



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0105052
(43) 공개일자 2023년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 6/20 (2018.01) A01H 1/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01H 6/20 (2022.05)
A01H 1/122 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2022-0000159
(22) 출원일자 2022년01월03일
심사청구일자 2022년01월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
이호정
서울특별시 관악구 관악로 125 (봉천동, 서울대입
구삼성아파트)
이석진
서울특별시 송파구 위례성대로 176 (오금동, 대림
아파트)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

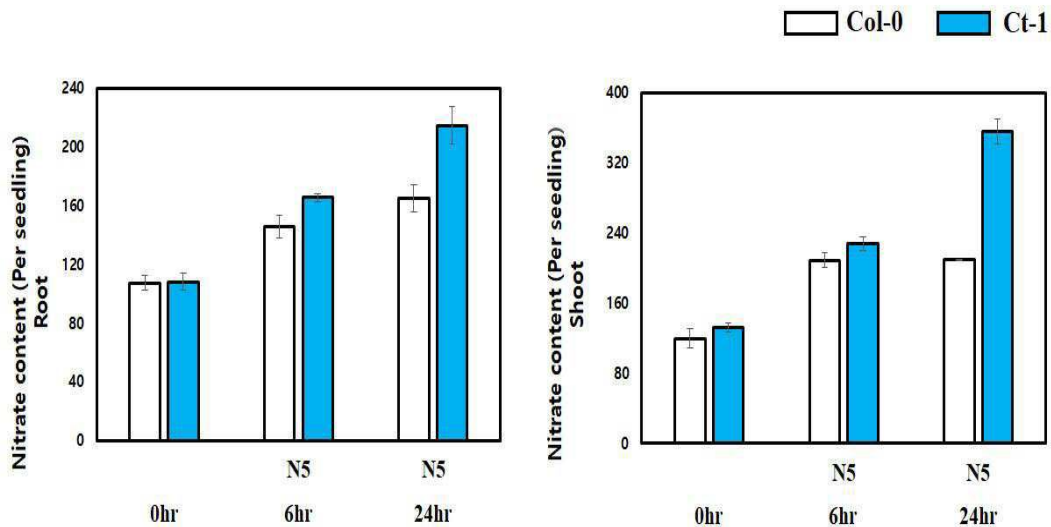
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 저질소 환경에서 질소이용능력, 식물생장 및 스트레스 저항력이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 저질소 환경에서 질소이용능력, 식물생장 및 스트레스 저항력이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 서열번호 3의 염기서열이 도입된 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법 및 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 식물의 생육 또는 성장을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C07K 14/415 (2013.01)

C12N 15/8271 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3의 염기서열이 도입된, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 질소 이용 능력 증진은 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 식물의 생육 또는 성장을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 질소 이용 능력 증진은 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 질산염의 흡수, 식물체 내로의 이동 및 축적을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 형질전환 식물체는 환경 스트레스에 대해 저항력을 갖는 것을 특징으로 하는, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;인 것을 특징으로 하는, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체.

청구항 6

서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;인 것을 특징으로 하는, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 8

서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 식물의 생육 또는 성장을 증진시키는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;인 것을 특징으로 하는, 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 식물의 생육 또는 성장을 증진시키는 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 저질소 환경에서도 질소이용능력, 식물생장 및 스트레스 저항력이 증진된 형질전환 식물체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 질산염(nitrate)은 식물의 주된 질소원으로서 뿌리를 통해서 흡수된 후 질산환원효소(nitrate reductase)의 활성화에 의해서 아질산염(nitrite)으로 환원되고, 연속적으로 아질산환원효소(nitrite reductase)의 활성화에 의해 암모늄으로 환원되어 핵산과 단백질을 포함한 식물생장에 필요한 다양한 대사물질로 동화된다.

[0003] 따라서 매년 약 10억 톤 가량의 질소비료가 작물재배에 투입되고 있으나, 비료 성분 중 질소가 가장 비싼 영양 성분이기 때문에 투입되는 비료의 양은 곧 농업 생산 비용을 증가시키는 원인이 된다. 뿐만 아니라 비료의 과다 사용으로 인해 미처 흡수되지 못한 비료는 유실되어 흙이나 강물의 오염원이 되고, 과도하게 사용될 경우 불완전 환원으로 지구 온난화의 원인이 되는 일산화질소(NO)를 생산한다. 농업환경의 오염은 농산물 생산에 있어서 양적 및 질적 저하를 가져올 뿐만 아니라, 생활환경도 오염시켜 국민 건강을 위협하므로 그 오염원의 제거는 매우 중요한 문제이다. 이러한 문제는 투입되는 비료의 양을 줄임으로써 해결할 수 있는데, 이러한 문제의 근본적인 해결 방안은 식물의 질소 흡수력을 향상시킴으로써 비료의 사용량을 줄이는 것이다.

[0004] 그러므로 질소 결핍 조건에서도 효율적으로 생장이 가능한 새로운 작물의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌**특허문헌**

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2016-0025822

발명의 내용**해결하려는 과제**

[0006] 이에 본 발명자들은 애기장대로부터 분리한 서열번호 1의 염기서열을 도입한 형질전환 식물체가 질소 결핍 조건에서도 질소 이용능력이 우수하고 동시에 식물의 생장과 스트레스에 대한 저항성이 증진된다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 서열번호 3의 염기서열이 도입된, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체를 제공하

는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 식물의 생육 또는 성장을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 그러므로 본 발명은 서열번호 3의 염기서열이 도입된, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 질소 이용 능력 증진은 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 식물의 생육 또는 성장을 증진시킬 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 질소 이용 능력 증진은 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 질산염의 흡수, 식물체 내로의 이동 및 축적을 증진시킬 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 환경 스트레스에 대해 저항력을 갖는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;일 수 있다.

