

특허청구의 범위

청구항 1

오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여하는 단백질(CMV 1a protein)과 상호작용 하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 담배식물 유래의 메틸화효소 유전자.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 담배식물 유래의 메틸화효소 유전자.

청구항 3

오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여하는 단백질(CMV 1a protein)과 상호작용 하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 담배식물 유래의 메틸화효소 단백질.

청구항 4

오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여된 단백질의 발현을 조절하는 제 1항의 유전자의 안티센스 유전자를 포함하는 CMV 증식 억제용 조성물.

청구항 5

오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여된 단백질의 발현을 조절하는 제 1항의 유전자 발현을 억제하거나 그 발현 단백질의 활성을 저해하는 것을 포함하는 CMV 증식 억제 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <9> 본 발명은 오이모자이크 바이러스의 증식 관련 단백질과 상호작용 하는 신규한 메틸트랜스퍼라제 유전자에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여하는 단백질(CMV 1a protein)과 상호작용 하는 단백질을 코딩하는 담배식물 유래의 메틸화효소 유전자에 관한 것이다.
- <10> 단백질의 번역후 변형(Post-translational modifications)은 프로테옴(proteome)의 구조적, 기능적 다양성을 확장한다. 예를 들어, 인산화(phosphorylation)와 아세틸화(acetylation)는 단백질을 활성화 또는 불활성화, 또는 그들의 상호작용을 조절하기 위한 가역적인 스위치(reversible switches)를 세포에 제공한다. 이런 상호작용은 유전자 발현을 조절하는 세포내 signaling에 필수적이다. 그것은 일시적인 시그널(transient signals)에 시기적 측면(temporal aspect)을 보장하는 길항효소들(예, kinases 와 phosphatases)의 콤비네이션이다. methylation, myristylation 또는 glycosylation과 같은 다른 단백질의 변형들은 더욱 정적이며, 중요한 생리학상의 역할을 한다. Lys 과 Arg 곁사슬(side chain)의 질소 또는 산소 원자에서 N-methylations는 특히, 아세틸화된 같은 히스톤 tails에서 가장 보편적인 것이며, 또한 단백질 곁사슬의 C-, O-, 및 S-methylations도 보고되었다(Walsh et al., 2005).
- <11> 오이모자이크 바이러스(Cucumber Mosaic Virus, CMV)는 Bromoviridae 과 Cucumovirus 속에 속한다. CMV particles는 20면체(icosahedral)형태를 가지며, positive-sense RNA genome인 RNAs 1-3으로 명명된 3부분을 포함한다(Palukaitis et al., 1992; Buck, 1996). CMV RNAs 1과 2는 1a 단백질과 2a 폴리머라제(polymerase) 단백질로 각각 명명되고, 바이러스 genome의 복제와 관련된 하나의 단백질을 각각 코딩한다(Palukaitis et al., 1992; Buck, 1996). 메틸트랜스퍼라제(methyltransferases, MT)(Mi et al., 1989)와 헬리카제(helicases, Hel)(Hodgman, 1988)에서 보존된(conserved)의 서열 모티프(sequence motifs)를 포함하는 RNA 1, 폴리머라제를 코딩하는 RNA 2는 CMV 리플리카제(replicase)로 명명된 막-결합 RNA-의존성 RNA 폴리머라제

(membrane-bound RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)와 관련되어 있음이 알려져 있다 (Hayes and Buck, 1990). 활성을 가진 CMV 리플리카제는 하나 또는 그 이상의 숙주 factor뿐만 아니라 1a와 2a 폴리머라제 단백질을 다로 구성되어 있다. RNA 2는 2b (Ding et al., 1994)라고 불리는 단백질을 코딩하는 추가의 open reading frame (ORF)을 가지며, ORF는 숙주-특이적 바이러스 축적 (host-specific virus accumulation) 및 전사후 유전자 억제(gene silencing)와 병원성 결정(virulence determination)에 관여한다. RNA 3은 3a 이동단백질 (movement protein, MP)을 코딩한다. MP는 세포와 세포사이에서 바이러스 RNA의 이동에 매우 중요하다 (Ding et al., 1995). 또한 MP는 시험관내에서 단일가닥 핵산(single-stranded nucleic acid)과 결합한다. RNA 4는 RNA 3의 3' half로부터 유래된 subgenomic mRNA이며 바이러스의 외피단백질 (coat protein, CP)의 합성에 관련되어 있다 (Schwinghamer and Symons, 1975). CMV 1a 단백질은 복제뿐만 아니라 전신 감염 (systemic infection)의 조절에도 관련된 것으로 알려져 있다 (reviewed by Palukaitis and Garcia-Arenal, 2003). 따라서, CMV 1a 단백질과 상호작용하고 조절하는 세포내 단백질의 동정은 CMV의 세포내 증식 또는 이러한 단백질의 다른 기능의 기본적 메커니즘을 이해하는 데 첫 단계가 될 것이다.

<12> CMV 1a 단백질의 세포내 표적에 대한 조사를 위해, 본 발명자는 이스트 투-하이브리드 스크린을 수행하였다. 본 발명자는 단백질 메틸트랜스퍼라제 domain을 포함하는 새로운 단백질을 찾아내었고, 그것의 유전자를 Tcoil (Tobacco CMV 1a interacting protein 1)으로 명명하였다. 본 발명에서, 본 발명자는 효모시스템과 시험관내에서 CMV의 1a 단백질이 Tcoil과 상호작용하는 생화학적 증거를 제시한다. 또한 본 발명자는 Tcoil은 시험관내에서 CMV 1a 단백질을 메틸화시킬 수 있음을 밝혔다. 게다가, Tcoil 안티센스 유전자도입 식물에서 감소된 CMV RNA 축적 (accumulation)은 본 발명자가 Tcoil이 CMV 복제 와/또는 확산에 영향을 줄 것이라고 제안을 뒷받침한다.

<13> 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여하는 단백질(CMV 1a protein)과 상호작용 하는 단백질을 코딩하는 담배식물 유래의 메틸화효소 유전자의 경우, 상기 유전자의 안티센스 유전자를 이용하여 CMV의 증식을 억제할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<14> 따라서, 본 발명의 주된 목적은 오이모자이크 바이러스의 증식을 억제할 수 있는 오이모자이크 바이러스의 증식 관련 단백질과 상호작용 하는 신규한 메틸트랜스퍼라제 유전자를 제공하는 데 있다.

<15> 본 발명의 다른 목적은 상기 오이모자이크 바이러스(CMV)의 증식 관련 단백질과 상호작용 하는 신규한 메틸트랜스퍼라제 유전자를 이용하여 상기 유전자의 안티센스 유전자를 포함하는 CMV 증식 억제용 조성물을 제공하는데 있다.

발명의 구성 및 작용

<16> 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여하는 단백질(CMV 1a protein)과 상호작용 하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 것을 특징으로 하는 담배식물 유래의 메틸화효소 유전자를 제공한다. 본 발명자는 이스트 투-하이브리드 시스템 (yeast two-hybrid system)을 사용하여 오이모자이크 바이러스의 1a 단백질과 상호작용 하는 새로운 메틸트랜스퍼라제 (methyltransferase)를 동정하였고 그것의 유전자를 Tcoil (Tobacco CMV 1a interacting protein 1)이라고 명명하였다.

<17> 세포내에서 일어나는 신호전달, 세포주기, 분화, DNA 복제 및 전사, 번역, 대사 등 거의 모든 반응들은 수많은 단백질의 상호작용을 통해 수행되고 조절되어 진다. 즉 cellular process의 이해는 이들의 조절에 관련되는 주요단백질과 이들 복합체를 구성하는 단백질간의 상호작용을 분석하여 각각의 기능을 밝히고 상대적인 관계를 규명하는데 있다. 따라서 기존에 알려진 단백질과 상호작용 하는 새로운 단백질을 찾아내어 알려진 단백질들과의 관계를 밝혀 세포내에서의 생화학적 현상과 기전을 연구하는 것은 현대생화학, 분자생물학의 주요한 연구대상이 되고 있다.

<18> 단백질간의 상호작용을 연구하는데 있어서 yeast two hybrid system은 효과적인 실험방법이라고 할 수 있다. Two hybrid는 이미 알고 있는 두 단백질간의 상호작용을 확인하고자 할 경우나 이미 알고 있는 단백질과 상호작용 하는 또 다른 단백질을 스크리닝 하고자 할 때 사용할 수 있다. 이 system은 세포내에서 작용하게 됨으로써 단백질의 구조변형 없이 약한 상호작용도 확인할 수 있는 장점이 있다. Two hybrid로 확인된 단백질간의 상호작용

용은 직접 생물학적기능과 연관시킬 수 있으며 물리적 상호작용을 저해하는 물질은 실제 세포내에서의 이들 단백질의 기능에 영향을 줄 것으로 예측할 수 있다. 실질적으로 세포내에서는 다양한 단백질들이 거대한 complex를 이루어 기능을 수행하는 만큼 이들 complex를 조절하는 것은 각각의 단백질들의 활성을 조절하는 방식과는 달리 보다 선택적으로 복합단백질의 기능을 조절할 수 있는 방법을 제시할 수 있다. 또한 two hybrid를 이용할 경우 직접 상호작용에 관여하는 단백질내의 motif나 domain을 사용함으로써 단백질의 상호작용에 관여하는 특정 부분을 조절하는 새로운 물질을 검색하는데도 이용할 수 있다.

<19> 본 발명에서는 특정단백질의 상호작용에 중요한 motif나 domain을 사용하여 이들의 상호작용을 효율적으로 조절할 수 있는 검색계로 효모의 two-hybrid system을 사용하였다.

<20> Yeast two-hybrid assay는 많은 eukaryotic trans-acting transcriptional regulator들이 독립적인 기능을 수행하는, 물리적으로 분리된 domain으로 구성되어 졌다는 사실에 착안하여 이루어진 system이다. 이 regulator들은 특정염기서열로 이루어진 promoter 부위와 결합하는 DNA-binding domain과 RNA polymerase II 복합체와 직접적으로 작용하여 transcription에 관여하는 기능을 수행하는 activation domain으로 구성되어 있다. 이 각각 domain은 하나의 단백질을 구성하여 특정 유전자를 발현시킬 수 있는 기능을 수행하게 된다.

