



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년05월07일
(11) 등록번호 10-2108179
(24) 등록일자 2020년04월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/10 (2006.01) C12P 33/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1025 (2013.01)
C12P 33/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0103029
(22) 출원일자 2019년08월22일
심사청구일자 2019년08월22일
(56) 선행기술조사문헌
JP02984406 B2
US20070049538 A1
서열1: XP_004143047.1

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

전체 청구항 수 : 총 14 항

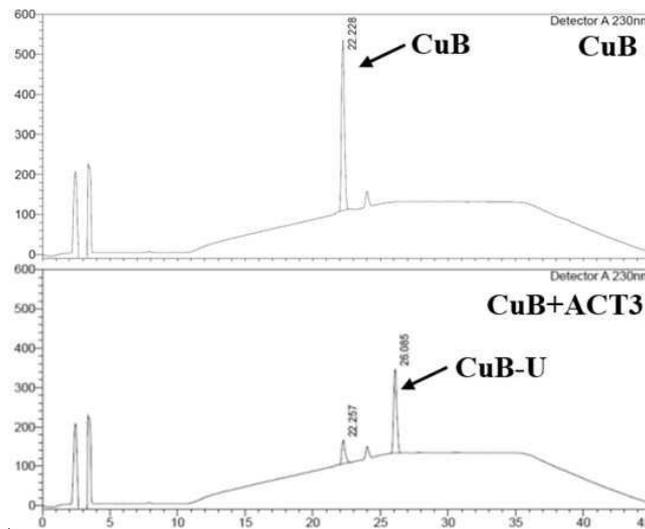
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **신규한 단백질 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 신규한 단백질 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 단백질 및 이를 포함하는 조성물은 스테로이드 계열 화합물 또는 이의 유도체를 아세틸화 시킬 수 있는바, 화합물의 아세틸화 용도로 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015K2A2A2001928

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 한중협력연구사업

연구과제명 Citrullus 속 에서의 쿠쿠비테신 생합성 경로 규명

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2015.07.01 ~ 2017.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질.

청구항 2

청구항 1의 단백질을 암호화하는 핵산 분자.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 핵산 분자.

청구항 4

청구항 2의 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

청구항 4의 재조합 발현벡터가 숙주세포에 형질전환된 형질전환체.

청구항 6

청구항 1의 단백질을 포함하는 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화용 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신, 엑디손, 코티솔 또는 에스트리올 중 하나인 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화용 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신은 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 D, 쿠쿠르비타신 E 또는 쿠쿠르비타신 I 중 하나인 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화용 조성물.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신이고, 상기 단백질은 상기 쿠쿠르비타신의 16번 탄소의 하이드록시기를 아세틸화시키는 것인, 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화용 조성물.

청구항 10

청구항 5의 형질전환체를 배양하는 단계; 및

상기 형질전환체의 배양물로부터 상기 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 생산 방법.

청구항 11

청구항 1의 단백질을 포함하는 조성물을 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체와 반응시키는 단계를 포함하는 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신, 엑디손, 코티솔 또는 에스트리올 중 하나인 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화 방법.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신은 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 D, 쿠쿠르비타신 E 또는 쿠쿠르비타신 I 중 하나인 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신 B, 상기 쿠쿠르비타신 D, 상기 쿠쿠르비타신 E 또는 상기 쿠쿠르비타신 I의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기를 아세틸화 시키는 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 화합물을 아세틸화 시킬 수 있는 신규한 단백질, 이를 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 화학적인 방법으로 화합물을 아세틸화 시키는 방법은 화학 반응을 통해서 아세틸기를 무작위로 붙이기 때문에 한 번의 화학 반응을 통해서 다양한 유도체가 합성되며, 특정 유도체만을 선택적으로 합성할 수 없다. 따라서 원하는 특정 유도체를 얻기 위해서는 분리 및 정제 과정이 추가적으로 더 필요하며, 이로 인해 비용과 공정 측면의 문제점이 있다. 이러한 실정에서 화합물의 특정 위치에 아세틸기를 붙이거나 떼 수 있는 물질의 창출이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 미국 공개특허 US2007-0049538

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 아세틸기전이 효소의 활성을 갖는 신규한 단백질을 제공함에 그 목적이 있다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 신규한 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공함에 있다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공함에 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현백터가 숙주세포에 형질전환된 형질전환체를 제공함에 있다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 스테로이드 계열 화합물을 아세틸화 할 수 있는 신규한 단백질을 포함하는 조성물을 제공함에 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 단백질의 생산 방법을 제공함에 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 신규한 단백질을 포함하는 조성물을 이용해 스테로이드 계열 화합물을 아세틸화 시키는 방법을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 1. 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질.
- [0015] 2. 위 1의 단백질을 암호화하는 핵산 분자.
- [0016] 3. 위 2에 있어서, 상기 핵산 분자는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 핵산 분자.
- [0017] 4. 위 2의 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현백터.
- [0018] 5. 위 4의 재조합 발현백터가 숙주세포에 형질전환된 형질전환체.
- [0019] 6. 위 1의 단백질을 포함하는 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화용 조성물.
- [0020] 7. 위 6에 있어서, 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신, 엑디손, 코티솔 또는 에스트리올 중 하나인 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화용 조성물.
- [0021] 8. 위 7에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신은 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 D, 쿠쿠르비타신 E 또는 쿠쿠르비타신 I 중 하나인 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화용 조성물.
- [0022] 9. 위 6에 있어서, 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신이고, 상기 단백질은 상기 쿠쿠르비타신의 16번 탄소의 하이드록시기를 아세틸화시키는 것인, 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화용 조성물.
- [0023] 10. 위 5의 형질전환체를 배양하는 단계; 및
- [0024] 상기 형질전환체의 배양물로부터 상기 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 생산 방법.
- [0025] 11. 위 1의 단백질을 포함하는 조성물을 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체와 반응시키는 단계를 포함하는 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화 방법.
- [0026] 12. 위 11에 있어서, 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신, 엑디손, 코티솔 또는 에스트리올 중 하나인 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화 방법.
- [0027] 13. 위 12에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신은 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 D, 쿠쿠르비타신 E 또는 쿠쿠르비타신 I 중 하나인 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화 방법.
- [0028] 14. 위 13에 있어서, 상기 쿠쿠르비타신 B, 상기 쿠쿠르비타신 D, 상기 쿠쿠르비타신 E 또는 상기 쿠쿠르비타신 I의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기를 아세틸화 시키는 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸화 방법.

