(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0009975
(43) 공개일자 2008년01월30일

(51) Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01) *A01N 65/00* (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0069851
(22) 출원일자 2006년07월25일
심사청구일자 2006년07월25일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
문정찬
경남 사천시 용현면 장송 892
장호희
경남 진주시 상대2동 191-26번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이종우

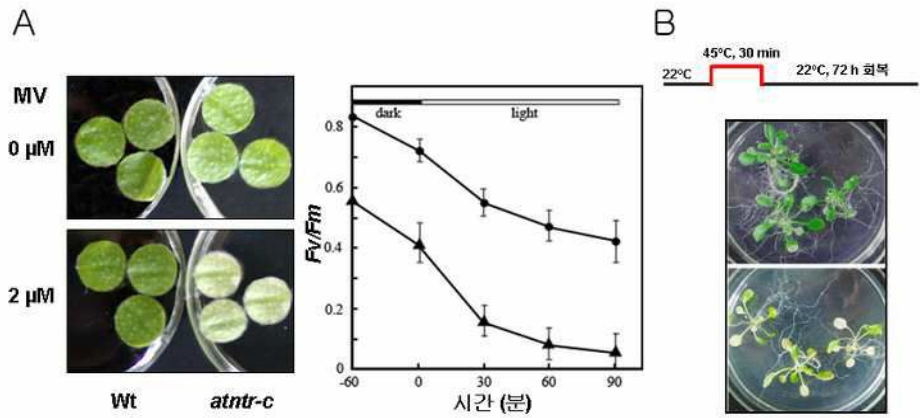
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 샤페론과 리덕타제 활성을 갖는 티오레독신 리덕타제타입－C의 고분자성 결합체와 이의 용도

(57) 요 약

본 발명은 샤페론과 리덕타제 활성을 갖는 티오레독신 리덕타제 타입－C의 고분자성 결합체와 이의 용도에 관한 것으로, 식물 또는 미생물에 존재하는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 간의 동종결합으로 이루어지고, 샤페론 활성을 갖는 티오레독신 리덕타제 타입-C의 고분자성 결합체; 상기 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 미생물에 도입하여 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 과량으로 발현하는 형질전환체; 상기 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 아그로박테리움 투머파시엔에 도입하고, 상기 아그로박테리움 투머파시엔스를 도입하여 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 과량으로 발현하는 식물 세포주; 및 상기 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 이성질체 군에서 선택된 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 발현하는 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움 투머파시엔스를 식물체에 형질전환시킴으로써, 식물체 내에서 과발현된 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 간의 고분자성 결합체가 형성된 환경 스트레스에 저항성 갖는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한 것이다.

대표도 - 도12



(72) 발명자

이중로

경남 사천시 정동면 풍정리 송보아파트 103-1004

박수권

경남 진주시 하대1동 308-18

이승식

경남 진주시 호탄동 605-8번지 스타타워 503호

박진호

경남 사천시 벌리동 주공아파트 206동 1402호

이균오

경남 진주시 가좌동 가좌주공 그린빌 102동 804호

이상열

경남 진주시 망경동 한보아파트 106동 1806호

특허청구의 범위

청구항 1

식물 또는 미생물에 존재하는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 간의 동종결합으로 이루어지고, 샤페론 활성을 갖는 티오레독신 리덕타제 타입-C의 고분자성 결합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

분자량이 적어도 100～1,000kDa인 것을 특징으로 하는 티오레독신 리덕타제 타입-C의 고분자성 결합체.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 종은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 벼(*Oryza sativa*), 노스톡 속 7120((*Nostoc* sp. 7120), 아나배나 바리아빌리스(*Anabaena variabilis*), 노스톡 푼티포르메(*Nostoc punctiforme*),시네크코커스 속 WH8102(*Synechococcus* sp. WH 8102), 더모시네크코커스 엘롱게이테스(*Thermosynechococcus elongates*), 프로클리로코커스 마리누스(*Prochlorococcus marinus*) 또는 미코박테리움 레프래(*Mycobacterium leprae*)인 것을 특징으로 하는 티오레독신 리덕타제 타입-C의 고분자성 결합체.

청구항 4

서열번호 2 내지 10의 아미노산 서열로 표시되는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 이성질체 군에서 선택된 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 미생물에 도입하여 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 과량으로 발현하는 형질전환체.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

형질전환된 대장균 (E.coli/pGEX-ATNTR-C; 수탁번호 KCTC10967BP)인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

아그로박테리움 투머파시엔스인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 7

제 6항의 아그로박테리움 투머파시엔스를 도입하여 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 단백질을 과량으로 발현하는 형질전환 식물 세포주.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

애기장대 또는 벼인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물 세포주.

청구항 9

서열번호 2 내지 10의 아미노산 서열로 표시되는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 이성질체 군에서 선택된 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 발현하는 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움 투머파시엔스를 식물체에 형질전환시킴으로써, 식물체 내에서 과발현된 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 간의 고분자성 결합체가 형성된 환경 스트레스에 저항성 갖는 형질전환 식물체의 제조방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<14> 본 발명은 샤페론과 리덕타제 활성을 갖는 티오레독신 리덕타제 타입－C의 고분자성 결합체와 이의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게 본 발명에서는 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 단백질이 구조와 분자량이 다른 다양한 형태로 존재하고 저분자 단백질은 퍼록시레독신에 전자를 전달하는 전자주개의 기능과 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 기능을 나타내고 고분자 단백질은 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 기능으로 작용함을 입증함으로써, 상기 구조적 변화에 따른 기능적 특성을 이용하여, 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 식물체에 도입하여 단백질 발현량을 조절함으로써 열충격과 산화적 스트레스 등의 다양한 환경 스트레스에 내성을 가지는 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

<15> 산화 환원의 조절은 다양한 생물학적 반응에서 중요한 역할을 한다. 그리고 이러한 산화환원의 균형유지를 위해 세포는 다양하게 짜여진 효소적, 비효소적 항산화 체계를 가지고 있다. 가장 잘 알려진 항산화 단백질 중의 하나인 퍼록시레독신은 거의 모든 종에서 발견되어진다(Chae et al., J. Biol. Chem., 268: 16815-16821, 1993; Storz et al., J. Bacteriol., 171: 2049-2055, 1989). 이 단백질은 촉매자리 시스테인을 통해서 과산화수소를 분해한다(Hillas et al., J. Biol. Chem., 275: 18801-18809, 2000). 그 촉매과정 동안, 시스테인 잔기는 과산화수소에 의해 산화되고 티오레독신(Trx)(Chae et al., J. Biol. Chem., 269: 27670-27678, 1994), 글루타레독신 (Grx)(Rouhier et al., Plant Physiol., 127: 1299-1309, 2001), 사이클로필린(cyclophilin)(Lee et al., J. Biol. Chem., 276: 29826-29832, 2001), 혹은 AhpF 와 AhpD(Poole et al., Biochemistry, 35: 65-75, 1996) 같은 환원 체계에 의해 내재적 혹은 상호적 이황화 결합을 통해 환원된다(Wood et al., Trends Biochem. Sci., 28: 32-40, 2003).

<16> 식물에서 퍼록시레독신(peroxiredoxin)단백질은 세포질, 엽록체, 미토콘드리아 등의 다양한 세포내의 구획에서 발견된다. 그들은 잘 보존된 시스테인 잔기와 구조적, 촉매적 특징에 따라 1-Cys Prx, 2-Cys Prx, type II Prx(Prx II), Prx Q 그리고 GPxs의 5종으로 구분된다. 이중에서 특히 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)이 가장 광범위하게 잘 연구가 되어져 있다. 애기장대(arabidopsis thaliana)에서 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)는 엽록체에서 틸라코이드(thylakoid) 막의 스트로마 (stroma) 표면에 붙어서 산화적 손상(damage) 로부터 엽록체 단백질을 보호한다고 열려져 있다 (Baier et al., Plant Phsiol., 199: 1407-1414, 1999). 활성산소종에 의해 유도되는 스트레스로부터 엽록체를 보호하기위해 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)의 활성자리 시스테인 잔기는 슬페닉(sulfenic)- , 슬피닉(sulfinic) 형태로 산화되고, 티오레독신-f (Trx-F), 티오레독신-m (Trx-m) 와 같은 전자 주개에 의해 다시 환원된다(Motohashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 98: 11224-11229, 2001; Balmer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 100: 370-375,2003). 이렇게 티오레독신이 관여하는 퍼록시레독신에 전자를 전달하는 전자 주개 체계는 식물에서 두 종류가 알려져 있다. 먼저 엽록체에서 작용한다고 알려져 있는 페레독신(ferredoxin) 의존적 티오레독신 체계와 세포질과 미토콘드리아에서 작용하는 NADPH 의존적 티오레독신 체계가 있다. 엽록체에서 작용한다고 알려져 있는 페레독신(ferredoxin) 의존적 티오레독신 체계는 광합성에 의해 생성된 전자가 광합성 체계 I(photosystem I)에서 페레독신(ferredoxin)과 페레독신 의존적 티오레독신 리덕타제(FTR)를 거쳐 최종적으로 티오레독신으로 전달된다. 또 다른 티오레독신 체계는 미티콘드리아와 세포질에 존재하는 NADPH 의존적 티오레독신 체계로서 최근에 애기장대(arabidopsis thaliana)에서 잘 연구되어져 있다(Laloi et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 98: 14144-14149:2001).

<17> NADPH 의존적 티오레독신 체계에서 식물과 곰팡이, 박테리아 등에서 발견되는 티오레독신 리덕타제(NTR)는 직접적으로 NADPH에서 전자를 받아 티오레독신에 전자를 전달하며 분자량이 대략 35kDa으로 이중체를 이룬다고 알려져 있다(Jacquot et al., J. Mol. Biol., 235:1357-1363,1994). 최근에 애기장대(arabidopsis thaliana)의 유전자서열 완전 해독에 의해 전형적인 티오레독신 리덕타제 (AtNTR-A, AtNTR-B) 이외에도 새로운 형태의 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체(AtNTR-C)가 존재한다는 것이 알려졌다(Serrato et al., J. Biol. Chem., 279: 43821-43827, 2004). 이 새로운 형태의 티오레독신 리덕타제는 카르복시 말단에 티오레독신 도메인(domain)을 포함하고 있고 애기장대(arabidopsis thaliana)뿐 아니라 벼와 시아노박테리아(cyanobacteria)에도 존재한다. 벼에서 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체는 티오레독신과 티오레독신 리덕타제의 두가지 활성을 가지고 있고 벼의 엽록체에 존재한다는 것이

알려졌다(Serrato et al., J. Biol. Chem., 279: 43821-43827, 2004). 또한 다이설파이드 아이소머라제(protein disulfide isoerase) 와 박테리아 티오레독신, 티오레독신 리덕타제 등과 같은 티오레독신 구조부위를 가지는 단백질들이 샤페론(chaperone) 활성을 가진다는 많은 보고가 있었다. (Wang, Methods Enzymol., 348: 66-75, 2002; Kern et al., Biochem. J., 371: 965-972, 2003; Jakob et al., Cell, 96: 341-352, 1999)

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<18> 이에, 본 발명자는 상술한 근거 하에 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 엽록체에 존재하는 퍼록시레독신의 전자주개로 작용할 수 있을 것이라 예측하고, 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체를 애기장대(arabidopsis thaliana)에서 클로닝하여 대장균에서 발현시킨 다음 이들 유전자 산물인 단백질을 순수 분리하였다. 이 단백질을 이용하여 전자전달 활성측정과 샤페론(chaperone) 활성을 확인하였다. 이러한 결과로부터 이 유전자를 도입한 형질전환 식물체의 병 저항성 및 환경재해 내성에 관한 특성을 분석하고 이를 산업에 이용하고자 하였다.

<19> 또한, 본 발명자는 벼 (rice) 와 애기장대(arabidopsis thaliana)로부터 분리한 유전자로부터 얻어진 단백질들의 구조적, 기능적인 특성이 모두 같은 결과를 보였기 때문에 본 발명에서는 이들 모두에서 얻어진 결과를 중복하여 제시하지 않고 대표적으로 애기장대(arabidopsis thaliana)에서 얻은 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 (AtNTR-C)의 특성에 관해 기술하기로 한다. 그러나 이 경우, 애기장대(arabidopsis thaliana)와는 다른 식물이나 벼 (rice)에서 얻은 유전자와 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 단백질의 특성이나 성질은 본 발명에서 제시한 애기장대(arabidopsis thaliana)의 결과와 유사하다는 사실을 밝혀둔다.

<20> 따라서, 본 발명의 목적은 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 항산화 단백질인 퍼록시레독신에 전자를 전달할 뿐 아니라 높은 분자량을 가지며 샤페론(chaperone) 활성을 나타내어 다양한 스트레스에 관여하는 특성을 이용하여 병 저항성 및 재해내성의 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<21> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 식물 또는 미생물에 존재하는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 간의 동종결합으로 이루어지고, 샤페론 활성을 갖는 티오레독신 리덕타제 타입-C의 고분자성 결합체를 제공한다.

<22> 또한 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 미생물에 도입하여 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 과량으로 발현하는 형질전환체를 제공한다.

<23> 또한 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 발현하는 재조합 벡터를 아그로박테리움 투머파시엔에 도입하고, 상기 아그로박테리움 투머파시엔스를 도입하여 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 과량으로 발현하는 식물 세포주를 제공한다.

<24> 더 나아가, 본 발명은 서열번호 2 내지 10의 아미노산 서열로 표시되는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 이성질체 군에서 선택된 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 발현하는 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움 투머파시엔스를 식물체에 형질전환시킴으로써, 식물체 내에서 과발현된 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 간의 고분자성 결합체가 형성된 환경 스트레스에 저항성 갖는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

<25> 본 발명에서 사용하는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질은 식물 또는 미생물 유래의 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 말하는데, 아미노산 서열에서 카르복시 말단에 티오레독신 도메인(domain)을 포함하고 있고 티오레독신과 티오레독신 리덕타제의 두가지 활성을 나타낸다.

<26> 하지만, 본 발명의 고분자 결합체는 개개의 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 말하는 것이 아니라, 복수 개의 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 상호 결합시킴으로써, 티오레독신과 티오레독신 리덕타제 활성 이외에도 샤페론 활성을 갖게 한 것이다. 이때, 본 발명의 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 간 고분자성 결합체는 분자량이 적어도 100～1,000kDa 인 것을 사용하는 것이 바람직하다.

<27> 본 발명에서는 대장균에 애기장대(arabidopsis)의 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 유전자를 도입하여 형질전환된 대장균 (E. coli/pGEX-ANTR-C)을 2006년 7월 19일 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)에 기탁하여 수탁번호 KCTC10967BP을 부여받았다.

<28> 상기 기탁한 형질전환체는 벡터에 삽입된 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 유전자를 온전하게 장기간 보관하

기 위해 사용하는데, 바람직하게는 냉동보관, 예를 들어 액화질소에 적절한 보관용 완충액과 함께 보관하여 사용한다.

<29> 이하 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

<30> 이때 사용되는 기술용어 및 과학용어에 있어서 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가진다.

<31> 본 발명에서 사용되는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 결합체는 식물 또는 미생물 유래의 동종간 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질의 결합을 말하는데, 식물 및 미생물에 존재하는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질은 각각 구조적 기능적인 특성이 유사하므로 이에 한정되는 것은 아니며 식물 및 미생물에 존재하는 대부분의 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 사용할 수 있다.

