



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0098027

(43) 공개일자

2014년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0069983(분할)

(22) 출원일자

2014년06월10일

심사청구일자

2014년06월10일

(62) 원출원

특허 10-2013-0009148

원출원일자

2013년01월28일

심사청구일자

2013년01월28일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

고영호

경기 안양시 동안구 관평로170번길 15, 801호 (관양동, 일송빌딩)

이시혁

서울 관악구 관악로 1, 농생명과학대학 200동 6104호 (신림동, 서울대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 12 항

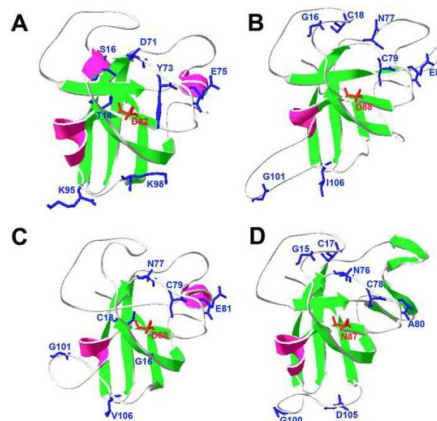
(54) 발명의 명칭 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신의 유전자 서열, 단백질 서열, 이를 이용한 소나무 재선충병 진단용 조성물 및 소나무 재선충병 예방 또는 치료용 약제

(57) 요약

본 발명은 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신의 신규 유전자 서열, 단백질 서열, 이를 이용한 소나무 재선충병 진단용 조성물, 진단용 키트 및 소나무 재선충병 예방 또는 치료용 약제에 관한 것이다.

본 발명자들은 소나무재선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 발현서열 태그 데이터베이스에서 두 개의 신규 익스팬신 유전자를 확인하여 이를 Bx-EXPB2 및 Bx-EXPB3로 명명하였다. 새로운 Bx-EXPBs 유전자는 150개의 아미노산을 코딩하며 코딩서열의 유사성은 앞서 보고된 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 EXPB1과 비교할 때 70.7~84.0%였다. Bx-EXPB2와 Bx-EXPB3는 각각 Bx-EXPB1 및 Bm-EXPB1과 클러스터되었고, 다른 선충 EXP 유전자들과 독립적인 계통을 형성하였다. 확인된 모든 Bx-EXPBs는 신호전달 펩타이드를 포함하며 증식단계 동안에만 발현되어, 감염된 동안 세포벽을 느슨하게 함으로써 숙주를 통해 선충 이동을 용이하게 하기 위해 분비되는 것으로 보인다. 정량적 실시간 PCR 분석은 Bx-EXPB3 mRNA의 상대적 축적이 시험한 세 Bx-EXPs 중 가장 높고 mRNA 축적 정도는 다음의 순서와 같았다: Bx-EXPB3 > Bx-EXPB2 >> Bx-EXPB1. Bx-EXPBs의 유사성 모델링은 구조적으로 최적 주형이 바실러스 서브틸리스의 EXLX1 단백질임을 보여주었고, 이 단백질은 Bx-EXPB3는 제외하고 Bx-EXPB1 및 Bx-EXPB2와 촉매 활성에 필수적인 잔기들을 공통으로 가진다. 종합하면, Bx-EXPB1과 Bx-EXPB2는 식물 조직을 통한 이동에 관련되어 있고, 병원성 발현에 역할을 수행하는 것으로 보인다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

강재순

서울특별시 서대문구 수색로 100 DMC 래미안 e-편
한세상 109동 1501호

한혜림

서울 강남구 선릉로 221, 208동 401호 (도곡동, 도
곡렉슬아파트)

문일성

서울 도봉구 마들로 859-19, 109동 308호 (도봉동,
도봉한신아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HRF-G-1012-6

부처명 한림대학교

연구사업명 한림대학교 group 연구활성화 지원사업

연구과제명 파킨슨병 질환 모델 구축을 통한 맞춤 의학 기반 확립

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교

연구기간 2012.11.01 ~ 2013.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 25의 핵산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자

청구항 2

청구항 1의 유전자로부터 발현되는 서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질

청구항 3

청구항 2의 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질에 대한 항체를 포함하는 소나무 재선충병 방제용 조성물

청구항 4

청구항 1의 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자에 대한 발현 억제제를 포함하는 소나무 재선충병 방제용 조성물

청구항 5

청구항 4에 있어서,

버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자에 대한 발현 억제제는 서열번호 25의 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 소나무 재선충병 방제용 조성물

청구항 6

청구항 4에 있어서,

버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자에 대한 발현 억제제는 서열번호 25의 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자의 siRNA임을 특징으로 하는 소나무 재선충병 방제용 조성물

청구항 7

서열번호 25의 핵산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물

청구항 8

서열번호 25의 핵산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물

청구항 9

서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물

청구항 10

서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질에 대한 항체를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물

청구항 11

서열번호 25의 핵산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자, 상기 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 키트

청구항 12

서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질 또는 상기 단백질에 대한 항체를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 키트

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신의 신규 유전자 서열, 단백질 서열, 이를 이용한 소나무 재선충병 진단용 조성물, 진단용 키트 및 소나무 재선충병 예방 또는 치료용 약제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 (*Bursaphelenchus xylophilus*; 이하 "*B. xylophilus*"와 혼용함)는 소나무 재선충병의 원인으로 알려져 있다 (Mamiya, 1975; Lee et al., 2011). 버사펠렌쿠스 자일로필러스 (*Bursaphelenchus xylophilus*)는 감염된 소나무에서 새 소나무로 솔수염하늘소 (pine sawyer beetle) 모노카무스 얼터네이즈 (*Monochamus alternates*)에 의해 전이되는 것으로 알려져 있다 (Mamiya, 1975). 숙주 나무의 감염 및 유지와 관련하여 잠재적 식물병원성을 발현하기 위해 *B. xylophilus*는 주로 다당류, 지방 및 단백질로 구성된 식물 세포벽과 같은 물리적 장벽을 넘어야 한다. 식물 세포벽의 구조는 β -1,4 글라이코사이드 결합에 의해 이어지는 반복된 포도당 분자로 이루어진 셀룰로스에 의해 결정된다 (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994; van den Brink and de Vries, 2011). 세포벽의 셀룰로스 골격은 비셀룰로스 분자, 헤미셀룰로스 또는 펙틴의 교차결합 매트릭스에 의해 관통된다. 소나무 재선충이 나무를 감염시키고 통상 한두달 내로 시들게 하거나 죽게 하지만 (Mamiya, 1975), 소나무 재선충이 나무를 감염시키고 증식하는 분자적 및 세포적 병원생리학에 대해서는 충분히 밝혀져 있지 않다. 그렇지만, 식물병의 개시 및 진행에 있어서 결정적인 역할을 하는 엔도글루카네이스 (Kikuchi et al., 2004; Smant et al., 1998), 펙테이트 라이에이스 {pectate lyases (Kikuchi et al., 2006; Popeijus et al., 2000)} 및 익스팬신 (EXPs) (Kikuchi et al., 2009)과 같은 다양한 세포벽 분해효소가 *B. xylophilus* 게놈 내에 존재한다는 사실은 *B. xylophilus*에서 분비되는 세포벽 분해효소가 숙주 나무의 감염 및 증식에 관여하는 중요한 인자일 수 있음을 암시한다.

[0003] 식물의 익스팬신은 비공유 결합을 약화함으로써 세포벽을 느슨하게 함으로써 다양한 발달상의 과정에서 중요한 역할을 수행하며 (McQueen-Mason and Cosgrove, 1994; McQueen-Mason and Cosgrove, 1995; Whitney et al., 2000), 세포벽이 분해되기 쉽도록 하고, 다른 세포벽 분해효소에 의해 세포벽 리모델링이 쉽도록 한다 (Cosgrove, 2000; van den Brink and de Vries, 2011). 대부분의 익스팬신이 식물에서 확인된 반면, 식물 기생

성 선충이 기능성 익스팬신을 발현한다는 최근의 발견은 이들이 식물-기생 관계를 조절하는 주요 인자 중 하나가 될 수 있음을 제시한다 (Qin et al., 2004; van den Brink and de Vries, 2011). 그러나, 식물 익스팬신과 비교할 때 선충 익스팬신의 생체내 기능에 관한 이해는 아직 초보적인 수준이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 소나무 재선충병을 유발하는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 (*Bursaphelenchus xylophilus*)로부터 새로운 익스팬신 유전자 및 단백질 서열을 규명하고, 익스팬신 단백질의 발현 패턴 및 구조를 연구하여 소나무 재선충병을 예방 및 치료할 수 있는 치료제 또는 치료방법을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

[0005] 또한, 본 발명은 상기 새로운 익스팬신 유전자 및 단백질 서열을 이용하여 소나무 재선충병을 진단하는 조성물 및 키트를 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명자들은 *B. xylophilus*의 감염 및 병원성의 분자적 및 세포적 메카니즘을 연구하기 위해 *B. xylophilus* cDNA 및 EST 라이브러리에서 익스팬신을 확인하였다. 또한 익스팬신의 단계별 특이적인 발현 패턴을 정량적 실시간 PCR로 규명하고, 3차원 유사성 모델링을 수행하여 구조를 예측하였다.

[0007] 익스팬신은 식물 세포벽을 느슨하게 하는 효소로서 세포 팽창 및 식물 세포벽 다당류의 재배치와 같은 다양한 역할을 수행한다 (Cosgrove, 2000). 최초의 선충 익스팬신이 감자 낭종 선충 *G. rostochiensis*에서 발견된 이래 (Qin et al., 2004), 다른 선충에서 몇몇 익스팬신이 확인되었다. 20 개의 예측 익스팬신이 고구마 뿌리혹 선충 (*Meloidogyne incognita*)의 게놈 분석을 통해 확인되었고 (Abad et al., 2008), *B. mucronatus*뿐 아니라 *B. xylophilus*로부터 익스팬신 유사 단백질이 확인되었다 (Kikuchi et al., 2007; Kikuchi et al., 2009).

[0008] 본 발명자들은 *B. xylophilus*에서 두 개의 새로운 익스팬신 B (EXPB) 유전자를 찾아내었다. 앞서 보고된 소나무 재선충 EXPB와 매우 유사도가 높은 두 EXPBs 모두 신호전달 펩타이드를 함유하였는데, 이는 이 단백질들이 분비되는 것이며, 감자 낭종 선충의 익스팬신 (Gr-EXP)에서 보이는 바와 같이, 병원성 발현 동안 세포벽을 느슨하게 하는데 관여하는 것과 일치한다 (Qin et al., 2004). Bx-EXPBs (이하 버사펠렌쿠스 자일로필러스의 익스팬신 B를 약자로 "Bx-EXPBs"로 사용함)는 식물 익스팬신들과 서열 유사성이 비교적 낮았다 (도 1A). 식물 익스팬신은 두 개의 구조 도메인으로 구성된다 (Cosgrove, 1997; Sampedro and Cosgrove, 2005): N-말단 도메인 (EXPB의 D1)은 엔도글루카나제 45 패밀리에 (EG45)의 촉매 도메인과 낮은 유사성을 나타내며, C-말단 도메인 (EXPB의 D2)은 예측된 탄수화물 결합 도메인 (CBD)을 가진다. 다양한 익스팬신-관련 단백질에서 발견되는 EG45-유사 도메인 (Kudla et al., 2005; Li et al., 2002; Xu et al., 2001)은 여러 개의 시스테인/트립토판 잔기와 보존된 HFD 아미노산 서열 모티프를 가진다. 선충 익스팬신을 포함하여 비식물성 익스팬신들은 식물성 익스팬신과는 독립적으로 진화해서 다른 유전자 구조를 갖게된 것으로 보인다. Bx-EXPBs는 또한 보존된 시스테인 잔기 및 변형된 HFD 모티프 (HVD 또는 HVN; Fig. 1A)와 같이 식물 익스팬신과 공유하는 특징들이 있기는 하지만 식물 익스팬신과 유사성이 별로 없다 (유사성이 20% 미만; 도 1B).

[0009] 선충 익스팬신에는 네 개의 유전자 구조가 있다 (Haegeman et al., 2010; Haegeman et al., 2011): (1) *B. xylophilus* 및 *B. mucronatus*, *G. rostochiensis*, *M. arenaria*, *M. chitwood*, *M. hapla*, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. paranaensis*, *Heterodera glycines* 및 *Xiphinema index*에서 발견된 신호전달 펩타이드-EXP 도메인 구조; (2) *Ditylenchus africanus*에서 발견된 신호전달-펩타이드-EXP 도메인-CBM 도메인 구조; (3) *G. rostochiensis*, *M. hapla* 및 *M. incognita*에서 발견된 신호전달 펩타이드-CBM 도메인-EXP 도메인 구조; (4) *M. incognita* 및 *M. javanica*에서 발견된 신호전달 펩타이드-비병원성 도메인 구조. 신호전달 펩타이드-비병원성 도메인 구조를 제외하고 다른 선충 익스팬신들은 도메인 서플링을 통해 생성되는 것으로 예측된다 (Haegeman et al., 2010). 비록 선충 익스팬신이 식물 익스팬신과 공통되는 특징이 있지만, 선충 익스팬신 도메인은 BLAST 서치를 통해 보면 식물 익스팬신보다는 세균 단백질에 더 가깝다. 또한, Bx-EXPBs의 게놈 DNA 서열은 Bx-EXPBs가 내생 또는 공생 미생물에서 유래하는 것처럼 보이지 않는다. Bx-EXPBs의 BLAST 서치 및 게놈 DNA 서열은 Bx-

EXPBs가 다른 세포벽 분해효소에서 나타난 것과 같이 수평적 유전자 이동을 통해 세균으로부터 유래하고 생물학적으로 기능할 수 있음을 제시해준다 (Jones et al., 2005; Kudla et al., 2005; Scholl et al., 2003).

