



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년09월22일
 (11) 등록번호 10-1440639
 (24) 등록일자 2014년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2008-7030956
 (22) 출원일자(국제) 2007년06월15일
 심사청구일자 2012년06월15일
 (85) 번역문제출일자 2008년12월19일
 (65) 공개번호 10-2009-0029218
 (43) 공개일자 2009년03월20일
 (86) 국제출원번호 PCT/CH2007/000297
 (87) 국제공개번호 WO 2007/147275
 국제공개일자 2007년12월27일
 (30) 우선권주장
 60/814,866 2006년06월19일 미국(US)
 60/881,402 2007년01월19일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 WO2003004992 A1
 WO2005015158 A1
 전체 청구항 수 : 총 26 항

(73) 특허권자
지보당 에스아
 스위스 체하-1214 베르니에 슈멩 드 라 파르튀브리 5
 (72) 발명자
슬랙 제이 패트릭
 미국 오하이오주 45140 러브랜드 스톤브리지 드라이브 9925
 (74) 대리인
제일특허법인, 장성구

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **핵산, 폴리펩타이드 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 단맛의 조절제를 위한 스크리닝에 기능성인 신규한 키메라 단백질(chimeric protein), 상응하는 핵산 서열, 발현 벡터, 형질감염(transfection)된 숙주 세포, 및 이들을 이용하여 단맛 반응의 조절제 및 증강제 (enhancer)를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 2 또는 서열번호: 20의 아미노산 서열을 갖는 CSR::T1R2 폴리펩타이드, 및

서열번호: 4 또는 서열번호: 22의 아미노산 서열을 갖는 CSR::T1R3 폴리펩타이드

로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 CSR::T1R을 포함하는, 하나 이상의 감미제(sweetener) 또는 감미 증강제(sweetness enhancer)에 결합할 수 있는 CSR::T1R 키메라 단백질(chimeric protein).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

CSR::T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체성 키메라 단백질, CSR::T1R2/T1R3 헤테로이량체성 키메라 단백질, 및 T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체성 키메라 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로이량체성 단백질 형태의 2 개 폴리펩타이드 서브유닛(subunit)를 포함하고, 이때 상기 헤테로이량체의 T1R2 서브유닛이 서열번호: 8의 아미노산 서열을 갖고, 상기 헤테로이량체의 T1R3 서브유닛이 서열번호: 10의 아미노산 서열을 갖는, CSR::T1R 키메라 단백질.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체성 단백질, CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b 헤테로이량체성 단백질, CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-b 헤테로이량체성 단백질 및 CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-a 헤테로이량체성 단백질을 포함하나 이들로 한정되지 않는 CSR::T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체성 키메라 단백질을 포함하고, 이때 CSR::T1R2-a가 서열번호: 2에 상응하고, CSR::T1R2-b가 서열번호: 20에 상응하며, CSR::T1R3-a가 서열번호: 4에 상응하고, CSR::T1R3-b가 서열번호: 22에 상응하는, CSR::T1R 키메라 단백질.

청구항 4

서열번호: 1(CSR::T1R2-a), 서열번호: 19(CSR::T1R2-b), 서열번호: 3(CSR::T1R3-a) 및 서열번호: 21(CSR::T1R3-b)로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산을 하나 이상 포함하는, 하나 이상의 감미제 또는 감미 증강제에 결합될 수 있는 CSR::T1R 키메라 단백질을 암호화하는 핵산.

청구항 5

제 4 항에 정의된 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 6

제 5 항에 정의된 발현 벡터에 의해 형질감염(transfection)된 숙주 세포.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

제 1 항에 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질 및 G-단백질을 안정적으로 발현하는 숙주 세포.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

제 1 항에 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질 및 G-단백질을 일시적으로 발현하는 숙주 세포.

청구항 9

발현에 충분한 조건 하에 CSR::T1R 키메라 단백질을 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양함으로써 CSR::T1R 키메라 단백질을 형성하는 단계를 포함하는,

제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항에 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질의 제조 방법.

청구항 10

(i) 단맛 자극 및 칼슘 자극으로부터 선택된 자극에 반응하는 CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 세포를 시험 물질과 접촉시킴으로써 기능성 반응을 제공하는 단계, 및

(ii) 시험 물질이 상기 세포에서 상기 CSR::T1R 키메라 단백질의 기능성 반응에 영향을 주는 지를 상기 세포에서의 하나 이상의 기능성 반응으로 확인하는 단계

를 포함하는, 미각 세포에서 단맛의 신호전달을 조절하는 물질을 확인하는 방법으로서, 이때 상기 CSR::T1R 키메라 단백질이 제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,
세포가 G-단백질도 발현하는, 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서,
G-단백질이 키메라 G-단백질인, 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서,
G-단백질이 키메라 G-단백질 G 알파 16-구스트듀신 44인, 방법.

청구항 14

제 10 항에 있어서,
단계 (ii)가 세포내 메신저(messenger)의 변화 또는 세포내 메신저에 의해 유발된 변화를 측정함으로써 수행되는, 방법.

청구항 15

제 11 항에 있어서,
기능성 반응이 이노시톨(inositol) 트라이포스페이트(IP3) 및 칼슘 이온(Ca^{2+})으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포내 메신저의 변화를 측정함으로써 확인되는, 방법.

청구항 16

제 10 항에 있어서,
상기 세포가 박테리아 세포, 진핵 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 포유류 세포, 양서류 세포 및 연충 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서,
세포가 포유류 세포인, 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서,
세포가 CHO, COS, HeLa 및 HEK-293 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 포유류 세포인, 방법.

청구항 19

제 10 항에 있어서,

단계 (i)이 칼슘의 존재하에 CSR::T1R 키메라 단백질을 시험 물질과 접촉시킴을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

칼슘이 염화칼슘의 형태로 제공되는, 방법.

청구항 21

조합 사용되는

(i) 제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항에 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질을 발현시키는 재조합 세포, 및

(ii) CSR::T1R 키메라 단백질의 작용제

를 포함하는, CSR::T1R 키메라 단백질의 조절제인 시험 물질을 확인하기 위한 키트.

청구항 22

(i) CSR::T1R 키메라 단백질을 발현시키는 재조합 세포를 성장시키는 단계,

(ii) 시험 물질을 적합한 농도의 작용제의 존재하에서 첨가하는 단계, 및

(iii) 시험 물질의 존재하의 반응 및 시험 물질의 부재하의 반응을 비교하여 세포의 기능성 반응의 변화를 측정함으로써 CSR::T1R 키메라 단백질의 조절제인 시험 물질을 확인하는 단계

를 포함하는,

CSR::T1R 키메라 단백질의 조절제인 시험 물질을 확인하기 위한 방법으로서,

상기 CSR::T1R 키메라 단백질이 제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 방법.

청구항 23

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

(ii) 시험 물질에 반응하는 파라미터의 변화를 음성 대조군과 비교하여 측정함으로써 조절제를 확인하는 단계

를 포함하는, CSR::T1R 키메라 단백질을 조절하는 물질을 확인하는 방법으로서,

상기 CSR::T1R 키메라 단백질이 제 1 항 내지 제 3 항중 어느 한 항에 정의된 바와 같은, 방법.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

리간드가 칼슘, 칼슘 이온 및 염화칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 25

제 23 항에 있어서,

단계 (i)이 형광 분광법; NMR 분광법; 흡광도 및 굴절률 중 하나 이상을 측정하는 방법; 유체역학적 방법; 크로마토그래피; 용해도의 측정; 및 생화학적 방법으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의해 수행되며, 용액, 이중층 막, 고체 상에의 부착, 지질 단층, 막 상에의 결합 및 소포체로 이루어진 군으로부터 선택된 적합한 환경에서 CSR::T1R 키메라 단백질의 성질을 측정하는, 방법.

청구항 26

제 4 항에 있어서,

그의 상응하는 단백질에서 C-말단을 형성하는 그의 단부 또는 단부 근처에서 서열번호: 6(HSV tag)을 추가적으로 포함하는, 핵산.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 단맛의 조절제를 위한 스크리닝에 기능성인 신규한 키메라 단백질(chimeric protein), 상응하는 핵산 서열, 발현 벡터, 형질감염(transfection)된 숙주 세포, 및 이들을 이용하여 단맛 반응의 조절제 및 증강제(enhancer)를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

배경기술

[0002] 식품 및 향미 업계는 예컨대, 당 또는 인공 감미료를 비롯한 감미제를 감소시키기 위하여 감미 조절제, 특히 감미 증강제(sweetness enhancer)에 대하여 크게 관심을 가져 왔다. 감미 증강제의 사용은 칼로리를 감소시킬 수 있고, 당에 의한 치아 손상을 방지할 수 있으며, 많은 인공 감미제와 관련된 쓴 맛/금속성 맛과 뒷맛을 방지하거나 감소시킬 수 있다.

[0003] 감미 조절제 또는 증강제를 위한 스크리닝을 위하여, T1R2/T1R3 헤테로이량체성 감미 수용체를 이용하는 공지된 스크리닝이 이용될 수 있다.

[0004] 감미 조절제/증강제를 확인(identification) 또는 특징분석하기 위하여, 유효한 증강제/조절제를 갖는 샘플의 결과 및 상기 증강제/조절제를 갖지 않는 샘플의 결과(둘다 감미제를 부가적으로 함유한다)가 일반적으로 비교된다. 그러나, 감미제, 특히 당은 삼투성에 큰 영향을 주고/주거나 점성을 갖는다. 점도 및 삼투성과 같은 샘플 성질을 변화시키기 때문에, 표준 스크리닝 방법을 이용할 때 부정확한 결과를 야기하는 인공산물이 발생할 수 있다.

[0005] 공지된 스크리닝의 또 다른 단점은 야생형(wildtype) T1R2/T1R3 수용체가 여러 개의 결합 도메인, 특히 아스파탐(aspartame) 및 슈크라로스(sucralose) 인공 감미제 뿐만 아니라 자당, 포도당, 과당과 같은 탄수화물 감미제에 결합하는 파리지옥형("VFT") 도메인을 비롯한 세포외 아미노 말단 도메인을 포함하는 점이다. 그러므로, VFT 리간드를 제외한 특이적 리간드, 특히 T1R2 및/또는 T1R3의 막관통 도메인("TMD(s)") 및 시스테인-풍부 도메인 리간드의 특이적 조절제를 위한 스크리닝이 공지된 스크리닝 방법에 의해서는 가능하지 않다.

[0006] T1R3의 TMD에서 결합하는 작용제는 사이클라메이트 및 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC)이다. 자당 및 슈크라로스는 T1R2 및 T1R3의 VFT에서 결합하며, 아스파탐은 T1R2의 VFT에서 결합한다.

[0007] 수용체에 결합하기 위해 당과 경쟁할 수 있는 물질의 확인을 방지하기 위하여, VFT 도메인과 물리적으로 구분되는 자리, 특히 TMD 및/또는 시스테인-풍부 도메인에서 결합되는 감미 수용체 조절제를 확인할 수 있는 스크리닝이 바람직하다.

발명의 상세한 설명

[0008] 본원에서 제공된 스크리닝 방법 및 결합 분석은 상기 문제점을 피하고, CSR::T1R 키메라 단백질(chimeric protein)을 이용함으로써 개선된 결과를 얻게 한다.

[0009] 제 1 측면에서,

[0010] 90% 이상의 서열 동일성으로 서열번호: 2(CSR::T1R2-a) 또는 서열번호: 20(CSR::T1R2-b)에 실질적으로 상동하는 CSR::T1R2 폴리펩타이드, 및

[0011] 90% 이상의 서열 동일성으로 서열번호: 4(CSR::T1R3-a) 또는 서열번호: 22(CSR::T1R3-b)에 실질적으로 상동하는 CSR::T1R3 폴리펩타이드

[0012] 로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 CSR::T1R을 포함하는,

- [0013] 하나 이상의 감미제 또는 감미 증강제에 결합할 수 있는 CSR::T1R 키메라 단백질이 제공된다.
- [0014] 또 다른 측면에서,
- [0015] CSR::T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체성 키메라 단백질, CSR::T1R2/T1R3 헤테로이량체성 키메라 단백질 및 T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체성 키메라 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 헤테로이량체성 단백질 형태의 2개 폴리펩타이드 서브유니트를 포함하고,
- [0016] 이때, 상기 헤테로이량체의 T1R2 서브유니트는 90% 이상의 서열 동일성으로 서열번호: 8에 본질적으로 상동하는 폴리펩타이드를 포함하고,
- [0017] 상기 헤테로이량체의 T1R3 서브유니트는 90% 이상의 서열 동일성으로 서열번호: 10에 본질적으로 상동하는 폴리펩타이드를 포함하는
- [0018] 상기 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질이 제공된다.
- [0019] 또 다른 측면에서,
- [0020] CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체성 단백질, CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b 헤테로이량체성 단백질, CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-b 헤테로이량체성 단백질, CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-a 헤테로이량체성 단백질, 또는 본원에 정의된 것과 실질적으로 상동하는 헤테로이량체성 단백질을 비롯한(그러나, 이에 한정되지 않는다) CSR::T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체성 키메라 단백질인 상기 정의된 2개 폴리펩타이드 서브유니트를 포함하고,
- [0021] 이때, CSR::T1R2-a는 서열번호: 2에 상응하고, CSR::T1R2-b는 서열번호: 20에 상응하며, CSR::T1R3-a는 서열번호: 4에 상응하고, CSR::T1R3-b는 서열번호: 22에 상응하는
- [0022] CSR::T1R 키메라 단백질이 제공된다.
- [0023] 또 다른 측면에서,
- [0024] 서열 동일성에 의해 측정될 때 서열번호: 1(CSR::T1R2-a), 서열번호: 19(CSR::T1R2-b), 서열번호: 3(CSR::T1R3-a) 및 서열번호: 21(CSR::T1R3-b)로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산,
- [0025] 하이브리드화에 의해 측정될 때 서열번호: 1(CSR::T1R2-a), 서열번호: 19(CSR::T1R2-b), 서열번호: 3(CSR::T1R3-a) 및 서열번호: 21(CSR::T1R3-b)로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산, 및
- [0026] 청구의 범위의 제 1 항에 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 실질적으로 상동하는 핵산
- [0027] 중 하나 이상을 포함하는, 하나 이상의 감미제 또는 감도 증강제에 결합할 수 있는 CSR::T1R 키메라 단백질을 암호화하는 핵산으로서,
- [0028] 이때, 서열 동일성에 의해 측정될 때 상기 실질적으로 상동하는 핵산이 90% 이상의 서열 동일성을 갖고,
- [0029] 하이브리드화에 의해 측정될 때 상기 실질적으로 상동하는 핵산이 50% 폼아마이드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 42℃ 용액 중에서 엄격한 하이브리드화 조건 하에 하이브리드화되고, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 65℃ 용액 중에서 세척되며,
- [0030] 상기 핵산이 그의 상응하는 단백질에서 C-말단을 형성하는 그의 단부 또는 단부 근처에서 서열번호: 6(HSV tag)을 포함하거나 포함하지 않는, 핵산이 제공된다.
- [0031] 또 다른 측면에서, 상기 정의된 핵산을 포함하는 발현 벡터가 제공된다.
- [0032] 또 다른 측면에서, 상기 정의된 발현 벡터에 의해 형질감염(transfection)된 숙주 세포가 제공된다.
- [0033] 또 다른 측면에서, 상기 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질 및 G- 단백질, 임의적으로는 Gaq-구스트듀신(Gustducin)에 실질적으로 상동하는 G-단백질을 안정하게 발현하는 전술된 숙주 세포가 제공된다.
- [0034] 또 다른 측면에서, 전술된 CSR::T1R 키메라 단백질 및 G- 단백질, 임의적으로는 Gaq-구스트듀신에 실질적으로 상동하는 G-단백질을 일시적으로 발현하는 전술된 숙주 세포가 제공된다.

- [0035] 또 다른 측면에서, 발현에 충분한 조건 하에 CSR::T1R 키메라 단백질을 위해 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양함으로써 CSR::T1R 키메라 단백질을 형성하고, 임의적으로 이를 세포로부터 회수하는 단계를 포함하는, 상기 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질의 제조 방법이 제공된다.
- [0036] 또 다른 측면에서, 미각 세포에서 단맛의 신호전달을 조절하는 물질을 확인하는 방법이 제공되며, 이 방법은
- [0037] (i) 단맛 자극 및 칼슘 자극으로 이루어진 군으로부터 선택된 자극에 반응하는 CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 세포를 하나의 시험 물질과 (임의적으로는 또 다른 시험 물질의 존재하에) 접촉시켜서 기능성 반응을 제공하는 단계, 및
- [0038] (ii) 하나 이상의 시험 물질이 상기 세포에서 상기 CSR::T1R 키메라 단백질의 기능성 반응에 영향을 주는 지를 상기 세포에서의 하나 이상의 기능성 반응으로 확인하는 단계를 포함하며,
- [0039] 이때, 상기 CSR::T1R 키메라 단백질은 상기 정의된 바와 같다.
- [0040] 또 다른 측면에서, 세포가 또한 G-단백질을 발현하는 상기 정의된 방법이 제공된다.
- [0041] 또 다른 측면에서, G-단백질이 Gαq-구스트듀신에 실질적으로 상동하는 키메라 G-단백질인 상기 정의된 방법이 제공된다.
- [0042] 또 다른 측면에서, G-단백질이 키메라 G-단백질 Gα과 16-구스트듀신 44인 상기 정의된 방법이 제공된다.
- [0043] 또 다른 측면에서, 단계 (ii)가 세포내 메신저(messenger)의 변화 또는 세포내 메신저에 의해 유발된 변화를 측정함으로써 수행되는 상기 정의된 방법이 제공된다.
- [0044] 또 다른 측면에서, 기능성 반응은 이노시톨(inositol) 트라이포스페이트(IP3) 및 칼슘 이온(Ca²⁺)으로 이루어진 군으로부터 선택된 세포내 메신저의 변화를 측정함으로써 확인되는 상기 정의된 방법이 제공된다.
- [0045] 또 다른 측면에서, 상기 세포가 박테리아 세포, 진핵 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 포유류 세포, 양서류 세포 및 연충 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 상기 정의된 방법이 제공된다.
- [0046] 또 다른 측면에서, 세포가 포유류 세포인 전술된 방법이 제공된다.
- [0047] 또 다른 측면에서, 세포가 CHO, COS, HeLa 및 HEK-293 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 포유류 세포인 전술된 방법이 제공된다.
- [0048] 또 다른 측면에서, 단계 (i)는 칼슘의 존재하에 CSR::T1R 키메라 단백질을 시험 물질과 접촉시킴을 추가로 포함하는 전술된 방법이 제공된다.
- [0049] 또 다른 측면에서, 칼슘이 염화칼슘의 형태로 제공되는 전술된 방법이 제공된다.
- [0050] 또 다른 측면에서, 조합 사용되는 (i) 상기 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포, 및 (ii) CSR::T1R 키메라 단백질의 작용제를 포함하는, CSR::T1R 키메라 단백질의 조절제로서 시험 물질을 확인하기 위한 키트가 제공된다.
- [0051] 또 다른 측면에서,
- [0052] (i) 상기 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포를 성장시키는 단계,
- [0053] (ii) 적합한 농도의 작용제의 존재하에서 시험 물질을 첨가하는 단계, 및
- [0054] (iii) 시험 물질의 존재하의 반응과 시험 물질의 부재하의 반응을 비교하여 세포의 기능성 반응의 변화를 측정함으로써 시험 물질을 상기 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질의 조절제로서 확인하는 단계
- [0055] 를 포함하는,
- [0056] 상기 정의된 키트의 사용 방법이 제공된다.
- [0057] 또 다른 측면에서,
- [0058] (i) CSR::T1R 키메라 단백질에 결합하는 리간드에 반응하여 변하는 파라미터를 측정하는 단계,
- [0059] (ii) 임의적으로는 리간드의 존재하에, 시험 물질에 반응하는 파라미터의 변화를 음성 대조군과 비교하여 측정함으로써 조절제 또는 리간드를 확인하는 단계

- [0060] 를 포함하는,
- [0061] 상기 정의된 CSR::T1R 키메라 단백질을 조절하는 물질의 확인 방법이 제공된다.
- [0062] 또 다른 측면에서, 리간드는 칼슘, 칼슘 이온 및 염화칼슘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 상기 정의된 방법이 제공된다.
- [0063] 또 다른 측면에서, (i) 단계가 형광 분광법; NMR 분광법; 흡광도 및 굴절률 중 하나 이상을 측정하는 방법; 유체역학적 방법; 크로마토그래피; 용해도의 측정; 및 생화학적 방법으로 이루어진 군에서 선택된 방법에 의해 수행되며, 상기 방법이 용액, 이중층 막, 고체 상에의 부착, 지질 단층, 막 상에의 결합 및 소포체로 이루어진 군으로부터 선택된 적합한 환경에서 CSR::T1R 키메라 단백질의 성질을 측정하는, 상기 정의된 방법이 제공된다.
- [0064] CSR::T1R 키메라 단백질은 CSR::T1R2 단량체, CSR::T1R3 단량체, CSR::T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체, CSR::T1R2/T1R3 헤테로이량체(야생형 T1R3을 갖는 키메라성 T1R2 서브유닛), 및 T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체(야생형 T1R2을 갖는 키메라성 T1R3 서브유닛)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] CSR::T1R2는 CSR::T1R2-a 및 CSR::T1R2-b를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. CSR::T1R3은 CSR::T1R3-a 또는 CSR::T1R3-b를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 각각의 a-변이체는 키메라성 CSR::T1R 단백질을 제공하기 위해 다른 기원(각각, CSR 및 T1R)의 두 부분이 연결되는 정확한 위치 측면에서 관련 b-변이체와 차이를 갖는다. 서열에서 명백히 알 수 있는 바와 같이, 변이체 -a는 시스테인-풍부 도메인(CRD) 바로 앞에서 연결되고, 변이체 -b는 CRD 바로 뒤에서 연결된다(서열번호: 1 + 2: CSR::T1R2-a 핵산 + 단백질; 서열번호: 3 + 4: CSR::T1R3-a 핵산 + 단백질; 서열번호: 19 + 20: CSR::T1R2-b 핵산 + 단백질; 서열번호: 21 + 22: CSR::T1R3-b 핵산 + 단백질).
- [0066] 각각의 키메라성 서브유닛은 각각의 다른 키메라성 서브유닛 또는 야생형 서브유닛과 결합할 수 있다. 따라서, CSR::T1R 키메라 단백질은 특히 CSR::T1R2-a 단량체, CSR::T1R3-a 단량체, CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체, CSR::T1R2-a/T1R3 헤테로이량체(야생형 T1R3을 갖는 키메라성 T1R2-a 서브유닛) 및 T1R2/CSR::T1R3-a 헤테로이량체(야생형 T1R2을 갖는 키메라성 T1R3-a 서브유닛) 뿐만 아니라, CSR::T1R2-b 단량체, CSR::T1R3-b 단량체, CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b 헤테로이량체, CSR::T1R2-b/T1R3 헤테로이량체(야생형 T1R3을 갖는 키메라성 T1R2-a 서브유닛), T1R2/CSR::T1R3-b 헤테로이량체(야생형 T1R2을 갖는 키메라성 T1R3-a 서브유닛), CSR::T1R2-a/T1R3-b 헤테로이량체 및 CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-a 헤테로이량체를 포함한다.
- [0067] CSR:T1R 키메라 단백질은 T1R2, T1R3, 또는 T1R2와 T1R3의 VFT 도메인을 갖지 않고, 따라서 T1R2 및/또는 T1R3의 TMD 도메인 및 시스테인-풍부 도메인에 결합하는 화합물을 특이적으로 확인할 수 있게 한다. 이들 확인된 화합물은 생체내 감미 수용체에 결합하기 위하여 VFT 부위에 결합하는 탄수화물과 경쟁하는 것으로 예상되지 않기 때문에 특히 관심을 끌고, 따라서 탄수화물의 감미 증강제에 대한 특히 관심있는 유력한 후보가 된다.
- [0068] 키메라 단백질은, 때때로 목적하는 성질을 보유하되 원하지 않는 성질을 가지지 않을 수 있는 둘 이상의 본래 단백질의 연결된 단편이다. 단백질의 3차원 공간에서의 접힘이 결정적이고 아미노산의 위치가 상기 접힘에 영향을 주기 때문에, 임의의 두 단편이 연결될 수 없다. 결정적인 도메인과 아미노산이 알려져 있더라도, 성공적인 발현, 올바른 접힘 및 목적하는 성질의 완전한 기능이 그다지 예측될 수 없다.
- [0069] 본 출원인은 키메라성 단량체인 CSR::T1R2 및 CSR::T1R3이 기능성이고, 기능성 CSR::T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체(CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 및 CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b 헤테로이량체에 대한 실시예를 참고한다; CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-b 및 CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-a 헤테로이량체가 또한 해당될 수 있다)를 형성할 수 있음을 발견하였다. 본 출원인의 실험은 CSR::T1R2 단량체성 서브유닛이 또한 헤테로이량체를 형성하지 않고도 그 자체로 기능성 감미 수용체로 기능함을 나타낸다. 예비 실험은 CSR::T1R3은 특정 G-단백질을 관여시키고/거나 활성화시키는데 어려움을 가질 수 있음을 나타낸다; 그러나, CSR::T1R3은 G-단백질을 활성화시키는 능력을 필요로 하지 않는 결합 분석에서 유용하다.
- [0070] 따라서, CSR::T1R2 및 CSR::T1R3은 본원에 기재된 방법에서 이들의 단량체 형태로도 또한 유용하다. 이들 방법에서 이용될 수 있는 대안적인 헤테로이량체는 키메라성 서브유닛/야생형 서브유닛 헤테로이량체(CSR::T1R2/T1R3 및 T1R2/CSR::T1R3)이다.
- [0071] CSR::T1R2/CSR::T1R3 헤테로이량체에서, 헤테로이량체성 착체중 CSR::T1R 서브유닛 각각은 2개 소스(source) 단백질로부터의 연결된 서열 단편으로 이루어진다. 2개 소스 단백질은 인간 칼슘-감응성 수용체(hCaSR), 및 T1R 단백질(T1R2 또는 T1R3)이다. 서브유닛 둘다에 공통된 hCaSR-유도된 단편(CSR)은 hCaSR의 세포외 도메인

(ECD)을 포함한다. T1R-유도된 단편은 T1R 서열의 막통과 도메인(TMD)을 포함하며, T1R2 또는 T1R3중 하나로부터 유도되기 때문에 다르다.

