

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2010-0103000 2010년09월27일
(51)	Int. Cl.	(71)	출원인
	<i>C12N 9/10</i> (2006.01) <i>C12N 15/54</i> (2006.01) <i>C07K 14/415</i> (2006.01) <i>A01H 1/00</i> (2006.01)		경희대학교 산학협력단
(21)	출원번호	(72)	발명자
(22)	출원일자		박영두
	심사청구일자		경기도 용인시 수지구 성북동 성동마을 수지자이 1차아파트 108동 702호
			이기호
			부산광역시 동래구 온천1동 153-8 SK히브스카이 102동 2206호
		(74)	대리인
			특허법인다울

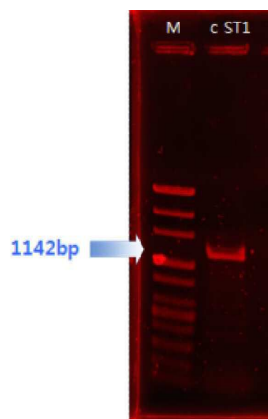
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 도드람 국화 유래의 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 단백질 및 이를 코딩하는 유전자

(57) 요약

본 발명은 도드람 국화(*Dendranthema grandiflorum* cv. Dodram) 유래의 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1) 단백질에 관한 것이다. 또한, 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 단백질 검출용 프라이머를 제작하고 이를 사용하여 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070501080002

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 현장협력기술개발사업

연구과제명 저항성 유전자의 개발 및 이용

기여율

주관기관 경희대학교

연구기간 2007.04.29~2009.04.24

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는, 도드람 국화(*Dendranthema grandiflorum* cv. Dodram) 유래의 메캅토 피루베이트 쉘퍼트랜스퍼라아제 1 (mrkapto-pyruvate sulfertransferase 1) 단백질.

청구항 2

제 1항의 메캅토 피루베이트 쉘퍼 트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 이루어지는 유전자.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 핵산 서열은 서열번호 3의 핵산 서열을 가지는 것인 유전자.

청구항 4

제 2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제 4항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 6

제 5항의 형질전환체를 이용한, 노화가 지연되고 저장 기간이 증가된 형질전환 국화.

청구항 7

(i) 서열번호 1 내지 2에 기재된 프라이머를 제작하는 단계; (ii) 도드람 국화의 RNA로부터 합성한 cDNA를, 상기 제작된 서열번호 1 내지 2로 이루어지는 프라이머 쌍을 사용하여 RT-PCR을 수행하여 메캅토 피루베이트 쉘퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 단계; 및 (iii) 상기 분리된 유전자를 이용하여 메캅토 피루베이트 쉘퍼트랜스퍼라아제 1의 전체 서열을 확인하는 단계를 포함하는, 도드람 국화로부터 메캅토 피루베이트 쉘퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법.

청구항 8

서열번호 1 내지 2에서 선택되는 메캅토 피루베이트 쉘퍼트랜스퍼라아제 1 단백질 검출용 프라이머.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스프레이 국화 도드람(*Dendranthema grandiflorum* cv. Dodram)의 노화 및 해독 작용과 관여하는 메캅토 피루베이트 쉘퍼트랜스퍼라아제 1(mercapto-pyruvate sulfertransferase 1)의 단백질을 도드람 국화로부

