

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 1로 표시되는 mRNA로 전사되는 RNA 결합 단백질 Napor-3 유전자에 있어서, 상기 Napor-3 유전자의 랫트 태아 뇌에서 발현은 에탄올에 의해 저해됨을 특징으로 하는 RNA 결합 단백질 Napor-3 유전자

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 Napor-3 유전자 mRNA(서열번호: 1)의 4561~4645번째 뉴클레오티드로 구성된 도메인 또는 이와 95% 이상의 상동성을 지닌 mRNA 도메인의 발현이 랫트 태아 뇌에서 에탄올에 의해 저해됨을 특징으로 하는 RNA 결합 단백질 Napor-3 유전자

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 랫트 태아 뇌는 중뇌, 후뇌 및 해마임을 특징으로 하는 RNA 결합 단백질 Napor-3 유전자

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 에탄올에 의해 랫트 태아의 뇌에서 발현 저해되는 RNA 결합 단백질 Napor-3 유전자에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 임신 중 에탄올에 의해 유발되는 태아 알코올 증후군의 유발 인자로서 태아의 뇌에서 발현 저해되는 RNA 결합 단백질 Napor-3 유전자에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 에탄올은 환성, 불안, 긴장 및 저해를 감소시키는 강하제로서 신체 내의 낮은 에탄올 수준에서도 반응을 지체시킴으로서 중추신경계에 영향을 미친다. 임신 기간 중 에탄올 흡수는 성장하는 태아에 여러 가지 기형을 유발하며 이를 총괄하여 태아 알코올 증후군으로 불려진다. 태아 알코올 증후군은 두개 안면부(craniofacial) 기형에 의해 특징 지워지고 태아의 발달 단계동안 뇌의 질량 및 세포사멸 신경퇴행을 유발시킨다. 또한 유아의 정신지체 장애뿐만 아니라 다양한 신경행동적 장애는 태아알코올증후군과 관련되어 있다. 신경전달물질 및 신호 분자는 에탄올에 의해 광범위에 걸쳐 영향을 받는다.
- <3> 본 발명은 에탄올이 성장하는 뇌의 새로운 유전자 발현에 영향을 끼친다는 것을 밝혀냈다. N-메틸 d-아스파테이트(NMDA) 수용체, 신경 필라멘트 헤비 폴리펩티드(NEFH), 필킨제 세포 단백질(PCP)-4, NADH 및 신경 세포사멸 저해 단백질 상에서 에탄올의 해로운 효과는 이미 알려져 있다.
- <4> 본 발명자들은 성숙된 태아에서 다양한 유전자 발현의 변화가 발생할 때 뇌의 성장에 중요한 저해가 있음을 인지하였다. 태아에 있어서 에탄올에 노출시킨 유전자 발현의 변화를 연구하기 위해 유전자의 분화 발현을 에탄올이 처리되지 않은 정상군 및 임신 19.5 일에 태아 랫트의 뇌에 에탄올을 처리한 군의 분화 디스플레이(DD)-PCR을 이용하여 측정하였다. 또한 정상 및 에탄올을 처리한 군과는 다른 특정 유전자의 존재를 서열 분석을 통해 확인하였다.
- <5> 그 후 *in situ* 혼성화 및 RPA(RNase protection assay)를 통해 본 발명자들은 임신 19.5일째 태아 랫트의 뇌 및 성체 랫트의 피질 및 해마의 각각의 위치에서 상기 특정 유전자의 발현을 측정하였다.
- <6> 그 결과 아포토시스와 관련된 RNA 결합 단백질인 'Napor-3' 유전자 및 상기 Napor-3 유전자와 서열 상동성을 지닌 유전자들이 에탄올 처리되지 않은 대조군과 비교시 에탄올 처리된 후 태아 랫트의 중뇌 및 후뇌뿐만 아니라 성체 랫트의 해마에서 그 발현이 감소됨을 측정하고 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 랫트 태아 뇌에서 아포토시스와 관련된 RNA 결합 단백질인 'Napor-3' 유전자 및 상기 Napor-3 유전자와 서열 상동성을 지닌 유전자들의 발현 패턴을 측정코자 한 것이다. 즉 에탄올 처리되지 않은 랫트 태아 대조군과 에탄올 처리된 후 태아 랫트의 중뇌 및 후뇌, 성체 랫트의 해마에서 Napor-3 유전자 발현을 측정함으로써 에탄올이 랫트 태아 뇌에서 Napor-3 유전자의 발현을 저해시킴을 규명코자 한 것이다.

과제 해결수단

<8> 본 발명의 목적은 서열번호: 1로 표시되는 mRNA로 전사되는 RNA 결합 단백질 Napor-3 유전자에 있어서, 상기 Napor-3 유전자의 랫트 태아 뇌에서 발현은 에탄올에 의해 저해됨을 특징으로 하는 RNA 결합 단백질 Napor-3 유전자를 제공하는 것이다.

<9> 또한 상기 Napor-3 유전자 mRNA(서열번호: 1)의 4561~4645번째 뉴클레오티드로 구성된 도메인 또는 이와 95% 이상의 상동성을 지닌 mRNA 도메인의 발현이 랫트 태아 뇌에서 에탄올에 의해 저해됨을 특징으로 한다.

<10> 한편 상기 랫트 태아 뇌는 중뇌, 후뇌 및 해마임을 특징으로 한다.