<21> DNA-binding domain과 activation domain은 recombinant DNA technology를 통해 물리적으로 분리하여 하나의 host내에서 별도로 발현시킬 수 있는데 이 때 이들은 서로 분리되어 있으므로 결합하여 유전자를 발현시킬 수는 없게 된다. 그러나 상호작용이 가능한 두 단백질을 각기 DNA binding domain의 유전자와 activation domain의 유전자에 결합시켜 효모에 도입해 발현시키면 두 단백질의 상호작용에 의해 분리되었던 DNA binding domain과 activation domain이 전사와 관련된 기능을 하게됨으로써 유전자발현이 가능해진다.

<22> 본 발명의 담배 유래의 유전자에서, 상기 유전자는 상기 아미노산 서열의단백질을 코딩할 수 있는 어떤 염기서열도 기질 수 있으나, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 담배식물 유래의 메틸화효소 유전자인 것이 바람직하다.

<23> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여하는 단백질(CMV 1a protein)과 상호작용 하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 담배식물 유래의 메틸화효소 단백질을 제공한다. CMV 1a 단백질과 Tcoil의 특이적 상호작용에 기초로 하는 본 발명의 Tcoil의 동정, 그리고 시험관내에서 CMV 1a 단백질을 메틸화할 수 있는 메틸트랜스퍼라제라는 본 발명의 증거는, 단백질 메틸화(protein methylation)가 1a 단백질이 바이러스의 복제와 이동을 용이하게 하는 기능을 조절하는데 중요함을 나타낸다.

<24> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여된 단백질의 발현을 조절하는 제 1항의 유전자의 안티센스 유전자를 포함하는 CMV 증식 억제용 조성물을 제공한다. 상기 안티센스 유전자는 본 발명의 담배 유래의 메틸화 효소 유전자, 즉 Tcoil sense 유전자의 mRNA의 전체 또는 일부 서열과 상보적인 어떤 염기서열도 기질 수 있으나, 본 발명의 실시예에서는 상기 Tcoil sense 유전자 전체의 염기서열을 갖는 안티센스 유전자를 사용하였다.

<25> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여된 단백질의 발현을 조절하는 제 1항의 유전자 발현을 억제하거나 그 발현 단백질의 활성을 저해하는 것을 포함하는 CMV 증식 억제 방법을 제공한다. 상기 유전자 발현 억제는 전사(transcription) 또는 번역(translation)을 억제와 같이 분자생물학적 방법에서 통상적으로 사용되는 모든 유전자 발현 억제 방법이 사용될 수 있다. 또한, 상기 발현 단백질의 활성 저해는 모노클로날 항체 (monoclonal antibody) 과 같이 분자생물학적 방법에서 통상적으로 사용되는 모든 단백질의 활성 저해 방법이 사용될 수 있다.

<26> CMV 1a 단백질의 기능은 Bromoviridae의 일부 형(type member)인 BMV에서 특히 잘 연구되었다. 1a는 BMV RNA 복제에서 핵심 요소 (key player)이다 (Chen et al., 2000). 효모에서의 1a 단독 발현에서, 1a는 핵주위 소포체(ER) 막과 관련되어 있으며, BMV RNA 복제과정에서 발생하는, 칸(compartments) 또는 소구체(spherules)의 형성을 유도한다 (den Boon et al., 2001; Restrepo-Hartwig et al., 1996; Schwartz et al., 2002). 이러한 소구체는 ER lumen에서 바깥쪽 핵주위 ER막의 50~70nm 함입부(invaginations)이다 (Schwartz et al., 2002). ER lumen은 neck를 통해서 세포질(cytoplasm)로 연결되어 있는 내측(interior)을 가지고 있다. 유사 막 함입부(similar membrane invaginations)는 bromoviruses, alphaviruses, nodaviruses 및 다른 많은 positive-stranded RNA virus들에 의한 자연적 감염에서 RNA 복제와 관련되어 있다 (Froshauer et al., 1988; Salonen et al., 2005). 1a는 또한 2a^{pol} N-말단과 상호작용에 의해 소구체에 2a^{pol} 을 보충(recruit)시킨다 (Chen and

Ahlquist, 2000; Salonen et al., 2005). 2a^{pol}이 없을 때는, 1a는 막-결합된(membrane-associated), 뉴클레이즈-저항성의(nuclease-resistant) 및 세정제-감수성(detergent-susceptible) 상태(state)에 RNA3을 보충한다. 이러한 상태에서 20 ~ 50 fold에 의해 RNA3 반감기(half-life)와 축적이 증가되고 RNA3 번역이 저해된다(Janda and Ahlquist, 1998, Schwartz et al., 2002). CMV 1a 단백질과 Tcoil의 특이적 상호작용에 기초로 하는 본 발명의 Tcoil의 동정, 그리고 시험관내에서 CMV 1a 단백질을 메틸화할 수 있는 메틸트랜스퍼라제라는 본 발명의 증거는, 단백질 메틸화(protein methylation)가 1a 단백질이 바이러스의 복제와 이동을 용이하게 하는 기능을 조절하는데 중요함을 나타낸다.

<27> 본 발명의 데이터는 Tcoil과 CMV 1a가 직접적으로 상호작용 한다는 것과 이러한 상호작용이 특이적이며 CMV 감염에 중요하다는 것을 결론을 뒷받침한다. Tcoil과 CMV 1a가 다른 단백질이 없을 때는 생체내 및 시험관내에서 둘다 상호작용함을 2가지 독립된 assay를 사용하여 나타냈다; 전형적인 이스트 투-하이브리드 시스템 및 GST pull-down assays (도 1 과 5). 게다가, Tcoil의 MT domain은 CMV 1a 단백질과 상호작용하는 데 중요하고 (도 6), Tcoil은 CMV 1a의 Hel domain 인 CMV 1a의 두 domain을 메틸화시킨다 (도 6). 그러나, 불행하게도, 본 발명자가 E. coli에서 full-length CMV 1a 단백질을 발현시킬 수 없었기 때문에 full-length CMV 1a 단백질의 메틸화를 확인할 수 없었다. CMV 감염성(infectivity)이 Tcoil antisense를 발현하는 유전자 도입된 담배식물에서 감소되는 상기 연구결과는 CMV 감염에 대한 생체내에서 이러한 상호작용의 중요성을 나타낸다.

<28> 단백질의 번역후 변형(Post-translational modifications)은 proteome의 구조적이고 기능적인 다양성을 확장시킨다. 그러나, CMV 1a의 번역후 변형이 식물에서 CMV의 주기(cycle)와 어떻게 관련되어 있는가는 현재 밝혀지지 않고 있다. 유력한 메커니즘(candidate mechanisms)은 Tcoil과 상호작용을 통해서 CMV 1a 단백질 메틸화와 같은 번역후 변형에 의한 CMV 1a 메틸트랜스퍼라제 또는 헬리카제 활성의 조절을 포함한다. 효모 Coq5 C-메틸트랜스퍼라제가 coenzyme Q 합성과 관련되어 있는 다른 폴리펩타이드의 안정성을 조절한다고 이전에 보고되었다(Baba et al., 2004). Coq5와 유사하게, Tcoil은 CMV 1a 안정성을 조절하는데 관여할 것이다. 게다가, CMV 1a 와 2a의 상호작용은 replication complex를 형성하는데 중요하고, protein 2a인 CMV 리플리카제(replicase)를 인산화하고, 2a 단백질의 인산화는 1a 와 2a 단백질 사이의 상호작용을 저해한다고 보고 되었기 때문에 (Kim et al., 2002), 1a-2a 상호작용은 CMV 1a 메틸화를 통해서 조절될 가능성이 있다. 결론적으로, CMV 1a 단백질의 메틸화는 CMV 1a 단백질과 숙주의 다른 단백질과의 상호작용을 변화시킬 것이며, CMV 감염의 증가와 감소를 유도할 것이다.

<29> 비록 Tcoil-CMV 1a 상호작용과 CMV 1a의 메틸화의 정확한 의미는 완전히 명백하지는 않지만, 그리고 CMV 1a 단백질 메틸화 잔기의 potential site는 아직 확인되지는 않았지만, 단백질 메틸화가 바이러스 증식(multiplication)에서 중요한 역할을 한다는 견해는 흥미로운 것이다. 따라서, CMV 1a의 메틸화된 잔기의 동정은 CMV 바이러스 단백질 조절의 그러한 새로운 방법(modes)의 이해를 높일 것이며, 단백질 구조와 기능의 미묘한 복잡성을 더욱 밝혀낼 것이다.

<30> 포유동물과 효모에서, 메틸트랜스퍼라제(methyltransferases)는 단백질-단백질 상호작용, 단백질 세포내 위치, 신호전달, RNA 프로세싱 및 전사와 같은 다양한 과정의 조절에 관련되어 왔다. 본 발명자는 이스트 투-하이브리드 시스템(yeast two-hybrid system)을 사용하여 오이모자이크 바이러스(cucumber mosaic virus, CMV)의 1a protein과 상호작용하는 새로운 메틸트랜스퍼라제를 동정하였고 이를 Tcoil (Tobacco CMV 1a interacting protein 1)이라고 명명하였다. 이러한 관찰과 일치되게, 세균에서 발현되고 정제된 재조합 GST-Tcoil 단백질은 시험관내에서 CMV 1a와 단단히 결합하였고, GST-Tcoil은 직접적으로 두 개의 분리된 CMV 1a의 domain을 메틸화시켰다; 메틸트랜스퍼라제 domain 과 헬리카제(helicase) domain. RT-PCR 분석은 Tcoil의 발현이 CMV 접종(inoculation)에 의해 증가됨을 나타냈다. Tcoil 안티센스 유전자 도입한 식물은 CMV RNA의 축적감소(accumulation)를 나타내었다. 이러한 결과는 Tcoil이 CMV 1a 단백질과 상호작용을 통해서 CMV의 증식을 조절한다는 것을 제안한다.

<31> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<32> 실시예 1. CMV-Kor RNAs의 추출 (Virus strain and RNA extraction)

<33> 본 발명에 이용한 CMV-Kor는 한국담배인삼공사로부터 받아 쓴 것이다. 증식과 정제는 김 등의 방법을 응용하여 이용하였다(Kim, S.J., Cho, H.S, You, J.S., Kwon, S.Y., Park, E.K., and Paek, K.H. (1996)). Complete nucleotide sequence and phylogenetic classification of the RNA 3 from Cucumber mosaic virus (CMV) strain: Kor. Mol. Cells 6, 190-196.) 상기에서 증식 및 정제한 CMV-Kor의 RNAs를 추출하기 위하여, 바이러스

입자로부터 TNE(10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM Na₂-EDTA)를 사용하여 CMV-Kor의 RNAs를 추출하고 에탄올로 침전시켰다. 상기 추출한 RNAs는 디에틸피로카보네이트(diethylpyrocarbonate)를 처리한 물에 용해시키고, 259 nm의 흡광도에서 관측하여 정량하였다.

