(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 15/55

(11) 공개번호 특2002-0076562
(43) 공개일자 2002년10월11일

(21) 출원번호 10-2001-0016517
(22) 출원일자 2001년03월29일

(71) 출원인 최강열
서울시 서대문구 영천동 100번지 삼호아파트 104동 206호

(72) 발명자 최강열
서울시 서대문구 영천동 100번지 삼호아파트 104동 206호
김선홍
서울특별시용산구용산동2가43-1,1층
권형배
서울특별시마포구신공덕동삼성아파트111동1703호
김경섭
서울특별시영등포구여의도동삼익아파트B202
안용호
서울특별시양천구목동신시가지아파트414-401

(74) 대리인 이후동
구현서

심사청구 : 있음

(54) 항암활성을 갖는 이중특이적인 탈인산화효소

요약

본 발명은 항암활성을 갖는 이중 특이적인 탈인산화효소에 관한 발명으로, 더욱 상세하게는 초파리 뿐 아니라 포유류 ERK를 특이적으로 저해하는 초파리의 새로운 맵카이네이즈 탈인산효소에 관한 발명으로, 본 발명의 효소는 ERK를 특이적으로 저해하고, G_1에서 S로의 진행을 저해하여, 맵카이네이즈 경로가 관여하는 종양치료에 유효하게 적용할 수 있다.

대표도
도 6a

명세서

도면의 간단한 설명

도 1의 a는 DMKP-3로 명명된 Drosophila MAPK 포스파테이즈 cDNA 서열 및 아미노산 서열, 1b는 계통적 분석도, 1c는 결합자리 모티프 비교 그림.

도 2는 DERK, DJNK, 그리고 Dp38 MAPK 활성도 조절에서 DMKP-3의 역할을 보여주는 그림. 2a는 안정한 세포에서 생산된 DMKP-3 단백질은 휴지기 세포에서 포스포-DERK의 레벨을 생성되는 DMKP-3의 용량에 의존적으로 감소시되는 것을 보여 주고, 2b와 2c는 LPS 혹은 NaCl에 의해 증가된 포스포-DJNK 혹은 포스포-Dp38의 레벨은 심지어 고농도에서도 크게 낮아지지 않았다는 것을 보여주며, 2c는 Cys-302를 알라닌(DMKP-3-CA)으로 바꾼 돌연변이 발현에 의해 포스포-DERK 레벨이 크게 감소하지 않는다는 것을 보여주는 그림.

도 3은 포유류 MAPK 트랜스-리포터 및 ERK에 대한 DMKP-3의 효과를 보여주는 그림. 도 3a의 위쪽 그림은 DMKP-3 발현벡터의 트렌지언트 트랜스펙션이 Elk-1 의존 트랜스-리포터의 발현을 용량 의존적으로 낮추는 것을 보여주고, 3a의 중간 그림은 c-Jun 의존적 트랜스-리포터 (JNK의 활성화 의해 발현됨)는 심지어 고농도의 DMKP-3 발현벡터의 트랜스펙션에도 크게 영향을 받지 않는다는 것을 보여 주며, 3a의 하단 그림은 c-CHOP 의존적 트랜스-리포터 (Dp38의 활성화에 의해 발현됨)의 발현도 DMKP-3 발현벡터의 트랜스펙션에도 크게 영향을 받지 않는다는 것을 보여준다. 도 3b는 정제된 GST-DMKP-3 단백질이 정제된 GST-DMKP-3 레벨이 증가함에 따라 점차적으로 포유류 포스포-ERK를 탈인산화하고, 포스포-ERK에 대한 포스파테이즈 활성은 포스파테이즈 저해제인 바나데이트 나트륨에 의해 블록되는 것을 보여 주는 사진.

도 4는 DMKP-3과 DERK의 특이적 상호작용을 보여주는 그림. 도 4a는 B42-DMKP-3과 LexA-DERK의 동시발현은 DMKP-3와 ERK가 결합하는 것을 유전적으로 보여주는 지표인 β-갈락토시데이즈 활성을 크게 증가시키지만, B42-DMKP-3과 LexA-DJNK 또는 LexA-Dp38의 동시발현은 단지 낮은 증가만이 관찰되는 것을 보여주는 데이터로 DMKP-3가 DERK와 특이성 있게 결합하는 것을 보여주는 그림이고, 4b는 B42-DMKP-3-R56A/R57는 두 알기닌을 대체해서 결합친화도가 약 18배 약해지는 것을 보여주는 그림임. 이와같은 결과는 DMKP-3의 기질특이성을 지지하는 결과로써, DMKP-3가 자신의 N-말단의 펜타펩다이드 모티프 (특히 R56과 R57이 중요함)를 통해 ERK와 특이성있게 결합시키는 것을 보여주는 결과임.

도 5는 DMKP-3 단백질의 위치 및 발생 조절에 대한 그림. 도 5a는 휴지기 Schneider 세포에 존재하는 DMKP-3 레벨은 낮고, 세포질에서 검출되는 것을 보여주는 사진이고, 5b는 비록 성충이나 번데기뿐 아니라 배에서도 8-12시간대에 비교적 높은 수준으로 검출되지만, 발생단계를 통해 검출되는 DMKP-3 mRNA 수준이 매우 낮은 것을 보여주는 그림 임.

도 6은 DMKP-3이 세포크기의 감소없이 G_1에서 S로의 진행 (세포증식과 관련)을 저해하는 것을 보여주는 그림. 도 6a는 인슐린이 G1에서 S의 세포주기 진행을 촉진하고, G0/G1에서 세포 비율을 감소시키고, S 단계의 세포의 상대적 비율을 DMKP-3 및 DMKP-3-CA를 인위적으로 발현시키면, G_1에서 S로 진행되는 세포주기변화가 억제되는 것을 보여주는 그림이고, 도 6b는 인슐린 처리 유무에 따른 BrdU를 삽입한 세포의 %를 보여주는 그림으로, BrdU 삽입은 DMKP-3을 발현하는 세포에서 대부분 저해되어(도 6b, 하단), 인슐린을 처리하거나 처리하지 않은 DMKP-3을 발현하는 세포에서 각각 19%와 12%만이 BrdU를 삽입하는 것을 보인다(도 6b, 상단).

도 7은 포워드 라이트 스캐터(Forward light scatter)분석에 의해 측정된 배양된 Schneider 세포의 크기변화를 측정한 그림으로써, 인슐린에 의해 세포의 크기가 증가되나, DMKP-3를 발현하는 세포주나 DMKP-3-CA(활성화 돌연변이)를 생산하는 세포주 모두에서 영향을 받지 않음을 보여주는 그림이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 항암활성을 갖는 이중 특이적인 탈인산화효소에 관한 발명으로, 더욱 상세하게는 초파리 뿐 아니라 포유류 Extra-cellular regulated kinase(이하, "ERK"라 한다)를 특이적으로 저해하는 초파리의 새로운 맵카이네이즈 탈인산효소에 관한 발명이다.

최근 여러 형태의 종양의 발생과 진행을 이끄는 세포에서 일어나는 경로에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다. 특히 많은 연구들이 정상세포에 비하여 암세포에서 변경되고, 돌연변이된 유전자나 단백질를 밝히는데 집중되고 있다. 유전학적 연구는 여러 형태의 종양을 발생시킬 수 있는 돌연변이를 가진 유전자 훼밀리를 밝혀냈다.

맵 카이네이즈 경로는 성장 인자, 영양상태 및 스트레스와 같은 여러 세포외 자극에 반응하여 세포의 성장, 분화 및 에팝토시스에 대한 중요한 세포 네트워크이다. 맵카이네이즈 경로는 효모에서 인간에 이르는 진핵생물체를 통하여 보존된다. 최근에는 ERK, SAPK 및 p38의 세 주요한 맵카이네이즈 신호 경로가 포유류에서 밝혀졌고, 맵카이네이즈 경로 사이의 균형있는 신호전달이 세포의 운명과 항상성을 결정하는 중요한 요소이고, 이러한 맵카이네이즈 신호 경로에 이상이 있는 경우, 특히 신호전달계가 지나치게 활성화된 경우, 많은 종류의 인간 종양이 발생하는 것으로 잘 알려져 있다.