- [0072] 카메라 단백질은 감미제 대신에 수용체 활성화를 위한 리간드/작용제로서 갈습을 이용하는 것을 허용하여서, 감미제의 존재로 인한 부작용이 방지될 수 있다.
- [0073] 본원에서 사용되는 CSR::T1R라는 용어는 CSR::T1R2 단일체(homomer); 또는 CSR::T1R3 단일체; 또는 CSR::T1R2와 CSR::T1R3의 또는 야생형 T1R3의 헤테로이량체성 착체(CSR::T1R2/CSR::T1R3 또는 CSR::T1R2/T1R3); 또는 CSR::T1R3와 CSR::T1R2의 또는 야생형 T1R2의 헤테로이량체성 착체(CSR::T1R2/CSR::T1R3 또는 T1R2/CSR::T1R3)를 지칭한다.
- [0074] 보다 일반적으로, 수용체는 생체내에서 및 많은 경우에 시험관내 방법에서 G-단백질에 결합되기 때문에, CSR::T1R은 또한 "GPCR"이라고도 지칭된다.
- [0075] 제공되는 카메라성 CSR::T1R 구조체(DNA, 벡터, 형질감염된 세포, 단백질)은 비제한적으로 단맛 반응의 조절제, 예컨대, 비제한적으로 감미 증강제에 대해 스크리닝할 때 유용하다. 전통적인 스크리닝 방법 및 결합 분석이 조절제 및 증강제를 위한 스크리닝에 이용될 수 있다. 이러한 스크리닝 방법론은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 하기에 개략되어 있다.
- [0076] 다르게는, 카메라성 CSR::T1R 구조체내의 CSR(hCaSR의 일부)는 생성된 수용체를 갈습 반응성으로 만들기 때문에, T1R 수용체의 리간드/작용제의 존재/부재하에 조절제에 대해 스크리닝할 때 리간드는 갈습(예컨대, 비제한적으로는 염화갈습 형태)으로 치환된다. 이는 실제 리간드/작용제가 존재하는 임의의 부정적인 효과를 방지하는 부가적인 이점을 갖는다. 예컨대, 당 리간드/작용제의 조절제에 대해 스크리닝할 때, 삼투성 등에 대한 당의 악영향이 방지된다.
- [0077] **분석에 사용되는 세포:**
- [0078] 형질감염된 또는 내인성 T1R3 및 T1R2는 CSR::T1R2 및/또는 CSR::T1R3 각각의 작용제 반응 또는 또 다른 조절제에 의존하는 상기 반응의 변화를 측정하는 방법을 부정적으로 방해할 수 있다. 관측된 신호가 CSR::T1R2 및/또는 CSR::T1R3 활성화에 직접적으로 관련될 수 있도록 T1R3 및 T1R2의 부재가 CSR::T1R2 및/또는 CSR::T1R3 활성화의 확인을 위한 "0"(null) 배경을 제공한다. 이로 인해 CSR::T1R2 및/또는 CSR::T1R3를 특이적으로 조절하는 물질을 확인할 수 있고, 야생형 T1R2 및 T1R3을 활성화시키는 물질을 배제하는데, T1R3의 경우에는 T1R3이 단맛 및 우마미(umami) 헤테로이량체 둘다의 일부이기 때문에 우마미 자극물질을 또한 포함할 수 있다.
- [0079] 내인성 야생형 T1R2 및/또는 T1R3의 존재는 일부 배경 신호를 유발하는데, 이는 바람직하지 않다. 내인성 T1R2 및/또는 T1R3를 갖는 세포는 충분히 낮은 배경을 갖는 결과를 얻는데 유용할 수 있는 반면, 내인성 T1R2 및 T1R3 수용체를 함유하지 않은 세포가 보다 바람직하다. 배경에 악영향을 주지 않으면서 야생형 T1R3을 함유할 수 있는 CSR::T1R2/T1R3 카메라 단백질, 또는 배경에 악영향을 주지 않으면서 야생형 T1R2를 함유할 수 있는 T1R2/CSR::T1R3 카메라 단백질을 이용할 때에는 예외이다.
- [0080] 하기에 열거된 세포는 내인성/야생형 T1R3 또는 내인성 야생형 T1R2를 함유하지 않기 때문에 특히 유용하다.
- [0081] 그러나, 대안적인 세포가 또한 본원에 기재된 방법에서 유용할 수 있다.
- [0082] 적합한 진핵 세포는 진핵 세포, 예를 들면 비제한적으로 포유류 세포, 효모 세포, 또는 곤충 세포(Sf9 포함), 양서류 세포(멜라닌색소포 세포 포함), 또는 캐노르하브디티스(Caenorhabditis) 세포(꼬마 선충을 포함)을 비롯한 연충 세포를 포함한다.
- [0083] 적합한 포유류 세포는 예를 들면 비제한적으로 COS 세포(Cos-1 및 Cos-7 포함), CHO 세포, HEK293 세포, HEK293T 세포, HEK293 T-Rex(상표명) 세포, 또는 기타 형질감염성(transfectable) 진핵 세포주를 포함한다.
- [0084] 적합한 박테리아 세포는 비제한적으로 대장균(E. coli)을 포함한다.
- [0085] 당해 기술 분야에서 잘 알려진 바와 같이, 세포들은 GPCR 및 G-단백질(포스포리파제 C 신호전달 경로에 수용체를 연결시킴)에 의해 일시적으로 또는 안정적으로 형질감염될 수 있다. GPCR이 맛을 내도록 향상된 결합을 제공하는 카메라 G-단백질 G 알파 16-구스트듀신 44(또한 G.서브..알파.16구스트(듀신)44, G.서브.알파.16구스트(듀신)44, Gα16구스트(듀신)44, Ga16구스트(듀신)44, Gα16-구스트듀신 44로 공지되어 있거나 또는 하기에 사용된 바와 같이 "G16구스트44"로 공지되어 있음)을 사용하는 우수한 이중 발현 시스템이 국제 특허 출원 공개 제 WO 2004/055048 호에 상세히 기술되어 있다. 다르게는, 국제 특허 출원 공개 제 WO 2004/055048 호에 기술

된 Gaq-구스트듀신에 기초한 다른 키메라 G-단백질, 또는 다른 G-단백질, 예를 들면 G16 또는 G15가 또한 사용될 수 있다.

- [0086] CSR::T1R는 신호전달 경로, 예를 들면 포스포리파제 C 신호전달 경로, 또는 예를 들면 아데닐레이트 사이클라제, 구아닐레이트 사이클라제, 포스포리파제 C, IP3, GTPase/GTP 결합, 아라키노이드 산, cAMP/cGMP, DAG, 단백질 키나제 c(PKC), MAP 키나제 티로신 키나제, 또는 ERK 키나제를 포함하는 신호전달 경로에 수용체를 연결시키는 G-단백질을 갖는 세포에서 발현될 수 있다.
- [0087] 다르게는, 하기에 더욱 상세히 기술되는 바와 같이, 임의의 적합한 리포터 유전자(reporter gene)가 CSR::T1R-활성화 반응 프로모터(promoter)에 연결되어 CSR::T1R 활성을 측정하는데 사용될 수 있다.
- [0088] **전술된 세포에 사용되는 벡터 구조체:**
- [0089] 상기 세포에서 GPCR 및/또는 G-단백질을 발현시키기 위한 벡터 구조체는 폴리머라제 사슬 반응(Polymerase Chain Reactions)을 사용하여 그 자체가 공지된 방법으로 제조될 수 있다. 서열의 규명 후, cDNA 단편은 적합한 벡터, 예를 들면 포유류 세포를 위한 pcDNA 3.1 포유류 발현 벡터로 서브클로닝되고 상응하는 숙주 세포에서 일시적으로 형질감염되어 유전자의 올바른 발현을 가능하게 할 수 있다.
- [0090] 후-형질감염 기간 후, 예를 들면 48시간 후, 세포 용해물이 제조되어 웨스턴-블롯 분석에 의해 분석하여 단백질의 올바른 발현을 확인할 수 있다. 올바른 단백질 발현이 확인되면, 적합한 세포, 예를 들면 HEK293T 세포 및 HEK T-Rex(상표명)를 포함하는 포유류 세포를 형질감염시켜 당해 기술분야에 잘 공지된 기법에 따라 단백질을 안정하게 발현시키는 세포를 발생시킬 수 있다.
- [0091] 다르게는, CSR::T1R G-단백질 결합된 수용체(GPCR)를 암호화하는 서열을 함유하고 발현시킬 수 있도록 다양한 비-포유류 발현 벡터/숙주 시스템을 사용할 수 있다. 이것에는 예를 들면 제조합 박테리오파지, 플라스미드 또는 코스미드(cosmid) DNA 발현 벡터에 의해 형질전환된 박테리아; 효모 발현 벡터에 의해 형질전환된 효모; 바이러스성 발현 벡터(예를 들면 바쿨로바이러스) 또는 박테리아성 발현 벡터(예를 들면 pBR322 플라스미드)에 의해 형질감염된 곤충 세포 시스템을 포함하는 미생물을 포함한다.
- [0092] 상기에서 기술된 시스템과 함께 사용될 수 있는 특이적 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 기술되어 있다.
- [0093] 박테리아 시스템에서, GPCR을 암호화시키는 폴리뉴클레오타이드 서열을 사용하고자 하는 용도에 따라 다수의 클로닝 및 발현 벡터를 선택할 수 있다. 예를 들면, GPCR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 일반적인 클로닝, 서브클로닝 및 증식은 pBLUESCRIPT(스트라타진(Stratagene); 캘리포니아 라 졸라 소제) 또는 pSPORT1 플라스미드(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))와 같은 다기능성 대장균 벡터를 사용하여 달성할 수 있다. GPCR을 암호화하는 서열을 벡터의 다수 클로닝 자리로 결합하여 lacZ 유전자를 분해함으로써 제조합 분자를 함유하는 형질전환된 박테리아를 확인하는 비색계 스크리닝 절차가 가능하다. 또한, 상기 벡터는 시험관내 전사, 다이텍옥시 서열분석, 헬퍼(helper) 파지를 갖는 단일 가닥 레스큐(rescue) 및 클로닝된 서열에서의 네스티드(nested) 결실부의 생성에 유용할 수 있다. 예를 들면 항체의 제조를 위해 다량의 GPCR이 필요한 경우, 높은 수준의 GPCR 발현을 지지하는 벡터가 사용될 수 있다. 예를 들면, 강한 유도성 SP6 또는 T7 박테리오파지 프로모터를 함유하는 벡터가 사용될 수 있다.
- [0094] 효모 발현 시스템은 GPCR의 생산에 사용될 수 있다. 구성적 또는 유도성 프로모터, 예컨대 알파 인자, 알콜 옥시다제 및 PGH 프로모터를 함유하는 다수의 벡터가 효모 사카로마이세스 세레비시애(Saccharomyces cerevisiae) 또는 피치아 파스토리스(Pichia pastoris)에 사용될 수 있다. 또한, 이러한 벡터는 발현된 단백질의 분비 또는 세포내 유지를 지지하고, 안전한 증식을 위해 숙주 계놈으로의 외래(foreign) 서열의 통합을 가능하게 한다.
- [0095] 곤충 세포주에서 이중 단백질의 발현을 위해, 예를 들면 레피도프테란 바쿨로바이러스(Lepidopteran baculovirus)의 유도체인 오토그래파 캘리포니카 멀티캡시드 뉴클레오-바이러스(Autographa californica multicapsid nucleo-virus; AcMNPV)가 사용될 수 있다. 이러한 시스템에서, 외래 유전자 발현은 매우 강한 후발 바이러스성 프로모터(late viral promoter)인 폴리헤드린 또는 p10 프로모터에 의해 지시되며, 제조합 단백질의 발현 및 회수를 최적화시키는 광범위한 벡터의 정렬을 사용할 수 있다. 이러한 벡터로 인해 높은 수준의 막-결합된 단백질 및 분비된 단백질 둘다의 발현 및 또한 N- 및 O-연결된 글라이코실화, 포스포릴화, 아실화, 단백질가수분해 및 분비된 백신 성분을 포함하는 포유류 시스템에서 발생하는 것으로 알려진 많은 번역후 변형(post-translational modification)이 가능하다. 다수의 벡터, 예를 들면 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 인

섹트셀렉트(InsectSelect; 상표명) 시스템을 상업적으로 입수할 수 있다.

- [0096] **발현 시스템:**
- [0097] 목적하는 단백질(GPCR(CSR::T1R) 및 G-단백질)을 암호화하는 cDNA를 발현시키기 위해, 전형적으로 전사를 지시하는 강한 프로모터, 전사/번역 종결제, 및 번역 개시를 위한 리보솜-결합 자리를 함유한 발현 벡터로 적절한 cDNA를 서브클로닝한다. 적합한 박테리아 프로모터, 예를 들면 대장균, 바실러스 종(Bacillus sp.), 및 살모넬라(Salmonella)가 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있으며, 이러한 발현 시스템을 위한 키트를 상업적으로 입수할 수 있다. 유사하게, 포유류 세포, 효모 및 곤충 세포를 위한 진핵 발현 시스템을 상업적으로 입수할 수 있다. 진핵 발현 벡터의 예로서는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 벡터 또는 레트로바이러스 벡터를 들 수 있다.
- [0098] 프로모터에 더하여, 발현 벡터는 전형적으로 숙주 세포 중에 단백질-암호화 핵산의 발현에 필요한 추가적인 원소 모두를 함유한 전사 유닛 또는 발현 카세트를 함유한다. 따라서, 전형적인 발현 카세트는 전사, 리보솜-결합 자리 및 번역 종결의 효과적인 폴리아데닐화에 필요한 단백질 및 신호를 암호화하는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 함유한다. 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 전형적으로 세포-표면 수용체에 유용한 재조합 단백질의 효과적인 세포-표면 발현을 촉진하도록 래트 소마토스타틴(Somatostatin)-3 수용체 서열의 N-말단 45 아미노산과 같은 막-표적 신호에 연결될 수 있다. 추가적인 원소는 예를 들면 증강제를 포함할 수 있다.
- [0099] 발현 카세트는 효과적인 종결을 제공하기 위해 구조 유전자의 하류에 전사 말단 영역을 또한 함유해야 한다. 종결 영역은 프로모터 서열과 동일한 유전자로부터 얻을 수 있거나 또는 다른 유전자로부터 얻을 수 있다.
- [0100] 단백질의 발현에 있어서, 당해 기술 분야에 잘 공지된 진핵 또는 원핵 세포에서의 발현을 위한 통상의 벡터가 사용될 수 있다. 벡터의 예로서 박테리아성 발현 벡터, 예를 들면 pBR322-기반 플라스미드, pSKF, 및 pET23D를 비롯한 플라스미드, 및 융합 발현 시스템, 예를 들면 GST 및 LacZ를 들 수 있다.
- [0101] 진핵 바이러스로부터의 조절성 원소를 함유하는 발현 벡터는 전형적으로 진핵 발현 벡터, 예를 들면 SV40 벡터, 거대세포 바이러스(cytomegalovirus) 벡터, 유두종 바이러스(papilloma virus) 벡터, 및 엡스타인-바르(Epstein-Barr) 바이러스로부터 유래된 벡터에 사용된다. 다른 대표적인 진핵 벡터는 pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A⁺, pMAMneo-5, 바칼로바이러스 pDSVE, pcDNA3.1, pIRES, 및 SV40 초기 프로모터, SV40 후기 프로모터, 메탈로티오네인(metallothionein) 프로모터, 뮤린 유방 종양 바이러스 프로모터, 라우스(Rous) 육종 바이러스 프로모터, 폴리헤드린 프로모터, 또는 진핵 세포에서의 발현에 효과적인 것으로 보이는 다른 프로모터의 지시하의 단백질의 발현을 허용하는 임의의 다른 벡터를 포함한다.
- [0102] 몇몇 발현 시스템은 티미딘 키나제, 하이그로마이신 B 포스포트랜스퍼라제, 및 다이하이드로폴레이트 리덕타제 등과 같은 유전자 증폭을 제공하는 마커(marker)를 갖는다.
- [0103] 발현 벡터에 전형적으로 포함되는 원소는 대장균에서 작용하는 레플리콘, 재조합 플라스미드가 잠복되어 있는 박테리아의 선택을 가능하게 하는 내약물 암호화 유전자, 및 진핵 세포 서열의 삽입을 허용하는 플라스미드의 비필수적 영역에서의 독특한 제한 자리를 또한 포함할 수 있다. 선택된 특정 내약물 유전자는 그다지 중요하지 않으며, 당해 기술 분야에 공지된 다수의 내약물 유전자 중 어떠한 것이라도 적합하다. 원핵 세포 서열은 필요에 따라 이것들이 진핵 세포 중의 DNA의 복제를 방해하지 않도록 임의적으로 선택된다.
- [0104] 박테리아 시스템에서, GPCR cDNA 단편은 단독으로 발현되거나, 대상의 GPCR이 대장균 주변세포질 말토즈-결합 단백질(MBP)에 융합된 융합 단백질로서 발현될 수 있는데, MBP(이것의 신호 펩타이드를 포함)는 GPCR의 아미노 말단에 연결된다. 야생형 GPCR cDNA 또는 MBP:GPCR 융합 cDNA는 적합한 플라스미드, 예를 들면 pBR322에 서브클로닝되며, 이때 대장균에서 GPCR 발현은 *lac* 야생형 프로모터에 의해 유인된다. 대장균에서의 GPCR의 발현 방법은 예를 들면 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 기술되어 있다.
- [0105] 내인성 GPCR이 결여된 유전공학 처리된 효소 시스템 및 곤충 세포 시스템은 CSR::T1R 활성 스크리닝을 위한 "0" 배경의 이점을 제공한다.
- [0106] 유전공학 처리된 효모 시스템은 내인성 효모 페로몬(pheromone) 수용체 경로의 대응하는 성분 대신에 인간의 GPCR 및 G α 단백질로 대체된다. 하향 신호 경로는 신호에 대한 정상 효모 반응이 선택 배지상에서 양성적 성장 또는 리포터 유전자 발현으로 전환되도록 변형된다(문헌[Broach, J. R. and J. Thorner (1996) Nature

384 (supp.):14-16]에 기술되어 있음).

- [0107] 유전공학 처리된 곤충 시스템은 포스포리파제 C 신호 경로를 결합시키는 수용체가 가능하도록 인간의 GPCR 및 G α 단백질을 혼입하고 있다(예를 들면 문헌[Knight and Grigliatti, (2004) J Receptors and Signal Transduction 24: 241-256]을 참조함).
- [0108] 양서류 세포 시스템, 특히 멜라닌색소포 세포는, 예를 들면 GPCR 발현 시스템에 대해 기술하고 있는 국제 특허 출원 공개 제 WO 92/01810 호에 기술되어 있다.
- [0109] **CSR::T1R의 과발현:**
- [0110] CSR::T1R는 이것을 강한 구성적 프로모터, 예를 들면 CMV 초기 프로모터의 조절 하에 위치시킴으로써 과발현될 수 있다. 다르게는, 보존된 GPCR 아미노산 또는 아미노산 도메인의 특정 돌연변이를 도입하여, 사용된 GPCR을 구성적으로 활성화시킬 수 있다.
- [0111] **CSR::T1R 발현 벡터 구조체의 세포에의 형질감염:**
- [0112] 다량의 단백질을 발현시키는 박테리아, 포유류, 효모 또는 곤충 세포주를 생산하기 위해 표준 형질감염 방법이 사용될 수 있다.
- [0113] 숙주 세포에 뉴클레오타이드 서열을 도입하기 위한 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 사용된 특정 유전공학 처리 절차에 의해 대상의 단백질을 발현시킬 수 있는 숙주 세포 중으로 관련 유전자를 성공적으로 도입시킬 수 있기만 하면 된다. 이러한 방법은 클로닝된 게놈 DNA, cDNA, 합성 DNA 또는 다른 외래 유전 물질을 숙주 세포에 도입하는 것을 포함할 수 있으며, 인산 칼슘 형질감염, 폴리브렌, 원형질체 융합, 전기천공, 리포솜, 미세 주사, 플라즈마 벡터, 바이러스성 벡터 등의 사용을 포함한다.
- [0114] 예를 들면, 비제한적으로 T-Rex(상표명) 발현 시스템(인비트로젠 코퍼레이션(Invitrogen Corp.), 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)을 사용할 수 있다. T-Rex(상표명) 시스템은 대장균 Tn10-암호화 테트라사이클린(Tet) 내성 오페론으로부터 조절성 원소를 사용하는 테트라사이클린-조절된 포유류 발현 시스템이다. T-Rex(상표명) 시스템에서의 테트라사이클린 조절은 테트라사이클린의 Tet 억제물질에의 결합, 및 대상의 유전자의 발현을 조절하는 프로모터의 탈억제화에 기초한다.
- [0115] **세포 배양:**
- [0116] 형질감염 후, 형질감염된 세포는 당해 기술 분야에 잘 공지된 표준 배양 조건을 사용하여 배양될 수 있다. 상이한 세포에서는 적절한 온도 및 세포 배양 배지를 포함하는 상이한 배양 조건을 필요로 한다는 것이 당해 기술 분야의 숙련자에게 잘 알려져 있다.
- [0117] **CSR::T1R 수용체 단백질 회수:**
- [0118] 원하는 경우, 단백질은 표준 기법을 사용하여 세포 배양물로부터 회수될 수 있다. 예를 들면, 세포는 침전 및 크로마토그래피 단계로 처리되기 전에 기계적으로 또는 삼투압 충격에 의해 활짝 벌어질 수 있으며, 그의 성질 및 서열은 회수되는 특정 재조합 물질에 따라 좌우될 것이다. 다르게는, 재조합 단백질은 재조합 세포가 배양된 배양 배지로부터 회수될 수 있다.
- [0119] **분석에 의해 확인될 수 있는 조절제:**
- [0120] CSR::T1R 수용체 활성의 조절제(리간드, 작용제, 부분 작용제, 길항물질, 역 작용제, 억제제, 증강제)을 포함하는 다양한 유형은 후술되는 바에 따라 확인될 수 있다.
- [0121] 조절제의 유형은 한번에 하나보다 많은 유형을 포함할 수 있고, 농도에 따라 좌우될 수 있다. 예컨대, 물질은 일정 농도 범위에서 작용제로 작용할 수 있으나, 다른 농도 범위에서는 또 다른 작용제(예컨대, 감미제 또는 당)의 조절제 또는 증강제로 작용할 수 있다. 따라서, 물질은 이들을 조절제로 확인하기 위해서 다른 농도에서 시험되어야 한다.
- [0122] 이후에는, 본원에 기재된 방법에서 확인되어야 하는 물질의 정의가 기재되어 있다.
- [0123] 조절제는 수용체의 세포 표면 발현, 리간드의 수용체에의 결합, 수용체의 활성 형태에 의해 개시된 세포내 반응(작용제의 존재하에 또는 부재하에) 중 하나 이상의 증가 또는 감소에 영향을 주는 물질이다. 조절제 그 자체가, 수용체에 결합하여 이것을 활성화시킴으로써 세포 반응의 증가를 조절하는 작용제일 수 있다.

