(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0060872
(43) 공개일자 2022년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 1/06 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01H 1/06 (2021.01)
A01H 5/10 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2020-0146988
(22) 출원일자 2020년11월05일
심사청구일자 2020년11월05일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김재연
경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 104동 1401호(가좌동, 센트럴웰가)
이스완토아리아바구스보에디
경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 306호(가좌동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

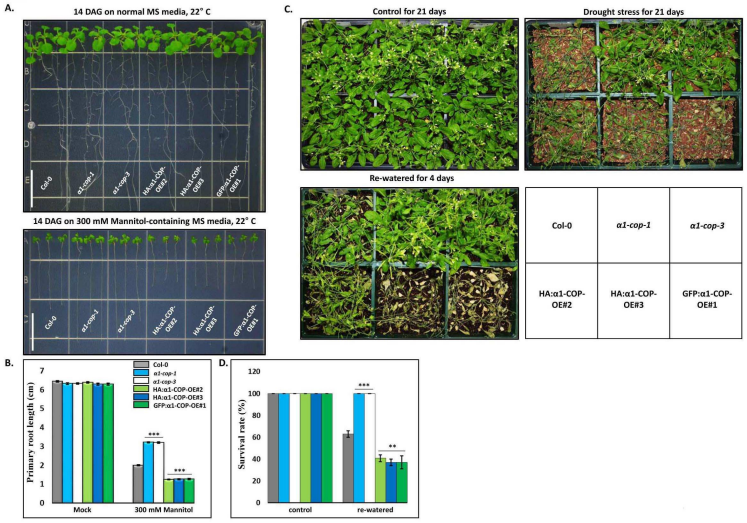
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 조절하는 α1-COP 유전자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 조절하는 *α1-COP* 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 *α1-COP* 유전자를 이용하면 다중 스트레스 저항성 작물을 개발할 수 있으므로 신품종 육종의 중요한 소재로 활용가능할 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/8271 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
(72) 발명자
부후이민
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)
부반티엔
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

우수웨이
경상남도 진주시 진주대로 501(가좌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711119475
과제번호 2020M3A9I4038352
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 유전자교정 도구 전달 효율증진 및 상동성수선(HDR) 기반 범용성 식물 유전체교정 활용 원천기술 개발
기 여 율 4/10
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.06.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395066003
과제번호 PJ014784012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대농작물신육종기술개발(R&D)
연구과제명 유전자 특위적인 무작위 돌연변이 유도 기술 개발
기 여 율 3/10
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395062666
과제번호 PJ013226012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명 유전자가위 고도화 기술개발
기 여 율 2/10
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345321167
과제번호 2020R1A6A1A03044344
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 식물생명공학연구소
기 여 율 1/10
과제수행기관명 경상대학교
연구기간 2020.06.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

식물 유래 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1) 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는, 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물 유래 α1-COP 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 식물세포에서 α1-COP 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해시켜 비형질전환 식물체에 비해 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 식물 유래 α1-COP 단백질 코딩 유전자를 유전자교정 시스템을 이용하여 녹아웃(knock-out)시켜 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 가뭄, 고온, 저온 및 염 스트레스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

(a) 식물 유래 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1) 단백질 코딩 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 식물세포에 도입하여 유전체를 교정하는 단계; 및

(b) 상기 유전체가 교정된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가된 유전체 교정 식물체의 제조방법.

청구항 6

식물 유래 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환된 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식물 유래 α1-COP 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해시켜 비형질전환 식물체에 비해 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 증가시키는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 가뭄, 고온, 저온 및 염 스트레스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 10

제9항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 11

식물 유래 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1) 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 저항성 조절용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 조절하는 *α1-COP* (Coatomer subunit alpha-1) 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물은 병원균 감염 및 초식 동물, 곤충의 공격과 같은 생물 스트레스와 가뭄, 더위, 추위, 영양결핍과 같은 비생물적 스트레스 속에서 끊임없이 신호를 주고받으며 살아간다. 비생물적 스트레스에 저항성이 낮은 식물은 분리한 환경에 적응할 때 많은 에너지를 필요로 하고 많은 물과 비료를 소비하여 환경에 큰 부담을 줄 수 있다. 비생물적 스트레스 중 고염, 가뭄, 온도의 변화는 고착생활을 하는 식물의 생육과 발달에 큰 영향을 미친다.

[0003] 원형질연락사(plasmodesma)를 통한 다양한 세포물질의 이동은 식물발달은 물론이고 병저항성 등 외부 스트레스에 대한 식물체의 저항성에 영향을 미친다. 본 발명자는 다양한 실험을 통해 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1)이 원형질연락사에 축적된 칼로스를 분해하는 효소인 PDBG2 (plasmodesmata-associated b-1,3-glucanase)의 세포간 이동에 필요하다는 것을 확인하였다.

[0004] 한편, 한국공개특허 제2015-0010299호에는 '*ARR22* 유전자를 이용한 식물체의 환경 스트레스 내성을 조절하는 방법 및 그에 따른 식물체'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제2101757호에는 '식물체의 원형질연락사 칼로스 축적 및 식물 생장을 조절하는 애기장대 유래의 *SPHK1* 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 조절하는 *α1-COP* 유전자 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 원형질연락사 조절에서 핵심적인 역할을 수행하는 칼로스의 축적과 관련된 돌연변이를 확보하여 분석한 결과 *α1-COP* 유전자에 우성(dominant) 돌연변이가 일어났음을 규명하였다. 또한 *α1-COP* 넉아웃(knockout) 및 과발현체 식물체를 제조하여 가뭄, 고온, 저온, 고염 및 다양한 중금속 등의 스트레스를 처리한 결과, *α1-COP* 넉아웃 돌연변이는 가뭄, 고온, 저온 및 고염 등 다중 스트레스에 저항성을 나타냈으나, 중금속 저항성을 나타내지 않음을 확인하였다. 또한, *α1-COP* 과발현체는 가뭄, 고온, 저온 및 고염 스트레스에 대해 비형질전환체에 비해 민감성이 증가되었음을 알 수 있었다. 상기 결과를 통해 다중 스트레스 저항성 작물 개발 타겟으로서 *α1-COP* 유전자의 가능성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 식물 유래 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1) 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는, 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 (a) 식물 유래 α1-COP 단백질 코딩 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 식물세포에 도입하여 유전체를 교정하는 단계; 및 (b) 상기 유전체가 교정된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가된 유전체 교정 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 식물 유래 α1-COP 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환된 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 조절된 형질전환 식물체 및

이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 식물 유래 α1-COP 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 저항성 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 다중 스트레스 저항성 작물 개발 타겟으로서 *α1-COP* 유전자의 가능성을 시사하였다. 다중 스트레스 저항성 작물의 확보는 농업 분야에서 매우 중요한 특성이므로, 본 발명의 애기장대 유래 *α1-COP* 유전자는 활용도가 높을 것으로 예상된다. 또한, *α1-COP* 유전자는 다양한 비생물적 스트레스(abiotic stress) 연관 유전자와 관련되어 있음이 확인되어, 유전자가위 기반 유전자교정 정밀육종의 매우 중요한 소재로 활용가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 가뭄 스트레스에 대한 *α1-COP* 유전자의 기능을 확인하기 위해, 21일간 물을 끊은 후 4일간 물공급을 재개한 후의 야생형, 돌연변이체 및 과발현 애기장대 식물체의 식물생장 결과를 보여준다. Col-0: 야생형, *α1-cop-1* 및 *α1-cop-5*: 돌연변이체, HA: α1-COP-OE#2, HA: α1-COP-OE#3 및 GFP: α1-COP-OE#1: *α1-COP* 과발현 형질전환체.

