(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0077107
(43) 공개일자 2023년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) *A01H 1/06* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
A01H 1/06 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2021-0164008
(22) 출원일자 2021년11월25일
심사청구일자 2021년11월25일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이상열
경상남도 진주시 진주역로96번길 15, 102동 3003호(포레나신진주아파트, 가좌동)
강창호
경상남도 사천시 곤명면 만지2길 20-12
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

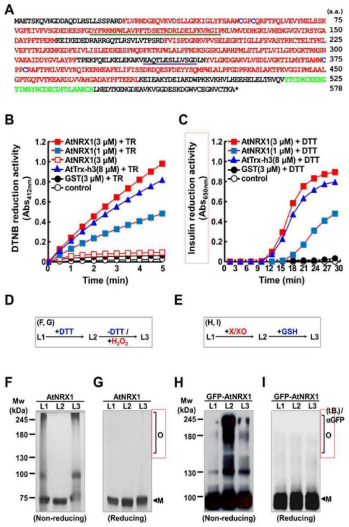
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질을 넉아웃시킨 알터나리아 브라시시콜라 진균 저항성 형질전환 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질을 넉아웃시킨 알터나리아 브라시시콜라 진균 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세히는 알터나리아 브라시시콜라 진균의 방어 반응에 안전핀 역할을 하는 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질의 발현을 음성 조절시켜 알터나리아 브라시시콜라 진균에 저항성을 지닌 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/8216 (2013.01)
C12N 15/8282 (2013.01)
(72) 발명자
박정훈
경상남도 진주시 내동로348번길 10, 가좌그린빌 102동 704호
이은선
경상남도 진주시 내동로348번길 10, 가좌그린빌 102동 704호
채호병
경상남도 진주시 순환로 503, 라온프라이빗시티럭스 416호
팽슬기
경상남도 진주시 진주대로500번길 8, 204호
위성동
경상남도 김해시 김해대로2324번길 54-27, 102동 1103호 (봉황동, 봉황역e편한세상아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345331714
과제번호 2016R1D1A1B0101655116
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(R&D)
연구과제명 리보좀인자를 통한 식물 스트레스 내성기작 연구 및 활용
기 여 율 1/5
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395063136
과제번호 G24013340012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명 레독스 매개 리보핵산결합단백질의 식물 스트레스 반응 조절 연구
기 여 율 1/5
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395063006
과제번호 G24013173012020
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명 시스템생물학 기반 유용신소재 생산을 위한 소포체스트레스 방어기전 연구
기 여 율 1/5
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395067952
과제번호 G24015824012021
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명 시스템합성 기반 리독스 조절을 통한 식물세포기능 향상과 분자농업용 작물 개발(1주관)
기 여 율 1/5
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395068022
과제번호 G24015862012021
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명 수확량 증진을 위한 RNA 대사조절 리독스인자 활용기술 개발(1주관)
기 여 율 1/5
과제수행기관명 경상국립대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 지니는 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 평상시에는 AtNRX1 단백질 단량체로 존재하지만 활성산소종으로 인한 산화 스트레스 시 AtNRX1 단백질 내의 시스테인 잔기를 산화시켜 산화환원 의존적으로 단량체에서 올리고머 형태로 가역적으로 전환되어 질병 저항성 유전자의 발현을 유도함을 특징으로 하는 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질을 포함하는 조성물

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질은 메틸 자스모네이트(MeJA) 처리 시 상향 조절 발현되고 알터나리아 브라시시콜라계 진균 병원체에 대한 음성적(negative) 방어반응을 나타냄을 특징으로 하는 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질을 포함하는 조성물

청구항 3

뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질의 발현을 넉아웃시킨 형질전환 식물 변이체 (atnrx1)에 있어서, 상기 변이체는 알터나리아 브라시시콜라계 진균 병원체의 공격 시 자스몬산 신호전달 활성화를 통해 질병 저항성 유전자의 발현을 유도함으로서 알터나리아 브라시시콜라계 진균 병원체에 대한 저항성을 증진시킨 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질 넉아웃 형질전환 식물 변이체

청구항 4

제 3항에 있어서, 자스몬산 신호전달 활성화는 자스몬산 반응성 전사인자(TF) 및 자스몬산 활성조절자에 의해 매개됨을 특징으로 하는 넉아웃 형질전환 식물 변이체

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질을 넉아웃시킨 알터나리아 브라시시콜라 진균 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세히는 알터나리아 브라시시콜라 진균의 방어 반응에 안전핀 역할을 하는 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질의 발현을 음성 조절시켜 알터나리아 브라시시콜라 진균에 저항성을 지닌 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 다양한 내부 및 외부 요인으로부터 생성된 활성 산소종(ROS)은 인간 및 포유류 시스템에서와 같이 식물체 내에서 중요한 역할을 한다. 특히 스트레스를 받지 않는 조건하에서 식물 성장, 발달 및 식물 호르몬 신호를 제어한다. 그러나 가뭄, 염분, 열, 추위, 높은 광도 및 병원체 공격과 같은 다양한 생물학적/비생물학적 스트레스에 노출되면 활성 산소종의 생성이 증폭된다.

[0005] 생성된 산화 스트레스는 식물 숙주를 보호하기 위한 방어 신호를 유발할 뿐만 아니라 중요한 세포 내 거대분자를 변성시켜 세포 손상을 유발한다. ROS는 양날의 검과 같은 역할을 하기 때문에 세포는 산화 환원 센서 단백질을 사용하여 세포 내 ROS 수준을 정확하게 인식하고 세포 산화 환원 항상성을 유지한다.

[0007] 산화환원에 민감한 단백질의 시스테인(Cys) 잔기는 친핵성 특성을 감안할 때 산화환원 변화를 효과적으로 인식하고 이 변화를 다운스트림 분자에 대한 신호로 변경하여 다운스트림 신호 과정을 활성화하여 단백질 활성, 유전자 전사 및 호르몬 신호전달 경로를 제어한다. 따라서 시스테인 잔기는 산화 환원 스위치로 작용한다.

[0009] 단백질의 산화환원 상태가 다양한 생리적 과정을 제어하는 핵심 요소인 것처럼 보이지만 현재까지 확인된 센서의 수는 제한적이다. 따라서 과학자들은 전산 및 생물 정보학 접근 방식을 통해 새로운 산화 환원 센서 단백질을 찾고 있다. 그러나 촉매 산화환원 센서를 발견하는 데 사용되는 이론적 접근 방식은 매우 불확실하며 이는 새로운 산화환원 센서를 식별하기 위해서는 이론과 실험 절차를 결합하는 것이 더욱 중요해진다.

[0011] 산화 환원 센서 후보의 식별에 대한 단서는 센서 단백질 패밀리에서 셀레노시스테인(Sec)-Cys 쌍의 산발적인 유출에서 유래한다. 그러한 패밀리 중 하나는 티오레독신(TRX) 및 TRX 환원효소 단백질로 구성되며, 이들의 활성 부위 Cys 잔기는 아마도 시원적 형태의 Sec에서 유래했을 것이다.

[0013] 따라서 Cys와 Sec은 다양한 유기체에서 TRX의 활성 부위에서 산발적으로 검출된다. 시스테인 산화의 조절된 역전은 시스테인 환원효소로 기능하는 보존된 TRX 슈퍼패밀리의 활성에 의존한다. 식물 면역 시스템은 수많은 면역 신호 단백질을 기능적으로 조절할 수 있는 잠재력을 가진 특정 TRX를 충원한다.

[0015] 또한, TRX는 식물에서 프로테인 S-니트로실화의 조절을 통해 다양한 신호전달 경로에 참여한다. 산화환원 단백질의 또 다른 그룹은 3개씩 텐덤(tandem)하게 배열된 TRX 유사 모듈을 포함하고 핵과 세포질 모두에 국한되는 뉴클레오레독신(NRX)을 포함한다. 특히, 아라비돕시스 탈리아나 게놈은 AtNRX1 및 AtNRX2의 2종의 NRX 이소타입을 인코딩한다. AtNRX2의 기능은 아직 제대로 특성화되지 않았지만 AtNRX1의 항산화 특성은 최근에 보고되었다. AtNRX1은 항산화 효소와 혼합 이황화 결합을 형성하고 표적에 환원력을 공급하여 산화 스트레스로부터 식물체를 보호한다.

[0017] 본 발명자들은 후보 산화 환원 센서 단백질로 NRX를 선택하고 아라비돕시스에서 그들의 생리학적 중요성을 측정하였다. 본 발명자들은 AtNRX1이 자스몬산(JA) 신호를 통해 곰팡이 병원체인 알터나리아 브라시시콜라에 대한 방어 반응을 활성화하는 산화환원 의존적 올리고머로의 구조적 변형이 발생하는지를 측정하였다.

[0019] 따라서 본 발명자들은 AtNRX1 단백질은 평상시 저분자량(LMW) 단량체로 존재하고 환원효소로 기능하지만, 알터나리아 브라시시콜라 진균류의 공격에 따른 ROS 생성에 의해 산화 스트레스 조건하에서는 AtNRX1 단백질의 활성부위인 시스테인 잔기에 산화를 초래하여 산화환원 센서로 작용시켜 AtNRX1 단백질을 저분자량의 단량체에서 고분자 올리고머 형태로 변형시킨다. 또한 Arabidopsis atnrx1 넉아웃 변이체는 야생형 식물체보다 알터나리아 브라시시콜라 진균에 더 큰 저항성을 나타냄을 확인하고 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 AtNRX1 단백질은 평상시 저분자량(LMW) 단량체로 존재하고 환원효소로 기능하지만, 알터나리아 브라시시콜라 진균류의 공격에 따른 ROS 생성에 의해 산화 스트레스 조건하에서는 AtNRX1 단백질의 활성부위인 시스테인 잔기에 산화를 초래하여 산화환원 센서로 작용시켜 AtNRX1 단백질을 저분자량의 단량체에서 고분자 올리고머 형태로 변형시킴을 측정코자 한 것이다. 또한 Arabidopsis atnrx1 넉아웃 변이체는 야생형 식물체보다 알터나리아 브라시시콜라 진균에 더 큰 저항성을 나타냄을 확인코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열을 지니는 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 조성물은 평상시에는 AtNRX1 단백질 단량체로 존재하지만 활성산소종으로 인한 산화 스트레스 시 AtNRX1 단백질 내의 시스테인 잔기를 산화시켜 산화환원 의존적으로 단량체에서 올리고머 형태로 가역적으로 전환되어 질병 저항성 유전자의 발현을 유도함을 특징으로 하는 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0025] 또한 상기 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질은 메틸 자스모네이트(MeJA) 처리 시 상향 조절 발현되고 알터나리아 브라시시콜라계 진균 병원체에 대한 음성적(negative) 방어반응을 나타냄을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명의 또다른 목적은 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질의 발현을 넉아웃시킨 형질전환 식물 변이체 (atnrx1)에 있어서, 상기 변이체는 알터나리아 브라시시콜라계 진균 병원체의 공격 시 자스몬산 신호전달 활성화를 통해 질병 저항성 유전자의 발현을 유도함으로서 알터나리아 브라시시콜라계 진균 병원체에 대한 저항성을 증진시킨 뉴클레오레독신 AtNRX1 단백질 넉아웃 형질전환 식물 변이체를 제공하는 것이다.