일반적으로 맵카이네이즈 경로에 관련된 종양의 치료에 사용되는 항암제는 미국특허 제5,420,245호에서와 같이 맵카이네이즈 신호 경로의 윗단계에서 관여하는 라스(Ras)의 세포외막으로 위치하는 것을 저해하는 파네실트랜스퍼레이즈의 억제제 등과 같은 항암제들이 일반적이다. 그러나 이러한 맵카이네이즈 신호 경로의 업스트림을 저해하는 항암제는 맵카이네이즈 신호 경로의 순 기능적인 작용인 정상세포의 성장이나 분화에도 저해하는 효과가 생기는 등의 여러 부작용을 동반할 수 있는 문제점이 있었다.

또한 라스 혹은 리셉터타이로신 카이네이즈(RYK) 등 윗단계의 단백질의 과발현이나 그들 유전자들의 돌연변이에 의해 발생하는 다양한 암에 효과적으로 작용하지 못하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기한 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의해 창출된 것으로서, 본 발명의 목적은 맵카이네이즈 경로의 아랫 단계에서 특이성있게 저해하는 새로운 종양치료제를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ERK를 특이적으로 저해하는 서열정보 1에 기재된 초파리의 새로운 맵카이네이즈 탈인산효소 유전자(이하, "DMKP-3"라 한다)를 제공한다.

또 본 발명은 상기의 유전자를 발현하기 위한 발현 벡터를 제공하며, 본 발명의 발현벡터는 프라즈미드 벡터가 바람직하며, 더욱 바람직하게는pOT2-DMKP-3, pMT/V5-DMKP-3, pPacPL-DMKP-3, pcDNA3.1-DMKP-3, 및 pB42AD-DMKP-3으로 구성된 군으로부터 선택된 1 종 이상의 발현벡터가 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기의 유전자에 의해 발현된 서열정보 2에 기재된 초파리의 새로운 맵카이네이즈 탈인산 효소를 제공한다.

본 발명의 맵카이네이즈 탈인산 효소는 포유류 또는 Drosophila의 ERK에 특이적으로 작용하며, G_1에서 S로 진행을 저해하는 것을 특징으로 한다.

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

마이토젠에 의해 활성화되는 단백질 인산화효소(Mitogen-activated protein kinase, 이하, "MAPK"라 함)경로는 성장인자, 사이토카인, 호르몬, 영양상태 및 스트레스와 같은 여러 세포외적 자극에 대해 세포의 성장, 분화 및 에팝토시스에 대한 중요한 세포 네트워크이다. ERK, JNK, 및 p38와 같은 다른 MAPK들을 이용하는 MAPK 경로가 포유류에서 밝혀졌고, 진핵생물체간에 잘 보존되어 있다(Blumer and Johnson, 1994. TIBS 19:232-240; Waskiewicz and Cooper, 1995. Curr.Opin.Cell Biol.7:798-805). MAPK 경로의 정확한 조절은 정상세포작용에 필수적이고, 신호경로의 잘못된 조절이 포유류에서 세포의 트랜스포메이션과 Drosophila에서 비정상적인 발생을 일으킨다. MAPK 경로는 신호경로의 다양한 수준에서 조절되고, MAPKs는 경로조절의 주요 타겟 중 하나이다(Haneda et al., 1999. Eur. J. Pharmacol.365:1-7). MAPKs 활성화는 여러 외부적 자극에 대해 보존된 모티프인 Thr-X-Tyr의 쓰레오닌과 타이로신 잔기의 인산화가 필요하다. MAPKs의 인산화는 타이로신 특이적인 MAPK 탈인산효소(MAPK phosphatase, 이하 "MKPs"라 함) 또는 이중특이적 MKPs에 의해 중재되는 가역과정이고, MAPKs 활성은 MAPK 인산화효소 및 MKPs의 활성의 균형에 의해 조절된다. 복합적인 MAPKs를 저해하는 MKPs가 밝혀졌고, 외부신호에 대한 세포의 항상성을 위한 균형있는 신호전달에 중요하다. 예를 들어, MKP-1 (CL100) 및 MKP-4는 ERK (Extra-cellular regulated kinase), JNK (c-Jun N-terminal kinase) 및 p38을 저해하고, PAC1은 ERK 및 p38 MAPK 들을 저해한다. 그러나 특정기질의 다운-레귤레이션에 관여하는 MKP 들도 밝혀졌다. 예를 들어, MKP-3 및 VHR은 ERK만 특이적으로 저해한다(Camps et al., 1998. FASEB J.14:6-16).

MAPKs의 활성화와 같이, MKP 들에 의한 MAPK 들의 조절기작은 효모 및 Drosophila을 포함한 진핵생물체를 통하여 잘 보존되어있다(Keyse, 1995. Nature. 359:644-647). 그러나, MAPKs의 다운-레귤레이션에 관여하는 MKPs는 Drosophila에서는 잘 밝혀지지 않았다. Drosophila ERK(DERK)의 다운레귤레이션에 관여하는 단백질 타이로신 탈인산효소 중의 하나가 최근 밝혀졌으나, 그 생리적인 기능은 밝혀지지 않고 있다(Lee et al., 2000. Biochem. J.349:821-828). Drosophila MAPK 경로는 포유류에서 볼수 있는 수용체 타이로신 카이네이즈-Ras-ERK 경로를 사용한다(Duffy and Perrimon, 1996. Curr. Opin. Cell. Biol. 8:231-238). 비록 포유류에서 ERK가 세포 증식에 중요한 인자이고, 세포주기 조절의 유도 및/또는 활성화를 통하여 세포성장을 조절한다는 것이 밝혀졌지만(Kerkhoff and Rapp, 1998. Oncogene 17:1457-1462), Drosophila에서 세포 증식에서 DERK의 역할은 밝혀지지 않았다.

본 발명에서는 우리는 in vitro와 in vivo에서 ERK에 대한 큰 기질특이성을 갖는 새로운 Drosophila MKP인 DMKP-3을 발견하여, 그 특성을 밝혔다. DMKP-3의 야생형과 촉매기능을 소실한 돌연변이 모두의 기능적 분석을 통해, DERK가 세포크기와 독자적으로, G_1에서 S단계의 조절을 통해서 세포의 증식에 관여한다는 것을 알았다.

이하, 본 발명을 비한정적인 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명한다.

실시예 1: DMKP-3의 서열특성 및 다른 이중 특이성 MKPs와의 비교

1) 새 Drosophila MAPK 인산화효소 cDNA의 동정과 클로닝

이중(dual) 특이적인 맵카이네이즈 탈인산효소(이하 "MKP"라 한다) 아미노산 서열를 갖는 Drosophila dbEST의 조사에 의해, 공지된 MKP의 촉매 도메인과 큰 상동성을 갖는 cDNA 절편을 얻었다. C-말단 cDNA 클론(GM13896)는 Research Genetics, Inc.(Huntsville, AL)에서 얻었고, N 말단이 결손된 cDNA는 pBlueScript SK(Stratagene)의 T3 프라이머인 5′-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3′ 및 Drosophila cDNA의 내부 서열 프라이머인 5′-GTAGCATTCGCCAGATGG-3′을 이용한 PCR에 의해 클로닝하였다.

