

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12N 9/02 C12N 15/82		(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2006년09월20일 10-0493500 2005년05월26일
(21) 출원번호	10-1998-0706878	(65) 공개번호	10-1999-0087454
(22) 출원일자	1998년08월28일	(43) 공개일자	1999년12월27일
번역문 제출일자	1998년08월28일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1997/003313	(87) 국제공개번호	WO 1997/32011
국제출원일자	1997년02월27일	국제공개일자	1997년09월04일
(81) 지정국	<p>국내특허 : 아일랜드, 오스트레일리아, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 중국, 쿠바, 체코, 그루지야, 헝가리, 일본, 대한민국, 세인트루시아, 스리랑카, 라트비아, 마다가스카르, 몽고, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로바키아, 우크라이나, 미국, 폴란드, 루마니아,</p> <p>AP ARIPO특허 : 말라위,</p> <p>EA 유라시아특허 : 벨라루스, 키르기즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 타지키스탄,</p> <p>EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드,</p>		
(30) 우선권주장	60/012,705	1996년02월28일	미국(US)
	60/013,612	1996년02월28일	미국(US)
	60/020,003	1996년06월21일	미국(US)
(73) 특허권자	신젠타 파티서페이션즈 아게 스위스 4058 바젤 슈바르츠발달레 215		
(72) 발명자	<p>볼라쓰 산드라 엘 미국 노쓰 캐롤라이나주 27707 듀렘 파인 오크 드라이브 4225</p> <p>존슨 마리 에이 미국 노쓰 캐롤라이나주 27606 랠리 헤더 드라이브 408</p> <p>포터 샤론 엘 미국 노쓰 캐롤라이나주 27613 랠리 위스퍼링 브랜치 로오드 3837</p> <p>워드 에릭 알 미국 노쓰 캐롤라이나주 27705 듀렘 몽고메리 스트리트 3003</p> <p>헤이페츠 피터 비 미국 노쓰 캐롤라이나주 27713 듀렘 스티브릿지 드라이브 3916</p>		
(74) 대리인	김영관 홍동오		

심사관 : 조영균

(54) 식물 프로토포르피리노겐 옥시다제 및 이의 억제제-내성 돌연변이체를 암호화하는 DNA 분자

요약

본 발명은 대두, 밀, 면화, 사탕무, 평지, 쌀 및 사탕수수로부터의 식물 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 신규한 DNA 서열을 제공한다. 또한, 본 발명은 제초제에 내성이 있는 변형된 형태의 프로톡스 효소를 교시한다. 본 발명에서 교시되는 제초제 내성 프로톡스 효소를 발현시키는 식물이 또한 제공된다. 이들 식물은 천연 프로톡스 유전자를 내성형으로 돌연변이시키는 과정을 통하여 프로톡스 억제제에 대해 내성이 되도록 조작할 수 있거나 이들을 억제제-내성 형태의 식물 프로톡스 효소를 암호화하는 유전자로 형질전환시킬 수 있다.

명세서

기술분야

본 발명은 일반적으로 식물 효소인 프로토포르피리노겐 옥시다제("프로톡스(protox)")에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 상기 효소를 암호화하는 DNA 분자 및 상기 효소의 변형된, 억제제-내성형에 관한 것이다. 또한 본 발명은 이들 변형된 형태를 기본으로하는 조직 배양 선별법 및 제초제 용도에 관한 것이다.

배경기술

I. 프로톡스 효소 및 클로로필/헴 생합성 경로에서 이의 역할

클로로필과 헴을 생산하는 생합성 경로는 다수의 공통 단계를 갖는다. 클로로필은 모든 녹색 광합성 유기체에 존재하는 광 흡수 색소이다. 헴은 헤모글로빈, 시토크롬, P450 혼합-기능 옥시게나제, 퍼옥시다제, 및 카탈라제의 조인자이며 (참조: Lehninger, Biochemistry. Worth Published, New York (1975)), 따라서 모든 호기성 유기체에 있어서 필수 성분이다.

클로로필과 헴의 생합성에 있어서 최종의 공통 단계는 프로토포르피리노겐 IX가 프로토포르피린 IX로 산화되는 단계이다. 프로토포르피리노겐 옥시다제(이후 "프로톡스"로 칭함)는 상기 최종 산화 단계를 촉매하는 효소이다(Matringe et al., Biochem. J. 260:231 (1989)).

프로톡스 효소는 효모 사카로마이세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae; Labbe-Bois and Labbe, In Biosynthesis of Heme and Chlorophyll, E.H. Dailey, ed. McGraw Hill; New York, pp. 235-285 (1990)), 보리 에티오플라스트(Jacobs and Jacobs, Biochem. J. 244:219 (1987)), 및 쥐의 간(Dailey and Karr, Biochem. 26:2697 (1987))을 포함한 수 많은 유기체로부터 부분적으로 또는 완전하게 정제되었다. 프로톡스를 암호화하는 유전자는 2종의 원핵세포 유기체인, 에스케리키아 콜리(Escherichia coli; Sasarman et al., Can. J. Microbiol. 39:1155 (1993))와 바실러스 서브틸리스(Bacillus subtilis; Dailey et al., J. Biol. Chem. 269:813 (1994))로부터 분리되었다. 이들 유전자는 서열 유사성을 전혀 공유하지 않는다; 이들의 예측된 단백질 생성물 중 어느것도 아미노산 서열이 동일하지 않다. 이. 콜리 단백질은 대략 21 kDa이며, 세포막과 결합되어 있다. 비. 서브틸리스 단백질은 51 kDa이며, 가용성, 세포질 활성이 있다.

현재 프로톡스 암호화 유전자가 또한 사람(참조: Nishimura et al., J. Biol. Chem. 270(14): 8076-8080 (1995)) 및 식물(WO 95/34659로 1995년 12월 21에 공개된 국제 출원 PCT/IB95/00452)로부터 분리되었다.

II. 제초제 표적으로서 프로톡스 유전자

경작물중 잡초 또는 식물과 같은 바람직하지 못한 초목을 방제하기 위하여 제초제를 사용하는 것은 거의 범세계적으로 실용되고 있다. 관련된 시장은 매년 천만 달러를 초과한다. 이런 광대한 사용에도 불구하고, 잡초 방제는 농부에 있어서 중요하고 비용이 많이 드는 문제로 남아있다.

제초제를 효과적으로 사용하기 위해서는 건실한 관리가 요구된다. 예를 들면, 적용 시간 및 방법과 잡초 식물 발육의 단계가 제초제를 사용하여 잡초를 방제하는데 있어서 좋은 결과를 얻는데 있어서 중요하다. 여러가지 잡초가 제초제에 대해 내성이 있기 때문에, 효과적인 제초제의 생산이 점점 더 중요해지고 있다.

불행하게도, 더욱 강력하고, 더욱 광범위한 잡초 스펙트럼과 더욱 신속한 토양 중에서의 분해력을 나타내는 제초제는 또한 더욱 큰 작물 식물독성을 가질 수 있다. 이런 문제에 대한 해결책 중 하나가 제초제에 대해 내성이 있거나 견디내는 작물을 개발하는 것이었다. 제초제에 내성이 있는 작물 하이브리드 또는 변종은 작물에 대한 손상의 위험을 주의하지 않고도 제초제를 사용할 수 있도록 한다. 내성의 발달은 제초제에 대한 작물의 민감성으로 인하여 제초제의 사용이 이전에는 금지되거나 제한되었던 작물(예를 들면, 프리-이머전스 용도; pre-emergence use)에 제초제를 사용할 수 있도록 한다. 예를 들면, 앤더슨(Anderson) 등의 미국 특허 제4,761,373호는 여러가지 이미다졸리논 또는 설펜아미도 제초제에 대해 내성이 있는 식물에 관한 것이다. 상기 내성은 변형된 아세트히드록시산 신타제(AHAS) 효소에 의해 부여된다. 군맨(Goodman) 등의 미국 특허 제4,975,374호는 GS를 억제하는 것으로 공지된 제초제, 예를 들면, 포르피노트리신 및 메티오닌 설폭스이민에 의한 억제에 내성이 있는 돌연변이 글루타민 신타타제(GS)를 암호화하는 유전자를 함유하는 식물 세포 및 식물에 관한 것이다. 베드브룩(Bedbrook) 등의 미국 특허 제5,013,659호는 술폰일우레아 제초제에 의한 억제에 식물이 내성이 갖도록 하는 돌연변이 아세트락타이트 신타타제를 발현시키는 식물에 관한 것이다. 소머스(Somers) 등의 미국 특허 제5,162,602호는 시클로헥산디온 및 아릴옥시페녹시프로파노산 제초제에 의한 억제를 견디내는 식물에 기술하고 있다. 상기 내성은 변형된 아세틸 조효소 A 카복실라제(ACCase)에 의해 부여된다.

프로토스 효소는 여러가지 제초제 화합물에 대한 표적으로서 작용한다. 프로토스를 억제하는 제초제는 수 많은 구조적으로 상이한 부류의 분자를 포함한다(Duke et al., Weed Sci. 39:465 (1991); Nandihalli et al., Pesticide Biochem. Physiol. 43:193 (1992); Matringe et al., FEBS Lett. 245:35 (1989); Yanase and Andoh, Pesticide Biochem. Physiol. 35:70 (1989)). 이들 제초제 화합물을 디페닐에테르{예, 아시플루오르펜, 5-[2-클로로-4-(트리플루오로메틸)페녹시]-2-니트로벤조산; 이의 메틸 에스테르, 또는 옥시플루오르펜, 2-클로로-1-(3-에톡시-4-니트로페녹시)-4-(트리플루오로벤젠)}, 옥시다졸(예, 옥시디아존, 3-[2,4-디클로로-5-(1-메틸에톡시)페닐]-5-(1,1-디메틸에틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-(3H)-온, 시클릭이미드(예, S-23142, N-(4-클로로-2-플루오로-5-프로파르길옥시페닐)-3,4,5,6-테트라히드로프탈이미드; 클로로프탈림, N-(4-클로로페닐)-3,4,5,6-테트라히드로프탈이미드), 페닐 피라졸(예, TNPP-에틸, 에틸 2-[1-(2,3,4-트리클로로페닐)-4-니트로피라졸릴-5-옥시]프로피오네이트; M&B 39279), 피리딘 유도체(예, LS 82-556), 및 페노필레이트 및 이의 O-페닐피롤리디노- 및 피페리디노카바메이트 유사체가 있다. 이들 화합물중 대다수가 명백하게 기질 유사체로서 작용하는, 상기 효소에 의해 촉매되는 정상적인 반응을 경쟁적으로 억제한다.

전형적으로, 프로토스에 대한 억제 효과는 약 395 내지 410nm에서 자극시킨 후, 약 622 내지 635nm에서 형광을 측정함으로써 결정된다(참조: Jacobs and Jacobs, Enzyme 28:206 (1982); Sherman et al., Plant Physiol. 97:280 (1991)). 상기 검정법은 프로토포르피린 IX가 형광성 색소이며, 프로토포르피리노겐 IX는 비형광성이라는 사실에 근거한 것이다.

프로토스-억제 제초제의 예측되는 작용 방식은 엽록체 중에 프로토포르피리노겐 IX의 축적이 연루되어 있다. 상기 축적은 퍼옥시다제 활성화에 의해 프로토포르피린 IX로 산화되는 세포질 중에서 프로토포르피리노겐 IX를 누출시키는 것으로 생각된다. 광에 노출시, 프로토포르피린 IX는 세포질 중에 단일 산소를 형성시킬 수 있다. 상기 단일 산소는 또한 다른 반응성 산소종을 형성시킬 수 있으며, 반응성 산소종은 지질 과산화와 막 파괴를 일으켜 세포를 신속하게 사멸시킬 수 있다(Lee et al., Plant Physiol. 102:881 (1993)).

프로토스 효소가 모두 식물 프로토스 효소를 억제하는 제초제에 대해 감응성인 것은 아니다. 에스케리키아 콜리(Sasarman et al., Can. J. Microbiol. 39:1155 (1993)) 및 바실러스 서브틸리스(Dailey et al., J. Biol. Chem. 269:813 (1994))로부터 분리된 유전자에 의해 암호화되는 프로토스 효소 둘다 이들 제초제 억제제에 대해 내성이 있다. 또한, 페닐이미드 제초제 S-23142에 대해 내성이 있는 단세포 조류인 클라미도모나스 레인하르트티(*Chlamydomonas reinhardtii*)의 변이체가 보고된 바 있다(Kataoke et al., J. Pesticide Sci. 15:449 (1990); Shibata et al., In Research in Photosynthesis, Vol. III, N. Murata, ed. Kluwer: Netherlands. pp. 567-570 (1992)). 이들 변이체중 적어도 1종은 변이체를 선택하는 제초제 억제제에 대해서 뿐만 아니라, 다른 부류의 프로토스 억제제에 대해서도 내성인 변형된 프로토스 활성을 갖는 것으로 나타났다(Oshio et al., Z. Naturforsch. 48c:339 (1993); Sato et al., In ACS Symposium on Porphyrin Pesticides, S. Duke ed. ACS Press: Washington, D.C. (1994)). 돌연변이 담배 세포주가 또한 억제제 S-21432에 대해 내성이 있는 것으로 보고되었다(Che et al., Z. Naturforsch. 48c:350 (1993)).

발명의 요약

본 발명은 밀, 대두, 면화, 사탕무, 평지, 쌀, 및 사탕수수로부터의 프로토포르피리노젠 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 분리된 DNA 분자 및 키메릭 유전자를 제공한다. 상기와 같은 분리된 DNA 분자의 서열은 서열 9(밀), 11(대두), 15(면화), 17(사탕무), 19(평지), 21(쌀), 및 23(사탕수수)으로 나타낸다.

본 발명은 또한 변형되지 않은 천연 식물 프로톡스 효소를 억제하는 화합물에 대해 내성이 있는 식물 프로토포르피리노젠 옥시다제(프로톡스) 효소의 변형된 형태, 및 상기와 같은 억제제-내성 식물 프로톡스 효소를 암호화하는 DNA 분자를 제공한다. 본 발명은 식물에서 억제제-내성 식물 프로톡스 효소를 발현시킬 수 있는 천연 프로톡스 유전자의 키메릭 유전자 및 변형된 형태를 제공한다.

억제제-내성 식물 프로톡스 효소를 암호화하는 유전자를 사용하여 전체 식물체중에 프로톡스-억제 제초제 내성을 부여할 수 있으며 이는 식물 세포 형질전환법에 있어서 선택성 마커로서 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 후손을 포함한 식물, 이들 변형된 프로톡스 효소를 암호화하는 식물 발현가능한 유전자를 함유하는 식물 조직 및 식물 종자를 포함한다. 이들 식물, 식물 조직 및 식물 종자를 식물에 있어서 천연 프로톡스 활성화에 대해 통상적으로 억제성인 수준에서 프로톡스-억제제에 대해 내성이 있다. 본 발명에 포함되는 식물은 특히 프로톡스 억제 제초제에 대한 강력한 표적물이 되는 것, 특히 옥수수 및 보리, 밀, 사탕수수, 호밀, 옌트, 잔디 및 목초, 기장 및 쌀과 같은 곡류와 같은 농업적으로 중요한 작물을 포함한다. 슈가 케인, 대두, 면화, 사탕무, 유종자 평지 및 담배가 또한 포함된다.

본 발명은 또한 본 발명에서 제공되는 식물 프로톡스 효소의 억제제-내성 형태를 생산하는, 본 발명의 방법으로 형질전환시킨 형질전환된 식물 또는 이들의 후손으로부터 기원하는 꽃, 줄기, 과실, 잎, 뿌리와 같은, 번식물 및 식물 부분과 함께, 예를 들어 식물 조직, 원형질체, 세포, 칼리(calli), 기관, 식물 종자, 배, 화분, 난세포, 접합체와 같은 식물질을 포함하는 식물의 생산 방법에 관한 것이다. 상기와 같은 식물은 내성 프로톡스를 암호화하는 구조 유전자로 안정하게 형질전환시킬 수 있거나, 직접적인 선택 기술로 제조하여 제초제 내성주를 분리하고, 특성화시켜 개발할 수 있다. 또한, 본 발명은 식물 열록체내에서 프로톡스 유전자를 발현시키는 색소체 형질전환 기술을 사용하는 것을 포함한다.

본 발명은 또한 식물 프로톡스 효소의 억제제-내성 형태를 암호화하는 유전자의 존재를 검출하고 식물 조직중 억제제-내성 프로톡스 전사물의 수준을 정량하는 프로브 및 방법에 관한 것이다. 이들 방법을 사용하여 식물 프로톡스 효소의 억제제-내성 형태를 암호화하는 유전자를 함유하고(하거나) 발현시키는 식물 또는 식물 조직을 확인하거나 선별할 수 있다.

<서열 목록에 대한 설명>

서열 1 아라비도프시스 탈리아나(Arabidopsis thaliana) 프로톡스-1 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 2 서열 1에 의해 암호화된 아라비도프시스 프로톡스-1 아미노산 서열.

서열 3 아라비도프시스 탈리아나 프로톡스-2 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 4 서열 3에 의해 암호화된 아라비도프시스 프로톡스-2 아미노산 서열.

서열 5 옥수수 프로톡스-1 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 6 서열 5에 의해 암호화된 옥수수 프로톡스-1 아미노산 서열.

서열 7 옥수수 프로톡스-2 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 8 서열 7에 의해 암호화된 옥수수 프로톡스-2 아미노산 서열.

서열 9 밀 프로톡스-1 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 10 서열 9에 의해 암호화된 밀 프로톡스-1 아미노산 서열.

서열 11 대두 프로톡스-1 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 12 서열 11에 의해 암호화된 대두 프로톡스-1 단백질.

서열 13 아라비도프시스 탈리아나 프로토스-1 유전자로부터의 프로모터 서열.

서열 14 옥수수 프로토스-1 유전자로부터의 프로모터 서열.

서열 15 면화 프로토스-1 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 16 서열 15에 의해 암호화된 면화 프로토스-1 아미노산 서열.

서열 17 사탕무 프로토스-1 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 18 서열 17에 의해 암호화된 사탕무 프로토스-1 아미노산 서열.

서열 19 평지 프로토스-1 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 20 서열 19에 의해 암호화된 평지 프로토스-1 아미노산 서열.

서열 21 쌀 프로토스-1 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 22 서열 21에 의해 암호화된 쌀 프로토스-1 아미노산 서열.

서열 23 사탕수수 프로토스-1 단백질에 대한 DNA 암호화 서열.

서열 24 서열 23에 의해 암호화된 사탕수수 프로토스-1 아미노산 서열.

서열 25 옥수수 프로토스-1 인트론 서열.

서열 26 사탕무 프로토스-1 유전자로부터의 프로모터 서열.

서열 27 Pclp_P1a-색소체 clpP 유전자 프로모터 상부 스트랜드 PCR 프라이머.

서열 28 Pclp_P1b-색소체 clpP 유전자 프로모터 하부 스트랜드 PCR 프라이머.

서열 29 Pclp_P2b-색소체 clpP 유전자 프로모터 하부 스트랜드 PCR 프라이머.

서열 30 Trps16_P1a-색소체 rps16 유전자 상부 스트랜드 PCR 프라이머.

서열 31 Trps16_P1b-색소체 rps16 유전자 하부 스트랜드 PCR 프라이머.

서열 32 minpsb_U-색소체 psbA 유전자 상부 스트랜드 프라이머.

서열 33 minpsb_L-색소체 psbA 유전자 하부 스트랜드 프라이머.

서열 34 APRTXP1a-상부 스트랜드 PCR 프라이머.

서열 35 APRTXP-1b-하부 스트랜드 PCR 프라이머.

기탁 사항

다음 벡터 분자는 미국 일리노이주 61604 페오리아 1815 노쓰 유니버시티 스트리트 노던 리저널 리서치 센터내 농업 연구부의 특허 걸쳐 콜렉션(Patent Culture Collection; NRRL)에 기탁되어 있다.

밀 프로토스-1a: p블루스크립트 SK 벡터중, pWDC-13(NRRL #B21545)로 1996년 3월 19일자로 기탁되었음.

대두 프로토스-1: p블루스크립트 SK 벡터중, pWDC-12(NRRL #B-21516)으로 1995년 12월 15일자로 기탁되었습.

면화 프로토스-1: p블루스크립트 SK 벡터중, pWDC-15(NRRL #B-21594)로 1996년 7월 1일자로 기탁되었습.

사탕무 프로토스-1: p블루스크립트 SK 벡터중, pWDC-16(NRRL #B-21595N)으로 1996년 7월 29일자로 기탁되었습.

평지 프로토스-1: p블루스크립트 SK 벡터중, pWDC-17(NRRL #B-21615)로 1996년 8월 23일자로 기탁되었습.

쌀 프로토스-1, p블루스크립트 SK 벡터중, pWDC-18(NRRL #B-21648)로 1996년 12월 6일자로 기탁되었습.

사탕수수 프로토스-1, p블루스크립트 SK 벡터중, pWDC-19(NRRL #B-21649)로 1996년 12월 6일자로 기탁되었습.

내성 돌연변이체 pAraC-2Cys, pMut-1 플라스미드중, 농업부 걸쳐 콜렉션에 pWDC-7하에 1994년 11월 14일자로 기탁 되었으며, 기탁 번호는 NRRL #21339N이다.

아라비도프시스 프로토스-1 프로모터를 함유하는 AraPT1Pro는 pWDC-11(NRRL #B-21515)로 1995년 12월 15일자로 기탁되었습.

옥수수 프로토스-1 암호화 서열의 나머지 부분에 융합되어있는 옥수수 프로토스-1 프로모터를 함유하는 플라스미드는 pWDC-14(NRRL #B-21546)로 1996년 3월 19일자로 기탁되었습.

사탕무 프로토스-1 프로모터를 함유하는 플라스미드는 pWDC-20(NRRL #B-21650)으로 1996년 12월 6일자로 기탁되었습.

발명의 상세한 설명

1. 식물 프로토스 암호화 서열

하나의 양태로, 본 발명은 밀, 대두, 면화, 사탕무, 평지, 쌀, 및 사탕수수로부터의, 프로토포르피리노젠 IX의 프로토포르피린 IX로의 산화반응을 촉매하는 효소인, 프로토포르피리노젠 옥시다제(본 명세서에서는 "프로토스"로 언급됨)를 암호화하는 분리된 DNA 분자에 관한 것이다. 밀 프로토스 효소에 대한 DNA 암호화 서열 및 대응하는 아미노산 서열은 각각 서열 9와 10으로 제공된다. 대두 프로토스 효소에 대한 DNA 암호화 서열과 대응하는 아미노산 서열은 각각 서열 11과 12로 제공된다. 면화 프로토스 효소에 대한 DNA 암호화 서열과 대응하는 아미노산 서열은 각각 서열 15와 16으로 제공된다. 사탕무 프로토스 효소에 대한 DNA 암호화 서열과 대응하는 아미노산 서열은 각각 서열 17과 18로 제공된다. 평지 프로토스 효소에 대한 DNA 암호화 서열과 대응하는 아미노산 서열은 각각 서열 19와 20으로 제공된다. 쌀 프로토스 효소에 대한 DNA 암호화 서열과 대응하는 아미노산 서열은 각각 서열 21과 22로 제공된다. 사탕수수 프로토스 효소에 대한 DNA 암호화 서열과 대응하는 아미노산 서열은 각각 서열 23과 24로 제공된다.

이전에 분리된, 아라비도프스 탈리아나 및 옥수수로부터의 프로토스 효소에 대한 DNA 암호화 서열과 대응하는 아미노산 서열이 본 발명에서 서열 1 내지 4(아라비도프시스) 및 서열 5 내지 8(옥수수)로 재생산되었다.

따라서, 본 발명은 밀 프로토스 효소, 대두 프로토스 효소, 면화 프로토스 효소, 사탕무 프로토스 효소, 평지 프로토스 효소, 쌀 프로토스 효소 및 사탕수수 프로토스 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 진핵세포 프로토스를 포함하는 프로토포르피리노젠 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자에 관한 것이다.

본 발명의 범주내에서는 쌍자엽 식물, 특히 서열 11, 15, 17 및 19로 제공되는 바와 같은, 대두 식물, 면화 식물, 사탕무 식물 및 평지 식물로부터의 프로토포르피리노젠 옥시다제(프로토스) 효소를 암호화하는 분리된 DNA 분자가 바람직하다. 서열 11로 제공되는 바와 같은 대두 및 서열 17로 제공되는 바와 같은 사탕무로부터의 프로토포르피리노젠 옥시다제(프로토스) 효소를 암호화하는 분리된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

단자엽 식물, 특히 서열 9, 21 및 23으로 제공되는 바와 같은, 밀 식물, 쌀 식물 및 사탕수수 식물로부터의 프로토포르피리노젠 옥시다제(프로토스) 효소를 암호화하는 분리된 DNA 분자가 또한 바람직하다. 서열 9로 제공되는 바와 같은 밀로부터의 프로토포르피리노젠 옥시다제(프로토스) 효소를 암호화하는 분리된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

또 다른 양태에서, 본 발명은 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소 단백질을 암호화하는, 쌍자엽 식물로부터 분리된 DNA 분자에 관한 것이고 여기서 단백질은 서열 12, 16, 18 및 20으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 추가로, 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소 단백질을 암호화하는 단자엽 식물로부터 분리된 DNA 분자를 포함하고 여기서 단백질은 서열 10, 22 및 24로 이루어진 그룹중에서 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 프로토포리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 분리된 DNA 분자가 보다 바람직하고 여기서 단백질은 서열 10으로 나타낸 밀의 아미노산 서열을 포함한다. 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 분리된 DNA 분자가 보다 바람직하고 여기서 단백질은 서열 12로 나타낸 콩 및 서열 18로 나타낸 슈거 비트의 아미노산 서열을 포함한다.

본 발명에 의해 제공된 정보를 사용하여 진핵 유기체로부터 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소에 대한 DNA 암호화 서열은 표준 방법을 사용하여 수득될 수 있다.

다른 양태에서, 본 발명은 밀 프로톡스 효소를 암호화하며 다음과 같은 하이브리드화 및 세척 조건하에서 서열 9의 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열을 갖는 분리된 DNA 분자에 관한 것이다:

(a) 7% 나트륨 도데실 황페이트(SDS)중, 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃에서 하이브리드화; 및

(b) 2X SSC, 1% SDS, 50℃에서 세척.

또 다른 양태로, 본 발명은 대두 프로톡스 효소를 암호화하며 다음과 같은 하이브리드화 및 세척 조건하에서 서열 11의 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열을 갖는 분리된 DNA 분자에 관한 것이다:

(a) 7% 나트륨 도데실 황페이트(SDS)중, 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃에서 하이브리드화; 및

(b) 2X SSC, 1% SDS, 50℃에서 세척.

또 다른 양태로, 본 발명은 면화 프로톡스 효소를 암호화하며 다음과 같은 하이브리드화 및 세척 조건하에서 서열 15의 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열을 갖는 분리된 DNA 분자에 관한 것이다:

(a) 7% 나트륨 도데실 황페이트(SDS)중, 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃에서 하이브리드화; 및

(b) 2X SSC, 1% SDS, 50℃에서 세척.

다른 양태로, 본 발명은 사탕무 프로톡스 효소를 암호화하며 다음과 같은 하이브리드화 및 세척 조건하에서 서열 17의 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열을 갖는 분리된 DNA 분자에 관한 것이다:

(a) 7% 나트륨 도데실 황페이트(SDS)중, 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃에서 하이브리드화; 및

(b) 2X SSC, 1% SDS, 50℃에서 세척.

다른 양태로, 본 발명은 평지 프로톡스 효소를 암호화하며 다음과 같은 하이브리드화 및 세척 조건하에서 서열 19의 뉴클레오티드 서열로 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열을 갖는 분리된 DNA 분자에 관한 것이다:

(a) 7% 나트륨 도데실 황페이트(SDS)중, 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃에서 하이브리드화; 및

(b) 2X SSC, 1% SDS, 50℃에서 세척.

다른 양태로, 본 발명은 쌀 프로톡스 효소를 암호화하며 다음과 같은 하이브리드화 및 세척 조건하에서 서열 21의 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열을 갖는 분리된 DNA 분자에 관한 것이다:

(a) 7% 나트륨 도데실 황페이트(SDS)중, 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃에서 하이브리드화; 및

(b) 2X SSC, 1% SDS, 50℃에서 세척.

다른 양태로, 본 발명은 사탕수수 프로토스 효소를 암호화하며 다음과 같은 하이브리드화 및 세척 조건하에서 서열 23의 뉴클레오티드 서열에 하이브리드화되는 뉴클레오티드 서열을 갖는 분리된 DNA 분자에 관한 것이다:

(a) 7% 나트륨 도데실 술페이트(SDS)중, 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃에서 하이브리드화; 및

(b) 2X SSC, 1% SDS, 50℃에서 세척.

본 발명에서 교시되는 분리된 진핵세포 프로토스 서열은 표준 유전공학 기술에 따라서 조작하여 목적하는 바에 따라 맞출 수 있다. 예를 들면, 전체 프로토스 서열 또는 이들의 일부를 프로토스 암호화 서열 및 전령 RNA에 특이적으로 하이브리드화될 수 있는 프로브로서 사용할 수 있다. 다양한 조건하에서 특이적으로 하이브리드화시키기 위해서는, 상기와 같은 프로브는 프로토스 암호화 서열 중에서 독특하며 바람직하게는 길이가 뉴클레오티드 10개 이상, 가장 바람직하게는 길이가 뉴클레오티드 20개 이상을 포함한다. 상기와 같은 프로브를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)의 숙지된 공정을 통하여 선택된 유기체로부터 프로토스 암호화 서열을 증폭시키고 분석할 수 있다. 이런 기술은 목적하는 유기체로부터의 추가적인 프로토스 암호화 서열을 분리시키는데 유용할 수 있거나 유기체중 프로토스 암호화 서열의 존재를 결정하기 위한 진단 검정법으로서 유용할 수 있다.

하이브리드의 안정성에 영향을 주는 인자는 하이브리드화의 스트린전시를 결정한다. 그러한 인자중 하나는 용융 온도 T_m 으로, 이는 하기 문헌에 제공된 식에 따라서 용이하게 계산할 수 있다: DNA PROBES, George H. Keller and Mark M. Manak, Macmillan Publishers Ltd, 1993, Section one: Molecular Hybridization Technology; page 8 ff. 바람직한 하이브리드화 온도는 약 25℃ 범위의 계산된 용융 온도 T_m 이하이며 바람직하게는 약 12 내지 15℃ 범위의 계산된 용융 온도 T_m 이하이고 올리고뉴클레오티드의 경우 약 5 내지 10℃ 범위의 용융 온도 T_m 이하이다.

상기 정의된 바와 같이 본 발명에 따르는 DNA 분자에 하이브리드화되는 DNA 분자, 바람직하게는 중간 정도의 스트린전시 조건하에서 길이가 10개 이상의 뉴클레오티드인 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소의 서열의 연속 부위를 포함하는 상기 DNA 분자로부터 수득할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브가 본 발명에 포함된다.

또한 본 발명은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 있어서 식물 프로토스 유전자 또는 길이가 10개 이상인 뉴클레오티드의 mRNA에 특이적으로 하이브리드화될 수 있는 뉴클레오티드 프로브의 용도에 관한 것이다.

다른 양태로, 본 발명은 프로토포르피리노겐 옥시다제 활성을 암호화하는 진핵세포 DNA 서열 또는 각각의 mRNA에 특이적으로 하이브리드화될 수 있는 프로브 및 본 발명에 따르는 프로브를 사용하여 진핵세포 유기체중에서 상기 DNA 서열을 검출하는 방법을 제공한다.

프로토스 특이적 하이브리드화 프로브를 또한 사용하여 게놈 프로토시 서열에 대한 프로브의 선택적인 하이브리드화를 기본으로하는 표준 기술을 사용하여 선택된 유기체의 게놈중 천연 진핵세포 프로토스 유전자(들)의 위치를 맵핑할 수 있다. 이들 기술로는, 비제한적으로, 프로토스 프로브 서열내에 확인되거나 함유되어 있는 DNA 다형성의 확인, 및 2종의 다형성 모 라인의 하이브리드의 자가 번식으로부터 유래되는 맵핑 집단에 있어서 공지된 맵 위치의 다른 마커에 대한 프로토스 유전자의 분리에 따른 상기 다형성의 용도를 포함한다(참조: Helentjaris et al., Plant Mol. Biol. 5: 109 (1985), Sommer et al. Biotechniques 12:82 (1992); D'Ovidio et al., Plant Mol. Biol. 15: 169 (1990)). 진핵세포 프로토스 서열이라면 어느것이나 진핵세포 유기체로부터의 프로토스 유전자 맵핑용 프로브로서 유용한 것으로 생각될 수 있지만, 바람직한 프로브는 선택된 유기체와 더욱 밀접한 관계가 있는 유기체로부터의 프로토스 서열이며, 가장 바람직한 프로브는 선택된 유기체로부터의 프로토스 서열이다. 상기 방법에서 프로토스 유전자의 맵핑은 사료용 식물에 있어서 특히 유용한 것으로 생각된다. 예를 들면, 제초제 내성을 부여하는 돌연변이 프로토스 유전자의 유전자 지도 위치를 알아으로써, 참조용 유전자 지도로부터 플랭킹 DNA 마커를 확인할 수 있다(참조: Helentjaris, Trends Genet. 3:217(1987)). 신규 사료용 식물주중에 제초제 내성 특성을 이입시키는 중에, 이들 마커를 사용하여 각회의 역교잡후 반복치(recurrent parent)중에 아직도 존재하는 프로토스-결합된 플랭킹 염색체 DNA의 정도를 모니터할 수 있다.

프로토스 특이적 하이브리드화 프로브를 또한 사용하여 노던 블롯 분석과 같은 표준 기술을 사용하여 유기체중 프로토스 mRNA의 수준을 정량할 수 있다. 이런 기술은 감소된 수준의 프로토스 활성화와 관련된, 신경정신 증상 및 피부 병소로 특징되는 사람에게 있어서의 자가복제 염색체 우성 질환과 같은 특성의 역조건과 관련될 수 있는 변화된 수준의 프로토스 발현을 검출하기 위한 진단 검정법으로서 유용할 수 있다(Brenner and Bloomer, New Engl. J. Med. 302:765 (1980)).

본 발명의 추가 양태는

(a) 길이가 뉴클레오타이드 10개 이상인 식물로부터의 프로토스 단백질에 대한 암호화 서열의 연속 부위를 포함하는, 식물 프로토스 유전자 또는 mRNA에 특이적으로 하이브리드화될 수 있는 뉴클레오타이드 프로브를 제조하는 단계;

(b) 단계 (a)에 따라서 제조된 뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 선택된 유기체로부터 클로닝된 게놈 DNA 단편 또는 cDNA 단편의 집단중에서 다른 프로토스 암호화 서열에 대해 프로브화시키는 단계; 및

(c) 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 부위를 포함하는 DNA 분자를 분리시켜 배가시키는 단계를 포함함을 특징으로하여, 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 부위를 포함하는 DNA 분자를 제조하는 방법이다.

본 발명의 다른 양태는

(a) 길이가 뉴클레오타이드 10개 이상인 식물로부터의 프로토스 단백질에 대한 암호화 서열의 연속 부위를 포함하는, 식물 프로토스 유전자 또는 mRNA에 특이적으로 하이브리드화할 수 있는 뉴클레오타이드 프로브를 제조하는 단계;

(b) 단계 (a)에 따라서 제조한 뉴클레오타이드 프로브를 사용하여 선택된 유기체로부터 클로닝된 게놈 DNA 단편 또는 cDNA 단편의 집단중에서 다른 프로토스 암호화 서열에 대해 프로브화시키는 단계; 및

(c) 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 분획을 포함하는 DNA 분자를 분리시키는 단계를 포함함을 특징으로하여, 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소 활성을 갖는 단백질을 암호화하는 DNA 분획을 포함하는 식물로부터 DNA 분자를 분리시키는 방법이다.

본 발명은 또한

(a) 적합한 클로닝 벡터를 사용하여 적절한 공급원의 유기체로부터 게놈성 또는 cDNA 라이브러리를 제조하는 단계;

(b) 프로브 분자와 라이브러리를 하이브리드화시키는 단계; 및

(c) 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)에 대한 아미노산 서열에 대응하는 뉴클레오타이드 서열을 잠재적으로 함유하는 클론인 라이브러리로부터 DNA 클론에 대한 상기 프로브의 포지티브 하이브리드화를 확인하는 단계를 포함함을 특징으로하여, 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소 활성을 나타내는 단백질을 암호화하는 필수적으로 순수한 DNA 서열을 생산하는 방법을 포함한다.

본 발명은 또한

(a) 게놈성 또는 cDNA 라이브러리로부터 전체 DNA를 제조하는 단계;

(b) 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)의 아미노산 서열의 축퇴성이 낮은 부위를 나타내는 프라이머와의 PCR 반응용 주형으로서 단계 (a)의 DNA를 사용하는 단계를 포함함을 특징으로하여, 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소 활성을 나타내는 단백질을 암호화하는 필수적으로 순수한 DNA 서열을 제조하는 방법을 포함한다.

본 발명의 다른 목적은

(a) 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)의 제1 샘플과 이의 기질을 반응시키는 단계;

(b) 단계 (a)로부터 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)의 비억제 반응성을 측정하는 단계;

(c) 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)의 제1 샘플과 이의 기질을 억제제 화합물을 포함하는 제2 샘플의 존재하에서 배양시키는 단계;

(d) 단계 (c)로부터 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소의 억제된 반응성을 특징하는 단계; 및

(e) 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소의 억제된 반응성과 비억제된 반응성을 비교하는 단계를 포함함을 특징으로하여, 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소의 억제제를 확인하기위한 검정법이다.

본 발명의 다른 목적은

(a) 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소의 제1 샘플과 이의 기질을 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소 억제제를 포함하는 제2 샘플의 존재하에서 반응시키는 단계;

(b) 단계 (a)로부터 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소의 비돌연변이 반응성을 측정하는 단계;

(c) 돌연변이된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소의 제1 샘플과 이의 기질을 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소 억제제를 포함하는 제2 샘플의 존재하에서 반응시키는 단계;

(d) 단계 (c)로부터 돌연변이된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소의 돌연변이된 반응성을 측정하는 단계; 및

(e) 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소의 돌연변이 반응성과 비돌연변이 반응성을 비교하는 단계를 포함함을 특징으로하여, 억제제-내성 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 돌연변이체를 확인하기이한 검정법이다.

본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따르는 방법으로 수득한 프로토스 효소 억제제이다.

숙주 유기체 중에서 효소를 재조합적으로 제조하기 위하여, 프로토스 암호화 서열을 선택된 숙주에 대해 디자인된 발현 카세트 중으로 삽입시켜 재조합적으로 생산된 숙주 중으로 도입시킬 수 있다. 프로모터, 시그널 서열, 5' 및 3' 비해독 서열과 같은 특이적 조절 서열의 선택은 당해 분야의 숙련가의 기술 수준내에 있다. 적절한 관독 프레임에 결합된 각각의 요소를 함유하는 생성된 분자는 숙주 세포중으로 형질전환시킬 수 있는 벡터중에 삽입시킬 수 있다. 적합한 발현 벡터와 단백질의 재조합적 제조 방법은 이. 콜리(참조: Studier and Moffatt, J. Mol. Biol. 189: 113 (1986); Brosius, DNA 8: 759 (1989)), 효모(참조: Schneider and Guarente, Meth. Enzymol. 194: 373 (1991)) 및 곤충 세포(참조: Luckow and Summers, Bio/Technol. 6:47 (1988))와 같은 숙주 유기체에 대해 숙지되어 있다. 특정 예로는 p블루스크립트(Stratagene, La Jolla, CA), pFLAG(International Biotechnologies, Inc., New Haven, CT), pTrcHis(Invitrogen, La Jolla CA), 및 바콜로바이러스 발현 벡터, 예를 들면, 오토그라피카 칼리포르니카(Autographica californica) 핵 폴리헤드로시스 바이러스(AcMNPV)의 계놈으로부터 유래된 것이 있다. 바람직한 바콜로바이러스/곤충 시스템은 pVII1392/Sf21 세포(Invitrogen, La Jolla, CA)이다.

