

특허청구의 범위

청구항 1

식물병 저항성 관련 유전자로서 고추 유래 E3유비퀴틴라이게이즈 단백질을 코딩하는 하기 (a) 또는 (b)의 분리된 유전자(*CaRING1*):

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자;

(b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(*CaRING1*).

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 기재의 유전자를 pBIN35S에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pBIN35S::*CaRING1*.

청구항 5

제1항 기재의 유전자 또는 제3항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 6

식물체로부터 mRNA 분리하여 제1항 기재의 *CaRING1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성 탐색방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식물체는 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균을 접종한 식물체인 것을 특징으로 하는 식물체의 병저항성 탐색방법.

청구항 8

제1항 기재의 *CaRING1* 유전자를 바이러스-유도 유전자 침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)을 위한 벡터인 TRV2(Tobacco Rattle Virus 2) 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 TRV2::*CaRING1*.

청구항 9

제2항 기재의 *CaRING1* 단백질의 세포내 위치 확인을 위한 재조합벡터 그룹에 있어서, 제1항 기재의 *CaRING1* 유전자를 p326GFP 벡터에 도입한 재조합벡터 *CaRING1*:smGFP, 제2항 기재의 단백질의 트랜스멤브레인 도메인을 코딩하는 염기서열을 포함한 5' 말단을 p326GFP 벡터에 도입한 재조합벡터 *CaRING1*△RING:smGFP 및 제2항 기재의 단백질의 트랜스멤브레인 도메인을 코딩하는 염기서열을 포함하지 않은 3' 말단을 p326GFP 벡터에 도입한 재조합벡터 *CaRING1*△TM:smGFP을 포함하는 재조합벡터 그룹.

청구항 10

제2항 기재의 *CaRING1* 단백질의 E3유비퀴틴라이게이즈 활성을 측정하기 위한 단백질 그룹에 있어서, 제1항 기재의 *CaRING1* 유전자를 pMAL-c4x 벡터에 도입한 후 말토스 바인딩 단백질(MBP)에 퓨전한 MBP-*CaRING1*, 제2항 기재 단백질의 링도메인을 코딩하는 염기서열을 포함한 부분을 pMAL-c4x 벡터에 도입한 후 말토스 바인딩 단백질(MBP)에 퓨전한 MBP-*CaRING1*△TM, 제2항 기재 단백질의 링도메인을 코딩하는 염기서열을 포함하지 않은 부분을 pMAL-c4x 벡터에 도입한 후 말토스 바인딩 단백질(MBP)에 퓨전한 MBP-*CaRING1*△RING, 각각 서열번호 2의 아미노산 중 110번째 아미노산인 시스테인이 세린으로 치환되거나, 서열번호 2의 아미노산 중 131번째 아미노산인 히스티딘이 티로신으로 치환된 링도메인의 아미노산이 돌연변이된 단백질 MBP-*CaRING1*C110S 및 MBP-*CaRING1*H131Y을 포함하는 단백질 그룹.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물병 저항성에 관련된 신규 유전자인 고추 E3유비퀴틴라이게이즈 유전자(*CaRING1: Capsicum annuum E3 ubiquitin ligase RING1*), 및 이를 이용한 생물적(biotic) 스트레스 탐색방법과 병저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주와 비병원성 균주에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되는 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 *CaRING1* 유전자의 염기서열 및 그에 따른 아미노산 서열을 제공하며, 이를 이용하여 병원성이나 비병원성 병원균 접종 시 저항성 관련 유전자 *CaRING1*의 차별적인 발현여부를 확인하는 식물체의 저항성 탐색방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 고추 식물에서 바이러스 유도 유전자 침묵(VIGS, virus-induced gene silencing) 기술을 이용하여 상기 *CaRING1* 유전자의 발현을 억제시켜 병저항성에 있어서 *CaRING1* 유전자의 역할을 확인하고, 그리고 상기 *CaRING1* 유전자를 고추 식물에 아그로박테리움 매개 일시적 발현(*Agrobacterium*-mediated transient expression) 방법과 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 형질전환(transgenic expression)을 통해 각각 도입시켜 *CaRING1* 유전자의 식물체 병저항성 증대효과를 확인하여, 이를 통한 식물병 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물은 외부의 병원체의 침해를 저지하기 위하여 다양한 형태의 방어관련 기작을 가지고 있다. 이와 같은 방어 관련 기작들은 효과적으로 식물을 보호하며 지금까지 알려져 있지 않은 생체 내 기작을 규명하는 것은 작물생산 측면에서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 과학기술적 가치를 지닌다. 또한 식물방어관련 기작을 위해서 유도되는 특이적인 유전자의 정보는 새로운 작물의 육종을 위한 중요한 자원으로 사용될 수 있다.

[0003] 우리나라에서 재배되는 주요한 가지과 작물로서 고추 (*Capsicum annuum* L.)는 농업경제에 있어서 가장 중요한 작물중의 하나이다. 고추식물에서 바이러스병, 세균병, 진균병 등이 다양하게 보고되어 있으나 지금까지 효과적인 병 저항성 작물은 보고되어 있지 않다. 그러므로 생명공학적인 기법을 이용한 효과적인 병저항성 관련 유전자의 분리 및 형질전환 식물의 제작은 생산비 절감의 효과 및 친환경시기대에 맞는 고품질 작물의 생산을 가능하게 하며 이와 연계된 다양한 산업의 활성화에 기여 할 수 있다.