[0010] 유사 모델링 (homology modeling)에 의한 Bx-EXPBs의 예측된 최적 주형은 *B. subtilis*의 익스팬신 (EXLX1)이다 (도 3 및 보충 표 1)(Kerff et al., 2008). EXLX1은 식물 익스팬신과 같이 D1과 D2 두 개의 도메인으로 이루어진다. D1 도메인은 식물 익스팬신의 D1과 높은 구조적 유사성을 보이는 여섯 가닥의 더블- ψ β -통형을 형성한다. 선충 D2 도메인은 구조적으로 식물 익스팬신의 D2 도메인과 관련이 있고, 탄수화물 결합 모듈 (carbohydrate binding modules; CBM)로 기능할 것으로 제안되는데, 이 기능은 전체 세포벽과 셀룰로스에 결합하는 EXLX1을 통해 수행된다 (Georgelis et al., 2011). EXLX1 구조와 반대로, Bx-EXPBs는 CBM이 없는 익스팬신 도메인으로 구성되었다. 최근, EXLX1의 구조-기능의 상관관계가 부위 특이적 돌연변이를 통해 분석되었다 (Georgelis et al., 2011): D1 도메인에서 촉매 활성에 필수적인 잔기 (D^{82})와 D2 도메인에서 셀룰로스 결합 및 세포벽을 느슨하게 하는 활성에 중요한 잔기 (W^{125} , W^{126} 및 Y^{157})가 밝혀졌다. EG45와 EG102의 촉매 부위의 D 잔기에 대응하는 EXLX1의 D^{82} 잔기만이 보존되었고 HFD 모티프에 위치하였다 (도 1)(Kerff et al., 2008). EXLX1의 D82A 또는 D82N 변이는 세포벽을 느슨하게 하는 활성을 완전히 제거하였고, 이는 D^{82} 잔기가 촉매활성에 필수적임을 말해준다 (Georgelis et al., 2011). 촉매성 D 잔기는 Bx-EXPB1과 Bx-EXPB2에서도 발견된 반면, Bx-EXPB3 및 Bm-EXPB1에서는 N 잔기가 발견되어 촉매성 Bx-EXPB1 및 Bx-EXPB2가 *B. xylophilus*에서 기능함을 제시한다. PPBS로서의 다른 잔기들 (T^{14} , S^{16} , D^{71} , Y^{73} , E^{75} , K^{95} 및 K^{98})은 EXLX1의 D1 도메인에서 동일하였고, 이는 3차원 구조에서 촉매성 D^{82} 잔기와 가까이 있었다 (도 3A). PPBS 잔기들은 선충과 식물 익스팬신에서 보존되지 않았다. 식물과 세균에서 보존되는 D^{71} 잔기는 선충에서는 N 잔기로 대체된다. Y^{73} 잔기는 EXLX1에서만 발견되지만, E^{75} 잔기는 Bx-EXPB3를 제외하고는 선충의 EXPB에서 동일하였다. 점 돌연변이 D71N, Y73A, T14A, S16A, E75A 및 E75Q 중에서 Y73A만이 현저한 활성 감소를 나타내었고, 다른 돌연변이들은 적당한 활성감소를 나타내었다. K95A 및 K98A는 효소 활성에 아무런 영향을 나타내지 않았고 (Georgelis et al., 2011), 이는 촉매성 잔기에서 멀리 떨어져 있기 때문이었다 (도 3).

[0011] 숙주 나무 내에서 비병원성 *B. mucronatus*의 분포의 한계가 밝혀진 반면, 병원성 *B. xylophilus*는 자유롭게 이동하여 심각한 병증의 원인이 되었다 (Futai, 1980; Kosaka et al., 2001; Odani et al., 1985). 숙주의 기생부 (aerial parts)에 기생성 (parasitic) 선충이 침입한 식물은 통상 수분 조절이 느슨해지고, 영구한 시들음증을 초과하여 죽는다 (Chen et al., 2006). 식물 기생성 선충은 최소한 하나의 익스팬신을 하인두선 (pharyngeal gland)에 코딩하는데, 이는 신호전달 펩타이드가 존재하여 숙주 내로 분비되는 것으로 보인다 (Kikuchi et al., 2004). 따라서, 익스팬신은 다른 세포벽 분해효소와 조합하여 숙주 내에서 이동을 증가시키는 것으로 보인다. EXLX1과의 유사성을 바탕으로, 병원성 *B. xylophilus*에 존재하는 EXPB는 촉매성인 반면, 비병원성 *B. mucronatus* 내의 불활성 EXPB는 D82N 돌연변이로 인해 불활성화되는데, 이는 병원성 *B. xylophilus*의 EXPB가 병원성 발현에서 역할을 수행할 뿐 아니라 식물 조직을 통한 이동에도 관여함을 말해준다.

[0012] Bx-EXPBs의 qrt-PCR 분석 및 단계-특이적 발현은 Bx-EXPBs가 숙주 내에서의 이동에 관여하며 감염되기 쉬운 숙주에서 감염의 증식 단계 동안 병원성 인자로서 역할을 수행함을 제시한다 (도 2). *B. xylophilus*의 생활주기는 복제와 기생을 위한 증식단계 와, 유충 형성 (dauer formation) 및 이동, 그리고 매개를 위한 전파 단계 (dispersive stage)로 나뉘어진다 (Ishibashi et al., 1978; Mamiya, 1975). 난, 유충 및 성충을 포함하는 증식단계는 혼합된 발단단계인데, 기생화, 감염, 증식 및 숙주에 의한 방어와 같은 대부분의 숙주-선충 상호관계가 이때 일어난다. 따라서, 증식 단계는 생식선 형성이 억제되는 전파 단계보다 *B. xylophilus*의 병원성 발현 또는 증식과 밀접하게 관련이 있는 것으로 보인다 (Kondo and Ishibashi, 1978). 비록 본 발명자들은 Bx-EXPBs의 생화학적 활성을 분석하지는 못했지만, 다른 증거들은 분비성 Bx-EXPB1 및 Bx-EXPB2가 숙주 나무의 세포벽을 느슨하게 하고 *B. xylophilus*가 이동하고 증식하도록 할 수 있다는 것을 강하게 뒷받침해준다.

[0013] 본 발명은 서열번호 24 및 서열번호 25 중 선택된 하나의 핵산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자에 관한 것이다.

[0014] 또한, 본 발명은 서열번호 12 및 서열번호 13 중 선택된 하나의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질에 관한 것이다.

- [0015] 또한, 본 발명은 상기 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질에 대한 항체를 포함하는 소나무 재선충병 방제용 조성물에 관한 것이다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자에 대한 억제제를 포함하는 소나무 재선충병 방제용 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 상기 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자에 대한 억제제는 서열번호 24 및 서열번호 25 중 선택된 하나의 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드임을 특징으로 한다.
- [0018] 또한, 상기 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자에 대한 억제제는 서열번호 24 및 서열번호 25 중 선택된 하나의 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자의 siRNA임을 특징으로 한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 서열번호 24 및 서열번호 25 중 선택된 하나의 핵산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 서열번호 24 및 서열번호 25 중 선택된 하나의 핵산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 서열번호 12 및 서열번호 13 중 선택된 하나의 아미노산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 또한, 본 발명은 서열번호 12 및 서열번호 13 중 선택된 하나의 아미노산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질에 대한 항체를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 서열번호 24 및 서열번호 25 중 선택된 하나의 핵산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자, 상기 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은 서열번호 12 및 서열번호 13 중 선택된 하나의 아미노산 서열을 갖는 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 단백질 또는 상기 단백질에 대한 항체를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 익스팬신 B '유전자'라 함은 이들 유전자의 DNA 또는 mRNA를 말하며, DNA 또는 mRNA의 전부 또는 일부를 모두 포함하는 개념이다.
- [0026] 본 발명의 소나무 재선충병 진단용 조성물은 상기 유전자 외에도 핵산의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다.
- [0027] 상기 익스팬신 B 유전자는 숙주 세포에서 특이적으로 발현이 증가한다. 따라서 상기 유전자의 발현 정도를 조사하면 소나무 재선충병을 진단할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 익스팬신 B 유전자는 숙주 나무에서 다량 발현되므로, 상기 유전자의 억제제를 투여하여 상기 유전자의 발현을 저해시키면 소나무 재선충병을 예방 또는 억제할 수 있다.
- [0029] 따라서 본 발명은 또한 상기 유전자의 억제제의 소나무 재선충병 치료 용도 및 유효량의 상기 유전자의 억제제를 숙주 나무에 투여하는 단계를 포함하는 소나무 재선충병 방제방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 소나무 재선충병 방제는 예방 및 억제를 포함한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 익스팬신 B 유전자에 대한 억제제는 상기 유전자의 mRNA에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0031] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 생체 내뿐만 아니라 생체 외에서도 유전자-특이적 억제를 달성하기 위해 성공적으로 사용되어 왔다. 안티센스 뉴클레오타이드는 특정 DNA 또는 RNA 타겟에 대해 안티센스(또는 상보)인 짧은 길이의 DNA 합성 가닥(또는 DNA 아날로그)이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟에 결합하고 전사, 번역 또는 스플라이싱의 단계에서 발현을 멈추게 함으로써 DNA 또는 RNA 타겟에 의해 인코딩된 단백질의 발현을 막기 위해 제안되었다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 배양 및 질병의 동물 모델에서도 성공적으로 이용되어

왔다(Hogrefe, 1999). 올리고뉴클레오타이드가 분해되지 않도록 더욱 안정하고 저항적이 되게 하기 위한 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형이 당업자에게 알려져 있고 이해된다. 여기서 사용된 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본(backbone) 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 본 발명이 속하는 기술분야에 알려진 방법에 의해 변형된다. 이들 변형은 본 발명 분야에 알려져 있는 올리고뉴클레오타이드 백본의 변형, 당 부분의 변형 또는 염기의 변형을 포함하나 이에 한정적인 것은 아니다.

- [0032] 또한, 익스팬신 B 유전자에 대한 억제제는 상기 유전자의 siRNA(Small Interfering RNA)일 수 있다.
- [0033] 즉, 상기 siRNA의 염기서열은 익스팬신 B 유전자(mRNA)의 염기서열 중 각각의 서열에서 연속된 19~23개의 연속된 염기서열일 수 있다.
- [0034] 상기 siRNA의 서열은 편의상 정방향 서열(sense strand)을 나타낸 것으로, 실제 유전자 억제효과를 나타내는 역방향 서열(antisense strand)과 함께 이중리보핵산쇄를 구성하게 된다.
- [0035] siRNA는 세포 배양 및 생체 내에서 오래 지속되는 효과, 생체 내에서 세포를 트랜스펙션시키는 능력 및 혈청 내 분해에 대한 저항력의 측면에서 생체 내에서 특정한 유전자의 발현의 저해에 대해 매우 강한 약물이 되는 잠재력을 지닌다(Bertrand et al., 2002). siRNA의 전달 및 siRNA를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터는 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 미국 출원 제2004/106567 및 2004/0086884는 바이러스성 벡터, 비바이러스성 벡터, 리포솜 전달 운반체, 플라스미드 주입 시스템, 인공 바이러스 엔벨로프 및 폴리라이신 컨쥬게이트를 포함한 전달 메커니즘뿐만 아니라 많은 발현 컨스트럭트/벡터를 제공하고 있다.
- [0036] siRNA는 상대적으로 낮은 농도로도 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의해 얻을 수 있는 효과와 동등하거나 높은 효과를 얻을 수 있기 때문에 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 대안으로 제시되고 있다(Thompson, 2002). siRNA의 이용은 질병의 동물 모델에 있어서 유전자 발현을 저해하는 데 대중성을 나타내고 있다. 당업자는 당해 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 원하는 방식대로 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드 및 siRNA를 합성하고 변형시킬 수 있다(Andreas Henschel, Frank Buchholz and Bianca Habermann (2004) DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs. Nucleic Acids Research 32(Web Server Issue):W113-W120 참조). 또한 당업자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA를 지닌 발현 컨스트럭트/벡터에 유용한 조절 서열(예컨대, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 그의 결합)을 잘 이해하고 있다.
- [0037] 소나무 재선충병 방제를 위해 사용되는 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA는 약제학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함한 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 예를 들어 하나 이상의 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 텍스트린, 글리세롤, 에탄올뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다. 이러한 조성물은 투여 후 활성 성분의 빠른 방출, 또는 지속적이거나 지연된 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.
- [0038] 상기 유전자의 저해제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 siRNA 외에도 상기 유전자의 발현을 억제하는 물질이면 어떤 것이든 가능하다. 따라서 종래 당해 기술 분야에서 상기 유전자의 저해제로 알려진 화합물 또한 이용 가능하다.
- [0039] 본 발명은 또한 익스팬신 B 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 억제제를 포함하는 소나무 재선충병 방제용 조성물을 제공한다. 본 발명의 유전자를 억제하면 그에 따른 단백질의 발현이 억제되어 소나무 재선충병 및 소나무 마름병이 억제되는 것이므로, 상기 유전자의 단백질을 저해하면 소나무 재선충병 및 소나무 마름병을 억제할 수 있다.
- [0040] 따라서 본 발명은 상기 단백질에 대한 억제제의 소나무 재선충병 및 소나무 마름병 방제 용도 및 유효량의 상기 단백질의 억제제를 숙주 나무에 투여하는 단계를 포함하는 소나무 재선충병 및 소나무 마름병 방제방법을 제공한다. 본 발명에 있어서 소나무 재선충병 및 소나무 마름병 방제는 예방 및 억제를 포함한다.
- [0041] 상기 단백질에 대한 억제제는 본 발명의 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체일 수 있다. 상기 단백질에 대한 모노클론 항체는 당업계에 통상적인 모노클론 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 모노클론 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클론 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있다. 또한, 항원결합성을 갖는 것이면

모노클론 항체 또는 폴리클론 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고, 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다.