[0029] 이때 자스몬산 신호전달 활성화는 자스몬산 반응성 전사인자(TF) 및 자스몬산 활성조절자에 의해 매개됨을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0031] 따라서 본 발명의 효과는 야생형 식물체보다 알터나리아 브라시시콜라 진균에 더 큰 저항성을 나타내는 Arabidopsis atnrx1 넉아웃 변이체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 AtNRX1의 구조적 및 기능적 특성화를 나타낸 것이다.

(A) AtNRX1의 아미노산 서열. 티오레독신(TRX) 도메인은 빨간색으로 표시되고 분기된 C1 도메인은 녹색으로 표시된다. TRXa 및 TRXa0 도메인의 4개의 보존된 시스테인(Cys) 잔기는 파란색으로 표시된다. NLS 매퍼(http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form)는 이분 핵 위치 신호(NLS, 갈색 밑줄) 및 핵 수출 신호(NES, 분홍색 밑줄)를 예측하였다.

(B,C) 5mM DTNB(B) 및 인슐린(C)을 기질로 사용하여 시험한 AtNRX1의 이황화 환원효소 활성. (B)에서 AtNRX1의 환원효소 활성은 1μM AtNRX1(■), 3μM AtNRX1(■), μM GST(●) 또는 8.35μM AtTRX-h3(▲); TR(□)이 없는 3 μM AtNRX1과 TR(○)이 있는 경우 기질 단독(대조군)이 비교를 위해 포함되었다.

(C)에서 AtNRX1의 환원효소 활성은 0.5mM DTT와 1μM AtNRX1(■), 3μM AtNRX1(■), 3μM GST(●), 또는 8.35 μM AtTRX-h3(▲); 0.5mM DTT(#)의 존재 하에 인슐린 감소를 대조군으로 사용하였다. (D-I) AtNRX1의 산화환원 의존적 가역적 구조 변형(단량체에서 올리고머로). (D,E) 환원제(DTT 또는 GSH), 산화제(H2O2) 및 크산틴/크산틴 산화효소로 담배잎에서 재조합 AtNRX1 단백질의 시험관 내(D) 및 GFP-AtNRX1(E)의 순차적 처리를 보여주는 계획 (X/XO) (E). (F-I) 시험관 내 AtNRX1(F, G) 및 담배잎(H, I)에서 분리된 GFP-AtNRX1의 산화환원 의존적 구조 스위치. 단백질은 비환원성(F,H) 및 환원성(G,I) 아크릴아미드 겔의 3개 레인(L1-L3)에 로딩되었고 SDS-PAGE로 분리되었다. 겔은 은 염색(F,G) 및 항-GFP 항체(H,I)로 면역 블롯팅되었다. (F) 및 (H) 왼쪽의 숫자는 단백질 마커의 분자량(MW)을 나타낸다. AtNRX1의 단량체(M) 및 올리고머(O)는 패널(G) 및 (I)의 오른쪽에 표시된다.

도 2는 AtNRX1의 구조적 및 기능적 특성에 대한 활성 부위 Cys 잔기의 영향을 나타낸 것이다.

(A) 야생형(WT) 및 변이 AtNRX1의 구조적 묘사. 3개의 TRX 도메인(TRXa, TRXb 및 TRXa0)과 1개의 DC1 도메인이 표시된다. 활성 부위 Cys 잔기와 AtNRX1의 치환된 세린(Ser) 잔기는 각각 검은색과 파란색으로 표시된다.

(B,C) 5mM DTNB(B) 및 인슐린(C)을 기질로 사용하는 WT 및 변이 AtNRX1의 이황화 환원 활성. (B)에서, AtNRX1 단백질의 환원 활성은 NADPH, TR 및 3μM AtNRX1(■)의 존재에 의해 측정되었다. 3μM AtNRX1M1(■); 3μM AtNRX1M2(■); 3μM AtNRX1M3(■); 또는 3μM GST(●). TR(○) 존재하에 기판 단독을 대조군으로 사용하였다. (C)에서 AtNRX1의 환원효소 활성은 0.5mM DTT와 3μM AtNRX1(■), 3μM AtNRX1M1(■), 3μM AtNRX1M2(■), 3μM AtNRX1M3(■), 또는 3 μM GST(●); 0.5mM DTT(#)의 존재 하에 인슐린 감소를 대조군으로 사용하였다.

(D-G) 시험관 내 AtNRX1M3(D, E) 및 담배잎에서 분리된 GFP-AtNRX1M3(F, G)의 산화환원 의존적 구조적 특성. 단백질은 비환원성(D,F) 및 환원성(E,G) 아크릴아미드 겔의 3개 레인(L1-L3)에 로딩되었고 SDS-PAGE로 분리되었다.

도 3은 AtNRX1 및 AtNRX1M3의 세포 내 위치 분석이다.

(A) 침윤된 담배잎에서 GFP-AtNRX1 및 GFP-AtNRX1M3의 세포내 국소화 패턴. 담배잎은 NLS-RFP 및 GFP-AtNRX1 또는 GFP-AtNRX1M3와 함께 침투되었다. GFP(왼쪽 패널) 및 RFP(두 번째 패널)의 형광 신호는 침투 후 3일(dpi)에 표피 세포의 공초점 현미경으로 관찰되었다. GFP-AtNRX1 및 GST-AtNRX1M3의 핵 위치를 확인하기 위해 GFP 및 RFP 이미지를 병합하였다(세 번째 패널). 필드의 DIC(Differential Interference Contrast) 이미지(오른쪽 패널)가 표시된다. 스케일 바 = 100 μm. (B) agroinfiltrated 담배잎에서 생성된 GFP-AtNRX1 및 GFP-AtNRX1M3의 분획 분석.

GFP-AtNRX1 및 GFP-AtNRX1M3 구성물을 담배잎에 침투시켰다. 잎에서 총 단백질을 추출하고 세포질 및 핵 분획을 분리하였다. GFP-AtNRX1의 단백질 수준은 항-GFP 항체를 사용한 면역 블롯팅(I.B.)에 의해 결정되었다. 분획 농축 정도는 마커 단백질(항-히스톤 H3, 핵 마커, 항-PEPC, 세포질 마커)에 특이적인 항체를 사용하여 결정되었다. 실험은 비슷한 결과로 3차례 반복되었다.

도 4는 AtNRX1 발현에 대한 다양한 스트레스와 식물 호르몬의 영향을 나타낸 것이다.

(A) AtNRX1 발현에 대한 식물 호르몬의 영향. 묘목을 10μM 메틸 자스모네이트(MeJA), 10μM 에테폰(ETP), 10μMabcisic acid(ABA), 1μMindole-3-아세트산(IAA), 1μMgibberellin A3(GA3), 10nM24-epibrassinol로 처리 및 3시간 동안 20μMt-제아틴(제아틴). (B) 다양한 스트레스에 대한 응답으로 AtNRX1 발현. 묘목은 고온(37℃ 2시간), 저온(4℃ 6시간), 탈수(12시간 공기건조), 염분(300mMNaCl), 진균성 병원균(Botrytis cinerea 및 Alternaria brasicicola) 및 펩타이드 유도제.

(C) JA에 대한 응답으로 AtNRX1 발현. 묘목을 MeJA로 처리하고 표시된 시점에서 샘플을 수집하였다. (D) A. 브라시시콜라 감염에 대한 응답으로 AtNRX1 발현. 묘목을 A. brasicicola에 감염시키고, 표시된 시점에서 샘플을 수집하였다. (A-D)에서는 스트레스 또는 호르몬 처리된 2주 된 전체 묘목에서 total RNA를 분리하였고, AtNRX1 발현은 ACTIN2(ACT2), Ubiquitin1(UBQ1) 및 UBQ10을 내인성 참조로 사용한다.

(E) PAtNRX1:GUS 구성의 개략도. RB, 오른쪽 테두리; LB, 왼쪽 테두리; P35S, 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터; PAtNRX1, AtNRX1 유전자 프로모터; Hyg, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 코딩 영역; GUSPlus-6 x His, 6개의 히스티딘 코돈에 융합된 β-글루쿠로니다제 유전자; CAT 인트론, 카탈라제 유전자 인트론; Tnos, 노팔린 신타제 터미네이터. 벡터에서 PAtNRX1의 삽입 위치는 제한 효소 부위인 BamHI/NdeI 및 BamHI/BglII로 표시된다. (F) 모의 및 MeJA 처리 후 PAtNRX1:GUSlines의 조직화학적 분석. 스케일 바 = 3mm.

도 5는 AtNRX1은 아라비돕시스에서 A. brasicicola에 대한 저항성을 음성적으로 조절함을 나타낸 것이다.

(A) 7 dpi에서 A. 브라시시콜라 감염에 대한 아라비돕시스 식물의 감수성. 잎에 5 μL(5 × 10^5 포자/mL)의 진균 포자 현탁액을 적하 접종하였다. (B) 4dpi에서 잎의 병변을 보여주는 사진. (C) 30개 식물의 잎에 있는 60개 이상의 병변의 평균 크기(적어도 3개의 복제물이 있음). (D) 4 dpi에서 qRT-PCR에 의해 분석된 접종된 식물에서 A. 브라시시콜라 큐티나제 A(AbCutA)의 상대 발현 수준.

도 6은 AtNRX1은 아라비돕시스에서 JA 매개 PDF1.2 발현을 음성적으로 조절함을 나타낸 것이다.

(A,B) A. 브라시시콜라에 감염된 Col-0 및 atnrx1(A) 또는 Col-0, AtNRX1OE 및 AtNRX1M3OE(B) 식물에서 PDF1.2 발현의 반정량적 역전사 PCR(sqRT-PCR) 분석. 4주 된 Arabidopsis 식물의 성숙한 잎에 A. brasicicola 포자 현탁액(106 포자/mL) 3 μL 방울을 접종하였다. 표시된 시점에서 총 RNA를 분리하고 sqRT-PCR로 PDF1.2 및 TUB2

(대조군)의 발현을 분석하였다.