2) 프라스미드의 제조

N 말단 Drosophila MKP 서열을 갖는 1.3kb PCR산물은 pBlueScript SK(Stratagene)의 EcoRV 자리에 서브 클로닝하여 pBS-N-DMKP-3을 제조하였다. 전 오픈 리딩 프레임에 대한 cDNA를 생산하기 위해 cDNA의 C말단 cDNA 절편(GM13896)을 갖는 pOT2벡터의 SmaI/SphI 자리에 서브-클로닝하였다. 대장균 DMKP-3발현벡터인 pGST-DMKP-3은 pGEX2TK(Pharmacia)의 EcoRI 자리에 pOT2-DMKP-3의 1.6kb의 절편을 삽입하여 제조하였다. Drosophila DMKP-3 발현벡터인 pPacPL-DMKP-3은 pPacPL의 XbaI-NotI에서 프라이머 5′- GGAATTCGGCTCTAGACCATGGCAGAAACGGAGCACGA-3′, 프라이머 5′- GGCAACGGCGATGTGGCGGCCGCTGCAAATGGGATCTC-3′ 및 주형으로 pOT2-DMKP-3을 사용하여 PCR을 통하여 얻었다. 포유류 DMKP-3 발현벡터인 pcDNA3.1-DMKP-3은 pcDNA3.1(Invitrogen)의 EcoRI 자리에 1.6kb의 pOT2-DMKP-3 절편을 갖는다. 구리에 의해 유도되는 pMT/V5-DMKP-3 벡터는 pMT/V5-C(Invitrogen)의 EcoRI 자리에 1.6kb의 pOT2-DMKP-3 절편을 갖는다. 프라이머로 5′-CGGCACGAATTCATGCCAGAAACGGAGCAC-3′와 5′- GCCACTCTCGAGTCATTTAAGACCCGTGTCCG-3′를, 주형으로는 pOT2-DMKP-3을 사용하여 얻은 두 하이브리드 벡터 pB42AD-DMKP-3은 pB42AD(Clonetech)의 EcoRI-XhoI 자리에 있다. pB42AD-DMKP-3(1-239)는 pB42AD의 EcoRI-XhoI 자리에서 프라이머로 5′-CGGCACGAATTCATGCCAGAAACGGAGCACG-3′와 5′-ATACTTCTCGAGTCACTTCTTCAACGCTTCCGAG-3′ 및 주형으로 pOT2-DMKP-3을 사용하여 PCR한 DMKP-3을 제조하였다. pB42AD-DMKP-3(210-411)는 pB42AD의 EcoRI-XhoI 자리에서 프라이머로 5′-CACAGTGAATTCAATTACAACGAGGCGCCCG-3′와 5′-GCCACTCTCGAGTCATTTAAGACCCGTGTCCG-3′ 및 주형으로 pOT2-DMKP-3을 사용하여 PCR한 DMKP-3을 갖는다. pLexA-DERK는 pLexA의 EcoRI 자리에 프라이머로 5′-GAAACGGAATTCATGGAGGAATTTAATTCGAGCG-3′와 5′-TACAGCGAATTCTTAAGGCGCATTGTCTGGTTGTC-3′ 및 주형으로 pPacPL-His-DERK를 사용한 PCR 유도된 DERK를 갖는다. pLexA-DJNK는 pLexA의 BamHI-XhoI 자리에 프라이머로 5′-ATCAGTGGATCCTGACGACAGCTCAGCACCAACAC-3′와 5′-AAAAGTCTCGAGCTACCGCGTTCTATTATTTGTATTG-3′ 및 주형으로 pPacPL-His-DJNK를 사용한 PCR 유도된 DJNK를 갖는다. pLexA-Dp38은 pLexA의 BamHI-XhoI 자리에 프라이머로 5′-TCAAGCGAATTCATGTCAGTGTCCATTACAAAAAAG-3′와 5′-GATGGTCTCGAGTCACTTTACATCCTTTAGAACC-3′ 및 주형으로 pPacPL-His-Dp38을 사용한 PCR 유도된 Dp38을 갖는다. 모든 다른 돌연변이 유도체는 각 돌연변이 벡터를 사용한 동일한 서브클로닝 방법에 의해 제조하였다.

3) 뉴크레오타이드 시퀀싱 및 유전자 구조 분석

DNA 시퀀싱은 Sanger 다이데옥시 체인 터미네이션 방법에 의해 진행하였고, 계통발생분석을 포함한 뉴크레오타이드 및 아미노산 서열 정렬은 벡터 NTI 버전 6.0.1 프로그램(InforMax Inc, MD)를 사용하였다.

상기 실험의 결과는 다음과 같다.

DMKP-3로 명명된 Drosophila MAPK 포스파테이즈 cDNA에 대한 새로 밝혀진 유전자는 약 45.7kDa의 분자량을 갖는 411 아미노산의 오픈 리딩 프레임을 갖는다(도 1a). 계통적 분석으로는 DMKP-3는 ERK를 특이성 있게 저해하는 것으로 알려져 있는 포유류 MKP-3와 밀접성을 갖고(도 1b), 총 아미노산 서열 동일성은 33.3%(44.8%포지티브 동일성)이다. DMKP-3 유전자는 N 말단 Cdc25상동성(CH2) 지역과 기질 결합에 대한 결합자리뿐 아니라 크게 보존된 넓은 활성자리를 갖는다(도 1 c). 비록 DMKP-3과 다른 MKPs와의 아미노산 서열 유사성이 N 말단에서 비교적 낮다고 하더라도, MKP-3에 의해 24.6%정도의 최고 서열 유사성을 갖는다. 결합 자리 모티프 내에서 ERK 결합에 관여하는 MKP-3의 펜타펩타이드 서열인 " IMLRR" 은 DMKP-3에서 " IVLRR" 로 잘 보존되어있다(도 1c).

실시예 2: MAKPs 조절에서 DMKP-3의 역할

1) 사이트 디렉티드 뮤타제네시스

DMKP-3의 사이트 디렉티드 뮤타제네시스는 PCR 베이즈 방법(Stratagene)을 사용하였다. DMKP-3-CA에 관한 앞쪽 프라이머로 5′-GAAACTCCGGCCAGGGCGTGGACCAGC-3′를, DMKP-3-CS에 관한 앞쪽 프라이머로 5′-GGTGCTGGTCCACTCCCTGGCCGGAG-3′를, DMKP-3-A56R/A57R에 관한 앞쪽 프라이머로 5′-CCCAGCATCGTCCTCGCGGCCCTGGCGGTTGGC-3′를 사용하였다. 뮤타제네시스에 사용한 뒤쪽 프라이머는 각 앞쪽 프라이머에 관한 상보적가닥이다. 돌연변이된 자리를 포함한 전 DMKP-3 서열은 염기서열분석에 의해 확인하였다.

2) 재조합 단백질들 및 항체 생산

GST-DMKP-3 단백질은 pGST-DMKP-3로 형질전환된 대장균에서 과발현하여 글루타치온 아가로스 비드(Sigma)로 정제하였다. DMKP-3 항체는 Lee 등의 방법(Biochem.J.349:821-829)에서와 같이, 정제된 GST-DMKP-3을 토끼에 면역화하여 제조하였으며, 정제하여 이용하였다.

3) 안정한 DMKP-3 세포주 및 세포배양의 제조

구리에 유도되는 DMKP-3, DMKP-CA 또는 DMKP-3-CS를 갖는 안정한 Schneider세포는 Lee 등의 방법(Biochem.J.349:821-829)에서와 같이, pMT/V5-DMKP-3(돌연변이 프라즈미드) 및 pCoHygro 벡터를 사용하여 제조하였다. Schneider 세포는 Schneider's Insect Media(Sigma)에서 배양하였고, Schneider 세포에서 DMKP-3의 유도 및 DJNK 및 Dp38의 활성화는 Lee 등의 방법(Biochem.J.349:821-829)에서와 같다. DERK의 활성화는 10μg/ml로 인간 인슐린을 5분간 처리하여 유도였다(Clemens et al., P.N.A.S. 97:6449-6503).

4) 웨스턴 블릿

웨스턴 블릿 분석은 Lee 등의 방법(Biochem.J.349:821-829)에서와 같이 수행하였다. 엔도지너스 DERK, DJNK 및 Dp38의 활성화는 포스포-특정 항-ERK, JNK 또는 p38 MAPK 항체(New England Bio Labs)를 사용하여 분석하였다. α-튜브린은 항-α-튜브린 항체(Calbiochem)를 사용하여 대조군으로서 검출하였다. 블릿은 horseradish peroxidase(HRP)-연결된 염소 항-마우스 IgG(Bio Rad) 및 염소 항-토끼 IgG(Promega) 이차항체로 프로브하였고, enhanced chemiluminescence(ECL)시스템(Genepia)을 이용하여 발광시킨 후, X-레이 필름에 감광한 뒤 현상하였다.

상기의 실험에 관한 결과는 다음과 같다.

안정한 세포에서 생산된 DMKP-3 단백질은 휴지기 세포에서 포스포-DERK의 레벨을 용량 의존적으로 감소시켰다(도 2a). 인간 인슐린으로 Schneider 세포의 자극은 DERK 및 DPI3K-DAkt 신호경로의 활성을 증가시켰다(Clemens 등, 2000). 따라서 인간 인슐린으로 Schneider 세포를 자극하여 DMKP-3이 인슐린에 의해 DERK 활성을 저해하는지를 확인하였다. 도 2A에서 볼수 있는 바와 같이, 인슐린은 Schneider 세포에서 DERK 활성을 2-3배 가량 증가시켰고, DMKP-3의 발현도 인슐린에 의해 증가되었던 포스포-DERK의 레벨을 용량 의존적으로 감소시켰다.