[0015] 또한 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;일 수 있다.

[0017] 또한 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 식물의 생육 또는 성장을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;일 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 Ct-1 애기장대 유래의 서열번호 3으로 이루어진 NRT1.1 유전자가 도입되어 과발현된 형질전환 식물체는 저질소 조건 하에서 질산염의 식물체 내로의 흡수, 이동 및 축적을 증진시켜 식물의 생장 또는 성장을 증진시킬 수 있고, 환경 스트레스에 대한 저항력을 향상시킬 수 있어, 농작물 등 다양한 식물 또는 작물에 적용할 경우 생산량 증대 효과를 도출할 수 있으며 동시에 적은 질소 시비 조건 하에서도 우수한 생장력을 나타냄에 따라 질소 비료의 사용 감축에 따른 환경오염 저감 효과도 도출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 발명의 일실시예에서 Ct-1 애기장대 유래의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 식물체의 제조를 위한 Ct-1 유래 NRT1.1 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터에 대한 개열지도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 Ct-1 애기장대 및 Col-0 애기장대로부터 분리된 각각의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에 대해, 서로 다른 질소 환경 하에서 각 식물체의 생장 정도를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 3은 Ct-1 애기장대 및 Col-0 애기장대로부터 분리된 각각의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에 대해, 뿌리틸의 생장을 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.
- 도 4는 Ct-1 애기장대 및 Col-0 애기장대로부터 분리된 각각의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에 대해 정상 환경(N5) 및 스트레스 환경(NO.025) 하에서 식물체의 생장 및 무게 측정 결과와(A, C), 안토시아닌의 발현정도를 측정한 결과를 나타낸 것이다(B, D).
- 도 5는 Ct-1 애기장대 및 Col-0 애기장대로부터 분리된 각각의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에 대해, ¹⁵N을 이용하여 각 식물체의 질산염 뿌리 축적 정도를 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 Ct-1 애기장대 및 Col-0 애기장대로부터 분리된 각각의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에 대해, 지상부(shoot) 및 지하부(root)에서의 질산염 함량을 비교 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 저질소 환경에서 질소이용능력, 식물생장 및 스트레스 저항력이 증진된 형질전환 식물체를 제공함에 특징이 있다.
- [0022] 본 발명자들은 질소 이용 능력이 증진된 새로운 형질전환 식물체를 연구하던 중, Ct-1의 애기장대로부터 분리된 NRT1.1 유전자가 식물체의 질소이용능력을 향상시킬 수 있고, 식물생장 및 성장을 촉진시킬 수 있으며, 스트레스 저항력을 증진시킬 수 있는 기능을 한다는 것을 최초로 규명하였다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에서는, 서로 다른 애기장대인 Col-0 및 Ct-1로부터 질산염 수송체인 NRT1.1 유전자를 분리하였고, 각각의 cDNA를 합성한 후, 이들의 염기서열을 분석하였는데, Col-0 및 Ct-1 유래의 NRT1.1 유전자가 서로 상이한 부분이 있음을 확인하였다. 특히 Ct-1 유래의 NRT1.1 유전자는 214번째 아미노산이 알라닌으로 치환되어 있는 것을 확인하였다. 즉 Col-0 유래의 NRT1.1 유전자는 214번째 아미노산이 아스파르트산 (Aspartic acid)인 반면, Ct-1 유래의 NRT1.1 유전자는 214번째 아미노산이 알라닌(Alanine)으로 치환되어 있는 것으로 나타났다.
- [0024] 이에 본 발명자들은 214번째 아미노산이 서로 다른 애기장대 유래의 NRT1.1 유전자에 대한 기능을 확인하기 위해, 각 애기장대 유래의 NRT1.1 유전자를 도입하여 과발현시킨 형질전환 애기장대를 제조하였고, 각 형질전환체에 대해 식물의 생장 정도, 스트레스 저항력 및 질산염 축적 정도를 비교 분석하였다.
- [0025] 그 결과, 특이하게도 Ct-1 유래의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대는 Col-0 유래의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에 비해 식물의 생장 및 성장이 더 높은 것으로 나타났고, 특히 저질소 환경 하에서, 식물의 생장 및 성장을 더 효과적으로 증진시킬 수 있는 것으로 나타났다.
- [0026] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에서는 환경 스트레스 조건을 유발시키고(저질소 환경 유발), 식물이 스트레스 환경에 놓이게 될 때 생성하는 안토시아닌 물질의 수준을 측정하였는데, Ct-1 유래의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대가 Col-0 유래 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에 비해 안토시아닌 물질의 생성 수준이 더 낮은 것으로 나타났다.
- [0027] 이는 Ct-1 유래의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대가 환경 스트레스에 대해 저항력이 높아 스트레스 지표 물질인 안토시아닌의 생성이 적다는 것을 의미한다.
- [0028] 뿐만 아니라 본 발명의 Ct-1 유래의 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에서는 Col-0 유래 NRT1.1 유전자가 도입된 형질전환 애기장대에 비해 질산염의 축적 및 이동도 더 우수한 것으로 나타났다.
- [0029] 그러므로 본 발명은 Ct-1 애기장대로부터 분리하여 합성한 NRT1.1 유전자가 식물체에서 질소 이용 능력의 향상, 식물생장 촉진 및 스트레스 저항력 증진 기능을 유도할 수 있음을 규명하였다.