효과

<11> 본 발명의 효과는 랫트 태아 뇌에서 아포토시스와 관련된 RNA 결합 단백질인 'Napor-3' 유전자 및 상기 Napor-3 유전자와 서열 상동성을 지닌 유전자들의 발현 패턴을 규명한 것이다. 즉 에탄올 처리되지 않은 랫트 태아 대조군과 에탄올 처리된 후 태아 랫트의 중뇌 및 후뇌, 성체 랫트의 해마에서 Napor-3 유전자 발현을 측정함으로써 에탄올이 랫트 태아 뇌에서 Napor-3 유전자의 발현을 저해시킴을 규명한 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<12> 임신기간 동안 에탄올 노출은 태아의 신경계에 다양한 부정적인 효과를 야기한다. 특히 에탄올은 태아 알코올 증후군(FAS) 태아의 성장 단계시 유전자 발현 패턴에 많은 변화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 목적은 성숙된 태아에서 유전자의 발현에 관한 에탄올의 역할을 규명하는데 있다.

<13> 상기 관점에서 전체 mRNA를 임신(gestational day) 19.5일에 10% 에탄올을 흡수시킨 태아 랫트의 전뇌로부터 분리하였다. 분화 디스플레이-PCR에 의해 분화 발현된 유전자 cDNA를 정제시킨 후, mRNA는 T-easy 벡터로 라이게이트시킨다. 서열 분석은 GenBank 데이터베이스를 사용하여 상동 유전자를 검색함으로써 수행되었다.

<14> 정상 대조군 및 에탄올이 처리된 조건하의 각각의 뇌에서 유전자 발현 및 분배 패턴을 측정하였다. 그 결과는 'Napor-3' mRNA와 같은 아포토시스와 관련된 RNA 결합 단백질과 서열 상동성을 지닌 cDNA 들이 에탄올이 처리되지 않은 대조군과 비교시 에탄올이 처리된 후 태아 랫트의 중뇌 및 후뇌뿐만 아니라 성체 랫트의 해마에서 상당히 감소됨을 나타내었다.

<15> 또한 태아 랫트의 전뇌 및 성체 랫트의 피질은 각각의 정상 대조군과 비교시 에탄올 처리군에서 Napor-3 mRNA의 분화 발현을 나타낸다. 따라서 에탄올은 성숙된 태아의 신경 세포 분화시 Napor-3 유전자 발현에 저해 영향을 초래할 수 있으며 태아의 태아 알코올 증후군-관련된 성장 손상을 나타낸다.

<16> 본 발명은 성숙된 태아의 신경조직발생 단계에서 태아 유전자 발현을 저해하는 에탄올의 역할을 규명한 것이다.

<17> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<18> 임신 19.5일에 에탄올 처리군 및 정상 태아 랫트의 전뇌에서 신규한 유전자의 발현을 연구하기 위해 분화 디스플레이(DD)-PCR이 20개의 프라이머 세트 조합을 사용하여 수행되었다.

<19> 도 1a는 에탄올 처리군 및 대조군 태아 랫트의 전뇌에서 각각의 cDNA 발현을 나타내는 전기영동 사진이다. 상기 전기영동 밴드는 아가로스 겔 상의 13E(에탄올 처리군) 영역에서는 나타나지 않았다. 이와 대조적으로 강한 밴드가 동일한 아가로스 겔 상의 13C(정상군) 영역에서 나타났다. BLAST 분석에 의한 13C 아라로스 겔 상의 밴드에서 추출된 cDNA의 29~111 뉴클레오티드 서열은 랫트 Napor-3 유전자 mRNA(기탁번호: AF090697) 중 4561~4645 뉴클레오티드 서열과 높은 상동성(95%)을 나타낸다(도 1b).

<20> *in situ* 혼성화 기술을 통해 에탄올 처리군(도 2a)보다 정상 피질 및 해마(도 2b)에서 높은 Napor-3 유전자 발현을 나타낸다. 또한 Napor-3 mRNA의 각각의 발현은 연령에 의존적이며 Napor-3 mRNA는 임신 19.5일(도 2c) 및 임신 21.5일(도 2d)째 정상 태아 랫트의 피질, 해마, 전뇌, 중뇌 및 후뇌에서 높이 발현된다.