- [0124] 조절제는 소분자, 펩타이드, 단백질, 핵산, 향체 또는 이것의 단편을 비롯한 여러 유형의 화합물을 포함한다. 이들은 합성 또는 천연 물질, 천연 물질의 추출물을 포함하는 여러 공급원, 예컨대 동물, 포유류, 곤충, 식물, 박테리아 또는 진균 세포 물질 또는 배양된 세포 또는 이러한 세포의 조건화된 배지로부터 유래될 수 있다.
- [0125] 리간드는 수용체에 결합하는 물질이다; 즉 이것은 작용제, 부분 작용제, 증강제, 길항물질 또는 역 작용제일 수 있다.
- [0126] 작용제는 작용제 부재하의 세포내 반응에 비해, 수용체에 결합할 때에 수용체를 활성화시키고 세포내 반응을 증가시키는 CSR::T1R 키메라 단백질 수용체의 리간드이다. 부가적으로 또는 대안적으로, 작용제 부재하에 세포 표면에 존재하는 세포 표면 수용체의 수에 비해 수용체의 세포 표면 발현이 증가하도록 작용제는 세포 표면 수용체의 내재화(internalization)를 감소시킬 수 있다.
- [0127] CSR::T1R의 작용제는 예컨대, 칼슘, 페틸라틴, 사이클라메이트, NDHC 및 신나모니트릴을 포함한다.
- [0128] CSR::T1R 키메라 단백질의 리간드는 2 유형, 즉 키메라 단백질의 CSR 부분에서 결합하는 CSR 도메인-리간드(칼슘) 또는 키메라 단백질의 T1R-부분에서 결합하는 TSR-도메인 리간드(단맛 반응의 조절제)로 분류될 수 있다.
- [0129] 부분 작용제는 수용체를 최대 활성화시키는 다른 작용제에 비해 수용체를 단지 부분적으로만 활성화시키는 작용제이다.
- [0130] 길항물질은 작용제와 동일한 자리(경쟁적 길항물질) 또는 상이한 자리(알로스테릭 길항물질)에서 수용체에 결합하지만, 수용체의 활성 형태에 의해 개시된 세포내 반응을 활성화시키지 않고, 그럼으로써 작용제의 존재 하 및 길항물질의 부재 하의 세포내 반응에 비해 작용제에 의해 유발된 세포내 반응을 억제하는 리간드이다.
- [0131] 수용체에 결합한 역 작용제는 역 작용제 부재 하의 세포내 반응에 비해 수용체에 의해 매개된 구성적 세포내 반응을 감소시킨다.
- [0132] 억제제는 억제제 부재 하의 작용제의 결합에 비해 작용제의 수용체에의 결합을 감소시키고/시키거나 작용제에 의해 유발된 세포내 반응을 감소시킨다.
- [0133] 증강제는 증강제 부재 하의 작용제의 결합에 비해 작용제의 수용체에의 결합을 증가시키고/시키거나, 작용제에 의해 유발된 세포내 반응을 증가시킨다.
- [0134] 리간드를 결합시키고 예를 들면 G-단백질을 통해 신호를 전달하는 수용체의 활성 또는 활성의 변화(즉, 조절제와의 상이한 상호 작용때문에)는 후술되는 분석에 의해 측정될 수 있다.
- [0135] **CSR::T1R 수용체의 조절제를 확인하는 분석:**
- [0136] 조절제는 기능적인 효과/파라미터를 측정하고 비교하는 매우 다양한 시험관내 및 생체내 분석을 사용하거나, 또는 다르게는 결합 분석에 의해 확인될 수 있다. 적합한 기능적 파라미터를 조사함으로써 수용체의 기능에 대한 시험 물질의 효과를 측정할 수 있다. 조절제를 확인하기 위해 수용체 활성에 영향을 주는 임의의 생리학적 변화를 사용할 수 있다.
- [0137] 이러한 기능적인 분석은 당해 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 예로서 제 2 메신저(예를 들면 세포내 칼슘 이온, cAMP, cGMP, IP3, 다이아실글라이세롤/DAG, 아라키노이드 산, MAP 키나제 또는 티로신 키나제)의 농도 또는 활성 또는 이들의 변화, 이온 플럭스(flux), 포스포릴화 수준, 전사 수준 및 신경전달물질 수준을 측정하는 것을 기반으로 하는 동물로부터 단리된 비손상 세포 또는 조직을 사용하는 분석, 및 GTP-결합, GTPase, 아데닐레이트 사이클라제, 포스포리피드-분해, 다이아실글라이세롤, 이노시톨 트라이포스페이트, 아라키돈산 방출, PKC, 키나제 및 전사 리포터에 기반한 분석을 들 수 있다. 몇몇 적합한 분석은 예를 들면 국제 특허 출원 공개 제 WO 01 18050 호에 기술되어 있다.
- [0138] 수용체 활성화는 전형적으로 후속의 세포내 사건을 개시하는데, 예를 들면 제 2 메신저(예, IP3)를 증가시켜 칼슘 이온의 세포내 저장물을 방출시킨다. 몇몇 G-단백질 결합된 수용체의 활성화는 포스포타이딜이노시톨의 포스포리파제 C-매개 가수분해를 통해 IP3의 형성을 자극한다. 이어서, IP3은 세포내 칼슘 이온 저장물의 방출을 자극한다. 따라서, 세포질 칼슘 이온 수준의 변화 또는 IP3과 같은 제 2 메신저 수준의 변화를 사용하여 G-단백질 결합된 수용체의 활성을 측정할 수 있다.
- [0139] 수용체를 발현시키는 세포를 그 표면에 또는 단리된 세포 막 일부 상에 함유하는 샘플에 의해 모든 기능적인 분석을 실시할 수 있다. 유용한 세포는 전술되어 있다. 분리된 세포 또는 세포 막을 사용하는 샘플 대신에,

유전자 이식 동물로부터의 조직을 사용할 수 있다.

- [0140] 본원에 기재된 스크리닝 방법은 단맛 반응의 조절제, 예컨대 감미 증강제를 확인하는데 특히 유용하다.
- [0141] 작용제 그 자체가 아닌 조절제(예, 길항물질, 부분 작용제, 역 작용제, 억제제 또는 증강제)을 확인하기 위해, 시험 물질을 갖는 샘플 및 시험 물질을 갖지 않는 샘플(둘다 작용제를 함유한다)을 비교한다. 예컨대, 작용제로 칼슘이 이용될 수 있다. 칼슘 이용은 TMD 둘다가 접근할 수 있는 이점을 갖는다. 다른 공지된 또는 확인된 작용제, 예컨대 페릴라틴, 사이클라메이트, 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC) 및 신나모니트릴이 또한 이용될 수 있으나, 확인되어야 하는 조절제의 조절제 결합 자리와 일치할 수 있는 리간드/작용제 결합 자리를 부분적으로 차지할 수 있고, 보다 낮은 신호를 유발할 수 있다. 예를 들면, 대조군(작용제를 갖지만 조절제를 갖지 않음)을 100의 비교 수용체 활성 값으로 정한다. 대조군과 비교하여 활성의 감소는 억제제, 길항물질 또는 역 작용제로 확인되고, 증가는 증강제로 확인된다. 일반적으로, 시험 물질을 갖지 않는 샘플 또는 시험 물질을 갖지만 CSR::T1R를 발현하지 않는 세포(형질감염을 가장한(mock-transfected) 세포)에 기초한 샘플과 비교할 때, 시험 물질을 갖는 샘플에서 측정된 활성의 10% 이상의 증가 또는 감소는 유의성을 갖는 것으로 간주될 수 있다.
- [0142] 감미 증강제를 확인하기 위하여, 시험 물질을 갖는 샘플과 시험 물질을 갖지 않는 샘플을 비교한다. 예컨대, 대조군(작용제, 예컨대 염화칼슘을 갖지만 조절제를 갖지 않음)을 100의 비교 수용체 활성 값으로 정한다. 증가는 증강제로 확인된다. 일반적으로, 시험 물질을 갖지 않는 샘플 또는 시험 물질을 갖지만 CSR::T1R를 발현시키지 않는 세포(형질감염을 가장한 세포)에 기초한 샘플과 비교할 때, 시험 물질을 갖는 샘플에서 측정된 활성의 10% 이상의 증가 또는 감소가 유의성을 갖는 것으로 간주될 수 있다.
- [0143] CSR::TSR1 키메라 단백질을 이용하는 스크리닝의 경우, 칼슘이 작용제로 이용될 수 있다. 다르게, CSR::TSR1의 T1R2 및/또는 T1R3 단편의 관련 부분에서 결합하는 작용제가 이용될 수 있다. 이들 작용제는 예컨대, 페릴라틴, 사이클라메이트, NDHC 및 신나모니트릴을 포함한다.
- [0144] **작용제 또는 부분 작용제의 확인:**
- [0145] VFT 도메인에서 결합하지 않는 작용제 또는 부분 작용제를 확인하기 위해, 시험 물질을 갖는 샘플을 작용제(예컨대, 염화칼슘, 페릴라틴, 사이클라메이트, 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC), 신나모니트릴 또는 또 다른 확인된 리간드/작용제)을 갖는 양성 대조군과 비교한다.
- [0146] 다르게/부가적으로, 시험 물질을 갖는 샘플 및 시험 물질을 갖지 않는 샘플을 CSR::T1R 키메라 단백질의 활성 측면에서 비교한다.
- [0147] 예를 들면, 작용제 또는 부분 작용제가 100mM 이하로 존재할 때 작용제 또는 부분 작용제는 양성 대조군 감미 작용제의 최대 생물학적 활성의 10% 이상에 대응하는 생물학적 활성을 갖는데, 예를 들면 이것은 작용제와 유사하거나 또는 이보다 높은 최대 생물학적 활성을 가질 수 있다. 최대 생물학적 활성은 작용제, 예컨대, 염화칼슘, 페릴라틴, 사이클라메이트, 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC), 신나모니트릴에 대해 소정의 수용체 분석 포맷(format) 내에서 달성될 수 있는 최대 달성가능한 수용체의 반응으로 정의되며, 이러한 반응은 동일한 작용제의 농도를 증가시키더라도 더 증가될 수 없다.
- [0148] 전술한 작용제는 또한 다른 농도에서 CSR::T1R 키메라 단백질의 작용제의 증강제로 작용할 수 있다. 이는 감미 증진 효과를 나타내는 신호에 대해 작용제-시험 물질을 시험하기 위해 칼슘 또는 다른 작용제를 이용함으로써 스크리닝 방법에서 시험될 수 있다.
- [0149] 다르게는, 시험 물질을 갖는 샘플에서 측정된 활성의 예를 들면 10% 이상의 증가를 시험 물질을 갖지 않는 샘플과 비교하거나, 또는 시험 물질을 갖지만 CSR::T1R를 발현시키지 않는 세포(형질감염을 가장한 세포)에 기초한 샘플과 비교한다.
- [0150] 길항물질을 확인하기 위해서는, 시험 물질을 갖는 공지된 작용제 및 시험 물질을 갖지 않는 공지된 작용제의 존재 하의 수용체 활성을 비교한다. 길항물질은 작용제-자극된 수용체 활성을 예를 들면 10% 이상 만큼 감소시킨다.
- [0151] 역 작용제를 확인하기 위해, 시험 물질을 갖는 공지된 작용제 및 시험 물질을 갖지 않는 공지된 작용제의 존재 하의 수용체 활성을 전술한 수용체를 과발현시키는 동물/세포/막을 포함하는 샘플에서 비교한다. 역 작용제는 수용체의 구성적 활성을 예를 들면 10% 이상 만큼 감소시킨다.

- [0152] 전술한 분석에서 CSR::T1R 수용체 활성을 측정하는 적합한 검출 방법의 다양한 예는 다음과 같다.
- [0153] 많은 스크리닝이 칼슘 활성화에 좌우되며, 이들을 위해 칼슘 농도가 낮은 완충 시스템이 이용되어서 세포, 수용체, 효소 또는 리포터 유전자의 비특이적 자극을 방지해야 한다.
- [0154] 세포질 이온 또는 막 전압의 변화 검출:
- [0155] 문헌["G-protein coupled receptors(Signal Transduction Series)", CRC Press 1999; 1st Edition; Eds Haga and Berstein]에 상세하게 기술된 바와 같이, 세포에 이온 감응성 염료를 부하시켜서 수용체 활성을 기록하였다. 이온 감응성 또는 막 전압 형광 지시제를 각각 사용하여 세포질에서의 이온 농도 또는 막전압의 변화를 측정한다.
- [0156] 칼슘 플럭스:
- [0157] 칼슘에 결합하는 세포-침투성 염료를 사용하여 GPCR의 활성화에 의해 유발된 세포내 칼슘 방출을 검출한다. 칼슘-결합된 염료는 세포내 칼슘 증가에 비례하는 형광 신호를 발생한다. 상기 방법으로 수용체 활성이 빠르고 정량적으로 측정된다.
- [0158] 사용된 세포는 CSR::T1R GPCR, 및 전술된 포스포리파제 C 경로에 결합하는 G-단백질을 공발현시키는 형질감염된 세포이다. 음성 대조군은 후보 화합물의 가능한 비특이적 효과를 배제하도록 CSR::T1R를 발현하지 않는(형질감염을 가장한) 세포 또는 이들의 막을 포함한다.
- [0159] 칼슘 플럭스 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 기술하고 있으며, 개정판이 하기에 요약되어 있다:
- [0160] 0일: 96-웰 플레이트를 웰당 8.5K 세포수로 시드화시키고, 영양 성장 배지에서 밤새 37°C의 온도로 유지시킨다.
- [0161] 1일: 웰당 150ng의 GPCR DNA 및 0.3 μ l의 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 (인비트로젠)을 사용하여 세포들을 형질감염시킨다. 형질감염된 세포들을 영양 성장 배지에서 밤새 37°C의 온도로 유지시킨다.
- [0162] 2일: 성장 배지를 제거하고, 세포들을 37°C에서 130mM NaCl, 5mM KCl, 10mM 헤페스, 0.5mM CaCl₂ 및 10mM 글루코즈를 함유하는 감소된 칼슘 C1 완충액(pH 7.4)에 용해된 2.5 μ M 프로베니시드 및 1.5 μ M 플루오(Fluo)-4 AM (몰레큘러 프로브스 (Molecular Probes))으로 이루어진 칼슘 분석 용액 50 μ l에 의해 1시간동안 (암소에서 실온으로) 배양시킨다. 감소된 칼슘 C1 완충액 125 μ l을 각각의 웰에 첨가하고, 상기 플레이트를 암소의 실온에서 30분 동안 추가적으로 배양시킨다.
- [0163] 완충액을 제거하고, 플레이트를 세척 완충액인 감소된 칼슘 C1 완충액 100 μ l으로 5회 세척하고, 세포를 감소된 칼슘 C1 완충액 200 μ l에서 재구성시킨다.
- [0164] 이어서, 플레이트를 형광 마이크로플레이트 판독기, 예를 들면 플렉스스테이션(Flexstation; 몰레큘러 디바이시스(Molecular Devices)) 또는 FLIPR(몰레큘러 디바이시스)에 놓고, 10배로 농축된 리간드 원료 용액 20 μ l의 첨가 후에 수용체의 활성화를 개시한다. 리간드를 첨가하기 전 15초 동안 및 리간드를 첨가한 후 45 내지 110초 동안 형광을 계속하여 모니터한다. 수용체 활성화 수준은 하기 수학식 1 및 수학식 2에 의해 정의된다:

수학식 1

- [0165] 활성화(%) = (최대 형광 - 기준 형광/기준 형광)*100

수학식 2

- [0166] 형광 증가 = 최대 형광 - 기준 형광
- [0167] 상기 식에서, 기준 형광은 리간드 첨가 전의 평균적인 형광 수준을 나타낸다.

- [0168] 유용한 세포는 비제한적으로 전술된 포유류 세포, 예를 들면 HEK293T 세포 및 HEK293 T-Rex(상표명) 세포이다. 세포들은 당해 기술 분야에서 잘 공지된 바와 같이 GPCR 및 G-단백질에 의해 일시적으로 또는 안정적으로 형질감염될 수 있다. 우수한 이종 발현 시스템이 국제 특허 출원 공개 제 WO 2004/055048 호에 상세하게 기술되어 있다.

- [0169] 칼슘 플럭스 분석은 예를 들면 하기 실시예 1에서 기술된 바와 같이 실시될 수 있다.
- [0170] 조절제의 확인은 하기 개정된 조건 하에 전술된 바와 같이 실시된다. 상기 신호를 작용제의 존재 및 시험 물질의 부재하에 CSR::T1R를 발현시키는 제조합 세포로부터 얻어진 CSR::T1R 활성의 기준 수준과 비교한다. 예를 들면 2배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 100배 이상 또는 이 이상의 CSR::T1R 활성의 증가 또는 감소로서 조절제를 확인한다.
- [0171] 다르게는, 조절제가 없는 샘플에 비교할 때, 또는 조절제를 갖지만 CSR::T1R 폴리펩타이드를 발현하지 않는 세포(형질감염을 가장한 세포)에서의 샘플과 비교할 때, 확인은 예를 들면 10% 이상의 증가 또는 감소된 형광 세기를 포함한다.
- [0172] 아데닐레이트 사이클라제 활성화:
- [0173] 아데닐레이트 사이클라제 활성의 분석은 예를 들면 문헌[Kenimer & Nirenberg, 1981, Mol. Pharmacol. 20: 585-591]에 상세하게 기술된 바에 따라 실시된다. 일반적으로, 반응 혼합물을 10분 미만 동안 37°C에서 배양시킨다. 배양 후, 반응 혼합물을 0.9ml의 차가운 6% 트라이클로로아세트산의 첨가에 의해 탈단백질화시킨다. 튜브를 원심분리시키고, 각각의 상청액을 도웁스(Dowex) AG50W-X4 칼럼에 첨가한다. 작용제에 의한 수용체 활성화 후에 발생한 cAMP의 수준을 측정하기 위하여 상기 칼럼으로부터의 cAMP 분획물을 계수 바이알 중으로 4ml의 0.1mM 이미다졸-HCl(pH 7.5)로 용출시킨다. CSR::T1R 폴리펩타이드를 발현시키지 않는 세포로부터 단백질 호모제네이트(homogenate)를 사용하여 대조군 반응을 또한 실시해야만 한다.
- [0174] IP3/칼슘 이온 신호:
- [0175] G-단백질을 발현시키는 세포에서, 형광을 사용하여 IP3/칼슘 이온에 대응하는 신호 및 그에 따른 수용체 활성을 검출할 수 있다. GPCR을 발현시키는 세포는 두개의 세포내 저장물로부터 기인한 결과 및 이온 채널의 활성화를 통해 증가된 세포질 칼슘 수준을 나타낼 수 있으며, 이러한 경우 EDTA와 같은 킬레이팅제로 임의적으로 보충된 칼슘-부재 완충액에서 상기 분석을 실시하여 칼슘 방출로부터 초래된 형광 반응을 내부 저장물과 구별하는 것이 꼭 필요한 것은 아니지만 바람직할 수 있다.
- [0176] 포스포리파제 C/세포내 칼슘 이온 신호:
- [0177] 포스포리파제 C 신호전달 경로에 수용체를 연결시키는 G-단백질을 갖는 세포에서 CSR::T1R를 발현시킨다. 예를 들면 형광 칼슘 이온 지시제 염료 및/또는 형광계 이미징을 사용하여 세포내 칼슘 이온 농도의 변화를 측정한다.
- [0178] GTPase/GTP 결합:
- [0179] CSR::T1R를 포함하는 GPCR에 있어서, 수용체 활성의 척도는 GPCR을 함유하는 세포 막에 의한 GTP의 결합이다. 표지된 GTP의 결합을 검출함으로써 막의 G-단백질의 결합이 측정된다.
- [0180] 수용체를 발현시키는 세포로부터 단리된 막을 35S-GTP γ S 및 비표지된 GDP를 함유한 완충액에서 배양시킨다. 활성 GTPase는 표지물을 무기 인산염으로서 방출하며, 이것은 20mM H₃PO₄ 중의 활성탄의 5% 현탁액에서 유리 무기 인산염의 분리 후 섬광 계수에 의해 검출된다. 혼합물을 배양시키고, 결합되지 않은 표지된 GTP를 GF/B 필터 상의 여과에 의해 제거한다. 결합 및 표지된 GTP를 액체 섬광 계수에 의해 측정한다. 시험 물질의 가능한 비특이적 효과를 배제하기 위하여, 대조군은 CSR::T1R를 발현시키지 않는(형질감염을 가장한) 세포로부터 단리된 막을 사용하는 분석을 포함한다. 이러한 방법은 문헌[Traynor and Nahorski, 1995, Mol. Pharmacol. 47: 848-854]에 상세하게 기술되어 있다.
- [0181] 조절제를 확인하기 위해서는, 전술된 바와 같이, GTP 결합 또는 GTPase 활성이 10% 이상 변화(증가 또는 감소)되는 것으로 일반적으로 충분하다. 그러나, 작용제의 확인을 위해서는, 전술된 분석을 하기 개정된 조건 하에 실시한다. 화합물이 100mM 이하, 예를 들면 10 내지 500 μ M, 예를 들면 약 100 μ M로 존재할 때 활성이 공지된 작용제(예들들면, 페릴라틴)의 활성의 50% 이상이라면, 또는 공지된 작용제에 의해 유발된 활성과 동일하거나 이 보다 높은 수준을 유발한다면 물질은 일반적으로 작용제로서 확인된다.
- [0182] 마이크로피지오미터(Microphysiometer) 또는 바이오센서:
- [0183] 본 분석은 문헌[Hafner, 2000, Biosens. Bioelectron. 15:149-158]에 상세하게 기술된 바와 같이 수행될 수 있다.