<34> 실시예 2. 담배 식물의 준비 및 바이러스 접종 (Plant material and virus inoculation)

<35> 담배(Tobacco, *Nicotiana tabacum* cv. NC82) 식물은 16시간의 빛/8시간의 어둠의 명암주기로, 25℃에서 성장시켰다. 인산완충액(0.25 M Na₂HPO₄, 5 mM EDTA)에서 감염된 잎을 갈아 상기 1)에서 수득한 CMV-Kor 입자를 함유한 담배 식물 액즙을 준비하였고, 이를 2-3개의 담배 묘목(8-10 잎의 단계) 어린잎의 표면에 카보런덤(carborundum, mesh 500, Hayashi Chemical)을 섞어 문질렀다. 대조군으로서 가접종된 식물은 인산완충액으로만 문질러 준비하였다. 상기 잎들은 접종 후 48시간 후에 거두어 유전자 라이브러리 작성을 위한 RNA 소스로서 사용하였다.

<36> 실시예 3. 이스트 투 하이브리드 스크리닝 (Yeast two-hybrid screening) 실험

<37> 매취메이커 II GAL4 투 하이브리드 시스템(MatchMaker II GAL4 two-hybrid system)은 클론테크 레보레이토리(Clontech Laboratories)에서 구입하였다. 상기 2)에서 수득한 CMV에 감염된 담배 잎에서 추출한 RNA로 pACT2 활성화 부위 발현벡터(pACT2 activation domain expression vector)를 이용하여 담배 cDNA 라이브러리(tobacco cDNA library)를 작성하였다. 상기 담배 cDNA 라이브러리는 pAS2-1/CMV 1a 결합부위 퓨전벡터(pAS2-1/CMV 1a binding domain fusion vector)를 이용하여 스크린하였다. 상기 두 퓨전벡터는 사크로마이세스 세레비지에 주 Y190 (*Saccharomyces cerevisiae* strain Y190, MATa, HIS3, lacZ, trp1, leu2, cyh2) 또는 HF7c(MATa, HIS3, lacZ, trp1, leu2)에서 상호 형질전환된 것이다. 그 형질전환된 효모세포들은 Leu, Trp 및 His이 결실된 최소 SD(synthetic dropout) 배지에서 선별하였다. 상기 선별과정에서 거짓 양성 클론을 제거하기 위하여, SD 배지 플레이트를 3-아미노-1,2,4-트리아졸(3-amino-1, 2, 4-triazole) 50 mM(Y190) 또는 5 mM(HF7c)로 보충하였다. 상기에서 선별된 효모 세포들은 8-12일동안, 30℃에서 성장시킨 후에, 5-브로모-4-클로로-3-인돌리-β-D-갈락토시드(X-gal)를 기질로 사용하여 β-갈락토시다아제(β-galactosidase)를 활성을 콜로니-리프트 필터분석(colony-lift filter assays)을 통하여 관찰하였다. 상기 분석에 의해 동정된 추정 양성 클론들(Leu+, Trp+, His+)을 재형질전환으로 선별하였다. 플라스미드는 각 Leu+, Trp+, His+ 및 LacZ+ 형질전환체(transformant)로부터 효모 플라스미드 분리키트(the Yeast Plasmid Isolation Kit, Clontech)를 이용하여 분리하였다. 일렉트로포레이션(electroporation)을 통해 상기에서 분리한 플라스미드로 E.coli XL1-블루 세포(*Escherichia coli* XL1-Blue cells, Stratagene)을 형질전환시켰다. 세균으로 증식된 pACT2 퓨전 플라스미드를 동정하고 분석하였다.

<38> 실시예 4. Tcoil의 full-length cDNA 분리

<39> Tcoil의 full-length cDNA를 분리하기 위하여 이스트 투 하이브리드 스크리닝에서 획득한 fragment를 32P를 이용하여 random-primed 후 이를 이용하여 약 5×10^4 clones개의 cDNA library 클론을 스크리닝 하였다. Hybridization은 Church등에 의한 방법에 의해 실시하였다. (G.M. Church, W. Gilbert, Genomic sequencing. Proc Natl Acad Sci USA 81 (1984) 1991-1995). Hybridization 실시 후 membranes을 2×SSC를 이용하여 상온에서 10분간 2번 wash 후 0.1×SSC과 0.1% SDS의 용액으로 상온에서 10분, 65℃에서 5분간 wash 하였고 X-ray film에 -70℃에서 48시간 동안 expose 하였다. Positive clones은 helper phage로부터 추출하여 pBluescript SK-phagemid vector로 recircularized를 유도하였다(Stratagene, USA).

<40> 실시예 5. in vitro 전사/번역 실험

<41> CMV 1a 단백질의 경우, ³⁵S-Met이 표지된 CMV 1a 단백질을 T7 프로모터의 다운스트림에 있는 CMV 1a cDNA로부터 직접적으로 상기 단백질을 합성할 수 있는 진핵세포 in vitro 번역 시스템을 사용하여 획득하였다. in vitro 전사/번역 실험은 T7 프로모터의 제어아래에 있는 CMV 1a 단백질의 코딩 시퀀스가 있는 pGBKT7 플라스미드를 TNT wheat germ system (Promega)을 이용하여 in vitro 전사/번역 반응에서의 주형으로서 사용하였다. 방사선표지로 ³⁵S-Met (Amersham-Pharmacia Biotech)를 사용하여 1시간 동안 단백질을 합성하였다.

<42> 실시예 6. GST혼합 Tcoil 단백질의 분리 (Preparation of recombinant proteins)

<43> GST 혼합 단백질을 E. coli에서 발현 후 정형화된 방법에 의해 분리하였다. GST 또는 GST 혼합 Tcoil(GST::Tcoil) 형질전환된 E. coli에 1 mM의 IPTG(isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside)를 첨가 후 2-3시간 동안 30℃ 또는 37℃에서 키운 후 세포를 모아PBS 용액으로 wash 후 세포 분해 용액 첨가 후 초음파로 세

포를 완전히 분해하였다. 원심분리로 분리된 상등액을 glutathione-agarose 컬럼을 통과시킨 후 PBS 용액으로 두 번 씻어준 후 10 mM의 reduced glutathione으로 GST::Tcoil을 분리하였다.

<44> 실시예 7. in vitro 메틸화 실험

<45> 메틸화 실험은 Lin 등의 방법과 Linder 등의 방법을 따라 실시 하였다. (Lin, W.J., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., and Herschman, H.R. (1996). The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. J. Biol. Chem. 271, 15034-15044 ; Linder, P., Lasko, P.F., Ashburner, M., Leroy, P., Nielsen, P.J., Nishi, K., Schnier, J., Slonimski, P.P. (1989). Birth of the D-E-A-D box. Nature 337, 121-122). 용액화한 세포 추출물 또는 분리한 GST::Tcoil 단백질, 메틸기 수용체 즉, GST::CMV 1a MT, GST::CMV 1a Hel 또는 GST::CMV 2a 와 메틸기 제공체인 0.25 μ Ci S-adenosyl-[methyl-3H]-l-methionine ([3H]SAM)과 혼합하여 30°C에서 2시간 동안 메틸화 반응을 유도 한 후 SDS-PAGE에서 분리 후 Amplifier (Amersham-Pharmacia Biotech) 에서 15 min 동안 반응 후 젤을 말리고 X-ray film에 -80°C에서 5일에서 14일 동안 노출후 Fujix BAS1000 phosphorimager로 관찰하였다.

<46> 실시예 8. 애기장대의 원형질 체에서의 Tcoil 의 위치확인

<47> in vivo에서 Tcoil의 위치를 파악하기 위하여 GFP (green fluorescence microscope)를 이용하여 in vivo 표적화 실험을 실시하였다. 종결코돈만 결실된 Tcoil cDNA를 Tcoil-5' (5'- CCGATCCCATGGCTTTCAGTTTCAAG-3') 와 Tcoil Nonstop (5'-AAGG ATCCAGTAAGGAACGGTAGC-3') 프라이머를 이용하여 PCR로 획득후 soluble-modified GFP (smGFP) 플라스미드의 N말단 부위에 혼합시켰다. 이 플라스미드는 pBIN³⁵S-mGFP4의 CaMV 35S-mGFP4-NosT 부분을 pUC118 플라스미드에 클로닝 후 site-directed 돌연변이를 유발하여 soluble화 하였다. (Davis, S.J., and Viestra, R.D. (1996). Soluble derivatives of green fluorescent protein (GFP) for use in Arabidopsis thaliana. Weeds World 3, 43-48 Davis, S.J., and Viestra, R.D. (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. Plant Mol. Biol. 36, 521-528). Tcoil::GFP를 애기장대 원형질체에 Jin 등의 방법을 따라 polyethylene glycol-mediated transformation을 실시하였다. (Jin, J.B., Kim, Y.A., Kim, S.J., Lee, S.H., Kim, D.H., Cheong, G.W., and Hwang, I. (2001). A new dynamin-like protein, ADL6, is involved from the trans-Golgi network to the central vacuole in Arabidopsis. Plant Cell 13, 1511-1526). Tcoil::GFP의 발현은 Zeiss (Jena) Axioplan 형광현미경을 이용하여 관찰하였고, 그 이미지는 Axiocam (Jena) 디지털 카메라로 찍었다.

<48> 실시예 9. CMV 감염에 대한 Tcoil센스를 과발현 또는 Tcoil 안티센스를 과발현 시킨 트랜스제닉 담배 식물의 감염 정도의 변화관찰

<49> 담배의 형질전환에 이용되었던 플라스미드는 전체 Tcoil cDNA의 센스와 안티센스 오리엔테이션으로 구성되어졌고, 바이너리 벡터(binary vector)인 pMBP2(Han, S.J., Cho, H.Y., You J.S., Nam Y.W., Park E.K., Shin J.S., Park Y.I., Park W.M. and Paek K.H., Gene silencing-mediated resistance in transgenic tobacco plants carrying potato virus Y coat protein gene., Mol. Cells, 9, pp376-383, 1999)의 폴리링커 사이트(polylinker site)에 클론 되어졌다. 그 구성체(construct)는 호에케마 등에 기재된 아그로박테리움 매개 형질전환(Agrobacterium-mediated transformations)을 이용하여 담배 식물(tobacco cv Smasun NN)로 삽입되어졌다 (Hoekema, A., Hirsch, P., Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R., A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. Nature, 303, pp179-180, 1983).