<32> 이중, 본 발명에서 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 NP_565954.1, 벼(*Oryza sativa*)의 AJ582621, 노스톡 속 7120((*Nostoc* sp. 7120)의 NP_484780, 아나배나 바리아빌리스(*Anabaena variabilis*)의 YP_325129, 노스톡 푼티포르메(*Nostoc punctiforme*)의 ZP_00109021,시네크코커스 속 WH8102(*Synechococcus* sp. WH 8102)의 NP_896780, 더모시네크코커스 엘롱게이테스(*Thermosynechococcus elongates*)의 NP_682714, 프로클리로코커스 마리누스(*Prochlorococcus marinus*)의 NP_682714 또는 미코박테리움 레프래(*Mycobacterium leprae*)의 NP_302724를 사용할 수 있고, 바람직하게는 다양한 환경 스트레스에 저항성을 가지는 형질전환 식물체의 제조를 위해 애기장대, 벼 등을 포함한 식물 유래의 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질을 사용하는 것이 바람직하다. 이때, 상기 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 이성질체의 아미노산 서열은 서열목록 2 내지 10에 각각 나타내었다.

<33> 상기 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질의 아미노산 서열은 서열목록(서열번호 2 내지 10)에 표시하여 나타내었고, 특히 애기장대는 아미노산 서열과 이를 암호화하는 유전자를 도 1에 도시하였다.

<34> 그리고, 본 발명에서 사용한 샤페론 (chaperone)은 단백질의 접힘(folding)에 관여하는 단백질로 일례로 단백질이 열 충격 (heat shock)과 같은 스트레스를 받게 되면 단백질은 제대로 접혀있던 3차원 구조가 풀리게 되어 자신의 역할을 정상적으로 수행할 수 없게 되는데, 샤페론 (chaperone)이라 명명된 그룹의 단백질들은 이렇게 풀려진 단백질들은 인식하고 결합해서 이들이 다시 제대로 접힐 수 있는 좋은 환경을 만들어주는 역할을 하는 단백질을 의미한다. 이러한 과정에서 단백질들간의 시스테인 (cystenine) 이중결합 (disulfide bonds)을 정상적인 수준의 결합으로 만들어주는 리덕타제 (reductase) 역할도 수행하는 이중기능의 단백질 활성을 나타낸다.

<35> 본 발명은 식물 및 미생물에서 존재하는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질의 리덕타제 기능뿐만 아니라, 이들의 결합체가 샤페론의 기능을 수행한다는 새로운 사실은 밝혀냄으로써 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질이 갖고있는 샤페론 기능의 특성을 응용하는 방법에 관한 것이다.

<36> 이는 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질의 고분자량 복합체에서 샤페론 기능이 우세하게 나타나기 때문인데 이러한 현상을 본 발명자는 다양한 환경스트레스 (열충격, 산화적 스트레스, 병원균 등) 저항성 형질전환 식물체 제조에 이용할 수 있도록 하는 것이다.

<37> 이와 같은 메카니즘의 특성은 본 발명에서 다양한 산화적 스트레스에 의하여 저분자량의 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질이 고분자량의 단백질 구조로 변화되는지와 변화된 고분자량의 단백질 구조가 리덕타제 기능에서 새로운 샤페론 기능으로 변환되는 가를 실험을 통하여 확인하였으며 이러한 구조적 기능적 전환에 의하여 식물 및 미생물 들이 외부스트레스에 강력한 저항성을 나타내게 된다는 것을 입증하였다.

<38> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 하지만 실시예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 이들 실시예의 범위가 본 발명에 국한되지는 않는다.

<39> 또한 반복적인 설명인 경우에는 생략한다.

<40> [실시예 1] 애기장대(arabidopsis thaliana)에 존재하는 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 (AtNTR-C) 의 아미노산과 핵산 서열

<41> 도 1은 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 아미노산 서열과 핵산 서열을 나타낸 것으로서 티오레독신 리덕타제 도메인(domain)의 활성 자리 시스테인인 C-A-I-C 와 티오레독신 도메인(domain)의 활성자리인 C-G-P-C가 잘 보존되어 져 있다는 것을 알 수 있다.

<42> [실시예 2] 애기장대(arabidopsis thaliana)의 원형질 세포(protoplast) 내에서 티오레독신 리덕타제 타입-

C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 존재위치 측정

<43> PSORT(http://www.psort.org) 프로그램을 이용하여 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 염기 서열을 분석한 결과, 아미노 말단에 엽록체로 가는 표적 펩타이드(peptide)가 존재한다는 것을 알 수 있었다. 그래서 세포 내에서 이 단백질의 위치를 추적하기 위해서 녹색형광 단백질(GFP) 플라스미드에 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 유전자를 도입하였다. 그리고 이를 애기장대(arabidopsis thaliana) 원형질 세포(protoplast)에서 발현 시킨후 녹색형광 단백질(GFP)의 일시적인 발현을 현광현미경으로 관찰하였다.

<44> 적색 형광 단백질(RFP) 플라스미드에 도입된 2-시스테인 퍼록시레독신-A (2-Cys Prx-A)를 엽록체로 가는 표준으로 사용하였다.

<45> 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이 녹색형광 단백질(GFP)의 발현(오른쪽 위)과 적색 형광 단백질(RFP)(왼쪽 아래)의 발현이 정확히 일치(오른쪽 아래)하는 것을 나타냄으로써 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 애기장대(arabidopsis thaliana)에서 엽록체에 위치한다는 것을 확인할 수 있었다.

<46> [실시예 3] 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 티오레독신 리덕타제 활성과 티오레독신 활성

<47> 도 3은 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 도메인(domain)별로 순수분리한 단백질을 나타내고 이를 이용하여 두가지 활성을 알아본 도면이다.

<48> 도 3-A의 오른쪽은 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 각각의 도메인(domain)을 나타낸 도면으로, 아미노 말단의 67개 아미노산은 엽록체로 가는 표적 펩타이드로 제거하였다. 그리고 왼쪽은 각각의 도메인(domain)을 박테리아에서 과발현시켜서 순수분리한 후 에스디에스(SDS) 첨가 변성 전기영동법으로 순수하게 분리가 되었다는 것을 보여주었다. 이들 단백질을 이용하여 티오레독신 리덕타제 활성(도 3의 B)과 티오레독신 활성 (도 3의 C)을 측정하였다.

<49> 티오레독신 리덕타제 활성은 디티엔비(DTNB)를 기질로 이용하여 NADPH로부터 전자를 받은 단백질이 디티엔비(DTNB)를 환원시켜 티앤비(TNB)로 전환될 경우 분광 광도계에서 흡광도가 증가하는 것을 이용하여 알아보았다.

<50> 이때, 흰색 동그라미는 DTNB와 NADPH만을 넣어준 혼합물을 나타내고 여기에 검은색 동그라미는 0.1 μM 의 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 (AtNTR-C)를 넣어준 혼합물, 검은색 삼각형은 0.1 μM의 티오레독신 리덕타제 도메인(domain) (TR-D)을 포함하는 혼합물, 흰색 삼각형은 0.1 μM의 티오레독신 도메인(domain) (Trx-D)을 포함하는 혼합물, 검은색 사각형은 박테리아의 티오레독신 리덕타제 0.1 μM을 포함하는 혼합물을 사용하였다.

<51> 그 결과, 완전한 형태의 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체는 박테리아의 티오레독신 리덕타제보다 강한 티오레독신 리덕타제 활성을 가지며 티오레독신 리덕타제 도매인만 분리하였을 경우 더 강한 활성을 가지는 것을 알 수 있었고, NADPH 만 넣어준 혼합물과 티오레독신 도메인(domain)을 넣어준 혼합물에서는 티오레독신 리덕타제 활성이 나오지 않는 것을 알 수 있었다 (도 3B 참조).

<52> 또한, 기질로서 인슐린을 사용하여 디티티(DTT)로부터 전자를 전달받은 단백질이 인슐린을 환원시키면 흡광도가 증가하는 것을 관찰함으로서 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 티오레독신 활성을 알아보았다.

<53> 이때, 도3-C의 흰색 동그라미는 인슐린과 디티티(DTT) 만을 넣은 혼합물이고 검은색 삼각형과 흰색 삼각형은 여기에 각각 0.1 μM의 티오레독신 도메인(domain)과 티오레독신 리덕타제 도메인(domain)을 넣은 것이다. 검은색 동그라미는 완전한 형태의 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 0.5 μM을 넣은 혼합물, 검은색 사각형은 박테리아의 티오레독신 0.1 μM을 넣은 혼합물을 나타낸 것이다.

<54> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 티오레독신 활성은 박테리아의 티오레독신 활성에 비해 매우 약한 활성을 가진다는 것을 확인하였고, 특히 티오레독신 활성은 티오레독신 도메인(domain)에 의해 나타나고 티오레독신 리덕타제 도메인(domain)이 있을 경우 그 활성이 작아지는 것으로 미뤄 티오레독신 활성이 티오레독신 리덕타제 도메인(domain)에 의해 저해

를 받고 있다는 것을 알 수 있었다.

<55> [실시예 4] 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 전자전달 활성

<56> 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 애기장대(arabidopsis thaliana)의 엽록체에 존재하면서 티오레독신 리덕타제 활성과 티오레독신 활성의 두가지 활성을 가지고 있기 때문에, 기존에 티오레독신과 티오레독신 리덕타제의 두 가지 단백질이 수행하던 기능을 단독으로 수행할 수 있는지 알아보았다. 즉, 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)이 과산화수소를 분해할 때 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 NADPH로부터 전자를 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)에 전달할 경우 분광 광도계에서 흡광도가 줄어드는 것을 이용하여 전자전달 활성을 알아보았다.

<57> 이때, 도 4-A는 100μM의 과산화수소, 150μM의 NADPH와 5μM의 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)이 들어있는 혼합물에 1.5μM의 BSA를 넣은 경우(흰색 네모), 검은색 마름모는 BSA 대신 1.5μM의 박테리아 티오레독신과 티오레독신 리덕타제를 넣은 경우, 검은색 동그라미는 BSA 대신 1.5μM의 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체를 넣은 경우를 나타낸다.

<58> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체는 매우 효과적으로 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)에 전자를 전달하여 과산화수소를 분해한다는 것을 알 수 있었고, 특히 박테리아의 티오레독신과 티오레독신 리덕타제의 두가지 단백질을 넣어준 혼합물보다도 활성이 강하다는 것을 알 수 있었다.

<59> 도 4-B에서는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 티오레독신 도매인과 티오레독신 리덕타제 도메인(domain)이 각각 분리되어 있거나 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-A 이성질체를 사용하여도 전자전달이 일어나는지 알아보았다.

<60> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 각 도메인(domain)이 붙어 있을 때에만 전자 전달이 일어났고 분리되었을 때에는 전자전달이 일어나지 않았다. 특히, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 티오레독신 리덕타제 도메인(domain) 대신 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-A 이성질체를 넣어 주어도 전자 전달은 일어나지 않았다. 또한, 각각의 도메인(domain)이 연결된 상태에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-A 이성질체에 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 티오레독신 도메인(domain)을 붙인 단백질(AtNTRA-Trx-D)를 넣어 주었을 때에도 전자전달이 일어나지 않았다. 이로써 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)으로의 전자전달은 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 온전한 형태에 의해서만 일어난다는 것을 확인할 수 있었다.

<61> [실시예 5] 다양한 분자량을 가진 고분자 단백질 구조의 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)

<62> 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 완전한 형태는 효과적으로 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)에 전자를 전달하지만, 각각의 도메인(domain)이 분리 되었을 때는 전자 전달이 일어나지 않기 때문에 완전한 형태와 잘려진 형태가 구조적으로 차이점이 있을 것이라 예상하고 크기에 의한 분리 크로마토그래피(size exclusion chromatography)와 무변성 전기영동법으로 구조적 차이점을 알아보았다.

<63> 이때, 분리 크로마토그래피는 TSK4000W_{XL} 컬럼(Tosoh, Japan)과 용출 완충용액 150 mM NaCl을 포함한 50 mM Hepes를 사용하였고, 상기 분리 크로마토그래피로부터 시간별로 분리된 분획은 무변성 전기영동법, 그리고 전자현미경에 의해 분석하고자 하였다. 특히, 용출 시간 16-18분, 20분 과 24분의 세 분획을 전자현미경에서 분석하였다.

<64> 그리고, 상기 무변성 전기영동법은 각 분획을 10% 무변성-전기영동법(native-PAGE) (도5-B 위쪽 패널) 과 12% 에스디에스(SDS) 첨가 변성 전기영동법 (아래쪽 패널)상에서 분리한 후 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레

독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 항체를 사용하여 웨스턴 블럿 (Western blot)(도5-B 오른쪽)을 수행하였다.

<65> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)는, 크기에 따른 분리 크로마토그래피에서 다른 크기의 고분자량 단백질 복합체를 형성하는 반면, 티오레독신 리덕타제 도메인(domain)은 이중체를 형성하였고, 티오레독신 도메인(domain)은 고분자량 복합체만을 형성하였다. 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 복합체의 분자량은 표준 단백질과 비교할 때 약 100~1,000kDa 이상의 분자량 대에 분포한다.

<66> 도 5-A에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 분자량 크기에 따른 분리 크로마토그래피에서 얻은 각각의 단백질 분획의 크기는 무변성-전기영동법(native-PAGE)을 하여 웨스튼 블러팅으로 다시 확인하였다. 다양하게 퍼진 단백질 복합체의 복합한 형태는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)와 이에 특이적인 항체와의 면역 반응물에 의해 각 단백질 분획에서 검출되었다(도 5-B,왼쪽 위쪽 패널). 가장 커다란 형태를 가진 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 단백질 복합체가 포함된 첫 번째 분자량의 크기에 따른 불리 크로마토그래피 분획의 단백질 분자량은 10% 무변성-전기영동법(native-PAGE)의 포어 (pore)를 투과하기에 너무 커서 분리하는 겔의 상단 부분에 남아 있는 반면에, 마지막 분획은 50～100kDa의 분자량을 가지는 단백질 혼합물을 포함하고 있는 것을 알 수 있었다.

<67> 그리고, 무변성-전기영동법(native-PAGE) 분석과는 달리, 모든 분획들의 에스디에스(SDS) 첨가 변성 전기영동법 분석은 단량체 크기인 50kDa의 분자량을 가진 단일 밴드를 나타내었다(도 5-B, 아래 패널). 이런 현상들은 자연적인 조건에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)가 다양한 수로 이루어진 동일다량 복합체(homo-polymeric complex)들로 존재함을 보여주고 있다.

<68> 또한, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 중합체 구조 (oligomeric structures)를 분석하기 위해 분자량의 크기에 따른 분리 크로마토그래피로부터 분리된 단백질을 2% 우라닐 아세테이트로 음화 염색한 다음, 전자 현미경 (electron microscopy)으로 분석하였다.

<69> 그 결과, 음성적으로 염색된(negatively stained) 단백질 분획의 EM은 세가지 다른 형태 즉, 구 모양(spherically-shaped)과 링 모양 (ring-shaped)의 구조뿐만 아니라 불규칙적인 모양의 작은 입자로 보였다(도 5-C 참조).

<70> 그리고, 용출 시간 16-18분의 분획에서 관찰된 구 모양의 입자는 평균 직경이 12 내지 18nm의 직경을 가지고 있었고 그 크기는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 분자의 수에 따라 다양하게 나타났다. 또한, 용출시간 20분의 분획에서 관찰된 링 모양의 구조는 100개의 특정 모양들의 평균 이미지를 도 5-D의 가운데 패널에서 보여주고 있다. 첫 번째와 두 번째 분획의 단백질 구조와 다르게, 용출시간 24분의 분획에서의 단백질들은 규칙적인 구조를 형성하지 않았다(도 3-C, 왼쪽 패널).