- [0030] 본 발명에서 상기 Ct-1 애기장대로부터 분리하여 합성한 NRT1.1의 cDNA 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있고, Ct-1 애기장대로부터 분리 NRT1.1 단백질 서열은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0031] 그러므로 본 발명은 서열번호 3의 염기서열이 도입된, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체를 제공할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 질소 이용 능력 증진은 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 식물의 생육 또는 성장을 증진시키는 것일 수 있다.
- [0033] 또한 본 발명에서 상기 질소 이용 능력 증진은 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 질산염의 흡수, 식물체 내로의 이동 및 축적을 증진시키는 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 상기 형질전환 식물체는 환경 스트레스에 대해 저항력을 갖는 특징이 있으며, 상기 환경 스트레스는 저질소 환경일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 상기 식물체로는 이에 제한되지는 않으나, 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;를 포함할 수 있다.
- [0036] 또한 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 형질전환 식물체는 타겟 유전자의 식물체 내로의 도입을 통해 제조될 수 있는데, 타겟 유전자를 포함하는 벡터를 사용하여 이루어질 수 있으며, 본 발명의 벡터를 식물 숙주세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 유전자총-매개 형질전환 방법 (bombardment), 아그로박테리움-매개 형질전환법, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리조솜-매개 형질감염법 및 DEAE-텍스트란 처리법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 벡터는 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 유전자 서열을 포함하는 재조합 벡터를 이용할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 캡티드, 이중의 캡티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0040] 본 발명에서, 상기 Ct-1 애기장대 유래의 NRT1.1 유전자, 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 NRT1.1 유전자 서열이 재조합 벡터 내로 삽입될 수 있는데, 여기서 상기 "재조합 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소 (translation control element)를 가지는 것이다.
- [0041] 또한 상기 재조합 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 본 발명의 방법으로 제조된 질소 이용 능력이 증진된 형질전환 식물체는 식물체 자체 또는 식물체의 종자를 모두 포함할 수 있다.
- [0043] 나아가 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 질소 결핍 또는 저질소 조건 하에서 식물의 생육 또는 성장을 증진시키는 방법을 제공할 수 있다.

[0044] 본 발명의 일실시예에 의하면, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 형질전환체를 대상으로 질소가 풍부한 조건 및 질소결핍 조건 하에서의 생육 정도를 관찰하였다.

[0045] 그 결과, 본 발명의 형질전환체는 질소가 풍부한 조건에서 정상적인 생육이 진행되는 것으로 나타났고, 특히 질소결핍 조건 하에서는 본 발명의 형질전환체가 Col-1 애기장대 유래의 NRT1.1 유전자를 도입한 형질전환체에 비해 식물의 생육이 더 우수한 것으로 나타났다.

[0047] 이상의 결과를 통해, 본 발명자들은 Ct-1 애기장대 유래의 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 NRT1.1 유전자를 도입하여 과발현시킨 형질전환 식물체는 질소결핍 또는 저질소 조건 하에서도 질소 이용 능력을 증진시켜 식물의 생장을 촉진시킬 수 있을 뿐만 아니라 환경 스트레스에 대한 식물의 저항력을 증진시킬 수 있고 질소이용 능력도 향상시킬 수 있는 특징을 갖는다. 따라서 Ct-1 애기장대 유래의 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 NRT1.1 유전자를 식물 또는 작물에 응용할 경우, 식물 또는 작물의 전체적인 생육과 생장 증진효과를 유도할 수 있고 동시에 질소 비료의 과도한 사용으로 인해 문제가 되었던 환경오염도 저감화시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0048]

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] <실시예 1>

[0052] 애기장대로부터 NRT 1.1 유전자의 분리 및 서열확인

[0053] 식물체로는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)를 사용하였으며, Col-0 및 Ct-1의 2종류의 애기장대 식물로부터 질산염 수송체 유전자인 NRT 1.1을 분리하여 cDNA를 합성하였다. 구체적으로 발아 후 2주일된 Col-0 및 Ct-1 애기장대 성체로부터 100mg씩 샘플을 채취하여 TRIzol 시약으로 각 식물체로부터 mRNA를 추출하였다. 이후 추출된 mRNA를 주형으로 하고 cDNA합성 키트(RevertAid First Strand cDNA Synthetic Kit (H1622; Thermo Fisher Scientific))를 사용하여 cDNA를 합성하였으며, 이때 하기 프라이머 서열을 사용하여 Col-0 및 Ct-1의 NRT1.1 cDNA를 확보하였다.

[0054] NRT1.1 F 프라이머 서열(서열번호 1):

[0055] 5' ATGTCCTCTCTGAACTAAATCTG 3'

[0056] NRT1.1 R 프라이머 서열(서열번호 2):

[0057] 5' ATGACCCATTGGAATACTCGG 3'

[0058] 이후 확보된 Col-0 및 Ct-1의 NRT1.1 cDNA에 대한 염기서열 분석을 수행하였다.

[0060] 그 결과, Col-0 및 Ct-1의 NRT1.1 cDNA의 염기서열이 서로 상이한 부분이 있는 것을 확인할 수 있었고, 특히 Ct-1의 NRT1.1 아미노산 서열은 214번째 아미노산이 알라닌(Alanine)으로 치환되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 즉, Col-0의 NRT1.1 은 214번째 아미노산 서열이 아스파르트산(Aspartic acid)인 반면, Ct-1의 NRT1.1 은 214번째 아미노산 서열이 알라닌(Alanine)인 것으로 확인되었다.

[0061] 본 발명에서 합성한 상기 Ct-1의 NRT1.1 cDNA 염기서열은 서열번호 3으로 나타내었고, 아미노산 서열은 서열번호 4로 나타내었다.

[0063] <실시예 2>

[0064] 형질전환 식물체의 제조

[0065] 상기 실시예 1에서 합성한 애기장대 Col-0 및 Ct-1로부터 분리한 NRT1.1 유전자가 각각 도입된 형질전환 식물체를 제조하였다. 이를 위해 상기에서 합성한 NRT1.1 유전자를 topo 벡터(pCR®8/GW/TOPO : invitrogen)에 각각 삽입하고 이를 다시 유전자 과발현 기능을 가지는 pMDC32 벡터에 LR 반응시켰다(LR Clonase® : invitrogen).

