

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0026057 (43) 공개일자 2013년03월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/29 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0089412 (22) 출원일자 2011년09월05일 심사청구일자 2011년09월05일	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동) (72) 발명자 강창호 경상남도 진주시 가호로 26, 주공2차 207동 302호 (가좌동) 김외연 경상남도 진주시 내동면 순환로 425-61, 남강휴먼 빌 106동 802호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 김동완	

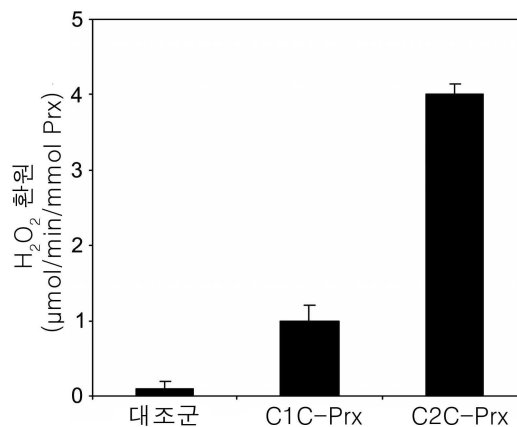
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 산화 스트레스 조건 하에서 분자 샤페론으로서 작용하는 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질

(57) 요약

본 발명은 종자의 휴면 상태를 조절하는 1-시스테인 퍼옥시레독신(1-Cys Prxs) 단백질이 산화 스트레스 조건 하에서 활성 시스테인 잔기가 과산화되면 분자 샤페론으로 기능 변화를 통해 종자의 발아 및 식물 성장을 촉진하는 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질에 관한 것이다.

대표도 - 도2b



(72) 발명자

김선영

경상남도 진주시 가호로 26, 가좌2 주공아파트 21
3동 1205호 (가좌동)

정영준

경상남도 진주시 향교로109번길 6-2, 3층 (옥봉동)

김미리

제주특별자치도 제주시 고마로13길 14,
태흥누리안@ 203호 (일도이동)

팽슬기

경상남도 마산시 산호동 314-43번지

강선빈

경상남도 김해시 분성로 155, 318동 807호 (외동,
한국2차아파트)

이은선

전라남도 순천시 도장길 40, 부영12차 아파트 120
1동 702호 (연향동)

이주형

경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 삼환나우빌
101동 1801호 (주약동)

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 배추(Brassica rapa) 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질에 있어서, 상기 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질은 종자의 휴면 상태를 조절하고 산화 스트레스 조건 하에서 활성 시스테인 잔기가 과산화되면서 분자 샤페론으로 기능 변화를 통해 종자의 발아와 식물의 생장을 촉진시킴을 특징으로 하는 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질은 아미노산 잔기 위치 46, 72 및 131에 보존된 시스테인 잔기를 포함하고, $0.8 \sim 1.2 \mu\text{mol/분/mmole}$ 효소로 H_2O_2 를 물로 환원시키는 낮은 퍼옥시다아제 활성을 지니는 특징으로 하는 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질은 산화 스트레스 조건 하에서 활성 시스테인 잔기가 과산화되어도 그 단백질의 입체 형태(conformation)에는 큰 변화가 없음을 특징으로 하는 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질

청구항 4

제 1항의 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질과 동일하게 산화 스트레스 조건 하에서 활성 시스테인 잔기가 과산화되면서 분자 샤페론으로 기능 변화를 통해 종자의 발아와 식물의 생장을 촉진시킴을 특징으로 하는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지닌 아라비도시스 탈리아나 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 종자의 휴면 상태를 조절하는 1-시스테인 퍼옥시레독신(1-Cys Prxs) 단백질이 산화 스트레스 조건 하에서 활성 시스테인 잔기가 과산화되면 분자 샤페론으로 기능 변화를 통해 종자의 발아 및 식물 생장을 촉진하는 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질에 관한 것이다. 또한 본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 배추(브라시카 라파) 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질의 서열 분석을 통해 보존적 시스테인 잔기 영역을 확인하고 그 단백질의 활성을 분석한 것이다.

배경 기술

[0002] 퍼옥시레독신(Prxs)은 박테리아부터 포유류까지 모든 유기체에 걸쳐 폭넓게 분포되어있는 티올-기반 퍼옥시다아제이다. 퍼옥시레독신은 과산화수소 및 알킬 하이드로퍼옥사이드를 각각 물 및 알코올로 환원시킴으로써 해독시킨다. 보존된 시스테인(Cys) 잔기의 수를 기초로 하여, 퍼옥시레독신은 1-Cys 퍼옥시레독신 그룹 또는 2-Cys 퍼옥시레독신 그룹으로 분류된다.

[0003] 대부분의 퍼옥시레독신은 2-Cys 퍼옥시레독신 그룹에 속하며 이들은 촉매 활성 작용에 참여하는 두 개의 보존된 시스테인 잔기를 포함한다. 2-Cys 퍼옥시레독신의 퍼옥시화 Cys 잔기는 기질의 환원에 필요하며 이는 Cys 잔기를 용해시켜 분자간- 또는 분자내- 디설파이드 가교의 형성을 초래한다. 그 뒤에 디설파이드는 다양한 다른 환

원 시스템에 의해 환원된다. 산화 스트레스 조건 하에서, 2-Cys 퍼옥시레독신은 설펜산 또는 설펜산으로의 퍼옥시화 Cys의 추가 산화를 통한 촉매 사이클 동안 가끔 H_2O_2 -의존적 불활성화를 겪으며, 이는 구조적 및 기능적 전환을 유도한다.

[0004] 그러나 1-Cys 퍼옥시레독신은 디설파이드의 결합의 형성을 위해 2-Cys 퍼옥시레독신에 필요한 용해성 Cys를 가지고 있지 않기 때문에 촉매 과정에서 글루타치온, 디티오프레이톨(DTT) 및 황화수소와 같은 전자 도너 포함-티올에 의해 재생되는 동안 1-Cys 퍼옥시레독신의 설펜산(sulfenic acid)이 형성된다. 티오레독신(Trx) 및 NADPH 티오레독신 환원효소(NTR)는 각 각 효모의 퍼옥시레독신 1p와 밀의 TaPER1를 위한 생물학적 환원제라고 확인되었다.

[0005] 1-Cys 퍼옥시레독신의 발현 수준은 종자 발달 말기에 유의미하게 증가하며, 휴면 상태를 유지하기 위해 저장되는 동안 성숙한 종자에서는 유지된다. 더욱이 스트레스 조건 하에서 1-Cys 퍼옥시레독신은 계속 발아를 억제하였다. 흥미롭게도 추정 이분 핵 위치 신호(NLS)는 식물 1-Cys 퍼옥시레독신의 C-말단에서 발견되었으며, 단백질은 미성숙한 배아의 핵 및 종자의 호분(aleurone)층 에 위치했다.

[0006] 따라서 이는 1-Cys 퍼옥시레독신이 산화 스트레스에 대항하여 종자 세포에 있어 핵 DNA의 보호에 부분적으로 기여한다는 것을 나타낸다. 종자 발아 및 식물 성장 동안 1-Cys 퍼옥시레독신의 퍼옥시화 Cys 잔기는 과산화 되며 식물이 색소체 설펜레독신(Srxs)을 함유하여도 이 메커니즘은 비가역적으로 작동된다.