터 분리하는 방법과, 분리된 메캅토 피루베이트 쉘퍼트랜스퍼라아제 1 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 쉘퍼트랜스퍼라아제(sulfertransferase, ST)는 동물, 식물 뿐만 아니라 미생물 등에서도 황 원자를 수용기질에 전달하는 역할을 하는 가장 대표적인 효소이다. ST에 속하는 유전자로는 thiosulfate:cyanide ST(rhodanese, EC 2.8.1.1), 3-mercapto pyruvate:(di)thiol ST(EC 2.8.1.2), thiosulfate:thiol ST(EC 2.8.1.3)와 thiosulfate:dithiol ST(EC 2.8.1.5)가 있다. ST의 주요 생리적 특징은 시아나이드(cyanide)의 해독 작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있고, 활성 산소를 이용하는 생물에서 산소 조직 부위의 세포 독성을 조절한다. 그 뿐만 아니라 황 대사과정에 관여하며, Fe-S 클러스터의 생합성 및 수복을 위한 황의 전달과정에 관여하는 중요한 효소이다.
- [0003] 특히 본 효소의 가장 큰 특징은, 티오-셀페이트(thiosulfate)의 황을 시아나이드(cyanide)로 옮겨주어 티오-시아나이드로 바꾸어 주는 것이다. 해당 기작은 다음과 같다(Westley, 1973 Rhodanese. *Adv. Enzymol.* 39, pp. 327-368).
- [0004]
- $$\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \text{Rhod} \rightarrow \text{SO}_3^{2-} + \text{Rhod-S}$$
- [0005]
- $$\text{Rhod-S} + \text{CN}^- \rightarrow \text{Rhod} + \text{SCN}^-$$
- [0006] 또한 Papenbrock와 Schmidt(2000, Characterization of two sulfurtransferase isozymes from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.*, 267, 5571-579.)에 의하여 식물체가 노화가 진행될수록 ST 효소의 활성이 증가함이 보고되었다. 현재까지 이 현상에 관한 가장 자명한 사실로 인정되는 가설로는, 식물체의 노화가 진행됨에 따라 노화된 잎에 존재하는 황 원소를 새로 자라나는 잎 또는 과실과 종자에 전달하기 위함으로 알려져 있다.
- [0007] ST는 식물의 노화와 관련 있는 여러 유전자 중 하나이다. 특히 ST는 식물체의 노화가 진행되면서 발생하는 가스 상태의 식물 호르몬인 에틸렌(ethylene)이 합성 되는 가운데 부산물로 만들어지는 독성 물질인 시아나이드(cyanide)를 해독하는 역할을 한다. 즉, 에틸렌 생합성 과정의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)가 ACC 옥시다아제(oxidase)에 의한 산화 반응의 결과 시아노포믹 산(cyanoformic acid)이 만들어지고, 이것이 CO₂와 공유 결합 반응이 일어나서 시아나이드(cyanide, HCN)가 합성된다고 알려져 있다(Yang과 Hoffmann, 1984 Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol.* 35:155-89.; Kende, 1993, Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 283-307). Kende(1993, Ethylene biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44, 283-307)의 보고에 따르면 시아나이드의 합성이 아미노산의 산화 과정 등 여러 곳에서 일어나지만 에틸렌의 생합성 과정에서 발생하는 것이 가장 많다고 하였다.
- [0008] 시아나이드(cyanide)는 세포 내에서 강한 독성 물질로 알려져 있다. 시아나이드는 금속 이온 효소(metalloenzyme)를 강하게 억제할 뿐만 아니라, 광합성 과정 중의 전자전달계(photosynthetic electron transport)를 막아 버리고, 리블로오즈-비스포스페이트 카르복실라아제(ribulose-bisphosphate carboxylase)와 카탈라아제(cathlase)의 활성을 50% 정도 감소시킨다고 알려져 있다. 즉 시아나이드는 식물의 여러 대사 과정에 중요한 영향을 미치는 물질로 볼 수 있다. 또한 시아나이드가 호흡급등형(climacteric) 작물인 아보타도에서 에틸렌과 같은 효과를 나타낸다는 보고가 있었으며, Pirrung과 Brauman(1987, Involvement of cyanide in the regulation of ethylene biosynthesis, *Postharvest Biol. Tec.* (25) pp. 55-61.)은 호흡급등형 조직에서 시아나이드가 에틸렌의 합성을 촉진하는 것을 확인 하였다.
- [0009] 시아나이드의 축적은 대체 호흡 과정인 시아나이드 저항 대사 과정(cyanide-resistance pathway)을 촉진하여, 식물체내 자유 라디칼(free radical)을 증가시키게 되고, 이것이 ACC 옥시데이제(oxidase)를 촉진하게 되어 에틸렌 합성이 증가되는 것으로 알려져 있다. 또한 증가된 자유 라디칼은 노화와 큰 관련이 있다고 생각되는 활성 산소종(active oxygen species, AOS)과 밀접한 관련이 있다.
- [0010] AOS는 미토콘드리아 활성의 영향으로 식물체의 노화를 야기 시키게 되는데, 이는 미토콘드리아의 노화로 인하여 AOS가 효과적 제거하지 못하여 생기는 산화적 피해이다. 이를 방어하기 위해, 식물체는 자가방어 시스템을 작동하여 보호하지만, 그 한계를 넘을 경우 식물체는 노화하기 시작되는 것이다.

- [0011] 시아나이드는 위와 같이 식물체의 생장 및 노화에 큰 영향을 미치기 때문에 조속한 해독이 필요하다. 식물에서의 이 역할을 수행하는 것이 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1(mercapto-pyruvate sulfertransferase 1; ST1)과 β -시아노-L-알라닌-합성효소(β -cyano-L-alanine synthase, CAS, EC 4.4.1.9)이다. 특히 ST1의 경우 독성 시아나이드를 저독성인 티오시아네이트(thiocyanate)로 전환시켜 줌으로써 해독작용을 하는 것으로 보고되어 있다(Nagahara 등, 1999, Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: molecular properties and mode of detoxification. *Histol Histopathol.* 14(4):1277-86; Ressler과 Tatake, 2001 Vicianin, prunasin, and beta-cyanoalanine in common vetch seed as sources of urinary thiocyanate in the rat. *J Agric Food Chem.* 49(10):5075-80.).
- [0012] 세계 4대 절화(cut flower) 중 하나인 국화는 주 재배 지역이 경남, 경기, 부산, 충남, 전남 등인데, 그 중 스프레이 국화의 재배량이 총 재배량의 1/3정도인 것으로 추산되고 있다. 또한 스프레이 국화는 측아를 제거할 필요가 없어 10a당 250시간의 노동력이 절감되며, 생육이 왕성하고, 재배기간이 짧아 경영상 이점이 많다.
- [0013] 스프레이 국화는 자연 개화기가 9~11월인 추국이지만, 차광 재배에 의해 연중 생산이 가능하며 일교차가 큰 고냉지에서 재배하면 절화 품질 향상에 효과적이다).
- [0014] 절화 국화의 수확 후 관리로 절화 수명 연장제로 STS를 18시간 흡수시켜서 잎의 황화와 꽃잎의 위조를 방지시킨다. 또한 유통과정상의 품질저하를 막기 위해 예냉 후 1-2℃로 저온 유통을 실시한다. 이에 따라 국화의 대량 생산 및 품질의 고급화, 그리고 저장과 유통 비용의 절감을 위하여, 국화의 노화 방지 및 저장 기간의 연장 기술의 개발이 필요하다. 그러나 국화에서 노화지연, 노화방지 및 해독작용에 관여하는 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1을 코딩(coding)하는 유전자에 관해서는 보고된 바가 없다.
- [0015] 본 발명자들은 국화 유래의 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 을 코딩하는 유전자를 규명하고, 이를 이용하여 노화지연 및 노화방지와 해독작용에 효과적인 기능성 국화를 제공하고, 이로 인하여 국화의 분화 및 절화 수명 연장으로 경제적으로 유용한 국화 품종 육성을 개발하기 위해 연구를 계속하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0016] 본 발명은 도드람 국화 유래의 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 제공하기 위한 것이다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질 검출용 프라이머 및 이를 이용하여 도드람 국화로부터 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