발명의 효과

- [0030] 본 발명은 신규한 단백질에 관한 것으로, 본 발명의 단백질은 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체를 아세틸화 할 수 있는바, 이를 포함하는 조성물은 스테로이드 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체의 아세틸

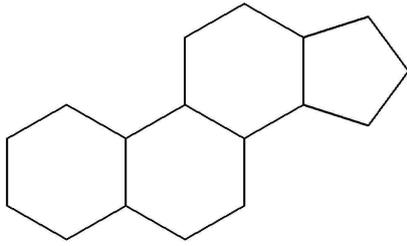
화용 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 시료 1의 표준품 및 시료 1의 HPLC 데이터를 나타낸다
- 도 2는 시료 2의 표준품 및 시료 2의 HPLC 데이터를 나타낸다.
- 도 3은 시료 3의 표준품 및 시료 3의 HPLC 데이터를 나타낸다.
- 도 4는 시료 4의 표준품 및 시료 4의 HPLC 데이터를 나타낸다.
- 도 5는 시료 5의 표준품 및 시료 5의 HPLC 데이터를 나타낸다.
- 도 6은 시료 6의 표준품 및 시료 6의 HPLC 데이터를 나타낸다.
- 도 7은 시료 7의 표준품 및 시료 7의 HPLC 데이터를 나타낸다.
- 도 8은 시료 1의 ¹H-NMR 데이터를 나타낸다.
- 도 9는 시료 1의 ¹³C-NMR 데이터를 나타낸다.
- 도 10은 시료 2의 ¹H-NMR 데이터를 나타낸다.
- 도 11은 시료 2의 ¹³C-NMR 데이터를 나타낸다.
- 도 12는 시료 3의 ¹H-NMR 데이터를 나타낸다.
- 도 13은 시료 3의 ¹³C-NMR 데이터를 나타낸다.
- 도 14는 시료 4의 ¹H-NMR 데이터를 나타낸다.
- 도 15는 시료 4의 ¹³C-NMR 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0035] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 신규한 단백질을 제공한다.
- [0036] 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질은 화합물을 아세틸화 시킬 수 있는 효소로서, 구체적으로, 4개의 고리를 가지는 트리테페노이드(Triterpenoid) 계열 화합물 또는 상기 화합물 유도체를 아세틸화 시킬 수 있는 효소이다.
- [0037] 본 발명의 '화합물 유도체'는 특정 화합물을 모체로 하여 작용기의 도입, 산화, 환원, 원자의 치환 등 모체의 구조를 대폭 변화시키지 않는 한도 내에서 변화된 화합물을 의미한다.
- [0038] 본 발명의 '트리테페노이드 계열 화합물 유도체'는 트리테페노이드 계열 화합물을 모체로 하여 작용기의 도입, 산화, 환원, 원자의 치환 등 모체의 구조를 대폭 변화시키지 않는 한도 내에서 변화된 화합물을 의미한다.
- [0039] 본 발명에서 상기 4개의 고리를 가지는 트리테페노이드 계열 화합물은 스테로이드(Steroid) 계열 화합물일 수 있다.
- [0040] 상기 스테로이드 계열 화합물은 6개의 탄소로 이루어진 고리 세 개에 5개의 탄소로 이루어진 고리 하나가 붙은 스테로이드 핵 구조를 포함하는 화합물의 총칭으로, 상기 스테로이드 핵구조는 하기 화학식 1과 같으며, 하기 화학식 1에 포함된 4개의 고리를 이루는 각 결합은 단일결합 또는 이중결합 일 수 있다:
- [0041] [화학식 1]



[0042]

[0043]

상기 스테로이드 계열 화합물을 적어도 하나의 하이드록시기를 가질 수 있다. 예를 들어, 스테로이드 계열 화합물을 구성하는 적어도 하나의 탄소에 하이드록시기가 결합되어있을 수 있다.

[0044]

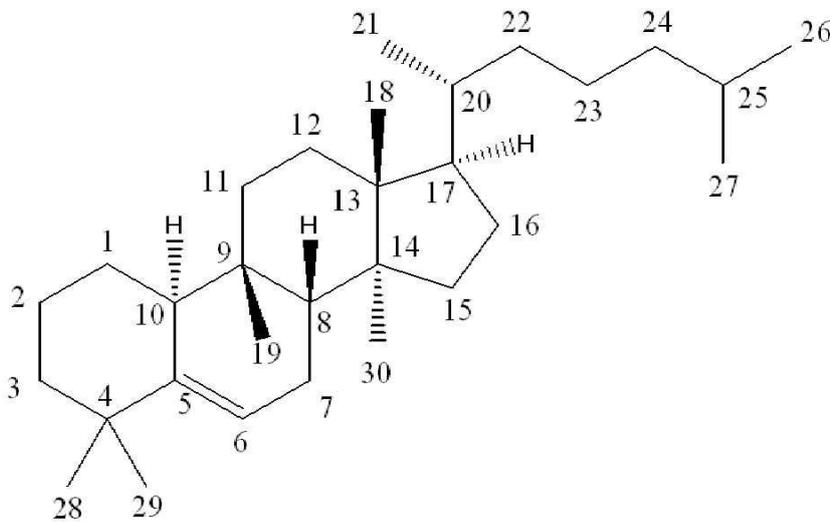
구체적으로, 본 발명에서 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신, 엑디손, 코티솔 또는 에스트리올일 수 있다.

[0045]

쿠쿠르비타신 화합물은 하기 화학식 2의 구조를 백본(backbone)으로 포함하는 화합물로, 하기 화학식 2에 포함된 적어도 하나의 탄소들에 작용기 또는 치환기가 결합되어있을 수 있다:

[0046]

[화학식 2]



[0047]

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

[0048]

[0049]

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

[0050]

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

[0052]

서열번호 1의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0053]

MGTMNYMQLHQIVSTETIKPSSPTPPNLTHTLSLFDQLAPHIFVPLVFFFHHGHGSGTCVQLLRRSLSMTLSTRYYPFAGRIKDNVSVDCNDEGVTFVEAR
LEGVTVSEILENPRSEIVEVLFVDGLQWKDSKIGALLKQVITFFECGLSIGVMLSHRLGLDNLVVKFVKDWAVVTRNSGFEGEEIVNPLFNSADLFPHGDLPL
AMSGAVVEEGNFTCKRFVFEKSKIVSLKNRISSEKVENPSRVEVVSALIKAIISASRNSQNHTLLQLTLNLRKRVPAPLPESLVGSLVSFFPVGVGGEREV
IELHELVTMRKEMGEFCKNYAKKYRTKEWPELIKRRLESREILSKNGNQLVYRFSSGCFPIIYEVDVFGWGAADWVTVAAFKMKNVTVMMLDAKNGGGIEA
LVSLQDHEMAAFQHNQELALAFASLNPSAN(서열번호 1).

[0054]

본 발명의 단백질은 천연으로부터 유래될 수도 있고, 공지의 단백질 합성 방법을 이용하여 합성될 수도 있으며,

예를 들어, 유전공학적 방법 또는 화학적 합성 방법에 의해 합성될 수 있다.