도 2는 고염 스트레스에 대한 *α1-COP* 유전자의 기능을 확인하기 위해, 300 mM NaCl 용액으로 관주한 후의 야생형, 돌연변이체 및 과발현체의 식물생장 결과를 보여준다.

도 3은 고온 스트레스에 대한 *α1-COP* 유전자의 기능을 확인하기 위해, 1주일은 MS 배지에서 22℃, 흙에서 2주간 22℃ 기른 후 5일간 37℃에서 처리한 후 다시 1주일간 22℃에서 회복시킨 후의 야생형, 돌연변이체 및 과발현체의 식물생장 결과를 보여준다. Col-0: 야생형, *α1-cop-5*: 돌연변이체, HA: α1-COP-OE#2: *α1-COP* 과발현 형질전환체.

도 4는 저온 스트레스에 대한 *α1-COP* 유전자의 기능을 확인하기 위해, 14일간 22℃에서 정상 MS 배지에서 배양한 후 4℃에서 9일간 처리 후 야생형, 돌연변이체 및 과발현체의 식물생장 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물 유래 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1) 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는, 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조절 방법에 있어서, 상기 α1-COP 단백질은 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 α1-COP 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명에 따른 애기장대 유래 α1-COP 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 본 발명에 있어서, 용어 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 조절하는 활성을 의미한다.

[0016] 본 발명에 따른 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 조절하는 방법은, 상기 식물 유래 α1-COP 단백질 코딩 유전자의 발현을 식물세포에서 저해시켜 비형질전환 식물체에 비해 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증가시키는 것일 수 있고, 또는 상기 α1-COP 단백질 코딩 유전자의 발현을 식물세포에서 과발현시켜 비형질전환 식물체에 비해 비생물적 스트레스에 대한 민감성을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 α1-COP 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제는 α1-COP 단백질 코딩 유전자에 T-DNA 삽입, 내생 트랜스포존(transposon), X-레이 또는 γ-레이 조사를 통한 돌연변이 유발, RNAi 또는 안티센스 RNA, CRISPR/Cas9 유전자 교정 시스템을 이용하여 α1-COP 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해(억제)하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 유전자의 발현을 저해하는 당업계의 통상의 방법이면 모두 가능할 수 있다.

[0018] 본 발명에 따른 식물체의 비생물적 스트레스 저항성 조절 방법에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 가뭄,

고온, 저온 및 염 스트레스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 발명은 또한, 식물 유래 α1-COP 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 유전자의 범위는 α1-COP 단백질을 코딩하는 게놈 DNA, cDNA 및 합성 DNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 α1-COP 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 애기장대 유래 *α1-COP* 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)을 포함할 수 있다.

[0020] 본 명세서에서, 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0021] 본 명세서에서, 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.

[0022] 본 발명의 상기 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ프로모터, Trp 프로모터, Lac 프로모터, T7 프로모터, Tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*Escherichia coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pLλ프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 재조합 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명에 있어서, "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시성(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 항시성 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0025] 본 발명의 재조합 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0027] 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적

인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자(dominant drug resistance gene)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 미세조류, 미생물 등을 포함한 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 츄린겐시스(*B. thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세슨스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스(Pseudomonas) 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모 (예컨대, *Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 식물세포이다.

[0030] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및/(또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

[0031] 본 발명은 또한,

[0032] (a) 식물 유래 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1) 단백질 코딩 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA(guide RNA) 및 엔도뉴클레아제(endonuclease) 단백질을 식물세포에 도입하여 유전체를 교정하는 단계; 및

[0033] (b) 상기 유전체가 교정된 식물세포로부터 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는, 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가된 유전체 교정 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0034] 용어 "유전체/유전자 교정(genome/gene editing)"은, 인간 세포를 비롯한 동·식물 세포의 유전체 염기서열에 표적지향형 변이를 도입할 수 있는 기술로서, DNA 절단에 의한 하나 이상의 핵산 분자의 결실(deletion), 삽입(insertion), 치환(substitutions) 등에 의하여 특정 유전자를 녹-아웃(knock-out) 또는 녹-인(knock-in)하거나, 단백질을 생성하지 않는 비-코딩(non-coding) DNA 서열에도 변이를 도입할 수 있는 기술을 말한다. 본 발명의 목적상 상기 유전체 교정은 특히 엔도뉴클레아제(endonuclease) 예컨대, Cas9 (CRISPR associated protein 9) 단백질 및 가이드 RNA를 이용하여 식물체에 변이를 도입하는 것일 수 있다. 또한, '유전자 교정'은 '유전자 편집'과 혼용되어 사용될 수 있다.

[0035] 용어 "표적 유전자"는 본 발명을 통해 교정하고자 하는 식물체의 유전체 내에 있는 일부 DNA를 의미하며, 그 유전자의 종류에 제한되지 않으며, 코딩 영역 및 비-코딩 영역을 모두 포함할 수 있다. 당업자는 그 목적에 따라, 제조하고자 하는 유전체 교정 식물체에 대하여 원하는 변이에 따라 상기 표적 유전자를 선별할 수 있다.

[0036] 용어 "가이드 RNA(guide RNA)"는 표적 유전자의 염기서열을 암호화하는 DNA에 특이적인 RNA를 의미하며, 표적 DNA 염기서열과 전부 또는 일부가 상보적으로 결합하여 해당 표적 DNA 염기서열로 엔도뉴클레아제 단백질을 이끄는 역할을 하는 리보핵산을 의미한다. 상기 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, crRNA (CRISPR RNA) 및 tracrRNA (trans-activating crRNA)를 구성 요소로 포함하는 이중 RNA (dual RNA); 또는 표적 유전자 내 염기서열과 전부 또는 일부 상보적인 서열을 포함하는 제1 부위 및 RNA-가이드 뉴클레아제와 상호작용하는 서열을 포함하는 제2 부위를 포함하는 단일 사슬 가이드 RNA(sgRNA) 형태를 말하나, RNA-가이드 뉴클레아제가 표적 염기서열에서 활성을 가질 수 있는 형태라면 제한없이 본 발명의 범위에 포함될 수 있으며, 함께 사용된 엔도뉴클레아제의 종류 또는 엔도뉴클레아제의 유래 미생물 등을 고려하여 당업계의 공지된 기술에 따라서 적절히 선택할 수 있다.

[0037] 또한, 상기 가이드 RNA는 플라스미드 주형으로부터 전사된 것, 생체 외(*in vitro*)에서 전사된(transcribed) 것

(예컨대, 올리고뉴클레오티드 이중가닥) 또는 합성한 가이드 RNA 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 또한, 본 발명에 따른 유전체 교정 식물체의 제조방법에 있어서, 상기 엔도뉴클레아제 단백질은 Cas9, Cpf1 (CRISPR from Prevotella and Francisella 1), TALEN (Transcription activator-like effector nuclease), ZFN (Zinc Finger Nuclease) 또는 이의 기능적 유사체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 Cas9 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 상기 Cas9 단백질은 스트렙토코커스 피요제네스(*Streptococcus pyogenes*) 유래의 Cas9 단백질, 캠필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) 유래의 Cas9 단백질, 스트렙토코커스 써모필러스(*S. thermophilus*) 또는 스트렙토코커스 아우레우스(*S. aureus*) 유래의 Cas9 단백질, 네이쎄리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) 유래의 Cas9 단백질, 파스투렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*) 유래의 Cas9 단백질, 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*) 유래의 Cas9 단백질 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. Cas9 단백질 또는 이의 유전자 정보는 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 GenBank와 같은 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다.