- [0018] 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는, 도드람 국화 유래의 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명의 "메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질" 분리를 위해 프라이머쌍을 제작하여 사용하였다. 제작된 프라이머쌍을 사용하여 도드람 국화로부터 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질에 해당하는 유전자를 분리하기 위해 RT-PCR을 수행하여 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 유전자의 전체 서열을 확보하였다.
- [0020] 본 발명의 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질은 서열번호 4로 기재된 아미노산 서열을 가진다. 또한, 하나 이상의 위치에서 일부 아미노산 서열이 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 변이된 변이체도 본 발명의 범주에 포함한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 도드람 국화 유래의 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 유전자에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명의 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는

유전자는, 바람직하게는 서열번호 3의 핵산서열을 가지는 유전자이다.

- [0023] 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 상기 핵산 서열 변이체 또한, 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0024] 또한, 본 발명은 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함한 통상의 모든 벡터를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 벡터는 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 발현조절 서열과 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명에 의해 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질과 이에 대한 유전자의 서열을 이용하여, 노화가 지연되고 저장 기간이 증가된 형질전환 국화를 만들 수 있다.
- [0028] 숙주세포로의 벡터 도입은 숙주 세포에 적합한 방법을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기충격유전자전달법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, 입자충법, 원형질 세포법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등의 공지된 방법으로 수행할 수 있다.
- [0029] 숙주세포로는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 슈조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등의 진핵 생물 유래의 세포가 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 또한, 본 발명의 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 유전자는 식물 개체 내로 형질전환될 수 있다. 식물로의 형질전환법은 바람직하게 아그로박테리움법, 원형질세포법, 입자충법 등이 있다. 형질전환되는 식물은 바람직하게는 국화이다.
- [0031] 또한, 본 발명은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질의 세포내 발현 수준을 증가 또는 감소시켜 식물, 바람직하게는 국화의 노화를 지연시키고 저장 기간을 증가시켜서 국화의 분화 및 절화(cut flower)의 수명을 연장시키는 기능성 국화를 제공한다.
- [0032] 예를 들어, 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 재조합 벡터로 식물, 보다 구체적으로 국화를 형질전환시킴으로써 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질의 세포내 발현 수준을 증가시킬 수 있다. 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 재조합 벡터는 상술한 바와 같다. 또한, 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 게놈 유전자의 엑손으로 하나 이상의 외생 핵산 서열을 도입시켜 유전자를 불활성화시켜 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질의 세포내 발현 수준을 억제 및 차단시킬 수 있다. 본 발명에서 용어, "외생(Exogenous) 핵산 서열"이란 숙주세포에서 정상적으로 발견되지 않는 핵산 서열을 의미하고, 외생 핵산서열을 유전자 게놈의 엑손으로 삽입함으로써 유전자의 불활성을 유도할 수 있다.
- [0033] 상기에서 예시한 방법으로, 목적에 맞게 식물, 바람직하게는 도드람 국화의 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질의 발현을 효과적으로 조절할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 (i) 서열번호 1 내지 2에 기재된 프라이머를 제작하는 단계; (ii) 도드람 국화의 RNA로부터 합

성한 cDNA를, 상기 제작된 서열번호 1 내지 2로 이루어지는 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하여 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 단계; 및 (iii) 분리된 유전자를 이용하여 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 유전자의 전체 서열을 확인하는 단계를 포함하는, 도드람 국화로부터 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법에 관한 것이다.

[0035] 각 단계를 각각 살펴보면 다음과 같다.

[0036] 상기 단계 (i) 전에, 식물에 대한 공지된 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질을 코딩하는 유전자 단백질의 유전자에 대한 서열을 수집하고 유전자 코딩 서열을 정렬하는 단계와 상기 정렬된 서열 중 상동성이 높은 영역을 선택하는 단계를 먼저 수행할 수 있다. 이 때 식물에 대한 공지된 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질의 유전자에 대한 서열은 NCBI GenBank 등으로부터 획득할 수 있으며, 상동성 비교는 욱안으로 나 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다.

[0037] 그 다음에 상기 (i) 단계의 프라이머를 제작하게 되는데, 상기 상동성이 높은 영역에 특이적인 프라이머쌍을 제작하게 된다. 본 발명에서, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 프라이머의 길이는 특별히 제한되지 않으며, 10 내지 50, 보다 바람직하게는 10 내지 40개의 염기서열을 가진다. 구체적으로, 본 발명에서 사용된 프라이머의 서열은 서열번호 1 내지 2로 기재되었다.