[0007] 2-Cys 퍼옥시레독신에 대한 이전의 실험 결과를 고려하여 본 발명자들은 C1C-퍼옥시레독신의 새로운 기능을 특성화시켰다. 본 발명자들은 산화 스트레스 시 배추의 1-Cys 퍼옥시레독신은 분자 샤페론으로서 기능할 수 있다는 것을 확인함으로써 식물체 내에서 1-Cys 퍼옥시레독신이 이러한 분자 샤페론 기능을 통해 종자 발아와 식물 성장에 유용한 것임을 발견하고 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 해결하려는 과제는 1-Cys 퍼옥시레독신이 산화 스트레스에 대항하여 종자 세포에 있어 핵 DNA의 보호에 부분적으로 기여함을 측정코자 한 것이며 산화 스트레스 시 배추의 1-Cys 퍼옥시레독신은 분자 샤페론으로서 기능할 수 있다는 것을 측정함으로써 식물체 내에서 1-Cys 퍼옥시레독신이 이러한 분자 샤페론 기능을 통해 종자 발아와 식물 성장에 유용한 것임을 측정코자 한 것이다. 또한 아라비도시스 유래 1-Cys 퍼옥시레독신의 분자 샤페론 기능을 확인함으로써 1-Cys 퍼옥시레독신의 분자 샤페론 기능을 규명코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 배추(Brassica rapa) 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질에 있어서, 상기 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질은 종자의 휴면 상태를 조절하고 산화 스트레스 조건 하에서 활성 시스테인 잔기가 과산화되면서 분자 샤페론으로 기능 변화를 통해 종자의 발아와 식물의 성장을 촉진시키는 특징으로 하는 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질을 제공하는 것이다.

[0010] 이때 상기 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질은 아미노산 잔기 위치 46, 72 및 131에 보존된 시스테인 잔기를 포함하고, $0.8 \sim 1.2 \mu\text{mol/분/mmol}$ 효소로 H_2O_2 를 물로 환원시키는 낮은 퍼옥시다아제 활성을 지니는 특징으로 한다.

[0011] 또한 상기 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질은 산화 스트레스 조건 하에서 활성 시스테인 잔기가 과산화되어도 그 단백질의 입체 형태(conformation)에는 큰 변화가 없음을 특징으로 한다.

[0012] 한편 본 발명의 또다른 목적은 상기 배추 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질과 동일하게 산화 스트레스 조건 하에서 활성 시스테인 잔기가 과산화되면서 분자 샤페론으로 기능 변화를 통해 종자의 발아와 식물의 생장을 촉진시킴을 특징으로 하는 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지닌 아라비도시스 탈리아나 유래 1-시스테인 퍼옥시레독신 단백질을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 효과는 1-Cys 퍼옥시레독신이 산화 스트레스에 대하여 종자 세포에 있어 핵 DNA의 보호에 부분적으로 기여함을 확인코자 한 것이며 산화 스트레스 시 배추의 1-Cys 퍼옥시레독신은 분자 샤페론으로서 기능할 수 있다는 것을 측정함으로써 식물체 내에서 1-Cys 퍼옥시레독신이 이러한 분자 샤페론 기능을 통해 종자 발아와 식물 성장에 유용한 것임을 확인한 것이다. 이를 통해 종자 발아 및 식물 성장을 조절할 수 있는 1-Cys 퍼옥시레독신의 분자 샤페론 활성을 증진시킨 형질전환 식물을 제공하려는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 상이한 식물로부터의 1Cys-퍼옥시레독신의 서열 정렬 및 복제수의 조사 및 배추로부터의 C1C-퍼옥시레독신 유전자의 발현 패턴에 관한 것이다. (A)는 브라시카 캄페스트리스(C1C-Prx), 아라비도시스 탈리아나(CAA72804), 호르데움 볼가레(CAA54066), 트리티쿰 아에스티붐(AAQ74769), 브로무스 세카리누스(CAA44884), 오라이자 사티바(A:P52573, B:A2YP42) 및 제로파이타 비스코세(Q8S3K4)의 단백질 서열 정렬을 나타낸 것이다.

1-Cys 퍼옥시레독신의 퍼옥시화 Cys 잔기는 화살표에 의해 나타냈으며, 핵 위치 신호(NLS)는 선으로 나타내었다. 정렬은 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)을 이용하여 제공되었으며, GeneDoc (<http://www.nrbcs.org/gfx/genedoc/>)으로 시각화되었다. 어두운 박스는 식물의 1-Cys 퍼옥시레독신 단백질 중 상이한 보존 수준을 나타낸다(검은색 = 100%, 회색 = 80%, 밝은 회색 = 60%). (B)는 게놈 서던 블로팅 분석을 나타낸 것이다. 정제된 게놈 DNA 10 μ g는 Bgl II, Hind III 또는 Xba I로 분해되었다. 아가로스 겔 상에서 크기-분류와 막으로 이동 후, 상기 블롯은 [³²P]-표지된 C1C-퍼옥시레독신 코딩 지역으로 구성된 프로브로 혼성화되었다.

(C)는 다양한 조직에서 C1C-퍼옥시레독신의 단백질 수준은 항-C1C-퍼옥시레독신 항체로 프로브된 웨스턴 블로팅에 의해 분석된다는 것을 나타낸 것이다. (D)는 배추를 4 시간 동안 10 mM H₂O₂, 1 mM 디아미드, 1 mM t-BOOH로 처리 또는 고온 처리(37℃) 처리한 후, C1C-퍼옥시레독신의 단백질 수준을 (C)처럼 분석한 것을 나타낸 것이다.

도 2는 시험관 내에서 C1C-퍼옥시레독신의 항산화제 활성을 나타낸 것이다. (A)는 금속-촉매 산화(MOS) 시스템에서 불활성화로부터 다양한 농도에서 C1C-퍼옥시레독신 (□) 및 C2C-퍼옥시레독신 (■)에 의한 글루타민 신세타아제의 티올-특이적 보호를 나타낸 것이다. (B)는 C1C-퍼옥시레독신 및 C2C-퍼옥시레독신의 H₂O₂ 환원 활성이 전자 도너로서 DTT를 이용하여 PeroXOquant 시약으로 비색 반응시 560 nm에서 측정되는 것을 나타낸 것이다.

도 3은 분자 샤페론으로서 C1C-퍼옥시레독신 기능을 나타낸 것이다. C1C-퍼옥시레독신의 부재 (●)에 있어서 (A)는 45℃에서 MDH의 열 응집, (B)는 25℃에서 인슐린의 10 mM DTT-유도 화학적 응집을 나타낸 것이며, C1C-퍼옥시레독신의 존재시 3:1(■), 6:1(◆) 및 9:1 (▲)의 기질에 대한 C1C-퍼옥시레독신의 몰 비율에서 측정되었다. C1C-퍼옥시레독신은 대조군으로서 3 μ M C2C-Prx (□) 또는 3 μ M BSA (○)으로 대체되었다. (C)는 열 (■) 또는 화학적 (□) 응집에 반하는 C1C-퍼옥시레독신 및 C2C-퍼옥시레독신의 예방 활성이 3:1의 몰비율에서 비교됨을 나타낸 것이다.