[0004] 식물이 여러 가지 신호에 반응하여 다양한 유전자의 발현을 유도하고 이렇게 발현된 유전자는 최종적으로 단백질의 형태로 식물의 생화학적 대사에서 사용된다. 최근의 연구에 따르면 이와 같은 단백질 합성 이후의 조절과정이 여러 가지 대사에서 중요한 역할을 수행하며 대표적인 예로 유비퀴티네이션(ubiquitination) 시스템이 있다. 유비퀴티네이션 시스템은 특이적인 기질을 분해하는 생체 내 기작으로서 이를 통하여 식물은 다양한 방어관련기작을 조절하며 그 기작에는 기주세포의 병원체 인식, 국부적 세포 죽음을 통한 과민성 반응, 피토크알렉신(phytoalexin) 과 같은 항균성 물질 생성, 병방어 관련 단백질 생성 등이 있다. 이러한 일련의 저항성 반응의 조절을 위한 과정에 있어서 불필요하거나 방어반응을 억제하는 역할을 하는 효소나 단백질의 특이적인 분해가 중요한데 이와 같은 분해는 주로 유비퀴티네이션 시스템을 통하여 일어나며 이때 E3유비퀴틴라이게이즈(E3 ubiquitin ligase)는 최종적으로 분해할 기질을 선별하므로써 특이적인 단백질의 분해를 가능하게 한다. 대표적인 모델식물로서 애기장대에서 약 1400개의 E3유비퀴틴라이게이즈가 존재한다고 알려져 있고 이들 유전자는 식물 방어관련 기작뿐만 아니라 다양한 식물의 생리적 과정 및 생화학적 대사를 조절할 것으로 예상되고 있으나 아직 고추식물에서는 알려진 것이 거의 없다. 그러므로 식물내의 다양한 대사를 조절하는 E3유비퀴틴라이게이즈에 관한 연구는 매우 각광받는 분야로서 특히 식물병 저항성 반응에 관여하는 E3유비퀴틴라이게이즈에 대한 연구와 이 기능을 밝혀내는 것은 고추식물의 병저항성 기작을 이해하는데 중요한 역할을 하며 병저항성 형질전환 식물체 제작을 위한 주요한 유전자원을 제공하는데 기여할 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0005] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인 고추 E3유비퀴틴라이게이즈(*E3 ubiquitin ligase RING1*)를 코딩하는 *CaRING1* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.
- [0006] 또한 본 발명의 목적은 상기 *CaRING1* 유전자를 이용하여 식물병에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.
- [0007] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaRING1* 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는 데 그 목적이 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

- [0009] 본 발명의 상기 목적은, 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광 고추 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)으로부터 분리한 신규 저항성 관련 유전자 *CaRING1*을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 병원균 처리를 통하여 *CaRING1*의 발현 여부를 조사하고, 고추식물과 이 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaRING1* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.
- [0010] 따라서 본 발명은 식물병 저항성 관련 유전자로서 고추 유래 E3유비퀴틴라이게이즈를 코딩하는 (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 (b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자(*CaRING1*)를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 E3유비퀴틴라이게이즈 단백질(*CaRING1*)을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터 및 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0013] 나아가 본 발명은 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaRING1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.
- [0014] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0015] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브(Probe)를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하여 병저항성에 관련될 것으로 추정되는 유전자를 선별하여 클론을 수득하고, 이 클론 중 E3유비퀴틴라이게이즈(*CaRING1*) 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독(Sequencing)함으로써, *CaRING1*로 명명된 고추 녹광 품종의 E3유비퀴틴라이게이즈(*CaRING1*) 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그로부터 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).
- [0016] 본 발명에 의한 상기 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트(Blast) 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaRING1* 단백질을 코딩 유전자를 확인하고 E3유비퀴틴라이게이즈(*CaRING1*) 유전자로 명명하였다. *CaRING1* 단백질은 아미노산 서열의 비교결과 E3유비퀴틴라이게이즈에서 전형적으로 나타나는 링 도메인(RING domain)을 가지고 있었고, 세포내에서의 위치를 결정하는데 중요한 역할을 하는 트랜스멤브레인 도메인(transmembrane domain)을 특이적으로 가지고 있었다(도 4 내지 도 7 참조). 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 E3유비퀴틴라이게이즈(accession no. NP_173506)와는 단백질 수준에서 65 %, 머스타드(*Brassica rapa*)의 징크핑거(zinc finger) 유전자(accession no. ABK56013)와는 단백질 수준에서 61 %의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, nucleotide blast program). 확인된 *CaRING1*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다.

- [0017] 다음에, 본 발명은 생물적 처리를 한 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaRING1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균 등 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 *CaRING1* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블롯, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 이용될 수 있다. 본 발명에 의한 *CaRING1* 유전자가 식물병원균에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 3 참조). 따라서 본 발명에 의한 *CaRING1* 유전자는 식물체의 병저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기의 *CaRING1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaRING1* 유전자가 억제된 식물체의 제작, *CaRING1* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다.
- [0019] 보다 구체적으로 본 발명은 또한 새롭게 개발된 바이러스 유도 유전자침묵(불능화)기술(virus-induced gene silencing (VIGS))에 이용되어지는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaRING1* 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2::*CaRING1*을 제작하였다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaRING1*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 병감수성이 증대되는 것을 확인할 수 있었다 (도 11 및 도 14 참조).
- [0020] 나아가 본 발명에 의한 *CaRING1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S::*CaRING1*)를 고추 식물에 아그로박테리움 매개 일시적 발현(*Agrobacterium*-mediated transient expression) 시키거나 본 발명에 의한 *CaRING1*이 과발현된 형질전환 애기장대 식물을 제조하여 식물병 저항성의 증대를 확인할 수 있었다 (도 8 내지 도 10 및 도 15 내지 도 16 참조).
- [0021] 본 발명에 의한 고추 E3유비퀴틴라이게이즈의 기능을 불능화 시킨 고추 식물 및 E3유비퀴틴라이게이즈를 과발현 시킨 애기장대 식물에 대한 식물병원균에 대한 저항성 검정평가를 수행하여 병저항성 발생여부를 알아 볼 수 있게 되었다. 이러한 본 발명으로 E3유비퀴틴라이게이즈의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보를 추적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신호전달에 대한 흥미로운 모형을 제공할 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병저항성이 증진되는 생명공학작 식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있다.

효과

- [0022] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자인 신규한 E3유비퀴틴라이게이즈 단백질을 코딩하는 *CaRING1* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 동시에, 이 유전자를 이용하여 식물체의 병저항성 탐색방법을 제공할 뿐 아니라 저항성 식물 육종 및 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 도모할 수 있게 되었다.
- [0023] 따라서 본 발명은 병저항성 식물체의 육종을 위한 재료를 제공할 수 있어 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0025] [실시예 1] *CaRING1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정

- [0026] 고추 세균성 점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 E3유비퀴틴라이게이즈(*E3 ubiquitin ligase*

RING1) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0027] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 있을 수거하였다.