<50> 실시예 10. RT-PCR

<51> 전체 RNA는 오스벨 등에 기재된 방법 (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J. A. and Struhl, K., Short protocols in molecular biology, New York: Wiley, 1995)을 응용하여 4주차 담배 잎에서 분리하였다. RT-PCR 분석을 위하여, cDNA는 MMLV-역전사효소(Promega)와 6-hexamer random primers를 이용하여 상기에서 수득한 전체 RNAs를 처리한 DNase I로부터 합성하였다. Tcoil (5'-AACACGCAATGGCTTTCAGTTTCAAG-3', 5'-TATGGGGGAAAATTAGTAAGGAACGGT-3'), PR-1 (5'-GCGAAA ACCTAGCTTGGGAAG-3', 5'-TATATAACG TGAAATGGACGC-3'), CMV 3UTR (5'-TTCTGTGTTTTCCAGAACC-3', 5'-GACAGGATCCACGCGTGGTCTCCTTTT GGA-3'), L25 (5'-TGCAATGAAGAAGATTGAGGACAACA-3', 5'-CCATT CAAGTGATCTAGTAACCTCAATCCAAG-3') 의 프라이머를 이용하여 PCR (94° C에서 3분동안 변성 [94° C에서 1분 57°C에서 45초 72°C에서 2분]의 조건으로 25회 annealing; 72°C에서 7분동안 합성)을 25회 수행하였다.

- <52> 실험결과 1. 이스트 투-하이브리드 스크리닝 (yeast two-hybrid screening)에 의한 CMV 1a 단백질과 상호작용하는 Tcoil의 동정
- <53> GAL4 DNA binding domain (BD)에 틀에 맞게(in frame) 융합된 CMV 1a는 pACT2 벡터로부터 발현된 GAL4 activation domain (AD)에 융합된 3가지 독립된 N. tabacum cDNA library의 이스트 투-하이브리드 스크린에서 미끼(bait)로써 사용되었다. 1.5×10^6 개의 스크린된 형질전환체(transformants)중에서, 368개 콜로니는 처음에 Leu, Trp 및 His가 없는 플레이트(plates)상에서 자랐다. 이러한 368개 콜로니는 재형질전환 되었고 콜로니-리프트 필터 분석(colony-lift filter assay)에 제공되었을 때, 14개 콜로니는 β -galactosidase 활성을 나타내었다(appendix). 3개의 클론은 동일한 cDNA를 포함하는 것으로 나타났지만, 그 클론들의 polyadenylation sequence의 length upstream에서만 변화되었다. 이 cDNA insert를 Tcoil으로 명명하였고, ~ 900 bp insert인 가장 긴 클론은 더욱 특성화되었다.
- <54> HIS3과 lacZ reporter 유전자의 자발적인 활성화(autonomous activation), GAL4 BD 또는 AD와 가능한 직접적 상호작용, 그리고 코딩된 GAL4 융합 protein의 높은 발현에 의해 유도되는 잠재적 인공구조물(potential artifacts)을 실험하기 위한 추가적인 플라스미드 복합체(combinations)와 구조체(constructs)를 사용하여 CMV 1a와 Tcoil2사이의 상호작용을 밝혔다(도 1a). pAS2-1::CMV 1a (bait)와 pACT2::Tcoil2 (prey)는 둘다 HIS3 또는 lacZ reporter gene을 단독으로 활성화 하지 않았다. Tcoil (pACT2::Tcoil로부터 발현된)는 GAL4 BD와 스스로 상호작용하지 않았고, CMV 1a (pAS2-1::CMV 1a로부터 발현된) 역시 GAL4 AD와의 상호작용이 관찰되지 않았다. CMV 1a protein은 두개의 기능적인 domain을 가진다: 추정 메틸트랜스퍼라제(transferase) domain (MT)과 추정 헬리카제(helicase) domain (Hel). CMV 1a의 domain이 Tcoil과 상호작용하는 것을 시험하기 위하여, 각 domain을 GAL4 BD에 융합하였다. Tcoil이 메틸트랜스퍼라제 domain, 예를 들어 CMV 1a 단백질의 1-456 아미노산부위를 포함하는 CMV-MT와 상호작용하는 것이 관찰되었으나, CMV 1a 단백질의 헬리카제 domain (646-993 아미노산)인 CMV-Hel과는 상호작용하지 않았다. 이러한 결과는 기질로써 o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG)를 사용하여 β -galactosidase 정량분석에 의해 밝혀졌다. CMV 1a와 Tcoil 유전자의 co-transformants의 β -galactosidase 활성은 양성 대조군(pVA3/pTD1-1)에 의해 관찰된 것의 약 44% 정도를 보였다. Thus, Tcoil interacted with CMV 1a through its MT domain. CMV-MT와 Tcoil co-transformants는 CMV 1a와 Tcoil co-transformants보다 7% 더 높은 활성을 나타냈다. 따라서, Tcoil은 CMV MT domain을 통해서 CMV 1a와 상호작용하였다.
- <55> 실험결과 2. Tcoil DNA의 클로닝과 서열 분석
- <56> 900 bp Tcoil cDNA insert의 서열분석은 GAL4 AD와 틀에 맞는 874 뉴클레오타이드의 open reading frame을 확인하였고 이러한 cDNA가 불완전한 클론임을 보여주었다. λ -GEM11 N. tabacum cDNA libraries를 스크린한 이러한 900 bp 단편을 사용하여, 본 발명자는 두개의 하이브리드 plaques를 동정하였다. 각각의 plaque는 Tcoil cDNA 클론들에 상응하는 동일한 전체유전자 서열을 포함하는 하나의 단일 insert를 포함하였다. Tcoil cDNA 서열들과 상기 900 bp의 비교는 후자가 코딩 부위의 N-말단 456 뉴클레오타이드의 결핍이 있음을 보여주었다. 이러한 연구결과와 일치하게, 본 발명자는 이러한 연구결과를 규명하고, N. tabacum poly (A)를 포함하는 RNA로부터 full-length Tcoil cDNA를 클론하기 위해 cDNA ends의 5'와 3' rapid amplification을 사용하였다. 370 아미노산 단백질을 코딩하는 것으로 예상되는 1,355 뉴클레오타이드의 full-length cDNA용 클론들을 얻었다. 이러한 cDNA는 완전한 Tcoil 코딩 서열인 1,100 뉴클레오타이드를 포함하였고, 24 뉴클레오타이드 5' untranslated region과 221 뉴클레오타이드 3' untranslated region에 의해 측점(flanked)되어있다(도 2a, GenBank accession number AY391749).
- <57> Tcoil의 서열분석은 새로운 단백질을 코딩하는 것으로 예상되는 특성화되지 않은 유전자임을 보여준다. 본 발명자는 PSI-BLAST(position-specific iterative Basic Local Alignment Search Tool)로 Tcoil의 188-345 잔기가 ubiquin과 menaquinone의 생합성에서 탄소 메틸화 반응(carbon methylation reaction)에 관련있는 UbiE-like C-methyltransferases family에 속해있는 MT domain을 포함한다고 예상했다. 도 2b에서 보여지는 바와 같이, Tcoil의 primary sequence는 특성화된 UbiE methyltransferases family members의 primary sequence와 단지 먼 관련이 있다. 이 특성화된 서열은 E. coli UbiE (19.8% 상동성) 및 S. cerevisiae (13.6% 상동성), L. donovani (15.2% 상동성) 및 B. subtilis (23.2% 상동성)를 포함한다. AdoMet-dependent methyltransferases에 존재하는 서열 유사성의 3개의 motif중 2개(motif II와 motif III)는 예상되는 Tcoil MT domain내에서 나타났다(Kagan and Clarke, 1994). 계통수(phylogenetic tree)는 Tcoil과 다른 UbiE methyltransferases family members와의 예상되는 진화적인 유연관계를 보여주었다(Figure 2-2C).