포스포-DERK와 다르게, LPS에 의해 증가된 포스포-DJNK의 레벨은 심지어 고농도에서도 크게 낮아지지 않았다(도 2b). 또 DMKP-3도 NaCl에 의해 증가된 포스포-Dp38의 레벨을 낮게 하지 않았다(도 2b). DMKP-3의 보존된 활성화 부위 내에 존재하는 Cys-302는 MKP 계열의 포스파테이즈 들에서 완전히 보존되어 있으며, 촉매작용을 위해 필수적이다. DERK 조절에 있어서, DMKP-3역할의 을 알기 위해, Cys-302를 알라닌(DMKP-3-CA) 및 세린(DMKP-3-CS)바꾼 돌연변이를 제조하였고, 그들 돌연변이 단백질을 발현할 수 있는 안정한 세포주를 제조하여 DERK 활성의 조절에 관한 그들의 활성을 조사하였다. 포스포-DERK 레벨은 심지어 고농도의 DMKP-3-CA 돌연변이 발현에서도

현저하게 낮아지지 않고, 심지어 고농도의 DMKP-3-CS 돌연변이 발현에서도 매우 낮게 낮아졌다(도 2c).

실시예 3: 포유류 MAPK 트랜스-리포터 및 ERK에 대한 DMKP-3 효과

1) PathDetect Trans-Reporting System 및 루시퍼레이즈 분석

in vivo에서 MAPK 경로의 활성화 상태를 검출하기 위해, 제조업체(Stratagene)에서 기술한 방법과 같이, Pathfinder Trans-reporting system을 사용하였다. 포유류 CV-1 세포는 100유닛/ml의 페니실린 및 100 μg/ml의 스트렙토마이신뿐 아니라 10%(v/v)FBS를 갖는 DMEM 배지에서 배양하였다. CV-1세포는 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 18시간 혈청없이 배양 후, 3x 10^7 세포를 pFR-Luc 및 융합 트랜스-액티베이터 프라즈미드(pFA-Elk-1, pFA2-Jun, 또는 pFA-CHOP)를 CMV-β-gal 대조벡터와 함께 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션은 Lipofectamin plus 시약(Gibco BRL)을 사용하여 매뉴얼에 따라 수행하였다. 모든 루시퍼레이즈 활성은 β-갈락토시데이즈 활성의 수준으로 표준화하였다.

2) 포스파테이즈 분석

In vitro DMKP-3 포스파테이즈 분석은 여러 다른 양의 정제된 GST-DMKP-3 단백질과 5 ng의 정제된 포유류 포스포-ERK (Stratagene)를 혼합하여 25μℓ의 포스파테이즈 어세이 버퍼(50mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 10mM DTT)에서 수행하였다. 반응은 30℃에서 30분간 행하였고, 샘플버퍼를 가하여 중지한 다음, 항-포스포-ERK 또는 항-ERK 항체로 웨스턴 블럿을 행하였다.

상기 실험의 결과는 다음과 같다.

DMKP-3의 in vivo 기질 특이성을 알기 위해, 전사인자, Elk-1, c-Jun 및 c-CHOP에 반응하는 MAPK 경로에 대한 포유류 트랜스-리포터를 이용하였다. 도 3a에서 볼 수 있는 바와 같이, DMKP-3 발현벡터의 트렌지언트 트랜스펙션은 Elk-1 의존 트랜스-리포터의 발현을 용량 의존적인 형태로 낮추었다(도 3a, 위쪽). 반면, Elk-1 의존적 트랜스-표지 유전자 발현은 DMKP-3-CS 유도에 의해 부분적으로만 저해되었고, 이것은 DERK 포스파테이즈 어세이 결과와 일치하였다(도 2c). Elk-1과 다르게, JNK의 독특한 활성상태를 대표하는 c-Jun 의존적 트랜스-리포터는 심지어 고농도의 DMKP-3 발현벡터의 트랜스펙션에도 크게 영향을 받지 않았고(도 3a, 중간), p38 MAPK의 활성상태를 대표하는 c-CHOP 의존적 트랜스-리포터도 DMKP-3 발현벡터의 트랜스펙션에도 크게 영향을 받지 않았다(도 3a, 하단). DMKP-3에 의한 포유류 ERK의 불활성화의 직접적 증거를 얻기 위해, 대장균에서 GST 융합단백질(GST-DMKP-3)로 전장 DMKP-3을 얻어서, 포스파테이즈 어세이를 위해 글루타치온 아가로스 컬럼으로 정제하였다. 정제된 GST-DMKP-3 단백질에 기질로 활성화된 포유류 ERK(포스포-ERK)를 첨가하여 직접 분석하였다. 도 3b에서 볼 수 있는 바와 같이, 정제된 GST-DMKP-3 단백질은 정제된 GST-DMKP-3 레벨이 증가함에 따라 순차적으로 포유류 포스포-ERK를 탈인산화하고, 포스포-ERK에 대한 포스파테이즈 활성은 포스파테이즈 저해제인 바나테이트 나트륨에 의해 블록되었다.

실시예 4: DMKP-3과 DERK의 특이적 상호작용(결합)

EGY48(MATα his3 trp1 ura3 lexAop(x6)-LEU2)효모 세포를 p8op-lacZ 표지 벡터(Clonetech)뿐 아니라 pLexA 및 pB42AD 베이스 벡터로 형질전환시켜서 우라실, 히스티딘 및 트립토판이 결핍된 합성배지(SC-Ura His Trp) 플레이트에서 선택하였다. β-갈락토시데이즈 어세이를 위해, 프라즈미드를 가지고 있는 균주를 선택배지에서 30℃로 밤새 배양한 후 2%갈락토스 및 1% 라피노스를 갖는 후레쉬 배지로 1/6배로 희석한 다음, β-갈락토시데이즈 활성을 측정하기 위해 세포추출물을 제조하기 전에 30℃에서 5시간 세포를 키웠다. 액체 어세이를 위해 각 4개의 형질전환체를 선택하였다.

이 실험의 결과는 다음과 같다.

DERK에 대한 DMKP-3 특이성을 알기 위해, 준-정량적인 방법인 효모를 이용한 투 하이브리드 어세이를 사용하였다. 전장 DERK, DJNK 혹은 Dp38 유전자 전체를 LexA DNA-결합 도메인에 각각 융합하여 p8op-LacZ 표지 프라즈미드를 사용한 전사 활성화 도메인(" B42")에 융합된 DMKP-3과의 결합을 알아보았다. B42-DMKP-3과 LexA-DERK의 동시발현은 β-갈락토시데이즈 활성을 크게 증가시켰지만, B42-DMKP-3과 LexA-DJNK 또는 LexA-Dp38를 동시에 발현시켰을 경우에는 단지 낮은 β-갈락코시데이스 활성 증가만이 관찰되었다(도 4a). DERK 결합에 관여하는 DMKP-3 도메인을 알기 위해, 각각 DMKP-3의 N 말단(1-239) 또는 C 말단(210-411) 도메인을 B42 전사 활성화 도메인에 융합하여서, DERK와 N 말단 또는 C 말단 도메인 펩타이드의 결합 활성을 측정하였다. LexA-DERK를 함께 발현시켰을 때, B42-DMKP-3(1-239잔기)융합 펩타이드는 β-갈락토시데이즈 활성을 크게 증가시켰지만, LexA-DERK와 함께 B42-DMKP-3(210-411잔기)융합 펩타이드의 발현으로 인한 결합활성은 크게 증가하지 않았다. 포유류 MKP-3에서 N-말단 펜타-펩타이드 서열내의 두 알기닌(64와 65번)잔기가 ERK 결합에 중요하고, 이것은 DMKP-3에서도 보존되어있어서, 본 발명자들은 " IVLRR" 펜타펩타이드에서 Arg-56 및 -57을 Ala으로 바꾼 알기닌 돌연변이를 갖는 B42-DMKP-3-R56A/R57 융합 벡터를 제조하여 돌연변이 융합단백질이 LexA-DERK와 상호작용하는지를 살펴보았다. 도 4b에서 볼 수 있는 바와 같이, B42-DMKP-3-R56A/R57는 두 알기닌을 대체해서 결합친화도가 약 18배 약해졌다.

실시예 5: DMKP-3 위치 및 발생조절

1) 면역세포화학(Immunocytochemistry)

구리 유도적 DMKP-3을 갖는 안정한 세포를 커버슬립에 플레이트하였다. 다음 날 $CuSO_4$를 1mM 처리한 후 세포를 24시간 더 배양하였다. 세포를 100%메탄올로 -20℃에서 10분간 고정시키고 투과시킨 후 1% BSA와 5% 염소 혈청을 갖는 PBS로 상온에서 30분간 배양해서 블록시켰다. 커버스립을 1:100의 블록 용액으로 희석된 DMKP-3 항체로 2시간 배양한 후 PBS로 3회 세척하였다. 이차 항체반응은 염소 항-토끼 로다민-부착된 IgG 이차 항체(1:100희석;Jackson)를 갖는 50% 글리세롤 용액으로 1시간 행하였다. PBS로 수회 세척 후, 슬립을 고정시키고 Radiance2000/MP(Bio-Rad, UK)위에서 사진을 찍었다.