- [0042] 상기 항체는 본 발명의 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 단백질의 부분 펩타이드도 포함하며, 본 발명의 부분 펩타이드로는 최소한 7개 이상, 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다.
- [0043] 본 발명의 소나무 재선충병 방제용 조성물은 방제를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 농약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 단백질에 대한 억제제가 항체일 경우 허용되는 담체는 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 완충액과 같은 최소량의 보조 물질로 구성될 수 있다.
- [0044] 또한 본 발명의 소나무 재선충병 방제용 조성물은 하나 또는 그 이상의 소나무 재선충병 또는 소나무 마름병 방제제와 함께 사용될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 소나무 재선충병 방제용 조성물은 상기 유효 성분 외에도 농약학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 포함할 수 있으며, 이러한 보조제로는 부형제, 봉해제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 가용화제 등이 있다.
- [0046] 또한 본 발명의 조성물은 방제를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용되는 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 방제 방법에 있어서, "유효량"은 소나무 재선충병 또는 소나무 마름병을 억제하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 본 발명의 유효 성분의 "유효량"은 식물병의 종류, 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 식물의 일반 상태, 방제 방법, 방제기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 익스팬신 B 유전자는 서열번호 24 또는 서열번호 25의 염기서열 중 하나 이상의 염기가 결실, 치환 또는 삽입된 염기서열일 수 있다.
- [0049] 상기 익스팬신 B 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍, 및 상기 유전자의 siRNA 서열은 당업자라면 용이하게 생성할 수 있다. 상기 서열들에 대해 실질적인 서열 동일성 또는 실질적인 서열 상동성을 지닌 서열 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 여기서 사용된 "실질적인 서열 동일성" 또는 "실질적인 서열 상동성"이라는 용어는 서열이 또 다른 서열과의 실질적인 구조적 또는 기능적 동일성을 나타냄을 표현하기 위해 사용된다. 이러한 차이는 예를 들어 다른 종 간의 코돈 용법의 고유의 변이에 기인한다. 2 이상의 다른 서열 사이의 유의적인 양의 서열 중복 또는 유사성이 있는 경우 이들 서열의 길이 또는 구조가 다르더라도 유사한 물리적 특성을 지니는 경우 구조적 차이는 무시할만한 정도가 된다.
- [0050] 본 발명에서 유전공학 기술과 관련된 사항은 샘브룩 등의 문헌(Sambrook, et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001)) 및 프레드릭 등의 문헌(Frederick M. Ausubel et al., Current protocols in molecular biology volume 1, 2, 3, John Wiley & Sons, Inc. (1994))에 개시되어 있는 내용에 의해 좀더 명확해진다.
- [0051] 본 발명은 또한 상기 유전자의 소나무 재선충병 진단 용도 및 상기 조성물과 소나무 재선충병 의심 식물로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하여 소나무 재선충병을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 진단 방법에서 상기 유전자를 포함하는 조성물과 시료 간의 반응의 확인은 DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 에세이(in vitro binding assay) 등을 이용할 수 있다. 예컨대 상기 유전자의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상 식물로부터 분리한 핵산과 혼성화(hybridization)한 후 본 발명이 속하는 기술분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerases chain reaction), 서던 블롯팅, 노던 블롯팅 등으로 이를 검출함으로써 소나무 재선충병 의심 식물에서 상기 유전자가 고발현된 상태인지를 조사하면 소나무 재선충병의 발생 여부를 판단할 수 있다. 상기 프로브를 방사선 동위원소 또는 효소 등으로 표지하면 용이하게 유전자의 존재를 확인할 수 있다. 상기 프로브의 염기서열은 상기 유전자의 염기서열과 70% 이상의 유사성이 있으면 족하다. 상기 프로브는 본 발명의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용한 유전자 증폭법에 의해 제조할 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 상기 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물을 제

공한다.

- [0054] 상기 센스 및 안티센스 프라이머쌍은 상기 유전자에 대한 상보적인 염기서열을 갖는 서열번호 1~8의 프라이머쌍 일 수 있다. 상기 프라이머쌍은 표 1에 정리하였다. 본 발명에서 '상보적'이란 프라이머의 염기서열에서 완전히 상보적인 것과 80% 이상의 상동성이 있는 것을 포함하는 개념이다.
- [0055] 상기 센스 프라이머 및 안티센스 프라이머를 이용하여 공지의 방법, 예컨대 RT-PCR 방법 등으로 상기 4종 유전자의 발현량을 측정할 수 있다.
- [0056] 본 발명은 또한 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하는 소나무 재선충병 진단용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 상기 단백질 외에도 단백질의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 포함할 수 있다. 앞서 언급한 바와 같이, 상기 익스펜신 B 유전자는 소나무 재선충병 숙주 세포에서 특이적으로 발현이 증가하므로 상기 유전자로부터 발현된 단백질을 이용하여 상기 유전자 또는 단백질의 과발현 여부를 조사하면 소나무 재선충병을 진단할 수 있다.
- [0057] 본 발명은 또한 상기 단백질의 소나무 재선충병 진단 용도 및 상기 조성물과 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하여 소나무 재선충병을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 진단 방법에서 상기 단백질을 포함하는 조성물과 시료 간의 반응의 확인은 DNA-단백질, RNA-단백질, 단백질-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 특이적 면역염색(histoimmunostaining), 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 어레이(in vitro binding assay) 등을 이용할 수 있다. 예컨대 상기 유전자들로부터 발현된 단백질의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상시료로부터 분리한 핵산 또는 단백질과 혼성화한 후 본 발명이 속하는 기술분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerases chain reaction), 웨스턴 블롯팅(western blotting) 등으로 이를 검출함으로써 대상체에서 상기 유전자가 고발현된 상태인지 조사하면 소나무 재선충병의 발생 여부를 판단할 수 있다. 상기 프로브를 방사선 동위원소 또는 효소 등으로 표지하면 용이하게 유전자의 존재를 확인할 수 있다.
- [0059] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 단백질 대신 상기 단백질에 대한 특이적 항체를 포함할 수 있다. 익스펜신 B 유전자는 소나무 재선충병 숙주 세포에서 특이적으로 발현이 증가하여 상기 유전자로부터 발현된 단백질의 양 또한 증가하게 된다. 따라서 상기 유전자로부터 발현된 단백질에 대한 항체를 이용하는 경우, 항원-항체 반응을 통해 상기 단백질을 검출해 내어 소나무 재선충병을 진단할 수 있다.
- [0060] 상기 단백질에 대한 모노클론 항체는 당업계에 통상적인 모노클론 항체 제작 방법을 통해 제작되어 사용할 수도 있고, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 상기 단백질에 대한 모노클론 항체는 일반적으로 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 또는 호스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 결합된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색 반응시킴으로써 정량 분석할 수도 있고, 아니면 직접 상기 단백질에 대한 모노클론 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 결합된 것을 사용하여 정량분석할 수도 있다. 또한, 모노클론 항체 대신에 상기 단백질을 인식하는 폴리클론 항체를 사용할 수도 있고 이는 당업계에 통상적인 항혈청 제작 방법을 통해 제작되어 사용될 수도 있으며, 항원결합성을 갖는 것이면 모노클론 항체 또는 폴리클론 항체의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고, 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다.
- [0061] 상기 항체는 본 발명의 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 4종 단백질의 부분 펩타이드도 포함하며, 본 발명의 부분 펩타이드로는 최소한 7개 이상, 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다.
- [0062] 또한 본 발명은 상기 익스펜신 B 유전자, 상기 유전자의 센스 및 안티센스 프라이머쌍, 상기 유전자로부터 발현된 단백질, 또는 상기 단백질에 대한 항체를 포함하는 소나무 재선충병 진단용 키트를 제공한다.
- [0063] 상기 소나무 재선충병 진단용 키트는 지지체, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질액, 또는 1,6-N-아세틸글루코사민 당쇄가지 변화를 측정하기 위한 L4-PHA, 폴리(A) RNA 분리시약 등을 더 포함할 수 있다.
- [0064] 상기 지지체는 니트로셀룰로오즈막, 폴리비닐수지로 합성된 96웰플레이트(96 well plate), 폴리스티렌수지로 합성된 96웰플레이트, 또는 유리로 된 슬라이드글라스 등일 수 있고, 상기 발색 효소는 퍼옥시다아제

(peroxidase), 또는 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등일 수 있으며, 상기 형광물질은 FITC, 또는 RITC 등일 수 있고, 상기 발색 기질액은 ABTS(2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzenothiazoline-6-sulfonic acid)), OPD(o-Phenylenediamine), 또는 TMB(Tetramethyl Benzidine) 등일 수 있다.

발명의 효과

[0065] 본 발명에 의한 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자 및 단백질 서열은 이를 이용하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가이 유전자 또는 단백질을 억제함으로써 숙주로의 침투를 저해할 수 있으므로, 소나무 재선충병 방제용 조성물로서 유용할 것으로 예측된다.

[0066] 본 발명에 의한 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B 유전자 및 단백질 서열은 이를 이용하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 숙주 내에서 이 유전자 또는 단백질이 과발현됨을 탐지함으로써 소나무 재선충병 감염 여부를 진단할 수 있으므로, 소나무 재선충병 진단용 조성물, 진단 키트로서 유용할 것으로 예측된다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1a는 선충, 식물 및 세균 유래 익스팬신 도메인을 정렬한 것이다. CLUSTALW를 이용하여 아미노산 서열을 정렬하였다. EXLX1의 공통잔기 (consensus residues) 및 예측된 다당류 결합부위는 각각 흑색 박스와 별표로 나타내었다. 선충 익스팬신의 변형된 HFD 모티프의 위치는 붉은 색 박스로 표시하였다. 역삼각형은 Bx-EXPBs 중 인트론의 위치를 나타낸다.

도 1b는 Molecular Evolutionary Genetic Analysis 4.0 버전 소프트웨어를 이용하여 구축한 계통수이다. 가지 길이는 치환된 아미노산 수에 비례하며, 나무 우측에 스케일 막대를 표시하였다. 이 부트스트랩 값은 1,000번의 반복실험에서 계산된 것이다. 선충: 소나무 선충 버사펠렌쿠스 자일로필러스 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 익스팬신 B (Bx-EXPB1, Bx-EXPB2 및 Bx-EXPB3); 버사펠렌쿠스 뮈크로나투스 (*B. mucronatus*) EXPB1 (Bm-EXPB1); 감자씨스트선충 (*Globodera rostochiensis*) EXPB1 (Gr-EXPB1) 및 EXPB2 (Gr-EXPB2). 식물: 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) EXPB3 (At-EXPB3); 담배 (*Nicotiana tabacum*) 익스팬신-유사 단백질 (Nt-EXPL); 토마토 (*Lycopersicon esculentum*) EXPB2 (Le-EXPB2); 토마토 (*Solanum lycopersicum*) EXPB (Sl-EXPB); 감자 (*S. tuberosum*) EXPB2 (St-EXPB2). 세균: 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) EXLX (Bs-EXLX); 클라비박터 (*Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis*) NCPPB 익스팬신-유사 단백질 (Cm-EXPL).