- <58> 실험결과 3. Genomic organization and tissue-specific expression
- <59> full-length Tcoil 프로브(probe)를 가지고 시행한 Southern blot analysis은 엄격한 조건(stringent condition)하에서 하이브리드된 4 또는 5 개 단편(fragment)을 나타냈다 (도 3a). 이러한 결과는 담배 전체 유전자에서 small gene family로써 Tcoil 유전자가 존재한다는 것을 나타낸다. 다양한 식물기관에서 Tcoil 유전자의 정상상태 전사체 수준 (the steady state transcript level)을 시험하기 위해, total RNA를 줄기(stems), 꽃(flowers), 및 뿌리(roots)로부터 각각 추출하였고 Tcoil 특이 프라이머 셋트로 RT-PCR 분석을 수행하였다. Tcoil 유전자 전사체는 줄기와 잎에 축적되었지만, 꽃과 뿌리에서는 검출되지 않았다 (도 3b).
- <60> 실험결과 4. CMV 접종에서 Tcoil의 발현형태 (Expression patterns of the Tcoil upon CMV inoculation)
- <61> CMV 접종한 후 담배에서 RT-PCR 분석을 사용하여 Tcoil의 발현패턴을 모니터링하였다. 접종한 후 지정된 시간 간격을 두고 CMV-접종된 잎으로부터 total RNA를 추출하였다. 모의 접종(mock inoculation) 처리는 카보린덤 마찰로 유발할 수 있는 상처가 유도된 Tcoil 유전자 발현을 상쇄시키기 위한 대조군으로써 포함되었다. 도 4에 보여지는 바와 같이, 모의-접종된 잎에서 탐지할 수 있는 Tcoil 유전자 축적의 변화가 없었다. Tcoil 전사체(transcripts)는 접종후 1일에서(dpi) 유도되었고 3 dpi에 의해 감소하기 시작했다. 대조군 실험과 같이, CMV 바이러스 유전자의 발현은 CMV 접종에 대한 양성 대조군 (positive control)로써 CMV RNAs의 보존된 (conserved) 3' end의 탐지에 의해 조사되었다. 또한 PR-1 유전자 발현 형태는 대조군 실험으로 조사되었다. 이것은 CMV에 민감하게 반응하는 동안에 역시 유도된다고 이전에 보고되어 있다 (Whitham et al., 2003). cDNA 양에 대한 내부 표준(internal standard)으로써, ribosomal protein L25의 농도를 측정하였다. 이러한 결과는 Tcoil 유전자가 CMV 감염에 대응하여 유도됨을 나타내었다.
- <62> 실험결과 5. CMV 1a 와 Tcoil 상호작용에 필요한 결합부위의 결정 (Determination of the binding regions necessary for the CMV 1a and Tcoil interaction)
- <63> CMV 1a에 대한 binding domain 역할을 하는 Tcoil에서의 부위를 분석하기 위하여, 이스트 투-하이브리드 시스템에서 full-length CMV 1a를 가지고 그들의 상호작용에 대한 preys로써, full-length Tcoil과 서로 다른 N- 및 C-말단이 절단된 것(truncations)을 실험하였다 (도 5a). prey 단백질의 적절한 발현은 western blotting에 의해 규명하였다 (데이터 미도시). 다른 것들 (Tcoil 과 Tcoil-MT)은 CMV 1a와 여전히 상호작용했으나, 몇몇 절단된 것들은 상호작용(Tcoild2 와 Tcoild3)을 완전히 잃었다. 이러한 결과로부터, Tcoil의 MT domain이 이스트 투-하이브리드 시스템에서 CMV 1a와 상호작용하기에 충분하다고 결론 내릴 수 있다.
- <64> CMV 1a 와 Tcoil의 MT domain 사이의 상호작용을 확인하기 위해, 본 발명자는 시험관내에서 glutathione S-transferase (GST) pull-down approach를 수행하였다. 결과적으로, 본 발명자는 각각 N- 및 C- 말단의 절단 (truncations)을 가진 GST 융합 단백질을 E. coli에서 생산하였다. 손상되지 않은 GST (대조군으로써)와 GST 융합 단백질을 E. coli로부터 쉽게 정제하였다 (데이터 미도시). binding assay를 위해, T7 프로모터의 downstream을 클론한 1a cDNA로부터 단백질을 직접 합성하는 진핵생물 시험관내 번역 시스템 (translation system)에서 35S-Met 표지된 1a 단백질을 얻었다. 각각의 정제된 GST 융합 단백질은 방사성 표지된 (radiolabeled) CMV 1a를 가지고 인큐베이션하였다. 상기 혼합물(mixture)은 낮은 온도에서 글루타치온-아가로즈 비드(beads)와 상호작용 하였고, 비드로부터 얻은 용출물(eluants)은 SDS-PAGE로 분석하였다. 글루타치온-S-아가로즈 비드에 포착된 (trapped) 용출 GST::Tcoil, GST::Tcoild1 및 GST::Tcoil-MT 융합 단백질들은 CMV 1a 폴리펩타이드와 복합체를 형성한다고 밝혀졌고, 이는 SDS 겔에서 분석된 3개의 각각의 밴드에 의해 나타난다 (도 5b, 레인 2, 3 및 6). 이와는 대조적으로, CMV 1a 폴리펩타이드를 GST 대조군 단백질, GST::Tcoild2, 또는 GST::Tcoild3과 인큐베이션 시켰을 때는 아무런 상호작용도 관찰되지 않았다 (도 5b, 레인 1, 4 및 5). 이러한 결과는 CMV 1a 와 Tcoil 또는 MT domain을 포함하는 그것의 유도체(derivatives) 사이의 분자간 결합은 시험관 내에서 효과적으로 일어남을 나타낸다.
- <65> 더욱이, 본 발명자는 이스트 투-하이브리드 시스템과 시험관내에서 Tcoil에 대한 binding domain 역할을 하는 CMV 1a의 부위를 분석하였다. 도 1에 보여지는 바와 같이, Tcoil은 CMV 1a의 MT domain과 상호작용을 하였으나, Hel domain과는 상호작용 하지 않았다. 추가적으로, CMV MT domain은 Tcoil의 MT domain과 상호작용 하였다. CMV 1a 와 Tcoil의 분리된 2개의 domain과의 각각의 상호작용은 시험관내에서 시험하였다. binding assay를 위해, CMV MT domain 과 Hel domain을 cell-free translated system을 사용하여 시험관내에서 합성하였다. 각각의 방사성 표지된 폴리펩타이드를 GST::Tcoil 융합 단백질을 가지고 인큐베이션 한 후 글루타치온-아가로즈 비드를 사용하여 GST pull down assay를 수행하였다. 글루타치온-아가로즈 비드에 포착된 용출 GST::Tcoil 융합 단백질은 도 5c에 보여지는 바와 같이, CMV MT domain과 복합체를 형성한다고 밝혀졌고, 레인 3은 각각의 밴드

는 SDS 겔에서 분석하였다. 가장 중요한 것은, GST::Tcoil 융합 단백질은 시험관내에서 번역된 CMV Hel domain과 복합체를 또한 형성하였다 (도 5c, 레인 4). 이와는 대조적으로, CMV Hel domain의 폴리펩타이드가 GST 대조군 단백질과 인큐베이션될 때 아무런 상호작용이 관찰되지 않았다 (도 5c, 레인 2).

<66> 실험결과 6. Tcoil의 메틸트랜스퍼라제 활성 (Methyltransferase activity of Tcoil)

<67> 본 발명자는 다음으로 재조합 GST::CMV 1a MT domain 뿐만 아니라 CMV 1a Hel domain을 25℃에서 24시간 동안 PBS [pH 7.4]에서 정제된 GST::Tcoil 및 [3H]S-adenosylmethionine (AdoMet)와 인큐베이션 함으로써, CMV 1a 단백질이 시험관내에서 Tcoil에 기질로써 제공될 수 있는지와 Tcoil이 메틸트랜스퍼라제 활성을 가지는 것을 증명하기를 원했다. 게다가, 그의 기질 특이성을 평가하기 위해, GST::CMV 2a는 Tcoil의 기질로써 또한 사용되었다. 놀랍게도, CMV 1a MT domain과 Hel domain 둘 다는 이러한 조건하에서 메틸화되었다 (도 6, 레인 5와 6). 그러나 예상되는 것처럼, CMV 2a 단백질이 시험관내에서 메틸화되지 않았으며 (도 6, 레인 7), 이는 CMV 2a는 이스트 투-하이브리드 시스템에서 Tcoil과 상호작용하지 않았기 때문이다. 본 발명자가 GST 단백질이 GST-CMV 1a MT domain와 메틸트랜스퍼라제 활성을 가지는 지를 시험했을 때, 기질로써 CMV 1a Hel domain 또는 CMV 2a는 어떠한 시그널도 탐지되지 않았다. 게다가, GST::CMV 1a MT domain과 CMV 1a Hel domain 둘다의 자가-메틸트랜스퍼라제 활성을 가지는지는 않았다 (도 6, 레인 8과 9). protein arginine methyltransferases (PRMT)와 히스톤(histones)(hnRNP1)과 같은 RNA-결합 단백질은 양성대조군으로 사용되었다 (도 6, 레인 1). 이러한 결과는 Tcoil이 CMV 1a 단백질을 메틸화하기 위한 메틸트랜스퍼라제 활성이 있음을 나타낸다.

<68> 실험결과 7. Tcoil의 세포내 위치측정 (Subcellular localization of Tcoil)

<69> 생체내에서 Tcoil의 위치를 조사하기 위해서, the green fluorescent protein (GFP)을 사용하여 생체내 표적화 실험(targeting experiment)을 시행하였다. 종결 코돈 (termination codon) 없이 전체 Tcoil cDNA를 GFP의 N-말단에 융합하고 원형질체 (Arabidopsis protoplasts)에 형질전환시켰다. GFP 단백질과 Tcoil::GFP 융합 단백질의 위치를 형광현미경 (fluorescence microscope)으로 관찰하였다 (도 7). Tcoil::GFP 융합 제조물의 형광은 세포 내부 곳곳에서 축적되었으며, 그 단백질은 세포질에 고농도로 확산됨을 나타내었다. 대조군으로 사용된 GFP 단백질은 또한 세포질 영역(cytoplasmic space)에서 검출되었다.

<70> 실험결과 8. antisense-oriented Tcoil 유전자 도입된 담배에서 CMV 감염에 대한 감소된 감수성

<71> 식물(planta)에서 Tcoil의 생물학적 기능을 더 이해하기 위해, 본 발명자는 sense 및 antisense-oriented Tcoil 둘 다의 유전자가 도입된 담배를 만들었고, 유전자 도입 식물의 모든 실험은 Tcoil의 단일 카피수(single copy)를 가진 독립된 T0 lines의 T1 자손(descendants)을 사용하여 3배수로 시행되었다. 우선, 본 발명자는 RT-PCR을 사용함으로써 유전자 도입된 식물과 대조군 식물에서 RNA 발현의 수준을 비교하였다. Tcoil 유전자 발현의 낮은 수준(low level)은 형질전환되지 않은 식물에서 나타났으며 sense Tcoil 유전자를 포함하는 유전자 도입된 식물(sense transgenic plants)에서 발현 수준은 대조군 식물보다 더 높았다. 차례대로, 대조군 식물에서 발현 수준은 antisense 유전자를 포함하는 유전자 도입 식물(antisense transgenic plants)보다 더 높았다 (도 8a). Tcoil 유전자 도입된 담배 식물은 바이러스 접종에 대해 달라진 반응을 보여주는 지를 시험하였다. 독립된 line 마다 10개의 6-leaf stage 유전자 도입된 T1 식물의 4개의 잎 및 형질전환되지 않은 대조군으로써 Samsun NN의 10개의 대조군 식물을, 바이러스 저항성에 있어서 어떠한 변화를 확인하기 위해, CMV-Kor로 접종하였다.

<72> 우선, 바이러스-관련된 RNA 3의 축적형태(accumulation pattern)를 형질전환되지 않은 식물 및 Tcoil 유전자 도입된 담배식물의 접종된 잎에서 실험했다. 접종 후 다양한 시간대(various time points)에서, CMV 바이러스 RNA 3의 축적은 RNA 3 특이 프라이머를 가지고 RT-PCR에 의해 확인되었다. 도 8b에서 보여지는 바와 같이, CMV RNA 3의 축적은 3 dpi에서 처음 탐지되었고, RNA 축적 수준은 형질전환되지 않은 식물과 sense 유전자 도입된 식물 사이에서는 유사하였다. 그러나, antisense 유전자 도입된 식물에서는, RNA 3 축적 수준은 형질전환되지 않은 식물보다 약간 감소하였다. 다음으로, 접종되지 않은 상부의 잎들(non inoculated upper leaves)에서 바이러스-관련된 RNA의 축적형태를 조사하였다. CMV RNA 3의 축적은 형질전환되지 않은 식물과 sense 유전자 도입된 식물에서 7 dpi후에 탐지되었고 그 수준은 둘 다에서 비슷하였다. 이와는 대조적으로, CMV RNA 3은 antisense 유전자 도입된 식물에서는 7 dpi에서조차 탐지되지 않았다 (도 8c).

