가 GPCR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 목적하는 용도에 따라 선택될 수 있다. 예를 들어, GPCR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 관용적인 클로닝, 서브클로닝 및 증폭은 pBLUESCRIPT(스트라타진(미국 캘리포니아주 라 졸라 소재) 또는 pSPORT1 플라스미드(라이프 테크놀로지스)와 같은 다기능성 에스케리키아 콜라이 벡터를 사용하여 달성할 수 있다. GPCR을 코딩하는 서열을 벡터의 다중 클로닝 부위로 라이게이션하면 lacZ 유전자가 파괴되어, 재조합 분자를 함유하는 형질전환된 박테리아의 동종을 위한 비색 스크리닝 방법을 수행할 수 있다. 또한, 이 벡터들은 시험관내 전사, 디테옥시 시퀀싱,

헬퍼 파지를 사용한 단일 가닥 구조(rescue), 및 클로닝 서열의 네스티드(nested) 결실의 발생에 유용할 수 있다. 다량의 GPCR이 예를 들어, 항체의 제조를 위해 필요한 경우, GPCR의 고도 발현을 지시하는 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 강한 유도적 SP6 또는 T7 박테리오파지 프로모터를 함유하는 벡터가 사용될 수 있다.

[0081] 효모 발현 시스템은 GPCR의 제조를 위해 사용될 수 있다. 기본구성적 또는 유도적 프로모터, 예컨대, α 인자, 알코올 옥시데이즈, 및 PGH 프로모터를 함유하는 다수의 벡터가 효모 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 또는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서 사용될 수 있다. 또한, 이러한 벡터는 발현된 단백질의 분비 또는 세포내 보유를 지시하고 외래 서열이 안정하게 증폭되도록 숙주 게놈 내로 도입될 수 있게 한다.

[0082] 이중 단백질을 곤충 세포주에서 발현시키는 경우, 예를 들어, 레피도프테란(*Lepidopteran*) 바콜로바이러스 또는 오토그래프스 칼리포르니카(*Autographs californica*) 멀티캡시드 뉴클레오-바이러스(AcMNPV)의 유도체가 사용될 수 있다. 이 시스템에서, 외래 유전자 발현은 매우 강한 후기 바이러스 프로모터, 즉 폴리헤드린 프로모터 또는 p10 프로모터에 의해 지시되고, 재조합 단백질의 발현 및 회수를 최적화시키는 매우 다양한 벡터가 이용될 수 있다. 이 벡터는 막-결합된 단백질 및 분비된 단백질 둘다의 고도 발현뿐만 아니라, N- 및 O-결합 글리코실화, 인산화, 아실화, 단백질분해 및 백신 성분의 분비를 포함하는, 포유동물 시스템에서 일어나는 것으로 공지된 많은 번역 후 변형도 가능하게 한다. 다수의 벡터가 시판되는데, 예를 들어, 인비트로젠으로부터 InsectSelect™ 시스템이 시판된다.

[0083] **발현 시스템**

[0084] 원하는 단백질(GPCR(CSR::T1R) 및 G-단백질)을 코딩하는 cDNA를 발현시키기 위해, 전형적으로 적절한 cDNA를, 전사를 지시하는 강한 프로모터, 전사/번역 종결서열, 및 번역 개시를 위한 라이보솜-결합 부위를 함유하는 발현 벡터 내로 서브클로닝한다. 적절한 박테리아 프로모터, 예컨대, 에스케리키아 콜라이, 바실러스 종 및 살모넬라가 당업계에 잘 공지되어 있고, 이러한 발현 시스템에 대한 키트는 시판되고 있다. 유사하게, 포유동물 세포, 효모 세포 및 곤충 세포를 위한 진행 발현 시스템도 시판되고 있다. 진행 발현 벡터는 예를 들어, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 벡터 또는 레트로바이러스 벡터일 수 있다.

[0085] 발현 벡터는 프로모터 이외에 전형적으로 숙주 세포 내에서 단백질 코딩 핵산의 발현에 필요한 모든 부가적 요소들을 함유하는 전사 유니트 또는 발현 카세트를 함유한다. 따라서, 전형적인 발현 카세트는 전사체의 효율적인 폴리아데닐화에 필요한 신호 및 단백질을 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터, 라이보솜 결합 부위 및 번역 종결서열을 함유한다. 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 전형적으로 세포-표면 수용체로서 유용한 재조합 단백질의 효율적인 세포-표면 발현을 촉진하는 포유동물-표적화 신호, 예컨대, 랫트 소마토스타틴(Somatostatin)-3 수용체 서열에 연결될 수 있다. 추가 요소는 예를 들어, 인핸서를 포함할 수 있다.

[0086] 발현 카세트는 효율적인 종결을 제공하기 위해 구조 유전자의 다운스트림에 위치한 전사 종결 영역도 함유해야 한다. 상기 전사 종결 영역은 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 취득될 수 있거나 상이한 유전자로부터 취득될 수 있다.

[0087] 단백질을 발현시키기 위해, 당업계에 잘 공지되어 있는 진행 세포 또는 원핵 세포에서 발현되는 통상적인 벡터를 사용할 수 있다. 벡터의 예는 박테리아 발현 벡터, 예를 들어, pBR322-기재의 플라스미드, pSKF 및 pET23D를 포함하는 플라스미드 및 융합 발현 시스템, 예컨대, GST 및 LacZ를 포함한다.

[0088] 진행 바이러스로부터 유래된 조절 요소를 함유하는 발현 벡터는 전형적으로 진행 발현 벡터, 예를 들어, SV40 벡터, 사이토메갈로바이러스 벡터, 유두종 바이러스 벡터, 및 엡스테인-바 바이러스로부터 유래된 벡터 형태로 사용된다. 다른 예시적 진행 벡터는 pMSG; pAV009/A⁺; pMT010/A⁺; pMAMneo-5; 바콜로바이러스 pDSVE; pcDNA3.1; pIRES; 및 SV40 초기 프로모터, SV40 후기 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 류린 유선 종양 바이러스 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터 또는 진행 세포 내에서 발현에 효과적인 것으로 밝혀진 다른 프로모터의 지시 하에 단백질의 발현을 가능하게 하는 임의의 다른 벡터를 포함한다.

[0089] 이러한 발현 시스템은 유전자 증폭을 제공하는 마커, 예컨대, 티미딘 카이네이즈, 하이그로마이신 B 포스포트랜스퍼레이즈, 다이하이드로폴레이트 리덕타이즈 등을 갖는다.

[0090] 발현 벡터에 전형적으로 포함되는 요소는 에스케리키아 콜라이에서 작용하는 레플리콘(replicon), 재조합 플라스미드를 보유하는 박테리아의 선별을 가능하게 하는 약물 내성을 코딩하는 유전자, 및 진행 서열의 삽입을 가능하게 하는 플라스미드의 비-본질적 영역 내의 독특한 제한 부위를 포함할 수도 있다. 선택된 구체적인 약물

내성 유전자는 중요하지 않고, 당업계에 공지되어 있는 많은 약물 내성 유전자들 중 임의의 유전자가 적합하다. 선택적으로, 원핵 서열은 이 서열이 필요한 경우 진핵 세포 내에서 DNA의 복제를 방해하지 않도록 선택된다.

[0091] 박테리아 시스템에서 GPCR cDNA 단편은 단독으로 발현될 수 있거나 원하는 GPCR이 에스케리키아 콜라이 세포질 주위 공간 말토스-결합 단백질(MBP)에 융합되어 있는 융합 단백질로서 발현될 수 있고, 이때 그의 신호 펩티드를 포함하는 MBP는 GPCR의 N-말단에 연결되어 있다. 야생형 GPCR cDNA 또는 MBP:GPCR 융합 cDNA는 적절한 플라스미드, 예를 들어, pBR322 내로 서브클로닝되고, 이때 에스케리키아 콜라이 내에서의 GPCR 발현은 야생형 lac 프로모터에 의해 유도된다. 에스케리키아 콜라이 내에서 GPCR을 발현시키는 방법은 예를 들어, 문헌("G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)"; Editors: Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 1st ed., pp. 265-280 CRC Press - Boca Raton FL; September 1999)에 기재되어 있다.

[0092] 내재성 GPCR이 결여된 유전공학적으로 개조된 효모 시스템 및 곤충 세포 시스템은 CSR::T1R 활성화 스크리닝을 위한 널 배경이라는 이점을 제공한다.

[0093] 유전공학적으로 개조된 효모 시스템은 내재성 효모 페로몬 수용체 경로의 GPCR 및 Gα 단백질 대신에 인간 GPCR 및 Gα 단백질을 사용한다. 다운스트림 신호전달 경로도 신호에 대한 정상적인 효모 반응이 선별 배지 상의 양성 생장 또는 레포트 유전자 발현으로 전환되도록 변경된다(문헌(Broach, J. R. and J. Thorner (1996) Nature 384 (supp.):14-16)에 기재됨).

[0094] 유전공학적으로 개조된 곤충 시스템은 수용체 커플링 포스포리파제 C 신호전달 경로를 가능하게 하는 인간 GPCR 및 Gα 단백질을 도입한다(예를 들어, 문헌(Knight and Grigliatti, (2004) J Receptors and Signal Transduction 24: 241-256) 참조).

[0095] 양서류 세포 시스템, 특히 멜라닌 세포가 예를 들어, GPCR 발현 시스템을 개시하는 국제특허출원 공개 제WO 92/01810호에 기재되어 있다.

[0096] **CSR::T1R의 과다발현**

[0097] CSR::T1R은 이를 강한 기본구성적 프로모터, 예컨대, CMV 초기 프로모터의 조절 하에 둬으로써 과다발현시킬 수 있다. 별법으로, 보존된 GPCR 아미노산 또는 아미노산 도메인의 일부 돌연변이는 사용된 GPCR이 기본구성적으로 활성을 나타내도록 도입될 수 있다. 별법으로, 과다발현은 유도적 프로모터, 예컨대, 이하에 기재된 T-RexTM 발현 시스템의 조절 하에 달성될 수 있다.

[0098] **세포 내로의 CSR::T1R 발현 벡터 구축물의 형질감염**

[0099] 표준 형질감염 방법을 이용하여 다량의 단백질을 발현하는 박테리아, 포유동물, 효모 또는 곤충 세포주를 제조할 수 있다.

[0100] 뉴클레오티드 서열을 숙주 세포 내로 도입하기 위한 임의의 공지된 방법을 이용할 수 있다. 이용되는 구체적인 유전공학적 방법은 관련 유전자를 원하는 단백질을 발현할 수 있는 숙주 세포 내로 성공적으로 도입할 수 있지만 하면 족하다. 상기 방법은 클로닝된 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA 또는 다른 외래 유전 물질을 숙주 세포 내로 도입하는 단계를 수반할 수 있고 인산칼슘 형질감염, 폴리브렌(polybrene), 원형질체 융합, 전기천공, 리포솜, 미세주입, 플라스마 벡터, 바이러스 벡터 등의 사용을 포함할 수 있다.

[0101] 예를 들어, 제한 없이 T-RexTM 발현 시스템(인비트로젠 코퍼레이션(미국 캘리포니아주 칼스바드 소재))을 사용할 수 있다. T-RexTM 발현 시스템은 에스케리키아 콜라이 Tn10-코딩된 테트라사이클린(Tet) 내성 오페론으로부터 유래된 조절 요소를 사용하는, 테트라사이클린에 의해 조절되는 포유동물 발현 시스템이다. T-RexTM 발현 시스템에서의 테트라사이클린 조절은 테트라사이클린과 Tet 리프레서(repressor)의 결합 및 원하는 유전자의 프로모터 조절 발현의 탈억제(depression)를 기초로 한다.

[0102] **세포 배양**

[0103] 형질감염 후, 형질감염된 세포는 당업계에 잘 공지되어 있는 표준 배양 조건을 이용하여 배양할 수 있다. 세포마다 상이한 배양 조건(적절한 온도 및 세포 배양 배지를 포함함)을 요구함은 당업자에게 자명할 것이다.

[0104] **CSR:T1R 수용체 단백질 회수**

[0105] 원하는 경우, 표준 기법을 이용하여 세포 배양물로부터 단백질을 회수할 수 있다. 예를 들어, 침전 및 크로마토그래피 단계를 수행하기 전에 세포를 기계적으로 파괴시키거나 삼투압 쇼크를 인가하여 파괴시킬 수 있고, 이

의 성질 및 순서는 회수될 구체적인 재조합 물질에 달려 있을 것이다.

- [0106] 별법으로, 재조합 단백질을 재조합 세포가 배양된 배양 배지로부터 회수할 수 있다.
- [0107] **분석에 의해 동정될 수 있는 조절제**
- [0108] CSR::T1R 수용체 활성의 조절제(리간드, 작용제, 부분 작용제, 길항제, 역 작용제, 억제제 및 증강제를 비롯한 다양한 종류의 조절제)는 이하에 기재된 바와 같이 동정될 수 있다.
- [0109] 조절제의 종류는 한번에 한 가지 이상의 종류를 포함할 수 있고, 농도에 의존할 수 있다. 예를 들어, 물질은 일부 농도 범위 내에서 작용제로서 작용할 수 있지만, 또 다른 농도 범위 내에서는 또 다른 작용제(예를 들어, 우마미 미각자극제)의 조절제 또는 증강제로서 작용할 수 있다. 따라서, 물질은 이것이 조절제인지를 확인하기 위해 다양한 농도에서 시험되어야 한다.
- [0110] 본원에 기재된 방법에서 동정될 물질의 정의는 이하에 기재된다.
- [0111] 조절제는 수용체의 세포 표면 발현, 리간드와 수용체의 결합, 및 수용체의 활성 형태에 의해 개시되는 세포내 반응(작용제의 존재의 반응 또는 작용제의 부재 하의 반응) 중 하나 이상의 증가 또는 감소에 영향을 미치는 물질이다. 조절제는 그 자체로 수용체에 결합하여 수용체를 활성화시킴으로써 세포 반응의 증가를 조절하는 작용제일 수 있다.
- [0112] 조절제는 소분자, 펩티드, 단백질, 핵산, 항체 또는 이의 단편을 포함하는 다양한 종류의 화합물을 포함한다. 이들은 천연 또는 합성 물질, 및 예를 들어, 동물, 포유동물, 곤충, 식물, 박테리아 진균 세포 물질 또는 배양된 세포, 또는 이러한 세포의 배양 배지로부터 유래된 천연 물질의 추출물을 포함하는 다양한 공급원으로부터 유래될 수 있다.
- [0113] 리간드는 수용체에 결합하는 물질이고, 작용제, 부분 작용제, 증강제, 길항제 또는 역 작용제일 수 있다.
- [0114] 작용제는 수용체를 활성화시키고 수용체에 결합하였을 때 작용제의 부재 하의 세포내 반응에 비해 세포내 반응을 증가시키는 CSR::T1R 키메라 단백질 수용체의 리간드이다. 추가로 또는 별법으로, 작용제는 수용체의 세포 표면 발현이 작용제의 부재 하에 세포 표면에 존재하는 세포 표면 수용체의 수에 비해 증가하도록 세포 표면 수용체의 내부이입화를 감소시킬 수 있다. CSR::T1R의 작용제는 예를 들어, 칼슘 및 N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)옥살아마이드를 포함한다.
- [0115] CSR::T1R 키메라 단백질의 리간드는 두 가지 종류, 즉 상기 키메라 단백질의 CSR 부분에 결합하는 CSR-도메인-리간드(칼슘)와, 키메라 단백질의 T1R-부분에 결합하는 T1R-도메인 리간드(우마미 미각 반응의 조절제)로 분류될 수 있다.
- [0116] 부분 작용제는 수용체를 최대로 활성화시키는 다른 작용제에 비해 수용체를 부분적으로만 활성화시키는 작용제이다.
- [0117] 길항제는 작용제와 동일한 부위(경쟁적 길항제) 또는 상이한 부위(알로스테릭 길항제)에서 수용체에 결합하지만 수용체의 활성 형태에 의해 개시되는 세포내 반응을 활성화시키지 않음으로써 작용제의 존재 및 길항제의 부재 하의 세포내 반응에 비해 작용제에 의해 유도되는 세포내 반응을 억제하는 리간드이다.
- [0118] 수용체에 결합하는 역 작용제는 역 작용제의 부재 하의 세포내 반응에 비해 수용체에 의해 매개되는 기본구성적 세포내 반응을 감소시킨다.
- [0119] 억제제는 억제제의 부재 하의 작용제의 결합에 비해 수용체와 작용제의 결합을 감소시키고/시키거나 작용제에 의해 유도되는 세포내 반응을 감소시킨다.
- [0120] 증강제는 증강제의 부재 하의 작용제의 결합에 비해 수용체와 작용제의 결합을 증가시키고/시키거나 작용제에 의해 유도되는 세포내 반응을 증가시킨다.
- [0121] 수용체 결합 리간드의 활성 또는 활성 변화, 및 예를 들어, G-단백질을 통한(즉, 조절제와의 상이한 상호작용으로 인한) 신호전달은 하기 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0122] **CSR::T1R 수용체의 조절제를 동정하기 위한 분석**
- [0123] 기능성 효과/파라미터를 측정하고 비교하기 위한 매우 다양한 시험관내 및 생체내 분석 또는 결합 분석을 이용하여 조절제를 동정할 수 있다. 수용체의 기능에 대한 시험 물질의 효과는 적절한 기능성 파라미터를 조사하여

측정할 수 있다. 수용체 활성화에 영향을 미치는 임의의 생리학적 변화를 이용하여 조절제를 동정할 수 있다.

[0124] 이러한 기능 분석, 예컨대, 제2 메신저(예를 들어, 세포내 칼슘(칼슘 이온), cAMP, cGMP, IP3, DAG, 아라키노이드산, MAP 카이네이즈 또는 티로신 카이네이즈를 포함함)의 농도 또는 활성화, 또는 이들의 변화, 이온 유동, 산화 농도, 전사 농도, 또는 신경전달물질의 농도의 측정을 기초로 한, 동물로부터 단리된 무손상 세포 또는 조직을 사용한 분석; 및 GTP-결합, GTPase, 아데닐레이트 사이클레이즈, 인지질-분해, 다이아실글리세롤, IP3, 아라키돈산 방출, PKC, 카이네이즈 및 전사 레포터를 기초로 한 분석이 당업계에 잘 공지되어 있다. 일부 적절한 분석은 예를 들어, 국제특허출원 공개 제WO 2001/18050호에 기재되어 있다.

[0125] 수용체 활성화는 전형적으로 후속 세포내 이벤트, 예를 들어, 제2 메신저, 예컨대, 칼슘 이온의 세포내 축적물을 방출시키는 IP3의 증가를 개시한다. 일부 G-단백질에 커플링된 수용체의 활성화는 포스포티로시노시톨의 포스포리파제 C-매개 가수분해를 통해 IP3의 형성을 자극한다. 그 다음, IP3은 세포내 칼슘 이온 축적물의 방출을 자극한다. 따라서, 세포질 칼슘 이온 농도의 변화 또는 제2 메신저, 예컨대, IP3 농도의 변화를 이용하여 G-단백질 커플링된 수용체 활성을 측정할 수 있다.

[0126] 모든 기능 분석은 표면 또는 단리된 세포막 분획 상에 수용체를 발현하는 세포를 함유하는 샘플에 의해 수행될 수 있다. 유용한 세포는 전술되어 있다. 분리된 세포 또는 세포 막을 갖는 샘플 대신에 형질전환 동물을 사용할 수 있다.

[0127] 본원에 기재된 스크리닝 방법은 우마미 미각 반응의 조절제, 특히 우마미 미각자극 증강제를 동정하는 데 특히 유용하다.

[0128] 그 자체가 작용제가 아닌 조절제(예를 들어, 길항제, 부분 작용제, 역작용제, 억제제 또는 증강제)를 동정하기 위해, 작용제 및 시험 물질을 함유하는 샘플과 작용제를 함유하지 시험 물질을 함유하지 않는 샘플을 비교한다. 작용제로는 예를 들어, 칼슘을 사용할 수 있다. 칼슘의 사용은 두 TMD가 모두 접근가능하다는 이점을 갖는다. 다른 공지된 작용제 또는 동정된 작용제, 예를 들어, N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드도 사용될 수 있지만, 상기 다른 공지된 작용제 또는 동정된 작용제는 동정될 조절제의 조절제 결합 부위와 일치할 수 있는 리간드/작용제 결합 부위를 부분적으로 차지할 것이고 보다 낮은 신호를 초래할 수 있다. 예를 들어, 대조군(작용제를 갖되 조절제는 갖지 않음)은 100의 상대적 수용체 활성화 값을 할당받는다. 대조군을 기준으로 한 활성화의 감소는 억제제, 길항제 또는 역 작용제의 동정을 가능하게 하고, 상기 활성화의 증가는 증강제의 동정을 가능하게 한다. 통상적으로, 시험 물질을 함유하지 않는 샘플, 또는 시험 물질을 함유하지 CSR::T1R을 발현하지 않는 세포(모의(mock) 형질감염된 세포)를 기초로 한 샘플과 비교할 때 시험 물질을 함유하는 샘플 중의 10% 이상의 측정된 활성화 증가 또는 감소는 유의한 것으로 간주될 수 있다.

[0129] 우마미 미각자극 증강제를 동정하기 위해, 시험 물질을 함유하는 샘플과 시험 물질을 함유하지 않는 샘플을 비교한다. 예를 들어, 대조군(작용제, 예컨대, 염화칼슘을 함유하지 조절제를 함유하지 않음)은 100의 상대적 수용체 활성화 값을 할당받는다. 증가는 증강제의 동정을 가능하게 한다. 통상적으로, 시험 물질을 함유하지 않는 샘플, 또는 시험 물질을 함유하지 CSR::T1R을 발현하지 않는 세포(모의 형질감염된 세포)를 기초로 한 샘플과 비교할 때 시험 물질을 함유하는 샘플 중의 10% 이상의 측정된 활성화 증가 또는 감소는 유의한 것으로 간주될 수 있다.

