(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0085420
(43) 공개일자 2010년07월29일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0004689
(22) 출원일자 2009년01월20일
심사청구일자 2009년01월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
황병국
서울 강남구 역삼2동 개나리아파트 42동 303호
김대성
광주광역시 동구 계림동 239-44번지
(74) 대리인
김선애

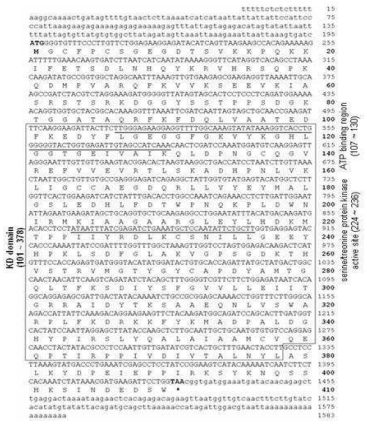
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 병저항성 관련 고추 카이네이즈 유전자 씨에이피아이케이1 및 이를 이용한 형질전환 식물체

(57) 요 약

본 발명은 식물병 저항성 관련 고추 카이네이즈 유전자인 *CaPIK1*(*Capsicum annuum Pathogen Induced Kinase 1*, 서열번호 1) 및 상기 유전자를 이용한 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용한 식물체의 저항성 탐색방법도 제공한다. 상기한 본 발명에 의하면, 식물체 병원균의 방어반응의 표지 및 병저항성 식물체의 분자육종을 위한 유전재료를 제공할 수 있고, 식물병 저항성 등의 탐색을 촉진할 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

식물병 저항성 관련 유전자로서 고추 유래 카이네이즈를 코딩하는 하기 (a) 또는 (b)의 분리된 유전자(*CaPIK1*):

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

(b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(CaPIK1).

청구항 3

제1항 기재의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 기재의 유전자를 pBIN35S에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 pBIN35S::*CaPIK1*.

청구항 5

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

청구항 6

식물체로부터 mRNA 분리하여 제1항 기재의 *CaPIK1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법.

청구항 7

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

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 식물체는 살리실산 (Salicylic acid), 에칠렌 (Ethylene) 및 메칠자스몬산 (Methyljasmoic acid) 중 어느 하나를 처리한 식물체인 것을 특징으로 하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 식물체는 산화, 염, 건조 및 저온 스트레스 중 어느 하나를 처리한 식물체인 것을 특징으로 하는 식물체의 저항성 탐색방법.

청구항 10

제1항 기재의 *CaPIK1* 유전자를 바이러스-유도 유전자 사일런싱(virus-induced gene silencing, VIGS)을 위한 벡터인 TRV2(Tobacco Rattle Virus 2) 벡터에 삽입시켜 제조한 재조합벡터 TRV2:: *CaPIK1*.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고추 (*Capsicum annuum* L.) 식물로부터 분리된 신규한 식물병 저항성 관련 유전자인 카이네이즈 유전자(*CaPIK1*: *C*apsicum *a*nnuum *P*athogen *I*nduced *K*inase *1*) 및 이를 이용한 식물에서의 병저항성 탐색방법과 병저항성 형질전환 식물체 제작에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 병원균 감염 후 고추 녹광 품종으로부터 분리된 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 *CaPIK1* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하며, 이

를 이용하여 생물적/화학적/물리적 저항성 유도 처리시 해당 유전자의 차별적 발현 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 고추 식물에서 바이러스 유도 유전자 사일런싱(VIGS, virus-induced gene silencing) 방법을 통해 이 유전자의 발현을 억제 시키는 방법, 그리고 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물에 이 유전자를 도입, 과발현(overexpression)하여 *CaPIK1* 유전자의 식물체 병저항성 증대효과를 확인하여, 이를 통한 병 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물의 병 저항성반응 또는 환경적 스트레스에 대한 내성을 가지는 식물의 방어관련 기작 연구는 지금까지 알려져 있지 않은 생체 내 기작을 규명하는 과학기술적 가치를 지닌다. 또한 식물방어관련 유전자의 정보는 작물의 분자적 유전육종의 직접적 재료로서 제공 되어질 수 있을 뿐 아니라 전통적 유전육종에도 사용될 수 있는 장점을 지니고 있다.

[0003] 환경친화적 식량생산의 측면에서 병방어 관련 다양한 유전자, 또는 이들 형질을 이용한 작물 육종은 경제적으로 중요한 병원체, 잡초, 그리고 환경적 스트레스에 의한 손실을 최소화함으로써 식량생산비용을 줄일 수 있으며, 고품질의 식량을 제공하여 농산물의 경쟁력회복에 기여함과 동시에 신품종의 개발과 연관되어진 다양한 산업의 활성화에 기여한다.

[0004] 우리나라에서 집약적으로 재배되고 주요 경제 작물로써 고추 (*Capsicum annuum L.*)는 식물병에 대한 방어의 신호전달경로를 연구하기 위한 훌륭한 실험시스템을 제공해 주고 있다. 고추 세균성점무늬병원균과 고추와의 상호작용에서 방어반응에 관여하는 유전자의 분자적 클로닝과 기능 분석은 고추의 병방어 반응 경로의 이해를 증진시키고, 저항성관련 유전자를 고추식물에서 발현시킨 병저항성 형질전환식물의 개발을 위한 유전자원의 토대가 된다.

[0005] 식물이 병원균에 감염되면, 기주식물은 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 활성화하는데, 이러한 방어기작은 병원체에 대한 기주세포의 인식을 시발점으로 국부적 세포 죽음과 같은 과민성 반응, 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 피토알렉신 (phytoalexin) 등 여러 종류의 항균성 물질을 생성하고, 병방어 관련 단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다.