재조합적으로 생산된 진핵세포 프로토스 효소는 다양한 목적에 유용하다. 예를 들면, 이는 시험관내에서 프로토스 효소 활성을 공급하기위하여 사용될 수 있다. 이는 또한 공지된 제초제 화학물질이 프로토스를 억제하는지에 대해 측정하기 위하여 표적이 확인되어 있는 공지된 제초제 화학물질을 선별하기 위한 시험관내 검정법에 사용할 수 있다. 상기와 같은 시험관내 검정법은 또한 프로토스 활성을 억제하며 따라서 후보 제초제인 화학물질을 확인하기 위한 더욱 일반적인 선별법으로서 사용할 수 있다. 재조합식으로 생산된 진핵세포 프로토스 효소는 또한 억제제-내성 프로토스 돌연변이체를 확인하기 위한 검정법에 사용할 수 있다(참조: 국제 특허원 PCT/IB95/00452; 1995년 6월 8일자로 출원되어, 1995년 12월 21일자로 WO 95/34659로 공개되었으며, 본 명세서에서 전체적으로 참고 문헌으로 인용됨). 달리, 재조합식으로 생산된 프로토스 효소는 신규한 억제성 제초제 뿐만 아니라 효소의 제초제 내성 형태를 합리적으로 고안하기 위하여 공지된 억제제와 이의 관계를 추가로 특성화하는데 사용할 수 있다.

II. 억제제 내성 식물 프로토스 효소

다른 양태로, 본 발명은 식물 프로토포르피리노겐 옥시다제(본 발명에서는 "프로토스"로 언급함) 효소의 아미노산 서열이 상기 효소의 억제제-내성 형태를 생산하도록 만들수 있는 변형을 교시한다. 본 발명은 본 명세서에 교시된 변형을 갖는 억제제-내성 식물 프로토스 효소, 및 이들 변형된 효소를 암호화하는 DNA 분자, 및 이들 변형된 효소를 식물중에서 발현시킬 수 있는 유전자에 관한 것이다.

따라서, 본 발명은 프로토스 억제제에 대한 내성을 부여하는 특성을 갖는 아미노산 변형 중 1개 이상을 갖게 되어, 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)가 진핵세포 프로토스를 억제하는 양의 제조제에 대해 내성인, 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 분리된 DNA 분자에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "억제"는 대상 제조제의 부재하에서 관찰된 효소 활성 수준과 비교한 대상 제조제의 존재하에서 관찰된 효소 활성에서의 감소를 언급하는 것으로, 감소 % 수준은 바람직하게는 10% 이상, 더욱 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상이다.

천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 변형된 프로토스인, 밀 프로토스 효소, 대두 프로토스 효소, 면화 프로토스 효소, 사탕무 프로토스 효소, 평지 프로토스 효소, 쌀 프로토스 효소 및 사탕수수 프로토스 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 진핵세포 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 바람직하다.

서열 6의 아미노산 159에 대응하는 위치에서 시스테인이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 시스테인이 페닐알라닌 또는 리신으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하고, 시스테인이 페닐알라닌으로 대체된 것이 가장 바람직하다.

서열 6의 아미노산 419에 대응하는 위치에서 이소류신이 다른 아미노산으로 대체되어 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA가 또한 바람직하다. 상기 이소류신이 트레오닌, 히스티딘, 글리신 또는 아스파라긴으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하고, 이소류신이 트레오닌으로 대체된 것이 가장 바람직하다.

서열 6에 아미노산 164에 대응하는 위치의 알라닌이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 알라닌이 트레오닌, 류신 또는 발린으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 6의 아미노산 165에 대응하는 위치의 글리신이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 글리신이 세린 또는 류신으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 6의 아미노산 370에 대응하는 위치의 티로신이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 티로신이 이소류신 또는 메티오닌으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 10의 아미노산 356에 대응하는 위치의 발린이 다른 아미노산으로 대체되어, 상기 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 발린이 류신으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 10의 아미노산 421에 대응하는 위치의 세린이 다른 아미노산으로 대체되어 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 세린이 프롤린으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 10의 아미노산 502에 대응하는 위치의 발린이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 발린이 알라닌으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 10의 아미노산 211에 대응하는 위치의 알라닌이 다른 아미노산으로 대체되어 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제조제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 알라닌이 발린 또는 트레오닌으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 10의 아미노산 212에 대응하는 위치의 글리신이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 글리신이 세린으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 10의 아미노산 466에 대응하는 위치의 이소류신이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 이소류신이 트레오닌으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 12의 아미노산 369에 대응하는 위치의 프롤린이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 프롤린이 세린 또는 히스티딘으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 12의 아미노산 226에 대응하는 위치의 알라닌이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 알라닌인 트레오닌 또는 류신으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 12의 아미노산 517에 대응하는 위치의 발린이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 발린이 알라닌으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 12의 아미노산 432에 대응하는 위치의 티로신이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 티로신이 류신 또는 이소류신으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 16의 아미노산 365에 대응하는 위치의 프롤린이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 프롤린이 세린으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 16의 아미노산 428에 대응하는 위치의 티로신이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 티로신이 시스테인 또는 아르기닌으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 18의 아미노산 449에 대응하는 위치의 티로신이 다른 아미노산으로 대체되어, 변형된 프로토스가 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 또한 바람직하다. 상기 티로신이 시스테인, 류신, 이소류신, 발린 또는 메티오닌으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

본 발명은 또한 프로토스 억제제에 대한 내성을 부여하는 특성을 갖는 제1 아미노산 치환과 제1 아미노산 치환에 의해 부여된 상기 내성을 향상시키는 특성을 갖는 제2 아미노산 치환을 갖는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자에 관한 것이다. 식물이 옥수수, 밀, 대두, 면화, 사탕무, 평지, 쌀, 사탕수수 및 아라비도프시스로 이루어진 군으로부터 선택되는, 식물 프로토스를 암호화하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 바람직하다. 식물이 옥수수, 밀, 대두, 사탕무, 및 아라비도프시스로 이루어진 군으로부터 선택된, 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

제2 아미노산 치환이

(I) 서열 2의 아미노산 305의 세린에 대응하는 위치;

- (II) 서열 2의 아미노산 249의 트레오닌에 대응하는 위치;
- (III) 서열 2의 아미노산 118의 프롤린에 대응하는 위치;
- (IV) 서열 2의 아미노산 425의 아스파라긴에 대응하는 위치; 및
- (V) 서열 2의 아미노산 498의 티로신에 대응하는 위치로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 일어나는 DNA 분자가 바람직하다.

제1 아미노산 치환이

- (a) 서열 6의 아미노산 164의 알라닌에 대응하는 위치;
- (b) 서열 6의 아미노산 165의 글리신에 대응하는 위치;
- (c) 서열 6의 아미노산 370의 티로신에 대응하는 위치;
- (d) 서열 6의 아미노산 159의 시스테인에 대응하는 위치;
- (e) 서열 6의 아미노산 419의 이소류신에 대응하는 위치;
- (f) 서열 10의 아미노산 356의 발린에 대응하는 위치;
- (g) 서열 10의 아미노산 421의 세린에 대응하는 위치;
- (h) 서열 10의 아미노산 502의 발린에 대응하는 위치;
- (i) 서열 10의 아미노산 211의 알라닌에 대응하는 위치;
- (k) 서열 10의 아미노산 212의 글리신에 대응하는 위치;
- (l) 서열 10의 아미노산 466의 이소류신에 대응하는 위치;
- (m) 서열 12의 아미노산 369의 프롤린에 대응하는 위치;
- (n) 서열 12의 아미노산 226의 알라닌에 대응하는 위치;
- (o) 서열 12의 아미노산 432의 티로신에 대응하는 위치;
- (p) 서열 12의 아미노산 517의 발린에 대응하는 위치;
- (q) 서열 16의 아미노산 428의 티로신에 대응하는 위치;
- (r) 서열 16의 아미노산 365의 프롤린에 대응하는 위치; 및
- (s) 서열 18의 아미노산 449의 티로신에 대응하는 위치로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 일어나는 DNA 분자가 또한 바람직하다.

식물 프로토스가 서열 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20 및 22로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 특히 바람직하다. 식물 프로토스가 서열 2, 4, 6, 8, 10, 12, 및 18로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자가 가장 바람직하다.

제1 아미노산 치환이

- (a) 서열 6의 아미노산 164의 알라닌에 대응하는 위치;
- (b) 서열 6의 아미노산 165의 글리신에 대응하는 위치;
- (c) 서열 6의 아미노산 370의 티로신에 대응하는 위치;
- (d) 서열 6의 아미노산 159의 시스테인에 대응하는 위치;
- (e) 서열 6의 아미노산 419의 이소류신에 대응하는 위치로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 일어나는, DNA 분자가 더욱 바람직하다.

제2 아미노산 치환이 서열 2의 아미노산 305의 세린에 대응하는 위치에서 일어나고 제1 아미노산 치환이

- (a) 서열 6의 아미노산 164의 알라닌에 대응하는 위치;
- (b) 서열 6의 아미노산 370의 티로신에 대응하는 위치로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 일어나는, DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 2의 아미노산 305에 대응하는 위치에서 상기 세린이 류신으로 대체되는 DNA 분자가 특히 바람직하다.

제2 아미노산 치환이 서열 2의 아미노산 249의 트레오닌에 대응하는 위치에서 일어나고 제1 아미노산 치환이

- (a) 서열 6의 아미노산 164의 알라닌에 대응하는 위치; 및
- (b) 서열 6의 아미노산 370의 티로신에 대응하는 위치로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 일어나는 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 2의 아미노산 249에 대응하는 위치에서 트레오닌이 이소류신 및 알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

제2 아미노산 치환이 서열 2의 아미노산 118의 프롤린에 대응하는 위치에서 일어나고 제1 아미노산 치환이

- (a) 서열 6의 아미노산 164의 알라닌에 대응하는 위치; 및
- (b) 서열 6의 아미노산 370의 티로신에 대응하는 위치로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 일어나는 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 2의 아미노산 118에 대응하는 위치에서 프롤린이 류신으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

제2 아미노산 치환이 서열 2의 아미노산 425의 아스파라긴에 대응하는 위치에서 일어나고 제1 아미노산 치환이

- (a) 서열 6의 아미노산 164의 알라닌에 대응하는 위치; 및
- (b) 서열 6의 아미노산 370의 티로신에 대응하는 위치로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에서 일어나는 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 2의 아미노산 425에 대응하는 위치에서 아스파라긴이 세린으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

제2 아미노산 치환이 서열 2의 아미노산 498의 티로신에 대응하는 위치에서 일어나고 제1 아미노산 치환이

- (a) 서열 6의 아미노산 164의 알라닌에 대응하는 위치; 및

(b) 서열 6의 아미노산 370의 티로신에 대응하는 위치로 이루어진 군으로부터 선택되는 위치에서 일어나는 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 2의 아미노산 498에 대응하는 위치에서 티로신이 시스테인으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 6의 아미노산 370에 대응하는 위치에서 티로신이 시스테인, 이소류신, 류신, 트레오닌 및 메티오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 6의 아미노산 370에 대응하는 위치에서 티로신이 시스테인, 이소류신, 류신, 트레오닌 및 메티오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 6의 잔기 164에 대응하는 위치의 알라닌이 발린, 트레오닌, 류신, 시스테인 및 티로신으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 6의 잔기 165에 대응하는 위치의 글리신이 세린과 류신으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 6의 잔기 165에 대응하는 위치의 글리신이 세린으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 6의 잔기 159에 대응하는 위치의 시스테인이 페닐알라닌과 리신으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 6의 잔기 159에 대응하는 위치의 시스테인이 페닐알라닌으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 6의 잔기 419에 대응하는 위치의 이소류신이 트레오닌, 히드티딘, 글리신 및 아스파라긴으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 6의 잔기 419에 대응하는 위치의 이소류신이 트레오닌으로 대체된 DNA 분자가 특히 바람직하다.

서열 10의 잔기 356에 대응하는 위치의 발린이 류신으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 10의 잔기 421에 대응하는 위치의 세린이 프롤린으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 10의 잔기 502에 대응하는 위치의 발린이 알라닌으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 10의 잔기 466에 대응하는 위치의 이소류신이 트레오닌으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 10의 잔기 212에 대응하는 위치의 글리신이 세린으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 10의 잔기 211에 대응하는 위치의 알라닌이 발린 또는 트레오닌으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 12의 잔기 369에 대응하는 위치의 프롤린이 세린 또는 히스티딘으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 12의 잔기 226에 대응하는 위치의 알라닌이 류신 또는 트레오닌으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 12의 잔기 432에 대응하는 위치의 티로신이 류신 또는 이소류신으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 12의 잔기 517에 대응하는 위치의 발린이 알라닌으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 16의 잔기 428에 대응하는 위치의 티로신이 시스테인 또는 아르기닌으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 16의 잔기 365에 대응하는 위치의 프롤린이 세린으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

서열 18의 잔기 449에 대응하는 위치의 프롤린이 류신, 이소류신, 발린 및 메티오닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산으로 대체된 DNA 분자가 더욱 바람직하다.

본 발명은 필수적으로 프로모터, 특히 본 발명에 따르는 진핵 세포 유기체 기원의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 DNA 분자에 기능적으로 결합되어 있는, 식물중에서 활성인 프로모터를 포함하는 발현 카세트 및 상기 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다. 본 발명에 따르는 발현 카세트는 엽록체 또는 미토콘드리아중으로 DNA 분자에 의해 암호화된 단백질을 표적화시킬 수 있는, DNA 분자에 기능적으로 결합된 시그널 서열을 추가로 포함할 수 있다.

본 발명은 필수적으로 프로모터, 특히 본 발명에 따르는 진핵세포 유기체로부터 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 이중성 DNA 분자에 기능적으로 결합된, 식물중에서 활성인 프로모터를 함유하는 발현 카세트를 포함함을 특징으로하는 키메릭 유전자에 관한 것이다. DNA 분자가 아라비도프시스, 슈가 케인, 대두, 보리, 면화, 담배, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수, 호밀, 옌트, 잔디 및 목초, 수수, 마초 및 쌀로 이루어진 군으로부터 선택된 식물로부터의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 키메릭 유전자가 바람직하다. DNA 분자가 대두, 면화, 담배, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수, 호밀, 옌트, 잔디 및 쌀로 이루어진 군으로부터 선택된 식물로부터의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 키메릭 유전자가 더욱 바람직하다. DNA 분자가 밀, 대두, 면화, 사탕무, 평지, 쌀 및 사탕수수로 이루어진 군으로부터 선택된 식물로부터의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다. DNA 분자가 대두, 사탕무, 및 밀로 이루어진 군으로부터 선택된 식물로부터의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스) 효소를 암호화하는 키메릭 유전자가 가장 바람직하다.

서열 10에 나타난 서열을 포함하는 밀 프로톡스, 서열 12로 나타난 서열을 포함하는 대두 프로톡스, 서열 16으로 나타난 서열을 포함하는 면화 프로톡스, 서열 18로 나타난 서열을 포함하는 사탕무 프로톡스, 서열 20으로 나타난 서열을 포함하는 평지 프로톡스, 서열 22로 나타난 서열을 포함하는 쌀 프로톡스 및 서열 24로 나타난 서열을 포함하는 사탕수수 프로톡스로 이루어진 군으로부터 선택된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스)를 암호화하는 이중성 DNA 분자에 기능적으로 결합된, 식물중에서 활성인 프로모터를 포함하는 키메릭 유전자가 더욱 바람직하다. 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로톡스)가 서열 10으로 나타난 서열을 포함하는 밀 프로톡스, 서열 12로 나타난 서열을 포함하는 대두 프로톡스, 및 서열 18로 나타난 서열을 포함하는 사탕무 프로톡스로 이루어진 군으로부터 선택된 키메릭 유전자가 더욱 바람직하다.

본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "프로톡스-1"은 엽록체 프로톡스를 언급하는 반면, "프로톡스-2"는 미토콘드리아 프로톡스를 언급하는 것이다.

DNA 분자가 프로톡스-1 활성 또는 프로톡스-2 활성을 갖는 아라비도프시스종으로부터의 단백질을 암호화하며, 바람직하게는 상기 단백질이 서열 2 또는 서열 4로 나타난 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

DNA 분자가 프로톡스-1 활성 또는 프로톡스-2 활성을 갖는 옥수수로부터의 단백질을 암호화하며, 바람직하게는 상기 단백질이 서열 6 또는 서열 8로 나타난 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

DNA 분자가 프로톡스-1 활성을 갖는 밀로부터의 단백질을 암호화하며, 바람직하게는 상기 단백질이 서열 10으로 나타난 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

DNA 분자가 프로톡스-1 활성을 갖는 대두로부터의 단백질을 암호화하며, 바람직하게는 상기 단백질이 서열 12로 나타난 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

DNA 분자가 프로톡스-1 활성을 갖는 면화로부터의 단백질을 암호화하며, 바람직하게는 상기 단백질이 서열 16으로 나타난 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

DNA 분자가 프로톡스-1 활성을 갖는 사탕무로부터의 단백질을 암호화하며, 바람직하게는 상기 단백질이 서열 18로 나타난 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

DNA 분자가 프로톡스-1 활성을 갖는 평지로부터의 단백질을 암호화하며, 바람직하게는 상기 단백질이 서열 20으로 나타난 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

DNA 분자가 프로토스-1 활성을 갖는 쌀로부터의 단백질을 암호화하며, 바람직하게는 상기 단백질이 서열 22로 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

DNA 분자가 프로토스-1 활성을 갖는 사탕수수로부터의 단백질을 암호화하며, 바람직하게는 상기 단백질이 서열 24로 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

본 발명은 또한 프로모터, 특히 비변형 효소를 억제하는 수준의 제초제에 대해 내성인, 본 발명에 따르는 진핵세포 유기체로부터의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자에 기능적으로 결합된, 식물중에서 활성인 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함함을 특징으로하는 키메릭 유전자를 구체화한다. DNA 분자가 아라비도프시스, 슈가 케인, 대두, 보리, 면화, 담배, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수, 호밀, 옌트, 잔디 및 목초, 수수, 마초 및 쌀로 이루어진 군으로부터 선택된 식물로부터의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소를 암호화하는 키메릭 유전자가 바람직하다. DNA 분자가 대두, 면화, 담배, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수, 호밀, 옌트, 잔디 및 쌀로 이루어진 군으로부터 선택된 식물로부터의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소를 암호화하는 키메릭 유전자가 더욱 바람직하다. DNA 분자가 아라비도프시스, 대두, 면화, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수 및 쌀로 이루어진 군으로부터 선택된 식물로부터의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소를 암호화하는 키메릭 유전자가 특히 바람직하다.

프로토스 억제제에 대한 내성을 부여하는 특성을 갖는 아미노산 변형을 1개 이상 갖는 진핵세포 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자에 기능적으로 결합된 식물중에서 활성인 프로모터를 포함하는 키메릭 유전자가 본 발명에 포함된다.

또한, 프로토스 억제제에 대한 내성을 부여하는 특성을 갖는 제1 아미노산 치환; 및 상기 제1 아미노산 치환에 의해 부여된 내성을 향상시키는 특성을 갖는 제2 아미노산 치환을 갖는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자에 기능적으로 결합된 식물중에서 활성인 프로모터를 포함하는 키메릭 유전자가 본 발명에 포함된다. 엽록체 또는 미토콘드리아중으로 상기 DNA 분자에 의해 암호화된 단백질을 표적화시킬 수 있는, DNA 분자에 기능적으로 결합되어 있는 시그널 서열을 추가로 포함하는 키메릭 유전자가 바람직하다.

본 발명에 따르는 키메릭 유전자는 또한 엽록체중으로 상기 DNA 분자에 의해 암호화된 단백질을 표적화시킬 수 있는, 상기 DNA 분자에 기능적으로 결합된 시그널 서열을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에 따르는 키메릭 유전자는 또한 미토콘드리아중으로 상기 DNA 분자에 의해 암호화된 단백질을 표적화시킬 수 있는, DNA 분자에 기능적으로 결합된 시그널 서열을 추가로 포함할 수 있다.

숙주 계놈중으로 안정하게 통합되는, 본 명세서에서 상기 언급한 DNA 서열이 또한 본 발명에 포함된다.

본 발명은 또한 식물 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 또는 이들의 기능적 등가 유도체를 포함하는 재조합 DNA 분자에 관한 것이다.

본 발명은 또한 상기 재조합 DNA 분자를 포함하는 재조합 DNA 벡터에 관한 것이다.

본 발명의 다른 목적은 숙주 세포를 안정하게 형질전환시킬 수 있는, 본 발명에 따르는 키메릭 유전자를 포함하는 재조합 벡터이다.

본 발명의 다른 목적은 식물, 식물 종자, 식물 조직 또는 식물 세포를 안정하게 형질전환시킬 수 있는, 본 발명에 따르는 키메릭 유전자를 포함하는 재조합 벡터이다. 상기 벡터가 식물을 안정하게 형질전환시킬 수 있는, 본 발명에 따르는 키메릭 유전자를 포함하는 재조합 벡터가 바람직하다. 상기 벡터로 안정하게 형질전환시킨 식물, 식물 종자, 식물 조직 또는 식물 세포는 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자를 발현시킬 수 있다. 상기 벡터로 안정하게 형질전환시킨 식물, 식물 종자, 식물 조직 또는 식물 세포가 비변형 효소를 억제하는 수준의 제초제에 대해 내성인 식물로부터의 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자를 발현시킬 수 있는 재조합 벡터가 바람직하다.

서열 10으로 나타낸 서열을 포함하는 밀 프로토스, 서열 12로 나타낸 서열을 포함하는 대두 프로토스, 서열 16으로 나타낸 서열을 포함하는 면화 프로토스, 서열 18로 나타낸 서열을 포함하는 사탕무 프로토스, 서열 20으로 나타낸 서열을 포함하는 평지 프로토스, 서열 22로 나타낸 서열을 포함하는 쌀 프로토스 및 서열 24로 나타낸 서열을 포함하는 사탕수수 프로토스

스로 이루어진 군으로부터 선택된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 이중성 DNA 분자에 기능적으로 결합되어 있는, 식물중에서 활성인 프로모터를 포함하는 키메릭 유전자를 포함하며, 숙주 세포를 안정하게 형질전환시킬 수 있는 재조합 벡터가 바람직하다.

프로토스 억제제에 대한 내성을 부여하는 특성을 갖는 제1 아미노산 치환; 및 상기 제1 아미노산 치환에 의해 부여된 상기 내성을 향상시키는 특성을 갖는 제2 아미노산 치환을 갖는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 DNA 분자에 기능적으로 결합되어 있는, 식물중에서 활성인 프로모터를 포함하는 키메릭 유전자를 포함하며, 식물 세포를 안정하게 형질전환시킬 수 있는 재조합 벡터가 또한 바람직하다.

본 발명에 따르는 벡터로 안정하게 형질전환시킨, DNA 분자를 발현시킬 수 있는 숙주 세포가 또한 본 발명에 포함된다. 식물 세포, 세균 세포, 효모 세포, 및 곤충 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 숙주 세포가 바람직하다.

본 발명은 또한 식물 및 이들의 자손, 식물 조직 및 식물 종자중의 천연 프로토스 활성을 억제하는 제초제에 대해 내성이며, 내성이 본 발명에 교시된 바와 같은 변형된 억제제-내성 프로토스 효소를 발현시키는 유전자에 의해 부여되는 이들 식물에 관한 것이다. 대표적인 식물로는 통상의 목적으로 제초제가 살포될 수 있는 식물이 있다. 농업적으로 중요한 작물, 즉, 아라비도프시스, 슈가 케인, 대두, 보리, 면화, 담배, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수, 호밀, 오토, 잔디 및 목초, 수수, 마초 및 쌀 등과 같은 속씨식물 및 겉씨식물이 바람직하다. 농업적으로 중요한 작물, 즉, 아라비도프시스, 면화, 대두, 평지, 사탕무, 옥수수, 쌀, 밀, 보리, 오토, 호밀, 사탕수수, 수수, 잔디, 마초, 목초와 같은 속씨식물 및 겉씨식물이 더욱 바람직하다. 농업적으로 중요한 작물, 즉, 아라비도프시스, 대두, 면화, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수, 및 쌀과 같은 속씨식물 및 겉씨식물이 특히 바람직하다.

프로토스 억제제에 대한 내성을 부여하는 특성을 갖는 제1 아미노산 치환; 및 상기 제1 아미노산 치환에 의해 부여된 내성을 향상시키는 특성을 갖는 제2 아미노산 치환을 갖는 식물 프로토스를 포함하는 변형된 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하며, 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대해 내성이 있는 식물에서 발현되고 상기 식물에 상기 내성을 부여하는 DNA 분자를 포함하는 식물이 바람직하다. DNA 분자가 대응하는 천연 프로토스 암호화 서열을 대체하는 식물이 바람직하다. 식물에 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대한 내성을 부여하는, 본 발명에 따르는 키메릭 유전자를 포함하는 식물 및 이들의 자손이 본 발명에 포함된다.

본 발명에 따르는 키메릭 유전자 1개 이상으로 안정하게 형질전환시킨, 식물 및 이들의 자손, 종자, 및 배양 조직을 포함한, 형질전환된 식물 조직이 본 발명에 포함된다. 필수적으로 프로모터, 특히 식물 조직 중에서 비변형 효소를 억제하는 수준의 제초제에 대해 내성이 있는 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 효소를 암호화하는 DNA 분자에 기능적으로 결합되어 있는, 식물중에서 활성인 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 키메릭 유전자 1개 이상으로 안정하게 형질전환시킨, 식물, 종자, 및 배양 조직을 포함한, 형질전환된 식물 조직이 바람직하다.

본 발명의 재조합 DNA 분자는 수많은 당해 분야의 숙지된 방법으로 식물 세포중으로 도입시킬 수 있다. 당해 분야의 숙련자들은 방법이 식물의 타입, 즉, 형질전환용으로 표적화된 단자엽 또는 쌍자엽 식물에 따라 선택될 수 있는 것임을 자명하게 알것이다. 식물 세포를 형질전환시키는 적합한 방법으로는 미세주입법(microinjection; Crossway et al., BioTechniques 4:320-334 (1986)), 전기천공(electroporation; Riggs et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5602-5606 (1986)), 아그로박테리움 매개된 형질전환법(Hinchee et al., Biotechnology 5:915-921 (1988)), 직접적인 유전자 전달법(Paszkowski et al., EMBO J. 3:2717-2722 (1984)), Agracetus, Inc., Madison, Wisconsin and Dupont, Inc., Wilmington, Delaware로부터 입수가 가능한 장치를 사용하는 충격 입자 가속화법(참조: 예를 들면, Sanford et al., 미국 특허 제4,945,050호; 및 McCabe et al., Biotechnology 6:923-926 (1988)), 및 원형질체 형질전환/재생법(참조: 미국 특허 제5,350,689호; Ciba-Geigy Corp.에 1994년 9월 27일자로 허여)이 있다. 또한 다음 문헌을 참고한다: Weissinger et al., Annual Rev. Genet. 22:421-477 (1988); Sanford et al., Particulate Science and Technology 5:27-37 (1987) (양파); Christou et al., Plant Physiol. 87:671-674 (1988) (대두); McCabe et al., Bio/Technology 6:923-926 (1988) (대두); Datta et al., Bio/Technology 8:736-740 (1990) (쌀); Klein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:4305-4309 (1988) (옥수수); Klein et al., Bio/Technology 6:559-563 (1988) (옥수수); Klein et al., Plant Physiol. 91:440-444 (1988) (옥수수); Fromm et al., Bio/Technology 8:833-839 (1990); 및 Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2:603-618 (1990) (옥수수).

형질전환된 식물, 특히 상기 방법으로 형질전환시킨 형질전환된 번식가능 식물 및 이들의 무성 및(또는) 유성 자손으로, 식물중의 천연 프로토스 활성에 대해 통상적으로 억제 수준의 제초제에 의한 억제에 대해 내성이거나 적어도 내성이 있는 형질전환된 번식가능 식물 및 이들의 무성 및(또는) 유성 자손이 본 발명의 범주내에 포함된다. 자손 식물로는 또한 역교잡

프로그램으로부터 발생되고 본 발명에 따르는 제초제 내성을 이들의 계놈중에 포함하는, 부모 식물과는 상이한 유전자 배경을 갖는 식물이 있다. 식물중의 천연 프로토스 활성화에 대해 통상적으로 억제 수준의 제초제에 의한 억제에 내성이거나 적어도 내성이 있는 하이브리드 식물이 특히 바람직하다.

본 발명에 따르는 형질전환된 식물은 쌍자엽 또는 단자엽 식물일 수 있다. *Lolium*, *Zea*, *Triticum*, *Triticale*, *Sorghum*, *Saccharum*, *Bromus*, *Oryzae*, *Avena*, *Hordeum*, *Secale* 및 *Setaria* 식물을 포함한 그라미나세아에(*Graminaceae*)과의 단자엽 식물이 바람직하다. 형질전환된 옥수수, 밀, 보리, 사탕수수, 호밀, 오토, 잔디 및 목초, 수수 및 쌀이 더욱 바람직하다. 옥수수, 밀, 사탕수수, 호밀, 오토, 잔디 및 쌀이 특히 바람직하다.

쌍자엽 식물중에서 아미비도프시스, 대두, 면화, 사탕무, 슈가 케인, 유종자 평지, 담배 및 해바라기가 본 발명에서 더욱 바람직하다. 대두, 면화, 담배, 사탕무 및 유종자 평지가 특히 바람직하다.

표현 "자손"이란 형질전환된 식물의 "무성적으로" 및 "유성적으로" 발생된 자손을 둘다 포함하는 것으로 이해된다. 이 정의는 또한 예를 들어, 세포 융합법 또는 돌연변이 선택법과 같은, 공지된 방법으로 수득할 수 있으며 형질전환된 식물의 모든 교배 및 융합 생성물과 함께, 초기 형질전환된 식물의 특성을 나타내는 모든 돌연변이체 및 변이체를 포함함을 의미한다. 이는 또한 자손 식물이 본 발명에 따르는 제초제 내성을 함유하는한, 역교배 프로그램으로부터 발생된 자손 식물을 포함한다.

본 발명의 다른 목적은 형질전환된 식물의 증식 물질에 관한 것이다. 형질전환된 식물의 증식 물질이란 생체내 또는 시험관내에서 유성적 또는 무성적으로 번식시킬 수 있는 식물 물질로서 본 발명에 대해 정의된다. 원형질체, 세포, 칼리(calli), 조직, 기관, 종자, 배, 화분, 난세포, 접합체가 형질전환된 식물로부터 수득한 다른 번식 물질과 함께 본 발명의 범주내에서 특히 바람직하다.

예를 들어, 본 발명의 방법으로 미리 형질전환시킨 형질전환된 식물 또는 이들의 자손으로부터 기원하며 따라서 형질전환된 세포의 적어도 일부로 이루어진 꽃, 줄기, 과실, 잎, 뿌리와 같은 식물의 일부가 또한 본 발명의 목적이다.

본 발명의 다른 목적은 본 발명에 따르는 DNA로 식물, 식물 일부를 형질전환시킴으로써 식물 프로토스 효소의 억제제 내성 형태가 생산되는, 본 발명의 방법으로 미리 형질전환시킨 형질전환된 식물 또는 이들의 자손으로부터 기원하는 예를 들어 꽃, 줄기, 과실, 잎, 뿌리와 같은, 다른 번식 물질인 식물의 일부와 함께, 세포, 칼리(calli), 조직, 기관, 종자, 배, 화분, 난세포, 접합체를 생산하는 방법이다. 식물 세포를 본 발명에 따르는 재조합 벡터 분자로 형질전환시킴을 특징으로하여, 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 활성을 갖는 진핵세포의 단백질을 암호화하는 분리된 DNA 분자를 포함하는 숙주 세포를 생산하는 방법이 바람직하다. 식물 세포를 본 발명에 따르는 재조합 벡터 분자로 형질전환시킴을 특징으로하여 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 활성을 갖는 진핵세포로부터의 단백질을 암호화하는 분리된 DNA 분자를 포함하는 식물 세포를 생산하는 방법도 또한 바람직하다. 모 식물을 본 발명에 따르는 재조합 벡터 분자로 형질전환시키고 공지된 식물 육종 기술로 상기 형질전환된 모 식물의 자손에게 제초제 내성을 전이시킴을 특징으로하여, 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스) 활성을 갖는 진핵세포로부터의 단백질을 암호화하는 분리된 DNA 분자를 포함하는 형질전환된 모 식물의 형질전환된 자손을 생산하는 방법이 바람직하다.

내성 프로토스 효소를 암호화하는 구조 유전자로 안정하게 형질전환시킨, 식물 프로토스 효소의 억제제-내성 형태를 생산하는, 식물, 식물 조직, 식물 종자 및 식물 일부의 생산 방법이 바람직하다. 본 발명에 따르는 DNA로 안정하게 형질전환시킨 식물, 식물 조직, 식물 종자 및 식물 일부를 생산하는 방법이 특히 바람직하다. 제초제 내성주를 분리시켜, 특성화한 다음 발달시키는 직접적인 선택방법으로 제조된, 식물 프로토스 효소의 억제제-내성 형태를 생산하는 식물, 식물 조직, 식물 종자 및 식물 일부를 생산하는 방법이 특히 바람직하다.

상기한 형질전환된 종자 및 식물 중으로 유전자 조작된 유전적 특성은 유성적 번식 또는 영양 성장을 거쳐 자손 식물에서 유지되어 보급될 수 있다. 일반적으로 상기 유지 및 번식은 킬링(tilling), 소잉(sowing) 또는 하베스팅(harvesting)과 같은 특정 목적에 맞게 개발된 공지된 농업적 방법을 사용할 수 있도록 한다. 수경법 또는 온실 기술과 같이 특정화된 방법을 또한 사용할 수 있다. 성장하는 작물은 곤충 또는 감염 뿐만 아니라 잡초 식물과에 경쟁으로부터 발생하는 공격 및 손상에 취약하기 때문에, 잡초, 식물 질병, 곤충, 노마토드(nematodes), 및 기타 부정적 조건을 방제하기 위한 방법을 수행하여 수율을 향상시킨다. 이들로는 토양 경작 또는 잡초 제거 및 감염된 식물의 제거와 같은 기계적 방법 뿐만 아니라 제초제, 진균제, 가메토사이드(gametocides), 성장 조절단, 숙성제 및 살충제와 같은 농업용 화학제의 사용이 있다.

본 발명에 따르는 형질전환된 식물 및 종자의 유리한 유전적 특성은 또한 해충의 내성, 제초제 내성, 또는 스트레스 내성, 개선된 영양가, 증가된 수율, 또는 룯징(lodging) 또는 쉐터링(shattering)으로부터의 소실량을 작게하는 개선된 구조와 같

은 개선된 특성을 갖는 식물을 개발하기 위한 목적의 식물 품종 변형에 사용될 수 있다. 여러가지 품종변형 단계가 교배시킬 식물주의 선택, 모주의 직접적인 수분, 또는 적합한 자손 식물의 선택과 같은 정의된 사람의 의도에 따라 특성화되어 있다. 목적에 따라 상이한 품종 변형법을 채택한다. 관련 기술은 당해 분야에 숙지되어 있으며 비제한적으로 하이브리드화, 내부적 품종변형, 역교배 품종변형, 다중주 품종변형, 품종 배합, 내부특이적 하이브리드화, 이수체 기술 등이 있다. 하이브리드화 기술로는 또한 기계적, 화학적 또는 생화학적 방법으로 웅성 또는 자성 단종 식물을 수득하기 위한 식물 하이브리드화 기술이 있다. 웅성 단종 식물을 다른 식물주의 화분으로 역수분시킴으로써 웅성 단종이지만 자성 번식 식물의 계능은 모 식물주 둘다의 특성을 균일하게 수득할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르는 형질전환된 종자 및 식물이 예를 들면 제초제 또는 살충제 처리와 같은 통상의 방법의 효과를 증가시키거나 이들의 개선된 유전적 특성으로 인하여 상기 방법이 불필요하도록 하는 변형된 식물주의 품종변형을 위하여 사용될 수 있다. 달리 스트레스 내성이 개선된 작물은 이들의 최적화된 유전적 "장치"에 기인하여, 필적하는 부정적 성장 조건을 견딜 수 없는 생성물 보다 더 좋은 품질의 생성물을 수확할 수 있다.

종자에 있어서, 종자의 발아 품질 및 균일성이 필수적인 생성물 특성인 반면, 농부에 의해 생산되어 판매되는 종자의 발아 품질과 균일성이 중요한 것은 아니다. 다른 작물과 잡초 종자로부터 작물의 보호, 종자가 갖고있는 질병의 방제, 및 발아가 우수한 종자의 생산이 어렵기 때문에, 순수한 종자의 성장, 정련 및 시판 분야의 숙련자인 종자 생산자들은 종자 생산법을 개발하였다. 따라서, 농부가 직접 수확한 작물로부터의 종자를 사용하는 대신 특정 품질 기준을 만족시키는 검증된 종자를 구입하는 것이 농부들에게는 통상의 관행이다. 종자로서 사용될 번식 물질은 통상적으로 제초제, 살충제, 진균제, 살균제, 살선충제, 살연체동물제 또는 이들의 혼합물을 포함하는 보호성 피복제로 처리한다. 통상적으로 사용되는 보호성 피복제는 갑탄, 카르복신, 티람("TMTD: 등록상표"), 메탈락실(Apron: 등록상표), 및 피리미포스-메틸(Actellic: 등록상표)를 포함한다. 경우에 따라 이들 화합물을 다른 담체, 계면활성제 또는 제형 기술에서 통상적으로 사용되는 도포-증진 애주번트와 함께 제형화하여 세균, 진균 또는 동물 해충에 의한 손상으로부터 보호한다. 보호성 피복제는 액체 제형을 사용한 번식 물질의 함침법 또는 혼합한 습식 또는 건식 제형을 사용한 피복법으로 도포할 수 있다. 눈 또는 과실에 직접적으로 처리하는 것과 같은 다른 적용 방법이 또한 가능하다.

따라서, 본 발명의 다른 목적은 경작된 식물용 식물 번식 물질, 특히 종자 처리에서 통상적으로 사용되는 종자 보호성 피복물로 처리한 식물 종자를 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 양태는 본 발명에 따르는 형질전환된 식물, 형질전환된 식물질, 또는 형질전환된 종자를 사용함을 특징으로 하는, 상기 예시된 바와 같은 방법과 같은 신규한 농업 방법을 제공하는 것이다. 제초제에 대한 내성을 부여하기 위하여 식물중에서 제초제 내성 형태의 제초제 표적 단백질을 발현시키기에 충분한 양으로 본 발명에 따르는 키메릭 유전자를 포함하는 형질전환된 식물 또는 이들의 자손을 사용하는 농업 방법이 본 발명에 포함된다. 본 발명에 따라서 형질전환된 식물로부터의 자손을 육종하기 위하여, 다음과 같은 방법을 사용할 수 있다: 하기 실시예에 기술된 바와 같이 생산된 옥수수 식물을 온실 또는 토양의 포트 중에서 당해 분야에 공지된 바와 같이 성장시켜, 개화시킨다. 성숙한 옥수수 수염으로부터 화분을 수득하여 동일한 식물의 이삭, 자매 식물, 또는 목적하는 옥수수 식물을 수분시키는데 사용한다. 유사하게, 형질전환된 식물 상에서 발달하는 이삭을 동일 식물, 자매 식물, 또는 바람직한 옥수수 식물로부터 수득한 화분으로 수분시킬 수 있다. 상기 방법으로 수득한 형질전환된 자손은 도입된 유전자(들) 및(또는) 첨부되는 DNA(유전형)의 존재, 또는 부여된 표현형에 의해 비-형질전환 자손과 구별될 수 있다. 형질전환된 자손은 목적하는 특성을 갖는 식물에 대해 통상적으로 수행되는 바와 유사하게 자가적으로 또는 다른 식물과 교배시킬 수 있다. 유사하게, 상기 방법으로 생산된 담배 또는 다른 형질전환 식물은 목적하는 특성을 갖는 자손을 생산하기 위하여 당해 분야에 공지된 바와 같이 자가적으로 또는 교배시킬 수 있다. 유사하게, 당해 분야 및 본 발명에 공지된 방법을 혼합하여 생산된 다른 형질전환된 유기체는 목적하는 특성을 갖는 자손을 생산하기 위하여 당해 분야에 공지된 바와 같이 재배할 수 있다.