[0040] Cas9 단백질은 RNA-guided DNA 엔도뉴클레아제 효소로, 이중 가닥 DNA 절단(double stranded DNA break)을 유도한다. Cas9 단백질이 정확하게 표적 염기서열에 결합하여 DNA 가닥을 잘라내기 위해서는 PAM (Protospacer Adjacent Motif)이라 알려진 3개의 염기로 이루어진 짧은 염기서열이 표적 염기서열 옆에 존재해야 하며, Cas9 단백질은 PAM 서열(NGG)로부터 3번째와 4번째 염기쌍 사이를 추정하여 절단한다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질은 리보핵산-단백질(ribonucleoprotein) 복합체를 형성하여 RNA 유전자 가위(RNA-Guided Engineered Nuclease, RGEN)로 작동할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 사용된 CRISPR/Cas9 시스템은 교정하고자 하는 특정 유전자의 특정위치에 이중나선 절단을 도입하여 DNA 수선 과정에서 유도되는 불완전 수선에 의한 삽입-결실(insertion-deletion, InDel) 돌연변이를 유도시키는 NHEJ(non-homologous end joining) 기작에 의한 유전자 교정 방법이다.

[0043] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 (a) 단계의 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 식물세포에 도입하는 것은, 식물 유래 *α1-COP* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA와 엔도뉴클레아제 단백질의 복합체(ribonucleoprotein); 또는 *α1-COP* 유전자의 표적 염기서열에 특이적인 가이드 RNA를 암호화하는 DNA 및 엔도뉴클레아제 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 벡터;를 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명은 또한, 식물 유래 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환된 식물체를 재분화하는 단계;를 포함하는 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0045] 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 식물 유래 α1-COP 단백질은 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 α1-COP 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함할 수 있고, 구체적인 내용은 전술한 것과 같다.

[0046] 또한, 본 발명의 제조방법에 있어서, 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같으며, 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0047] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 가뭄, 고온, 저온 및 염 스트레스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조방법에 있어서, 상기 α1-COP 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 식물세포에서 저해시키면 비형질전환 식물체 즉, 야생형에 비해 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 증가시킬 수 있고, 또는 α1-COP 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 식물세포에서 과발현시키면 비형질전환 식물체에 비해 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 민감성을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 상기 α1-COP 단백질 코딩 유전자의 발현 저해는 *α1-COP* 유전자에 대한 센스(sense) 또는 안티센스(antisense) DNA, 또는 microRNA를 포함하는 재조합벡터로 식물세포를 형질전환시켜 α1-COP 단백질 코딩 유전자의 발현을

저해하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업계에 공지된 유전자 발현 저해 기술을 이용할 수 있다.

[0050] 본 발명은 또한, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0051] 본 발명에 따른 형질전환 식물체는 α1-COP 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해시킨 경우에는 비생물적 스트레스에 대한 저항성이 증가된 것을 특징으로 하며, α1-COP 단백질 코딩 유전자의 발현을 증가시킨 경우에는 비생물적 스트레스에 대한 저항성의 감소를 특징으로 한다.

[0052] 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 당근, 미나리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물일 수 있고, 바람직하게는 쌍자엽 식물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 애기장대 식물체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 본 발명은 또한, 식물 유래 α1-COP (Coatomer subunit alpha-1) 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 저항성 조절용 조성물을 제공한다.

[0054] 상기 조성물은 유효성분으로 식물 유래 α1-COP 단백질을 코딩하는 유전자 또는 α1-COP 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이를 포함하며, 상기 α1-COP 단백질을 코딩하는 유전자 또는 α1-COP 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환함으로써 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 조절할 수 있다.

[0055] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 식물 유래 α1-COP 단백질은 바람직하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 애기장대 유래 α1-COP 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] **재료 및 방법**

[0060] **1. 식물 재료**

[0061] 본 발명에 사용된 돌연변이체는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) Col-0 생태형의 유전적 배경이고, T-DNA 삽입 계통은 *α1-cop-1* (SALK_078465)과 *α1-cop-5* (SALK_003425) 이다. *α1-COP* 과발현 형질전환체(p35S::α1-COP-OE#2, p35S::α1-COP-OE#3 및 p35S::GFP:α1-COP-OE#1)를 제조하기 위해서, *α1-COP*의 전체 cDNA로부터 증폭된 PCR 산물(종결 코돈 포함 또는 미포함)을 pDONR207 플라스미드(Invitrogen, USA)로 클로닝하였다. 그 결과로 생긴 entry 클론을 게이트웨이 바이너리 벡터인 pMDC43 및 pDEST-^{GW}VYCE로 클로닝하였다. 형질전환 식물체는 아그로박테리움 매개 형질전환법을 통해 야생형 Col-0으로부터 획득하였다. 간단하게, 발달 중인 애기장대 꽃을 상기 벡터로 형질전환된 아그로박테리움을 포함하는 배양액에 5초간 침지시킨 후, T_1 종자를 형질전환된 식물체를 동정하기 위한 선별 배지에서 생장시켰다.

[0063] **2. 비생물적 스트레스 처리**

[0064] **2-1. 가뭄 스트레스 처리 및 저항성 검증**

[0065] 야생형, 돌연변이체 및 과발현체의 종자를 20%(v/v) 표백제로 15분동안 표면멸균시킨 후, 증류수로 4회 세척하고, 4℃의 암 조건에서 3일간 방치한 후 0.6% 아가를 포함하는 MS 배지에 정식하였다. 가뭄(/만니톨) 스트레스는, 전술한 종자를 16시간 명/8시간 암의 광주기 조건 및 22℃의 온도 조건에서 발아시킨 후, 발아 2일 후 유묘를 새로운 정상 MS 배지(mock) 또는 300 mM 만니톨을 포함하는 배지(가뭄 스트레스 조건)로 옮긴 후, 14 DAG(day after germination)에 주근(primary root) 길이 분석을 수행하였다. 토양에서의 가뭄 스트레스를 위해, MS 배지에서 생장시킨 14일령의 애기장대 식물체를 토양으로 옮긴 후, 21일 동안 가뭄 스트레스(물 공급을 하지 않음)를 처리하였다. 스트레스 처리 후 4일간 재관수한 후 식물체의 생존율을 분석하였다.

[0067] **2-2. 고염 스트레스 처리 및 저항성 검증**

[0068] 상기 2-1.에서와 동일한 방법으로 멸균 및 생장시킨 발아 후 2일령의 유묘를 정상적인 MS 배지(mock) 또는 300 mM 염화나트륨을 포함하는 배지(고염 스트레스 조건)로 옮긴 후 11 DAG에 주근의 길이 및 생존율을 분석하였다. 또한, MS 배지에서 생장시킨 14일령의 애기장대 식물체를 토양으로 옮긴 후, 정상 토양(대조군) 또는 300 mM의 염 조건 토양(스트레스군)에서 24일간 둔 후, 24일째 식물체의 생체중을 측정하였다.

[0070] **2-3. 고온 스트레스 어세이**

[0071] 상기 2-1.에서와 동일한 방법으로 멸균, 생장 및 발아시켰다. 7일령의 유묘를 토양으로 옮긴 후 22℃의 생장 챔버(16시간 명/8시간 암의 광주기)에서 2주간 성장시킨 후, 3주령의 식물체를 37℃의 생장 챔버(16시간 명/8시간 암의 광주기)로 옮겨 고온 스트레스를 처리하였다. 5일 후, 식물체를 22℃의 생장 챔버로 다시 옮기고 1주일 후 식물체의 생존율을 확인하였다.

[0073] **2-4. 저온 스트레스 어세이**

[0074] 상기 2-1.에서와 동일한 방법으로 멸균 및 생장시킨 발아 후 2일령의 유묘를 새 MS 배지로 옮기고 16시간 명/8시간 암의 광주기 조건 및 22℃의 온도 조건(대조군) 또는 16시간 명/8시간 암의 광주기 조건 및 4℃의 온도 조건(저온 스트레스 조건)으로 9일간 배양시켰다. 9일 후 주근의 길이 및 측근(lateral root)의 수를 분석하였다.