[0006] 이러한 일련의 저항성 반응을 나타내기 위한 신호전달의 과정의 대부분은 단백질 특정 아미노산의 인산화(phosphorylation)를 통한 활성화를 통해 하위 단계의 신호를 전달하게 된다. 이 과정에서 일어나는 인산화는 카이네이즈 (kinase) 라 불리는 효소가 에이티피 (ATP)의 말단 인산기를 특정 단백질의 아미노산에 전달해 주는 과정이다. 카이네이즈는 기주 식물의 특정 병원체에 대한 인식으로부터 특정 단백질의 인산화를 통한 신호전달에 이르기까지 광범위한 부분에서 생리적 역할의 다양성과 중요성을 지닌 만큼 많은 선행연구가 이루어지고 있다.

[0007] 카이네이즈 유전자는 식물 및 동물에서 기능 분석이 광범위하게 이루어지고 있는 유전자원으로, 생명체의 각종 생리적 기능에서 중추적 역할을 하는 것으로 연구 보고되어 오고 있다. 특히 식물과 병원균과의 상호작용에 있어서 1차적으로 외부 병원체를 인식하는 수용자 (receptor) 역할의 카이네이즈 연구가 현재 활발히 연구되고 있고, 동물 및 식물의 저항성 반응에서 신호전달 경로로서 그 역할이 규명되고 있다. 카이네이즈 유전자는 수많은 유사형태 (paralogues)가 존재하는데, 모델 식물로 쓰이는 애기장대에서는 1,200여 이상의 카이네이즈 종류의 유전자가 존재한다. 이러한 풍부성 (redundancy) 에도 불구하고, 많은 카이네이즈가 식물에서 고유의 핵심인자로서 역할을 하고 있다. 이렇듯 세포내에서 대부분의 생리과정에 관여하는 카이네이즈에 관한 연구는 그 중요성이 크고, 특히 식물병저항성 반응에 관여하는 카이네이즈에 대한 연구와 이 기능을 밝혀내는 것은 고추식물의 병저항성 기작을 이해하는데 필요하고, 병저항성 형질전환 식물체 제작을 위한 주요한 유전자원을 제공하는데 기여할 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 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 카이네이즈 (*CaPIK1: Capsicum annuum Pathogen Induced Kinase 1*) 유전자를 분리하여 해독함으로써

그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명은 상기 *CaPIK1* 유전자를 이용하여 식물병, 화학물질 또는 환경스트레스에 대한 저항성 존재 여부를 탐색하는 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하고자 하는 것이다.

[0010] 더 나아가, 본 발명은 이 유전자를 식물체에 도입하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제작하는데 그 목적이 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0012] 본 발명의 상기 목적은, 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종한 후, 접종되어진 고추 잎으로부터 분리한 신규 저항성 관련 유전자 *CaPIK1*을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 생물적/화학적/물리적 처리를 통하여 *CaPIK1*의 발현 여부를 조사하고, 고추식물과 이 유전자를 과발현하는 형질전환 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaPIK1* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.

[0013] 따라서 본 발명은 식물병 저항성 관련 유전자로서 고추 유래 카이네이즈를 코딩하는 (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자 또는 (b) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자(CaPIK1)를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 카이네이즈 단백질(CaPIK1)을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 제조한 재조합 벡터 및 형질전환 식물체를 제공한다.

[0016] 나아가 본 발명은 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaPIK1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.

[0017] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.

[0018] 먼저, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광 고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고, 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물에서 얻은 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxygenin)으로 표지하여 프로브를 만들고, 이 cDNA와 프로브를 이용 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하여 병저항성에 관련될 것으로 추정되는 클론을 선발하여, 이들 중 카이네이즈 (kinase) 유전자로 확인된 유전자의 염기서열을 해독함으로써, *CaPIK1*로 명명된 고추 녹광 품종의 카이네이즈 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그에 따른 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).

[0019] 본 발명에 의한 상기 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 CaPIK1 단백질 코딩 유전자를 확인하고 카이네이즈(*CaPIK1*) 유전자로 명명하였다. CaPIK1 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 식물의 리셉터-라이크 사이토플라스믹 프로테인 카이네이즈 (receptor-like cytoplasmic protein kinase)에서 전형적으로 나타나는 카이네이즈 도메인 (kinase domain)을 가지고 있었고, 포플러 (*Populus nigra*)의 카이네이즈 유전자(accession no. BAA94510)와는 단백질 수준에서 65 %, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 카이네이즈 유전자 (accession no. Q9LQQ8)와는 단백질 수준에서 63 %의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, nucleotide blast program). 확인된 *CaPIK1*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다.

[0020] 다음에, 본 발명은 생물적/화학적/물리적 처리를 한 식물체로부터 RNA 분리하여 *CaPIK1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성 또는 비병원성 세균 등 병원균을 예로 들 수 있다. 상기 식물 호르몬 또는 화학적 유도체는 살리실산 (Salicylic acid), 에칠렌 (Ethylene) 및 메칠자스몬산 (Methy ljasmoic acid) 등을 예로 들 수 있다. 또한 환경적 스트레스는 산화, 염, 건조 및 저온 스트레스 등을 예로 들 수 있다. 상기 *CaPIK1* 유전자 발현 여부 확인은 노던 블럿, 실시간 RT-PCR, 마이크로어레이법 외에도 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 다양한 방법들이 사용될 수 있다. 본 발명에 의한 *CaPIK1* 유전자가 식물병원균, 식물 호르몬, 화학적 유도

체 또는 환경적 스트레스에 의해 차별적으로 유도 발현되는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 3 내지 도 5 참조). 따라서 본 발명에 의한 *CaPIK1* 유전자는 식물체의 저항성 탐색방법에 유용하게 이용될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기의 *CaPIK1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 고추식물에서 특이적으로 *CaPIK1* 유전자가 억제된 식물체의 제작, *CaPIK1* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성 생성여부를 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체의 제작방법 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 보다 구체적으로 본 발명은 *CaPIK1* 유전자의 발현을 억제하는 VIGS 식물체 제작(도 6 내지 도 8 참조), *CaPIK1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S::*CaPIK1*)(도 9)와 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물에서의 형질전환 발현(transgenic expression)을 통한 *CaPIK1* 유전자의 식물체 병저항성 활성화 기능을 확인하고(도 10 내지 도 13) 이를 통한 병 저항성 형질전환 식물체를 제공한다.