<71> 상기 결과에 의해, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)는 분자량의 크기에 의한 분리 크로마토그래피와 무변성-전기영동법(native-PAGE)의 분석을 통해 다양한 크기의 복합체 구조를 가진다는 것을 알 수 있었고, 특히 각각의 도메인(domain)을 따로 분리하였을 경우 구조가 변하므로 인해 전자전달이 일어나지 않는다는 것을 확인하였다.

<72> [실시예 6] 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 샤페론(chaperone) 활성과 구조와의 관계

<73> 일반적으로 샤페론(chaperone)의 가장 큰 특징 중 하나는 단백질이 가역적으로 이중체, 삼중체, 그리고 고중합체로 결합한다는 것이다 (Hendrick et al., Annu. Rev. Biochem., 62:349-384, 1993). 특히, 많은 열충격 단백질(열충격단백질(sHSP)s)은 생체 내에서 고분자량 복합체를 형성한다고 알려져 있는데 이것은 샤페론(chaperone) 활성을 위해 꼭 필요한 특성이다(Haley et al., J. Mol. Biol., 277:27-35, 1998). 또한, 다이설파이드 아이소머라제 (protein disulfide isomerase)와 박테리아의 티오레독신, 티오레독신 리덕타제와 같이 티오레독신 구조부위를 가지는 단백질들이 샤페론(chaperone) 활성을 가진다는 많은 보고가 있었다.

<74> 이에, 본 실시예에서는 다양한 형태의 고분자량 복합체를 형성하고 티오레독신 구조부위를 가지고 있는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)가 샤페론(chaperone)의 활성을 가지고 있는 지의 여부를 알아보았다.

<75> 먼저, 말레이트 디하이드로게나제(malate dehydrogenase)를 기질로 사용하여 온도가 45℃로 유지되는 분광 광도계 셀에서 열에 의한 말레이트 디하이드로게나제(malate dehydrogenase)의 응집을 억제하는 능력을 측정함으로써, 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 활성을 알아보았다(도 6-A). 이때, 검은 색 마름모는 1μM의 말레이트 디하이드로게나제(malate dehydrogenase) 혼자 들어있는 혼합물, 검은색 사각형은 1μM의 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 단백질이 첨가된 혼합물, 검은색 삼각형과 검은색 동그라미는 각각 티오레독신 리덕타제 도메인(domain)과 티오레독신 도메인(domain) 1μM이 첨가된 혼합물, 그리고 흰색 삼각형은 티오레독신 도메인(domain)과 티오레독신 리덕타제 도메인(domain)을 각각 1μM씩 첨가해준 혼합물을 나타낸 것이다.

<76> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)는 매우 효과적으로 말레이트 디하이드로게나제(malate dehydrogenase)의 열에 의한 응집을 효과적으로 방지한다는 것을 알 수 있었다. 그리고 각각의 도메인(domain)의 경우 완전한 형태의 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 보다 약한 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 기능을 가지고 있었고, 각각의 도메인(domain)을 섞어 주더라도 완전한 형태보다는 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 기능이 약하다는 것을 알 수 있었다.

<77> 도 6-B에서는 기질로 화학약품에 의해 변성된 말레이트 디하이드로게나제(malate dehydrogenase)를 이용하여 변성된 단백질이 원래의 구조로 되돌아 올 때 그 과정을 촉매하는 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 기능을 알아보았다. 말레이트 디하이드로게나제(malate dehydrogenase)를 화학 약품으로 변성시킨 후, 시간대별로 되살아나는 활성을 측정하고 여기에 다른 단백질을 같이 넣어 주었을 때 되살아나는 활성을 비교하여 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 활성의 특성을 알아보았다.

<78> 이때, 검은색 마름모는 0.1μM의 말레이트 디하이드로게나제(malate dehydrogenase)만 넣어둔 혼합물, 검은색 동그라미는 1μM의 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)를 넣어준 혼합물, 흰색 마름모와 흰색 사각형은 각각 1μM의 티오레독신 리덕타제 도메인(domain)과 티오레독신 도메인(domain)을 넣어준 혼합물을 나타내고, 검은색 사각형은 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 활성이 있다고 알려진 박테리아 티오레독신 1μM을 넣어준 혼합물을 나타낸 것이다.

<79> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)는 약하지만 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 기능을 가지고 있다는 것을 알 수 있었고 각각의 도메인(domain)의 경우는 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 기능이 완전한 형태보다 더 강하다는 것을 확인하였다(도 6-B 참조). 즉, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)는 도 6-A와 6-B에서 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 기능과 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 기능을 가지고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

<80> 그리고, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)는 다양한 구조를 가지기 때문에, 이들 구조와 세가지 기능, 전자를 전달하는 리덕타제 기능, 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase)및 샤페론 폴다제(foldase) 기능과의 관계를 알아보았다.

<81> 먼저, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 분자량 크기에 의한 분리 크로마토그리피에서 사이즈가 가장 큰 분획(F-I)과 가장 작은 분획(F-II)로 나눈 후 이들 분획을 재크로마토그래피하여 첫 번째 분자량의 크기에 의한 분리 크로마토그래피의 용출 시간과 비교한 결과, 거의 같은 용출 시간에서 추출됨이 입증되어 단백질 구조들이 안정하다는 것을 확인하였다(도 6-C 참조).

<82> 또한, 분자량 크기에 의한 분리 재 크로마토그래피를 하지 않은 애기장대(arabidopsis thaliana)의 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 활성과 비교하였을 때, 크기가 가장 큰 단백질 복합체(F-I)에서는 매우 강한 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 활성과 약한 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 활성이 나타났으며, 반면 크기가 제일 작은 단백질 복합체(F-II)에서는 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 활성은 전혀 나오지 않고 매우 강한 리덕타제 활성과 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 활성을 나타내었다(도 6-D 참조).

<83> 상술한 결과로부터, 단백질 복합체의 거대분자 형성은 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 활성을 촉진시키고, 복합체의 저분자량 종들로의 분리는 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase)의 활성과 전자를 전달하는 리덕타제의 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

<84> 따라서, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 세

가지 기능은 특정적인 단백질 구조와 관련 있다고 결론지을 수 있다.

<85> [실시예 7] 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 구조와 기능에 있어서 티오레독신 도메인(domain)의 중요성

<86> 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-A와 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 염기 서열에서 가장 큰 차이점은 카르복시 말단에 존재하는 티오레독신 도메인(domain)으로 알려져 있는데, 이중 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-A(AtNTRA)는 분자량 크기에 의한 분리 크로마토그래피에서 이중체와 사중체의 저분자량 복합체를 이루는 것으로 보고되고 있다(도 7-A, 위쪽 패널).

<87> 이에, 본 실시예에서는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 카르복시 말단에 존재하는 티오레독신과 상기 티오레독신 리덕타제 타입-A와의 단백질 구조적 차이점에서 중요한 역할을 할 것이라 예상하고, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-A의 카르복시 말단에 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 티오레독신 도메인(domain)을 붙은 재조합 연결 단백질을 PCR 기법(Rouhier et al., Biochem. Bioph. Res. Co., 341:1300-1308, 2006)에 의해 제조하여 복합체 형성에 대한 특성을 분석하였다.

<88> 그 결과, 도 7-A에 도시한 바와 같이 이중체와 사중체의 저분자량 복합체로 존재하던 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-A는 카르복시 말단에 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 티오레독신 도메인(domain)이 붙으므로 해서 분자량 크기에 의한 분리 크로마토그래피에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)와 비슷하게 다양한 크기의 복합체 구조를 가지게 된다는 것을 확인하였고, 특히 고분자량 복합체의 량이 많이 증가한다는 것을 확인할 수 있었다.

<89> 또한, 애기장대(arabidopsis thaliana)의 티오레독신 리덕타제 타입-A에 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 티오레독신 도메인(domain)이 연결되면서 발생되는 구조적 전환이 기능에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

<90> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-A는 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 기능이 전혀 없었지만 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 티오레독신 도메인(domain)이 연결되면서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)와 비슷한 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 활성이 생긴다는 것을 확인하였다.

<91> 하지만, 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)에 전자를 전달하는 리덕타제 활성은 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)와 비슷한 형태의 연결 구조가 되더라도 일어나지 않았다.

<92> 즉, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 구조적 특징과 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 기능은 카르복시 말단에 존재하는 티오레독신 도메인(domain)에 의해서 생긴다는 것을 확인할 수 있었고, 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)에 전자를 전달하는 리덕타제의 기능은 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 고유한 활성이라는 것을 확인할 수 있었다.

<93> [실시예 8] 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 구조와 활성에 있어서 카르복시 말단의 중요성

<94> 상기 결과에서 알 수 있듯이, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 카르복시 말단에 존재하는 티오레독신 도메인(domain)은 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)가 다양한 형태의 구조를 가지며 샤페론(chaperone) 활성을 가지는데 필수적으로 작용하고 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)에 전자를 전달하는 리덕타제 활성에도 매우 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

<95> 이에, 본 실시예에서는 티오레독신 도메인(domain)의 중요성을 분석하고 확인하기 위해서 카르복시 말단에서 특히 염기성을 띠는 잔기가 많은 14개의 아미노산을 잘라낸 재조합 유전자를 PCR 기법으로 제조하고 단백질을 순수 분리하여 카르복시 말단의 중요성을 알아보았다.

<96> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 카르복시 말단 14개의 아미노산이 제거된 단백질은 무변성 전기영동법과 분자량 크기에 의한 분리 크로마토그래피에서 온전한 형태의 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)와 비교해서 상대적으로 고분자량 복합체의 량이 증가한다는 것을 확인하였다(도 8-A,B 참조).

<97> 또한, 단백질의 수소성 표면에 결합한다고 알려져 있는 비스에이앤에스(Bis-ANS)를 이용한 결합 분석에서 카르복시 말단이 제거된 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 단백질은 더 많은 비스에이앤에스(Bis-ANS)의 결합으로 인해 형광의 세기가 두 배 정도 증가하는 것을 관찰하였다(도 8-C 참조). 즉, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 카르복시 말단의 염기성을 띠는 잔기가 많은 14개의 아미노산을 제거할 경우 수소성 표면 (hydrophobic region)이 많이 노출이 되어 더 많은 고분자량 복합체가 만들어진다는 것을 확인하였다.

<98> 그리고, 상기 단백질의 활성을 비교해 본 결과, 2-시스테인 퍼록시레독신(2-cys peroxiredoxin)에 전자를 전달하던 리덕타제 활성은 전혀 나타나지 않았고(도 8-D 참조), 말레이트 디하이드로게나제(malate dehydrogenase)를 이용한 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase)활성은 온전한 형태의 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)보다 2배 이상 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 카르복시 말단에 존재하는 티오레독신 도메인(domain)이 고분자량 복합체의 형성에 매우 중요하고 특히, 카르복시 말단의 염기성을 띠는 잔기가 많은 14개의 아미노산 부위가 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 구조 변환과 활성의 제어에 중요한 역할을 할 것이라 예측할 수 있었다.

<99> [실시예 9] 열충격에 의한 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 구조변환과 기능 전환

<100> 상술한 결과에 의해, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 여러 가지 기능은 특정적인 단백질 구조와 관련이 있다는 것을 알 수 있었다.

<101> 이에, 본 실시예에서는 상술한 기능과 구조의 전환이 어떤 조건 하에서 변하는지를 알아보았다.

<102> 또한, 통상적으로 열충격단백질(sHSP)는 열충격에 대해 고분자 복합체를 형성함으로써 샤페론(chaperone)활성을 나타낸다고 알려져 있어(Haley et al., J. Mol. bio., 277: 27-35, 1998; Hendrick et al., Annu. Rev. Biochem., 62: 349-384, 1993), 열충격단백질(sHSP)과 같이 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕차제 타입-C 이성질체의 구조변화도 열충격에 의해 일어날 수 있는지를 알아보았다.

<103> 그 결과, 열충격단백질(sHSP)과 같이 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 단백질 구조와 기능은 다양한 온도에서 20분 동안 배양했을 때 현저하게 변화되었다(도 9 참조). 즉, 배양 온도의 증가에 따라, 무변성 전기영동법에서 저분자량 단백질의 양은 감소함과 동시에 고분자량 단백질의 량이 크게 증가되었다.

<104> 그리고, 에스디에스(SDS) 첨가 변성 전기영동법에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 단백질량이 변하지 않는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 열충격이 주어지는 동안 저분자량 단백질들은 보다 높은 분자량의 복합체로 모여진다는 것을 의미한다.

<105> 또한, 비스에이엔에스(Bis-ANS)의 결합을 알아보면 온도가 올라갈수록 더 많은 비스에이엔에스(Bis-ANS)가 결합하여 형광의 세기가 증가하는 것을 알 수 있다(도 9-B 참조). 즉, 열충격이 가해지면 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 수소성 표면이 증가하여 고분자량 복합체로 구조가 변한다는 것을 의미한다.

<106> 그리고, 열 충격에 의해 고분자량 복합체로 구조가 변한 후 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 세가지 활성을 비교해보면, 온도가 올라갈수록 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 활성은 두배 이상 증가하는 반면 샤페론(chaperone) 폴다제(foldase) 활성과 전자를 전달하는 리덕타제 활성은 점점 줄어들어서 온도가 60℃가 되었을 때는 전혀 나타나지 않았다(도 9-C 참조).

<107> 따라서, 상술한 결과를 분석하면 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)는 열충격에 의해 구조적, 기능적 전환이 일어나고, 특히 온도가 올라갈수록 고분자량 복

합체로 전환이 일어나면서 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 활성이 강화되는 것을 확인할 수 있었다.

<108> [실시예 10] 생체내에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 분포와 구조변화

<109> 애기장대(arabidopsis thaliana) 내에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 존재와 구조를 알아보았다.

<110> 먼저, 애기장대(arabidopsis thaliana)의 여러 가지 조직에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 발현 정도를 알아보았다. 그리고, 애기장대(arabidopsis thaliana)의 각 조직으로부터 추출한 단백질을 에스디에스(SDS) 첨가 변성 전기영동법을 수행한 후 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 항체를 이용하여 웨스턴 블럿(western blot)(Western blot)을 수행하였다.

<111> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체는 광합성을 하는 조직-잎, 줄기에서 특히 많이 발현되었고 꽃과 뿌리에서도 양은 적지만 발현되었다(도 10-A 참조). 특이한 점은 무변성 전기영동법에서 다른 조직의 경우, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 다양한 크기의 복합체로 이루어져 있다는 것을 확인하였지만, 뿌리에서는 오직 고분자량 복합체로만 존재한다는 것을 확인하였다(도 10-B 참조).

<112> 그리고, 애기장대(arabidopsis thaliana)의 뿌리에는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C)의 목적 단백질인 퍼록시다제가 존재하지 않는다는 보고(Horling, Konig et al., *plant physiol. Biochem.,* **40**: 491-499, 2002; Lamkemeyer, Laxa et al., *Plant J* ., **45**: 968-81, 2006)에 기초하여, 애기장대(arabidopsis thaliana)의 뿌리에서는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 전자전달의 리덕타제 기능보다는 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 기능이 강화되어져 있을 것이라는 것을 짐작할 수 있었다.

<113> 또한, 실험관 내 실험(in vitro)에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 열에 의해서 구조적 기능적 전환이 일어났기 때문에 식물내에서도 열에의한 구조적 전환이 일어나는지 무변성 전기영동법으로 알아보았다.

<114> 먼저, 2주간 키운 애기장대(arabidopsis thaliana)를 45℃에서 시간별로 열처리를 한 후 각각의 샘플로부터 단백질을 추출하여 무변성 전기영동법을 실시하고 웨스턴 블럿(western blot)을 시행하였다.