- [0184] 아라키노이드 산:
- [0185] 아라키노이드 산의 세포내 수준은 수용체 활성의 지시자로서 사용된다. 이러한 방법은 문헌[Gijon et al., 2000, J. Biol. Chem., 275:20146-20156]에 상세하게 기술되어 있다.
- [0186] cAMP/cGMP:
- [0187] 예를 들면 문헌[Horton & Baxendale, 1995, Methods Mol. Biol. 41: 91-105]에 의해 기술된 바와 같이, cAMP 방사면역분석(RIA) 또는 cAMP 결합 단백질을 사용하여 세포내 또는 세포외 cAMP를 측정한다. 다르게는, cAMP 측정용의 다수의 키트, 예를 들면 엘제이엘 바이오시스템스(LJL Biosystems) 및 엔이엔 라이프 사이언스 프로덕츠(NEN Life Science Products)에 의해 고효율 형광 극성-기반 균일 분석을 상업적으로 입수할 수 있다. 다르게는, 면역분석을 사용하여 cGMP의 세포내 또는 세포외 수준을 측정할 수 있다. 예를 들면, 문헌[Felley-Bosco et al., Am. J. Resp. Cell and Mol. Biol., 11:159-164 (1994)]에 기술된 방법을 사용하여 cGMP의 수준을 측정할 수 있다. 다르게는, 미국 특허 제 4,115,538 호에 기술된 바와 같이 cAMP 및/또는 cGMP 측정용 분석 키트를 사용할 수 있다.
- [0188] 시험 물질의 가능한 비특이적 효과를 배제하기 위해 형질감염을 가장한 세포 또는 이것의 추출물을 갖는 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- [0189] DAG/IP3:
- [0190] 수용체 활성화에 의해 유발된, 포스포리피드 분해에 의해 방출된 제 2 메신저 다이아실글라이세롤(DAG) 및/또는 IP3을 예를 들면 문헌[Phospholipid Signalling Protocols, edited by Ian M. Bird, Totowa, N.J., Humana Press, 1998]에 기술된 바와 같이 GPCR(CSR::T1R) 활성의 지시자로서 검출하고 사용할 수 있다. 다르게는, 이노시톨 트라이포스페이트의 측정용 키트를 퍼킨 엘머(Perkin Elmer) 및 시스바이오 인터내셔널(CisBio International)로부터 상업적으로 입수할 수 있다.
- [0191] 시험 물질의 가능한 비특이적 효과를 배제시키기 위해 형질감염을 가장한 세포 또는 이것의 추출물을 갖는 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- [0192] PKC 활성화:
- [0193] 성장 인자 수용체 티로신 키나제는 포스포리피드- 및 칼슘-활성화 단백질 키나제의 과인 단백질 키나제 C(PKC)의 활성화에 관련된 경로를 통해 신호를 보낼 수 있다.
- [0194] PKC에 의해 유발된 유전자 생산물의 증가는 PKC 활성화를 보여주며, 따라서 수용체 활성을 보여준다. 이러한 유전자 생산물은 예를 들면 원종양 유전자 전사 인자-암호화 유전자(c-fos, c-myc 및 c-jun 포함), 프로테아제(protease), 프로테아제 억제제(콜라게나제(collagenase) 유형 I 및 플라스미노겐(plasminogen) 활성화 억제제 포함) 및 접착 분자(세포내 접착 분자 I(ICAM I) 포함)를 포함한다.
- [0195] PKC 활성화는 문헌[Kikkawa et al., 1982, J. Biol. Chem. 257: 13341]에 기술된 바와 같이 직접적으로 측정될 수 있으며, 이때 포스포셀룰로즈 종이에 결합함으로써 후속적으로 분리되는 PKC 기질 펩타이드의 포스포릴화가 측정된다. 이것은 정제된 키나제의 활성을 측정하는데 사용되거나 또는 조절의 세포 추출에서 사용될 수 있다. 단백질 키나제 C 샘플은 분석 직전에 20mM HEPES/2mM DTT에서 희석될 수 있다.
- [0196] 판베라(PanVera)에 의해 상업적으로 입수할 수 있는 단백질 키나제 C 어세이 키트(Protein Kinase C Assay Kit)를 사용하여 대안적인 분석이 실시될 수 있다.
- [0197] 전술된 PKC 분석은 GPCR(CSR::T1R)를 발현시키는 세포로부터의 추출물 상에서 실시된다.
- [0198] 다르게는, PKC 활성화에 의해 활성화된 유전자의 대조군 서열에 의해 유도된 리포터 유전자 구조체를 사용하여 활성을 측정할 수 있다.
- [0199] 시험 물질의 가능한 비특이적 효과를 배제시키기 위해 형질감염을 가장한 세포 또는 이것의 추출물을 갖는 음성 대조군을 사용할 수 있다.
- [0200] MAP 키나제 활성화:
- [0201] MAP 키나제 활성화는 상업적으로 입수할 수 있는 키트, 예를 들면 뉴 잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs)의 p38 MAP 키나제 분석 키트, 또는 퍼킨-엘머 라이프 사이언스이즈(Perkin-Elmer Life Sciences)의 플래시플

레이트(FlashPlate; 상표명) MAP 키나제 분석을 사용하여 측정할 수 있다. Gq 및 Gi 결합된 GPCR을 갖는 세포를 사용하는 경우, GPCR(CSR::T1R) 활성을 확인하기 위해 p42/44 MAP 키나제 또는 ERK1/2를 측정할 수 있으며, ERK1/2 분석 키트는 티지알 바이오사이언스이즈(TGR Biosciences)에 의해 상업적으로 입수할 수 있으며, 이것은 GPCR 활성화 이후에 내인성 ERK1/2 키나제의 포스포틸화를 측정하는 것이다.

[0202] 다르게는, 공지된 합성 또는 천연 티로신 키나제 기질 및 표지된 인산염에 의해 티로신 키나제 활성을 직접적으로 측정하는 방법이 잘 알려져 있으며; 다른 유형의 키나제(예, 세린/트레오닌 키나제)의 활성도 유사하게 측정될 수 있다.

[0203] 정제된 키나제, 및 하나 이상의 CSR::T1R 폴리펩타이드를 발현시키는 세포로부터 제조된 조직의 추출물 둘다를 사용하여 모든 키나제 분석을 실시할 수 있다. 사용되는 키나제 기질은 상기 기질을 대표하는 전장 단백질 또는 합성 펩타이드일 수 있다. 핀나(Pinna) 및 루젠(Ruzzene)(문헌[1996, Biochem. Biophys. Acta 1314:191-225])은 키나제 활성을 검출하는데 유용한 다수의 포스포틸화 기질 자리를 열거하고 있다. 다수의 키나제 기질 펩타이드를 상업적으로 입수할 수 있다. 특히 유용한 것은 많은 수용체 및 비수용체 티로신 키나제용 기질인 "Src-관련 펩타이드" RRLIEDAEYAARG(시그마(Sigma)로부터 상업적으로 입수가능)이다. 몇몇 방법은 필터에 펩타이드 기질을 결합시키는 것을 필요로 하며, 따라서 결합을 용이하게 하기 위해 펩타이드 기질은 순 양성 전하를 가져야 한다. 일반적으로, 펩타이드 기질은 2 이상의 염기성 잔기 및 유리-아미노 말단을 가져야 한다. 일반적으로, 반응에는 0.7 내지 1.5mM의 펩타이드 농도를 사용한다.

[0204] 시험 물질의 가능한 비특이적 효과를 배제시키기 위해 형질감염을 가장한 세포 또는 이것의 추출물을 갖는 음성 대조군을 사용할 수 있다.

[0205] 전사 리포터/CSR::T1R-반응성 프로모터/리포터 유전자

[0206] 리포터 유전자 분석으로 조절제를 확인하기 위해서, 2배 이상의 신호의 증가 또는 10%의 신호의 감소가 유의성을 갖는다. 시험 물질의 존재하의 활성과 시험 물질의 부재하의 활성을 비교하는 경우, 작용제는 예를 들면 2배 이상, 5배 이상, 10배 이상 또는 이 이상으로 자극한다.

[0207] CSR::T1R에 작용제를 결합함으로써 개시된 세포내 신호가 케스캐이드 식으로 세포내 사건을 촉진하며, 이것의 최종적인 결과로서 하나 이상의 유전자의 전사 또는 번역이 빠르고 검출가능하게 변한다.

[0208] 그러므로, 수용체의 활성은 CSR::T1R 활성화에 반응하는 프로모터에 의해 유도되는 리포터 유전자의 발현을 검출함으로써 측정될 수 있다.

[0209] 본원에 사용된 "프로모터"는 수용체-조절 발현에 필요한 하나 이상의 기본적인 프로모터, 증강제 및 전사-인자 결합 자리를 비롯한, 유전자 발현의 수용체-매개 조절에 필요한 하나 이상의 전사 대조군 원소 또는 서열이다. CSR::T1R에 결합하는 작용제로부터 비롯된 세포내 신호에 반응하는 프로모터가 선택되어, 전사, 번역 또는 최종적인 활성이 쉽게 검출가능하고 측정가능한 대응하는 프로모터-조절 리포터 유전자에 작동적으로 연결된다.

[0210] 리포터 유전자는 예를 들면 루시페라제(luciferase), CAT, GFP, β-락타마제(lactamase), β-갈락토시다제(galactosidase), 및 소위 "조기 발현(immediate early)" 유전자, c-fos 원종양 유전자, 전사 인자 CREB, 혈관 활성 장관 펩타이드(VIP) 유전자, 소마토스타틴 유전자, 프로엔케팔린(proenkephalin) 유전자, 포스포엔올피루베이트 카복시-키나제(PEPCK) 유전자, NF-κB에 반응하는 유전자, 및 AP-1-반응성 유전자(Fos 및 Jun, Fos-관련 항원(Fra) 1 및 2, IκBα, 오르니틴 데카복실라제 및 아넥신 I 및 II에 대한 유전자 포함)로부터 선택될 수 있다.

[0211] 당해 기술 분야의 숙련자가 잘 이해하는 바와 같이, 프로모터는 선택된 리포터 유전자에 따라 선택될 것이다.

[0212] 루시페라제, CAT, GFP, β-락타마제, β-갈락토시다제, 및 이들의 생산물을 검출하기 위한 분석은 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 추가적인 리포터 유전자의 예는 후술된다.

[0213] "조기 발현" 유전자가 적합하며, 빠르게 유도된다(예를 들면, 수용체와 이펙터(effector) 단백질 또는 리간드가 접촉하는 수 분 내에). 리포터 유전자의 바람직한 성질은 하기 중 하나 이상을 포함한다: 리간드 결합에 대한 빠른 반응성; 휴지기 세포에서의 낮은 발현 또는 검출가능하지 않은 발현; 새로운 단백질 합성과 무관한 일시적인 유도; 새로운 단백질 합성을 필요로 하는 후속의 전사 정지; 및 수 분 내지 수 시간의 짧은 반감기를 가지며 상기 유전자로부터 전사된 mRNA. 마찬가지로, 프로모터는 상기 성질 중 하나, 수개 또는 모두를 가질 수 있다.

[0214] c-fos 원종양 유전자가 다수의 상이한 자극에 반응하고 빠른 유도를 갖는 유전자의 예이다. c-fos 조절 원소는

전사 개시에 필요한 TATA 박스, 즉 기본적인 전사를 위한 두 개의 상류 원소, 및 이분 대칭성을 갖는 원소를 포함하며 TPA, 혈청, EGF, 및 PMA에 의한 유도에 필요한 증강제를 포함한다. c-fos mRNA 캡 자리로부터 상류의 -317과 -298 bp 사이에 위치하는 20bp c-fos 전사 증강제 원소가 혈청 결핍 NIH 3T3 세포에서 혈청 유도에 필수적이다. 두 개의 상류 원소 중 하나는 -63 내지 -57에 위치하며, 이것은 cAMP 조절을 위한 공통 서열과 유사하다.

[0215] 전사 인자 CREB(사이클릭 AMP 반응성 원소 결합 단백질)는 세포내 cAMP의 수준에 반응한다. 그러므로, cAMP 수준의 조절에 의해 신호를 보내는 수용체의 활성화는 전사 인자의 결합 또는 CREB-결합 원소(CRE, 또는 cAMP 반응 원소로 지칭됨)에 연결된 리포터 유전자의 발현을 검출함으로써 확인될 수 있다. CRE의 DNA 서열은 TGACGTCA이다. CREB 결합 활성화에 반응하는 리포터 구조체는 미국 특허 제 5,919,649 호에 기술되어 있다.

[0216] 다른 적합한 리포터 유전자 및 이들의 프로모터는 cAMP 반응성인 혈관활성 장관 펩타이드(VIP) 유전자 및 이것의 프로모터; cAMP 반응성인 소마토스타틴 유전자 및 이것의 프로모터; cAMP, 니코틴 작용제, 및 포볼(phorbol) 에스터에 반응성인 프로엔케팔린 및 이것의 프로모터; 및 cAMP 반응성인 포스포엔올피루베이트 카복시-키나제(PEPCK) 유전자 및 이것의 프로모터를 포함한다.

[0217] GPCR 활성의 변화에 반응성인 리포터 유전자 및 이것의 프로모터의 추가적인 예는 AP-1 전사 인자 및 NF-κB를 포함한다. AP-1 프로모터는 팰린드롬(palindrome) TGA(C/G)TCA인 공통의 AP-1 결합 자리를 특징으로 한다. AP-1 자리는 또한 포볼 에스터 12-O-테트라데카노일포볼-β-아세테이트(TPA)를 포함하는 중앙 프로모터에 의한 유도의 매개에 원인이 되며, 따라서 이것은 때때로 TPA-반응 원소에서 TRE로서 지칭된다. AP-1은 성장 자극에 대해 세포의 초기 반응과 관련된 여러 유전자를 활성화시킨다. AP-1-반응성 유전자의 예는 Fos 및 Jun(이것의 단백질 그 자체가 AP-1 활성을 형성함), Fos-관련 항원(Fra) 1 및 2, IκBα, 오르니틴 데카복실라제 및 아넥신 I 및 II에 대한 유전자를 포함한다.

[0218] NF-κB 프로모터/결합 원소는 공통 서열 GGGGACTTTC를 갖는다. 다수의 유전자들은 NF-κB 반응성으로서 확인되었으며, 이것의 대조군 원소는 리포터 유전자에 연결되어 GPCR 활성을 모니터링할 수 있다. NF-κB에 반응성인 유전자는 예를 들면 IL-1β, TNF-α, CCR5, P-셀렉션(selection), Fas 리간드, GM-CSF 및 IκBα를 암호화하는 것들을 포함한다. NF-κB-반응성 리포터를 암호화하는 벡터는 당해 기술 분야에 공지되어 있거나, 당해 기술 분야에서 통상적인 기술, 예를 들면 합성 NF-κB 원소 및 최소 프로모터를 사용하거나 또는 NF-κB 조절되어야 하는 것으로 알려진 유전자의 NF-κB-반응성 서열을 사용하여 쉽게 형성할 수 있다. 추가적으로, NF-κB 반응성 리포터 구조체는 예를 들면 클론테크(CLONTECH)로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

[0219] 소정의 프로모터 구조체는 이 구조체에 의해 형질감염된 GPCR(CSR::T1R)-발현 세포를 작용제(예, 페틸라틴)에 노출시킴으로써 용이하게 시험될 수 있다. 작용제에 반응하여 리포터 유전자의 발현이 2배 이상 증가하는 것은 상기 리포터가 GPCR(CSR::T1R) 활성을 측정하는데 적합하다는 것을 시사한다.

[0220] 전사 분석을 위한 대조군은 GPCR(CSR::T1R)를 발현하지 않지만 리포터 구조체를 포함하는 세포 및 프로모터가 없는 리포터 구조체를 갖는 세포 둘다를 포함한다.

[0221] 리포터 유전자 활성화에 의해 확인된 바와 같이, GPCR(CSR::T1R) 활성을 조절하는 물질은 신호의 GPCR(CSR::T1R) 특이성을 규명하고 이것의 활성 스펙트럼을 측정하는 다른 프로모터 및/또는 다른 수용체를 사용하여 규명될 수 있고, 그러므로써 임의의 비특이적 신호, 예를 들면 리포터 유전자 경로를 통한 비특이적 신호를 배제시킬 수 있다.

[0222] 이노시톨 포스페이트(IP) 측정:

[0223] 포스파티딜 이노시톨(PI) 가수 분해는 48시간 또는 그 이상 동안 3H-미오이노시톨을 사용하여 세포를 표지화하는 것을 포함하는 미국 특허 제 5,436,128 호에 기술된 바에 따라 측정될 수 있다. 표지된 세포를 1시간 동안 시험 물질과 접촉시킨 후, 이러한 세포를 용해시키고 클로로폼-메탄올-물에서 추출시킨다. 이후, 이온 교환 크로마토그래피에 의해 이노시톨 포스페이트를 분리시키고 섬광 계수에 의해 이것을 정량화시킨다. 작용제에 있어서, 배수(fold) 자극은 완충액 대조군의 존재하의 분당 계수(counts per minute; cpm)에 대한 시험 물질의 존재하의 cpm의 비를 계산함으로써 측정된다. 유사하게, 억제제, 길항물질 및 역 작용제에 있어서, 배수 억제는 완충액 대조군(이는 작용제를 함유하거나 함유하지 않을 수 있다)의 존재하의 cpm에 대한 시험 물질의 존재하의 cpm의 비를 계산함으로써 측정된다.

[0224] 결합 분석:

- [0225] 리간드 결합에 대한 기능성 반응에 의해 유발된 파라미터의 변화를 측정하는 전술한 기능성 분석에 대한 대안으로, CSR::T1R 수용체로의 리간드 결합을 측정하는 결합 분석에 의해 리간드 결합을 측정할 수 있다.
- [0226] 결합 분석은 당해 기술 분야에 널리 알려져 있으며, 용액, 이중층 막, 임의적으로 고체 상에의 부착, 지질 단층 또는 소포체 환경에서 시험할 수 있다. CSR::T1R 폴리펩타이드로의 조절제의 결합은 분광학적 특성(예를 들면, 형광, 흡광도 또는 굴절률)의 변화, 유체역학적 방법(예를 들면, 형태를 사용함), 크로마토그래피, CSR::T1R 폴리펩타이드의 용해도의 측정에 의해 확인될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 결합 분석은 생화학적이며, 재조합 CSR::T1R 폴리펩타이드를 발현하는 세포/조직으로부터의 막 추출물을 사용한다. 예를 들면, 결합 분석은 미국 특허 제 20050032158 호의 문단[0169] 내지 [0198]에서 아들러(Adler) 등에 의해 T1R에 대해 기재된 바와 같이 수행될 수 있다.
- [0227] **CSR::T1R 수용체 폴리펩타이드 및 핵산, 및 실질적으로 상동의 폴리펩타이드 및 핵산:**
- [0228] 본원에 기재된 방법에서 유용한 CSR::T1R 키메라 단백질은 서열번호: 2(CSR::T1R2-a), 서열번호: 4(CSR::T1R3-a), 서열번호: 20(CSR::T1R2-b), 서열번호: 22(CSR::T1R3-b), 서열번호: 2와 서열번호: 4의 키메라성 헤테로이량체(CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a), 서열번호: 20과 서열번호: 22의 키메라성 헤테로이량체(CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b), 서열번호: 2와 서열번호: 22의 키메라성 헤테로이량체(CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-b), 서열번호: 20과 서열번호: 4의 키메라성 헤테로이량체(CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-a), 서열번호: 2 또는 20과 야생형 T1R3의 헤테로이량체(CSR::T1R2-a/T1R3 또는 CSR::T1R2-b/T1R3), 및 서열번호: 4 또는 22와 야생형 T1R2의 헤테로이량체(T1R2/CSR::T1R3-a 또는 T1R2/CSR::T1R3-b)로부터 선택된 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0229] 다르게는, CSR::T1R 키메라 단백질(또는 CSR::T1R을 암호화하는 핵산)은, 실질적으로 상동성이고 기능성이 유지되는(즉, 리간드에 결합되고/되거나 리간드에 의해 활성화되거나, 또는 상기 수용체를 암호화하는) 수용체(또는 상기 CSR::T1R 수용체를 형성하는 뉴클레오타이드 서열)일 수 있다.
- [0230] 실질적으로 상동하는 CSR::T1R 키메라 단백질은 CSR::T1R2 및/또는 CSR::T1R3의 T1R2 또는 T1R3 부분의 마우스, 래트, 햄스터, 유인원 및 개로부터의 T1R2 및/또는 T1R3을 비롯하여 대립 변이체 또는 상이한 종의 관련 부분에 의해 대체된 단백질을 포함한다.
- [0231] 추가적으로, 실질적으로 상동하는 CSR::T1R 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열은 보존적 돌연변이 및/또는 점 돌연변이에 의해 형성될 수 있으며, 후술되는 바와 같이 임의의 보존적으로 변형된 임의의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0232] 핵산 서열과 관련하여, 보존적으로 변형된 변이체는 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 아미노산 서열(보존적으로 치환된 아미노산, 즉 아르기닌과 교환된 리신 및 하기에서 설명되는 추가적인 예들)을 암호화하는 핵산을 의미한다.
- [0233] 유전 암호의 겹침 때문에, 서열은 다르지만 기능적으로 동일한 많은 수의 핵산이 임의의 소정의 폴리펩타이드/단백질을 암호화한다. 이러한 핵산 변종은 보존적으로 변형된 변종의 하나의 종인 "침묵 변종(silent variations)"이다. 폴리펩타이드를 암호화하는 각각의 핵산 서열은 또한 핵산의 모든 가능한 침묵 변종을 기술한다. 그러므로, 핵산에서의 각각의 코돈(일반적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG 및 일반적으로 트립토판의 유일한 코돈인 TGG 제외)은 변형되어, 동일한 폴리펩타이드를 생산하는 기능적으로 동일한 핵산 서열을 생산할 수 있다. 따라서, 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 각각의 침묵 변종은 각각의 소정의 핵산 서열에 내재되어 있다.
- [0234] 아미노산 서열과 관련하여, PCR, 유전자 클로닝, cDNA의 특정 자리-지향 돌연변이화, 숙주 세포의 형질감염, 및 시험관내 전사를 포함하는 재조합 유전자 기법의 공지된 프로토콜을 사용하여 아미노산 치환이 유도될 수 있는데, 이러한 것들은 CSR::T1R 서열에 상기 변화를 도입하는데 사용될 수 있다. 이어서, 변이체는 미각-세포-특이적 GPCR 기능 활성을 위해 스크리닝될 수 있다. 기능적으로 유사한 아미노산을 제공하는 보존적 치환 표는 당해 기술 분야에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 보존적 치환을 선택하는 하나의 대표적인 가이드라인은 다음을 포함한다(원래의 잔기 다음에 전형적인 치환이 음): 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 또는 gin 또는 glu; met/leu 또는 tyr 또는 ile; phe/met 또는 leu 또는 tyr; ser/thr; thr/ser; trp/tyr; tyr/trp 또는 phe; val/ile 또는 leu.

- [0235] 또 다른 전형적인 가이드라인에서는 하기 6개의 군을 사용하고 있으며, 이들 각각은 서로 보존적으로 치환되는 아미노산을 함유한다: 1) 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 리신(L); 5) 아이소루신(I), 루신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 및 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W).
- [0236] 또 다른 가이드라인에서는 서로 보존적인 치환으로서 양성 또는 음성의 모든 하전된 아미노산을 허용한다. 또한, 단일 아미노산 또는 암호화된 서열에서 적은 백분율(예를 들면, 26% 이하, 또는 20% 이하, 또는 10% 이하)의 아미노산을 변경, 첨가 또는 결실시킨 각개의 치환, 결실 또는 첨가가 보존적으로 변형된 변종인 것으로 간주된다.
- [0237] 실질적으로 상동의 뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열은 어느 정도의 서열 동일성을 갖거나 또는 후술되는 바와 같은 특성의 엄격한 하이브리드화 조건 하에서 하이브리드화된다.
- [0238] 서열 동일성(%):
- [0239] 실질적으로 상동의 뉴클레오타이드 서열은 90% 이상, 95% 이상, 또는 98% 이상의 서열 동일성(%)을 갖는다.
- [0240] 실질적으로 상동의 폴리펩타이드 서열은 90% 이상, 95% 이상 또는 98% 이상의 서열 동일성(%)을 갖는다.
- [0241] 서열 동일성(%)의 계산치는 다음과 같이 측정된다.
- [0242] BLAST(Basic Local Alignment Search Tool)는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>에서 입수할 수 있는 Blastn 프로그램에 의해 사용된 지식 검색 알고리즘(heuristic search algorithm)이다. 또 다른 뉴클레오타이드 서열에 대한 뉴클레오타이드 쿼리(query) 서열의 동일성(%)을 측정하기 위해서, 10의 EXPECT(데이터베이스 서열에 대한 일치률 기록하기 위한 통계적 유의 임계값) 및 DUST 필터링을 포함하는 BLAST 버전 2.2.1.3의 디폴트(default) 파라미터를 사용하는 Blastn을 사용한다.
- [0243] 또 다른 폴리펩타이드 서열에 대한 폴리펩타이드 쿼리 서열의 동일성(%)을 측정하기 위해서, 10의 EXPECT 및 DUST 필터링을 포함하는 BLAST 버전 2.2.1.3의 디폴트 파라미터를 사용하는 Blastp를 사용한다.
- [0244] 엄격한 하이브리드화 조건:
- [0245] 뉴클레오타이드 서열은, 이것들이 후술되는 엄격한 하이브리드화 조건 하에 본원에서 제시된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이것의 보체에 선택적으로 하이브리드화될 수 있다면 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 엄격한 조건은 50%의 폼아미드, 5×SSC 및 1% SDS로 이루어진 용액 중의 42°C의 온도이며, 0.2×SSC 및 0.1% SDS로 이루어진 용액 중에 65°C에서 세척된다 (1×SSC = 0.15M NaCl, 0.015M Na₃ 시트레이트 pH 7.0).
- [0246] 배경 하이브리드화는 예를 들면 스크리닝된 cDNA 또는 게놈 DNA 라이브러리에 존재하는 다른 뉴클레오타이드 서열 때문에 발생할 수 있다.
- [0247] 표적 DNA에서 관측된 특이적 상호작용의 10배 미만의 세기를 갖는 신호는 배경으로서 간주된다. 상호작용의 세기는 예를 들면 32P로 프로브를 방사표지화함으로써 측정될 수 있다.
- [0248] **조절제를 확인하기 위한 키트:**
- [0249] CSR::T1R, 또는 실질적으로 이것의 상동성인 서열을 발현하는 재조합 세포를 포함하고, CSR::T1R의 작용제, 예컨대 비제한적으로 염화칼슘, 페릴라틴, NDHC, 사이클라메이트 및 신나모니트릴을 포함하는 키트, 예를 들면 스크리닝 키트 또는 고성능 스크리닝 키트가 또한 제공된다.
- [0250] 칼슘을 포함하는 키트의 사용은 키메라 단백질에만 결합하여 활성화시키고 야생형 수용체 또는 키메라 단백질의 T1R2 및 T1R3 부분에는 결합하지 않는 이점을 갖는다.
- [0251] 임의적으로, 상기 세포는 추가적으로 예컨대, 칼슘 신호를 위한 G-단백질을 포함한다. 적합한 G-단백질은 공지되어 있으며, 상기에 기술되어 있고, 당해 기술 분야의 숙련가들은 필요에 따라 상기 세포에 이들을 도입하는 방법을 잘 알고 있다. 매우 유용한 키메라 G-단백질은 G 알파 16-구스트듀신 44이다.
- [0252] 작용제는 적합한 농도, 예를 들면 1nM 내지 10mM, 또는 0.1 μM 내지 1mM, 예를 들면 0.1 μM 내지 100 μM로 제공된다.
- [0253] 유용한 농도는 예컨대, 염화칼슘의 경우 0.2 내지 20mM, 페릴라틴의 경우 5 내지 500 μM, 신나모니트릴의 경우 10 내지 1000 μM, 사이클라메이트의 경우 0.01 내지 5mM, 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC)의 경우 0.033

내지 3.3mM이다.