효 과

[0022] 상술한 바와 같이, 본 발명이 완성됨으로써, 고추 식물 세균병인 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자인 신규한 카이네이즈를 코딩하는 *CaPIK1* 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공함과 동시에, 이 유전자를 이용하여 식물병 저항성 및 환경 스트레스 내성의 탐색방법을 제공할 뿐 아니라 저항성 식물 육종 및 형질전환 식물체 제작에 기여하는 효과를 도모할 수 있게 되었다.

[0023] 아울러 본 발명에 의한 *CaPIK1* 유전자를 애기장대에 과발현시켜 식물병 저항성을 확인하고 역으로 *CaPIK1* 유전자 사일런싱을 통한 저항성 감소를 확인하는 것으로 식물체의 저항성 탐색방법을 제공하고 본 발명에 의한 *CaPIK1*은 병 저항성 식물체의 육종을 위한 재료로서 제공되어 질 수 있다.

[0024] 이러한 본 발명은 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 식물육종 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0025] 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.

[0026] **[실시예 1] *CaPIK1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정**

[0027] 고추세균성점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 카이네이즈 (*CaPIK1*: *C*apsicum *a*nnuum *P*athogen *I*nduced *K*inase *1*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0028] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성세포사멸반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.

[0029] 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 고추세균성점무늬병균의 비병원성 균주를 접종한 고추식물의 잎과 접종하지 않은 건전한 고추식물의 잎에서 추출한 총 mRNA를 디옥시제닌(digoxygenin)으로 표지하여 프로브를 만든 다음, 디퍼런셜 하이브리다이제이션(differential hybridization)을 수행하였다.

[0030] 하이브리다이제이션 결과 비병원성 균주 접종된 식물체의 mRNA 프로브에 대해서만 집중적으로 증폭되어 나타난 유전자를 병저항성에 관련된 유전자로 추정하고 클론을 수득하였다.

[0031] 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된

유전자 데이터베이스와 비교함으로써 CaPIK1 단백질 코딩 유전자를 확인하고 카이네이즈 (*CaPIK1*) 유전자로 명명하였다. CaPIK1 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 식물의 리셉터-라이크 사이토플라스믹 프로테인 카이네이즈 (receptor-like cytoplasmic protein kinase)에서 전형적으로 나타나는 카이네이즈 도메인 (kinase domain)을 가지고 있었고, 포플러 (*Populus nigra*)의 카이네이즈 유전자(accession no. BAA94510)와는 단백질 수준에서 65 %, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 의 카이네이즈 유전자 (accession no. Q9LQQ8)와는 단백질 수준에서 63 %의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, nucleotide blast program). 확인된 *CaPIK1*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다.

[0032] **[실시예 2] 병원균 접종 후 고추식물에서의 *CaPIK1* 유전자의 발현 탐색**

[0033] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaPIK1* 유전자의 병저항성 탐색에의 이용방법을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.

[0034] **[단계 1]**

[0035] 먼저 저항성 탐색 방법을 구체적으로 제시하기 위하여 식물체와 친화적 반응을 나타내는 고추 세균성 점무늬병원균(*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 3, 4엽의 뒷면에 주사기를 이용하여 접종하고, 접종 후에는 28℃, 100% 상대습도 조건에서 15시간 동안 습실 처리 하였다. 접종 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 각각 접종된 잎을 샘플링 하여 RNA를 분리하고, 분리한 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시켰다.

[0036] 다음으로 실시예 1에서 수득된 *CaPIK1* 유전자에 클레나우 효소(Klenow enzyme)를 이용하여 동위원소가 붙은 α-^{32}P[dCTP] 을 표지한 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서 65℃로 16-24 시간 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.

[0037] 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일 량의 RNA 시료가 로딩 되었음을 확인하였다. 이상의 실험결과를 도 3에 나타내었으며 실험의 결과 *CaPIK1* 유전자는 병원성 및 비병원성 고추세균성점무늬병 접종 후 10시간 이후에 발현이 시작되고 접종 후 25시간 이후에는 모두 발현이 감소하였다. 비병원성 균주를 접종하여 저항성 반응을 보이는 고추 식물에서의 *CaPIK1* 발현이 병원성 균주에 비해 강했다.

[0038] **[실시예 3] 식물 호르몬 및 화학적 유도체에 의한 *CaPIK1* 유전자의 유도 발현**

[0039] 본 발명의 *CaPIK1* 유전자가 통상 저항성 유도에 사용되는 식물 호르몬 및 화학적 유도체에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0040] **[단계 1]**

[0041] 먼저, *CaPIK1* 유전자의 발현 유도에 유용한 유도체를 탐색하기 위하여, 식물병 저항성 발현의 유도에 관여한다고 알려진 화학물질들 중 살리실산(salicylic acid), 에칠렌 (ethylene), 메칠자스몬산 (methyl jasmonic acid)을 사용하여 저항성 유도 시험을 실시하였다. 모든 실험에 6엽기의 고추 잎이 이용되었다.

[0042] 살리실산은 5 mM, 메칠자스몬산은 100 μM 의 농도로 고추 잎에 스프레이 하는 방법으로 처리하였으며 메칠자스몬산을 처리한 후에는 밀봉 처리하였다. 에칠렌은 20 μl/L의 농도로 하여 기체 상태로 식물체가 있는 밀폐된 유리 용기에 주입하는 방법으로 처리하였다. 각각의 식물들은 처리 1, 5, 10, 15, 20, 25시간 후에 잎을 수거하였고 각각의 샘플에서 RNA를 추출하였고 추출된 RNA를 포름알데히드를 함유하는 겔 상에서 전기영동한 후 나이론막 (Hybond N+)으로 전이시킨 후 다음과 같이 노던블러팅을 수행하였다.