[0076] **실시예 1. 비생물적 스트레스에 대한 *α1-COP* 유전자의 돌연변이체 및 과발현체의 저항성 검증**

[0077] *α1-COP* 유전자에 의한 식물체의 비생물적 스트레스에 대한 저항성을 분석하기 위해, 가뭄, 고염, 고온 및 저온 스트레스 조건을 야생형, 돌연변이체 및 과발현체에 처리하고 식물체의 생장을 확인하였다.

[0078] 먼저, 가뭄 스트레스는 21일간 물을 끊은 후 4일간 물공급을 재개한 후의 식물생장 수준을 통해 분석하였고, 고염 스트레스는 정상 MS 배지에서 발아한 2일령의 유묘를 300 mM NaCl을 포함하거나 포함하지 않는 MS 배지에서 9일간 생장시킨 후 각 식물체의 생장 수준을 통해 분석하였으며, 고온 스트레스는 정상 MS 배지에서 발아한 7일령의 유묘를 토양으로 옮겨 22℃에서 2주간 성장시킨 후, 37℃의 생장 챔버로 옮겨 5일간 방치한 후 22℃의 조건으로 옮겨 회복시키며 각 식물체의 생장 수준을 분석하였으며, 저온 스트레스는 14일간 22℃에서 정상 MS 배지에서 배양한 후 4℃에서 9일간 처리 후 각 식물체의 생장 수준을 분석하였다.

[0079] 그 결과, 도 1 내지 4에 개시된 바와 같이, *α1-COP* 돌연변이체는 야생형에 비해 가뭄, 고염, 고온 및 저온 스트레스에 대한 저항성이 증진되었음을 관찰할 수 있었으며, *α1-COP* 과발현 형질전환체는 야생형에 비해 상기 모든 비생물적 스트레스 조건에서 저항성이 감소되었음을 확인할 수 있었다.

[0081] **실시예 2. 식물 α1-COP 단백질의 상동성 비교**

[0082] 애기장대 α1-COP과 다른 식물의 α1-COP 단백질과 상동성을 비교하였다. 그 결과, 하기 표 1 내지 3에 개시된 바와 같이 α1-COP 단백질이 다양한 작물 및 과수에서 매우 높은 정도로 보존되어 있음을 알 수 있었다. 상기 결과를 통해 애기장대 외, 다른 식물에서 *α1-COP*가 넉아우트 될 때 비생물학적인 스트레스 저항성이 애기장대 식물에서처럼 유도될 수 있음을 유추할 수 있었다.

표 1

식물체에서 α1-COP 단백질의 상동성 비교

Gene_id	E_value	Bit_score	Alignment_length	Identity (%)	Species	Common_name	gf	
AT1G62020	0	2536	1217	100	ath	*Arabidopsis thaliana*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	
ME09277G00040	0	2228	1222	85.92	mes	*Manihot esculenta*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Cassava
CS00237G00220	0	2219	1220	86.8	csi	*Citrus sinensis*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	sweet orange
ME02994G00340	0	2219	1220	86.48	mes	*Manihot esculenta*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Cassava
PT15G06970	0	2216	1220	86.39	ptr	*Populus trichocarpa*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Black cottonwood
CM00019G03440	0	2210	1220	84.67	cme	*Cucumis melo*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Muskmelon
CL02G04920	0	2188	1220	84.51	cla	*Citrullus lanatus*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Watermelon
PT12G07480	0	2187	1221	85.75	ptr	*Populus trichocarpa*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Black cottonwood
PPE_005G22230	0	2175	1220	83.52	ppe	*Prunus persica*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Peach
CP00139G00270	0	2175	1219	83.92	cpa	*Carica papaya*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Papaya
CM00059G01590	0	2173	1221	83.95	cme	*Cucumis melo*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Muskmelon
BV9G12860	0	2163	1221	83.05	bvu	*Beta vulgaris*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Beet
TC0002G07440	0	2162	1221	84.19	tca	*Theobroma cacao*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Cacao
TC0002G07430	0	2162	1221	84.28	tca	*Theobroma cacao*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Cacao
MD06G017900	0	2158	1221	83.62	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D035923	Apple
PPE_004G08760	0	2155	1220	82.95	ppe	*Prunus persica*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Peach
CM00059G01600	0	2154	1221	84.11	cme	*Cucumis melo*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Muskmelon
SL04G080980	0	2148	1220	83.69	sly	*Solanum lycopersicum*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Tomato
CL11G14880	0	2146	1221	84.44	cla	*Citrullus lanatus*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Watermelon
ST07G015210	0	2146	1220	82.05	stu	*Solanum tuberosum*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Potato
ST04G034370	0	2143	1220	83.44	stu	*Solanum tuberosum*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Potato
MD00G223890	0	2142	1220	82.38	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D092619	Apple
GM11G12080	0	2140	1224	82.84	gma	*Glycine max*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Soybean
GM12G04290	0	2138	1224	82.6	gma	*Glycine max*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Soybean
CL11G14870	0	2137	1221	84.03	cla	*Citrullus lanatus*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Watermelon
GM10G34310	0	2137	1222	82.9	gma	*Glycine max*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Soybean
SL07G032100	0	2137	1220	81.8	sly	*Solanum lycopersicum*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Tomato

[0083]

표 2

Gene_id	E_value	Bit_score	Alignment_length	Identity (%)	Species	Common_name	gf	
TC0008G03520	0	2134	1223	81.93	tca	*Theobroma cacao*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Cacao
MD00G293700	0	2132	1220	82.05	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D092620	Apple
GM20G33270	0	2130	1222	82.57	gma	*Glycine max*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Soybean
ME07012G00670	0	2117	1220	81.15	mes	*Manihot esculenta*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Cassava
MD14G021150	0	2103	1221	81.82	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D035923	Apple
GM04G43440	0	2090	1220	80.9	gma	*Glycine max*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Soybean
OS09G04110	0	2056	1221	78.95	osa	*Oryza sativa ssp. japonica*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Rice
ZM01G50560	0	2054	1227	78.24	zma	*Zea mays*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Maize
BV1G08250	0	2051	1218	79.39	bvu	*Beta vulgaris*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Beet
OS03G50340	0	2051	1221	78.54	osa	*Oryza sativa ssp. japonica*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Rice
OS03G50350	0	2037	1221	77.97	osa	*Oryza sativa ssp. japonica*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Rice
ZM05G05600	0	2030	1222	77.91	zma	*Zea mays*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Maize
VV18G09820	0	1560	827	87.18	vvi	*Vitis vinifera*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Grape Vine
MD10G020320	0	1205	676	82.84	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D018081	Apple
CP00139G00260	0	964	593	77.57	cpa	*Carica papaya*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Papaya
MD00G452860	0	761	484	75.41	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D028761	Apple
CP00150G00450	0	610	356	82.02	cpa	*Carica papaya*	HOM03D000291 ORTHO03D018081	Papaya
CP00150G00460	0	588	341	80.35	cpa	*Carica papaya*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Papaya
CP00139G00250	6.00E-158	480	234	94.44	cpa	*Carica papaya*	HOM03D000291 ORTHO03D075151	Papaya
ZM03G01550	1.00E-153	468	234	90.17	zma	*Zea mays*	HOM03D000291 ORTHO03D075151	Maize
MD00G076200	2.00E-138	435	295	71.86	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D082549	Apple
MD10G020210	8.00E-138	433	297	71.72	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Apple
MD00G293750	7.00E-135	425	285	73.68	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D000719	Apple
MD00G310970	4.00E-93	308	151	91.39	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D283289	Apple
MD02G009690	1.00E-64	225	119	84.03	mdo	*Malus domestica*	HOM03D007256 ORTHO03D057887	Apple
MD00G248440	1.00E-63	221	142	73.24	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D164336	Apple