2) mRNA의 정량화

여러 Drosophila 조직 및 발생 단계에서 얻은 mRNA에서 합성된 DNA 없는 일차 cDNA를 갖는 Drosophila rapid-Scan™ Gene Expression panel(Origene)를 사용하여, DMKP-3 센스 프라이머는 5′-GCAAGGAGTGGCTGCAGTCC-3′, 앤티센스 프라이머는 5′-GGGATTATCTCTACGGGCGC-3′인 두 내부적 DMKP-3 프라이머를 사용한 제조업자의 지시에 기재된 것에 따라 PCR을 행하였다. 15 μℓ의 PCR산물을 0.5 μg/ml의 EtBr을 갖는 아가로스 젤 전기영동으로 분리하여 조사하였다.

상기 실험의 결과는 다음과 같다.

MKP-3는 세포질에만 존재하므로, 본 발명자들은 정제된 항-DMKP-3 항체를 사용하여 DMKP-3의 위치를 조사하였다. 휴지기 Schneider 세포에 존재하는 DMKP-3 레벨은 낮고, 세포질에서 검출되었다(도 5a). 단백질이 과생산될 때도 DMKP-3 및 DMKP-3-CA 단백질은 여전히 세포질에 위치한다(도 5a). 비록 성충이나 번데기뿐 아니라 배에서도 8-12시간 비교적 높은 수준으로 검출되지만, 발생단계를 통해 검출되는 DMKP-3 mRNA 수준은 매우 낮다(도 5b). 표준화를 위해 검출된 RP49 mRNA 수준은 거의 같다.

실시예 6: DMKP-3의 $G1_1$/S 저해

훌로우 사이토메트리를 위해, DMKP-3 및 DMKP-3-CA 안정한 세포주를 10%FBS를 갖는 Schneider 배지에서 50% 정도로 세포가 자랄 때 까지 키웠다. FACS(fluorescent activating cell sorting)분석을 위해 세포를 모으기 전에 세포를 DMKP-3 또는 DMKP-3-CA 유도를 위해, 1 mM $CuSO_4$를 처리하여, 69시간 키웠다. 일부는 세포를 모으기 전에 10 μg/ml의 인간 인슐린으로 24시간 처리하였다. 6-웰 플레이트로부터 얻은 세포를 PBS로 2회 세척하고 70% 에탄올을 첨가하여 고정하였다. 세포를 1% 말 혈청을 갖는 PBS로 세척한 후, DNA를 100μg/ml의 프로피디움 아요다이드로 4℃에서 30분간 염색하였다. 세포주기 프로파일 및 FCS는 Becton Dickinson FACS Caliber를 사용하였고, 자료는 ModFit LT 2.0(Verity Software House, Inc., ME) 및 WinMDI2.8(Scripps Research Institute, CA)를 사용하여 분석하였다. BrdU 삽입 연구를 위해, Schneider 세포를 6 웰-플레이트의 커버슬립에서 60% 정도로 세포가 차도록 23℃에서 키웠다. 그들을 7 μg의 pPacPL 벡터, pPacPL-DMKP-3 또는 pPacPL-DMKP-3-CA를 가지고, Han 등의 방법(J.Biol.Chem. 273: 369-374, 1998)에 따라 인산칼슘으로 트랜스펙션하였다. 24시간 후, 세포를 10% FBS를 갖는 후레쉬 배지로 세척하고 10 μg/ml의 인간 인슐린을 가진 배지 또는 인슐린이 없는 배지로 24시간 배양하였다. BrdU 레이블을 4시간 행한 후, 세포를 메탄올/포름알데히드(99:1)으로 -20℃에서 15분간 고정한 후 0.2% Triton-X100를 갖는 PBS로 5분간 세척하였다. 슬립을 항-DMKP-3 항체(1:100)으로 배양한 후, 로다민이 부착된 항-토끼 이차 항체(1:100)로, 배양하였다. 세포를 상온에서 10분간 3.7% 포름알데히드로 고정하고, PBS로 세척 후, BrdU 항체에 2M HCl로 30분간 처리하였다. 이후 슬립을 PBS로 5회 세척 한 후 1% BSA 및 5% 염소 혈청을 갖는 PBS로 블록시켰다. 세포를 블록 용액에서 항-BrdU 단클론 항체(Jackson)로 배양한 후, Cy2 부착된 이차 항체(Jackson)의 혼합액에 배양하였다. DNA 염색을 위해, 고정된 세포를 1 μg/ml의 4',6'-Diamidine-2-phenylindole dihydrochloride(Boehringer Mannheim)으로 염색하였다. 각 실험은 적어도 3회 실시하였다.

상기 실험의 결과는 다음과 같다.

본 발명의 발명자들은 인간 인슐린이 Schneider 세포의 증식과 크기 증가 모두를 촉진시킨다는 것을 발견하였다. 따라서, DERK가 인슐린 경로에 의해 Drosophila Schneider 세포의 증식과 크기 증가의 조절에 관여하는지를 알기 위해, 인슐린을 처리하여, G1에서 S로 진행하는 세포의 비율을 분석하여 세포주기 진행을 모니터하였고, DMKP-3 발현의 효과를 조사하였다. 인슐린은 G1에서 S의 세포주기 진행을 촉진하고, G0/G1에서 세포 비율을 감소시키고, S 단계의 세포의 상대적 비율을 DMKP-3 및 DMKP-3-CA 모두에서 유사하게 증가시켰다(도 6a). 인슐린에 의한 G1에서 S로 진행은 $CuSO_4$와 DMKP-3의 유도에 의해 크게 블록되어, S 단계에서의 세포의 비율은 18.5% 정도가 감소하였다(도 6a). DMKP-3-CA는 DERK 포스파테이즈 활성의 대부분을 잃었지만, G1에서 S로 진행의 저해능력의 일부는 가지고 있어서, 인슐린처리 세포에서 $CuSO_4$와 DMKP-3의 유도에 의해 약 9.9% 감소하였다(도 6a). $CuSO_4$의 효과를 피하고, G1에서 S로 진행의 조절에서 DMKP-3의 작용을 확인하기 위해, 트렌지언트 발현에 의한 DMKP-3 단백질을 발현하였고, 브로모데옥시유리딘(BrdU) 삽입을 모니터함으로써, G_1에서 S로의 세포주기 진행을 측정하였다. 본 발명의 세포성장 조건에서 약 33%의 세포가 BrdU를 삽입하였고, BrdU를 삽입한 세포의 %는 인슐린처리로 60% 증가하였고(도 6b), 이것은 인슐린이 DNA 합성에 분명한 효과를 갖는다는 것을 나타낸다. BrdU 삽입은 DMKP-3을 발현하는 세포에서 대부분 저해되어(도 6b, 하단), 인슐린을 처리하거나 처리하지 않은 DMKP-3을 발현하는 세포에서 각각 19%와 12%만이 BrdU를 삽입한다(도 6b, 상단). BrdU를 삽입한 세포의 %는 인슐린처리하지않고, DMKP-3-CA를 발현하는 세포에서 감소하지 않는다(도 6b). 그러나, BrdU를 삽입한 세포의 %는 인슐린을 갖는 배지에서 성장하는 DMKP-3-CA를 발현하는 세포에서 60%에서 35%로 다소 낮아진다. 따라서 DMKP-3-CA 돌연변이는 인슐린으로 자극된 세포에서 G1에서 S로 진행에 대해 부분적인 저해효과를 갖는다. 따라서, DMKP-3이 G_1에서 S로의 진행을 저해하여 Schneider 세포의 인슐린 촉진된 증식을 저해한다는 것이 명백하다.

포워드 라이트 스캐터(Forward light scatter)분석에 의해 측정된 배양된 Schneider 세포의 크기는 DMKP-3 또는 DMKP-3-CA발현 유전자를 갖는 세포 모두에서 각각 인슐린처리에 의해 크게 증가하였다(도 7, 상단). 그러나 크기 증가는 $CuSO_4$에 의한 DMKP-3 또는 DMKP-3-CA의 유도에 의해 크게 저해되지 않았다(도 7, 상단과 중간부분 비교). $CuSO_4$의 처리 자체는 DMKP-3 또는 DMKP-3-CA 안정된 세포에 대한 크기를 변화시키지 않는다(도 7). 전체적으로 본 발명은 DERK가 세포의 크기가 아니라 세포의 증식을 이끄는 신호전달에서 중요한 역할을 한다는 것을 밝혔다.