<115> 그 결과, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 저분자량 복합체 구조가 점점 줄어들면서 고분자량 복합체의 양이 증가하는 것을 관찰하였다. 즉, 실험관 내 실험뿐만 아니라 식물체 내(in vivo)에서도 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체는 열충격에 의해서 그 구조가 변한다는 것을 확인하였다.

<116> [실시예 11] 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 애기장대(arabidopsis thaliana)의 성장과 광합성 효율에 미치는 영향

<117> 본 실시예에서는 애기장대(arabidopsis thaliana) 내에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 중요성을 알아보기 위해서 솔크(SALK)의 티 디엔에이(T-DNA)가 삽입되어 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 제거된 돌연변이 식물체를 선별하고 이 식물을 야생종 애기장대(arabidopsis thaliana)와 비교하였다.

<118> 먼저, 솔크(SALK)의 데이타 자료(data base)로부터 애기장대(arabidopsis thaliana) 게놈(genome) 상에서 특히 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 유전자 내에 티 디엔에이(T-DNA)가 삽입된 애기장대(arabidopsis thaliana) 씨앗(seeds)를 분양받았다. 이 씨를 이용하여 먼저 카나마이신이 든 배지에서 형질전환된 식물을 선별하고, 다시 PCR을 이용하여 동성종(ho)을 선별하였다(도 11-A 참조). 그리고 상기 선별한 식물과 야생종 식물에서 단백질을 분리하여 에스디에스(SDS) 첨가 변성 전기영동법을 실시한 후 웨스턴 블럿(western blot)을 수행하였다.

<119> 그 결과, 형질전환된 식물(atntr-c)에서는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 전혀 발현되지 않는다는 것을 확인하였다(도 11-B 참조).

<120> 그리고, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 식물과 야생종 애기장대(arabidopsis thaliana)를 같은 날에 심어서 자라는 모양을 관찰하였다.

<121> 그 결과, 발아 시기는 똑같았지만, 발아 후 14, 21, 28, 40일 후에 관찰한 모습에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 식물체는 야생종에 비해 성장 속도가 매우 늦고 전체적으로 식물이 작다는 것을 확인 하였다(도 11-C 참조). 특히, 발아 후 21일된 식물의 잎을 관찰한 결과, 야생종보다 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 식물은 잎의 크기가 매우 작고 색깔도 상대적으로 옅다는 것을 확인하였다.

<122> 그리고, 상술한 결과에 따라 잎 색깔이 차이가 나기 때문에 두 식물 사이에 광합성 효율에서 차이가 나는지를 알아보았다.

<123> 일반적으로 식물에 있어서 광합성은 두가지 색소 집단, 즉 광계Ⅰ(photosystem Ⅰ; PSI)과 광계II(photosystem II; PSII)에 의해 이루어지는데, 본 실시예에서는 이 중 PSII에 의한 광합성 효율을 엽록소 형광 기술(chlorophyll fluorescence techniques)로부터 최대 광화학 효율(Fv/Fm)로 측정하였다.

<124> 그 결과, 일반적인 건강한 식물 잎의 Fv/Fm 값은 약 0.86인데, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 식물의 경우, 그 수치가 약 0.51로 매우 적은 광합성 효율을 가진다는 것을 확인하였다.

<125> [실시예 12] 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 식물의 스트레스 민감성

<126> 상술한 결과에 의해, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체는 과산화수소를 분해하는 퍼록시다제의 실질적인 전자 주개의 활성을 가질 뿐만 아니라 분자 샤페론(chaperone)으로서 스트레스로부터 다른 단백질을 보호하는 활성을 가지고 있음을 알 수 있었다.

<127> 이에, 본 실시예에서는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 식물이 다양한 스트레스에 어떠한 민감성을 보이는지 야생종 애기장대(arabidopsis thaliana)와 비교하였다.

<128> 먼저, 식물에서 빛에 노출되면 산화적 스트레스를 일으킨다고 알려진 메틸 비올로겐(MV; methyl viologen)을 처리하여 산화적 스트레스에 대한 반응을 알아보았다. 그리고, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 애기장대(arabidopsis thaliana)와 야생종 애기장대(arabidopsis thaliana)의 잎을 원형으로 절단하고 0μM과 2μM의 메틸 비올로겐(MV)에 띄워둔 상태로 1시간 동안 암상태로 둔 후, 빛에 노출 시키고 시간대 별로 최대 광화학 효율(Fv/Fm)과 모양을 관찰 하였다(도 12-A 참조).

<129> 그 결과, 메틸 비올로겐(MV)에 의해 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 애기장대(arabidopsis thaliana)의 잎이 더 많이 탈색된다는 것을 알 수 있었고, 최대 광화학 효율(Fv/Fm) 역시 야생종 애기장대(arabidopsis thaliana, 검은색 동그라미)에 비해 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 애기장대(arabidopsis thaliana, 검은색 삼각형)에 비교하여 현저하게 감소하는 것을 확인하였다.

<130> 또한, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 샤페론(chaperone)의 활성을 가지고 있기 때문에 열충격에 대한 민감성을 알아보았다.

<131> 먼저, 2주간 키운 애기장대(arabidopsis thaliana)를 45℃에서 30분간 열처리를 한 후 22℃에서 72시간 동안 회복시켰다.

<132> 그 결과, 야생종 애기장대(arabidopsis thaliana)의 경우 거의 피해를 입지 않았지만, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 발현되지 않는 식물은 회복기간동안 잎의 가장자리가 말라서 탈색이 되는 것을 확인하였다.

<133> 따라서, 상술한 결과로부터 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin

reductase isotype C) 이성질체는 애기장대(arabidopsis thaliana) 내에서 산화적 스트레스와 열충격에 대한 내성에서 매우 중요한 역할을 한다는 것을 확인할 수 있었다.

<134> [실시예 13] 애기장대(arabidopsis thaliana)의 티오레독신 리덕타제 타입-C 이성체유전자를 도입한 형질전환 식물체

<135> 애기장대의 티오레독신 리덕타제 타입-C 이성체 유전자를 도입하기 위한 식물체 전이용 벡터를 제조하기 위하여 2-시스테인 퍼록시레독신 I의 cDNA 절편을 벡터 pBI121의 XbaI/SacI부위에 크로닝하여 콜리 플라워 모자이크 바이러스(CaM virus)의 35S 프로모터(promoter)와 2'/7'전사 종결자의 조절 하에서 발현될 수 있는 재조합 식물체 전이용 벡터인 pBI121::를 제조하였다. 이때, 도 13에서 도시한 바와 같이 kan은 카나마이신으로 형질전환 후 형질전환 식물체를 선별하기 위한 항생제 마커(marker), RB는 우측보드(right board), LB는 좌측보드 (left board), AtNTR-C는 애기장대의 티오레독신 리덕타제 타입-C 이성체의 펩타이드 유전자, 및 2'/7'는 아그로박테리움 투머파시엔스 (Agrobacterium tumefaciencs) 유전자중 2'/7' 유전자의 비해독 유전자 염기서열을 나타낸다.

<136> 그리고, 상기 재조합 벡터를 아그로박테리움 투머파시엔스 (agrobacterium tumerfaciens) 박테리아에 전기충격법으로 형질 전환하여 형질전환 식물체를 제조하였다.

발명의 효과

<137> 이상과 같이, 본 발명은 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 퍼록시레독신에 전자를 전달하는 리덕타제 활성과 단백질의 풀림을 방지하고 구조 변화를 촉진하는 샤페론(chaperone)의 기능을 가지고 있으며, 이러한 기능들은 단백질의 4차구조의 동적인 전환과 관련 있음을 입증하였고, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 단백질 구조와 기능적 변화는 열충격에 의해 민감하게 조절하는 것을 입증하였다.

<138> 그리고, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 샤페론(chaperone) 기능은 카르복시 말단에 존재하는 티오레독신 도메인(domain)에 의해 매우 강화 된다는 것을 알 수 있었다. 특히, 카르복시 말단의 14개의 아미노산이 제거될 경우 리덕타제 활성이 사라지고 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 활성이 강해지는 것으로 이 부분이 구조적 전환과 기능적 전환의 조절에서 중요한 역할을 하는 것을 입증하였다.

<139> 또한, 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 구조적 전환은 식물체 내에서도 열충격에 의해 일어난다는 것을 확인 하였고, 애기장대(arabidopsis thaliana)의 뿌리에서는 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 고분자량 복합체로만 존재하는 것을 확인함으로서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 단백질은 애기장대(arabidopsis thaliana)의 뿌리에서 리덕다체의 활성보다는 샤페론(chaperone) 홀다제(holdase) 활성이 강화되는 것을 입증하였다.

<140> 그리고, 애기장대(arabidopsis thaliana)에서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 단백질이 발현되지 않을 경우 식물은 정상적인 성장 조건에서도 성장이 저해되었고 광합성 효율이 떨어진다는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라 산화적 스트레스와 열충격에 매우 민감한 반응을 보인다는 것을 관찰함으로서 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 단백질은 식물체 내에서 산화적 스트레스뿐 아니라 다양한 스트레스 상황에서 식물이 반응할 때 매우 중요한 역할을 하는 것을 입증하였다.

<141> 따라서, 본 발명에 따른 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 유전자를 도입한 형질전환 식물의 제조는 다양한 환경 스트레스에 저항성을 가지는 형질전환 식물체의 제조를 가능하게 할 수 있게 한 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 애기장대(arabidopsis thaliana) 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

<2> 도 2는 애기장대(arabidopsis thaliana) 원형질 세포(protoplast) 내에서 티오레독신 리덕타제 타입-

C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 세포내 존재부위를 나타낸 도면이고,

<3> 도 3은 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 도메인(domain) 구조와 분리한 형질전환 단백질을 에스디에스(SDS) 첨가 변성 전기영동법으로 확인하고 티오레독신 리덕타제 활성과 티오레독신 활성을 측정한 도면이고,

<4> 도 4는 퍼록시레독신을 이용하여 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 전자전달 활성 측정과 각각의 도메인(domain)이 미치는 영향을 알아본 도면이고,

<5> 도 5는 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체에 대해 분자량 크기별로 분리한 분리 크로마토그래피의 용출 흡광도와, 무변성-전기영동법(native-PAGE)으로 분리하고 염색한 젤, 및 전자현미경으로 본 구조를 나타낸 도면이고,

<6> 도 6은 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 샤페론(chaperone) 활성을 알아보고 분자량 크기와 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 가지는 여러 가지 활성과의 관계를 알아본 도면이고,

<7> 도 7은 티오레독신 리덕타체 타입-A 이성질체에 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 카르복사 말단에 존재하는 티오레독신 도메인(domain)을 연결한 재조합 단백질의 구조변화와 그 활성 변화를 관찰한 도면이고,

<8> 도 8은 카르복시 말단의 아미노산 14개가 잘려진 형질전환 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 단백질의 구조 변화 및 전자전달과 샤페론(chaperone) 활성을 알아본 도면이고,

<9> 도 9는 열충격에 의한 구조변화를 무변성 전기영동법과 에스디에스(SDS)-첨가 변성 전기영동법을 이용하여 확인하고, 이때 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체의 여러 가지 활성 변화를 관찰한 도면이고,

<10> 도 10은 애기장대(arabidopsis thaliana) 조직 내에서 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체 단백질의 분포와 구조를 알아보고 열충격에 의한 구조변화를 무변성-전기영동법(native-PAGE)으로 알아본 도면 이고,

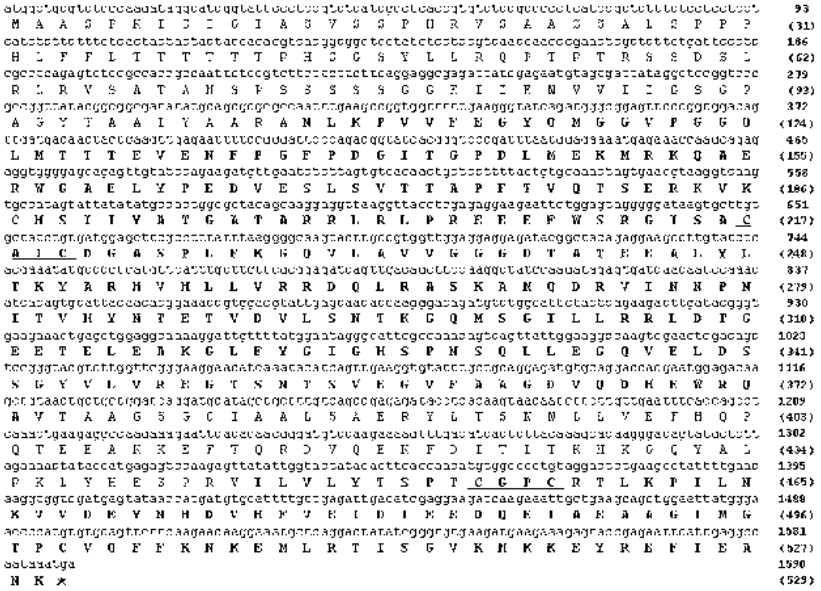
<11> 도 11은 애기장대(arabidopsis thaliana)에서 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 제거된 식물체를 선택해서 야생종과 비교하여 겉모습을 관찰하고 광합성 효율을 비교한 도면이고,

<12> 도 12는 티오레독신 리덕타제 타입-C(thioredoxin reductase isotype C) 이성질체가 제거된 애기장대(arabidopsis thaliana)와 야생종 애기장대(arabidopsis thaliana)를 이용하여 산화적 스트레스와 열충격에 의한 스트레스 내성을 알아본 도면이고,

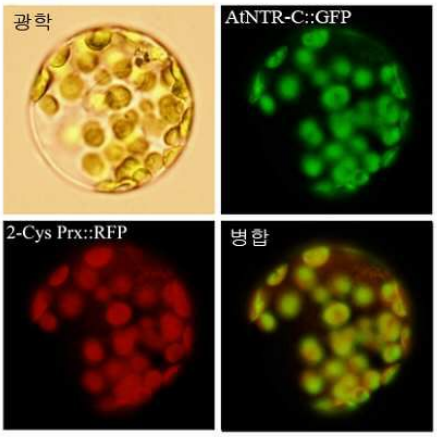
<13> 도 13은 애기장대의 티오레독신 리덕타제 타입-C 단백질 유전자를 함유한 재조합 벡터를 나타낸 개열 지도이다.