[0130] CSR::T1R 키메라 단백질을 사용하는 스크리닝의 경우, 칼슘이 작용제로서 사용될 수 있다. 별법으로, CSR::T1R의 T1R1 및/또는 T1R3 단편의 관련 부분에 결합하는 작용제를 사용할 수 있다. 이 작용제는 예를 들어, hT1R1/hT1R3 야생형 우마미 수용체의 공지된 합성 작용제인 N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드(CAS 번호 745047-97-6)를 포함한다. 상기 화합물 및 이의 제조는 국제특허출원 공개 제WO 2005/041684호 및 관련된 특허출원인 미국 특허출원 공개 제2006/045953호(실시예 132)에 기재되어 있다.

[0131] **작용제 또는 부분 작용제의 동정**

[0132] VFT 도메인에 결합하지 않는 작용제 또는 부분 작용제를 동정하기 위해, 시험 물질을 함유하는 샘플을 작용제(예를 들어, 염화칼슘, N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드, 또는 또 다른 동정된 리간드/작용제)를 함유하는 양성 대조군과 비교한다. 별법으로/추가로, 시험 물질을 함유하는 샘플과 시험 물질을 함유하지 않는 샘플을 CSR::T1R 키메라 단백질의 활성화 면에서 비교한다.

[0133] 예를 들어, 작용제 또는 부분 작용제는 상기 작용제 또는 부분 작용제가 100 mM 이하의 농도로 존재하는 경우, 양성 대조군 우마미 수용체 작용제의 최대 생물학적 활성의 10% 이상에 반응하는 생물학적 활성, 예를 들어, 작용제와 유사한 또는 작용제보다 높은 최대 생물학적 활성을 나타낼 수 있다. 최대 생물학적 활성은 소정의 수

용체 분석 포맷 내에서 달성될 수 있는, 작용제, 예를 들어, 염화칼슘 또는 N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드에 대한 최대 달성가능한 수용체 반응으로서 정의되고, 이 반응은 증가하는 농도의 동일한 작용제의 첨가에도 불구하고 더 증가하지 않는다.

[0134] 전술한 작용제들은 상이한 농도에서 CSR::T1R 키메라 단백질의 증강제로서도 작용할 수 있다. 이것은 우마미 증강 효과를 표시하는 신호에 대한 작용제-시험 물질을 시험하기 위해 칼슘 또는 다른 작용제를 사용함으로써 스크리닝 방법에서 시험될 수 있다.

[0135] 별법으로, 시험 물질을 함유하는 샘플 중의 측정된 활성 증가, 예를 들어, 10% 이상의 측정된 활성 증가는 시험 물질을 함유하지 않는 샘플과 비교되거나 시험 물질을 함유하되 CSR::T1R을 발현하지 않는 세포(모의 형질감염된 세포)를 기초로 한 샘플과 비교된다.

[0136] 길항제를 동정하기 위해, 공지된 작용제의 존재 하에 시험 물질을 사용한 경우의 수용체 활성과 공지된 작용제의 존재 하에 시험 물질을 사용하지 않은 경우의 수용체 활성을 비교한다. 길항제는 작용제-자극된 수용체 활성이 예를 들어, 10% 이상까지 감소됨을 보인다.

[0137] 역 작용제를 동정하기 위해, 공지된 작용제의 존재 하에 시험 물질을 사용한 경우의 수용체 활성과 공지된 작용제의 존재 하에 시험 물질을 사용하지 않은 경우의 수용체 활성을 전술한 바와 같이 수용체를 과다발현하는 동물/세포/막을 포함하는 샘플 중에서 비교한다. 역 작용제는 수용체의 기본구성적 활성이 예를 들어, 10% 이상까지 감소됨을 보인다.

[0138] 상기 분석에서 CSR::T1R 수용체 활성을 측정하는 적절한 검출 방법의 다양한 예는 이하에 기재된다.

[0139] 많은 스크리닝이 칼슘 활성화에 의존하고, 이 스크리닝의 경우 세포, 수용체, 효소 또는 레포터 유전자의 비특이적 자극을 피하기 위해 칼슘이 낮은 완충제 시스템이 사용되어야 한다.

[0140] **세포질 이온 또는 막 전압의 변화의 검출**

[0141] 세포는 문헌("G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)", CRC Press 1999; 1st Edition; Eds Haga and Berstein)에 상세히 기재된 바와 같이 수용체 활성을 기록하기 위해 이온 감수성 안료와 함께 로딩한다. 이온 감수성 또는 막 전압 형광 표시자를 사용하여 세포질 이온 농도 또는 막 전압의 변화를 측정한다.

[0142] **칼슘 유동**

[0143] GPCR의 활성화에 의해 유도되는 세포내 칼슘 방출은 칼슘에 결합하는 세포 영구 안료를 사용하여 검출한다. 칼슘에 결합된 안료는 세포내 칼슘의 생성에 비례하여 형광 신호를 발생시킨다. 이 방법은 수용체 활성의 신속하고 정량적인 측정을 가능하게 한다.

[0144] 사용되는 세포는 CSR::T1R GPCR, 및 전술한 포스포리파제 C 경로에의 커플링을 가능하게 하는 G-단백질을 동시에 발현하는 형질감염된 세포이다. 음성 대조군은 후보 화합물의 가능한 비-특이적 효과를 배제시키기 위해 CSR::T1R을 발현하지 않는(모의 형질감염된) 세포 또는 이의 막을 포함한다.

[0145] 칼슘 유동 검출 프로토콜은 문헌("G-protein coupled receptors (Signal Transduction Series)"; Editors: Tatsuya Haga and Gabriel Berstein, 1st ed., 424pp. CRC Press - Boca Raton FL; September 1999)에 상세히 기재되어 있고, 이의 개조된 버전은 다음과 같이 요약된다:

[0146] 0일: 96-웰 플레이트를 웰 당 8.5K 세포로 시딩하고 37°C의 영양 성장 배지 중에서 밤새 유지시킨다.

[0147] 1일: 세포를 웰 당 총 150 ng의 GPCR DNA 및 0.3 μ l의 리포펙타민 2000(인비트로젠)을 사용하여 형질감염시킨다. 형질감염된 세포를 37°C의 영양 성장 배지 중에서 밤새 유지시킨다.

[0148] 2일: 성장 배지를 버리고, 37°C에서 130 mM의 NaCl, 5 mM의 KCl, 10 mM의 HEPES, 0.5 mM의 CaCl₂ 및 10 mM의 글루코스(pH 7.4)를 함유하는 환원된 칼슘 C1 완충제 용액 중에 용해된 1.5 μ M의 Fluo-4 AM(몰레큘라 프로브스) 및 2.5 μ M의 프로베니시드(probenicid)로 구성된 50 μ l의 칼슘 분석 용액과 함께 세포를 (실온의 암실에서) 1시간 동안 항온처리한다. 125 μ l의 환원된 칼슘 C1 완충제를 각 웰에 첨가하고 플레이트를 실온의 암실에서 30분 동안 더 항온처리한다. 완충제 용액을 버리고 플레이트를 세척 완충제로서 100 μ l의 환원된 칼슘 C1 완충제를 사용하여 5회 세척하고, 세포를 200 μ l의 환원된 칼슘 C1 완충제로 재구성시킨다.

[0149] 이어서, 플레이트를 형광 마이크로플레이트 판독기, 예를 들어, 플렉스테이션(Flexstation)(몰레큘라 디바이스

스) 또는 FLIPR(분리형 플루오로메트릭 이미징 시스템) 내에 배치하고, 20 μ l의 10X 농축 리간드 저장 용액을 첨가하여 수용체 활성화를 개시한다. 형광도를 리간드 첨가 전에 15초 동안 연속적으로 모니터링하고, 리간드 첨가 후에 45 내지 110초 동안 연속적으로 모니터링한다. 수용체 활성화 수준을 하기 수학적 1 또는 2로 정의하거나 기준 형광도(F_0)로 표준화된 피크 형광도(F)의 증가를 측정하여 정의한다:

수학적 1

[0150] % 활성화 = (최대 형광도 - 기준 형광도/기준 형광도)*100

수학적 2

[0151] 형광도 증가 = 최대 형광도 - 기준 형광도

[0152] 상기 식에서,

[0153] 기준 형광도는 리간드 첨가 전의 평균 형광도 수준을 나타낸다.

[0154] 데이터는 하기 수학적 3을 이용하여 표준화시킨다:

수학적 3

[0155] $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$.

[0156] 상기 식에서,

[0157] F는 피크 형광도 신호이고,

[0158] F_0 는 기준 형광도 신호이며,

[0159] 기준 형광도는 리간드 첨가 전 처음 10 내지 15초 동안 계산된 평균 형광도를 나타낸다.

[0160] 유용한 세포는 제한 없이 전술한 포유동물 세포, 예를 들어, HEK293T 세포 및 HEK293 T-RexTM 세포이다. 세포는 당업계에 잘 공지되어 있는 바와 같이 GPCR 및 G-단백질에 의해 일시적으로 또는 안정적으로 형질감염될 수 있다. 훌륭한 이중 발현 시스템은 국제특허출원 공개 제WO 2004/055048호에 상세히 기재되어 있다.

[0161] 칼슘 유동 분석은 예를 들어, 하기 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.

[0162] 조절제의 동정은 하기와 같이 변경된 상기 절차를 이용하여 수행한다. 신호는 작용제의 존재 및 시험 물질의 부재 하에 CSR::T1R을 발현하는 재조합 세포로부터 획득된 CSR::T1R 활성의 기준 수준과 비교된다. CSR::T1R 활성의 증가 또는 감소, 예를 들어, CSR::T1R 활성의 2배 이상, CSR::T1R 활성의 5배 이상, CSR::T1R 활성의 10배 이상 또는 CSR::T1R 활성의 100배 이상의 증가 또는 감소에 의해 조절제가 동정된다.

[0163] 별법으로, 동정은 조절제를 함유하지 않는 샘플과 비교된 경우, 또는 조절제를 함유하되 CSR::T1R 폴리펩티드를 발현하지 않는 세포(모의 형질감염된 세포) 샘플과 비교된 경우 예를 들어, 10% 이상의 형광 강도의 증가 또는 감소를 이용한다.

[0164] 아데닐레이트 사이클레이즈 활성

[0165] 아데닐레이트 사이클레이즈 활성의 분석은 예를 들어, 문헌(Kenimer & Nirenberg, 1981, Mol. Pharmacol. 20: 585-591)에 기재된 바와 같이 수행한다. 반응 혼합물을 통상적으로 37°C에서 10분 미만의 시간 동안 항온처리한다. 항온처리 후, 0.9 ml의 냉각된 6% 트라이클로로아세트산을 첨가하여 반응 혼합물을 탈단백질화시킨다. 튜브를 원심분리하고, 각 상청액을 Dowex AG50W-X4 컬럼에 첨가한다. 4 ml의 0.1 mM 이미다졸-HCl(pH 7.5)을 사용하여 cAMP 분획을 컬럼으로부터 카운팅 바이알 내로 용출하여, 작용제에 의한 수용체 활성화 후 생성된 cAMP의 농도를 측정한다. 대조군 반응 또한 CSR::T1R 폴리펩티드를 발현하지 않는 세포로부터의 단백질 균질화물을 사용하여 수행해야 한다.

[0166] IP3/ 칼슘 이온 신호

[0167] G-단백질을 발현하는 세포에서 IP3/칼슘 이온에 상응하는 신호 및 이에 따른 수용체 활성을, 형광도를 이용하여 검출할 수 있다. GPCR을 발현하는 세포는 세포내 축적물 및 이온 채널의 활성화 둘다로부터의 기여의 결과로서 증가된 세포질 칼슘 농도를 나타낼 수 있고, 이 경우 내부 축적물로부터의 칼슘 방출로부터 비롯된 형광 반응을

구별하기 위해 킬레이팅제, 예컨대, EDTA로 보충되거나 보충되지 않은 칼슘-무함유 완충제 중에서 이러한 분석을 수행하는 것이 필수적이지는 않지만 바람직할 수는 있다.

[0168] **포스포리파제 C/세포내 칼슘 이온 신호**

[0169] 수용체를 포스포리파제 C 신호 전달도입 경로에 연결하는 G-단백질과 함께 CSR::T1R을 세포에서 발현시킨다. 예를 들어, 형광 칼슘 이온 표시자 안료 및/또는 형광측정 이미징을 이용하여 세포내 칼슘 이온 농도의 변화를 측정한다.

[0170] **GTPase/GTP 결합**

[0171] CSR::T1R을 포함하는 GPCR의 경우, 수용체 활성화의 척도는 GPCR을 함유하는 세포막에 의한 GTP의 결합이다. 표지된 GTP의 결합을 검출함으로써 막의 G-단백질 커플링을 측정한다. 수용체를 발현하는 세포로부터 단리된 막을 35 S-GTP γ S 및 표지되지 않은 GDP를 함유하는 완충제 중에서 항온처리한다. 활성화된 GTPase는 20 mM H_3PO_4 중의 활성화된 5% 차콜 현탁액 중의 자유 무기 포스페이트의 분리 후 신틸레이션 카운팅에 의해 검출되는 무기 포스페이트로서 표지를 방출한다.

[0172] 혼합물을 항온처리하고, 결합되지 않은 표지된 GTP를 GF/B 필터 상으로의 여과에 의해 제거한다. 결합된 표지된 GTP를 액체 신틸레이션 카운팅으로 측정한다. 대조군은 시험 물질의 가능한 비-특이적 효과를 배제시키기 위해 CSR::T1R을 발현하지 않는 세포(모의 형질감염된 세포)로부터 단리된 막을 사용한 분석을 포함한다. 방법은 문헌(Traynor and Nahorski, 1995, Mol. Pharmacol. 47: 848-854)에 상세히 기재되어 있다.

[0173] 전술한 바와 같이, GTP 결합 또는 GTPase 활성화의 10% 이상의 변화(증가 또는 감소)가 통상적으로 조절제를 동정하는 데 충분하다. 그러나, 작용제를 동정하기 위해, 하기와 같이 변형된 상기 분석을 수행한다. 물질은 화합물이 100 mM 이하, 예를 들어, 10 내지 500 μ M, 예컨대, 약 100 μ M로 존재하는 경우 상기 물질의 활성이 공지된 작용제(예를 들어, N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드)의 활성의 50% 이상인 경우, 또는 상기 물질이 공지된 작용제에 의해 유도된 활성 이상의 활성을 유도하는 경우 작용제로서 동정된다.

[0174] **마이크로생체기능측정기 또는 바이오센서**

[0175] 이러한 분석은 문헌(Hafner, 2000, Biosens. Bioelectron. 15: 149-158)에 상세히 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.

[0176] **아라키노이드산**

[0177] 아라키노이드산의 세포내 농도는 수용체 활성화의 표시자로서 사용된다. 상기 농도의 측정 방법은 문헌(Gijon et al., 2000, J. Biol. Chem., 275: 20146-20156)에 상세히 기재되어 있다.

[0178] **cAMP/cGMP**

[0179] 세포내 또는 세포외 cAMP는 예를 들어, 문헌(Horton & Baxendale, 1995, Methods Mol. Biol. 41: 91-105)에 기재된 바와 같이 cAMP 방사성면역분석(RIA) 또는 cAMP 결합 단백질을 사용하여 측정한다. 별법으로, cAMP의 측정을 위한 다수의 키트가 시판되는데, 예를 들어, 고효율 형광 편광-기재 균질 분석(High Efficiency Fluorescence Polarization-based homogeneous assay) 키트는 LJI 바이오시스템스 및 NEN 라이프 사이언스 프로덕츠로부터 시판된다. 별법으로, cGMP의 세포내 또는 세포외 수준은 면역분석을 이용하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 문헌(Felley-Bosco et al., Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol., 11:159-164 (1994))에 기재된 방법을 이용하여 cGMP의 농도를 측정할 수 있다. 별법으로, 미국 특허 제4,115,538호에 기재된 cAMP 및/또는 cGMP 측정용 분석 키트를 사용할 수 있다.

[0180] 시험 물질의 가능한 비-특이적 효과를 배제시키기 위해 모의 형질감염된 세포 또는 이의 추출물을 사용한 음성 대조군을 사용할 수 있다.

[0181] **DAG/IP3**

[0182] 수용체 활성화에 의해 일어나는 인지질 분해에 의해 방출되는 제2 메신저인 DAG 및/또는 IP3을 예를 들어, 문헌(Phospholipid Signalling Protocols, edited by Ian M. Bird, Totowa, N.J., Humana Press, 1998)에 기재된 바와 같이 검출하여 GPCR(CSR::T1R) 활성화의 표시자로서 사용할 수 있다. 별법으로, IP3 측정용 키트는 퍼킨 엘머 및 시스바이오 인터네이션으로부터 시판된다.

- [0183] 시험 물질의 가능한 비-특이적 효과를 배제시키기 위해 모의 형질감염된 세포 또는 이의 추출물을 사용한 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- [0184] **PKC 활성화**
- [0185] 성장 인자 수용체 티로신 카이네이즈는 인지질- 및 칼슘-활성화된 단백질 카이네이즈의 패밀리인 PKC의 활성화를 수반하는 경로를 통해 신호를 전달할 수 있다.
- [0186] PKC에 의해 유도된 유전자 생성물의 증가는 PKC 활성화를 보임으로써 수용체 활성을 나타낸다. 이 유전자 생성물은 예를 들어, 프로토-온코진(proto-oncogene) 전사 인자-코딩 유전자(c-fos, c-myc 및 c-jun을 포함함), 단백질분해효소, 단백질분해효소 억제제(콜라게네이즈 타입 I 및 플라스미노겐 활성화제 억제제를 포함함), 및 부착 분자(세포내 부착 분자 I(ICAM I)을 포함함)를 포함한다.
- [0187] PKC 활성화는 문헌(Kikkawa et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 13341)에 기재된 바와 같이 직접적으로 측정할 수 있고, 이때 포스포셀룰로스 종이에의 결합에 의해 추후에 분리되는 PKC 기질 펩티드의 인산화를 측정한다. PKC 활성화는 정제된 카이네이즈 또는 미정제 세포 추출물의 활성을 측정하는 데 사용될 수 있다. PKC 샘플은 분석 직전에 20 mM HEPES/2 mM DTT로 희석시킬 수 있다. 대안적 분석은 판버라(PanVera)에 의해 시판되는 PKC 분석 키트를 사용하여 수행할 수 있다. 상기 PKC 분석은 GPCR(CSR::T1R)을 발현하는 세포로부터의 추출물에 대해 수행된다. 별법으로, 활성화는 PKC 활성화에 의해 활성화된 유전자의 대조군 서열에 의해 유도된 레포터 유전자 구축물의 사용을 통해 측정될 수 있다.
- [0188] 시험 물질의 가능한 비-특이적 효과를 배제시키기 위해 모의 형질감염된 세포 또는 이의 추출물을 사용한 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- [0189] **MAP 카이네이즈 활성화**
- [0190] MAP 카이네이즈 활성화는 시판되는 키트, 예를 들어, 뉴 잉글랜드 바이오랩스에 의해 시판되는 p38 MAP 카이네이즈 분석 키트, 또는 퍼킨-엘머 라이프 사이언스에 의해 시판되는 FlashPlateTM MAP 카이네이즈 분석 키트를 사용하여 측정할 수 있다. p42/44 MAP 카이네이즈 또는 ERK1/2는 Gq 및 Gi 커플링된 GPCR을 갖는 세포가 사용된 경우 GPCR(CSR::T1R) 활성을 보이는 것으로 측정될 수 있고, GPCR 활성화 후 내재성 ERK1/2 카이네이즈의 인산화를 측정하는 ERK1/2 분석 키트는 TGR 바이오사이언시스로부터 시판된다.
- [0191] 별법으로, 공지된 합성 또는 천연 티로신 카이네이즈 기질 및 표지된 포스페이트를 통한 티로신 카이네이즈 활성의 직접적인 측정은 잘 공지되어 있고, 다른 종류의 카이네이즈(예를 들어, 세린/쓰레오닌 카이네이즈)의 활성화도 유사하게 측정될 수 있다.
- [0192] 모든 카이네이즈 분석은 정제된 카이네이즈, 및 하나 이상의 CSR::T1R 폴리펩티드를 발현하는 세포로부터 제조된 미정제 추출물을 사용하여 수행할 수 있다. 사용되는 카이네이즈의 기질은 기질을 대표하는 전장 단백질 또는 합성 펩티드일 수 있다. 문헌(Pinna & Ruzzene (1996, Biochem. Biophys. Acta 1314: 191-225))에는 카이네이즈 활성을 검출하는 데 유용한 다수의 인산화 기질 부위가 기재되어 있다. 다수의 카이네이즈 기질 펩티드가 시판되고 있다. 특히 유용한 카이네이즈 기질은 많은 수용체 및 비-수용체 티로신 카이네이즈에 대한 기질인 "Src-관련 펩티드"인 RRLIEDAEYAARG(시그마로부터 시판됨)이다. 몇몇 방법은 펩티드 기질을 필터에 결합시키는 단계를 필요로 하며, 펩티드 기질은 결합을 촉진하는 순 양 전하를 가져야 한다. 일반적으로, 펩티드 기질은 2개 이상의 염기성 잔기 및 자유 N-말단을 가져야 한다. 반응은 일반적으로 0.7 내지 1.5 mM의 펩티드 농도를 사용한다.
- [0193] 시험 물질의 가능한 비-특이적 효과를 배제시키기 위해 모의 형질감염된 세포 또는 이의 추출물을 사용한 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- [0194] **전사 레포터/CSR::T1R-반응성 프로모터/레포터 유전자**
- [0195] 레포터 유전자 분석을 이용하여 조절자를 동정하는 데 있어서 신호의 2배 이상의 증가 또는 10% 감소가 유의하다. 작용제는 시험 물질의 존재 하의 활성화와 시험 물질의 부재 하의 활성을 비교할 때 예를 들어, 2배, 5배 또는 10배 이상 자극한다.
- [0196] 작용제와 CSR::T1R의 결합에 의해 개시된 세포내 신호는 세포내 이벤트 캐스케이드를 변화시키고, 이의 궁극적인 결과는 하나 이상의 유전자의 전사 또는 번역의 신속하고 검출가능한 변화이다.