- <21> 또한 임신 19.5일째 정상 태아 랫트의 대뇌 피질에서 에탄올 처리군(도 3c)보다 높은 Napor-3 mRNA의 발현이 안티센스 프로브(도 3b)에 의해 나타난다. Napor-3 mRNA 발현을 나타내는 검은색 화살표는 센스 프로브에 의해 정상군(도 3a)에서 나타나지 않았다.
- <22> RPA(RNase protection assay)는 에탄올 처리 후 태아(임신 19.5일) 및 성체 랫트 뇌의 각각의 영역에서 Napor-3 mRNA 수준을 동일하게 하는데 사용되었고 각각의 정상군(도 4a)과 비교하였으며 이는 *in situ* 혼성화 결과와 일치된다(도 2,3). 임신 19.5일째의 정상군과 비교했을 때 정량 분석은 에탄올을 처리한 태아 랫트의 후뇌, 중뇌에서 전뇌보다 낮은 Napor-3 mRNA 발현을 나타낸다(도 4b). 또한 정상군보다 현저히 낮은 Napor-3 mRNA 발현이 에탄올을 처리한 성체 랫트의 해마에서 관찰되었다(도 4b). 도 4c는 도 4의 태아와 성체 랫트의 뇌의 각각의 영역에서 정상군(에탄올을 처리하지 않은 대조군)과 에탄올 처리군 간의 Napor-3 mRNA 밴드의 밀도 차이를 나타내며 또한 이는 도 4b와 일치한다.
- <23> 에탄올 처리군으로부터 분리된 태아 랫트의 뇌에서 cDNA들의 분화 발현의 생물학적 연구는 신경조직 발생 동안 표현형 통제의 메커니즘에 관한 유용한 통찰력을 제공한다. 여기에 제시된 증거는 에탄올에 의한 유발된 병리학적인 반응에서 신규한 타겟으로서 Napor-3 mRNA를 증명했다. 본 발명의 클론 13C는 랫트의 Napor-3(AF090697)의 암호화 지역과 95% 서열 상동성을 나타낸다. Napor-3은 신경아세포종 ELAV-타입 RBP이며, 이것의 발현은 프로그램화된 세포 사멸의 발생과 일치한다.
- <24> RNA 결합 단백질의 RNA 프로세싱, mRNA 운반, 안정성 및 번역 등과 같은 유전자 발현의 후 전사 조절의 기능을 지닌다. RNA 결합 단백질의 슈퍼패밀리(superfamily)는 보존된 도메인, RRM이라고 불리는 긴 80~90 아미노산을 포함한다. RNP 1 및 RNP 2 모티프는 RRM에 대한 시그네처(signature) 서열이며 특이적으로 RNA와 상호작용한다. 단백질을 포함한 RNA 인식 모티프 중에서 RNA 결합 단백질은 초파리(*Drosophila*) 신경계의 적절한 발달에 필수적이다.
- <25> *elav* 로커스의 불활성화는 신경계의 발달을 파괴하며 사멸을 유도한다: *elav* 로커스의 변이는 신경아세포가 계속해서 증식하도록 하며 부적절한 변이 및 이동을 저해하는 신경계의 역기능을 유발시킨다. *elav* 유사 단백질은 RNP 2/RNP 1 타입을 분류된 3개의 RNA 인식 모티프로 구성되어 있다. 3개의 RNA 인식 모티프의 첫 번째 및 두 번째 모티프는 반복적으로 정렬되어 있으며 세 번째 인식 모티프와 분리되어 있고 이 모티프 사이에는 염기성 아미노산 잔기가 다수 삽입되어 있다.
- <26> Napor-3은 선택적 스플라이싱, RNA 편집, 안정성 및 번역을 포함하는 세포질 RNA 및 핵의 RNA 처리과정을 포함한다. 또한 Napor-3은 중추신경계의 발달에 중요한 역할을 한다. Napor-3가 허혈성-유도된 세포사멸을 일으킬 것이라는 판단은 Napor-3 과발현과 성장 동안 세포사멸 비율 증가간의 상호관련성을 증명하는 이전 연구로부터 기인하였다. 더욱이 RNA 마이크로인젝션에 의한 Napor-3의 과발현은 신경계 및 낭배형성시 여러 가지 결함을 초래하며 태아 발달 동안 Napor-3 유전자 조절의 엄격한 통제에 대한 필요성을 제안한다.
- <27> 성장 및 신경조직발생 동안 세포사멸시 Napor-3의 역할에 상응하여 본 발명의 목적은 태아 및 성체 랫트의 뇌에서 Napor-3 mRNA의 영역 분배 패턴을 결정하는 것이다. 본 발명의 13C 클론은 랫트의 Napor-3(AF090697)과 95% 서열 상동성을 나타낸다. 이전 데이터에 따라서 본 발명에서 *in situ* 혼성화 커플링된 분화 디스플레이(DD)-PCR 및 RPA는 Napor-3 mRNA가 임신 19.5일째 에탄올을 처리한 군보다 정상 대조군에서 태아 랫트의 해마, 피질, 전뇌, 후뇌 및 중뇌에서 현저히 발현된다는 것을 측정하였으며 성숙된 태아 단계에서 에탄올이 Napor-3 발현을 억제한다는 것을 확인하였다.
- <28> 또한 에탄올이 처리된 성체 랫트의 뇌는 낮은 Napor-3 mRNA 발현을 나타낸다. Napor-3의 발현은 특히 발달하는 대뇌 피질, 배쪽 중뇌(ventral telencephalon)의 핵, 등쪽 시상(dorsal thalamus) 및 전뇌의 시상하부에서 특히 높게 나타난다. 배아 세포 사멸의 가장 높은 비율은 분열하는 세포에서 Napor-3 발현과 연관되어 있다.
- <29> 따라서 상기에서 언급된 본 발명의 결과는 증식하는 태아의 뇌의 각각의 영역에서 Napor-3 발현을 억제함으로써 에탄올이 배아가 성장하는 동안 태아 알코올 증후군-관련된 성장장애를 야기시키는 것이다.
- <30> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <31> (실시예 1) 실험군 및 대조군 시료의 채취
- <32> 암컷(n=40) 및 수컷(n=10) 스프래그-돌리 랫트(250 gm 몸무게)를 임의로 실온-통제 환경에서 6시부터 20시까지 사료와 함께 광선하에 적응시켰다. 임신한 랫트는 두 군으로 나누어 졌다: (1) 실험군(n=30)은 10% 에탄

울을 구강으로 섭취하였고 (2) 대조군 즉 에탄올을 처리하지 않은 정상군(n=10)은 물을 섭취하였다. 시간에 맞춰 임신한(임신 0.5일과 같은 수정한 날) 랫트는 임신 19.5일 및 21.5일에 희생시키고 뇌 샘플을 전뇌, 중뇌 및 후뇌로 나눈다.