이후 대장균 세포주(TOP10 cell : invitrogen)에 heat-shock 방법으로 형질전환시킨 후, 콜로니가 생성될 때까지 배양하였다. 이후 생성된 콜로니를 다시 LB 배지에서 배양 후 플라스미드 벡터를 추출하였다. 그런 다음, NRT1.1(Col-0) 유전자 및 NRT1.1(Ct-1) 유전자가 삽입된 pMDC32 벡터를 아그로박테리아에 전기적 충격방법으로 형질전환한 후 배양하였고, 형질전환된 아그로박테리아를 화침방법(floral dipping transformation)을 통해 준비된 NRT1.1 유전자 기능이 없는 nrt1.1ko 애기장대에 형질전환하였다. 이후 형질전환된 각각의 식물로부터 씨를 수확하고 3세대까지 자가수분하여 동종라인을 확보하였고, RT-PCR을 이용하여 형질전환된 식물체에서 NRT1.1(Col-0) 및 NRT1.1(Ct-1) 유전자의 각 과발현을 확인하여, 형질전환된 식물체를 확인하였다.

[0067] <실시예 3>

[0068] 형질전환 식물체의 질소환경에 따른 뿌리털 성장 분석

[0069] 상기 실시예 2에서 제조한 NRT1.1(Col-0) 및 NRT1.1(Ct-1) 유전자가 각각 과발현된 형질전환 애기장대 식물체를 대상으로, 4%이상의 차아염소산나트륨으로 상기 식물체의 종자들을 소독한 후, 3일 동안 침윤과정을 거치고, 1/2 MS (Murashige & Skoog medium including vitamins cat, M0222.0050) 아가로즈 배지에 심은 다음, 4일 동안 배양하였다. 그리고 Murashige & Skoog Modified Basal Salt Mixture(No Nitrogen, Phosphate, or Potassium) 아가로즈 배지에 옮겨서 2일 동안 배양하였다. 이후 이들을 각각 다른 질소 환경(KNO_3 5 mM, KNO_3 0.5 mM+ K_2SO_4 0.25 mM, KNO_3 0.05 mM+ K_2SO_4 0.25 mM, KNO_3 0.025 mM+ K_2SO_4 0.25 mM)하에서 현미경 해부현미경 LEICA EZ4D를 사용하여 뿌리털을 관찰하였다. 또한, 광학현미경 optinity HD camera KCX-20을 사용하여 뿌리끝과 뿌리중간 부분을 100배 확대하여 관찰하였다.

[0071] 그 결과, 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이, Col-0의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체에 비해 Ct-1의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체가 저질소 환경에서 뿌리털의 길이가 더 긴 것을 확인할 수 있었고, 뿌리털의 개수도 월등히 많은 것을 확인할 수 있었다.

[0072] 이를 통해 본 발명자들은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 Ct-1의 NRT1.1 유전자가 저질소 환경에서 식물체의 뿌리털 성장능을 촉진시키는 활성이 있음을 알 수 있었다.

[0074] <실시예 4>

[0075] 형질전환 식물체의 환경스트레스 저항력 분석

[0076] 상기 실시예 2에서 제조한 NRT1.1(Col-0) 및 NRT1.1(Ct-1) 유전자가 각각 과발현된 형질전환 애기장대 식물체를 대상으로, 환경스트레스 저항력 분석을 수행하였다. 이를 위해 질소 환경에 정상적인 조건(N5)과 저질소 환경으로 환경스트레스를 유발시킨 조건(N0.025)에서 각 식물체를 배양하였고, 각 식물체의 무게 분석 및 안토시아닌 분석을 수행하였다.

[0077] 먼저 무게분석은 4%이상의 차아염소산나트륨으로 상기 식물체의 종자들을 소독한 후에 3일 동안 침윤과정을 거쳤고, 이후 1/2 MS (Murashige & Skoog medium including vitamins cat, M0222.0050) 아가로즈 배지에 심고 4일 동안 배양하였다. 그리고 Murashige & Skoog Modified Basal Salt Mixture (No Nitrogen, Phosphate, or Potassium) 아가로즈 배지에 옮겨서 2일 동안 배양하였다. 이후 이들을 각각 다른 질소 환경 (KNO_3 5 mM, KNO_3 0.025 mM+ K_2SO_4 0.25 mM)에 놓이게 한 후, 50 개체를 모아 무게를 측정하였다.

[0079] 그 결과, 도 4C에 나타낸 바와 같이, Col-0의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체에 비해 Ct-1의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체가 색물의 생장이 우수하여 전반적으로 무게가 더 많이 나가는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 또한 본 발명자들은 식물의 스트레스 저항성 확인을 위해 안토시아닌 수준을 분석하였는데, 안토시아닌은 식물이 스트레스가 많은 환경에 놓이게 되면 스트레스에 저항하기 위해 분비되는 식물체에 축적되는 물질로 알려져 있다. 따라서 안토시아닌의 수준 여부를 통해 식물체의 스트레스 여부를 확인할 수 있다.

[0082] 이에 본 발명자들은 상기 실시예 2에서 제조한 각 형질전환 식물체 100 mg을 사용하여 각 샘플에 대해 400 μ l의 MeOH(1 % v / v HCl)를 첨가하고 호일로 감싼 후, 4 ° C에서 밤새도록 배양하였다. 이후 증류수 400 μ l와 클로로포름 400 μ l를 첨가하고 2분간 848 x g로 볼텍싱 후, 원심분리하였다. 그런 뒤, 추출된 안토시아닌 수준을 A535와 A650에서 Multi-Detection Microplate Reader를 사용하여 측정하였다.