- [0197] 따라서, 수용체의 활성화는 CSR::T1R 활성화에 반응하는 프로모터에 의해 유도된 레포터 유전자의 발현을 측정함으로써 측정할 수 있다.
- [0198] 본원에서 사용된 "프로모터"는 수용체-조절된 발현에 필요한 기본 프로모터, 인핸서 및 전사-조절 결합 부위 중 하나 이상을 포함하는, 유전자 발현의 수용체-매개 조절에 필수적인 전사 조절 요소 또는 서열이다. 작용제와 CSR::T1R의 결합으로부터 비롯된 세포내 신호에 반응하는 프로모터를 선별하여, 전사, 번역 또는 궁극적 활성이 용이하게 검출될 수 있고 측정될 수 있는 상응하는 프로모터-조절 레포터 유전자에 작동가능하게 연결시킨다.
- [0199] 레포터 유전자는 예를 들어, 루시퍼레이스, CAT, GFP, β -락타메이즈, β -갈락토시데이즈, 및 소위 "즉시 초기(immediate early)" 유전자, c-fos 프로토-온코진, 전사 인자 CREB, 혈관활성 장 펩티드(VIP) 유전자, 소마토스타틴 유전자, 프로엔케팔린 유전자, 포스포에놀피루베이트 카복시-카이네이즈(PEPCK) 유전자, NF- κ B에 반응하는 유전자 및 AP-1-반응 유전자(Fos 및 Jun, Fos-관련 항원(Fra) 1 및 2, I κ B α , 오르니틴 데카복실레이즈, 및 아넥신 I 및 II에 대한 유전자를 포함함)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0200] 프로모터는 당업자에게 자명한 바와 같이 선택된 레포터 유전자에 따라 선택될 것이다.
- [0201] 루시퍼레이스, CAT, GFP, β -락타메이즈, β -갈락토시데이즈, 및 이들의 생성물의 검출을 위한 분석은 당업계에 잘 공지되어 있다. 추가 레포터 유전자의 예는 이하에 기재되어 있다.
- [0202] "즉시 초기" 유전자가 적합하고 신속히 유도된다(예를 들어, 수용체와 이펙터 단백질 또는 리간드 사이의 수분의 접촉 시간 내에 유도됨). 레포터 유전자의 바람직한 성질은 하기 성질 중 하나 이상을 포함한다: 리간드 결합에의 신속한 반응; 정지 세포에서의 낮은 또는 검출불가능한 발현; 신규 단백질 합성과 무관한 일시적인 유도; 신규 단백질 합성을 필요로 하는 전사의 후속 셧-오프(shut-off); 및 수분 내지 수 시간의 짧은 반감기를 갖는 유전자로부터 전사된 mRNA. 유사하게, 프로모터는 상기 성질들 중 한 성질, 여러 가지 성질 또는 상기 성질들 모두를 가질 수 있다.
- [0203] c-fos 프로토-온코진은 다수의 다양한 자극에 대해 반응하고 신속히 유도되는 유전자의 일례이다. c-fos 조절 요소는 전사 개시에 필요한 TATA 박스, 기본 전사를 위한 두 개의 업스트림 요소, 및 이분 대칭을 갖는 요소를 포함하며 포볼(phorbol) 에스터 12-O-테트라데카노일포볼- β -아세테이트(TPA), 혈청, EGF 및 PMA에 의한 유도에 필요한 인핸서를 포함한다. c-fos mRNA 캡 부위로부터 -317 내지 -298 bp 업스트림에 위치한 20 bp c-fos 전사 인핸서 요소는 혈청을 공급받지 못한 NIH 3T3 세포에서의 혈청 유도에 필수적이다. 상기 두 개의 업스트림 요소들 중 하나는 -63 내지 -57에 위치하고, cAMP 조절을 위한 컨센서스 서열과 유사하다.
- [0204] 전사 인자 CREB(cAMP 반응성 요소 결합 단백질)는 세포내 cAMP의 농도에 반응한다. 따라서, cAMP 농도의 조절을 통해 신호를 전달하는 수용체의 활성화는 전사 인자의 결합, 또는 CREB-결합 요소(CRE, 또는 cAMP 반응 요소로 지칭됨)에 연결된 레포터 유전자의 발현을 검출함으로써 측정할 수 있다. CRE의 DNA 서열은 TGACGTCA이다. CREB 결합 활성화에 반응하는 레포터 구축물은 미국 특허 제5,919,649호에 기재되어 있다.
- [0205] 다른 적절한 레포터 유전자 및 이의 프로모터는 cAMP에 반응하는 VIP 유전자 및 이의 프로모터; cAMP에 반응하는 소마토스타틴 유전자 및 이의 프로모터; cAMP, 니코틴산 작용제 및 포볼 에스터에 반응하는 프로엔케팔린 및 이의 프로모터; 및 cAMP에 반응하는 PEPCK 유전자 및 이의 프로모터를 포함한다.
- [0206] GPCR 활성화의 변화에 반응하는 레포터 유전자 및 이의 프로모터의 추가 예는 AP-1 전사 인자 및 NF- κ B를 포함한다. AP-1 프로모터는 팔린드롬(palindrome) TGA(C/G)TCA인 컨센서스 AP-1 결합 부위를 특징으로 한다. 또한, AP-1 결합 부위는 TPA를 포함하는 종양 프로모터에 의한 유도를 매개하는 것을 담당하므로 종종 TRE, 즉 TPA-반응 요소로도 지칭된다. AP-1은 성장 자극에 대한 세포의 초기 반응에 관여하는 다수의 유전자를 활성화시킨다. AP-1-반응성 유전자의 예는 Fos 및 Jun(이 단백질 자체가 AP-1 활성을 구성함), Fra 1 및 2, I κ B α , 오르니틴 데카복실레이즈, 및 아넥신 I 및 II에 대한 유전자들을 포함한다.
- [0207] NF- κ B 프로모터/결합 요소는 컨센서스 서열 GGGGACTTTC를 갖는다. 다수의 유전자가 NF- κ B 반응성 유전자로서 동정되었고, 이들의 조절 요소들은 GPCR 활성을 모니터링하기 위해 레포터 유전자에 연결될 수 있다. NF- κ B에 반응하는 유전자는 예를 들어, IL-1 β , TNF- α , CCR5, P-셀렉션, Fas 리간드, GM-CSF 및 I κ B α 를 코딩하는 유전자들을 포함한다. NF- κ B-반응성 레포터를 코딩하는 벡터는 당업계에 공지되어 있거나, 당업계의 통상의 기술, 예를 들어, 합성 NF- κ B 요소 및 최소 프로모터를 사용하거나 NF- κ B 조절을 받는 것으로 공지되어 있는 유전자의 NF- κ B-반응성 서열을 사용하여 용이하게 형성할 수 있다. 또한, NF- κ B 반응성 레포터 구축물은 예를 들어, 클론테크로부터 시판된다.

- [0208] 소정의 프로모터 구축물은 상기 구축물로 형질감염된 GPCR(CSR::T1R)-발현 세포를 작용제(예를 들어, N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드)에 노출시켜 용이하게 시험할 수 있다. 작용제에 반응한, 레포터 유전자 발현의 2배 이상의 증가는 상기 레포터가 GPCR(CSR::T1R) 활성을 측정하는 데 적합함을 표시한다.
- [0209] 전사 분석을 위한 대조군은 GPCR(CSR::T1R)을 발현하지 않지만 레포터 구축물을 보유하는 세포, 및 프로모터가 없는 레포터 구축물을 보유하는 세포 둘다를 포함한다.
- [0210] 레포터 유전자 활성화에 의해 나타난 GPCR(CSR::T1R) 활성을 조절하는 물질은 신호의 GPCR(CSR::T1R) 특이성을 입증하기 위해 다른 프로모터 및/또는 다른 수용체를 사용하여 입증할 수 있고 상기 물질의 활성의 스펙트럼을 측정함으로써, 임의의 비-특이적 신호, 예를 들어, 레포터 유전자 경로를 통한 비-특이적 신호를 배제시킬 수 있다.
- [0211] **이노시톨 포스페이트(IP) 측정**
- [0212] 포스파티딜 이노시톨(PI) 가수분해는 세포를 ³H-미요이노시톨로 48시간 이상의 시간 동안 표지하는 단계를 포함하는, 미국 특허 제5,436,128호에 기재된 방법에 따라 측정한다. 표지된 세포를 1시간 동안 시험 물질과 접촉시킨 후, 상기 세포를 용해하고 클로로포름-메탄올-물로 추출한다. 이어서, IP를 이온 교환 크로마토그래피로 분리하고 IP를 신틸레이션 카운팅으로 정량한다. 작용제의 경우, 자극 정도는 완충제 대조군의 존재 하의 분당 카운트(cpm)에 대한 시험 물질의 존재 하의 cpm의 비를 계산함으로써 측정한다. 마찬가지로, 억제제, 길항제 및 역 작용제의 경우, 억제 정도는 완충제 대조군(작용제를 함유하거나 함유하지 않을 수 있음)의 존재 하의 cpm에 대한 시험 물질의 존재 하의 cpm의 비를 계산함으로써 측정한다.
- [0213] **결합 분석**
- [0214] 리간드 결합에 대한 기능성 반응에 의해 야기된 파라미터의 변화를 측정하는, 전술한 기능 분석에 대한 대안으로, 리간드와 CSR::T1R 수용체의 결합을 측정하는 결합 분석으로 리간드 결합을 측정할 수 있다.
- [0215] 결합 분석은 당업계에 잘 공지되어 있고 용액, 고체 상에 부착되거나 부착되지 않은 이중층 막, 지질 단일층 또는 소포체 중에서 시험될 수 있다. 조절제와 CSR::T1R 폴리펩티드의 결합은 예를 들어, 분광학적 특징(예컨대, 형광도, 흡광도 또는 굴절 지수)의 변화 측정, 유체역학적 방법(예를 들어, 형태를 사용하는 방법), 크로마토그래피, 또는 CSR::T1R 폴리펩티드의 용해도의 측정을 통해 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 결합 분석은 생화학적인 방법이고 재조합 CSR::T1R 폴리펩티드를 발현하는 세포/조직으로부터의 막 추출물을 사용한다.
- [0216] 결합 분석은 예를 들어, 미국 특허출원 공개 제2005/0032158호(Adler et al.)의 [0169] 내지 [0198] 단락에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다.
- [0217] **CSR::T1R 수용체 폴리펩티드 및 핵산, 및 실질적으로 상동성인 폴리펩티드 및 핵산**
- [0218] 본원에 기재된 방법에 유용한 CSR::T1R 키메라 단백질은 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 2와 서열번호 4로 구성된 키메라 이중이량체, 서열번호 2와 야생형 T1R3으로 구성된 이중이량체, 및 서열번호 4와 야생형 T1R1로 구성된 이중이량체로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 별법으로, CSR::T1R 키메라 단백질(또는 CSR::T1R을 코딩하는 핵산)은 실질적으로 유사하며 기능성 수용체로 남아있는(즉, 리간드에 결합하고/하거나 리간드에 의해 활성화되거나, 상기 수용체를 코딩하는) 수용체일 수 있다.
- [0219] 실질적으로 상동성인 CSR::T1R 키메라 단백질은 T1R1 또는 T1R3 부분이 마우스, 래트, 햄스터, 원숭이 및 개로부터의 T1R1 및/또는 T1R3을 포함하는 대립유전자 변이체 또는 다른 종의 관련 부분으로 치환되어 있는 단백질을 포함한다.
- [0220] 또한, 실질적으로 상동성인 CSR::T1R 뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열은 보존적 돌연변이 및/또는 점 돌연변이에 의해 형성될 수 있고 이하에 상세히 기재되는 임의의 보존적으로 변경된 변이체를 포함할 수 있다.
- [0221] 핵산 서열의 경우, 보존적으로 변경된 변이체는 동일한 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열(보존적으로 치환된 아미노산, 즉 아르기닌으로 치환된 라이신, 및 이하에 기재된 추가 예)을 코딩하는 핵산을 의미한다.
- [0222] 유전 코드의 축퇴성 때문에, 서열에서 상이하나 기능적으로 동일한 다수의 핵산이 임의의 주어진 폴리펩티드/단백질을 코딩한다. 이러한 핵산 변이는 보존적으로 변경된 변이 중 한 종인 "침묵 변이"이다. 폴리펩티드를 코딩하는 각 핵산 서열은 핵산의 모든 가능한 침묵 변이를 의미하기도 한다. 따라서, 핵산의 각 코돈(통상적으로

메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG, 및 통상적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG를 제외함)을 변경시켜, 동일한 폴리펩티드를 생산할 기능적으로 동일한 핵산 서열을 생성할 수 있다. 따라서, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 각 침묵 변이는 각각의 주어진 핵산 서열에 내포되어 있다.

[0223] 아미노산 서열의 경우, 아미노산 치환은 PCR, 유전자 클로닝, cDNA의 부위-지정 돌연변이유발, 숙주 세포의 형질감염, 및 CSR::T1R 서열에 변이를 도입하는 데 사용될 수 있는 시험관내 전사를 비롯한 재조합 유전자 기법의 공지된 프로토콜을 이용하여 도입할 수 있다. 그 다음, 미각-세포-특이적 GPCR 기능적 활성화에 대해 변이체를 스크리닝할 수 있다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 보존적 치환을 선별하기 위한 한 예시적 가이드라인은 ala/gly 또는 ser; arg/lys; asn/gln 또는 his; asp/glu; cys/ser; gln/asn; gly/asp; gly/ala 또는 pro; his/asn 또는 gln; ile/leu 또는 val; leu/ile 또는 val; lys/arg, gin 또는 glu; met/leu, tyr 또는 ile; phe/met, leu 또는 tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp 또는 phe; val/ile 또는 leu를 포함한다(원래의 잔기 다음에 예시적 치환이 기재되어 있음).

[0224] 대안적 예시적 가이드라인은 하기 6개의 군을 사용하고, 각 군은 또 다른 아미노산으로 보존적으로 치환되는 아미노산을 포함한다: 1) 알라닌(A), 세린(S), 쓰레오닌(T); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 라이신(L); 5) 아이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 및 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W).

[0225] 또 다른 대안적 가이드라인은 모든 하전된 아미노산들이 양성이든 아니면 음성이든 관계없이 서로에 대한 보존적 치환으로서 치환되도록 하는 것이다. 또한, 코딩된 서열에서 단일 아미노산 또는 작은 비율(예를 들어, 26% 이하, 20% 이하, 또는 10% 이하)의 아미노산을 변경시키거나, 부가하거나 결실시키는 개개의 치환, 결실 또는 부가 또한 보존적으로 변경된 변이인 것으로 간주된다.

[0226] 실질적으로 상동성인 뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열은 이하에 기재된 바와 같은 서열 동일성을 갖거나 일부 엄격한 혼성화 조건 하에 혼성화된다.

[0227] % 서열 동일성

[0228] 실질적으로 상동성인 뉴클레오타이드 서열은 90% 이상, 95% 이상 또는 98% 이상의 % 서열 동일성을 갖는다. 실질적으로 상동성인 폴리펩티드 서열은 90% 이상, 95% 이상 또는 98% 이상의 % 서열 동일성을 갖는다.

[0229] % 서열 동일성은 다음과 같이 계산된다:

[0230] BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)는 웹사이트(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에서 입수할 수 있는 프로그램인 Blastn에 의해 사용되는 발견적 검색 알고리즘이다. 또 다른 뉴클레오타이드 서열에 대한 검색 뉴클레오타이드 서열의 % 동일성을 측정하기 위해, 10의 EXPECT(데이터베이스 서열에 대한 일치치를 보고하기 위한 통계학적 유의 역치)를 포함하는 BLAST 버전 2.2.1.3의 디폴트 파라미터 및 DUST 필터링을 사용하는 Blastn을 사용한다. 또 다른 폴리펩티드 서열에 대한 검색 폴리펩티드 서열의 % 동일성을 측정하기 위해, 10의 EXPECT를 포함하는 BLAST 버전 2.2.1.3의 디폴트 파라미터 및 DUST 필터링을 사용하는 Blastp를 사용한다.

[0231] 엄격한 혼성화 조건

[0232] 뉴클레오타이드 서열은 이 서열이 이하에 상세히 기재되는 엄격한 혼성화 조건 하에 본원에 기재된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체에 선별적으로 혼성화시킬 수 있는 한 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 엄격한 조건은 42°C에서 50% 포름아마이드, 5xSSC 및 1% SDS로 구성된 용액 중에서 혼성화시키고 65°C에서 0.2xSSC 및 0.1% SDS(1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M 시트르산나트륨(pH 7.0))로 구성된 용액 중에서 세척하는 조건이다.

[0233] 배경 혼성화는 예를 들어, 스크리닝될 cDNA 또는 게놈 DNA에 존재하는 다른 뉴클레오타이드 서열로 인해 일어날 수 있다.

[0234] 표적 DNA에서 관찰된 특이적 상호작용의 2배 미만 또는 경우에 따라 10배 미만 강도를 나타내는 신호는 배경으로 간주된다. 상호작용의 강도는 예를 들어, 프로브를 예컨대, ³²P로 방사성표지함으로써 측정할 수 있다.

[0235] 조절제를 동정하기 위한 키트

[0236] 키트, 예를 들어, 스크리닝 키트 또는 고처리 스크리닝 키트는 CSR::T1R 또는 CSR::T1R과 실질적으로 상동성인 서열을 발현하는 재조합 세포를 포함하며, CSR::T1R의 작용제, 예컨대, 제한 없이 염화칼슘 및 N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드(CAS 번호 745047-97-6)를 포함한다.

- [0237] 칼슘을 포함하는 키트의 사용은 키메라 단백질에만 결합하여 키메라 단백질을 활성화시키고 야생형 수용체 또는 키메라 단백질의 T1R1 및 T1R3 부분에는 결합하지 않는다는 점이다.
- [0238] 경우에 따라, 세포는 예를 들어, 칼슘 신호전달을 위한 G-단백질을 추가로 포함한다. 적절한 G-단백질은 공지되어 있고 전술되어 있으며, 당업자는 필요에 따라 G-단백질을 세포에 도입하는 방법을 인식하고 있다. 매우 유용한 키메라 G-단백질은 국제특허출원 공개 제WO 2004/055048호에 기재된 Ga16-구스트독신 44이다.
- [0239] 작용제는 적절한 농도, 예를 들어, 1 nM 내지 10 mM, 또는 0.1 μ M 내지 1 mM, 예컨대, 0.1 내지 100 μ M의 농도로 제공된다.
- [0240] 유용한 농도는 예를 들어, 염화칼슘의 경우 0.2 내지 20 mM이고, N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드의 경우 5 내지 500 μ M이다.
- [0241] 키트의 임의 성분은 제공된 재조합 세포를 배양하기 위한 적절한 배지, 및 세포가 성장할 고체 지지체, 예를 들어, 세포 배양 디쉬 또는 마이크로타이터 플레이트를 포함할 수 있고, 이 임의 성분들은 당업자가 용이하게 입수할 수 있다.
- [0242] 키트는 다음과 같이 사용될 수 있다:
- [0243] (i) CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포를 고체 지지체 상에서 성장시킨다.
- [0244] (ii) 약 1 nM 내지 100 mM 이상의 시험 물질을 적절한 농도의 작용제의 존재 하에 소정의 플레이트 또는 웰의 배양 배지에 첨가한다.
- [0245] (iii) 세포의 기능성 반응의 변화는 시험 물질의 존재 하의 반응과 시험 물질의 부재 하의 반응을 비교하여 측정함으로써 조절제인 시험 물질을 동정한다.
- [0246] 예를 들어, (iii)은 수용체 활성을 측정하는 전술한 검출 방법들 중 하나 이상의 방법과 함께 전술한 분석 중 하나 이상의 분석에 따라 수행될 수 있다. 이것은 전술되어 있는, 특별히 선택된 또는 개조된 재조합 세포를 필요로 할 수 있다. 적합한 분석은 예를 들어, CSR::T1R의 활성화 및 시험 물질에 반응한 상기 활성의 변화를 측정하기 위한 칼슘 유동 분석이다.
- [0247] 키트는 다음과 같이 증강제를 동정하는 데 사용될 수 있다:
- [0248] (i) CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포를 고체 지지체 상에서 성장시킨다.
- [0249] (ii) 약 1 nM 내지 100 mM 이상의 시험 물질을 적절한 농도의 칼슘 작용제(예를 들어, 제한 없이 염화칼슘의 형태)의 존재 하에 소정의 플레이트 또는 웰의 배양 배지에 첨가한다.
- [0250] (iii) 칼슘에 대한 세포의 기능성 반응의 변화는 시험 물질의 존재 하의 반응과 시험 물질의 부재 하의 반응을 비교하여 측정함으로써 증강제인 시험 물질을 동정한다.
- [0251] 적절한 염화칼슘 농도는 예를 들어, 약 0.2 내지 20 mM, 0.5 내지 10 mM, 또는 약 1 mM이다.
- [0252] **동정된 조절제의 확인**
- [0253] 전술한 방법에 의해 동정된 조절제는 동정된 조절제를 시험하기 위해 향수 전문가 또는 피실험자로 구성된 패널을 이용한 단순 감각 실험에 의해 용이하게 확인될 수 있다. 화합물은 우마미 미각을 확인하기 위해 예를 들어, 물 중에서 시험될 수 있거나, 우마미 미각을 증강시키는 조절제를 확인하기 위해 조절제를 함유하지 않은 음성 대조군과 비교하여 우마미 미각자극제와 함께 시험된다.
- [0254] **대규모 스크리닝 분석**
- [0255] 전사 레포터 분석 및 전술한 대부분의 세포-기재 분석은 CSR::T1R 활성을 조절하는 물질에 대해 라이브러리를 스크리닝하기에 매우 적합하다.
- [0256] 분석은 분석 단계들을 자동화하고 전형적으로 (예를 들어, 로봇 분석에서 마이크로타이터 플레이트 상의 마이크로타이터 포맷으로) 동시에 수행되는 분석에 임의의 편리한 공급원으로부터의 화합물을 제공함으로써 큰 화학적 라이브러리를 스크리닝하도록 디자인될 수 있다.
- [0257] 분석은 다수의 잠재적 조절제를 함유하는 조합 화학적 또는 펩티드 라이브러리를 제공하는 단계를 포함하는 고처리 스크리닝 방법에서 수행될 수 있다. 그 다음, 상기 라이브러리를 전술한 분석 중 하나 이상의 분석에서

스크리닝하여 전술한 활성을 나타내는 라이브러리 물질(특히, 화학적 종 또는 서브클래스)을 동정한다. 이로써 동정된 조절제는 직접 사용될 수 있거나, 유도체를 제조하고 시험함으로써 추가 조절제를 동정하기 위한 전구물질로서 사용될 수 있다.