<33> *in situ* 혼성화를 위해 태아는 NBP(neutral buffered p-formaldehyde)에 고정되고 동결억제된 동결 조직 섹션은 시상면(sagittal plane)화시켰다. RPA로 신선한 뇌 조직을 무균화 제거시켜 액화질소에서 동결시켰다. 전체 RNA는 TRIzol 시약(Life Technologies, 미국)에 의해 분리되었다. 별도로 언급되지 않는다면 케미컬/키트/플라스미드 등은 Promega(미국)사로부터 구매되었다.

<34> (실시예 2) PCR을 통한 cDNA의 획득

<35> 정제된 전체 RNA 3 μ g은 역전사효소에 의해 42°C에서 첫 번째 가닥 cDNA의 합성에 사용되었다. 두 번째 가닥 cDNA 합성은 첫 번째 단계의 PCR 1 사이클 동안 50°C에서 수행되었다. Taq DNA 폴리머라제는 94°C에서 반응 혼합물에 첨가되었다. 증폭된 PCR 생성물은 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)를 포함한 2% 아가로스 겔에서 분리되었고 그 후 각각의 발현된 밴드는 Wizard SV Gel 및 PCR Clean-up System Kit를 사용하여 추출되었으며, pGEM®-T Easy 벡터로 클로닝되었으며, Sequenase Version™ 2.0 DNA sequencing Kit (USB, 미국)에 의해 PCR 단편의 서열을 확인하였고 마지막으로 서열 배열은 BLAST 프로그램의 GenBank 데이터베이스로부터 알려진 서열을 이용하여 확인하였다.

<36> (실시예 3) 혼성화를 통한 Napor-3 mRNA 발현 측정

<37> cDNA 단편, cRNA 프로브는 pGEM®-T Easy 재조합 서브클론으로부터 합성되었다. 센스 및 안티센스 cDNA 단편, cRNA 프로브는 각각 Pst I 또는 Sac II로 라이너화시킨 cDNA 컨스트럭트로부터 T7 또는 Sp6 RNA 폴리머라제로 전사시켰다. [³⁵S]-UTP-표지된 프로브가 시험관 내에서 1.0x10⁹ cpm/ μ g의 특이적 활성을 지닌 전사 키트를 사용하여 제조되었다. 섹션은 전-혼성화, 혼성화 및 후-혼성화 완충액으로 커버되었고 RNase A로 처리되었다. 슬라이드는 자기방사선 X-선 필름에 노출되었고 슬라이드를 NTB-2 에멀전 용액에 담가놓았다.

<38> 임신 19.5일째 태아 랫트의 전뇌, 중뇌 및 후뇌와 성체 랫트의 피질 및 해마에서 cDNA 단편 mRNA 농도는 RPA에 의해 측정되었다. ³²P-UTP-표지된 리보프로브는 pGEM®-T Easy 플라스미드로 라이너화시킨 Pst I 또는 Sac II를 사용하여 T7 또는 Sp6 폴리머라제를 합성하였다. RNA 샘플은 1x-혼성 완충액에서 6x10⁵ cpm 프로브로 혼합되었다. 혼성화되지 않은 RNA는 RNase A에 의해 분해되었다. 전기영동 및 다음의 RPA 자가방사선상(autoradiogram) 분석이 수행되었다.

<39> 실험치는 3개의 실험의 평균을 나타내며, 평균(±표준오차)(n=5)로서 표현된다. 일원분산분석(one-way ANOVA)에 이어서 Tukey-Kramer 다중비교방법은 p가 0.05보다 작을 때 대조군(에탄올을 처리하지 않은 정상군) 및 에탄올 처리군간의 유의한 차이를 측정하기 위해서 SPSS® 버전 10.0 (SPSS Inc., 미국)을 이용하여 수행되었다.

도면의 간단한 설명

<40> 도 1a는 mRNA 분화 디스플레이(DD)-PCR에 의해 확인된 분화 발현 유전자를 나타낸 것이다. C 레인은 대조군, E 레인은 에탄올 처리군, M 레인은 1 kb 크기 마커를 나타내며 ACP는 어닐링 대조 프라이머를 각각 나타낸다. 전체 RNA는 임신 19.5일째 정상군(에탄올이 처리되지 않은 대조군) 및 에탄올 처리된 군의 태아 랫트의 전뇌로부터 분리되며 GeneFishing DEG 스크리닝법을 사용한다. 이는 13C에 존재하는 강한 밴드와 대비하여 13E 영역의 밴드는 존재하지 않음을 통해 나타난다.

<41> 도 1b는 분화 디스플레이(DD)-PCR에 의해 얻어진 13C의 서열은 BLAST 프로그램의 GeneBank 데이터베이스를 사용하여 서열을 비교시 랫트 Napor-3 유전자 서열(AF090697)과 95% 상동성을 나타낸다.

<42> 도 2는 Napor-3 mRNA 발현을 확인하기 위한 태아 랫트 뇌의 시상동(parasagittal) (a-b)부위 및 시상봉합(sagittal) (c-d)부위를 나타낸 대표적인 영상이다. 방사능 사진의 흰색 화살표는 *in situ* 혼성화에 의해 임신 19.5일 (도면 a-c) 및 21.5일째(도면 d) 피질(C), 해마(Hi) 전뇌(F), 중뇌(M) 및 후뇌(H)의 Napor-3 mRNA 발현을 나타낸다. 또한 에탄올이 처리된 군(도 a)의 Napor 발현은 에탄올이 처리되지 않은 정상군(도 b-d)과 비교시 감소된다. 축적 막대: 700 μ m.