[0084]

표 3

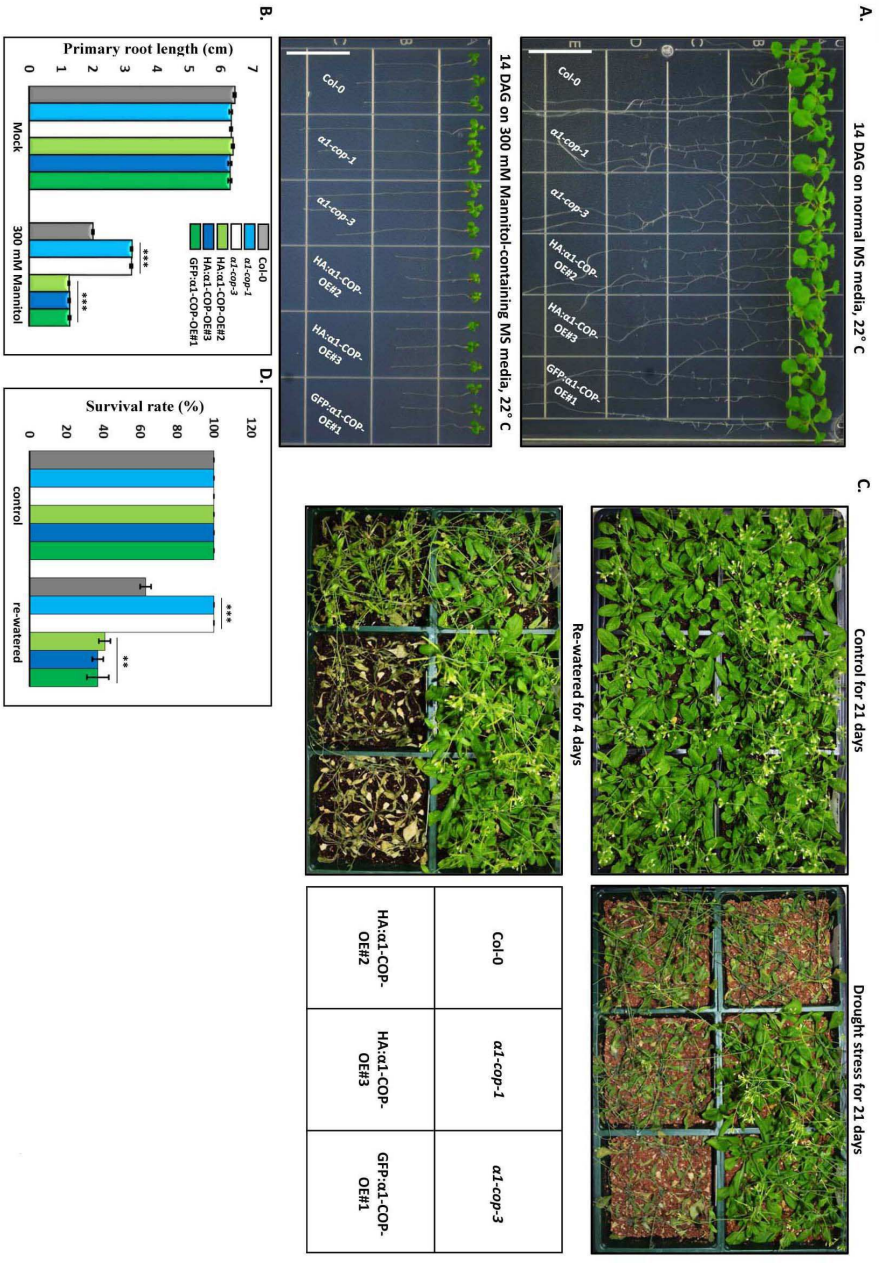
Gene_id	E_value	Bit_score	Alignment_length	Identity (%)	Species	Common_name	gf	
MD00G205610	3.00E-53	189	113	78.76	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D058938	Apple
MD14G021090	9.00E-53	201	121	78.51	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D058938	Apple
MD00G487360	1.00E-52	194	103	83.5	mdo	*Malus domestica*	HOM03D007256 ORTHO03D057887	Apple
VV00G04360	4.00E-38	144	69	95.65	vvi	*Vitis vinifera*	HOM03D000291 ORTHO03D300835	Grape Vine
MD00G293760	2.00E-34	134	75	77.33	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D062348	Apple
MD10G020310	4.00E-33	135	77	75.32	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D062348	Apple
GM13G04341	1.00E-32	128	65	87.69	gma	*Glycine max*	HOM03D000291 ORTHO03D285533	Soybean
MD00G346180	4.00E-26	109	54	81.48	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D302495	Apple
MD00G363900	2.00E-20	94	51	80.39	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D230875	Apple
MD00G293610	1.00E-16	81.6	40	87.5	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D176716	Apple
MD10G020240	7.00E-14	73.9	39	82.05	mdo	*Malus domestica*	HOM03D000291 ORTHO03D250069	Apple
TC0006G08580	1.00E-74	271	813	26.69	tca	*Theobroma cacao*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	
ME02196G00200	1.00E-74	271	796	26.76	mes	*Manihot esculenta*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	
ZM09G13430	1.00E-74	273	800	27.38	zma	*Zea mays*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	
MT4G011950	2.00E-74	271	816	26.72	mtr	*Medicago truncatula*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	
ME02581G00050	2.00E-74	271	811	26.76	mes	*Manihot esculenta*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	
CM00067G00040	3.00E-74	270	874	26.66	cme	*Cucumis melo*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	
GR06G09900	3.00E-74	270	921	25.73	gra	*Gossypium raimondii*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	
BR01G32920	3.00E-74	271	817	26.93	bra	*Brassica rapa*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	
PT01G17920	4.00E-74	270	811	26.51	ptr	*Populus trichocarpa*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	
CRU_003G14950	6.00E-74	270	814	26.66	cru	*Capsella rubella*	HOM03D000291 ORTHO03D000714	

Source: BLAST hits against the PLAZA database

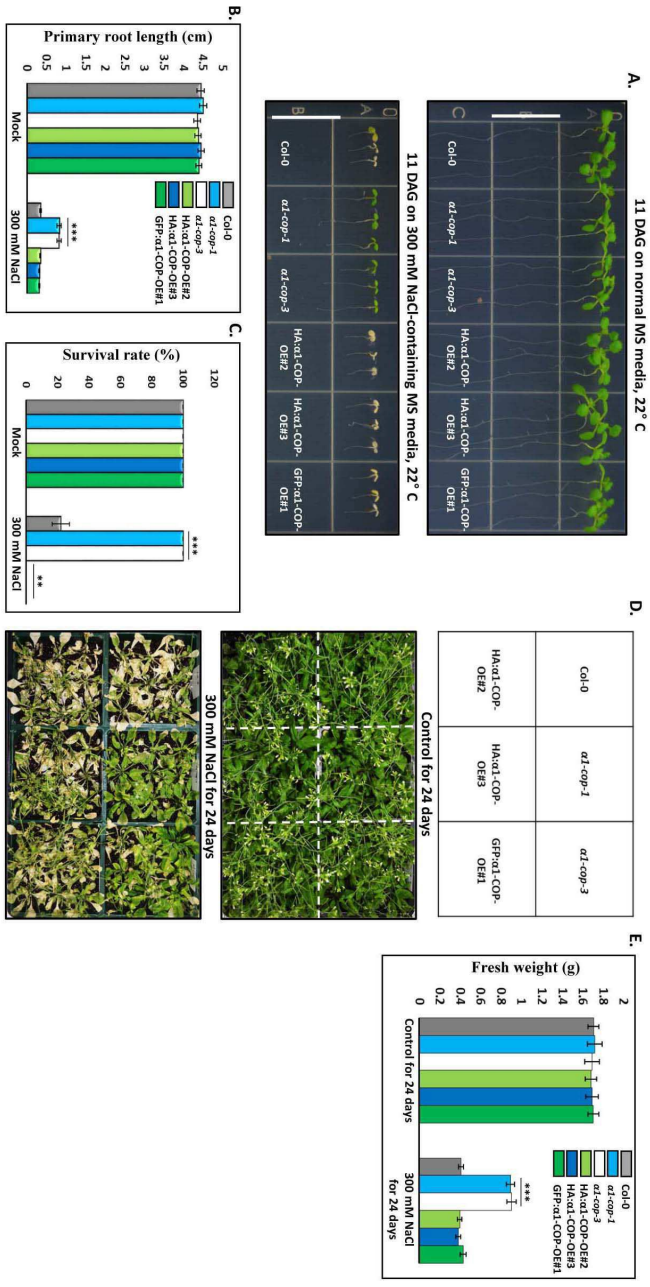
[0085]