본 발명의 변형된 억제제-내성 프로토스 효소는 이들의 천연 대응체(즉, 재조합 DNA 방법을 통하거나 또는 선택적인 품종변형을 통한 간접적인 방법으로 사람에 의해 조작되지 않은 식물에 천연적으로 존재하는 억제제-내성 형태)와 비교하여 아미노산 치환, 첨가 또는 결실을 1개 이상 갖는다. 프로토스 효소의 억제제-내성 형태를 수득하거나, 억제제 내성을 향상시키기 위하여 변형시킬 수 있는 아미노산 위치를 아라비도프시스, 옥수수, 대두, 면화, 사탕무, 평지, 쌀, 사탕수수 및 밀로부터의 식물 프로토스-1 서열표로 표 1에 진한 글씨로 표시하였다. 당해 분야의 숙련가들은 본 발명에 나타난 프로토스 효소 서열과 충분히 유사한 구조를 갖는 식물 프로토스 유전자가 본 발명에 따라서 변형된 것의 아미노산 배열과 대등하게 변화시키고 확인하여 효소의 억제제-내성 형태를 발생시킬 수 있음이 자명할 것이다. 상기과 같은 추가의 식물 프로토스 유전자는 국제 특허된 PCT/IB95/00452 (1995년 6월 8일자로 출원되어, 1995년 12월 21일자로 WO95/34659로 공개)에 기술된 바와 같은 표준 기술을 사용하여 수득할 수 있으며, 상기 문헌은 본 발명에서 참고문헌으로 인용된다.

본 발명에서 교시된 제초제 내성 프로토스 암호화 서열을 암호화하는 DNA 분자는 경작 식물에서 최적으로 발현되도록 유전공학적으로 조작할 수 있다. 이는 대상이 되는 경작식물종 중에서 최적으로 발현되도록 하기 위하여 내성 대립유전자의

암호화 서열을 변화시키는 것을 포함할 수 있다. 특정 경작 식물종에서의 최적 발현을 수행하기 위한 암호화 서열 변형 방법은 숙지되어 있다(참조: Perlak et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3324 (1991); Koziel et al., Bio/Technol. 11:194 (1993)).

최적 발현을 위하여 프로토스 암호화 서열을 유전공학적으로 조작하는 것은 또한 적합한 조절 서열(즉, 프로모터, 시그널 서열, 전사 종결인자)을 기능적으로 연결하는 단계를 포함할 수 있다. 식물 또는 식물 세포종에서 작용할 수 있는 프로모터(즉, 식물 세포종의 프로토스와 같은 관련된 구조 유전자의 발현을 유도할 수 있는 것)의 예로는 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 19S 또는 35S 프로모터 및 CaMV 이중 프로모터; 노팔린 신타제 프로모터; 병원론-관련(PR) 단백질 프로모터; 리블로스 비스포스페이트 카복실라제의 소형 서브유닛(ssuRUBISCO) 프로모터, EPA 0 559 603에 대한 참고로 브라시카로부터의 열 쇼크 단백질 프로모터(hsp90 프로모터), 아라비도프시스 액틴 프로모터 및 WO 95/14098을 참고로 한 SuperMas 프로모터 등이 있다. 바람직한 프로모터는 높은 수준의 지속적 발현을 부여하는 것이고, 더욱 바람직한 것은 제초제에 의한 손상에 감응성인 조직중에서 높은 특이적 발현을 부여하는 것이다. 바람직한 프로모터는 쌀 액틴 프로모터(McElroy et al., Mol. Gen. Genet. 231:150 (1991)), 옥수수 유비퀴틴 프로모터(EP 0 342 926; Taylor et al., Plant Cell Rep. 12: 491 (1993)), 및 담배, 아라비도프시스, 또는 옥수수로부터의 PR-1 프로모터(참고: 미국 특허원 EP-332 104 및 08/181,271; Ryals et al., 본 명세서에서 전체적으로 참고문헌으로 인용됨)이다. 당해 분야에 공지된 방법에 따라서 프로모터 자체를 변형하여 프로토스 발현이 증가 되도록 프로모터 강도를 조작할 수 있다.

본 발명자들은 또한 억제제-내성 프로토스 암호화 서열을 갖는, 사용하기 위한 다른 바람직한 프로모터가 천연 프로토스 유전자와 관련있는 프로모터(즉, 프로토스 프로모터; 참조: 본원과 동일자로 동일인에 의해 출원되어 계류중인, "Promoter from Protoporphyrinogen Oxidase (Genes)" 제목의 도켓 번호 PH/5-20765/P1/CGC1846)임을 발견하였다. 아라비도프시스 프로토스-1 유전자로부터의 프로모터 서열은 서열 13에 나타나 있으며, 옥수수 프로토스-1 유전자로부터의 프로모터 서열은 서열 14에, 사탕무 프로토스-1 유전자로부터의 프로모터 서열은 서열 26에 나타나 있다.

프로토스 프로모터 자체가 억제제-내성 프로토스 암호화 서열의 발현에 적합하기 때문에, 본 명세서에 교시된 변형을 이중성 조절 서열을 갖는 키메릭 유전자를 작제할 필요 없이 식물 세포 계층에 존재하는 천연 프로토스 유전자에 직접 수행할 수 있다. 상기와 같은 변형은 동종성 재조합과 같은 지시된 돌연변이 기술을 통하여 수행되어 생성된 제초제-내성 표현형을 기준으로하여 선택할 수 있다(참조: 실시예 10, Pazkowski et al., EMBO J. 7: 4021-4026 (1988), 미국 특허 제 5,487,992호, 특히 컬럼 18-19 및 실시예 8). 상기 방법의 추가적인 잇점은 천연 프로토스 프로모터를 함유하는 것 외에, 생성된 변형 유전자가 또한 천연 유전자의 일부인 시그널 또는 운반 펩티드 암호화 서열과 같은 다른 조절 인자를 포함하는 것이다.

시그널 또는 운반 펩티드를 본 발명의 키메릭 DNA 작제물중의 프로토스 암호화 서열에 융합시켜 발현된 프로토스 효소가 목적하는 작용 부위로 운반되도록 지시할 수 있다. 시그널 펩티드의 예로는 식물 병원론-관련 단백질, 예를 들면, PR-1, PR-2 등에 천연적으로 결합된 것들이 있다(참조: Payne et al., Plant Mol. Biol. 11:89-94 (1988)). 운반 펩티드의 예로는 문헌: Von Heijne et al., Plant Mol. Biol. Rep. 9:104-126 (1991); Mazur et al., Plant Physiol. 85:1110 (1987); Vorst et al., Gene 65:59 (1988)에 기술된 바와 같은 엽록체 운반 펩티드, 및 문헌: Boutry et al., Nature 328:340-342 (1987)에 기술된 바와 같은 미토콘드리아 운반 펩티드가 있다. 엽록체 및 미토콘드리아 운반 펩티드가 미토콘드리아와 엽록체내에서 프로토스 효소 활성이 전형적으로 일어나기 때문에 본 발명에 특히 유용할 것으로 생각된다. 엽록체에서의 프로토스 효소 활성의 억제가 주로 프로토스-억제 제초제의 작용을 기준으로하는 것으로 판단되기 때문에 엽록체 운반 펩티드가 사용하기에 가장 바람직하다(Witkowski and Halling, Plant Physiol. 87:632 (1988); Lehnen et al., Pestic. Biochem. Physiol. 37:239 (1990); Duke et al., Weed Sci. 39: 465 (1991)). 액포와 같은 여러가지 세포 구획으로 암호화된 단백질을 편재시키는 서열이 또한 포함된다(참조: Neuhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10362-10366 (1991) 및 Chrispeels, Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 42: 21-53 (1991)). 이들 공보의 관련 기술은 본 명세서에서 전체적으로 참고문헌으로 인용된다.

본 발명의 키메릭 DNA 작제물(들)은 다중 카피수의 프로모터 또는 다중 카피수의 프로토스 구조 유전자를 함유할 수 있다. 또한, 본 작제물(들)은 마커에 대한 암호화 서열 및 시그널 또는 운반 펩티드와 같은 다른 펩티드에 대한 암호화 서열을 포함할 수 있으며, 이들 각각은 DNA 분자중의 다른 기능 인자와 함께 적합한 판독 프레임에 존재한다. 상기와 같은 작제물의 제조는 당해 분야의 숙련가의 통상적인 수준내에 있다.

유용한 마커로는 예를 들어, 하이그로마이신, 가나마이신, G418, 젠타마이신, 링코마이신, 메토평렉세이트, 클리포세이트, 포스포노트리신 등에 대한 내성과 같은 제초제, 항생제 또는 약물 내성을 제공하는 펩티드가 있다. 이들 마커를 사용하여

비형질전환 세포로부터 본 발명의 키메릭 DNA 작제물로 형질전환시킨 세포를 선별할 수 있다. 다른 유용한 마커는 가시적 반응, 예를 들어 색 반응으로 용이하게 검출할 수 있는 펩티드성 효소, 예로는 루시페라제, β -글루쿠로니다제, 또는 β -갈락토시다제가 있다.

선택적인 잇점을 형질전환 세포에 제공함으로써 목적하는 뉴클레오티드 서열을 혼입시킬 수 있는 유전적으로 형질전환시킨 세포의 포지티브 선택법은 본 명세서에서 WO 94/20627로서 참고문헌으로 인용된 바와 같다.

동종성 재조합에 의해 각각의 식물 세포에 존재하는 수천 카피수의 원형 색소체 게놈중으로 유전자를 삽입시킨 색소체 발현은 핵-발현된 유전자보다 수 많은 카피수의 잇점을 갖도록하여 발현 수준이 전체 가용성 식물 단백질의 10%를 초과할 수 있도록한다. 또한, 색소체-암호화된 특성인 화분 운반가능한 것이 아니기 때문에 색소체 발현이 바람직하며; 따라서, 형질전환된 식물의 야생 관계로의 부주의한 형질전환 유전자의 잠재적 위험이 없게된다. 색소체 형질전환 기술은 미국 특허 제5,451,513호, 제5,545,817호, 및 제5,545,818호(이들은 모두 전체적으로 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨); PCT 출원 WO95/16783(이는 전체적으로 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨); 및 McBride et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:7301-7305 (1994)(이 또한 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨)에 광범위하게 기술되어 있다. 담배 엽록체 형질전환에 대한 기본적인 기술이 Laboratory of Dr. Pal Maliga at Rutgers University(Piscataway, New Jersey)에서 개발되어 정련되어 있으며 선택성 항균 내성 마커를 플래깅시키는 클로닝된 색소체 DNA의 영역을 갖는 잎 조직의 입자 충돌 단계를 포함한다. 표적화 서열로 통칭되는 1 내지 1.5Kb 플래깅 영역은 색소체 게놈을 사용한 동종성 재조합을 용이하게하여 156Kb 담배 색소체의 특정 영역을 치환 또는 변형시킨다. 초기에, 스펙티노마이신 및(또는) 스트렙토마이신에 대한 내성을 부여하는 엽록체 16S rRNA 및 rps12 유전자중에서의 점 돌연변이를 형질전환용 선택성 마커로 이용한다 (Svab, Z., Hajdukiewicz, P., and Maliga, P. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8526-8530; 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨; Staub, J. M., and Maliga, P. (1992) Plant Cell 4, 39-45; 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨). 이에 따라 표적 잎의 충돌 100회당 대략 1회의 주기로 안정한 동종세포질 형질전환체가 생성된다. 이들 마커 사이의 클로닝 부위의 존재는 외부 유전자를 도입시키기위한 색소체 표적화 벡터를 발생시킨다(Staub, J. M., and Maliga, P., EMBO J. 12: 601-606 (1993); 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨). 퇴행성 rRNA 또는 r-단백질 항생제 내성 유전자를 우세한 선택성 마커, 스펙티노마이신 탈독소화 효소 아미노글리코시드-3'-아데닐트랜스퍼라제를 암호화하는 세균성 aadA 유전자로 대체시킴으로써 형질전환 주기가 실질적으로 증가된다(Svab, Z., and Maliga, P. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 913-917; 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨). 이전에, 상기 마커는 녹조류인 클라미도모나스 라인하르티 (*Chlamydomonas reinhardtii*)의 색소체 게놈의 고-주기 형질전환에 성공적으로 사용되었다(Goldschmidt-Clermont, M. (1991) Nucl. Acids Res. 19, 4083-4089; 본 명세서에서 참고문헌으로 인용됨).

따라서, 본 발명은 또한 천연 또는 변형된 밀, 대두, 면화, 사탕무, 평지, 쌀, 또는 사탕수수 프로토스 효소를 암호화하는 DNA 분자와 같은, 천연 식물 프로토스 효소 또는 변형된 식물 프로토스 효소를 암호화하는 분리된 DNA 분자에 기능적으로 결합된 식물 색소체 프로모터를 포함하는 키메릭 유전자를 포함한다. 특히 바람직한 식물 색소체 프로모터는 clpP 유전자 프로모터이다. 키메릭 유전자는 또한 분리된 DNA 분자에 기능적으로 결합된 색소체 프로모터로부터의 5' 비해독 서열 (5'UTR) 및 색소체 유전자 3' 비해독 서열(3'UTR)을 포함하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 3'UTR이 색소체 rps16 유전자 3'비해독 서열이다.

본 발명은 또한 상기한 바와 같은 키메릭 유전자를 포함하는 색소체 형질전환 벡터 뿐만 아니라 상기와 같은 색소체 형질전환 벡터로 형질전환시킨 식물 색소체를 포함하며, 여기서 상기 변형된 식물 프로토스 효소가 상기 식물 색소체에서 발현된다. 본 발명은 또한 상기 식물 색소체를 포함하는, 자손을 포함한 식물 또는 식물 세포를 포함하며, 여기서 변형된 식물 프로토스 효소는 식물에서 발현되고 천연 프로토스 활성을 억제하는 양의 제초제에 대한 내성을 식물에 부여한다.

제초제 내성 프로토스 대립유전자가 작물 식물 또는 작물 식물을 재생시킬 수 있는 식물 세포 배양에서 천연 유전자의 지시된 돌연변이를 통하여 수득되는 경우, 변형된 암호화 서열을 유전공학적으로 처리하여 식물 중으로 형질전환시킬 필요 없이 제초제 내성 작물을 개발하기 위한 통상의 품종변형 기술을 사용하여 시판되는 품종으로 이동시킬 수 있다. 달리, 제초제 내성 유전자를 분리시켜, 최적 발현을 위하여 유전공학적으로 조작한 다음 목적하는 품종 중으로 형질전환시킬 수 있다.

프로토스 억제제에 대해 내성인 변형된 프로토스를 암호화하는 유전자가 또한 식물 세포 형질전환 방법에서 선택성 마커로서 사용될 수 있다. 예를 들면, 형질전환 유전자로 형질전환시킨 식물, 식물 조직 또는 식물 세포를 또한 식물에 의해 발현될 수 있는 변형된 프로토스를 암호화하는 유전자로 형질전환시킬 수 있다. 상기 형질전환된 세포를 프로토스 억제제를 함유하는 매질로 옮기는데, 여기서 형질전환된 세포만이 생존한다. 선택제로서 특히 유용한 것으로 생각되는 프로토스 억제제는 디페닐에테르{예, 아시플루오르펜, 5-[2-클로로-4-(트리플루오로메틸)페녹시]-2-니트로벤조산; 이의 메틸 에스테르; 또는 옥시플루오르펜, 2-클로로-1-(3-에톡시-4-니트로페녹시)-4-(트리플루오로벤젠)}, 옥시디아졸,(예, 옥시

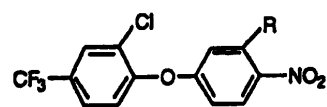
다아존, 3-[2,4-디클로로-5-(1-메틸에톡시)페닐]-5-(1,1-디메틸에틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-(3H)-온, 시클릭 이미드(예, S-23142, N-(4-클로로-2-플루오로-5-프로파르길옥시페닐)-3,4,5,6-테트라히드로프탈이미드; 클로로프탈림, N-(4-클로로페닐)-3,4,5,6-테트라히드로프탈이미드), 페닐 피라졸(예, TNPP-에틸, 에틸 2-[1-(2,3,4-트리클로로페닐)-4-니트로피라졸릴-5-옥시]프로피오네이트; M&B 39279), 피리딘 유도체(예, LS82-556), 및 페노필레이트 및 이의 O-페닐피롤리디노- 및 피페리디노카르바메이트 유사체 및 국제 특허원 WO 92/04827; EP 532146에 기술된 바와 같은 바이시클릭 트리아졸론이 있다.

변형된 프로토스-암호화 유전자로 형질전환시킬 수 있는 식물 세포에 상기 방법을 적용할 수 있으며, 관심있는 형질전환 유전자에 대해 사용할 수 있다. 형질전환 유전자와 프로토스 유전자의 발현은 식물 세포상의 동일한 프로모터 기능에 의해, 또는 별개의 프로모터에 의해 구동될 수 있다.

본 발명의 변형된 억제제-내성 프로토스 효소는 천연 프로토스 활성을 억제하는 제초제에 대해 내성이다. 프로토스를 억제하는 제초제로는 수 많은 상이한 구조를 갖는 부류의 분자가 있으며(Duke et al., Weed Sci. 39:465 (1991); Nadihalli et al., Pesticide Biochem. Physiol. 43:193 (1992); Matringe et al., FEBS Lett. 245:35 (1989); Yanase and Andoh, Pesticide Biochem. Physiol. 35:70 (1989)), 예로는 디페닐에테르(예, 아시플루오르펜, 5-[2-클로로-4-(트리플루오로메틸)페녹시]-2-니트로벤조산; 이의 메틸 에스테르; 또는 옥시플루오르펜, 2-클로로-1-(3-에톡시-4-니트로페녹시)-4-(트리플루오로벤젠)]}, 옥시디아졸, (예, 옥시디아존, 3-[2,4-디클로로-5-(1-메틸에톡시)페닐]-5-(1,1-디메틸에틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-(3H)-온, 시클릭 이미드(예, S-23142, N-(4-클로로-2-플루오로-5-프로파르길옥시페닐)-3,4,5,6-테트라히드로프탈이미드; 클로로프탈림, N-(4-클로로페닐)-3,4,5,6-테트라히드로프탈이미드), 페닐 피라졸(예, TNPP-에틸, 에틸 2-[1-(2,3,4-트리클로로페닐)-4-니트로피라졸릴-5-옥시]프로피오네이트; M&B 39279), 피리딘 유도체(예, LS82-556), 및 페노필레이트 및 이의 O-페닐피롤리디노- 및 피페리디노카르바메이트 유사체가 있다.

특히 중요한 디페닐에테르는 화학식 1을 갖는 것이다:

[화학식 1]



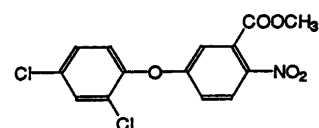
여기서, R은 $-COONa$ (화학식 II), $-CONHSO_2CH_3$ (화학식 III) 또는 $-COOCH_2COOC_2H_5$ (화학식 IV; 참조 Maigrot et al., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 47-51 (1989))와 대등하다.

다른 관심 있는 디페닐에테르는 R이 $\begin{matrix} NOCH_2COOCH_3 \\ || \\ CCH_2OCH_3 \end{matrix}$ 인 것이다:

(화학식 IVa; 참조 Hayashi et al., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 53-58 (1989)).

다른 관심있는 디페닐에테르는 다음 화학식을 갖는 것이다:

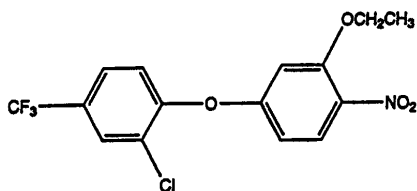
[화학식 IVb]



(화학식 IVb; 비페녹스, 참조 Dest et al., Proc. Northeast Weed Sci. Conf. 27:31 (1973)).

추가로 관심있는 디페닐에테르는 다음 화학식을 갖는 것이다:

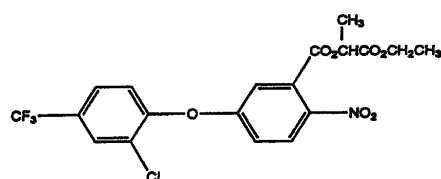
[화학식 IVc]



(화학식 IVc; 옥시플루오르펜, 참조: Yih and Swithenbank, J. Agric. Food Chem., 23:592 (1975))

또다른 관심있는 디페닐에테르는 다음 화학식을 갖는 것이다:

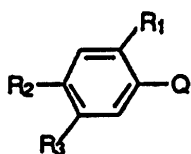
[화학식 IVd]



(화학식 IVd; 락토펜, 참조: page 623 of "The Pesticide Manual," 10th ed., ed. by C. Tomlin, British Crop Protection council, Surrey (1994))

또한 중요한 것은 하기 화학식의 이미드로서 공지된 계열의 제초제이다;

[화학식 V]

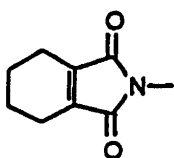


상기식에서,

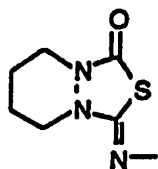
Q는 화학식 VI의 화합물, 화학식 VII의 화합물, 화학식 VIII의 화합물, 화학식 IX의 화합물, 화학식 IXa의 화합물 또는 화학식 IXb의 화합물이고,

R₁은 H, Cl 또는 F이고, R₂는 Cl이고, R₃은 최적으로 치환된 에테르, 티오에테르, 에스테르, 아미노 또는 알킬기이다. 또한, R₂ 및 R₃가 함께 5 또는 6원 헤테로시클릭 환을 형성할 수 있다.

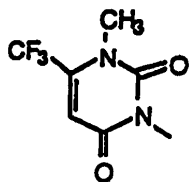
[화학식 VI]



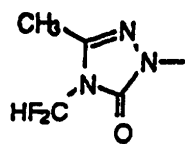
[화학식 VII]



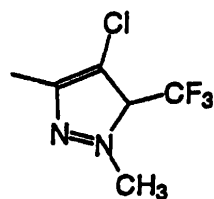
[화학식 VIII]



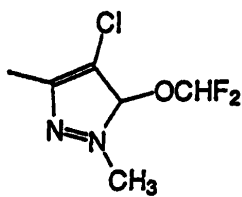
[화학식 IX]



[화학식 IXa]



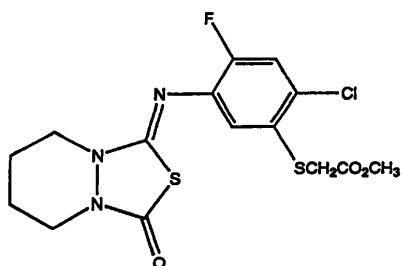
[화학식 IXb]



(참조: Hemper et al. (1985) "Proceedings of the Eighth International Congress of Pesticide Chemistry", Ragdale et al., eds., Amer. Chem. Soc. Washington, D.C., pp 42-48 (1994)).

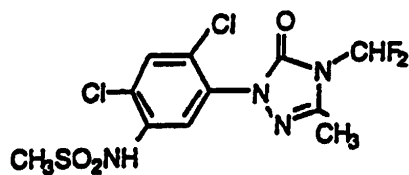
특히 관심있는 이미드 제조제의 예는 다음과 같다:

[화학식 VIIa]



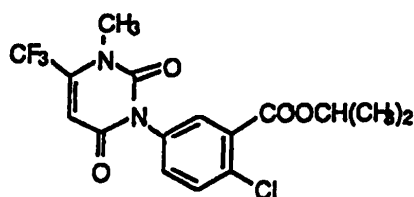
(플루티아세트-메틸, 참조: Miyazawa et al., Brighton Crop Protection Conference-Weeds, pp. 23-28 (1993)).

[화학식 X]

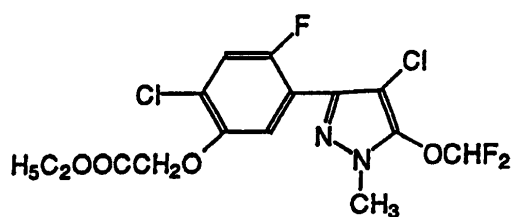


(술펜트라존, 참조: Van Saun et al., Brighton Crop Protection Conference-Weeds, pp. 77-82 (1991)).

[화학식 XI]

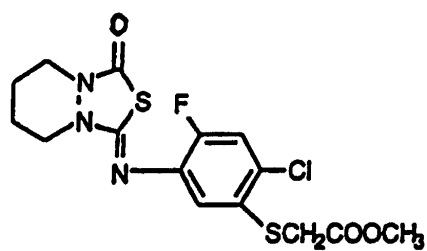


[화학식 XII]

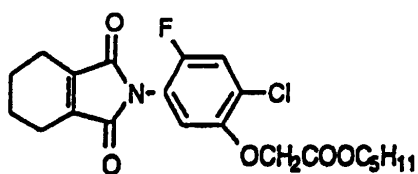


(참조: Miura et al., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: 35-40 (1993)).

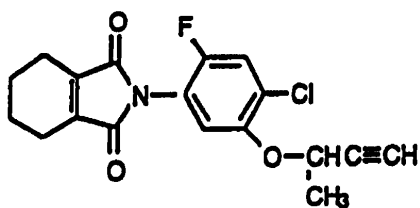
[화학식 XIII]



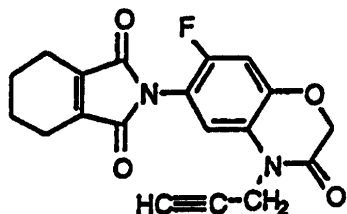
[화학식 XIV]



[화학식 XV]



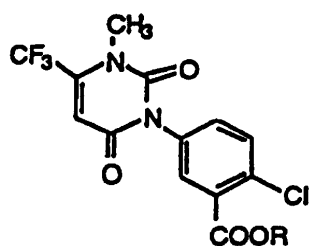
[화학식 XVI]



상기 화합물의 제초제 활성은 다음 문헌에 기술되어 있다: Proceedings of the 1991 Brighton Crop Protection Conference, Weeds (British Crop Protection Council)(화학식 X과 XVI), Proceedings of the 1993 Brighton Crop Protection Conference, Weeds (British Crop Protection Council)(화학식 XII 및 XIII), 미국 특허 제4,746,352호(화학식 XI) 및 Abstracts of the Weed Science Society of America vol. 33, pg. 9 (1993)(화학식 XIV).

가장 바람직한 이미드 제초제는 화학식 XVII을 갖는 아릴우라실로 분류되는 것이다:

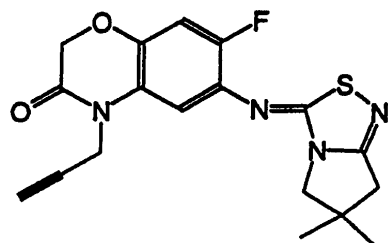
[화학식 XVII]



여기서, R은 (C₂₋₅-알케닐옥시)카르보닐-C₁₋₄-알킬(미국 특허 제5,183,492호에 기술된 바와 같음, 본 명세서에서 참고 문헌으로 인용됨)이다.

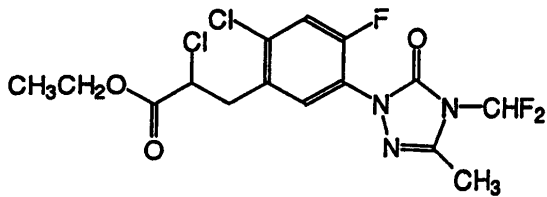
또한 중요한 제초제는 다음 화학식의 것들이 있다:

[화학식 XVIII]



(티아디아지민, 참조: Weiler et al., Brighton Crop Protection Conference-Weeds, pp. 29-34 (1993));

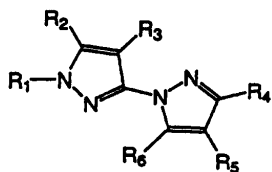
[화학식 XIX]



(카르펜트라존, 참조: Van Saun et al., Brighton Crop Protection Conference-Weeds: pp. 19-22 (1993));

하기 화학식의 N-치환된 피라졸

[화학식 XX]



여기서, R₁은 1개 이상의 할로겐 원자로 임의로 치환된 C₁-C₄-알킬이고,

R₂는 수소이거나 1개 이상의 할로겐 원자로 임의로 치환된 C₁-C₄-알콕시이거나,

R₁ 및 R₂는 함께 -(CH₂)_n-X-를 형성하며, 이때 X는 R₂에 결합되어 있으며;

R₃은 수소 또는 할로겐이고,

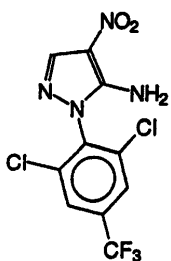
R₄는 수소 또는 C₁-C₄-알킬이고,

R₅는 수소, 니트로, 시아노 또는 -COOR₆ 또는 -CONR₇R₈이고,

R₆은 수소, C₁-C₆-알킬, C₂-C₆-알케닐 또는 C₂-C₆-알키닐이다(참조: 국제 특허원 WO 94/08999, WO 93/10100, 및 미국 특허 제5,405,829호(Schering에 양도)).

N-페닐피라졸

[화학식 XXI]

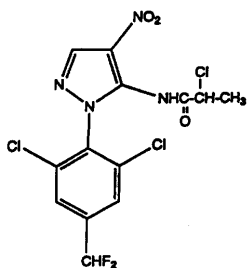


(니피라클로펜)

(참조: page 621 of "The Pesticide Manual", 9th ed., ed. by C.R. Worthing, British Crop Protection Council, Surrey (1991)); 및

3-치환된-2-아릴-4,5,6,7-테트라히드로인다졸

[화학식 XXIa]



(BAY 11340)

(Lyga et al. Pesticide Sci. 42:29-36 (1994)).

본 명세서에서 참고문헌으로 인용되는 WO 96/01254 및 WO 97/00246에 기술된 타입의 페닐피라졸이 또한 중요하다(화학식 XXII).

프로토스의 활성을 통상적으로 억제하는 제초제 수준은 당해 분야에 공지되어 있으며, 환경, 시간 및 적용 방법과 같은 외부 인자에 부분적으로 의존하는 적용비율을 포함한다. 예를 들면, 화학식 V 내지 IX의 이미드 제초제인 경우, 더욱 특히 화학식 X 내지 XVII의 화합물의 경우, 적용비율 범위는 0.0001 내지 10kg/ha, 바람직하게는 0.005 내지 2kg/ha이다. 상기 투여 비율 또는 제초제 농도는 목적하는 작용 및 사용되는 특정 화합물에 따라 상이할 수 있으며, 당해 분야에 공지된 방법으로 측정할 수 있다.

본 발명의 다른 목적은 아라비도프시스, 슈가 케인, 대두, 보리, 면화, 담배, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수, 호밀, 옌트, 잔디 및 목초, 수수, 마초 및 쌀 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 식물의 집단에 유효량의 프로토스-억제 제초제를 적용시킴을 특징으로하여, 바람직하지 못한 식물의 성장을 조절하는 방법이다. 대두, 면화, 담배, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수, 호밀, 옌트, 잔디 및 쌀로 이루어진 군으로부터 선택된 집단에 유효량의 프로토스-억제 제초제를 적용시킴을 특징으로하여, 바람직하지 못한 식물의 성장을 조절하는 방법이 바람직하다. 아라비도프시스, 대두, 면화, 사탕무, 유종자 평지, 옥수수, 밀, 사탕수수, 및 쌀로 이루어진 군으로부터 선택된 집단에 적용시킴을 특징으로하여, 바람직하지 못한 식물의 성장을 조절하는 방법이 특히 바람직하다.

본 발명은 다음 상세한 실시예를 참고로하여 추가로 기술된다. 이들 실시예는 설명만을 목적으로 제공되며, 달리 명시하지 않는 한 제한하고자함이 아니다.

실시예

실시예에서 사용되는 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기술은 당해 분야에 숙지되어 있으며 다음 문헌에 기술되어 있다: T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) 및 T.J. Silhavy, M.L. Berman, 및 L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984).

섹션 A: 식물 프로토포르피리노겐 옥시다제 (프로토스) 유전자의 분리 및 특성화

실시예 1

옥수수 프로토스-1 암호화 서열에 대한 서열 상동성을 기준으로한 밀 프로토스-1 cDNA의 분리

트리티쿰 아에스티쿰(Triticum aestivum; cv Kanzler)으로부터 제조된 전체 RNA가 람다 Uni-Zap 벡터중의 통상의 cDNA 라이브러리 작제용으로 Clontech에 의해 제공되었다. 대략 50,000pfu의 cDNA 라이브러리를 10cm 페트리 디쉬 당 대략 5,000pfu의 밀도로 페트리 디쉬에 플레이팅하고 복사 필터 용기물을 니트로셀룰로소막(Schieicher and Schuell) 상

에 확립시킨다. 플라크 용기물을 랜덤 프라이밍 방법(Life Technologies)으로 32P-dCTP로 표지시킨 옥수수 프로토스-1 cDNA(서열 5, 참조: 국제 특허원 PCT/IB95/00452, 1995년 6월 8일자로 출원하여, 1995년 12월 21일자로 WO 95/34659로 공개됨)로 프로브화한다. 하이브리드화 조건은 7% 나트륨 도데실 황산염(SDS), 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃이다. 세척 조건은 2X SSC, 1% SDS 50℃이다(Church and Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991-1995 (1984), 본 명세서에서 전면 참고문헌으로 인용됨). 포지티브하게 하이브리드화된 플라크를 정제하여 생체내에서 절단된 p블루스크립트 플라스미드에 삽입한다. cDNA 삽입물의 서열은 형광 염료(Applied Biosystems, Inc.)로 표지시킨 디데옥시 종결제를 사용하는 쇠 종결 방법으로 결정한다. "밀 프로토스-1"로 명명된, 초기 선별로부터 수득한 최장의 밀 프로토스-1 cDNA의 길이는 1489 bp이다. 밀 프로토스-1은 다른 공지된 식물 프로토스 펩티드 서열과의 비교를 기준으로 하여 운반 펩티드와 성숙 암호화 서열의 대략 126개의 아미노산에 대한 암호화 서열이 결여되어 있다.

2차 선별을 수행하여 길이가 보다 긴 밀 프로토스 cDNA를 수득한다. 2차 선별의 경우, 람다 Uni-Zap 벡터를 사용하여 트리티쿰 아에스티붐(cv Kanzfer) cDNA 라이브러리를 내부적으로 제조한다. 대략 200,000pfu의 cDNA 라이브러리가 상기한 바와 같이 선별되는데, 밀 프로토스-1 cDNA를 프로브로 사용하고 하이브리드화 및 세척 조건이 50℃가 아닌 65℃인 점이 상이하다. "밀 프로토스-1a"로 명명된, 상기 선별 과정으로부터 수득한 최장 밀 cDNA의 길이는 1811bp이다. 상기 cDNA의 뉴클레오타이드 서열과 이를 암호화하는 아미노산 서열을 각각 서열 9 및 10에 나타낸다. 기타 공지된 식물 프로토스 펩티드 서열과 대응하는 게놈성 서열과 비교하여, 상기 cDNA는 전장이거나 단지 약간의 운반 펩티드 코돈이 결실된 것이다(표 1). 상기 밀 단백질 서열은 서열 6에 나타낸 옥수수 프로토스-1 단백질 서열과 91% 동일(95% 유사)하다.

p블루스크립트 SK 벡터 중의, 밀 프로토스-1a가 1996년 3월 19일자로 pWDC-13(NRRL #B21545)으로 기탁되었다.

실시예 2

아라비도프시스 프로토스-1 암호화 서열에 대한 서열 상동성을 기준으로한 대두 프로토스-1 cDNA의 분리

대두로부터 제조된 람다 Uni-Zap cDNA 라이브러리(v Williams 82, 상배축)를 Stratagene로부터 구입한다. 대략 50,000pfu의 라이브러리를 10cm 페트리 디쉬 당 대략 5,000pfu의 밀도로 페트리 디쉬에 플레이팅하고 복사 용기물을 콜로니/플라크 선별막(NEN Dupont)상에 확립시킨다. 플라크 용기물을 랜덤 프라이밍 방법(Life Technologies)으로 32P-dCTP로 표지시킨 아라비도프시스 프로토스-1 cDNA(서열 1, 참조: 국제 특허원 PCT/IB95/00452, 1995년 6월 8일자로 출원하여, 1995년 12월 21일자로 WO 95/34659로 공개됨)로 프로브화한다. 하이브리드화 조건은 7% 나트륨 도데실 황산염(SDS), 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃이다. 세척 조건은 2X SSC, 1% SDS 50℃이다(Church and Gilbert, (1984)). 포지티브하게 하이브리드화된 플라크를 정제하여 생체내에서 절단된 p블루스크립트 플라스미드 중으로 삽입한다. cDNA 삽입물의 서열은 형광 염료(Applied Biosystems, Inc.)로 표지시킨 디데옥시 종결제를 사용하는 쇠 종결 방법으로 결정한다. "대두 프로토스-1"로 명명된, 수득한 최장의 대두 cDNA의 길이는 다른 공지된 식물 프로토스 펩티드 서열과의 비교를 기준으로하여 전장 길이이다(표 1). 대두 프로토스-1의 길이는 1847bp이며 58.8kDa의 단백질을 암호화한다. 상기 cDNA의 뉴클레오타이드 서열 및 이를 암호화하는 아미노산 서열을 각각 서열 11 및 12로 나타낸다. 대두 단백질은 아라비도프시스 프로토스-1 단백질과 78% 동일(87% 유사)하다.

p블루스크립트 SK 벡터중의, 대두 프로토스-1은 1995년 12월 15일자로 pWDC-12(NRRL #B-21516)로 기탁되었다.

서열 2, 6, 10, 12, 15, 17, 19, 21, 23에 나타낸 서열에 의해 암호화된 각 단백질의 예측되는 아미노산 서열의 배열을 표 1에 나타낸다. 서열 4 및 8에 나타낸 서열에 의해 암호화된 각 단백질의 예측되는 아미노산 서열의 배열을 표 2에 나타낸다.

[표 1a]

아라비도프시스("Arabpt-1"; 서열 2), 옥수수("Mzpt-1"; 서열 6), 밀("Wtpt-1"; 서열 10), 대두("Soybeanpt-1"; 서열 12), 면화("Cottonpt-1"; 서열 16), 사탕무("Sugpt-1"; 서열 18), 팽지("Rapept-1"; 서열 20), 쌀("Ricept-1"; 서열 22), 및 사탕수수("Sorghumpt-1"; 서열 24)의 비교

PileUp 프로그램(GCG package, University of Wisconsin, Madison, WI)을 사용하여 배열시킨다. 제초제 내성을 부여하거나 향상시키도록 본 명세서의 기술에 따라서 변형시킬 수 있는 위치는 진한 글씨로 표시하였다.