도 4는 C1C-퍼옥시레독신에 대한 과산화 효과를 나타낸 것이다. (A)는 C1C-퍼옥시레독신의 과산화 분석을 나타낸 것이다. 과산화 반응은 본 발명의 실시예에 기술된 바와 같이 실시된다. Sephadex G-50 컬럼을 통한 투석 후

에, 각 샘플의 2 μ g는 2차원 겔 분석되었다. 상부 패널은 대조군 샘플($-H_2O_2$)이며; 하부 패널은 과산화수소-처리 샘플($+H_2O_2$)이다.

(B)는 과산화된 C1C-퍼옥시레독신의 면역 분석을 나타낸 것이다. 웨스턴 블롯팅 분석을 위해, 정제된 C1C-퍼옥시레독신 (-) 및 과산화된 C1C-퍼옥시레독신 (+) 50 ng은 SDS-PAGE되었으며 C1C-Prx에 대한 α -C1C-퍼옥시레독신 항체 또는 특이적으로 과산화된 C1C-퍼옥시레독신과 교차반응하는 항-hPrx6-SO₂H 항체와 프로브되었다.

(C)는 C1C-퍼옥시레독신의 퍼옥시다아제(■) 및 사페론(□) 활성이 과산화 전(C1C-Prx) 또는 후(C1C-Prx-SO₂H)와 비교된 것을 나타낸 것이다. 과산화 전의 활성은 100%로 설정하였다. (D)는 정제된 C1C-퍼옥시레독신 (-) 및 과산화된 C1C-퍼옥시레독신이 10% 천연-PAGE(상부 패널) 또는 12% SDS-PAGE(하부 패널) 겔에 의해 분리되는 것과 쿠마시 염색되는 것을 나타낸 것이다. (E 및 F)는 과산화 전(○)과 후(●)의 원-자외선 CD 스펙트럼(E)과 고유 Trp 형광 스펙트럼(F)이 본 발명의 실시예에 기술된 바와 같이 측정됨을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 퍼옥시레독신은 알킬 하이드로퍼옥사이드를 알코올로 환원시키고 과산화수소를 물로 환원시키는 촉매로서의 산화 효소이다. 1-Cys 퍼옥시레독신(1-Cys Prxs)은 식물에서 종자 발달 후반기에 중요한 역할을 수행한다. 식물에서 이들의 생화학적 기능을 특성화하기 위해서, 1Cys-Prx 유전자는 배추의 cDNA 라이브러리로부터 클로닝되었으며 “C1C-Prx”로서 표시된다.

[0016] C1C-Prx는 아미노산 잔기 위치 46에 보존된 Cys잔기와 함께 아미노산 위치 72 및 131에 두 개의 추가적인 시스테인(Cys) 잔기를 포함하고 있다. 글루타민 신세타아제(GS) 보호 및 과산화수소 환원 에세이는 C1C-Prx가 퍼옥시다아제로서 활성을 지니나, 이 활성은 배추에서 2-Cys Prx라고 이미 알려진 C2C-Prx의 활성과 비교시 매우 약하다는 것을 나타냈다.

[0017] 또한 C1C-Prx는 말레이트 탈수소효소의 열- 또는 화학적-유도 응집을 예방하나 효율성은 C2C-Prx보다는 낮다. 과산화수소 처리는 2차원 겔 상에서 C1C-Prx의 이동성을 변화시키며 이는 보존된 Cys 잔기의 과산화를 의미한다. 더욱이 과산화 후, C1C-Prx의 사페론 활성은 거의 2배정도 증가하였으나 퍼옥시다아제 활성은 효소가 존재하지 않는 반응 혼합물의 기저 수준으로 감소하였다.

[0018] 그러나 원-자외선 원편광 이색성 스펙트럼, 내인성 트립토판 형광 스펙트럼 및 천연-PAGE를 사용한 구조 분석에 따르면, 과산화는 C1C-Prx의 입체 형태 변화를 유도하지는 않는다. 따라서 본 발명자들은 1-Cys Prxs는 종자 발아 및 식물 발달 동안 광적인 조건 하에서 분자 사페론으로 작용할 뿐만 아니라 가벼운 산화 스트레스를 경감시킴을 측정하였다. 또한 과산화는 퍼옥시다아제로부터 분자 사페론까지 1-Cys Prxs의 기능적 전환을 조절한다.

[0019] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0020] 배추 1 Cys-Prx (C1C-Prx)의 특성화

[0021] 배추 종자의 cDNA 라이브러리는 프로브로서 RIC-Prx인 짝 1Cys-Prx 유전자로 스크리닝되었다. 이 스크리닝을 위해, 1Cys-Prx 유전자가 만들어졌으며 클로닝되었다. 이들의 전체-길이 뉴클레오타이드 서열을 측정 한 후에, 이 유전자는 “C1C-Prx”라고 칭했다. 뉴클레오타이드 서열은 845 bp로 구성되었으며 서열번호: 1로 나타나는 216개 아미노산의 단일 폴리펩티드에 대응하는 651 bp의 오픈 리딩 프레임 1개를 포함한다(도 1A). C1C-Prx의 아미노산 서열은 다양한 식물로부터의 1-Cys Prx 아미노산 서열과 높은 서열 유사성을 나타냈으나 서열번호: 2로 나타나는 아라비도시스 1-Cys 퍼옥시레독신(90%)과 보리 1-Cys 퍼옥시레독신(71%)에서 가장 높은 유사성을 나타냈다. 흥미롭게도 C1C-Prx는 아미노산 잔기 위치 46 및 아미노산 잔기 위치 72와 131에 2개의 추가 Cys 잔기를 포함하고 있으며 더욱이 아라비도시스의 Atper1의 46 위치에 Cys에 해당하는 위치 46의 Cys는 모든 Prx

단백질에 보존되어 있다.

[0022] 복제 수 및 C1C-Prx의 유전자 발현

[0023] C1C-Prx의 코딩 지역은 [^{32} P]로 표지되었으며 배추 게놈에서 1-Cys-Prx의 복제 수를 측정하기 위한 서던 블롯팅 분석을 위한 프로브로서 사용되었다. 게놈 DNA를 3개의 상이한 제한 효소, *Bgl* II, *Hind* III 또는 *Xba* I로 분해시킬 때 C1C-Prx의 서열은 분열되지 않으며, 2개 또는 3개의 분해된 단편들이 프로브와 혼성화되고 이는 배추 게놈 내에 1-Cys-Prx 유전자의 여러 복사본이 존재함을 의미한다(도 1B).

[0024] 식물에서 C1C-Prx의 역할을 조사하기 위하여, 본 발명자들은 처음으로 다양한 조건 하에서 C1C-Prx 단백질 발현을 확인하였다. 전체 단백질은 스트레스-처리 배추 묘목으로부터 추출되었으며, 웨스턴 블롯팅 분석은 항-C1C-Prx 항체를 사용하여 실시되었다(도 1D). 산화 스트레스와 고온 처리는 C1C-Prx 수준을 변화시키지 않았다. C1C-Prx의 기관-특이적 발현 분석은 종자-특이적 패턴을 나타냈다(도 1C).

[0025] 퍼옥시다아제로서 C1C-Prx의 기능

[0026] 퍼옥시다아제는 일반적으로 산화 스트레스를 완화시키는 항산화제로서 작용하는 티올-기반 퍼옥시다아제이기 때문에 C1C-Prx의 항산화제/퍼옥시다아제 활성이 연구되었다. DTT/ $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2$ 의 존재시, 글루타민 신세타아제(GS)는 이전에 H.Z. Chae, S.J. Chung, and S.G. Rhee, Thioredoxin-dependent peroxide reductase from 5 yeast, J. Biol. Chem. 269 (1994)에 기술된 바와 같이 하이드록시 라디칼의 생성에 의해 불활성화되나, C1C-Prx의 첨가는 용량-의존적으로 불활성을 억제한다. 하지만 완전한 억제에 요구되는 C1C-Prx의 용량은 요구되는 C2C-Prx의 양보다 거의 5배이다(도 2A).