A. 브라시시콜라 감염 전(-) 또는 후(+) Col-0, atnrx1, AtNRX1^{OE} 및 AtNRX1M3^{OE} 식물에서 PDF1.2의 상대적 발현. 포자 현탁액(10^6 포자/mL)의 액적(3μL)을 성숙한 잎에 적용하였다. 잎에서 총 RNA를 분리하고 ACT2, UBQ1 및 UBQ10에 대한 PDF1.2의 발현을 접종 후 48시간(hpi)에서 qRT-PCR에 의해 결정하였다.

도 7은 정상(스트레스 없음) 및 생물학적 스트레스 조건에서 JA 의존성 방어 시스템에서 AtNRX1의 작용 모드를 나타내는 모델을 나타낸 것이다.

이 모델에서 AtNRX1은 정상적인 조건에서 방어 관련 유전자의 JA 의존적 발현을 억제한다. 그러나 괴사성 진균 병원체의 외부 공격은 동시에 JA와 ROS를 생성한다. 세포 내 ROS의 관련 축적은 산화환원 센서로 작용하고 AtNRX1의 활성 부위 Cys 잔기의 산화를 초래하여 AtNRX1 단량체의 구조적 변형(올리고머화)을 유도한다. TF에 대한 올리고머 AtNRX1의 감소된 친화력(JA 신호전달을 매개하는 TF와 같은 핵의 알려지지 않은 인자)은 TFα의 탈억제를 초래하여 JA 신호전달을 활성화하고 JA 반응성 유전자의 하위 집합의 발현 프로필을 변경한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] (1) AtNRX1의 산화환원 의존적 구조 변형

[0036] AtNRX1 단백질이 여러 TRX 도메인을 포함하는 산화환원 단백질이라는 점을 감안할 때(도 1A), 본 발명자들은 먼저 5,5-디티오-비스-(2-니트로벤조산)(DTNB) 및 인슐린을 포함한 범용 기질을 사용하여 대장균에서 발현되는 재조합 AtNRX1 단백질의 환원효소 활성을 측정하였다. AtNRX1은 예상대로 티오레독신 환원효소(TR)와 함께 DTNB를 감소시킨다. 또한, 1,4-디티오트레이톨(DTT)이 있는 경우 AtNRX1은 농도 의존적 방식으로 인슐린을 감소시켜 환원효소 활성을 확인하였다(도 1A,B).

[0038] DTNB와 인슐린으로 수행된 분석에서 AtNRX1의 환원효소 활성은 AtTrx-h3보다 2.7배 이상 높았다. 2-Cys 퍼옥시레독신, 글루타티온 퍼옥시다제(GPx) 및 PR1의 비발현자(NPR1)와 같은 산화환원 센서 단백질은 디티올 및 이황화 결합의 가역적 교환을 통해 외부 자극에 대한 반응으로 4차 구조를 전환한다. TRX 계열 단백질인 AtNRX1의 구조적 특성을 고려하여(도 1A), 본 발명자들은 AtNRX1이 산화환원 의존적 구조 변형을 겪는다고 가정하였다.

[0040] 이 가설을 테스트하기 위해 환원제와 산화제로 순차적으로 처리한 후 AtNRX1의 올리고머화를 분석하였다(도 1D-I). 시험관 내에서 정제된 재조합 AtNRX1 단백질 및 agroinfiltration을 통해 담배잎에서 일시적으로 발현된 녹색 형광 단백질(GFP)-AtNRX1 융합 단백질은 각각 도 1D,E에 나타낸 계획에 따라 처리되었다.

[0042] 이어서, 재조합 AtNRX1 및 GFP-AtNRX1 단백질의 상태를 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)에 의한 비환원(도 1F,H) 및 환원(도 1G,I) 아크릴아미드 겔에서 검사하였다. 결과는 처리되지 않은 AtNRX1이 다중 단량체 형태와 개별 올리고머 형태로 구성되었음을 나타내었다(도 1F).

[0044] 그러나 DTT 처리는 AtNRX1 올리고머를 단량체로 해리하였다(도 1F). PD-10 탈염 컬럼으로 DTT를 제거한 후 과산화수소(H_2O_2)로 처리하면 AtNRX1의 올리고머 구조가 복원되었다(도 1F). SDS-PAGE를 환원하여 미처리, DTT 처리 및 H_2O_2 처리 샘플을 분석한 결과, 재조합 AtNRX1 단백질의 수준이 산화환원 처리에 의해 변경되지 않았음을 나타낸다(도 1G). 이러한 데이터는 AtNRX1의 4차 구조가 산화환원 의존적 방식으로 단량체 및 올리고머 형태 간에 가역적으로 전환됨을 시사한다.

[0046] 시험관 내에서 관찰된 재조합 AtNRX1의 산화환원 의존적 구조적 변화가 식물에서 확인되었다(도 1F,G). agroinfiltration을 통해 담배잎에서 일시적으로 발현되는 GFP-AtNRX1은 크산틴/크산틴 산화효소(X/XO)로 처리하고 GSH로 후속 처리할 때 구조를 가역적으로 전환하였다(도 1H,I). 모의 처리에서 식물의 단백질 추출물은 주로 GFP-AtNRX1 단량체와 소량의 해당 올리고머로 구성되었다(도 1H). 그러나 GFP-AtNRX1 올리고머의 양은 모의

샘플과 비교하여 X/XO로 3시간 동안 처리된 담배잎에서 유의하게 증가하였다(도 1H).

[0048] 또한 X/XO 처리 시 생성된 매우 풍부한 GFP-AtNRX1 올리고머는 GSH로 후속 처리하여 대부분 단량체로 해리되었다(도 1H). 이러한 결과는 식물에서 AtNRX1의 구조적 변형이 X/XO 및 세포내 산화환원 상태에 의해 가역적으로 조절됨을 나타낸다.

[0050] (2) TRX 도메인의 Cys 잔기는 AtNRX1의 올리고머화에 필수적이다.

[0052] AtNRX1에는 3개의 TRX 도메인(도 2A)이 있으며 그 중 2개는 활성(a 및 a0)이고 하나는 비활성(b)이다. 이전 보고서에 따르면 TRX 도메인은 종종 이를 포함하는 단백질의 올리고머화를 매개하며 활성 TRX 도메인의 Cys 잔기는 이 과정에 필요하다.

[0054] 따라서 본 발명자들은 AtNRX1의 TRX 도메인에서 Cys 잔기의 생물학적 관련성을 조사하기로 결정하였다(도 2A). 이를 위해 본 발명자들은 AtNRX1의 3종의 변이체: AtNRX1M1을 생성하였으며, 여기서 TRXa 도메인의 아미노산 위치 55 및 58(각각 C55 및 C58)에 있는 2개의 활성 부위 Cys 잔기가 Ser 잔기로 대체하였다. TRXa0 도메인의 활성 부위에 있는 C375 및 C378이 Ser 잔기로 대체된 AtNRX1M2; 및 4개의 Cys-to-Ser 치환(C55S), (C58S), C375S 및 C378S를 모두 포함하는 AtNRX1M3이었다.

[0056] 재조합 야생형(WT) 및 변이 AtNRX1 단백질은 대장균에서 생산되었으며, 이러한 각 단백질의 환원효소 활성은 범용 기질, DTNB 및 인슐린을 사용하여 측정되었다(도 2B,C). WT AtNRX1은 TR 및 DTT와 함께 DTNB 및 인슐린을 각각 감소시켜 환원효소 활성을 확인하였다.

[0058] 변이체 단백질 중에서 AtNRX1M1과 AtNRX1M2는 DTNB와 인슐린을 감소시켰으나 이러한 2종의 변이체 단백질의 환원효소 활성은 AtNRX1의 50%에 불과하였다. 반면에 AtNRX1M3은 환원효소 활성을 나타내지 않았다.

[0060] 다음으로, 본 발명자들은 AtNRX1M3를 사용하여 AtNRX1의 올리고머화에서 활성 부위 Cys 잔기의 역할을 조사하였다. 정제된 재조합 AtNRX1M3 및 담배잎에서 일시적으로 생성된 GFP-AtNRX1M3은 각각 도 1D,E에 표시된 계획에 따라 처리되었으며, 이러한 단백질의 산화환원 상태는 SDS-PAGE에 의해 비환원성(도 2D,H) 및 환원성(도 2D,H) 아크릴아미드 겔에 대해 조사되었다(도 2E, I).

[0062] 결과는 재조합 AtNRX1(도 1F, H)과 달리 산화환원 상태에 관계없이 시험관 내 재조합 AtNRX1M3 및 생체 내 GFP-AtNRX1M3(도 2D,H)이 모두 단량체로 존재함을 보여주었으며, 이는 AtNRX1의 활성 부위 Cys 잔기가 산화 환원 의존적 구조 전환에 중요한 역할을 함을 나타낸다.

[0064] (3) AtNRX1 및 AtNRX1M3의 세포 내 국소화

[0066] NLS 매퍼(http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)를 사용한 생물정보학 분석은 AtNRX1의 N 말단에서 추정되는 이분형 핵 위치 신호(NLS)를 드러냈다. 반면에 Wregex(http://wregex.ehubio.es)를 사용한 분석은 서열 중간에 핵 방출 신호(NES)를 표시하였다(도 1A). 이전에 보고된 세포질과 핵에 대한 AtNRX1의 이중 국소화가 본 발명에서 확인되었다.

[0068] AtNRX1M3은 환원효소 기능(도 1)과 스트레스 민감도(도 2) 면에서 AtNRX1과 다른 특성을 보였기 때문에 본 발명

자들은 그것의 세포내 국소화 패턴을 AtNRX1과 비교하였다. 담배잎을 NLS-RFP 및 GFP-AtNRX1 또는 GFP-AtNRX1M3 구조와 함께 침투시켰다. 3일 후, GFP 및 RFP의 형광 신호는 공초점 현미경으로 전염병 세포에서 시각화되었다(도 3A). GFP-AtNRX1 및 GFP-AtNRX1M3 모두 NLS-RFP와 함께 핵에 공동 국소화되었다.

[0070] 또한, 본 발명자들의 분획 실험에서 GFP-AtNRX1 및 GFP-AtNRX1M3이 모두 침윤된 담배잎의 세포질 및 핵 분획에서 검출되었다(도 3B). 이러한 결과는 AtNRX1과 AtNRX1M3이 모두 동일한 세포 내 위치 패턴을 나타냄을 의미한다.