발명의 효과

<73> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 오이모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV)의 복제와 이동에 관여하는 단백질(CMV 1a protein)과 상호작용 하는 단백질을 코딩하는 담배식물 유래의 메틸화효소 유전자를

규명하고, 이러한 유전자의 발현을 조절함으로써, CMV의 증식을 조절할 수 있게 된다. 이는 CMV에 대한 저항성을 향상시킨 형질전환된 식물을 생산하고 육종할 수 있는 효과를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 효모에서 Tco1과 CMV 바이러스 단백질의 상호작용을 나타낸다. (a) 콜로니-리프트 필터-β-갈락토시다제 분석(colony-lift filter-β-galactosidase assays)에서 +는 양성 β-galactosidase 활성을 나타내는 blue colony를 나타내고, -는 음성 β-galactosidase 활성을 나타내는 white colony를 나타낸다. (b) 기질로써 o-nitrophenyl-β-D galactopyranoside를 사용하여 β-galactosidase 활성의 Quantitative liquid assays quantization을 나타낸다. 에러 바(error bars)는 각 샘플에 대한 표준 편차(standard deviation)를 지시한다.
- <2> 도 2는 Tco1의 뉴클레오타이드 서열과 단백질 서열 비교를 나타낸다. (a)는 Tco1 cDNA의 뉴클레오타이드와 추정되는 아미노산 서열이다. 메틸트랜스퍼라제 domain은 밑줄 그어진 것이고, AdoMet-dependent 메틸트랜스퍼라제의 motif I과 motif II는 굵은 이탤릭체로 표시된다. (b)는 다른 UbiE-like C-methyltransferases family members를 가지는 Tco1의 예상되는 아미노산 서열의 alignment이다. E.coli, S. cerevisiae, L. donovani 및 B. subtilis로부터 서열을 비교하였다. 상기 alignments는 PAM 250 table과 Jotun Hein method를 사용함으로써, DNASTAR MegAlign으로부터 산출하였다. shaded residues는 두 units 거리내에서 일치한다. (c) 진화적인 계통수(phylogenetic tree)는 Tco1과 다른 UbiE methyltransferases family members와의 예상되는 진화적인 유연관계를 보여준다.
- <3> 도 3은 Southern blot과 서로 다른 기관(organ)에서 Tco1의 발현 비교를 나타낸다. (a) 담배 genomic DNA를 EcoRI (E), HindIII(H), 또는 XbaI(X)로 자르고, 0.8% 아가로스 겔상에서 분리하였다. Nytran Plus membrane에 옮긴 후, 그 blot을 ³²P-표지된 full-length Tco1 cDNA probe와 중간의 엄격성 조건에서 하이브리드시켰다. autoradiograms를 Fuji-BAS 2500 phosphor image analyzer로 가시화하였다. DNA size standards (MM)은 왼쪽에 나타난다. (b)는 서로 다른 기관에서 Tco1 전사체(transcripts)의 축적을 나타낸다. 레인들은: S (줄기); F (꽃); L (잎); R (뿌리)이다. ribosomal protein L25의 전사체 농도는 cDNA 양 측정에 대한 내부 표준으로 탐지하였다.
- <4> 도 4는 CMV-Kor 접종에서 Tco1 유전자의 RT-PCR 분석이다. total RNA는 접종 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일(dpi)에서 잎 조직으로부터 추출하였다. 잎 조직은 다른 CMV- 또는 mock-접종된 식물의 잎으로부터 분리하였다. cDNA는 total RNAs로부터 합성하였으며, RT-PCR은 gene-specific primers를 가지고 수행되었다. 상보성의 CMV RNAs의 3' end와 PR-1은 CMV 접종에 대한 양성 대조군으로써 탐지되었다. cDNA 양 평가에 대한 내부표준으로써, L25의 농도를 모니터링하였다.
- <5> 도 5는 CMV 1a 단백질과 상호작용하는 데 필요한 Tco1의 부위 동정(identification)과 시험관내 상호작용 분석(interaction analysis)을 나타낸다. (a)는 이스트 투-하이브리드 시스템에서 Tco1과 CMV 1a 단백질의 서로 다른 부분들 사이의 상호작용 분석을 나타낸다. 절단된 클론들의 이름과 아미노산의 각 locus는 왼쪽과 위쪽에 각각 나타내었다. 상호작용의 강도는 기질로써 ONPG를 사용하여 liquid assays에 의해 측정되었다. (b)는 Tco1과 시험관내에서 번역된 CMV 1a 단백질의 GST conjugated truncated 클론의 시험관내 GST pull down assay를 나타낸다. ³⁵S-Met-표지된 CMV 1a를 GST(음성대조군), GST::Tco1, GST::Tco1d1, GST::Tco1d2, GST::Tco1d3 또는 GST::Tco1-MT 10μg으로 글루타치온-아가로스 비드가 있는 상태에서 인큐베이션하였다. 결합한 혼합물로부터 얻은 침전물을 SDS-PAGE에 제공하였고, 단백질들은 autoradiography에 의해 가시화되었다. (c)는 GST::Tco1과 시험관내에서 번역된 CMV 1a MT 또는 CMV 1a Hel의 GST pull down assay를 나타낸다. 레인들은: only GST::Tco1; GST와 ³⁵S-Met-표지된 CMV 1a Hel; GST::Tco1과 ³⁵S-Met-표지된 CMV 1a MT; GST::Tco1과 ³⁵S-Met-표지된 CMV 1a Hel을 나타낸다.
- <6> 도 6은 정제된 Tco1에 의해 CMV 1a MT domain과 CMV 1a Hel domain의 메틸화를 나타낸다. 단백질 메틸트랜스퍼라제 분석(protein methyltransferase assay)은 [³H]SAM의 0.25 μCi이 있을 때에 보여지는 복합체(combination)로써, 정제된 단백질의 동일량(10 μg)으로 수행되었다. 레인은: PRMT1과 hnRNP1(positive control(PC)로써); GST와 GST::CMV 1a MT; GST와 GST::CMV 1a Hel; GST와 GST::CMV 2a; GST::Tco1과 GST::CMV 1a MT; GST::Tco1과 GST::CMV 1a Hel; GST::Tco1과 GST::CMV 2a; only GST::CMV 1a MT; only GST::CMV 1a Hel을 나타낸다. 반응결과물은 10% SDS-PAGE에 의해 분리되었고, autoradiography에 의해 시각화되었다. hnRNA1(59 kDa), GST::DMV 1a MT(77 kDa) 및 GST::CMV 1a Hel(65 kDa) 밴드들은 화살표로 표시하였

다. 분자량 size marker는 왼쪽에 나타내었다 (in kilodaltons).

<7> 도 7은 Arabidopsis protoplasts에서 Tcoi1::GFP 의 세포내 위치를 나타낸다. control GFP (위) 또는 Tcoi1::GFP 융합 (아래) 구조체를 Arabidopsis protoplasts에 형질전환하였다. 도입된 유전자의 발현은 형광현미경을 사용하여 24시간 후에 측정하였다. 왼쪽 panel은 light 현미경 결과를 보여준다. 그리고 오른쪽 panel은 GFP (green) 과 chlorophyll (CH) (red)의 오버랩을 보여준다.

<8> 도 8은 유전자 도입된 담배 식물에서 Tcoi 유전자의 발현 및 wild type 식물과 유전자 도입된 식물에서 CMV RNA 3의 축적(accumulations)을 나타낸다. (a)는 형질전환 되지 않은 대조군 식물과 비교하여 유전자 도입된 T1 담배식물의 RT-PCR을 나타낸다. cDNA 양에 대한 내부표준에 따라, L25 전사체(transcripts)의 농도 또한 모니터링하였다. (b)와 (c)는 접종된 잎(b), 접종되지 않은 잎(c)에서 CMV RNA 3의 축적 농도의 비교를 나타낸다. 대조군 식물과 함께 유전자 도입된 T1 식물의 CMV RNA 3 축적은 접종 후 서로 다른 날짜에서 CMV RNA 3 특이 프라이머 셋트를 사용하여 RT-PCR로 모니터 하였다.

도면

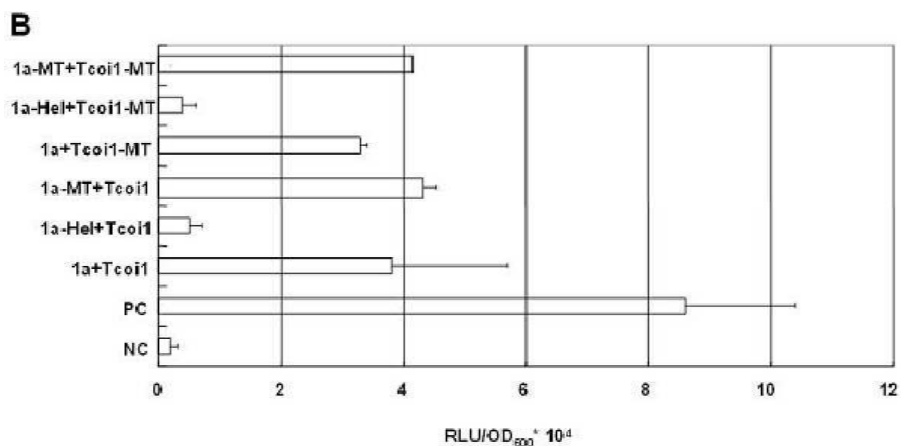
도면1a

A

GAL4 BD ⁺ Vector	GAL4 AD ⁺ Vector	His	β -Galactosidase
pAS2-1:CMV 1a	Δ	-	-
pAS2-1:CMV 1a	pACT2::Tcoi1	-	-
pAS2-1	pACT2	-	-
pAS2-1:CMV 1a	pACT2::Tcoi1	-	-
pAS2-1:CMV 1a	pACT2::Tcoi1	+	+
pAS2-1:CMV 1a-MT ^d	pACT2::Tcoi1	+	+
pAS2-1:CMV 1a-Hel ^e	pACT2::Tcoi1	-	-
pAS2-1:CMV 1a	pACT2::Tcoi1-MT	+	+
pAS2-1:CMV 1a-MT ^d	pACT2::Tcoi1-MT	-	-
pAS2-1:CMV 1a-Hel ^e	pACT2::Tcoi1-MT	-	-