[0027] 또한 C1C-Prx의 퍼옥시다아제 활성은 페릭스 산화-자일레놀 오렌지(FOX) 분석에 의해 측정되나 이것은 H_2O_2 에 의한 철 이온(Fe^{2+})의 산화시 자일레놀 오렌지에 의한 착색된 콤플렉스의 생성을 기반으로 하고 있다. C1C-Prx와 C2C-Prx 모두는 H_2O 의 H_2O_2 의 환원을 촉매화하나, C1C-Prx는 C2C-Prx 보다 훨씬 낮은 효율성을 보였다. 한편 보바인 혈청 알부민(BSA)은 반응을 매개하지는 않는다(도 2B).

[0028] 분자 샤페론으로서 C1C-Prx의 기능

[0029] 퍼옥시다아제로서 C1C-Prx의 낮은 효율성을 고려하여, 본 발명자들은 퍼옥시다아제 및 샤페론으로서 2-Cys Prxs의 이중 기능과 비슷한 또 다른 기능을 할 수도 있다는 가능성을 연구하였다. 본 발명자들은 기질로서 MDH 및 인슐린을 사용하여 C1C-Prx의 샤페론 활성을 측정하였다. 놀랍게도 C1C-Prx의 첨가는 양성 대조군인 C2C-Prx만큼 효율적으로 45°C에서 MDH의 열 응집을 양-의존적으로 예방하였으며, 응집은 서브유닛 몰 비율 1 MDH/ 9 C1C-Prx에서 완전히 차단되었다(도 3A). 기질로서 인슐린 β -체인을 지니는 C1C-Prx 샤페론 기능의 분석은 C1C-Prx가 기질의 화학적-유도 응집을 예방한다는 것으로 밝혀졌다(도 3B). 이 결과는 C1C-Prx가 변성으로부터 다양한 단백질 기질을 보호한다는 것을 나타낸다. 대조적으로 본 발명자들이 반응 혼합물의 C1C-Prx를 음성 대조군인 BSA로 대체하였을 때, MDH도 인슐린도 검출되지 않았으며, 이는 샤페론 활성이 C1C-Prx의 특이적 속성이라는 것을 나타낸다. 하지만 C1C-Prx는 C2C-Prx만큼 효율적인 샤페론은 아니다; C1C-Prx 샤페론 활성은 C2C-Prx의 활성에 비해 1/3 정도이다(도 3C).

[0030] 과산화 및 C1C-Prx 기능의 변화

[0031] 밀 TaPER1의 과산화 효과는 잘 특성화되었다. 과산화되었을 때 퍼옥시화 Cys 잔기는 이들의 설피닐 및 설포닐 형태로 보존되었으며 그 결과 2차원 겔에서 검출될 수 있는 등전점의 변화를 일으켰다. C1C-Prx가 과산화되는지 여부를 분석하기 위해서, 재조합 1-Cys Prx 단백질은 H_2O_2 이 존재하는 상태에서 배양되었으며, 산화 상태는 면역 블롯팅에 의해 이차원 겔 상에서 분석되었다. H_2O_2 의 부재시, C1C-Prx 분자의 대부분은 단 하나의 점으로서 대응하는 환원 형태로 이차원 겔 상에서 검출되었다.

[0032] 대조적으로 H_2O_2 의 존재시, C1C-Prx의 유의미한 양은 이동 시프트를 나타냈으며, 이는 과산화가 설핀산 또는 설폰산 형태의 퍼옥시화 Cys 잔기의 변화를 초래했다는 것을 암시한다(도 4A). C1C-Prx의 H_2O_2 -유도 과산화는 항-hPrx6-SO₂H 항체를 사용하여 면역 블롯팅 분석에 의해 확인되었다. 항-hPrx6-SO₂H 항체는 hPrx6 또는 C1C-Prx의 퍼옥시화 Cys 잔기의 설피닐 및 설포닐 형태를 특이적으로 인식한다(도 4B).

[0033] 이전의 몇몇 연구는 2-Cys Prxs의 과산화가 구조적 기능적 변화를 유도한다는 것을 보고하였다. C1C-Prx도 H_2O_2 에 의해 과산화되기 때문에, C1C-Prx의 기능적 변화의 가능성이 증가되었다. 이 가설을 확인하기 위해서, C1C-Prx의 퍼옥시다아제 및 샤페론 활성은 H_2O_2 처리 전후와 비교되었다. 과산화 후, C1C-Prx의 퍼옥시다아제 활성은 크게 감소하였으며, 반면에 C1C-Prx의 샤페론 활성은 상당히 증가하였다(도 4C). 이 결과는 C1C-Prx의 기능적 이행은 C1C-Prx의 산화 상태에 의해 조절된다는 것을 나타낸다.

[0034] 과산화로 인한 C1C-Prx의 구조적 변화와 퍼옥시다아제부터 샤페론까지의 기능 변화 사이의 관계를 연구하기 위해서, C1C-Prx의 단백질 구조는 원-자외선 CD 스펙트럼, 트립토판 형광 및 천연-PAGE를 분석하여 분석되었다. 과산화 전에 C1C-Prx의 원-자외선 CD 스펙트럼은 208 nm 및 22 nm에서 2개의 상이한 최소치를 나타냈으나, 이 스펙트럼은 과산화 후에는 222 nm에서 확실한 최소치를 나타내었다. 이 결과는 과산화 전 18.5% 에서부터 과산화 후 6.9% 까지 단백질의 α-나선형 함량의 근소한 변화를 나타낸다(도 4E). Trp 잔기에 의한 단백질의 고유 형광 방출도 단백질의 올리고머화 상태도 과산화에 의해 유의미하게 변화되지는 않았다(도 4D, F).

[0035] 종자 발달과 종자 발아하는 동안 다량의 활성 산소종(ROS)이 생성되며 이는 식물 세포에 해로울 수 있다. ROS 스트레스를 완화시키기 위해서 종자 세포는 과산화물 제거효소(SOD), 카탈라아제 및 퍼옥시레독신을 포함하는 훌륭한 항산화제 시스템을 갖추고 있다. 퍼옥시레독신 시스템에서, 1-Cys 퍼옥시레독신은 '휴면-관련 단백질'로서 확인되었으며, 이들 유전자는 미성숙한 배아의 핵 및 종자의 호분층에서 특이적으로 발현되었다. 식물 종자에서 1-Cys 퍼옥시레독신의 역할을 연구하기 위해서, C1C-Prx가 쌀 1-Cys Prx 유전자인 R1C-Prx과 높은 서열 상동성을 기초로 하고 있는 배추로부터 클로닝되었으며, 인코딩된 단백질의 구조적 기능적 특징이 실험되었다.