도면

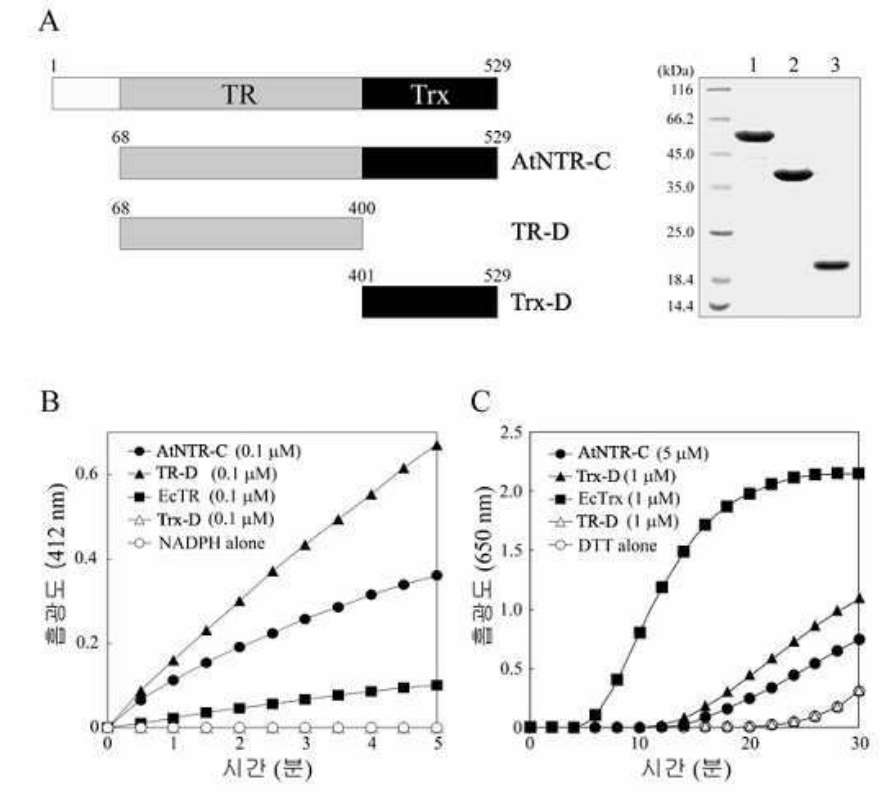
도면1



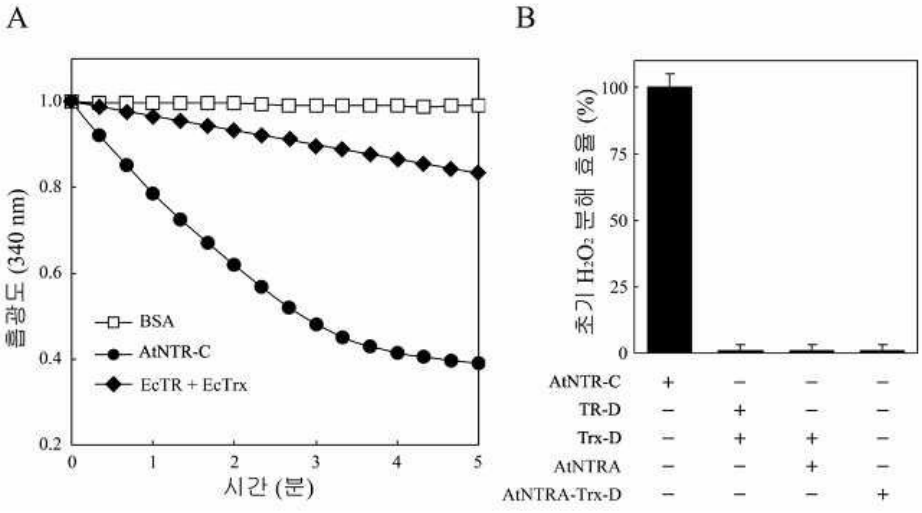
도면2



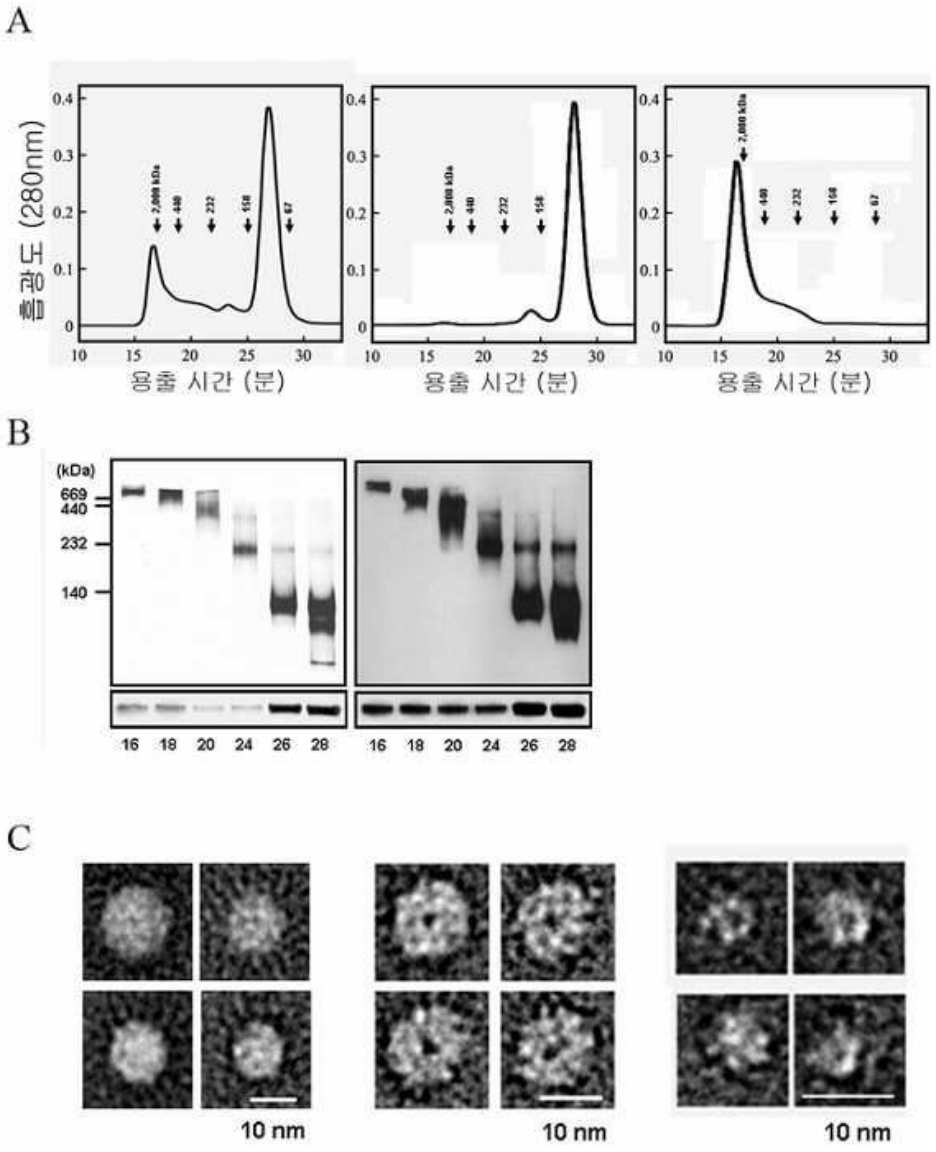
도면3


A
1
529
TR
Trx
68
529
AtNTR-C
68
400
TR-D
401
529
Trx-D
(kDa)
1 2 3
116
66.2
45.0
35.0
25.0
18.4
14.4
B
AtNTR-C (0.1 μM)
TR-D (0.1 μM)
EcTR (0.1 μM)
Trx-D (0.1 μM)
NADPH alone
흡광도 (412 nm)
시간 (분)
C
AtNTR-C (5 μM)
Trx-D (1 μM)
EcTrx (1 μM)
TR-D (1 μM)
DTT alone
흡광도 (650 nm)
시간 (분)

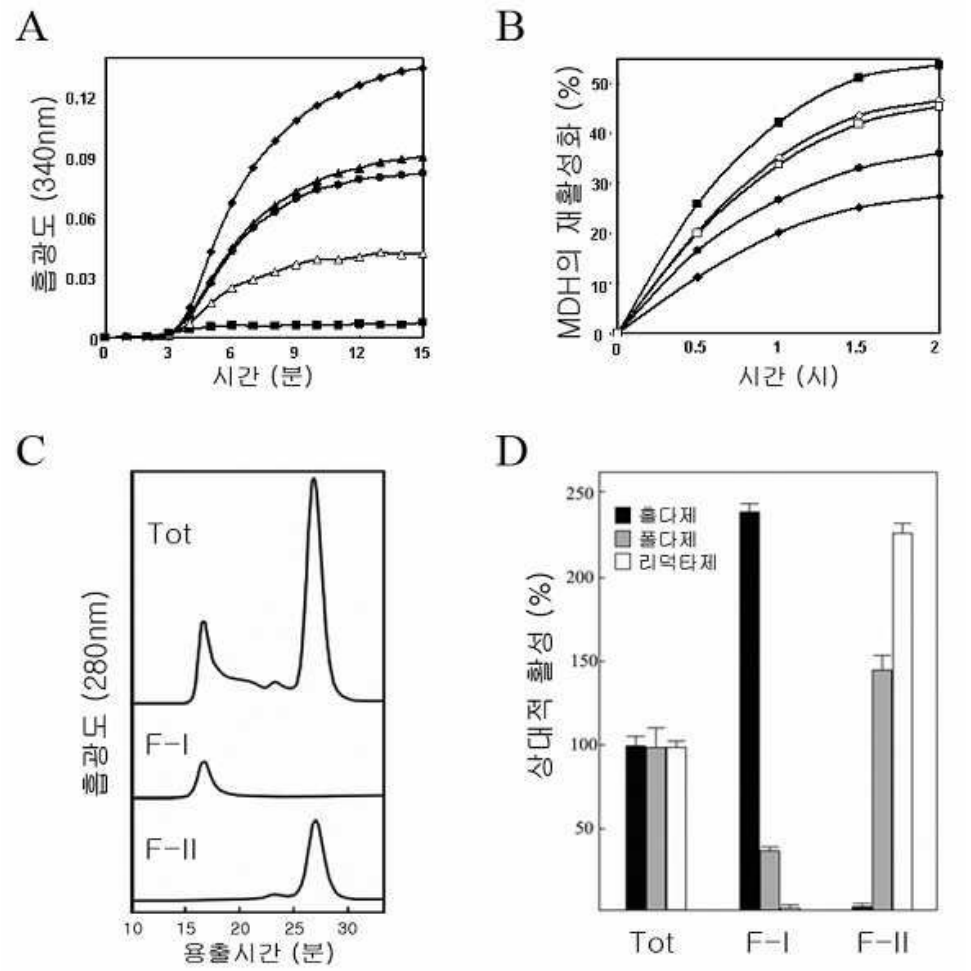
도면4


A
BSA
AtNTR-C
EcTR + EcTrx
흡광도 (340 nm)
시간 (분)
B
초기 H2O2 분해 효율 (%)
AtNTR-C + – – –
TR-D – + – –
Trx-D – + + –
AtNTRA – – + –
AtNTRA-Trx-D – – – +

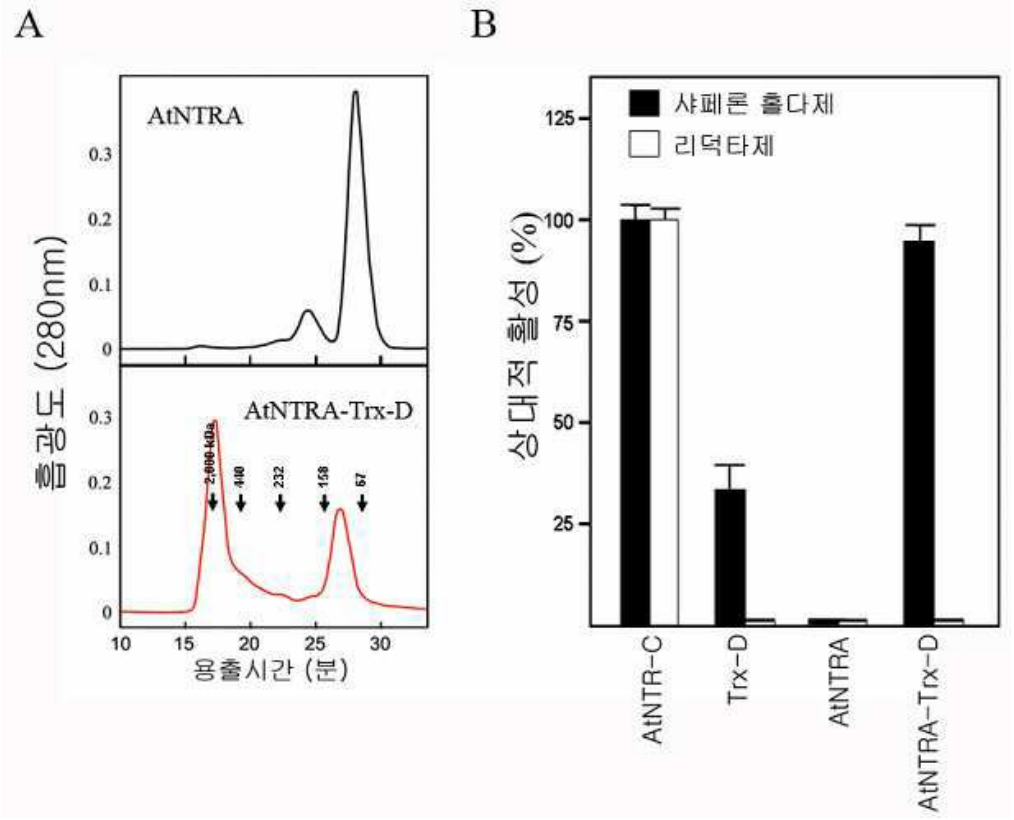
도면5


A
흡광도 (280nm)
용출 시간 (분)
용출 시간 (분)
용출 시간 (분)
B
(kDa)
669
440
232
140
16 18 20 24 26 28
16 18 20 24 26 28
C
10 nm
10 nm
10 nm

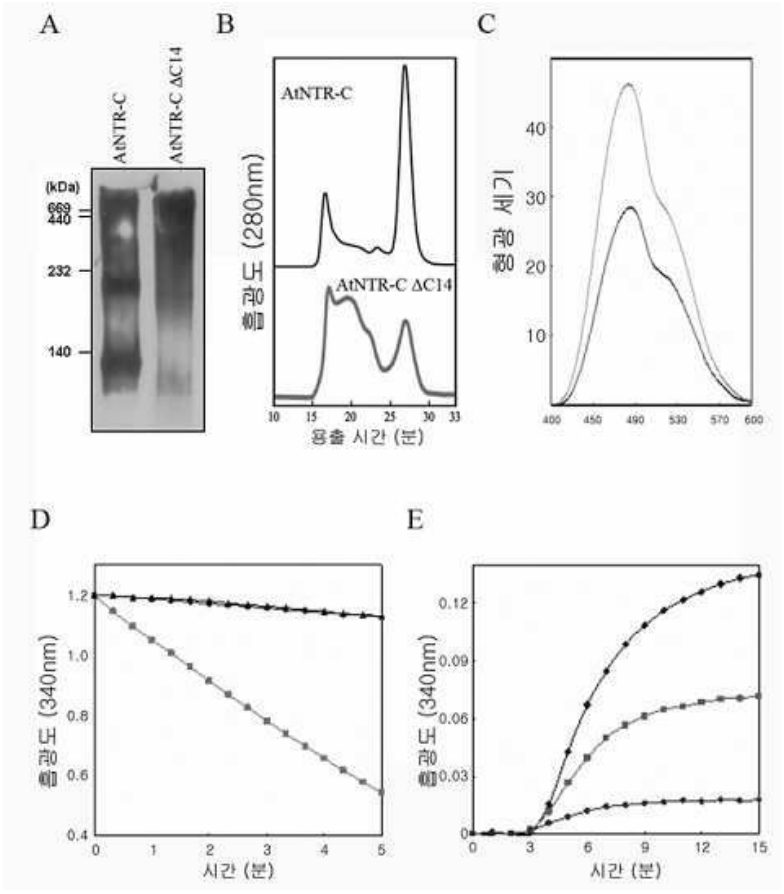
도면6


A
흡광도 (340nm)
0.12
0.09
0.06
0.03
0
0
3
6
9
12
15
시간 (분)
B
MDH의 재활성화 (%)
50
40
30
20
10
0
0
0.5
1
1.5
2
시간 (시)
C
흡광도 (280nm)
Tot
F-I
F-II
10
15
20
25
30
용출시간 (분)
D
상대적 활성 (%)
250
200
150
100
50
효다제
폴다제
리덕타제
Tot
F-I
F-II