[0043] 실시예 1에서 수득된 *CaPIK1* 유전자에 클레나우 효소(Klenow enzyme)를 이용하여 동위원소가 붙은 α-^{32}P[dCTP] 을 표지한 후 이를 반응액[0.25 M 인산완충액, 7% SDS, 1 mM EDTA, 5% 덱스트란 황산염(Dextran Sulfate)]에서

65 ℃로 16-24 시간 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. 상기 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일 량의 RNA 시료가 로딩 되었음을 확인하였다.

[0044] 실험의 결과 *CaPIK1* 유전자는 도 4에서 보이는 것과 같이 살리실산은 처리 후 발현이 15시간부터 유도되어 25시간까지 발현이 강하게 유지되는 것을 관찰할 수 있었고, 에칠렌은 처리 이후 15시간부터 발현이 시작되었고, 메칠자스몬산은 처리 후에는 1시간에 발현이 유도된 뒤 발현이 감소되고 1시간 이후에 다시 발현되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0045] **[실시예 4] 환경적 스트레스에 의한 *CaPIK1* 유전자의 유도 발현**

[0046] 본 발명의 *CaPIK1* 유전자가 환경적 스트레스에 의해 유도될 수 있는지를 알아보고 그 구체적 유도방법을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.

[0047] **[단계 1]**

[0048] 여러 환경적 스트레스를 처리하여 *CaPIK1* 유전자의 발현의 유도 여부를 관찰하였다. 산화적 스트레스를 위한 메칠 비올로겐과, 염 (NaCl), 건조, 저온 스트레스를 각각 처리하여 저항성 유도 시험을 실시하였다. 모든 실험에 6엽기의 고추 잎이 이용되었다.

[0049] 메칠 비올로겐은 100 μM, NaCl은 100 mM 농도로 고추 잎에 스프레이 하는 방법으로 처리하였으며, 건조는 수분 공급의 중단, 저온은 4 ℃ 보관을 통해 처리하였다. 각각의 식물들은 처리 1, 5, 10, 15, 20, 25 시간 후에 잎을 수거하였고 각각의 샘플에서 RNA를 추출하여 실시예 3의 단계 1에서와 같은 방법을 통해 노던블러팅을 실시하였다. 산화, 염, 건조, 저온 스트레스 처리 후 *CaPIK1* 의 시간별 발현양상을 알아보았으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 각각의 시험에서 노던블러팅 수행시 리보솜 RNA의 양을 모니터링 함으로써 동일 량의 RNA 시료가 로딩 되었음을 확인하였으며, 대조구로서 어떤 스트레스도 처리하지 않은 건전 잎을 사용하였다.

[0050] 시험 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, *CaPIK1* 유전자는 메칠 비올로렌 처리 이후 15시간에 발현이 시작되어 그 이후로 발현이 강하게 진전되는 것이 관찰되었고, 염 스트레스 처리시 1시간부터 약하게 발현이 증가하다가 15시간 이후에 강하게 발현되는 것이 관찰되었다. 건조 처리시 10시간 이후에 지속적으로 발현하였고, 저온 처리시 1시간부터 발현이 이루어지다가 감소하며 25시간 이후에는 발현되지 않음을 관찰하였다.

[0051] **[실시예 5] *CaPIK1* 유전자 발현의 억제에 의한 병 저항성의 변화**

[0052] 고추식물에서 *CaPIK1* 유전자의 발현이 특이적으로 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaPIK1* 유전자를 새롭게 개발된 바이러스 유도 유전자 사일런싱(VIGS, virus-induced gene silencing)에서 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaPIK1* 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:*CaPIK1*을 제조하였다.

[0053] 이렇게 제조한 재조합벡터 TRV2:*CaPIK1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV3101)에 전기천공법 (electrophoration)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추 유묘 (seedling)의 떡잎에 주사기를 이용, 엽육주사 (infiltration) 방법으로 접종하여 고추식물에 도입함으로써 *CaPIK1* 유전자의 발현의 억제를 유도시켰다.

[0054] **[단계 1]**

[0055] *CaPIK1*의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성의 변화를 알아보기 위하여, 상기의 *CaPIK1*의 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 대조구로서 TRV2:00 벡터를 접종한 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a를 10^6 cfu ml^{-1} 의 농도

로 접종한 후 1, 3, 5, 7일 이후 접종 잎의 병징을 관찰하였고, 5 x 10^4 cfu ml^{-1} 로 접종하여 접종 후 0, 3일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였다(도 6 및 도 7). 그리고 병원균 10^8 cfu ml^{-1} 로 접종하여 접종 이후 24시간 후에 실험구와 대조구의 감염 잎을 잎에서 RNA를 추출하여 알티-피시알 (RT-PCR)을 통해 *CaPIK1* 의 특이적인 유전자 억제 효과와 함께 병 접종시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였다 (도 8).

[0056] 도 6에서와 같이 실험결과 VIGS로 *CaPIK1*의 발현이 억제된 식물에서 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 병징을 관찰한 결과, 병원성 균주 접종시 대조구에 비하여 접종 후 3일 이후에 빠른 황화와 괴저 현상이 진전되는 것이 관찰되었고, 비병원성 균주 접종시 대조구 식물에서 3일째 국부적 저항성 반응으로 세포사멸이 나타나지만 *CaPIK1*의 발현이 억제된 식물에서는 국부적 세포사멸이 관찰되지 않고, 수침상이 진전되는 것을 관찰하였다.

[0057] 그리고 도 7에서와 같이 감염조직에서 병원성 균과 비병원성 균의 세균 생장을 측정한 결과 대조구에 비교하여 *CaPIK1*의 발현이 억제된 식물에서 더 많은 세균생장을 나타냈다.

[0058] 또한 알티-피시알 시험 결과 도 8과 같이, *CaPIK1*이 억제된 식물에서 효과적으로 유전자의 억제가 나타나는 것이 관찰되었고, *CaBPR1, CaSAR82A, CaPR4* 와 같은 저항성 관련 유전자의 발현이 줄어든 반면 *CaDEF1* 은 그 발현의 차이가 없었다.