- [0055] 본 발명의 단백질은 전술한 아미노산 서열로 이루어진 단백질 뿐만 아니라 이의 아미노산 서열 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 본 발명 단백질의 변이체란, 본 발명의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환, 아미노산 유사체의 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 경우에 따라서, 본 발명의 단백질은 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 수식(modification)된 것 일 수도 있다.
- [0056] 뿐만 아니라, 본 발명의 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 및 이들의 기능적 동등물을 포함한다.
- [0057] 용어 '기능적 동등물'이란, 서열번호 1의 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. '실질적으로 동질의 생리활성'이란 화합물을 아세틸화 시키는 활성을 의미한다.
- [0059] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0060] 전술한 본 발명의 단백질을 암호화하는 핵산 분자의 서열은, 이와 동등한 기능을 갖는 단백질을 암호화하는 한, 하나 이상의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다.
- [0061] 상기 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질은 바람직하게는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열을 갖는 핵산 분자에 의해 암호화된다. 상기 핵산 분자 서열은 단쇄 또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자 또는 RNA(mRNA) 분자일 수 있다.
- [0062] 서열번호 2의 염기서열은 다음과 같다:
- [0063] ATGGGGACGATGAATTACATGCAACACCTTCAAATTGTTTCAACAGAAACCATTAAACCTTCTTCTCCAACCTCTCCAAATCTCAACACTCATACCCTCTCCCTCTTCGATCAGCTAGCCCCACATTTTCGTGCCTCTCGTGTCTTCTTCTCCACCACGGTACGCGTTCGGGTACTTGCCTCAATGCTTCGACGATCTTTCTATGACTCTATCTCGGTACTACCCATTTGCGGGTAGGATTAAGACAACGCTCGGTTGACTGTAACGATGAGGGGTGACTTTTGTGGAGGCTCGGCTCGAGGGCGTGACGGTGTCCGAGATTTGGAAAACCTAGAAGTGAGATTGTGGAAGTGTATTGTGTGATGGGTGCAATGAAAAGATTCAAAAATTGGAGCTTTGTGAAGTTCAAATAACGTTTTTTGAATGTGGAGATTGAGCATTGGAGTGATGCTGTCTCACAGGCTTGGGGATTGGCAACGTTAGTGAAGTTCGTAAGATTGGGACGTCGTGACTCGAACAGCGGTTTTGGGAAGAAATTGTAACCCGCTTTTAACTCTGCGGATTTGTCCCCACGGCGACTTACCCGCCATGTCCGGCCCGTGGTTGAAGAAGGAAATTTACGTGCAAGAGTTTCGTATTCGAAGGTTCAAAGATTGTATCCCTAAAAAATAGGATTTACAGAGAAGGTGGAGAATCCATCTCGAGTGAAGTTGTGTCAGCATTAAATTTACAAGCCATCATTTCAGCTTCGCGAAATCCCAAACCACCCACACTGTTGTTACAAACACTAAATTTACGTAAAAGGGTGGCGCCGCTGCCGAAAAGTTTAGTGGGAAGTTAGTGTCAATCTTCCCGGTGGGTGTGGCGGAGAAAAGAGAAGTAAATAGAGCTGCATGAGTTGGTGGGTACAATGAGAAAAGAAATGGGAGAGTTTGTAAACAAATACGCCAAAAAGTACAGAACAAAAGAGTGGCTGAATTGATAAAAAGACGATTAATGAATCGAGAGAAATTTGAGCAAAAATGGGAATAATCAATGGTTTATAGATTTAGCAGTGGATGCAATTTCCAATTTATGAAGTGATTTTGGGTGGGGACGGCGGATTGGGTTACTGTGGCGCGTTAAGATGAAAAACACCGTAATGATGTTGGACGCCAAAAATGGCGCGGAATTGAAGCTTTGGTCAGTTTACAAGACCAGAAATGGCTGCCTTCCAACACAATCAGGAGCTTCTGCTTTTGCTTCTTGAACCCAAGTGCCAATTA(서열번호 2).
- [0064] 상기 핵산 분자의 서열은 이와 동등한 기능을 갖는 단백질을 암호화하는 한, 적어도 하나의 핵산 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 또한, 상기 핵산 분자 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 상기 핵산 분자는 서열번호 2와 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 핵산 분자의 '서열 상동성의 %' 는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 핵산 분자 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참조 서열에 비해 추가 또는 삭제 즉, 갭(gap)을 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명의 상기 단백질을 암호화하는 핵산 분자 서열은 천연에서 분리되거나 인위적으로 합성 또는 유전적 재조합 방법을 통하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 핵산 분자 서열은 수박 식물체로부터 유래된 것 일 수 있다.
- [0066] 전술한 핵산 분자 서열을 이를 발현할 수 있는 벡터에 작동적으로 연결시켜, 본 발명의 단백질이 제공될 수 있다.

- [0068] 나아가, 본 발명은 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현백터를 제공한다.
- [0069] 본 발명에서 용어, “재조합 발현백터”란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 백터로서, 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 재조합 발현백터는 플라스미드 백터, 코즈미드 백터, 박테리오파이지 백터 및 바이러스 백터 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 발현백터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다.
- [0072] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현백터가 숙주세포에 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0073] 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 방법으로, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주 세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 미세사출법(microprojectile bombardment), 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘(CaPO₄) 침전, 염화 칼슘(CaCl₂) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포솜 매개법(liposome-mediated method), 텍스트란 설페이트, 리포펙타민, 열충격법 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0074] 용어 ‘형질전환체’는 세포 내로 도입된 이중성 핵산 분자를 포함하는 원핵 또는 진핵 세포를 의미한다.
- [0075] 형질전환체는 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량이 다르게 나타나므로 당업자가 목적하는 바에 가장 적합한 숙주 세포를 선택하여 사용할 수 있다. 상기 숙주세포는 에스케리키아 콜라이(대장균, *Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)일 수 있으며, 진균, 효모, 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 바람직하게, 본 발명의 숙주세포는 에스케리키아 콜라이(대장균, *Escherichia coli*)일 수 있으며, 상기 에스케리키아 콜라이 균주로는 Rosetta2(DE3), C41(DE3), SoluBL21, BL21a1 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 나아가, 본 발명은 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 생산 방법을 제공한다.
- [0079] 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 생산 방법은, 전술한 형질전환체를 배양하는 단계; 및 상기 단백질을 분리하는 단계;를 포함한다. 구체적으로, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 생산 방법은, 상기 형질전환체를 배양액에서 배양하고 단백질의 발현을 유도하는 단계; 상기 단백질이 유도된 배양액으로부터 원심분리를 이용하여 세포를 침전시키고, 소니케이터를 이용하여 세포를 파쇄하는 단계; 및 파쇄된 세포를 원심분리하여 상층액을 회수한 후 His-tag 된 단백질을 분리하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0080]
- [0081] 본 발명은 본 발명의 단백질을 포함하는 화합물 또는 이의 유도체의 아세틸화용 조성물을 제공한다.
- [0082] 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물은 트리페노이드 계열 화합물 또는 이의 유도체, 특히 스테로이드 계열 화합물 또는 이의 유도체에 포함된 적어도 하나의 하이드록시기를 아세틸화 할 수 있다.
- [0083] 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신, 엑디손, 코티솔 또는 에스트리올일 수 있으며, 상기 쿠쿠르비타신은 쿠쿠르비타신 A, 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 C, 쿠쿠르비타신 D, 쿠쿠르비타신 E, 쿠쿠르비타신 F, 쿠쿠르비타신 G, 쿠쿠르비타신 H, 쿠쿠르비타신 I, 쿠쿠르비타신 J, 쿠쿠르비타신 K, 쿠쿠르비타신 L, 쿠쿠르비타신 O, 쿠쿠르비타신 P, 쿠쿠르비타신 Q, 쿠쿠르비타신 R, 쿠쿠르비타신 S 또는 쿠쿠르비타신 T 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0084] 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물은 상기 쿠쿠르비타신 B, 쿠쿠르비타신 D, 쿠쿠르비타신 E 또는 쿠쿠르비타신 I의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기를 특이적으로 아세틸화 할 수 있다. 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물을 이용하면, 화학적인 방법으로 아세틸기를 붙이는 방법으로 유도체를 합성하는 경우와 달리, 원하는 위치에서 아세틸화된 생성물만 고효율로 합성할 수 있다는 장점이 있다. 즉, 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물을

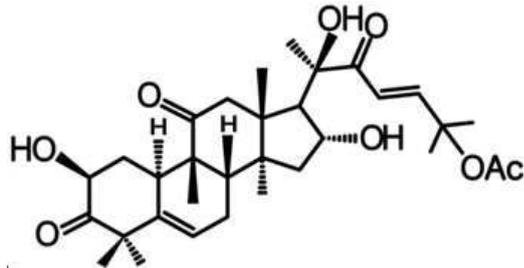
이용하면, 화합물의 특정 위치에 아세틸화 된 유도체를 얻을 수 있어, 원하는 화합물을 얻기 위해 분리 및 정제 과정을 거칠 필요가 없기 때문에 비용과 공정 측면에서 장점이 있다.