도 2(A)는 버사펠렌쿠스 자일로필러스 (*Bursaphelenchus xylophilus*)의 증식단계, 전과단계 및 배지에서 추출한 cDNA로부터 얻은 Bx-EXP mRNA이다. P와 D는 각각 증식단계와 전과단계를 나타낸다. 화살표는 버사펠렌쿠스 자일로필러스-특이적 DNA 조각을 나타낸다. M: 100bp DNA 표준물질, 1과 3: D-F1과 D-R1으로 증폭된 PCR 산물, 2와 4: CF1과 C-R1으로 증폭된 PCR 산물. (B)와 (C)는 qrt-PCR을 통해 증식단계 (B) 및 인비트로 증식단계 (배지에서 성장함: C)의 Bx-EXP mRNA 축적을 나타낸다. 막대는 평균 상대비 + 표준편차를 나타낸다. 각 막대 위의 다른 문자는 t-test에 의한 통계 오차를 나타낸다 ($P < 0.001$).

도 3은 버사펠렌쿠스 자일로필러스 익스팬신 B의 EXP 도메인의 3차원 유사모델들이다. (A) 3D30: 바실러스 서브틸리스 유래 EXLX 단백질, Bx-EXPB2와 가장 유사한 주형이다. (B-D), Bx-EXPB1, 2 및 3의 예측 모델이다. α -나선 및 β -가닥은 붉은 자주빛과 연두색으로 각각 나타내었다. 예측된 다당류 결합부위와 활성화에 필수적인 촉매 잔기는 각각 청색과 적색으로 나타내었다.

도 4는 버사펠렌쿠스 자일로필러스 유래 익스팬신 B (Bx-EXPB)의 계놈 서열들이다. 각 Bx-EXPB 계놈 서열은 표 1의 특이적 프라이머로 증폭시킨 PCR 산물에서 얻은 것이다. 진한 글자는 각각 개시 및 종결코돈을 나타낸다. 인트론 서열은 적색으로 나타내었다.

도 5는 3 유사성-모델링된 3차원 구조와 주형의 예측 잔기당 오류를 나타낸다. 3D30의 예측 잔기당 오류, 바실러스 서브틸리스 익스팬신의 실험 3차원 구조 (A; Kerff et al., 2008.) 및 2HCZ (B), 1N10 (C), 1WC2 (D) 및 1BW3 (E)에 기초한 Bx-EXPB2의 모델링된 3차원 구조를 청색부터 적색까지 색상구배를 이용하여 시각화한 것이다. 청색은 잔기당 예측 잔기 오류가 0.1 nm 미만인 좀더 신뢰도 높은 구역을 나타내며, 적색은 잔기당 예측 잔기 오류가 0.35 nm를 초과하는, 신뢰도가 낮은 구역을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0068] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [0069] **선충, 배지 및 배양 조건**
- [0070] *B. xylophilus*와 *B. mucronatus*는 Baermann의 방법 (Viglierchio and Schmitt, 1983)을 이용하여 감염된 소나무의 칩에서 분리하여 보트리스 시네리아 론 상에서 25℃로 배양하였다. 두 종 간의 구별은 현미경 관찰과 종-특이적 PCR (species-specific PCR; ssPCR)에 의해 수행되었다 (Kang et al., 2004). dissection으로 새로이 나타나는 *M. alternatus* adult를 4번째 단계의 dispersive juvenile로부터 분리하였다. *B. xylophilus*로 분리된 선충을 육안 식별한 후 ssPCR (Species-specific PCR)로 재확인하였다 (Kang et al., 2004).
- [0071] **총 RNA 추출 및 cDNA 합성**
- [0072] 증식, 분산 또는 인비트로 증식 (배지 증식) 단계의 *B. xylophilus*로부터 트리폴 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 총 RNA를 추출하였다 (Chomczynski and Sacchi, 1987).
- [0073] cDNAs는 Superscript III™ 역전사효소로 합성하였다. 2 µg의 총 RNA, 0.2 µM의 Oligo-dT 프라이머, 1 µl의 역전사효소 및 반응 혼합물 (0.4 mM의 각 dNTP와 2.4 mM MgSO₄)을 혼합하여 최종 부피가 20 µl가 되도록 하였다. 반응은 cDNA를 합성하기 위해 50 분간 50 °C로 배양하고, 20 분간 37 °C로 배양한 다음 RNase H (Invitrogen)를 가하여 RNA를 제거하였다.
- [0074] **소나무 재선충으로부터 얻은 익스팬신 클로닝**
- [0075] *EXPB* 유전자의 부분 조각을 증폭하기 위해, 선충 *EXPB* 유전자 중 서열 유사성에 기초한 두 개의 degenerative 프라이머 (D-F1 및 D-R1; 표 1)를 이용하였다. 모든 PCR 반응은 Pfx Taq 폴리머레이즈 (Invitrogen)로 수행하였다. 단일 가닥 cDNA로부터 *EXPB* 유전자를 증폭시키기 위해 다음의 파라미터를 이용하였다: 95 °C로 1분 유지한 이후 95 °C로 20 초간, 53 °C로 20초간, 및 68 °C로 40초간을 35사이클 수행하고, 68 °C로 1분간 유지하였다. 각 PCR 반응 혼합물 5 µl씩을 GelStar 핵산염색 (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME, USA)이 함유된 1% 아가로즈 젤에서 분리하였다. 그 결과 얻은 PCR 산물은 pGEMT-easy 벡터 (Promega, Madison, WI, USA) 내로 클론시켰고, 양 가닥 모두 서열을 결정하였다.
- [0076] **Bx-EXPBs의 정량적 실시간 PCR**
- [0077] *B. xylophilus* 내의 각 EXPB의 상대적 발현 수준을 알아보기 위한 정량적 PCR을 수행하기 위해 총 RNA (10 ng)를 정량적 PCR의 주형으로 이용하였다. 정량적 PCR 증폭은 Bx-EXPB1에 특이적인 프라이머 (표 1)로 수행하였다. *B. xylophilus* 유래 튜블린 (Tubulin) 유전자는 정량시 참고 유전자로 사용하였다 (Kang et al., 2009). 각 유전자의 증폭효율은 다음의 식 $E = 10^{-1/\text{slope}}$ 라는 등식을 이용하여 평가하였다. 이때 기울기 (slope)는 증폭 결정시간 (Ct 값)에 대 순차적으로 희석된 주형 cDNA 농도의 그래프에서 얻었다. 최적화된 PCR 마스터 혼합물 (20 µl)은 0.2 mM dNTPs, 5 반응 완충액, 희석된 SYBR Green I (최종농도 1:40,000 ; Invitrogen), 0.5 U AccuPrime™ Pfx DNA polymerase (Invitrogen), 2 µl의 cDNA (총 RNA 10ng에 해당함), 및 2 µM의 Bx-EXPBs의 센스 및 안티센스 프라이머를 함유한다. 정량적 PCR은 Chromo4i (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 최적화된 가열 프로그램은 95 °C로 3분 1사이클, 95 °C로 20초, 60 °C로 20초, 68 °C로 30초를 40사이클, 그리고 68 °C로 3분간 최종 1사이클이었다. 정량적 PCR 후 PCR 산물의 동질성은 녹는점 분석으로 확인하였다. 전사수준 정량은 $2^{-\Delta Ct}$ 방법 (Pfaffl, 2001)에 따라 수행하였다. 정량적 PCR은 독립적으로 추출한 총 RNA (cDNA)로 두 번 반복하여 수행하였고, 각 반응은 실험 내 변이 (intra-experiment variation)를 최소화하기 위해 세 번 반복 수행하였다. 통계 차이를 탐지하기 위해 t-test에 SigmaStat ver. 2.0 software (SPSS, USA)를 이용하였다.

[0078] **다중배열과 익스팬신의 계통학적 분석**

[0079] *B. xylophilus* EST 라이브러리 및 게놈 DNA에서 유추한 EXPB 아미노산 서열dmf 선충, 식물 및 세균에서 얻은 익스팬신 서열과 비교하였다. EXP 도메인의 단백질 서열은 단백질 중량 매트릭스로서 Gonnet를 이용하여 ClustalX ver. 1.83으로 배열되었다. 계통수 작성은 Neighbor-joining method (boot trap, n = 1,000)로 수행되었다. 계통수는 Molecular Evolutionary Genetic Analysis ver. 4.1 소프트웨어를 이용하여 단백질 서열에 의해 얻었다. 이 분석에 이용된 익스팬신은 다음과 같다; 선충: EST 라이브러리에서 3 개의 EXPB [*B. xylophilus* EXPB1 (AB374536; Bx-EXPB1), Bx-EXPB2 (T3-1245 clone) 및 Bx-EXPB3 (T3-2805 클론)] 그리고 8개의 EXPs; *B. mucronatus* EXPB1 (AB374538; Bm-EXPB1); 감자 시스트 선충 (*Globodera rostochiensis*) EXPB1 (AJ556781; Gr-EXPB1) 및 Gr- EXPB2 (AJ311902); 뿌리썩이 선충 (*Ditylenchus destructor*) EXPB1 (GU373911) 및 EXPB2 {콩 시스트 선충 (*Heterodera glycines*) EXPB1 (BF014507; Hg-EXPB1)}. 식물: 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) EXPB3 (NM_118965; At-EXPB3); 담배 (*Nicotiana tabacum*) EXPL 단백질 (AF333386; Nt-EXPL); 토마토 (*Lycopersicon esculentum*) EXPB2 (DQ205653; Le-EXPB2); 감자 (*Solanum tuberosum*) EXPB2 (DQ314759; St-EXPB2). 세균: *Bacillus subtilis* EXLX1 (GU327817; Bs-EXLX1) 및 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPB EXP-유사 단백질 (NC_009480; Cm-EXPL).

[0080] **유사성 모델링을 통한 단백질 구조 예측**

[0081] Bx-EXPBs에서 EXP 도메인의 주형 확인은 PHYRE (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~servers/phyre/>)(Kelley and Sternberg, 2009) 또는 Swiss Model Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace>)를 이용하여 수행하였다 (Arnold et al., 2006). Bx-EXPBs의 예측 3차원 구조는 Qualitative Model Energy Analysis (QMEAN) server (<http://swissmodel.expasy.org/qmean>)를 이용하여 평가되었다. 잔기당 예측 오류가 가장 작고 가장 높은 QMEAN 점수를 받은 유사성 모델이 Bx-EXPBs의 3차원 구조를 나타내는데 이용되었다. 모델과 구조의 시각화 및 변형은 Swiss PDB viewer 4.0.1. (Swiss Institute of Bioinformatics)로 수행하였다 (Kaplan and Littlejohn, 2001).

[0082] **결과 1: *B. xylophilus*에서 세 종류의 익스팬신 B가 발견되었다.**

[0083] *B. xylophilus* 유래 익스팬신 유전자를 확인하기 위해 다른 선충 EXPB 유전자의 유사성에 기초하여 degenerative 프라이머 (D-F1 및 D-R1)를 합성하였다. 얻어진 PCR 산물의 뉴클레오티드 서열은 먼저 보고된 *B. xylophilus*의 EST 클론과 비교하였다 (Kang et al., 2004; Kang et al., 2009). 두 개의 EXPB 유전자는 EST 라이브러리의 두 EST 클론과 일치하였고, 본 발명자들은 이를 각각 "Bx-EXPB2" 및 "Bx-EXPB3"로 명명하였다. 모든 EXPBs는 분비 단백질의 공통 구조를 공유한다. 예컨대, 모든 Bx-EXPBs는 신호 펩타이드 (16 아미노산 길이)를 함유하는 것으로 예측되었다. 각 Bx-EXPBs의 전장 cDNA는 예측 분자량 15.6~15.8kDa으로 450bp이었다. 확인된 Bx-EXPBs는 단 하나의 EXP 도메인과 시스테인 보존 잔기들을 함유하였는데, 이것들은 EXPA 및 EXPB 패밀리어서도 발견된다. Bx-EXPB2와 Bx-EXPB3는 각각 Bx-EXPB1 (AB374536) 및 Bm-EXPB1 (AB374538)과 84% 및 86%의 서열 상동성을 나타내었다. 하지만, 이들은 Bx-EXP (EU143763)와는 비교적 낮은 서열 상동성 (54.4 ~ 60.4%)을 나타내었다. Bx-EXPBs의 유래를 시험하기 위해 게놈 서열을 분석하였다. 모든 Bx-EXPBs의 게놈 DNA 서열에서는 하나의 인트론이 발견되었다 (도 1A 및 도 4).

[0084] **결과 2: 선충 유래 EXPB 유전자들은 독립적으로 클러스터되었다.**

[0085] 선충, 세균 및 식물 유래 예측된 단백질 서열의 EXP 도메인 배열을 기준으로 neighbor-joining analysis로 계통수를 작성하였다 (도 1b). *B. xylophilus*, *B. mucronatus*, *G. rostochiensis* 및 *Heterodera glycines*와 같은 선충의 EXPs는 세균 및 식물 EXPs와 떨어져 독립적인 클러스터를 형성하였다. 선충 익스팬신은 세균보다는 식물의 익스팬신과 가까운 관계였다.