- [0254] 임의적인 키트 성분은, 제공된 재조합 세포를 배양하기 위한 적합한 배지, 및 예를 들면 세포 배양 접시 또는 마이크로적정 플레이트 상에서 세포들을 성장시키는 고체 지지체를 포함할 수 있으며, 이러한 임의적인 성분은 당해 기술 분야의 숙련가가 용이하게 이용할 수 있을 것이다.
- [0255] 키트는 다음과 같이 사용할 수 있다:
- [0256] (i) CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포를 고체 지지체 상에서 성장시킨다.
- [0257] (ii) 약 1nM 내지 100mM 또는 이 이상의 농도의 시험 물질을 적합한 농도의 작용제의 존재하에서 한정된 플레이트 또는 웰의 배양 배지에 첨가한다.
- [0258] (iii) 시험 물질의 존재하의 반응과 시험 물질의 부재하의 반응을 비교함으로써 세포의 기능적인 반응의 변화를 측정함으로써 시험 물질이 조절제로 확인된다.
- [0259] 예를 들면, 단계 (iii)은 상기에서 기술된 수용체의 활성을 기록하는 검출 방법중 어느 하나와 조합하여 상기에서 기술된 분석법 중 어느 하나에 따라 실시될 수 있다. 이러한 것은 또한 전술된 특이적으로 선택되고 또는 개정된 재조합 세포를 필요로 할 수 있다. 적합한 분석은 예를 들면 시험 물질에 반응하는 CSR::T1R의 활성화 또는 이것의 변화를 측정하는 칼슘 플럭스 분석이다.
- [0260] 키트는 증강제를 확인하기 위해 다음과 같이 사용될 수 있다:
- [0261] (i) CSR::T1R 키메라 단백질을 발현하는 재조합 세포를 고체 지지체 상에서 성장시킨다.
- [0262] (ii) 약 1nM 내지 100mM 또는 이 이상의 농도의 시험 물질을 적합한 농도의 칼슘 작용제(예컨대, 비제한적으로 염화칼슘의 형태)의 존재하에서 한정된 플레이트 또는 웰의 배양 배지에 첨가한다.
- [0263] (iii) 시험 물질의 존재하의 반응과 시험 물질의 부재하의 반응을 비교함으로써 칼슘에 대한 세포의 기능적인 반응의 변화를 측정함으로써 시험 물질이 증강제로 확인된다.
- [0264] 적합한 염화칼슘 농도는 예컨대 약 0.2 내지 20mM, 또는 0.5 내지 10mM 또는 약 1mM이다.
- [0265] **확인된 조절제의 분석:**
- [0266] 상기에서 기술된 방법에 의해 동정된 조절제는 플라보리스트(flavorists) 또는 시험자의 심사위원단이 동정된 조절제의 맛을 보는 단순한 감각적 실험에 의해 용이하게 분석할 수 있다. 화합물은 단맛을 확인하기 위해 예컨대, 물 중에서 맛을 보거나 또는 단맛을 증진시키는 조절제를 확인하기 위해 조절제가 없는 음성 대조군과 비교하여 감미 자극물질과 함께 맛을 보게 된다.
- [0267] **대규모 스크리닝 분석:**
- [0268] 본원의 상기에서 기술된 전사 리포터 분석 및 대부분의 세포를 기본으로 하는 분석은 CSR::T1R 활성을 조절하는 물질의 라이브러리를 스크리닝하는데 매우 적합하다.
- [0269] 상기 분석은 분석 단계를 자동화하고, 임의의 편리한 공급원으로부터의 화합물을 분석에 제공하여 대규모 화합물 라이브러리를 스크리닝하는 것으로 설계될 수 있으며, 이러한 분석은 전형적으로 평행식(예를 들면 로보트 분석에서 마이크로적정 플레이트 상의 마이크로적정 포맷)으로 실시된다.
- [0270] 다수의 유효한 조절제를 함유하는 조합적인 화합물 또는 펩타이드 라이브러리를 제공하는 것을 포함하는 고성능 스크리닝 방법으로 분석을 실시할 수 있다. 이어서, 상기 라이브러리는 전술된 활성을 보여 주는 라이브러리 물질(구체적인 화합물 종류 또는 하위종류)를 확인하기 위해 전술된 하나 이상의 분석에서 스크리닝된다. 따라서, 확인된 조절제는 직접적으로 사용되거나 또는 유도체를 제조하고 시험함으로써 추가의 조절제를 확인하는 선도 물질로서 작용할 수 있다.
- [0271] 합성 화합물 라이브러리는 메이브리지 케미칼 컴파니(Maybridge Chemical Co.; 영국 콘월 트레빌레트 소재), 콤지넥스(Comgenex; 미국 뉴저지주 프린스턴 소재), 브랜든 어쏘시에이트(Brandon Associates; 미국 뉴햄프셔주 메리마크 소재) 및 마이크로소스(Microsource; 미국 코네티컷주 뉴 밀포드 소재)를 비롯한 여러 회사로부터 상업적으로 입수할 수 있다.
- [0272] **시험 물질의 라이브러리:**

- [0273] 조합적인 화합물 라이브러리는 시약과 같은 다수의 화합물 "기본 단위(building block)"들을 조합하여 화학적 합성 또는 생물학적 합성에 의해 생성된 다양한 화합물을 모아 놓은 것이다. 예를 들면, 폴리펩타이드 라이브러리와 같은 선형 조합 화합물 라이브러리는 소정의 화합물의 길이(즉, 폴리펩타이드 화합물에서의 아미노산의 수)에서 모든 가능한 방식의 일련의 화합물 기본 단위(아미노산)를 조합함으로써 형성된다. 수백만의 화합물이 화합물 기본 단위의 조합적인 혼합을 통해 합성될 수 있다.
- [0274] 희귀 화합물 라이브러리는 알드리치(Aldrich; 미국 위스콘신주 밀워키 소재)로부터 입수할 수 있다.
- [0275] 박테리아, 진균, 식물 및 동물 추출물 형태의 천연 화합물의 라이브러리는 예를 들면 판 래보러토리스(Pan Laboratories; 미국 워싱턴주 보텔 소재) 또는 미코서치(MycoSearch; 미국 노스캐롤라이나주 소재)로부터 상업적으로 입수할 수 있거나, 또는 당해 기술 분야에 잘 공지된 방법에 의해 용이하게 제조할 수 있다. 부가적으로, 천연 및 합성적으로 생성된 라이브러리 및 화합물은 통상의 화학, 물리 및 생화학 수단에 의해 용이하게 변형된다.
- [0276] 다른 라이브러리는 단백질/발현 라이브러리, 예를 들면 식품, 식물, 동물, 박테리아를 포함하는 천연 공급원으로부터의 cDNA 라이브러리, 하나 이상의 폴리펩타이드의 불규칙으로 또는 계통적으로 돌연변이된 변이체를 발현하는 라이브러리, 하나의 세포 또는 조직의 mRNA 함유물을 발현시키는데 사용되는 바이러스성 벡터에서의 계층 라이브러리를 포함한다.
- [0277] 고성능 분석에서, 하루에 수천 개 이하의 상이한 조절제 또는 리간드를 스크리닝할 수 있다. 특히, 마이크로적정 플레이트의 각각의 웰을 사용하여, 선택된 유효한 조절제에 대한 별개의 분석을 실시할 수 있거나, 또는 농도 또는 배양 시간 효과가 관찰되는 것이라면, 5 내지 10개의 웰당 하나의 조절제를 시험할 수 있다. 따라서, 하나의 표준 마이크로적정 플레이트에서는 약 100개의 조절제를 분석할 수 있다. 만일 1536개의 웰 플레이트가 사용되는 경우, 하나의 플레이트에서는 약 100 내지 약 1500개의 상이한 화합물을 용이하게 분석할 수 있다. 1일 당 수 개의 상이한 플레이트를 분석할 수 있다; 따라서 약 6,000 내지 20,000개 이하의 상이한 화합물에 대한 분석 스크리닝이 가능하다.
- [0278] **분석 방법에서 CSR::T1R 조절 효과를 시험할 수 있는 시험 물질의 유형:**
- [0279] 시험 물질은 소 화합물, 화학 중합체, 생물학적 중합체, 펩타이드, 단백질, 당, 탄수화물, 핵산 및 지질을 비롯한 임의의 물질일 수 있다. 물질은 합성 화합물, 화합물의 혼합물, 천연 생산물 또는 천연 샘플, 예를 들면 식물 추출물, 배양 상청액, 또는 조직 샘플일 수 있다.
- [0280] 단맛을 변형시킬 수 있는 화합물의 예로서, 메틸 차비콜(methyl chavicol), 테아사포닌(Theasaponin) E1, 아세실팜(Acesulfame) K, 알리탐(Alitame), 아스파탐(Aspartame), CH 401, 돌신(Dulcin), 네오타م(Neotame), 소듐 사이클라메이트, 슈크라로즈, 슈퍼아스파탐, 사이나린(Cynarin), 글라이시필린(Glycyphyllin), 레바우다이오시드(Rebaudioside) C, 아브루소시드(Abrusoside) A, 아브루소시드 B, 아브루소시드 C, 아브루소시드 D, 아브루소시드 E, 아피오글라이시르히진(Apioglycyrrhizin), 아라보글라이시르히진(Araboglycyrrhizin), 바이유노시드(Baiyunoside), 브라제인, 브리오둘코시드(Bryodulcoside), 카르노시플로시드(Carnosifloside) V, 카르노시플로시드 VI, D, 콤민시(cumminsi), 사이클로카리오시드(Cyclocarioside) A, 사이클로카리오시드 I, 돌코시드 A, 글라이시르히즈산(Glycyrrhizic Acid), 헤르난둘신(Hernandulcin), 4베타-하이드록시-헤스페리딘-7-글루코시드 다이하이드로칼콘, 휴양퀴오시드(Huangqioid) E, 휴양퀴오시드 E, 3-하이드록시플로리드진, 2,3-다이하이드로-6-메톡시 3-O-아세테이트, 마빈린 말토실-알파-(1,6)-네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘, 모그로시드(Mogroside) IIE, 모그로시드 III, 모그로시드 IIIE, 모그로시드 IV, 모그로시드 V, 11-옥소 모그로시드 V, 모나틴(Monatin), 모노암모늄 글라이시르히진에이트(Mag), 뮤쿠로지오시드 lib, 나링긴 다이하이드로칼콘, 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘 (NHDHC), 네오모그로시드, 오스라딘, 페리안드린 I, 페리안드린 II, 페리안드린 III, 페리안드린 IV, 페리안드린 V, 플로미소시드(Phlomisoside) I, 플로리진(Phlorizin), 필로둘신(Phylodulcin), 폴리포도시드(Polypodoside) A, 포타슘 마그네슘 칼슘 글라이시르히진, 프테로카리오시드 A, 프테로카리오시드 B, 레바우다이오시드 A, 레바우다이오시드 B, 루버소시드(Rubusoside), 스칸데노시드(Scandenoside) R6, 시아메노시드(Siamenoside) I, 소듐 글라이시르히진에이트, 스테비올비오시드(Steviolbioside), 스테비오시드(Stevioside), 알파-글라이코실 수아비오시드 A, 수아비오시드 B, 수아비오시드 G, 수아비오시드 H, 수아비오시드 I, 수아비오시드 J, 타우마틴(Thaumatococin), 트라이암모늄 글라이시르히진에이트(TAG), 트릴로바틴 큐르쿨린(Trilobatin Curculin), 스트로긴(Strogin) 1, 스트로긴 2, 스트로긴 4, 미라쿨린(Miraculin), 호들신, 주주바사포닌(Jujubasaponin) II, 주주바사포닌 III, 아브루소시드 E, 페리안드린산 I, 모노글루쿠로니드, 페리안드린산 II, 모노글라이쿠로니드, 클로로겐산, 베타-(1,3-하이드록시-4-메톡시벤

질)-헤스페르틴 다이하이드로칼콘, 3'-카복시-헤스페르틴 다이하이드로칼콘, 3'-스테비오시드 유사물을 열거할 수 있다.

- [0281] 감미 자극물질의 확인된 조절제는 예를 들면 단맛의 감각을 발휘할 수 있는 인공 감미료의 조절제를 포함할 수 있다.
- [0282] 소비재는 식품, 음료, 경구 위생 제품, 및 이러한 제품의 혼합을 위한 조성물, 특히 향미 조성물을 포함한다. 향미 조성물은 가공동안 가공 식품 또는 음료에 첨가될 수 있거나, 또는 이것들은 실질적으로 그 자체의 소비재, 예를 들면 소스 등과 같은 양념일 수 있다. 감미 자극물질은 과자류 및 디저트를 비롯한 다른 단맛 소비재 뿐만 아니라 짠맛 및 달고 신맛의 소비재에서 특히 관심이 되고 있다. 소비재의 예로서 과자류 제품, 케익, 시리얼 제품, 제과류 제품, 빵 제품, 김, 휴잉김, 소스(양념), 스프, 가공 식품, 조리 과일 및 식물성 제품, 육류 및 육류 제품, 계란 제품, 우유 및 유제품, 치즈 제품, 버터 및 버터 대용 제품, 우유 대용 제품, 콩 제품, 식용 오일 및 지방 제품, 의약품, 음료, 알콜 음료, 맥주, 소프트 드링크, 식품 추출물, 식물성 추출물, 육류 추출물, 양념, 감미료, 기능성 식품, 의료 및 비의료성 검, 정제, 로젠지, 드립, 유화제, 엘릭시르, 시럽, 및 음료, 인스턴트 음료 및 발포정을 제조하는 다른 물질을 포함한다.
- [0283] **핵산 및 단백질의 서열:**
- [0284] 전술된 구조체 및 방법에서 이용되는 서열은 하기에서 열거하고 있는 서열에서 찾을 수 있다.
- [0285] 서열번호: 1 및 19는 CSR::T1R2 키메라 단백질(-a/-b)을 암호화하는 뉴클레오타이드/핵산 서열에 상응하고, 서열번호: 2 및 20은 CSR::T1R2 키메라 단백질(-a 및 -b)의 폴리펩타이드/아미노산 서열에 상응한다. 서열번호: 3 및 21은 CSR::T1R3 키메라 단백질(-a 및 -b)을 암호화하는 뉴클레오타이드/핵산 서열에 상응하고, 서열번호: 4 및 22는 CSR::T1R3 키메라 단백질(-a 및 -b)의 폴리펩타이드/아미노산 서열에 상응한다.
- [0286] 2개 서브유니트를 포함하는 착체로, CSR::T1R2 키메라 단백질 및 CSR::T1R3 키메라 단백질은 기능적인 키메라성 감미 수용체를 형성한다. 생성된 착체는 2개의 -a 변이체, 2개의 -b 변이체, 또는 조합체(CSR::T1R2-a와 CSR::T1R3-b 또는 CSR::T1R2-b와 CSR::T1R3-b), 또는 본원에 기재된 이들의 기능을 보유하는 이들의 상동 변이체를 포함할 수 있다.
- [0287] 형질감염된 구조체에서, 신규한 키메라 단백질을 위해 암호화하는 핵산(변이체-a에 대해서는 서열번호:1 또는 3, 및 변이체-b에 대해서는 서열번호: 19 및 21)에 뒤이어 C-말단에서의 HSV tag(서열번호: 5)가 온다.
- [0288] 따라서, 생성된 단백질은 하기 아미노산을 포함한다: 서열번호: 1의 아미노산에 이어서 서열번호: 5, 서열번호: 19에 이어서 서열번호: 5, 서열번호: 3에 이어서 서열번호: 5, 또는 서열번호: 21에 이어서 서열번호: 5.
- [0289] T1R2/T1R3 수용체 착체의 공지된 T1R2 및 T1R3 서브유니트의 공지된 전장 핵산 및 단백질 서열이 T1R2의 경우에는 서열번호: 7 + 8, 및 T1R3의 경우에는 서열번호: 9 + 10에 제공되어 있다.
- [0290] 공지된 전장 hCaSR 수용체 핵산 및 단백질 서열이 서열번호: 11 + 12에 제공되어 있다.
- [0291] 서열번호: 1 + 2: CSR::T1R2-a 핵산 + 단백질
- [0292] 서열번호: 3 + 4: CSR::T1R3-a 핵산 + 단백질
- [0293] 서열번호: 5 + 6: C-말단 핵산에서의 HSV tag + 단백질
- [0294] 서열번호: 7 + 8: T1R2(전장 암호화 서열) 핵산 + 단백질
- [0295] 서열번호: 9 + 10: T1R3(전장 암호화 서열) 핵산 + 단백질
- [0296] 서열번호: 11 + 12: hCaSR 핵산 + 단백질
- [0297] 서열번호: 13 내지 18: 프라이머 서열, 실시예 2a 및 b, 및 실시예 3a 및 b의 비교
- [0298] 서열번호: 19 + 20: CSR::T1R2-b 핵산 + 단백질
- [0299] 서열번호: 21 + 22: CSR::T1R3-b 핵산 + 단백질
- [0300] 서열번호: 23 - 25: 프라이머 서열, 실시예 2b 및 3b의 비교
- [0301] 전술된 방법을 예시하는 일련의 실시예가 하기에 기술된다. 하기 실시예는 단지 예시적인 것으로 어떠한 방식으로든 상기 방법 또는 키트를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

실시예

- [0302] 모든 실시예는 인간의 T1R2, T1R3 및 hCaSR로부터 유도된 DNA 서열을 이용한다.
- [0303] 실시예 개요
- [0304] 1: Fluo-4 칼슘 분석
- [0305] 2a: CSR::T1R2-a 벡터 구조체의 제조
- [0306] 2b: CSR::T1R2-b 벡터 구조체의 제조
- [0307] 3a: CSR::T1R3-a 벡터 구조체의 제조
- [0308] 3b: CSR::T1R3-b 벡터 구조체의 제조
- [0309] 4: T1R2, T1R3 벡터 구조체의 제조(비교를 위해 야생형 수용체)
- [0310] 5: CSR::T1R2/CSR::T1R3 및 T1R2/T1R3 이중 발현의 형질감염
- [0311] 5.2: CSR:T1R2/CSR:T1R3 헤테로이량체를 발현하는 안정 세포주의 제조
- [0312] 6a: CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a의 활성화
- [0313] 6b: CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b의 활성화
- [0314] 실시예 1
- [0315] Fluo-4 칼슘 분석
- [0316] Fluo-4는 세포내 칼슘에 대한 형광 지시자이며, 이것은 칼슘 농도의 변화, 특히 리간드의 첨가 후 발생하는 수용체 활성화에 반응한 증가를 측정하는 것이다.
- [0317] Ga 16-구스트듀신 44를 안정하게 발현시키는 HEK293 세포를 숙주 세포로 사용하고 실시예 4에 기술된 바에 따라 다양한 구조체에 의해 형질감염시켰다.
- [0318] 흑색의 투명한 바닥을 갖는 96-웰 플레이트를 모든 분석에서 사용하였다. 분석 전날에 이것들을 웰당 8500의 형질감염 세포수로 시드화시키고, 사용된 세포에 적절한 성장 배지에서 밤새 37°C로 유지시켰다. HEK293 세포를 위해, 높은 글루코스, L-글루타민, 피록시딘 하이드로클로라이드를 함유하고 10% 우태 혈청으로 보충된 돌베코 개정 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle medium)를 HEK293 세포의 성장 및 유지를 위해 사용하였다.
- [0319] 분석할 때, 성장 배지를 제거하고, 세포들을 감소된 칼슘 C1 완충액에 용해된 1.5 μM Fluo-4 AM(몰레큘러 프로브스(상표명), 인비트로젠(미국)) 및 2.5 μM의 프로베니시드(시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))로 구성되는 50 μl의 칼슘 분석 용액과 함께 1시간 동안(37°C 온도의 암소에서) 배양시켰다. 감소된 칼슘 C1 완충액은 130mM NaCl, 5mM KCl, 10mM 헤페스, 0.5mM CaCl₂(2mM로부터 감소) 및 10mM 글루코스를 함유한다(pH 7.4).
- [0320] 처음 1 시간 동안의 부하 후, 자동화 플레이트 세척기(바이오 텍(Bio Tek))를 사용하여 웰당 100 μl의 감소된 칼슘 C1 완충액으로 플레이트를 5회 세척하고, 세척 후 플레이트를 실온의 암소에서 30분 동안 추가적으로 배양시켜 Fluo-4-AM의 완전한 탈에스터화를 실시하였다. 완충액을 제거하고, 플레이트를 100 μl의 감소된 칼슘 C1 세척 완충액으로 5회 세척하고, 최종적으로 세포를 180 μl의 감소된 칼슘 C1 세척 완충액에서 재구성하였다.
- [0321] 분석 판독을 위하여, 플레이트를 FLIPR(형광 이미징 플레이트 판독기; fluorescence imaging plate reader(FLIPR-Tetra, 몰레큘러 디바이스즈))에 위치시키고, 10배로 농축된 리간드 원료 용액 20 μl를 첨가한 후에 수용체의 활성화를 개시하고, 이것들은 감소된 칼슘 C1 완충액에서 제조되었다.
- [0322] 리간드의 첨가 전의 15초 동안 및 리간드의 첨가 후 105초 동안 형광을 계속하여 모니터링하였다(45 내지 105초가 충분할 수 있다).
- [0323] 수용체의 활성화는 비교 형광 단위(RFU)로 주어지며, 하기 수학적 2에 의해 정의된다:
- [0324] 수학적 2