[0258] 합성 화합물 라이브러리는 메이브리지 케미칼 캠퍼니(영국 콘웰 트레빌렛 소재), 콤넥스(미국 뉴저지주 프린스턴 소재), 브랜든 어소시에티스(미국 뉴햄프셔주 메리맥 소재) 및 마이크로소스(미국 코네티컷주 뉴 밀포드 소재)를 포함하는 다수의 회사로부터 시판된다.

[0259] **시험 물질의 라이브러리**

[0260] 조합 화학적 라이브러리는 화학적 또는 생물학적 합성, 또는 다수의 화학적 "빌딩 블록", 예컨대, 시약의 조합에 의해 발생된 다양한 화합물의 집합체이다. 예를 들어, 선형 조합 화학적 라이브러리, 예를 들어, 폴리펩티드 라이브러리는 소정의 화합물 길이(즉, 소정의 폴리펩티드 화합물의 아미노산의 수)에 대해 모든 가능한 방식으로 화학적 빌딩 블록(아미노산)의 세트를 조합하여 형성한다. 화학적 빌딩 블록의 이러한 조합적 혼합을 통해 수백만 가지의 화합물이 합성될 수 있다.

[0261] 회귀 화학적 라이브러리는 알드리치(미국 위스콘신주 밀워키 소재)로부터 입수가능하다. 박테리아, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물들로 구성된 라이브러리는 예를 들어, 판 레이보레이토리스(미국 워싱턴주 보셀 소재)로부터 시판되거나, 당업계에 잘 공지되어 있는 방법에 의해 용이하게 제조될 수 있다. 또한, 천연적으로 및 합성적으로 제조된 라이브러리 및 화합물은 보편적인 화학적, 물리적 및 생물학적 수단을 통해 용이하게 변경된다.

[0262] 다른 라이브러리는 단백질/발현 라이브러리, 천연 공급원(예를 들어, 식품, 식물, 동물 및 박테리아를 포함함)으로부터의 cDNA 라이브러리, 하나 이상이 폴리펩티드의 무작위적으로 또는 체계적으로 돌연변이된 변이체를 발현하는 라이브러리, 및 한 세포 또는 조직의 mRNA 내용물을 발현하는 데 사용되는 바이러스 벡터 내의 게놈 라이브러리를 포함한다.

[0263] 고처리 분석에서, 하루에 최대 수천 가지의 상이한 조절제 또는 리간드를 스크리닝할 수 있다. 구체적으로, 마이크로타이터 플레이트의 각 웰을 사용하여 선별된 잠재적 조절제에 대한 별도의 분석을 수행할 수 있거나, 농도 또는 항온처리 시간 효과가 관찰되는 경우, 5 내지 10개의 웰마다 단일 조절제를 시험할 수 있다. 따라서, 단일 표준 마이크로타이터 플레이트는 약 100개의 조절제를 분석할 수 있다. 1536개 웰 플레이트가 사용되는 경우, 단일 플레이트는 약 100 내지 약 1500가지 상이한 화합물들을 용이하게 분석할 수 있다. 하루에 여러 상이한 플레이트를 분석할 수 있고, 최대 약 6,000 내지 20,000가지 상이한 화합물에 대한 분석 스크리닝이 가능하다.

[0264] **분석 방법에서 CSR::T1R 조절 효과에 대해 시험될 수 있는 시험 물질의 종류**

[0265] 시험 물질은 작은 화합물, 화학적 중합체, 생물학적 중합체, 펩티드, 단백질, 당, 탄수화물, 핵산 및 지질을 포함하는 임의의 물질일 수 있다. 물질은 합성 화합물, 화합물의 혼합물, 천연 생성물 또는 천연 샘플, 예컨대, 식물 추출물, 배양 상청액 또는 조직 샘플일 수 있다.

[0266] 우마미 미각을 조절할 수 있는, 예컨대, 불리일으키거나 증강시킬 수 있는 화합물의 예는 글루타메이트 또는 이의 염(MSG, IMP 및 GMP를 포함함)을 포함한다.

[0267] 동정된 우마미 미각자극 조절제는 예를 들어, N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드를 포함할 수 있다. 우마미 미각자극 조절제는 우마미 미각을 불리일으키거나(작용제), 증강시키거나, 억제할 수 있다. 또한, 합성 우마미 수용체 작용제 및/또는 우마미 미각자극 조절제의 다른 예는 국제특허출원 공개 제WO 2005/041684호 및 관련 미국 특허출원 공개 제2006/045953호에서 찾을 수 있다.

[0268] 소모품은 식품, 음료, 구강 케어 제품, 및 이러한 제품과 혼합될 조성물, 특히 방향 조성물을 포함한다. 방향 조성물은 이의 가공 과정 동안에 가공된 식품 또는 음료에 첨가될 수 있거나, 실제로 그 자체가 소모품, 예컨대, 소스 등과 같은 조미료일 수 있다. 방향 소모품은 통상적으로 염 또는 염 대체물을 함유하고, 이러한 방향 소모품의 예는 감자 제품, 칩, 크리스프, 시리얼 제품, 쌀 제품, 타피오카 제품, 사고(sago) 제품, 제과 제품, 페이스트리 제품, 빵 제품, 효모 제품, 염 및 스파이스 제품, 머스타드 제품, 식초 제품, 소스(조미료), 가공된 식품, 요리된 과일 및 야채류 제품, 육류 및 육류 제품, 알 제품, 우유 및 낙농 제품, 요구르트, 치즈 제품, 버터 및 버터 대용물 제품, 우유 대용물 제품, 대두 제품, 식용유 및 지방 제품, 음료, 알코올계 음료, 맥주, 소프트 드링크, 정제, 로젠지, 점안제, 에멀전, 엘릭시르, 시럽 및 음료 제조를 위한 다른 제제, 식품 추

출물, 식물 추출물, 육류 추출물, 조미료 및 이들의 조합물을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

- [0269] **핵산 및 단백질의 서열**
- [0270] 본원에 기재된 구축물 및 방법에서 사용된 서열은 하기 서열목록에서 발견될 수 있다.
- [0271] 서열번호 1은 CSR::T1R1 키메라 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드/핵산 서열에 상응하고, 서열번호 2는 CSR::T1R1 키메라 단백질의 폴리펩티드/아미노산 서열에 상응한다. 서열번호 3은 CSR::T1R3 키메라 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드/핵산 서열에 상응하고, 서열번호 4는 CSR::T1R3 키메라 단백질의 폴리펩티드/아미노산 서열에 상응한다.
- [0272] CSR::T1R1 키메라 단백질 및 CSR::T1R3 키메라 단백질은 두 서브유니트를 포함하는 결합체로서 함께 기능성 키메라 우마미 수용체를 형성한다.
- [0273] 형질감염된 구축물에서, 신규 키메라 단백질(서열번호 1 또는 3)을 코딩하는 핵산 다음에 C-말단에 위치한 HSV 태그(서열번호 5)가 존재한다. 따라서, 생성된 단백질은 하기 아미노산 서열을 포함할 것이다: 서열번호 1의 아미노산 서열에 이어서 서열번호 5의 아미노산 서열, 또는 서열번호 3의 아미노산 서열에 이어서 서열번호 5의 아미노산 서열.
- [0274] T1R1/T1R3 수용체 결합체의 공지된 T1R1 및 T1R3 서브유니트의 공지된 전장 핵산 및 단백질 서열은 T1R1의 경우 서열번호 7 + 8로 표시되고, T1R3의 경우 서열번호 9 + 10으로 표시된다.
- [0275] 공지된 전장 hCaSR 수용체 핵산 및 단백질 서열은 서열번호 11 + 12로 표시된다.
- [0276] 서열번호 1 + 2: CSR::T1R1 핵산 + 단백질
- [0277] 서열번호 3 + 4: CSR::T1R3 핵산 + 단백질
- [0278] 서열번호 5 + 6: C-말단 핵산에 있는 HSV 태그 + 단백질
- [0279] 서열번호 7 + 8: T1R1(전장 코딩 서열) 핵산 + 단백질
- [0280] 서열번호 9 + 10: T1R3(전장 코딩 서열) 핵산 + 단백질
- [0281] 서열번호 11 + 12: hCaSR 핵산 + 단백질
- [0282] 서열번호 13 내지 18: 프라이머 서열(실시예 2와 실시예 3을 비교함)
- [0283] 이하, 전술한 방법들을 설명하기 위해 제공되는 일련의 실시예가 기재된다. 하기 실시예는 설명을 위한 것이고, 폴리펩티드, 핵산, 발현 벡터, 숙주 세포, 방법 또는 키트를 임의의 방식으로 한정하기 위한 것으로 해석되서는 안 된다.

실시예

- [0284] 모든 실시예는 인간 T1R1, T1R3 및 hCaSR로부터 유래된 DNA 서열을 사용한다.
- [0285] **실시예 1**
- [0286] Fluo-4 칼슘 분석
- [0287] Fluo-4는 세포내 칼슘에 대한 형광 표시자이고, 세포내 칼슘 농도의 변화, 특히 리간드 첨가 후 일어나는 수용체 활성화에 반응한 세포내 칼슘 농도의 증가를 측정할 수 있게 한다.
- [0288] Gα16-구스트딘 44를 안정하게 발현하는 HEK293 세포를 숙주 세포로서 사용하여 실시예 4에 기재된 바와 같은 다양한 구축물로 형질감염시켰다.
- [0289] 흑색의 투명-바닥 96-웰 플레이트를 모든 분석에 사용하였다. 이 플레이트를 전날 웰 당 8500개의 형질감염된 세포로 시딩하고 사용된 세포에 적합한 성장 배지 중에서 37°C에서 밤새 유지시켰다. HEK293 세포의 경우, 고농도 글루코스, L-글루타민 및 파이록시딘 하이드로클로라이드를 함유하며 10% 태아 소 혈청으로 보충된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle medium)을 HEK293 세포의 성장 및 유지에 사용하였다.
- [0290] 분석 시점에서, 성장 배지를 버리고, 세포를 환원된 칼슘 C1 완충제 용액에 용해된 1.5 μM의 Fluo-4 AM(분자량

라 프로브스™, 인비트로젠(미국 소재)) 및 2.5 μM의 프로베니시드(시그마-알드리치)로 구성된 칼슘 분석 용액 50 μl와 함께 (37℃의 암실 내에서) 1시간 동안 항온처리하였다. 환원된 칼슘 C1 완충제 용액은 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.5 mM CaCl₂(2 mM로부터 환원됨) 및 10 mM 글루코스(pH 7.4)를 함유한다.

[0291] 초기 1시간의 로딩 시간 후, 플레이트를 자동화된 플레이트 세척기(바이오텍)를 이용하여 웰 당 100 μl의 환원된 칼슘 C1 완충제로 5회 세척하고, 세척 후, 플레이트를 실온의 암실 내에서 30분 동안 더 항온처리하여 Fluo-4 AM의 완전한 탈에스터화를 허용하였다. 완충제 용액을 버리고, 플레이트를 100 μl의 환원된 칼슘 C1 세척 완충제로 5회 세척하고, 최종적으로 세포를 180 μl의 환원된 칼슘 C1 세척 완충제로 재구성시켰다.

[0292] 분석 관독을 위해, 플레이트를 FLIPR(형광 이미징 플레이트 관독기(FLIPR-Tetra, 몰레큘라 디바이시스)) 내에 배치하고, 환원된 칼슘 C1 완충제를 사용하여 제조한 10X 농축된 리간드 저장 용액 20 μl를 첨가한 후 수용체 활성화를 개시하였다.

[0293] 리간드 첨가 전에 15초 동안 형광도를 연속적으로 모니터링하고, 리간드 첨가 후에 105초 동안 형광도를 연속적으로 모니터링하였다(45 내지 105초면 충분할 수 있음).

[0294] 수용체 활성화는 기준 형광도(F₀)로 표준화된 피크 형광도(F)의 증가에 의해 측정된다. 데이터는 하기 수학적 식 3을 이용하여 표준화시킨다:

[0295] 수학적 식 3

[0296] $\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$.

[0297] 상기 식에서,

[0298] F는 피크 형광도 신호이고,

[0299] F₀는 기준 형광도 신호이며,

[0300] 기준 형광도는 리간드 첨가 전 처음 10 내지 15초 동안 계산된 평균 형광도를 나타낸다. 수득된 값은 형질감염된 수용체와의 직접적 또는 간접적 상호작용("신호")에 반응한, 세포의 칼슘 증가에 상응한다.

[0301] 음성 대조군으로서 모의 형질감염된 세포를 동일한 농도의 리간드에 노출시키고, 신호에 상응하지 않는 칼슘 잔류물의 농도를 측정하였다.

[0302] 활성화된 수용체를 함유하는 세포는 음성 대조군에 비해 유의한 신호($\Delta F/F$)에 의해 동정되었다.

[0303] **실시예 2**

[0304] CSR::T1R1 벡터 구축물의 제조

[0305] CSR::T1R1 키메라 cDNA 벡터 구축물은 PCR에 의해 생성된 두 DNA 단편을 이 두 PCR 생성물에 공통된 제한효소 부위를 통해 연결함으로써, 즉 hCaSR의 세포의 N-말단 도메인(ATD) 및 시스테인-풍부 도메인(CRD)을 함유하는 PCR 생성물(1-Lys⁶⁰¹)을, 막 도메인(TMD) 및 Thr⁶¹⁰에서 시작하는 C-말단을 함유하는, T1R1의 한 단편인 PCR 생성물에 연결함으로써 생성하였다.

[0306] CSR::T1R1 키메라 DNA의 제조를 용이하게 하기 위해, BsiW I 부위를, 상기 두 단편을 형성하는 데 사용되는 프라이머에 도입하였다. 도입된 상기 부위, 완충제 중의 적절한 제한효소, 및 당업자에게 잘 공지되어 있는 조건을 이용하여 단편들을 효소를 사용한 라이게이션으로 연결시켰다.

[0307] 형성된 PCR-생성물/단편 내의 BsiW I 부위는 hCaSR-ATD 단편의 C-말단과 T1R1 단편의 N-말단 사이에 위치하여, 키메라 DNA의 두 PCR 생성물/단편의 라이게이션을 허용한다. BsiW 부위의 도입은 원래의 hT1R1 서열을, 생성된 서열에서 원래의 hT1R1의 Thr⁶⁰⁹/Val⁶¹⁰이 Arg⁶⁰⁹/Thr⁶¹⁰으로 치환되어 있는 서열로 전환시킨다. 플래티넘 Taq 하이 피델리티 중합효소(Platinum Taq High Fidelity Polymerase) 및 하기 서열번호 13 내지 16의 특정 프라이머를 사용한 PCR을 이용하여 CSR::T1R1 키메라 cDNA 단편을 포함하는 단편을 증폭시켰다. F는 전방향 프라이머를 나타내고, R은 역방향 프라이머를 나타낸다. 밑줄친 문자는 PCR 생성물의 후속 서브클로닝을 위한 프라이머 내에 위치한 제한 부위를 표시한다:

[0308] hCaSR-ATD 프라이머 F(서열번호 13): CACCAAGCTTATGGCATTATATAGCTGC

- [0309] hCaSR-ATD 프라이머 R(서열번호 14): ATATCGTACGCTTGGCAATGCAGGAGGT
- [0310] TAS1R1-단편 프라이머 F(서열번호 15): ATATCGTACGGTGTGTTTGGCTTTGCGT
- [0311] TAS1R1-단편 프라이머 R(서열번호 16): ATATGCGGCCGCAGGTGGAGCCGACGCGCT
- [0312] PCR 증폭용 주형은 인간 군상 유두(papillae) 미각 조직으로부터 유래된 cDNA 라이브러리로부터 단리된, 인간 CaSR(오리진 인코포레이티드(미국 소재)로부터 시판됨) 또는 인간 T1R1에 대한 전장 cDNA이었다. PCR 반응 파라미터는 다음과 같다: 94℃에서 5분; 이어서 94℃에서 45초, 54℃에서 15초 및 72℃에서 2분으로 구성된 35 주기; 및 이어서, 72℃에서 10분의 최종 연장 주기.
- [0313] 생성된 핵산 단편을 겔 전기영동으로 분리하고, 정제하고 pCR-Topo-II 벡터(인비트로젠) 내로 서브클로닝하고, 생성된 클론을 DNA 시퀀싱으로 검증하여 PCR 증폭으로부터 발생된 돌연변이의 부재를 확인하였다. 시퀀싱 후, 삽입물을 3-조각 라이게이션을 통해 pcDNA4-TO 벡터(인비트로젠(미국 소재)으로부터 구입됨)를 기초로 한 발현 카세트 벡터 구축물 내로 서브클로닝하여, CSR::T1R1 키메라 cDNA 단편이 상기 벡터 구축물 내에서 조립되게 하였다.
- [0314] 형성된 벡터 구축물의 C-말단은 HSV 당단백질 D 에피토프를 코딩하는데, 상기 에피토프는 그 자신에 결합하는 특정 항체를 사용한 면역조직화학적 연구에 사용될 수 있다. CSR::T1R1 cDNA를 갖는 생성된 CSR::T1R1 벡터는 서열번호 2의 아미노산 서열(CSR::T1R1) 다음에 서열번호 6의 아미노산 서열(HSV 에피토프)이 (N-말단에서 C-말단 방향으로) 연결되어 있는 CSR::T1R1:HSV 단백질이 발현되게 한다.
- [0315] **실시예 3**
- [0316] CSR::T1R3 벡터 구축물의 제조
- [0317] CSR::T1R3 키메라 cDNA 벡터 구축물은 PCR에 의해 생성된 두 DNA 단편을 이 두 PCR 단편 내의 공통된 제한효소 부위를 통해 연결함으로써, 즉 hCaSR의 ATD 및 CRD를 함유하는 PCR 생성물(1-Lys⁶⁰¹)을, TMD 및 Arg⁶⁰⁹에서 시작되는 C-말단을 함유하는 T1R3의 단편인 PCR 생성물에 연결함으로써 생성하였다.
- [0318] CSR::T1R3 키메라 DNA의 제조를 용이하게 하기 위해, Bsiw I 부위를, 상기 두 단편을 형성하는 데 사용되는 프라이머에 도입하였다. 도입된 상기 부위, 완충제 중의 적절한 제한효소, 및 당업자에게 잘 공지되어 있는 조건을 이용하여 단편을 효소를 사용한 라이게이션으로 연결시켰다.
- [0319] 형성된 PCR-생성물/단편 내의 Bsiw I 부위는 hCaSR-ATD 단편의 C-말단과 T1R3 단편의 N-말단 사이에 위치하여, 상기 두 단편의 라이게이션을 허용한다. Bsiw 부위의 도입은 원래의 hT1R3의 Arg⁶⁰⁹/Ser⁶¹⁰이 Arg⁶⁰⁹/Thr⁶¹⁰으로 치환되어 있는 서열을 포함하는 벡터 구축물을 생성시킨다. 도입된 라이게이션 부위, 완충제 중의 적절한 제한효소, 및 당업자에게 잘 공지되어 있는 조건을 이용하여 단편을 효소를 사용한 라이게이션으로 연결시켰다.
- [0320] 플래티넘 Taq 하이 피델리티 중합효소 및 하기 서열번호 17 및 18의 특정 프라이머를 사용한 PCR을 이용하여 CSR::T1R3 키메라 cDNA 단편을 포함하는 단편을 증폭시켰다. 그 후, T1R3의 증폭된 PCR 생성물과 hCaSR의 증폭된 PCR 생성물(상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 형성됨)을 하기 프라이머에 표시된 제한 부위를 통해 라이게이션시켰다. F는 전방향 프라이머를 나타내고, R은 역방향 프라이머를 나타낸다. 밑줄친 문자는 PCR 생성물의 후속 라이게이션 및 서브클로닝을 위한 프라이머 내에 위치한 제한 부위를 표시한다:
- [0321] hCaSR-ATD F 및 hCaSR-ATD R: 상기 실시예 2에 기재된 서열번호 13 및 서열번호 14
- [0322] TAS1R3-단편 프라이머 F(서열번호 17): ATATCGTACGCGTTCCTGGCATGGGGC
- [0323] TAS1R3-단편 프라이머 R(서열번호 18): ATATGCGGCCGCACTCATGTTCCCTGATT
- [0324] PCR 증폭을 위한 주형은 인간 군상 유두 미각 조직으로부터 유래된 cDNA 라이브러리로부터 단리된, hCaSR(오리진 인코포레이티드(미국 소재)로부터 구입됨) 또는 hT1R3에 대한 전장 cDNA이었다. PCR 반응 파라미터는 다음과 같다: 94℃에서 5분; 이어서 94℃에서 45초, 54℃에서 15초 및 72℃에서 2분으로 구성된 35 주기; 및 이어서, 72℃에서 10분의 최종 연장 주기.
- [0325] 생성된 PCR 단편(이 PCR 생성물이 검증된 후 라이게이션을 수행함)을 겔 전기영동으로 분리하고, 정제하고 pCR-Topo-II 벡터(인비트로젠) 내로 서브클로닝하였다. 생성된 클론을 DNA 시퀀싱으로 검증하여 PCR 증폭으로부터 발생된 돌연변이의 부재를 확인하였다.