[0028] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR(Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리로부터 개개의 cDNA 클론을 제조하여 나이론막(Hybond N+)에 일정하게 흡착시킨 후, 각각 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxigenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.

[0029] 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

[0030] 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 *CaRING1* 단백질을 코딩 유전자를 확인하고 E3유비퀴틴라이게이즈(*CaRING1*) 유전자로 명명하였다. *CaRING1* 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 E3유비퀴틴라이게이즈에서 전형적으로 나타나는 링 도메인(RING domain)을 가지고 있었고, 세포내에서의 위치를 결정하는데 중요한 역할을 하는 트랜스 멤브레인 도메인(transmembrane domain)을 특이적으로 가지고 있었다. 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 E3 유비퀴틴라이게이즈(accession no. NP_173506)와는 단백질 수준에서 65 %, 머스타드 (*Brassica rapa*)의 징크 핑거(zinc finger) 유전자(accession no. ABK56013)와는 단백질 수준에서 61 %의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, nucleotide blast program). 확인된 *CaRING1*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다.

[실시예 2] 병원균 접종에 의한 고추식물에서의 *CaRING1* 유전자의 발현 탐색방법

[0032] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaRING1* 유전자의 저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[단계 1]

[0034] 먼저 저항성 탐색방법을 구체적으로 제시하기 위하여, 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 불친화적 반응을 나타내는 비병원성 균주 Bv5-4a를 배양한 후, 10^8 cfu/ml의 농도로 6엽기의 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)의 3, 4엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 접종하고, 접종 후에는 28°C, 100% 상대습도 조건에서 16시간 동안 습실 처리하였다. 접종 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 각각 3, 4엽을 샘플링하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막(Hybond N+)으로 전이시켰다.

[0035] 다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaRING1* 유전자에 클레나우효소(Klenow enzyme)를 이용하여 동위원소가 붙은 α - 32 P[dCTP]를 표지한 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65°C로 16-24시간 동안 배양하여 하이브리다이제이션(hybridization)을 실시하였다. 이렇게 동위원소가 표지된 상기의 DNA 프로브는 나이론막(Hybond N+)에 붙어있는 mRNA에 붙게 되며 이 나이론막(Hybond N+) 위에 X-ray 필름을 얹게 되면 동위원소가 표지된 DNA가 X-ray 필름을 감광시키므로, 발현 유무와 정도를 알아볼 수 있게 하였다.

[0036] 상기 노던블로팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일량의 RNA 시료가 로딩(loading) 되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과를 도 3에 나타내었으며 실험의 결과 *CaRING1* 유전자는 병원성 균주와 비병원성 고추 세균성 점무늬병 접종 후 빠른 시간에 모두 발현이 시작되었고, 비병원성 균주를 접종하여 저항성 반응을 보이는 고추 식물에서 그 발현이 강하고 시간이 경과함에 따라 발현이 증가하게 되었다. 즉, 친화적 반응에서는 *CaRING1* 유전자의 발현이 1시간 이후에 최고조에 도달한 뒤 급속히 감소되었으나, 불친화적 반응에서는 1시간 이후부터 25시간까지 발현이 점진적으로 증가하였다.

[0037] [실시예 3] 식물세포 내에서 CaRING1 단백질 위치확인

[0038] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaRING1* 유전자의 식물세포 내에서의 이동을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[0039] [단계 1]

[0040] 식물세포 내에서 CaRING1 단백질의 이동을 확인하기 위하여 실시예 1에서 수득한 *CaRING1* 유전자의 3' 말단에 그린플루오레센트 단백질을 퓨전(CaRING1:smGFP)하여 양과표피세포에서 발현시킨 후 24시간 뒤 콘포컬(conforcal)현미경을 이용하여 관찰하였다. 그리고 이때 *CaRING1* 유전자에서 세포내의 위치결정에 중요한 역할을 할 것으로 여겨지는 트랜스멤브레인 도메인의 기능을 밝히기 위하여 이 도메인을 포함한 5' 말단(서열번호 2의 아미노산 1 - 55)을 그린플루오레센트 단백질과 퓨전(CaRING1△RING:smGFP)시키고 이 도메인을 포함하지 않은 3' 말단(서열번호 2의 아미노산 56 - 197)을 그린플루오레센트 단백질과 퓨전(CaRING1△TM:smGFP)하여 동일한 실험을 수행하였다. 그 결과 도 4에서 나타난 것처럼 CaRING1 단백질이 세포막으로 이동하는 것을 관찰할 수 있었으며 동시에 트랜스멤브레인 도메인이 CaRING1 단백질의 세포내 위치를 결정하는데 필요하다는 것을 알 수 있었다.

[0041] [실시예 4] CaRING1 단백질의 E3유비퀴틴라이게이즈 활성 측정

[0042] 상기 실시예 1에서 수득한 CaRING1 단백질의 기능을 E3유비퀴틴라이게이즈 활성을 측정하기 위하여 다음과 같이 실험하였다.

[0043] [단계 1]

[0044] CaRING1 단백질의 E3유비퀴틴라이게이즈 활성 측정을 위해서 실시예 1에서 수득한 *CaRING1* 유전자를 pMAL c4x 벡터(New England Biolabs)에 도입시켜 말토스 바인딩 단백질(maltose binding protein, MBP)과 퓨전시켰다(MBP-CaRING1). 그리고 E3유비퀴틴라이게이즈 활성에 있어서 링 도메인의 역할을 밝히기 위하여 링도메인을 가지고 있지 않은 부분(MBP-CaRING1△RING)(서열번호 2의 아미노산 1 - 78), 링도메인을 가지고 있는 부분(MBP-CaRING1△TM)(서열번호 2의 아미노산 79 - 197), 링도메인이 돌연변이된 단백질(MBP-CaRING1C110S, MBP-CaRING1H131Y)을 동일하게 말토스 바인딩 단백질로 퓨전시켰다. 상기 링도메인이 돌연변이된 단백질 MBP-CaRING1C110S와 MBP-CaRING1H131Y는 링도메인의 구조를 결정하프로서 E3 유비퀴틴라이게이즈 활성을 갖기 위해서 필수적인 아미노산 서열을 돌연변이 시킨 단백질로서, MBP-CaRING1C110S는 서열번호 2의 아미노산 중 110번째 아미노산인 시스테인이 세린으로, MBP-CaRING1H131Y는 서열번호 2의 아미노산 중 131번째 아미노산인 히스티딘이 티로신으로 치환된 돌연변이 단백질이다. 상기와 같이 퓨전된 단백질을 Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG)를 이용하여 발현시킨 후에 단백질을 New England BioLab사에서 제공하는 아밀로스 레진(amylose resin)을 이용하여 순화하였다(도 5).