^aBD, binding domain
^bAD, activation domain
^cNo coexpressed vector
^dMethyltransferase domain of CMV 1a protein
^eHelicase domain of CMV 1a protein

도면1b



도면2a

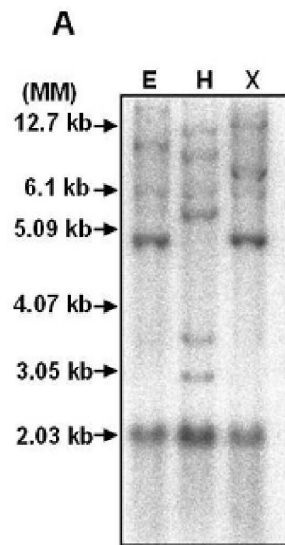
A

```

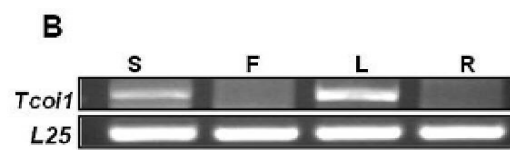
1  gctcgcatcaagattaacacgcaaatggctttcagtttcaagcttgacactgtgaatccc
      M A P S F K L D 22T V N P 12
61  aatttcttcacccctaactaacaatccaataagaagaagccgaatgttttgggtttaaa
      N F F T L T N N P I R R S R N V L G F K 32
121 ttgtcagcttcttcaagcagtagtggaatgcacaaatttcagaggcatttgaggaaagga
      L S A S S S S S G N A Q I S E A F E E G 52
181 caacttgaaaggcctcgttggacaggggaacccactttcacgtctagtggagctctt
      Q L E R P R W T G E T P L S R L V G A L 72
241 atttccctcaaacctctcttctctatactcaaaccttggcgccagacaagtcttatcagt
      I S F K P L F S I L K L G A R Q V L I S 92
301 acagctgagaaaaactaatattccatggaggagatgacaaaggagatactggattctgat
      T A E K T N I P W R E M T K E I L D S D 112
361 gtttacaaagagtttagagagcatccagaatcctgccattgtatatcctgattattatcta
      V Y K E L E S I Q N P A I V Y P D Y Y L 132
421 aatcccttccacgcgtatgatgaaggcaacctctcctggctggctgcagctgaagtagag
      N P F H A Y D E G N L S W L A A A E V E 152
481 gctgcaaccatgtcgatggtagacgtgcaataacctaatgcttcttcaactgaagaagca
      A A T M S M V R R A I P N A S S L E E A 172
541 aaccagatagtacgsgaaattggcttgacgcaatcgaataacatcatcaacaatattca
      N Q I V R G N W L D A I E K H H Q Q Y S 192
601 ggagacttgctcaatcagagacattcttgacattggatgctctgttggtgttagcacagga
      G D L S I R D I L D I G C S V G V S T G 212
661 tatcttgcggacatatatccttttgcataagtaactggctcggatctttcaccttatttt
      Y L A D R Y P F A K V T G L D L S P Y F 232
721 ctgctgttgctcagtatataagaagaagaagaagcgagagaaagaatcctatcagctgg
      L A V A Q Y K E K K R S E R K N P I S W 252
781 atacatgcaaacggcgaaaacactggcttgccctccaaatcatttgacctgtttcaatt
      I H A N G E N T G L P S K S F D L V S I 272
841 gcttatgtgtttcatgaatgtcctgaaagagcaataagaatttagtgaaggagtcattt
      A Y V F H E C P E R A I R N L V K E S F 292
901 cggatacttcgacctggaggaactgttgctataactgataactcgccaaagtcgaagatt
      R I L R P G G T V A I T D N S P K S K I 312
961 cttcaggaattaccaaccagtgtgtttacattgatgaagagcacagaaccttttctggat
      L Q E L P P V L F T L M K S T E P F L D 332
1021 gagtattacttgactgatcttgaagagtgatgagggaactggttttgccaatgtacaa
      E Y Y L T D L E R V M R E T G F A N V Q 352
1081 actgttctcactgatcctasacacasaactgttaccgctaccgttcttactaattttcc
      T V L T D P R H R T V T A T V P Y * 370
1141 ccccatacttactgaagcatgtttgttagcaatctgctcaggaattggagagaaaaa
1201 aaacataataatctgttaagtttggaacagatttttatccatcatttagaaaaaaaaa
1261 tgcagcagcttttgaactatgaattactatgtttttttttctttagtaattattt
1321 aattttctttttggaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

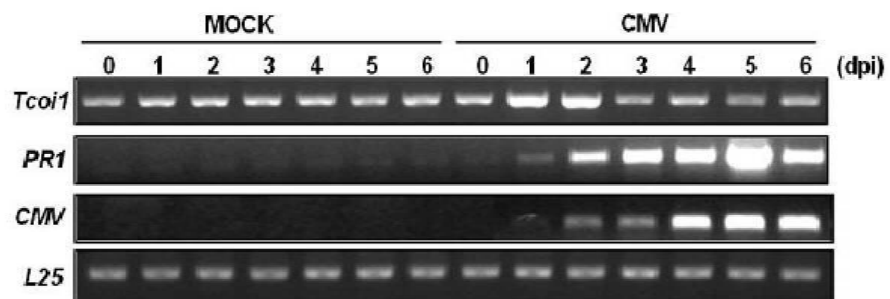

도면3a



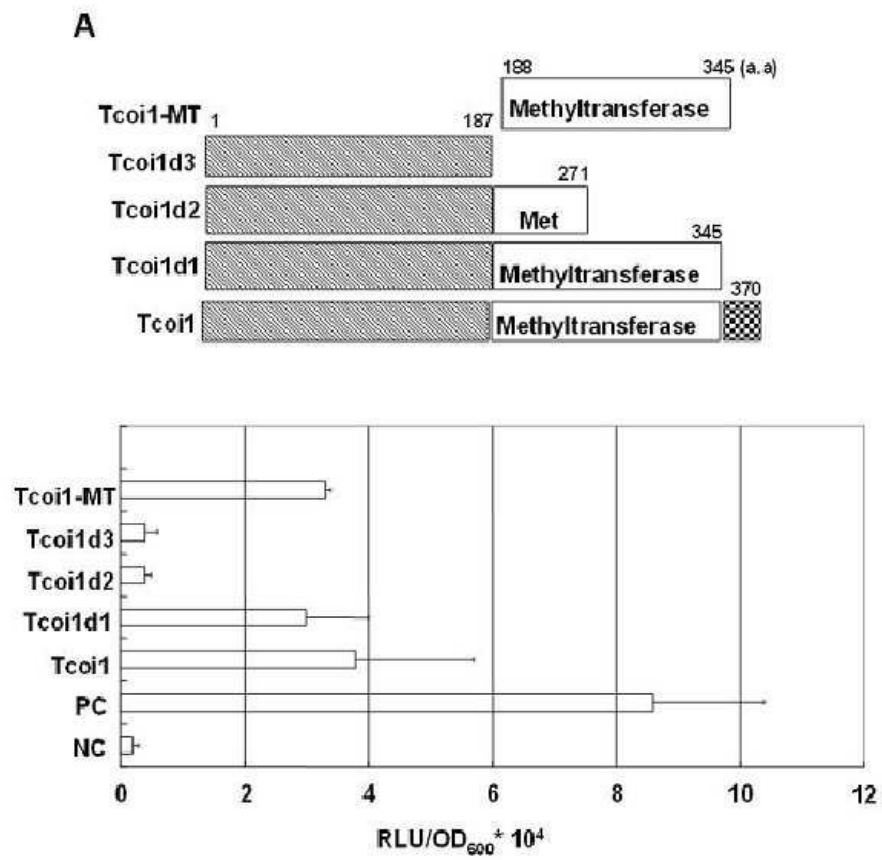
도면3b



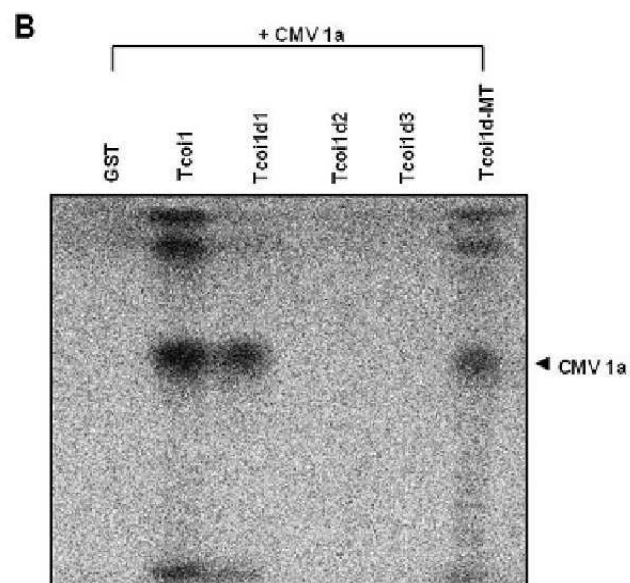
도면4



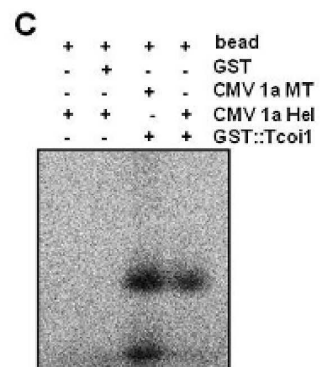
도면5a



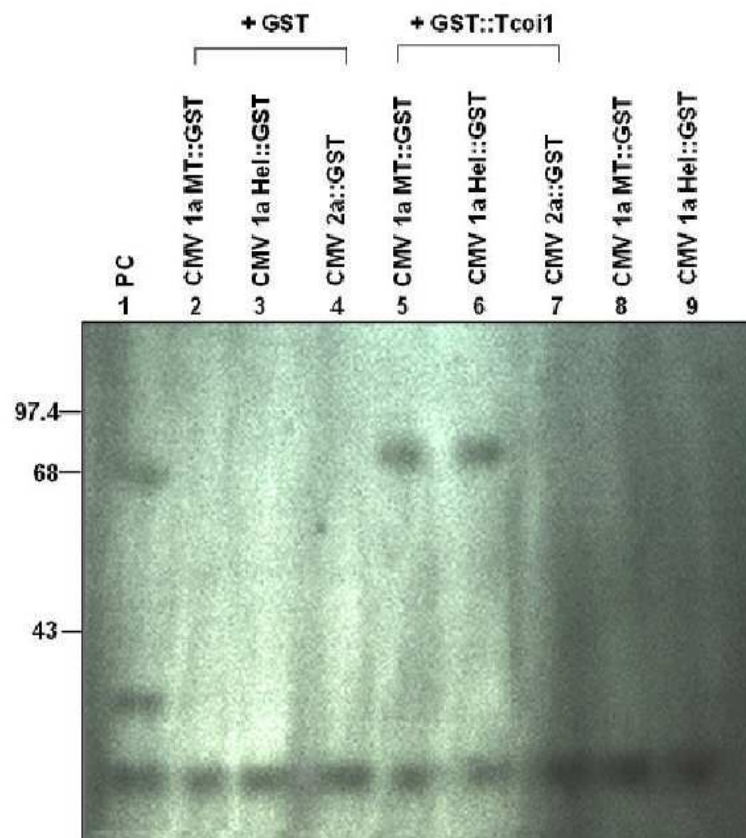
도면5b



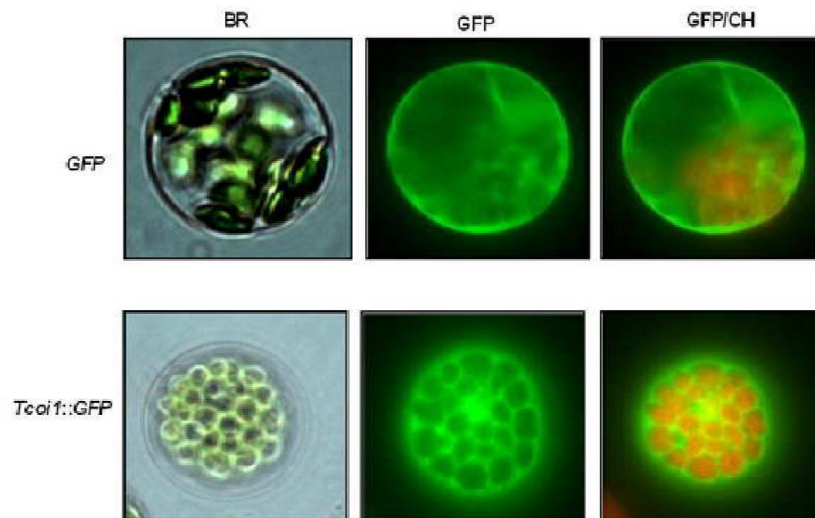
도면5c



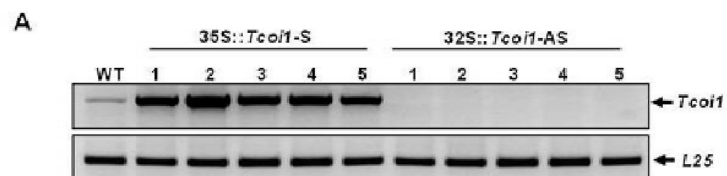
도면6



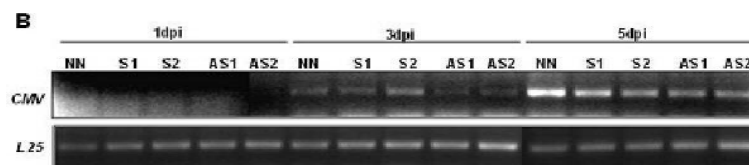
도면7



도면8a



도면8b



도면8c



서열목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> Novel gene of methyltransferase interacting with Cucumber mosaic

virus la protein

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1355

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (27)..(1133)

<400> 1

gcgctcgcat caagattaac acgcaa atg gct ttc agt ttc aag ctt gac 50
Met Ala Phe Ser Phe Lys Leu Asp
1 5

act gtg aat ccc aat ttc ttc acc cta act aac aat cca ata aga aga 98
Thr Val Asn Pro Asn Phe Phe Thr Leu Thr Asn Asn Pro Ile Arg Arg
10 15 20

agc cgt aat gtt ttg ggg ttt aaa ttg tca gct tct tca agc agt agt 146
Ser Arg Asn Val Leu Gly Phe Lys Leu Ser Ala Ser Ser Ser Ser
25 30 35 40

gga aat gca caa att tca gag gca ttt gag gaa gga caa ctt gaa agg 194
Gly Asn Ala Gln Ile Ser Glu Ala Phe Glu Glu Gly Gln Leu Glu Arg
45 50 55

cct cgt tgg aca ggg gaa acc cca ctt tca cgt cta gtt gga gct ctt 242