[0086] 또한, 본 발명은 전술한 단백질 또는 이를 포함하는 조성물을 이용한 트리페노이드 계열 화합물, 특히 스테로이드 계열 화합물 또는 이의 유도체의 아세틸화 방법을 제공한다.

[0087] 예를 들어, 스테로이드 계열 화합물의 아세틸화 방법은 본 발명의 단백질을 포함하는 조성물을 스테로이드 계열 화합물 또는 이의 유도체와 반응시키는 단계를 포함한다. 상기 스테로이드 계열 화합물은 전술한 바와 같이, 쿠쿠르비타신, 엑디손, 코티솔 또는 에스트리올일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0088] 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신 B일 수 있고, 그 구조는 하기 화학식 3과 같다:

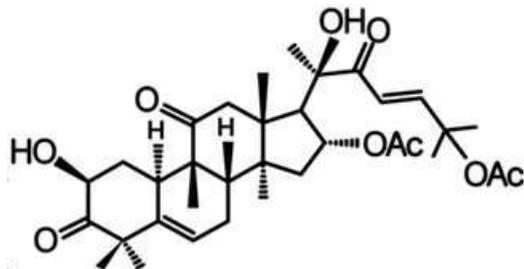
[0089] [화학식 3]



[0090]

[0091] 상기 반응을 통해 상기 쿠쿠르비타신 B의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기가 아세틸화 될 수 있으며, 상기 쿠쿠르비타신 B의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물(이하, 쿠쿠르비타신 B-U)은 하기 화학식 4와 같다:

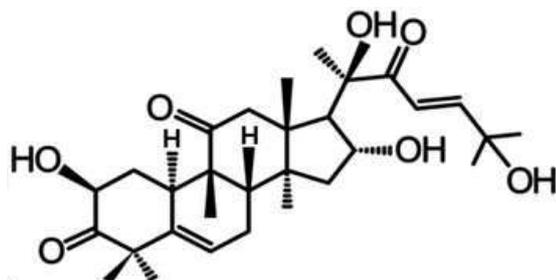
[0092] [화학식 4]



[0093]

[0094] 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신 D일 수 있고, 그 구조는 하기 화학식 5와 같다:

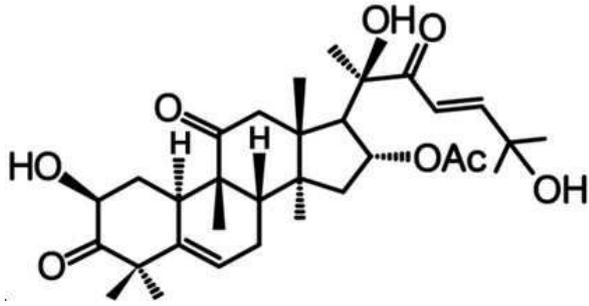
[0095] [화학식 5]



[0096]

[0097] 상기 반응을 통해 상기 쿠쿠르비타신 D의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기가 아세틸화 될 수 있으며, 상기 쿠쿠르비타신 D의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물(이하, 쿠쿠르비타신 D-U)은 하기 화학식 6과 같다:

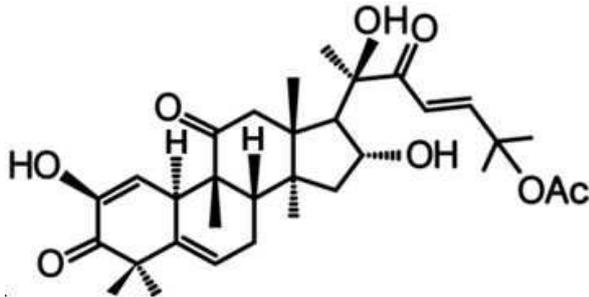
[0098] [화학식 6]



[0099]

[0100] 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신 E일 수 있고, 그 구조는 하기 화학식 7과 같다:

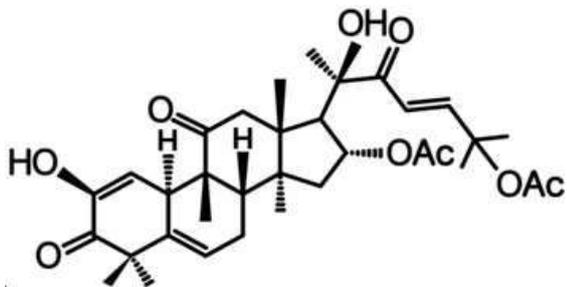
[0101] [화학식 7]



[0102]

[0103] 상기 반응을 통해 상기 쿠쿠르비타신 E의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기가 아세틸화 될 수 있으며, 상기 쿠쿠르비타신 E의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물(이하, 쿠쿠르비타신 E-U)은 하기 화학식 8과 같다:

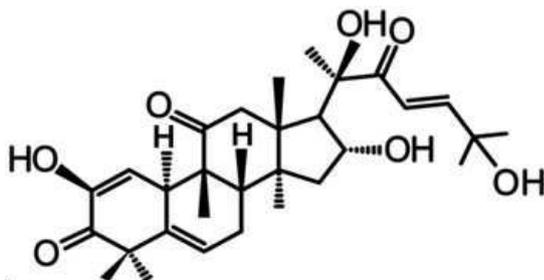
[0104] [화학식 8]



[0105]

[0106] 상기 스테로이드 계열 화합물은 쿠쿠르비타신 I일 수 있고, 그 구조는 하기 화학식 9와 같다:

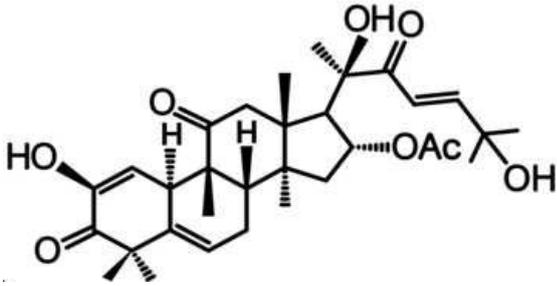
[0107] [화학식 9]



[0108]

[0109] 상기 반응을 통해 상기 쿠쿠르비타신 I의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기가 아세틸화 될 수 있으며, 상기 쿠쿠르비타신 I의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물(이하, 쿠쿠르비타신 I-U)은 하기 화학식 10과 같다:

[0110] [화학식 10]



[0111]

[0113]

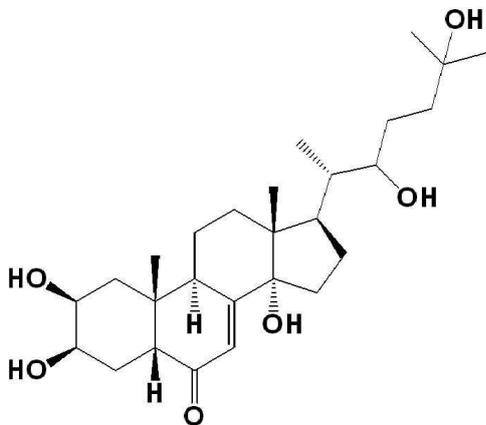
상기 반응을 통해 상기 엑디손에 포함된 적어도 하나의 하이드록시기가 아세틸화 될 수 있다. 예를 들어, 상기 반응을 통해 엑디손의 2, 3, 14, 22 또는 25번 탄소에 결합된 하이드록시기 중 적어도 하나가 아세틸화 될 수 있다.