- [0326] 시퀀싱 후, 삽입물을 3-조각 라이게이션을 통해 pcDNA4-TO 벡터(인비트로젠(미국 소재)으로부터 구입됨)를 기초로 한 발현 카세트 벡터 구축물 내로 서브클로닝하여, CSR::T1R3 벡터 구축물을 형성하였다. 형성된 벡터 구축물의 C-말단은 HSV 당단백질 D 에피토프를 코딩하는데, 상기 에피토프는 그 자신에 결합하는 특정 항체를 사용한 면역조직화학적 연구에 사용될 수 있다. 생성된 벡터는 서열번호 4의 아미노산 서열(CSR::T1R3) 다음에 서열번호 6의 아미노산 서열(HSV 에피토프)이 (N-말단에서 C-말단 방향으로) 연결되어 있는 CSR:T1R3:HSV 단백질이 발현되게 한다.
- [0327] **실시예 4**
- [0328] CSR::T1R1/CSR::T1R3의 형질감염
- [0329] 사용된 형질감염된 벡터 구축물은 실시예 2 및 3에서 전술한 바와 같이 형성된 구축물이었다. hCaSR의 경우, 전장 cDNA를 기초로 한, 시판되는 pCMV-기재 벡터 구축물을 사용하였다(TRUECLONE 콜렉션, 오리진 인코포레이티드(미국 소재)).
- [0330] Gα16-구스트딘신 44를 안정하게 발현하는 HEK293T 세포(국제특허출원 공개 제WO 2004/055048호에 기재된 바와 같이 형성됨)를 CSR::T1R1, CSR::T1R3 구축물 또는 hCaSR로 다음과 같이 형질감염시켰다:
- [0331] 0일째 날, HEK293T/Gα16-구스트딘신 44 세포를 흑색 투명-바닥 96-웰 플레이트에 웰 당 8500개 세포 밀도로 플레이트팅하고 선별 생장 배지 중에서 밤새 생장시켰다. 1일째 날, 배지를 항생제-무함유 및 혈청-무함유 생장 배지로 바꾸고, 세포를 CSR::T1R1 및 CSR::T1R3(각각 75 ng 씩 총 150 ng), T1R1 및 T1R3(각각 75 ng 씩 총 150 ng), 또는 75 ng의 hCaSR 벡터 구축물 DNA 및 0.3 μl의 리포펙타민 2000(인비트로젠)으로 형질감염시켰다.
- [0332] hCaSR 벡터는 칼슘에 대한 감수성을 나타내고, 칼슘 결합 부위가 GPCR의 VFT에 위치하고 있기 때문에 칼슘에 대한 감수성을 나타내는 GPCR을 위한 양성 대조군으로서 사용되었는데, 이때 키메라에 대한 VFT는 GPCR로부터 유래된다.
- [0333] CSR::T1R1/CSR::T1R3 이중이량체의 형질감염을 위해, 각각 75 ng의 벡터 구축물을 1쌍 당 총 150 ng이 되도록 조합하여 리포펙타민 0.3 μl의 200과 함께 사용하였다. 75 ng의 hCaSR 벡터 DNA가 상기 칼슘-감지 단량체 GPCR을 위해 사용되었다.
- [0334] 상기 리포펙타민/DNA 혼합물을 3 내지 4시간 동안 세포와 함께 항온처리한 후, 배지를 항생제-무함유 및 혈청-함유 생장 배지로 바꾸었다. 세포를 밤새 생장시키고, Fluo-4 칼슘 분석을 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행하였다.
- [0335] 상기 벡터 구축물들 중 하나로 일시적으로 형질감염된 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 형광 이미징 플레이트 판독기(FLIPR-Tetra, 몰레큘라 디바이시스)를 이용하여 동정하였다.
- [0336] **실시예 5**
- [0337] 합성 우마미 수용체 작용제에 의한 CSR::T1R1 동중체 및 CSR::T1R1/CSR::T1R3의 활성화
- [0338] 다양한 리간드를 사용한 자극 후 세포내 칼슘 반응을, Gα16-구스트딘신 44를 안정하게 발현하고 CSR::T1R1 및/또는 CSR::T1R3 키메라 구축물로 형질감염된 HEK293T 세포에서 측정하였다. 결과를, 실시예 5에 기재된 hCaSR 벡터 구축물(단량체 hCaSR을 형성함)로 형질감염된 세포 또는 모의 형질감염된 세포에서 얻은 결과와 비교하였다.
- [0339] 형질감염을 실시예 4에 기재된 바와 같이 수행하였다. 결과는 실시예 1에 기재된 바와 같이 계산하였다(데이터는 자극 후 기준치를 초과하는 표준화된 증가(ΔF/F)를 표시하고, 6회의 반복 실험의 평균(AVG) 및 ± 표준 편차(STD)가 표시됨). 하기 리간드들은 형질감염된 세포를 자극하기 위해 괄호 안에 표시된 농도로 사용되었다: 염화칼슘(2 mM), N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드(CAS 번호 745047-97-6)(25 μM), 및 MSG(2.5 mM)와 IMP(0.2 mM)의 조합물(하기 표에서 "MSG+IMP"로 표시됨).
- [0340] 수득된 칼슘 이동 신호는 기준 형광도(F₀)로 표준화된 피크 형광도(F)의 증가이다. 데이터는 하기 수학적 식 3을 이용하여 표준화시킨다:
- [0341] 수학적 식 3
- [0342]
$$\Delta F/F = (F - F_0)/F_0$$

- [0343] 상기 식에서,
- [0344] F는 피크 형광도 신호이고,
- [0345] F₀는 기준 형광도 신호이며,
- [0346] 기준 형광도는 리간드 첨가 전에 측정된 평균 형광도로부터 산출된다. $\Delta F/F$ 값은 형질감염된 수용체와의 직접적 또는 간접적 상호작용("신호")에 반응한, 세포의 칼슘 증가에 상응한다.
- [0347] 우마미 수용체를 발현하지 않는 모의 형질감염된 HEK293T 세포 및 구축물로 형질감염되지 않은 Ga16-구스트릭신 44 세포를 단순히 배경에 상응하는 신호를 측정하기 위한 음성 대조군으로서 사용하였다.
- [0348] 형질감염된 세포를 표시된 우마미 수용체 작용제, 칼슘-감지 도메인을 함유하는 단백질을 위한 양성 대조군(칼슘), 및 음성 대조군(C1 완충제)에 노출시켰다.
- [0349] 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 하기 표 1은 시험된 다양한 벡터 구축물 각각에 대한 6회 반복 실험의 $\Delta F/F \pm$ STD의 평균 차이를 보여준다:

표 1

[0350]

	CSR::T1R1		CSR::T1R1/ CSR::T1R3		hCaSR		음성 대조군 (모의 형질감염)	
	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
양성 대조군 (칼슘)	0.78	0.06	0.72	0.08	1.44	0.33	0.24	0.02
745047-97-6-옥살아마이드	0.31	0.03	0.43	0.01	0.04	0.01	0.03	0.01
MSG+IMP	0.03	0.01	0.03	0.01	0.03	0.01	0.04	0.003
음성 대조군 (C1 완충제)	0.04	0.02	0.04	0.01	0.04	0.01	0.04	0.01
AVG는 평균 $\Delta F/F$ 를 나타내고, STD는 표준 편차를 나타낸다.								

- [0351] 음성 대조군/모의 형질감염은 배경 신호에 상응하는 신호 수준을 보여준다.
- [0352] 양성 대조군(칼슘)이 보여주는 바와 같이, 칼슘-감지 도메인을 갖는 모든 형질감염된 세포는 칼슘에 반응한다 (CSR::T1R1 동종체, CSR::T1R1/CSR::T1R3 이종이량체 및 hCaSR).
- [0353] MSG+IMP 혼합물을 사용한 자극 시 CSR::T1R1 키메라 동종체의 반응은 전혀 관찰되지 않았다. MSG+IMP의 경우, CSR::T1R 키메라의 반응 부재는 T1R1로부터 유래된 VFT 도메인, 즉 CSR::T1R 키메라에 존재하지 않으며 (이론에 구속받고자 하는 것은 아니지만) MSG 및 IMP에 대한 결합 부위를 함유하는 것으로 생각되는 도메인인의 부재에 기인할 수 있다.
- [0354] hCaSR 단백질은 염화칼슘에만 반응하였고 시험된 우마미 미각자극제에 의해 활성화될 수 없었다.
- [0355] 염화칼슘 및 N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드(CAS 번호 745047-97-6)의 경우, 신호의 유의한 증가가 CSR::T1R1 키메라 동종체 및 CSR::T1R1/CSR::T1R3 키메라 이종이량체를 발현하는 세포에서 관찰되었다. 모의 형질감염된 음성 대조군 또는 C1 완충제 음성 대조군에서는 반응이 전혀 관찰되지 않았다.
- [0356] CSR::T1R1/CSR::T1R3 키메라 이종이량체로 형질감염된 세포에서 검출된, 염화칼슘 및 N-(2-메톡시-4-메틸-벤질)-N'-(2-피리딘-2-일-에틸)-옥살아마이드(CAS 번호 745047-97-6) 신호는 음성 대조군(모의 형질감염된 HEK293T/Ga16-구스트릭신 44 세포)에서 관찰된 배경 신호보다 유의하게 높았고, hCaSR 수용체로 형질감염된 세포에서 관찰된 신호 크기의 약 50%이었다.
- [0357] 이 결과는 CSR::T1R1 키메라 동종체 및 CSR::T1R1/CSR::T1R3 키메라 이종이량체가 칼슘 및 N-(2-메톡시-4-메틸

수용체, 핵산, 폴리펩티드, 발현 벡터, 숙주 세포, 방법 및 키트가 일부 예시적 실시양태와 관련하여 전술되어 있지만, 다른 유사한 실시양태들이 이용될 수 있거나, 동일한 효과를 달성하기 위해 변경 및 부가를 상기 실시양태들에 가할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 다양한 실시양태들이 조합되어 원하는 특징을 제공할 수 있기 때문에 개시된 모든 실시양태들이 반드시 택일적으로 이용될 수 있는 것은 아니다. 당업자라면 개시내용의 기술적 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 변경을 가할 수 있다. 따라서, 수용체, 핵산, 폴리펩티드, 발현 벡터, 숙주 세포, 방법 및 키트는 임의의 단일 실시양태로 한정되어서는 안 되고, 오히려 첨부된 청구범위의 내용에 따라 넓게 해석되어야 한다.

SEQUENCE LISTING

– 29 –

20	25	30	
atc ctt ggg ggg ctc ttt cct att cat ttt gga gta gca gct aaa gat Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp 35 40 45			144
caa gat ctc aaa tca agg ccg gag tct gtg gaa tgt atc agg tat aat Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn 50 55 60			192
ttc cgt ggg ttt cgc tgg tta cag gct atg ata ttt gcc ata gag gag Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu 65 70 75 80			240
ata aac agc agc cca gcc ctt ctt ccc aac ttg acg ctg gga tac agg Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg 85 90 95			288
ata ttt gac act tgc aac acc gtt tct aag gcc ttg gaa gcc acc ctg Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu 100 105 110			336
agt ttt gtt gct caa aac aaa att gat tct ttg aac ctt gat gag ttc Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe 115 120 125			384
tgc aac tgc tca gag cac att ccc tct acg att gct gtg gtg gga gca Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala 130 135 140			432
act ggc tca ggc gtc tcc acg gca gtg gca aat ctg ctg ggg ctc ttc Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe 145 150 155 160			480
tac att ccc cag gtc agt tat gcc tcc tcc agc aga ctc ctc agc aac Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn 165 170 175			528
aag aat caa ttc aag tct ttc ctc cga acc atc ccc aat gat gag cac Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His 180 185 190			576
cag gcc act gcc atg gca gac atc atc gag tat ttc cgc tgg aac tgg Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp			624

195	200	205	
gtg ggc aca att gca gct gat gac gac tat ggg cgg ccg ggg att gag Val Gly Thr Ile Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu 210 215 220			672
aaa ttc cga gag gaa gct gag gaa agg gat atc tgc atc gac ttc agt Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser 225 230 235 240			720
gaa ctc atc tcc cag tac tct gat gag gaa gag atc cag cat gtg gta Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val 245 250 255			768
gag gtg att caa aat tcc acg gcc aaa gtc atc gtg gtt ttc tcc agt Glu Val Ile Gln Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser 260 265 270			816
ggc cca gat ctt gag ccc ctc atc aag gag att gtc cgg cgc aat atc Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile 275 280 285			864
acg ggc aag atc tgg ctg gcc agc gag gcc tgg gcc agc tcc tcc ctg Thr Gly Lys Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu 290 295 300			912
atc gcc atg cct cag tac ttc cac gtg gtt ggc ggc acc att gga ttc Ile Ala Met Pro Gln Tyr Phe His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe 305 310 315 320			960
gct ctg aag gct ggg cag atc cca ggc ttc cgg gaa ttc ctg aag aag Ala Leu Lys Ala Gly Gln Ile Pro Gly Phe Arg Glu Phe Leu Lys Lys 325 330 335			1008
gtc cat ccc agg aag tct gtc cac aat ggt ttt gcc aag gag ttt tgg Val His Pro Arg Lys Ser Val His Asn Gly Phe Ala Lys Glu Phe Trp 340 345 350			1056
gaa gaa aca ttt aac tgc cac ctc caa gaa ggt gca aaa gga cct tta Glu Glu Thr Phe Asn Cys His Leu Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu 355 360 365			1104
cct gtg gac acc ttt ctg aga ggt cac gaa gaa agt ggc gac agg ttt Pro Val Asp Thr Phe Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe 370 375 380 385			1152

370	375	380	
agc aac agc tcg aca gcc ttc cga ccc ctc tgt aca ggg gat gag aac			1200
Ser Asn Ser Ser Thr Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr Gly Asp Glu Asn			
385	390	395	400
atc agc agt gtc gag acc cct tac ata gat tac acg cat tta cgg ata			1248
Ile Ser Ser Val Glu Thr Pro Tyr Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile			
	405	410	415
tcc tac aat gtg tac tta gca gtc tac tcc att gcc cac gcc ttg caa			1296
Ser Tyr Asn Val Tyr Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln			
	420	425	430
gat ata tat acc tgc tta cct ggg aga ggg ctc ttc acc aat ggc tcc			1344
Asp Ile Tyr Thr Cys Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe Thr Asn Gly Ser			
	435	440	445
tgt gca gac atc aag aaa gtt gag gcg tgg cag gtc ctg aag cac cta			1392
Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu			
	450	455	460
cgg cat cta aac ttt aca aac aat atg ggg gag cag gtg acc ttt gat			1440
Arg His Leu Asn Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp			
465	470	475	480
gag tgt ggt gac ctg gtg ggg aac tat tcc atc atc aac tgg cac ctc			1488
Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Trp His Leu			
	485	490	495
tcc cca gag gat ggc tcc atc gtg ttt aag gaa gtc ggg tat tac aac			1536
Ser Pro Glu Asp Gly Ser Ile Val Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn			
	500	505	510
gtc tat gcc aag aag gga gaa aga ctc ttc atc aac gag gag aaa atc			1584
Val Tyr Ala Lys Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile			
	515	520	525
ctg tgg agt ggg ttc tcc agg gag gtg ccc ttc tcc aac tgc agc cga			1632
Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg			
	530	535	540
gac tgc ctg gca ggg acc agg aaa ggg atc att gag ggg gag ccc acc			1680
Asp Cys Leu Ala Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr			

545	550	555	560	
tgc tgc ttt gag tgt gtg gag tgt cct gat ggg gag tat agt gat gag				1728
Cys Cys Phe Glu Cys Val Glu Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Ser Asp Glu				
565	570	575		
aca gat gcc agt gcc tgt aac aag tgc cca gat gac ttc tgg tcc aat				1776
Thr Asp Ala Ser Ala Cys Asn Lys Cys Pro Asp Asp Phe Trp Ser Asn				
580	585	590		
gag aac cac acc tcc tgc att gcc aag cgt acg gtg ttt ttg gct ttg				1824
Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala Lys Arg Thr Val Phe Leu Ala Leu				
595	600	605		
cgt gag cac acc tct tgg gtg ctg ctg gca gct aac acg ctg ctg ctg				1872
Arg Glu His Thr Ser Trp Val Leu Leu Ala Ala Asn Thr Leu Leu Leu				
610	615	620		
ctg ctg ctg ctt ggg act gct ggc ctg ttt gcc tgg cac cta gac acc				1920
Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp His Leu Asp Thr				
625	630	635	640	
cct gtg gtg agg tca gca ggg ggc cgc ctg tgc ttt ctt atg ctg ggc				1968
Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu Met Leu Gly				
645	650	655		
tcc ctg gca gca ggt agt ggc agc ctc tat ggc ttc ttt ggg gaa ccc				2016
Ser Leu Ala Ala Gly Ser Gly Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Gly Glu Pro				
660	665	670		
aca agg cct gcg tgc ttg cta cgc cag gcc ctc ttt gcc ctt ggt ttc				2064
Thr Arg Pro Ala Cys Leu Leu Arg Gln Ala Leu Phe Ala Leu Gly Phe				
675	680	685		
acc atc ttc ctg tcc tgc ctg aca gtt cgc tca ttc caa cta atc atc				2112
Thr Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Val Arg Ser Phe Gln Leu Ile Ile				
690	695	700		
atc ttc aag ttt tcc acc aag gta cct aca ttc tac cac gcc tgg gtc				2160
Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr His Ala Trp Val				
705	710	715	720	
caa aac cac ggt gct ggc ctg ttt gtg atg atc agc tca gcg gcc cag				2208
Gln Asn His Gly Ala Gly Leu Phe Val Met Ile Ser Ser Ala Ala Gln				

725	730	735	
ctg ctt atc tgt cta act tgg ctg gtg gtg tgg acc cca ctg cct gct Leu Leu Ile Cys Leu Thr Trp Leu Val Val Trp Thr Pro Leu Pro Ala 740 745 750			2256
agg gaa tac cag cgc ttc ccc cat ctg gtg atg ctt gag tgc aca gag Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Met Leu Glu Cys Thr Glu 755 760 765			2304
acc aac tcc ctg ggc ttc ata ctg gcc ttc ctc tac aat ggc ctc ctc Thr Asn Ser Leu Gly Phe Ile Leu Ala Phe Leu Tyr Asn Gly Leu Leu 770 775 780			2352
tcc atc agt gcc ttt gcc tgc agc tac ctg ggt aag gac ttg cca gag Ser Ile Ser Ala Phe Ala Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Asp Leu Pro Glu 785 790 795 800			2400
aac tac aac gag gcc aaa tgt gtc acc ttc agc ctg ctc ttc aac ttc Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Phe Asn Phe 805 810 815			2448
gtg tcc tgg atc gcc ttc ttc acc acg gcc agc gtc tac gac ggc aag Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Thr Ala Ser Val Tyr Asp Gly Lys 820 825 830			2496
tac ctg cct gcg gcc aac atg atg gct ggg ctg agc agc ctg agc agc Tyr Leu Pro Ala Ala Asn Met Met Ala Gly Leu Ser Ser Leu Ser Ser 835 840 845			2544
ggc ttc ggt ggg tat ttt ctg cct aag tgc tac gtg atc ctc tgc cgc Gly Phe Gly Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu Cys Arg 850 855 860			2592
cca gac ctc aac agc aca gag cac ttc cag gcc tcc att cag gac tac Pro Asp Leu Asn Ser Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln Asp Tyr 865 870 875 880			2640
acg agg cgc tgc ggc tcc acc Thr Arg Arg Cys Gly Ser Thr 885			2661

<210> 2

<211> 887

<212> PRT
<213> human

<400> 2

Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His
1 5 10 15

Thr Ser Ala Tyr Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile
20 25 30

Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp
35 40 45

Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn
50 55 60

Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu
65 70 75 80

Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg
85 90 95

Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu
100 105 110

Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe
115 120 125

Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala
130 135 140

Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe
145 150 155 160

Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn
165 170 175

Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His
180 185 190

Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp
195 200 205

Val Gly Thr Ile Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu
210 215 220

Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser
225 230 235 240

Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val
245 250 255

Glu Val Ile Gln Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser
260 265 270

Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile
275 280 285

Thr Gly Lys Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu
290 295 300

Ile Ala Met Pro Gln Tyr Phe His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe
305 310 315 320

Ala Leu Lys Ala Gly Gln Ile Pro Gly Phe Arg Glu Phe Leu Lys Lys
325 330 335

Val His Pro Arg Lys Ser Val His Asn Gly Phe Ala Lys Glu Phe Trp
340 345 350

Glu Glu Thr Phe Asn Cys His Leu Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu
355 360 365

Pro Val Asp Thr Phe Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe
370 375 380

Ser Asn Ser Ser Thr Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr Gly Asp Glu Asn
385 390 395 400

Ile Ser Ser Val Glu Thr Pro Tyr Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile
405 410 415

Ser Tyr Asn Val Tyr Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln
420 425 430

Asp Ile Tyr Thr Cys Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe Thr Asn Gly Ser
435 440 445

Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu
450 455 460

Arg His Leu Asn Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp
465 470 475 480

Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Trp His Leu
485 490 495

Ser Pro Glu Asp Gly Ser Ile Val Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn
500 505 510

Val Tyr Ala Lys Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile
515 520 525

Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg
530 535 540

Asp Cys Leu Ala Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr
545 550 555 560

Cys Cys Phe Glu Cys Val Glu Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Ser Asp Glu
565 570 575

Thr Asp Ala Ser Ala Cys Asn Lys Cys Pro Asp Asp Phe Trp Ser Asn
580 585 590

Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala Lys Arg Thr Val Phe Leu Ala Leu
595 600 605

Arg Glu His Thr Ser Trp Val Leu Leu Ala Ala Asn Thr Leu Leu Leu
610 615 620

Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp His Leu Asp Thr
625 630 635 640

Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu Met Leu Gly
645 650 655

Ser Leu Ala Ala Gly Ser Gly Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Gly Glu Pro
660 665 670