도면

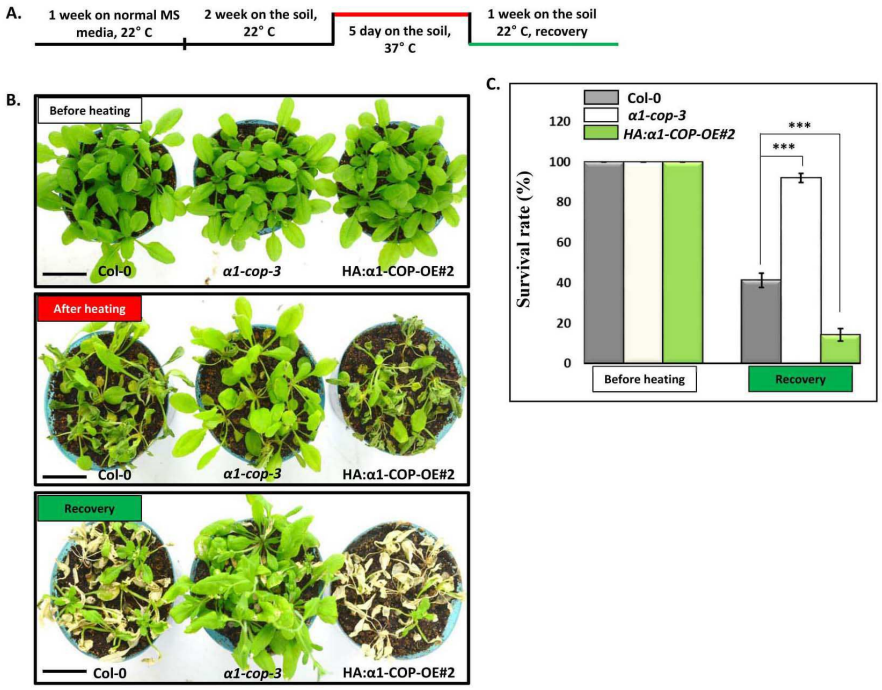
도면1


A.
14 DAG on normal MS media, 22° C
Col-0
α1-cop-1
α1-cop-3
HA:α1-COP-OE#2
HA:α1-COP-OE#3
GFP:α1-COP-OE#1
14 DAG on 300 mM Mannitol-containing MS media, 22° C
B.
Primary root length (cm)
Mock
300 mM Mannitol
C.
Control for 21 days
Re-watered for 4 days
Drought stress for 21 days
D.
Survival rate (%)
control
re-watered
Col-0
α1-cop-1
α1-cop-3
HA:α1-COP-OE#2
HA:α1-COP-OE#3
GFP:α1-COP-OE#1

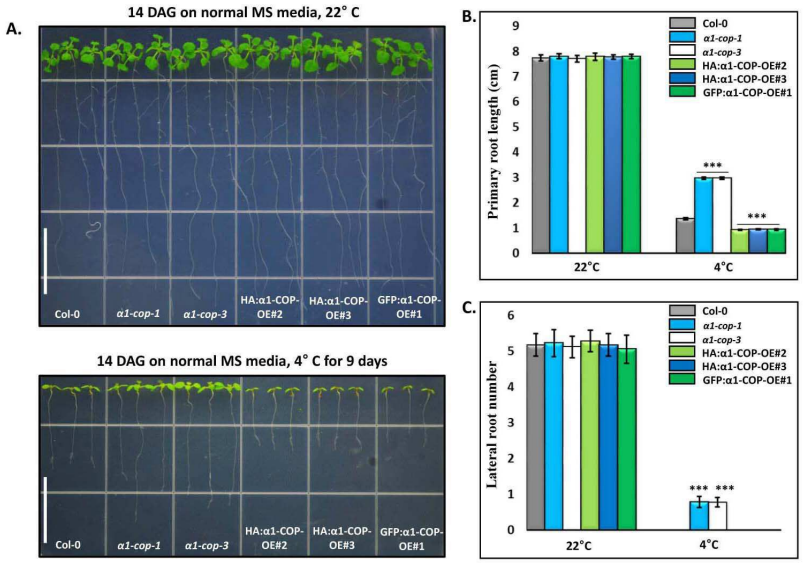
도면2


A.
11 DAG on normal MS media, 22° C
11 DAG on 300 mM NaCl-containing MS media, 22° C
Col-0
α1-cop-1
α1-cop-3
HA:α1-COP-OE#2
HA:α1-COP-OE#3
GFP:α1-COP-OE#1
B.
Primary root length (cm)
Mock
300 mM NaCl
C.
Survival rate (%)
D.
Control for 24 days
300 mM NaCl for 24 days
E.
Fresh weight (g)

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> a1-COP gene controlling abiotic stress of plant and uses thereof

<130> PN20211

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 3651

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atgttgacaa agttcgaaac caaaagtaac agagttaagg gactgagttt tcaccctaaa 60