[0072] (4) AtNRX1의 발현 분석

[0074] AtNRX1의 발현을 유도하는 특정 식물 호르몬을 확인하기 위해(도 4A), 10μM 메틸 자스모네이트(MeJA), 10μM 에테폰(ETP), 10μM 앱시스산(ABA), 1μM 인돌-3-아세트산(IAA), 1μM 지베렐린 A3(GA3), 10nM 24-에피브라시놀리드(eBL) 및 20μM t-제아틴(제아틴)을 포함하는 다양한 식물 호르몬으로 처리된 아라비돕시스 식물에서 그 발현을 분석하였다. AtNRX1의 전사 수준은 MeJA 처리에서 가장 큰 증가를 나타내었다.

[0076] 그러나 다른 호르몬에서는 유의미한 변화가 감지되지 않았다. 또한 AtNRX1이 비생물적/생물학적 스트레스 반응과 관련이 있는지 확인하기 위해 열 스트레스(37℃에서 2시간), 저온 스트레스(4℃에서 6시간), 탈수(12시간 동안 공기 건조), 염분 스트레스(300mM NaCl), 진균 병원체(Botrytis cinerea 및 A.brasicicola) 및 펩타이드 유발제(도 4B)로 처리된 14일령의 WT Arabidopsis Columbia(Col-0) 식물에서 AtNRX1의 발현을 분석하였다.

[0078] AtNRX1의 전사체 수준은 열 스트레스와 A. brasicicola 감염에 의해 현저하게 상승하였고, 추위, 탈수, 염분, 펩타이드 유발제 및 B. cinerea에 의해 약간 증가하였다. AtNRX1 발현은 괴사성 진균 병원체와 MeJA에 의해 크게 증가했기 때문에 MeJA 처리 및 A. 브라시시콜라 감염 후 시간 펄스에 의한 발현도 모니터링하였다(도 4C, D). AtNRX1의 상대적 전사 수준은 A. brasicicola와 MeJA로 처리한 후 점차 증가하여 각각 처리 후 36시간과 18시간에 최고점에 도달하였다.

[0080] 유사하게 AtNRX1 프로모터(PAtNRX1:GUS)의 제어 하에 β-글루쿠로니다제(GUS) 유전자를 발현하는 형질전환 아라비돕시스 식물의 조직화학적 분석은 AtNRX1의 MeJA 유도 발현을 나타내었다(도 4E,F).

[0082] (5) AtNRX1은 괴사성 진균 병원체에 대한 방어 반응을 음성적으로 제어한다.

[0084] JA 신호는 식물 성장, 발달 및 스트레스 반응을 포함한 식물 생리학의 다양한 측면을 조절한다. 곰팡이 병원체 또는 상처 스트레스에 대한 방어 신호는 자스모네이트 ZIM-도메인(JAZ) 단백질과 같은 JA 반응성 전사 인자(TF) 및 활성 조절자의 다양한 조합에 의해 매개된다. JA 신호전달 TF와 다른 다운스트림 전사 조절자 간의 특정 상호작용은 특정 식물 생리학적 반응 동안 JA 신호전달의 출력을 미세 조정한다.

[0086] 상기한 바와 같은 AtNRX1의 발현이 JA 및 진균 병원체에 의해 조절된다는 결과에 기반하여 본 발명자들은 T-DNA 삽입 변이체, atnrx1(SALK_113401)(도 S2A) 및 야생형 WT(Col-0) 배경에서 콜리플라워 모자이크 바이러스 35S(P35S) 프로모터의 제어 하에 AtNRX1 또는 AtNRX1M3을 과발현하는 형질전환 아라비돕시스 계통(도 S2B)을 사용하여 AtNRX1의 생리학적 역할과 기본 분자 메커니즘을 조사하였다.

[0088] 반정량적 역전사 PCR(sqRT-PCR) 결과, AtNRX1 및 AtNRX1M3의 발현이 WT 식물보다 각각 AtNRX1 과발현

(AtNRX1OE) 및 AtNRX1M3 과발현(AtNRX1M3^{OE}) 계통에서 훨씬 더 높았으며 atnrx1 변이체에서는 신호가 검출되지 않았다(도 S2B). 대조적으로, 대조군으로 사용된 Actin2(ACT2, At3g18780)의 전사체 수준은 모든 샘플에서 거의 동일하였다(도 S2C). 또한, 3주령 WT, atnrx1, AtNRX1^{OE} 및 AtNRX1M3^{OE} 식물체의 성장 표현형도 유사하였다(도 S2D).

[0090] 다음으로, 본 발명자들은 A. brasicicola에 감염된 6주령 아라비돕시스 식물체의 질병 증상 및 곰팡이 성장을 분석하였다. AtNRX1^{OE} 및 AtNRX1M3^{OE} 식물체의 감염된 잎은 WT 식물의 것보다 훨씬 더 심각한 질병 증상(도 5A)과 더 큰 괴사 병변(도 5B,C)을 나타냈으며, 이는 AtNRX1 및 AtNRX1M3의 과발현이 A. 브라시시콜라 감염에 대한 아라비돕시스의 감수성을 증가시켰음을 나타낸다.

[0092] 대조적으로, atnrx1 넉아웃 식물은 야생형 WT 식물보다 괴사성 진균 병원체에 대해 더 강한 저항성을 보였다(도 5A-C). 감염된 아라비돕시스 식물에서 A. brasicicola의 증식을 정량화하기 위해 A. brassicicola Cutinase A(AbCutA) 유전자의 상대 발현 수준을 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)로 측정하고 Arabidopsis ACT2, 유비퀴틴 1(UBQ1) 및 UBQ10 유전자(내인성 참조로 사용됨)(도 5D)의 발현 수준에 상대적으로 정규화하였다. atnrx1 변이체에서 AbCutA의 발현 수준은 WT 식물체에서와 유사한 낮은 수준으로 유지되었다. 그러나 증가된 질병 증상과 일치하게, AtNRX1^{OE} 및 AtNRX1M3^{OE} 식물은 WT 식물체보다 A. brasicicola의 현저하게 빠른 증식을 나타내었다.

[0094] 따라서, AtNRX1 및 AtNRX1M3의 과발현은 A. brasicicola 감염에 대한 Arabidopsis의 감수성을 증가시켰다. 또한, AbCutA mRNA 수준에 따라 AtNRX1M3^{OE} 식물은 AtNRX1^{OE} 식물보다 A. 브라시콜라 감염에 더 민감한 것으로 나타났다(도 5D).

[0096] (6) AtNRX1은 PDF1.2의 발현을 음성 조절한다.

[0098] 야생형 WT 식물과 비교할 때, atnrx1 넉아웃 변이체 식물은 A. 브라시시콜라 감염에 더 내성이 있는 반면, AtNRX1^{OE} 식물은 더 감수성이었다. 이것은 AtNRX1이 괴사성 진균 병원체에 대한 식물 반응을 음성적으로 조절한다는 것을 나타낸다. AtNRX1이 A. brasicicola 감염 및 JA 신호전달에 대한 반응을 제어하는 방법을 조사하기 위해 본 발명자들은 괴사성 진균 병원체에 대한 방어에 관여하는 잘 규명된 JA 신호전달 유전자인 PLANT DEFENSIN 1.2(PDF1.2)의 전사체 수준을 WT, atnrx1, AtNRX1^{OE} 및 AtNRX1M3^{OE} 식물체에서 시퀀스 특이적 프라이머를 사용하여 sqRT-PCR에 의해 A. brasicicola 감염 후 시간 펄스에 의해 조사하였다.

[0100] PDF1.2 전사체의 축적은 감염 후 2일(dpi)에서 가장 높은 축적으로 WT 식물에서 A. 브라시콜라 감염에 의해 증가하였다(도 6A,B). WT 식물과 비교하여 PDF1.2의 발현은 atnrx1 넉아웃 변이 식물에서 향상되었으나(도 6A) AtNRX1^{OE} 및 AtNRX1M3^{OE} 식물에서는 감소하였다(도 6B). 본 발명자들은 또한 A. brasicicola 감염 전후에 qRT-PCR을 통해 WT, atnrx1, AtNRX1^{OE} 및 AtNRX1M3^{OE}에서 PDF1.2의 발현을 분석하였다.

[0102] 결과는 PDF1.2 발현이 2 dpi에서 WT 식물에서 A. 브라시시콜라 감염에 의해 유의하게 유도되었음을 보여주었다. WT와 비교하여 PDF1.2의 발현은 atnrx1 넉아웃 식물체에서 약 56% 더 높았지만 AtNRX1^{OE} 및 AtNRX1M3^{OE} 식물에서 각각 44% 및 50% 더 낮았다(도 6C).

[0104] 식물체 세포 내의 반응과 환경 신호를 조절하기 위해 촉매 Cys-thiols를 포함하는 산화 환원 센서는 ROS 수준의

변경을 민감하게 인식하고 번역 후 변형을 통해 해당 대상 시스템에 이러한 정보를 변환시킨다. 따라서 세포 산화 환원 전위의 ROS 매개 이동은 식물 대사, 식물 호르몬 신호전달 및 식물 생리학의 전신 네트워크를 조절하는 중심 메커니즘을 구성하는 것으로 여겨진다.

[0106] 예를 들어, 식물의 가뭄 저항성은 산화환원 변화와 에틸렌 및 ABA 네트워크를 통한 식물 호르몬 신호 간의 상호작용에 의해 제어된다. 식물의 방어 반응과 기공 폐쇄는 산화 환원 상태와 살리실산(SA), JA 및 ABA와 같은 식물 호르몬 간의 크로스토크에 의해 제어된다. 뿌리 구조는 산화 환원 신호와 수많은 식물 호르몬의 조절에 의해 엄격하게 조절된다. 유전자 발현의 JA 유도 변화는 풍부한 아스코르브산염 및 GSH 풀에 의해 조절된다.

[0108] 이러한 예와 다른 예는 ROS 수준의 변화가 식물 호르몬(SA, ethylene, JA) 신호전달 경로의 기능과 대사 및 생리학적 출력을 조절한다는 것을 나타내지만, 산화 환원 변화가 이러한 과정을 조절하는 방법을 결정하는 분자 메커니즘은 제대로 이해되지 않은 채로 남아 있다. MeJA, jasmonoyl isoleucine(JA-Ile), cis-12-oxophytodienoic acid(OPDA) 및 cis-jasmone을 포함한 JA 및 그 유도체는 건강한 식물과 상처 입은 식물 모두에서 생성된다.