[0086] **결과 3: 증식 단계에서 Bx-EXPBs의 발현**

[0087] *B. xylophilus*의 증식 단계와 분산 단계 간의 EXPBs의 발현을 비교하였다. 변질성(degenerative) 프라이머 (DF1 및 DF2)를 이용하면 진한 단일 띠가 증식 단계의 cDNA에서 관측되었지만, 분산 단계의 cDNA에서는 관찰되지 않았다 (도 2A). 그러나, 최초로 보고된 Bx-EXP로부터 디자인된 프라이머 세트 (EU143763; C-F1: 5'-GCGTTGTAATAGGTGAACCTCTCC; C-R1: 5'-AGGCCAAGGATGCTACTATCACC; 도 2A)를 이용하면 밴드가 생성되지 않았다. 이 결과는 EXPBs가 분산 단계 *B. xylophilus*에서는 발현되지 않음을 제시한다. 이들은 술수염 하늬소 내에 머무르기 때문에, EXPBs에 의해 분해되는 세포벽 또는 장벽이 존재하지 않는다. 세 EXPBs의 발현 패턴을 좀더 규명하기 위하여, 각 EXPB에 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 정량적 PCR을 수행하였다. 본 발명자들은 Bx-EXPB2 및 Bx-EXPB3의 mRNA가 인 비보 (도 2B) 및 인 비트로 (도 2C) 증식단계에서 Bx-EXPB1의 mRNA보다 훨씬 높은 수준으로 축적됨을 밝혔다. 상대적 발현 수준은 다음과 같다: Bx-EXPB3 > Bx-EXPB2 >> Bx-EXPB1.

[0088] **결과 4: 추정된 다당류 결합부위 및 촉매잔기는 Bx-EXPBs에서 보존된다.**

[0089] Bx-EXPs의 기능을 다루기 위하여 단백질 유사성 모델링을 수행하였다. Swiss-Model Workspace and Phyre를 통하여 주형을 확인하였다. 주형의 품질은 전체 모델의 포괄적 스코어를 나타내는 QMEAN 스코어로 분석하였고, 모델 신뢰도를 0에서 1 범위로 예측하여 반영하였다 (Benkert et al., 2009). *B. subtilis* 유래 EXLX1, 3D30은 확인된 Bx-EXPBs 주형 중 가장 높은 QMEAN 스코어를 나타내었다 (표 2)(Kerff et al., 2008). 잔기당 추정 오류 또한 고려하였다 (도 5). 각 Bx-EXPB의 EXP 도메인은 EXP 도메인과 유사한 *B. subtilis* 유래 EXLX1의 D1과 16.5 내지 25.2%의 서열 동일성을 나타내었다. 그러나, EXPBs의 전체 구조는 EXLX1의 D1 도메인과 유사하였는데, EXP 도메인 구조에서 구조적 차이점이 발견되었다. EXLX1의 D1 도메인은 짧은 고리로 우회하는 세 개의 α 나선 및 여섯 개의 β 가닥으로 구성되었다 (도 3A).

[0090] 두 개의 α 나선 (Bx-EXPB1; 도 3B), 하나의 α 나선과 하나의 β 가닥 (Bx-EXPB2; 도 3C), 그리고 두 개의 α 나선 결손 및 세 개의 β 가닥 부가 (Bx-EXPB3; 도 3D)가 Bx-EXPBs의 EXP 도메인의 3차원 구조에서 예측되었다. EXLX1의 촉매성 D⁸² 잔기는 Bx-EXPB1과 Bx-EXPB2의 D⁸⁸ 잔기에 대응하였다 (도 3B 및 3C). 반면, 이는 Bx-EXPB3의 N 잔기로 대체된다 (도 3D).

[0091] EXLX1의 D1 도메인 내의 예측된 다당류 결합부위 (putative polysaccharide binding sites; PPBS)는 촉매성 D⁸² 잔기에 가까이 연결되었다 (도 3A). 다중 배열에 기초하여 PPBS에 상응하는 잔기들은 예측된 3차원 구조에 나타내었다 (도 3). Bx-EXPB2의 PPBS 대응 잔기들은 Bx-EXPBs 중 EXLX1의 PPBS와 가장 유사한 분포 패턴을 나타내었다 (도 3C).

표 1

Primer	Sequence	Experiment
D-F1	5'-ATYACKCCCMAGKYKAACAAGCC	Bx-EXPBs 증폭
D-R1	5'-CABTYGTYKTCSTRYKGGGAAGG	
RT-B1-F	5'-ATGAATCGCGTCTACTTGTGTCGC	Bx-EXPBs의 qRT-PCR
RT-B1-R	5'-TTAACATCCGCTGGCAGGGCTAGC	
RT-B2-F	5'-ATGAATTCCTTGTACTTGTGG	
RT-B2-R	5'-TTAGCAGCTGCTGATGGTGGTCTGAT	
RT-B3-F	5'-ATGAATCCCTTGTACTTGTGGCAG	
RT-B3-R	5'-TCAACAGTTGTGGTTGGGGTGGTGTGCGC	
Tubulin-F	5'-TCCGTACCCTGAAGTTGGCTAACC	"
Tubulin-R	5'-AAGTGGAGACGAGGGAATGGAACC	

표 2

Bx-EXPB2 model	Qmean score ¹	Secondary structure agreement ²	Solvent accessibility agreement ³	Protein	Species
3D30 ⁴	0.745	87.5	76.4	Expansin (EXLX1)	<i>Bacillus subtilis</i>
2HCZ	0.710	82.6	78.9	β -expansin	<i>Zea mays</i>
1N10	0.678	81.8	77.2	Pollen allergen	<i>Phleum pratense</i>
1WC2	0.638	72.8	73.9	β -1,4-endoglucanase	<i>Mytilus edulis</i>
1BW3	0.499	69.6	73.6	Endoglucanase	<i>Hordeum vulgare</i>

- [0093]
- [0094] 1. Qmean 스코어는 전체 모델의 global score를 나타내며, 0부터 1까지의 예측 모델 신뢰도를 반영한다.
- [0095] 2. 2차구조 일치 (Secondary structure agreement)는 목표 서열의 예측 2차구조와 모델의 계산된 2차구조 사이의 일치 정도를 나타낸다.
- [0096] 3. 용매 접근도 일치 (Solvent accessibility agreement)는 ACCpro (내부에 있음/노출됨)을 이용한 상대적 예측 용매 접근도와 DSSP (>25% 접근도는 노출되어 있음을 가리킴)에서 추론한 상대적 용매 접근도 간의 일치 정도를 나타낸다.
- [0097] 4. 3D30은 Bx-EXPB2 유사성 모델에서 주형으로 이용되었다.

도면

도면 1a

Panel A

Sequences are aligned by amino acid identity. The alignment shows conserved regions across various Bx-EXP proteins. Asterisks (*) indicate positions where the sequence is identical across all sequences shown.

Panel B

Sequences are aligned by amino acid identity. The alignment shows conserved regions across various Bx-EXP proteins. Asterisks (*) indicate positions where the sequence is identical across all sequences shown.

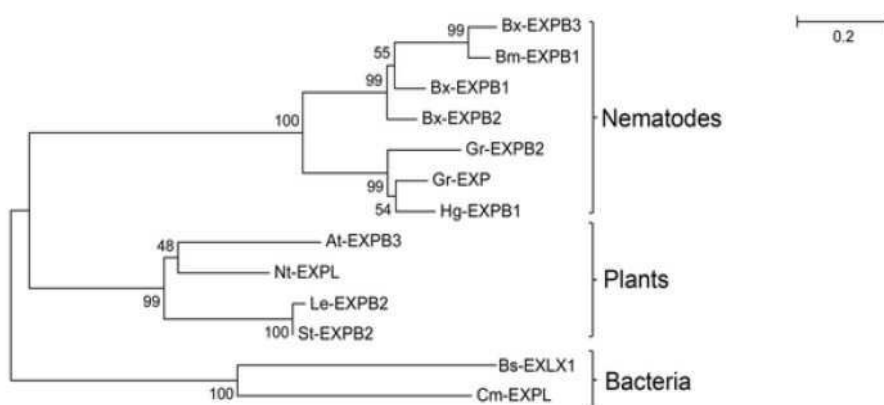
Panel C

Sequences are aligned by amino acid identity. The alignment shows conserved regions across various Bx-EXP proteins. Asterisks (*) indicate positions where the sequence is identical across all sequences shown.

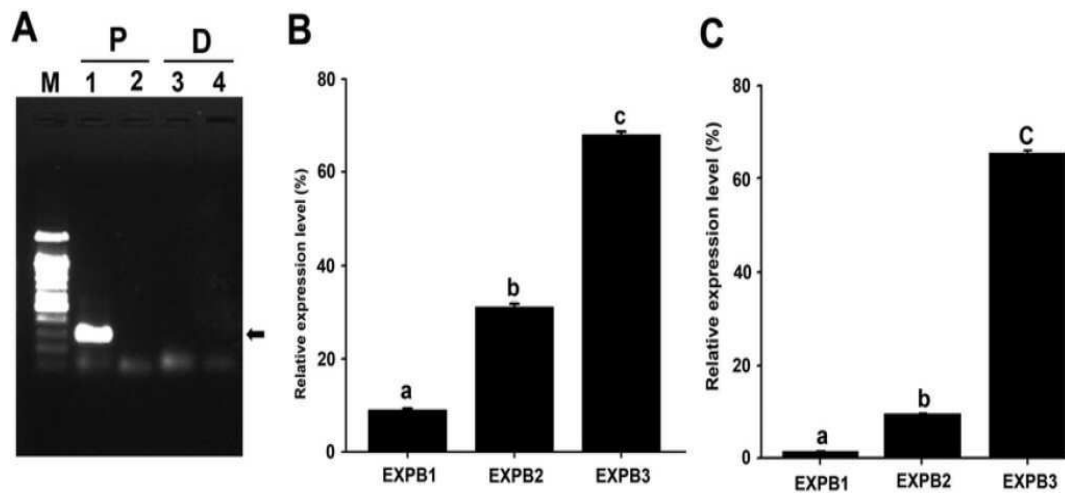
Panel D

Sequences are aligned by amino acid identity. The alignment shows conserved regions across various Bx-EXP proteins. Asterisks (*) indicate positions where the sequence is identical across all sequences shown.

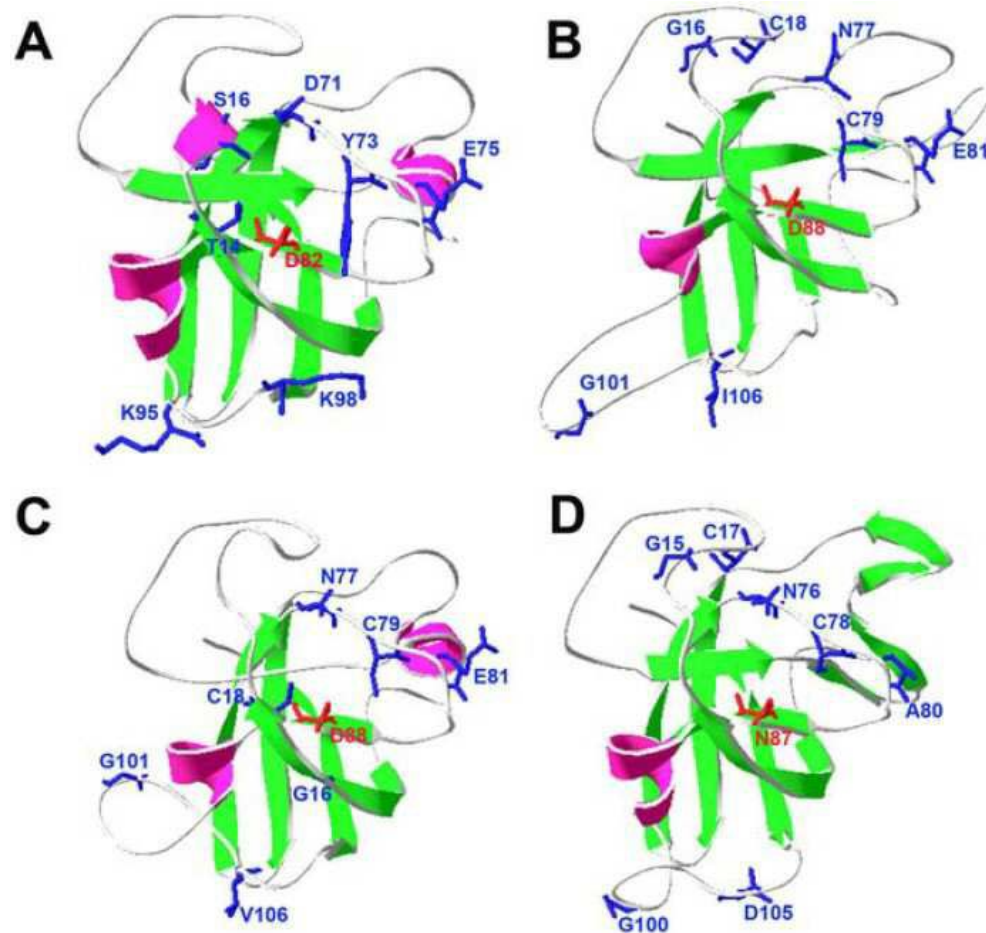
도면 1b



도면2



도면3



도면4

Bx-EXPB1 genomic DNA sequence

```

ATGAATCGCGTCTACTTGTGTGCGTGTGGCATCATTTGTCATCGCCGACCAGATCACTCCCAGTTGAACAAGCCCATCTCCGGAGCGGAGTTCACTT 100
TCTACGGAGCCTCAGGAAGAGGGGCTTGTGGTCTGGATGTGCAAACTTGTGGCCGCGGTGTCTGGAAGCCTCTTCGACTCCAATGGTCAATGGGTGCC 200
CTCGAATCTGCCTGACGGAAGATACATTTTGGATGACCCAGTTTGCCGAGGCATCTGCGTCCAGATCGAGTACAAGGGAAAAACGTAGGTGGCTGGAGGG 300
AAAAGGAGTGGATATTCTGAAGCCTGGAGTCGAAAAACACGGCTTTTCAACAGGTCGCTCATAAGATATCCCCGAACCTTGATGCCGGTGATCGTAAA 400
AGGAAGTCTACACTGATTCTCCCAAAATAAATTTTCCATATAGCAATCAAAAGTTATGGCAAAAAATTTGCCGAATCTACAAAACCTTCCTCGATCATT 500
TCAGTGCTGTTTTCCCGCGCAGCAACAAATGCCCGAATGTGCTGTGGACCACGTGCACCTCTCCACGGACGCGTTCCTCATCCTGGAGCCAGCCGAGG 600
AACCGTCGGAATCGCGAAGCCAGCCACCATCACGTATCTGTTCTGCAATCAGACCTCCGTACCAGCGCCCGAGCGCTGGCTCCAGCGCTAGTCCTAGT 700
GCCAGTTCCACCGCTAGCCCTGCCAGCGGATGTAA 736
    
```