cgaccatgga ttctcgcgag tttgcacagt ggcgtgatcc agctctggga ttatcgtatg 120

ggtactttga tcgatagatt cgacgaacac gaaggacctg ttcgtggtgt tcatttccac 180

aattctcagc ctctcttcgt ctccggaggg gatgattaca agattaaagt gtggaactac 240

aaaaaccaca ggtgcctttt cactcttcta gggcatcttg attatatccg cacggttcag 300

ttccatcatg agtacccatg gattgtgagt gcaagtgatg atcaaactat ccgtatatgg 360

aactggcaat cacggacttg tgtttctgta ttgactggtc acaatcatta tgttatgtgt 420

gcttctttcc atccgaaaga agacctcgtc gtatcagctt cgttagatca gactgttcgt 480

gtttgggata ttggtgctct taggaagaag actgtatctc ctgctgatga tatcatgagg 540

ttgactcaga tgaatagtga tctttttggt ggagttgatg ccattgtcaa gtacgttctt 600

gaaggtcatg atagaggtgt aaactgggct gcttttcatc ccaccctgcc tcttattgtc 660

tcgggtgcag atgaccgcca agtaaagctg tggcgtatga atgaaactaa agcttgggag 720

gtggatacat tgcgaggcca tatgaataac gtttcatctg ttatgttcca tgcaaaacag 780

gacataattg tatcaaactc tgaagataag agcatccgtg tctgggatgc taccaagcga 840

actggacttc agactttccg tcgtgaacat gatagattct ggattcttgc agttcaccct 900

gagatgaatc tactagcagc aggacatgac agtggcatga ttgtgttcaa gcttgagaga 960

gaacgtcctg catttgcttt gagtggggat tctttgttct atgccaagga tagattcttg 1020

cggtactatg aatattcaac tcaaagggat tcccaagtta tccctatacg gcgtccgggt 1080

actccaagct tgaatcaaag tcctaggact ctatcataca gtcccactga aaatgcagtt 1140

ttgatctgct cagatctgga tggtggttcg tatgagttgt acatcatacc gaaagatagt 1200

gttggcagga gtgacgttgt gcaagatgca aagagaggga caggtggctc tgcagtattc 1260

attgcccgta accgatttgc tgttctcgag aaaagcacca gccaagtgct agtcaagaat 1320

ctaaagaatg aggtggttaa aaagagtcct ctgcctattc ccacagatgc tatcttttat 1380

gctgggactg ggaatttgct ttgtagatct gaggataaag tagttatctt tgacctccag 1440

caaaggcttg ttcttggtga gcttcagaca ccatttgtta ggtacgttgt ttggtccagt 1500

gatatggaga gtgttgcttt gctcagcaaa catactatca ttatcgcgag caaaaaactt 1560

gttctccagt gcacgcttca tgagacgata cgtgtgaaaa gtggagcttg ggacgataat 1620

ggtgtcttca tttacacaac tttgaatcat atcaagtact gtcttcctaa tggagatagt 1680

ggaatcatcc gaaccctgga tgtcccaatc tatatcacca aggtgtctgg taatacaatc 1740

ttttgcttgg atcgggatgg caaaaacaag gctatcacca ttaatgcaac cgagtacatt 1800

ttcaagcttt cactgctgag gaagagatat gatcatgtca tgagcatgat aaagaactct 1860

cagctatgtg gacaggctat gattgcttac ctgcagcaga aaggattccc tgaagttgcc 1920

ctccattttg ttgaagatga gaggatccga ttcaatctgg ctcttgaaag tggcaacatc 1980

agtgtggctg ttgcatccgc tacacagatt aacgagaaag accactggta tagacttgga 2040

gtggaggctc ttcgccaagg taattctgga attgttgagt ttgcatacca gcagacaaag 2100

aactttgaga ggttatcttt tctttatctc attactggaa atttggacaa gctttcaaag 2160

ttgatgaaga ttgcagaagt gaagaacaac gtaatgggac agtttcacaa tgctctctac 2220

ctaggagatg ttaaagagcg tgttaagata ctggagaatg ctggtcattt gcctctagct 2280

tatatcacag cttcggttca tggtttaaat gacattgctg agcgactggc aactgagtta 2340

ggagacaacg tgccctcatt gcctgaagga aaaactccat cgcttctaat gccaccgaca 2400

cccatcatgt gtggtggtga ttggcctctt cttagagtga tgaaaggaat atttgaagga 2460

ggacttgaga gtgcagacag aggaggtact gttgatgaag aagatgttga aggggattgg 2520

ggtgaggaac ttgacattaa tgttgatgga atggagaaca gagatattga agacattttg 2580

gcggctgcag aagcaggtga agaagaaaac gatgaggaag gtggatgggg acttgaagac 2640

ttggtgctcc caccagagct tgacactcct aaagcctctg ctaatgcacg ttcatctgtt 2700

tttgtgacac ctccccaagg tatgcccgta agtcagagct ggagccagaa atcttctctt 2760

gctgctgagc aagccgcagc gggaagcttc gacactgcaa tgcgtctgct ccacagacag 2820

cttggtatca agaactttac acctttgaaa tcgatgtttc tagatctgtt caatggcagc 2880

catagctatc tgcgtgcttt ttcttcatgt cctgtggttc cacttgccat tgagcgtgga 2940

tggagcgagt cttccagtcc caacgtccgt agcccaccag ctcttgttta tgatttctct 3000

cagctagacg agaagctcaa atccggctac aaagctacaa caactgggaa attcactgag 3060

gctctccgtc tcttcctttc tatcctgcac accatccctc tagtggtagt cgagacaaga 3120

agagaagtgg atgaggtcaa ggaattaatc gttatcgtta aagaatatgt ccttggtctt 3180

caaatggagc tcaagaggag agagatgaaa gatgatccgg tgaggcagca agagctcgct 3240

gcttacttca ctcactgcaa cctccaaaca cctcacttac ggcttgcgct gcttagtgca 3300

atgggtgtct gctacaaggc aaagaacctc gccactgctt ctaatttcgc cagaagactg 3360

ttggaaacaa gcccagttga tagccaagcc aagatggcta gacaagttgt gcaagccgct 3420

gaacgtaaca tgaccgatga aacaaagctt aactacgact tcaggaaccc ttttgtggta 3480

tgtggttcca catatgtccc gatctacaga ggacagaaag acgtctcatg tccttactgc 3540

accgcccggt ttgtaccaaa ccaggaagga aacatctgca cggtctgtga tctagcagtg 3600

attggcgcag acgcatctgg tttgttatgc tctccatctc aagtccggtg a 3651

<210> 2

<211> 1216

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Leu Thr Lys Phe Glu Thr Lys Ser Asn Arg Val Lys Gly Leu Ser
1 5 10 15