[0110] 또한 이러한 호르몬은 초식성 곤충, 괴사성 병원체 및 기타 생물학적/비생물학적 스트레스와 같은 다양한 외부 자극에 반응하여 높은 수준으로 축적된다. JA 및 그 유도체 JA-Ile는 다양한 세포내 신호전달 경로를 조절함으로써 뿌리 성장 억제, 식물 발달, 병원균 저항성, 웅성 불임, 사상체 개시 및 안토시아닌 축적과 같은 광범위한 식물 생리학적 프로세스를 세포내 신호전달 경로의 다양한 세트로 조절하고 다운스트림 표적 유전자를 재프로그래밍 시킨다.

[0112] JA 신호전달의 분자적 기초는 처음에 SCF^{COI1} 단백질의 특성화를 통해 밝혀졌다. JA 둔감 coi1-1 변이체는 여러 표현형을 나타낸다. 녹아웃 또는 기능 획득 변이 실험과 결합된 광범위한 전방 유전자 스크리닝은 JA 신호전달의 여러 양성 및 음성 조절자를 식별하였다. 생체 활성 JA에 결합하면 JA 수용체인 SCF^{COI1}이 JA 신호전달의 음성 조절자, 즉 JAZ 단백질에 결합하여 유비퀴틴화 한다. JAZ 단백질은 이후에 26S 프로테아솜에 의해 분해되어 JA 반응성 TF가 JA 반응성 유전자의 발현을 조절할 수 있게 한다.

[0114] 식물에서 확인된 JAZ-TF(예: MYC/MYB TF)에 의해 매개되는 독점적인 JA 신호전달 경로에도 불구하고, JAZ-TF 매개 JA 신호전달과 관련된 부분적으로 독립적인 표현형을 나타내는 여러 변이체 뿐만 아니라 coi1-1보다 약한 JAZ-TF와 관련된 여러 변이체 표현형이 있음이 또한 발견되었다. 이러한 결과는 JAZ-TF가 JA 신호전달 경로의 유일한 컴포넌트가 아님을 시사한다.

[0116] 대신, 다른 TF 또는 조절 단백질도 다양한 JA 신호 출력을 조절한다. 이 가능성을 설명하기 위해 다른 유형의 TF와 JA 반응성 TF의 헤테로다이머화 및 TF에 결합하기 위해 경쟁하는 다른 공동 조절자의 모집을 포함하여 몇 가지 가설이 제안되었다. JA 신호가 다양한 대사 및 생리학적 출력을 조절하는 방법에 대한 보다 완전한 이해를 얻으려면 새로운 JA 신호 조절자 또는 TF를 식별하는 것이 중요하다.

[0118] 본 발명에서는 주요 자스몬산(JA) 신호 구성 요소인 AtNRX1의 새로운 조절자를 식별하고 작업 모델에서 결과를 요약하였다(도 7). 정상적인 조건(스트레스 없음)에서 AtNRX1은 JA 신호전달을 통해 방어 관련 유전자의 발현을 억제하는 환원된 단량체로 존재한다. 이 과정에서 AtNRX1은 전사인자(TF) 역할을 하지 않는다. 따라서 AtNRX1이 JA 신호전달을 매개하는 전자인자 (도 7의 TF)와 같은 핵의 알려지지 않은 요소와 함께 작동한다고 가정한다.

[0120] 이전에 보고된 AtNRX1의 핵 위치는 본 발명에서 확인되었다. 다양한 외부 자극이 동시에 JA와 ROS를 생성한다.

세포내 ROS의 관련 축적은 산화환원 센서로 작용하고 AtNRX1 단량체의 구조적 변형(올리고머화)을 유도하는 AtNRX1의 활성 부위 Cys 잔기의 산화를 초래한다. TF에 대한 올리고머 AtNRX1의 감소된 친화력은 결과적으로 TF의 억제를 해제하였으며 따라서 JA 신호전달을 활성화하고 JA-반응성 유전자의 하위 집합의 발현 프로필을 변경한다.

[0122] 괴사성 진균 병원체의 공격을 받는 식물 방어 시스템을 소총의 기계적 시스템과 비교하면 AtNRX1은 안전핀으로 간주된다. 즉, AtNRX1의 산화환원 의존성 올리고머화가 TFα로부터 해리를 유발하면 병원체를 공격하는 PDF1.2와 같은 방어 관련 유전자의 발현을 활성화하기 위해 JA 신호가 TF를 트리거 한다.

[0124] 이러한 모델은 포유동물 세포에서 세포질 형태의 NRX에 의한 Wnt/-카테닌 신호전달의 산화환원 의존성 조절과 일부 유사성을 공유한다. 세포 내 산화 환원 상태의 Wnt 신호전달 매개 변화는 NRX의 산화 및 Wnt 신호전달의 중심 음성 조절자인 Disheveled 1(Dvl1)과의 해리를 유발한다. 그러나 핵 AtNRX1 단백질과 달리 세포질 포유동물 NRX는 산화된 조건에서 산화환원 의존적 구조 전환을 나타내지 않는다.

[0126] 인간 질병에 대한 최근 연구에 따르면, 티오레독신 상호작용 단백질(TXNIP)은 세포의 산화환원 조절에 중요한 역할을 하는 TRX 산화환원 시스템의 중요한 생리학적 억제제로 확인되었다. 이와 유사하게, AtNRX1의 다양한 파트너 단백질을 탐색하고 그 기능을 연구하는 것도 AtNRX1의 세포 내 역할을 더 잘 이해하는 데 크게 도움이 될 것이다.

[0128] 산화 환원 매개 단량체에서 올리고머로의 전이를 포함한 산화 환원 단백질의 구조적 이동이 개별 구조 상태의 단백질에 특정 기능을 부여할 수 있다는 점을 감안할 때 올리고머화된 AtNRX1이 식물 핵에서 TF와 독립적으로 이러한 기능을 수행하는지 여부를 결정하는 것에 관심을 두게된다.

[0130] 본 발명자들의 발견은 SA 신호전달의 산화 환원 의존적인 조절을 다소 연상시킨다. 여기서 전사 보조인자 NPR1은 올리고머의 ROS-매개 구조적 변형을 단량체로 유도하였으며 NPR1의 핵 형태는 TGACG-모티프 결합(TGA) TF에 결합하고 전사 재프로그래밍을 유발한다.

[0132] SDS PAGE 분석에서 AtNRX1 단백질은 올리고머 형성 외에도 다양한 단백질 밴드 패턴을 보였다. 도 1 F,G의 단량체 AtNRX1과 도 2 D,E의 단량체 AtNRX1M3에 대해 두 개의 가까운 밴드가 나타났다. 또한 단백질 신호(약 90kDa)는 비환원(L1) 조건에서 도 2 D에서 관찰된다. 이러한 현상은 니트로실레이션, 포스포릴레이션, 아세틸레이션, 금속-결합 등의 다양한 번역-후 변형에 의한 단백질 변형에 의한 것으로 예상된다.

[0134] 증가하는 증거는 ROS 매개 산화 환원 신호가 식물 호르몬과 짜여져 있음을 나타낸다. 이러한 발견과 일치하게, 본 발명자들은 여기에서 AtNRX1이 식물에서 JA 신호전달 단백질의 하위 집합을 조정하는 산화 환원 센서 역할을 한다는 것을 나타내었다. 특히 본 발명자들의 결과는 괴사성 진균 병원체에 대한 효과적인 생물학적 방어에 중요한 JA 반응의 서브 세트를 조절하는 AtNRX1/-TF 모듈의 역할을 나타낸다. 그러나 본 발명자들의 결과는 이 모듈이 식물의 발달 및 성장 반응에 상대적으로 덜 중요함을 시사한다.

[0136] 본 발명에서는 괴사성 진균 병원체에 대한 대표적인 내병성 유전자인 PDF1.2의 발현 분석 결과, atnrx1 넉아웃 변이체의 저항성은 JA 신호전달의 개선된 활성화에 기인한 반면, $AtNRX1^{OE}$ 및 $AtNRX1M3^{OE}$ 식물의 질병 감수성은 나타낸다. JA 신호의 지연된 활성화로 인한 것이다. 즉, $AtNRX1^{OE}$ 및 $AtNRX1M3^{OE}$ 식물은 과도하게 축적된 AtNRX1 또는 AtNRX1M3 단백질이 병원체 감염의 경우에도 JA 신호전달의 활성화를 계속 방해하여 PDF1.2와 같은 방어 유전자의 발현을 지연시키기 때문에 질병에 감수성을 지닌다. $AtNRX1^{OE}$와 $AtNRX1M3^{OE}$를 비교하면 $AtNRX1M3^{OE}$에서

PDF1.2의 표현형이 AtNRX1^{OE}의 표현형보다 상대적으로 적다(도 6A,B).

[0138] 이는 AtNRX1M3가 산화환원 의존적 구조적 변화를 겪지 않아 AtNRX1보다 JA 신호의 활성화를 더 심하게 방지하기 때문이다. 그럼에도 불구하고, 아라비돕시스와 A.brasicicola 또는 다른 식물 병원체 사이의 상호 작용에 대한 면밀한 조사는 atnrx1 변이에 대한 표현형을 규명할 수 있다.

[0140] 세포 산화 환원 상태를 기반으로 한 티올 기반 조절은 환경 변동 및 생물학적/비생물학적 스트레스에 대처하기 위해 식물이 사용하는 민감한 메커니즘이다. AtNRX1과 같은 다면적 산화 환원 단백질은 외부 자극을 식물 호르몬 매개 세포 내 신호전달 네트워크와 연결된다. 다양한 입력을 통합하고 식물 방어와 성장 및 발달을 제어하는 특별히 조정된 출력을 생성한다. 이러한 데이터는 산화환원 조절이 다양한 식물 생리학적 상태를 제어하기 위해 다른 신호 모듈과 통합되는 방식에 대한 이해를 향상시킨다.

[0142] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다.

[0144] (실시예 1) 재료

[0146] DTT, H2O2, MeJA, COR 및 GSH를 포함한 화학 물질은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다. SDS-PAGE에 대한 분자 마커는 Amersham Biosciences(Uppsala, 스웨덴)에서 구입하였다. 항-GFP, 항-HA, 항-MYC, 항-GST 및 항-6×His 항체는 Abcam(캠브릿지, 영국)에서 수득하였다. Elicitor peptide 1(PEP1) 재조합 단백질은 MyBioSource(San Diego, CA, 미국)에서 구입하였다.