Thr Arg Pro Ala Cys Leu Leu Arg Gln Ala Leu Phe Ala Leu Gly Phe
675 680 685

Thr Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Val Arg Ser Phe Gln Leu Ile Ile
690 695 700

Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr His Ala Trp Val
705 710 715 720

Gln Asn His Gly Ala Gly Leu Phe Val Met Ile Ser Ser Ala Ala Gln
725 730 735

Leu Leu Ile Cys Leu Thr Trp Leu Val Val Trp Thr Pro Leu Pro Ala
740 745 750

Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Met Leu Glu Cys Thr Glu
755 760 765

Thr Asn Ser Leu Gly Phe Ile Leu Ala Phe Leu Tyr Asn Gly Leu Leu
770 775 780

Ser Ile Ser Ala Phe Ala Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Asp Leu Pro Glu
785 790 795 800

Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Phe Asn Phe
805 810 815

Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Thr Ala Ser Val Tyr Asp Gly Lys
820 825 830

Tyr Leu Pro Ala Ala Asn Met Met Ala Gly Leu Ser Ser Leu Ser Ser
835 840 845

Gly Phe Gly Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu Cys Arg
850 855 860

Pro Asp Leu Asn Ser Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln Asp Tyr
865 870 875 880

Thr Arg Arg Cys Gly Ser Thr
885

<210> 3
<211> 2688
<212> DNA
<213> human

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2688)

<400> 3

atg gca ttt tat agc tgc tgc tgg gtc ctc ttg gca ctc acc tgg cac Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His 1 5 10 15	48
acc tct gcc tac ggg cca gac cag cga gcc caa aag aag ggg gac att Thr Ser Ala Tyr Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile 20 25 30	96
atc ctt ggg ggg ctc ttt cct att cat ttt gga gta gca gct aaa gat Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp 35 40 45	144
caa gat ctc aaa tca agg ccg gag tct gtg gaa tgt atc agg tat aat Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn 50 55 60	192
ttc cgt ggg ttt cgc tgg tta cag gct atg ata ttt gcc ata gag gag Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu 65 70 75 80	240
ata aac agc agc cca gcc ctt ctt ccc aac ttg acg ctg gga tac agg Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg 85 90 95	288
ata ttt gac act tgc aac acc gtt tct aag gcc ttg gaa gcc acc ctg Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu 100 105 110	336
agt ttt gtt gct caa aac aaa att gat tct ttg aac ctt gat gag ttc Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe 115 120 125	384
tgc aac tgc tca gag cac att ccc tct acg att gct gtg gtg gga gca Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala 130 135 140	432
act ggc tca ggc gtc tcc acg gca gtg gca aat ctg ctg ggg ctc ttc Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe 145 150 155 160	480
tac att ccc cag gtc agt tat gcc tcc tcc agc aga ctc ctc agc aac Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn 165 170 175	528
aag aat caa ttc aag tct ttc ctc cga acc atc ccc aat gat gag cac	576

Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His	
180 185 190	
cag gcc act gcc atg gca gac atc atc gag tat ttc cgc tgg aac tgg	624
Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp	
195 200 205	
gtg ggc aca att gca gct gat gac gac tat ggg cgg ccg ggg att gag	672
Val Gly Thr Ile Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu	
210 215 220	
aaa ttc cga gag gaa gct gag gaa agg gat atc tgc atc gac ttc agt	720
Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser	
225 230 235 240	
gaa ctc atc tcc cag tac tct gat gag gaa gag atc cag cat gtg gta	768
Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val	
245 250 255	
gag gtg att caa aat tcc acg gcc aaa gtc atc gtg gtt ttc tcc agt	816
Glu Val Ile Gln Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser	
260 265 270	
ggc cca gat ctt gag ccc ctc atc aag gag att gtc cgg cgc aat atc	864
Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile	
275 280 285	
acg ggc aag atc tgg ctg gcc agc gag gcc tgg gcc agc tcc tcc ctg	912
Thr Gly Lys Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu	
290 295 300	
atc gcc atg cct cag tac ttc cac gtg gtt ggc ggc acc att gga ttc	960
Ile Ala Met Pro Gln Tyr Phe His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe	
305 310 315 320	
gct ctg aag gct ggg cag atc cca ggc ttc cgg gaa ttc ctg aag aag	1008
Ala Leu Lys Ala Gly Gln Ile Pro Gly Phe Arg Glu Phe Leu Lys Lys	
325 330 335	
gtc cat ccc agg aag tct gtc cac aat ggt ttt gcc aag gag ttt tgg	1056
Val His Pro Arg Lys Ser Val His Asn Gly Phe Ala Lys Glu Phe Trp	
340 345 350	
gaa gaa aca ttt aac tgc cac ctc caa gaa ggt gca aaa gga cct tta	1104
Glu Glu Thr Phe Asn Cys His Leu Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu	

355	360	365	
cct gtg gac acc ttt ctg aga ggt cac gaa gaa agt ggc gac agg ttt			1152
Pro Val Asp Thr Phe Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe			
370	375	380	
agc aac agc tcg aca gcc ttc cga ccc ctc tgt aca ggg gat gag aac			1200
Ser Asn Ser Ser Thr Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr Gly Asp Glu Asn			
385	390	395	400
atc agc agt gtc gag acc cct tac ata gat tac acg cat tta cgg ata			1248
Ile Ser Ser Val Glu Thr Pro Tyr Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile			
405	410	415	
tcc tac aat gtg tac tta gca gtc tac tcc att gcc cac gcc ttg caa			1296
Ser Tyr Asn Val Tyr Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln			
420	425	430	
gat ata tat acc tgc tta cct ggg aga ggg ctc ttc acc aat ggc tcc			1344
Asp Ile Tyr Thr Cys Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe Thr Asn Gly Ser			
435	440	445	
tgt gca gac atc aag aaa gtt gag gcg tgg cag gtc ctg aag cac cta			1392
Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu			
450	455	460	
cgg cat cta aac ttt aca aac aat atg ggg gag cag gtg acc ttt gat			1440
Arg His Leu Asn Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp			
465	470	475	480
gag tgt ggt gac ctg gtg ggg aac tat tcc atc atc aac tgg cac ctc			1488
Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Trp His Leu			
485	490	495	
tcc cca gag gat ggc tcc atc gtg ttt aag gaa gtc ggg tat tac aac			1536
Ser Pro Glu Asp Gly Ser Ile Val Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn			
500	505	510	
gtc tat gcc aag aag gga gaa aga ctc ttc atc aac gag gag aaa atc			1584
Val Tyr Ala Lys Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile			
515	520	525	
ctg tgg agt ggg ttc tcc agg gag gtg ccc ttc tcc aac tgc agc cga			1632
Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg			

530	535	540	
gac tgc ctg gca ggg acc agg aaa ggg atc att gag ggg gag ccc acc			1680
Asp Cys Leu Ala Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr			
545	550	555	560
tgc tgc ttt gag tgt gtg gag tgt cct gat ggg gag tat agt gat gag			1728
Cys Cys Phe Glu Cys Val Glu Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Ser Asp Glu			
	565	570	575
aca gat gcc agt gcc tgt aac aag tgc cca gat gac ttc tgg tcc aat			1776
Thr Asp Ala Ser Ala Cys Asn Lys Cys Pro Asp Asp Phe Trp Ser Asn			
	580	585	590
gag aac cac acc tcc tgc att gcc aag cgt acg cgg ttc ctg gca tgg			1824
Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala Lys Arg Thr Arg Phe Leu Ala Trp			
	595	600	605
ggc gag ccg gct gtg ctg ctg ctg ctc ctg ctg ctg agc ctg gcg ctg			1872
Gly Glu Pro Ala Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu			
610	615	620	
ggc ctt gtg ctg gct gct ttg ggg ctg ttc gtt cac cat cgg gac agc			1920
Gly Leu Val Leu Ala Ala Leu Gly Leu Phe Val His His Arg Asp Ser			
625	630	635	640
cca ctg gtt cag gcc tcg ggg ggg ccc ctg gcc tgc ttt ggc ctg gtg			1968
Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Phe Gly Leu Val			
	645	650	655
tgc ctg ggc ctg gtc tgc ctc agc gtc ctc ctg ttc cct ggc cag ccc			2016
Cys Leu Gly Leu Val Cys Leu Ser Val Leu Leu Phe Pro Gly Gln Pro			
	660	665	670
agc cct gcc cga tgc ctg gcc cag cag ccc ttg tcc cac ctc ccg ctc			2064
Ser Pro Ala Arg Cys Leu Ala Gln Gln Pro Leu Ser His Leu Pro Leu			
	675	680	685
acg ggc tgc ctg agc aca ctc ttc ctg cag gcg gcc gag atc ttc gtg			2112
Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu Phe Leu Gln Ala Ala Glu Ile Phe Val			
690	695	700	
gag tca gaa ctg cct ctg agc tgg gca gac cgg ctg agt ggc tgc ctg			2160
Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser Trp Ala Asp Arg Leu Ser Gly Cys Leu			

705	710	715	720	
cgg ggg ccc tgg gcc tgg ctg gtg gtg ctg ctg gcc atg ctg gtg gag				2208
Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu Val Val Leu Leu Ala Met Leu Val Glu				
	725	730	735	
gtc gca ctg tgc acc tgg tac ctg gtg gcc ttc ccg ccg gag gtg gtg				2256
Val Ala Leu Cys Thr Trp Tyr Leu Val Ala Phe Pro Pro Glu Val Val				
	740	745	750	
acg gac tgg cac atg ctg ccc acg gag gcg ctg gtg cac tgc cgc aca				2304
Thr Asp Trp His Met Leu Pro Thr Glu Ala Leu Val His Cys Arg Thr				
	755	760	765	
cgc tcc tgg gtc agc ttc ggc cta gcg cac gcc acc aat gcc acg ctg				2352
Arg Ser Trp Val Ser Phe Gly Leu Ala His Ala Thr Asn Ala Thr Leu				
	770	775	780	
gcc ttt ctc tgc ttc ctg ggc act ttc ctg gtg ccg agc cag ccg ggc				2400
Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly Thr Phe Leu Val Arg Ser Gln Pro Gly				
	785	790	795	800
cgc tac aac cgt gcc cgt ggc ctc acc ttt gcc atg ctg gcc tac ttc				2448
Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly Leu Thr Phe Ala Met Leu Ala Tyr Phe				
	805	810	815	
atc acc tgg gtc tcc ttt gtg ccc ctc ctg gcc aat gtg cag gtg gtc				2496
Ile Thr Trp Val Ser Phe Val Pro Leu Leu Ala Asn Val Gln Val Val				
	820	825	830	
ctc agg ccc gcc gtg cag atg ggc gcc ctc ctg ctc tgt gtc ctg ggc				2544
Leu Arg Pro Ala Val Gln Met Gly Ala Leu Leu Leu Cys Val Leu Gly				
	835	840	845	
atc ctg gct gcc ttc cac ctg ccc agg tgt tac ctg ctc atg cgg cag				2592
Ile Leu Ala Ala Phe His Leu Pro Arg Cys Tyr Leu Leu Met Arg Gln				
	850	855	860	
cca ggg ctc aac acc ccc gag ttc ttc ctg gga ggg ggc cct ggg gat				2640
Pro Gly Leu Asn Thr Pro Glu Phe Phe Leu Gly Gly Gly Pro Gly Asp				
	865	870	875	880
gcc caa ggc cag aat gac ggg aac aca gga aat cag ggg aaa cat gag				2688
Ala Gln Gly Gln Asn Asp Gly Asn Thr Gly Asn Gln Gly Lys His Glu				

885

890

895

<210> 4
<211> 896
<212> PRT
<213> human

<400> 4

Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His
1 5 10 15

Thr Ser Ala Tyr Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile
20 25 30

Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp
35 40 45

Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn
50 55 60

Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu
65 70 75 80

Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg
85 90 95

Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu
100 105 110

Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe
115 120 125

Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala
130 135 140

Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe
145 150 155 160

Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn
165 170 175

Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His
180 185 190

Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp
195 200 205

Val Gly Thr Ile Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu
210 215 220

Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser
225 230 235 240

Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val
245 250 255

Glu Val Ile Gln Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser
260 265 270

Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile
275 280 285

Thr Gly Lys Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu
290 295 300

Ile Ala Met Pro Gln Tyr Phe His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe
305 310 315 320

Ala Leu Lys Ala Gly Gln Ile Pro Gly Phe Arg Glu Phe Leu Lys Lys
325 330 335

Val His Pro Arg Lys Ser Val His Asn Gly Phe Ala Lys Glu Phe Trp

340

345

350

Glu Glu Thr Phe Asn Cys His Leu Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu
355 360 365

Pro Val Asp Thr Phe Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe
370 375 380

Ser Asn Ser Ser Thr Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr Gly Asp Glu Asn
385 390 395 400

Ile Ser Ser Val Glu Thr Pro Tyr Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile
405 410 415

Ser Tyr Asn Val Tyr Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln
420 425 430

Asp Ile Tyr Thr Cys Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe Thr Asn Gly Ser
435 440 445

Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu
450 455 460

Arg His Leu Asn Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp
465 470 475 480

Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Trp His Leu
485 490 495

Ser Pro Glu Asp Gly Ser Ile Val Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn
500 505 510

Val Tyr Ala Lys Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile
515 520 525

Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg

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

Val Ala Leu Cys Thr Trp Tyr Leu Val Ala Phe Pro Pro Glu Val Val
740 745 750

Thr Asp Trp His Met Leu Pro Thr Glu Ala Leu Val His Cys Arg Thr
755 760 765

Arg Ser Trp Val Ser Phe Gly Leu Ala His Ala Thr Asn Ala Thr Leu
770 775 780

Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly Thr Phe Leu Val Arg Ser Gln Pro Gly
785 790 795 800

Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly Leu Thr Phe Ala Met Leu Ala Tyr Phe
805 810 815

Ile Thr Trp Val Ser Phe Val Pro Leu Leu Ala Asn Val Gln Val Val
820 825 830

Leu Arg Pro Ala Val Gln Met Gly Ala Leu Leu Leu Cys Val Leu Gly
835 840 845

Ile Leu Ala Ala Phe His Leu Pro Arg Cys Tyr Leu Leu Met Arg Gln
850 855 860

Pro Gly Leu Asn Thr Pro Glu Phe Phe Leu Gly Gly Gly Pro Gly Asp
865 870 875 880

Ala Gln Gly Gln Asn Asp Gly Asn Thr Gly Asn Gln Gly Lys His Glu
885 890 895

<210> 5

<211> 51

<212> DNA

<213> herpes simplex virus

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(51)

<400> 5
tgc ggc cgc cag cct gaa ctc gct cct gaa gac ccg gaa gat taa tct 48
Cys Gly Arg Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp Ser
1 5 10 15

aga 51
Arg

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> herpes simplex virus

<400> 6

Cys Gly Arg Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
1 5 10

<210> 7
<211> 2526
<212> DNA
<213> human

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2526)

<400> 7
atg ctg ctc tgc acg gct cgc ctg gtc ggc ctg cag ctt ctc att tcc 48
Met Leu Leu Cys Thr Ala Arg Leu Val Gly Leu Gln Leu Leu Ile Ser
1 5 10 15

tgc tgc tgg gcc ttt gcc tgc cat agc acg gag tct tct cct gac ttc 96
Cys Cys Trp Ala Phe Ala Cys His Ser Thr Glu Ser Ser Pro Asp Phe
20 25 30

acc ctc ccc gga gat tac ctc ctg gca ggc ctg ttc cct ctc cat tct 144
Thr Leu Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Ala Gly Leu Phe Pro Leu His Ser
35 40 45

ggc tgt ctg cag gtg agg cac aga ccc gag gtg acc ctg tgt gac agg Gly Cys Leu Gln Val Arg His Arg Pro Glu Val Thr Leu Cys Asp Arg 50 55 60	192
tct tgt agc ttc aat gag cat ggc tac cac ctc ttc cag gct atg cgg Ser Cys Ser Phe Asn Glu His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met Arg 65 70 75 80	240
ctt ggg gtt gag gag ata aac aac tcc acg gcc ctg ctg ccc aac atc Leu Gly Val Glu Glu Ile Asn Asn Ser Thr Ala Leu Leu Pro Asn Ile 85 90 95	288
acc ctg ggg tac cag ctg tat gat gtg tgt tct gac tct gcc aat gtg Thr Leu Gly Tyr Gln Leu Tyr Asp Val Cys Ser Asp Ser Ala Asn Val 100 105 110	336
tat gcc acg ctg aga gtg ctc tcc ctg cca ggg caa cac cac ata gag Tyr Ala Thr Leu Arg Val Leu Ser Leu Pro Gly Gln His His Ile Glu 115 120 125	384
ctc caa gga gac ctt ctc cac tat tcc cct acg gtg ctg gca gtg att Leu Gln Gly Asp Leu Leu His Tyr Ser Pro Thr Val Leu Ala Val Ile 130 135 140	432
ggg cct gac agc acc aac cgt gct gcc acc aca gcc gcc ctg ctg agc Gly Pro Asp Ser Thr Asn Arg Ala Ala Thr Thr Ala Ala Leu Leu Ser 145 150 155 160	480
cct ttc ctg gtg ccc atg att agc tat gcg gcc agc agc gag acg ctc Pro Phe Leu Val Pro Met Ile Ser Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Thr Leu 165 170 175	528
agc gtg aag cgg cag tat ccc tct ttc ctg cgc acc atc ccc aat gac Ser Val Lys Arg Gln Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp 180 185 190	576
aag tac cag gtg gag acc atg gtg ctg ctg ctg cag aag ttc ggg tgg Lys Tyr Gln Val Glu Thr Met Val Leu Leu Leu Gln Lys Phe Gly Trp 195 200 205	624
acc tgg atc tct ctg gtt ggc agc agt gac gac tat ggg cag cta ggg Thr Trp Ile Ser Leu Val Gly Ser Ser Asp Asp Tyr Gly Gln Leu Gly 210 215 220	672

gtg cag gca ctg gag aac cag gcc act ggt cag ggg atc tgc att gct Val Gln Ala Leu Glu Asn Gln Ala Thr Gly Gln Gly Ile Cys Ile Ala 225 230 235 240	720
ttc aag gac atc atg ccc ttc tct gcc cag gtg ggc gat gag agg atg Phe Lys Asp Ile Met Pro Phe Ser Ala Gln Val Gly Asp Glu Arg Met 245 250 255	768
cag tgc ctc atg cgc cac ctg gcc cag gcc ggg gcc acc gtc gtg gtt Gln Cys Leu Met Arg His Leu Ala Gln Ala Gly Ala Thr Val Val Val 260 265 270	816
gtt ttt tcc agc cgg cag ttg gcc agg gtg ttt ttc gag tcc gtg gtg Val Phe Ser Ser Arg Gln Leu Ala Arg Val Phe Phe Glu Ser Val Val 275 280 285	864
ctg acc aac ctg act ggc aag gtg tgg gtc gcc tca gaa gcc tgg gcc Leu Thr Asn Leu Thr Gly Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Ala 290 295 300	912
ctc tcc agg cac atc act ggg gtg ccc ggg atc cag cgc att ggg atg Leu Ser Arg His Ile Thr Gly Val Pro Gly Ile Gln Arg Ile Gly Met 305 310 315 320	960
gtg ctg ggc gtg gcc atc cag aag agg gct gtc cct ggc ctg aag gcg Val Leu Gly Val Ala Ile Gln Lys Arg Ala Val Pro Gly Leu Lys Ala 325 330 335	1008
ttt gaa gaa gcc tat gcc cgg gca gac aag aag gcc cct agg cct tgc Phe Glu Glu Ala Tyr Ala Arg Ala Asp Lys Lys Ala Pro Arg Pro Cys 340 345 350	1056
cac aag ggc tcc tgg tgc agc agc aat cag ctc tgc aga gaa tgc caa His Lys Gly Ser Trp Cys Ser Ser Asn Gln Leu Cys Arg Glu Cys Gln 355 360 365	1104
gct ttc atg gca cac acg atg ccc aag ctc aaa gcc ttc tcc atg agt Ala Phe Met Ala His Thr Met Pro Lys Leu Lys Ala Phe Ser Met Ser 370 375 380	1152
tct gcc tac aac gca tac cgg gct gtg tat gcg gtg gcc cat ggc ctc Ser Ala Tyr Asn Ala Tyr Arg Ala Val Tyr Ala Val Ala His Gly Leu 385 390 395 400	1200

cac cag ctc ctg ggc tgt gcc tct gga gct tgt tcc agg ggc cga gtc His Gln Leu Leu Gly Cys Ala Ser Gly Ala Cys Ser Arg Gly Arg Val 405 410 415	1248
tac ccc tgg cag ctt ttg gag cag atc cac aag gtg cat ttc ctt cta Tyr Pro Trp Gln Leu Leu Glu Gln Ile His Lys Val His Phe Leu Leu 420 425 430	1296
cac aag gac act gtg gcg ttt aat gac aac aga gat ccc ctc agt agc His Lys Asp Thr Val Ala Phe Asn Asp Asn Arg Asp Pro Leu Ser Ser 435 440 445	1344
tat aac ata att gcc tgg gac tgg aat gga ccc aag tgg acc ttc acg Tyr Asn Ile Ile Ala Trp Asp Trp Asn Gly Pro Lys Trp Thr Phe Thr 450 455 460	1392
gtc ctc ggt tcc tcc aca tgg tct cca gtt cag cta aac ata aat gag Val Leu Gly Ser Ser Thr Trp Ser Pro Val Gln Leu Asn Ile Asn Glu 465 470 475 480	1440
acc aaa atc cag tgg cac gga aag gac aac cag gtg cct aag tct gtg Thr Lys Ile Gln Trp His Gly Lys Asp Asn Gln Val Pro Lys Ser Val 485 490 495	1488
tgt tcc agc gac tgt ctt gaa ggg cac cag cga gtg gtt acg ggt ttc Cys Ser Ser Asp Cys Leu Glu Gly His Gln Arg Val Val Thr Gly Phe 500 505 510	1536
cat cac tgc tgc ttt gag tgt gtg ccc tgt ggg gct ggg acc ttc ctc His His Cys Cys Phe Glu Cys Val Pro Cys Gly Ala Gly Thr Phe Leu 515 520 525	1584
aac aag agt gac ctc tac aga tgc cag cct tgt ggg aaa gaa gag tgg Asn Lys Ser Asp Leu Tyr Arg Cys Gln Pro Cys Gly Lys Glu Glu Trp 530 535 540	1632
gca cct gag gga agc cag acc tgc ttc ccg cgc act gtg gtg ttt ttg Ala Pro Glu Gly Ser Gln Thr Cys Phe Pro Arg Thr Val Val Phe Leu 545 550 555 560	1680
gct ttg cgt gag cac acc tct tgg gtg ctg ctg gca gct aac acg ctg Ala Leu Arg Glu His Thr Ser Trp Val Leu Leu Ala Ala Asn Thr Leu 565 570 575	1728