[0084] 그 결과, 도 4B 및 4D에 나타난 바와 같이, Col-0의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체에 비해 Ct-1의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체에서 안토시아닌의 수준이 적은 것을 확인할 수 있었다.

[0085] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 서열번호 3으로 이루어진 애기장대 Ct-1 유래 NRT1.1 유전자가 식물체의 환경스트레스를 저감시키는 활성도 가지고 있음을 알 수 있었다.

[0086]

[0087] <실시예 5>

[0088] 형질전환 식물체의 질소 이용 능력 향상능 분석

[0090] <5-1> 질산염 흡수능 분석

[0091] 상기 실시예 2에서 제조한 NRT1.1(Col-0) 및 NRT1.1(Ct-1) 유전자가 각각 과발현된 형질전환 애기장대 식물체를 대상으로 질산염 흡수량 분석을 통해 질소이용 능력 여부를 분석하였다. 이를 위해 자연에 99.636% 존재하는 14 N가 아닌 0.364% 차지하는 중질소 15 N를 이용하여 분석하였다. 먼저 뿌리털을 관찰했던 조건과 동일하게 4%이상의 차아염소산나트륨으로 각 형질전환 식물체의 종자들을 소독한 후에 3일 동안 침윤과정을 거치고, 1/2 MS (Murashige & Skoog medium including vitamins cat, M0222.0050) 아가로즈 배지에 심고 4일 동안 배양하였다. 이후 Murashige & Skoog Modified Basal Salt Mixture (No Nitrogen, Phosphate, or Potassium) 아가로즈 배지에 옮겨서 2일 동안 배양하였다. 그런 뒤 $K^{15}NO_3$ 5mM, $K^{15}NO_3$ 0.5mM 및 K_2SO_4 0.25mM가 포함된 액체 Murashige & Skoog Modified Basal Salt Mixture (No Nitrogen, Phosphate, or Potassium) 배지에서 6시간 동안 배양 후, 뿌리만 채취하여 액체질소에 넣어서 동결 시켰다. 이후, 고운 가루로 갈아서 80 °C에서 밤새도록 모든 수분을 제거하고, 서울대 농업생명과학대학 농생명과학공동기기원(NICEM)에 있는 안정성 동위원소비 질량분석기(Stable Isotope Ratio Mass Spectrometer System with Elemental Analyzer) (Vision-EA)를 사용하여 외부에서 주입한 15 N의 추적 정도를 분석하였다.

[0093] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 저질소 환경(N0.5)에서 질산염의 흡수량은 Col-0의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체에 비해 Ct-1의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체에서 더 높게 나타났다.

[0094] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 Ct-1의 NRT1.1 유전자는 정상 환경에 비해 스트레스 환경 하에서 식물의 질산염 흡수능을 촉진시켜 식물체 내에 질산염을 이송할 수 있도록 작용한다는 것을 알 수 있었다.

[0096] <5-2> 형질전환 식물체의 지상부 및 지하부에서의 질산염 함량 분석

[0097] 상기 <5-1>에서 사용한 형질전환 식물체에 대해 식물체 내에 함유된 질산염의 함량을 살리실산 분석을 통해 정량화하였다. 이를 위해 4%이상의 차아염소산나트륨으로 형질전환 식물체들의 종자를 소독한 후, 3일 동안 침윤과정을 거친 다음 1/2 MS(Murashige & Skoog medium including vitamins cat, M0222.0050) 아가로즈 배지에 심고 4일 동안 배양하였다. 이후 Murashige & Skoog Modified Basal Salt Mixture (No Nitrogen, Phosphate, or Potassium) 아가로즈 배지에 옮겨서 2일동안 배양하였다. 그런 뒤, 이들을 각각 질소 환경(KNO_3 5mM)에 놓이게 한 다음, 각 식물체 100 mg을 증류수 1 mL에서 100 ° C에서 20 분 동안 가열하였다. 가열한 시료를 15,871 g에서 10 분 동안 원심분리하고 0.1 mL의 상등액을 새로운 15 mL 튜브로 옮겼다. 분석을 위해 0.4 mL의 살리실산-황산 용액(황산 100 mL에 살리실산 5 g)을 실온에서 20분 동안 상기 튜브에 첨가하였고 상온에서 5분 동안 8 % NaOH의 8.5 ml 용액을 첨가하고 OD₄₁₀에서 Multi-Detection Microplate Reader 사용하여 흡수량을 측정하였다.

[0099] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 식물체의 지상부(shoot) 및 지하부(root) 모두 Col-0의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체에 비해 Ct-1의 NRT1.1이 과발현된 형질전환 식물체에서 질산염의 함량이 더 높은 것으로 나타났다.

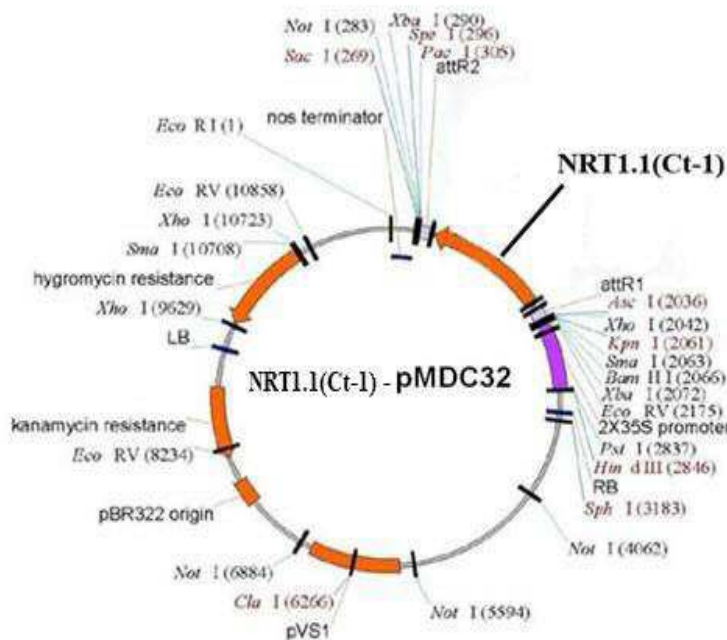
[0100] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 Ct-1의 NRT1.1 유전자가 식물 체 내에서 질산염의 이동, 흡수 및 축적을 향상시키는 활성이 있음을 알 수 있었다.