[0148] (실시예 2) 식물 재료 및 성장 조건

[0150] 아라비돕시스 탈리아나 야생형 Columbia(Col-0)를 본 발명에서 WT로 사용하였다. 동형접합 T-DNA 삽입 변이주 atnrx1(SALK_113401; Col-0 배경)은 아라비돕시스 탈리아나 생물자원센터(ABRC; Ohio State University, Columbus, OH, USA)에서 입수하였다. 묘목은 3%(w/v) 슈크로오즈 및 0.25%(w/v) 피타겔(Sigma-Aldrich)을 함유하는 Murashige 및 Skoog(MS) 배지(pH 5.7)에서 성장하였다. 아라비돕시스와 담배 식물은 각각 22℃와 28℃의 성장 챔버에서 16시간 명도/8시간 암광 기간 및 100 μmol m^{-2} s^{-1} 광도에서 성장하였다. 자스민산(JA) 및 MeJA를 디메틸 설폭사이드(DMSO)에 용해시켜 각각의 200mM 스톡 용액을 제조하였다.

[0152] (실시예 3) 플라스미드 및 형질전환 식물체의 구축

[0154] AtNRX1의 전체 길이 코딩 서열(CDS)은 프라이머 세트 AtNRX1-attB1_F 및 AtNRX1-attB2_R을 사용하여 cDNA로부터 PCR 증폭되었다. PCR 산물을 젤에서 추출하여 attB1_F 및 attB2_R 프라이머를 사용하여 2차 PCR 증폭에 사용하였다. 두 번째 PCR에 의해 증폭된 DNA 단편은 제조업체의 지침(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 따라 BP 반응 키트를 사용하여 게이트웨이 진입 벡터 pDONR221에 클로닝되어 pDONR-AtNRX1 컨스트럭트를 생성하였다. AtNRX1M1, AtNRX1M2 및 AtNRX1M3 단백질에서 Cys-to-Ser 치환을 생성하기 위해, AtNRX1의 뉴클레오티드 서열은 QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 사용하여 다음 프라이머 쌍으로 변이되었다: AtNRX1- AtNRX1M2의 경우 C55,58S_F/_R 및 AtNRX2의 경우 AtNRX1-C375,378S_F/_R.

[0156] AtNRX1 및 AtNRX1M3 서열은 pMDC43 벡터에 클로닝되어 [58] 각각 pMDC43-AtNRX1 및 pMDC43-AtNRX1M3 구성체를 생성한 다음 표준 프로토콜을 사용하여 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 GV3101 및 추가로 아라비돕시스 식물

로 형질전환 되었다. atnrx1 넉아웃 변이체를 사용하여 각각 형질전환 $AtNRX1^{OE}$ 및 $AtNRX1M3^{OE}$ 계통을 생성한다. 30 mg/L 하이그로마이신을 함유하는 배지에서 형질전환 계통을 선택하고 게놈 DNA 기반 PCR 및 sqRT-PCR로 확인하였다.

[0158] (실시예 4) 아라비돕시스의 넉아웃 변이체 및 과발현 라인의 표현형 분석

[0160] 진균 병원체에 대한 저항성에서 AtNRX1의 역할을 평가하기 위해 6주령 WT, atnrx1, $AtNRX1^{OE}$ 및 $AtNRX1M3^{OE}$ 식물에 알터나리아 브라시시콜라 균주 MUCL20297을 접종하였다. A.brassicicola를 28℃에서 2주간 PDA(potato dextrose agar) 배지(Difco, Sparks, MD, 미국)에 배양하였고, 식물 접종을 위해 포자를 0.02% Tween-20에 현탁시켰다. 진균 포자 현탁액의 5 μL 분취량(5×10^5 포자/mL)을 식물 잎의 표면에 적가하였다. 질병 증상과 곰팡이 성장은 3-7dpi에서 모니터링되었다.

[0162] (실시예 5) 재조합 단백질의 발현

[0164] 전체 길이 AtNRX1 및 AtNRX1M1-3 CDS를 서열 특이적 프라이머를 사용하여 PCR 증폭하고 pGEM-T Easy 벡터(Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝하였다. 그런 다음 BamHI 및 EcoRI 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 AtNRX1 및 AtNRX1M1-3 CDS를 절제하고 단편을 pGEX-2T(Promega) 및 pET28a(Novagen, Madison, WI, USA) 발현 벡터에 서브클로닝하였다. 생성된 플라스미드는 앞서 설명한 바와 같이 단백질 발현을 위해 E. coli BL21(DE3; pLysS)로 형질전환 시켰다. 형질전환된 세포를 600 nm(Abs600)에서 배양액의 흡광도가 1.0이 될 때까지 50 μg/mL 암피실린을 함유하는 LB 배지에서 37℃에서 배양하였다.

[0166] 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST)-융합 및 6xHis-태그된 단백질은 GST Sepharose 4 Fast Flow(GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) 및 Ni^{2+}-하전 IMAC-sepharose 6 Fast Flow(GE Healthcare)를 사용하여 정제시켰다. 각기. GST 및 6x His 모이어티는 트롬빈(GE Healthcare)으로 절단하여 제거하였다. TSK 헤파린-5PW 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 컬럼(7.5 × 75 mm)을 사용하여 AtNRX1 단백질을 추가로 정제시켰다. 정제된 AtNRX1 단백질은 생화학적 분석을 위해 20mM HEPES-NaOH 완충액(pH 7.5)으로 투석하였다.

[0168] (실시예 6) 총 RNA 분리 및 유전자 발현 분석

[0170] 스트레스 조건에서 AtNRX1의 발현을 분석하기 위해 1x MS 배지에서 14일 동안 자란 아라비돕시스 식물을 고온(37℃ 2시간), 저온(4℃ 6시간), 탈수(공기 12시간 동안 건조), 염(300mM NaCl) 및 유발 펩타이드(PEP1) 등 다양한 비생물적 스트레스에 노출시켰다. 또한 6주 된 식물에 괴사성 진균 병원체(Botrytis cinerea 및 A. brasicicola)를 공격하였다. 또한, AtNRX1이 특정 식물 호르몬의 신호전달에 관여하는지 확인하기 위해 10μM JA, 10μM ETP, 10μM ABA, 1μM IAA, 1μM GA, 10nM eBL 및 20 μM 제아틴으로 처리된 식물에서 해당 유전자의 발현을 분석하였다.

[0172] 시간 의존적 AtNRX1 발현을 분석하기 위해 A. 브라시시콜라 또는 MeJA로 처리된 식물을 다양한 시점에서 샘플링하였다. 수집된 샘플은 즉시 액체 N_2에서 동결되었고 RNA 추출에 사용되었다. RNA 추출 키트(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 각 샘플에서 총 RNA를 추출하고 NanoDrop ND-1000 분광광도계(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 RNA 농도 및 순도를 측정하였다. 게놈 DNA 오염을 제거하기 위해 1μg 총 RNA를 RNase-free DNase I로 처리하였다.

[0174] cDNA의 첫 번째 가닥은 제조자의 지침에 따라 oligo(dT)18 프라이머와 Revert Aid M-MuLV 역전사효소(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 합성되었다. 그런 다음, TOP realTM qPCR 2X Pre MIX(SYBR Green with high ROX)를 사용하여 CFX 384 TouchTM RT-PCR 검출 시스템(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)을 수행하였다.

[0176] PCR 사이클링 조건은 95℃에서 15분, 95℃에서 10초, 55℃에서 10초, 72℃에서 30초의 사이클을 40회 반복하고, 마지막으로 용융 곡선 단계를 거쳐 증폭된 특이성을 확인하였다. 각 샘플에 대해 3개의 생물학적 복제를 수행하고 ACT2, UBQ1 및 UBQ10 유전자에 대해 발현 수준을 정규화하였다. 그런 다음, 서열 특이적 프라이머 세트를 사용하여 sqRT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 반응은 1 μL의 2배 희석된 cDNA(템플릿) 및 5 μM 프라이머를 사용하여 설정하였다.

[0178] PCR 사이클링 조건은 95℃에서 5분, 95℃에서 30초, 55℃에서 20초, 72℃에서 60초의 28 사이클이었다. ACT2 또는 튜불린 2(TUB2)가 대조군으로 사용되었다.

[0180] (실시예 7) AtNRX1 프로모터 활성 분석

[0182] AtNRX1의 프로모터 영역(PAtNRX1; ~1kb)은 프라이머 쌍 PAtNRX1F-attB1/PANRX1R-attB2를 사용하여 고신뢰도 PCR에 의해 Col-0 식물의 게놈 DNA로부터 증폭하였다. 생성된 PCR 생성물은 제조자의 지침에 따라 BP 반응 키트(Invitrogen)를 사용하여 pDONR-PAtNRX1을 생성하기 위해 게이트웨이 pDONR221 진입 벡터에 클로닝 시켰다. NdeI 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 pDONR-PAtNRX1에서 PAtNRX1 서열을 절단하고 DNA 중합효소 I Large(Klenow) 단편(New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA)으로 평활 말단을 처리한 다음 BamHI로 분해하였다. 35S 프로모터를 BamHI를 사용하여 pCAMBIA1305.1 이원 벡터(P35S)에서 절단하고, DNA 중합효소 I 대형 단편으로 말단을 평활화한 다음, BglII로 절단하였다.

[0184] 그런 다음 PAtNRX1을 이진 벡터의 GUS 리포터 유전자와 융합하여 PAtNRX1:GUS 컨스트럭트를 생성하고, 이를 A. 튜메파시엔스 균주 GV3101로 형질전환하고 꽃 디핑법을 사용하여 아라비돕시스 식물에 추가로 형질전환시켰다. 형질전환된 종자는 10 μg mL^{-1} 하이그로마이신(Duchefa, Haarlem, The Netherlands) 및/또는 250 μg mL^{-1} 세포탁심(Duchefa)이 보충된 MS 한천 배지에서 선별하였다.