[0038] 단계 (ii)에서, 시료로부터 RNA 분리와 RT-PCR은 일반적인 방법으로 수행할 수 있다. 상기 단계 (iii)에서는 분리된 유전자 단편을 이용하여 T-벡터에 넣어 이것을 이용하여 염기 서열을 확인 할 수 있는데, 상기 유전자 단편의 T-벡터의 도입은 공지된 일반적인 방법으로 수행할 수 있다.

[0039] 본 발명의 방법으로 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질 분리에 사용될 수 있는 식물의 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 식량작물류, 채소작물류, 특용작물류, 과수류, 화훼류 및 사료작물류에 속하는 다양한 식물체를 시료로 사용할 있다.

[0040] 구체적으로, 본 발명에서 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1의 분리에 사용된 도드람 국화(*Dendranthema grandiflorum* cv. Dodram)는 기내의 무균 상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA를 분리하였다.

[0041] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 2에서 선택되는 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질 검출용 프라이머를 제공한다.

[0042] 본 발명에서 제공하는 프라이머들은 식물의 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질 간에 상동성이 높은 영역을 선택적으로 인지하므로, 다양한 식물에서 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질의 검출에 효율적으로 사용될 수 있는 프라이머들이다.

[0043] 서열번호 1 내지 2의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍은 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 효소 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 cDNA 합성을 개시하게 된다.

[0044] 본 발명의 프라이머 서열은 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지로는 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제 등과 같은 효소; ³³P과 같은 방사성 동위원소; cy3, cy5 등의 형광성 분자; 바이오틴과 같은 화학 그룹을 예로 들 수 있다.

효 과

[0045] 본 발명의 방법으로 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질을 식물체로부터 효과적으로 분리할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 메캅토 피루베이트 쉘퍼트렌스퍼라아제 1 단백질은 시아나이드(cyanide)에 대한 해독 능력 촉진 및 그로 인한 노화 지연에 관계가 있으므로, 이를 이용하여 과발현 벡터(over-expression vector)를 만들어 식물 형질전환 시, 노화가 지연되고 저장기간을 증가시킬 수 있는 형질전환된 기능성 국화를 제공할 수 있다. 또한 국화의 분화 및 절화 수명 연장으로 경제적으로 유용한 국화 품종을 제공하는 효과를 얻을 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0046] 이하에서는, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0047] **실시예 1: 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 (mercapto-pyruvate sulfertransferase 1) 단백질 유전자를 분리하기 위한 프라이머의 작성**

[0048] 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 유전자의 공통된 부분을 찾기 위하여 기존에 발표되어 있는 작물별 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1의 유전자를 "National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank"에서 검색하였다. 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 Entrez 프로그램을 사용하였다. 검색방법으로는 유전자명으로 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1(mercapto-pyruvate sulfertransferase 1)를 검색어로 선정하였다.

[0049] 수집된 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질의 유전자 가운데, 모델 식물인 배추과의 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 염기서열을 선발, 염기서열의 상동성을 많이 보이는 부분을 BLAST 프로그램으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머들의 서열은 표 1에 기재된 바와 같다.

표 1

프라이머	염기서열
cST1-F (서열번호 1)	5'-ATA TGG CTT CGA CCC TTT TC-3'
cST1-R (서열번호 2)	5'-TCA TGA AGA AGA ATC TTC CCC-3'

[0051] **실시예 2: 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질의 유전자 분리**

[0052] 도드람 국화(*Dendranthema grandiflorum* cv. Dodram)로부터 RNA의 분리는 GibcoBRL회사에서 제공된 트리졸 (Trizol) 시약을 사용하여 수행하였다. 도드람 국화의 잎을 액체질소를 이용하여 파쇄한 다음, 1ml 트리졸 (Trizol) 용액을 첨가하고 잘 섞은 후 5분 동안 상온에 두었다. 다음, 200 μ l의 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 섞은 다음 다시 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 이소프로페놀(isopropanol)을 500 μ l를 넣고 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 침전시켰다. 다음, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시킨 후 DEPC 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0053] 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 유전자의 분리는 확보된 RNA를 주형으로 올리고 dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용, cDNA를 합성한 뒤 작성한 프라이머로 PCR하여 분리하였다. cDNA합성 프로그램 조건은 1 μ g의 RNA를 올리고 dT 프라이머와 70℃에서 두어 RNA 이차구조를 제거한 뒤 45℃에서 30분간 역전사 시키고 그 사용된 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 94℃에서 5분간 두었다. 그 후 합성된 cDNA 1 마이크로그램을 사용, 작성한 프라이머와 태크 중합효소(tag polymerase)로 PCR하였는데 그 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 2분으로 40 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0054] 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pCR[®]4-TOPO[®]벡터에 클로닝하고, 올바른 유전자의 삽입여부를 확인하기 위하여 *EcoRI*를 이용하였다. 그 결과는 도 1b와 같다. 이후 상기 유전자가 삽입된 자리에 근접한 T7 프로모터와 T3 프로모터에 결합하는 T7과 T3 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

[0055] **실시예 3: 메캅토 피루베이트 쉐퍼트랜스퍼라아제 1 단백질 유전자의 전체 염기서열 확인**

[0056] 염기서열 분석용 pCR[®]4-TOPO[®] 벡터 내부에 클로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST 프로그램을 사용하여 이루어졌다. 그 결과 cST1-F(서열번호 1)와 cST1-R(서열번호 2) 프라이머로 증폭된 1142bp 산물의 염