	1	50
Rapept-1 MDLSLRP.. QPFLSPFSNP FPRSRYKPL	
Arabpt-1 MELSLRPTT QSLPSFSKP NLRINVKPL	
Sorghumpt-1	
Mzpt-1	
Wtpt-1M ATATVAAASP LRGRVTGRPH	
Ricept-1	
Cottonpt-1MTAL IDLSLRSSP SVSPFSIPKH QHPPRFKPF	
Soybeanpt1MV SVFNEILFPP NQTLRPSLH SPTSFFTSPT RKFPSSRPNP	
Sugpt-1	MKSMALSNCI PQTCMPLRS SGHYRGNCIM LSIPCSLIGR RGYYSKKRR	
	51	100
Rapept-1	NLRCSVSGGS VGSSTIEGG GGGKTVTADC VIVGGGISGL CIAQALVTKH	
Arabpt-1	RLRCSVAGGP TVGSSKIEGG GGT.TTTTDC VIVGGGISGL CIAQALATKH	
Sorghumpt-1	
Mzpt-1ADC VVGGGISGL CIAQALATRH	

[표 1b]

Wtpt-1	RVRPRCATAS	SATETPAAPG	VRL...	SAEC	VIVGAGISGL	CTAQAALATRY
Ricept-1
Cottonpt-1	KLRCSLAEGP	TISSSKIDGG	ESS...	IADC	VIVGGGISGL	CTAQAALATKH
Soybeanpt1	ILRCSTAEES	TASPPKTR..	DSA...	PVDC	VVVGGVVSGL	CTAQAALATKH
Sugpt-1	MSMSCSTSSG	SKSAVKEAGS	GSGAGGLLDC	VIVGGGISGL	CTAQAALCTKH	
	101				150	
Rapept-1	PDA..AKNVM	VTEAKDRVGG	NITT..	REEQ	GFLWEEGPNs	FQPSDEMLTM
Arabpt-1	PDA..APNLI	VTEAKDRVGG	NITT..	REEN	GFLWEEGPNs	FQPSDEMLTM
Sorghumpt-1STVERPEE		GYLWEEGPNs	FQPSDFVLSM
Mzpt-1	..G..VGDVL	VTEARARPGG	NITTVERPEE		GYLWEEGPNs	FQPSDFVLTM
Wtpt-1	..G..VSDLL	VTEARLRPGG	NITTVERPDE		GYLWEEGPNs	FQPSDFVLTM
Ricept-1
Cottonpt-1	RDV..ASNVI	VTEARDRVGG	NITTVER..	D	GYLWEEGPNs	FQPSDFILTm
Soybeanpt1	..A..NANVV	VTEARDRVGG	NITIMER..	D	GYLWEEGPNs	FQPSDEMLTM
Sugpt-1	SSSSLSFNFI	VTEAKDRVGG	NIVTVE..	AD	GYIWEEGPNs	FQPSDAVLTM
	151				200	
Rapept-1	VVDSGLKDDL	VLGDPTAPRF	VLWNGKLRPV	PSKLITDLFFF	DLMSIGGKIR	
Arabpt-1	VVDSGLKDDL	VLGDPTAPRF	VLWNGKLRPV	PSKLITDLFFF	DLMSIGGKIR	
Sorghumpt-1	AVDSGLKDDL	VFGDNPAPRF	VLWEGKLRPV	PSKPADLFFF	DLMSIPGKLR	
Mzpt-1	AVDSGLKDDL	VFGDNPAPRF	VLWEGKLRPV	PSKPADLFFF	DLMSIPGKLR	
Wtpt-1	AVDSGLKDDL	VFGDNPAPRF	VLWEGKLRPV	PSKPGDLFFF	SLMSIPGKLR	
Ricept-1
Cottonpt-1	AVDSGLKDDL	VLGDNPAPRF	VLWEGKLRPV	PSKPTDLFFF	DLMSIAGKLR	
Soybeanpt1	VVDSGLKDEL	VLGDPTAPRF	VLWNRKLRPV	PGKLITDLFFF	DLMSIGGKIR	
Sugpt-1	AVDSGLKDEL	VLGDNPAPRF	VLWNDKLRPV	PSSLITDLFFF	DLMTIPGKIR	
	201				250	
Rapept-1	AGFGAIGIRP	SPFGREESVE	EFVRRNLGDE	VFERLTIEPFC	SGVYAGDPAK	
Arabpt-1	AGFGALGIRP	SPFGREESVE	EFVRRNLGDE	VFERLTIEPFC	SGVYAGDPSK	
Sorghumpt-1	AGLGALGIRP	PAPFGREESVE	EFVRRNLGAE	VFERLTIEPFC	SGVYAGDPSK	
Mzpt-1	AGLGALGIRP	PPFGREESVE	EFVRRNLGAE	VFERLTIEPFC	SGVYAGDPSK	
Wtpt-1	AGLGALGIRP	PPFGREESVE	EFVRRNLGAE	VFERLTIEPFC	SGVYAGDPSK	
Ricept-1
Cottonpt-1	AGFGAIGIRP	PPFGYEEsVE	EFVRRNLGAE	VFERFIEPFC	SGVYAGDPSK	

[표 1c]

Soybeanpt1	AGFGALGIRP	PPFGHEESVE	EFVRRNLGDE	VFERLIEPFC	SGVYAGDPSK
Sugpt-1	AALGALGFRP	SPPFHEESVE	HFVRRNLGDE	VFERLIEPFC	SGVYAGDPAK
251 300					
Rapept-1	LSMKAAPGKV	WLEENGSSI	IGGAFKAIQA	KNKAPKTTRD	PRLPKPKGQT
Arabpt-1	LSMKAAPGKV	WLEQNGSSI	IGGTFKAIQE	RKNAPKAERD	PRLPKPQGQT
Sorghumpt-1	LSMKAAPGKV	WLEEAGSSI	IGGTIKTIQE	RGNPKPPRD	PRLPKPKGQT
Mzpt-1	LSMKAAPGKV	WLEETGGSI	IGGTIKTIQE	RSKNPKPPRD	ARLPKPKGQT
Wtpt-1	LSMKAAPGKV	WLEETGGSI	IGGTIKAIQD	KGKNPKPPRD	PRLPAPKGQT
Ricept-1	RALKAAPGKV	WLEDTGGSI	IGGTIKTIQE	RGNPKPPRD	PRLPTPKGQT
Cottonpt-1	LSMKAAPGKV	WLEETGGSI	IGGTFKTIQE	RNKTPKPPRD	PRLPKPKGQT
Soybeanpt1	LSMKAAPGKV	WLEKNGSSI	IGGTFKAIQE	RNGASKPPRD	PRLPKPKGQT
Sugpt-1	LSMKAAPGKV	WLEBQGGSI	IGGTFKAIQE	RGSNPKPPRD	QRLPKPKGQT
301 350					
Rapept-1	VGSFRKGLIM	LPEAISARLG	DKVKVSWKLS	SITKLASGEY	SLTYETPEGI
Arabpt-1	VGSFRKGLRM	LPEAISARLG	SKVKLSWKLS	GITKLESGGY	NLTYETPDGL
Sorghumpt-1	VASFRKGLAM	LPNAITSSLG	SKVKLSWKLT	SMIKSDGKGY	VLEYETPEGV
Mzpt-1	VASFRKGLAM	LPNAITSSLG	SKVKLSWKLT	SITKSDGKGY	VLEYETPEGV
Wtpt-1	VASFRKGLAM	LPNAIASRLG	SKVKLSWKLT	SITKADNGY	VLGYETPEGL
Ricept-1	VASFRKGLIM	LPDAITSRLG	SKVKLSWKLT	SITKSDNGY	ALVYETPEGV
Cottonpt-1	VGSFRKGLIM	LPEAIANSIG	SNVKLSWKLS	SITKLGNGGY	NLTYETPEGM
Soybeanpt1	VGSFRKGLIM	LPDAISARLG	NKVKLSWKLS	SISKLDSGEY	SLTYETPEGV
Sugpt-1	VGSFRKGLVM	LPTAISARLG	SRVKLSWTL	SITKSLNGEY	SLTYDTPDGL
351 400					
Rapept-1	VTVQSKSVVM	TVPSHVASSL	LRPLSDSAE	ALSKLYYPPV	AAVSISYAKE
Arabpt-1	VSVQSKSVVM	TVPSHVASGL	LRPLSESAAN	ALSKLYYPPV	AAVSISYPKE
Sorghumpt-1	VLVQAKSVIM	TIPSYVASDI	LRPLSGDAAD	VLSRFYYPPV	AAVTVSYPKE
Mzpt-1	VSVQAKSVIM	TIPSYVASNI	LRPLSSDAAD	ALSRFYYPPV	AAVTVSYPKE
Wtpt-1	VSVQAKSVIM	TIPSYVASDI	LRPLSIDAAD	ALSKFYYPV	AAVTVSYPKE
Ricept-1	VSVQAKTVVM	TIPSYVASDI	LRPLSSDAAD	ALSIFYYPV	AAVTVSYPKE
Cottonpt-1	VSLQSRSVVM	TIPSHVASNL	LHPLSAAAAD	ALSQFYYPV	ASVTVSYPKE
Soybeanpt1	VSLQCKTVVL	TIPSYVASTL	LRPLSAAAAD	ALSKFYYPV	AAVSISYPKE
Sugpt-1	VSVRIKSVVM	TVPSYVASRL	LRPLSDSAAD	SLSKFYYPV	AAVSLSYPKE

[표 1d]

	401		450
Rapept-1	AIRSECLIDG ELKGFGQLHP RTQKVEITLT IYSSSLFPNR APPGRVILLN		
Arabpt-1	AIRTECLIDG ELKGFGQLHP RTQGVETLTG IYSSSLFPNR APPGRILLIN		
Sorghumpt-1	AIRKECLIDG ELQGFGQLHP RSQGVETLTG IYSSSLFPNR APAGRVILLN		
Mzpt-1	AIRKECLIDG ELQGFGQLHP RSQGVETLTG IYSSSLFPNR APDGRVILLN		
Wtpt-1	AIRKECLIDG ELQGFGQLHP RSQGVETLTG IYSSSLFPNR APAGRVILLN		
Ricept-1	AIRKECLIDG ELQGFGQLHP RSQGVETLTG IYSSSLFPNR APAGRVILLN		
Cottonpt-1	AIRKECLIDG ELKGFGQLHP RSQGIETLTG IYSSSLFPNR APSGRVILLN		
Soybeanpt1	AIRSECLIDG ELKGFGQLHP RSQGVETLTG IYSSSLFPNR APPGRVILLN		
Sugpt-1	AIRSECLING ELQGFGQLHP RSQGVETLTG IYSSSLFPGR APPGRILLIS		
	451		500
Rapept-1	YIGGAINIGI LSKSEGELVE AVDRDLRML IKPSSTDPLV LGVKLWQAI		
Arabpt-1	YIGGSINIGI LSKSEGELVE AVDRDLRML IKRSTDEPK LGVRWVQAI		
Sorghumpt-1	YIGGAINIGI VSKTESELVE AVDRDLRML INPTAVDEPLV LGVRWVQAI		
Mzpt-1	YIGGAINIGI VSKTESELVE AVDRDLRML INSTAVDEPLV LGVRWVQAI		
Wtpt-1	YIGGSINIGI VSKTESDLVG AVDRDLRML INPRAADELA LGVRWVQAI		
Ricept-1	YIGGSINIGI VSKTESELVE AVDRDLRML INPRAVDEPLV LGVRWVQAI		
Cottonpt-1	YIGGAINIGI LSKTEGELVE AVDRDLRML INPNAKDEPLV LGVRWVQAI		
Soybeanpt1	YIGGAINIGI LSKTIDSELVE TVDRDLRKIL INPNAQDFV VGVRLWQAI		
Sugpt-1	YIGGAKNFGI LNKSKDELAK TVDKDLRML INPDAKLPRV LGVRWVQAI		
	501		550
Rapept-1	PQFLIGHIDL VDAAKASLSS SGHEGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYETAT		
Arabpt-1	PQFLVGHFDI LDTAKSSLTS SGHEGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYETAI		
Sorghumpt-1	PQFLVGHLDL LEAAKSALDQ GGYNGFLGG NYVAGVALGR CIEGAYESAA		
Mzpt-1	PQFLVGHLDL LEAAKAALDR GGYDGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYESAS		
Wtpt-1	PQFLIGHILR LAAAKSALGQ GGYDGLFLGG KYVAGVALGR CIEGAYESAS		
Ricept-1	PQFLIGHLDH LEAAKSALGK GGYDGLFLGG NYVAGVALGR CVEGAYESAS		
Cottonpt-1	PQFLVGHLDL LDSAKMALRD SGFHGLFLGG NYVSGVALGR CVEGAYEVAA		
Soybeanpt1	PQFLVGHLDL LDVAKASIRN TGFEGLFLGG NYVSGVALGR CVEGAYEVAA		
Sugpt-1	PQFSIGHFDL LDAAKAALTD TGVKGLFLGG NYVSGVALGR CIEGAYESAA		
	551		563
Rapept-1	QVNDFMSRYA YK*		
Arabpt-1	EVNDFMSRYA YK*		

[표 1e]

Sorghumpt-1	QIYDFLTKYA YK*
Mzpt-1	QISDFLTKYA YK*
Wtpt-1	QVSDFLTKYA YK*
Ricept-1	QISDFLTKYA YK*
Cottonpt-1	EVKEFLSQYA YK*
Soybeanpt1	EVNDFLTKRV YK*
Sugpt-1	EVVDFLSQYS DK*

[표 2a]

아라비도프시스 (서열 4)와 옥수수 (서열 8) 프로토크스-2 아미노산 서열의 비교

2개의 서열 사이의 수직 막대는 동일한 잔기를 표시한다. 문헌: Deveraux et al., Nucleic Acids Res. 12:387-395 (1984)에 기술된 GAP 프로그램을 사용하여 배열시킨다.

유사성 %: 75.889 동일성 %: 57.905

프로토스-2. Pep x Mzprotox-2.Pep

```
1 .....MASGA Vad.HQIEAVSGKRVAV 21
                               | |:|: .: |...:| |
1 MLALTASASSASSHPYRHASAHTRRPRLRAVLAMAGSDDPRAAPARSVAV 50

22 VGAGVSGLAAYK LKSRGLNVTVF EADGRVGGKLR SVMQNGLIWDEGANT 71
   ||||| ||||| |:|: .: ||||| |:|. |:| |:|. .: |:| |||||
51 VGAGVSGLAAYRLRQSGVNVTVF EAADRAGGKIRTNSEGGFVWDEGANT 100

72 MTEAEPEVGSLLDDLGLREKQQFPISQKKRYIVRNGVPVMLPTNPIELVT 121
   |||:| |.:.:| |||||. :|||:| ||. ||||| |:|. |:|. :|. :|. :|.
101 MTEGEWEASRLIDDLGLQDKQQYPNSQHKRYIVKDGAPALIPSDPISLMK 150

122 SSVLSTQSKFQILLEPFLWKK...KSSKVS DASAEE SVSEFFQRHFGQE 167
   |||||. |:|: .: |:| |:| .: |:| |:|. .: |:| |:|. :| |||||. |
151 SSVLSTKSKIALFFEPFLYKKANTRNSGKVS EHLSESVGSFCERHFGRE 200
```

[표 2b]

```

168 VVDYLIDPFVGGTSAADPDLSMKHSFPDLWNVEKSFGSIIVGAIRTKFA 217
    |||::|||:||||:|:|::|.||.||||:|:..||:|||| |.:|
201 VVDYFVDPFVAGTSAGDPESLSIRHAFPALWNLERKYGSVIVGAILSKLA 250

218 AKGGKSRDTKSSPGTKKSGRSFSFKGGMQILPDTLCKSLSHDEINLDSK 267
    |||:. :. ..|.|:..|.||||.|||| |.:| ..:..|:..|:..
251 AKGDPVKTRHDSSGKRRNRVVSFSFHGGMQSLINALHNEVGDDNVKLGTE 300

268 VLSLS..YNSGSRQENWSLSCVSHNETQRQ...NPHYDAVIMTAPLCNVK 312
    ||||. :... :.||:|. |.....: |. :|||||||:|:|
301 VLSLACTFDGVPALGRWSISVDSKDSGDKDLASNQTFDAVIMTAPLSNVR 350

313 EMKVMKGGQFPQLNFLPEINYMPLSVLITTFTEKVKRPLEGFGVLIPSK 362
    ||. |||.|. |:|||:~:|:|:~:|.|. |:~:|:|:|:|:|:|
351 RMKFTKGGAPVVLDFLPKMDYLPLSLMVTAFKKDDVKKPLEGFGVLIPYK 400

363 E.QKHGFKTLGTLFSSMMFPDRSPSDVHLYTTFIGGSRNQELAKASTDEL 411
    | ||||:|:|:|:|:|:|:|:|.|. |.||||:|:|:|:|.|. |
401 EQQKHGLKTLGTLFSSMMFPDRAPDDQYLYTTFVGSSHNRDLGAPTSIL 450

412 KQVVTSDLQRLLGVEGEPVSVNHYYWRKAFPLYDSSYDSVMEAIKMEKD 461
    ||:|:|:|.~:|:|:|:|. |. | |. |:|:|. |. |:|:|:|:|:|.~
451 KQLVTSDLKKLLGVEGQPTFVKHVYWGNAFPLYGHDYSSVLEAIEKMEKN 500

462 LPGFFYAGNHRGGLSVGKSIASGCKAADLVISYLESCSNDKKPNDSL* 509
    |||||:|:~:|.|. |:|:|:|. |:|:|:| .....:
501 LPGFFYAGNSKDGLAVGSVIASGSKAADLAISYLESHTKHNNSH*... 545

```

실시예 3

옥수수 프로토क्स-1 암호화 서열에 대한 서열 상동성을 기준으로한 면화 프로토क्स-1 cDNA의 분리

고시피움 히르수툼(*Gossypium hirsutum*) L로부터 제조된 람다 Uni-Zap cDNA 라이브러리(72시간, 암갈색 자엽)를 아리조나 주립대학의 Dept. of Botany, Dr. Dick Trelease (Ni W. and Trelease R.N: Arch. Biochem. Biophys. 289: 237-243 (1991))로부터 취득하였다. 대략 50,000 pfu의 라이브러리를 10cm 페트리 디쉬 당 대략 5,000pfu의 밀도로 페트리 디쉬에 플레이팅하고 복사 필터 용기물을 콜로니/플라크 선별막(NEN Dupont)상에 확립한다. 플라크 용기물을 랜덤 프라이밍 방법(Life Technologies)으로 32P-dCTP로 표지시킨 옥수수 프로토क्स-1 cDNA(서열 5)로 프로브화한다. 하이브리드화 조건은 7% 나트륨 도데실 술페이트(SDS), 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃이다. 세척 조건은 2X SSC, 1% SDS 50℃이다(Church and Gilbert, (1984)). 포지티브하게 하이브리드화된 플라크를 정제하여 생체내에서 절단된 p블루스크립트 플라스미드 중으로 삽입한다. cDNA 삽입물의 서열은 형광 염료(Applied Biosystems, Inc.)로 표지시킨 디데옥시 중결제를 사용하는 쇠 중결 방법으로 결정한다. "면화 프로토क्स-1"로 명명된, 취득한 최장의 면화 cDNA의 길이는 다른 공지된 식물 프로토क्स 펩티드 서열과의 비교를 기준으로 전장 길이인 것으로 나타났다(표 1). 면화 프로토क्स-1의 길이는 1826bp이며 58.2kDa의 단백질을 암호화한다. 상기 cDNA의 뉴클레오티드 서열 및 이를 암호화하는 아미노산 서열을 각각 서열 13 및 14로 나타낸다. 면화 단백질은 옥수수 프로토क्स-1 단백질과 77% 동일(86% 유사)하다.

p블루스크립트 SK 벡터중의, 면화 프로토क्स-1은 1996년 7월 1일자로 pWDC-15 (NRRL #B-21594)로 기탁되었다.

실시예 4

아라비도프시스 프로토क्स-1 암호화 서열에 대한 서열 상동성을 기준으로한 사탕무 프로토क्स-1 cDNA의 분리

베타 불가리스(Beta vulgaris)로부터 제조된 람다-Zap cDNA 라이브러리를 펜실베이니아주 필라델피아 소재의 Plant Science Institute의 Dr. Philip Rea(Yongcheol Kim, Eugene J. Kim, and Philip A. Rea, Plant Physiol. 106; 375-382 (1994))로부터 취득하였다. 대략 50,000pfu의 라이브러리를 10cm 페트리 디쉬 당 대략 5,000pfu의 밀도로 페트리 디쉬에 플레이팅하고 복사 필터 용기물을 니트로셀룰로스막(Schleicher and Schuell) 상에 확립한다. 플라크 용기물을 랜덤 프라이밍 방법(Life Technologies)으로 32P-dCTP로 표지시킨 아라비도프시스 프로토क्स-1 cDNA(서열 5)로 프로브화한다. 하이브리드화 조건은 7% 나트륨 도데실 황산염(SDS), 0.5 M NaPO₄ pH 7.0, 1 mM EDTA 50℃이다. 세척 조건은 2X SSC, 1% SDS 50℃이다(Church and Gilbert (1984)). 포지티브하게 하이브리드화된 플라크를 정제하여 생체내에서 절단된 p블루스크립트 플라스미드 중으로 삽입한다. cDNA 삽입물의 서열은 형광 염료(Applied Biosystems, Inc.)로 표지시킨 디데옥시 종결제를 사용하는 쇠 종결 방법으로 결정한다. "사탕무 프로토क्स-1"로 명명된, 취득한 사탕무 프로토क्स-1 cDNA의 최장 길이는 다른 공지된 식물 프로토क्स 펩티드 서열과의 비교를 기준으로 전장 길이이다(표 1). 사탕무 프로토क्स-1의 길이는 1910bp이며 60kDa의 단백질을 암호화한다. 상기 cDNA의 뉴클레오타이드 서열 및 이를 암호화하는 아미노산 서열을 각각 서열 15 및 16으로 나타낸다. 사탕무 단백질은 아라비도프시스 프로토क्स-1 단백질과 73% 동일(82% 유사)하다.

p블루스크립트 SK 벡터 중의, 사탕무 프로토क्स-1은 1996년 7월 29일자로 pWDC-16(NRRL #B-21595)으로 기탁되었다.

실시예 5

아라비도프시스 프로토क्स-1 암호화 서열에 대한 서열 상동성을 기준으로한 평지 프로토क्स-1 cDNA의 분리

브라시카 나푸스(Brassica napus; 3-4주, 성숙 녹색잎)로부터 제조된 람다 Uni-ZapII cDNA 라이브러리를 Dr. Guenther Ochs, Institut Fuer Allgemeine Botanik, Johannes Gutenberg-Universitaet Mainz, Germany (Gunther Ochs, Gerald Schock, and Aloysius Wild, Plant Physiol. 103:303-304(1993))로부터 취득하였다. 대략 50,000pfu의 라이브러리를 10cm 페트리 디쉬 당 대략 5,000pfu의 밀도로 페트리 디쉬에 플레이팅하고 복사 필터 용기물을 니트로셀룰로스막(Schleicher and Schuell) 상에 확립한다. 플라크 용기물을 랜덤 프라이밍 방법(Life Technologies)으로 32P-dCTP로 표지시킨 아라비도프시스 프로토क्स-1 cDNA(서열 1)로 프로브화한다. 하이브리드화 조건은 7% 나트륨 도데실 황산염(SDS), 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃이다. 세척 조건은 2X SSC, 1% SDS 50℃이다(Church and Gilbert (1984)). 포지티브하게 하이브리드화된 플라크를 정제하여 생체내에서 절단된 p블루스크립트 플라스미드 중으로 삽입한다. cDNA 삽입물의 서열은 형광 염료(Applied Biosystems, Inc.)로 표지시킨 디데옥시 종결제를 사용하는 쇠 종결 방법으로 결정한다. "평지 프로토क्स-1"로 명명된, 취득한 평지 프로토क्स-1 cDNA의 최장 길이는 다른 공지된 식물 프로토क्स 펩티드 서열과의 비교를 기준으로 전장 길이이다(표 1). 평지 프로토क्स-1의 길이는 1784bp이며 57.3kDa의 단백질을 암호화한다. 상기 cDNA의 뉴클레오타이드 서열 및 이를 암호화하는 아미노산 서열을 각각 서열 17 및 18로 나타낸다. 평지 단백질은 아라비도프시스 프로토क्स-1 단백질과 87% 동일(92% 유사)하다.

p블루스크립트 SK 벡터 중의, 평지 프로토क्स-1은 1996년 8월 23일자로 pWDC-17(NRRL #B-21615)로 기탁되었다.

실시예 6

옥수수 프로토क्स-1 암호화 서열에 대한 서열 상동성을 기준으로한 쌀 프로토क्स-1 cDNA의 분리

오리자 사티바(Oryza sativa; 5일간 연푸르게된 새로 나온 가지)로부터 제조된 람다 gt11 cDNA 라이브러리를 Clontech로부터 구입하였다. 대략 50,000pfu의 cDNA 라이브러리를 10cm 페트리 디쉬 당 대략 5,000pfu의 밀도로 페트리 디쉬에 플레이팅하고 복사 필터 용기물을 니트로셀룰로스막(Schleicher and Schuell) 상에 확립한다. 플라크 용기물을 랜덤 프라이밍 방법(Life Technologies)으로 32P-dCTP로 표지시킨 옥수수 프로토क्स-1 cDNA(서열 5)로 프로브화한다. 하이브리드화 조건은 7% 나트륨 도데실 황산염(SDS), 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50℃이다. 세척 조건은 2X SSC, 1% SDS 50℃이다(Church and Gilbert (1984)). 포지티브하게 하이브리드화된 플라크를 정제하고, 람다 DNA를 Wizard Lambda-Prep kit(Promega)를 사용하여 제조한다. cDNA 삽입물을 p블루스크립트 SK 벡터 중으로 EcoRI 단편으로 표준 기술을 사용하여 서브클로닝한다. cDNA 삽입물의 서열은 형광 염료(Applied Biosystems, Inc.)로 표지시킨 디데옥시 종결제를 사용하는 쇠 종결 방법으로 결정한다. "쌀 프로토क्स-1"로 명명된, 취득한 쌀 프로토क्स-1 cDNA의 최장 길이는

1224 bp이다. 쌀 프로토스-1은 다른 공지된 식물 프로토스 펩티드 서열과의 비교를 기준으로하여 운반 펩티드 및 성숙 암호화 서열의 대략 172개 아미노산에 대한 암호화 서열이 결여되어 있다(표 1). 상기 부분적인 cDNA의 뉴클레오타이드 서열과 이를 암호화하는 아미노산서열을 각각 서열 19 및 20으로 나타낸다.

p블루스크립트 SK 벡터중의, 쌀 프로토스-1은 1996년 12월 6일자로 pWDC-18(NRRL #B-21648)로 기탁되었다.

실시예 7

옥수수 프로토스-1 암호화 서열에 대한 서열 상동성을 기준으로한 사탕수수 프로토스-1 cDNA의 분리

소르굼 비콜러(*Sorghum bicolor*; 3-6일 녹색 과종물)로부터 제조된 람다-Zap II cDNA 라이브러리를 Dr. Klaus Pfizenmaier, Institute of Cell Biology and Immunology, University of Stuttgart, Germany(Harald Wajant, Karl-Wolfgang Mundry, and Klaus Pfizenmaier, Plant Mol. Biol. 26:735-746 (1994))로부터 수득하였다. 대략 50,000pfu의 cDNA 라이브러리를 10cm 페트리 디쉬 당 대략 5,000pfu의 밀도로 페트리 디쉬에 플레이팅하고 복사 필터 용기물을 니트로셀룰로스막(Schleicher and Schuell) 상에 확립한다. 플라크 용기물을 랜덤 프라이밍 방법(Life Technologies)으로 32P-dCTP로 표지시킨 옥수수 프로토스-1 cDNA(서열 5)로 프로브화한다. 하이브리드화 조건은 7% 나트륨 도데실 술페이트(SDS), 0.5M NaPO₄ pH 7.0, 1mM EDTA 50°C이다. 세척 조건은 2X SSC, 1% SDS 50°C이다(Church and Gilbert (1984)). 포지티브하게 하이브리드화된 플라크를 정제하고 절단된 p블루스크립트 플라스미드 중으로 생체내에서 삽입한다. cDNA 삽입물의 서열은 형광 염료(Applied Biosystems, Inc.)로 표지시킨 디데옥시 종결제를 사용하는 쉘 종결 방법으로 결정한다. "사탕수수 프로토스-1"로 명명된, 수득한 사탕수수 프로토스-1 cDNA의 최장 길이는 1590bp이다. 사탕수수 프로토스-1은 다른 공지된 식물 프로토스 펩티드 서열과의 비교를 기준으로하여 운반 펩티드 및 성숙 암호화 서열의 대략 44개 아미노산에 대한 암호화 서열이 결여되어 있다(표 1). 상기 부분적인 cDNA의 뉴클레오타이드 서열과 이를 암호화하는 아미노산 서열을 각각 서열 21 및 22로 나타낸다.

p블루스크립트 SK 벡터 중의, 사탕수수 프로토스-1은 1996년 12월 6일자로 pWDC-19(NRRL #B-21649)로 기탁되었다.

실시예 8

세균 시스템에 있어서 프로토스 억제 제조제에 대한 식물 프로토스 클론 감응성의 입증

프로토스-1/SASX38, 프로토스-2/SASX36 및 p블루스크립트/XL1-블루의 액체 배양물을 L amp¹⁰⁰에서 성장시킨다. 각 배양물의 100μl 분취량을 여러가지 농도(1.0nM-10mM)의 화학식 XVII의 프로토스 억제 아릴우라실 제조제를 함유하는 L amp¹⁰⁰배지 상에 플레이팅시킨다. 복사 세트의 플레이트를 37°C에서 18시간 동안 배양시킨다.

프로토스⁺ 이. 콜리 균주 XL1-블루는 어떠한 농도의 제조제에 대해서도 감응성을 나타내지 않았는데, 이는 유사한 제조제에 대한 천연 세균성 효소의 보고된 내성과 일치하는 것이다. 프로토스-1/SASX38은 명백하게 감응성이었는데, 10nM 정도로 낮은 농도의 억제제에 의해서도 거의 대부분의 세균층이 제거되었다. 프로토스-2/SASX38 또한 감응성이지만, 고농도(10μl)의 제조제에 대해서만 감응성이었다. 제조제는 암실에서 거의 전체적으로 유지되는 플레이트 상에서도 효과적이었다. 제조제의 독성은 플레이트에 헤마틴 20μg/ml를 가하면 거의 제거되었다.

2종의 식물 프로토스 균주간의 상이한 제조제 내성은 효소 감응성에 있어서 본질적으로 상이한 것 보다는, 이들 2종의 플라스미드로부터의 발현이 상이한데 원인이 있는 것으로 짐작된다. 프로토스-1/SASX38은 헴-결핍성 매질중에서 프로토스-2/SASX38 보다 더 천천히 성장한다. 또한, 성장 속도가 아랍 프로토스-1/SASX38에 필적하는 Mz프로토스-2/SASX38 균주는 보다 낮은 농도(10-100nM)의 제조제에 대해서도 매우 감응성이다.

섹션 B: 프로토스-억제 제조제에 대해 내성인 식물 프로토스 유전자의 동정 및 특성화

실시예 9

이. 콜리 발현 시스템에서 프로토스-억제 제조제에 대해 내성인 식물 프로토스 유전자에 대한 선별

플라스미드 벡터 pFL61(Minet et al., Plant J. 2:417-422 (1992))중 아라비도프시스 탈리아나(Landsberg) cDNA 라이브러리를 수득하여 증폭시킨다. 이. 콜리 hemG 돌연변이체 SASX38(Sasarman et al., J. Gen. Microbiol. 113:297 (1979))를 수득하여 헤마틴(United States Biochemicals) 20 μ g/ml를 함유하는 L 배지상에 유지시킨다. 상기 플라스미드 라이브러리를 Bio-Rad Gene 펄서와 제조업자의 조건을 이용하여 전기천공으로 SASX38 중으로 형질전환시킨다. 상기 전기천공된 세포를 암피실린 100 μ g/ml를 함유하는 L 한천상에 대략 500,000 형질전환체/10cm 플레이트의 밀도로 플레이팅시킨다. 이어서 상기 세포를 낮은 조명하에 37℃에서 40시간 동안 배양시키고 외부에서 헤스를 가하지 않고도 성장할 수 있는 것에 대해 선별한다. pFL61 라이브러리로부터 헤스 독립 영양체를 400/10⁷의 주기로 회수한다. 22개의 상보적인 클론을 서열 분석하면 9개가 "프로토스-1"으로 표시되는 타입의 것이고, 상기 프로토스 유전자는 엽록체성 프로토스 효소를 발현시킬 것으로 생각된다.

pFL61 라이브러리는 양방향으로 아라비도프시스 cDNA가 삽입되어 있는 효모 발현 라이브러리이다. 이들 cDNAs는 또한 세균에서 발현시킬 수 있다. 프로토스 cDNAs는 벡터 중의 NotI 클로닝 부위에 대해 대략 10개 아미노산 5' 효모 PGK 3' 서열로 프레임내 ATG에서 명백하게 개시되며 떨어져 있는 스트림의 lacZ 프로모터 300bp로부터 또는 미정의된 은폐적 세균 프로모터로부터 발현된다. 엽록체 운반 서열의 확실한 영역이 포함되어 있는 프로토스-1 cDNAs가 이. 콜리 SASX38 균주의 성장을 억제하기 때문에, 적어도 일정량의 엽록체 운반 서열이 부착되어 있는 클론을 돌연변이/제조제 선택 실험용으로 선택한다. 상기 클론, pSLV19는 추정되는 엽록체 운반 펩티드의 아미노산중 17개만을 함유하며, DNA 서열은 아라비도프시스 프로토스-1 cDNA(서열 1)의 bp 151에서 개시된다.

상기 플라스미드 pSLV19로 랜덤 돌연변이 균주 XL1-Red(Stratagene, La Jolla, CA)를 형질전환시킨다. 상기 형질전환 물을 50 μ g/ml 암피실린을 함유하는 L 배지상에 플레이팅하고 37℃에서 48시간 동안 배양시킨다. 형질전환된 세포의 층을 플레이트로부터 걷어내고 Wizard Megaprep 키트(Promega, Madison, WI)를 사용하여 플라스미드 DNA를 제조한다. 상기 돌연변이체 균주로부터 분리된 플라스미드 DNA는 2000개의 뉴클레오티드당 대략 1개의 랜덤 염기 변화를 함유할 것으로 예측된다(참조: Greener et al., Strategies 7(2):32-34 (1994)).

돌연변이 플라스미드 DNA를 hemG 돌연변이체 SASX38(Sasarman et al., J. Gen. Microbiol. 113:297 (1979)) 중으로 형질전환시키고 여러가지 농도의 프로토스-억제 제조제를 함유하는 L 배지상에 플레이팅한다. 상기 플레이트를 37℃에서 2일간 배양시킨다. 플라스미드 DNA를 야생형 균주를 효과적으로 사멸시키는 농도의 제조제의 존재하에서 성장하는 모든 콜로니로부터 분리시킨다. 이어서 분리된 DNA를 SASX38 중으로 형질전환시키고 제조제상에 다시 플레이팅시켜 관찰된 내성이 플라스미드로부터 기원하는지 확인한다. 상기 선별 단계를 통과하는 플라스미드로부터의 프로토스 암호화 서열을 NotI 분해법으로 절단하고, 비돌연변이 벡터 중으로 재클로닝시켜, 제조제 내성 부여 능력에 대해 다시 시험한다. 제조제 내성이 부여된 프로토스 cDNAs의 DNA 서열을 결정하고 야생형 아라비도프시스 프로토스-1 서열(서열 1)과 비교하여 돌연변이를 확인한다.

단일 암호화 서열 돌연변이체를 1차 돌연변이 실험으로부터 회수한다. 단지 성장 속도를 증가시킴으로써 상기 돌연변이체의 제조제에 대한 "내성"을 향상시킨다. 서열 2의 아미노산 56에서 트레오닌에 대한 ACG 코돈을 리신에 대한 AAG 코돈으로 전환시키는, pSLV19의 절단된 엽록체 운반 서열중에 서열 1이 뉴클레오티드 197에서 C가 A로 변화시키는 돌연변이를 함유하며, 이에 따라 세균 돌연변이체를 더욱 좋게 상보시킨다. 상기 플라스미드는 또한 AGT(Ser)를 AGC(Ser)로 변화시키는, 뉴클레오티드 1059에서 사일런트 암호화 서열 돌연변이를 함유한다. 상기 플라스미드를 pMut-1로 나타낸다.

상기 pMut-1 플라스미드로 상기한 바와 같이 돌연변이 XL1-Red 균주를 형질전환시키고 상기 돌연변이된 DNA를 분리한 다음 비돌연변이 pMut-1 프로토스 유전자에 대해 치사량인 제조제 농도에 플레이팅한다. 제조제 내성 콜로니를 37℃에서 2일 후 분리시키고 상기한 바와 같이 분석한다. 다중 플라스미드는 제조제 내성 프로토스 암호화 서열을 함유하는 것으로 나타났다. 서열을 분석하면 상기 내성 유전자가 2종의 부류에 속하는 것으로 나타났다. 확인된 내성 돌연변이중 하나는 서열 1로 나타난 아라비도프시스 프로토스-1 서열의 뉴클레오티드 689에서 C가 T로 변화된다. 상기 변화는 서열 2의 아미노산 220에서 알라닌에 대한 GCT 코돈을 발린에 대한 GTT 코돈으로 전환시키며, 이를 pAraC-1 Val로 표시한다.

제2 부류의 제조제 내성 돌연변이체는 아라비도프시스 프로토스-1 서열중 뉴클레오티드 1307에서 A의 G로의 변화를 함유한다. 상기 변화는 아미노산 426에서 티로신에 대한 TAC 코돈을 시스테인에 대한 TGC 코돈으로 전환시키며, pAraC-2Cys로 표시한다.

제3 내성 돌연변이체는 아라비도프시스 프로토스-1 서열중 뉴클레오티드 691에서 G가 A로의 변화를 갖는다. 상기 돌연변이는 pAraC-1중의 돌연변이에 인접한 코돈 위치에서 아미노산 221의 글리신에 대한 GGT 코돈을 세린에 대한 AGT 코돈으로 전환시킨다. 상기 플라스미드를 pAraC-3Ser로 표시한다.

pMut-1 플라스미드중의 내성 돌연변이체 pAraC-2Cys는 1994년 11월 14일자로 pWDC-7 표시하에 Agricultural Research Culture Collection에 기탁되었으며 기탁번호는 NRRL #21339N이다.

실시에 10

랜덤 선별로 확인된 위치에서의 추가적인 제조제-내성 코돈 치환

랜덤 선별에서 제조제 내성 부위로 확인된 아미노산을 다른 아미노산으로 대체시켜 세균 시스템에서 기능과 제조제 내성에 대해 시험한다. 아라비도프시스 프로토스-1 서열의 올리고뉴클레오티드-지시된 돌연변이를 Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (Clontech, Palo Alto, CA)를 사용하여 수행한다. 서열 분석으로 아미노산 변화를 확인한 후, 돌연변이된 플라스미드를 SASX38를 형질전환시키고 L-amp¹⁰⁰ 배지 상에 플레이팅하여 기능 및 내성에 대해 시험하기 위하여 여러가지 농도의 프로토스-억제 제조제에 대해 시험한다.

상기 공정을 아라비도프시스 프로토스-1 서열(서열 1)의 뉴클레오티드 688-690에서의 알라닌 코돈 및 뉴클레오티드 1306-1308에서의 티로신 코돈에 적용시킨다. 결과는 뉴클레오티드 688-690에서의 알라닌 코돈을 발린, 트레오닌, 류신, 시스테인, 또는 이소류신에 대한 코돈으로 변화시켜 기능을 보유하는 제조제-내성 프로토스 효소를 생산할 수 있음을 입증한다. 상기 결과는 또한 뉴클레오티드 1306-1308에서의 티로신 코돈을 시스테인, 이소류신, 류신, 트레오닌, 메티오닌, 발린, 또는 알라닌으로 변화시켜 기능을 보유하는 제조제-내성 프로토스 효소를 생산할 수 있음을 입증한다.