[0059] **[실시예 5] *CaPIK1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaPIK1* 유전자의 과다발현에 의한 애기장대 식물의 병 저항성 변화**

[0060] 모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에서 *CaPIK1* 유전자의 과다발현시 다른 병 발생과 관련된 유전자들의 유도 여부 및 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 *CaPIK1* 유전자를 Stratagene에서 제공하는 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:*CaPIK1*을 제조한 후 이렇게 재조된 재조합 벡터인 pBIN35S:*CaPIK1*을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법(electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 *CaPIK1* 유전자의 과다발현을 유도시킨 형질전환 애기장대를 제작하고 아래와 같은 시험을 수행하였다.

[0061] **[단계 1]**

[0062] *CaPIK1* 유전자가 과다 발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여 상기 *CaPIK1* 유전자가 과다 발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 *CaPIK1*과 애기장대 식물의 저항성 관련 유전자인 *PR1, RD29a* 유전자의 발현을 관찰하였으며 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0063] 도 9에서 #2, #3, #5 는 사용된 형질전환 식물의 계통번호를 나타내고, 실험결과 *CaPIK1* 유전자가 과다 발현된 형질전환 애기장대 식물에서만 *CaPIK1* 유전자와 병저항성 관련 *PR1, RD29a* 이 발현됨을 관찰할 수 있었다.

[0064] **[단계 2]**

[0065] 상기와 같이 *CaPIK1*이 과다 발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주를 5 x 10^4 cfu / ml 농도로 접종하고 식물체의 변화를 관찰하였다. 도 10에 나타난 바와 같이, *CaPIK1*이 과다 발현된 식물체에서 야생형에 비하여 세균성 병에 대하여 저항성을 나타내고 있음이 관찰되었고, 도 11에 나타난 바와 같이, 감염조직에서 세균생장을 관찰한 결과 *CaPIK1* 유전자가 과다발현된 식물에서 세균 생장이 야생형 식물 감염조직에서의 세균생장보다 적은 것을 알 수 있었다. 도 12에 나타난 바와 같이, 트리판 블루 염색 (trypan blue staining) 결과를 통하여 *CaPIK1* 유전자가 과다 발현된 식물에서 저항성 식물에서 관찰되는 세포사멸반응이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다.

[0066] **[단계 3]**

[0067] *CaPIK1*이 과다 발현된 식물에, 애기장대에서 노균병을 일으키는 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2 (*Hyaloperonospora parasitica* Noco 2)를 접종한 후 병저항성의 변화를 관찰하였다. *CaKIN1*이 과발현된 식물과

과발현하지 않는 야생형 대조구 식물의 떡잎시기에 하이알로페로노스포라 파라시티카 Noco2를 5 x 10^4 포자 ml^{-1}의 농도로 스프레이접종 하였다. 접종 후 17 ℃의 온도에서 습실 처리하였다.

[0068] 그 결과 *CaPIK1*을 과발현하는 형질전환 애기장대 식물에서 저항성이 증가되어 노균병원균의 포자형성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었고 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0069] 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

[0070] 도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 카네이즈 유전자의 염기서열 및 아미노산서열을 나타낸 도면이고,

[0071] 도 2는 고추 녹광 품종의 각 기관에서 *CaPIK1* 유전자의 발현 결과를 나타낸 도면이고,

[0072] 도 3은 고추 녹광 품종에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성 및 비병원성 균주를 접종하였을 때, 접종된 잎과 접종되지 않은 잎에서의 *CaPIK1* 유전자의 발현 결과를 나타낸 도면이고,

[0073] 도 4는 살리실산 (Salicylic acid), 에칠렌 (Ethylene) 및 메칠 자스몬산 (Methyl jasmonate)을 처리한 후 시간별로 *CaPIK1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0074] 도 5는 메칠 비올로겐 (Methyl viologen), 염, 건조 및 저온 스트레스를 처리한 후 시간별로 *CaPIK1* 유전자의 발현 유도 결과를 나타낸 도면이고,

[0075] 도 6은 바이러스 유도 유전자 사일런싱(virus-induced gene silencing; VIGS)의 방법을 사용하여 *CaPIK1* 유전자의 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 증대되어 감수성 병징이 확대되는 것을 나타낸 도면이고,

[0076] 도 7은 *CaPIK1* 유전자의 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 생장을 나타낸 그래프이고,

[0077] 도 8은 *CaPIK1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, *CaPIK1* 의 효과적인 발현 억제와 저항성 관련 유전자의 발현 차이를 나타낸 결과를 보인 도면이고,

[0078] 도 9는 상기의 재조합벡터 pBIN35S:*CaPIK1*과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여 *CaPIK1* 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 *CaPIK1* 유전자가 과다발현되고, 이로 인해 애기장대의 병저항성 관련 유전자인 *PR1* 과 *RD29a* 유전자의 발현이 증가된 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

[0079] 도 10은 *CaPIK1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주에 대한 병저항성이 나타난 식물체의 사진이고,

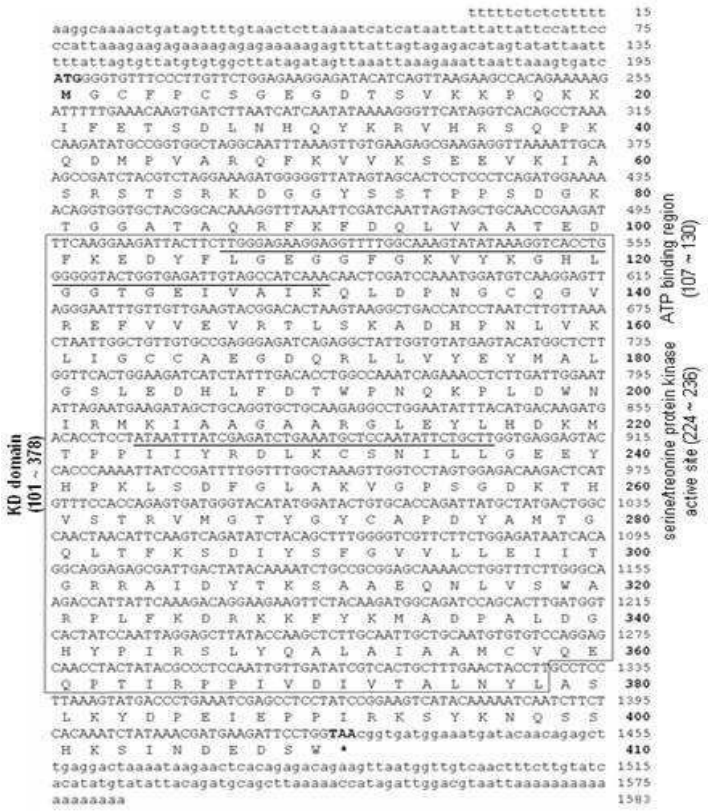
[0080] 도 11은 *CaPIK1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 생장을 검정한 결과를 나타낸 그래프이고,