ctg ctg ctg ctg ctg ctt ggg act gct ggc ctg ttt gcc tgg cac cta Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Gly Leu Phe Ala Trp His Leu 580 585 590	1776
gac acc cct gtg gtg agg tca gca ggg ggc cgc ctg tgc ttt ctt atg Asp Thr Pro Val Val Arg Ser Ala Gly Gly Arg Leu Cys Phe Leu Met 595 600 605	1824
ctg ggc tcc ctg gca gca ggt agt ggc agc ctc tat ggc ttc ttt ggg Leu Gly Ser Leu Ala Ala Gly Ser Gly Ser Leu Tyr Gly Phe Phe Gly 610 615 620	1872
gaa ccc aca agg cct gcg tgc ttg cta cgc cag gcc ctc ttt gcc ctt Glu Pro Thr Arg Pro Ala Cys Leu Leu Arg Gln Ala Leu Phe Ala Leu 625 630 635 640	1920
ggt ttc acc atc ttc ctg tcc tgc ctg aca gtt cgc tca ttc caa cta Gly Phe Thr Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Val Arg Ser Phe Gln Leu 645 650 655	1968
atc atc atc ttc aag ttt tcc acc aag gta cct aca ttc tac cac gcc Ile Ile Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr His Ala 660 665 670	2016
tgg gtc caa aac cac ggt gct ggc ctg ttt gtg atg atc agc tca gcg Trp Val Gln Asn His Gly Ala Gly Leu Phe Val Met Ile Ser Ser Ala 675 680 685	2064
gcc cag ctg ctt atc tgt cta act tgg ctg gtg gtg tgg acc cca ctg Ala Gln Leu Leu Ile Cys Leu Thr Trp Leu Val Val Trp Thr Pro Leu 690 695 700	2112
cct gct agg gaa tac cag cgc ttc ccc cat ctg gtg atg ctt gag tgc Pro Ala Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Met Leu Glu Cys 705 710 715 720	2160
aca gag acc aac tcc ctg ggc ttc ata ctg gcc ttc ctc tac aat ggc Thr Glu Thr Asn Ser Leu Gly Phe Ile Leu Ala Phe Leu Tyr Asn Gly 725 730 735	2208
ctc ctc tcc atc agt gcc ttt gcc tgc agc tac ctg ggt aag gac ttg Leu Leu Ser Ile Ser Ala Phe Ala Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Asp Leu 740 745 750	2256

cca gag aac tac aac gag gcc aaa tgt gtc acc ttc agc ctg ctc ttc 2304
Pro Glu Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Phe
755 760 765

aac ttc gtg tcc tgg atc gcc ttc ttc acc acg gcc agc gtc tac gac 2352
Asn Phe Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Thr Ala Ser Val Tyr Asp
770 775 780

ggc aag tac ctg cct gcg gcc aac atg atg gct ggg ctg agc agc ctg 2400
Gly Lys Tyr Leu Pro Ala Ala Asn Met Met Ala Gly Leu Ser Ser Leu
785 790 795 800

agc agc ggc ttc ggt ggg tat ttt ctg cct aag tgc tac gtg atc ctc 2448
Ser Ser Gly Phe Gly Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu
805 810 815

tgc cgc cca gac ctc aac agc aca gag cac ttc cag gcc tcc att cag 2496
Cys Arg Pro Asp Leu Asn Ser Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln
820 825 830

gac tac acg agg cgc tgc ggc tcc acc tga 2526
Asp Tyr Thr Arg Arg Cys Gly Ser Thr
835 840

<210> 8
<211> 841
<212> PRT
<213> human

<400> 8

Met Leu Leu Cys Thr Ala Arg Leu Val Gly Leu Gln Leu Leu Ile Ser
1 5 10 15

Cys Cys Trp Ala Phe Ala Cys His Ser Thr Glu Ser Ser Pro Asp Phe
20 25 30

Thr Leu Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Ala Gly Leu Phe Pro Leu His Ser
35 40 45

Gly Cys Leu Gln Val Arg His Arg Pro Glu Val Thr Leu Cys Asp Arg
50 55 60

Ser Cys Ser Phe Asn Glu His Gly Tyr His Leu Phe Gln Ala Met Arg
65 70 75 80

Leu Gly Val Glu Glu Ile Asn Asn Ser Thr Ala Leu Leu Pro Asn Ile
85 90 95

Thr Leu Gly Tyr Gln Leu Tyr Asp Val Cys Ser Asp Ser Ala Asn Val
100 105 110

Tyr Ala Thr Leu Arg Val Leu Ser Leu Pro Gly Gln His His Ile Glu
115 120 125

Leu Gln Gly Asp Leu Leu His Tyr Ser Pro Thr Val Leu Ala Val Ile
130 135 140

Gly Pro Asp Ser Thr Asn Arg Ala Ala Thr Thr Ala Ala Leu Leu Ser
145 150 155 160

Pro Phe Leu Val Pro Met Ile Ser Tyr Ala Ala Ser Ser Glu Thr Leu
165 170 175

Ser Val Lys Arg Gln Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp
180 185 190

Lys Tyr Gln Val Glu Thr Met Val Leu Leu Leu Gln Lys Phe Gly Trp
195 200 205

Thr Trp Ile Ser Leu Val Gly Ser Ser Asp Asp Tyr Gly Gln Leu Gly
210 215 220

Val Gln Ala Leu Glu Asn Gln Ala Thr Gly Gln Gly Ile Cys Ile Ala
225 230 235 240

Phe Lys Asp Ile Met Pro Phe Ser Ala Gln Val Gly Asp Glu Arg Met

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

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

625	630	635	640	
Gly Phe Thr Ile Phe Leu Ser Cys Leu Thr Val Arg Ser Phe Gln Leu	645	650	655	
Ile Ile Ile Phe Lys Phe Ser Thr Lys Val Pro Thr Phe Tyr His Ala	660	665	670	
Trp Val Gln Asn His Gly Ala Gly Leu Phe Val Met Ile Ser Ser Ala	675	680	685	
Ala Gln Leu Leu Ile Cys Leu Thr Trp Leu Val Val Trp Thr Pro Leu	690	695	700	
Pro Ala Arg Glu Tyr Gln Arg Phe Pro His Leu Val Met Leu Glu Cys	705	710	715	720
Thr Glu Thr Asn Ser Leu Gly Phe Ile Leu Ala Phe Leu Tyr Asn Gly	725	730	735	
Leu Leu Ser Ile Ser Ala Phe Ala Cys Ser Tyr Leu Gly Lys Asp Leu	740	745	750	
Pro Glu Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Cys Val Thr Phe Ser Leu Leu Phe	755	760	765	
Asn Phe Val Ser Trp Ile Ala Phe Phe Thr Thr Ala Ser Val Tyr Asp	770	775	780	
Gly Lys Tyr Leu Pro Ala Ala Asn Met Met Ala Gly Leu Ser Ser Leu	785	790	795	800
Ser Ser Gly Phe Gly Gly Tyr Phe Leu Pro Lys Cys Tyr Val Ile Leu	805	810	815	
Cys Arg Pro Asp Leu Asn Ser Thr Glu His Phe Gln Ala Ser Ile Gln	820	825	830	

Asp Tyr Thr Arg Arg Cys Gly Ser Thr
835 840

<210> 9
<211> 2559
<212> DNA
<213> human

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2559)

<400> 9
atg ctg ggc cct gct gtc ctg ggc ctc agc ctc tgg gct ctc ctg cac 48
Met Leu Gly Pro Ala Val Leu Gly Leu Ser Leu Trp Ala Leu Leu His
1 5 10 15

cct ggg acg ggg gcc cca ttg tgc ctg tca cag caa ctt agg atg aag 96
Pro Gly Thr Gly Ala Pro Leu Cys Leu Ser Gln Gln Leu Arg Met Lys
20 25 30

ggg gac tac gtg ctg ggg ggg ctg ttc ccc ctg ggc gag gcc gag gag 144
Gly Asp Tyr Val Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Glu Ala Glu Glu
35 40 45

gct ggc ctc cgc agc cgg aca cgg ccc agc agc cct gtg tgc acc agg 192
Ala Gly Leu Arg Ser Arg Thr Arg Pro Ser Ser Pro Val Cys Thr Arg
50 55 60

ttc tcc tca aac ggc ctg ctc tgg gca ctg gcc atg aaa atg gcc gtg 240
Phe Ser Ser Asn Gly Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Lys Met Ala Val
65 70 75 80

gag gag atc aac aac aag tcg gat ctg ctg ccc ggg ctg cgc ctg ggc 288
Glu Glu Ile Asn Asn Lys Ser Asp Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly
85 90 95

tac gac ctc ttt gat acg tgc tcg gag cct gtg gtg gcc atg aag ccc 336
Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Ala Met Lys Pro
100 105 110

agc ctc atg ttc ctg gcc aag gca ggc agc cgc gac atc gcc gcc tac Ser Leu Met Phe Leu Ala Lys Ala Gly Ser Arg Asp Ile Ala Ala Tyr 115 120 125	384
tgc aac tac acg cag tac cag ccc cgt gtg ctg gct gtc atc ggg ccc Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro 130 135 140	432
cac tcg tca gag ctc gcc atg gtc acc ggc aag ttc ttc agc ttc ttc His Ser Ser Glu Leu Ala Met Val Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe 145 150 155 160	480
ctc atg ccc cag gtc agc tac ggt gct agc atg gag ctg ctg agc gcc Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Gly Ala Ser Met Glu Leu Leu Ser Ala 165 170 175	528
cgg gag acc ttc ccc tcc ttc ttc cgc acc gtg ccc agc gac cgt gtg Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val 180 185 190	576
cag ctg acg gcc gcc gcg gag ctg ctg cag gag ttc ggc tgg aac tgg Gln Leu Thr Ala Ala Ala Glu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Trp Asn Trp 195 200 205	624
gtg gcc gcc ctg ggc agc gac gac gag tac ggc cgg cag ggc ctg agc Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Glu Tyr Gly Arg Gln Gly Leu Ser 210 215 220	672
atc ttc tcg gcc ctg gcc gcg gca cgc ggc atc tgc atc gcg cac gag Ile Phe Ser Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu 225 230 235 240	720
ggc ctg gtg ccg ctg ccc cgt gcc gat gac tcg cgg ctg ggg aag gtg Gly Leu Val Pro Leu Pro Arg Ala Asp Asp Ser Arg Leu Gly Lys Val 245 250 255	768
cag gac gtc ctg cac cag gtg aac cag agc agc gtg cag gtg gtg ctg Gln Asp Val Leu His Gln Val Asn Gln Ser Ser Val Gln Val Val Leu 260 265 270	816
ctg ttc gcc tcc gtg cac gcc gcc cac gcc ctc ttc aac tac agc atc Leu Phe Ala Ser Val His Ala Ala His Ala Leu Phe Asn Tyr Ser Ile 275 280 285	864
agc agc agg ctc tcg ccc aag gtg tgg gtg gcc agc gag gcc tgg ctg	912

Ser Ser Arg Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Leu	
290 295 300	
acc tct gac ctg gtc atg ggg ctg ccc ggc atg gcc cag atg ggc acg	960
Thr Ser Asp Leu Val Met Gly Leu Pro Gly Met Ala Gln Met Gly Thr	
305 310 315 320	
gtg ctt ggc ttc ctc cag agg ggt gcc cag ctg cac gag ttc ccc cag	1008
Val Leu Gly Phe Leu Gln Arg Gly Ala Gln Leu His Glu Phe Pro Gln	
325 330 335	
tac gtg aag acg cac ctg gcc ctg gcc acc gac ccg gcc ttc tgc tct	1056
Tyr Val Lys Thr His Leu Ala Leu Ala Thr Asp Pro Ala Phe Cys Ser	
340 345 350	
gcc ctg ggc gag agg gag cag ggt ctg gag gag gac gtg gtg ggc cag	1104
Ala Leu Gly Glu Arg Glu Gln Gly Leu Glu Glu Asp Val Val Gly Gln	
355 360 365	
cgc tgc ccg cag tgt gac tgc atc acg ctg cag aac gtg agc gca ggg	1152
Arg Cys Pro Gln Cys Asp Cys Ile Thr Leu Gln Asn Val Ser Ala Gly	
370 375 380	
cta aat cac cac cag acg ttc tct gtc tac gca gct gtg tat agc gtg	1200
Leu Asn His His Gln Thr Phe Ser Val Tyr Ala Ala Val Tyr Ser Val	
385 390 395 400	
gcc cag gcc ctg cac aac act ctt cag tgc aac gcc tca ggc tgc ccc	1248
Ala Gln Ala Leu His Asn Thr Leu Gln Cys Asn Ala Ser Gly Cys Pro	
405 410 415	
gcg cag gac ccc gtg aag ccc tgg cag ctc ctg gag aac atg tac aac	1296
Ala Gln Asp Pro Val Lys Pro Trp Gln Leu Leu Glu Asn Met Tyr Asn	
420 425 430	
ctg acc ttc cac gtg ggc ggg ctg ccg ctg cgg ttc gac agc agc gga	1344
Leu Thr Phe His Val Gly Gly Leu Pro Leu Arg Phe Asp Ser Ser Gly	
435 440 445	
aac gtg gac atg gag tac gac ctg aag ctg tgg gtg tgg cag ggc tca	1392
Asn Val Asp Met Glu Tyr Asp Leu Lys Leu Trp Val Trp Gln Gly Ser	
450 455 460	
gtg ccc agg ctc cac gac gtg ggc agg ttc aac ggc agc ctc agg aca	1440
Val Pro Arg Leu His Asp Val Gly Arg Phe Asn Gly Ser Leu Arg Thr	

465	470	475	480	
gag cgc ctg aag atc cgc tgg cac acg tct gac aac cag aag ccc gtg				1488
Glu Arg Leu Lys Ile Arg Trp His Thr Ser Asp Asn Gln Lys Pro Val				
	485	490	495	
tcc cgg tgc tgc cgg cag tgc cag gag ggc cag gtg cgc cgg gtc aag				1536
Ser Arg Cys Ser Arg Gln Cys Gln Glu Gly Gln Val Arg Arg Val Lys				
	500	505	510	
ggg ttc cac tcc tgc tgc tac gac tgt gtg gac tgc gag gcg ggc agc				1584
Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp Cys Glu Ala Gly Ser				
	515	520	525	
tac cgg caa aac cca gac gac atc gcc tgc acc ttt tgt ggc cag gat				1632
Tyr Arg Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ala Cys Thr Phe Cys Gly Gln Asp				
	530	535	540	
gag tgg tcc ccg gag cga agc aca cgc tgc ttc cgc cgc agg tct cgg				1680
Glu Trp Ser Pro Glu Arg Ser Thr Arg Cys Phe Arg Arg Arg Ser Arg				
	545	550	555	560
ttc ctg gca tgg ggc gag ccg gct gtg ctg ctg ctg ctc ctg ctg ctg				1728
Phe Leu Ala Trp Gly Glu Pro Ala Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu				
	565	570	575	
agc ctg gcg ctg ggc ctt gtg ctg gct gct ttg ggg ctg ttc gtt cac				1776
Ser Leu Ala Leu Gly Leu Val Leu Ala Ala Leu Gly Leu Phe Val His				
	580	585	590	
cat cgg gac agc cca ctg gtt cag gcc tgc ggg ggg ccc ctg gcc tgc				1824
His Arg Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys				
	595	600	605	
ttt ggc ctg gtg tgc ctg ggc ctg gtc tgc ctc agc gtc ctc ctg ttc				1872
Phe Gly Leu Val Cys Leu Gly Leu Val Cys Leu Ser Val Leu Leu Phe				
	610	615	620	
cct ggc cag ccc agc cct gcc cga tgc ctg gcc cag cag ccc ttg tcc				1920
Pro Gly Gln Pro Ser Pro Ala Arg Cys Leu Ala Gln Gln Pro Leu Ser				
	625	630	635	640
cac ctc ccg ctc acg ggc tgc ctg agc aca ctc ttc ctg cag gcg gcc				1968
His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu Phe Leu Gln Ala Ala				

645	650	655	
gag atc ttc gtg gag tca gaa ctg cct ctg agc tgg gca gac cgg ctg Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser Trp Ala Asp Arg Leu 660 665 670			2016
agt ggc tgc ctg cgg ggg ccc tgg gcc tgg ctg gtg gtg ctg ctg gcc Ser Gly Cys Leu Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu Val Val Leu Leu Ala 675 680 685			2064
atg ctg gtg gag gtc gca ctg tgc acc tgg tac ctg gtg gcc ttc ccg Met Leu Val Glu Val Ala Leu Cys Thr Trp Tyr Leu Val Ala Phe Pro 690 695 700			2112
ccg gag gtg gtg acg gac tgg cac atg ctg ccc acg gag gcg ctg gtg Pro Glu Val Val Thr Asp Trp His Met Leu Pro Thr Glu Ala Leu Val 705 710 715 720			2160
cac tgc cgc aca cgc tcc tgg gtc agc ttc ggc cta gcg cac gcc acc His Cys Arg Thr Arg Ser Trp Val Ser Phe Gly Leu Ala His Ala Thr 725 730 735			2208
aat gcc acg ctg gcc ttt ctc tgc ttc ctg ggc act ttc ctg gtg cgg Asn Ala Thr Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly Thr Phe Leu Val Arg 740 745 750			2256
agc cag ccg ggc cgc tac aac cgt gcc cgt ggc ctc acc ttt gcc atg Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly Leu Thr Phe Ala Met 755 760 765			2304
ctg gcc tac ttc atc acc tgg gtc tcc ttt gtg ccc ctc ctg gcc aat Leu Ala Tyr Phe Ile Thr Trp Val Ser Phe Val Pro Leu Leu Ala Asn 770 775 780			2352
gtg cag gtg gtc ctc agg ccc gcc gtg cag atg ggc gcc ctc ctg ctc Val Gln Val Val Leu Arg Pro Ala Val Gln Met Gly Ala Leu Leu Leu 785 790 795 800			2400
tgt gtc ctg ggc atc ctg gct gcc ttc cac ctg ccc agg tgt tac ctg Cys Val Leu Gly Ile Leu Ala Ala Phe His Leu Pro Arg Cys Tyr Leu 805 810 815			2448
ctc atg cgg cag cca ggg ctc aac acc ccc gag ttc ttc ctg gga ggg Leu Met Arg Gln Pro Gly Leu Asn Thr Pro Glu Phe Phe Leu Gly Gly 820 825 830 835			2496

820

825

830

ggc cct ggg gat gcc caa ggc cag aat gac ggg aac aca gga aat cag 2544
Gly Pro Gly Asp Ala Gln Gly Gln Asn Asp Gly Asn Thr Gly Asn Gln
835 840 845

ggg aaa cat gag tga 2559
Gly Lys His Glu
850

<210> 10
<211> 852
<212> PRT
<213> human

<400> 10

Met Leu Gly Pro Ala Val Leu Gly Leu Ser Leu Trp Ala Leu Leu His
1 5 10 15

Pro Gly Thr Gly Ala Pro Leu Cys Leu Ser Gln Gln Leu Arg Met Lys
20 25 30

Gly Asp Tyr Val Leu Gly Gly Leu Phe Pro Leu Gly Glu Ala Glu Glu
35 40 45

Ala Gly Leu Arg Ser Arg Thr Arg Pro Ser Ser Pro Val Cys Thr Arg
50 55 60

Phe Ser Ser Asn Gly Leu Leu Trp Ala Leu Ala Met Lys Met Ala Val
65 70 75 80

Glu Glu Ile Asn Asn Lys Ser Asp Leu Leu Pro Gly Leu Arg Leu Gly
85 90 95

Tyr Asp Leu Phe Asp Thr Cys Ser Glu Pro Val Val Ala Met Lys Pro
100 105 110

Ser Leu Met Phe Leu Ala Lys Ala Gly Ser Arg Asp Ile Ala Ala Tyr
115 120 125

Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro
130 135 140

His Ser Ser Glu Leu Ala Met Val Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe
145 150 155 160

Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Gly Ala Ser Met Glu Leu Leu Ser Ala
165 170 175

Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val
180 185 190

Gln Leu Thr Ala Ala Ala Glu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Trp Asn Trp
195 200 205

Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Glu Tyr Gly Arg Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ile Phe Ser Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu
225 230 235 240

Gly Leu Val Pro Leu Pro Arg Ala Asp Asp Ser Arg Leu Gly Lys Val
245 250 255

Gln Asp Val Leu His Gln Val Asn Gln Ser Ser Val Gln Val Val Leu
260 265 270

Leu Phe Ala Ser Val His Ala Ala His Ala Leu Phe Asn Tyr Ser Ile
275 280 285

Ser Ser Arg Leu Ser Pro Lys Val Trp Val Ala Ser Glu Ala Trp Leu
290 295 300

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

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

Gly Phe His Ser Cys Cys Tyr Asp Cys Val Asp Cys Glu Ala Gly Ser
515 520 525

Tyr Arg Gln Asn Pro Asp Asp Ile Ala Cys Thr Phe Cys Gly Gln Asp
530 535 540

Glu Trp Ser Pro Glu Arg Ser Thr Arg Cys Phe Arg Arg Arg Ser Arg
545 550 555 560

Phe Leu Ala Trp Gly Glu Pro Ala Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
565 570 575