발명의 효과

본 발명은 Drosophila와 포유류 세포에서 ERK에 대한 높은 기질특이성을 갖는 새로운 Drosophila MKP인 DMKP-3에 관한 발명으로, 이를 맵카이네이즈 경로에 관여하는 효소의 조절의 이상을 가진 특히 ERK 의 조절의 저해로 인해 생긴 종양에 본 발명의 유전자를 전이시켜서 종양의 치료에 이용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

ERK를 특이적으로 저해하는 서열정보 1에 기재된 초파리의 새로운 맵카이네이즈 탈인산효소 유전자.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 상기의 유전자를 발현하기 위한 발현 벡터.

청구항 3.

제 2 항에 있어서,

상기의 발현벡터는 pOT2-DMKP-3, pMT/V5-DMKP-3, pPacPL-DMKP-3, pcDNA3.1-DMKP-3, 및 pB42AD-DMKP-3으로 구성된 군으로부터 선택된 1 종 이상의 발현벡터인 것을 특징으로 하는 발현 벡터.

청구항 4.

제 1 항의 유전자에 의해 발현된 서열정보 2에 기재된 초파리의 새로운 맵카이네이즈 탈인산 효소.

청구항 5.

제 1 항에 있어서,

상기의 ERK는 포유류 또는 Drosophila인 것을 특징으로 하는 맵카이네이즈 탈인산효소.

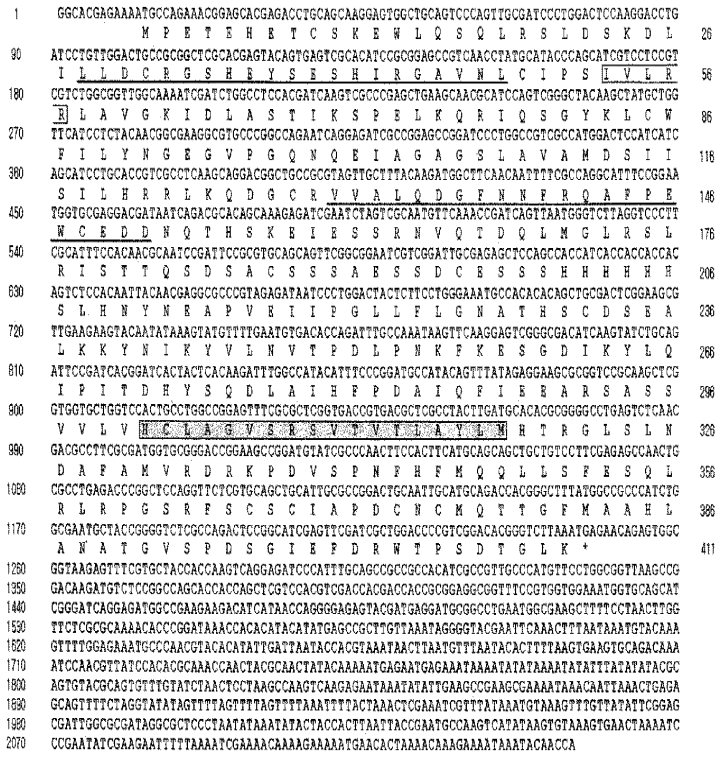
청구항 6.

제 1 항 또는 제 4 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

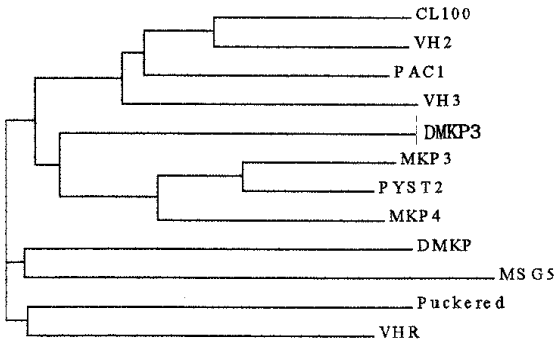
상기의 탈인산효소는 G_1 에서 S로 진행을 저해하는 것을 특징으로 하는 탈인산효소.

도면

도면 1a



도면 1b

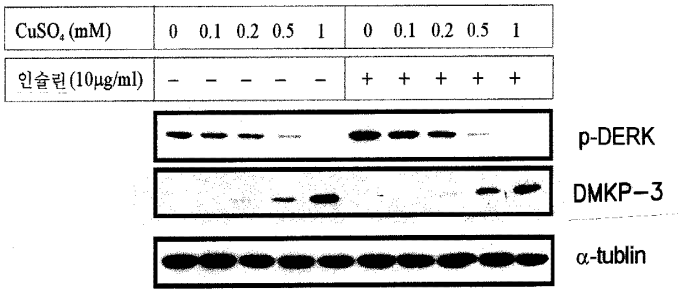

CL100
VH2
PAC1
VH3
DMKP3
MKP3
PYST2
MKP4
DMKP
MSG5
Puckered
VHR

도면 1c

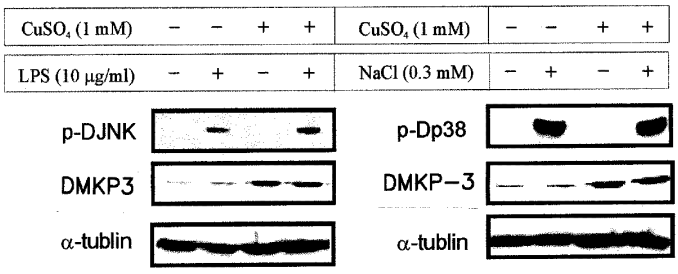
결합자리 모티프

DMKP3	(51)	PSIVL**RR**LAVG**K**IDLA
MKP3	(59)	PGIML**RR**LQ**K**GNLPVR
MKP4	(46)	LPALLL**RR**L**RR**GSLSV
PAC1	(50)	PWNALL**RRR**A**R**ARGPP
PYST2	(1)	PGLML**RR**L**RK**GNLPIR
hVH2	(68)	RCNTIV**RRR**A**K**GSVSL
hVH3	(46)	NLNSVVL**RR**A**R**GGAVS
CL100	(47)	RFSTIV**RRR**A**K**GAKGA