- [0325] 형광 증가 = 최대 형광 - 기준 형광
- [0326] 상기 식에서, 기준 형광은 리간드의 첨가 전 처음 10 내지 15초 동안 계산된 형광 평균치를 의미한다.
- [0327] 음성 대조군으로서, 형질감염을 가장한 세포들을 동일 농도의 리간드에 노출시키고, 신호에 대응하지 않는 미량 칼슘의 농도를 측정하였다.
- [0328] 활성화된 수용체를 갖는 세포들은 상기 음성 대조군보다 유의하게 큰 신호(RFU)에 의해 확인되었다.
- [0329] 실시예 2a
- [0330] CSR::T1R2-a 벡터 구조체의 제조
- [0331] PCR 생성물 둘다에 공통된 제한 효소 자리에 의해 PCR에서 발생된 2개 DNA 단편을 연결시킴으로써, 즉 hCaSR의 세포외 아미노 말단 도메인(ATD)을 나타내는 PCR 생성물(1-Phe⁵³⁹)을, 시스테인-풍부 도메인(CRD), 막통과 도메인(TMD) 및 Ser⁴⁹³에서 시작하는 C-말단을 함유하는 T1R2의 "-a" 단편을 나타내는 PCR 생성물(T1R2-a, 서열번호: 1(핵산) 및 2(단백질))에 연결시킴으로써 CSR::T1R2-a 키메라성 cDNA 벡터 구조체를 생성시켰다.
- [0332] CSR::T1R2-a 키메라성 DNA의 제조를 용이하게 하기 위하여, 전술된 2개 단편을 형성하는데 이용된 프라이머에 Sac II 자리를 도입하였다. 당해 기술 분야에 잘 알려진 조건하에 완충액중 적절한 제한 효소 및 상기 도입된 자리를 이용하여, 상기 단편을 효소적 결찰에 의해 연결하였다.
- [0333] 형성된 PCR-생성물/단편내의 이들 Sac II 자리는 hCaSR ATD 단편의 C-말단 단부 및 T1R2-a 단편의 N-말단 단부에 각각 위치하여서, 키메라성 DNA의 2개 PCR-생성물/단편의 결찰을 가능하게 하였다. 상기 Sac II 자리의 혼입은 hCaSR내의 Phe⁵³⁹를 아르기닌 잔기로 전환시킨다. 플래티넘 태크 하이 피델리티 폴리머라아제(Platinum Taq High Fidelity Polymerase)를 사용하는 PCR이 이용되어서, 하기에 제공된 서열번호: 13 내지 16의 특이적 프라이머를 사용하여 CSR:T1R2-a 키메라성 cDNA 단편을 포함하는 단편을 증폭하였다. F는 순방향 프라이머를 지칭하고, R은 역방향 프라이머를 지칭한다.
- [0334] 밑줄친 문자는 PCR 생성물의 후속적인 서브클로닝을 위해 프라이머내에 위치한 제한 자리를 나타낸다.
- [0335] hCaSR-ATD 프라이머 F(서열번호: 13):
- [0336] CACCAAGCTTATGGCATTATAGCTGC
- [0337] hCaSR-ATD 프라이머 R(서열번호: 14):
- [0338] ATATCCGCGGCACCTCCCTGGAGAACCC
- [0339] T1R2-단편 프라이머 F(서열번호: 15):
- [0340] ATATCCGCGGTCCATGTGTTCCAAGAGG
- [0341] T1R2-단편 프라이머 R(서열번호: 16):
- [0342] ATATGCGGCCGAGTCCCTCCTCATGGT
- [0343] PCR 증폭을 위한 주형은 인간의 CaSR(미국 오리젠 잉크(Origene Inc.)에서 상업적으로 입수 가능), 또는 인간의 심상유두 막 조직으로부터 생성된 cDNA 라이브러리로부터 단리된 인간의 T1R2을 위한 전장 cDNA이었다. PCR 반응 파라미터는 5분동안 94℃, 이어서 45초동안 94℃, 15초동안 54℃ 및 2분동안 72℃로 이루어진 35회 주기, 이어서 10분동안 72℃의 최종 연장 주기이었다.
- [0344] 생성된 핵산 단편을 겔 전기영동에 의해 분리하고, 정제하고, pCR-Topo-II 벡터(인비트로젠)내로 서브클로닝하고, 생성된 클론을 DNA 서열분석에 의해 규명하여, PCR 증폭으로부터 발생한 돌연변이가 없음을 확실하게 하였다.
- [0345] 서열분석 후에, 3 조각 결찰에 의해 pcDNA4-TO 벡터(미국 인비트로젠으로부터 구입)를 기본으로 하는 발현 카세트 벡터 구조체내로 삽입물을 서브클로닝하여서, 벡터 구조체내의 CSR::T1R2-a 키메라성 cDNA 단편의 조립을 가능하게 하였다.
- [0346] 형성된 벡터 구조체의 C-말단은 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 당단백질 D 에피토프를 암호화하고, 이는 상기 에피토프에 결합하는 특이적 항체를 이용하는 면역세포화학 연구에 사용될 수 있다. CSR:T1R2-a cDNA를 갖는 생

성된 CSR:T1R2-a 벡터 구조체는 서열번호: 2(CSR:T1R2-a), 이어서 서열번호: 6(HSV 에피토프)(아미노 말단에서 C 말단 방향)의 연결된 아미노산 서열의 CSR:T1R2-a:HSV 단백질의 발현을 허용한다.

- [0347] 실시예 2b
- [0348] CSR::T1R2-b 벡터 구조체의 제조
- [0349] PCR 생성물 둘다에 공통된 제한 효소 자리에 의해 PCR에서 발생된 2개 DNA 단편을 연결시킴으로써, 즉 hCaSR의 세포외 아미노 말단 도메인(ATD) 및 시스테인-풍부 도메인(CRD)을 나타내는 PCR 생성물(1-Ile⁶⁰³)을, 막통과 도메인(TMD) 및 Val⁵⁵⁷에서 시작하는 C-말단을 함유하는 T1R2의 "-b" 단편을 나타내는 PCR 생성물(T1R2-b, 서열번호: 19(핵산) 및 20(단백질))에 연결시킴으로써 CSR::T1R2-b 키메라성 cDNA 벡터 구조체를 생성시켰다.
- [0350] CSR:T1R2-b 키메라성 DNA의 제조를 용이하게 하기 위하여, 본원에서 전송된 2개 단편을 형성하는데 이용된 프라이머에 BsiW I 자리를 도입하였다. 당해 기술 분야에 잘 알려진 조건하에 완충액중 적절한 제한 효소 및 상기 도입된 자리를 이용하여, 상기 단편을 효소적 결합에 의해 연결하였다.
- [0351] 형성된 PCR-생성물/단편내의 상기 BsiW I 자리는 hCaSR ATD 단편의 C-말단 단부 및 T1R2-b 단편의 N-말단 단부에 각각 위치하여서, 키메라성 DNA의 2개 PCR-생성물/단편의 결합을 가능하게 하였다. 상기 BsiW I 자리의 혼입은 hCaSR내의 Glu⁶⁰²/Ile⁶⁰³를 Arg/Thr 잔기로 전환시킨다. 플래티넘 태크 하이 피델리티 폴리머라아제를 사용하는 PCR이 이용되어서, 하기에 제공된 서열번호: 13, 16, 23 및 24의 특이적 프라이머를 사용하여 CSR:T1R2-b 키메라성 cDNA 단편을 포함하는 단편을 증폭하였다. F는 순방향 프라이머를 지칭하고, R은 역방향 프라이머를 지칭한다.
- [0352] 밑줄친 문자는 PCR 생성물의 후속적인 서브클로닝을 위해 프라이머내에 위치한 제한 자리를 나타낸다.
- [0353] hCaSR-ATD 프라이머 F(서열번호: 13):
- [0354] CACCAAGCTTATGGCATTATAGCTGC
- [0355] hCaSR-ATD 프라이머 R(서열번호: 23):
- [0356] ATA TCG TAC GCT TGG CAA TGC AGG AGG T
- [0357] T1R2-단편 프라이머 F(서열번호: 24):
- [0358] ATA TCG TAC GGT CTT CCT GGA ATG GCA T
- [0359] T1R2-단편 프라이머 R(서열번호: 16):
- [0360] ATATGCGGCCGAGTCCCTCCTCATGGT
- [0361] PCR 증폭을 위한 주형은 인간의 CaSR(미국 오리젠 잉크에서 상업적으로 입수가능), 또는 인간의 심상유두 미각 조직으로부터 발생된 cDNA 라이브러리로부터 단리된 인간의 T1R2을 위한 전장 cDNA이었다. PCR 반응 파라미터는 5분동안 94℃, 이어서 45초동안 94℃, 15초동안 54℃ 및 2분동안 72℃로 이루어진 35회 주기, 이어서 10분동안 72℃의 최종 연장 주기이었다.
- [0362] 생성된 핵산 단편을 겔 전기영동에 의해 분리하고, 정제하고, pCR-Topo-II 벡터(인비트로젠)내로 서브클로닝하고, 생성된 클론을 DNA 서열분석에 의해 규명하여, PCR 증폭으로부터 발생한 돌연변이가 없음을 확실하게 하였다.
- [0363] 서열분석 후에, 3 조각 결합에 의해 pcDNA4-T0 벡터(미국 인비트로젠으로부터 구입)를 기본으로 하는 발현 카세트 벡터 구조체내로 삽입물을 서브클로닝하여서, 벡터 구조체내의 CSR::T1R2-b 키메라성 cDNA 단편의 조립을 가능하게 하였다.
- [0364] 형성된 벡터 구조체의 C-말단은 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 당단백질 D 에피토프를 암호화하고, 이는 상기 에피토프에 결합하는 특이적 항체를 이용하는 면역세포화학 연구에 사용될 수 있다. CSR:T1R2-b cDNA를 갖는 생성된 CSR:T1R2-b 벡터 구조체는 서열번호: 20(CSR:T1R2-b), 이어서 서열번호: 6(HSV 에피토프)(아미노 말단에서 C 말단 방향으로)의 연결된 아미노산 서열의 CSR:T1R2-b:HSV 단백질의 발현을 허용한다.
- [0365] 실시예 3a

- [0366] CSR::T1R3-a 벡터 구조체의 제조
- [0367] PCR 생성물 둘다에 공통된 제한 효소 자리에 의해 PCR에서 생성된 2개 DNA 단편을 연결시킴으로써, 즉 hCaSR의 세포외 아미노 말단 도메인(ATD)을 나타내는 PCR 생성물(1-Phe⁵³⁹)을, 시스테인-풍부 도메인(CRD), 막통과 도메인(TMD) 및 Ser⁴⁹⁷에서 시작하는 C-말단을 함유하는 T1R3 단편에 연결시킴으로써 CSR::T1R3-a 키메라성 cDNA 벡터 구조체를 생성시켰다.
- [0368] CSR::T1R3-a 키메라성 cDNA 벡터 구조체의 제조를 용이하게 하기 위하여, 전술된 2개 단편을 제조하는데 이용된 프라이머내에 Sac II 자리를 도입하였다.
- [0369] 형성된 PCR-생성물/단편내의 이들 Sac II 자리는 hCaSR-ATD 단편의 C-말단 단부 및 T1R3-a 단편의 N-말단 단부에 각각 위치하여서, 2개 단편의 결찰을 가능하게 하였다. 상기 Sac II 자리의 혼입은 이전의 hCaSR의 Phe⁵³⁹가 아르기닌 잔기로 전환된 서열을 포함하는 벡터 구조체를 발생시킨다. 당해 기술 분야에 잘 알려진 조건하에서 완충액중 적절한 제한 효소 및 도입된 결찰 자리를 이용하여, 효소적 결찰에 의해 단편을 연결하였다.
- [0370] 플래티넘 태크 하이 피델리티 폴리머라아제를 사용하는 PCR이 이용되어서, 하기에 열거된 서열번호: 17 및 서열번호: 18의 특이적 프라이머를 사용하여 CSR::T1R3-a 키메라성 cDNA 단편을 포함하는 단편을 증폭시켰다. 이후에, T1R3-a의 증폭된 PCR-생성물 및 hCaSR의 증폭된 PCR 생성물(이는 상기 실시예 2에 기재된 바와 같이 형성됨)을 하기에 열거된 프라이머에 표시한 제한 자리에 의해 결찰시켰다. F는 순방향 프라이머를 지칭하고, R은 역방향 프라이머를 지칭한다. 밑줄친 문자는 증폭된 PCR 생성물의 후속적인 결찰 및 서브클로닝을 위해 프라이머내에 위치한 제한 자리를 나타낸다.
- [0371] hCaSR-ATD F 및 hCaSR-ATD R:
- [0372] 상기 실시예 2a에 기재된 서열번호: 13 및 서열번호: 14
- [0373] TAS1R3-a-단편 프라이머 F(서열번호: 17):
- [0374] ATATCCGCGGTCCCGGTGCTCGCGGCAG
- [0375] TAS1R3-a-단편 프라이머 R(서열번호: 18):
- [0376] ATATGCGGCCGCACTCATGTTCCCTGATT
- [0377] PCR 증폭을 위한 주형은 hCaSR(미국 오리젠 잉크에서 구입), 또는 인간의 심상유두 미각 조직으로부터 발생된 cDNA 라이브러리로부터 단리된 hT1R3을 위한 전장 cDNA이었다.
- [0378] PCR 반응 파라미터는 5분동안 94℃, 이어서 45초동안 94℃, 15초동안 54℃ 및 2분동안 72℃로 이루어진 35회 주기, 이어서 10분동안 72℃의 최종 연장 주기이었다.
- [0379] 생성된 핵산 단편(단편을 규명한 후에 결찰을 수행하였다)을 겔 전기영동에 의해 분리하고, 정제하고, pCR-Topo-II 벡터(인비트로젠, 미국)내로 서브클로닝하였다. 생성된 클론을 DNA 서열분석에 의해 규명하여, PCR 증폭으로부터 발생한 돌연변이가 없음을 확실하게 하였다.
- [0380] 서열분석 후에, 3 조각 결찰에 의해 pcDNA4-TO 벡터(미국 인비트로젠으로부터 구입)를 기본으로 하는 발현 카세트 벡터 구조체내로 삽입물을 서브클로닝하여서 CSR::T1R3-a 벡터 구조체를 형성하였다. 형성된 벡터 구조체의 C-말단은 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 당단백질 D 에피토프를 암호화하고, 이는 상기 에피토프에 결합하는 특이적 항체를 이용하는 면역세포화학 연구에 사용될 수 있다. 생성된 벡터 구조체는 서열번호: 4(CSR::T1R3-a), 이어서 서열번호: 6(HSV 에피토프)(아미노 말단에서 C 말단 방향)의 연결된 아미노산 서열의 CSR::T1R3-a::HSV 단백질의 발현을 허용하였다.
- [0381] 실시예 3b
- [0382] CSR::T1R3-b 벡터 구조체의 제조
- [0383] PCR 생성물 둘다에 공통된 제한 효소 자리에 의해 PCR에서 생성된 2개 DNA 단편을 연결시킴으로써, 즉 hCaSR의 세포외 아미노 말단 도메인(ATD) 및 시스테인-풍부 도메인(CRD)을 나타내는 PCR 생성물(1-Ile⁶⁰³)을, 막통과 도메인(TMD) 및 Arg⁵⁶⁰에서 시작하는 C-말단을 함유하는 T1R3 단편을 나타내는 PCR 생성물에 연결시킴으로써

CSR::T1R3-b 키메라성 cDNA 벡터 구조체를 생성시켰다.

- [0384] CSR::T1R3-b 키메라성 cDNA 벡터 구조체의 제조를 용이하게 하기 위하여, 전술된 2개 단편을 제조하는데 이용된 프라이머내에 BsiW I 자리를 도입하였다.
- [0385] 형성된 PCR-생성물/단편내의 상기 BsiW I 자리는 hCaSR-ATD 단편의 C-말단 단부 및 T1R3-b 단편의 N-말단 단부에 각각 위치하여서, 2개 단편의 결합을 가능하게 하였다. 상기 BsiW I 자리의 혼입은 이전의 hCaSR의 Phe⁵³⁹가 아르기닌 잔기로 전환된 서열을 포함하는 벡터 구조체를 발생시킨다. 당해 기술 분야에 잘 알려진 조건하에서 완충액중 적절한 제한 효소 및 도입된 결합 자리를 이용하여, 효소적 결합에 의해 상기 단편을 연결하였다.
- [0386] 플래티넘 태크 하이 피델리티 폴리머라아제를 사용하는 PCR이 이용되어서, 하기에 열거된 서열번호: 25 및 서열번호: 18의 특이적 프라이머를 사용하여 CSR::T1R3-b 키메라성 cDNA 단편을 포함하는 단편을 증폭하였다. 이후에, T1R3-b의 증폭된 PCR-생성물 및 hCaSR의 증폭된 PCR 생성물(이는 상기 실시예 2b에 기재된 바와 같이 형성됨)을 하기에 열거된 프라이머에 표시한 제한 자리에 의해 결합시켰다. F는 순방향 프라이머를 지칭하고, R은 역방향 프라이머를 지칭한다. 밑줄친 문자는 증폭된 PCR 생성물의 후속적인 결합 및 서브클로닝을 위해 프라이머내에 위치한 제한 자리를 나타낸다.
- [0387] hCaSR-ATD F 및 hCaSR-ATD R:
- [0388] 상기 실시예 2b에 기재된 서열번호: 13 및 서열번호: 23
- [0389] TAS1R3-단편 프라이머 F-b(서열번호: 25):
- [0390] ATA TCG TAC GCG GTT CCT GGC ATG GGG C
- [0391] TAS1R3-단편 프라이머 R(서열번호: 18):
- [0392] ATATGCGGCCGCACTCATGTTTCCCCTGATT
- [0393] PCR 증폭을 위한 주형은 hCaSR(미국 오리젠 잉크에서 구입), 또는 인간의 심상유두 미각 조직으로부터 발생된 cDNA 라이브러리로부터 단리된 hT1R3-b를 위한 전장 cDNA이었다. PCR 반응 파라미터는 5분동안 94°C, 이어서 45초동안 94°C, 15초동안 54°C 및 2분동안 72°C로 이루어진 35회 주기, 이어서 10분동안 72°C의 최종 연장 주기이었다.
- [0394] 생성된 핵산 단편(단편을 규명한 후에 결합을 수행하였다)을 겔 전기영동에 의해 분리하고, 정제하고, pCR-Topo-II 벡터(인비트로젠, 미국)내로 서브클로닝하였다. 생성된 클론을 DNA 서열분석에 의해 규명하여, PCR 증폭으로부터 발생한 돌연변이가 없음을 확실하게 하였다.
- [0395] 서열분석 후에, 3 조각 결합에 의해 pcDNA4-TO 벡터(미국 인비트로젠으로부터 구입)를 기본으로 하는 발현 카세트 벡터 구조체내로 삽입물을 서브클로닝하여서, CSR::T1R3-b 벡터 구조체를 형성하였다. 형성된 벡터 구조체의 C-말단은 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 당단백질 D 에피토프를 암호화하고, 이는 상기 에피토프에 결합하는 특이적 항체를 이용하는 면역세포화학 연구에 사용될 수 있다. 생성된 벡터 구조체는 서열번호: 22(CSR::T1R3-b), 이어서 서열번호: 6(HSV 에피토프)(아미노 말단에서 C 말단 방향)의 연결된 아미노산 서열의 CSR::T1R3-b:HSV 단백질의 발현을 허용한다.
- [0396] 실시예 4
- [0397] T1R2, T1R3 벡터 구조체의 제조(비교를 위해 야생형 수용체)
- [0398] T1R2 및 T1R3 벡터 구조체를 형성하기 위해, 인간의 T1R2 및 T1R3을 위한 전체 단백질 암호화 서열을 함유하는 cDNA 단편을 인간 심상 cDNA 라이브러리로부터 단리시키고, 완전히 서열분석하고, 이어서 pCDNA3.1(인비트로젠)내로 서브클로닝하였다.
- [0399] 실시예 5
- [0400] CSR::T1R2/CSR::T1R3 및 T1R2/T1R3 이중 발현의 형질감염
- [0401] 이용된 형질감염 벡터 구조체는 전술된 바와 같이 형성된 실시예 2a와 3a, 또는 2b와 3b 및 4에 기재된 것이었다. hCaSR의 경우, 전장 cDNA를 기본으로 하는 상업적으로 입수가 가능한 pCMV-기본 벡터 구조체를 이용하였다(트루클론 컬렉션(TRUECLONE collection), 오리젠 잉크, 미국).

- [0402] Gα16-구스트듀신 44을 안정하게 발현하는 HEK293T 세포(국제 특허 출원 공개 제 WO2004/055048 호에 기재된 바와 같이 형성됨)는 하기와 같이 CSR::T1R2와 CSR::T1R3 벡터 구조체에 의해, 또는 T1R2와 T1R3에 의해, 또는 hCaSR에 의해 형질감염시켰다.
- [0403] 0일째, HEK293T/Gα16-구스트듀신 44 세포를 웰 당 8500 세포 밀도로 96-웰 흑색의 투명한 바닥을 갖는 플레이트에 평판배양하고, 선택적인 성장 배지에서 밤새 성장시켰다. 1일째, 배지를 항생제-부재 및 혈청-부재 성장 배지로 바꾸고, CSR:T1R2(-a 또는 -b) 및 CSR:T1R3(-a 또는 -b) 각각 75ng(총 150ng), T1R2와 T1R3(총 150ng), 또는 hCaSR 벡터 구조체 DNA 75ng 및 리포펙타민 2000(인비트로젠) 0.3μl를 사용하여 세포를 형질감염시켰다.
- [0404] hCaSR 벡터는 칼슘에 대해 감응성이고 키메라를 위한 VFT가 유도된 수용체의 VFT에 칼슘 결합 자리가 놓이기 때문에, 칼슘에 감응성인 GPCR을 위한 양성 대조군으로 hCaSR 벡터를 이용하였다.
- [0405] CSR:T1R2/CSR:T1R3(CSR:T1R2-a/CSR:T1R3-a 또는 CSR:T1R2-b/CSR:T1R3-b) 또는 T1R2/T1R3 헤테로이량체의 형질 감염을 위해, 각 쌍이 총 150ng이 되도록 각각의 벡터 구조체 75ng을 합하고, 리포펙타민 2000 0.3μl를 함께 사용하였다. hCaSR 벡터 DNA 75ng을 상기 칼슘-감응성 단량체 GPCR을 위해 이용하였다.
- [0406] 전술된 리포펙타민/DNA 혼합물을 3 내지 4시간 동안 세포상에서 배양하고, 이어서 항생제-부재, 혈청-함유의 성장 배지로 교체하였다. 세포를 밤새 성장시키고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 Fluo-4 칼슘 분석을 실시하였다.
- [0407] 실시예 1에 기재된 바와 같이 형광 이미징 플레이트 판독기(FLIPR-테트라, 몰레큘러 디바이시스)를 이용하여 전술한 벡터 구조체중 하나에 의해 일시적으로 형질감염된 세포를 확인하였다.
- [0408] 실시예 5.2
- [0409] CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체를 발현하는 안정한 세포주의 제조
- [0410] 테트라사이클린-조절된 CSR::T1R2-a의 존재하에 CSR::T1R3-a이 구성적으로 과발현되어 두 단백질의 구성적 과발현의 가능한 세포독성 효과를 방지하는 안정한 세포주를 생성시켰다. 헤테로이량체중 하나의 서브유닛(CSR::T1R2-a)를 암호화하는 DNA를 테트라사이클린-조절된 벡터 중에 배치하여서, 안정한 클론 주의 생존력 및 기능이 최적화될 수 있도록 그의 발현 수준을 조절하였다.
- [0411] 인간의 CSR::T1R2-a를 함유하는 선형화된 pcDNA4-TO 벡터(인비트로젠)를, 국제 특허 출원 공개 제 WO2004/055048 호에 기재된 바와 같이 제조된 Gα16구스트44 발현 세포주내에 먼저 형질감염시킴으로써 키메라성 인간 CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체를 안정하게 발현하는 인간 세포주를 발생시켰다. Gα16구스트44를 발현하는 세포주는 미각 수용체의 증진된 결합력을 나타내고, 테트라사이클린 유도성이며, Gα16구스트44 혼입된 G-단백질을 안정하게 발현하고, HEK-293-T-Rex 세포주(미국 인비트로젠으로부터 상업적으로 입수가능함)를 기반으로 한다. CSR:T1R2-a을 발현하는 클론 세포주를 확인하고, 인간 CSR::T1R3-a cDNA를 함유하는 선형화된 pcDNA3.1-하이그로(Hygro) 벡터(인비트로젠)에 의해 형질감염시켜서, CSR::T1R2-a 및 CSR::T1R3-a 둘다를 발현하는 2배 안정한 클론 세포주를 수득하였다.
- [0412] 선형화된 CSR:T1R2-a/pcDNA4TO 구조체 4μg 및 리포펙타민 2000(인비트로젠) 0.3μl에 의한 형질감염 24시간 후에, 37°C에서 10% FBS, 블라스티시딘 0.005mg/ml, G418 0.36mg/ml 및 제오신 0.2mg/ml이 보충된 DMEM(인비트로젠)을 함유하는 선택적인 배지에서 1:150,000 이하의 10배 희석하에 세포를 재-평판배양하였다. 2 내지 3주 후에, 내제오신성 콜로니를 개별 증량시키고, 테트라사이클린 10μg/ml에 의한 4시간 유도후에 50 μM 페릴라틴에 대한 기능성 반응에 근거하여 안정한 클론을 선택하여서 CSR::T1R2-a cDNA를 발현시켰다. CSR::T1R2-a cDNA의 최소 기본 발현을 나타내는 개별 클론(# 17)을 확인하고, 이를 CSR:T1R3-a 구조체에 대한 수용물로 이용하여서 헤테로이량체성 수용체 착체를 위한 안정한 세포주를 발생시켰다. 유도성 CSR::T1R2-a를 함유하는 클론 17을, 선형화된 CSR::T1R3-a/pcDNA3.1-하이그로 벡터 구조체 DNA 4μg 및 리포펙타민 2000(인비트로젠) 0.3μl에 의해 형질감염시켰다. 리포펙타민/DNA 혼합물을 3 내지 4시간동안 세포상에서 배양시키고, 이어서 항생제-부재 및 혈청-함유의 성장 배지로 교체하였다. 24시간후에, 37°C에서 10% FBS, 블라스티시딘 0.005mg/ml, G418 0.36mg/ml, 제오신 0.2mg/ml 및 하이그로마이신 0.2mg/ml이 보충된 DMEM을 함유하는 선택적인 배지에서 세포를 재-평판배양하였다.
- [0413] 내성 콜로니를 증량시켜서, 페릴라틴(CSR::T1R2-a의 결합/활성화에 의함) 및 소듐 사이클라메이트(CSR:T1R3-a의 결합/활성화에 의함) 둘다에 대한 반응에 근거하여 CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체를 함유하는 것으

로 확인되었으며, 이는 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 FLIPR-테트라 계측기(몰레큘러 디바이시스) 상에서 자동화된 형광계 이미징에 의해 확인하였다. (CSR::T1R2-a의 과발현을 유도하는) 테트라사이클린 10 μ g/ml에 의한 유도후에 감미 자극물질에 대한 기능성 반응에 대하여 모든 잠재성 클론을 평가하였다. 테트라사이클린 유도없이 잠재성 클론을 시험하여서, 기본적으로는 낮은 수준의 T1R2-a를 발현하지만 CSR::T1R3-a와 조립되어 기능성 헤테로이량체 착체를 생성시키기에는 충분한 CSR::T1R2-a 수용체 발현을 갖는 임의의 클론을 확인하였다 (테트라사이클린-조절된 시스템, 예컨대 T-Rex HEK-293(인비트로젠)은 시스템의 고유 누설로 인해 형질전환 유전자의 기본 발현이 낮은 수준인 것으로 공지되어 있다). 유도가능한 기능성 CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체를 발현하는 안정적인 클론을 50 μ M 페릴라틴 및 5mM(밀리몰) 소듐 사이클라메이트 둘다에 대한 반응에 근거하여 확인하였다. 다수의 감미 자극물질에 대해 가장 큰 테트라사이클린-유도성 반응을 나타내는 하나의 클론 세포주를 증식시키고, 후속적인 비교를 위해 이용하였다. 다양한 리간드/감미 자극물질을 사용한 시험의 결과가 하기 표 1에 기재되어 있다.