[0102] 이상의 결과를 통해, 본 발명자들은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 Ct-1의 NRT1.1 유전자가 과발현된 형질전환 식물체는 질소결핍 또는 저질소 조건 하에서도 질소 이용 능력이 향상되어 식물의 성장 촉진 효과를 나타낼 뿐만 아니라 환경스트레스에 대한 식물의 저항력을 증진시킬 수 있고 질소이용능력을 향상시킬 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 Ct-1 애기장대 유래의 NRT1.1 유전자를 이용할 경우, 식물 또는 작물의 전체적인 생육과 성장 증진을 유도할 수 있고 질소 비료의 과도한 사용으로 인해 문제가 되었던 환경오염도 저감화시킬 수 있다.

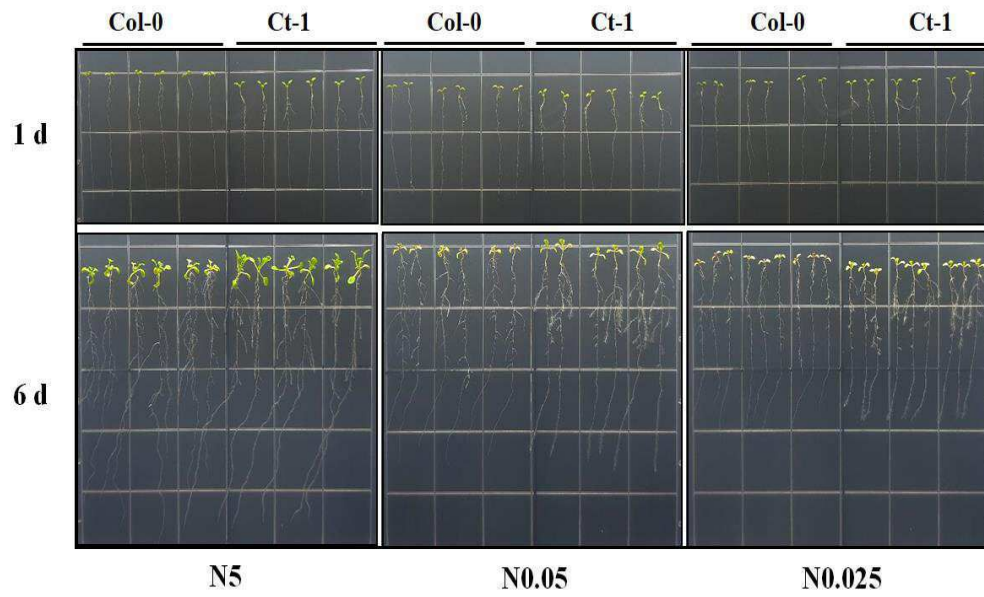
[0104] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