[0045] [단계 2]

[0046] 순화된 MBP-CaRING1 단백질을 이용하여 E3유비퀴틴라이게이즈 활성을 측정하기 위하여 유비퀴틴 시스템에서 필요로 하는 요소들(E1, E2, ATP, ubiquitin)과 함께 30℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 도 6에서 관찰한 바와 같이 유비퀴티네이션 시스템에서 CaRING1 단백질은 E3유비퀴틴라이게이즈 활성을 보였으며 유비퀴티네이션 시스템에 필요로 하는 모든 요소가 존재할 경우에만 활성을 나타냈다. E3유비퀴틴라이게이즈 활성은 웨스턴 블롯방법을 통해 측정되었으며 이때 유비퀴틴 항체와 MBP 항체를 사용하였다. 퓨전프로테인인 MBP는 대조구로서 사용되었다.

[0047] [단계 3]

[0048] E3유비퀴틴라이게이즈 활성에 있어서 CaRING1 단백질의 링 도메인의 역할을 밝히기 위하여, 순화된 deletion mutant variants(MBP-CaRING1△RING, MBP-CaRING1△TM)와 site directed mutants variants (MBP-CaRING1C110S, MBP-CaRING1H131Y)를 이용하여 E3유비퀴틴라이게이즈 활성을 측정하였다. 도 7에서 관찰한 바와 같이 E3유비퀴틴라이게이즈 활성을 위해서는 링 도메인이 필수적임을 알 수 있었다. 웨스턴 블롯은 단계 2에서와 동일한 방법을 사용하였다.

[0049] [실시예 5] *CaRING1* 유전자 과발현에 의한 고추 식물의 병저항성 관련 세포사멸변화

[0050] 고추식물에서 *CaRING1* 유전자가 과발현 되었을 때 병에 대한 저항성을 위한 세포사멸 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaRING1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:*CaRING1*을 제조한 후 재조합 벡터인 pBIN35S:*CaRING1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 전기천공법(electroporation) 방법을 통하여 도입하고 이를 고추 잎에 접종하여 *CaRING1*을 과발현하는 고추식물의 병저항성 관련 세포사멸변화 여부를 관찰하였다.

[0051] [단계 1]

[0052] *CaRING1*을 과발현하는 재조합벡터 (35S:*CaRING1*)와 *CaRING1*을 과발현하지 않는 대조구 벡터 (35S:00)를 이용하여 형질전환 시킨 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)를 흡광도(optical density) 600 (OD₆₀₀) 에서 1.0, 0.5, 0.1 농도로 고추 잎의 엽맥을 경계로 하여 각각 접종하고 그 결과를 도 8에 나타내었다. 그 결과 각각 접종 4일째, 7일째 *CaRING1*을 과발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 접종한 부위에서 세포사멸이 일어나는 것을 관찰할 수 있었으며 이때 접종부위에 페놀화합물(phenolic compound)의 집적이 일어나는 것을 자외선(UV) 하에서 관찰할 수 있었다. 세포사멸을 정량하기 위해서 접종 후 각각 20시간, 40시간 후에 잎 조직에서 유출되는 전해질을 측정하였다. 대조구에 비해서 *CaRING1*을 과발현 시킨 조직에서 유출되는 전해질이 매우 증가하였으며(도 9) 엽맥을 따라 농도별로 접종한 잎을 트리판 블루 염색(trypan blue staining)한 결과 대조구에 비해 세포사멸이 증가함이 관찰 되었다(도 10). 접종 후 3일째 병저항성의 신호전달 물질로 알려진 활성산소의 발생량을 알아보기 위해 댁 염색(3,3'-diaminobenzidine(DAB) staining)을 수행하였고 그 결과를 도 10에 나타내었다. 그 결과, *CaRING1*을 과발현 하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 균주를 접종한 부위에서 활성산소의 축적이 강하게 일어나는 것을 관찰할 수 있었다.

[0053] [실시예 6] *CaRING1* 유전자 발현의 억제에 의한 병저항성의 변화

[0054] 고추식물에서 *CaRING1* 유전자의 발현이 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 감수성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaRING1* 유전자를 새롭게 개발된 바이러스 유도 유전자 침묵(VIGS, virus-induced gene silencing)에서 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaRING1* 유전자를 TRV2 벡터(참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2::*CaRING1*을 제조하였다. 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV2::*CaRING1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가는 GV3101 균주를 고추 유묘(seedling)의 떡잎에 주사기를 사용하여 인필트레이션(infiltration) 방법으로 접종하여 고추식물에 도입함으로써 *CaRING1* 유전자의 발현의 억제를 유도시켰다.

[0055] [단계 1]

[0056] *CaRING1*의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대해 저항성의 변화를 알아보기 위하여, 상기의 *CaRING1* 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 대조구로서 TRV:00 벡터를 접종한 고추 녹광품종에 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 10^8 , 10^7 , 10^6 cfu ml⁻¹의 농도로 접종한 후 각각 0, 3일 이후 접종 잎의 병징을 관찰하였고(도 11), 5×10^4 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 후 0, 3일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였다(도 12). 또한 병원균을 10^7 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 이후 12, 24시간 후에 실험구와 대조구의 감염 잎에서 살리실산(salicylic acid, SA)을 추출하여 정량하였으며 RNA를 추출하여 리얼타임 알티-피시알(real time RT-PCR)을 통해 *CaRING1*의 특이적인 유전자 억제 효과와 함께 병 접종시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였다(도 13). 그리고 비병원성 균주 Bv5-4a를 10^7 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 이후 12, 24시간 후에 실험구와 대조구의 과민성 반응과 관련된 활성산소방출과 세포사멸을 각각 댁 염색과 트리판 블루 염색과 접종후 시간에 따른 전해질 유출을 측정함으로써 관찰하였다(도 14).