Bx-EXPB2 genomic DNA sequence

```

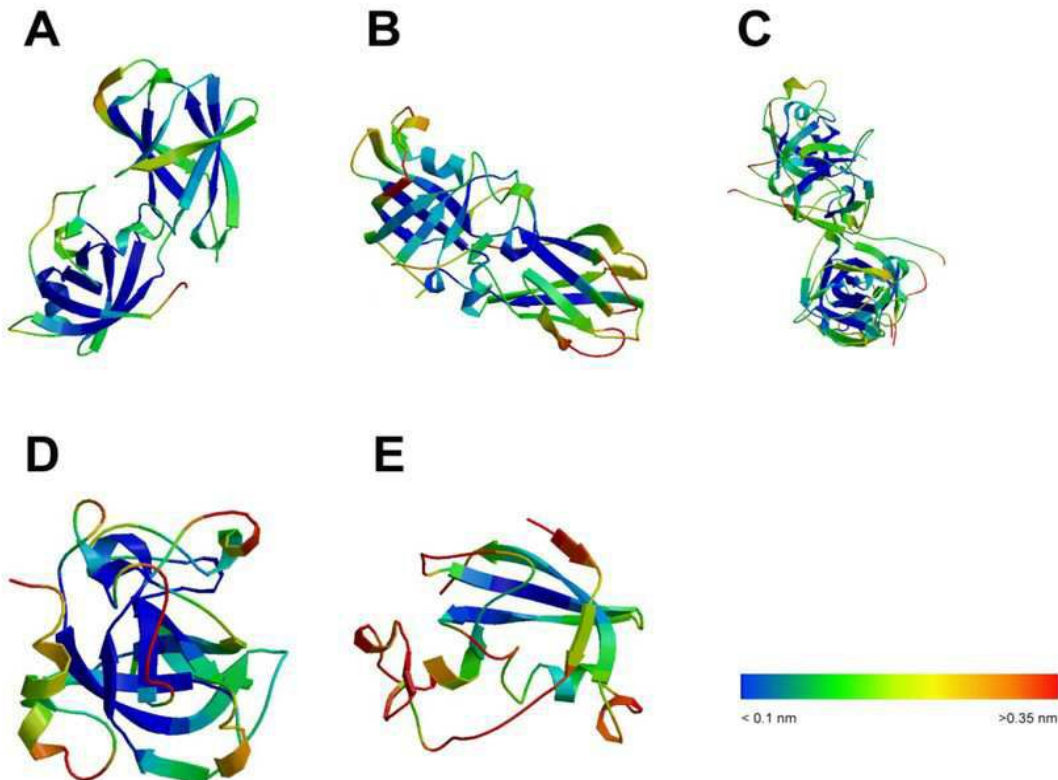
ATGAATTCCTGTACTTGTGTGGCTTGTGGCTCCATTTGTCGTGCGCGACTTGATCACTCCCAGTTGAACAAGCCCATTCGGCGGCGGAGTTCACTT 100
TCTACGGAGCCTTCGGAAAGGGAGCATGTGGCTTGGATGTAACTCCTGCTCGGCGCGAGTCTCTGGAGACCTCTTCGACTCCAGCGCCCAATGGGTACC 200
CTCTACGCTGCCGATGGAAGATACATTTTGGATGACCCAGTCTGCAAAAGCATCTGCGTCCAGATCGAGTACAAGGGAAAAACGTAGGTGGCTGCAGGG 300
GAAAGGAGTGGATATTCTGAACAAAGAGAAGCCTAGAACTAAATACGCGGTTCCCAAACTGGTCGCTCATAAGAAATCCTCGAATTTTGATGCCAGAG 400
ACCGTAAATGAAGTCCATTTTTTGGGCTTTTGAAGCTAGGACCTTGGTGATCTGGGAAATTACAAGCCAAGGACCTAACACATGTGCAGCAAAAT 500
ATAATCCTAATACTTGACACAAACAGGACTAAAAATTTCTCACTAGTGTGTCGCAAAAGTCGCTGCTGCGACTTCGGCGACATGCACTGTGCAAAAAAG 600
GTTAGAGAGCAACACCCGAAAAATCCTATTGTATCTTCTACAGGCTAAAAATTGCACTTCTTTTAGGATCTCGGCATGAAAGCTTTGGGATTCTTT 700
AAAAGTAGGGCGCACACTGGCTCCAAAAAGAAATCAAGCTTTTCAAGGACAAACCAAAAGTTATTACCAAAAAATTTGTACTCTCCAAAAACCCCA 800
ATCTTTTCAGTGCCACCTTCCCGCCGACAAACAGTGCCCGAATGCGCTGTGGACCACTGCACCTCTCCGAAAGCCGCTTCTTGGTTCTGGAGCCAGC 900
CGGAGGAACTGTGGATGCGGAAAGCCGCCACCATCACCTATCTGTTCTGCAATCAGACCACCATCAGCAGCTGCTAA 989
    
```

Bx-EXPB3 genomic DNA sequence

```

ATGAATCCCTGTACTTGTGTGGCAGTGGTGGTGCCATTGTCATCGCCGACTTGATCAAGCCCGAGTTGAACAAGCCCATCACCGCGAGTTTACTTTTA 100
CTGGAGCCACCGGACGGGGCGCTGTGGTCTGGACATTGCCAATTTGTGGCCGAGTGTGCTCCAACTCTTCGACCCAGCTCCCAATGGGTGCCCTC 200
GGATCTGCGCGACGGAAGATACGTTCTGGATGACCTGTGTGCAAGGGAATCTGCGTCCAGATCGAGTACAAGGGCGTCACGTAAGTGGGGAAAGGGGA 300
GGGATAGTTTTGGAGTAGGACACGCTGTATAGAGGATAGTTGCAAGAATGAGCGGCCTTTGGTATCAAACTGTTTTATTAGATAATTGTATTTCTCC 400
TGCCTACAGTAGAGTCTTACGCGGTGGATCTTAGTTTGCAGCTGGAAAAAGACTCCTTTTACCAAAAGTTGACCTACTCTATTGCACTTATACCGT 500
AGAGCAAAAAAGTTTCTCAGAACTGAACAAATGCCCTTTATCTATCTTTCCATTGTCCCTTGGCATTAGGACTTTTGGCACCCTGCAAGCAACAAGCTA 600
GCGTAGTTTTTCAAAAAAACTAAAAAGCCAGTTTCTGTAGAGGAAAAAGCTGTATCAATGAATATACATATTCACAGTGCCAAACAATAACA 700
ACTTCTTGTAAAACTAAAGAACTAAAAAACGACGGAACCTTCTGAAAAACCAATATGTGTAATGTTTCAGCGGCACCTTCCAGTGGACAACGAA 800
TGTGCGCCTGCGACGTCGACCACGTCAACCTGTCCGAGGAGGCGTTCTGATCCTGGAACCGGCCGAGGAAACAACGAGAGCGCGAAGCCAGCCACTA 900
TCACGTATCTGAAGTGACGCGACACCCCAACCAAACTGTGA 949
    
```

도면5



서열 목록

<110>	Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University	
<120>	Gene sequence and protein sequence of pindwood nematode Bursaphelenchus xylophilus expansin, and pharmaceutical composition for preventing and treating pine wilt disease	
<130>	HallymU-201301-YounghoKoh	
<160>	25	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer "D-F1"	
<400>	1	
	atyackcccm agkykaacaa gcc	23
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer "D-R1"	
<400>	2	
	cabtygtykt csrykgggaa gg	22
<210>	3	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer "RT-B1-F"	
<400>	3	
	atgaatcgcg tctacttggt gtcgc	25
<210>	4	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer "RT-B1-R"	

<400> 4
ttaacatccg ctggcagggc tagc 24

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer "RT-B2-F"
<400> 5
atgaattcct tgtacttggt gg 22

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer "RT-B2-R"
<400> 6
ttagcagctg ctgatggtgg tctgat 26

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer "RT-B3-F"
<400> 7

atgaatccct tgtacttggt ggcag 25

<210> 8
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer "RT-B3-R"
<400> 8
tcaacagttt gtggttgggg tgggtgtcgc 29

<210> 9
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer "Tubulin-F"

<400> 9

tccgtaccct gaagttggct aacc

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer "Tubulin-R"

<400> 10

aagtggagac gagggaatgg aacc

24

<210> 11

<211> 171

<212> PRT

<213> bursaphelenchus xylophilus

<400> 11

Met Asn Arg Val Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Ala Ser Phe Val Ile Ala

1 5 10 15

Asp Gln Ile Thr Pro Gln Leu Asn Lys Pro Ile Ser Gly Gly Glu Phe

20 25 30

Thr Phe Tyr Gly Ala Ser Gly Arg Gly Ala Cys Gly Leu Asp Val Gln

35 40 45

Asn Leu Ser Ala Ala Val Ser Gly Ser Leu Phe Asp Ser Asn Gly Gln

50 55 60

Trp Val Pro Ser Asn Leu Pro Asp Gly Arg Tyr Ile Leu Asp Asp Pro

65 70 75 80

Val Cys Arg Gly Ile Cys Val Gln Ile Glu Tyr Lys Gly Lys Thr Ala

85 90 95

Val Phe Pro Ala Asp Asn Lys Cys Pro Glu Cys Ala Val Asp His Val

100 105 110

Asp Leu Ser Thr Asp Ala Phe Leu Ile Leu Glu Pro Ala Gly Gly Thr

115 120 125

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

Thr Ser Val Thr Ser Ala Pro Ser Ala Gly Ser Ser Ala Ser Pro Ser
145 150 155 160

Ala Ser Ser Thr Ala Ser Pro Ala Ser Gly Cys
165 170

<210> 12

<211> 131

<212> PRT

<213> Bursaphelenchus xylophilus

<400> 12

Met Asn Ser Leu Tyr Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro Phe Val Val Ala
1 5 10 15