[0114]

상기 엑디손의 구조는 하기 화학식 11과 같다:

[0115]

[화학식 11]



[0116]

[0117]

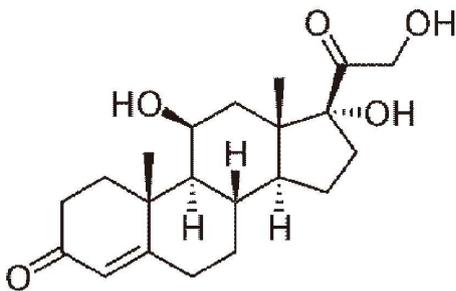
상기 반응을 통해 상기 코티솔에 포함된 적어도 하나의 하이드록시기가 아세틸화 될 수 있다. 예를 들어, 상기 반응을 통해 코티솔의 11, 17 또는 21번 탄소에 결합된 하이드록시기 중 적어도 하나가 아세틸화 될 수 있다.

[0118]

상기 코티솔의 구조는 하기 화학식 12와 같다:

[0119]

[화학식 12]



[0120]

[0121]

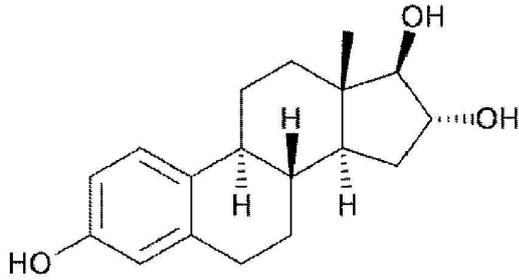
상기 반응을 통해 상기 에스트리올에 포함된 적어도 하나의 하이드록시기가 아세틸화 될 수 있다. 예를 들어, 상기 반응을 통해 에스트리올의 3, 16 또는 17번 탄소에 결합된 하이드록시기 중 적어도 하나가 아세틸화 될 수 있다.

[0122]

상기 에스트리올의 구조는 하기 화학식 13과 같다:

[0123]

[화학식 13]



- [0124]
- [0126] 나아가, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질 또는 그의 기능적 동등물을 이용한 반응을 통해 얻어진 아세틸화된 화합물을 제공할 수 있다.
- [0127] 본 발명의 상기 아세틸화된 화합물은 스테로이드 계열 화합물 및 그 유도체의 탄소에 결합된 적어도 하나의 하이드록시기가 아세틸화된 화합물일 수 있다.
- [0128] 예를 들어, 상기 아세틸화된 화합물은 쿠쿠르비타신의 16번 탄소에 결합된 하이드록시기가 아세틸화된 화합물일 수 있으며, 예를 들어, 쿠쿠르비타신 B-U, 쿠쿠르비타신 D-U, 쿠쿠르비타신 E-U, 또는 쿠쿠르비타신 I-U일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0129] 또한, 상기 아세틸화된 화합물은 엑디손, 코티솔, 에스트리올 또는 이들의 유도체의 적어도 하나의 하이드록시기가 아세틸화된 화합물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0131] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0133] **[실시예]**

[0134] **1. 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질(아세틸전이효소 3; ACT3)의 생산**

[0135] 수박(citrullus spp.) 식물체로부터 total RNA를 추출하였고, oligo-dT prime 및 reverse transcription enzyme를 이용하여 complementary DNA(cDNA)를 제작하였다. 상기 제작된 cDNA를 주형(template)으로 하여 forward primer, reverse primer 및 pfu DNA polymerase를 이용해서 polymerase chain reaction(PCR)법으로 ACT3를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭하였고, gel 전기영동법으로 상기 폴리뉴클레오타이드를 분리 및 정제하였다. 상기 forward primer의 서열은 서열번호 3 (CAATGGGTCGCGGATCCATGGAGTCAGCATGAAA)과 같고, 이는 ACT3를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 개시코돈과 BamH1 제한효소 염기서열 (GGATCC)이 포함된 서열이다. 상기 reverse primer의 서열은 서열번호 4(GTGGTGGTGGTCTCGAGGTGGAGCTGAAGAAC)와 같고, 이는 종결코돈이 제외되고 XhoI 제한효소 염기서열(CTCGAG)이 포함된 서열이다.

[0136] 상기 정제된 ACT3를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 infusion cloning법으로 pET28a(+) 재조합 발현벡터에 클로닝 하였다.

[0137] 상기 클로닝된 ACT3 재조합 발현벡터를 단백질 발현 *E. coli*인 BL21a1에 형질전환 시킨 후, LB(lysogeny broth) 배양액에서 1mM IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)로 16℃에서 180rpm으로 mixing 시켜 ACT3의 발현을 유도하였다.

[0138] ACT3가 유도된 배양액(2 리터)을 원심분리기를 이용하여 원심 분리하여 BL21a1 cell을 침전 시킨 후, 침전된 BL21a1 cell을 binding buffer(20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, pH7.4)에 현탁 시켰으며, sonicator를 이용하여 BL21a1 cell을 파쇄하였다. 파쇄된 BL21a1 cell을 원심분리하여 상층액을 회수한 후, Ni sepharose를 이용하여 His-tag된 ACT3를 분리하였고, binding buffer로 washing 후 Elution buffer(350~500mM imidazole, 20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, pH7.4)로 ACT3 용액을 회수 하였다.

[0139] 회수된 ACT3 용액을 30KDa cut off centricon을 이용하여 농축하였고, storage buffer(10% glycerol, 50mM sodium phosphate, 0.1M sodium citrate, pH 7.4)로 교환 후 -80℃에 보관 하여 사용하였다.

[0141] **2. ACT3 효소 반응**

[0142] 각각의 200 μM의 쿠쿠르비타신 B(이하, CuB), 쿠쿠르비타신 D(이하, CuD), 쿠쿠르비타신 E(이하, CuE), 쿠쿠르비타신 I(이하, CuI), 엑디손, 코티솔 및 에스트리올, 400 μM의 acetyl-CoA(aceryl coenzyme A) 및 40μg의

ACT3를 효소반응 buffer(50mM sodium phosphate buffer, pH7.4)에 넣고 30℃에서 1시간 동안 효소 반응시켰다. 각각의 반응된 결과물을 100% etyl acetate로 분획 하였으며, 분획 용액을 centrifugal vacuum concentrator로 건조 시켰고, 각각을 120 μl의 100% 메탄올에 녹여 분석용 시료로 사용하였다.

[0143] 각 기질(CuB, CuD, CuE, CuI, 엑디손, 코티솔, 또는 에스트리올)과 ACT3의 반응으로 얻어진 결과물로부터 얻어진 분석용 시료는 하기 표 1과 같다.

표 1

시료 1	시료 2	시료 3	시료 4	시료 5	시료 6	시료 7
CuB+ACT3 효소반응 생성물	CuD+ACT3 효소반응 생성물	CuE+ACT3 효소반응 생성물	CuI+ACT3 효소반응 생성물	엑디손 +ACT3 효소반응 생성물	코티솔 +ACT3 효소반응 생성물	에스트리올 +ACT3 효소반응 생성물

[0146] **3. 효소 반응 결과물의 HPLC (high performance liquid chromatography) 분석**

[0147] ACT3 효소 반응 결과를 확인하기 위해, HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하여 표 1의 각 시료를 분석하였다.