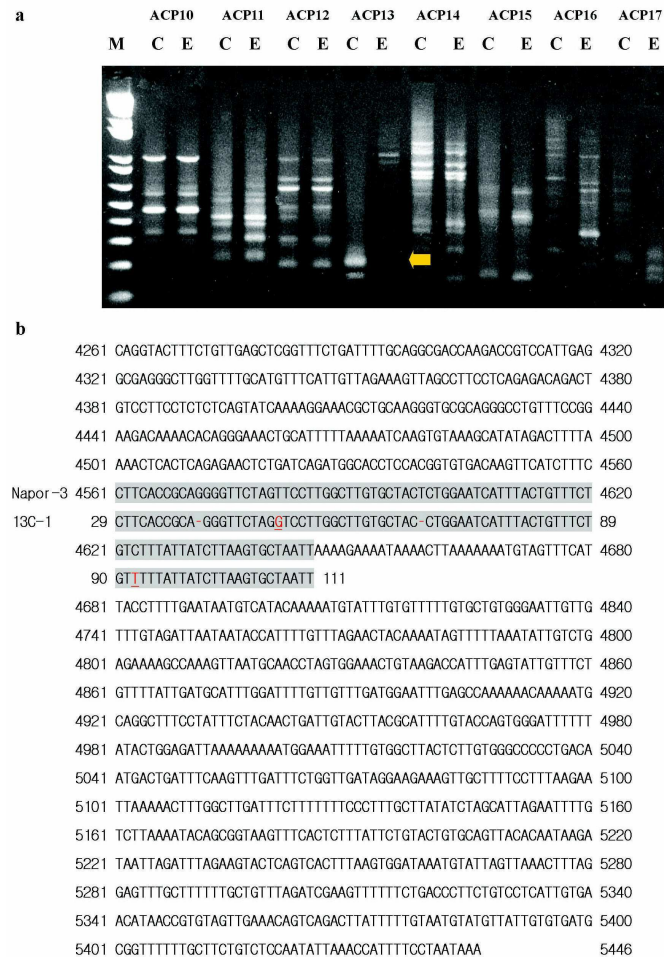
<43> 도 3은 밝은 영역의 포토마이크로그래프는 임신 19.5일째 *in situ* 혼성화에 의한 센스(a) 및 안티-센스(b,c) cRNA 프로브를 사용하여 태아 랫트의 대뇌 피질에서 Napor-3 mRNA 발현을 나타낸다. 에탄올을 처리하지 않은

정상군(a)에서는 센스 프로브에 의해 검출되지 않았으며, 안티-센스 프로브에 의해 Napor-3 mRNA 발현을 나타내는 화살표는 에탄올이 처리된 군(c)보다 정상군(b)에서 더욱 광범위하게 발현됨을 나타낸다. 축적 막대: 50 μ m.

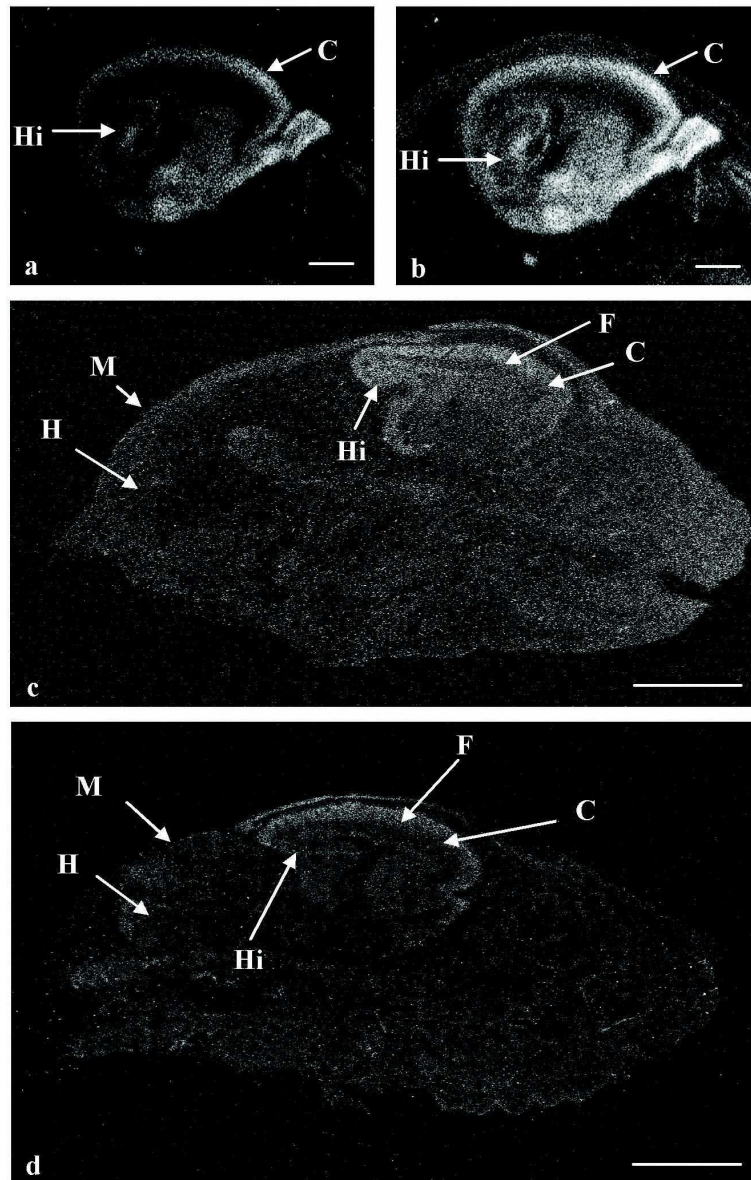
- <44> 도 4a는 임신 19.5일째(라인 1-6) 정상 및 에탄올이 처리된 뇌, 성체 랫트의 뇌 (라인 7-10)에서 Napor-3 mRNA 발현을 나타내는 RPA(RNase protection assay) 도면이다. 여기서 UP는 분해되지 않은 리보뉴클레아제 cRNA 프로브를 나타내고 DP는 분해된 리보뉴클레아제 cRNA 프로브를 나타낸다. 10 μ g 전체 RNA는 라인을 따라 분주된다. 라인 1, 3, 5, 7, 9는 정상군의 전뇌, 중뇌, 후뇌, 피질, 해마를 나타낸다. 라인 2, 4, 6, 8, 10은 에탄올이 처리된 군의 전뇌, 중뇌, 후뇌, 피질, 해마를 나타낸다.
- <45> 도 4b는 도 4a의 Napor-3 mRNA 밴드에 상응하는 평균 밀도($\pm$ 표준오차)를 Sigma Gel, version 1.0 (Jandel Scientific, 미국)을 사용하여 사이클론필린 mRNA 대조군과 보정 후 밀도치의 차이를 나타낸 것이다.
- <46> 도 4c는 각각의 컬럼은 도 4b에서 정상군과 에탄올이 처리된 군간의 밀도 차이를 나타낸다. 도 4b, 4c에서 x 축의 숫자는 태아 랫트의 전뇌(1), 중뇌(2) 및 후뇌(3), 성체 랫트의 피질(4) 및 해마(5)를 나타낸다.