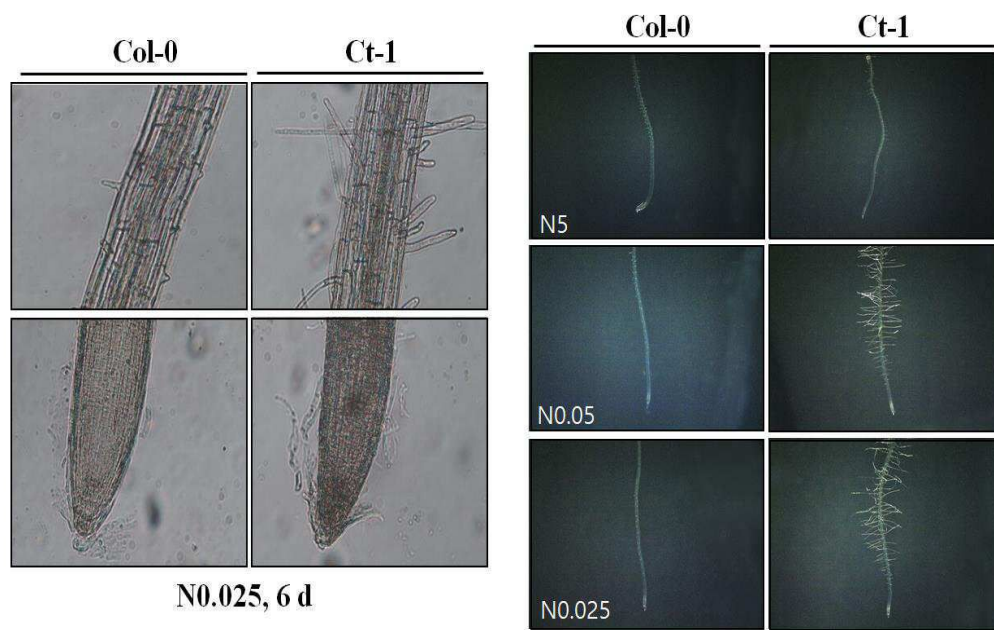
도면1



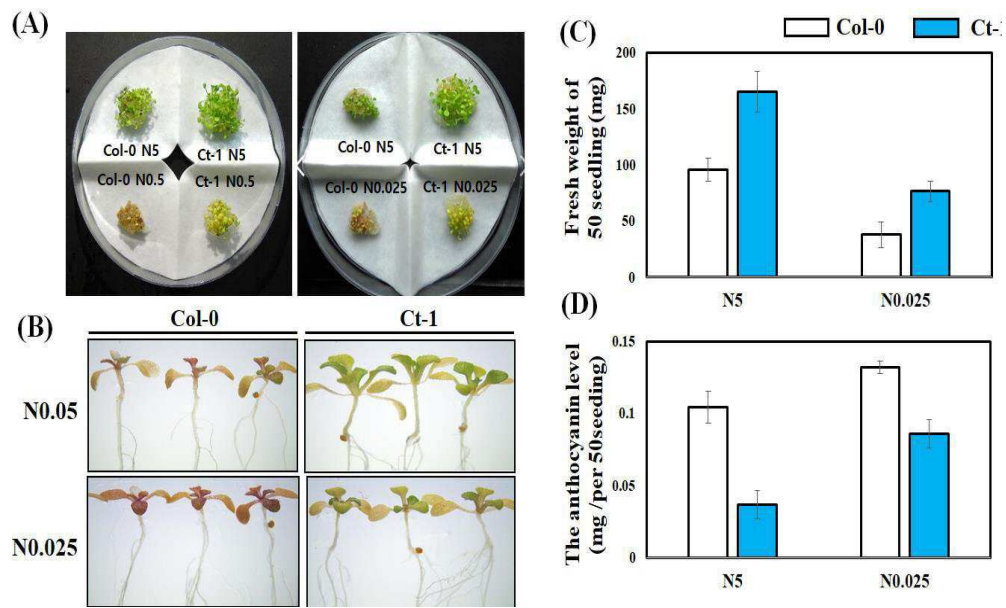
도면2



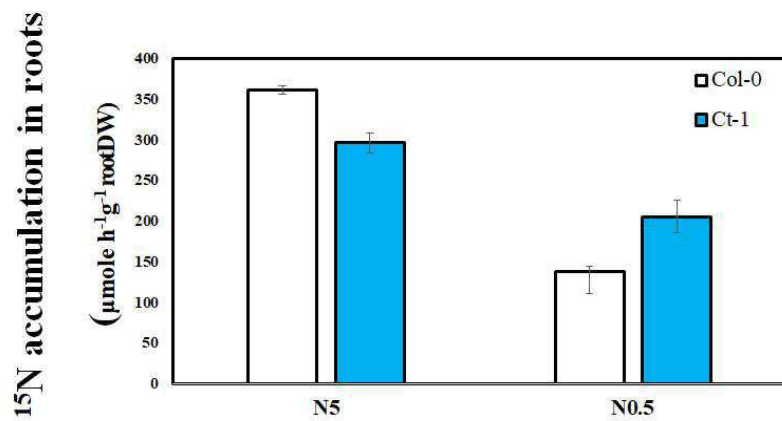
도면3



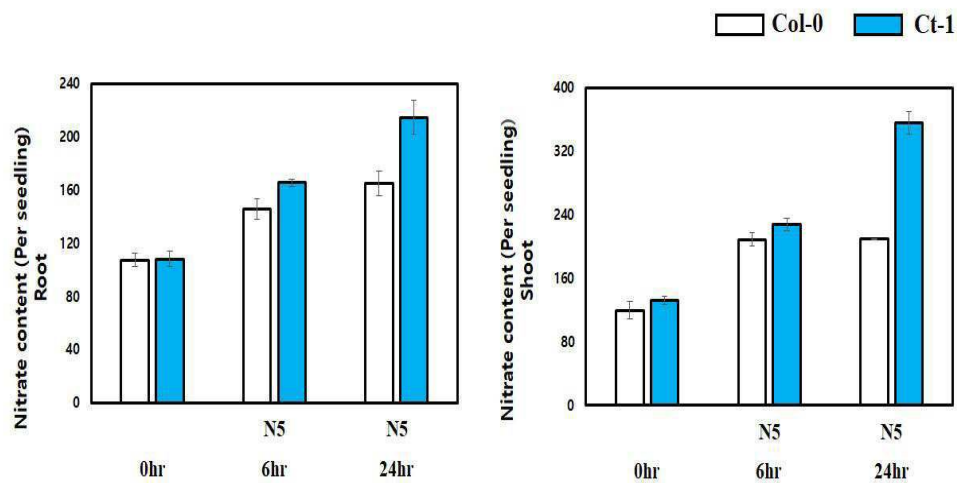
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110>	Industry Academic Cooperation Foundation of Korea University	
<120>	Transgenic plants with improved nitrogen utilization ability, plant growth and stress resistance in a low-nitrogen environment, and manufacturing method thereof	
<130>	NPDC100639	
<160>	4	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	NRT1.1 F primer sequence	
<400>	1	
	atgtctcttc ctgaaactaa atctg	25
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	NRT1.1 R primer sequence	
<400>	2	
	atgacccatt ggaataactcg g	21
<210>	3	
<211>	1773	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Ct-1 NRT1.1 CDS sequence	
<400>	3	
	atgtctcttc ctgaaactaa atctgatgat atccttcttg atgcttgga cttccaaggc	60
	cgteccgccg atcgctcaaa aaccggcggc tgggccagcg ccgcatgat tctttgtatt	120
	gaggccgtgg agaggctgac gacgttaggt atcggagtta atctgggtgac gtatttgacg	180
	ggaactatgc atttaggcaa tgcaactgcg gctaacaccg ttaccaattt cctcggaact	240