Ser Leu Ala Leu Gly Leu Val Leu Ala Ala Leu Gly Leu Phe Val His
580 585 590

His Arg Asp Ser Pro Leu Val Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys
595 600 605

Phe Gly Leu Val Cys Leu Gly Leu Val Cys Leu Ser Val Leu Leu Phe
610 615 620

Pro Gly Gln Pro Ser Pro Ala Arg Cys Leu Ala Gln Gln Pro Leu Ser
625 630 635 640

His Leu Pro Leu Thr Gly Cys Leu Ser Thr Leu Phe Leu Gln Ala Ala
645 650 655

Glu Ile Phe Val Glu Ser Glu Leu Pro Leu Ser Trp Ala Asp Arg Leu
660 665 670

Ser Gly Cys Leu Arg Gly Pro Trp Ala Trp Leu Val Val Leu Leu Ala
675 680 685

Met Leu Val Glu Val Ala Leu Cys Thr Trp Tyr Leu Val Ala Phe Pro
690 695 700

Pro Glu Val Val Thr Asp Trp His Met Leu Pro Thr Glu Ala Leu Val
705 710 715 720

His Cys Arg Thr Arg Ser Trp Val Ser Phe Gly Leu Ala His Ala Thr
725 730 735

Asn Ala Thr Leu Ala Phe Leu Cys Phe Leu Gly Thr Phe Leu Val Arg
740 745 750

Ser Gln Pro Gly Arg Tyr Asn Arg Ala Arg Gly Leu Thr Phe Ala Met
755 760 765

Leu Ala Tyr Phe Ile Thr Trp Val Ser Phe Val Pro Leu Leu Ala Asn
770 775 780

Val Gln Val Val Leu Arg Pro Ala Val Gln Met Gly Ala Leu Leu Leu
785 790 795 800

Cys Val Leu Gly Ile Leu Ala Ala Phe His Leu Pro Arg Cys Tyr Leu
805 810 815

Leu Met Arg Gln Pro Gly Leu Asn Thr Pro Glu Phe Phe Leu Gly Gly
820 825 830

Gly Pro Gly Asp Ala Gln Gly Gln Asn Asp Gly Asn Thr Gly Asn Gln
835 840 845

Gly Lys His Glu
850

<210> 11
<211> 3237
<212> DNA
<213> human

<220>

<221> CDS
<222> (1)..(3237)

<400> 11

atg gca ttt tat agc tgc tgc tgg gtc ctc ttg gca ctc acc tgg cac 48
Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His
1 5 10 15

acc tct gcc tac ggg cca gac cag cga gcc caa aag aag ggg gac att 96
Thr Ser Ala Tyr Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile
20 25 30

atc ctt ggg ggg ctc ttt cct att cat ttt gga gta gca gct aaa gat 144
Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp
35 40 45

caa gat ctc aaa tca agg ccg gag tct gtg gaa tgt atc agg tat aat 192
Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn
50 55 60

ttc cgt ggg ttt cgc tgg tta cag gct atg ata ttt gcc ata gag gag 240
Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu
65 70 75 80

ata aac agc agc cca gcc ctt ctt ccc aac ttg acg ctg gga tac agg 288
Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg
85 90 95

ata ttt gac act tgc aac acc gtt tct aag gcc ttg gaa gcc acc ctg 336
Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu
100 105 110

agt ttt gtt gct caa aac aaa att gat tct ttg aac ctt gat gag ttc 384
Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe
115 120 125

tgc aac tgc tca gag cac att ccc tct acg att gct gtg gtg gga gca 432
Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala
130 135 140

act ggc tca ggc gtc tcc acg gca gtg gca aat ctg ctg ggg ctc ttc 480
Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe
145 150 155 160

tac att ccc cag gtc agt tat gcc tcc tcc agc aga ctc ctc agc aac 528

Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn	
165 170 175	
aag aat caa ttc aag tct ttc ctc cga acc atc ccc aat gat gag cac	576
Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His	
180 185 190	
cag gcc act gcc atg gca gac atc atc gag tat ttc cgc tgg aac tgg	624
Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp	
195 200 205	
gtg ggc aca att gca gct gat gac gac tat ggg cgg ccg ggg att gag	672
Val Gly Thr Ile Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu	
210 215 220	
aaa ttc cga gag gaa gct gag gaa agg gat atc tgc atc gac ttc agt	720
Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser	
225 230 235 240	
gaa ctc atc tcc cag tac tct gat gag gaa gag atc cag cat gtg gta	768
Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val	
245 250 255	
gag gtg att caa aat tcc acg gcc aaa gtc atc gtg gtt ttc tcc agt	816
Glu Val Ile Gln Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser	
260 265 270	
ggc cca gat ctt gag ccc ctc atc aag gag att gtc cgg cgc aat atc	864
Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile	
275 280 285	
acg ggc aag atc tgg ctg gcc agc gag gcc tgg gcc agc tcc tcc ctg	912
Thr Gly Lys Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu	
290 295 300	
atc gcc atg cct cag tac ttc cac gtg gtt ggc ggc acc att gga ttc	960
Ile Ala Met Pro Gln Tyr Phe His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe	
305 310 315 320	
gct ctg aag gct ggg cag atc cca ggc ttc cgg gaa ttc ctg aag aag	1008
Ala Leu Lys Ala Gly Gln Ile Pro Gly Phe Arg Glu Phe Leu Lys Lys	
325 330 335	
gtc cat ccc agg aag tct gtc cac aat ggt ttt gcc aag gag ttt tgg	1056
Val His Pro Arg Lys Ser Val His Asn Gly Phe Ala Lys Glu Phe Trp	

340	345	350	
gaa gaa aca ttt aac tgc cac ctc caa gaa ggt gca aaa gga cct tta			1104
Glu Glu Thr Phe Asn Cys His Leu Gln Glu Gly Ala Lys Gly Pro Leu			
355	360	365	
cct gtg gac acc ttt ctg aga ggt cac gaa gaa agt ggc gac agg ttt			1152
Pro Val Asp Thr Phe Leu Arg Gly His Glu Glu Ser Gly Asp Arg Phe			
370	375	380	
agc aac agc tcg aca gcc ttc cga ccc ctc tgt aca ggg gat gag aac			1200
Ser Asn Ser Ser Thr Ala Phe Arg Pro Leu Cys Thr Gly Asp Glu Asn			
385	390	395	400
atc agc agt gtc gag acc cct tac ata gat tac acg cat tta cgg ata			1248
Ile Ser Ser Val Glu Thr Pro Tyr Ile Asp Tyr Thr His Leu Arg Ile			
405	410	415	
tcc tac aat gtg tac tta gca gtc tac tcc att gcc cac gcc ttg caa			1296
Ser Tyr Asn Val Tyr Leu Ala Val Tyr Ser Ile Ala His Ala Leu Gln			
420	425	430	
gat ata tat acc tgc tta cct ggg aga ggg ctc ttc acc aat ggc tcc			1344
Asp Ile Tyr Thr Cys Leu Pro Gly Arg Gly Leu Phe Thr Asn Gly Ser			
435	440	445	
tgt gca gac atc aag aaa gtt gag gcg tgg cag gtc ctg aag cac cta			1392
Cys Ala Asp Ile Lys Lys Val Glu Ala Trp Gln Val Leu Lys His Leu			
450	455	460	
cgg cat cta aac ttt aca aac aat atg ggg gag cag gtg acc ttt gat			1440
Arg His Leu Asn Phe Thr Asn Asn Met Gly Glu Gln Val Thr Phe Asp			
465	470	475	480
gag tgt ggt gac ctg gtg ggg aac tat tcc atc atc aac tgg cac ctc			1488
Glu Cys Gly Asp Leu Val Gly Asn Tyr Ser Ile Ile Asn Trp His Leu			
485	490	495	
tcc cca gag gat ggc tcc atc gtg ttt aag gaa gtc ggg tat tac aac			1536
Ser Pro Glu Asp Gly Ser Ile Val Phe Lys Glu Val Gly Tyr Tyr Asn			
500	505	510	
gtc tat gcc aag aag gga gaa aga ctc ttc atc aac gag gag aaa atc			1584
Val Tyr Ala Lys Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile			

515	520	525	
ctg tgg agt ggg ttc tcc agg gag gtg ccc ttc tcc aac tgc agc cga			1632
Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg			
530	535	540	
gac tgc ctg gca ggg acc agg aaa ggg atc att gag ggg gag ccc acc			1680
Asp Cys Leu Ala Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr			
545	550	555	560
tgc tgc ttt gag tgt gtg gag tgt cct gat ggg gag tat agt gat gag			1728
Cys Cys Phe Glu Cys Val Glu Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Ser Asp Glu			
565	570	575	
aca gat gcc agt gcc tgt aac aag tgc cca gat gac ttc tgg tcc aat			1776
Thr Asp Ala Ser Ala Cys Asn Lys Cys Pro Asp Asp Phe Trp Ser Asn			
580	585	590	
gag aac cac acc tcc tgc att gcc aag gag atc gag ttt ctg tcg tgg			1824
Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala Lys Glu Ile Glu Phe Leu Ser Trp			
595	600	605	
acg gag ccc ttt ggg atc gca ctc acc ctc ttt gcc gtg ctg ggc att			1872
Thr Glu Pro Phe Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe Ala Val Leu Gly Ile			
610	615	620	
ttc ctg aca gcc ttt gtg ctg ggt gtg ttt atc aag ttc cgc aac aca			1920
Phe Leu Thr Ala Phe Val Leu Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr			
625	630	635	640
ccc att gtc aag gcc acc aac cga gag ctc tcc tac ctc ctc ctc ttc			1968
Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe			
645	650	655	
tcc ctg ctc tgc tgc ttc tcc agc tcc ctg ttc ttc atc ggg gag ccc			2016
Ser Leu Leu Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Gly Glu Pro			
660	665	670	
cag gac tgg acg tgc cgc ctg cgc cag ccg gcc ttt ggc atc agc ttc			2064
Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe			
675	680	685	
gtg ctc tgc atc tca tgc atc ctg gtg aaa acc aac cgt gtc ctc ctg			2112
Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu			

690	695	700	
gtg ttt gag gcc aag atc ccc acc agc ttc cac cgc aag tgg tgg ggg			2160
Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Phe His Arg Lys Trp Trp Gly			
705	710	715	720
ctc aac ctg cag ttc ctg ctg gtt ttc ctc tgc acc ttc atg cag att			2208
Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu Val Phe Leu Cys Thr Phe Met Gln Ile			
	725	730	735
gtc atc tgt gtg atc tgg ctc tac acc gcg ccc ccc tca agc tac cgc			2256
Val Ile Cys Val Ile Trp Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg			
	740	745	750
aac cag gag ctg gag gat gag atc atc ttc atc acg tgc cac gag ggc			2304
Asn Gln Glu Leu Glu Asp Glu Ile Ile Phe Ile Thr Cys His Glu Gly			
	755	760	765
tcc ctc atg gcc ctg ggc ttc ctg atc ggc tac acc tgc ctg ctg gct			2352
Ser Leu Met Ala Leu Gly Phe Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala			
	770	775	780
gcc atc tgc ttc ttc ttt gcc ttc aag tcc cgg aag ctg ccg gag aac			2400
Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn			
	785	790	800
ttc aat gaa gcc aag ttc atc acc ttc agc atg ctc atc ttc ttc atc			2448
Phe Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe Phe Ile			
	805	810	815
gtc tgg atc tcc ttc att cca gcc tat gcc agc acc tat ggc aag ttt			2496
Val Trp Ile Ser Phe Ile Pro Ala Tyr Ala Ser Thr Tyr Gly Lys Phe			
	820	825	830
gtc tct gcc gta gag gtg att gcc atc ctg gca gcc agc ttt ggc ttg			2544
Val Ser Ala Val Glu Val Ile Ala Ile Leu Ala Ala Ser Phe Gly Leu			
	835	840	845
ctg gcg tgc atc ttc ttc aac aag atc tac atc att ctc ttc aag cca			2592
Leu Ala Cys Ile Phe Phe Asn Lys Ile Tyr Ile Ile Leu Phe Lys Pro			
	850	855	860
tcc cgc aac acc atc gag gag gtg cgt tgc agc acc gca gct cac gct			2640
Ser Arg Asn Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala			

865	870	875	880	
ttc aag gtg gct gcc cgg gcc acg ctg cgc cgc agc aac gtc tcc cgc				2688
Phe Lys Val Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Asn Val Ser Arg				
	885	890	895	
aag cgg tcc agc agc ctt gga ggc tcc acg gga tcc acc ccc tcc tcc				2736
Lys Arg Ser Ser Ser Leu Gly Gly Ser Thr Gly Ser Thr Pro Ser Ser				
	900	905	910	
tcc atc agc agc aag agc aac agc gaa gac cca ttc cca cag ccc gag				2784
Ser Ile Ser Ser Lys Ser Asn Ser Glu Asp Pro Phe Pro Gln Pro Glu				
	915	920	925	
agg cag aag cag cag cag ccg ctg gcc cta acc cag caa gag cag cag				2832
Arg Gln Lys Gln Gln Gln Pro Leu Ala Leu Thr Gln Gln Glu Gln Gln				
	930	935	940	
cag cag ccc ctg acc ctc cca cag cag caa cga tct cag cag cag ccc				2880
Gln Gln Pro Leu Thr Leu Pro Gln Gln Arg Ser Gln Gln Gln Pro				
	945	950	955	960
aga tgc aag cag aag gtc atc ttt ggc agc ggc acg gtc acc ttc tca				2928
Arg Cys Lys Lys Gln Lys Val Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe Ser				
	965	970	975	
ctg agc ttt gat gag cct cag aag aac gcc atg gcc cac agg aat tct				2976
Leu Ser Phe Asp Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His Arg Asn Ser				
	980	985	990	
acg cac cag aac tcc ctg gag gcc cag aaa agc agc gat acg ctg acc				3024
Thr His Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser Asp Thr Leu Thr				
	995	1000	1005	
cga cac cag cca tta ctc ccg ctg cag tgc ggg gaa acg gac tta				3069
Arg His Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu Thr Asp Leu				
	1010	1015	1020	
gat ctg acc gtc cag gaa aca ggt ctg caa gga cct gtg ggt gga				3114
Asp Leu Thr Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro Val Gly Gly				
	1025	1030	1035	
gac cag cgg cca gag gtg gag gac cct gaa gag ttg tcc cca gca				3159
Asp Gln Arg Pro Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu Ser Pro Ala				

1040 1045 1050

ctt gta gtg tcc agt tca cag agc ttt gtc atc agt ggt gga ggc 3204
 Leu Val Val Ser Ser Ser Gln Ser Phe Val Ile Ser Gly Gly Gly
 1055 1060 1065

agc act gtt aca gaa aac gta gtg aat tca taa 3237
 Ser Thr Val Thr Glu Asn Val Val Asn Ser
 1070 1075

<210> 12
 <211> 1078
 <212> PRT
 <213> human

<400> 12

Met Ala Phe Tyr Ser Cys Cys Trp Val Leu Leu Ala Leu Thr Trp His
 1 5 10 15

Thr Ser Ala Tyr Gly Pro Asp Gln Arg Ala Gln Lys Lys Gly Asp Ile
 20 25 30

Ile Leu Gly Gly Leu Phe Pro Ile His Phe Gly Val Ala Ala Lys Asp
 35 40 45

Gln Asp Leu Lys Ser Arg Pro Glu Ser Val Glu Cys Ile Arg Tyr Asn
 50 55 60

Phe Arg Gly Phe Arg Trp Leu Gln Ala Met Ile Phe Ala Ile Glu Glu
 65 70 75 80

Ile Asn Ser Ser Pro Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Leu Gly Tyr Arg
 85 90 95

Ile Phe Asp Thr Cys Asn Thr Val Ser Lys Ala Leu Glu Ala Thr Leu
 100 105 110

Ser Phe Val Ala Gln Asn Lys Ile Asp Ser Leu Asn Leu Asp Glu Phe
115 120 125

Cys Asn Cys Ser Glu His Ile Pro Ser Thr Ile Ala Val Val Gly Ala
130 135 140

Thr Gly Ser Gly Val Ser Thr Ala Val Ala Asn Leu Leu Gly Leu Phe
145 150 155 160

Tyr Ile Pro Gln Val Ser Tyr Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ser Asn
165 170 175

Lys Asn Gln Phe Lys Ser Phe Leu Arg Thr Ile Pro Asn Asp Glu His
180 185 190

Gln Ala Thr Ala Met Ala Asp Ile Ile Glu Tyr Phe Arg Trp Asn Trp
195 200 205

Val Gly Thr Ile Ala Ala Asp Asp Asp Tyr Gly Arg Pro Gly Ile Glu
210 215 220

Lys Phe Arg Glu Glu Ala Glu Glu Arg Asp Ile Cys Ile Asp Phe Ser
225 230 235 240

Glu Leu Ile Ser Gln Tyr Ser Asp Glu Glu Glu Ile Gln His Val Val
245 250 255

Glu Val Ile Gln Asn Ser Thr Ala Lys Val Ile Val Val Phe Ser Ser
260 265 270

Gly Pro Asp Leu Glu Pro Leu Ile Lys Glu Ile Val Arg Arg Asn Ile
275 280 285

Thr Gly Lys Ile Trp Leu Ala Ser Glu Ala Trp Ala Ser Ser Ser Leu
290 295 300

Ile Ala Met Pro Gln Tyr Phe His Val Val Gly Gly Thr Ile Gly Phe

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

Val Tyr Ala Lys Lys Gly Glu Arg Leu Phe Ile Asn Glu Glu Lys Ile
515 520 525

Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Phe Ser Asn Cys Ser Arg
530 535 540

Asp Cys Leu Ala Gly Thr Arg Lys Gly Ile Ile Glu Gly Glu Pro Thr
545 550 555 560

Cys Cys Phe Glu Cys Val Glu Cys Pro Asp Gly Glu Tyr Ser Asp Glu
565 570 575

Thr Asp Ala Ser Ala Cys Asn Lys Cys Pro Asp Asp Phe Trp Ser Asn
580 585 590

Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala Lys Glu Ile Glu Phe Leu Ser Trp
595 600 605

Thr Glu Pro Phe Gly Ile Ala Leu Thr Leu Phe Ala Val Leu Gly Ile
610 615 620

Phe Leu Thr Ala Phe Val Leu Gly Val Phe Ile Lys Phe Arg Asn Thr
625 630 635 640

Pro Ile Val Lys Ala Thr Asn Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Leu Leu Phe
645 650 655

Ser Leu Leu Cys Cys Phe Ser Ser Ser Leu Phe Phe Ile Gly Glu Pro
660 665 670

Gln Asp Trp Thr Cys Arg Leu Arg Gln Pro Ala Phe Gly Ile Ser Phe
675 680 685

Val Leu Cys Ile Ser Cys Ile Leu Val Lys Thr Asn Arg Val Leu Leu
690 695 700

Val Phe Glu Ala Lys Ile Pro Thr Ser Phe His Arg Lys Trp Trp Gly
705 710 715 720

Leu Asn Leu Gln Phe Leu Leu Val Phe Leu Cys Thr Phe Met Gln Ile
725 730 735

Val Ile Cys Val Ile Trp Leu Tyr Thr Ala Pro Pro Ser Ser Tyr Arg
740 745 750

Asn Gln Glu Leu Glu Asp Glu Ile Ile Phe Ile Thr Cys His Glu Gly
755 760 765

Ser Leu Met Ala Leu Gly Phe Leu Ile Gly Tyr Thr Cys Leu Leu Ala
770 775 780

Ala Ile Cys Phe Phe Phe Ala Phe Lys Ser Arg Lys Leu Pro Glu Asn
785 790 795 800

Phe Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Phe Ser Met Leu Ile Phe Phe Ile
805 810 815

Val Trp Ile Ser Phe Ile Pro Ala Tyr Ala Ser Thr Tyr Gly Lys Phe
820 825 830

Val Ser Ala Val Glu Val Ile Ala Ile Leu Ala Ala Ser Phe Gly Leu
835 840 845

Leu Ala Cys Ile Phe Phe Asn Lys Ile Tyr Ile Ile Leu Phe Lys Pro
850 855 860

Ser Arg Asn Thr Ile Glu Glu Val Arg Cys Ser Thr Ala Ala His Ala
865 870 875 880

Phe Lys Val Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Asn Val Ser Arg
885 890 895

Lys Arg Ser Ser Ser Leu Gly Gly Ser Thr Gly Ser Thr Pro Ser Ser
900 905 910

Ser Ile Ser Ser Lys Ser Asn Ser Glu Asp Pro Phe Pro Gln Pro Glu
915 920 925

Arg Gln Lys Gln Gln Gln Pro Leu Ala Leu Thr Gln Gln Glu Gln Gln
930 935 940

Gln Gln Pro Leu Thr Leu Pro Gln Gln Gln Arg Ser Gln Gln Gln Pro
945 950 955 960

Arg Cys Lys Gln Lys Val Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe Ser
965 970 975

Leu Ser Phe Asp Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His Arg Asn Ser
980 985 990

Thr His Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser Asp Thr Leu Thr
995 1000 1005

Arg His Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu Thr Asp Leu
1010 1015 1020

Asp Leu Thr Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro Val Gly Gly
1025 1030 1035

Asp Gln Arg Pro Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu Ser Pro Ala
1040 1045 1050

Leu Val Val Ser Ser Ser Gln Ser Phe Val Ile Ser Gly Gly Gly
1055 1060 1065

Ser Thr Val Thr Glu Asn Val Val Asn Ser
1070 1075

<210> 13
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Primer sequence

<400> 13
 caccaagctt atggcatttt atagctgc 28

<210> 14
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Primer sequence

<400> 14
 atatcgtagc cttggcaatg caggaggt 28

<210> 15
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Primer sequence

<400> 15
 atatcgtagc gtgttttttg cttgcgt 28

<210> 16
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Primer sequence

<400> 16
 atatgcggcc gcaggtggag ccgcagcgcc t 31

<210> 17
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Primer sequence

<400> 17
 atatcgtagc cggttcctgg catggggc 28

<210> 18
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> Primer sequence

<400> 18
 atatgcggcc gcactcatgt ttccctgat t 31