[0148] 시료의 분석에 앞서, 각 시료의 표준품에 대한 retention time을 확인하였다. 상기 표준품은 각 시료의 기질로 사용된 물질이며, 구체적으로 시료1의 표준품은 CuB, 시료2의 표준품은 CuD, 시료3의 표준품은 CuE, 시료4의 표준품은 CuI, 시료5의 표준품은 엑디손, 시료6의 표준품은 코티솔, 시료7의 표준품은 에스트리올이다.

[0150] 효소 반응 생성물 분석에 사용한 HPLC의 조건은 하기 표 2와 같다.

표 2

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

[0152] HPLC를 통해 시료 1 내지 시료 7을 각각 분석하였고, 각 시료의 표준품에 대한 retention time과 같은 peak 외에, 다른 retention time의 peak가 검출되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 ACT3에 의해 효소 반응이 일어난 것을 알 수 있었다.

[0153] 각 시료의 표준품 및 시료에 대한 HPLC 결과는 도 1 내지 7에 나타나있다.

[0155] **4. 효소 반응 결과물의 LC-MS(liquid chromatography-mass spectrometry) 분석**

[0156] HPLC 분석에 따른 새롭게 검출된 물질의 분자량을 알아내기 위해 LC-MS 분석을 실시하였다.

[0157] 효소 반응 생성물의 분자량 분석에 사용한 LC-MS의 조건은 하기 표 3과 같다.

표 3

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

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

[0159] 하기 표 4는 각 시료의 표준품 및 효소 반응 생성물의 LC-MS 값을 나타낸다.

표 4

[0160]

	시료 1의 표준품 (CuB)	시료 2의 표준품 (CuD)	시료 3의 표준품 (CuE)	시료 4의 표준품 (CuI)
LC-MS 값	603.3170	561.3064	601.3013	559.2908
	시료 1 (CuB-U)	시료 2 (CuD-U)	시료 3 (CuE-U)	시료 4 (CuI-U)
LC-MS 값	645.3275	603.3170	643.3119	601.3013

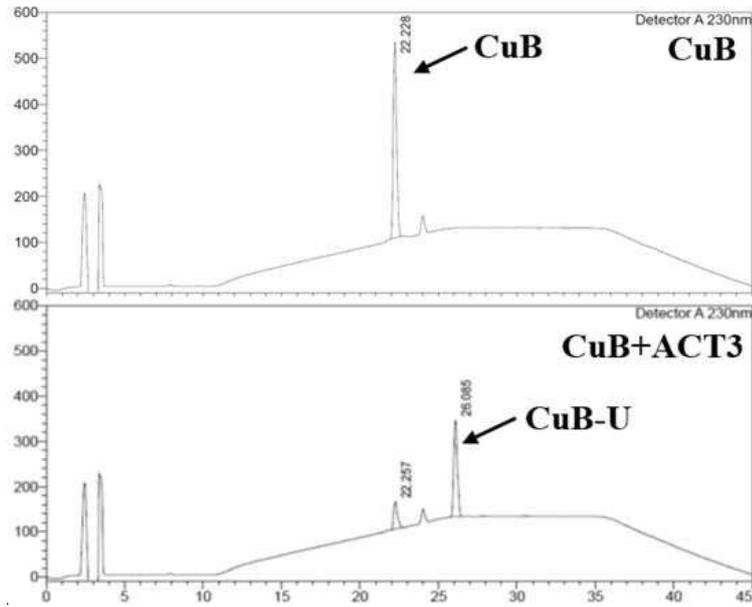
[0161] 또한, 추가적으로 1H-NMR (600 MHz, CD3OD, δH)과 13C-NMR (150 MHz, CD3OD, δC) 분석을 진행하였다. 각 효소 반응 생성물의 1H-NMR 데이터 및 13C-NMR 데이터를 도 8 내지 도 16에 나타냈다.

[0162] NMR 분석을 통해, 시료 1에 포함된 CuB+ACT3 효소반응 생성물은 CuB-U(화학식 4의 구조)이고(도 8 및 9 참고), 시료 2에 포함된 CuD+ACT3 효소반응 생성물은 CuD-U(화학식 6의 구조)이고(도 10 및 11 참고), 시료 3에 포함된 CuE+ACT3 효소반응 생성물은 CuE-U(화학식 8의 구조)이고(도 12 및 13 참고), 시료 4에 포함된 CuI+ACT3 효소반응 생성물은 CuI-U(화학식 10의 구조)인 것(도 14 및 15 참고)이 확인 되었다.

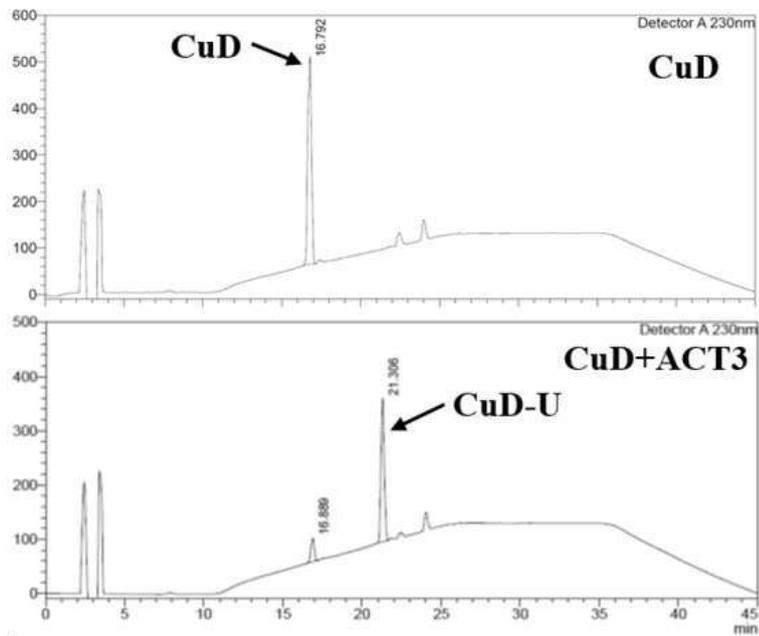
[0163] 상기 분석 결과에 따라, 본 발명의 ACT3을 이용해 스테로이드 계열 화합물에 포함된 하이드록시기가 아세틸화될 수 있다는 것을 확인하였다.