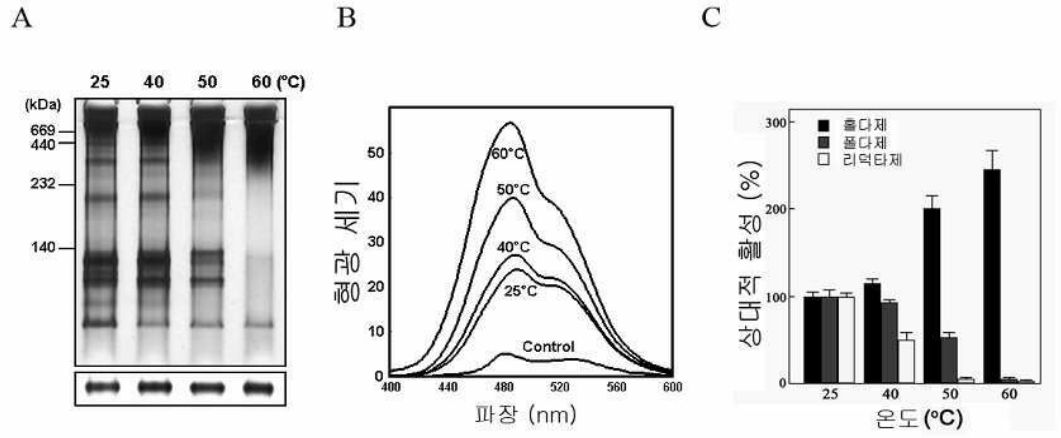
도면7


A
AtNTRA
AtNTRA-Trx-D
흡광도 (280nm)
0.3
0.2
0.1
0
2,000 kDa
440
232
158
67
10
15
20
25
30
용출시간 (분)
B
샤페론 활성
리덕타제
상대적 활성 (%)
125
100
75
50
25
AtNTR-C
Trx-D
AtNTRA
AtNTRA-Trx-D

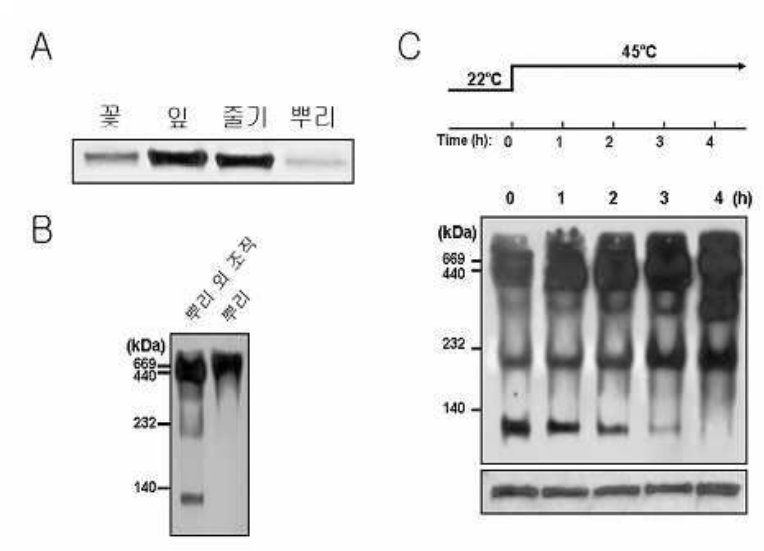
도면8


A
B
C
AtNTR-C
AtNTR-C ΔC14
(kDa)
669
440
232
140
흡광도 (280nm)
AtNTR-C
AtNTR-C ΔC14
용출 시간 (분)
형광 세기
D
E
흡광도 (340nm)
시간 (분)
흡광도 (340nm)
시간 (분)

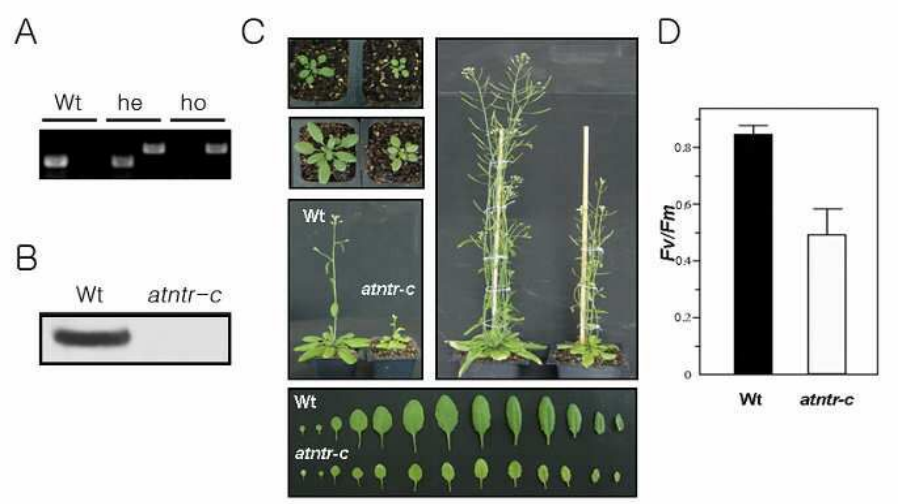
도면9


A
B
C
25
40
50
60 (°C)
(kDa)
669
440
232
140
60°C
50°C
40°C
25°C
Control
형광 세기
파장 (nm)
홀다제
폴다제
리악타제
상대적 활성 (%)
온도 (°C)

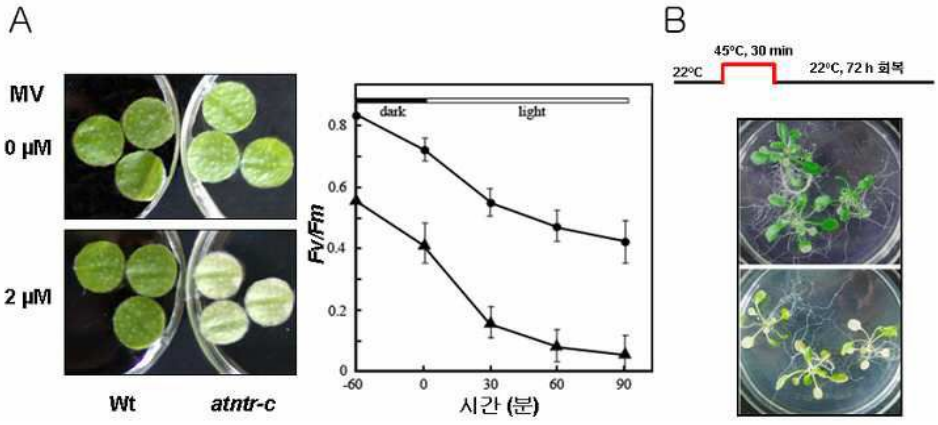
도면10



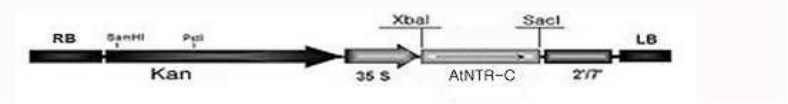
도면11



도면12



도면13



서열목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGDANG NATIONAL UNIVERSITY
<120> Thioredoxin reductase isotype C complex with activity of chaperon and reductase, and uses thereof

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1590
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1
atggctgcgt ctcccaagat aggcatcggt attgcctccg tctcatcgcc tcaccgtgtc 60

tccgccgcct catccgctct ttctcctcct cctcatctct tctttctcac tactactact 120

accacacgtc acggcggctc ctatctcctc cgtcaaccaa cccgaactcg ctcttctgat 180

tccctccgcc tcagagtctc cgccaccgcc aattctccgt cttcttcttc ttcaggaggc 240

gagattatcg agaatgtagt gattataggc tccggtcccg ccggttatac ggcggcgata 300

tatgcagcgc gcgccaattt gaagccggtg gtttttgaag ggtatcagat gggcggagtt 360

cccggtggac agttgatgac aactactgaa gttgagaatt ttccgggatt cccagacggt 420

atcacgggtc ccgatttaat ggagaaaatg agaaagcaag cagagaggtg gggagcagag 480

ttgtatccag aagatgttga atctcttagt gtcacaactg ctccttttac tgtgcaaact 540

agtgaacgta aggtcaagtg ccatagtatt atatatgcca ctggcgctac agcaaggagg 600

ttaaggttac ctcgagagga agaattctgg agtaggggga taagtgcttg tgctatctgt 660

gatggagctt cgcctttatt taaggggcaa gtacttgccg tggttggagg aggagatacg 720

gctacagagg aagccttgta tctcacgaaa tatgcccgtc atgttcattt gcttgttcgc 780

agagatcagt tgagagcttc caaggctatg caagatagag tgatcaacaa tccaaacatc 840

acagtgcatt acaacacgga aaccgtggac gtattgagca acaccaaggg acagatgtct 900

ggcattctac tcagaagact tgatacgggt gaagaaactg agctggaggc aaaaggattg 960

ttttatggaa tagggcattc gccaaacagt cagttattgg aaggccaagt cgaactcgac 1020

agctccgggt acgtcttggt tcgggaagga acatcaaata catcagttga aggtgtattt 1080

gctgcaggag atgtgcagga ccacgaatgg agacaagctg taactgctgc tggatcagga 1140

tgcatagctg ctttgtcagc cgagagatac ctcacaagta acaatcttct tgttgaattt 1200

caccagcctc aaactgaaga ggccaagaaa gaattcacac aacgggatgt ccaagaaaag 1260

tttgacatca ctcttacaaa gcacaaggga cagtatgctc ttagaaaact ataccatgag 1320

agtccaagag ttatattggt actatacact tcaccaacat gtggcccctg taggactctg 1380

aagcctattt tgaacaaggt ggtcgatgag tataaccatg atgtgcattt tgttgagatt 1440

gacatcgagg aagatcaaga aattgctgaa gcagctggaa ttatgggaac cccatgtgtg 1500

cagttcttca agaacaagga aatgctcagg actatatcgg gtgtgaagat gaagaaagag 1560

taccgagaat tcattgaggc caataaatga 1590

<210> 2
<211> 529

<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

```
Met Ala Ala Ser Pro Lys Ile Gly Ile Gly Ile Ala Ser Val Ser Ser
  1               5                  10                  15

Pro His Arg Val Ser Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ser Pro Pro Pro His
             20                  25                  30

Leu Phe Phe Leu Thr Thr Thr Thr Thr Thr Arg His Gly Gly Ser Tyr
         35                  40                  45

Leu Leu Arg Gln Pro Thr Arg Thr Arg Ser Ser Asp Ser Leu Arg Leu
     50                  55                  60

Arg Val Ser Ala Thr Ala Asn Ser Pro Ser Ser Ser Ser Ser Gly Gly
 65                  70                  75                  80

Glu Ile Ile Glu Asn Val Val Ile Ile Gly Ser Gly Pro Ala Gly Tyr
                 85                  90                  95

Thr Ala Ala Ile Tyr Ala Ala Arg Ala Asn Leu Lys Pro Val Val Phe
            100                 105                 110

Glu Gly Tyr Gln Met Gly Gly Val Pro Gly Gly Gln Leu Met Thr Thr
        115                 120                 125

Thr Glu Val Glu Asn Phe Pro Gly Phe Pro Asp Gly Ile Thr Gly Pro
    130                 135                 140

Asp Leu Met Glu Lys Met Arg Lys Gln Ala Glu Arg Trp Gly Ala Glu
145                 150                 155                 160

Leu Tyr Pro Glu Asp Val Glu Ser Leu Ser Val Thr Thr Ala Pro Phe
                165                 170                 175

Thr Val Gln Thr Ser Glu Arg Lys Val Lys Cys His Ser Ile Ile Tyr
            180                 185                 190

Ala Thr Gly Ala Thr Ala Arg Arg Leu Arg Leu Pro Arg Glu Glu Glu
        195                 200                 205

Phe Trp Ser Arg Gly Ile Ser Ala Cys Ala Ile Cys Asp Gly Ala Ser
```

```
    210                 215                 220

Pro Leu Phe Lys Gly Gln Val Leu Ala Val Val Gly Gly Gly Asp Thr
225                 230                 235                 240

Ala Thr Glu Glu Ala Leu Tyr Leu Thr Lys Tyr Ala Arg His Val His
                245                 250                 255

Leu Leu Val Arg Arg Asp Gln Leu Arg Ala Ser Lys Ala Met Gln Asp
            260                 265                 270

Arg Val Ile Asn Asn Pro Asn Ile Thr Val His Tyr Asn Thr Glu Thr
        275                 280                 285

Val Asp Val Leu Ser Asn Thr Lys Gly Gln Met Ser Gly Ile Leu Leu
    290                 295                 300

Arg Arg Leu Asp Thr Gly Glu Glu Thr Glu Leu Glu Ala Lys Gly Leu
305                 310                 315                 320

Phe Tyr Gly Ile Gly His Ser Pro Asn Ser Gln Leu Leu Glu Gly Gln
                325                 330                 335

Val Glu Leu Asp Ser Ser Gly Tyr Val Leu Val Arg Glu Gly Thr Ser
            340                 345                 350

Asn Thr Ser Val Glu Gly Val Phe Ala Ala Gly Asp Val Gln Asp His
        355                 360                 365

Glu Trp Arg Gln Ala Val Thr Ala Ala Gly Ser Gly Cys Ile Ala Ala
    370                 375                 380

Leu Ser Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ser Asn Asn Leu Leu Val Glu Phe
385                 390                 395                 400

His Gln Pro Gln Thr Glu Glu Ala Lys Lys Glu Phe Thr Gln Arg Asp
                405                 410                 415

Val Gln Glu Lys Phe Asp Ile Thr Leu Thr Lys His Lys Gly Gln Tyr
            420                 425                 430

Ala Leu Arg Lys Leu Tyr His Glu Ser Pro Arg Val Ile Leu Val Leu
        435                 440                 445
```

Tyr Thr Ser Pro Thr Cys Gly Pro Cys Arg Thr Leu Lys Pro Ile Leu
450 455 460

Asn Lys Val Val Asp Glu Tyr Asn His Asp Val His Phe Val Glu Ile
465 470 475 480

Asp Ile Glu Glu Asp Gln Glu Ile Ala Glu Ala Ala Gly Ile Met Gly
485 490 495

Thr Pro Cys Val Gln Phe Phe Lys Asn Lys Glu Met Leu Arg Thr Ile
500 505 510

Ser Gly Val Lys Met Lys Lys Glu Tyr Arg Glu Phe Ile Glu Ala Asn
515 520 525

Lys

<210> 3
<211> 488
<212> PRT
<213> Oryza sativa

<400> 3
Met Ala Val Thr Arg Leu Ala Val Ala Ala Ala Leu Ser Ala Lys Ala
1 5 10 15