tctttcatgc tctgtctcct cgggtggcttc atcgccgata cctttctcgg caggtaccta 300
acgattgcta tattcgccgc aatccaagcc acgggtgttt caatcttaac tctatcaaca 360
atcataccgg gacttcgacc accaagatgc aatccaacaa cgtcgtctca ctgcgaacaa 420
gcaagtggaa tacaactgac ggtcctatac ttagccttat acctcaccgc tctaggaacg 480
ggaggcgtga aggctagtgt ctcgggtttc gggtcggacc aattcgtatga gaccgaacca 540
aaagaacgat cgaaaatgac atatttcttc aaccgtttct tcttttgtat caacgttggc 600

tctcttttag ctgtgacggt ccttgtctac gtacaagacg ctgttggacg caaatggggc 660
tatggaattt gcgcgtttgc gatcgtgctt gcactcagcg ttttcttggc cggaacaaac 720
cgctaccgtt tcaagaagtt gatcggtagc ccgatgacgc aggttgcctgc ggttatcgtg 780
gcggcgttga ggaataggaa gctcgagctg ccggcagatc cgtcctatct ctacgatgtg 840
gatgatatta ttgcggcgga aggttcgatg aagggtaaac aaaagctgcc acacactgaa 900
caattccgtt cattagataa ggcagcaata agggatcagg aagcgggagt tacctcgaat 960
glattcaaca agtggacact ctcaacacta acagatgttg aggaagtga acaaatcgtg 1020

cgaatgttac caatttgggc aacatgcac cttttctgga ccgtccacgc tcaattaacg 1080
acattatcag tcgcacaatc cgagacatta gaccgttcca tcgggagctt cgagatccct 1140
ccagcatcga tggcagcttt ctacgtcggg ggccctctcc taaccaccgc cgtctatgac 1200
cgcgtcgcca ttcgtctatg caaaaagcta ttcaactacc cccatggtct aagaccgctt 1260
caacggatcg gtttggggct tttcttcgga tcaatggcta tggctgtggc tgctttggtc 1320
gagctcaaac gtcttagaac tgcacacgct catggtccaa cagtcaaac gtttctctta 1380
gggttttata tactcatccc acaatatctt attgtcggta tcggcgaagc gttaatctac 1440

acaggacagt tagatttctt cttgagagag tgccctaag gtatgaaagg gatgagcacg 1500
ggtctattgt tgagcacatt ggcattagc tttttcttca gctcggttct cgtgacaatc 1560
gtcgagaaat tcaccgggaa agctcatcca tggattgccg atgatctcaa caagggccgt 1620
ctttacaatt tctactgget tgtggccgta cttgttgect tgaacttctt cattttccta 1680
gttttctcca agtggtagct ttacaaggaa aaaagactag ctgaggtggg gattgagttg 1740
gatgatgagc cgagtattcc aatgggtcat tga 1773

<210> 4

<211> 590

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ct-1 NRT1.1 amino acid sequence

<400> 4

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

245 250 255
 Ala Val Ile Val Ala Ala Trp Arg Asn Arg Lys Leu Glu Leu Pro Ala
 260 265 270

 Asp Pro Ser Tyr Leu Tyr Asp Val Asp Asp Ile Ile Ala Ala Glu Gly
 275 280 285
 Ser Met Lys Gly Lys Gln Lys Leu Pro His Thr Glu Gln Phe Arg Ser
 290 295 300
 Leu Asp Lys Ala Ala Ile Arg Asp Gln Glu Ala Gly Val Thr Ser Asn
 305 310 315 320
 Val Phe Asn Lys Trp Thr Leu Ser Thr Leu Thr Asp Val Glu Glu Val
 325 330 335
 Lys Gln Ile Val Arg Met Leu Pro Ile Trp Ala Thr Cys Ile Leu Phe

 340 345 350
 Trp Thr Val His Ala Gln Leu Thr Thr Leu Ser Val Ala Gln Ser Glu
 355 360 365
 Thr Leu Asp Arg Ser Ile Gly Ser Phe Glu Ile Pro Pro Ala Ser Met
 370 375 380
 Ala Val Phe Tyr Val Gly Gly Leu Leu Leu Thr Thr Ala Val Tyr Asp
 385 390 395 400
 Arg Val Ala Ile Arg Leu Cys Lys Lys Leu Phe Asn Tyr Pro His Gly
 405 410 415

 Leu Arg Pro Leu Gln Arg Ile Gly Leu Gly Leu Phe Phe Gly Ser Met
 420 425 430
 Ala Met Ala Val Ala Ala Leu Val Glu Leu Lys Arg Leu Arg Thr Ala
 435 440 445
 His Ala His Gly Pro Thr Val Lys Thr Leu Pro Leu Gly Phe Tyr Leu
 450 455 460
 Leu Ile Pro Gln Tyr Leu Ile Val Gly Ile Gly Glu Ala Leu Ile Tyr
 465 470 475 480
 Thr Gly Gln Leu Asp Phe Phe Leu Arg Glu Cys Pro Lys Gly Met Lys

 485 490 495

Gly Met Ser Thr Gly Leu Leu Leu Ser Thr Leu Ala Leu Gly Phe Phe			
500	505	510	
Phe Ser Ser Val Leu Val Thr Ile Val Glu Lys Phe Thr Gly Lys Ala			
515	520	525	
His Pro Trp Ile Ala Asp Asp Leu Asn Lys Gly Arg Leu Tyr Asn Phe			
530	535	540	
Tyr Trp Leu Val Ala Val Leu Val Ala Leu Asn Phe Leu Ile Phe Leu			
545	550	555	560
Val Phe Ser Lys Trp Tyr Val Tyr Lys Glu Lys Arg Leu Ala Glu Val			
565	570	575	
Gly Ile Glu Leu Asp Asp Glu Pro Ser Ile Pro Met Gly His			
580	585	590	