도면

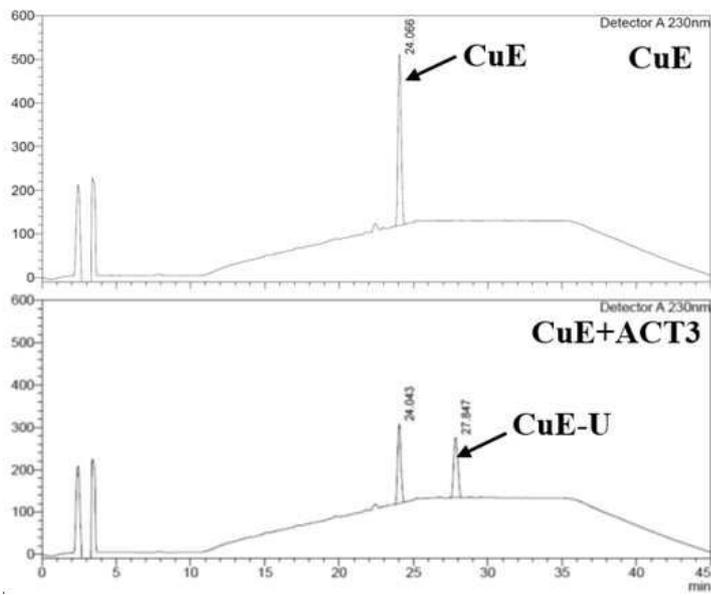
도면1



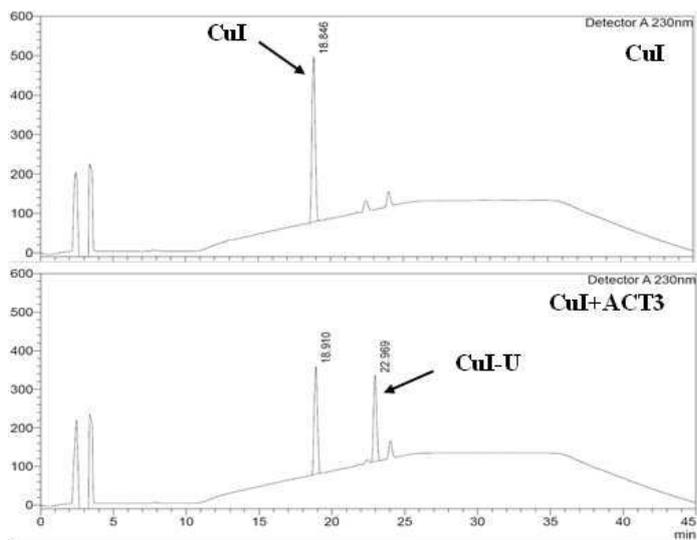
도면2



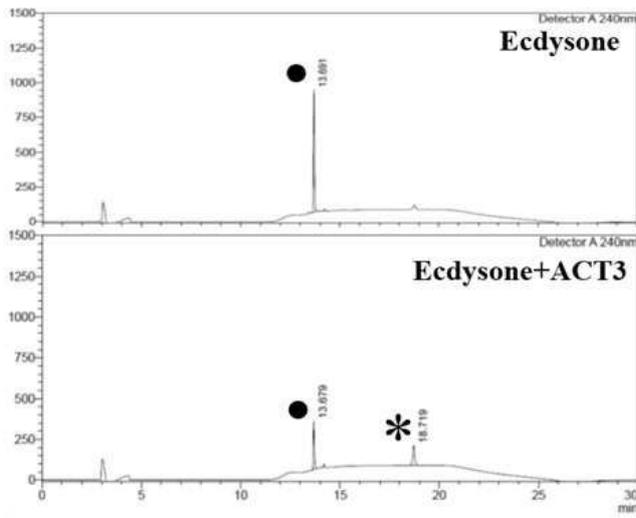
도면3



도면4

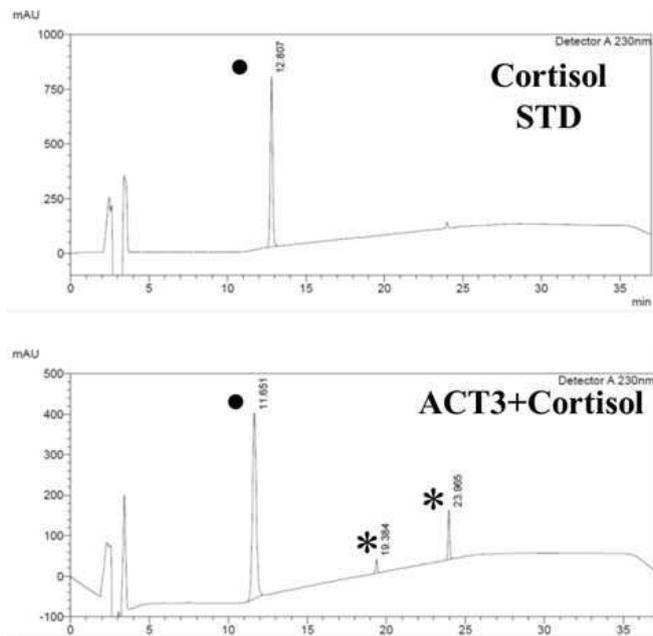


도면5



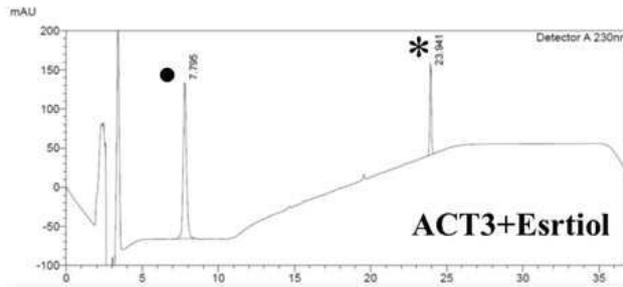
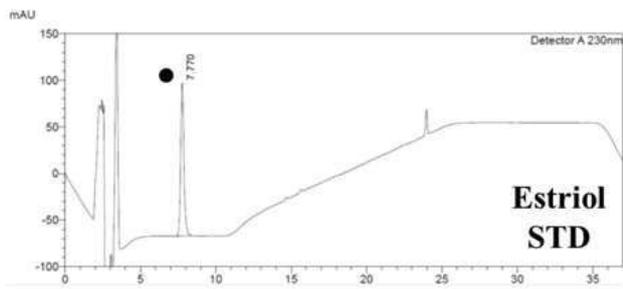
● : Cortisol * : New form of Cortisol