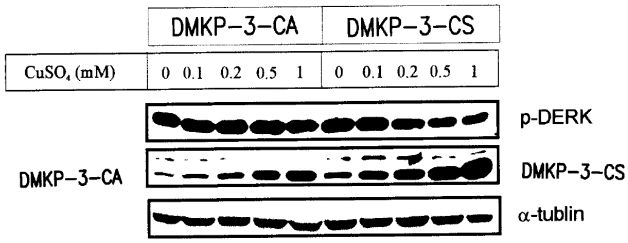
도면 2a



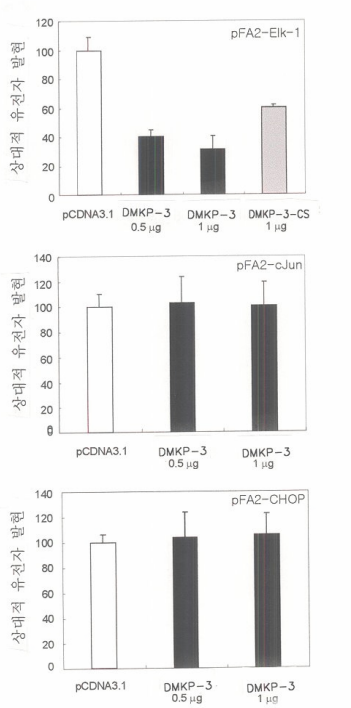
도면 2b



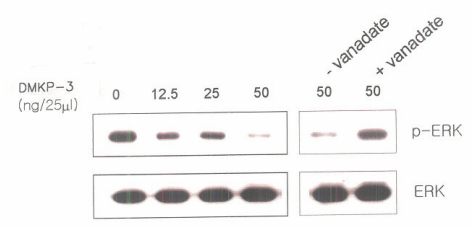
도면 2c



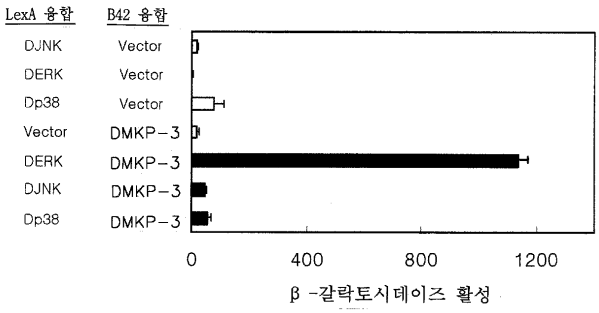
도면 3a



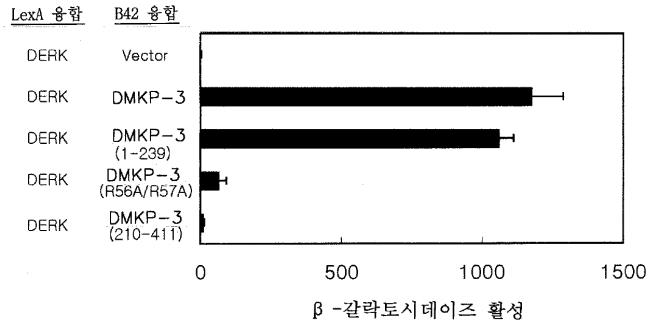
도면 3b



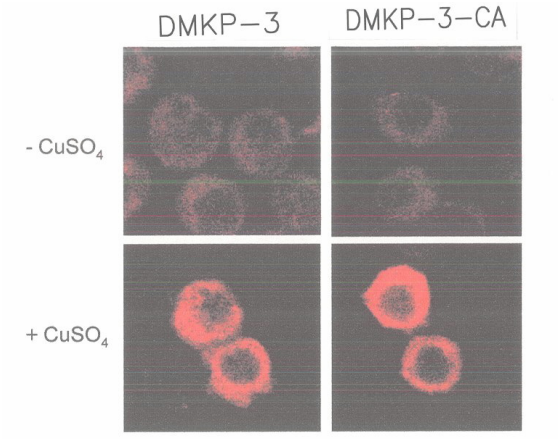
도면 4a



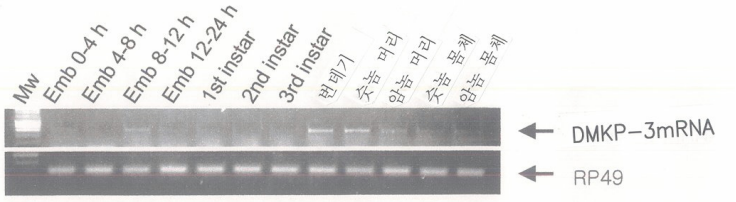
도면 4b



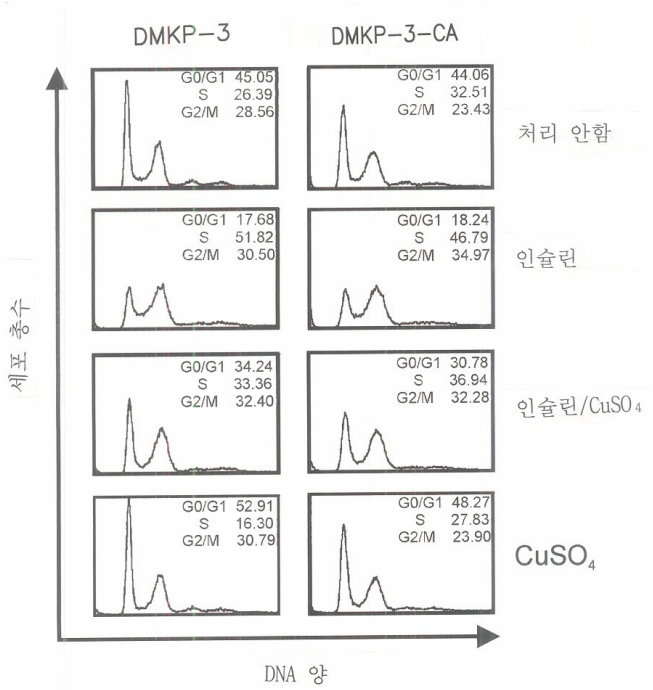
도면 5a



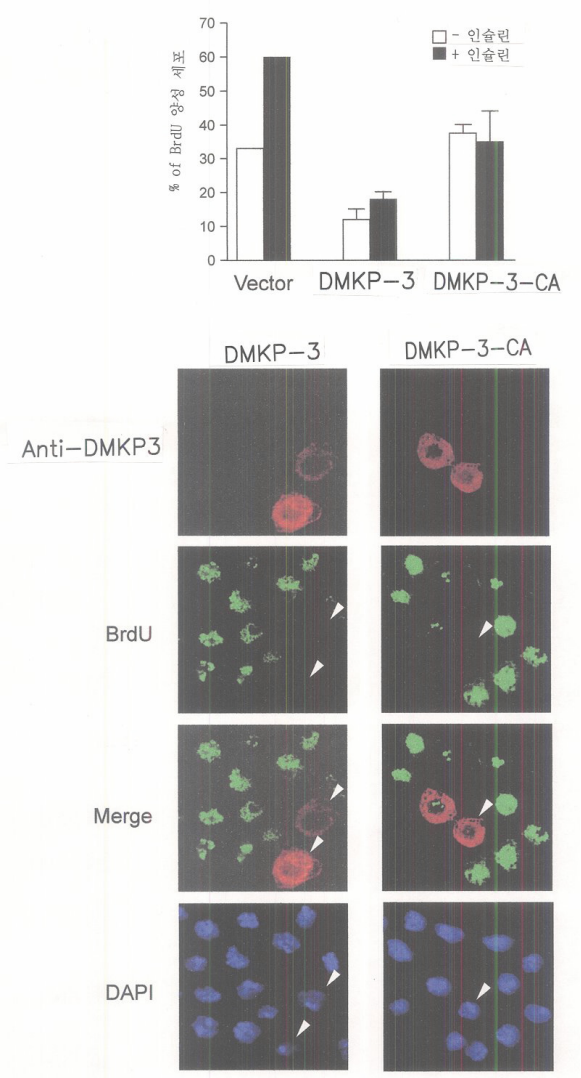
도면 5b


Mw
Emb 0-4 h
Emb 4-8 h
Emb 8-12 h
Emb 12-24 h
1st instar
2nd instar
3rd instar
번데기
숫놈 머리
암놈 머리
숫놈 몸체
암놈 몸체
DMKP-3mRNA
RP49

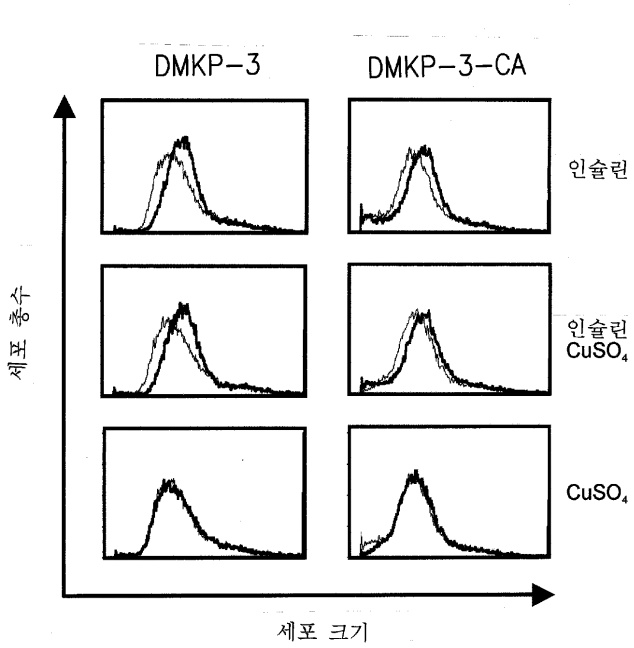
도면 6a


DMKP-3
DMKP-3-CA
G0/G1 45.05
S 26.39
G2/M 28.56
G0/G1 44.06
S 32.51
G2/M 23.43
처리 안함
G0/G1 17.68
S 51.82
G2/M 30.50
G0/G1 18.24
S 46.79
G2/M 34.97
인슐린
G0/G1 34.24
S 33.36
G2/M 32.40
G0/G1 30.78
S 36.94
G2/M 32.28
인슐린/CuSO4
G0/G1 52.91
S 16.30
G2/M 30.79
G0/G1 48.27
S 27.83
G2/M 23.90
CuSO4
세포 숫자
DNA 양

도면 6b


% of BrdU 양성 세포
70
60
50
40
30
20
10
0
- 인슐린
+ 인슐린
Vector
DMKP-3
DMKP-3-CA
DMKP-3
DMKP-3-CA
Anti-DMKP3
BrdU
Merge
DAPI