[0036] 본 발명자들은 C1C Prx가 종자에서 특이적으로 발현된다는 것(도 1C)과 발현된 단백질이 세포의 핵과 세포질 모두에 위치한다는 것을 밝혔다. 이 C1C Prx의 패턴은 1-Cys Prx 유전자 패밀리에 상응하는 이전의 보고와 일치한다. 하지만 하나의 복사본 이상이 쌀과 같은 배추 계통에서 검출되었다(도 1B). 체내에서 1-Cys Prxs의 생리학적 중요성은 형질전환 아라비도시스 및 토마토 식물에서 이전에 연구되었다. 이 연구는 1-Cys Prxs가 종자 휴면과 관련되어 있지는 않으나 대신에 발아를 억제하고 적합하지 않은 조건 하에서 식물에 저항성을 부여한다는 것을 나타낸다. 사실 1-Cys Prxs는 스트레스 하에서 세포 보호에 많은 역할을 하였다. 1-Cys Prx 유전자가 없어진 *prx1p* 효모 세포는 야생형 세포와 비교시 열 충격과 외인성 H_2O_2 에 더욱 민감함을 보였다. 다른 한편으로는 세포가 산화 스트레스를 받았을 때 *E. coli*의 아라비도시스 1-Cys Prx 유전자인 *AtPer1*의 이소성 발현은 2-Cys Prxs와 비슷하게 세포의 생존율을 증가시켰다. 더욱이 *Xerophyta viscosa* Baker에서 1-Cys Prx의 증가된 발현은 고온 및 염도와 같은 비생물적 스트레스에 대항하여 식물에 저항성을 부여하였다.

- [0037] 세포의 보호를 담당하는 1-Cys-Prxs의 기능은 무엇인가라는 질문에 답하기 위해서, 본 발명자들은 먼저 C1C-Prx의 항산화제 활성을 실험하였다. 제조한 C1C-Prx 단백질은 H_2O_2 를 제거하였으나 이것의 효율은 시험관내 C2C-Prx(도 2)와 C-PrxII(자료에는 나타내지 않음) 비교시 매우 낮은 편이었다. 이 결과는 Atp1에 대한 이전의 결과와 일치한다.
- [0038] 1-Cys Prx가 낮은 항산화제 활성으로 인해 단독으로 식물에 이러한 많은 저항성을 부여하는 것이 가능한지 여부는 이 세포가 2-Cys Prxs, 퍼옥시다아제 및 카탈라아제를 포함하는 산화 스트레스를 완화시키는 많은 효율적인 시스템을 갖고 있기 때문이다.
- [0039] 따라서 본 발명자들은 1-Cys Prxs가 또 다른 잘 알려진 세포 보호 시스템인 샤페론 활성을 가지고 있는지 가능성을 생각하였다. 본 발명자들의 실험은 C1C-Prx1가 MDH의 열 응집뿐만 아니라 인슐린의 화학적 응집을 예방한다는 것을 밝혔다(도 2). 이 결과는 C1C-Prx1가 퍼옥시다아제 및 분자 샤페론으로서 이중 기능을 한다는 것과 적합하지 않은 조건 하에서 단백질 변성의 예방은 1-Cys Prxs의 중요한 역할이라는 것을 나타낸다.
- [0040] 촉매 사이클 동안, 2-Cys Prxs의 특이적 Cys 잔기는 과산화되며, 이는 구조적 및 기능적 변화를 유도하는 것으로 예상된다. 마찬가지로 본 연구에서 C1C-Prx는 H_2O_2 처리에 의해 과산화되는 것으로 밝혀졌으나(도 4), 과산화 후 형태 변화는 유의미하지 않았으며 이는 2-Cys Prxs의 경우와는 약간 다르다. 하지만 놀랍게도 이것의 기능은 과산화에 의하여 퍼옥시다아제부터 샤페론까지 전환된다. 특이적으로 퍼옥시다아제 활성은 사라지나 샤페론 활성은 과산화 후에 2배 증가하였다.
- [0041] 종합해 보면 이 결과는 C1C-Prx의 낮은 퍼옥시다아제 활성은 정상 조건 하에서 종자 발달과 발아동안 유전자 발현의 통제를 위해 중요하지만, 샤페론 활성이 스트레스 조건 하에서 식물에 보호에 결정적인 역할을 한다는 것을 나타낸다. 또한 기능적 이행은 세포의 산화 상태에 의해 조절된다. 열 스트레스 또는 산화 스트레스 하의 종자에서 일정 단백질 발현 수준을 생각해 보면(도 1), 이들 이중 기능 사이에서 전이하는 능력은 C1C-Prx의 주요한 장점이며, 과산화는 마스터 컨트롤러인 것으로 여겨진다.
- [0042] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0043] (실시예 1) 클론
- [0044] 본 실험에 사용된 쌀 유전자 R1C-Prx(1Cys-Prx)를 포함하는 클론이 MAFF (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries) DNA बैं크, 일본(GenBank 수탁번호 C19186)으로부터 친절하게 기증되었다.
- [0045] (실시예 2) 배추로부터의 C1C-Prx 유전자의 클로닝
- [0046] cDNA 발현 라이브러리(Stratagene, La Jolla, CA, USA)는 λ ZAP II 벡터 및 배추(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) 종자로부터 mRNA를 사용하여 컨스트럭트되었다. 뒤이어 이 라이브러리는 프로브로서 R1C-Prx 유전자를 사용하여 스크리닝되었으며, 포지티브 플라크로부터 cDNA 삽입은 ExAssist 조력 파지(Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 이용하여 체내 절제에 의해 회복되었다. 이 결과로 만들어지는 포지티브 클론으로부터의 cDNA 서열은 양쪽 가닥으로부터 측정되었다.

- [0047]
- [0048] (실시예 3) *E. coli*에서 단백질의 발현
- [0049] *E. coli*에서 C1C-Prx의 발현에 대한 C1C-Prx 유전자의 오픈 리딩 프레임은 pGEX2T 발현 벡터로 클로닝되었다. 이 결과로 만들어지는 컨스트럭트인 pGEX-C1C-Prx은 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS으로 도입되었다. 글루타치온 S-트랜스퍼라아제(GST)-융합 C1C-Prx은 C1C-Prx-아가로스 컬럼을 사용하여 GST 및 C1C-Prx의 융합에 의해 수득되었으며 뒤이어 GST를 제거하기 위해 트롬빈이 투여되었다.
- [0050] (실시예 4) 퍼옥시다아제 및 샤페론 활성 분석
- [0051] H.Z. Chae, S.J. Chung, and S.G. Rhee, Thioredoxin-dependent peroxide reductase from 5 yeast, J. Biol. Chem. 269 (1994)에 기술된 바와 같이 DTT/Fe³⁺/O(티올-포함 금속-촉매화 시스템)의 존재시 글루타민 신세타아제(GS)의 불활성을 억제하는 단백질의 능력을 측정함으로써 C1C-Prx의 티올-의존적 항산화제 활성이 확인되었다. 더욱이 항산화제 활성은 이전에 기술된 바와 같이 PeroXOquant 정량적 퍼옥사이드 분석 키트(Pierce Chemicals, Rockford, IL)를 사용하여 비색 반응(colorimetric reaction)에서 H₂O₂의 농도의 감소를 측정함으로써 테스트되었다.
- [0052] 열- 또는 화학-유도적 응집은 C1C-Prx 및 C2C-Prx의 다양한 농도에서 기질로서 말살 탈수소효소(MDH) 또는 인슐린을 지닌 샤페론 활성을 측정하기 위해 이용되었다. 기질의 응집은 H.H. Jang 등이 Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function, Cell 117 (2004)에 기술한 바와 같이 DU850 분광광도계의 650 nm에서 혼탁도 증가를 모니터링함으로써 측정되었다.
- [0053] (실시예 5) C1C-Prx의 과산화 분석
- [0054] 100 mM 포스페이트 완충용액(pH 7.0)에서 4 μM 농도의 재조합 C1C-Prx가 10 mM H₂O₂가 존재하거나 없는 조건에서 1시간 동안 배양되었다. 샘플에서 프리 H₂O₂는 크기 배제 원심분리 필터(Bio-GelP-6, Bio-Rad)를 사용하여 제거되었다. 샘플을 이용하여 2-차원 겔 분석과 SDS- 또는 천연-PAGE 실험을 실시하였고 뒤이어 쿠마시 블루 염색을 실시하였다.
- [0055] (실시예 6) 원편광 이색성(CD) 분광법 및 트립토판 형광 스펙트럼 분석
- [0056] C1C-Prx 및 10 mM 나트륨 포스페이트 완충용액(pH 7.4)에서 과산화된 C1C-Prx에 [16]에 기술된 바와 같이 Jasco J-815 분광편광계(Jasco, Great Dunmow, 영국)를 이용하여 원-자외선 원편광 이색성(CD) 스펙트럼 분석이 실시되었다. 10 mM 나트륨 포스페이트 완충용액(pH 7.4)에서 100 μg/ml C1C-Prx의 트립토판 형광 스펙트럼은 295 nm의 여기 파장 SFM25 분광형광계(Kontron, Germany)로 기록되었다. 모든 실험은 적어도 3회 반복되었으며, 자료는 표준편차(SD)와 평균값을 나타낸다.
- [0057] (실시예 7) 게놈 서던 블롯팅 및 웨스턴 블롯팅 분석
- [0058] 서던 블로팅 분석을 위해, 게놈 DNA가 이전에 기술된 바와 같이 14일령의 배추 묘목으로부터 추출되었다. 정제