도면6



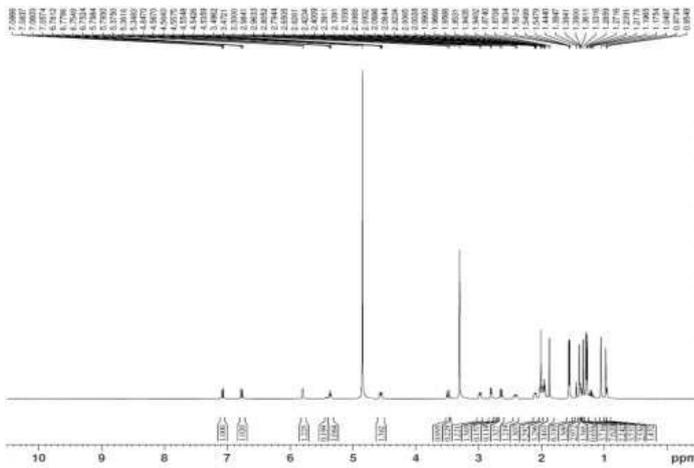
● : Cortisol * : New form of Cortisol

도면7

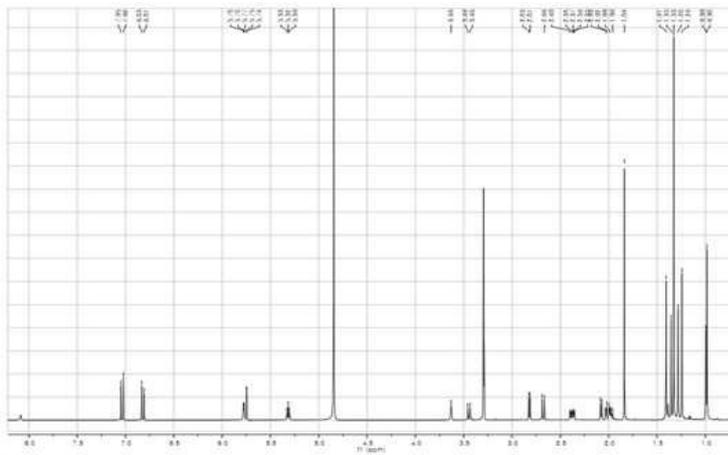


● : Estriol * : New form of Estriol

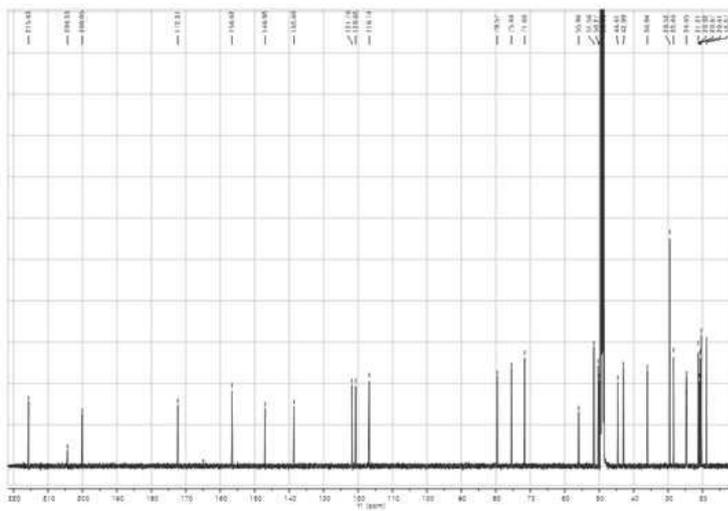
도면8



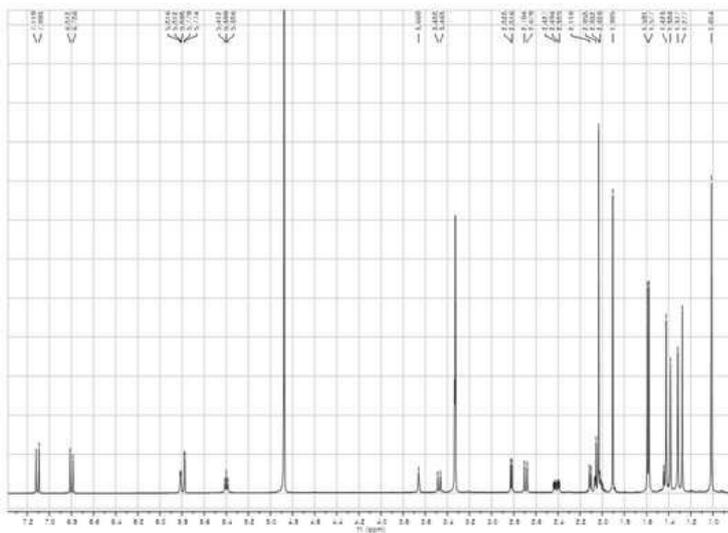
도면12



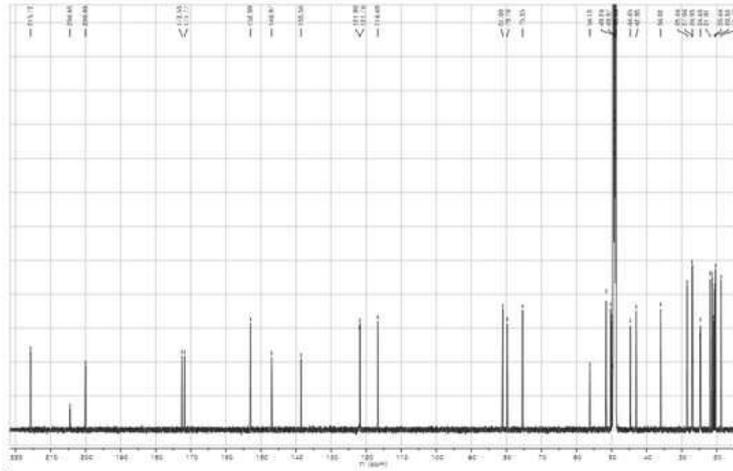
도면13



도면14



도면15



서열 목록

<110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION

<120> Novel protein and uses thereof

<130> 19P02014

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 437

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACT3

<400> 1

Met Gly Thr Met Asn Tyr Met Gln His Leu Gln Ile Val Ser Thr Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Phe Phe Phe Ser His His Gly His Gly Ser Gly Thr Cys Val Gln Leu

50 55 60

Leu Arg Arg Ser Leu Ser Met Thr Leu Ser Arg Tyr Tyr Pro Phe Ala

65 70 75 80

Gly Arg Ile Lys Asp Asn Val Ser Val Asp Cys Asn Asp Glu Gly Val

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

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

435
 <210> 2
 <211> 1314
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ACT3
 <400> 2

atggggacga tgaattacat gcaacacctt caaattgttt caacagaaac cattaacct 60

 tctttccaa ctctccaaa tctcaacct catacctct cctcttcga tcagctagcc 120
 cccacattt tcgtgcctct cgtgttcttc ttctcccacc acggtcacgg ttcgggtact 180
 tgcgtccaat tgcttcgac atctctttct atgactctat ctcggtacta cccatttgcg 240
 ggtaggatta aagacaacgt ctcggttgac tgtaacgatg agggggtgac ttttgtggag 300
 gctcggctcg agggcgtgac ggtgtcggag attttgaaa accctagaag tgagattgtg 360
 gaagtgttat ttgtgatgg gttgcaatgg aaagattcaa aaattggagc tttgttgaag 420
 gtcaaataa cgttttttga atgtggagga ttgagcattg gagtgatgct gtctcacagg 480

 cttggggatt tggcaacgtt agtgaagttc gtaaaagatt gggcagtcgt gactcgaac 540
 agcggttttt gggaagaaat tgtaaacccg ctttttaact ctgcggattt gttccccac 600
 ggcgacttac ccgcatgct cggcggctg gttgaagaag gaaatttcac gtgcaagagg 660
 ttcgtattcg aaggttcaaa gattgtatcc ctaaaaaata ggatttcaga gaaggtggag 720

aatccatctc gactggaagt tgtgtcagca ttaatttaca aagccatcat ttcagcttcg 780
 cgaaattccc aaaaccacc cactgttg ttacaaacac taaatttacg taaaagggtg 840
 gcgccgccgc tgccgaaag tttagtggga agtttagtgt cattcttccc ggtgggtgtg 900

ggcggagaaa gagaagtaat agagctgcat gatttggtgg gtacaatgag aaaagaaatg 960
 ggagagtttt gtaacaaata cgccaaaag tacagaacaa aagagtggcc tgaattgata 1020
 aaaagacgat taaatgaatc gagagaaatt ttgagcaaaa atgggaataa tcaattggtt 1080
 tatagattta gcagtggatg caattttcca atttatgaag tggattttgg gtggggagcg 1140
 gcggattggg ttactgtggc ggcgtttaag atgaaaaaca ccgtaatgat gttggacgcc 1200
 aaaaatggcg gcggaattga agctttggtc agtttacaag accacgaaat ggctgccttc 1260
 caacacaatc aggagcttct tgcttttgct tctttgaacc caagtgccaa ttaa 1314

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACT3_forward primer

<400> 3

caaatgggtc gcggatccat ggagtcagca ttgaaa 36

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ACT3_reverse primer

<400> 4

gtggtggtgg tgctcgaggt gttggagctg aagaac 36