표 1

리간드	리간드 농도	CSR::T1R2-a / CSR::T1R3-a		T1R2/T1R3		G16구스트44 (음성 대조군)	
		AVG (dF/F)	S.D. (dF/F)	AVG (dF/F)	S.D. (dF/F)	AVG (dF/F)	S.D. (dF/F)
p-ETBZ	100 μ M	1.11	0.05	1.029	0.1	0.16	0.01
NDHC	1mM	1.64	0.23	1.71	0.05	0.23	0.01
NarDHC	1mM	1.43	0.23	1.40	0.15	0.22	0.07
사이클라메이트	5mM	1.28	0.063	1.60	0.08	0.17	0.06

상기 표는 하기 수학적 식 3을 이용하여 자극후 기준선위의 표준화된 형광 증가를 나타낸다:

수학적 식 3

$$\Delta F/F = (F-F_0)/F_0$$

상기 식에서,

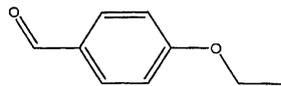
F는 피크 형광 신호이고,

F₀는 기준 형광 신호이며, 리간드 첨가 이전에 측정된 형광 신호 평균치로부터 측정한다.

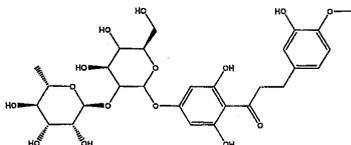
수득된 $\Delta F/F$ 값은 형질감염된 수용체와의 직접 또는 간접 상호작용에 대해 반응한 세포의 칼슘 증가("신호")에 해당한다(3회 반복(replicate) 실험의 평균치(AVG) 및 표준 편차(S.D.)가 제공되어 있다).

리간드의 화학 구조식을 하기에 나타내었다:

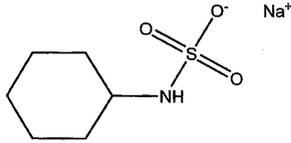
p-ETBZ = p-에톡시벤즈알데하이드



NDHC



[0426] 소듐 사이클라메이트



[0427]

[0428] (사이클라메이트는 감미 자극물질이다. 나트륨 이온의 부가적인 존재는 수 용해도를 증가시키지만, 단 맛에는 더 이상 기여하지 않는다.)

[0429] 실시예 6a

[0430] CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a의 활성화

[0431] 다양한 리간드에 의한 자극후의 세포내 칼슘 반응을, Gα16-구스트듀신 44을 안정하게 발현하며 CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 키메라성 헤테로이량체에 의해 형질감염된 HEK293T 세포에서 측정하였다. 그 결과를 (야생형 T1R2/T1R3 감미 헤테로이량체를 형성하기 위해) 실시예 4에 기재된 T1R2 벡터 구조체 및 T1R3 벡터 구조체 둘다, 또는 (단량체성 hCaSR을 형성하기 위해) 실시예 5에 기재된 hCaSR 벡터 구조체에 의해 형질감염된 세포에서 취득된 결과와 비교하였다.

[0432] 형질감염은 실시예 4에 기재된 바와 같이 실시하였다. 결과를 실시예 1에 기재된 바와 같이 계산하였다(데이터는 자극후 기준선을 넘는 순 형광 증가(상대 형광 단위 또는 RFU)를 나타내고; 6회 반복 실험의 평균치(AVG) 및 ±표준 편차(STD)가 제공되어 있다). 하기 리간드는 형질감염된 세포를 자극하기 위하여 괄호안에 표시된 농도로 사용되었다: 염화칼슘(2mM), 슈크라로즈(0.5mM), 아스파탐(0.85mM), 페릴라틴(50 μM), 신나모니트릴(100 μM), 사이클라메이트(1mM), 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC)(0.33mM).

[0433] 취득된 신호는 형질감염된 수용체와의 직접 또는 간접 상호작용에 대해 반응한 세포의 칼슘 증가에 해당하는 RFU 단위의 형광("신호")이다.

[0434] 감미 수용체를 발현시키지 않는 구조체없이 형질감염된 형질감염을 가장한 HEK293T/Gα16-구스트듀신 44 세포를 음성 대조군으로 이용하여, 배경에만 해당하는 신호를 측정하였다.

[0435] 형질감염된 세포를 기재된 감미제, 및 칼슘-감응성 도메인을 함유하는 단백질을 위한 양성 대조군(칼슘), 및 음성 대조군(C1 완충액)에 노출시켰다.

[0436] 그 결과를 하기 표에 기재하였다.

[0437] AVG 칸은 형광 평균치를 제공하고, STD 칸은 표준 편차를 제공한다. 하기 표는 시험된 다양한 벡터 구조체 각각에 대한 6회 반복의 RFU ±STD의 변화 평균치를 나타낸다.

표 2

[0438] 결과

	CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a		hCaSR		T1R2/T1R3		음성 대조군(가장 형질감염)	
	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
양성대조군(칼슘)	3912	295	7610	1776	1361	426	1570	509
아스파탐	72	78	41	97	531	154	-125	116
슈크라로즈	-75	130	22	92	601	173	-186	36
페릴라틴	2400	466	73	354	1840	333	-379	327
신나모니트릴	1501	194	197	33	632	484	-998	36
사이클라메이트	370	213	196	79	341	132	-324	297
NDHC	631	233	-257	53	331	129	-524	44
음성 대조군 (C1 완충액)	-115	70	57	101	-63	131	-217	204

- [0439] 음성 대조군/가장 형질감염은 배경 신호에 해당하는 신호 수준을 보여준다.
- [0440] 양성 대조군(칼슘)이 보여주는 바와 같이, 칼슘-감응성 도메인을 갖는 모든 형질감염된 세포는 칼슘에 반응한다(CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체 및 hCaSR).
- [0441] 칼슘에 대한 키메라성 헤테로이량체의 반응은 감미 헤테로이량체를 사용하여 획득된 반응과 비교될 수 없다. 칼슘은 T1R2/T1R3 감미 헤테로이량체의 작용제가 아니기 때문에, 칼슘은 Gα16-구스트듀신 44 g-단백질만을 발현하는 형질감염을 가장한 세포보다 큰 신호를 주지 않았다.
- [0442] 아스파탐 및 슈크라로즈의 경우, T1R2/T1R3 헤테로이량체 만으로 형질감염된 세포에서 신호가 검출되었다. 슈크라로즈 및 아스파탐은 CSR::T1R 키메라에 존재하지 않는 T1R2의 VFT에 결합되는 것으로 보이며, 이는 CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체에서 신호가 없는 이유가 된다.
- [0443] hCaSR은 염화칼슘에만 반응하고, 시험된 임의의 감미 자극물질에 의해 활성화될 수 없었다.
- [0444] 염화칼슘, 페릴라틴, 신나모니트릴, 사이클라메이트 및 NDHC의 경우, CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 키메라성 헤테로이량체를 발현하는 세포에서 유의한 신호 증가가 관찰되었다.
- [0445] 페릴라틴, 신나모니트릴, 사이클라메이트 및 NDHC의 경우, 이들 신호는 T1R2/T1R3 헤테로이량체에 대해 검출된 신호에 유사한 세기를 가졌다.
- [0446] 키메라성 CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a 헤테로이량체에 의해 형질감염된 세포에서 검출된 상기 신호는 T1R2/T1R3 헤테로이량체에서의 신호 및 음성 대조군(형질감염을 가장한 HEK293T/Gα16-구스트듀신 44 세포)에서 획득된 배경 신호 둘다보다 유의하게 높았고, hCaSR 수용체에 의해 형질감염된 세포에서 획득된 신호값의 약 50%이었다.
- [0447] 상기 결과는 CSR::T1R2-a/CSR::T1R3-a이 칼슘, 페릴라틴, 사이클라메이트, 신나모니트릴 및 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC)에 의해 활성화되지만, 슈크라로즈 또는 아스파탐에 의해서는 활성화되지 않음을 증명한다.
- [0448] 실시예 6b
- [0449] CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b의 활성화
- [0450] 다양한 리간드에 의한 자극후 세포내 칼슘 반응을, Gα16-구스트듀신 44을 안정하게 발현하며 CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b 키메라성 헤테로이량체에 의해 형질감염된 HEK293T 세포에서 측정하였다. 그 결과를 (T1R2/T1R3 감미 헤테로이량체를 형성하기 위한) 실시예 4에 기재된 T1R2 벡터 구조체 및 T1R3 벡터 구조체 둘다, 또는 (단량체성 hCaSR을 형성하기 위한) 실시예 5에 기재된 hCaSR 벡터 구조체에 의해 형질감염된 세포에서 획득된 결과와 비교하였다.
- [0451] 형질감염은 실시예 4에 기재된 바와 같이 실시하였다. 결과를 실시예 1에 기재된 바와 같이 계산하였다(데이터는 자극후 기준선을 넘는 표준화된 형광 증가(ΔF/F)를 나타내고; 6회 반복 실험의 평균치(AVG) 및 ±표준 편차(STD)가 제공되어 있다). 염화칼슘(2mM), 슈크라로즈(0.5mM), 페릴라틴(50 μM)을 시험 리간드로 사용하였다.
- [0452] 획득된 칼슘 이동(calcium mobilization) 신호는 기준 형광(F₀)에 대해 표준화된 피크 형광(F)의 증가이다. 데이터는 하기 수학적 식 3을 이용하여 표준화하였다:
- [0453] 수학적 식 3
- [0454]
$$\Delta F/F = (F-F_0)/F_0$$
- [0455] 상기 식에서,
- [0456] F는 피크 형광 신호이고,
- [0457] F₀는 기준 형광 신호이며, 리간드 첨가 이전에 측정된 형광 신호 평균치로부터 측정한다.
- [0458] 획득된 ΔF/F 값은 형질감염된 수용체와의 직접 또는 간접 상호작용에 대해 반응한 세포의 칼슘 증가("신호")에 해당한다.
- [0459] 감미 수용체를 발현시키지 않는 구조체 없이 형질감염을 가장한 HEK293T/Gα16-구스트듀신 44 세포를 음성 대조군으로 이용하여, 배경에만 해당하는 신호를 측정하였다.

[0460] 형질감염된 세포를 기재된 바와 같은 감미제, 및 칼슘-감응성 도메인을 함유하는 단백질을 위한 양성 대조군(칼슘), 및 음성 대조군(C1 완충액)에 노출시켰다.

[0461] 그 결과를 하기 표에 기재하였다.

[0462] AVG 칸은 ΔF/F 평균치를 제공하고, STD 칸은 표준 편차를 제공한다. 하기 표는 시험된 다양한 벡터 구조체 각각에 대한 6회 반복의 ΔF/F ± STD의 변화 평균치를 나타낸다.

표 3

[0463] 결과

	CSR::T1R2-b/ CSR::T1R3-b		CSR::R2-b 단독		T1R2/T1R3		음성 대조군 (가장 형질감염)	
	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD	AVG	STD
양성 대조군 (칼슘)	0.46	0.11	0.424	0.02	0.19	0.001	0.20	0.01
슈크라로즈	0.017	0.006	0.016	0.001	0.12	0.006	0.03	0.00
페릴라틴	0.169	0.04	0.11	0.02	0.5	0.02	0.06	0.02
음성 대조군 (C1 완충액)	0.017	0.001	0.036	0.008	0.03	0.01	0.03	0.002

[0464] 음성 대조군/가장 형질감염은 배경 신호에 대응하는 신호 수준을 보여준다.

[0465] 양성 대조군(칼슘)이 보여주는 바와 같이, 칼슘-감응성 도메인을 갖는 모든 형질감염된 세포는 칼슘에 반응한다(CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b 헤테로이량체 및 hCaSR).

[0466] 칼슘에 대한 키메라성 헤테로이량체의 반응은 감미 헤테로이량체를 사용하여 획득된 반응과 비교될 수 없다. 칼슘은 T1R2/T1R3 감미 헤테로이량체의 작용제가 아니기 때문에, 칼슘은 Gα16-구스트듀신 44 g-단백질만을 발현하는 형질감염을 가장한 세포보다 큰 신호를 주지 않았다.

[0467] 슈크라로즈의 경우, T1R2/T1R3 헤테로이량체(야생형) 만으로 형질감염된 세포에서 신호가 검출되었다. 슈크라로즈는 CSR::T1R 키메라에 존재하지 않는 T1R2의 VFT에 결합되는 것으로 보이며, 이는 CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b 헤테로이량체에서 신호가 없는 이유가 된다.

[0468] hCaSR은 염화칼슘에만 반응하고, 시험된 임의의 감미 자극물질에 의해 활성화될 수 없었다.

[0469] 염화칼슘, 페릴라틴의 경우, 임의의 T1R3 구조체 또는 그의 변이체의 부재하에 발현되는 CSR::T1R2-b 단일체 뿐만 아니라 CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b 키메라성 헤테로이량체를 발현하는 세포에서 유의한 신호 증가가 관찰되었다.

[0470] 키메라성 CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b 헤테로이량체에 의해 형질감염된 세포에서 검출된 상기 신호는 음성 대조군(형질감염을 가장한 HEK293T/Gα16-구스트듀신 44 세포)에서 획득된 배경 신호보다 유의하게 높았다.

[0471] 상기 결과는 CSR::T1R2-b/CSR::T1R3-b이 칼슘 및 페릴라틴에 의해 활성화되지만 슈크라로즈에 의해서는 활성화되지 않음을 증명한다.

[0472] 수용체, 핵산, 폴리펩타이드, 방법 및 키트가 특정의 예시적인 실시양태와 결부하여 상기에 기재되어 있지만, 다른 유사한 실시양태가 사용될 수 있고, 동일한 기능을 수행하기 위해 기재된 실시양태에 변경 및 부가가 이루어질 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 추가적으로, 다양한 실시양태가 목적하는 성질을 제공하도록 조합될 수 있으므로 기재된 모든 실시양태가 반드시 택일적인 필요는 없다. 당해 기술 분야의 통상의 기술을 가진 자들은 본 기재의 진의 및 범위로 부터 벗어남이 없이 여러 변경을 실시할 수 있다. 그러므로, 수용체, 핵산, 폴리펩타이드, 방법 및 키트는 어떤 하나의 실시양태로 한정되어서는 안되며, 첨부된 청구의 범위의 기재에 따라 폭과 범위가 해석되어야 한다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Givaudan SA
Slack, Jay

<120> Nucleic acid, polypeptide and its use

<130> 30240/PCT

<150> US

<151> 2006-06-19

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2661

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> fusion product of human DNA sequence fragments

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2661)

<400> 1

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 cgg cgg tcc atg tgt tcc aag			1632
Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Arg Ser Met Cys Ser Lys			
530	535	540	
agg tgc cag tca ggg caa aag aag aag cct gtg ggc atc cac gtc tgc			1680
Arg Cys Gln Ser Gly Gln Lys Lys Lys Pro Val Gly Ile His Val Cys			
545	550	555	560
tgc ttc gag tgc atc gac tgc ctt ccc ggc acc ttc ctc aac cac act			1728
Cys Phe Glu Cys Ile Asp Cys Leu Pro Gly Thr Phe Leu Asn His Thr			
565	570	575	
gaa gat gaa tat gaa tgc cag gcc tgc ccg aat aac gag tgg tcc tac			1776
Glu Asp Glu Tyr Glu Cys Gln Ala Cys Pro Asn Asn Glu Trp Ser Tyr			

580	585	590	
cag agt gag acc tcc tgc ttc aag cgg cag ctg gtc ttc ctg gaa tgg			1824
Gln Ser Glu Thr Ser Cys Phe Lys Arg Gln Leu Val Phe Leu Glu Trp			
595	600	605	
cat gag gca ccc acc atc gct gtg gcc ctg ctg gcc gcc ctg ggc ttc			1872
His Glu Ala Pro Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly Phe			
610	615	620	
ctc agc acc ctg gcc atc ctg gtg ata ttc tgg agg cac ttc cag aca			1920
Leu Ser Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln Thr			
625	630	635	640
ccc ata gtt cgc tcg gct ggg gcc ccc atg tgc ttc ctg atg ctg aca			1968
Pro Ile Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu Thr			
645	650	655	
ctg ctg ctg gtg gca tac atg gtg gtc ccg gtg tac gtg ggg ccg ccc			2016
Leu Leu Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro Pro			
660	665	670	
aag gtc tcc acc tgc ctc tgc cgc cag gcc ctc ttt ccc ctc tgc ttc			2064
Lys Val Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys Phe			
675	680	685	
aca atc tgc atc tcc tgt atc gcc gtg cgt tct ttc cag atc gtc tgc			2112
Thr Ile Cys Ile Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser Phe Gln Ile Val Cys			
690	695	700	
gcc ttc aag atg gcc agc cgc ttc cca cgc gcc tac agc tac tgg gtc			2160
Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp Val			
705	710	715	720
cgc tac cag ggg ccc tac gtc tct atg gca ttt atc acg gta ctc aaa			2208
Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu Lys			
725	730	735	
atg gtc att gtg gta att ggc atg ctg gcc acg ggc ctc agt ccc acc			2256
Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro Thr			
740	745	750	
acc cgt act gac ccc gat gac ccc aag atc aca att gtc tcc tgt aac			2304
Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys Asn			

755	760	765	
ccc aac tac cgc aac agc ctg ctg ttc aac acc agc ctg gac ctg ctg			2352
Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu Leu			
770	775	780	
ctc tca gtg gtg ggt ttc agc ttc gcc tac atg ggc aaa gag ctg ccc			2400
Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu Pro			
785	790	795	800
acc aac tac aac gag gcc aag ttc atc acc ctc agc atg acc ttc tat			2448
Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe Tyr			
805	810	815	
ttc acc tca tct gtc tcc ctc tgc acc ttc atg tct gcc tac agc ggg			2496
Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser Gly			
820	825	830	
gtg ctg gtc acc atc gtg gac ctc ttg gtc act gtg ctc aac ctc ctg			2544
Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu Leu			
835	840	845	
gcc atc agc ctg ggc tac ttc ggc ccc aag tgc tac atg atc ctc ttc			2592
Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu Phe			
850	855	860	
tac ccg gag cgc aac acg ccc gcc tac ttc aac agc atg atc cag ggc			2640
Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln Gly			
865	870	875	880
tac acc atg agg agg gac tga			2661
Tyr Thr Met Arg Arg Asp			
885			
<210> 2			
<211> 886			
<212> PRT			
<213> artificial			
<220>			
<223> Synthetic Construct			
<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 Arg Ser Met Cys Ser Lys
530 535 540

Arg Cys Gln Ser Gly Gln Lys Lys Lys Pro Val Gly Ile His Val Cys
545 550 555 560

Cys Phe Glu Cys Ile Asp Cys Leu Pro Gly Thr Phe Leu Asn His Thr
565 570 575

Glu Asp Glu Tyr Glu Cys Gln Ala Cys Pro Asn Asn Glu Trp Ser Tyr
 580 585 590

Gln Ser Glu Thr Ser Cys Phe Lys Arg Gln Leu Val Phe Leu Glu Trp
 595 600 605

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

Leu Ser Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln Thr
 625 630 635 640

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

Leu Leu Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro Pro
 660 665 670

Lys Val Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys Phe
 675 680 685

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

Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp Val
 705 710 715 720

Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu Lys
 725 730 735

Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro Thr
 740 745 750

Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys Asn
 755 760 765

Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu Leu
 770 775 780

Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu Pro
 785 790 795 800

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

Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser Gly
 820 825 830

Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu Leu
 835 840 845

Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu Phe
 850 855 860

Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln Gly
 865 870 875 880

Tyr Thr Met Arg Arg Asp
 885

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

<220>
 <223> fusion product of human DNA sequence fragments

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

<400> 3
 atg gca ttt tat agc tgc tgc tgg gtc ctc ttg gca ctc acc tgg cac 48

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 ccg cgg tcc cgg tgc tcg cgg			1632
Leu Trp Ser Gly Phe Ser Arg Glu Val Pro Arg Ser Arg Cys Ser Arg			

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

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

885

890

895

<210> 4
 <211> 895
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<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 Arg Ser Arg Cys Ser Arg
 530 535 540

Gln Cys Gln Glu Gly Gln Val Arg Arg Val Lys Gly Phe His Ser Cys
 545 550 555 560

Cys Tyr Asp Cys Val Asp Cys Glu Ala Gly Ser Tyr Arg Gln Asn Pro
 565 570 575

Asp Asp Ile Ala Cys Thr Phe Cys Gly Gln Asp Glu Trp Ser Pro Glu
 580 585 590

Arg Ser Thr Arg Cys Phe Arg Arg Arg Ser Arg Phe Leu Ala Trp Gly
 595 600 605

Glu Pro Ala Val Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Ala Leu Gly
 610 615 620

Leu Val Leu Ala Ala Leu Gly Leu Phe Val His His Arg Asp Ser Pro
 625 630 635 640

Leu Val Gln Ala Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Phe Gly Leu Val Cys
 645 650 655