[0081] 도 12는 *CaPIK1* 유전자를 과발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균 접종 후 과민성 세포사멸 반응이 증가된 것을 트리판 블루(trypan blue) 염색을 통해 살펴본 결과를 보인 사진이고,

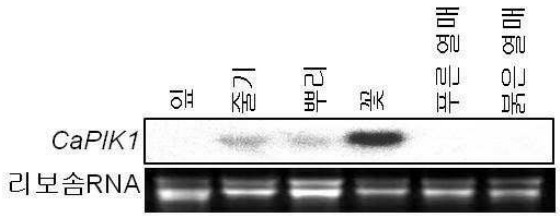
[0082] 도 13은 *CaPIK1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병 (*Hyaloperonospora parasitica*)에 대한 병저항성이 나타난 결과를 보인 도면이다.

도면

도면1



도면2



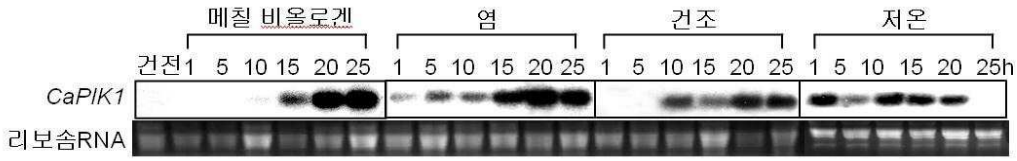
도면3



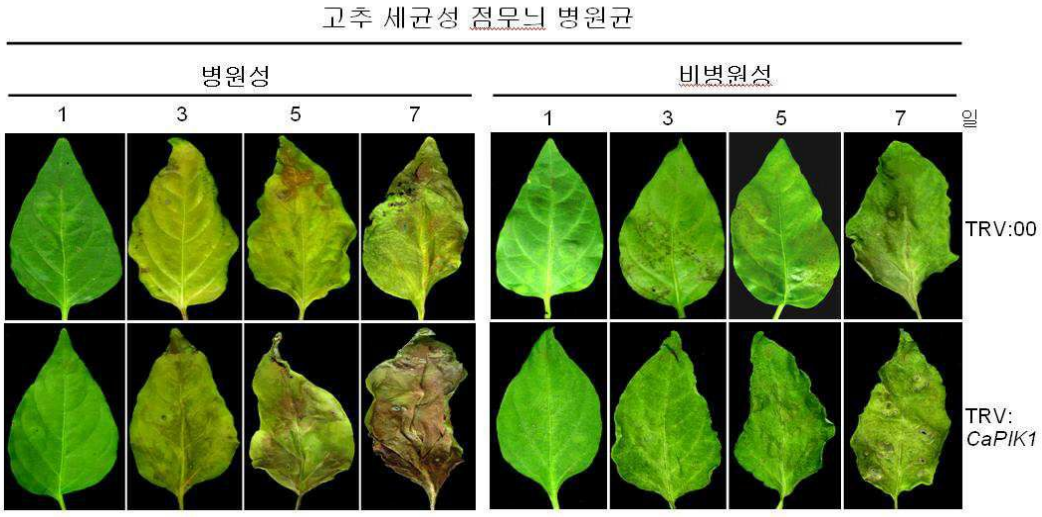
도면4



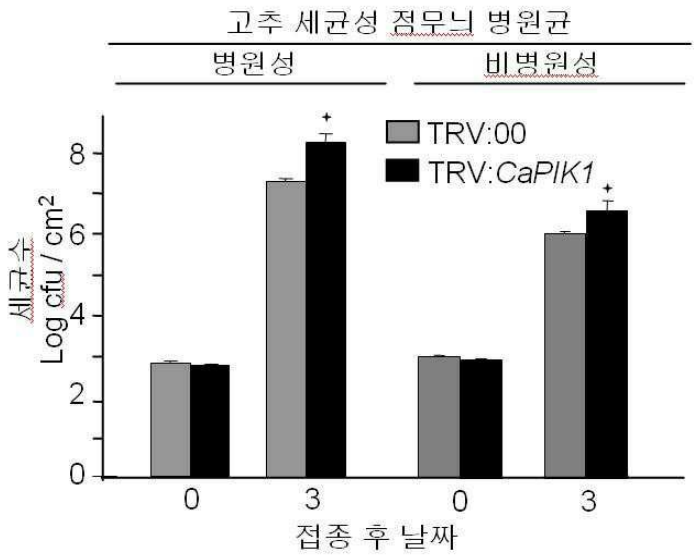
도면5



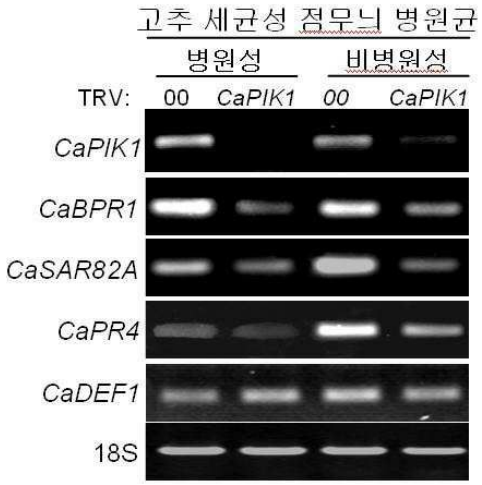
도면6