된 게놈 DNA(10 µg)는 각기 제한효소 *Bgl* II, *Hind* III, 및 *Xba* I로 완전히 분해(digest)되었으며, 이 결과로 만들어진 DNA 절편은 0.8% 아가로스 겔 상에서 분리되었으며 나일론 막(Hybond N⁺, Amersham)으로 이동되었다. UV 가교 결합(cross-linking) 후에, 막은 혼성을 위해서 ³²P-표지된 *CIC-Prx* cDNA 프로브로 밤새 배양되었다.

[0059]

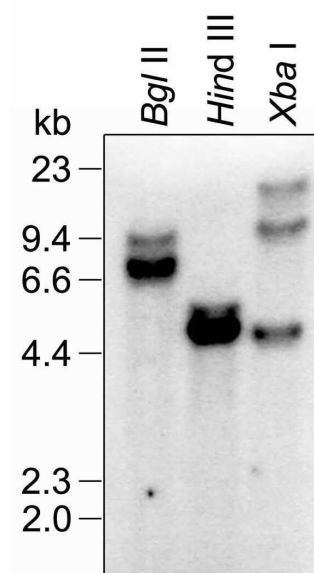
웨스턴 블롯팅 분석을 위해 5일령의 배추 묘목이 10 mM H₂O₂, 1 mM 디아미드, 1 mM t-BOOH, 또는 열 (37°C)에서 4시간 동안 스트레스를 받았다. 이것과 동일한 절차가 5개의 상이한 조직으로부터 샘플을 준비하기 위해서 이용되었다: 떡잎, 잎, 뿌리, 꽃 및 종자. 이들 식물 샘플로부터 추출된 전체 단백질을 이전에 기술된 바와 같이 웨스턴 블롯팅을 수행하기 위해서 사용되었다.

도면

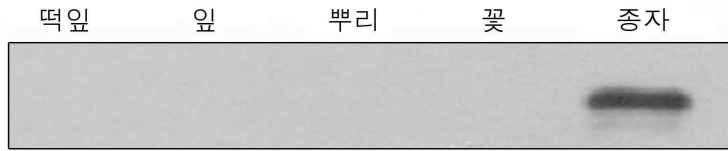
도면1a

<i>Brassica campestris</i>	MPGITLGDIVPNLEVTTHKNEKLHDYFADSWTVLFSHPGDFTPVCTTELAMAKYAHEFEQKRGVKLLGLSCDDI	75
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MPGITLGDIVPNLEVTTHKNEKLHDYFADSWTVLFSHPGDFTPVCTTELAMAKYAHEFEQKRGVKLLGLSCDDV	75
<i>Hordeum vulgare</i>	MPGLTIGDTPNLELDSTHGKIRIHDYVGNFYVILFSHPGDFTPVCTTELAAMANYAKEFEKRGVKLLGLSCDDV	75
<i>Triticum aestivum</i>	MPGLTIGDTPNLELDSTHGKIRIHDYVGNFYVILFSHPGDFTPVCTTELAAMANYAKEFEKRGVKLLGLSCDDV	75
<i>Bromus secalinus</i>	-----STHGKIRIHDYVGNFYVILFSHPGDFTPVCTTELAAMANYAKEFEKRGVKLLGLSCDDV	59
<i>Oryza sativa-A</i>	MPGLTIGDTPNLELDSTHGKIRIHDYVGNFYVILFSHPGDFTPVCTTELAAMAGYAKEFEKRGVKLLGLSCDDV	75
<i>Oryza sativa-B</i>	MPGLTLGDIVPDLELDSTHGKIRLHDFVCDAYVILFSHPGDFTPVCTTELSMAGYAGEFEKRGVKLLGLSCDDV	75
<i>Xerophyta viscosa</i>	MPGLTIGDTPNLELDTTGRIRIHDYVGNFYVILFSHPGDFTPVCTTELGMMAAYADEFSKRGVKLLGLSCDDV	75
<i>Brassica campestris</i>	QSHKDWIKDIEAFTPGSKVTYPIADPNKEIIPQLNMIDPIENG-----PSRALHIVGPDCKIKLSFLYPSTTG	144
<i>Arabidopsis thaliana</i>	QSHKDWIKDIEAFNFGSKVNYPIADPNKEIIPQLNMIDPIENG-----PSRALHIVGPDCKIKLSFLYPSTTG	144
<i>Hordeum vulgare</i>	QSHKDWIKDIEAYKPGSKVTYPIADPPDRSAIKQLNMVDPDEKD-AEGQLPSRTLHIVGPDCKVKSFLYPSTG	149
<i>Triticum aestivum</i>	QSHKDWIKDIEAYKPGSKVTYPIADPPDRSAIKQLNMVDPDEKD-AEGQLPSRTLHIVGPDCKVKSFLYPSTG	149
<i>Bromus secalinus</i>	QSHKDWIKDIEAYKPGSKVTYPIADPPDRSAIKQLNMVDPDEKD-AEGQLPSRTLHIVGPDCKVKSFLYPSTG	133
<i>Oryza sativa-A</i>	QSHKDWIKDIEAYKPGNRVTYPIADPPDRSAIKQLNMVDPDEKDSNGGHLPSRALHIVGPDCKVKSFLYPACVG	150
<i>Oryza sativa-B</i>	QSHKDWIKDIEAYKPGNRVTYPIADPPDRSAIKQLNMVDPDEKDTAGGELPSRALHIVGPDCKVKSFLYPACVG	150
<i>Xerophyta viscosa</i>	QSHKDWIKDIEAYTPGCHVKYPIADPPDRSAIKQLNMVDPDETESKCAVPSRALHIIGPDCKRIKLSFLYPSTG	150
<i>Brassica campestris</i>	RNMDEVLRALDSLLMAAKHKNKIATPVNWKPEEVEVVISPAVSDBEAKKLFPOGFETADLPSSKGYLRFTVVS	216
<i>Arabidopsis thaliana</i>	RNMDEVLRALDSLLMAAKHKNKIATPVNWKPEEVEVVISPAVSDBEAKKMFPOGFETADLPSSKGYLRFTVVS	216
<i>Hordeum vulgare</i>	RNMDEVVRAVDSLLTAAKHK--VATPANWKPGEVVIAPGVSDDEAKKMFPOGFETADLPSSKGYLRFTKV-	218
<i>Triticum aestivum</i>	RNMDEVVRAVDSLLTAAKHK--VATPANWKPGEVVIAPGVSDDEAKKMFPOGFETADLPSSKGYLRFTKV-	218
<i>Bromus secalinus</i>	RNMDEVVRAVDSLLTAAKHK--VATPANWKPGEVVIAPGVSDDEAKKLFPOGFETADLPSSKGYLRFTKV-	202
<i>Oryza sativa-A</i>	RNMDEVVRAVDSLLTAAKHA--VATPVNWKPGERVVIEPVSDDEAKEFPPOGFETADLPSSKGYLRFTKVG	220
<i>Oryza sativa-B</i>	RNMDEVLRALDSLLTAARHR--VATPVNWKPGERVVIEPVSDDEAKARFPAGFETAQLPSNKCGLRFTQVD	220
<i>Xerophyta viscosa</i>	RNMDEVLRALDSLLTAQAAHK--VATPANWKPGEVVIAPGVSDDEAKKLFPOGYKSVLDLPSSKGYLRFTNV-	219