기서열(도 1)과 아미노산 서열을 분석한 결과, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)와 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물의 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 유전자와 상동성을 보였으며, 특히 배추의 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 유전자와는 97%의 상동성을 보였다. 즉, RNA를 대상으로 cST1-F(서열번호 1)와 cST1-R(서열번호 2) 프라이머를 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 도드람 국화의 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 유전자의 전체 유전자가 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0057] 또한 NCBI Conserved Domain 프로그램을 이용하여(도 5 참고), 분리한 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 유전자에 티오쥘페이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 (Thiosulfate sulfurtransferase: TST)의 N-터미널(N-terminal)부분과 C-터미널(C-terminal)부분이 각각의 E-값이 5e-42, 7e-37로 정확하게 존재하며, 로텐제이즈 관련 쥘퍼트랜스퍼라아제(Rhodanese-related sulfurtransferase)의 도메인의 E-값이 4e-72로 정확하게 포함되는 것을 통해, 그 정확도가 높음을 확인하였다. 확인된 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 유전자 염기서열을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정한 후, 이를 도드람 국화로부터 분리된 전체 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 유전자로 결정하고, 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 4에 나타내었다. 그리고 상기 단백질에 대한 유전자 서열은 서열번호 3에 나타내었다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 각 cST1-F와 cST1-R을 사용한 RT-PCR에 의해 ‘도드람’ 국화로부터 증폭된 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1(mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

[0059] 도 2는 cST1-F(서열번호 1)와 cST1-R(서열번호 2)을 사용한 RT-PCR에 의해 ‘도드람’ 국화로부터 증폭된 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 pCR[®]4-TOPO[®] 벡터에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 *EcoRI*를 처리하여 확인한 사진이다.

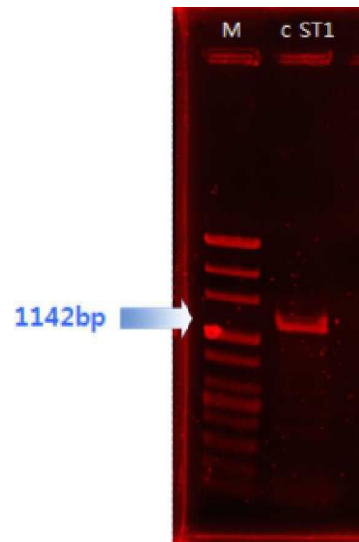
[0060] 도 3은 RT-PCR에 의해 분리된 ‘도드람’ 국화의 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX 프로그램을 사용하여 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 시퀀스 간에 상동성 비교 결과이다.

[0061] 도 4는 RT-PCR에 의해 분리된 ‘도드람’ 국화의 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX 프로그램을 사용하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 시퀀스간에 상동성 비교 결과이다.

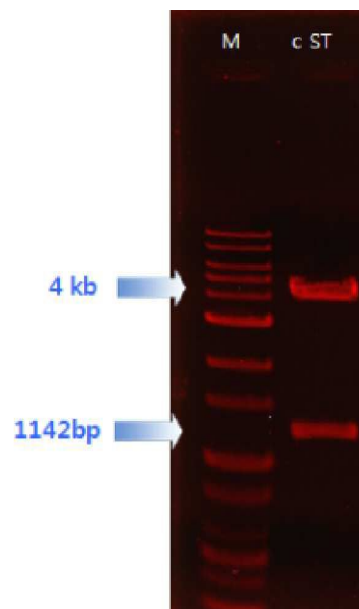
[0062] 도 5는 RT-PCR에 의해 분리된 ‘도드람’ 국화의 메캅토 피루베이트 쥘퍼트랜스퍼라아제 1 (mrcapto-pyruvate sulfertransferase 1)을 코딩하는 유전자를 NCBI Conserved Domain 프로그램을 이용하여 분석한 결과이다.

도면

도면1



도면2



도면3

```
>[gb|AC196074.1] mercaptopyruvate sulfurtransferase 1 [Brassica rapa subsp. pekinensis]
Length=379

Score = 754 bits (1948), Expect = 0.0
Identities = 371/379 (97%), Positives = 373/379 (98%), Gaps = 0/379 (0%)
Frame = +3

Query 3      MASTLPSRTFLAATHRLITPSLLPQKPLHLASFLTRRGFFSQLGSYSTAYRSARAMASAG 182
Sbjct 1      MASTLPSRTFLAATHRLITPSLLPQKPLHLASFLTRR FFSQLGSYSTAYRSARAMASAG 60
           MASTLPSRTFLAATHRLITPSLLPQKPLHLASFLTRRVFFSQLGSYSTAYRSARAMASAG

Query 183     IGARAGYSTSSSVATNEPVVSVDWLHNSNLRPDLKVLDAWYMPDEQRNPIQEYQVAHIF 362
Sbjct 61     TGARAGYSTSSSVATNEPVVSVDWLHNSNLRPDLKVLDAWYMPDEQRNPIQEYQVAHIF 120

Query 363     GALFFDLGIDSRSTSLPHMLPSEEAFAAGCSALGIENKDGVVVYDAKGVPFAARVWWT 542
Sbjct 121     GALFFDLGIDSRSTSLPHMLPSEEAFAAGCSALGIENKDGVVVYDAKGVPFAARVWWT 180

Query 543     RVFGHDKVWLDGGLFMRWRASGYDVESASGDAILKASAASEAIEKIYQGH5VSPITPQT 722
Sbjct 181     RVFGHDKVWLDGGLFMRWRASGYDVESASGDAILKASAASEAIEKIYQGH5VSPITPQT 240

Query 723     KQPHLVWTLQVKNMEDQTYQHVDARSKARFDGTAPEPRKGIRSGHIFGSKCVYPQL 902
Sbjct 241     KQPHLVWTLQVKNMEDQTYQHVDARSKARFDGTAPEPRKGIRSGHIFGSKCVYPQL 300

Query 903     FDSASQTLLPAEDLKKRFEQEEISLDKPIILASCGTGVTIACILAMGLHRVGKTDVPYDGS 1082
Sbjct 301     FDSASQTLLPAEDLKKRFEQEEISLDKPIILASCGTGVTIACILAMGLHRVGKTDVPYDGS 360

Query 1083    WTEWATQPDLEMEGEDSSS 1139
Sbjct 361    WTEWATQPDLEMEGEDSSS 379
```