Leu Arg Ala Ser Ala Ala Pro Ala Val Asp Glu Glu Ala Pro Ala Ser
20 25 30

Pro Pro Pro Ser Asp Leu Gly Lys Gly Val Glu Asn Leu Val Ile Ile
35 40 45

Gly Ser Gly Pro Ala Gly Tyr Thr Ala Ala Ile Tyr Ala Ala Arg Ala
50 55 60

Asn Leu Lys Pro Val Val Phe Glu Gly Tyr Gln Val Gly Gly Val Pro
65 70 75 80

Gly Gly Gln Leu Met Thr Thr Thr Glu Val Glu Asn Phe Pro Gly Phe
85 90 95

Pro Asp Gly Val Thr Gly Pro Asp Leu Met Asp Lys Met Arg Lys Gln

```
            100                 105                 110

Ala Glu Arg Trp Gly Ala Glu Leu His Gln Glu Asp Val Glu Phe Val
        115                 120                 125

Asn Val Lys Ser Arg Pro Phe Val Ile Arg Ser Ser Asp Arg Glu Val
    130                 135                 140

Lys Cys His Ser Val Ile Ile Ala Thr Gly Ala Ala Ala Lys Arg Leu
145                 150                 155                 160

Arg Leu Pro Arg Glu Asp Glu Phe Trp Ser Arg Gly Ile Ser Ala Cys
                165                 170                 175

Ala Ile Cys Asp Gly Ala Ser Pro Leu Phe Lys Gly Gln Val Leu Ala
            180                 185                 190

Val Val Gly Gly Gly Asp Thr Ala Thr Glu Glu Ala Ile Tyr Leu Thr
        195                 200                 205

Lys Tyr Ala Arg His Val His Leu Leu Val Arg Lys Asp Gln Leu Arg
    210                 215                 220

Ala Ser Lys Ala Met Gln Asp Arg Val Leu Asn Asn Pro Asn Ile Thr
225                 230                 235                 240

Val His Phe Asn Thr Glu Ala Val Asp Val Val Ser Asn Pro Lys Gly
                245                 250                 255

Gln Met Ser Gly Ile Gln Leu Lys Arg Thr Asp Thr Gly Glu Glu Ser
            260                 265                 270

Val Leu Glu Val Lys Gly Leu Phe Tyr Gly Ile Gly His Thr Pro Asn
        275                 280                 285

Ser Gln Leu Leu Gln Gly Gln Ile Asp Leu Asp Asp Ala Gly Tyr Ile
    290                 295                 300

Leu Val Glu Glu Gly Thr Ala Lys Thr Ser Val Asp Gly Val Phe Ala
305                 310                 315                 320

Ala Gly Asp Val Gln Asp His Glu Trp Arg Gln Ala Val Thr Ala Ala
                325                 330                 335
```

```
Gly Ser Gly Cys Val Ala Ala Leu Ser Val Glu Arg Tyr Leu Val Ala
            340                 345                 350

Asn Asp Leu Leu Val Glu Phe His Gln Pro Val Arg Glu Glu Lys Glu
        355                 360                 365

Lys Glu Ile Thr Asp Arg Asp Val Glu Met Gly Phe Asp Ile Ser His
    370                 375                 380

Thr Lys His Arg Gly Gln Tyr Ala Leu Arg Lys Val Tyr His Glu Ser
385                 390                 395                 400

Pro Arg Leu Val Cys Val Leu Tyr Thr Ser Pro Thr Cys Gly Pro Cys
                405                 410                 415

Arg Thr Leu Lys Pro Ile Leu Ser Lys Val Ile Asp Glu Tyr Asn Glu
            420                 425                 430

His Val His Phe Val Glu Ile Asp Ile Glu Glu Asp Pro Glu Ile Ala
        435                 440                 445

Glu Ala Ala Gly Ile Met Gly Thr Pro Cys Val Gln Phe Phe Lys Asn
    450                 455                 460

Lys Glu Met Leu Arg Thr Val Ser Gly Val Lys Met Lys Lys Glu Tyr
465                 470                 475                 480

Arg Glu Phe Ile Glu Ser Asn Lys
                485
```

<210> 4
<211> 483
<212> PRT
<213> Nostoc sp. 7120

```
<400>    4
Met Phe Ser Cys His Ser Pro Cys Arg Ser Asp Met Leu Cys Tyr Ile
  1               5                  10                  15

Lys Arg Ser Arg Tyr Glu Phe Val Ile Asn Ile Met Ser Asn Pro Thr
             20                  25                  30

Val Glu Asn Leu Val Ile Ile Gly Ser Gly Pro Ala Gly Tyr Thr Ala
```

```
          35                  40                  45

Ala Ile Tyr Ala Ala Arg Ala Asn Leu Lys Pro Val Val Phe Glu Gly
     50                  55                  60

Phe Gln Ala Gly Gly Leu Pro Gly Gly Gln Leu Met Thr Thr Thr Glu
 65                  70                  75                  80

Val Glu Asn Phe Pro Gly Phe Pro Gln Gly Ile Thr Gly Pro Glu Leu
                 85                  90                  95

Met Asp Arg Met Lys Ala Gln Ala Glu Arg Trp Gly Ala Glu Leu Tyr
            100                 105                 110

Thr Glu Asp Val Ile Ser Val Asp Leu Ser Gln Arg Pro Phe Thr Val
        115                 120                 125

Arg Ser Glu Glu Arg Glu Val Lys Ala His Thr Ile Ile Ile Ala Thr
    130                 135                 140

Gly Ala Thr Ala Lys Arg Leu Gly Leu Pro Ser Glu His Glu Phe Trp
145                 150                 155                 160

Ser Arg Gly Ile Ser Ala Cys Ala Ile Cys Asp Gly Ala Thr Pro Ile
                165                 170                 175

Phe His Gly Ala Glu Leu Ala Val Ile Gly Ala Gly Asp Ser Ala Ala
            180                 185                 190

Glu Glu Ser Ile Tyr Leu Thr Lys Tyr Gly Ser Lys Val Asn Leu Leu
        195                 200                 205

Val Arg Ser Glu Lys Met Arg Ala Ser Lys Ala Met Gln Asp Arg Val
    210                 215                 220

Leu Ser Asn Pro Lys Ile Gln Val His Trp Asn Thr Glu Val Val Asp
225                 230                 235                 240

Val Phe Gly Asn Gly His Met Asp Gly Val Lys Val Arg Asn Asn Gln
                245                 250                 255

Thr Gly Glu Glu Thr Asn Val His Ala Lys Gly Leu Phe Tyr Ala Ile
            260                 265                 270
```

```
Gly His Lys Pro Asn Thr Ser Leu Phe Gln Gly Gln Leu Glu Leu Asp
        275                 280                 285

Glu Ile Gly Tyr Val Val Thr Lys His Gly Ser Pro Glu Thr Ser Val
    290                 295                 300

Glu Gly Val Phe Ala Ala Gly Asp Val Gln Asp His Glu Tyr Arg Gln
305                 310                 315                 320

Ala Ile Thr Ala Ala Gly Ser Gly Cys Ala Ala Ala Leu Leu Ala Glu
                325                 330                 335

Arg Trp Leu Ser Ala Asn Ala Leu Ile Gln Glu Phe His Gln Glu Ala
            340                 345                 350

Thr Ile Asn Asn Glu Leu Glu Thr Gln Pro Val Ala Gln Lys Thr Glu
        355                 360                 365

Ala Glu Gln Glu Ala Gly Phe Asp Val Asn Ala Thr Arg His Ala Gly
    370                 375                 380

Gly Tyr Ala Leu Arg Lys Leu Phe His Glu Ser Asp Arg Leu Leu Ile
385                 390                 395                 400

Val Lys Tyr Val Ser Pro Gly Cys Gly Pro Cys His Thr Leu Lys Pro
                405                 410                 415

Ile Leu Asn Lys Val Val Asp Glu Phe Asp Ser Lys Ile His Phe Val
            420                 425                 430

Glu Ile Asp Ile Asp Gln Asp Arg Asp Ile Ala Glu Asn Ala Gly Val
        435                 440                 445

Thr Gly Thr Pro Thr Val Gln Phe Phe Lys Asp Lys Glu Leu Val Lys
    450                 455                 460

Glu Val Lys Gly Val Lys Gln Lys Ser Glu Tyr Arg Leu Leu Ile Glu
465                 470                 475                 480

Gly Asn Leu
```

<210> 5
<211> 456

<212> PRT
<213> Anabaena variabilis

<400> 5

```
Met Ser Asn Pro Thr Val Glu Asn Leu Val Ile Ile Gly Ser Gly Pro
  1               5                  10                  15

Ala Gly Tyr Thr Ala Ala Ile Tyr Ala Ala Arg Ala Asn Leu Lys Pro
             20                  25                  30

Val Val Phe Glu Gly Phe Gln Ala Gly Gly Leu Pro Gly Gly Gln Leu
         35                  40                  45

Met Thr Thr Thr Glu Val Glu Asn Phe Pro Gly Phe Pro Gln Gly Ile
     50                  55                  60

Thr Gly Pro Asp Leu Met Asp Arg Met Lys Ala Gln Ala Glu Arg Trp
 65                  70                  75                  80

Gly Ala Glu Leu Tyr Thr Glu Asp Val Ile Ser Val Asp Leu Ser Gln
                 85                  90                  95

Arg Pro Phe Thr Val Arg Ser Glu Glu Arg Glu Phe Lys Ala His Ser
            100                 105                 110

Ile Ile Ile Ala Thr Gly Ala Thr Ala Lys Arg Leu Gly Leu Pro Ser
        115                 120                 125

Glu His Gln Phe Trp Ser Arg Gly Ile Ser Ala Cys Ala Ile Cys Asp
    130                 135                 140

Gly Ala Thr Pro Ile Phe His Gly Ala Glu Leu Ala Val Ile Gly Ala
145                 150                 155                 160

Gly Asp Ser Ala Ala Glu Glu Ser Ile Tyr Leu Thr Lys Tyr Gly Ser
                165                 170                 175

Lys Val Asn Leu Leu Val Arg Ser Glu Lys Met Arg Ala Ser Lys Ala
            180                 185                 190

Met Gln Asp Arg Val Leu Ser Asn Pro Lys Ile Gln Val His Trp Asn
        195                 200                 205

Thr Glu Val Val Asp Val Phe Gly Asn Gly His Met Asp Gly Val Lys
```

```
    210                 215                 220

Val Arg Asn Asn Lys Thr Gly Glu Glu Thr Thr Val His Ala Arg Gly
225                 230                 235                 240

Leu Phe Tyr Ala Ile Gly His Lys Pro Asn Thr Ser Leu Phe Gln Gly
                245                 250                 255

Gln Leu Glu Leu Asp Glu Ile Gly Tyr Val Val Thr Lys His Gly Ser
            260                 265                 270

Pro Glu Thr Ser Val Glu Gly Val Phe Ala Ala Gly Asp Val Gln Asp
        275                 280                 285

His Glu Tyr Arg Gln Ala Ile Thr Ala Ala Gly Ser Gly Cys Ala Ala
    290                 295                 300

Ala Leu Leu Ala Glu Arg Trp Leu Ser Ala Asn Ala Leu Ile Gln Glu
305                 310                 315                 320

Phe His Gln Glu Pro Thr Ile Asn Asn Glu Leu Glu Thr Gln Pro Val
                325                 330                 335

Ala Gln Lys Thr Glu Ala Glu Gln Glu Ala Gly Phe Ala Leu Ser Ala
            340                 345                 350

Thr Arg His Ala Gly Gly Tyr Ala Leu Arg Lys Leu Phe His Glu Ser
        355                 360                 365

Asp Arg Leu Leu Ile Val Lys Tyr Val Ser Pro Gly Cys Gly Pro Cys
    370                 375                 380

His Thr Leu Lys Pro Ile Leu Asn Lys Val Val Asp Glu Phe Asp Gly
385                 390                 395                 400

Lys Ile His Phe Val Glu Ile Asp Ile Asp Gln Asp Arg Asp Ile Ala
                405                 410                 415

Glu Asn Ala Gly Val Thr Gly Thr Pro Thr Val Gln Phe Phe Lys Asp
            420                 425                 430

Lys Glu Leu Val Lys Glu Val Lys Gly Val Lys Gln Lys Ser Glu Tyr
        435                 440                 445
```

Arg Gln Leu Ile Glu Ala Asn Leu
450 455

<210> 6
<211> 458
<212> PRT
<213> Nostoc punctiforme

<400> 6
Met Val Met Thr Asn Pro Thr Val Glu Asn Leu Val Ile Ile Gly Ser
1 5 10 15

Gly Pro Ala Gly Tyr Thr Ala Ala Ile Tyr Ala Gly Arg Ala Asn Leu
20 25 30

Lys Pro Val Val Phe Glu Gly Phe Gln Ala Gly Gly Leu Pro Gly Gly
35 40 45

Gln Leu Met Thr Thr Thr Glu Val Glu Asn Phe Pro Gly Phe Pro Gln
50 55 60

Gly Ile Thr Gly Pro Glu Leu Met Asp Gln Met Lys Ala Gln Ala Glu
65 70 75 80

Arg Trp Gly Ala Glu Leu Tyr Thr Glu Asp Val Ile Ser Val Asp Leu
85 90 95

Ser Gln Arg Pro Phe Thr Val Arg Ser Gln Glu Arg Glu Ile Lys Thr
100 105 110

Asn Ser Ile Val Ile Ala Thr Gly Ala Thr Ala Lys Arg Leu Gly Leu
115 120 125

Pro Asn Glu His Glu Phe Trp Ser Arg Gly Ile Ser Ala Cys Ala Ile
130 135 140

Cys Asp Gly Ala Thr Pro Ile Phe His Gly Ala Glu Leu Ala Val Ile
145 150 155 160

Gly Ala Gly Asp Ser Ala Ala Glu Glu Ser Ile Tyr Leu Thr Lys Tyr
165 170 175

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

180 185 190

Lys Ala Met Gln Asp Arg Val Leu Ser Asn Pro Lys Ile Gln Val His
195 200 205

Trp Asn Thr Glu Ala Val Asp Ile Tyr Gly Asn Gly His Met Glu Gly
210 215 220

Val Lys Val Arg Asn Thr Lys Thr Gly Glu Glu Ser Lys Leu His Ala
225 230 235 240

Lys Gly Leu Phe Tyr Ala Val Gly His Thr Pro Asn Thr Ser Leu Phe
245 250 255

Lys Gly Gln Leu Glu Leu Asp Glu Val Gly Tyr Val Val Thr Lys Pro
260 265 270

Gly Ser Val Glu Thr Ser Leu Glu Gly Val Phe Ala Ala Gly Asp Val
275 280 285

Gln Asp His Glu Phe Arg Gln Ala Ile Thr Ala Ala Gly Thr Gly Cys
290 295 300

Met Ala Ala Met Leu Ala Glu Arg Trp Leu Ser Ala Ser Gly Leu Ile
305 310 315 320

Gln Glu Phe His Gln Gln Pro Glu Ile Ala Asp Asn Glu Leu Glu His
325 330 335

Gln Pro Ala Lys Lys Thr Glu Ala Glu Glu Glu Ala Gly Phe Asn Leu
340 345 350

Asp Glu Thr Arg His Gln Gly Gly Tyr Ala Leu Arg Lys Leu Phe His
355 360 365

Glu Ser Asp Arg Leu Leu Leu Val Lys Tyr Val Ser Pro Gly Cys Gly
370 375 380

Pro Cys His Thr Leu Lys Pro Ile Leu Asn Lys Val Val Asp Glu Phe
385 390 395 400

Asp Ser Lys Ile His Phe Val Glu Ile Asp Ile Asp Lys Asp Arg Asp
405 410 415

```
Ile Ala Glu Asn Ala Gly Val Thr Gly Thr Pro Thr Val Gln Leu Phe
            420                 425                 430

Lys Asn Lys Glu Leu Val Lys Glu Val Lys Gly Val Lys Gln Lys Thr
        435                 440                 445

Glu Tyr Arg Gln Leu Ile Glu Ser Asn Leu
    450                 455
```