[0057] 도 11에서와 같이 VIGS로 *CaRING1*의 발현이 억제된 식물에서 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 병징을 관찰한 결과, 병원성 균주 접종시 접종 후 6일째 대조구와 비교하여 증가된 황화와 괴저 현상의 진전이 관찰되었고, 비병원성 균주 접종시 대조구 식물에서 3일째 국부적 저항성 반응으로 세포사멸이 나타나지만 *CaRING1*의 발현이 억제된 식물에서는 국부적 세포사멸이 감소하는 것이 관찰되었다. 그리고 감염조직에서 병원성 균과 비병원성 균의 세균 생장을 측정한 결과 대조구에 비교하여 *CaRING1*의 발현이 억제된 식물에서 더 많은

세균생장을 나타냈다(도 12). 살리실산의 축적의 경우 특히, *CaRING1*의 발현이 억제된 식물이 비병원성 균주에 감염되었을 경우 매우 감소하였으며 리얼타임 알티-피시알 실험 결과, *CaRING1*이 억제된 식물에서 효과적으로 고추 방어관련 유전자의 억제가 나타나는 것이 관찰되었고, *CaBPR1*, *CaDEF1*, *CaPO2* 와 같은 저항성 관련 유전자의 발현이 줄어들었다(도 13). 그리고 도 14에서 관찰한 바와 같이 *CaRING1* 이 억제된 식물에서는 비병원성 균주 접종이 일어나는 과민성 반응을 위한 활성산소 축적 및 세포사멸이 매우 감소하는 것이 관찰되었다(도 14).

[0058] [실시예 7] *CaRING1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaRING1* 유전자의 과발현에 의한 애기장대 식물의 병저항성의 변화

[0059] 모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에서 *CaRING1* 유전자의 과발현시 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaRING1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN3S 벡터에 도입시켜 pBIN35S::*CaRING1*을 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S::*CaRING1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합 벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 형질 전환 시켜서 *CaRING1* 유전자의 과다발현을 유도시킨 후 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0060] [단계 1]

[0061] 상기와 같이 *CaRING1*이 과발현된 식물에 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)균주를 접종하고 세균의 생장과 병징을 관찰하였다. 도 15와 같이 *CaRING1*이 과발현된 식물체에서 야생형에 비하여 세균생장이 억제됨이 관찰 되었으며, 10^7 cfu ml⁻¹ 농도로 접종하여 병징을 관찰한 결과 야생형에 비해서 병징이 감소하는 것을 관찰 하였다.

[0062] 도 15에서 #5, #13, #16 는 사용된 형질 전환 식물의 계통번호를 나타낸다.

[0063] [단계 2]

[0064] *CaRING1*이 과발현된 식물에, 애기장대에서 노균병을 일으키는 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후 병저항성의 변화를 관찰하였다. *CaRING1*이 과발현된 식물과 과발현하지 않는 야생형 대조구 식물의 떡잎에 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2를 5×10^4 spores/ml의 농도로 분무접종 하였다. 접종 후 17℃의 온도에서 습실 처리하였다. 그 결과 도 16에 나타난 바와 같이, *CaRING1*을 과발현하는 형질전환 애기장대 식물에서 저항성이 증가되어 노균병원균의 분생자병 및 포자형성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었고 *CaRING1*이 과발현된 식물의 노균병에 대한 저항성의 세포수준 관찰을 아닐린 블루 염색(aniline blue staining)을 통해서 수행하였다. 그 결과 *CaRING1* 유전자가 과발현된 식물에서 대조구에 피해서 균사생장이 억제됨이 관찰되었다.

[0065] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 E3유비퀴틴라이게이즈(*CaRING1*) 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이다.

[0067] 도 2는 고추 녹광 품종의 각 기관에서 *CaRING1* 유전자의 발현 결과를 나타낸 도면이다.

[0068] 도 3은 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 접종하였을 때 접종되지 않은 고추잎과 접종된 고추잎에서의 *CaRING1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이다.

[0069] 도 4는 그린플루오레센트 단백질을 표지한 *CaRING1* 및 *CaRING1*의 세포내 위치에 있어서 트랜스멤브레인 도메인의 역할을 확인하기 위한 돌연변이 단백질의 세포내 위치를 나타낸 도면이다.

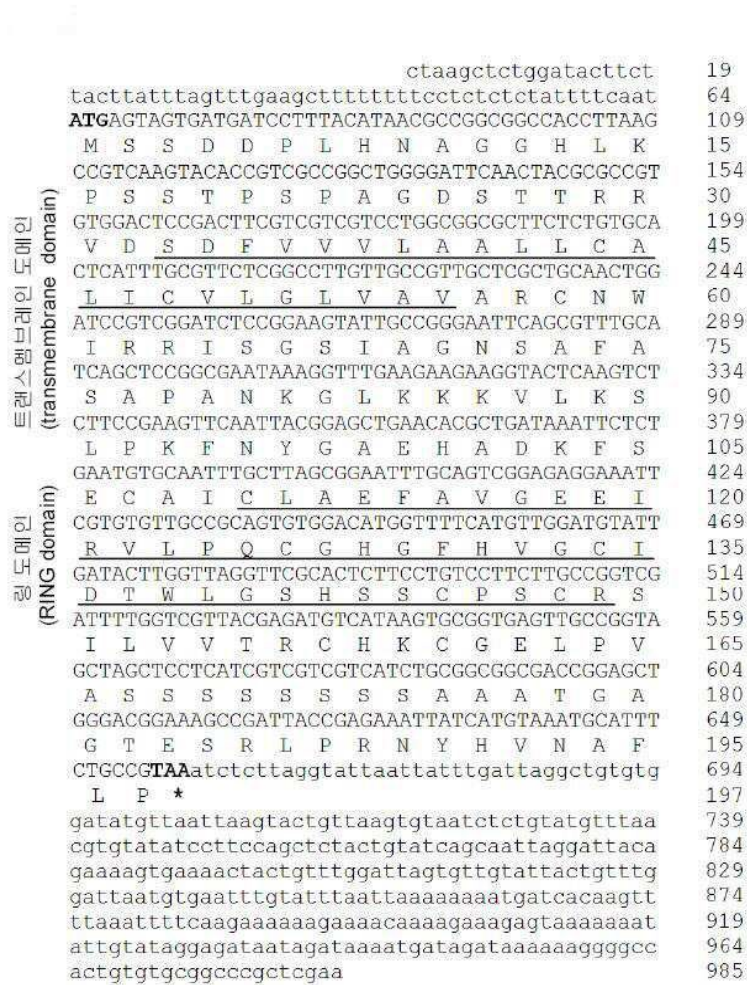
[0070] 도 5는 *CaRING1* 단백질의 E3유비퀴틴라이게이즈 활성을 측정하기 위하여 *CaRING1*과 돌연변이 단백질을 대장균

에서 발현시키고 아밀로스 레진을 이용하여 순화한 결과를 보인 도면이다.