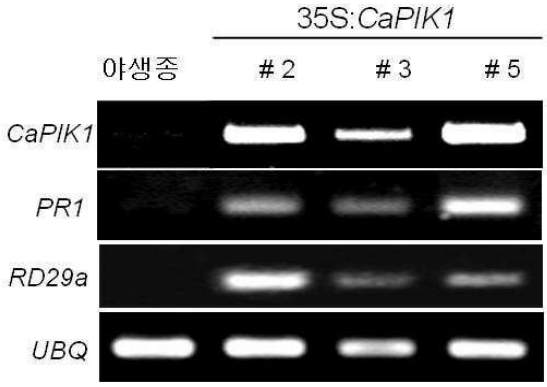
도면7


고추 세균성 점무늬 병원균
병원성
비병원성
TRV:00
TRV:CaPIK1
세균수
Log cfu / cm²
0
2
4
6
8
0
3
0
3
접종 후 날짜

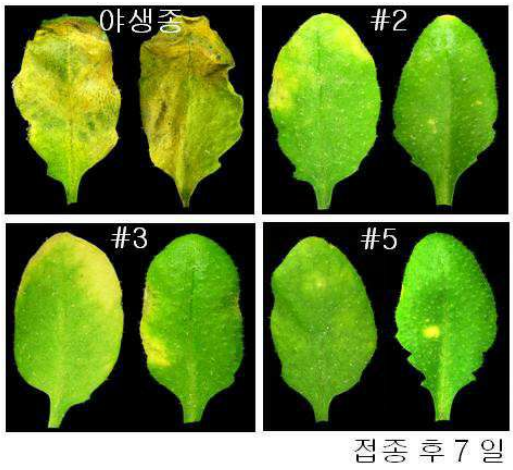
도면8


고추 세균성 점무늬 병원균
병원성
비병원성
TRV:
00
CaPIK1
00
CaPIK1
CaPIK1
CaBPR1
CaSAR82A
CaPR4
CaDEF1
18S

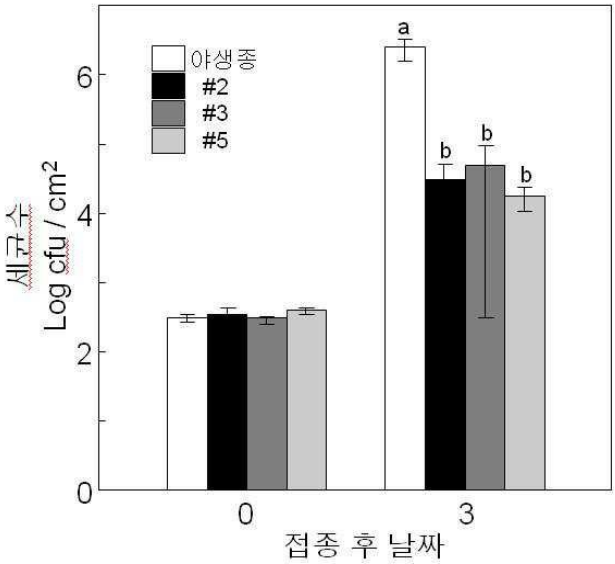
도면9



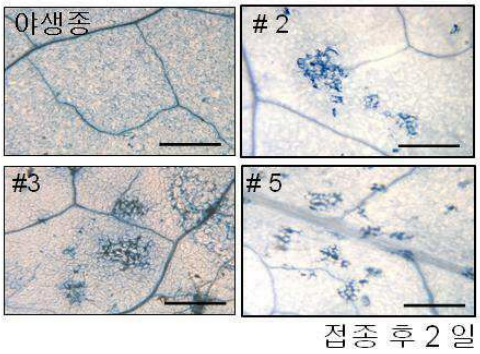
도면10



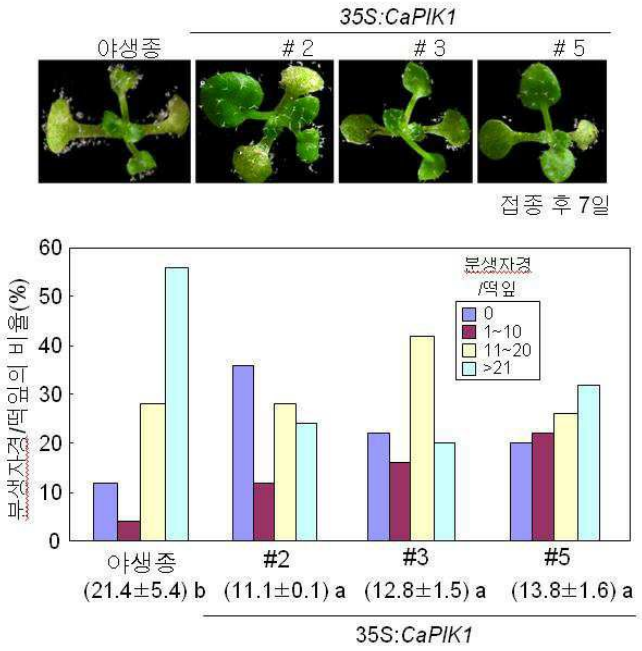
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
<120> Disease resistance-related pepper kinase gene CaPIK1 and transgenic plants using the same