실시에 11

이미 확인된 내성 돌연변이체의 효소 기능 및(또는) 제조제 내성을 증가시키는 추가적인 돌연변이 분리

제조제 내성 프로토스 유전자를 함유하는 플라스미드로 돌연변이 균주 XL1-Red를 형질전환시키고 돌연변이된 DNA를 상기한 바와 같이 분리한다. 돌연변이된 플라스미드를 SASX38 중으로 형질전환시키고 원래의 "내성" 돌연변이체의 성장을 억제하기에 충분한 농도의 제조제에 대해 선별한다. 내성 콜로니를 분리하고 내성이 더 높은 표현형이 상기한 바와 같이 암호화 서열 의존적임을 증명한다. 이들 돌연변이체의 서열을 결정하고 선조 서열과 비교하여 돌연변이를 확인한다.

상기 공정을 상기한 바와 같이 pAraC-1 Val 돌연변이체에 적용시킨다. 결과는 아미노산 305(서열 2)에서의 세린 코돈을 류신에 대한 코돈으로 변화시켜 pAraC-1 Val 돌연변이만을 갖는 것 보다 프로토스-억제 제조제에 대해 내성이 더 높은 효소를 생산할 수 있음을 입증한다. 상기 제2 부위 돌연변이를 AraC305Leu로 표시한다. 아미노산 249에서의 트레오닌 코돈에 대해서도 동일한 결과가 입증되는데, 여기서는 이소류신 또는 알라닌으로 변화시켜 효소의 내성을 더 크게한다. 이들 변화를 각각 AraC249Ile 및 AraC249Ala로 표시한다.

상기 공정을 또한 상기한 바와 같이 pAraC-2Cys 돌연변이체에 적용시킨다. 결과는 아미노산 118(서열 2)에서의 프롤린 코돈을 류신에 대한 코돈으로 변화시켜 pAraC-1Cys 돌연변이만을 갖는 것보다 프로토스-내성 제조제에 대해 내성이 더 높은 효소를 생산할 수 있음을 입증한다. 상기 돌연변이를 AraC118Leu로 표시한다. 동일한 결과가 아미노산 305에서의 세린 코돈에 대해서도 입증되는데, 여기서 류신으로 변화시키면 내성이 더 큰 pAraC-2Cys 효소로 된다. 상기 변화는 또한 상기한 바와 같이 pAraC-1Val 돌연변이체에 대해서 분리하여 AraC305Leu로 표시한다. pAraC-2Cys 돌연변이체의 제조제 내성을 향상시키는 추가적인 돌연변이로는 AraC425Ser로 표시되는, 아미노산 425에서의 아스파라긴의 세린으로의 변화, 및 AraC498Cys로 표시되는, 아미노산 498에서의 티로신의 시스테인으로의 변화가 있다.

이들 변화를 "제2 부위" 돌연변이로 언급하는데, 이는 이들이 단독으로 제조제 내성을 부여하기에는 충분치 못하지만, 이미 돌연변이된 효소의 기능 및(또는) 제조제 내성을 향상시키기 때문이다. 이는 가능한 모든 치환 시험을 완전히 수행한 것은 아니기 때문에 이들 부위에서 다른 아미노산 치환이 제조제 내성 효소를 생산하기에 충분할 수 있다는 가능성을 배제시키지는 않는다.

실시에 12

높은 기능/높은 내성 프로토クス 효소를 생성시키기 위한, 확인된 내성 돌연변이와 확인된 제2 부위 돌연변이의 혼합

상기한 AraC305Leu 돌연변이는 AraC-1Val 및 AraC-2Cys 돌연변이 플라스미드 둘다의 기능/제조제 내성을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 상기 제2 부위 돌연변이의 일반적인 유용성을 시험하기위한 노력으로 AraC-2Leu, AraC-2Val, 및 AraC-2Ile 돌연변이를 합하여 제조제 내성에 대해 시험한다. 각 경우에 있어서, AraC305Leu 변화는 프로토クス-억제 제조제상에서의 내성 프로토クス 돌연변이체의 성장 속도를 확실하게 증가시킨다. AraC-2Ile 내성 돌연변이체를 2차 부위 돌연변이 AraC249Ile 또는 AraC118Leu와 혼합하면 내성이 더 높은 돌연변이 프로토クス 효소가 생산된다. AraC249Ile 돌연변이는 AraC-1 돌연변이체를 향상시키는 것으로 확인된 2차 부위 돌연변이가 또한 AraC-2 돌연변이체의 내성을 증가시킬 수 있음을 입증하는 것이다. AraC-2Ile, AraC305Leu, 및 AraC249Ile를 함유하는 3개의 돌연변이 플라스미드가 또한 기능이 더 높고, 제조제 내성이 더 큰 프로토クス-1 효소를 생산하는 것으로 밝혀졌다.

실시에 13

제조제 내성을 부여하기위하여 돌연변이시킬 수 있는 옥수수 프로토クス-1 유전자에서의 부위 확인

상기한 바와 같은 pMut-1 아라비도프시스 프로토クス-1 플라스미드는 다른 플라스미드가 사용되는 경우 분리되는 빈번하게 출현하는 프로모터 돌연변이체와 대항하여, 높은 주기로 실제 암호화 서열 돌연변이체를 수득하는 돌연변이/선별 실험에서 사용될 경우 매우 효과적이다. 옥수수 프로토クス-1에 대해 효율적인 플라스미드 선별 시스템을 생성시키기위한 실험에서, 옥수수 cDNA를 아라비도프시스 cDNA와 대략 동일한 서열로 pMut-1 벡터 중으로 유전자 조작한다. 중첩하는 PCR 융합 방법을 사용하여, pMut-1 아라비도프시스 클론의 5' 말단(상기한 바와 같은 미스-센스 돌연변이를 1개 갖는 엽록체 운반 펩티드의 17개 아미노산을 포함함)을 옥수수 서열의 아미노산 번호 14(서열 6)에서 개시되는 옥수수 프로토クス-1 cDNA에 융합시킨다. 옥수수 cDNA의 3' 말단은 변화되지 않는다. NotI 제한 부위는 상기 융합체의 양쪽 말단에 위치하며, 키메릭 유전자를 pMut-1으로부터의 pFL61 플라스미드 골격중으로 클로닝시킨다. 서열 분석으로 단일 뉴클레오티드 PCR-유래된 사일런트 돌연변이는 뉴클레오티드 745-747(서열 5)에서의 ACG 코돈을 ACT 코돈으로 전환시키는 것으로 밝혀졌는데, 상기 코돈은 둘다 트레오닌을 암호화한다. 키메릭 Arab-옥수수 프로토クス-1 플라스미드를 pMut-3으로 표시한다.

상기 pMut-3 플라스미드로 상기한 바와 같이 돌연변이 XL1-Red 균주를 형질전환시키고 돌연변이된 DNA를 분리하여 비돌연변이 pMut-3 옥수수 프로토クス 유전자에 대해 치명적인 제조제 농도상에 플레이팅시킨다. 37℃에서 2일후 제조제 내성 콜로니를 분리시켜 상기한 바와 같이 분석한다. 상기 분석으로 다중 플라스미드가 제조제 내성 프로토クス 암호화 서열을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 서열 분석으로 5개의 단일 염기 변화가 각각 옥수수 프로토クス-1 효소가 제조제에 대해 내성이 되도록하는 것으로 밝혀졌다. 이들 돌연변이중 3개는 아라비도프시스 프로토クス-1 유전자중의 동종성 위치에 내성을 부여하는 것으로 이미 밝혀진 아미노산 변화에 대응한다. 3개중 2개는 pMzC-1Val 및 pMzC-1Thr로, 아미노산 164(서열 6)에서의 알라닌(GCT)을 발린(GAT) 또는 트레오닌(ACT)으로 전환시킨다. 상기 위치는 상기한 바와 같은 pAraC-1 돌연변이에 대응한다. 제3의 유사한 변화는 아미노산 165에서의 글리신(GGT)을 세린(AGT)으로 전환시키는데, 이는 상기한 바와 같은 AraC-3Ser 돌연변이에 대응한다. 이들은 식물 프로토クス 유전자에서 확인된 제조제-내성 돌연변이가 또한 다른 종으로부터의 대등한 식물 프로토クス 유전자에 제조제 내성을 부여할 수 있다는 예측을 입증하는 것이다.

옥수수 프로토クス-1 선별로부터 분리된 돌연변이중 2개는 제조제 내성 부위로 이전에 확인된 바 없는 잔기에서 아미노산을 변화시킨다. 변화중 하나는 옥수수 프로토クス-1 서열(서열 6)의 아미노산 159에서 시스테인(TGC)을 페닐알라닌(TTC)로 변화시킨다.

추가로 아미노산을 치환시켜 3개의 옥수수 돌연변이 부위에서 시험한다. 글리신 165가 류신으로 변화될 때 또는 시스테인 159가 류신 또는 리신으로 변화될 때 내성이 입증된다. 이소류신 419을 히스티딘, 글리신, 또는 아스파라긴으로 변화시킴으로써 내성 효소가 또한 발생된다.

제조제에 대해 고도로 내성인 아라비도프시스 프로토クス-1 효소를 생산하는 각각의 아미노산 변화는 상기한 바와 같은 부위-지시된 돌연변이에 의해 옥수수 프로토クス-1 유전자 중으로 유전자 조작한다. 세균 시험으로 아미노산 164(서열 6)에서의 알라닌(GCT)을 류신(CTT)으로 변화시키면 고도로 내성인 옥수수 효소가 생산됨을 입증한다. 아라비도프시스중의 AraC-2 부위와 유사한 돌연변이는 옥수수 랜덤 선별에서 분리되지 않는다. 그러나 상기 부위에서의 변화, 즉 옥수수 효소(서열 6)중 티로신 370을 이소류신 또는 메티오닌으로 변화시키면 제조제 내성 효소가 생산된다.

실시에 14

제조제 내성을 부여하기위하여 돌연변이시킬 수 있는 밀 프로토क्स-1 유전자에서의 부위 확인

밀 프로토क्स-1에 대해 효율적인 플라스미드 선별 시스템을 생성시키기 위하여, 밀 cDNA를 옥수수 cDNA에 대해서 상기한 바와 같이 pMut-1 벡터 중으로 유전자조작한다. 상기 키메릭 Arab-밀 프로토क्स-1 플라스미드를 pMut-4로 표시한다. pMut-4 DNA를 돌연변이시키고 상기한 바와 같이 제조제 내성에 대해 선별한다. 상기 분석으로 제조제 내성 프로토क्स 암호화 서열을 함유하는 다중 플라스미드가 밝혀진다. 서열 분석은 각각 제조제 내성 밀 프로토क्स 1 효소를 발생시키는 7개의 단일 염기 변화를 나타낸다. 이들 돌연변이중 4개는 아라비도프시스 및(또는) 옥수수 프로토क्स-1 유전자의 동종 위치에서 내성을 부여하는 것으로 이미 밝혀진 아미노산 변화에 상응한다. 2개는 아미노산 211(서열 10)에서 알라닌(GCT)을 발린(GAT) 또는 트레오닌(ACT)으로 전환시킨다. 상기 위치는 상기한 pAraC-1 돌연변이에 대응한다. 제3의 유사한 변화는 아미노산 212에서의 글리신(GGT)을 세린(AGT)으로 전환시키는데, 이는 상기한 AraC-3Ser 돌연변이에 대응한다. 제4의 변화는 아미노산 466에서 이소류신(ATA)을 트레오닌(ACA)으로 전환시키며, 이는 옥수수로부터의 Mz419Thr 돌연변이체에 대응한다.

밀 프로토क्स-1 선별로부터 분리된 돌연변이중 3개는 제조제 내성 부위로 이전에 확인된 바 없는 잔기에서 아미노산을 변화시킨다. 이중 하나는 밀 프로토क्स-1 서열(서열 10)의 아미노산 356에서 발린(GTT)을 류신(CTT)으로 전환시킨다. 두 번째 것은 아미노산 421에서 세린(TCT)을 프롤린(CCT)으로 전환시킨다. 세 번째 것은 아미노산 502에서 발린(GTT)을 알라닌(GCT)으로 전환시킨다.

실시예 15

제조제 내성을 부여하기위하여 돌연변이시킬 수 있는 대두 프로토क्स-1 유전자에서의 부위 확인

대두 프로토क्स-1에 대해 효율적인 플라스미드 선별 시스템을 생성시키기 위하여, 대두 cDNA를 옥수수 cDNA에 대해서 상기한 바와 같이 pMut-1 벡터 중으로 유전자 조작한다. 상기 키메릭 Arab-대두 프로토क्स-1 플라스미드를 pMut-5로 표시한다. pMut-5 DNA를 돌연변이시키고 상기한 바와 같이 제조제 내성에 대해 선별한다. 상기 분석으로 제조제 내성 프로토क्स 암호화 서열을 함유하는 다중 플라스미드가 밝혀진다. 서열 분석은 각각 제조제 내성 대두 프로토क्स 1 효소를 발생시키는 4개의 단일 염기 변화를 나타낸다. 이들 돌연변이중 2개는 아라비도프시스 및 (또는) 밀 프로토क्स-1 유전자중 동종 위치에서 내성을 부여하는 것으로 이전에 밝혀진 아미노산 변화에 대응한다. 하나는 아미노산 226(서열 12)에서 알라닌(GCA)을 트레오닌(ACA)으로 전환시킨다. 상기 위치는 상기한 pAraC-1Thr 돌연변이에 대응한다. 제2의 유사한 변화는 아미노산 517에서 발린(GTT)을 알라닌(GCT)으로 전환시키며, 이는 밀로부터의 Wht502Val 돌연변이에 대응한다.

대두 프로토क्स-1 선별로부터 분리된 돌연변이중 2개는 제조제 내성 부위로 이미 확인된 바 없는 잔기에서 아미노산을 변화시킨다. 하나는 대두 프로토क्स-1 서열(서열 12)의 아미노산 369에서 프롤린(CCT)을 세린(TCT)으로 전환시킨다.

제조제 내성이 높은 아라비도프시스 프로토क्स-1 효소를 생산하는 각각의 아미노산 변화를 상기한 바와 같은 부위 지시된 돌연변이에 의해 대두 프로토क्स-1 유전자중으로 유전자 조작한다. 세균 시험은 아미노산 226(서열 12)에서 알라닌(GCA)을 류신으로 변화시키면 내성 대두 효소가 생산되는 것으로 밝혀졌다. 아미노산 432(서열 12)에서 티로신(TAC)을 류신 또는 이소류신으로 변화시키면 또한 제조제 내성 효소가 생산된다.

실시예 16

제조제 내성을 부여하기위하여 돌연변이시킬 수 있는 사탕무 프로토क्स-1 유전자에서의 부위 확인

사탕무 프로토क्स-1에 대해 효율적인 플라스미드 선별 시스템을 생성시키기 위하여, 사탕무 cDNA를 옥수수 cDNA에 대해서 상기한 바와 같이 pMut-1 벡터 중으로 유전자 조작한다. 상기 키메릭 Arab-사탕무 프로토क्स-1 플라스미드를 pMut-6으로 표시한다. pMut-6 DNA를 돌연변이시키고 상기한 바와 같이 제조제 내성에 대해 선별한다. 상기 분석으로 제조제 내성 프로토क्स 암호화 서열을 함유하는 다중 플라스미드가 밝혀진다. 서열 분석은 제조제 내성 사탕무 프로토क्स 1 효소를 발생시키는 단일 염기 변화를 나타낸다. 상기 변화는 아미노산 449에서 티로신(TAC)을 시스테인(TGC)으로 전환시키고 아라비도프시스중 AraC-2 돌연변이와 유사하다.

제조제 내성이 높은 아라비도프시스 프로토क्स-1 효소를 생성시키는 각각의 아미노산 변화를 상기한 바와 같은 부위 지시된 돌연변이에 의해 사탕무 프로토क्स-1 유전자 중으로 유전자 조작한다. 세균 시험으로 아미노산 449에서 티로신(TAC)을 류신, 이소류신, 발린, 또는 메티오닌으로 변화시키면 제조제 내성 사탕무 효소가 생성되는 것으로 입증된다.

실시예 17

제조제 내성을 부여하기 위하여 돌연변이시킬 수 있는 면화 프로토스-1 유전자에서의 부위 확인

면화 프로토스-1에 대해 효율적인 플라스미드 선별 시스템을 생성시키기 위하여, 면화 cDNA를 옥수수 cDNA에 대해서 상기한 바와 같이 pMut-1 벡터 증으로 유전자 조작한다. 상기 키메릭 Arab-면화 프로토스-1 플라스미드를 pMut-7로 표시한다. pMut-7 DNA를 돌연변이시키고 상기한 바와 같이 제조제 내성에 대해 선별한다. 상기 분석으로 제조제 내성 프로토스 암호화 서열을 함유하는 다중 플라스미드가 밝혀진다. 서열 분석은 각각 제조제 내성 면화 프로토스 1 효소를 발생시키는 3개의 단일 염기 변화를 나타낸다. 2개의 돌연변이체는 각각 아미노산 428(서열 16)에서 티로신(TAC)을 시스테인(TGC) 및 아르기닌(CGC)으로 변화시킨다. 아르기닌은 이미 확인된 AraC-2 부위에서 내성을 부여하는 신규한 치환이다. 제3의 돌연변이는 아미노산 365에서 프롤린(CCC)을 세린(TCC)으로 전환시킨다. 상기 변화는 대두 돌연변이체 Soy369Ser에 대응한다.

실시예 18

내성 돌연변이의 여러가지 프로토스-억제 화합물에 대해 교차-내성의 증명

단일 프로토스 억제 제조제에 대한 내성을 기준으로하여 원래 확인된, 내성 돌연변이체 플라스미드를 다른 프로토스 억제 화합물의 스펙트럼에 대해 시험한다. 이 시험의 경우, 야생형 플라스미드를 함유하는 SASX38 균주를 각 화합물의 농도 범위 상에 플레이팅시켜 각각에 대한 치사 농도를 결정한다. SASX38중 내성 돌연변이 플라스미드를 플레이팅하여 야생형 플라스미드를 함유하는 SASX38 균주에 대해 치사량인 농도 보다 10배 이상 더 높은 농도에서의 각 화합물에서의 생존 능력에 대해 평가한다.

하기 표 3A 및 3B에 설명된 세균의 교차-내성 시험으로부터의 결과는 확인된 각각의 돌연변이가 여러가지 프로토스 억제 화합물에 대한 내성을 부여함을 나타낸다.

[표 3A]

다양한 프로토스 억제제에 대한 식물 프로토스 돌연변이의 교차 내성

화합식	AraC-1Val	AraC-2Cys	AraC-1Thr	AraC-3Thr	MzC-1Val
XVII	+	+	+	+	+
VIIa	+	+	+	-	+
IV	++	-	++	++	-
XV	+	+	+	+	+
XI	-	+	+	++	+
XVI	-	-	-	-	+
XII	+	-	++	++	++
XIV	+	-	+	+	+
*X					
+ = WT 보다 10배 이상의 내성 ++ = WT 보다 100배 이상의 내성 - = 교차 내성 없음 * = 본 화합물 시험되었지만 어떠한 정보도 제공하지 못함					

[표 3B]

다양한 프로토스 억제제에 대한 식물 프로토스 돌연변이의 교차 내성

	AraC- 1Leu	AraC- 2Ile	AraC- 1Leu + AraC- 2Met	AraC- 1Leu + AraC- 2Leu	AraC- 2Ile + AraC3 05Leu	AraC- 2Cys + AraC425 Ser	AraC- 2Leu + AraC425 Ser	AraC- 2Met + AraC425 Ser
XVII	+	+	+	+	+	+	+	+
VIIa	++	++	++	++	++	++	++	++
IV	++	-	+	++	+	-	+	+
XV	++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++
XI	++	++	++	++	++	++	++	++
XVI	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	++
XII								
XIV	++	++	++	++	++	-	++	++

섹션 C: 형질전환된 식물중에서 제초제-내성 프로토스 유전자의 발현

실시예 19

동종성 재조합 또는 유전자 전환에 의한 프로토스-억제 제초제에 대한 내성 식물의 유전자 조작

기술된 돌연변이체 암호화 서열이 천연 프로토스 프로모터의 조절하에서 발현될 경우 제초제 내성을 효과적으로 부여하기 때문에, 천연 염색체 위치 중에서 프로토스 암호화 서열에 대해 표적화된 변화는 제초제 내성 식물과 식물 세포를 발생시키기 위한 다른 방법을 나타낸다. 목적하는 돌연변이를 함유하지만, 자체적인 발현 시그널(프로모터 또는 3' 비해독 영역)이 결여되어 있는 프로토스 DNA 단편을 몇몇 당해 분야에 숙지된 방법(예를 들면, 아그로박테리움 형질전환, 원형질체로의 직접적인 유전자 전달, 미세발사성 충돌)으로 도입시켜 제초제-내성 형질전환체를 선택할 수 있다. 도입된 DNA 단편은 또한 암호화된 아미노산 서열을 변화시키지 않고 (즉, 사일런트 돌연변이) 부위-지시된 시험관내 돌연변이에 의해 도입되는 진단 제한 효소 부위 또는 다른 서열 다형성을 함유한다. 여러가지 선택성 마커 및 제초제 내성 유전자에 대해 이미 보고된 바 있는 바와 같이(참조: Paszkowski et al., EMBO J. 7:4021-4026 (1988); Lee et al., Plant Cell 2: 415-425 (1990); Resseeuw et al., Plant J. 7:109-119 (1995)), 일부 형질전환체는 돌연변이 DNA가 프로토스 염색체 좌로 동정적으로 집합되는 것, 또는 천연 프로토스 염색체 서열이 도입된 돌연변이 서열로 전환되는 것으로 부터 발생하는 것으로 밝혀졌다. 이들 형질전환체는 이들의 제초제-내성 표현형, 및 이들의 프로토스 염색체좌중 진단적 제한 효소의 존재에 의해 인정된다.

실시예 20

식물 형질전환 벡터의 작제

식물 형질전환용으로 수많은 형질전환 벡터를 입수할 수 있으며, 본 발명의 유전자를 상기와 같은 벡터와 함께 사용할 수 있다. 사용하기 위한 벡터의 선택은 바람직한 형질전환 기술 및 형질전환시키기 위한 표적 종에 따른다. 특정 표적의 경우, 상이한 항생제 또는 제초제 선택 마커가 바람직할 수 있다. 형질전환에 통상적으로 사용되는 선택 마커로는 가나마이신과 관련 항생제에 대해 내성을 부여하는 nptII 유전자(Messing & Vierra, Gene 19: 259-268 (1982); Beran et al., Nature 304:184-187 (1983)), 제초제 포스포트리신에 대한 내성을 부여하는 bar 유전자(White et al., Nucl Acids Res 18:1062 (1990), Spencer et al. Theor Appl Genet 79:625-631 (1990)), 항생제 하이그로마이신에 대한 내성을 부여하는 hph 유전자(Biochinger & Diggelmann, Mol Cell Biol 4:2929-2931), 및 메토틱렉세이트에 대한 내성을 부여하는 dhfr 유전자(Bourouis et al., EMBO J. 2(7):1099-1104(1983))가 있다.

I. 아그로박테리움 형질전환용으로 적합한 벡터의 작제

아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 사용하는 형질전환용으로 수 많은 벡터를 입수할 수 있다. 이들은 전형적으로 적어도 1개의 T-DNA 경계 서열을 포함하며 pBIN19(Bevan, Nucl. Acids Res. (1984)) 및 pXYZ와 같은 벡터가 있다. 하기 2개의 전형적인 벡터의 작제가 기술된다.

pCIB200과 pCIB2001의 작제: 아그로박테리움에 대해 사용하기 위한 재조합 벡터의 작제용으로 바이너리(binary) 벡터 pCIB200과 pCIB2001을 사용하여 다음 방법으로 작제한다. pTJS75(Schmidhauser & Helinski, J Bacteriol. 164: 446-455 (1985))를 NarI 분해시켜 테트라사이클린-내성 유전자를 절단시킨 다음, NPTII을 포함하는 pUC4K(Messing & Vierra, Gene 19: 259-268 (1982); Bevan et al., Nature 304:184-187 (1983); McBride et al., Plant Molecular Biology 14:266-276 (1990))로부터의 AccI 단편을 삽입시켜 pTJS75kan을 생성시킨다. XhoI 링커를 좌측 및 우측 T-DNA 경계, 식물 선택성 nos/nptII 키메라 유전자 및 pUC 폴리링커(Rothstein et al., Gene 53: 153-161 (1987))를 함유하는 pCIB7의 EcoRV 단편에 결합시키고, XhoI-분해된 단편을 SalI-분해된 pTJS75kan중으로 클로닝시켜 pCIB200을 생성시킨다(참조: EP 0 332 104, 실시예 19). pCIB200은 하기 독특한 폴리링커 제한 부위를 함유한다: EcoRI, SstI, KpnI, BglII, XbaI, 및 SalI. pCIB2001은 pCIB200의 유도체로, 이는 다른 제한 부위의 폴리링커 중으로 삽입시켜 생성시킨다. pCIB2001의 폴리링커중 독특한 제한 부위는 EcoRI, SstI, KpnI, BglI, XbaI, SalI, MluI, BclI, AvrII, ApaI, HpaI, 및 StuI이다. 이들 독특히 제한 부위를 함유하는 것외에, pCIB2001은 또한 식물 및 세균성 가나마이신 선택성, 아그로박테리움-매개된 형질전환용 좌 및 우측 T-DNA 경계, 이. 콜리과 다른 숙주간의 이동용 RK2-유래 trfA 기능, 및 RK2로부터의 OriT 및 OriV 기능을 갖는다. pCIB2001 폴리링커는 자체적인 조절 시그널을 함유하는 식물 발현 카세트의 클로닝용으로 적합하다.

pCIB10 및 이들의 하이그로마이신 선택 유도체의 작제: 바이너리 벡터 pCIB10은 식물 중에서의 선택을 위한 가나마이신 내성을 암호화하는 유전자, T-DNA 우 및 좌측 경계 서열을 함유하며 이. 콜리 및 아그로박테리움 둘다에서 복제되도록 하는 야생 숙주-범위 플라스미드 pRK252로부터의 서열을 포함한다. 이의 작제는 문헌: Rothstein et al., Gene 53: 153-161 (1987)에 기술되어 있다. pCIB10의 여러가지 유도체가 작제되었는데 문헌에 기술된 하이그로마이신 B 포스포트랜스퍼라제에 대한 유전자를 포함한다(Gritz et al., Gene 25: 179-188(1983)). 이들 유도체는 하이그로마이신에 대해서만 (pCIB743), 또는 하이그로마이신 및 가나마이신에 대해서 (pCIB715, pCIB717) 형질전환된 식물 세포를 선택할 수 있도록 한다.

II. 비-아그로박테리움 형질전환용으로 적합한 벡터의 작제.

아그로박테리움 투메파시엔스를 사용하지 않는 형질전환은 선택된 형질전환 벡터중 T-DNA 서열에 대한 요구조건을 피하게 되며 결과적으로 T-DNA 서열을 함유하는 상기한 것 중 하나와 같은 벡터외에 이들 서열이 결여되어 있는 벡터를 사용할 수 있다. 아그로박테리움에 의존하지 않는 형질전환 기술로는 입자 충돌, 원형질체 흡수(예, PEG 및 전기천공) 및 미세주입을 통한 형질전환법이 있다. 벡터의 선택은 대부분 형질전환시킬 종에 대해 바람직한 선택에 따른다. 이후, 일부 전형적인 벡터의 작제를 기술한다.

pCIB3064의 작제: pCIB3064는 제초제 바스타(또는 포스포노트리신)에 의해 선택과 함께 직접적인 유전자 전달 방법으로 적합한 pUC-유래 벡터이다. 플라스미드 pCIB246은 이. 콜리 GUS 유전자와 CaMV 35S 전사 종결인자에 기능적 융합식으로 CaMV 35S 프로모터를 포함하며 PCT 공개 공보 WO 93/07278에 기술되어 있다. 상기 벡터의 35S 프로모터는 개시 부위의 ATG 서열 5'를 2개 함유한다. 표준 PCT 기술을 사용하여 이들 부위를 ATG's가 제거되어 제한 부위 SspI 및 PvuII을 발생시키는 방식으로 돌연변이시킨다. 신규한 제한 부위는 독특한 SalI 부위로부터 96 및 37bp 떨어져 있으며 실제적인 개시 부위로부터는 101 및 42bp 떨어져 있다. 생성된 pCIB246의 유도체를 pCIB3025로 표시한다. 이어서 SalI 및 SacI로 분해시켜 pCIB3025로부터 GUS 유전자를 절단하여, 말단을 평활시킨 다음 재결합시켜 플라스미드 pCIB3060을 발생시킨다. 플라스미드 pJIT82는 John Innes Centre, Norwich로부터 수득하여 스트렙토마이세스 비리도크로모겐(*Streptomyces viridochromogenes*)로부터의 bar 유전자를 함유하는 400bp SmaI 단편을 절단한 다음, pCIB3060의 HpaI 부위중에 삽입한다(Thompon et al. EMBO J 6:2519-2523 (1987)). 이는 CaMV 35S 프로모터 및 제초제 선택용 종결인자의 조정하에서 bar 유전자, 암시실린 내성에 대한 유전자(이. 콜리 중에서의 선택용) 및 독특한 부위 SphI, PstI, HindIII, 및 BamHI를 갖는 폴리링커를 포함하는 pCIB3064를 발생시킨다. 상기 벡터는 이들 자체의 조절 시그널을 함유하는 식물 발현 카세트의 클로닝에 적합하다.

pSOG19 및 pSOG35의 작제: pSOG35는 메토크세이트에 대한 내성을 부여하는 선택성 마커로서 이. 콜리 디히드로폴레이트 리덕타제(DHFR)를 이용하는 형질전환 벡터이다. PCR을 사용하여 35S 프로모터(~800 bp), 옥수수 Adh1 유전자로부터의 인트론 6(~550 bp) 및 pSOG10으로부터의 GUS 비해독 리더 서열중 18 bp를 증폭시킨다. 이. 콜리 디히드로폴레이트 리덕타제 타입 II 유전자를 암호화하는 250bp 단편을 또한 PCR로 증폭시키고 이들 2개의 PCR 단편은 pUC 벡터

골격과 노팔린 신타제 종결인자를 포함하는, pB1221(Clontech)로부터의 SacI-PstI 단편과 함께 집합시킨다. 이들 단편을 집합시킴으로써 pSOG19가 생성되며, 이는 인트론 6 서열, GUS 리더, DHFR 유전자 및 노팔린 신타제 종결인자를 갖는 융합체중에 35S 프로모터를 함유한다. pSOG19중의 GUS 리더를 옥수수 클로로틱 모틀 바이러스(Maize Chlorotic Mottle Virus; MCMV)로부터의 리더 서열로 대체시키면 벡터 pSOG35가 생성된다. pSOG19 및 pSOG35는 암피실린 내성용 pUC 유전자를 포함하며 외부 서열의 클로닝으로부터 입수할 수 있는 HindIII, SphI, PstI 및 EcoRI 부위를 갖는다.

실시에 21

식물 발현 카세트의 작제

형질전환된 식물에서 발현시키기 위한 유전자 사열을 먼저 발현 카세트중 적합한 프로모터와 적합한 전사 종결인자의 상부 스트림 뒤에 집합시킨다. 이어서 이들 발현 카세트를 실시예 20에 기술된 식물 형질전환 벡터로 용이하게 운반할 수 있다.

I. 프로모터 선택

발현 카세트에서 사용되는 프로모터의 선택은 형질전환된 식물에서 형질전환 유전자의 공간적 및 주기적 발현 패턴을 결정한다. 선택된 프로모터는 특정 세포 타입(예로서 잎 상피 세포, 중피 세포, 뿌리 피질 세포) 또는 특정 조직 또는 기관(예를 들어 뿌리, 잎 또는 꽃)에서 발현시키고 상기 선택은 목적하는 위치의 형질전환 유전자 발현을 반영하는 것이다. 별법으로, 선택된 프로모터는 광-유발 또는 기타 주기적으로 조절되는 프로모터하에서 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 이는 목적하고 화학 유발제에 의한 처리로 유발된 경우에만 형질전환 유전자의 발현을 유발시킬 수 있는 가능성을 제공한다.

II. 전사 종결인자

발현 카세트에 사용하기 위한 여러가지 전사 종결인자를 입수할 수 있다. 이들은 형질전환 유전자 뒤의 전사 종결과 정확한 폴리아데닐화에 있어서 역할을 한다. 적합한 전사 종결인자는 식물에서 작용하는 것으로 공지된 것이며 CaMV 35S 종결인자, tml 종결인자, 노팔린 신타제 종결인자, pea rbcS E9 종결인자 뿐만 아니라 식물 프로토스 유전자와 천연적으로 관련된 종결인자(즉, "프로토스 종결인자")가 있다. 이들은 단자엽식물 및 쌍자엽식물 둘다에서 사용될 수 있다.

III. 발현 향상 또는 조절용 서열

수많은 서열이 전사 유니트내에서 유전자 발현을 향상시키는 것으로 밝혀졌으며 이들 서열은 본 발명의 유전자와 함께 사용하여 형질전환된 식물 중에서 이들의 발현을 증가시킬 수 있다.

여러가지 인트론 서열은 특히 단자엽 세포에서의 발현을 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 예를 들면, 옥수수 Adh1 유전자의 인트론은 옥수수 세포중으로 도입될 경우 이의 동종 프로모터하에서 야생형 유전자의 발현을 확실하게 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 인트론 1은 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 유전자를 갖는 융합 작제물중에서의 발현에 있어서 부분적으로 효과적이며 증가시키는 것으로 밝혀졌다(Callis et al., Genes Develop. 1: 1183-1200 (1987)). 동일한 실험 시스템으로, 옥수수 브론즈1 유전자로부터의 인트론은 발현을 증가시키는데 있어서 유사한 효과를 가졌다(Callis et al., 상기). 인트론 서열은 통상적으로 식물 형질전환 벡터, 전형적으로 비-해독 리더내에 포함시킨다.

바이러스로부터 유도된 수많은 비-해독 리더 서열이 또한 발현을 증가시키는 것으로 공지되었으며, 이들은 쌍자엽식물 세포에서 특히 효과적이다. 상술하면, 담배 모자이크 바이러스로부터 (TMV, "W-서열"), 옥수수 클로로틱 모틀 바이러스(MCMV), 및 알팔파 모자이크 바이러스(AMV)의 리더 서열이 발현을 향상시키는데 효과적인 것으로 밝혀졌다(예를 들면, Gallie et al. Nucl. Acids Res. 15:8693-8711 (1987); Skuzeski et al. Plant Molec. Biol. 15:65-79 (1990)).

IV. 세포내에서 유전자 생성물의 표적화

유전자 생성물을 표적화하기 위한 여러가지 메카니즘이 식물중에 존재하는 것으로 공지되어 있으며 이들 메카니즘의 기능을 조정하는 서열이 어느 정도 상세하게 특징화되어 있다. 예를 들면, 유전자 생성물을 엽록체로 표적화시키는 것은 여러가지 단백질의 아미노 종결 말단에서 발견되고 엽록체가 완전 단백질 생성물을 들여오는 동안 분해되는 시그널 서열에 의해 조절된다(예, Comai et al. J. Biol. Chem. 263: 15104-15109 (1988)). 이들 서열을 이중성 유전자 생성물에 융합시켜 이중성 생성물의 엽록체로의 운반을 수행할 수 있다(van den Broeck et al. Nature 313: 358-363 (1985)). 적합한 시그널 서열을 암호화하는 DNA는 RUVISCO 단백질, CAB 단백질, EPSP 신타제 효소, GS2 단백질 및 엽록체 편재화시키는 것으로 공지된 수많은 다른 단백질을 암호화하는 cDNAs의 5' 말단으로부터 분리시킬 수 있다.

다른 유전자 생성물을 미토콘드리아 및 퍼옥시좀과 같은 다른 기관에 편재시키다(예, Unger et al. *Plant Molec. Biol.* 13: 411-418 (1989)). 이들 생성물을 암호화하는 cDNAs는 또한 이중성 유전자 생성물을 이들 기관으로 표적화시키도록 조작시킬 수 있다. 그러한 서열의 예로는 핵-암호화된 ATP아제 및 미토콘드리아에 대한 특정 아스파테이트 아미노 트랜스퍼라제 동등형이 있다. 세포 단백질체로의 표적화는 다음 문헌에 기술되어 있다: Rogers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6512-6516 (1985)).

또한 유전자 생성물을 다른 세포 구획으로 표적화시키는 서열이 특징화 되어 있다. 아미노 종결 서열은 ER, 아포플라스트로 표적화시키고, 호분 세포로부터의 세포외 분비에 역할을 한다(Koehler & Ho, *Plant Cell* 2: 769-783 (1990)). 또한, 아미노 종결 말단은 카복시 종결 말단과 함께 유전자 생성물의 액포 표적화에 역할을 한다(Shishi et al., *Plant Molec. Biol.* 14: 357-368 (1990)).

상기한 적합한 표적화 서열을 대상이 되는 형질전환 유전자 서열에 융합시킴으로써 형질전환 유전자 생성물이 기관 또는 세포 구획으로 향하도록 할 수 있다. 엽록체 표적화의 경우, 예를 들면, RUBISCO 유전자, CAB 유전자, EPSP 신타제 유전자, 또는 GS2 유전자로부터의 엽록체 시그널 서열을 형질전환 유전자의 아미노 종결 ATG에 대한 프레임에 융합시킨다. 선택된 시그널 서열은 공지된 분해 부위를 포함하여야 하며 작제된 융합물을 분해용으로 필요한 분해 부위 이우의 아미노산을 고려하여야 한다. 일부 경우에 있어서 상기 요구조건을 분해 부위와 형질전환 유전자 ATG 사이에 적은수의 아미노산을 첨가함으로써 또는 별법으로 형질전환 유전자 서열내의 일부 아미노산을 대체시킴으로써 충족시킬 수 있다. 엽록체 운반용으로 작제된 융합체는 문헌에 기술된 방법을 이용하여 시험관내 해독 또는 시험관내 전사된 작제물에 따른 생체내 엽록체 흡수 효과에 대해 시험할 수 있다(Bartlett et al. In Edelman et al. (Eds.) *Methods in Chloroplast Molecular Biology*, Elsevier, pp. 1081-1091 (1982); Wasmann et al. *Mol. Gen. Genet.* 205: 446-453 (1986)). 이들 작제 기술은 당해 분야에 숙지되어 있으며 미토콘드리아와 퍼옥시좀에 대등하게 적용할 수 있다. 형질전환 유전자의 발현을 위하여 필요할 수 있는 표적화 선택은 제공되는 경로에 대한 개시점으로서 요구되는 전구체의 세포 편재화에 따른다. 일부 경우에 있어서 미토콘드라이성 또는 퍼옥시좀성일 수 있지만 이는 통상적으로 세포질성 또는 엽록체성이다. 형질전환 유전자 발현 생성물은 통상적으로 ER, 아포플라스트 또는 액포로 표적화시킬 필요가 없다.

세포 표적화에 대해 상기한 메카니즘은 이들의 동족 프로모터와 관련해서 뿐만 아니라, 이중성 프로모터와 관련해서도 이용될 수 있어 표적화 시그널이 유도되는 프로모터와는 상이한 발현 패턴을 갖는 프로모터의 전사 조절하에서 특정 세포 표적화 목표를 수행할 수 있다.

실시예 22

쌍자엽식물의 형질전환

쌍자엽 식물에 대한 형질전환 기술은 당해 분야에 숙지되어 있으며 아그로박테리움-기본 기술과 아그로박테리움을 필요로 하지 않는 기술이 있다. 비-아그로박테리움 기술은 외인성 유전 물질을 원형질체 또는 세포에 의해 직접 흡수시키는 단계를 포함한다. 이는 PEG 또는 전기영동 매개된 흡수, 입자 충돌-매개된 운반, 또는 미세주입에 의해 수행할 수 있다. dlefm 기술의 예가 하기 문헌에 기술되어 있다: Paszkowski et al., *EMBO J* 3: 2717-2722 (1984), Potrykus et al., *Mol. Gen. Genet.* 199: 169-177 (1985), Reich et al., *Biotechnology* 4: 1001-1004 (1986), 및 Klein et al., *Nature* 327: 70-73 (1987). 각 경우에 있어서 형질전환된 세포는 당해 분야에 공지된 표준 기술을 이용하여 전체 식물로 재생시킨다.