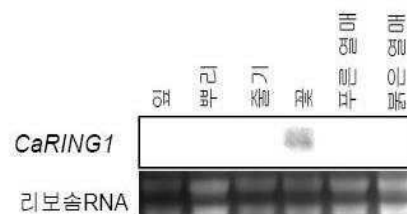
- [0071] 도 6은 CaRING1 단백질의 E3유비퀴틴라이게이즈 활성을 측정한 도면이다.
- [0072] 도 7은 CaRING1 단백질의 E3유비퀴틴라이게이즈 활성에 있어서 링 도메인의 역할을 확인하기 위하여 CaRING1과 돌연변이 단백질들의 E3유비퀴틴라이게이즈 활성을 측정한 도면이다.
- [0073] 도 8은 재조합벡터 pBIN35S:CaRING1과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 고추 식물에서 CaRING1 유전자를 과발현하였을 때 세포사멸이 유도되는 결과를 보인 사진이다.
- [0074] 도 9는 재조합벡터 pBIN35S:CaRING1과 균주를 이용하여 유발되는 세포사멸로 인한 전해질 유출을 측정한 결과를 보인 도면이다.
- [0075] 도 10은 재조합벡터 pBIN35S:CaRING1과 균주를 이용하여 유발되는 활성산소의 축적을 덤 염색을 통해 확인하고 세포사멸을 트리판 블루염색을 통해 관찰한 결과를 나타내는 사진이다.
- [0076] 도 11은 바이러스-유도 유전자침묵(virus-induced gene silencing, VIGS)의 방법을 이용하여 CaRING1 유전자 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 병 감수성이 증대하는 것을 나타낸 사진이다.
- [0077] 도 12는 CaRING1 유전자 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 감염 고추 잎 조직에서의 세균 성장을 나타낸 도면이다.
- [0078] 도 13은 CaRING1 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 살리실산축적의 변화와 CaRING1의 효과적인 발현 억제와 저항성 관련 유전자의 발현 차이를 나타낸 결과를 나타낸 도면이다.
- [0079] 도 14는 CaRING1 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 과민성 반응에 의한 세포사멸이 감소와 이를 위한 활성산소 축적을 측정한 결과를 나타낸 도면이다.
- [0080] 도 15는 재조합벡터 pBIN35S:CaRING1과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 CaRING1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 성장과 병징을 관찰한 결과를 나타낸 도면이다.
- [0081] 도 16은 CaRING1 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco2)에 대한 병저항성이 나타난 결과를 보인 도면이다.