Asp Leu Ile Thr Pro Gln Leu Asn Lys Pro Ile Ser Gly Gly Glu Phe
20 25 30

Thr Phe Tyr Gly Ala Ser Gly Lys Gly Ala Cys Gly Leu Asp Val Ser
35 40 45

Ser Cys Ser Ala Ala Val Ser Gly Asp Leu Phe Asp Ser Ser Ala Gln
50 55 60

Trp Val Pro Ser Thr Leu Pro Asp Gly Arg Tyr Ile Leu Asp Asp Pro

65 70 75 80

Val Cys Lys Gly Ile Cys Val Gln Ile Glu Tyr Lys Gly Lys Thr Ala
85 90 95

Thr Phe Pro Ala Asp Asn Lys Cys Pro Glu Cys Ala Val Asp His Val
100 105 110

Asp Leu Ser Glu Ala Ala Phe Leu Val Leu Glu Pro Ala Gly Gly Thr
115 120 125

Val Gly Val
130

<210> 13

<211> 150

<212> PRT

<213>

> Bursaphelenchus xylophilus

<400> 13

Met Asn Pro Leu Tyr Leu Leu Ala Val Val Val Pro Phe Val Ile Ala

1 5 10 15

Asp Leu Ile Thr Pro Gln Leu Asn Lys Pro Ile Thr Gly Glu Phe Thr

20 25 30

Phe Thr Gly Ala Thr Gly Arg Gly Ala Cys Gly Leu Asp Ile Ala Asn

35 40 45

Leu Ser Ala Gly Val Ser Ser Lys Leu Phe Asp Pro Ser Ser Gln Trp

50 55 60

Val Pro Ser Asp Leu Pro Asp Gly Arg Tyr Val Leu Asp Asp Pro Val

65 70 75 80

Cys Lys Gly Ile Cys Val Gln Ile Glu Tyr Lys Gly Val Thr Gly Thr

85 90 95

Phe Pro Val Asp Asn Glu Cys Ala Ala Cys Asp Val Asp His Val Asn

100 105 110

Leu Ser Glu Glu Ala Phe Leu Ile Leu Glu Pro Ala Gly Gly Asn Asn

115 120 125

Gly Asp Ala Lys Pro Ala Thr Ile Thr Tyr Leu Lys Cys Ser Asp Thr

130 135 140

Thr Pro Thr Thr Asn Cys

145 150

<210> 14

<211> 271

<212> PRT

<213> Globodera rostochiensis

<400> 14

Met Ser Ser Ser Glu Ala Ile Leu Cys Leu Leu Cys Leu Leu Ala Val

1 5 10 15

Asn Phe Arg Ala Gln Ile Val Leu Ala Ser Val Thr Ala Lys Leu Glu

20 25 30

Gly Lys Ser Trp Asn Gly Gly Gly Gln Tyr Val Pro Asn Phe Lys Asn

35 40 45
 Asn Asp Gly Ser Lys Ile Ala Cys Ser Val Lys Phe Ser Leu Thr Pro
 50 55 60
 Lys Lys Gly Thr Thr Ile Gly Ser Val Trp Gly Ala Asn Ala Val Ser
 65 70 75 80
 Gly Ala Ser Asn Gln Tyr Thr Leu Ala Pro Pro Ala Asp Ile Ala Pro
 85 90 95
 Gly Ala Thr His Thr Asn Ala Gly Val Asn Ile Asn Gly Asn Gly Ala
 100 105 110

 Pro Thr Leu Lys Leu Ile Glu Ala Lys Tyr Phe Ile Asp Asp Val Cys
 115 120 125
 Gly Gly Ala Pro Ala Gly Ser Cys Met Gly Cys Leu Ser Asn Thr Lys
 130 135 140
 Met Asp Gly Pro Ile Asn Lys Asn Leu Asn Lys Pro Phe Lys Asn Ser
 145 150 155 160
 Val Phe Thr Phe Tyr Gly Ala Gly Gly Arg Gly Ala Cys Gly Leu Asp
 165 170 175
 Ala Gly Val Pro Lys Met Ser Ala Ala Gly Ser Gly Asn Leu Phe Lys

 180 185 190
 Pro Asp Gly Gln Trp Val Asp Ala Cys Arg Lys Asp Lys Arg Thr Leu
 195 200 205
 Leu Asp Asp Pro Ile Cys Lys Asn Ile Cys Val Lys Ile Asp Tyr Asn
 210 215 220
 Gly Lys Thr Leu Thr Val Pro Ile Asn Asn Lys Cys Pro Glu Cys Thr
 225 230 235 240
 Pro Ser His Val Asp Leu Ser Ile Asp Ala Phe Asn Tyr Leu Glu Pro
 245 250 255

 Arg Gly Gly Leu Val Gly Lys Ala Thr Gly Xaa Arg Ser Pro Ile
 260 265 270
 <210> 15
 <211> 165
 <212> PRT

<213> Globodera rostochiensis

<400> 15

Met Ser Cys Ser Gln Leu Ile Leu Cys Leu Leu Cys Leu Leu Leu Val

1 5 10 15

His Pro Asn Glu Ser Cys Met Gly Cys Leu Ser Ser Thr Thr Thr Asp

20 25 30

Gly Pro Ile Asn Gln Asn Leu Asn Lys Pro Phe Thr Asn Gly Val Phe

35 40 45

Thr Phe Asn Glu Ala Thr Gly Arg Ser Ala Cys Gly Leu Asp Ala Gly

50 55 60

Lys Pro Lys Met Ser Ala Ser Val Ser Gly Lys Leu Phe Lys Ser Asp

65 70 75 80

Gly Gln Trp Lys Asn Ala Cys Arg Ile Asp Gln Gln Tyr Met Leu Asp

85 90 95

Asp Pro Ile Cys Lys Asn Ile Cys Val Lys Ile Asp Tyr Lys Gly Lys

100 105 110

Ser Leu Thr Val Pro Ile Asn Asn Lys Cys Pro Glu Cys Pro Pro Asn

115 120 125

Asn Val Asp Leu Ser Ile Asp Ala Phe Thr Tyr Leu Glu Ser Arg Ala

130 135 140

Val Gly Lys Ala Thr Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Leu Lys Cys Pro Ser

145 150 155 160

Gly Ile Lys Ala Cys

165

<210> 16

<211> 295

<212> PRT

<213> Heterodera glycines

<400> 16

Met Asn Ala Phe Phe Ser Phe Gly Ile Phe Leu Ala Ile Gln Phe His

1 5 10 15

Ala Gln Phe Val Leu Ala Asp Val Thr Ala Ser Ile Lys Pro Ser Ser

20 25 30
 Thr Trp Asn Gly Gly Gly Gln Tyr Ile Leu Ser Phe Lys Asn Asn Asp
 35 40 45
 Asn Ser Lys Thr Val Cys Ser Val Lys Phe Thr Leu Thr Pro Ala Ser
 50 55 60
 Gly Thr Ser Ile Ser Ala Lys Trp Gly Phe Asp Ala Val Ser Gly Ala
 65 70 75 80

 Ser Asn Gln Tyr Thr Leu Ser Asn Asn Ala Asp Ile Ala Pro Gly Ala
 85 90 95
 Thr Asn Ser Asn Gly Gly Leu Asn Ile Gln Gly Thr Asn Pro Asn Gly
 100 105 110
 Pro Pro Ala Thr Pro Thr Leu Gln Leu Ile Glu Ala Lys Tyr Tyr Ser
 115 120 125
 Asn Gly Val Cys Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser Ser
 130 135 140
 Ser Ser Ser Ser Ser Cys Met Gly Cys Leu Ala Ser Thr Gly Thr Ser

 145 150 155 160
 Gly Pro Ile Asp Ser Tyr Ile Gly Lys Ser Ile Ser Asn Ser Val Phe
 165 170 175
 Thr Phe Tyr Gly Gly Gly Gly Arg Gly Ala Cys Gly Leu Asp Ser Gly
 180 185 190
 Val Pro Lys Met Ser Ala Ala Gly Ser Gly Lys Leu Phe Lys Ser Asp
 195 200 205
 Gly Gln Trp Lys Asp Ala Cys Arg Ala Asp Lys Gln Tyr Met Leu Asp
 210 215 220

 Asp Pro Ile Cys Lys Asp Ile Cys Ile Lys Ile Asp Tyr Asn Gly Lys
 225 230 235 240
 Ser Leu Thr Val Pro Ile Asn Asn Lys Cys Pro Glu Cys Asp Val Asn
 245 250 255
 His Val Asp Leu Thr Ile Asp Ala Phe Asn Tyr Leu Glu Pro Arg Gly
 260 265 270
 Gly Glu Val Gly Lys Ala Thr Gly Ala Thr Leu Thr Tyr Met Lys Cys

275 280 285

Pro Ser Asn Ile Lys Ala Cys

290 295

<210> 17

<211> 208

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<400> 17

Met Ala Tyr Asp Asp Leu His Glu Gly Tyr Ala Thr Tyr Thr Gly Ser

1 5 10 15

Gly Tyr Ser Gly Gly Ala Phe Leu Leu Asp Pro Ile Pro Ser Asp Met

20 25 30

Glu Ile Thr Ala Ile Asn Pro Ala Asp Leu Asn Tyr Gly Gly Val Lys

35 40 45

Ala Ala Leu Ala Gly Ser Tyr Leu Glu Val Glu Gly Pro Lys Gly Lys

50 55 60

Thr Thr Val Tyr Val Thr Asp Leu Tyr Pro Glu Gly Ala Arg Gly Ala

65 70 75 80

Leu Asp Leu Ser Pro Asn Ala Phe Arg Lys Ile Gly Asn Met Lys Asp

85 90 95

Gly Lys Ile Asn Ile Lys Trp Arg Val Val Lys Ala Pro Ile Thr Gly

100 105 110

Asn Phe Thr Tyr Arg Ile Lys Glu Gly Ser Ser Arg Trp Trp Ala Ala

115 120 125

Ile Gln Val Arg Asn His Lys Tyr Pro Val Met Lys Met Glu Tyr Glu

130 135 140

Lys Asp Gly Lys Trp Ile Asn Met Glu Lys Met Asp Tyr Asn His Phe

145 150 155 160

Val Ser Thr Asn Leu Gly Thr Gly Ser Leu Lys Val Arg Met Thr Asp

165 170 175

Ile Arg Gly Lys Val Val Lys Asp Thr Ile Pro Lys Leu Pro Glu Ser

180 185 190

Gly Thr Ser Lys Ala Tyr Thr Val Pro Gly His Val Gln Phe Pro Glu

195 200 205
 <210> 18
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis
 <400> 18

Met Thr Arg Ala Ser Ala Leu Pro Gly Arg Pro Arg Ala Pro Arg Arg
 1 5 10 15
 Pro Phe Thr Ala Ala Arg Arg Arg Ile Leu Ser Ala Ala Leu Ala Val
 20 25 30
 Leu Val Ala Val Ala Gly Pro Ala Met Ala Ala Ser Ala Ala Ser Ala
 35 40 45

Ala Pro Ala Ala Gly Pro Ala Arg Val Ser Gly Tyr Ala Thr His Tyr
 50 55 60
 Ser Leu Gly Pro Asp Gly Arg Thr Thr Asn Gly Asn Cys Ser Leu Pro
 65 70 75 80
 Ala Ile Pro Lys Asp Arg Leu Tyr Val Ala Val Gly Pro Asp Leu Tyr
 85 90 95
 Ala Gly Gly Ala Gly Cys Gly Ser Tyr Phe Asp Val Thr Gly Pro His
 100 105 110
 Gly Thr Val Arg Val Glu Val Ala Asp Ser Cys His Glu Cys Val His

115 120 125
 Gly His Leu Asp Leu Ser Glu Glu Ala Phe Arg Ala Ile Gly Asp Tyr
 130 135 140
 Asp Ala Gly Ile Ile Thr Thr Ser Tyr Val Pro Val Ala Ala Ser Thr
 145 150 155 160
 Val Pro Pro Leu Ser Phe Arg Phe Lys Asp Gly Ser Ser Ala Tyr Trp
 165 170 175
 Ala Ala Leu Gln Val Leu Asp Ala Gly Val Arg Leu Arg Ser Val Glu
 180 185 190

Leu Trp Val Gly Ala Arg Trp Val Pro Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Gly
 195 200 205
 Tyr Trp Leu Ala Pro Gly Tyr Val Gly Ala Gly Pro Phe Thr Val Arg
 210 215 220
 Val Thr Asp Thr Thr Gly Arg Thr Ala Thr Val Gln Gly Ile Val Leu
 225 230 235 240
 Asp Pro Met Arg Leu Gln His Thr Ala Ser Arg Leu Arg
 245 250
 <210> 19
 <211> 264
 <212> PRT

 <213> arabidopsis thaliana
 <400> 19
 Met Gln Leu Phe Pro Val Met Leu Ala Thr Leu Cys Ile Val Leu Gln
 1 5 10 15
 Leu Leu Ile Gly Ser Ser Ala Leu Ala Thr Thr Asn Arg His Val Ser
 20 25 30
 Asn Ser His Trp Leu Pro Ala Val Ala Thr Trp Tyr Gly Ser Pro Asn
 35 40 45
 Gly Asp Gly Ser Asp Gly Gly Ala Cys Gly Tyr Gly Thr Leu Val Asp
 50 55 60

 Val Lys Pro Leu His Ala Arg Val Gly Ala Val Asn Pro Ile Leu Phe
 65 70 75 80
 Lys Asn Gly Glu Gly Cys Gly Ala Cys Tyr Lys Val Arg Cys Leu Asp
 85 90 95
 Lys Ser Ile Cys Ser Arg Arg Ala Val Thr Val Ile Ile Thr Asp Glu
 100 105 110
 Cys Pro Gly Cys Ser Lys Thr Ser Thr His Phe Asp Leu Ser Gly Ala
 115 120 125
 Val Phe Gly Arg Leu Ala Ile Ala Gly Glu Ser Gly Pro Leu Arg Asn

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

145 150 155 160
 Gly Lys Asn Ile Ala Phe His Val Asn Glu Gly Ser Thr Asp Phe Trp
 165 170 175
 Leu Ser Leu Leu Val Glu Phe Glu Asp Gly Glu Gly Asp Ile Gly Ser
 180 185 190
 Met His Ile Arg Gln Ala Gly Ala Arg Glu Trp Leu Glu Met Lys His
 195 200 205