도면4

```
>[ref|NP_565203.1] [UG] ST1 (MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE 1); thiosulfate sulfurtransferase
[Arabidopsis thaliana]
gb|AAC17062.1| Similar to E. coli sulfurtransferase (rhodanese) gb|AE00338.
ESTs gb|T039394, gb|T03983 and gb|W43228 come from this gene.
[Arabidopsis thaliana]
emb|CA855306.1| thiosulfate sulfurtransferase [Arabidopsis thaliana]
db|BA85148.1| mercaptopyruvate sulfurtransferase [Arabidopsis thaliana]
db|AAU77692.1| Atig79230/TUPSH12R_39 [Arabidopsis thaliana]
db|AA04695.1| mercaptopyruvate sulfurtransferase (Met1/Rdh1) [Arabidopsis thaliana]
db|BAC42830.1| putative mercaptopyruvate sulfurtransferase [Arabidopsis thaliana]
gb|AB648385.1| Atig79230 [Arabidopsis thaliana]
Length=379

GENE ID: 844264 ST1 | ST1 (MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE 1)
[Arabidopsis thaliana] (10 or fewer PubMed links)

Score = 654 bits (1686), Expect = 0.0
Identities = 324/383 (84%), Positives = 353/383 (92%), Gaps = 8/383 (2%)
Frame = +3

Query 3      MASTLPSRTFLAATHRLITPSLLPQKPLHLASFLTRRGFFSQLGSYSTAYRSA----RAM 170
Sbjct 1      MASTLPSRTFLAATHRLITPSL-PQK + A*PLA- SQLGS STAYRS RAM
           MASTLPSRTFLAATHRLITPSL-PQKIFNPATFLSR-SLHSQLGSATAYKSTWARRAM

Query 171     ASAGIGARAGYSTSSSVATNEPVVSVDWLHNSNLRPDLKVLDAWYMPDEQRNPIQEYQV 350
Sbjct 59     AS G+ +AGYSTSS V+T+EFVSVDWLH+NLREFDLK+LDASWYMPDEQRNPIQEYQV
           ASTGVETKAGYSTSS-VSTSEPVVSVDWLHNLREFDLK+LDASWYMPDEQRNPIQEYQV

Query 351     AHIPGALFFDLGIDSRSTSLPHMLPSEEAFAAGCSALGIENKDGVVVYDAKGVPFAARV 530
Sbjct 118     AHIP ALFFDLGIDSR TSLPHMLP+EEAFAAGCSALGI+NRD VVVYD KG+PSAARV
           AHIPRALFFDLGIDSRKTSLPHMLPTEEAFAAGCSALGIDNRDEVVVYDGKGFPSAARV

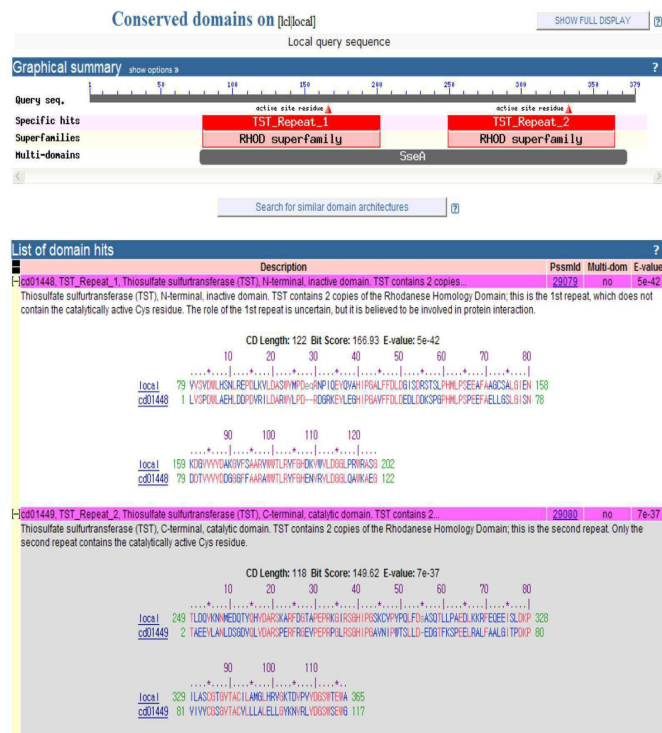
Query 531     WNTLRVFGHDKVWLDGGLFMRWRASGYDVESASGDAILKASAASEAIEKIYQGH5VSP 710
Sbjct 178     WN RVFGH+KVVWLDGGLFMRWRASGYDVESASGDAILKASAASEAIEKIYQGH5VSP
           WMRFRVFGHEKVVWLDGGLFMRWRASGYDVESASGDAILKASAASEAIEKIYQGH5VSP

Query 711     TFQTKFQPHLVWTLQVKNMEDQTYQHVDARSKARFDGTAPEPRKGIRSGHIFGSKCVP 890
Sbjct 238     TFQTKFQPHLVWTLQVKNMED TYQH+DARSKARFDGTAPEPRKGIRSGHIFGSKC+P
           TFQTKFQPHLVWTLQVKNMEDQTYQHIDARSKARFDGTAPEPRKGIRSGHIFGSKCIP

Query 891     YPQLFDSASQTLLPAEDLKKRFEQEEISLDKPIILASCGTGVTIACILAMGLHRVGKTDVP 1070
Sbjct 298     FPQ+PDS + TLLPAE+LKKRF+QE+ISLDKPI+ASCGTGVTIACILAMGLHR+GKTDVP+
           FPQMFDSCH-TLLPAEELKKRFQEDISLDKPIASCGTGVTIACILAMGLHRGKTDVPI

Query 1071    YDGSWTEWATQPDLEMEGEDSSS 1139
Sbjct 357    YDGSWTEWATQPDLE+E +SSS
           YDGSWTEWATQPDLETSEVSSS 379
```