Phe His Pro Lys Arg Pro Trp Ile Leu Ala Ser Leu His Ser Gly Val
20 25 30

Ile Gln Leu Trp Asp Tyr Arg Met Gly Thr Leu Ile Asp Arg Phe Asp
35 40 45

Glu His Glu Gly Pro Val Arg Gly Val His Phe His Asn Ser Gln Pro
50 55 60

Leu Phe Val Ser Gly Gly Asp Asp Tyr Lys Ile Lys Val Trp Asn Tyr
65 70 75 80

Lys Asn His Arg Cys Leu Phe Thr Leu Leu Gly His Leu Asp Tyr Ile
85 90 95

Arg Thr Val Gln Phe His His Glu Tyr Pro Trp Ile Val Ser Ala Ser
100 105 110

Asp Asp Gln Thr Ile Arg Ile Trp Asn Trp Gln Ser Arg Thr Cys Val
115 120 125

Ser Val Leu Thr Gly His Asn His Tyr Val Met Cys Ala Ser Phe His
130 135 140

Pro Lys Glu Asp Leu Val Val Ser Ala Ser Leu Asp Gln Thr Val Arg
145 150 155 160

Val Trp Asp Ile Gly Ala Leu Arg Lys Lys Thr Val Ser Pro Ala Asp
165 170 175

Asp Ile Met Arg Leu Thr Gln Met Asn Ser Asp Leu Phe Gly Gly Val

180 185 190

Asp Ala Ile Val Lys Tyr Val Leu Glu Gly His Asp Arg Gly Val Asn

195 200 205

Trp Ala Ala Phe His Pro Thr Leu Pro Leu Ile Val Ser Gly Ala Asp

210 215 220

Asp Arg Gln Val Lys Leu Trp Arg Met Asn Glu Thr Lys Ala Trp Glu

225 230 235 240

Val Asp Thr Leu Arg Gly His Met Asn Asn Val Ser Ser Val Met Phe

245 250 255

His Ala Lys Gln Asp Ile Ile Val Ser Asn Ser Glu Asp Lys Ser Ile

260 265 270

Arg Val Trp Asp Ala Thr Lys Arg Thr Gly Leu Gln Thr Phe Arg Arg

275 280 285

Glu His Asp Arg Phe Trp Ile Leu Ala Val His Pro Glu Met Asn Leu

290 295 300

Leu Ala Ala Gly His Asp Ser Gly Met Ile Val Phe Lys Leu Glu Arg

305 310 315 320

Glu Arg Pro Ala Phe Ala Leu Ser Gly Asp Ser Leu Phe Tyr Ala Lys

325 330 335

Asp Arg Phe Leu Arg Tyr Tyr Glu Tyr Ser Thr Gln Arg Asp Ser Gln

340 345 350

Val Ile Pro Ile Arg Arg Pro Gly Thr Pro Ser Leu Asn Gln Ser Pro

355 360 365

Arg Thr Leu Ser Tyr Ser Pro Thr Glu Asn Ala Val Leu Ile Cys Ser

370 375 380

Asp Leu Asp Gly Gly Ser Tyr Glu Leu Tyr Ile Ile Pro Lys Asp Ser

385 390 395 400

Val Gly Arg Ser Asp Val Val Gln Asp Ala Lys Arg Gly Thr Gly Gly

405 410 415

Ser Ala Val Phe Ile Ala Arg Asn Arg Phe Ala Val Leu Glu Lys Ser

420 425 430

Thr Ser Gln Val Leu Val Lys Asn Leu Lys Asn Glu Val Val Lys Lys

435 440 445

Ser Pro Leu Pro Ile Pro Thr Asp Ala Ile Phe Tyr Ala Gly Thr Gly

450 455 460

Asn Leu Leu Cys Arg Ser Glu Asp Lys Val Val Ile Phe Asp Leu Gln

465 470 475 480

Gln Arg Leu Val Leu Gly Glu Leu Gln Thr Pro Phe Val Arg Tyr Val

485 490 495

Val Trp Ser Ser Asp Met Glu Ser Val Ala Leu Leu Ser Lys His Thr

500 505 510

Ile Ile Ile Ala Ser Lys Lys Leu Val Leu Gln Cys Thr Leu His Glu

515 520 525

Thr Ile Arg Val Lys Ser Gly Ala Trp Asp Asp Asn Gly Val Phe Ile

530 535 540

Tyr Thr Thr Leu Asn His Ile Lys Tyr Cys Leu Pro Asn Gly Asp Ser

545 550 555 560

Gly Ile Ile Arg Thr Leu Asp Val Pro Ile Tyr Ile Thr Lys Val Ser

565 570 575

Gly Asn Thr Ile Phe Cys Leu Asp Arg Asp Gly Lys Asn Lys Ala Ile

580 585 590

Thr Ile Asn Ala Thr Glu Tyr Ile Phe Lys Leu Ser Leu Leu Arg Lys

595 600 605

Arg Tyr Asp His Val Met Ser Met Ile Lys Asn Ser Gln Leu Cys Gly

610 615 620

Gln Ala Met Ile Ala Tyr Leu Gln Gln Lys Gly Phe Pro Glu Val Ala

625 630 635 640

Leu His Phe Val Glu Asp Glu Arg Ile Arg Phe Asn Leu Ala Leu Glu

645 650 655

Ser Gly Asn Ile Ser Val Ala Val Ala Ser Ala Thr Gln Ile Asn Glu

660 665 670

Lys Asp His Trp Tyr Arg Leu Gly Val Glu Ala Leu Arg Gln Gly Asn

675 680 685

Ser Gly Ile Val Glu Phe Ala Tyr Gln Gln Thr Lys Asn Phe Glu Arg
690 695 700
Leu Ser Phe Leu Tyr Leu Ile Thr Gly Asn Leu Asp Lys Leu Ser Lys
705 710 715 720
Leu Met Lys Ile Ala Glu Val Lys Asn Asn Val Met Gly Gln Phe His
725 730 735
Asn Ala Leu Tyr Leu Gly Asp Val Lys Glu Arg Val Lys Ile Leu Glu
740 745 750
Asn Ala Gly His Leu Pro Leu Ala Tyr Ile Thr Ala Ser Val His Gly

755 760 765
Leu Asn Asp Ile Ala Glu Arg Leu Ala Thr Glu Leu Gly Asp Asn Val
770 775 780
Pro Ser Leu Pro Glu Gly Lys Thr Pro Ser Leu Leu Met Pro Pro Thr
785 790 795 800
Pro Ile Met Cys Gly Gly Asp Trp Pro Leu Leu Arg Val Met Lys Gly
805 810 815
Ile Phe Glu Gly Gly Leu Glu Ser Ala Asp Arg Gly Gly Thr Val Asp
820 825 830

Glu Glu Asp Val Glu Gly Asp Trp Gly Glu Glu Leu Asp Ile Asn Val
835 840 845
Asp Gly Met Glu Asn Arg Asp Ile Glu Asp Ile Leu Ala Ala Ala Glu
850 855 860
Ala Gly Glu Glu Glu Asn Asp Glu Glu Gly Gly Trp Gly Leu Glu Asp
865 870 875 880
Leu Val Leu Pro Pro Glu Leu Asp Thr Pro Lys Ala Ser Ala Asn Ala
885 890 895
Arg Ser Ser Val Phe Val Thr Pro Pro Gln Gly Met Pro Val Ser Gln

900 905 910
Ser Trp Ser Gln Lys Ser Ser Leu Ala Ala Glu Gln Ala Ala Ala Gly
915 920 925
Ser Phe Asp Thr Ala Met Arg Leu Leu His Arg Gln Leu Gly Ile Lys
930 935 940

Asn Phe Thr Pro Leu Lys Ser Met Phe Leu Asp Leu Phe Asn Gly Ser
945 950 955 960
His Ser Tyr Leu Arg Ala Phe Ser Ser Cys Pro Val Val Pro Leu Ala
965 970 975

Ile Glu Arg Gly Trp Ser Glu Ser Ser Ser Pro Asn Val Arg Ser Pro
980 985 990
Pro Ala Leu Val Tyr Asp Phe Ser Gln Leu Asp Glu Lys Leu Lys Ser
995 1000 1005
Gly Tyr Lys Ala Thr Thr Thr Gly Lys Phe Thr Glu Ala Leu Arg Leu
1010 1015 1020
Phe Leu Ser Ile Leu His Thr Ile Pro Leu Val Val Val Glu Thr Arg
1025 1030 1035 1040
Arg Glu Val Asp Glu Val Lys Glu Leu Ile Val Ile Val Lys Glu Tyr

1045 1050 1055
Val Leu Gly Leu Gln Met Glu Leu Lys Arg Arg Glu Met Lys Asp Asp
1060 1065 1070
Pro Val Arg Gln Gln Glu Leu Ala Ala Tyr Phe Thr His Cys Asn Leu
1075 1080 1085
Gln Thr Pro His Leu Arg Leu Ala Leu Leu Ser Ala Met Gly Val Cys
1090 1095 1100
Tyr Lys Ala Lys Asn Leu Ala Thr Ala Ser Asn Phe Ala Arg Arg Leu
1105 1110 1115 1120

Leu Glu Thr Ser Pro Val Asp Ser Gln Ala Lys Met Ala Arg Gln Val
1125 1130 1135
Val Gln Ala Ala Glu Arg Asn Met Thr Asp Glu Thr Lys Leu Asn Tyr
1140 1145 1150
Asp Phe Arg Asn Pro Phe Val Val Cys Gly Ser Thr Tyr Val Pro Ile
1155 1160 1165
Tyr Arg Gly Gln Lys Asp Val Ser Cys Pro Tyr Cys Thr Ala Arg Phe
1170 1175 1180
Val Pro Asn Gln Glu Gly Asn Ile Cys Thr Val Cys Asp Leu Ala Val

1185 1190 1195 1200

Ile Gly Ala Asp Ala Ser Gly Leu Leu Cys Ser Pro Ser Gln Val Arg

1205 1210 1215