도면

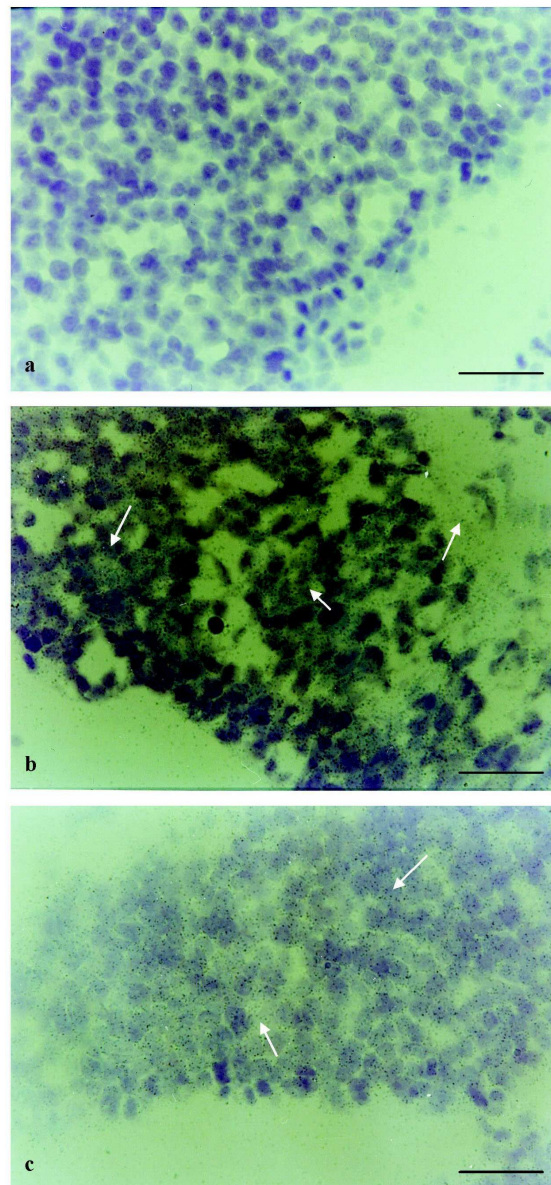
도면1



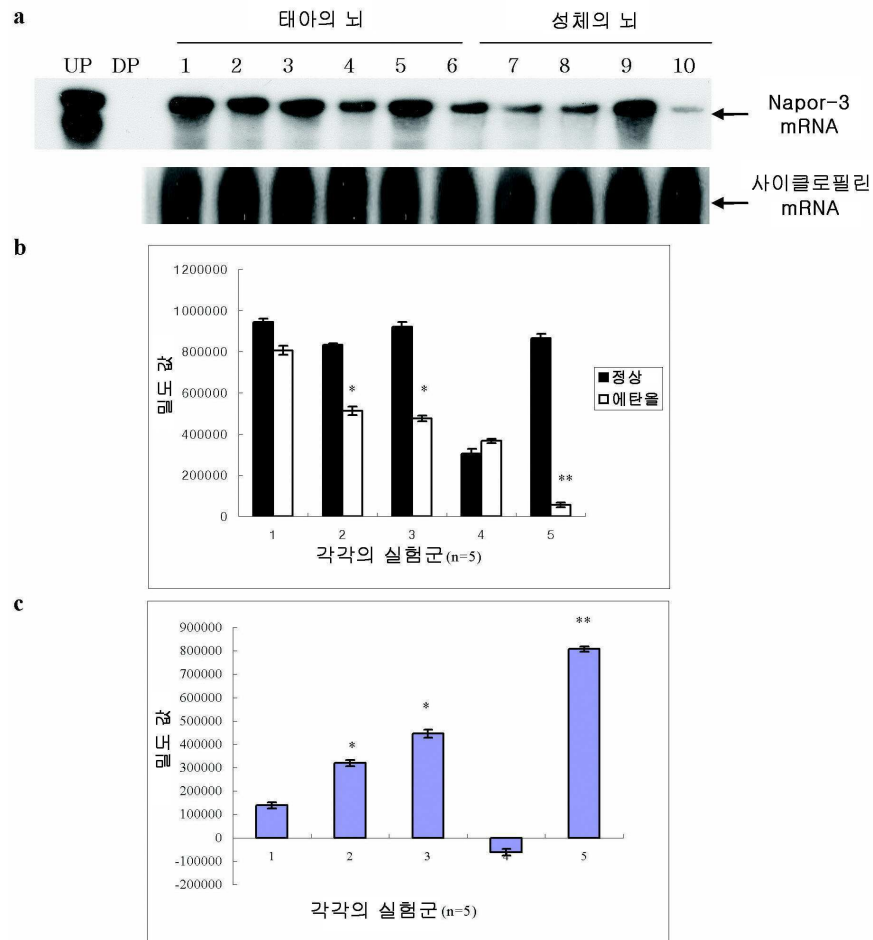
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> RNA binding protein Napor-3 inhibited by ethanol in prenatal rat brain