도면

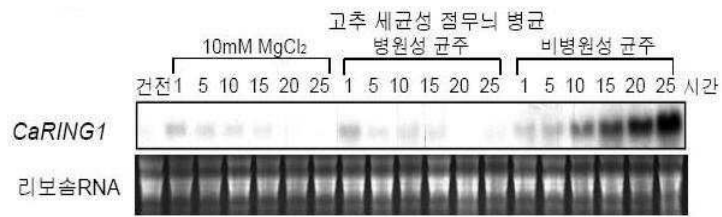
도면1



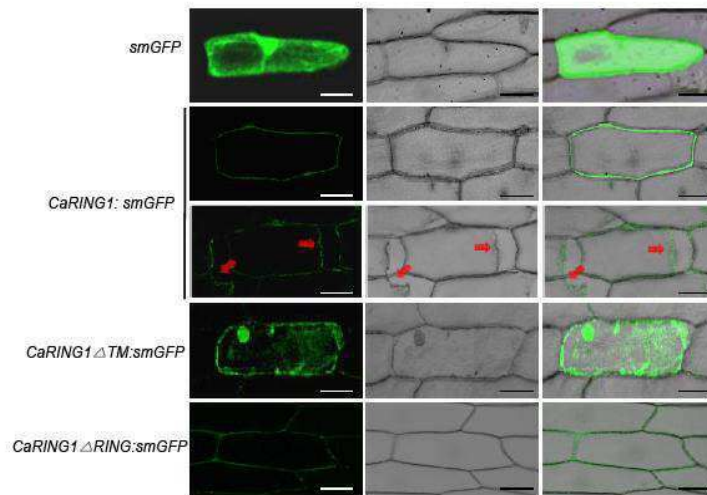
도면2



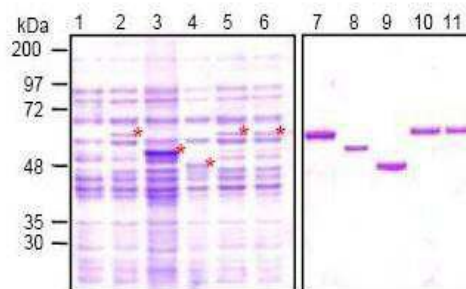
도면3



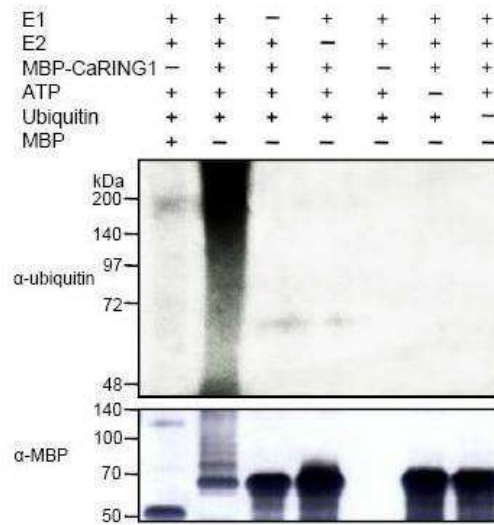
도면4



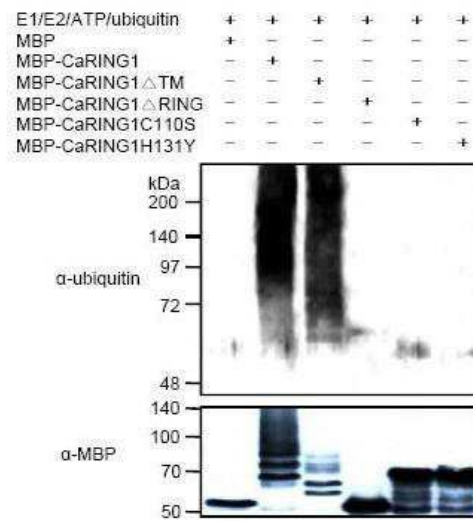
도면5



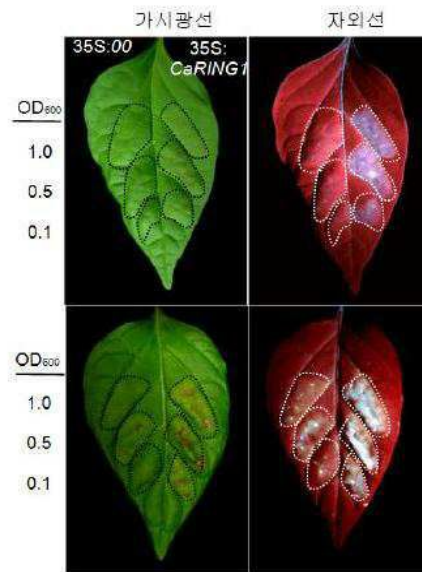
도면6



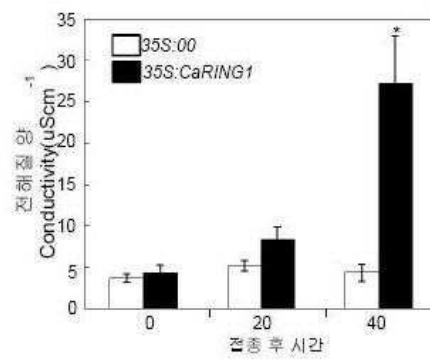
도면7



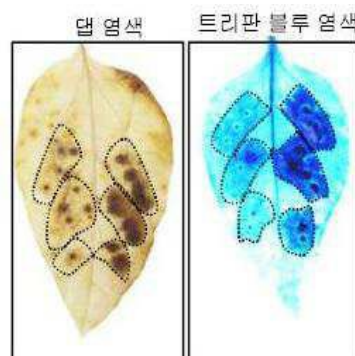
도면8



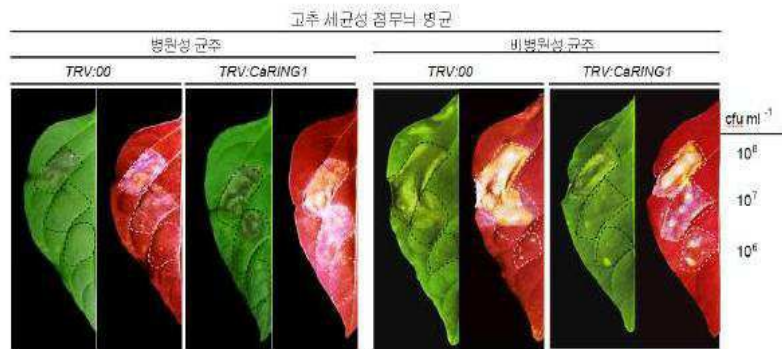
도면9



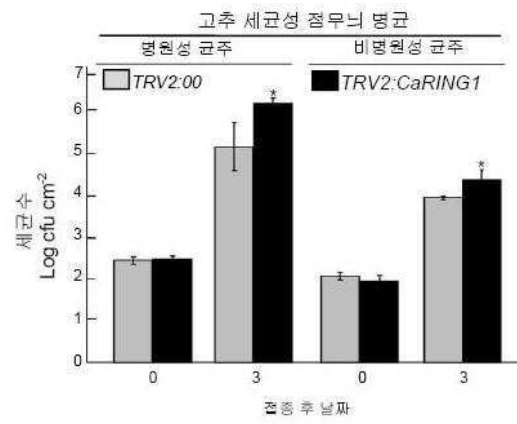
도면10



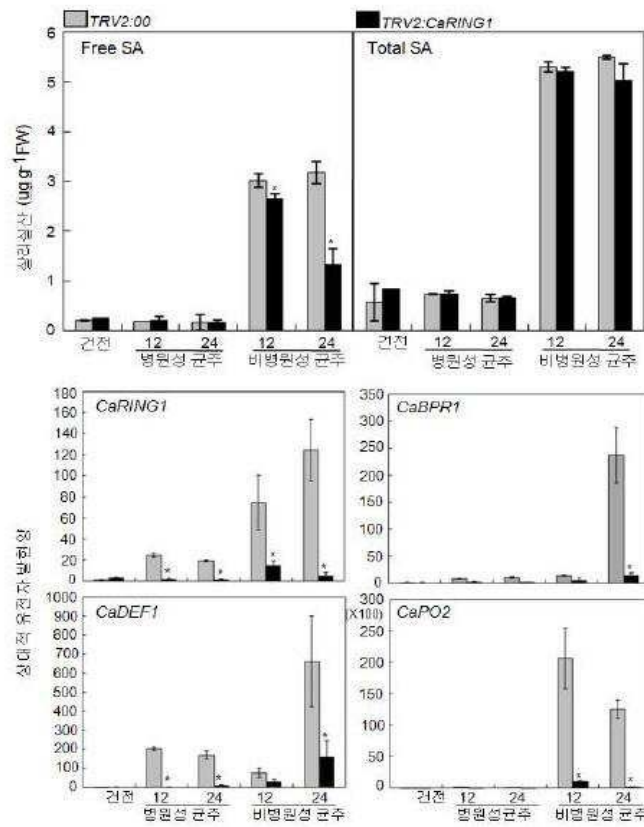
도면11



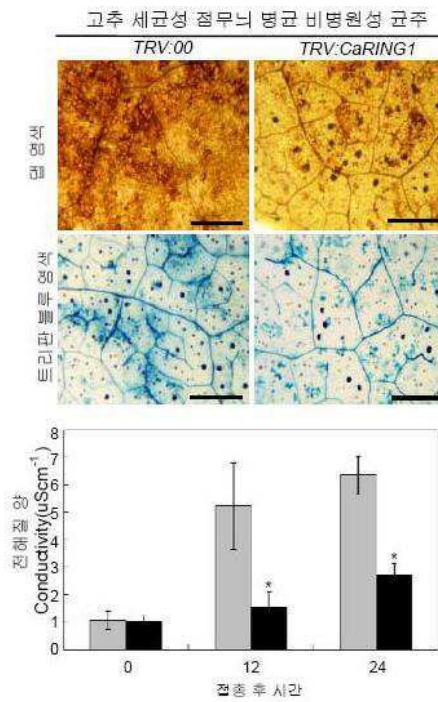
도면12



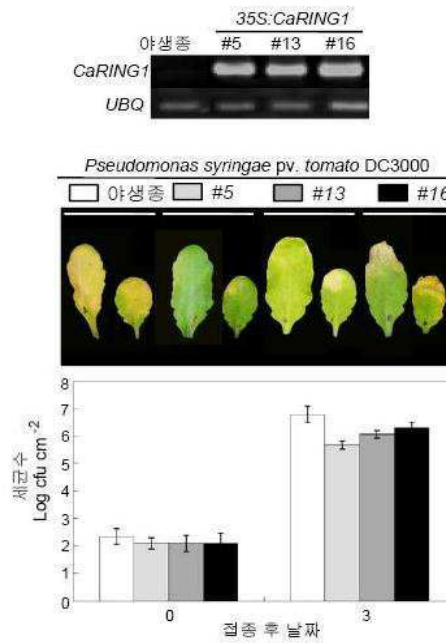
도면13



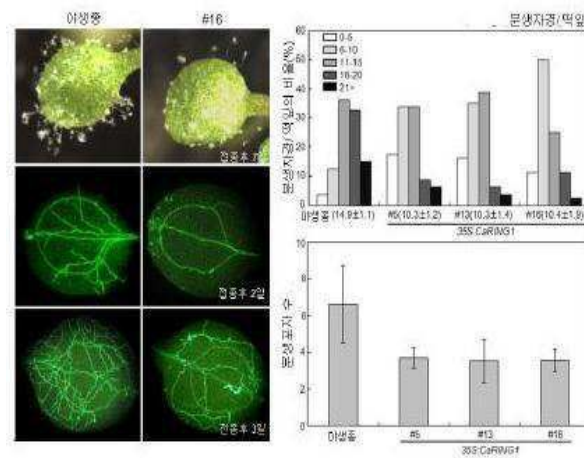
도면14



도면15



도면16



서열목록

- <110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
- <120> Disease resistance-related pepper E3 ubiquitin ligase gene
CaRING1 and transgenic plants using the same
- <130> P11-090820-01
- <160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 985

<212> DNA

<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 1

ctaagctctg gatacttctt acttatttag ttgaagctt tttttcctc tctctatitt 60

caatatgagt agt gatgac ctttacataa cgccggcggc caccttaagc cgtcaagtac 120

accgtcgccg gctggggatt caactacgcg ccgtgtggac tccgacttcg tcgtcgtcct 180

ggcggcgctt ctctgtcac tcatttgcgt tctcggcctt gttgccgttg ctgctgcaa 240

ctggatccgt cggatctccg gaagtattgc cggaattca gcgtttgcat cagctccggc 300

gaataaaggt ttgaagaaga aggtactcaa gtctcttccg aagttcaatt acggagctga 360

acacgtgat aaattctctg aatgtgcaat ttgcttagcg gaatttgcag tcggagagga 420

aattcgtgtg ttgccgcagt gtggacatgg tttcatgtt ggatgtattg atacttggtt 480