도면5



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> MERCAPTO-PYRUVATE SULFERTRANSFERASE 1 PROTEIN OF Dendranthema grandiflorum cv. Dodram AND A GENE ENCODING THE SAME

<130> P09-045

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cST1-F Primer

<400> 1

atatgcttc gacccttttc

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> cST1-R Primer

<400> 2
 tcatgaagaa gaatcttccc c 21

<210> 3
 <211> 1140
 <212> DNA
 <213> Dendranthema grandiflorum cv. Dodram

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1137)

<400> 3
 atg gct tcg acc ctt ttc tcc aga act ttt cta gct gca acc cac cgc 48
 Met Ala Ser Thr Leu Phe Ser Arg Thr Phe Leu Ala Ala Thr His Arg
 1 5 10 15

ttg atc act cct tct ctt ctc cct caa aag ccc ctt cat ctc gcc tcc 96
 Leu Ile Thr Pro Ser Leu Leu Pro Gln Lys Pro Leu His Leu Ala Ser
 20 25 30

ttt ctt act agg aga ggg ttc ttc tct cag tta ggc tct tac tct aca 144
 Phe Leu Thr Arg Arg Gly Phe Phe Ser Gln Leu Gly Ser Tyr Ser Thr
 35 40 45

gct tat aga tca gct cga gct atg gct tct gct gga att ggg gca aga 192
 Ala Tyr Arg Ser Ala Arg Ala Met Ala Ser Ala Gly Ile Gly Ala Arg
 50 55 60

gca ggc tac tcg act tca tca tct gta gca act aat gag cct gtt gtt 240
 Ala Gly Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Val Ala Thr Asn Glu Pro Val Val
 65 70 75 80

tct gtt gat tgg ctt cat tct aat ctt aga gag cct gat ttg aag gtt Ser Val Asp Trp Leu His Ser Asn Leu Arg Glu Pro Asp Leu Lys Val 85 90 95	288
ttg gat gcg tca tgg tac atg cca gat gag cag agg aat ccc atc caa Leu Asp Ala Ser Trp Tyr Met Pro Asp Glu Gln Arg Asn Pro Ile Gln 100 105 110	336
gaa tat cag gtt gct cat att cct ggt gct ctc ttc ttt gat ttg gat Glu Tyr Gln Val Ala His Ile Pro Gly Ala Leu Phe Phe Asp Leu Asp 115 120 125	384
gga ata tca gat cga tca aca agt ttg cca cat atg ttg ccg tct gag Gly Ile Ser Asp Arg Ser Thr Ser Leu Pro His Met Leu Pro Ser Glu 130 135 140	432
gaa gct ttt gct gct ggt tgc tct gct ctt gga att gag aac aag gat Glu Ala Phe Ala Ala Gly Cys Ser Ala Leu Gly Ile Glu Asn Lys Asp 145 150 155 160	480
gga gtg gtt gtt tat gat gca aag ggt gtc ttt agt gca gct cgt gta Gly Val Val Val Tyr Asp Ala Lys Gly Val Phe Ser Ala Ala Arg Val 165 170 175	528
tgg tgg acg ctc cga gtt ttt gga cat gac aaa gtg tgg gtg ctt gat Trp Trp Thr Leu Arg Val Phe Gly His Asp Lys Val Trp Val Leu Asp 180 185 190	576
gga gga cta ccg aga tgg cgt gct tca gga tat gat gtt gaa tct agt Gly Gly Leu Pro Arg Trp Arg Ala Ser Gly Tyr Asp Val Glu Ser Ser 195 200 205	624
gca tca ggt gat gct att ttg aaa gcc agt gct gca agt gag gct att Ala Ser Gly Asp Ala Ile Leu Lys Ala Ser Ala Ala Ser Glu Ala Ile 210 215 220	672
gag aaa atc tat caa gga cat tcc gtg agt cca ata acc ttt cag acc Glu Lys Ile Tyr Gln Gly His Ser Val Ser Pro Ile Thr Phe Gln Thr 225 230 235 240	720
aag ttc cag cca cat cta gtg tgg aca ctt gat cag gtg aag aac aat Lys Phe Gln Pro His Leu Val Trp Thr Leu Asp Gln Val Lys Asn Asn 245 250 255	768
atg gag gat caa aca tat caa cac gta gac gca cgt tcc aag gcc agg	816