<130> P11-090105-01

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1583
<212> DNA
<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 1
ttttctctc tttttaaggc aaaactgata gttttgtaac tcttaaaatc atcataatta 60

ttattattcc attccccatt aaagaagaga aaagagagaa aaagagttta ttagtagaga 120

catagtatat taatttttat tagtgttatg tgtggcttat agatagttaa attaaagaaa 180

ttaattaaag tgatcatggg gtgtttccct tgttctggag aaggagatac atcagttaag 240

aagccacaga aaaagatttt tgaaacaagt gatcttaatc atcaatataa aagggttcat 300

aggtcacagc ctaaacaaga tatgccggtg gctaggcaat ttaaagttgt gaagagcgaa 360

gaggttaaaa ttgcaagccg atctacgtct aggaaagatg ggggttatag tagcactcct 420

ccctcagatg gaaaaacagg tggtgctacg gcacaaaggt ttaaattcga tcaattagta 480

gctgcaaccg aagatttcaa ggaagattac ttcttgggag aaggaggttt tggcaaagta 540

tataaaggtc acctgggggg tactggtgag attgtagcca tcaaacaact cgatccaaat 600

ggatgtcaag gagttaggga atttgttgtt gaagtacgga cactaagtaa ggctgaccat 660

cctaatcttg ttaaactaat tggctgttgt gccgagggag atcagaggct attggtgtat 720

gagtacatgg ctcttggttc actggaagat catctatttg acacctggcc aaatcagaaa 780

cctcttgatt ggaatattag aatgaagata gctgcaggtg ctgcaagagg cctggaatat 840

ttacatgaca agatgacacc tcctataatt tatcgagatc tgaaatgctc caatattctg 900

cttggtgagg agtaccaccc aaaattatcc gattttggtt tggctaaagt tggtcctagt 960

ggagacaaga ctcatgtttc caccagagtg atgggtacat atggatactg tgcaccagat 1020

tatgctatga ctggccaact aacattcaag tcagatatct acagctttgg ggtcgttctt 1080

ctggagataa tcacaggcag gagagcgatt gactatacaa aatctgccgc ggagcaaaac 1140

ctggtttctt gggcaagacc attattcaaa gacaggaaga agttctacaa gatggcagat 1200

ccagcacttg atggtcacta tccaattagg agcttatacc aagctcttgc aattgctgca 1260

atgtgtgtcc aggagcaacc tactatacgc cctccaattg ttgatatcgt cactgctttg 1320

aactaccttg cctccttaaa gtatgaccct gaaatcgagc ctcctatccg gaagtcatac 1380

aaaaatcaat cttctcacaa atctataaac gatgaagatt cctggtaacg gtgatggaaa 1440

tgatacaaca gagcttgagg actaaaataa gaactcacag agacagaagt taatggttgt 1500

caactttctt gtatcacata tgtatattac agatgcagct taaaaaccat agattggacg 1560

taattaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1583

<210> 2
<211> 410
<212> PRT
<213> Capsicum annuum L. cv. Nockwang

<400> 2
Met Gly Cys Phe Pro Cys Ser Gly Glu Gly Asp Thr Ser Val Lys Lys
1 5 10 15

Pro Gln Lys Lys Ile Phe Glu Thr Ser Asp Leu Asn His Gln Tyr Lys
20 25 30

Arg Val His Arg Ser Gln Pro Lys Gln Asp Met Pro Val Ala Arg Gln
35 40 45

Phe Lys Val Val Lys Ser Glu Glu Val Lys Ile Ala Ser Arg Ser Thr
50 55 60

Ser Arg Lys Asp Gly Gly Tyr Ser Ser Thr Pro Pro Ser Asp Gly Lys
65 70 75 80

Thr Gly Gly Ala Thr Ala Gln Arg Phe Lys Phe Asp Gln Leu Val Ala
85 90 95

Ala Thr Glu Asp Phe Lys Glu Asp Tyr Phe Leu Gly Glu Gly Gly Phe
100 105 110

Gly Lys Val Tyr Lys Gly His Leu Gly Gly Thr Gly Glu Ile Val Ala
115 120 125

Ile Lys Gln Leu Asp Pro Asn Gly Cys Gln Gly Val Arg Glu Phe Val
130 135 140

```
Val Glu Val Arg Thr Leu Ser Lys Ala Asp His Pro Asn Leu Val Lys
145                 150                 155                 160

Leu Ile Gly Cys Cys Ala Glu Gly Asp Gln Arg Leu Leu Val Tyr Glu
                165                 170                 175

Tyr Met Ala Leu Gly Ser Leu Glu Asp His Leu Phe Asp Thr Trp Pro
            180                 185                 190

Asn Gln Lys Pro Leu Asp Trp Asn Ile Arg Met Lys Ile Ala Ala Gly
        195                 200                 205

Ala Ala Arg Gly Leu Glu Tyr Leu His Asp Lys Met Thr Pro Pro Ile
    210                 215                 220

Ile Tyr Arg Asp Leu Lys Cys Ser Asn Ile Leu Leu Gly Glu Glu Tyr
225                 230                 235                 240

His Pro Lys Leu Ser Asp Phe Gly Leu Ala Lys Val Gly Pro Ser Gly
                245                 250                 255

Asp Lys Thr His Val Ser Thr Arg Val Met Gly Thr Tyr Gly Tyr Cys
            260                 265                 270

Ala Pro Asp Tyr Ala Met Thr Gly Gln Leu Thr Phe Lys Ser Asp Ile
        275                 280                 285

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

Ile Asp Tyr Thr Lys Ser Ala Ala Glu Gln Asn Leu Val Ser Trp Ala
305                 310                 315                 320

Arg Pro Leu Phe Lys Asp Arg Lys Lys Phe Tyr Lys Met Ala Asp Pro
                325                 330                 335

Ala Leu Asp Gly His Tyr Pro Ile Arg Ser Leu Tyr Gln Ala Leu Ala
            340                 345                 350

Ile Ala Ala Met Cys Val Gln Glu Gln Pro Thr Ile Arg Pro Pro Ile
        355                 360                 365

Val Asp Ile Val Thr Ala Leu Asn Tyr Leu Ala Ser Leu Lys Tyr Asp
```

370 375 380

Pro Glu Ile Glu Pro Pro Ile Arg Lys Ser Tyr Lys Asn Gln Ser Ser
385 390 395 400

His Lys Ser Ile Asn Asp Glu Asp Ser Trp
405 410