aggttcgcac tcttctgtc cttcttgcg gtcgattttg gtcgttacga gatgtcataa 540

gtgcggtgag ttgccggtag ctagctctc atcgtcgtcg tcacttcgcg cggcgaccgg 600

agctgggacg gaaagccgat taccgagaaa ttatcatgta aatgcatttc tgccgtaaat 660

ctcttaggta ttaattattt gattaggctg tgtggatatg ttaattaagt actgttaagt 720

gtaatctctg tatgtttaac gtgtatatcc ttccagctct actgtatcag caattaggat 780

tacagaaaag tgaaaactac tgtttgatt agtgtgtat tactgtttgg attaatgtga 840

atttgatatt aattaaaaa aatgatcaca agttttaaat tttcaagaaa aaagaaaaca 900

aaagaaagag taaaaaata ttgtatagga gataatagat aaaatgatag ataaaaaagg 960

ggccactgtg tgcggccgcg tcgaa 985

<210> 2
<211> 197
<212> PRT
<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 2
Met Ser Ser Asp Asp Pro Leu His Asn Ala Gly Gly His Leu Lys Pro
1 5 10 15

Ser Ser Thr Pro Ser Pro Ala Gly Asp Ser Thr Thr Arg Arg Val Asp
20 25 30

Ser Asp Phe Val Val Val Leu Ala Ala Leu Leu Cys Ala Leu Ile Cys
35 40 45

Val Leu Gly Leu Val Ala Val Ala Arg Cys Asn Trp Ile Arg Arg Ile
50 55 60

Ser Gly Ser Ile Ala Gly Asn Ser Ala Phe Ala Ser Ala Pro Ala Asn
65 70 75 80

Lys Gly Leu Lys Lys Lys Val Leu Lys Ser Leu Pro Lys Phe Asn Tyr
85 90 95

Gly Ala Glu His Ala Asp Lys Phe Ser Glu Cys Ala Ile Cys Leu Ala
100 105 110

Glu Phe Ala Val Gly Glu Glu Ile Arg Val Leu Pro Gln Cys Gly His
115 120 125

Gly Phe His Val Gly Cys Ile Asp Thr Trp Leu Gly Ser His Ser Ser
130 135 140

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

Gly Glu Leu Pro Val Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala
165 170 175

Ala Thr Gly Ala Gly Thr Glu Ser Arg Leu Pro Arg Asn Tyr His Val
180 185 190

Asn Ala Phe Leu Pro
195