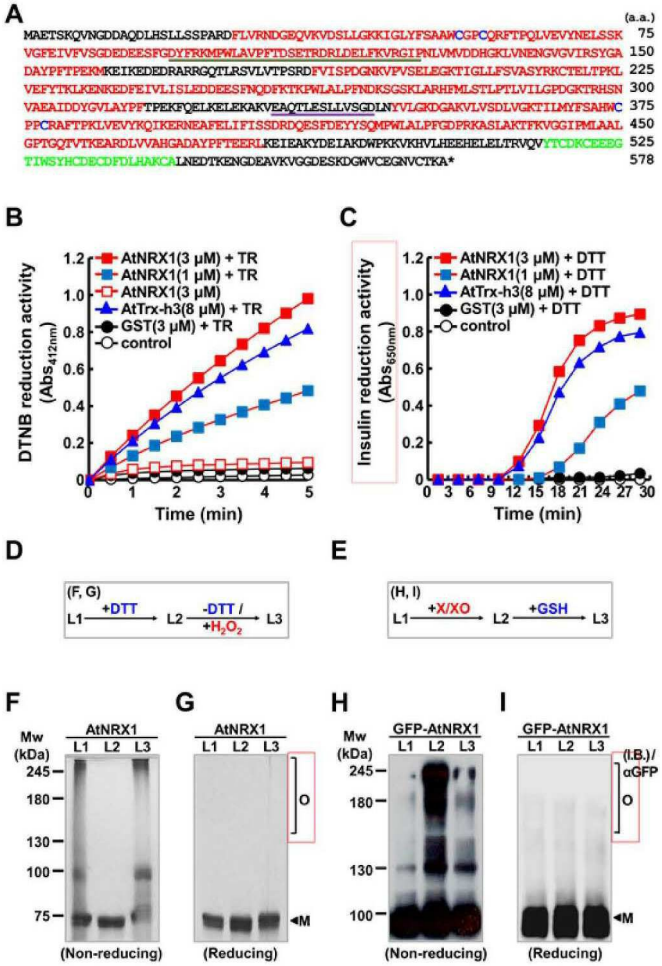
[0186] 14일 된 묘목을 36시간 동안 모의(DMSO) 또는 MeJA 처리한 다음, 이전에 설명한 대로 전체 묘목을 GUS 염색 분석에 사용하였다. 간단히 말해서, 묘목을 GUS 염색 용액(1 mg/mL 5-브로모-4-클로로-3-인돌일-D-글루클로니드, 200 mM 소듐 포스페이트[pH 7.0], 0.5 mM 페리시아나이드, 0.5 mM 페로시아나이드 및 10mM DTT)을 첨가한 다음 암실에서 37℃에서 밤새 인큐베이션 시켰다. 70% 에탄올을 사용하여 조직을 제거하고 디지털 카메라를 사용하여 GUS 이미지를 촬영하였다.

[0188] (실시예 8) AtNRX1의 산화환원 의존적 구조적 스위칭

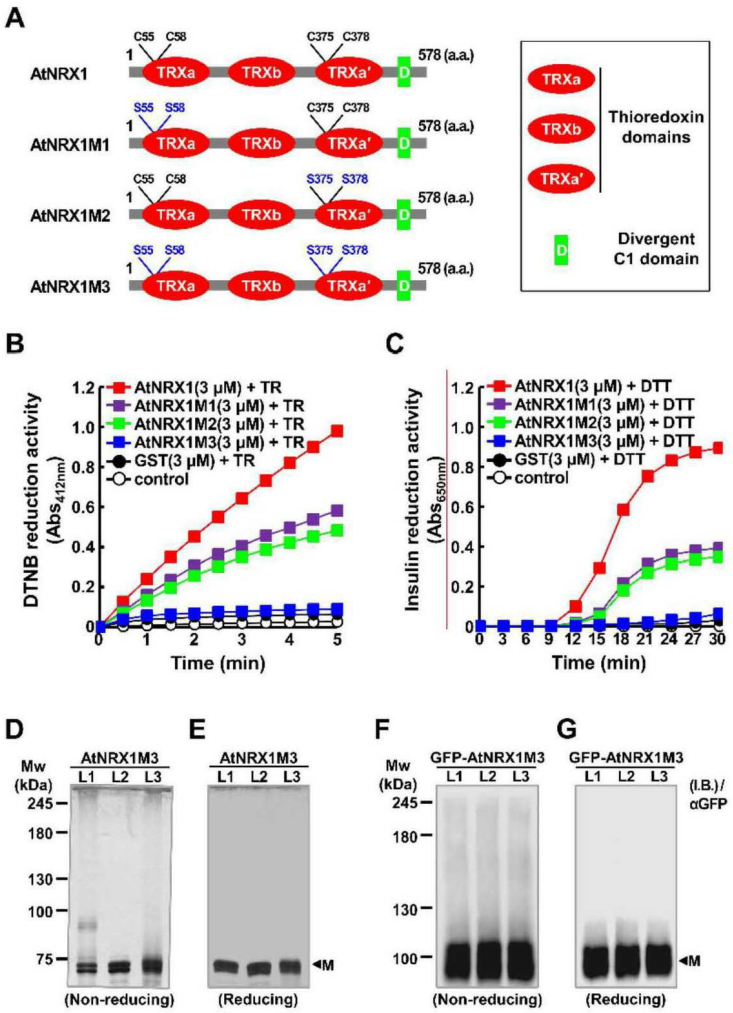
[0190] 정제된 재조합 AtNRX1 단백질을 10mM DTT 또는 10mM H2O2로 처리하여 AtNRX1의 산화환원 의존적 구조적 변형을 시험관 내에서 분석하였다. 식물에서 AtNRX1의 산화환원 의존적 구조적 변화를 추적하기 위해 GFP-AtNRX1 또는 GFP-AtNRX1M3 컨스트럭트를 운반하는 A. 튜메파시엔스 균주를 X/XO(100mM/0.05U mL^{-1}) 및 10 mM GSH 처리된 담배잎에 침투시켰다. 잎 샘플을 3dpi에서 수확하고 액체 N2에서 분쇄하였다. 총 단백질 추출물을 10% 환원성 또는 비환원성 아크릴아미드 겔에서 SDS-PAGE로 분리하고 항-GFP 항체로 웨스턴 블롯팅하였다.

도면

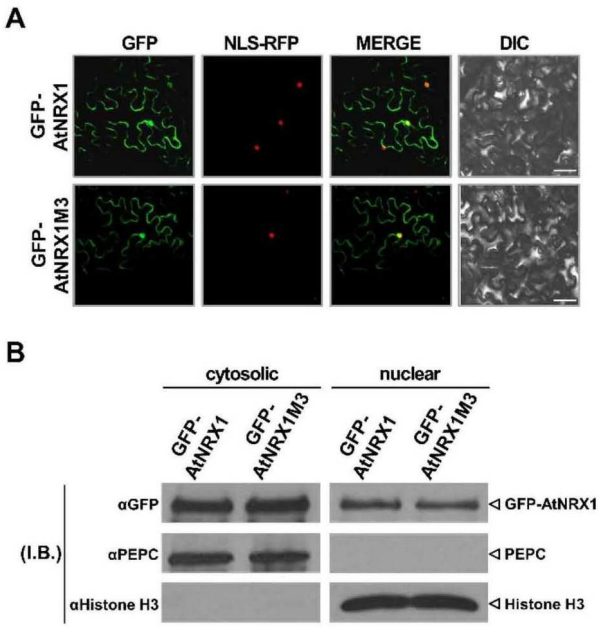
도면1


A
(a.a.)
MAETSKQVNGDDAQDLHSLLSSPARDFLVRNDGEQVKVDSLLGKKIGLYFSAAWCGPCQRFTPQLVEVYNELSSK 75
VGFEIVFVSGDEDEESFGDYFRKMPWLAVPFTDSETRDRLDELFKVRGIPNLVMVDDHGKLVNENGVGVIRSYGA 150
DAYPFTPEKMKEIKEDEDRARRGQTLRSVLVTPSRDFVISPDGNKVPVSELEGKTIGLLFSVASYRKCTELTPKL 225
VEFYTKLKENKEDFEIVLISLEDDEESFNQDFKTKPWLALPFNDKSGSKLARHFMLSTLPTLVILGPDGKTRHSN 300
VAEAIDDYGVLAYPFTPEKFQELKELEKAKVEAQTLESLLVSGDLNYVLGKDGAKVLVSDLVGKTILMYFSAHWC 375
PPCRAFTPKLVEVYKQIKERNEAFELIFISSDRDQESFDEYYSQMPWLALPFGDPRKASLAKTFKVGGIPMLAAL 450
GPTGQTVTKEARDLVVAHGADAYPFTEERLKEIEAKYDEIAKDWPKKVKHVLHEEHELELTRVQVYTCDKCEEEG 525
TIWSYHCDECDFDLHAKCALNEDTKENGDEAVKVGGDESKDGWVCEGNVCTKA* 578
B
DTNB reduction activity (Abs412nm)
AtNRX1(3 μM) + TR
AtNRX1(1 μM) + TR
AtNRX1(3 μM)
AtTrx-h3(8 μM) + TR
GST(3 μM) + TR
control
Time (min)
C
Insulin reduction activity (Abs650nm)
AtNRX1(3 μM) + DTT
AtNRX1(1 μM) + DTT
AtTrx-h3(8 μM) + DTT
GST(3 μM) + DTT
control
Time (min)
D
(F, G)
L1 +DTT L2 -DTT / +H2O2 L3
E
(H, I)
L1 +X/XO L2 +GSH L3
F
AtNRX1
Mw (kDa)
L1 L2 L3
245
180
130
100
75
(Non-reducing)
G
AtNRX1
L1 L2 L3
O
M
(Reducing)
H
GFP-AtNRX1
Mw (kDa)
L1 L2 L3
245
180
130
100
(Non-reducing)
I
GFP-AtNRX1
L1 L2 L3
(I.B.) / αGFP
O
M
(Reducing)