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 5446

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

ctgtggcatt gatgtttgag cgcacttctg aactggcttt tgttgagact atcagtgtag

60

aaagcatgcg ctgtcccaaa tccgtgtta ctatgagaaa tgaggagctg cttttaagta	120
acggcacagc caacaagatg aacggagctt tggatcattc agaccagcca gaccagatg	180
ccattaagat gtttgcgga cagatcccta ggtcctggtc ggaaaaggag ctgaaagaac	240
tttttgagcc ttatggagct gtctaccaga tcaacgtcct ccgggaccgg agtcagaacc	300
ctccccagag taaaggttgt tgtttcgtaa cattttatac aagaaaagct gcacttgagg	360
cccagaatgc actgcacaat attaaaactt tacctgggat gcatcatccc attcagatga	420
aacctgcaga tagtgaaaag tcaaacgctg tggaagacag aaaattgttc ataggaatgg	480
ttccaagaa atgtaacgag aatgatatca gagtgatgtt ttctccattc ggtcagatag	540
aagaatgccg gattctccgg ggacctgatg ggctgagtcg aggctgtgcg tttgtcacat	600
tttctacaag ggcaatggca cagaatgcaa tcaaagccat gcatcagtct cagaccatgg	660
agggtgctc ttcaccaatc gtggtgaagt ttgctgacac tcagaaggac aaagagcaaa	720
ggcgccctca gcagcagctt gcacagcaga tgcaacagct caaactgcc acttggggga	780
acctaacagg actgggtgga cttacccgc agtacctggc gcttctgcag caggccacct	840
cctccagcaa cctgggtgca ttcagtggca ttcagcaaat ggctggcatg aatgctttac	900
agttacagaa tctggcaaca ctggctgctg ctgcagctgc tgctcaaacc tcagccacca	960
gcaccaatgc aaacctctg tctagcacia gcagtgcctt gggagccctc acaagccctg	1020
tggctgcttc aacccccaat tccaccgtg gtgcggccat gaattccttg acctctcttg	1080
ggactctaca aggattggct ggagccactg tcggattgaa taatattaat gcactagcag	1140
glatggcggc tctgaatgga ggacttggcg ccacagcctt gacgaatggt acggctggca	1200

ccatggacgc cctgacccag gcctactcag gaattcagca gtatgaggca gctgcactgc	1260
ccactttgta cagccagagc ttgctgcaac agcagagtgc tgcaggcagc cagaaggaag	1320
gtccagaggg ggcaaacctc tttattttacc accttcaca ggagtttggg gaccaggaca	1380
ttctgcagat gticatgccc ttgggaaatg ttatctctgc taaagtcttc attgacaaac	1440
agaccaatct gagcaagtgc ttgggttttg ttagctatga caatccagtc tctgcacaag	1500
ctgcaatcca ggctatgaac ggctttcaga tcggcatgaa acgcttgaag gtgcagctga	1560
aacgctccaa aaacgacagc aaaccttact gatcctaacc ccagaagctc cctgctctta	1620
ttttagcttt cttaggacat cttcatgccc gttagtcacg gtttgcttag catgtccctg	1680
tggcgtctca aaaacagttt catcgctccg tcattgtttc tgatgtcttt ctgacctcac	1740
atcatatttg gttctcttac tgaccttga tctagttttg accttgaaa ttgcatgtg	1800
acctcatcta gctatgaatt ctgggaagtc aatgtgaaaa acattgctgc attcatgcaa	1860
gactgaaatt attagacaaa ttatagaaaa caaacctgt ggcaaaaatg tttctttctt	1920
atTTTTTTTT cttttcataa aacagacttg aaagtattac acagggattg gcattctgcc	1980
cggctcactgg tgacaatagc aatatgtgtc caggacaca gaatgttggt ttctaacaga	2040
ctacttccaa aaacagtttg agaaaaaaaa aaaaactgtc tgattttaag tctctagagg	2100
tctgtaatag tttttacatt tttcaggcag tgtaaagttt ttgataagg ccattttagg	2160
tggctcactt tctcattaag atatatatat agaaccactt tttgtagatt agtataagaa	2220
aaatatattac cctgttttgg ggcaaatgct acctatttgt gtcacctttt gctgaactga	2280
ctcacagtta gacaatccat ggtttaatgc acatgaaatt acctatattt tatactgttc	2340
caatgtacag gagaaaggct actgtaagct gcgtcatgtt ggtgcttctg tggattaagt	2400