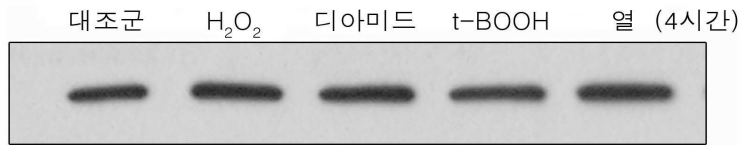
도면1b



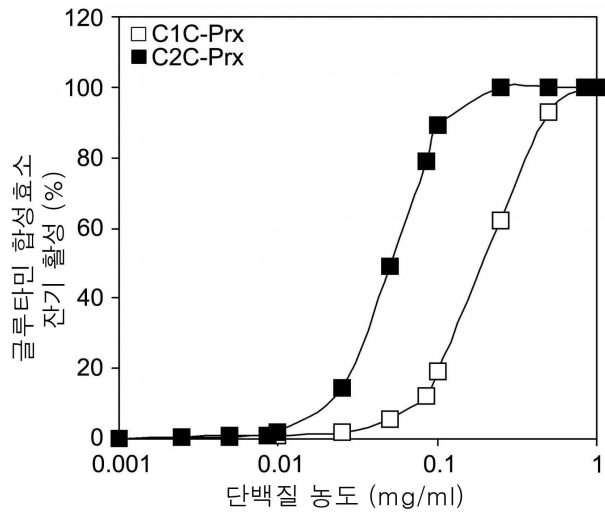
도면1c



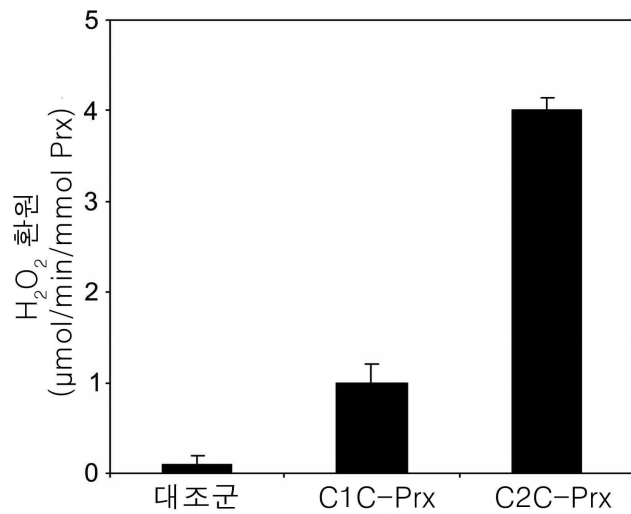
도면1d



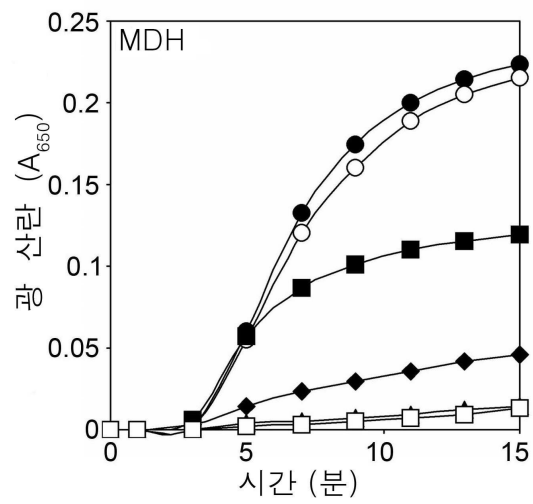
도면2a



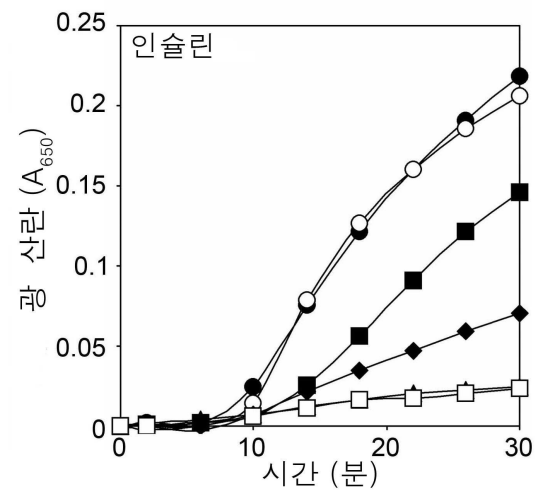
도면2b



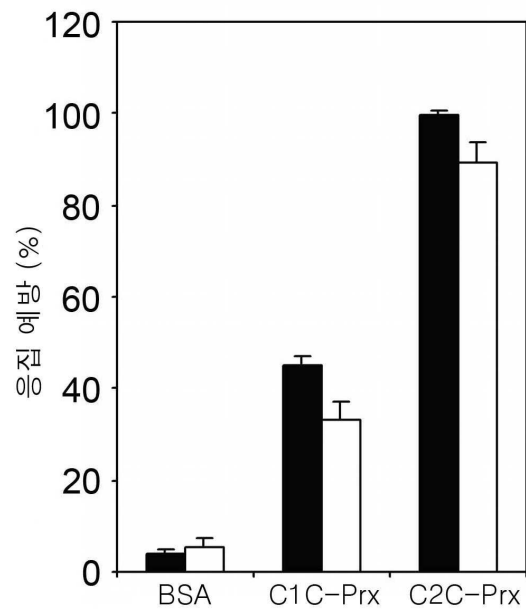
도면3a



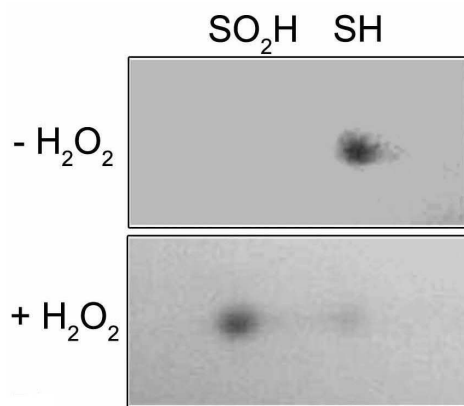
도면3b



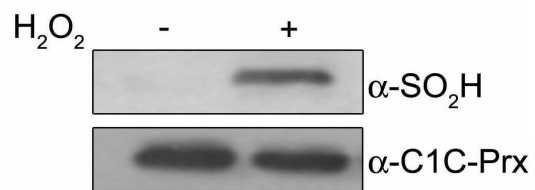
도면3c



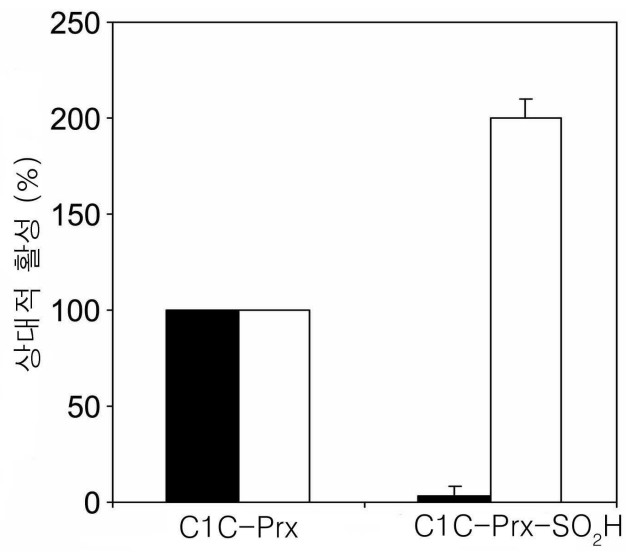
도면4a



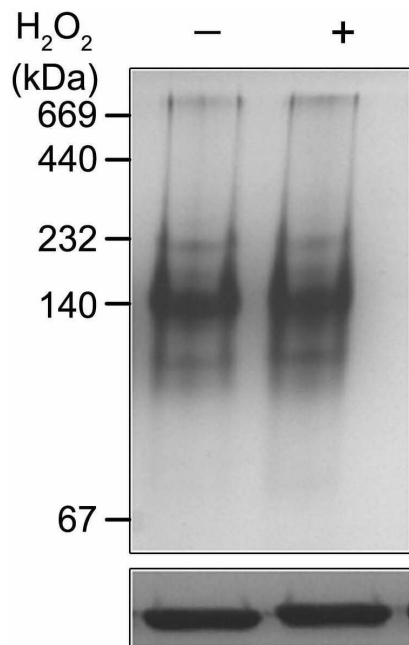
도면4b



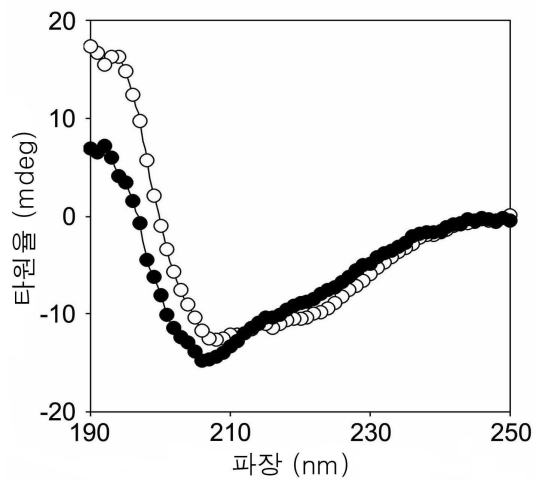
도면4c



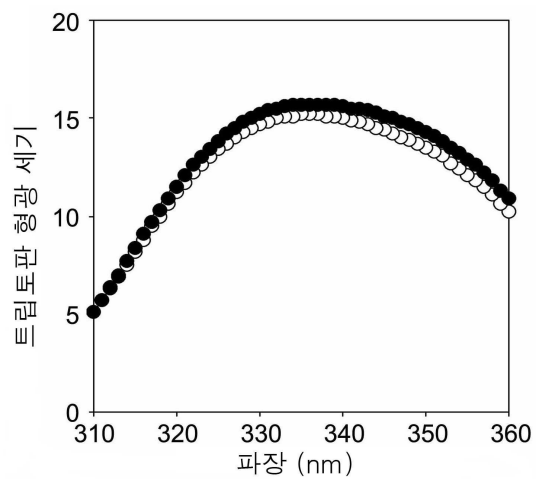
도면4d



도면4e



도면4f



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> 1-Cysteine peroxiredoxin protein functioned as a molecular
chaperone under oxidative stress conditions

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 216

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 1

Met Pro Gly Ile Thr Leu Gly Asp Thr Val Pro Asn Leu Glu Val Glu

1

5

10

15

Thr Thr His Lys Asn Phe Lys Leu His Asp Tyr Phe Ala Asp Ser Trp

20 25 30

Thr Val Leu Phe Ser His Pro Gly Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr Thr

35 40 45

Glu Leu Gly Ala Met Gly Lys Tyr Ala His Glu Phe Glu Gln Arg Gly

50 55 60

Val Lys Leu Leu Gly Leu Ser Cys Asp Asp Ile Gln Ser His Lys Asp