Met Glu Asp Gln Thr Tyr Gln His Val Asp Ala Arg Ser Lys Ala Arg
260 265 270

ttt gat ggt aca gct cca gaa ccc cgt aag gga ata aga agt ggt cat 864
Phe Asp Gly Thr Ala Pro Glu Pro Arg Lys Gly Ile Arg Ser Gly His
275 280 285

atc cct gga agc aag tgt gtc cct tat cct cag ttg ttt gat tct gct 912
Ile Pro Gly Ser Lys Cys Val Pro Tyr Pro Gln Leu Phe Asp Ser Ala
290 295 300

tct caa aca ctg tta cca gca gaa gac ctg aag aaa cgg ttt gaa caa 960
Ser Gln Thr Leu Leu Pro Ala Glu Asp Leu Lys Lys Arg Phe Glu Gln
305 310 315 320

gaa gag atc tca ttg gac aag cct att ctg gcc tgc tgt ggc act ggt 1008
Glu Glu Ile Ser Leu Asp Lys Pro Ile Leu Ala Ser Cys Gly Thr Gly
325 330 335

gta aca gct tgc atc ctg gca atg ggg ctt cac cga gtg gga aaa act 1056
Val Thr Ala Cys Ile Leu Ala Met Gly Leu His Arg Val Gly Lys Thr
340 345 350

gat gtg cca gtc tac gat ggc tgc tgg act gaa tgg gca aca caa cca 1104
Asp Val Pro Val Tyr Asp Gly Ser Trp Thr Glu Trp Ala Thr Gln Pro
355 360 365

gac ttg cct atg gag ggg gaa gat tct tct tca tga 1140
Asp Leu Pro Met Glu Gly Glu Asp Ser Ser Ser
370 375

<210> 4
<211> 379
<212> PRT
<213> Dendranthema grandiflorum cv. Dodram

<400> 4
Met Ala Ser Thr Leu Phe Ser Arg Thr Phe Leu Ala Ala Thr His Arg
1 5 10 15

Leu Ile Thr Pro Ser Leu Leu Pro Gln Lys Pro Leu His Leu Ala Ser
20 25 30

Phe Leu Thr Arg Arg Gly Phe Phe Ser Gln Leu Gly Ser Tyr Ser Thr

35	40	45
Ala Tyr Arg Ser Ala Arg Ala Met Ala Ser Ala Gly Ile Gly Ala Arg		
50	55	60
Ala Gly Tyr Ser Thr Ser Ser Ser Val Ala Thr Asn Glu Pro Val Val		
65	70	75 80
Ser Val Asp Trp Leu His Ser Asn Leu Arg Glu Pro Asp Leu Lys Val		
	85 90	95
Leu Asp Ala Ser Trp Tyr Met Pro Asp Glu Gln Arg Asn Pro Ile Gln		
100	105	110
Glu Tyr Gln Val Ala His Ile Pro Gly Ala Leu Phe Phe Asp Leu Asp		
115	120	125
Gly Ile Ser Asp Arg Ser Thr Ser Leu Pro His Met Leu Pro Ser Glu		
130	135	140
Glu Ala Phe Ala Ala Gly Cys Ser Ala Leu Gly Ile Glu Asn Lys Asp		
145	150	155 160
Gly Val Val Val Tyr Asp Ala Lys Gly Val Phe Ser Ala Ala Arg Val		
	165 170	175
Trp Trp Thr Leu Arg Val Phe Gly His Asp Lys Val Trp Val Leu Asp		
	180 185	190
Gly Gly Leu Pro Arg Trp Arg Ala Ser Gly Tyr Asp Val Glu Ser Ser		
195	200	205
Ala Ser Gly Asp Ala Ile Leu Lys Ala Ser Ala Ala Ser Glu Ala Ile		
210	215	220
Glu Lys Ile Tyr Gln Gly His Ser Val Ser Pro Ile Thr Phe Gln Thr		
225	230	235 240
Lys Phe Gln Pro His Leu Val Trp Thr Leu Asp Gln Val Lys Asn Asn		
	245 250	255
Met Glu Asp Gln Thr Tyr Gln His Val Asp Ala Arg Ser Lys Ala Arg		
260	265	270

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

Ile Pro Gly Ser Lys Cys Val Pro Tyr Pro Gln Leu Phe Asp Ser Ala
290 295 300

Ser Gln Thr Leu Leu Pro Ala Glu Asp Leu Lys Lys Arg Phe Glu Gln
305 310 315 320

Glu Glu Ile Ser Leu Asp Lys Pro Ile Leu Ala Ser Cys Gly Thr Gly
325 330 335

Val Thr Ala Cys Ile Leu Ala Met Gly Leu His Arg Val Gly Lys Thr
340 345 350

Asp Val Pro Val Tyr Asp Gly Ser Trp Thr Glu Trp Ala Thr Gln Pro
355 360 365

Asp Leu Pro Met Glu Gly Glu Asp Ser Ser Ser
370 375