tggtctctca tcacaagtct taaggtctta atgttatctg ttgataagac aagcttagaa	2460
ttggtttact taaaacaaaa aaaaaaaga atttcaaaaa aaaaagttgt ttgcttaaaa	2520
aaaaaaagtt catgtgagag aaaaaagaaa aaaaaagaaa aaaaaaaaaa ctattccaga	2580
ctaagttttg tgttggcctg agaagcattg gcgtcacttt tttttattg tggactatta	2640
gatgtgtttg tgttcagcaa aatgtgatgt tttgtttttt cttttaaaga aaaaagtga	2700
aactatctag tgccaaattc caaaggtact tcttcctag agcttcgctg gtttcctgtg	2760
agaagtgatt tgataacatg gtatcttatt atgtgttttg tataaatccc taatatataa	2820
aacaacaag aaaaaaaaaa aggttacaaa gtttgtaac ttgctattcc gtggtcttgt	2880
tgctgaaat tgttattgtt tgttatttct ctatgctgtt ttttgaaga cattgtataa	2940
gtgccgtgtg tcaactttct aacctctcca cgtcaatgct gtgacggcag ccttcacaat	3000
gtatcttctt cataatatct ggaaacctct aaggtagaaa agtcttgaac ttttaacct	3060
ttttaccag agttatttgg aatgttgggt actttttata ctgcatcct tgggtttgtt	3120
ttgggtgtt tagatatctt ttccatttg tatcttctga gttatctttt gtttttgag	3180
tcacacacct tcccaaaaaa cccttaagtc ttttcttaa accgtttttt atttctttt	3240
ttatccctc ctctctatca ccctgtgctc ctccagttta aatataagag actgagtaga	3300
ccctgggaaa ggaaaaacag gtagagctta gccctacaca aaccctaaag accgtgtctg	3360
cttttgata aggttttcat ggtatgccct cgtgtacaat atttttatac accctggagt	3420
taaatggctt tttggtggtc caatctttca agaagtttta cttttgttc ttaaaccacc	3480
ctatgtaatg ctgagtcagc ctttggctcg ggattctcag acgcatgtgg acacctgaat	3540

atgcaaggtg tcttctgaa aagccacac atttcaagt gttggccatg taagaggaga	3600
tcagctgctc ttcaccacaa ttactacaa atactaggac tagttcctgc tgttgctctc	3660
gaaagtgcc aattcctgag tctggcttca tatgagcaga tgtcttggtc tgacagaccc	3720
caatgtcatg cctacagtc aaacacacac ccagcctctg ggaaaacaca ccttgcaagc	3780
ttctggctc agctccctt tcttcacac cctccctcca ttgtatttta tgtgtgtgtg	3840
aatgtgatag cctgagatg gaaaggatta gcctctcaca atgcaaaaaa aaaaaaaaaa	3900
aaaaaaaaagt tccctcctc cagcacgcgc acttcagtg acatgattgg tgtagccca	3960
ctgtttacca ctgccgggc cttcttcat ccttgagggc tattttgtac tttctgcagc	4020
actcagctca ctaacagtga tcacacacat tctcagctc tctatggtgg tgtgtaggta	4080
cagtgtaga aacacaagag aataccagtt gtatttcata gaccatctcg ttcacaatct	4140
atttagttat taatgatata aatctcaaaa aaaaatcttg acttttttt tcccccatg	4200
gaagccaact gccctcctc ctcttaacc acctgcgcc cccgagaggc tcgggtcagg	4260
caggtacttt ctgttgagct cggtttctga ttttgaggc gaccaagacc gtccattgag	4320
gcgagggtt ggttttgcat gtttcattgt tagaaagtta gccttctca gagacagact	4380
gtccttctc tctcagtatc aaaaggaaac gctgcaaggg tgcgcagggc ctgtttccgg	4440
aagacaaaac acagggaac tgcattttta aaaatcaagt gtaaagcata tagactttta	4500
aaactcactc agagaactct gatcagatgg cacctccag gtgtgacaag ttcattcttc	4560
cttcaccga ggggttctag ttcttggct tgtgtactc tggaatcatt tactgtttct	4620
gtctttatta tcttaagtgc taattaaaag aaaataaaac ttaaaaaat gtagtttcat	4680
tacctttga ataatgtcat acaaaaatgt atttgtgtt ttgtgctgtg ggaattgttg	4740

ttttagatt aataatacca ttttgttttag aactacaaaa tagtttttaa atattgtctg	4800
agaaaagcca aagttaatgc aacctagtgg aaactgtaag accatttgag tattgtttct	4860
gttttattga tgcatttga ttttgttgtt ttagtgaatt tgagccaaaa aacaaaaatg	4920
caggctttcc tatttctaca actgattgta cttacgcatt ttgtaccagt gggatttttt	4980
atactggaga ttaaaaaaaaa atggaaattt ttgtggctta ctcttgtggg cccctgaca	5040
atgactgatt tcaagtttga tttctggttg ataggaagaa agttgctttt cctttaagaa	5100
ttaaaaactt tggtttgatt tctttttttc cttttgctta tatctagcat tagaattttg	5160
tcttaaaata cagcggtaag ttctactctt tattctgtac tgtgcagtta cacaataaga	5220
taattagatt tagaagtact cagtcacttt aagtggataa atgtattagt taaactttag	5280
gagtttgctt ttttgcgtt tagatcgaag ttttttctga cctttctgtc ctcatgtga	5340
acataaccgt gtagttgaaa cagtcagact ttttttgta atgtatgtta ttgtgtgatg	5400
cggttttttg ctctgtctc caatattaaa ccattttcct aataaa	5446