 Val Trp Gly Ala Asn Trp Cys Ile Ile Gly Gly Pro Leu Lys Gly Pro
 210 215 220
 Phe Ser Ile Lys Leu Thr Thr Leu Ser Ala Gly Lys Thr Leu Ser Ala
 225 230 235 240
 Thr Asp Val Val Pro Arg Asn Trp Ala Pro Lys Ala Thr Tyr Ser Ser
 245 250 255
 Arg Leu Asn Phe Ser Pro Val Leu
 260
 <210> 20
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> Lycopersicon esculentum

 <400> 20
 Met Gly Leu Phe Asp Ile Ser His Leu Val Ile Phe Ser His Leu Ile
 1 5 10 15
 Ile Val Leu Val Cys Phe Ile Cys Pro Ser Phe Gly Tyr Lys Pro Lys
 20 25 30
 His Phe Asn Leu Ser Thr His Ala Thr His Trp Gly Thr Ala Gly Ala
 35 40 45
 Thr Trp Tyr Gly Ser Pro His Gly Ala Gly Ser Asp Gly Gly Ser Cys
 50 55 60
 Gly Tyr Gly Ser Ala Val Ser Glu Ala Pro Leu Ser Ser Phe Val Thr

 65 70 75 80
 Gly Ile Gly Pro Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Lys Glu Cys Gly Ala Cys
 85 90 95

Tyr Gln Val Lys Cys Thr Lys Lys Met His Arg Ser Cys Ser Gly Lys
 100 105 110
 Gly Val Arg Val Val Ile Thr Asp Phe Cys Pro Gly Gly Pro Cys Val
 115 120 125
 Ala Gln Ser Ala His Phe Asp Leu Ser Gly Thr Ala Phe Gly Ala Met
 130 135 140

Ala Ile Pro Gly Gln Glu Gln Lys Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Gln
 145 150 155 160
 Ile Arg Tyr Ala Arg Val Ala Cys Asp Tyr Ser Arg Lys Asn Ile Val
 165 170 175
 Phe His Val Asp Gln Gly Ser Asn Ser Glu Tyr Phe Ala Val Val Ile
 180 185 190
 Glu Phe Glu Gln Gly Asp Gly Asp Leu Ala Lys Val Glu Leu Lys Glu
 195 200 205
 Lys Arg Ser Ser Ser Ile Ile Ser Arg Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Lys

210 215 220
 Trp Arg Gln Met Gln Gln Ser Trp Gly Ala Val Trp Lys Leu Asp Ala
 225 230 235 240
 Gly Ser Lys Leu His Pro Pro Phe Ser Ile Arg Leu Thr Ser Gln Tyr
 245 250 255
 Ser Asp Gln Ile Leu Ile Ala Asn Asn Val Ile Pro Thr Gly Trp Gln
 260 265 270
 Pro Gly Ala Thr Tyr Arg Ser Leu Val Asn Tyr Arg Val
 275 280 285

<210> 21
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum
 <400> 21

Met Ser Tyr Pro Pro Ile Pro Gln Tyr Ser Phe Tyr Leu Phe Ile Ile
 1 5 10 15
 Leu Ala Met Phe Ser Leu Ser Leu Lys Thr Cys Ser Ser Val Pro Ser

20 25 30
 Lys Leu Val Asn Ile Ser Met Ala Glu Thr Asp Pro Phe Leu Pro Ala
 35 40 45
 Val Ala Thr Trp Tyr Gly Asp Pro Asp Gly Ala Gly Ser Asp Gly Gly

 50 55 60
 Ala Cys Gly Tyr Gly Asn Asp Val Arg Asn Pro Pro Phe Ser Ala Met
 65 70 75 80
 Val Ser Ala Gly Asn Ser Asn Leu Phe Lys Gly Gly Lys Gly Cys Gly
 85 90 95
 Ala Cys Tyr Gln Val Ile Cys Lys Glu Lys Val Asp Cys Ser Glu Ile
 100 105 110
 Pro Ile Thr Val Thr Ile Thr Asp Glu Cys Pro Ala Thr Cys Gly Asp
 115 120 125

 Gly Ala Pro Phe His Phe Asp Leu Ser Gly Thr Ala Phe Gly Ala Leu
 130 135 140
 Ala Lys Pro Gly Gln Ala Asp Leu Phe Arg Gly Ala Gly Ile Leu Asn
 145 150 155 160
 Ile Thr Tyr Lys Arg Val Ala Cys Asn Tyr Pro Gln Thr Thr Val Thr
 165 170 175
 Phe Lys Ile Asp Leu Gly Ser Asn Pro Ser Tyr Phe Ser Cys Val Ile
 180 185 190
 Glu Phe Glu Asn Gly Asp Gly Asp Leu Asp Ile Val Glu Leu Gln Thr

 195 200 205
 Ser Gly Ser Asp Gln Trp Leu Pro Met Lys Gln Leu Trp Gly Ala Asn
 210 215 220
 Trp Asn Ile Asp Leu Val Pro Pro Gln Ala Thr Ala Pro Phe Ser Ile
 225 230 235 240
 Arg Leu Thr Thr Leu Asp Ser Lys Lys Thr Leu Val Ala Glu Asn Val
 245 250 255
 Ile Pro Val Asp Trp Ala Pro Gly Lys Ser Tyr Arg Ser Ile Val Asn
 260 265 270

Phe

<210> 22

<211> 279

<212> PRT

<213> Solanum tuberosum

<400> 22

Met Gly Leu Phe Asp Ile Ser His Leu Val Ile Phe Ser His Leu Ile

1 5 10 15

Ile Val Leu Val Cys Phe Ile Cys Pro Ser Phe Gly Tyr Lys Pro Lys

20 25 30

His Phe Asn Leu Ser Thr His Ala Thr His Trp Gly Thr Ala Gly Ala

35 40 45

Thr Trp Tyr Gly Ser Pro His Gly Ala Gly Ser Asp Gly Gly Ser Cys

50 55 60

Gly Tyr Gly Ser Ala Val Ser Gln Ala Pro Phe Ser Ser Phe Val Thr

65 70 75 80

Gly Ile Gly Pro Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Lys Glu Cys Gly Ala Cys

85 90 95

Tyr Gln Val Lys Cys Thr Lys Lys Met His Gly Ser Cys Ser Gly Lys

100 105 110

Gly Val Arg Val Val Ile Thr Asp Phe Cys Pro Gly Gly Pro Cys Val

115 120 125

Ala Gln Ser Ala His Phe Asp Leu Ser Gly Thr Ala Phe Gly Ser Met

130 135 140

Ala Ile Pro Gly Gln Glu Gln Lys Leu Arg Asp Ala Gly Val Leu Gln

145 150 155 160

Ile Arg Tyr Ala Arg Val Ala Cys Asp Tyr Ser Arg Lys Asn Ile Val

165 170 175

Phe His Val Asp Gln Gly Ser Asn Ser Glu Tyr Phe Ala Val Val Ile

180 185 190

Glu Phe Glu Glu Gly Asp Gly Asp Leu Ala Lys Val Glu Leu Lys Glu

195 200 205
 Lys Ile Ser Ser Ile Thr Lys Asn Ser Lys Trp Arg Gln Met Gln Gln
 210 215 220
 Ser Trp Gly Ala Val Trp Lys Leu Asp Ala Gly Ser Glu Leu His Pro
 225 230 235 240
 Pro Phe Ser Ile Arg Leu Thr Ser Gln Tyr Ser Asp Gln Ile Leu Ile
 245 250 255
 Ala Lys Asn Val Ile Pro Thr Gly Trp Gln Pro Gly Ala Thr Tyr Arg
 260 265 270

Ser Leu Val Asn Tyr Arg Val

275
 <210> 23
 <211> 736
 <212> DNA
 <213> Bursaphelenchus xylophilus
 <400> 23
 atgaatcgcg tctacttggt gtcgctgttg gcatcatttg tcatcgccga ccagatcact 60
 ccccgattga acaagcccat ctccggaggc gagttcactt tctacggagc ctcaggaaga 120
 ggggcttgtg gtctggatgt gcaaaacttg tcggccgcgg tgtctggaag cctcttcgac 180
 tccaatggtc aatgggtgcc ctggaatctg cctgacggaa gatacatttt ggatgaccca 240
 gtttgccgag gcatctgcgt ccagatcgag tacaaggga aaacgtaggt ggctggaggg 300

 aaaaggagtg gatattctga agcctggagt cgaataataca cggcttttca aacaggtcgc 360
 tcataagata tccccgaact ttgatgccgg tgatcgtaaa aggaagtcta cactgattct 420
 cccaaataa atttttccat atagcaatca aaaagttagt gcaaaaaatt tgccgaatct 480
 acaaaacttc ctgcatcatt tcagtgtgtt ttccccgcc gacaacaaat gccccgaatg 540
 tgctgtggac cagtcgacc tctccacgga cgcgttcctc atcctggagc cagccggagg 600
 aaccgtcgga atcgcaagc cagccacat cacgtatctg ttctgcaatc agacctccgt 660
 caccagcgcc ccgagcgctg gctccagcgc tagtcctagt gccagttcca ccgctagccc 720

 tgccagcgga tgtaaa 736
 <210> 24
 <211> 979
 <212> DNA

<213> Bursaphelenchus xylophilus

<400> 24

atgaattcct tgtacttggt ggcggttggt gctccatttg tegtgcgca ctgatcact 60
 cccagttga acaagcccat ttccggcggc gagttcactt tctacggagc ttccggaaag 120
 ggagcatgtg gcttggatgt aagctcctgc tcggccgcag tctctggaga cctcttcgac 180
 tccagcgccc aatgggtacc ctctacgtg ccgatggaa gatacathtt ggatgaccca 240
 gtctgcaaag gcatctgcgt ccagatcgag tacaaggga aaacgtaggt ggctgcaggg 300

gaaaggagtg gatattctga acaagagaag cctagaaact aaaatacgcg ggttcccaaa 360
 ctggctgctc ataagaaatc ctgcaathtt gatgccagag accgtaaaat gaagtccatt 420
 tttttgggcc ttttgaagct agggactttg gtgattctgg gaaattacaa gccaaggacc 480
 taacacatgt gcagcaaatt ataatcctaa tacttgacac aaaccaggac taaaatttct 540
 cactagtctg tccgcaaagt cgctgctgcg acttcggcga catgcactgt gcaaaaaaag 600
 gttagagagc aacacccgaa aaaatcctat tgtatcttct acaggctaaa aaattgcact 660
 ttcttttagg atctccggca tgaaagcttt gggattcttt aaaagtaggg cgcacactgg 720

ctccaaaaga aatcaagctt ttccaaggac aacccaaaaa gttattacca aaaaatttgt 780
 ctactctcca aaatacccca atcttttcag tgccaccttc cccgccgaca acaagtcccc 840
 cgaatgcgct gtggaccagc tcgacctctc cgaagccgcc ttcttggttc tggagccagc 900
 cggaggaact gttggagtcg cgaagcccg caccatcacc tatctgttct gcaatcagac 960
 caccatcagc agctgctaa 979

<210> 25

<211> 947

<212> DNA

<213> Bursaphelenchus xylophilus

<400> 25

atgaatccct tgtacttggt ggcaagtgtg gtgccattcg tcatcgccga ctgatcacg 60
 cccagttga acaagcccat caccggcgag ttactttta ctggagccac cggacggggc 120
 gcctgtggtc tggacattgc caatttgtcg gccggagtgt cgtccaaact cttcgacccc 180
 agctcccaat ggggtgccctc ggatctgccg gacggaagat acgttctgga tgacctgtg 240
 tgcaagggaa tctgcgtcca gatcgagtac aaggcgctca cgtaagttgg ggaaggggga 300
 gggatagttt tggagtagga cagctctgta tagaggatag ttgcaaagaa tgagcgccct 360
 ttggtatcaa aactgtttta ttagataatt gtatttctcc tgcctacagt agatgcttct 420

tacgccgtg gatcttagtt tgcagctgga aaacgactcc tttttacaa agttgaccta	480
ctctattcga cttataccgt agagcaaaaa agtttcctac agaactgaac aaatgccctt	540
tatctatctt tccattgtcc cttggcatta ggacttttgg caccgtgcaa gcacaagcta	600
gcgttagttt tticaaaaa aactaaaagc ccagtttctt gtagaggaga aaaagctgta	660
tcaaatgaat atacatattc acagtgccaa acaataaaca acttcttgta aaactaaaga	720
atactaaaaa aacgacggaa ctttctgaaa aaccaatat gtgtaaatgt ttcagcggca	780
ccttcccagt ggacaacgaa tgtgccgcct gcgacgtcga ccacgtcaac ctgtccgagg	840
aggcgttctt gatcctggaa ccggccggag gaaacaacgg agacgcgaag ccagccacta	900
tcacgtatct gaagtgcagc gacaccaccc caaccacaaa ctgttga	947