아그로박테리움-매개된 형질전환은 형질전환 효율이 높고 수많은 상이한 종에 대해 이용도가 광범위하기 때문에 쌍자엽 식물의 형질전환용으로 바람직한 기술이다. 통상적으로 아그로박테리움으로 형질전환시킬 수 있는 수 많은 작물종으로는 담배, 토마토, 해바라기, 면화, 유종자 평지, 감자, 대두, 알팔파, 및 포폴라가 있다(EP 0 317 511(면화), EP 0 249 432(토마토; Calgene), WO 87/07299(브라시카(Brassica); Calgene), US 4,795,855(포폴라)).

재조합 아그로박테리움에 의한 표적 식물종의 형질전환은 통상적으로 식물로부터의 외부식물과 아그로박테리움의 동시-배양 단계를 포함하며 당해 분야에 숙지된 프로토콜에 따른다. 형질전환된 조직을 바이너리 플라스미드 T-DNA 경계 사이에 존재하는 항생제 또는 제초제 내성 마커를 포함하는 선택성 배지상에서 재생시킨다.

실시예 23

단자엽 식물의 형질전환

대부분의 단자엽 식물종의 형질전환은 이제 통상인 것으로 되었다. 바람직한 기술로는 PEG 또는 전기영동 기술, 및 유합 조직 중으로의 입자 충돌을 사용한 원형질체로의 직접적인 유전자 전달법이 있다. 형질전환은 단일 DNA종 또는 다중 DNA종(즉, 동시적인-형질전환)을 사용하여 수행할 수 있으며 이들 기술 둘다 본 발명에서 사용하기에 적합하다. 동시-형질전환은 복잡한 벡터 작제 단계를 피하여 대상이 되는 유전자 및 선택성 마커에 대해 비결합된 좌를 갖는 형질전환된 식물을 생성시키는 잇점을 가질 수 있는데, 후속되는 생성에서 선택성 마커를 제거할 수 있다는 것은 바람직한 것으로 간주되어야 한다. 그러나, 동시-형질전환의 단점은 별개의 DNA 종이 게놈중으로 집합하는 비율이 100% 미만인 것이다 (Schocher et al. *Biotechnology* 4: 1093-1096 (1986)).

특허원 EP 0292 435(Ciba-Geigy), EP 0 392 225(Ciba-Geigy) 및 WO 93/07278(Ciba-Geigy)에는 염선된 옥수수 종자로부터의 식물조직 및 원형질체의 제조, PEG 또는 전기영동법을 사용한 원형질체의 형질전환, 및 형질전환된 원형질체로부터의 옥수수 식물의 재생 기술이 개시되어 있다. 문헌: Kamm et al., *Plant Cell* 2: 603-618 (1990) 및 Fromm et al., *Biotechnology* 8: 833-839 (1990)에는 입자 충돌법을 이용한 A188-유래 옥수수종의 형질전환 방법이 공개되어 있다. 또한 WO 93/07278(Ciba-Geigy) 및 문헌: Koziel et al., *Biotechnology* 11: 194-200 (1993)에는 입자 충돌법에 의해 옥수수 우량종을 형질전환시키는 방법이 기술되어 있다. 상기 기술은 수분후 14 내지 15일 경과후 옥수수 이상으로부터 절단한 1.5 내지 2.5mm 길이의 미성숙 옥수수 배와 충돌용으로 PDS-1000He Biolistics 장치를 이용한다.

쌀의 형질전환은 또한 원형질체 또는 입자 충돌법을 이용하는 직접적인 유전자 전달 기술로 수행할 수 있다. 원형질체-매개된 형질전환법은 자포니카-타입 및 인디카-타입에 대해 다음 문헌에 기술되어 있다: Zhang et al., *Plant Cell Rep* 7: 379-384 (1988); Shimimoto et al., *Nature* 338: 274-277 (1989); Datta et al. *Biotechnology* 8: 736-740 (1990). 상기 타입 둘다 통상적으로 입자 충돌법을 이용하여 형질전환시킨다(Christou et al., *Biotechnology* 9: 957-962 (1991)).

특허원 EP 0332 581(Ciba-Geigy)에는 포오이데애(Pooideae) 원형질체의 발생, 형질전환 및 재생 기술이 기술되어 있다. 이들 기술은 닥틸리스(Dactylis)와 밀을 형질전환시킨다. 또한, 타입 C 장기간 재생가능성 식물조직의 세포중으로 입자를 충돌시키는 방법을 이용하는 밀 형질전환에 대해서는 문헌: Vasil et al., *Biotechnology* 10: 667-674 (1992)에, 미성숙 배 및 미성숙 배-유래 조직의 입자 충돌법을 이용하는 형질전환에 대해서는 문헌: Vasil et al., *Biotechnology* 11: 1553-1558 (1993) 및 Weeks et al., *Plant Physiol.* 102: 1077-1084 (1993)에 기술되어 있다. 그러나, 밀 형질전환에 대해 바람직한 기술은 미성숙 배의 입자 충돌에 의한 밀의 형질전환이며 유전자 운반전에 높은 슈크로스 또는 높은 말토오스 단계를 포함한다. 충돌전에, 일정수의 배(길이 0.75 내지 1mm)를 3% 슈크로스(Murashige & Skoog, *Physiologia Plantarum* 15: 473-497 (1962)) 및 체세포 배를 유발시키기위하여 3mg/l의 2,4-D를 함유하는 MS 배지상에 플레이팅하여, 이를 암실에서 진행시킨다. 선택한 충돌날, 유발 재지로부터 배를 제거하여 오소모티쿰(즉, 목적하는 농도, 전형적으로 15%로 슈크로스 또는 말토오스가 첨가된 유발 배지)상에 플레이팅시킨다. 배를 2 내지 3시간 동안 원형질분해시킨 다음 충돌시킨다. 표적 플레이트당 20개의 배가 전형적이지만, 임계적인 것은 아니다. 적합한 유전자-포함 플라스미드(pCIB3064 또는 pSG35와 같은)를 표준 공정을 이용하여 마이크로미터 크기의 금분상으로 침전시킨다. 각 플레이트의 배를 DuPont Biolistics, 헬름 장치로 표준 80 메쉬 스크린을 이용하여 ~1000psi의 생산 압력으로 쏘핑시킨다. 충돌후, 배를 다시 암실에 놓고 약 24시간 동안(오소모티쿰 상에서) 회수한다. 24시간후, 오소모티쿰으로부터 배를 회수하여 유발 배지상에 다시 놓는데, 여기서 이들은 재생시키기전 약 1개월간 체류시킨다. 대략 1개월이 경과된 후 성장하는 배발생 조직을 갖는 배 이식물을 추가로 적합한 선택제(pCIB3064의 경우 10mg/l 바스타 및 pSOG35의 경우 2mg/l 메토평트렉세이트)를 함유하는, 재생 배지(MS + 1 mg/l GA)로 옮긴다. 대략 1개월후, 성장한 가지를 절반 농도의 MS, 2% 슈크로스, 및 동일한 농도의 선택제를 함유하는 "GA7s"로 공지된 대용량 멸균 컨테이너로 옮긴다. 특허원 WO 94/13822에는 밀 형질전환 방법이 기술되어 있으며 이는 본 명세서에서 참고 문헌으로 인용된다.

실시예 24

아라비도프시스 탈리아나 프로토스-1 프로모터 서열의 분리

아라비도프시스 탈리아나로부터 제조된 람다 Zap II 게놈성 DNA 라이브러리(Columbia, 전체 식물)를 Stratagene으로부터 구입한다. 대략 125,000 파아지를 페트리 디쉬 15cm 당 25,000pfu의 밀도로 플레이팅하고 복사 용기물을 콜로니/플라크 스크린막(NEN Dupont) 상에 확립한다. 플라크 용기물을 아라비도프시스 프로토스-1 cDNA(서열 1; 랜덤 프라이밍법(Life Technologies)을 이용하여 32P-dCTP로 표지시킴)로 프로브화한다. 하이브리드화 및 세척 조건은 문헌(Church and Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1991-1995 (1984))에 기술된 바와 같이 65°C이다. 포지티브하게 하이브리드화하는 플라크를 정제하고 생체내에서 p블루스크립트 플라스미드 중으로 절단한다. 게놈성 DNA 삽입물로부터의 서열을 형광 염료로 표지시킨 디데옥시 종결인자(Applied Biosystems, Inc.)를 사용하는 쉐 종결법으로 결정한다. 클론중 하나인, AraPT1Pro는 프로토스-1 단백질 암호화 서열의 개시 메티오닌(ATG)으로부터의 아라비도프시스 서열의 580

bp를 함유하는 것으로 측정되었다. 상기 클론은 또한 프로토스-1 cDNA 서열의 bp 1241로 확장되는 암호화 서열과 인트론을 함유한다. 580 bp 5' 비암호화 단편은 추정되는 아라비도프시스 프로토스-1 프로모터이고, 상기 서열은 서열 13에 나타난다.

AraPT1Pro는 1995년 12월 15일자로 pWDC-11 (NRRL #B-21515)로 기탁되었다.

실시예 25

천연 아라비도프시스 프로토스-1 프로모터하에서 변형된 프로토스-1 유전자를 발현시키는 식물 형질전환 벡터의 작제

적합한 변형된 아라비도프시스 프로토스-1 cDNA의 전장 cDNA를 EcoRI-XhoI 부분 분해 단편으로 분리하여 식물 발현 벡터 pCGN1761ENX(참조: 국제 특허원 PCT/IB95/00452; 1995년 6월 8일자로 출원되어 1995년 12월 21일자로 WO 95/34659로 공개, 실시예 9) 중으로 클로닝한다. 상기 플라스미드를 NcoI 및 BamHI로 분해시켜 완전한 프로토스-1 cDNA와 아그로박테리움 투메파시엔스의 tml 유전자의 3' 비해독 서열로부터의 전사 종결인자로 이루어진 단편을 생산한다. 상기한 AraPT1Pro 플라스미드를 NcoI 및 BamHI로 분해시켜 p블루스크립트 및 580bp 추정 아라비도프시스 프로토스-1 프로모터로 이루어진 단편을 생산한다. 이들 2개의 단편을 결합시켜 천연 프로토스 프로모터에 변형된 프로토스 cDNA를 융합시킨다. 프로토스-1 프로모터/프로토스-1 cDNA/tml 종결인자 융합체를 KpnI로 분해시켜 절단하여 바이너리 벡터 pCIB200 중으로 클로닝한다. 바이너리 플라스미드를 아그로박테리움 중으로 전기영동에 의해 형질전환시킨 다음 진공 유입법(Bechtold et al., C.R. Acad. Sci. Paris 316: 1194-1199 (1993))을 이용하여 아라비도프시스 중으로 형질전환시킨다. 변형된 프로토스 유전자를 발현시키는 형질전환체를 가나마이신 또는 프로토스 억제 제조제의 여러가지 농도에 대해 선택한다.

실시예 26

천연 프로토스-1 프로모터/변형된 프로토스-1 융합체의 발현에 의한 제조제 내성 식물의 생산

상기한 공정을 이용하여, 프로토스-1 서열(서열 1)중 뉴클레오타이드 1306-1308에서 TAC의 ATG(티로신을 메티오닌으로)로의 변화를 함유하는 아라비도프시스 프로토스-1 cDNA를 천연 프로토스-1 프로모터 단편에 융합시켜 아라비도프시스 탈리아나 중으로 형질전환시킨다. 상기 변형된 프로토스-1 효소(AraC-2Met)는 상기 기술된 세균 발현 시스템에서 시험시 천연 효소보다 여러가지 프로토스-억제 제조제에 대해 >10배 정도 더 내성이 있는 것으로 밝혀졌다. 진공 침투된 식물로부터의 종자를 수집하여 화학식 17의 프로토스 억제성 아릴우라실 제조제의 범위(10.0nM-1.0uM) 상에 플레이팅시킨다. 야생형 아라비도프시스로 여러번 실험한 결과 10.0nM 농도의 상기 화합물이 정상적인 종자 발아를 억제시키기에 충분한 것으로 나타났다. 천연 프로토스-1 프로모터에 융합된 AraC-2Met 변형된 효소를 발현시키는 형질전환된 종자는 500nM 이하 농도의 제조제에서 정상적인 아라비도프시스 종모를 생산하는데, 이는 야생형 아라비도프시스와 비교하여 제조제 내성이 50배 이상 더 높은 것을 나타낸다. 따라서 상기 프로모터/변형된 프로토스 효소 융합체는 식물 형질전환용으로 효과적인 선택성 마커로서 작용한다. 100.0nM의 프로토스-억제 제조제 상에서 발아된 수개의 식물을 토양에 이식하여, 2 내지 3주간 성장시키고, 여러가지 농도의 프로토스-억제 제조제를 사용한 분무 검정법으로 시험한다. 비어있는 벡터 대조 형질전환체와 비교하여, AraPT1Pro/AraC-2Met 형질전환 유전자는 제조제 분부에 대해 >10배 이상 내성이 있었다.

실시예 27

아라비도프시스 발아 검정에 의한 여러가지 프로토스-억제 화합물에 대한 내성 돌연변이체의 교차 내성의 증명

상기한 공정을 이용하여, 프로토스-1 서열(서열 1)의 뉴클레오타이드 1306-1308에서 TAC의 ATC(티로신을 이소류신으로)로의 변화 및 뉴클레오타이드 945-947에서 TAC의 TTA(세린을 류신으로)로의 변화를 둘다 함유하는 아라비도프시스 프로토스-1 cDNA를 천연 프로토스-1 프로모터 단편에 융합시키고 아라비도프시스 탈리아나 중으로 형질전환시킨다. 상기 변형된 프로토스-1 효소(AraC-2Ile + AraC305Leu)는 세균 시스템으로 시험시(실시예 8 내지 12 참조) 천연 효소보다 화학식 17의 프로토스 억제 아릴우라실 제조제에 대해 >10 이상 더 내성이 있는 것으로 밝혀졌다. 상기 융합체를 함유하는 동형 아라비도프시스주를 상기한 바와 같은 종모 발아 검정법으로 프로토스 억제 제조제에 대해 내성이 높은 것으로 밝혀진 형질전환체로부터 발생시킨다. 한주로부터의 종자를 야생형 아라비도프시스의 발아를 억제하는 것으로 밝혀진 화합물의 농도에 대해 발아 검정을 반복함으로써 여러가지 프로토스-억제 화합물에 대한 교차-내성을 시험한다. 이들 실험으로부터의 결과를 표 4에 나타낸다.

[표 4]

종자 발아 검정에 있어서 여러가지 프로토콜 억제제에 대한 교차 내성

화학식	통상적인 명칭	내성
II	아실플로오로펜	+
III	포마사펜	+
IV	플루오로글리코펜	±
IVb	비페녹스	+
IVc	옥시플로오로펜	+
IVd	락토펜	±
VIIa	플루티아세트-메틸	++
X	솔펜트라존	+
XI	플루프로파질	++
XIV	플루미클로락	+
XVI	플루미옥사진	+++
XVII		++
XXIa	BAY11340	+
XXII		++
$\pm \leq$ WT 보다 10배 이상의 내성 $+ \geq$ WT 보다 10배 이상의 내성 $++ \geq$ WT 보다 100배 이상의 내성 $+++ \geq$ WT 보다 1000배 이상의 내성		

실시예 28

옥수수 프로토콜스-1 프로모터 서열의 분리

람다 FIX II 벡터중 Zea Mays(Missouri 17 동종변식, 푸르게된 종묘) 게놈성 DNA 라이브러리를 Stratagene로부터 구입한다. 대략 250,000pfu의 라이브러리를 플레이트 15cm 당 50,000 파아지의 밀도로 플레이팅하고 복사 용기물을 콜로니/플라크 선별막(NEN Dupont) 상에 확립한다. 플라크 용기물을 랜덤 프라이밍법(Life Technologies)으로 32P-dCTP로 표시시킨 옥수수 프로토콜스-1 cDNA(서열 5)로 프로브화한다. 하이브리드화 및 세척 조건은 문헌: Church and Gilbert, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1991-1995 (1984)에 기술된 바와 같이 65°C이다. 람다 파아지 DNA를 3개의 포지티브하게 하이브리드화하는 파아지로부터 Wizard Lambda Preps DNA 정제 시스템(Promega)을 이용하여 분리한다. 제한 분해, 하이브리드화 패턴, 및 DNA 서열 분석에 의한 분석으로 5'에 위치하는 옥수수 게놈성 DNA의 대략 3.5kb를 함유하는 람다 클론이 cDNA 클론으로서 이미 분리된 옥수수 프로토콜스-1 암호화 서열과 동일하였다. 상기 단편은 옥수수 프로토콜스-1 프로모터를 포함한다. 상기 단편의 서열을 서열 14에 나타낸다. 뉴클레오티드 1 내지 3532로부터, 상기 서열은 5' 비암호화 서열을 포함한다. 뉴클레오티드 3533 내지 3848로부터, 상기 서열은 옥수수 프로토콜스-1 단백질의 5' 말단을 암호화한다.

옥수수 프로토콜스-1 암호화 서열의 나머지 부분에 융합된 서열 14의 서열을 함유하는 플라스미드는 1996년 3월 19일자로 pWDC-14(NRRL #B-21546)으로 기탁되었다.

실시예 29

천연 옥수수 프로토콜스-1 프로모터 하에 변형된 프로토콜스-1 유전자를 발현시키는 식물 형질전환 벡터의 작제

3848 bp 옥수수 게놈성 단편(서열 14)을 Sall-KpnI 부분 분해 생성물로서 분리된 람다 파아지 클론으로부터 절단하여 아미노산 164(서열 6)에서 알라닌의 류신으로의 변화를 함유하는 변형된 옥수수 프로토스-1 cDNA로부터 유래된 KpnI-NotI 단편에 결합시킨다. 이로써 천연 옥수수 프로토스-1 프로모터가 세균 시스템(실시예 8 내지 13)에서 제초제 내성을 부여하는 것으로 밝혀진 전장 cDNA에 융합된다. 상기 융합체를 CaMV 35S 종결인자 서열을 함유하는 pUC18 유래 벡터 중으로 클로닝하여 프로토스 프로모터/변형된 프로토스 cDNA/종결인자 카세트를 생성시킨다. 상기 카세트를 함유하는 플라스미드를 pWCo-1로 표시한다.

옥수수 게놈성 클론으로부터의 암호화 서열에서 밝혀진 제1 인트론을 옥수수 cDNA 중으로 다시 조작하여 옥수수 형질 전환용 제2 작제물을 생성시킨다. 표준 중복 PCR 융합 기술을 이용하여 삽입한다. 인트론(서열 25)의 길이는 93bp이고 서열 6의 뉴클레오티드 203과 204 사이에 삽입시키는데, 실시예 28에 기술된 람다 클론중의 천연 서열에서와 같이 정확하게 나타난다. 상기 인트론-함유 발현 카세트를 pWCo-2로 표시한다.

실시예 30

형질전환된 옥수수 식물에서 옥수수 프로토스-1 프로모터 활성의 증명

옥수수 프로모터/변형된 프로토스 융합체로 형질전환시킨 옥수수 식물을 형질전환 유전자에 대해 특이적인 프라이머를 사용한 PCR 분석을 이용하여 확인한다. PCR 포지티브 식물로부터 전체 RNA를 제조하여 권장되는 조건하에서 Superscript M-MLV(Life Technologies)를 사용하여 역전사시킨다. 역전사 반응물 2 μ l를 변형된 프로토스 서열에 대해 특이적이라도 고안된 PCR 반응에 사용한다. 비형질전환 대조군이 상기 반응에서 생성물을 산출시키지 못하는 반면, pWCo-1로 형질전환시킨 식물중 대략 85%는 포지티브 결과를 산출하며, 이는 형질전환 유전자로부터 유래된 mRNA의 존재를 나타내는 것이다. 이는 옥수수 프로토스 프로모터에 대한 활성의 일부 수준을 증명하는 것이다. 형질전환된 옥수수 식물로부터의 RNA's를 또한 프로브로서 서열 6으로부터의 방사선표지된 옥수수 프로토스 cDNA 단편을 사용하는 표준 노던 블롯 분석 방법으로 분석한다. 비형질전환 대조군의 수준 보다 확실히 높은 수준의 프로토스-1 mRNA가 형질전환된 옥수수 식물중 일부에서 검출된다. 상기 상승된 mRNA 수준은 클로닝된 옥수수 프로토스 프로모터로부터의 변형된 프로토스-1 mRNA의 발현에 기인하는 것으로 추정된다.

실시예 31

사탕무 프로토스-1 프로모터 서열의 분리

게놈성 사탕무 라이브러리를 람다 Fix II 벡터에서 Stratagene에 의해 제조한다. 대략 300,000pfu의 라이브러리를 플레이팅하고 실시예 28에서 옥수수에 대해 기술한 바와 같이 사탕무 프로토스-1 cDNA 서열(서열 17)로 프로브화한다. 제한 분해, 하이브리드화 패턴 및 DNA 서열 분석에 의한 분석은 5' 위치한 사탕무 게놈성 DNA의 대략 7kb를 함유하는 람다 클론이 cDNA 클론으로서 이미 분리된 사탕무 암호화 서열과 일치한다. 2606bp의 PstI-Sall 단편을 람다 클론으로부터 p블루 스크립트 벡터중으로 서브클로닝한다. 상기 단편은 5' 비암호화 서열의 2068bp를 함유하며 사탕무 프로토스-1 프로모터 서열을 포함한다. 이는 또는 프로토스-1 암호화 서열의 제1 453bp 및 상기 암호화 서열 중에 함유된 85bp 제1 인트론을 포함한다. 상기 단편의 서열을 서열 26에 나타낸다.

서열 26의 서열을 함유하는 플라스미드는 1996년 12월 6일자로 pWDC-20(NRRL #B-21650)으로 기탁되었다.

실시예 32

천연 사탕무 프로토스-1 프로모터하의 변형된 사탕무 프로토스-1 유전자를 발현시키는 식물 형질전환 벡터의 작제

사탕무 게놈성 단편(서열 26)을 5' 비암호화 서열의 2068bp 및 사탕무 프로토스-1 암호화 서열의 제1 300bp를 포함하는 SaCI-BsrGI 단편으로서 실시예 31에 기술된 게놈성 서브클론으로부터 절제한다. 상기 단편을 아미노산 449에서 티로신의 메티오닌으로의 변화를 함유하는 변형된 사탕무 프로토스-1 cDNA(서열 18)로부터 유래된 BsrGI-NotI 단편에 결합시킨다. 이에 의해 천연 사탕무 프로토스-1 프로모터가 세균 시스템(실시예 8 내지 13)에서 제초제 내성을 부여하는 것으로 밝혀진 전장 cDNA에 융합된다. 상기 융합체를 CaMV 35S 종결인자 서열을 함유하는 pUC18 유래 벡터중으로 클로닝하여 프로토스 프로모터/변형된 프로토스 cDNA/종결인자 카세트를 생성시킨다. 상기 카세트를 함유하는 플라스미드를 pWCo-3으로 나타낸다.

실시에 33

천연 사탕무 프로토क्स-1 프로모터/변형된 사탕무 프로토क्स-1 융합체의 발현에 의한 제초제 내성 식물의 생산

pWCo-3으로부터의 발현 카세트를 아그로박테리움을 포함한, 쌍자엽식물, 원형질체에 적용시킬 수 있는 형질전환 방법, 및 통상의 형질전환 방법을 이용하여 사탕무중으로 형질전환시킨다. 변형된 프로토क्स-1 효소를 발현시키는 형질전환된 사탕무는 RNA-PCR로 확인하고 비형질전환 사탕무에 대해 치사량인 농도의 프로토क्स-억제 제초제에 대한 내성에 대해 시험한다.

섹션 D: 식물 색소체중에서 프로토क्स 유전자의 발현

실시에 34

색소체 형질전환 벡터중 GUS 리포터 유전자와 색소체 rps16유전자3'비해독 서열에 융합된 담배 색소체 clpP 유전자 프로모터와 천연 clpP 5' 비해독 서열을 함유하는 키메릭 유전자의 제조

I. 담배 색소체 clpP 유전자 프로모터와 완전 5' 비해독 RNA (5'UTR)의 증폭

N. tabacum c.v. "Xanthi NC"로부터의 전체 DNA를 구조적으로 발현된 색소체 clpP 유전자의 ATG 개시 코돈에 대해 197번 위치에서 도입된 EcoRI 제한 부위를 포함하는 좌에서 우 "상부 스트랜드" 프라이머(프라이머 Pclp_P1a: 5'-gcggaattcattatctattatcattagaaag-3'(서열 27); 밑줄친 EcoRI 제한 부위) 및 해독 개시점에서 도입된 NcoI 제한 부위를 포함시키는 clpP 프로모터의 ATG 개시 코돈에 대해 영역 -21에서 -1에 대해 상동성인 좌에서 우 "하부 스트랜드" 프라이머(프라이머 Pclp-P2b: 5'-gcgccatggttaaatgaaagaagaactaaa-3'(서열 28); 밑줄친 NcoI 제한 부위)를 사용하는 PCR용 주형으로서 사용한다. 상기 PCR 반응은 Pfu 열안정성 DNA 폴리머라제(Stratagene, La Jolla CA)로 사용하여 하기와 같은 제조업자의 권장(Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ)에 따라서 Perkin Elmer Thermal Cycler 480에서 수행한다: 95°C 7분, 이어서 95°C 1분/43°C에서 2분/72°C 1분 사이클 4회, 이어서 95°C 1분/55°C 2분/72°C 1분 사이클 25회. 프로모터와 좌측 말단에서 EcoRI 부위와 우측 말단에서 NcoI 부위를 함유하며 *N. tabacum* 색소체 DNA 서열의 뉴클레오티드 74700 내지 74505(Chinozaki et al., EMBO J. 5: 2043-2049 (1986))에 대응하는 clpP 유전자의 5' 비해독 영역을 포함하는 214bp 암피실린 생성물을 표준 공정으로 겔 여과하고 EcoRI 및 NcoI(모든 제한 효소는 New England Biolabs, Beverly, MA로부터 구입함)로 분해한다.

II. 담배 색소체 rps16 유전자 3' 비해독 RNA 서열(3'UTR)의 증폭

N. tabacum c.v. "Xanthi NC"로부터의 전체 DNA를 도입된 XbaI 제한 부위를 포함하는 좌에서 우 "상부 스트랜드" 프라이머에 바로 이어서 리보소말 단백질 S16을 암호화하는 색소체 rps16 유전자의 TAA 종결 코돈(프라이머 rps16P-1a(5'-GCGTCTAGATCAACCGAAATTCAATTAAGG-3'(서열 30); 밑줄친 XbaI 제한 부위) 및 rps16 3'UTR의 3' 말단에서 도입된 HindIII 제한 부위를 포함시키는 rps16의 TAA 종결 코돈에 대해 +134에서 +151 까지의 영역에 상동성인 우에서 좌 "하부 스트랜드"(프라이머 rps16P-1b(5'-CGCAAGCTTCAATGGAAGCAATGATAA-3' (서열 31); 밑줄친 HindIII 제한 부위)를 사용하는 PCR용 주형으로서 사용한다. 좌측 말단에서 XbaI 부위와 우측 말단에서 HindIII 부위를 함유하며 *N. tabacum* 색소체 DNA 서열 (Shinozaki et al., 1986)의 뉴클레오티드 4943에서 5093에 대응하는 영역을 함유하는 rps16 유전자의 3' 비해독 영역을 포함하는 169 증폭 생성물을 겔 정제하여 XbaI 및 HindIII로 분해시킨다.

III. GUS 리포터 유전자 단편을 clpP 유전자 프로모터와 5' 및 3' UTR's에 결합

ATG 개시 코돈에서 NcoI 제한 부위와 XbaI 부위에 이어서 천연 3' UTR을 함유하는 플라스미드 pRAJ275(Clontech)로부터 유래되는 1864bp b-갈락투로니다제(GUS) 리포터 유전자 단편을 NcoI 및 XbaI로 분해시켜 생산한다. 상기 단편을 4 가지 방식 반응으로 클로닝 벡터 pGEM3Zf(-)(Promega, Madison, WI)로부터의 201bp EcoRI/NcoI clpP 프로모터 단편, 157bp XbaI/HindIII rps16 3'UTR 단편, 및 3148bp EcoRI/HindIII 단편에 결합시켜 플라스미드 pPH138을 작제한다. 색소체 형질전환 벡터 pPH140은 플라스미드 pPRV111a(Zoubenko et al. 1994)를 EcoRI 및 HindIII로 분해시키고 생성된 7287 bp 단편을 pPH138의 EcoRI/HindIII 단편에 결합시켜 작제한다.

실시에 35

색소체 형질전환 벡터중 GUS 리포터 유전자와 색소체 rps16 유전자 3' 비해독 서열에 융합된 담배 색소체 clpP 유전자 프로모터와 담배 색소체 psbA 유전자 최소 5' 비해독 서열을 함유하는 키메릭 유전자의 제조

담배 색소체 clpP 유전자 프로모터와 절단된 5' 비해독 RNA(5' UTR): *N. tabacum* c.v. "Xanthi NC"로부터의 전체 DNA의 증폭물을 좌에서 우 "상부 스트랜드" 프라이머 Pclp-P1a(서열 27) 및 위치 -11에서의 clpP 5' UTR에서 도입된 XbaI 제한 부위를 포함시키는 clpP 프로모터의 ATG 개시 코돈에 대해 -34에서 -11까지의 영역에 상동성인 우에서 좌 "하부 스트랜드" 프라이머(프라이머 Pclp_P1b: 5'-gcgctctagaaagaactaaatactatatttcac-3'(서열 29); 밑줄친 XbaI 제한 부위)를 사용하는 상기한 바와 같은 PCR용 주형으로서 사용된다. 좌측 말단에서 EcoRI 부위와 우측 말단에서 XbaI 부위를 함유하는 clpP 유전자의 프로모터와 절단된 5'UTR을 포함하는 202 bp 증폭반응 생성물을 겔 정제하고 XbaI로 분해시킨다. 계속해서 XbaI 부위를 클레나우 DNA 폴리머라제(New England Biolabs)로 포함시키고 상기 단편을 EcoRI로 분해시킨다. 이를 5가지 반응 방식으로, 합성 올리고뉴클레오티드 minpsb_U(상부 스트랜드: 5'-gggagtcctgatgattaataaacaagattttac-3'(서열 32)) 및 minpsb_L(하부 스트랜드: 5'-catggtaaaaatcttggtttatcatacatcaggagactccc-3'(서열 33)); 밑줄친 NcoI 제한 부위 5' 위에 달린것), 상기한 NcoI/XbaI GUS 리포터 유전자 단편, 상기한 XbaI/HindIII rps16 3'UTR 단편, 및 EcoRI/HindIII pGEM3Zf(-) 단편을 어니얼링시켜 생성된 담배 색소체 psbA 유전자 5' UTR의 최종 38개 뉴클레오티드와 ATG 개시 코돈에 대응하는 이중사 DNA 단편(ATG 개시 코돈중으로 도입된 NcoI 제한 부위를 갖는)에 결합시켜 플라스미드 pPH139를 작제한다. 색소체 형질전환 벡터 pPH144는 플라스미드 pPRV111a(Zoubenko, et al., Nucleic Acids Res 22: 3819-3824 (1994))를 EcoRI 및 HindIII로 분해시키고 생성된 7287 bp 단편을 pPH139의 2251 bp EcoRI/HindIII 단편에 결합시켜 작제한다.

실시에 36

담배 색소체 형질전환용 벡터중 아라비도프시스 탈리아나 프로토스-1 암호화 서열과 색소체 rps16 유전자 3' 비해독 서열에 융합된 담배 색소체 clpP 유전자 프로모터와 완전 5' 비해독 서열을 함유하는 키메릭 유전자의 제조

아미노 종결 색소체 운반 펩티드의 영역을 암호화하는 프로토포르피리노겐 IX 옥시다제("프로토스") 유전자로부터의 cDNA 서열, 전장 cDNA 및 3' 비해독 영역을 포함하는 아라비도프시스 탈리아나 NotI 삽입물을 포함하는 플라스미드 AraC-2Met로부터의 minprep DNA를, 성숙 프로토스 단백질 암호화 서열의 추론되는 개시부에서 도입된 NcoI 제한 부위와 신규한 ATG 개시 코돈을 포함하는 좌에서 우 "상부 스트랜드" 프라이머(전장 전구체 단백질의 ATG 개시 코돈에 대해 뉴클레오티드 + 172에서 + 194와 상동성을 가짐)(프라이머 APRTXP1a: 5'-GGGACCATGGATTGTGTGATTGTCGGCGGAGG-3'(서열 34); 밑줄친 NcoI 제한 부위) 및 PROTOX 전구체 단백질의 천연 ATG 개시 코돈에 대해 뉴클레오티드 + 917에서 + 940에 대해 상동성인 우에서 좌 "하부 스트랜드" 프라이머(프라이머 ATRTXP1b: 5'-CTCCGCTCTCCAGCTTAGTGATAC-3'(서열 35))를 사용하는 상기한 바와 같은 PCR용 주형으로 사용한다. 778bp 생성물을 NcoI 및 SfuI로 분해시키고 생성된 682 bp 단편을 PROTOX 암호화 서열의 3' 영역을 포함하는 AraC-2Met의 844bp SfuI/NotI DAN 단편과 클로닝 벡터 pGEM5Zf(+)(Promega, Madison WI)의 2978bp NcoI/NotI 단편에 결합시켜 플라스미드 pPH141을 작제한다. rps16 3' UTR을 사용하여 276'854-내성 SV1-Met PROTOX 유전자를 유도시키는 clpP 프로모터를 함유하는 색소체 형질전환 벡터 pPH143은 pPH141을 NcoI 및 SspI로 분해시키고 완전 PROTOX 암호화 서열을 함유하는 1491bp 단편을 분리시키고 상기한 rps16P_1a 및 rps16P-1b PCR 생성물을 HindIII로 분해시키고, 이들을 pPH140의 7436 bp NcoI/HindIII 단편에 결합시켜 작제한다.

실시에 37

담배 색소체 형질전환용 벡터중 아라비도프시스 탈리아나 프로토스-1 암호화 서열 및 색소체 rps16 유전자 3' 비해독 서열에 융합된 담배 색소체 clpP 유전자 프로모터와 담배 색소체 psbA 유전자 최소 5' 비해독 서열을 함유하는 키메릭 유전자의 제조

pPH141을 NcoI 및 SspI로 분해시키고 완전 PROTOX 암호화 서열을 함유하는 1491 bp 단편을 분리시키고, 상기한 rps16P_1a 및 rps16P-1b PCR 생성물을 HindIII로 분해시킨 다음, 이들을 pPH144의 7465 bp NcoI/HindIII 단편에 결합시켜, rps16 3'UTR로 276'854-내성 SV1-Met PROTOX 유전자를 유도시키는 clpP 프로모터/psbA 5'UTR 융합체를 함유하는 색소체 형질전환 벡터 pPH145를 작제한다.

실시에 38

담배 색소체 계놈의 바이오리스팅 형질전환

Nicotiana tabacum c.v. 'Xanthi cn'의 종자를 T 아가 배지상에 1인치 원식 배열로 플레이트당 7개씩 발아시키고 파종후 12 내지 14일 경고후 필수적으로 상기한 바와 같은 플라스미드 pPH143 및 pPH145로부터의 DNA로 피복시킨 1 μ m 텅스텐 입자(M10, Biorad, Hercules, CA)로 충돌시킨다(Svab, Z. and Maliga, P. (1993) PNAS 90, 913-917). 충돌시킨 종묘를 T 배지 상에서 2일간 배양시키고 이후 잎을 절제하여 500 μ g/ml 스펙티노마이신 디히드로클로라이드(Sigma, St. Louis, MO)를 함유하는 RMOP 배지(Svab, Z., Hajdukiewicz, P. and Maliga, P (1990) PNAS 87, 8526-8530)의 플레이트상에 밝은 명(350-500pmol 광자/m²/초) 중에서 양측면에 놓는다. 충돌후 3 내지 8주 경과후 표백된 잎 아래에서 나타나는 내성 줄기를 동일한 선택 배지 상으로 서브클로닝하고, 제2의 줄기를 분리하여 서브클로닝한다. 독립적인 서브클로닝 형질전환된 색소체 게놈 카피의 완전 분리는 서던 블로팅의 표준 기술(Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor)로 평가한다. BamHI/EcoRI-분해된 전체 세포 DNA(Mettler, I. J. (1987) Plant Mol Biol Reporter 5, 346-349)를 1% 트리스-붕산염(TBE) 아가로스 겔상에서 분리시키고, 나일론막(Amersham)으로 옮겨 rps7/12 색소체 표적화 서열의 영역을 함유하는 pC8로부터의 0.7kb BamHI/HindIII DNA 단편에 대응하는 ³²P-표지된 랜덤 프라이밍된 DNA 서열로 프로브화한다. 호모플라스믹 가지를 스펙티노마이신-함유 MS/IBA 배지(McBride, K.E. et al. (1994) PNAS 91, 7301-7305) 상에서 무균적으로 뿌리를 내린 후 온실로 옮긴다.

본 명세서에 기술된 본 발명의 다양한 변형은 당해 분야의 숙련가에게 자명할 것이다. 상기와 같은 변형은 첨부되는 특허 청구의 범위의 범주내에 속하는 것이다.