Leu Gly Leu Val Cys Leu Ser Val Leu Leu Phe Pro Gly Gln Pro Ser
 660 665 670

Pro Ala Arg Cys Leu Ala Gln Gln Pro Leu Ser His Leu Pro Leu Thr
 675 680 685

Gly Cys Leu Ser Thr Leu Phe Leu Gln Ala Ala Glu Ile Phe Val Glu
 690 695 700

Ser Glu Leu Pro Leu Ser Trp Ala Asp Arg Leu Ser Gly Cys Leu Arg
 705 710 715 720

Gly Pro Trp Ala Trp Leu Val Val Leu Leu Ala Met Leu Val Glu Val
 725 730 735

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 5
- <211> 45
- <212> DNA
- <213> herpes simplex virus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(45)

<400> 5
 tgc ggc cgc cag cct gaa ctc gct cct gaa gac ccg gaa gat taa 45
 Cys Gly Arg Gln Pro Glu Leu Ala Pro Glu Asp Pro Glu Asp
 1 5 10

<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> 2520
 <212> DNA
 <213> human

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2520)

<400> 7
 atg ggg ccc agg gca aag acc atc tcc tcc ctg ttc ttc ctc cta tgg 48
 Met Gly Pro Arg Ala Lys Thr Ile Ser Ser Leu Phe Phe Leu Leu Trp
 1 5 10 15

gtc ctg gct gag ccg gct gag aac tcg gac ttc tac ctg cct ggg gat 96
 Val Leu Ala Glu Pro Ala Glu Asn Ser Asp Phe Tyr Leu Pro Gly Asp
 20 25 30

tac ctc ctg ggt ggc ctc ttc tcc ctc cat gcc aac atg aag ggc att 144
 Tyr Leu Leu Gly Gly Leu Phe Ser Leu His Ala Asn Met Lys Gly Ile
 35 40 45

gtt cac ctt aac ttc ctg cag gtg ccc atg tgc aag gag tat gaa gtg 192
 Val His Leu Asn Phe Leu Gln Val Pro Met Cys Lys Glu Tyr Glu Val
 50 55 60

aag gtg ata ggc tac aac ctc atg cag gcc atg cgc ttt gcg gtg gag 240
 Lys Val Ile Gly Tyr Asn Leu Met Gln Ala Met Arg Phe Ala Val Glu
 65 70 75 80

gag atc aac aat gac agc agc ctg ctg cct ggt gtg ctg ctg ggc tat 288
 Glu Ile Asn Asn Asp Ser Ser Leu Leu Pro Gly Val Leu Leu Gly Tyr
 85 90 95

gag atc gtg gat gtg tgc tac atc tcc aac aat gtc cag ccg gtg ctc 336
 Glu Ile Val Asp Val Cys Tyr Ile Ser Asn Asn Val Gln Pro Val Leu
 100 105 110

tac ttc ctg gca cac gag gac aac ctc ctt ccc atc caa gag gac tac 384
 Tyr Phe Leu Ala His Glu Asp Asn Leu Leu Pro Ile Gln Glu Asp Tyr
 115 120 125

agt aac tac att tcc cgt gtg gtg gct gtc att ggc cct gac aac tcc 432
 Ser Asn Tyr Ile Ser Arg Val Val Ala Val Ile Gly Pro Asp Asn Ser
 130 135 140

gag tct gtc atg act gtg gcc aac ttc ctc tcc cta ttt ctc ctt cca 480
 Glu Ser Val Met Thr Val Ala Asn Phe Leu Ser Leu Phe Leu Leu Pro
 145 150 155 160

cag atc acc tac agc gcc atc agc gat gag ctg cga gac aag gtg cgc 528
 Gln Ile Thr Tyr Ser Ala Ile Ser Asp Glu Leu Arg Asp Lys Val Arg
 165 170 175

ttc ccg gct ttg ctg cgt acc aca ccc agc gcc gac cac cac atc gag 576
 Phe Pro Ala Leu Leu Arg Thr Thr Pro Ser Ala Asp His His Ile Glu
 180 185 190

gcc atg gtg cag ctg atg ctg cac ttc cgc tgg aac tgg atc att gtg 624
 Ala Met Val Gln Leu Met Leu His Phe Arg Trp Asn Trp Ile Ile Val
 195 200 205

ctg gtg agc agc gac acc tat ggc cgc gac aat ggc cag ctg ctt ggc 672
 Leu Val Ser Ser Asp Thr Tyr Gly Arg Asp Asn Gly Gln Leu Leu Gly
 210 215 220

agc ctc ctc ggc tgt gac aaa agc acc tgc acc aag agg gtg gtc tac 1248
 Ser Leu Leu Gly Cys Asp Lys Ser Thr Cys Thr Lys Arg Val Val Tyr
 405 410 415

ccc tgg cag ctg ctt gag gag atc tgg aag gtc aac ttc act ctc ctg 1296
 Pro Trp Gln Leu Leu Glu Glu Ile Trp Lys Val Asn Phe Thr Leu Leu
 420 425 430

gac cac caa atc ttc ttc gac ccg caa ggg gac gtg gct ctg cac ttg 1344
 Asp His Gln Ile Phe Phe Asp Pro Gln Gly Asp Val Ala Leu His Leu
 435 440 445

gag att gtc cag tgg caa tgg gac cgg agc cag aat ccc ttc cag agc 1392
 Glu Ile Val Gln Trp Gln Trp Asp Arg Ser Gln Asn Pro Phe Gln Ser
 450 455 460

gtc gcc tcc tac tac ccc ctg cag cga cag ctg aag aac atc caa gac 1440
 Val Ala Ser Tyr Tyr Pro Leu Gln Arg Gln Leu Lys Asn Ile Gln Asp
 465 470 475 480

atc tcc tgg cac acc atc aac aac acg atc cct atg tcc atg tgt tcc 1488
 Ile Ser Trp His Thr Ile Asn Asn Thr Ile Pro Met Ser Met Cys Ser
 485 490 495

aag agg tgc cag tca ggg caa aag aag aag cct gtg ggc atc cac gtc 1536
 Lys Arg Cys Gln Ser Gly Gln Lys Lys Lys Pro Val Gly Ile His Val
 500 505 510

tgc tgc ttc gag tgc atc gac tgc ctt ccc ggc acc ttc ctc aac cac 1584
 Cys Cys Phe Glu Cys Ile Asp Cys Leu Pro Gly Thr Phe Leu Asn His
 515 520 525

act gaa gat gaa tat gaa tgc cag gcc tgc ccg aat aac gag tgg tcc 1632
 Thr Glu Asp Glu Tyr Glu Cys Gln Ala Cys Pro Asn Asn Glu Trp Ser
 530 535 540

tac cag agt gag acc tcc tgc ttc aag cgg cag ctg gtc ttc ctg gaa 1680
 Tyr Gln Ser Glu Thr Ser Cys Phe Lys Arg Gln Leu Val Phe Leu Glu
 545 550 555 560

tgg cat gag gca ccc acc atc gct gtg gcc ctg ctg gcc gcc ctg ggc 1728
 Trp His Glu Ala Pro Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly
 565 570 575

ttc ctc agc acc ctg gcc atc ctg gtg ata ttc tgg agg cac ttc cag 1776
 Phe Leu Ser Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln
 580 585 590

aca ccc ata gtt cgc tgc gct ggg ggc ccc atg tgc ttc ctg atg ctg 1824
 Thr Pro Ile Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu
 595 600 605

aca ctg ctg ctg gtg gca tac atg gtg gtc ccg gtg tac gtg ggg ccg 1872
 Thr Leu Leu Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro
 610 615 620

ccc aag gtc tcc acc tgc ctc tgc cgc cag gcc ctc ttt ccc ctc tgc 1920
 Pro Lys Val Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys
 625 630 635 640

ttc aca atc tgc atc tcc tgt atc gcc gtg cgt tct ttc cag atc gtc 1968
 Phe Thr Ile Cys Ile Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser Phe Gln Ile Val
 645 650 655

tgc gcc ttc aag atg gcc agc cgc ttc cca cgc gcc tac agc tac tgg 2016
 Cys Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp
 660 665 670

gtc cgc tac cag ggg ccc tac gtc tct atg gca ttt atc acg gta ctc 2064
 Val Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu
 675 680 685

aaa atg gtc att gtg gta att ggc atg ctg gcc acg ggc ctc agt ccc 2112
 Lys Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro
 690 695 700

acc acc cgt act gac ccc gat gac ccc aag atc aca att gtc tcc tgt 2160
 Thr Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys
 705 710 715 720

aac ccc aac tac cgc aac agc ctg ctg ttc aac acc agc ctg gac ctg 2208
 Asn Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu
 725 730 735

ctg ctc tca gtg gtg ggt ttc agc ttc gcc tac atg ggc aaa gag ctg 2256
 Leu Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu
 740 745 750

ccc acc aac tac aac gag gcc aag ttc atc acc ctc agc atg acc ttc 2304
 Pro Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe
 755 760 765

tat ttc acc tca tct gtc tcc ctc tgc acc ttc atg tct gcc tac agc 2352
 Tyr Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser
 770 775 780

ggg gtg ctg gtc acc atc gtg gac ctc ttg gtc act gtg ctc aac ctc 2400
 Gly Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu
 785 790 795 800

ctg gcc atc agc ctg ggc tac ttc ggc ccc aag tgc tac atg atc ctc 2448
 Leu Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu
 805 810 815

ttc tac ccg gag cgc aac acg ccc gcc tac ttc aac agc atg atc cag 2496
 Phe Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln
 820 825 830

ggc tac acc atg agg agg gac tag 2520
 Gly Tyr Thr Met Arg Arg Asp
 835

<210> 8
 <211> 839
 <212> PRT
 <213> human

<400> 8

Met Gly Pro Arg Ala Lys Thr Ile Ser Ser Leu Phe Phe Leu Leu Trp
 1 5 10 15

Val Leu Ala Glu Pro Ala Glu Asn Ser Asp Phe Tyr Leu Pro Gly Asp
 20 25 30

Tyr Leu Leu Gly Gly Leu Phe Ser Leu His Ala Asn Met Lys Gly Ile
 35 40 45

Val His Leu Asn Phe Leu Gln Val Pro Met Cys Lys Glu Tyr Glu Val
50 55 60

Lys Val Ile Gly Tyr Asn Leu Met Gln Ala Met Arg Phe Ala Val Glu
65 70 75 80

Glu Ile Asn Asn Asp Ser Ser Leu Leu Pro Gly Val Leu Leu Gly Tyr
85 90 95

Glu Ile Val Asp Val Cys Tyr Ile Ser Asn Asn Val Gln Pro Val Leu
100 105 110

Tyr Phe Leu Ala His Glu Asp Asn Leu Leu Pro Ile Gln Glu Asp Tyr
115 120 125

Ser Asn Tyr Ile Ser Arg Val Val Ala Val Ile Gly Pro Asp Asn Ser
130 135 140

Glu Ser Val Met Thr Val Ala Asn Phe Leu Ser Leu Phe Leu Leu Pro
145 150 155 160

Gln Ile Thr Tyr Ser Ala Ile Ser Asp Glu Leu Arg Asp Lys Val Arg
165 170 175

Phe Pro Ala Leu Leu Arg Thr Thr Pro Ser Ala Asp His His Ile Glu
180 185 190

Ala Met Val Gln Leu Met Leu His Phe Arg Trp Asn Trp Ile Ile Val
195 200 205

Leu Val Ser Ser Asp Thr Tyr Gly Arg Asp Asn Gly Gln Leu Leu Gly
210 215 220

Glu Arg Val Ala Arg Arg Asp Ile Cys Ile Ala Phe Gln Glu Thr Leu
225 230 235 240

Pro Thr Leu Gln Pro Asn Gln Asn Met Thr Ser Glu Glu Arg Gln Arg

245

250

255

Leu Val Thr Ile Val Asp Lys Leu Gln Gln Ser Thr Ala Arg Val Val
 260 265 270

Val Val Phe Ser Pro Asp Leu Thr Leu Tyr His Phe Phe Asn Glu Val
 275 280 285

Leu Arg Gln Asn Phe Thr Gly Ala Val Trp Ile Ala Ser Glu Ser Trp
 290 295 300

Ala Ile Asp Pro Val Leu His Asn Leu Thr Glu Leu Arg His Leu Gly
 305 310 315 320

Thr Phe Leu Gly Ile Thr Ile Gln Ser Val Pro Ile Pro Gly Phe Ser
 325 330 335

Glu Phe Arg Glu Trp Gly Pro Gln Ala Gly Pro Pro Pro Leu Ser Arg
 340 345 350

Thr Ser Gln Ser Tyr Thr Cys Asn Gln Glu Cys Asp Asn Cys Leu Asn
 355 360 365

Ala Thr Leu Ser Phe Asn Thr Ile Leu Arg Leu Ser Gly Glu Arg Val
 370 375 380

Val Tyr Ser Val Tyr Ser Ala Val Tyr Ala Val Ala His Ala Leu His
 385 390 395 400

Ser Leu Leu Gly Cys Asp Lys Ser Thr Cys Thr Lys Arg Val Val Tyr
 405 410 415

Pro Trp Gln Leu Leu Glu Glu Ile Trp Lys Val Asn Phe Thr Leu Leu
 420 425 430

Asp His Gln Ile Phe Phe Asp Pro Gln Gly Asp Val Ala Leu His Leu

Gly Tyr Thr Met Arg Arg Asp
835

<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 384
 Ser Leu Met Phe Leu Ala Lys Ala Gly Ser Arg Asp Ile Ala Ala Tyr
 115 120 125

tgc aac tac acg cag tac cag ccc cgt gtg ctg gct gtc atc ggg ccc 432
 Cys Asn Tyr Thr Gln Tyr Gln Pro Arg Val Leu Ala Val Ile Gly Pro
 130 135 140

cac tcg tca gag ctc gcc atg gtc acc ggc aag ttc ttc agc ttc ttc 480
 His Ser Ser Glu Leu Ala Met Val Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Phe
 145 150 155 160

ctc atg ccc cag gtc agc tac ggt gct agc atg gag ctg ctg agc gcc 528
 Leu Met Pro Gln Val Ser Tyr Gly Ala Ser Met Glu Leu Leu Ser Ala
 165 170 175

cgg gag acc ttc ccc tcc ttc ttc cgc acc gtg ccc agc gac cgt gtg 576
 Arg Glu Thr Phe Pro Ser Phe Phe Arg Thr Val Pro Ser Asp Arg Val
 180 185 190

cag ctg acg gcc gcc gcg gag ctg ctg cag gag ttc ggc tgg aac tgg 624
 Gln Leu Thr Ala Ala Ala Glu Leu Leu Gln Glu Phe Gly Trp Asn Trp
 195 200 205

gtg gcc gcc ctg ggc agc gac gac gag tac ggc cgg cag ggc ctg agc 672
 Val Ala Ala Leu Gly Ser Asp Asp Glu Tyr Gly Arg Gln Gly Leu Ser
 210 215 220

atc ttc tcg gcc ctg gcc gcg gca cgc ggc atc tgc atc gcg cac gag 720
 Ile Phe Ser Ala Leu Ala Ala Ala Arg Gly Ile Cys Ile Ala His Glu
 225 230 235 240

ggc ctg gtg ccg ctg ccc cgt gcc gat gac tcg cgg ctg ggg aag gtg 768
 Gly Leu Val Pro Leu Pro Arg Ala Asp Asp Ser Arg Leu Gly Lys Val
 245 250 255

cag gac gtc ctg cac cag gtg aac cag agc agc gtg cag gtg gtg ctg 816
 Gln Asp Val Leu His Gln Val Asn Gln Ser Ser Val Gln Val Val Leu
 260 265 270

ctg ttc gcc tcc gtg cac gcc gcc cac gcc ctc ttc aac tac agc atc 864
 Leu Phe Ala Ser Val His Ala Ala His Ala Leu Phe Asn Tyr Ser Ile
 275 280 285

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

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

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 tgc 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 tgc 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 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	795	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 Phe Lys Val Ala Ala Arg Ala Thr Leu Arg Arg Ser Asn Val Ser Arg				2688
	885	890	895	
aag cgg tcc agc agc ctt gga ggc tcc acg gga tcc acc ccc tcc tcc Lys Arg Ser Ser Ser Leu Gly Gly Ser Thr Gly Ser Thr Pro Ser Ser				2736
	900	905	910	
tcc atc agc agc aag agc aac agc gaa gac cca ttc cca cag ccc gag Ser Ile Ser Ser Lys Ser Asn Ser Glu Asp Pro Phe Pro Gln Pro Glu				2784
	915	920	925	
agg cag aag cag cag cag ccg ctg gcc cta acc cag caa gag cag cag Arg Gln Lys Gln Gln Gln Pro Leu Ala Leu Thr Gln Gln Glu Gln Gln				2832
	930	935	940	
cag cag ccc ctg acc ctc cca cag cag caa cga tct cag cag cag ccc Gln Gln Pro Leu Thr Leu Pro Gln Gln Gln Arg Ser Gln Gln Gln Pro				2880
	945	950	955	960
aga tgc aag cag aag gtc atc ttt ggc agc ggc acg gtc acc ttc tca Arg Cys Lys Gln Lys Val Ile Phe Gly Ser Gly Thr Val Thr Phe Ser				2928
	965	970	975	
ctg agc ttt gat gag cct cag aag aac gcc atg gcc cac agg aat tct Leu Ser Phe Asp Glu Pro Gln Lys Asn Ala Met Ala His Arg Asn Ser				2976
	980	985	990	
acg cac cag aac tcc ctg gag gcc cag aaa agc agc gat acg ctg acc Thr His Gln Asn Ser Leu Glu Ala Gln Lys Ser Ser Asp Thr Leu Thr				3024
	995	1000	1005	
cga cac cag cca tta ctc ccg ctg cag tgc ggg gaa acg gac tta Arg His Gln Pro Leu Leu Pro Leu Gln Cys Gly Glu Thr Asp Leu				3069
	1010	1015	1020	
gat ctg acc gtc cag gaa aca ggt ctg caa gga cct gtg ggt gga Asp Leu Thr Val Gln Glu Thr Gly Leu Gln Gly Pro Val Gly Gly				3114
	1025	1030	1035	
gac cag cgg cca gag gtg gag gac cct gaa gag ttg tcc cca gca Asp Gln Arg Pro Glu Val Glu Asp Pro Glu Glu Leu Ser Pro Ala				3159

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

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

<400> 13
 caccaagctt atggcatttt atagetgc 28

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

<220>
 <223> primer

<400> 14
 atatccgcgg cacctccctg gagaacct 28

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

<220>
 <223> primer

<400> 15
 atatccgcgg tccatgtgtt ccaagagg 28

<210> 16
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> primer

<400> 16
 atatgcggcc gcagtcctc ctcacggt 28

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

<220>
 <223> primer

<400> 17
 atatccggg tcccgtgct cgcgcag 28

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

<220>
 <223> primer

<400> 18
 atatgcgcc gcactcatgt ttccctgat t 31

<210> 19
 <211> 2658
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> fusion product of human DNA sequence fragments

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2658)

<400> 19
 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 cgt acg gtc ttc ctg gaa tgg			1824
Glu Asn His Thr Ser Cys Ile Ala Lys Arg Thr Val Phe Leu Glu Trp			
	595	600	605
cat gag gca ccc acc atc gct gtg gcc ctg ctg gcc gcc ctg ggc ttc			1872
His Glu Ala Pro Thr Ile Ala Val Ala Leu Leu Ala Ala Leu Gly Phe			
	610	615	620
ctc agc acc ctg gcc atc ctg gtg ata ttc tgg agg cac ttc cag aca			1920
Leu Ser Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln Thr			
625	630	635	640
ccc ata gtt cgc tcg gct ggg ggc ccc atg tgc ttc ctg atg ctg aca			1968
Pro Ile Val Arg Ser Ala Gly Gly Pro Met Cys Phe Leu Met Leu Thr			
	645	650	655
ctg ctg ctg gtg gca tac atg gtg gtc ccg gtg tac gtg ggg ccg ccc			2016
Leu Leu Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro Pro			
	660	665	670
aag gtc tcc acc tgc ctc tgc cgc cag gcc ctc ttt ccc ctc tgc ttc			2064
Lys Val Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys Phe			
	675	680	685
aca att tgc atc tcc tgt atc gcc gtg cgt tct ttc cag atc gtc tgc			2112
Thr Ile Cys Ile Ser Cys Ile Ala Val Arg Ser Phe Gln Ile Val Cys			
	690	695	700
gcc ttc aag atg gcc agc cgc ttc cca cgc gcc tac agc tac tgg gtc			2160
Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp Val			

705	710	715	720	
cgc tac cag ggg ccc tac gtc tct atg gca ttt atc acg gta ctc aaa				2208
Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu Lys				
	725	730	735	
atg gtc att gtg gta att ggc atg ctg gcc acg ggc ctc agt ccc acc				2256
Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro Thr				
	740	745	750	
acc cgt act gac ccc gat gac ccc aag atc aca att gtc tcc tgt aac				2304
Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys Asn				
	755	760	765	
ccc aac tac cgc aac agc ctg ctg ttc aac acc agc ctg gac ctg ctg				2352
Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu Leu				
	770	775	780	
ctc tca gtg gtg ggt ttc agc ttc gcc tac atg ggc aaa gag ctg ccc				2400
Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu Pro				
	785	790	795	800
acc aac tac aac gag gcc aag ttc atc acc ctc agc atg acc ttc tat				2448
Thr Asn Tyr Asn Glu Ala Lys Phe Ile Thr Leu Ser Met Thr Phe Tyr				
	805	810	815	
ttc acc tca tcc gtc tcc ctc tgc acc ttc atg tct gcc tac agc ggg				2496
Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser Gly				
	820	825	830	
gtg ctg gtc acc atc gtg gac ctc ttg gtc act gtg ctc aac ctc ctg				2544
Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu Leu				
	835	840	845	
gcc atc agc ctg ggc tac ttc ggc ccc aag tgc tac atg atc ctc ttc				2592
Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu Phe				
	850	855	860	
tac ccg gag cgc aac acg ccc gcc tac ttc aac agc atg atc cag ggc				2640
Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln Gly				
	865	870	875	880
tac acc atg agg agg gac				2658
Tyr Thr Met Arg Arg Asp				

885

<210> 20
 <211> 886
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Synthetic Construct

<400> 20

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 Glu Trp
 595 600 605

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

Leu Ser Thr Leu Ala Ile Leu Val Ile Phe Trp Arg His Phe Gln Thr
 625 630 635 640

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

Leu Leu Leu Val Ala Tyr Met Val Val Pro Val Tyr Val Gly Pro Pro
 660 665 670

Lys Val Ser Thr Cys Leu Cys Arg Gln Ala Leu Phe Pro Leu Cys Phe
 675 680 685

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

Ala Phe Lys Met Ala Ser Arg Phe Pro Arg Ala Tyr Ser Tyr Trp Val
 705 710 715 720

Arg Tyr Gln Gly Pro Tyr Val Ser Met Ala Phe Ile Thr Val Leu Lys
 725 730 735

Met Val Ile Val Val Ile Gly Met Leu Ala Thr Gly Leu Ser Pro Thr
 740 745 750

Thr Arg Thr Asp Pro Asp Asp Pro Lys Ile Thr Ile Val Ser Cys Asn
 755 760 765

Pro Asn Tyr Arg Asn Ser Leu Leu Phe Asn Thr Ser Leu Asp Leu Leu
 770 775 780

Leu Ser Val Val Gly Phe Ser Phe Ala Tyr Met Gly Lys Glu Leu Pro
 785 790 795 800

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

Phe Thr Ser Ser Val Ser Leu Cys Thr Phe Met Ser Ala Tyr Ser Gly
 820 825 830

Val Leu Val Thr Ile Val Asp Leu Leu Val Thr Val Leu Asn Leu Leu
 835 840 845

Ala Ile Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Pro Lys Cys Tyr Met Ile Leu Phe
 850 855 860

Tyr Pro Glu Arg Asn Thr Pro Ala Tyr Phe Asn Ser Met Ile Gln Gly
 865 870 875 880

Tyr Thr Met Arg Arg Asp
 885

<210> 21
 <211> 2691
 <212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> fusion product of human DNA sequence fragments

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2691)

<400> 21

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	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	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 cgg 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			

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> 23
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> primer

<400> 23
 atatcgtacg cttggcaatg caggaggt 28

<210> 24
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> primer

<400> 24
 atatcgtacg gtcttcctgg aatggcat 28

<210> 25
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial

<220>
 <223> primer

<400> 25

atatcgtacg cggttcctgg catggggc

28