<210> 7
<211> 457
<212> PRT
<213> Synechococcus sp. WH 8102

<400> 7

```
Met Ser Val Asp Ala Ser Gly His Ile Glu Asn Ile Val Ile Leu Gly
  1               5                  10                  15

Ser Gly Pro Ala Gly Tyr Thr Ala Ala Ile Tyr Ala Ala Arg Ala Asn
             20                  25                  30

Leu Gln Pro Leu Leu Ile Thr Gly Phe Gln Arg Gly Gly Ile Pro Gly
         35                  40                  45

Gly Gln Leu Met Thr Thr Thr His Val Glu Asn Phe Pro Gly Phe Pro
     50                  55                  60

Asp Gly Ile Leu Gly Pro Asp Leu Met Asp Leu Met Lys Ala Gln Ala
 65                  70                  75                  80

Val Arg Trp Gly Thr His Leu Ile Glu Ala Asp Ala Asp Arg Ile Asp
                 85                  90                  95

Leu Ser Gln Arg Pro Phe Arg Ile Glu Ala Glu Gly Gln Thr Ile Gln
            100                 105                 110

Ala His Ala Val Val Ile Ala Thr Gly Ala Ser Ala Asn Arg Leu Gly
        115                 120                 125

Leu Pro Ser Glu Asp Arg Tyr Trp Ser Ser Gly Ile Ser Ala Cys Ala
    130                 135                 140

Ile Cys Asp Gly Ala Thr Pro Gln Phe Arg Asn Glu Glu Leu Ala Val
```

```
145                 150                 155                 160

Val Gly Gly Gly Asp Ser Ala Cys Glu Glu Ala Val Tyr Leu Thr Lys
                165                 170                 175

Tyr Gly Ser His Val His Leu Ile Val Arg Ser Asp Gln Phe Arg Ala
            180                 185                 190

Ser Ala Ala Met Ala Asp Arg Val Met Ala Asn Pro Ala Ile Thr Val
        195                 200                 205

His Trp Asn Ser Glu Ile Glu Asp Val Ala Gly Gly Thr Trp Met Glu
    210                 215                 220

Ser Leu Thr Leu Arg Asp Arg Val Thr Ser Glu Thr Arg Ala Leu Ala
225                 230                 235                 240

Val Arg Gly Leu Phe Tyr Ala Ile Gly His Thr Pro Asn Thr Asp Leu
                245                 250                 255

Leu Lys Asp Gln Ile Asp Leu Asp Gly Lys Gly Tyr Leu Leu Thr Ala
            260                 265                 270

Ser Gly Arg Pro Glu Thr Ser Val Asp Gly Val Phe Ser Ala Gly Asp
        275                 280                 285

Val Ala Asp Ala Glu Trp Arg Gln Gly Ile Thr Ala Ala Gly Ser Gly
    290                 295                 300

Cys Lys Ala Ala Leu Ala Ala Glu Arg Trp Leu Thr His His Asn Leu
305                 310                 315                 320

Ala Thr Arg Val Pro Arg Ala Ser Val Asp Pro Ala Lys Ala Glu Gln
                325                 330                 335

Pro Val Asn Val Ala Val Thr Thr Glu Glu Ser Tyr Asp Pro Gln Gly
            340                 345                 350

Leu Trp Gln Lys Gly Ser Phe Ala Leu Arg Lys Leu Tyr His Asp Ser
        355                 360                 365

Asp Lys Pro Leu Leu Val Val Tyr Thr Ser Pro Thr Cys Gly Pro Cys
    370                 375                 380
```

```
His Val Leu Lys Pro Gln Leu Gln Arg Val Ile Asn Glu Leu Asp Gly
385                 390                 395                 400

His Ala Gln Ala Val Val Ile Asp Ile Glu Ala Asp Gln Ala Ile Ala
                405                 410                 415

Glu Gln Ala Gly Val Ser Gly Thr Pro Thr Val Gln Leu Phe His Asn
            420                 425                 430

Lys Glu Met Val Lys Gln Trp Arg Gly Val Lys Pro Arg Ser Glu Phe
        435                 440                 445

Lys Ala Ala Ile Glu Ser Leu Ala Ala
    450                 455
```

<210> 8
<211> 453
<212> PRT
<213> Thermosynechococcus elongates

<400> 8

```
Met Thr Pro Pro Arg Ile Glu Asn Val Val Ile Ile Gly Ser Gly Pro
  1               5                  10                  15

Ala Gly Tyr Thr Ala Ala Ile Tyr Ala Ala Arg Ala Asn Leu Lys Pro
             20                  25                  30

Leu Met Phe Glu Gly Tyr Gln Ile Gly Gly Leu Pro Gly Gly Gln Leu
         35                  40                  45

Met Thr Thr Thr Glu Val Glu Asn Phe Pro Gly Phe Pro Glu Gly Ile
     50                  55                  60

Gln Gly Pro Gln Leu Met Ala Arg Met Lys Ala Gln Ala Glu Arg Trp
 65                  70                  75                  80

Gly Thr Glu Met Val Thr Glu Asp Val Ile Gln Val Asp Phe Ser Gln
                 85                  90                  95

Arg Pro Phe Leu Ile Ser Ser Ala Glu Arg Gln Val Tyr Ala His Ser
            100                 105                 110

Val Ile Ile Cys Thr Gly Ala Thr Ala Lys Arg Leu His Leu Pro Gly
```

```
        115                 120                 125

Glu Glu Gln Tyr Trp Thr Lys Gly Val Ser Ala Cys Ala Ile Cys Asp
    130                 135                 140

Gly Ala Thr Pro Ile Phe Lys Asp Val Glu Leu Ala Val Ile Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Asp Ser Ala Ala Glu Glu Ala Val Tyr Leu Thr Lys Tyr Gly Ser
                165                 170                 175

His Val His Leu Leu Val Arg Ser Asp Lys Met Arg Ala Ser Lys Ala
            180                 185                 190

Met Gln Asp Arg Val Phe Ala Asn Pro Lys Ile Thr Val His Trp Gln
        195                 200                 205

Thr Glu Ala Arg Glu Ile Leu Gly Asp Gly Asn Leu Met Thr Gly Leu
    210                 215                 220

Arg Ile Ile Asn Lys Ala Thr Gly Glu Glu Ser Leu Leu Pro Val Arg
225                 230                 235                 240

Gly Leu Phe Tyr Ala Ile Gly His Thr Pro Asn Thr Gln Leu Phe Lys
                245                 250                 255

Asp Phe Leu Glu Leu Asp Ser Val Gly Tyr Ile Val Thr Arg His Gly
            260                 265                 270

Thr Gln Thr Asn Val Glu Gly Val Phe Ala Ala Gly Asp Val Gln Asp
        275                 280                 285

His Glu Tyr Arg Gln Ala Val Thr Ala Ala Gly Ser Gly Cys Met Ala
    290                 295                 300

Ala Leu Asp Ala Glu Arg Trp Leu Ser Ala Arg Gly Leu Ile Gln Glu
305                 310                 315                 320

Phe His Gln Arg Ala Thr Glu Thr Gln Pro Ala Ala Thr Ala Lys Pro
                325                 330                 335

Thr Ala Ser Pro Gln Gln Glu Phe Asp Pro Asn Ala Ile Lys His Arg
            340                 345                 350
```

```
Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Lys Leu Phe His Glu Ser Asp Arg Leu Leu
        355                 360                 365

Leu Val Lys Tyr Val Ser Pro Thr Cys Gly Pro Cys His Thr Leu Lys
    370                 375                 380

Pro Ile Leu Asp Arg Leu Val Glu Glu Phe Asp Gly Lys Val Gln Leu
385                 390                 395                 400

Ile Glu Ile Asp Ile Thr Glu Asp Ser Ala Ile Ala Glu Gln Ala Gly
                405                 410                 415

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

Glu Val Ile Val Gly Met Lys Pro Lys Ser Gln Tyr Arg Glu Thr Leu
        435                 440                 445

Gln Arg Tyr Leu Ser
    450
```

<210> 9
<211> 458
<212> PRT
<213> Prochlorococcus marinus

<400> 9

```
Met Glu Thr Lys Val Lys Glu Asp Asn Val Glu Asn Leu Val Ile Ile
  1               5                  10                  15

Gly Ser Gly Pro Ala Gly Tyr Thr Ala Ala Ile Tyr Ala Ala Arg Ala
             20                  25                  30

Asn Leu Gln Pro Leu Leu Val Thr Gly Phe Asn Ser Gly Gly Ile Pro
         35                  40                  45

Gly Gly Gln Leu Met Thr Thr Thr Phe Val Glu Asn Tyr Pro Gly Phe
     50                  55                  60

Pro Asp Gly Val Leu Gly Pro Glu Leu Met Asp Leu Met Lys Ala Gln
 65                  70                  75                  80

Ala Glu Arg Trp Gly Thr Asn Leu Tyr Glu Ser Asp Val Ile Ser Ile
```

85 90 95

Asp Thr Ser Lys Ser Pro Phe Glu Leu Lys Thr Leu Glu Gly Ser Ile
100 105 110

Lys Ser Asn Ser Ile Ile Ile Ala Thr Gly Ala Ser Ala Asn Arg Leu
115 120 125

Gly Val Ile Asn Glu Asp Lys Phe Trp Ser Lys Gly Ile Ser Ala Cys
130 135 140

Ala Ile Cys Asp Gly Ala Thr Pro Gln Phe Arg Asn Glu Glu Leu Ala
145 150 155 160

Val Ile Gly Gly Gly Asp Ser Ala Cys Glu Glu Ala Ala Tyr Leu Thr
165 170 175

Lys Tyr Gly Ser Lys Val His Leu Leu Val Arg Ser Glu Lys Leu Arg
180 185 190

Ala Ser Ala Ala Met Ile Asp Arg Val Lys Ala Asn Ser Lys Ile Glu
195 200 205

Ile His Trp Asn Thr Lys Val Glu Lys Ala Asn Gly Thr Asp Trp Leu
210 215 220

Glu Asn Val Glu Thr Ile Asn Ser His Lys Gly Asn Val Glu Ile Lys
225 230 235 240

Val Lys Gly Leu Phe Tyr Ala Ile Gly His Thr Pro Asn Thr Lys Phe
245 250 255

Leu Asn Asn Lys Ile Glu Leu Asp Lys Lys Gly Tyr Ile Ala Cys Asn
260 265 270

Ser Gly Arg Pro Glu Thr Ser Ile Glu Gly Ile Phe Ala Ala Gly Asp
275 280 285

Val Val Asp Ser Glu Trp Arg Gln Gly Val Thr Ala Ala Gly Thr Gly
290 295 300

Cys Met Ala Ala Leu Ala Ala Glu Arg Trp Leu Ala Glu Lys Asn Leu
305 310 315 320

Ser Lys Ile Ile Val Arg Glu Thr Ser Glu Pro Glu Lys Thr Leu Ser
325 330 335

Ser Ser Ser Phe Asn Glu Glu Val Thr Asn Glu Asp Thr Phe Asn Leu
340 345 350

Asn Ser Glu Trp Gln Lys Gly Ser Tyr Ala Leu Arg Lys Leu Tyr His
355 360 365

Glu Ser Asn Lys Pro Ile Leu Val Ile Phe Ser Ser Pro Ser Cys Gly
370 375 380

Pro Cys His Val Leu Lys Pro Gln Leu Lys Arg Val Ile Lys Glu Phe
385 390 395 400

Asp Gly Ala Val Gln Gly Ile Glu Ile Asp Ile Asp Lys Asp Gln Glu
405 410 415

Ile Ala Lys Gln Ala Gly Ile Asn Gly Thr Pro Thr Ile Gln Leu Phe
420 425 430

Lys Asp Lys Leu Leu Lys Lys Gln Trp Gln Gly Val Lys Gln Arg Ser
435 440 445

Glu Phe Lys Glu Ala Ile Gln Asn Ile Ile
450 455

<210> 10
<211> 458
<212> PRT
<213> Mycobacterium leprae

<400> 10
Met Asn Thr Thr Pro Ser Ala His Glu Thr Ile His Glu Val Ile Val
1 5 10 15

Ile Gly Ser Gly Pro Ala Gly Tyr Thr Ala Ala Leu Tyr Ala Ala Arg
20 25 30

Ala Gln Leu Thr Pro Leu Val Phe Glu Gly Thr Ser Phe Gly Gly Ala
35 40 45

Leu Met Thr Thr Thr Glu Val Glu Asn Tyr Pro Gly Phe Arg Asn Gly

```
     50                  55                  60

Ile Thr Gly Pro Glu Leu Met Asp Asp Met Arg Glu Gln Ala Leu Arg
 65                  70                  75                  80

Phe Gly Ala Glu Leu Arg Thr Glu Asp Val Glu Ser Val Ser Leu Arg
                 85                  90                  95

Gly Pro Ile Lys Ser Val Val Thr Ala Glu Gly Gln Thr Tyr Gln Ala
            100                 105                 110

Arg Ala Val Ile Leu Ala Met Gly Thr Ser Val Arg Tyr Leu Gln Ile
        115                 120                 125

Pro Gly Glu Gln Glu Leu Leu Gly Arg Gly Val Ser Ala Cys Ala Thr
    130                 135                 140

Cys Asp Gly Ser Phe Phe Arg Gly Gln Asp Ile Ala Val Ile Gly Gly
145                 150                 155                 160

Gly Asp Ser Ala Met Glu Glu Ala Leu Phe Leu Thr Arg Phe Ala Arg
                165                 170                 175

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

Met Leu Gly Arg Ala Arg Asn Asn Asp Lys Ile Lys Phe Ile Thr Asn
        195                 200                 205

His Thr Val Val Ala Val Asn Gly Tyr Thr Thr Val Thr Gly Leu Arg
    210                 215                 220

Leu Arg Asn Thr Thr Thr Gly Glu Glu Thr Thr Leu Val Val Thr Gly
225                 230                 235                 240

Val Phe Val Ala Ile Gly His Glu Pro Arg Ser Ser Leu Val Ser Asp
                245                 250                 255

Val Val Asp Ile Asp Pro Asp Gly Tyr Val Leu Val Lys Gly Arg Thr
            260                 265                 270

Thr Ser Thr Ser Met Asp Gly Val Phe Ala Ala Gly Asp Leu Val Asp
        275                 280                 285
```

```
Arg Thr Tyr Arg Gln Ala Ile Thr Ala Ala Gly Ser Gly Cys Ala Ala
    290                 295                 300

Ala Ile Asp Ala Glu Arg Trp Leu Ala Glu His Ala Gly Ser Lys Ala
305                 310                 315                 320

Asn Glu Thr Thr Glu Glu Thr Gly Asp Val Asp Ser Thr Asp Thr Thr
                325                 330                 335

Asp Trp Ser Thr Ala Met Thr Asp Ala Lys Asn Ala Gly Val Thr Ile
            340                 345                 350

Glu Val Thr Asp Ala Ser Phe Phe Ala Asp Val Leu Ser Ser Asn Lys
        355                 360                 365

Pro Val Leu Val Asp Phe Trp Ala Thr Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met
    370                 375                 380

Val Ala Pro Val Leu Glu Glu Ile Ala Ser Glu Gln Arg Asn Gln Leu
385                 390                 395                 400

Thr Val Ala Lys Leu Asp Val Asp Thr Asn Pro Glu Met Ala Arg Glu
                405                 410                 415

Phe Gln Val Val Ser Ile Pro Thr Met Ile Leu Phe Gln Gly Gly Gln
            420                 425                 430

Pro Val Lys Arg Ile Val Gly Ala Lys Gly Lys Ala Ala Leu Leu Arg
        435                 440                 445

Asp Leu Ser Asp Val Val Pro Asn Leu Asn
    450                 455
```