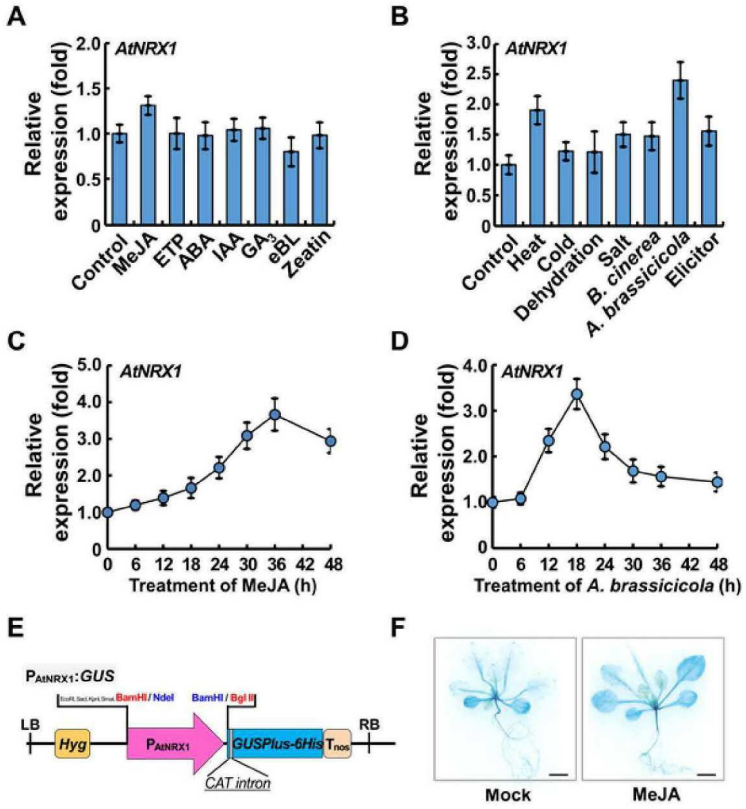
도면2


A
AtNRX1
AtNRX1M1
AtNRX1M2
AtNRX1M3
C55 C58
C375 C378
S55 S58
S375 S378
578 (a.a.)
TRXa
TRXb
TRXa'
D
Thioredoxin domains
Divergent C1 domain
B
DTNB reduction activity (Abs412nm)
AtNRX1(3 μM) + TR
AtNRX1M1(3 μM) + TR
AtNRX1M2(3 μM) + TR
AtNRX1M3(3 μM) + TR
GST(3 μM) + TR
control
Time (min)
C
Insulin reduction activity (Abs650nm)
AtNRX1(3 μM) + DTT
AtNRX1M1(3 μM) + DTT
AtNRX1M2(3 μM) + DTT
AtNRX1M3(3 μM) + DTT
GST(3 μM) + DTT
control
Time (min)
D
E
F
G
Mw (kDa)
AtNRX1M3
GFP-AtNRX1M3
L1 L2 L3
245
180
130
100
75
(Non-reducing)
(Reducing)
(I.B.) / αGFP
M

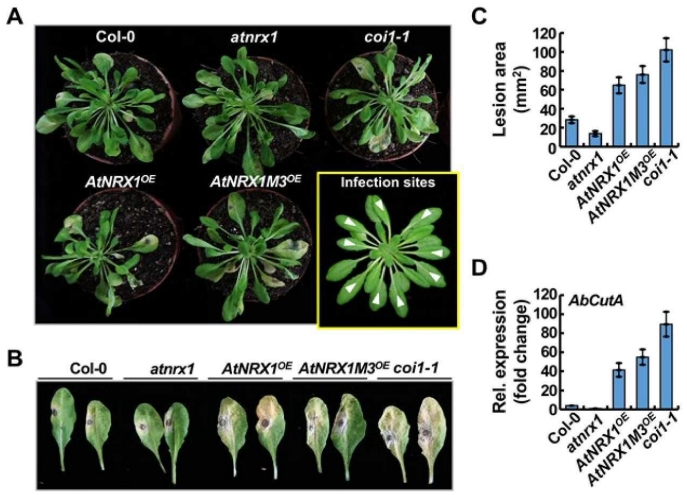
도면3


A
GFP
NLS-RFP
MERGE
DIC
GFP-AtNRX1
GFP-AtNRX1M3
B
cytosolic
nuclear
GFP-AtNRX1
GFP-AtNRX1M3
(I.B.)
αGFP
αPEPC
αHistone H3
GFP-AtNRX1
PEPC
Histone H3

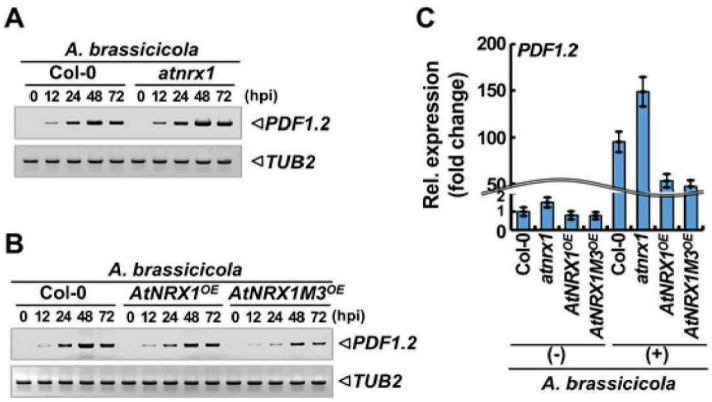
도면4


A
AtNRX1
Relative expression (fold)
Control
MeJA
ETP
ABA
IAA
GA3
eBL
Zeatin
B
AtNRX1
Relative expression (fold)
Control
Heat
Cold
Dehydration
Salt
B. cinerea
A. brassicicola
Elicitor
C
AtNRX1
Relative expression (fold)
Treatment of MeJA (h)
D
AtNRX1
Relative expression (fold)
Treatment of A. brassicicola (h)
E
PAtNRX1:GUS
BamHI / NdeI
BamHI / BglII
LB
Hyg
PAtNRX1
GUSPlus-6His
Tnos
RB
CAT intron
F
Mock
MeJA

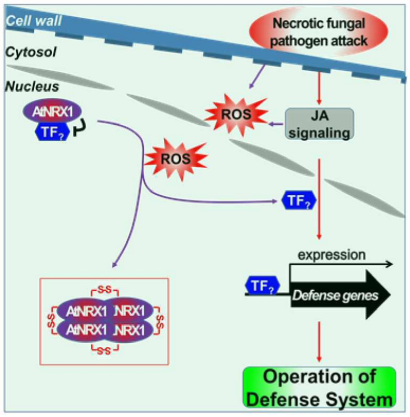
도면5


A
Col-0
atnrx1
coi1-1
AtNRX1OE
AtNRX1M3OE
Infection sites
B
Col-0
atnrx1
AtNRX1OE
AtNRX1M3OE
coi1-1
C
Lesion area (mm²)
Col-0
atnrx1
AtNRX1OE
AtNRX1M3OE
coi1-1
D
AbCutA
Rel. expression (fold change)
Col-0
atnrx1
AtNRX1OE
AtNRX1M3OE
coi1-1

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Alternaria brassicola fungal-resistant transgenic plants knocking out Nucleoredoxin AtNRX1 protein

<130> KP-1057

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 578

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Ala Glu Thr Ser Lys Gln Val Asn Gly Asp Asp Ala Gln Asp Leu
1 5 10 15

His Ser Leu Leu Ser Ser Pro Ala Arg Asp Phe Leu Val Arg Asn Asp

20 25 30

Gly Glu Gln Val Lys Val Asp Ser Leu Leu Gly Lys Lys Ile Gly Leu

35 40 45

Tyr Phe Ser Ala Ala Trp Cys Gly Pro Cys Gln Arg Phe Thr Pro Gln

50 55 60

Leu Val Glu Val Tyr Asn Glu Leu Ser Ser Lys Val Gly Phe Glu Ile

65 70 75 80

Val Phe Val Ser Gly Asp Glu Asp Glu Glu Ser Phe Gly Asp Tyr Phe

85 90 95

Arg Lys Met Pro Trp Leu Ala Val Pro Phe Thr Asp Ser Glu Thr Arg

100 105 110

Asp Arg Leu Asp Glu Leu Phe Lys Val Arg Gly Ile Pro Asn Leu Val

115 120 125

Met Val Asp Asp His Gly Lys Leu Val Asn Glu Asn Gly Val Gly Val

130 135 140

Ile Arg Ser Tyr Gly Ala Asp Ala Tyr Pro Phe Thr Pro Glu Lys Met

145 150 155 160

Lys Glu Ile Lys Glu Asp Glu Asp Arg Ala Arg Arg Gly Gln Thr Leu

165 170 175

Arg Ser Val Leu Val Thr Pro Ser Arg Asp Phe Val Ile Ser Pro Asp

180 185 190

Gly Asn Lys Val Pro Val Ser Glu Leu Glu Gly Lys Thr Ile Gly Leu

195 200 205

Leu Phe Ser Val Ala Ser Tyr Arg Lys Cys Thr Glu Leu Thr Pro Lys

210 215 220

Leu Val Glu Phe Tyr Thr Lys Leu Lys Glu Asn Lys Glu Asp Phe Glu

225 230 235 240

Ile Val Leu Ile Ser Leu Glu Asp Asp Glu Glu Ser Phe Asn Gln Asp

245 250 255

Phe Lys Thr Lys Pro Trp Leu Ala Leu Pro Phe Asn Asp Lys Ser Gly

260 265 270

Ser Lys Leu Ala Arg His Phe Met Leu Ser Thr Leu Pro Thr Leu Val

275 280 285

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

290 295 300

Ile Asp Asp Tyr Gly Val Leu Ala Tyr Pro Phe Thr Pro Glu Lys Phe

305 310 315 320

Gln Glu Leu Lys Glu Leu Glu Lys Ala Lys Val Glu Ala Gln Thr Leu

325 330 335

Glu Ser Leu Leu Val Ser Gly Asp Leu Asn Tyr Val Leu Gly Lys Asp

340 345 350

Gly Ala Lys Val Leu Val Ser Asp Leu Val Gly Lys Thr Ile Leu Met

355 360 365

Tyr Phe Ser Ala His Trp Cys Pro Pro Cys Arg Ala Phe Thr Pro Lys

370 375 380

Leu Val Glu Val Tyr Lys Gln Ile Lys Glu Arg Asn Glu Ala Phe Glu

385 390 395 400

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

405 410 415

Tyr Ser Gln Met Pro Trp Leu Ala Leu Pro Phe Gly Asp Pro Arg Lys

420 425 430

Ala Ser Leu Ala Lys Thr Phe Lys Val Gly Gly Ile Pro Met Leu Ala

435 440 445

Ala Leu Gly Pro Thr Gly Gln Thr Val Thr Lys Glu Ala Arg Asp Leu

450 455 460

Val Val Ala His Gly Ala Asp Ala Tyr Pro Phe Thr Glu Glu Arg Leu

465 470 475 480

Lys Glu Ile Glu Ala Lys Tyr Asp Glu Ile Ala Lys Asp Trp Pro Lys

485 490 495

Lys Val Lys His Val Leu His Glu Glu His Glu Leu Glu Leu Thr Arg

500 505 510

Val Gln Val Tyr Thr Cys Asp Lys Cys Glu Glu Glu Gly Thr Ile Trp

515 520 525

Ser Tyr His Cys Asp Glu Cys Asp Phe Asp Leu His Ala Lys Cys Ala
530 535 540
Leu Asn Glu Asp Thr Lys Glu Asn Gly Asp Glu Ala Val Lys Val Gly
545 550 555 560
Gly Asp Glu Ser Lys Asp Gly Trp Val Cys Glu Gly Asn Val Cys Thr
565 570 575
Lys Ala