65 70 75 80

Trp Ile Pro Asp Ile Glu Ala Phe Thr Pro Gly Ser Lys Val Thr Tyr

85 90 95

Pro Ile Ile Ala Asp Pro Asn Lys Glu Ile Ile Pro Gln Leu Asn Met

100 105 110

Ile Asp Pro Ile Glu Asn Gly Pro Ser Arg Ala Leu His Val Val Gly

115 120 125

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

130 135 140

Arg Asn Met Asp Glu Val Leu Arg Ala Leu Asp Ser Leu Leu Met Ala

145 150 155 160

Ala Lys His Lys Asn Lys Ile Ala Thr Pro Val Asn Trp Lys Pro Asp

165 170 175

Glu Pro Val Val Ile Ser Pro Ala Val Ser Asp Glu Glu Ala Lys Lys

180 185 190

Leu Phe Pro Gln Gly Phe Lys Thr Ala Lys Leu Pro Ser Lys Lys Gly

195 200 205

Tyr Leu Arg Val Ala Asp Val Ser

210 215

<210> 2

<211> 216

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Pro Gly Ile Thr Leu Gly Asp Thr Val Pro Asn Leu Glu Val Glu

1 5 10 15
 Thr Thr His Asp Lys Phe Lys Leu His Asp Tyr Phe Ala Asn Ser Trp
 20 25 30
 Thr Val Leu Phe Ser His Pro Gly Asp Phe Thr Pro Val Cys Thr Thr
 35 40 45
 Glu Leu Gly Ala Met Ala Lys Tyr Ala His Glu Phe Asp Lys Arg Gly
 50 55 60
 Val Lys Leu Leu Gly Leu Ser Cys Asp Asp Val Gln Ser His Lys Asp
 65 70 75 80

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

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