도면 7



<110> CHOI, KANG YEOL
<120> Dual specific Phosphatase with anticancer activity
<160> 23
<170> KopatentIn 1.71
<210> 1
<211> 1233
<212> DNA
<213> Drosophila
<400> 1

atgccagaaa cggagcacga gacctgcagc aaggagtggc tgcagtccca gttgcgatcc 60
ctggactcca aggacctgat cctgttggac tgccgcggct cgcacgagta cagtgagtcg 120
cacatccgcg gagccgtcaa cctatgcata cccagcatcg tcctccgtcg tctggcggtt 180
ggcaaaatcg atctggcctc cacgatcaag tcgcccgagc tgaagcaacg catccagtcg 240
ggctacaagc tatgctggtt catcctctac aacggcgaag gcgtgcccgg ccagaatcag 300
gagatcgccg gagccggatc cctggccgtc gccatggact ccatcatcag catcctgcac 360
cgtcgcctca agcaggacgg ctgccgcgta gttgctttac aagatggctt caacaatttt 420
cgccaggcat ttccggaatg gtgcgaggac gataatcaga cgcacagcaa agagatcgaa 480
tctagtcgca atgttcaaac cgatcagtta atgggtctta ggtcccttcg catttccaca 540
acgcaatccg attccgcgtg cagcagttcg gcggaatcgt cggattgcga gagctccagc 600
caccatcacc accaccacag tctccacaat tacaacgagg cgcccgtaga gataatccct 660
ggactactct tcctgggaaa tgccacacac agctgcgact cggaagcgtt gaagaagtac 720
aatataaagt atgttttgaa tgtgacacca gatttgccaa ataagttcaa ggagtccccc 780
gacatcaagt atctgcagat tccgatcacg gatcactact cacaagattt ggccatacat 840
ttcccggatg ccatacagtt tatagaggaa gcgcggtccg caagctcggt ggtgctggtc 900

cactgcctgg ccggagtttc gcgctcggtg accgtgacgc tcgcctactt gatgcacacg 960
cggggcctga gtctcaacga cgccttcgcg atggtgcggg accggaagcc ggatgtatcg 1020
cccaacttcc acttcatgca gcagctgctg tccttcgaga gccaactgcg cctgagaccc 1080
ggctccaggt tctcgtgcag ctgcattgcg ccggactgca attgcatgca gaccacgggc 1140
tttatggccg cccatctggc gaatgctacc ggggtctcgc cagactccgg catcgagttc 1200
gatcgctgga ccccgtcgga cacgggtctt aaa 1233

<210> 2
<211> 411
<212> PRT
<213> Drosophila
<400> 2

Met Pro Glu Thr Glu His Glu Thr Cys Ser Lys Glu Trp Leu Gln Ser
1 5 10 15
Gln Leu Arg Ser Leu Asp Ser Lys Asp Leu Ile Leu Leu Asp Cys Arg
20 25 30
Gly Ser His Glu Tyr Ser Glu Ser His Ile Arg Gly Ala Val Asn Leu
35 40 45
Cys Ile Pro Ser Ile Val Leu Arg Arg Leu Ala Val Gly Lys Ile Asp
50 55 60
Leu Ala Ser Thr Ile Lys Ser Pro Glu Leu Lys Gln Arg Ile Gln Ser
65 70 75 80
Gly Tyr Lys Leu Cys Trp Phe Ile Leu Tyr Asn Gly Glu Gly Val Pro
85 90 95
Gly Gln Asn Gln Glu Ile Ala Gly Ala Gly Ser Leu Ala Val Ala Met
100 105 110
Asp Ser Ile Ile Ser Ile Leu His Arg Arg Leu Lys Gln Asp Gly Cys
115 120 125
Arg Val Val Ala Leu Gln Asp Gly Phe Asn Asn Phe Arg Gln Ala Phe
130 135 140
Pro Glu Trp Cys Glu Asp Asp Asn Gln Thr His Ser Lys Glu Ile Glu
145 150 155 160
Ser Ser Arg Asn Val Gln Thr Asp Gln Leu Met Gly Leu Arg Ser Leu
165 170 175
Arg Ile Ser Thr Thr Gln Ser Asp Ser Ala Cys Ser Ser Ser Ala Glu
180 185 190
Ser Ser Asp Cys Glu Ser Ser Ser His His His His His His Ser Leu
195 200 205
His Asn Tyr Asn Glu Ala Pro Val Glu Ile Ile Pro Gly Leu Leu Phe
210 215 220
Leu Gly Asn Ala Thr His Ser Cys Asp Ser Glu Ala Leu Lys Lys Tyr
225 230 235 240
Asn Ile Lys Tyr Val Leu Asn Val Thr Pro Asp Leu Pro Asn Lys Phe
245 250 255
Lys Glu Ser Gly Asp Ile Lys Tyr Leu Gln Ile Pro Ile Thr Asp His
260 265 270
Tyr Ser Gln Asp Leu Ala Ile His Phe Pro Asp Ala Ile Gln Phe Ile
275 280 285
Glu Glu Ala Arg Ser Ala Ser Ser Val Val Leu Val His Cys Leu Ala
290 295 300
Gly Val Ser Arg Ser Val Thr Val Thr Leu Ala Tyr Leu Met His Thr

305 310 315 320
Arg Gly Leu Ser Leu Asn Asp Ala Phe Ala Met Val Arg Asp Arg Lys
325 330 335
Pro Asp Val Ser Pro Asn Phe His Phe Met Gln Gln Leu Leu Ser Phe
340 345 350
Glu Ser Gln Leu Arg Leu Arg Pro Gly Ser Arg Phe Ser Cys Ser Cys
355 360 365
Ile Ala Pro Asp Cys Asn Cys Met Gln Thr Thr Gly Phe Met Ala Ala
370 375 380
His Leu Ala Asn Ala Thr Gly Val Ser Pro Asp Ser Gly Ile Glu Phe
385 390 395 400
Asp Arg Trp Thr Pro Ser Asp Thr Gly Leu Lys
405 410

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> T3 primer of the pBlueScript SK
<400> 3
aattaaccct cactaaaggg 20

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> internal sequence primer of the Drosophila
<400> 4
gtagcattcg ccagatgg 18

<210> 5
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pPacPL-DMKP-3
<400> 5
ggaattcggc tctagaccat ggcagaaacg gagcacga 38

<210> 6
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pPacPL-DMKP-3
<400> 6
ggcaacggcg atgtggcggc cgctgcaaat gggatctc 38

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> PCR primer of pB42AD-DMKP-3
<400> 7
cggcacgaat tcatgccaga aacggagcac 30
<210> 8
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pB42AD-DMKP-3
<400> 8
gccactctcg agtcatttaa gacccgtgtc cg 32
<210> 9
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pB42AD-DMKP-3(1-239)
<400> 9
cggcacgaat tcatgccaga aacggagcac g 31
<210> 10
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pB42AD-DMKP-3(1-239)
<400> 10
atacttctcg agtcacttct tcaacgcttc cgag 34
<210> 11
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pB42AD-DMKP-3(210-411)
<400> 11
cacagtgaat tcaattacaa cgaggcgccc g 31
<210> 12
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pB42AD-DMKP-3(210-411)
<400> 12
gccactctcg agtcatttaa gacccgtgtc cg 32
<210> 13
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pLexA-DERK
<400> 13

gaaacggaat tcatggagga atttaattcg agcg 34

<210> 14
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pLexA-DERK
<400> 14
tacagcgaat tcttaaggcg cattgtctgg ttgtc 35

<210> 15
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pLexA-DJNK
<400> 15
atcagtggat cctgacgaca gctcagcacc aacac 35

<210> 16
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pLexA-DJNK
<400> 16
aaaagtctcg agctaccgcg ttctattatt tgtattg 37

<210> 17
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pLexA-Dp38
<400> 17
tcaagcgaat tcatgtcagt gtccattaca aaaaag 36

<210> 18
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> PCR primer of pLexA-Dp38
<400> 18
gatggtctcg agtcacttta catcctttag aacc 34

<210> 19
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Forward primer for DMKP-3-CA
<400> 19
gaaactccgg ccagggcgtg gaccagc 27

<210> 20

<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Forward primer for DMKP-3-CS
<400> 20
ggtgctggtc cactccctgg ccggag 26
<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Forward primer for DMKP-3-A56R/A57R
<400> 21
cccagcatcg tcctcgcggc cctggcggtt ggc 33
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sense primer of DMKP-3
<400> 22
gcaaggagtg gctgcagtcc 20
<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Antisense primer of DMKP-3
<400> 23
gggattatct ctacgggcgc 20