Pro Arg Trp Thr Gly Glu Thr Pro Leu Ser Arg Leu Val Gly Ala Leu
60 65 70

att tcc ttc aaa cct ctc ttc tct ata ctc aaa ctt ggt gcc aga caa 290
Ile Ser Phe Lys Pro Leu Phe Ser Ile Leu Lys Leu Gly Ala Arg Gln
75 80 85

gtt ctt atc agt aca gct gag aaa act aat att cca tgg agg gag atg 338
Val Leu Ile Ser Thr Ala Glu Lys Thr Asn Ile Pro Trp Arg Glu Met

90	95	100	
aca aag gag ata ctg gat tct gat gtt tac aaa gag tta gag agc atc			386
Thr Lys Glu Ile Leu Asp Ser Asp Val Tyr Lys Glu Leu Glu Ser Ile			
105	110	115	120
cag aat cct gcc att gta tat cct gat tat tat cta aat ccc ttc cac			434
Gln Asn Pro Ala Ile Val Tyr Pro Asp Tyr Tyr Leu Asn Pro Phe His			
	125	130	135
gcg tat gat gaa ggc aac ctc tcc tgg ctg gct gca gct gaa gta gag			482
Ala Tyr Asp Glu Gly Asn Leu Ser Trp Leu Ala Ala Ala Glu Val Glu			
	140	145	150
gct gca acc atg tcg atg gtg aga cgt gca ata cct aat gct tct tca			530
Ala Ala Thr Met Ser Met Val Arg Arg Ala Ile Pro Asn Ala Ser Ser			
	155	160	165
ctt gaa gaa gca aac cag ata gta cgc gga aat tgg ctt gac gca atc			578
Leu Glu Glu Ala Asn Gln Ile Val Arg Gly Asn Trp Leu Asp Ala Ile			
	170	175	180
gaa aaa cat cat caa caa tat tca gga gac ttg tca atc aga gac att			626
Glu Lys His His Gln Gln Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Ile Arg Asp Ile			
185	190	195	200
ctt gac att gga tgc tct gtt ggt gta agc aca gga tat ctt gcg gac			674
Leu Asp Ile Gly Cys Ser Val Gly Val Ser Thr Gly Tyr Leu Ala Asp			
	205	210	215
aga tat cct ttt gct aaa gta act ggt ctg gat ctt tca cct tat ttt			722
Arg Tyr Pro Phe Ala Lys Val Thr Gly Leu Asp Leu Ser Pro Tyr Phe			
	220	225	230
ctt gct gtt gct cag tat aaa gaa aag aaa aga agc gag aga aag aat			770
Leu Ala Val Ala Gln Tyr Lys Glu Lys Lys Arg Ser Glu Arg Lys Asn			
	235	240	245
cct atc agc tgg ata cat gca aac ggc gaa aac act ggc ttg cct tcc			818
Pro Ile Ser Trp Ile His Ala Asn Gly Glu Asn Thr Gly Leu Pro Ser			
	250	255	260
aaa tca ttt gac ctt gtt tca att gct tat gtg ttt cat gaa tgt cct			866
Lys Ser Phe Asp Leu Val Ser Ile Ala Tyr Val Phe His Glu Cys Pro			

265	270	275	280	
gaa aga gca ata aga aat tta gtg aag gag tca ttt cgg ata ctt cga				914
Glu Arg Ala Ile Arg Asn Leu Val Lys Glu Ser Phe Arg Ile Leu Arg				
	285	290	295	
cct gga gga act gtt gct ata act gat aac tcg cca aag tcg aag att				962
Pro Gly Gly Thr Val Ala Ile Thr Asp Asn Ser Pro Lys Ser Lys Ile				
	300	305	310	
ctt cag gaa tta cca cca gtg ctg ttt aca ttg atg aag agc aca gaa				1010
Leu Gln Glu Leu Pro Pro Val Leu Phe Thr Leu Met Lys Ser Thr Glu				
	315	320	325	
cct ttt ctg gat gag tat tac ttg act gat ctt gaa aga gtg atg agg				1058
Pro Phe Leu Asp Glu Tyr Tyr Leu Thr Asp Leu Glu Arg Val Met Arg				
	330	335	340	
gaa act ggt ttt gcc aat gta caa act gtt ctc act gat cct aga cac				1106
Glu Thr Gly Phe Ala Asn Val Gln Thr Val Leu Thr Asp Pro Arg His				
	345	350	355	360
aga act gtt acc gct acc gtt cct tac taat ttt cccccatac ttactgaagc				1160
Arg Thr Val Thr Ala Thr Val Pro Tyr				
	365			
atgttttggtt agcaatctgc tcaggaaatt ggaagagaaa aaaaacatat aatctgttaa				1220
gtttggaaca gattttttat ccatcattta gaaaagaaaa aatgcagcag cttttgtaaa				1280
ctatgaaatt actatgtttt ttttttcttg tagtaattat ttaat tttct tttttgaaa				1340
aaaaaaaaa aaaaa				1355
<210> 2				
<211> 369				
<212> PRT				
<213> Nicotiana tabacum				
<400> 2				
Met Ala Phe Ser Phe Lys Leu Asp Thr Val Asn Pro Asn Phe Phe Thr				

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

Lys Lys Arg Ser Glu Arg Lys Asn Pro Ile Ser Trp Ile His Ala Asn
245 250 255

Gly Glu Asn Thr Gly Leu Pro Ser Lys Ser Phe Asp Leu Val Ser Ile
260 265 270

Ala Tyr Val Phe His Glu Cys Pro Glu Arg Ala Ile Arg Asn Leu Val
275 280 285

Lys Glu Ser Phe Arg Ile Leu Arg Pro Gly Gly Thr Val Ala Ile Thr
290 295 300

Asp Asn Ser Pro Lys Ser Lys Ile Leu Gln Glu Leu Pro Pro Val Leu
305 310 315 320

Phe Thr Leu Met Lys Ser Thr Glu Pro Phe Leu Asp Glu Tyr Tyr Leu
325 330 335

Thr Asp Leu Glu Arg Val Met Arg Glu Thr Gly Phe Ala Asn Val Gln
340 345 350

Thr Val Leu Thr Asp Pro Arg His Arg Thr Val Thr Ala Thr Val Pro
355 360 365

Tyr