[서열 목록]

(1) 일반 정보:

(i) 출원인: 볼라쓰, 산드라

존슨 마리에

포터 샤론

워드 에릭

헤이페츠 피터

(ii) 발명의 명칭: 식물 프로토포르피리노겐 옥시다제를 암호화하는 DNA 분자 및

이의 억제제 내성 돌연변이체

(iii) 서열수: 35

(iv) 서신 주소:

(A) 수신인: 노바르티스 코포레이션

(B) 가: 화이트 플레인즈 로오드 520 피. 오. 박스 2005

(C) 시: 테리타운

(D) 주: 뉴욕

(E) 국: 미국

(F) 우편번호: 10591-9005

(v) 컴퓨터 관독 형태:

(A) 매질형: 플로피 디스크

(B) 컴퓨터: IBM PC 호환

(C) 운용 시스템: PC-DOS/MS-DOS

(D) 소프트웨어: 페이턴트인 릴리즈 #1.0, 비전 #1.30

(vi) 현 출원 정보:

(A) 출원번호:

(B) 출원일:

(C) 분류:

(vii) 이전 출원 정보:

(A) 출원번호: US 60/012,705

(B) 출원일: 28-FEB-1996

(vii) 이전 출원 정보:

(A) 출원번호: US 60/013,612

(B) 출원일: 28-FEB-1996

(vii) 이전 출원 정보:

(A) 출원번호: US 60/020,003

(B) 출원일: 21-JUN-1996

(viii) 대리인 정보:

(A) 성명: Meigs, J. Timothy

(B) 등록번호: 38,241

(C) 참조/포켓 번호: CGC 1847

(ix) 통신정보:

(A) 전화: (919) 541-8587

(B) 팩스: (919) 541-8689

(2) 서열 1에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1719 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(vi) 최초 기원:

(A) 유기체: 아라비도프시스 탈리아나

(vii) 직접적인 기원

(B) 클론: pWDC-2(NRRL B-21238)

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: CDS

(B) 위치: 31..1644

(C) 또 따른 정보: /산물="아라비도프시스 프로투스-1"

(xi) 서열 기술: 서열 1:

[서열 1a]

TGACAAAATT	CCGAATTCTC	TGCGATTTC	ATG GAG TTA TCT CTT CTC CGT CCG	54
	Met Glu Leu Ser Leu Leu Arg Pro			
	1	5		

[서열 1b]

ACG ACT CAA TCG CTT CTT CCG TCG TTT TCG AAG CCC AAT CTC CGA TTA Thr Thr Gln Ser Leu Leu Pro Ser Phe Ser Lys Pro Asn Leu Arg Leu 10 15 20	102
AAT GTT TAT AAG CCT CTT AGA CTC CGT TGT TCA GTG GCC GGT GGA CCA Asn Val Tyr Lys Pro Leu Arg Leu Arg Cys Ser Val Ala Gly Gly Pro 25 30 35 40	150
ACC GTC GGA TCT TCA AAA ATC GAA GGC GGA GGA GGC ACC ACC ATC ACG Thr Val Gly Ser Ser Lys Ile Glu Gly Gly Gly Gly Thr Thr Ile Thr 45 50 55	198
ACG GAT TGT GTG ATT GTC GGC GGA GGT ATT AGT GGT CTT TGC ATC GCT Thr Asp Cys Val Ile Val Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala 60 65 70	246
CAG GCG CTT GCT ACT AAG CAT CCT GAT GCT GCT CCG AAT TTA ATT GTG Gln Ala Leu Ala Thr Lys His Pro Asp Ala Ala Pro Asn Leu Ile Val 75 80 85	294
ACC GAG GCT AAG GAT CGT GTT GGA GGC AAC ATT ATC ACT CGT GAA GAG Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu 90 95 100	342
AAT GGT TTT CTC TGG GAA GAA GGT CCC AAT AGT TTT CAA CCG TCT GAT Asn Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp 105 110 115 120	390
CCT ATG CTC ACT ATG GTG GTA GAT AGT GGT TTG AAG GAT GAT TTG GTG Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val 125 130 135	438
TTG GGA GAT CCT ACT GCG CCA AGG TTT GTG TTG TGG AAT GGG AAA TTG Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu 140 145 150	486
AGG CCG GTT CCA TCG AAG CTA ACA GAC TTA CCG TTC TTT GAT TTG ATG Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met 155 160 165	534
AGT ATT GGT GGG AAG ATT AGA GCT GGT TTT GGT GCA CTT GGC ATT CGA Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg 170 175 180	582
CCG TCA CCT CCA GGT CGT GAA GAA TCT GTG GAG GAG TTT GTA CGG CGT	630

[서열 1c]

365	370	375	
ATC CGA ACA GAA TGT TTG ATA GAT GGT GAA CTA AAG GGT TTT GGG CAA			1206
Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln			
380	385	390	
TTG CAT CCA CGC ACG CAA GGA GTT GAA ACA TTA GGA ACT ATC TAC AGC			1254
Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser			
395	400	405	
TCC TCA CTC TTT CCA AAT CGC GCA CCG CCC GGA AGA ATT TTG CTG TTG			1302
Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu			
410	415	420	
AAC TAC ATT GGC GGG TCT ACA AAC ACC GGA ATT CTG TCC AAG TCT GAA			1350
Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu			
425	430	435	440
GGT GAG TTA GTG GAA GCA GTT GAC AGA GAT TTG AGG AAA ATG CTA ATT			1398
Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile			
445	450	455	
AAG CCT AAT TCG ACC GAT CCA CTT AAA TTA GGA GTT AGG GTA TGG CCT			1446
Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro			
460	465	470	
CAA GCC ATT CCT CAG TTT CTA GTT GGT CAC TTT GAT ATC CTT GAC ACG			1494
Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr			
475	480	485	
GCT AAA TCA TCT CTA ACG TCT TCG GGC TAC GAA GGG CTA TTT TTG GGT			1542
Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly			
490	495	500	
GGC AAT TAC GTC GCT GGT GTA GCC TTA GGC CGG TGT GTA GAA GGC GCA			1590
Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala			
505	510	515	520
TAT GAA ACC GCG ATT GAG GTC AAC AAC TTC ATG TCA CGG TAC GCT TAC			1638
Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr			
525	530	535	
AAG TAAATGTAAA ACATTAAATC TCCAGCTTG CGTGAGTTT ATTAAATATT			1691
Lys			

[서열 1e]

TTGAGATATC CAAAAAAAAA AAAAAAAAA 1719

(2) 서열 2에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 537 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(C) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 2:

[서열 2a]

Met	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Arg	Pro	Thr	Thr	Gln	Ser	Leu	Leu	Pro	Ser				
1				5					10					15					
Phe	Ser	Lys	Pro	Asn	Leu	Arg	Leu	Asn	Val	Tyr	Lys	Pro	Leu	Arg	Leu				
			20					25					30						
Arg	Cys	Ser	Val	Ala	Gly	Gly	Pro	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Lys	Ile	Glu				
			35					40					45						
Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Thr	Ile	Thr	Thr	Asp	Cys	Val	Ile	Val	Gly	Gly				
			50			55					60								
Gly	Ile	Ser	Gly	Leu	Cys	Ile	Ala	Gln	Ala	Leu	Ala	Thr	Lys	His	Pro				
65					70					75					80				
Asp	Ala	Ala	Pro	Asn	Leu	Ile	Val	Thr	Glu	Ala	Lys	Asp	Arg	Val	Gly				
				85					90					95					
Gly	Asn	Ile	Ile	Thr	Arg	Glu	Glu	Asn	Gly	Phe	Leu	Trp	Glu	Glu	Gly				
			100					105					110						
Pro	Asn	Ser	Phe	Gln	Pro	Ser	Asp	Pro	Met	Leu	Thr	Met	Val	Val	Asp				
			115				120					125							
Ser	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Leu	Val	Leu	Gly	Asp	Pro	Thr	Ala	Pro	Arg				
			130				135				140								
Phe	Val	Leu	Trp	Asn	Gly	Lys	Leu	Arg	Pro	Val	Pro	Ser	Lys	Leu	Thr				
145					150				155						160				

[서열 2b]

```

Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala
    165                      170                      175

Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu
    180                      185                      190

Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu
    195                      200                      205

Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser
    210                      215                      220

Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln
    225                      230                      235                      240

Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Ala Ile Gln Glu Arg
    245                      250                      255

Lys Asn Ala Pro Lys Ala Glu Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Gln
    260                      265                      270

Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Arg Met Leu Pro Glu
    275                      280                      285

Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu
    290                      295                      300

Ser Gly Ile Thr Lys Leu Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Thr Tyr Glu
    305                      310                      315                      320

Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr
    325                      330                      335

Val Pro Ser His Val Ala Ser Gly Leu Leu Arg Pro Leu Ser Glu Ser
    340                      345                      350

Ala Ala Asn Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val
    355                      360                      365

Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Thr Glu Cys Leu Ile Asp
    370                      375                      380

Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Gly Val
    385                      390                      395                      400

```

[서열 2c]

Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala
405 410 415

Pro Pro Gly Arg Ile Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn
420 425 430

Thr Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp
435 440 445

Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Asn Ser Thr Asp Pro Leu
450 455 460

Lys Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val
465 470 475 480

Gly His Phe Asp Ile Leu Asp Thr Ala Lys Ser Ser Leu Thr Ser Ser
485 490 495

Gly Tyr Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala
500 505 510

Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Ile Glu Val Asn
515 520 525

Asn Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
530 535

(2) 서열 3에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1738 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(iv) 안티센스: No

(vi) 최초 기원:

(A) 유기체: 아라비도프시스 탈리아나

(vii) 직접적인 기원:

(B) 클론: pWDC-1(NRRL B-21237)

(ix) 특징

(A) 명칭/키아: CDS

(B) 위치: 70..1596

(C) 또 다른 정보: /산물="아라비도프시스 프로투스-2"

(xi) 서열 기술: 서열 3:

[서열 3a]

TTTTTACTT ATTTCCGTCA CTGCTTTCGA CTGGTCAGAG ATTTTGACTC TGAATTGTTG	60
CAGATAGCA ATG GCG TCT GGA GCA GTA GCA GAT CAT CAA ATT GAA GCG	108
Met Ala Ser Gly Ala Val Ala Asp His Gln Ile Glu Ala	
1 5 10	
GTT TCA GGA AAA AGA GTC GCA GTC GTA GGT GCA GGT GTA AGT GGA CTT	156
Val Ser Gly Lys Arg Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu	
15 20 25	
GCG GCG GCT TAC AAG TTG AAA TCG AGG GGT TTG AAT GTG ACT GTG TTT	204
Ala Ala Ala Tyr Lys Leu Lys Ser Arg Gly Leu Asn Val Thr Val Phe	
30 35 40 45	
GAA GCT GAT GGA AGA GTA GGT GGG AAG TTG AGA AGT GTT ATG CAA AAT	252
Glu Ala Asp Gly Arg Val Gly Gly Lys Leu Arg Ser Val Met Gln Asn	
50 55 60	
GGT TTG ATT TGG GAT GAA GGA GCA AAC ACC ATG ACT GAG GCT GAG CCA	300
Gly Leu Ile Trp Asp Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Ala Glu Pro	
65 70 75	
GAA GTT GGG AGT TTA CTT GAT GAT CTT GGG CTT CGT GAG AAA CAA CAA	348
Glu Val Gly Ser Leu Leu Asp Asp Leu Gly Leu Arg Glu Lys Gln Gln	
80 85 90	
TTT CCA ATT TCA CAG AAA AAG CGG TAT ATT GTG CGG AAT GGT GTA CCT	396
Phe Pro Ile Ser Gln Lys Lys Arg Tyr Ile Val Arg Asn Gly Val Pro	
95 100 105	
GTG ATG CTA CCT ACC AAT CCC ATA GAG CTG GTC ACA AGT AGT GTG CTC	444
Val Met Leu Pro Thr Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu	
110 115 120 125	

[서열 3b]

TCT ACC CAA TCT AAG TTT CAA ATC TTG TTG GAA CCA TTT TTA TGG AAG Ser Thr Gln Ser Lys Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys 130 135 140	492
AAA AAG TCC TCA AAA GTC TCA GAT GCA TCT GCT GAA GAA AGT GTA AGC Lys Lys Ser Ser Lys Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser 145 150 155	540
GAG TTC TTT CAA CGC CAT TTT GGA CAA GAG GTT GTT GAC TAT CTC ATC Glu Phe Phe Gln Arg His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile 160 165 170	588
GAC CCT TTT GTT GGT GGA ACA AGT GCT GCG GAC CCT GAT TCC CTT TCA Asp Pro Phe Val Gly Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser 175 180 185	636
ATG AAG CAT TCT TTC CCA GAT CTC TGG AAT GTA GAG AAA AGT TTT GGC Met Lys His Ser Phe Pro Asp Leu Trp Asn Val Glu Lys Ser Phe Gly 190 195 200 205	684
TCT ATT ATA GTC GGT GCA ATC AGA ACA AAG TTT GCT GCT AAA GGT GGT Ser Ile Ile Val Gly Ala Ile Arg Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly 210 215 220	732
AAA AGT AGA GAC ACA AAG AGT TCT CCT GGC ACA AAA AAG GGT TCG CGT Lys Ser Arg Asp Thr Lys Ser Ser Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg 225 230 235	780
GGG TCA TTC TCT TTT AAG GGG GGA ATG CAG ATT CTT CCT GAT ACG TTG Gly Ser Phe Ser Phe Lys Gly Gly Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu 240 245 250	828
TGC AAA AGT CTC TCA CAT GAT GAG ATC AAT TTA GAC TCC AAG GTA CTC Cys Lys Ser Leu Ser His Asp Glu Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu 255 260 265	876
TCT TTG TCT TAC AAT TCT GGA TCA AGA CAG GAG AAC TGG TCA TTA TCT Ser Leu Ser Tyr Asn Ser Gly Ser Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser 270 275 280 285	924
TGT GTT TCG CAT AAT GAA ACG CAG AGA CAA AAC CCC CAT TAT GAT GCT Cys Val Ser His Asn Glu Thr Gln Arg Gln Asn Pro His Tyr Asp Ala 290 295 300	972
GTA ATT ATG ACG GCT CCT CTG TGC AAT GTG AAG GAG ATG AAG GTT ATG	1020

[서열 3c]

Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Cys Asn Val Lys Glu Met Lys Val Met	
305 310 315	
AAA GGA GGA CAA CCC TTT CAG CTA AAC TTT CTC CCC GAG ATT AAT TAC	1068
Lys Gly Gly Gln Pro Phe Gln Leu Asn Phe Leu Pro Glu Ile Asn Tyr	
320 325 330	
ATG CCC CTC TCG GTT TTA ATC ACC ACA TTC ACA AAG GAG AAA GTA AAG	1116
Met Pro Leu Ser Val Leu Ile Thr Thr Phe Thr Lys Glu Lys Val Lys	
335 340 345	
AGA CCT CTT GAA GGC TTT GGG GTA CTC ATT CCA TCT AAG GAG CAA AAG	1164
Arg Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln Lys	
350 355 360 365	
CAT GGT TTC AAA ACT CTA GGT ACA CTT TTT TCA TCA ATG ATG TTT CCA	1212
His Gly Phe Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro	
370 375 380	
GAT CGT TCC CCT AGT GAC GTT CAT CTA TAT ACA ACT TTT ATT GGT GGG	1260
Asp Arg Ser Pro Ser Asp Val His Leu Tyr Thr Thr Phe Ile Gly Gly	
385 390 395	
AGT AGG AAC CAG GAA CTA GCC AAA GCT TCC ACT GAC GAA TTA AAA CAA	1308
Ser Arg Asn Gln Glu Leu Ala Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln	
400 405 410	
GTT GTG ACT TCT GAC CTT CAG CGA CTG TTG GGG GTT GAA GGT GAA CCC	1356
Val Val Thr Ser Asp Leu Gln Arg Leu Leu Gly Val Glu Gly Glu Pro	
415 420 425	
GTG TCT GTC AAC CAT TAC TAT TGG AGG AAA GCA TTC CCG TTG TAT GAC	1404
Val Ser Val Asn His Tyr Tyr Trp Arg Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Asp	
430 435 440 445	
AGC AGC TAT GAC TCA GTC ATG GAA GCA ATT GAC AAG ATG GAG AAT GAT	1452
Ser Ser Tyr Asp Ser Val Met Glu Ala Ile Asp Lys Met Glu Asn Asp	
450 455 460	
CTA CCT GGG TTC TTC TAT GCA GGT AAT CAT CGA GGG GGG CTC TCT GTT	1500
Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His Arg Gly Gly Leu Ser Val	
465 470 475	
GGG AAA TCA ATA GCA TCA GGT TGC AAA GCA GCT GAC CTT GTG ATC TCA	1548
Gly Lys Ser Ile Ala Ser Gly Cys Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser	

[서열 3d]

480 485 490	
TAC CTG GAG TCT TGC TCA AAT GAC AAG AAA CCA AAT GAC AGC TTA TAACATTGTC	
1603	
Tyr Leu Glu Ser Cys Ser Asn Asp Lys Lys Pro Asn Asp Ser Leu	
495 500 505	
AAGGTTTCGTC CCTTTTATC ACTTACTTTG TAACTTGTA AAATGCAACA AGCCGCCGTG	1663
CGATTAGCCA ACAACTCAGC AAAACCCAGA TTCTCATAAG GCTCACTAAT TCCAGAATTA	1723
ACTATTTATG TAAAA	1738

(2) 서열 4에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 508 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(C) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 4:

[서열 4a]

Met	Ala	Ser	Gly	Ala	Val	Ala	Asp	His	Gln	Ile	Glu	Ala	Val	Ser	Gly	
1					5				10					15		
Lys	Arg	Val	Ala	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Ala	
			20					25					30			
Tyr	Lys	Leu	Lys	Ser	Arg	Gly	Leu	Asn	Val	Thr	Val	Phe	Glu	Ala	Asp	
			35				40					45				
Gly	Arg	Val	Gly	Gly	Lys	Leu	Arg	Ser	Val	Met	Gln	Asn	Gly	Leu	Ile	
			50			55					60					
Trp	Asp	Glu	Gly	Ala	Asn	Thr	Met	Thr	Glu	Ala	Glu	Pro	Glu	Val	Gly	
65					70				75					80		
Ser	Leu	Leu	Asp	Asp	Leu	Gly	Leu	Arg	Glu	Lys	Gln	Gln	Phe	Pro	Ile	
			85					90					95			
Ser	Gln	Lys	Lys	Arg	Tyr	Ile	Val	Arg	Asn	Gly	Val	Pro	Val	Met	Leu	
			100				105					110				

[서열 4b]

Pro Thr Asn Pro Ile Glu Leu Val Thr Ser Ser Val Leu Ser Thr Gln
115 120 125

Ser Lys Phe Gln Ile Leu Leu Glu Pro Phe Leu Trp Lys Lys Lys Ser
130 135 140

Ser Lys Val Ser Asp Ala Ser Ala Glu Glu Ser Val Ser Glu Phe Phe
145 150 155 160

Gln Arg His Phe Gly Gln Glu Val Val Asp Tyr Leu Ile Asp Pro Phe
165 170 175

Val Gly Gly Thr Ser Ala Ala Asp Pro Asp Ser Leu Ser Met Lys His
180 185 190

Ser Phe Pro Asp Leu Trp Asn Val Glu Lys Ser Phe Gly Ser Ile Ile
195 200 205

Val Gly Ala Ile Arg Thr Lys Phe Ala Ala Lys Gly Gly Lys Ser Arg
210 215 220

Asp Thr Lys Ser Ser Pro Gly Thr Lys Lys Gly Ser Arg Gly Ser Phe
225 230 235 240

Ser Phe Lys Gly Gly Met Gln Ile Leu Pro Asp Thr Leu Cys Lys Ser
245 250 255

Leu Ser His Asp Glu Ile Asn Leu Asp Ser Lys Val Leu Ser Leu Ser
260 265 270

Tyr Asn Ser Gly Ser Arg Gln Glu Asn Trp Ser Leu Ser Cys Val Ser
275 280 285

His Asn Glu Thr Gln Arg Gln Asn Pro His Tyr Asp Ala Val Ile Met
290 295 300

Thr Ala Pro Leu Cys Asn Val Lys Glu Met Lys Val Met Lys Gly Gly
305 310 315 320

Gln Pro Phe Gln Leu Asn Phe Leu Pro Glu Ile Asn Tyr Met Pro Leu
325 330 335

Ser Val Leu Ile Thr Thr Phe Thr Lys Glu Lys Val Lys Arg Pro Leu
340 345 350

[서열 4c]

Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Ser Lys Glu Gln Lys His Gly Phe
 355 360 365
 Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser Met Met Phe Pro Asp Arg Ser
 370 375 380
 Pro Ser Asp Val His Leu Tyr Thr Thr Phe Ile Gly Gly Ser Arg Asn
 385 390 395 400
 Gln Glu Leu Ala Lys Ala Ser Thr Asp Glu Leu Lys Gln Val Val Thr
 405 410 415
 Ser Asp Leu Gln Arg Leu Leu Gly Val Glu Gly Glu Pro Val Ser Val
 420 425 430
 Asn His Tyr Tyr Trp Arg Lys Ala Phe Pro Leu Tyr Asp Ser Ser Tyr
 435 440 445
 Asp Ser Val Met Glu Ala Ile Asp Lys Met Glu Asn Asp Leu Pro Gly
 450 455 460
 Phe Phe Tyr Ala Gly Asn His Arg Gly Gly Leu Ser Val Gly Lys Ser
 465 470 475 480
 Ile Ala Ser Gly Cys Lys Ala Ala Asp Leu Val Ile Ser Tyr Leu Glu
 485 490 495
 Ser Cys Ser Asn Asp Lys Lys Pro Asn Asp Ser Leu
 500 505

(2) 서열 5에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1691 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티젠스: No

(vi) 최초 기원:

(A) 유기체: 지아 메이(옥수수)

(vii) 직접적인 기원:

(B) 클론: pWDC-4(NRRL B-21260)

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: CDS

(B) 위치: 1..1443

(D) 또 다른 정보: /산물="옥수수 프로텍스-1 cDNA"

(xi) 서열 기술: 서열 5:

[서열 5a]

GCG GAC TGC GTC GTG GTG GGC GGA GGC ATC AGT GGC CTC TGC ACC GCG	48
Ala Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala	
1 5 10 15	
CAG GCG CTG GCC ACG CGG CAC GGC GTC GGG GAC GTG CTT GTC ACG GAG	96
Gln Ala Leu Ala Thr Arg His Gly Val Gly Asp Val Leu Val Thr Glu	
20 25 30	
GCC CGC GCC CGC CCC GGC GGC AAC ATT ACC ACC GTC GAG CGC CCC GAG	144
Ala Arg Ala Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Glu	
35 40 45	
GAA GGG TAC CTC TGG GAG GAG GGT CCC AAC AGC TTC CAG CCC TCC GAC	192
Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp	
50 55 60	
CCC GTT CTC ACC ATG GCC GTG GAC AGC GGA CTG AAG GAT GAC TTG GTT	240
Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val	
65 70 75 80	
TTT GGG GAC CCA AAC GCG CCG CGT TTC GTG CTG TGG GAG GGG AAG CTG	288
Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu	
85 90 95	
AGG CCC GTG CCA TCC AAG CCC GCC GAC CTC CCG TTC TTC GAT CTC ATG	336
Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Ala Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met	
100 105 110	
AGC ATC CCA GGG AAG CTC AGG GCC GGT CTA GGC GCG CTT GGC ATC CGC	384

[서열 5b]

Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg	
115 120 125	
CCG CCT CCT CCA GGC CGC GAA GAG TCA GTG GAG GAG TTC GTG CGC CGC	432
Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg	
130 135 140	
AAC CTC GGT GCT GAG GTC TTT GAG CGC CTC ATT GAG CCT TTC TGC TCA	480
Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser	
145 150 155 160	
GGT GTC TAT GCT GGT GAT CCT TCT AAG CTC AGC ATG AAG GCT GCA TTT	528
Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe	
165 170 175	
GGG AAG GTT TGG CGG TTG GAA GAA ACT GGA GGT AGT ATT ATT GGT GGA	576
Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly	
180 185 190	
ACC ATC AAG ACA ATT CAG GAG AGG AGC AAG AAT CCA AAA CCA CCG AGG	624
Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg	
195 200 205	
GAT GCC CGC CTT CCG AAG CCA AAA GGG CAG ACA GTT GCA TCT TTC AGG	672
Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg	
210 215 220	
AAG GGT CTT GCC ATG CTT CCA AAT GCC ATT ACA TCC AGC TTG GGT AGT	720
Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ser	
225 230 235 240	
AAA GTC AAA CTA TCA TGG AAA CTC ACG AGC ATT ACA AAA TCA GAT GAC	768
Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asp	
245 250 255	
AAG GGA TAT GTT TTG GAG TAT GAA ACG CCA GAA GGG GTT GTT TCG GTG	816
Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Val	
260 265 270	
CAG GCT AAA AGT GTT ATC ATG ACT ATT CCA TCA TAT GTT GCT AGC AAC	864
Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn	
275 280 285	
ATT TTG CGT CCA CTT TCA AGC GAT GCT GCA GAT GCT CTA TCA AGA TTC	912
Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Arg Phe	

[서열 5c]

290	295	300	
TAT TAT CCA CCG GTT GCT GCT GTA ACT GTT TCG TAT CCA AAG GAA GCA			960
Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala			
305	310	315	320
ATT AGA AAA GAA TGC TTA ATT GAT GGG GAA CTC CAG GGC TTT GGC CAG			1008
Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln			
325	330	335	
TTG CAT CCA CGT AGT CAA GGA GTT GAG ACA TTA GGA ACA ATA TAC AGT			1056
Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser			
340	345	350	
TCC TCA CTC TTT CCA AAT CGT GCT CCT GAC GGT AGG GTG TTA CTT CTA			1104
Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp Gly Arg Val Leu Leu Leu			
355	360	365	
AAC TAC ATA GGA GGT GCT ACA AAC ACA GGA ATT GTT TCC AAG ACT GAA			1152
Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu			
370	375	380	
AGT GAG CTG GTC GAA GCA GTT GAC CGT GAC CTC CGA AAA ATG CTT ATA			1200
Ser Glu Leu Val' Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile			
385	390	395	400
AAT TCT ACA GCA GTG GAC CCT TTA GTC CTT GGT GTT CGA GTT TGG CCA			1248
Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro			
405	410	415	
CAA GCC ATA CCT CAG TTC CTG GTA GGA CAT CTT GAT CTT CTG GAA GCC			1296
Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Glu Ala			
420	425	430	
GCA AAA GCT GCC CTG GAC CGA GGT GGC TAC GAT GGG CTG TTC CTA GGA			1344
Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly			
435	440	445	
GGG AAC TAT GTT GCA GGA GTT GCC CTG GGC AGA TGC GTT GAG GGC GCG			1392
Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala			
450	455	460	
TAT GAA AGT GCC TCG CAA ATA TCT GAC TTC TTG ACC AAG TAT GCC TAC			1440
Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr			
465	470	475	480

[서열 5d]

AAG TGATGAAAGA AGTGGAGCGC TACTTGTTAA TCGTTTATGT TGCATAGATG	1493
Lys	
AGGTGCCTCC GGGGAAAAAA AAGCTTGAAT AGTATTTTTT ATTCTTATTT TGTAATTTGC	1553
ATTCTCTGTTT TTTTCTCTAT CAGTAATTAG TTATATTTTA GTTCTGTAGG AGATTGTTCT	1613
GTTCACTGCC CTTCAAAAGA AATTTTATTT TTCATTCTTT TATGAGAGCT GTGCTACTTA	1673
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA	1691

(2) 서열 6에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 481 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 6:

[서열 6a]

Ala	Asp	Cys	Val	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Ile	Ser	Gly	Leu	Cys	Thr	Ala
1				5					10					15	
Gln	Ala	Leu	Ala	Thr	Arg	His	Gly	Val	Gly	Asp	Val	Leu	Val	Thr	Glu
			20					25						30	
Ala	Arg	Ala	Arg	Pro	Gly	Gly	Asn	Ile	Thr	Thr	Val	Glu	Arg	Pro	Glu
			35					40					45		
Glu	Gly	Tyr	Leu	Trp	Glu	Glu	Gly	Pro	Asn	Ser	Phe	Gln	Pro	Ser	Asp
			50					55					60		
Pro	Val	Leu	Thr	Met	Ala	Val	Asp	Ser	Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Leu	Val
			65			70				75					80
Phe	Gly	Asp	Pro	Asn	Ala	Pro	Arg	Phe	Val	Leu	Trp	Glu	Gly	Lys	Leu
				85					90						95
Arg	Pro	Val	Pro	Ser	Lys	Pro	Ala	Asp	Leu	Pro	Phe	Phe	Asp	Leu	Met
				100					105					110	

[서열 6b]

Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg
 115 120 125
 Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg
 130 135 140
 Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser
 145 150 155 160
 Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe
 165 170 175
 Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Thr Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly
 180 185 190
 Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Ser Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg
 195 200 205
 Asp Ala Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg
 210 215 220
 Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ser
 225 230 235 240
 Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asp
 245 250 255
 Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Val
 260 265 270
 Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asn
 275 280 285
 Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Arg Phe
 290 295 300
 Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala
 305 310 315 320
 Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln
 325 330 335
 Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser
 340 345 350

[서열 6c]

Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Asp Gly Arg Val Leu Leu Leu
 355 360 365
 Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu
 370 375 380
 Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile
 385 390 395 400
 Asn Ser Thr Ala Val Asp Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro
 405 410 415
 Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Glu Ala
 420 425 430
 Ala Lys Ala Ala Leu Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly
 435 440 445
 Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala
 450 455 460
 Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr
 465 470 475 480

Lys

(2) 서열 7에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 2061 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(iv) 앤티센스: No

(vi) 최초 기원:

(A) 유기체: 지아 메이(옥수수)

(vii) 직접적인 기원:

(B) 클론: pWDC3(NRRL B-21259)

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: CDS

(B) 위치: 64..1698

(D) 또 따른 정보: /산물-"옥수수 프로텍스-2"

(xi) 서열 기술: 서열 7:

[서열 7a]

CTCTCCTACC TCCACCTCCA CGACAACAAG CAAATCCCCA TCCAGTTCCA AACCCCTAACT	60
CAA ATG CTC GCT TTG ACT GCC TCA GCC TCA TCC GCT TCG TCC CAT CCT	108
Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser His Pro	
1 5 10 15	
TAT CGC CAC GCC TCC GCG CAC ACT CGT CGC CCC CGC CTA CGT GCG GTC	156
Tyr Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val	
20 25 30	
CTC GCG ATG GCG GGC TCC GAC GAC CCC CGT GCA GCG CCC GCC AGA TCG	204
Leu Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser	
35 40 45	
GTC GCC GTC GTC GGC GCC GGG GTC AGC GGG CTC GCG GCG GCG TAC AGG	252
Val Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg	
50 55 60	
CTC AGA CAG AGC GGC GTG AAC GTA ACG GTG TTC GAA GCG GCC GAC AGG	300
Leu Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg	
65 70 75	
GCG GGA GGA AAG ATA CGG ACC AAT TCC GAG GGC GGG TTT GTC TGG GAT	348
Ala Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp	
80 85 90 95	
GAA GGA GCT AAC ACC ATG ACA GAA GGT GAA TGG GAG GCC AGT AGA CTG	396
Glu Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu	
100 105 110	
ATT GAT GAT CTT GGT CTA CAA GAC AAA CAG CAG TAT CCT AAC TCC CAA	444
Ile Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln	
115 120 125	

[서열 7b]

CAC AAG CGT TAC ATT GTC AAA GAT GGA GCA CCA GCA CTG ATT CCT TCG His Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser 130 135 140	492
GAT CCC ATT TCG CTA ATG AAA AGC AGT GTT CTT TCG ACA AAA TCA AAG Asp Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys 145 150 155	540
ATT GCG TTA TTT TTT GAA CCA TTT CTC TAC AAG AAA GCT AAC ACA AGA Ile Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg 160 165 170 175	588
AAC TCT GGA AAA GTG TCT GAG GAG CAC TTG AGT GAG AGT GTT GGG AGC Asn Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser 180 185 190	636
TTC TGT GAA CGC CAC TTT GGA AGA GAA GTT GTT GAC TAT TTT GTT GAT Phe Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp 195 200 205	684
CCA TTT GTA GCT GGA ACA AGT GCA GGA GAT CCA GAG TCA CTA TCT ATT Pro Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile 210 215 220	732
CGT CAT GCA TTC CCA GCA TTG TGG AAT TTG GAA AGA AAG TAT GGT TCA Arg His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser 225 230 235	780
GTT ATT GTT GGT GCC ATC TTG TCT AAG CTA GCA GCT AAA GGT GAT CCA Val Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro 240 245 250 255	828
GTA AAG ACA AGA CAT GAT TCA TCA GGG AAA AGA AGG AAT AGA CGA GTG Val Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val 260 265 270	876
TCG TTT TCA TTT CAT GGT GGA ATG CAG TCA CTA ATA AAT GCA CTT CAC Ser Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His 275 280 285	924
AAT GAA GTT GGA GAT GAT AAT GTG AAG CTT GGT ACA GAA GTG TTG TCA Asn Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser 290 295 300	972
TTG GCA TGT ACA TTT GAT GGA GTT CCT GCA CTA GGC AGG TGG TCA ATT	1020

[서열 7c]

480	485	490	495	
AAG ATG GAG AAA AAC CTT CCA GGG TTC TTC TAC GCA GGA AAT AGC AAG				1596
Lys Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys				
500	505	510		
GAT GGG CTT GCT GTT GGA AGT GTT ATA GCT TCA GGA AGC AAG GCT GCT				1644
Asp Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala				
515	520	525		
GAC CTT GCA ATC TCA TAT CTT GAA TCT CAC ACC AAG CAT AAT AAT TCA				1692
Asp Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser				
530	535	540		
CAT TGAAAGTGTC TGACCTATCC TCTAGCAGTT GTCGACAAAT TTCTCCAGTT				1745
His				
545				
CATGTACAGT AGAAACCGAT GCGTTGCAGT TTCAGAACAT CTTCACTTCT TCAGATATTA				1805
ACCCCTTCGTT GAACATCCAC CAGAAAGGTA GTCACATGTG TAAGTGGGAA AATGAGGTTA				1865
AAAACATATTA TGGCGGCCGA AATGTTTCCTT TTTGTTTTC TCACAAGTGG CCTACGACAC				1925
TTGATGTTGG AAATACATTT AAATTTGTTG AATTGTTTGA GAACACATGC GTGACGTGTA				1985
ATATTTGCCT ATTGTGATTT TAGCAGTAGT CTTGGCCAGA TTATGCTTTA CGCCTTTAAA				2045
AAAAAAAAAA AAAAAA				2061

(2) 서열 8에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 544 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 8:

[서열 8a]

Met Leu Ala Leu Thr Ala Ser Ala Ser Ser Ala Ser Ser His Pro Tyr
1 5 10 15

[서열 8b]

Arg His Ala Ser Ala His Thr Arg Arg Pro Arg Leu Arg Ala Val Leu
 20 25 30
 Ala Met Ala Gly Ser Asp Asp Pro Arg Ala Ala Pro Ala Arg Ser Val
 35 40 45
 Ala Val Val Gly Ala Gly Val Ser Gly Leu Ala Ala Ala Tyr Arg Leu
 50 55 60
 Arg Gln Ser Gly Val Asn Val Thr Val Phe Glu Ala Ala Asp Arg Ala
 65 70 75 80
 Gly Gly Lys Ile Arg Thr Asn Ser Glu Gly Gly Phe Val Trp Asp Glu
 85 90 95
 Gly Ala Asn Thr Met Thr Glu Gly Glu Trp Glu Ala Ser Arg Leu Ile
 100 105 110
 Asp Asp Leu Gly Leu Gln Asp Lys Gln Gln Tyr Pro Asn Ser Gln His
 115 120 125
 Lys Arg Tyr Ile Val Lys Asp Gly Ala Pro Ala Leu Ile Pro Ser Asp
 130 135 140
 Pro Ile Ser Leu Met Lys Ser Ser Val Leu Ser Thr Lys Ser Lys Ile
 145 150 155 160
 Ala Leu Phe Phe Glu Pro Phe Leu Tyr Lys Lys Ala Asn Thr Arg Asn
 165 170 175
 Ser Gly Lys Val Ser Glu Glu His Leu Ser Glu Ser Val Gly Ser Phe
 180 185 190
 Cys Glu Arg His Phe Gly Arg Glu Val Val Asp Tyr Phe Val Asp Pro
 195 200 205
 Phe Val Ala Gly Thr Ser Ala Gly Asp Pro Glu Ser Leu Ser Ile Arg
 210 215 220
 His Ala Phe Pro Ala Leu Trp Asn Leu Glu Arg Lys Tyr Gly Ser Val
 225 230 235 240
 Ile Val Gly Ala Ile Leu Ser Lys Leu Ala Ala Lys Gly Asp Pro Val
 245 250 255

[서열 8c]

Lys Thr Arg His Asp Ser Ser Gly Lys Arg Arg Asn Arg Arg Val Ser
 260 265 270
 Phe Ser Phe His Gly Gly Met Gln Ser Leu Ile Asn Ala Leu His Asn
 275 280 285
 Glu Val Gly Asp Asp Asn Val Lys Leu Gly Thr Glu Val Leu Ser Leu
 290 295 300
 Ala Cys Thr Phe Asp Gly Val Pro Ala Leu Gly Arg Trp Ser Ile Ser
 305 310 315 320
 Val Asp Ser Lys Asp Ser Gly Asp Lys Asp Leu Ala Ser Asn Gln Thr
 325 330 335
 Phe Asp Ala Val Ile Met Thr Ala Pro Leu Ser Asn Val Arg Arg Met
 340 345 350
 Lys Phe Thr Lys Gly Gly Ala Pro Val Val Leu Asp Phe Leu Pro Lys
 355 360 365
 Met Asp Tyr Leu Pro Leu Ser Leu Met Val Thr Ala Phe Lys Lys Asp
 370 375 380
 Asp Val Lys Lys Pro Leu Glu Gly Phe Gly Val Leu Ile Pro Tyr Lys
 385 390 395 400
 Glu Gln Gln Lys His Gly Leu Lys Thr Leu Gly Thr Leu Phe Ser Ser
 405 410 415
 Met Met Phe Pro Asp Arg Ala Pro Asp Asp Gln Tyr Leu Tyr Thr Thr
 420 425 430
 Phe Val Gly Gly Ser His Asn Arg Asp Leu Ala Gly Ala Pro Thr Ser
 435 440 445
 Ile Leu Lys Gln Leu Val Thr Ser Asp Leu Lys Lys Leu Leu Gly Val
 450 455 460
 Glu Gly Gln Pro Thr Phe Val Lys His Val Tyr Trp Gly Asn Ala Phe
 465 470 475 480
 Pro Leu Tyr Gly His Asp Tyr Ser Ser Val Leu Glu Ala Ile Glu Lys
 485 490 495

[서열 8d]

Met Glu Lys Asn Leu Pro Gly Phe Phe Tyr Ala Gly Asn Ser Lys Asp
 500 505 510
 Gly Leu Ala Val Gly Ser Val Ile Ala Ser Gly Ser Lys Ala Ala Asp
 515 520 525
 Leu Ala Ile Ser Tyr Leu Glu Ser His Thr Lys His Asn Asn Ser His
 530 535 540

(2) 서열 9에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1811 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(vi) 최초 기원: No

(A) 유기체: 트리티컴 아에스티범(밀)

(vii) 직접적인 기원

(B) 클론: pWPC-13(NRRL B-21545)

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: CDS

(B) 위치: 3..1589

(D) 또 다른 정보: /산물="밀 프로토스-1"

(xi) 서열 기술: 서열 9:

[서열 9a]

GC GCA ACA ATG GCC ACC GCC ACC GTC GCG GCC GCG TCG CCG CTC CGC	47
Ala Thr Met Ala Thr Ala Thr Val Ala Ala Ala Ser Pro Leu Arg	
1 5 10 15	

GGC AGG GTC ACC GGG CGC CCA CAC CGC GTC CGC CCG CGT TGC GCT ACC	95
Gly Arg Val Thr Gly Arg Pro His Arg Val Arg Pro Arg Cys Ala Thr	
20 25 30	

[서열 9b]

GCG AGC AGC GCG ACC GAG ACT CCG GCG GCG CCC GGC GTG CGG CTG TCC Ala Ser Ser Ala Thr Glu Thr Pro Ala Ala Pro Gly Val Arg Leu Ser 35 40 45	143
GCG GAA TGC GTC ATT GTG GGC GCC GGC ATC AGC GGC CTC TGC ACC GCG Ala Glu Cys Val Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala 50 55 60	191
CAG GCG CTG GCC ACC CGA TAC GGC GTC AGC GAC CTG CTC GTC ACG GAG Gln Ala Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Ser Asp Leu Leu Val Thr Glu 65 70 75	239
GCC CGC GAC CGC CCG GGC GGC AAC ATC ACC ACC GTC GAG CGT CCC GAC Ala Arg Asp Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Asp 80 85 90 95	287
GAG GGG TAC CTG TGG GAG GAG GGA CCC AAC AGC TTC CAG CCC TCC GAC Glu Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp 100 105 110	335
CCG GTC CTC ACC ATG GCC GTG GAC AGC GGG CTC AAG GAT GAC TTG GTG Pro Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val 115 120 125	383
TTC GGG GAC CCC AAC GCG CCC CGG TTC GTG CTG TGG GAG GGG AAG CTG Phe Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu 130 135 140	431
AGG CCG GTG CCG TCG AAG CCA GGC GAC CTG CCT TTC TTC AGC CTC ATG Arg Pro Val Pro Ser Lys Pro Gly Asp Leu Pro Phe Phe Ser Leu Met 145 150 155	479
AGT ATC CCT GGG AAG CTC AGG GCC GGC CTT GGC GCG CTC GGC ATT CGC Ser Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg 160 165 170 175	527
CCA CCT CCT CCA GGG CGC GAG GAG TCG GTG GAG GAG TTT GTG CGC CGC Pro Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg 180 185 190	575
AAC CTC GGT GCC GAG GTC TTT GAG CGC CTC ATC GAG CCT TTC TGC TCA Asn Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser 195 200 205	623
GGT GTA TAT GCT GGT GAT CCT TCG AAG CTT AGT ATG AAG GCT GCA TTT	671

[서열 9c]

Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe	
210 215 220	
GGG AAG GTC TGG AGG TTG GAG GAG ATT GGA GGT AGT ATT ATT GGT GGA	719
Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Ile Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly	
225 230 235	
ACC ATC AAG GCG ATT CAG GAT AAA GGG AAG AAC CCC AAA CCG CCA AGG	767
Thr Ile Lys Ala Ile Gln Asp Lys Gly Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg	
240 245 250 255	
GAT CCC CGA CTT CCG GCA CCA AAG GGA CAG ACG GTG GCA TCT TTC AGG	815
Asp Pro Arg Leu Pro Ala Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg	
260 265 270	
AAG GGT CTA GCC ATG CTC CCG AAT GCC ATC GCA TCT AGG CTG GGT AGT	863
Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Ala Ser Arg Leu Gly Ser	
275 280 285	
AAA GTC AAG CTG TCA TGG AAG CTT ACG AGC ATT ACA AAG GCG GAC AAC	911
Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ala Asp Asn	
290 295 300	
CAA GGA TAT GTA TTA GGT TAT GAA ACA CCA GAA GGA CTT GTT TCA GTG	959
Gln Gly Tyr Val Leu Gly Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Leu Val Ser Val	
305 310 315	
CAG GCT AAA AGT GTT ATC ATG ACC ATC CCG TCA TAT GTT GCT AGT GAT	1007
Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp	
320 325 330 335	
ATC TTG CGC CCA CTT TCA ATT GAT GCA GCA GAT GCA CTC TCA AAA TTC	1055
Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ile Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe	
340 345 350	
TAT TAT CCG CCA GTT GCT GCT GTA ACT GTT TCA TAT CCA AAA GAA GCT	1103
Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala	
355 360 365	
ATT AGA AAA GAA TGC TTA ATT GAT GGG GAG CTC CAG GGT TTC GGC CAG	1151
Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln	
370 375 380	
TTG CAT CCA CGT AGC CAA GGA GTC GAG ACT TTA GGG ACA ATA TAT AGC	1199
Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser	

[서열 9d]

385	390	395	
TCT TCT CTC TTT CCT AAT CGT GCT CCT GCT GGA AGA GTG TTA CTT CTG			1247
Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu			
400	405	410	415
AAC TAT ATC GGG GGT TCT ACA AAT ACA GGG ATC GTC TCC AAG ACT GAG			1295
Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu			
420	425	430	
AGT GAC TTA GTA GGA GCC GTT GAC CGT GAC CTC AGA AAA ATG TTG ATA			1343
Ser Asp Leu Val Gly Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile			
435	440	445	
AAC CCT AGA GCA GCA GAC CCT TTA GCA TTA GGG GTT CGA GTG TGG CCA			1391
Asn Pro Arg Ala Ala Asp Pro Leu Ala Leu Gly Val Arg Val Trp Pro			
450	455	460	
CAA GCA ATA CCA CAG TTT TTG ATT GGG CAC CTT GAT CGC CTT GCT GCT			1439
Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His Leu Asp Arg Leu Ala Ala			
465	470	475	
GCA AAA TCT GCA CTG GGC CAA GGC GGC TAC GAC GGG TTG TTC CTA GGA			1487
Ala Lys Ser Ala Leu Gly Gln Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly			
480	485	490	495
GGA AAC TAC GTC GCA GGA GTT GCC TTG GGC CGA TGC ATC GAG GGT GCG			1535
Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala			
500	505	510	
TAC GAG AGT GCC TCA CAA GTA TCT GAC TTC TTG ACC AAG TAT GCC TAC			1583
Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Val Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr			
515	520	525	
AAG TGA TGGAAGTAGT GCATCTCTTC ATTTTGTGTC ATATACGAGG TGAGGCTAGG			1639
Lys			
ATCGGTAAAA CATCATGAGA TTCTGTAGTG TTTCTTTAAT TGAAAAACA AATTTTAGTG			1699
ATGCAATATG TGCTCTTTCC TGTAAGTTCGA GCATGTACAT CGGTATGGGA TAAAGTAGAA			1759
TAAGCTATTC TGCAAAAGCA GTGATTTTTT TTGAAAAAAA AAAAAAAAAA AA			1811

(2) 서열 10에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 528 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 10:

[서열 10a]

Ala Thr Met Ala Thr Ala Thr Val Ala Ala Ala Ser Pro Leu Arg Gly
1 5 10 15

Arg Val Thr Gly Arg Pro His Arg Val Arg Pro Arg Cys Ala Thr Ala
20 25 30

Ser Ser Ala Thr Glu Thr Pro Ala Ala Pro Gly Val Arg Leu Ser Ala
35 40 45

Glu Cys Val Ile Val Gly Ala Gly Ile Ser Gly Leu Cys Thr Ala Gln
50 55 60

Ala Leu Ala Thr Arg Tyr Gly Val Ser Asp Leu Leu Val Thr Glu Ala
65 70 75 80

Arg Asp Arg Pro Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Pro Asp Glu
85 90 95

Gly Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro
100 105 110

Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Phe
115 120 125

Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg
130 135 140

Pro Val Pro Ser Lys Pro Gly Asp Leu Pro Phe Phe Ser Leu Met Ser
145 150 155 160

Ile Pro Gly Lys Leu Arg Ala Gly Leu Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro
165 170 175

Pro Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn

[서열 10b]

180	185	190
Leu Gly Ala Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly 195	200	205
Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly 210	215	220
Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Ile Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr 225	230	235 240
Ile Lys Ala Ile Gln Asp Lys Gly Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp 245	250	255
Pro Arg Leu Pro Ala Pro Lys Gly Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys 260	265	270
Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala Ile Ala Ser Arg Leu Gly Ser Lys 275	280	285
Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr Ser Ile Thr Lys Ala Asp Asn Gln 290	295	300
Gly Tyr Val Leu Gly Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Leu Val Ser Val Gln 305	310	315 320
Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile 325	330	335
Leu Arg Pro Leu Ser Ile Asp Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr 340	345	350
Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile 355	360	365
Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu 370	375	380
His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser 385	390	395 400
Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn 405	410	415
Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser		

[서열 10c]

420	425	430
Asp Leu Val Gly Ala Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn		
435	440	445
Pro Arg Ala Ala Asp Pro Leu Ala Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln		
450	455	460
Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly His Leu Asp Arg Leu Ala Ala Ala		
465	470	475
Lys Ser Ala Leu Gly Gln Gly Gly Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly		
485	490	495
Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala Tyr		
500	505	510
Glu Ser Ala Ser Gln Val Ser Asp Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys		
515	520	525

(2) 서열 11에 대한 정보:

(i) 서열 특징

(A) 길이: 1847 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(vi) 최초 기원

(A) 유기체: 콩

(vii) 직접적인 기원

(B) 클론: pWDC-12(NRRL-B 21516)

(ix) 특징

(A) 명칭/키: CDS

(B) 위치: 55..1683

(D) 또 다른 정보: /산물 "콩 프로텍스-1"

(xi) 서열 기술: 서열 11:

[서열 11a]

CTTTAGCACA GTGTTGAAGA TAACGAACGA ATAGTGCCAT TACTGTAACC AACC ATG	57
Met	
1	
GTT TCC GTC TTC AAC GAG ATC CTA TTC CCG CCG AAC CAA ACC CTT CTT	105
Val Ser Val Phe Asn Glu Ile Leu Phe Pro Pro Asn Gln Thr Leu Leu	
5 10 15	
CGC CCC TCC CTC CAT TCC CCA ACC TCT TTC TTC ACC TCT CCC ACT CGA	153
Arg Pro Ser Leu His Ser Pro Thr Ser Phe Phe Thr Ser Pro Thr Arg	
20 25 30	
AAA TTC CCT CGC TCT CGC CCT AAC CCT ATT CTA CGC TGC TCC ATT GCG	201
Lys Phe Pro Arg Ser Arg Pro Asn Pro Ile Leu Arg Cys Ser Ile Ala	
35 40 45	
GAG GAA TCC ACC GCG TCT CCG CCC AAA ACC AGA GAC TCC GCC CCC GTG	249
Glu Glu Ser Thr Ala Ser Pro Pro Lys Thr Arg Asp Ser Ala Pro Val	
50 55 60 65	
GAC TGC GTC GTC GTC GGC GGA GGC GTC AGC GGC CTC TGC ATC GCC CAG	297
Asp Cys Val Val Val Gly Gly Gly Val Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln	
70 75 80	
GCC CTC GCC ACC AAA CAC GCC AAT GCC AAC GTC GTC GTC ACG GAG GCC	345
Ala Leu Ala Thr Lys His Ala Asn Ala Asn Val Val Val Thr Glu Ala	
85 90 95	
CGA GAC CGC GTC GGC GGC AAC ATC ACC ACG ATG GAG AGG GAC GGA TAC	393
Arg Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Met Glu Arg Asp Gly Tyr	
100 105 110	
CTC TGG GAA GAA GGC CCC AAC AGC TTC CAG CCT TCT GAT CCA ATG CTC	441
Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu	
115 120 125	
ACC ATG GTG GTG GAC AGT GGT TTA AAG GAT GAG CTT GTT TTG GGG GAT	489
Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly Asp	
130 135 140 145	
CCT GAT GCA CCT CGG TTT GTG TTG TGG AAC AGG AAG TTG AGG CCG GTG	537
Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro Val	
150 155 160	

[서열 11b]

CCC GGG AAG CTG ACT GAT TTG CCT TTC TTT GAC TTG ATG AGC ATT GGT Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly 165 170 175	585
GGC AAA ATC AGG GCT GGC TTT GGT GCG CTT GGA ATT CGG CCT CCT CCT Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro Pro 180 185 190	633
CCA GGT CAT GAG GAA TCG GTT GAA GAG TTT GTT CGT CGG AAC CTT GGT Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly 195 200 205	681
GAT GAG GTT TTT GAA CGG TTG ATA GAG CCT TTT TGT TCA GGG GTC TAT Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr 210 215 220 225	729
GCA GGC GAT CCT TCA AAA TTA AGT ATG AAA GCA GCA TTC GGG AAA GTT Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val 230 235 240	777
TGG AAG CTG GAA AAA AAT GGT GGT AGC ATT ATT GGT GGA ACT TTC AAA Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys 245 250 255	825
GCA ATA CAA GAG AGA AAT GGA GCT TCA AAA CCA CCT CGA GAT CCG CGT Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg 260 265 270	873
CTG CCA AAA CCA AAA GGT CAG ACT GTT GGA TCT TTC CGG AAG GGA CTT Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu 275 280 285	921
ACC ATG TTG CCT GAT GCA ATT TCT GCC AGA CTA GGC AAC AAA GTA AAG Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val Lys 290 295 300 305	969
TTA TCT TGG AAG CTT TCA AGT ATT AGT AAA CTG GAT AGT GGA GAG TAC Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu Tyr 310 315 320	1017
AGT TTG ACA TAT GAA ACA CCA GAA GGA GTG GTT TCT TTG CAG TGC AAA Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys Lys 325 330 335	1065

[서열 11c]

ACT GTT GTC CTG ACC ATT CCT TCC TAT GTT GCT AGT ACA TTG CTG CGT Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu Arg 340 345 350	1113
CCT CTG TCT GCT GCT GCT GCA GAT GCA CTT TCA AAG TTT TAT TAC CCT Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr Pro 355 360 365	1161
CCA GTT GCT GCA GTT TCC ATA TCC TAT CCA AAA GAA GCT ATT AGA TCA Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Ser 370 375 380 385	1209
GAA TGC TTG ATA GAT GGT GAG TTG AAG GGG TTT GGT CAA TTG CAT CCA Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro 390 395 400	1257
CGT AGC CAA GGA GTG GAA ACA TTA GGA ACT ATA TAC AGC TCA TCA CTA Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu 405 410 415	1305
TTC CCC AAC CGA GCA CCA CCT GGA AGG GTT CTA CTC TTG AAT TAC ATT Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile 420 425 430	1353
GGA GGA GCA ACT AAT ACT GGA ATT TTA TCG AAG ACG GAC AGT GAA CTT Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu Leu 435 440 445	1401
GTG GAA ACA GTT GAT CGA GAT TTG AGG AAA ATC CTT ATA AAC CCA AAT Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro Asn 450 455 460 465	1449
GCC CAG GAT CCA TTT GTA GTG GGG GTG AGA CTG TGG CCT CAA GCT ATT Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala Ile 470 475 480	1497
CCA CAG TTC TTA GTT GGC CAT CTT GAT CTT CTA GAT GTT GCT AAA GCT Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys Ala 485 490 495	1545
TCT ATC AGA AAT ACT GGG TTT GAA GGG CTC TTC CTT GGG GGT AAT TAT Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr 500 505 510	1593
GTG TCT GGT GTT GCC TTG GGA CGA TGC GTT GAG GGA GCC TAT GAG GTA	1641
[서열 11d]	
Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val 515 520 525	
GCA GCT GAA GTA AAC GAT TTT CTC ACA AAT AGA GTG TAC AAA Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys 530 535 540	1683
TAGTAGCAGT TTTTGT TTTT GTGGTGAAT GGGTGATGGG ACTCTCGTGT TCCATTGAAT	1743
TATAATAATG TGAAAGTTTC TCAAATTCGT TCGATAGGTT TTTGGCGGCT TCTATTGCTG	1803
ATAATGTAAA ATCCTCTTTA AGTTTGAAAA AAAAAAAAAA AAAA	1847

(2) 서열 12에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 543 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 12:

[서열 12a]

Met	Val	Ser	Val	Phe	Asn	Glu	Ile	Leu	Phe	Pro	Pro	Asn	Gln	Thr	Leu
1				5					10					15	
Leu	Arg	Pro	Ser	Leu	His	Ser	Pro	Thr	Ser	Phe	Phe	Thr	Ser	Pro	Thr
			20					25					30		
Arg	Lys	Phe	Pro	Arg	Ser	Arg	Pro	Asn	Pro	Ile	Leu	Arg	Cys	Ser	Ile
		35					40					45			
Ala	Glu	Glu	Ser	Thr	Ala	Ser	Pro	Pro	Lys	Thr	Arg	Asp	Ser	Ala	Pro
	50					55					60				
Val	Asp	Cys	Val	Val	Val	Gly	Gly	Gly	Val	Ser	Gly	Leu	Cys	Ile	Ala
65					70					75				80	
Gln	Ala	Leu	Ala	Thr	Lys	His	Ala	Asn	Ala	Asn	Val	Val	Val	Thr	Glu
				85					90					95	
Ala	Arg	Asp	Arg	Val	Gly	Gly	Asn	Ile	Thr	Thr	Met	Glu	Arg	Asp	Gly
		100						105						110	

[서열 12b]

Tyr Leu Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met
 115 120 125
 Leu Thr Met Val Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu Gly
 130 135 140
 Asp Pro Asp Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Arg Lys Leu Arg Pro
 145 150 155 160
 Val Pro Gly Lys Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile
 165 170 175
 Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly Phe Gly Ala Leu Gly Ile Arg Pro Pro
 180 185 190
 Pro Pro Gly His Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu
 195 200 205
 Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val
 210 215 220
 Tyr Ala Gly Asp Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys
 225 230 235 240
 Val Trp Lys Leu Glu Lys Asn Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe
 245 250 255
 Lys Ala Ile Gln Glu Arg Asn Gly Ala Ser Lys Pro Pro Arg Asp Pro
 260 265 270
 Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly
 275 280 285
 Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asn Lys Val
 290 295 300
 Lys Leu Ser Trp Lys Leu Ser Ser Ile Ser Lys Leu Asp Ser Gly Glu
 305 310 315 320
 Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr Pro Glu Gly Val Val Ser Leu Gln Cys
 325 330 335
 Lys Thr Val Val Leu Thr Ile Pro Ser Tyr Val Ala Ser Thr Leu Leu
 340 345 350

[서열 12c]

```

Arg Pro Leu Ser Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Lys Phe Tyr Tyr
    355                360                365

Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Ile Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg
    370                375                380

Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His
    385                390                395                400

Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser
    405                410                415

Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr
    420                425                430

Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Asp Ser Glu
    435                440                445

Leu Val Glu Thr Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Ile Leu Ile Asn Pro
    450                455                460

Asn Ala Gln Asp Pro Phe Val Val Gly Val Arg Leu Trp Pro Gln Ala
    465                470                475                480

Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Val Ala Lys
    485                490                495

Ala Ser Ile Arg Asn Thr Gly Phe Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn
    500                505                510

Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu
    515                520                525

Val Ala Ala Glu Val Asn Asp Phe Leu Thr Asn Arg Val Tyr Lys
    530                535                540

```

(2) 서열 13에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 583 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: DNA(계놈)

(iii) 추정 서열: No

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: 프로모터

(B) 위치: 1..583

(D) 또 다른 정보: /기능="아라비도프시스 프로토스-1 프로모터"

(xi) 서열 기술: 서열 13:

[서열 13]

GAATTCGGAT CGAATTATAT AATTATCATA AATTTGAATA AGCATGTTGC CTTTATTAA	60
AGAGGTTTAA TAAAGTTTGG TAATAATGGA CTTTGACTTC AAATCGATT CTCATGTAAT	120
TAATTAATAT TTACATCAAA ATTTGGTCAC TAATATTACC AAATTAATAT ACTAAAATGT	180
TAATTCGCAA ATAAACACT AATTCCAAAT AAAGGGTCAT TATGATAAAC ACGTATTGAA	240
CTTGATAAAG CAAAGCAAAA ATAATGGGTT TCAAGGTTTG GGTATATAT GACAAAAAAA	300
AAAAAAGGTT TGGTTATATA TCTATTGGGC CTATAACCAT GTTATACAAA TTTGGGCCTA	360
ACTAAAATAA TAAAATAAAC GTAATGGTCC TTTTATATTT TGGGTCAAAC CCAACTCTAA	420
ACCCAAACCA AAGAAAAAGT ATACGGTACG GTACACAGAC TTATGGTGTG TGTGATTGCA	480
GGTGAATATT TCTCGTCGTC TTCTCCTTTC TTCTGAAGAA GATTACCCAA TCTGAAAAAA	540
ACCAAGAAGC TGACAAAATT CCGAATTCTC TGCGATTTC ATG	583

(2) 서열 14에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 3848 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: DNA(계놈)

(iii) 추정 서열: No

(ix) 특징

(A) 명칭/키: 프로모터

(B) 위치: 1..3848

(D) 또 다른 정보: /기능="옥수수 프로토스-1 프로모터"

(xi) 서열 기술: 서열 14:

[서열 14a]

TCGATCTTTC TAGGCTGATC CCCAAATCTT CCTCCGAAGC CCCTGGCGCC TCTGCCCCCTT	60
GGAGCTGGTG GCCTGAAAGA GCTTTGCTGT TGCCCCGAAG ATTGTGAGGT ATATTGTGAC	120
CTCTGAGACT GACTTCCTTT GTCGTCACCT TGAGTGGAGT TATGGATTGA CCTGACGTGC	180
CTCAGATGGA TTCTTCCTCC GAAGCCCCTG GTCATTTCGG AGAATCTGTA ATCTTATTCC	240
CTTCTTTGGC GAAAATCTGT CAGCTTGGAT GTACTCATCC ATCTTCTGAA GCAGCTTCTC	300
CAGAGTTTGT GGAGGCTTCC TGGCGAAATA TTGGGCTGTA GGTCCCTGGAC GAAGACCCTT	360
GATCATGGCC TCAATGACAA TCTCATTGGG CACCGTAGGC GCTTGTGCCC TCAATCGCAA	420
GAACCTTCGT ACATATGCCT GAAGGTATTC TTCGTGATCT TGTGTGCATT GGAACAGAGC	480
CTGAGCTGTG ACCGACTTCG TTTGAAAGCC TTGGAAGCTA GTAACCAACA TGTGCTTAAG	540
CTTCTGCCAC GACGTGATAG TCCCTGGCCG AAGAGAAGAA TACCATGTTT GGGCTACATT	600
CCGGACTGCC ATGACGAAGG ACTTCGCCAT GACTACAGTG TTGACCCCAT ACGAAGATAT	660
AGTTGCTTCG TAGCTCATCA GAAACTGCTT TGGATCTGAG TGCCCATCAT ACATGGGGAG	720
CTGAGGTGGC TTGTATGATG GGGGCCATGG GGTAGCCTGC AGTTCTGCTG CCAAGGGAGA	780
AGCATCATCA AAAGTAAAGG CATCATGATT AAAATCATCA TACCATCCAT CCTCGTTGAA	840
TAAGCCTTCT TGACGAAGCT CCCTGTGTTG GGGCCTTCGA TCTTGTTTCA CTGAACAAG	900
ATGACGCACT TCTTCAGTGG CTTGCTCGAT CTTTCTTTGG AGATCAGCCA GTCGCACCAT	960
CTTCTCCTTC TTTCTTTGTA CTTGTTGATG GATGATCTCC ATGTCCCTGA TCTCTTGGTC	1020
CAACTCCTCC TCTTGGAGTG TCAGACTGGT GGCTTTCCTC TTCTGGCTTC GAGCCTCTCG	1080

[서열 14b]

AAGAGAAAGA GTTCTTGAT TTGGGTCCAG CGGCTGCAGT GCAGTGGTCC CTGGTGCTGA	1140
AGCTTTCTTC GGTGGCATGA CAAAGGTCAG TGCTTGCCGA AGGTGGTCGA AAAGGGTTCA	1200
CTAGAGGTGG GAGCCAATGT TGGGGACTTC TCAAGTGCTA TGAGTTAAGA ACAAGGCAAC	1260
ACAAAATGTT AAATATTAAT AGCTTTCATC TTTCGAAGCA TTATTCCCT TTGGGTATAA	1320
TGATCTTCAG ACGAAAGAGT CCTTCATCAT TGCATATAT GTTAATAGAA GGAGGAGCAT	1380
ATGAAATGTA AGAGACAACA TGAACAATCG TGTCAGATTG TTAATTCATC ATCATTTTAT	1440
TATTATGGAA AAATAGAAAC AATATTGAAT TACAAATGTA CCTTGCGCTT GACAGAAGAT	1500
AAAAGTACAA GCTTGACGCA CGAGCAAGTA CAAGTCAGTG TGAACAGTAC GGGGGTACTG	1560
TTCATCTATT TATAGGCACA GGACACAGCC TGTGAGAAAT TACAGTCATG CCCTTTACAT	1620
TTACTATTGA CTTATAGAAA AATCTATGAG GACTGGATAG CCTTTTCCCC TTTAAGTCGG	1680
TGCCTTTTTC CGCGATTAAG CCGAATCTCC CTTGCGCATA GCTTCGGAGC ATCGGCAACC	1740
TTGCTCACGA TCATGCCCTT CTCATTGTGT ATGCTTTTAA TCCTGAATTC GAAGGTACCT	1800
GTCCATAAAC CATACTTGA AGACATTGTT AAATTATGTT TTTGAGGACC TTCGGAGGAC	1860
GAAGGCCCC AACAGTCGTG TTTTGAAGGA CCTTCGGAAG ATGAAGGCC CCAACAAGAC	1920
CTATCCATAA AACCAACCTA TCCACAAAAC CGACCCCAT CACCCTTCAT TTGCCTCACC	1980
AACAACCCTA ATTAGGTTGT TGGTTTAAAT TTTTAGGGT CAATTGGTC ATCACCATCC	2040
ACTGTCACTC CACAACTCA ATATCAATAA ACAGACTCAA TCACCCAAAC TGACCATACC	2100
CATAAAACCG CCCACCCCTT CTAGCGCCTC GCCAGAAACC AGAAACCCTG ATTCAGAGTT	2160
CAAACCTAAA ACGACCATAA CTTTCACCTT GGAACGCGAA TCAGGTCCAT TTTTTCCTAA	2220
ATCACACAAA ATTAAATTC GCATCCGATA ATCAAGCCAT CTCCTCACTA TGGTTTAAAG	2280
TGTTGCTCAC ACTAGTGAT TTATGGACTA ATCACCTGTG TATCTCATAC AATAACATAT	2340
CAGTACATCT AAGTTGTTAC TCAATTACCA AAACCGAATT ATAGCCTTCG AAAAAGGTTA	2400
TCGACTAGTC ACTCAATTAC CAAAACCTAA CTTTAGACTT TCATGTATGA CATCCAACAT	2460

[서열 14c]

GACACTGTAC TGGACTAAAC CACCTTTCAA GCTACACAAG GAGCAAAAAT AACTAATTTT 2520

CGTAGTTGTA GGAGCTAAAG TATATGTCCA CAACAATAGT TAAGGGAAGC CCCCAAGGAC 2580

TTAAAAGTCC TTTTACCTCT TGAAACTTTT GTCGTGGTCT ACTTTTTCAC TTTAAACTTC 2640

AAAATTTGAC ATTTTATCAC CCCTTAACTC TTAAAACCAT TTAAATTACA TTCTTACTAG 2700

ATTATAGATG ATTTTGTGTG GAAAAGTTT TAAGACATGT TTACACATTG ATTAAATCA 2760

TTTGTCAAT TTCCTAGAGT TAAATCTAAT CTTATTAAAA CTATTAGAGA TACTTTCACG 2820

AGCTCTAAAT ATTTTATTTT TTTTATTATG GAATTTTGT AGAATTCCTA TAGACCTTTT 2880

TTTGTGGTTT AAAAGCCTTG CCATGTTTTT AACAAGTTTT TTTCTATTT TTTGAAATTT 2940

TCTTGGAAC CACTTCTAAC CCGGTAGAAG ATTTATTTTG CTACACTTAT ATCTACAACA 3000

AAATCAACTT ATGAAATTGT CTTGGAACT ACCTCTAACC CGGTAGAATG AATTGGAATG 3060

AAAATTAAAC CAACTTACGG AATCGCCCA CATATGTCGA TTAAAGTGA TATGGATACA 3120

TATGAAGAAG CCCTAGAGAT AATCTAAATG GTTTCAGAAT TGAGGGTTAT TTTTGAAGT 3180

TTGATGGGAA GATAAGACCA TAACGGTAGT TCACAGAGAT AAAAGGGTTA TTTTTTTCAG 3240

AAATATTTGT GCTGCAATTG ATCCTGTGCC TCAAATTCAG CCTGCAACCA AGGCCAGGTT 3300

CTAGAGCGAA CAAGGCCAC GTCACCCGTG GCCCGTCAGG CGAAGCAGGT CTTGTGCAGA 3360

CTTTGAGAGG GATTGGATAT CAACGGAACC AATCACGCAC GGCAATGCGA TTCCAGCCCC 3420

ACCTGTAACG TTCCAGTGGG CCATCCTTAA CTCCAAGCCC AACGGCCCTA CCCCATCTCG 3480

TCGTGTCATC CACTCCGCC CACAGGCGCT CAGCTCCGA ACGCCGCCG AAATGGTCGC 3540

CGCCACAGCC ACCGCCATGG CCACCGCTGC ATCGCCGCTA CTCAACGGGA CCCGAATACC 3600

TGCGCGGCTC CGCCATCGAG GACTCAGCGT GCGCTGCGCT GCTGTGGCGG GCGGCGCGGC 3660

CGAGGCACCG GCATCCACCG GCGCGCGGCT GTCCGCGGAC TGC GTTGTGG TGGGCGGAGG 3720

CATCAGTGGC CTCTGCACCG CGCAGGCGCT GGCCACGCG CACGGCGTCG GGGACGTGCT 3780

[서열 14d]

TGTCACGGAG GCGCGCGCC GCGCGGCGG CAACATTACC ACCGTCGAGC GCGCGAGGA 3840

AGGGTACC 3848

(2) 서열 15에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1826 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(vi) 최초 기원:

(A) 유기체: 고시피움 히르수툼(무명)

(vii) 직접적인 기원:

(B) 클론: pWPC-15(NRRL B-21594)

(ix) 특징

(A) 명칭/키: misc 특징

(B) 위치: 31..1647

(D) 또 다른 정보: /산물="무명 프로토스010 암호화 영역"

(xi) 서열 기술: 서열 15:

[서열 15a]

CCTCTCGCTC GCCTGGCCCC ACCACCAATC ATGACGGCTC TAATCGACCT TTCTCTTCTC	60
CGTTCCTCGC CCTCCGTTTC CCCTTTCTCC ATACCCACC ACCAGCATCC GCCCCGCTTT	120
CGTAAACCTT TCAAGCTCCG ATGCTCCCTC GCCGAGGGTC CCACGATTTC CTCATCTAAA	180
ATCGACGGGG GAGAATCATC CATCGCGGAT TGCCTCATCG TTGGAGGTGG TATCAGTGGA	240
CTTTGCATTG CTCAAGCTCT CGCCACCAAG CACCGTGACG TCGCTTCCAA TGTGATTGTG	300
ACGGAGGCCA GAGACCGTGT TGGTGGCAAC ATCACTACCG TTGAGAGAGA TGGATATCTG	360

[서열 15b]

TGGGAAGAAG GCCCAACAG TTTTCAGCCC TCCGATCCTA TTCTAACCAT GGCCGTGGAT	420
AGTGGATTGA AGGACGATT TGGTTTAGGT GACCCTAATG CACCGCGATT TGTACTATGG	480
GAGGGAAAAAC TAAGGCCTGT GCCCTCCAAG CCAACCGACT TGCCGTTTTT TGATTGATG	540
AGCATTGCTG GAAAACTTAG GGCTGGGTTC GGGGCTATTG GCATTGCGCC TCCCCCTCCG	600
GGTTATGAAG AATCGGTGGA GGAGTTTGTG CGCCGTAATC TTGGTGCTGA GGTTTTTGAA	660
CGCTTTATTG AACCATTTTG TTCAGGTGTT TATGCAGGGG ATCCTTCAAA ATTAAGCATG	720
AAAGCAGCAT TTGAAGAGT ATGGAAGCTA GAAGAGATTG GTGGCAGCAT CATGGTGGC	780
ACTTTCAAGA CAATCCAGGA GAGAAATAAG ACACCTAAGC CACCCAGAGA CCGCGTCTG	840
CCAAAACCGA AGGGCCAAAC AGTTGGATCT TTTAGGAAGG GACTTACCAT GCTGCCTGAG	900
GCAATTGCTA ACAGTTTGGG TAGCAATGTA AAATTATCTT GGAAGCTTTC CAGTATTACC	960
AAATTGGGCA ATGGAGGGTA TAACTTGACA TTTGAAACAC CTGAAGGAAT GGTATCTCTT	1020
CAGAGTAGAA GTGTTGTAAT GACCATTCCA TCCCATGTTG CCAGTAACTT GTTGCATCCT	1080
CTCTCGGCTG CTGCTGCAGA TGCATTATCC CAATTTTATT ATCCTCCAGT TGCATCAGTC	1140
ACAGTCTCCT ATCCAAAAGA AGCCATTGCA AAAGAATGTT TGATTGATGG TGAACCTAAG	1200
GGGTTTGCC AGTTGCACCC ACGCAGCCAA GGAATTGAAA CTTTAGGGAC GATATACAGT	1260
TCATCACTTT TCCCAATCG AGCTCCATCT GGCAGGGTGT TGCTCTTGAA CTACATAGGA	1320
GGAGCTACCA AACTGGAAT TTTGTCCAAG ACTGAAGGGG AACTTGTAAG AGCAGTTGAT	1380
CGTGATTGA GAAAAATGCT TATAAATCCT AATGCAAAGG ATCCTCTTGT TTTGGGTGTA	1440
AGAGTATGGC CAAAAGCCAT TCCACAGTTC TTGGTTGGTC ATTTGGATCT CCTTGATAGT	1500
GCAAAAAATGG CTCTCAGGGA TTCTGGGTTT CATGGACTGT TTCTTGGGG CAACTATGTA	1560
TCTGGTGTGG CATTAGGACG GTGTGTGGAA GGTGCTTACG AGGTTGCAGC TGAAGTGAAG	1620
GAATTCCTGT CACAATATGC ATACAAATAA TATTGAAATT CTTGTCAGGC TGCAAATGTA	1680

[서열 15c]

GAAGTCAGTT ATTGGATAGT ATCTCTTTAG CTAAAAAATT GGGTAGGGTT TTTTGTGTA	1740
GTTCCCTGAC CACTTTTGG GGTTCATT AGAACTTCAT ATTTGTATAT CATGTTGCAA	1800
TATCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA	1826

(2) 서열 16에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 539 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(C) 쇠: 관련 없음

(D) 형태: 관련 없음

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 16:

[서열 16a]

```

Met Thr Ala Leu Ile Asp Leu Ser Leu Leu Arg Ser Ser Pro Ser Val
1           5           10           15

Ser Pro Phe Ser Ile Pro His His Gln His Pro Pro Arg Phe Arg Lys
           20           25           30

Pro Phe Lys Leu Arg Cys Ser Leu Ala Glu Gly Pro Thr Ile Ser Ser
           35           40           45

Ser Lys Ile Asp Gly Gly Glu Ser Ser Ile Ala Asp Cys Val Ile Val
           50           55           60

Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Ala Thr Lys
65           70           75           80

His Arg Asp Val Ala Ser Asn Val Ile Val Thr Glu Ala Arg Asp Arg
           85           90           95

Val Gly Gly Asn Ile Thr Thr Val Glu Arg Asp Gly Tyr Leu Trp Glu
           100          105          110

Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Ile Leu Thr Met Ala
           115          120          125

```

[서열 16b]

Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Asn Ala
130 135 140

Pro Arg Phe Val Leu Trp Glu Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys
145 150 155 160

Pro Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Ala Gly Lys Leu
165 170 175

Arg Ala Gly Phe Gly Ala Ile Gly Ile Arg Pro Pro Pro Pro Gly Tyr
180 185 190

Glu Glu Ser Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Ala Glu Val
195 200 205

Phe Glu Arg Phe Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp
210 215 220

Pro Ser Lys Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Arg Val Trp Lys Leu
225 230 235 240

Glu Glu Ile Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Phe Lys Thr Ile Gln
245 250 255

Glu Arg Asn Lys Thr Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys
260 265 270

Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu
275 280 285

Pro Glu Ala Ile Ala Asn Ser Leu Gly Ser Asn Val Lys Leu Ser Trp
290 295 300

Lys Leu Ser Ser Ile Thr Lys Leu Gly Asn Gly Gly Tyr Asn Leu Thr
305 310 315 320

Phe Glu Thr Pro Glu Gly Met Val Ser Leu Gln Ser Arg Ser Val Val
325 330 335

Met Thr Ile Pro Ser His Val Ala Ser Asn Leu Leu His Pro Leu Ser
340 345 350

Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ser Gln Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala
355 360 365

[서열 16c]

```

Ser Val Thr Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu
  370                375                380

Ile Asp Gly Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln
 385                390                395                400

Gly Ile Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn
      405                410                415

Arg Ala Pro Ser Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala
      420                425                430

Thr Asn Thr Gly Ile Leu Ser Lys Thr Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala
      435                440                445

Val Asp Arg Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Asn Ala Lys Asp
      450                455                460

Pro Leu Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Lys Ala Ile Pro Gln Phe
      465                470                475                480

Leu Val Gly His Leu Asp Leu Leu Asp Ser Ala Lys Met Ala Leu Arg
      485                490                495

Asp Ser Gly Phe His Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ser Gly
      500                505                510

Val Ala Leu Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Val Ala Ala Glu
      515                520                525

Val Lys Glu Phe Leu Ser Gln Tyr Ala Tyr Lys
      530                535

```

(2) 서열 17에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1910 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(vi) 최초 기원:

(A) 유기체: 베타 불가리스(슈거 비트)

(vii) 직접적인 기원:

(B) 클론: pWDC-16(NRRL B-21595N)

(ix) 특징

(A) 명칭/키: misc 특징

(B) 위치: 1..1680

(D) 또 다른 정보: /산물="슈거 비트 프로토크스-1 암호화 영역"

(xi) 서열 기술: 서열 17:

[서열 17a]

ATGAAATCAA TGGCGTTATC AAACGTCATT CCACAGACAC AGTGCATGCC ATTGCGCAGC	60
AGCGGGCATT ACAGGGGTAA TTGTATCATG TTGTCAATTC CATGTAGTTT AATTGGAAGA	120
CGAGGTTATT ATTCACATAA GAAGAGGAGG ATGAGCATGA GTTGCAGCAC AAGCTCAGGC	180
TCAAAGTCAG CGGTTAAAGA AGCAGGATCA GGATCAGGTG CAGGAGGATT GCTAGACTGC	240
GTAATCGTTG GAGGTGGAAT TAGCGGGCTT TGCATCGCGC AGGCTCTTTG TACAAAACAC	300
TCCTCTTCCT CTTTATCCCC AAATTTTATA GTTACAGAGG CCAAAGACAG AGTTGGCGGC	360
AACATCGTCA CTGTGGAGGC CGATGGCTAT ATCTGGGAGG AGGGACCCAA TAGCTTCCAG	420
CCTTCCGACG CGGTGCTCAC CATGGCGGTC GACAGTGGCT TGAAAGATGA GTTGGTGCTC	480
GGAGATCCCA ATGCTCCTCG CTTTGTGCTA TGGAATGACA AATTAAGGCC CGTACCTTCC	540
AGTCTCACCG ACCTCCCTTT CTTCGACCTC ATGACCATTC CGGGCAAGAT TAGGGCTGCT	600
CTTGGTGCTC TCGGATTTTC CCCTTCTCCT CCACCTCATG AGGAATCTGT TGAACACTTT	660
GTGCGTCGTA ATCTCGGAGA TGAGGTCTTT GAACGCTTGA TTGAACCCCTT TTGTTTCAGT	720
GTGTATGCCG GTGATCCTGC CAAGCTGAGT ATGAAAGCTG CTTTGGGAA GGTCTGGAAG	780
TTGGAGCAAA AGGGTGGCAG CATAATTGGT GGCACCTCTCA AAGCTATACA GGAAAGAGGG	840

[서열 17b]

```

AGTAATCCTA AGCCGCCCCG TGACCAGCGC CTCCTAAAC CAAAGGGTCA GACTGTTGGA    900
TCCTTTAGAA AGGGACTCGT TATGTTGCCT ACCGCCATTT CTGCTCGACT TGGCAGTAGA    960
GTGAAACTAT CTTGGACCCT TTCTAGTATC GTAAAGTCAC TCAATGGAGA ATATAGTCTG    1020
ACTTATGATA CCCAGATGG CTTGGTTTCT GTAAGAACCA AAAGTGTGT GATGACTGTT    1080
CCATCATATG TTGCAAGTAG GCTTCTTCGT CCACTTTCAG ACTCTGCTGC AGATTCTCTT    1140
TCAAAATTTT ACTATCCACC AGTGCAGCA GTGTCACCTT CCTATCTAA AGAAGCGATC    1200
AGATCAGAAT GCTTGATTAA TGGTGAACCT CAAGGTTTCG GGCAACTACA TCCCCGAGT    1260
CAGGGTGTGG AAACCTTGGG AACAAATTTAT AGTTCGTCTC TTTTCCCTGG TCGAGCACCA    1320
CCTGGTAGGA TCTTGATCTT GAGCTACATC GGAGGTGCTA AAAATCCTGG CATATTAAAC    1380
AAGTCGAAAG ATGAACTTGC CAAGACAGTT GACAAGGACC TGAGAAGAAT GCTTATAAAT    1440
CCTGATGCAA AACTTCCTCG TGTACTGGGT GTGAGAGTAT GGCCTCAAGC AATACCCAG    1500
TTTTCTATTG GGCACCTTGA TCTGCTCGAT GCTGCAAAAG CTGCTCTGAC AGATACAGGG    1560
GTCAAAGGAC TGTTCCTTGG TGGCAACTAT GTTTCAGGTG TTGCCTTGGG GCGGTGTATA    1620
GAGGGTGCTT ATGAGTCTGC AGCTGAGGTA GTAGATTTC TCTCACAGTA CTCAGACAAA    1680
TAGAGCTTCA GCATCCTGTG TAATTCAACA CAGGCCTTTT TGTATCTGTT GTGCGCGCAT    1740
GTAGTCTGGT CGTGGTGCTA GGATTGATTA GTTGCTCTGC TGTGTGATCC ACAAGAATTT    1800
TGATGGAATT TTTCCAGATG TGGGCATTAT ATGTTGCTGT CTTATAAATC CTTAATTTGT    1860
ACGTTTAGTG AATTACACCG CATTTGATGA CTAAAAAAA AAAAAAAAAA    1910

```

(2) 서열 18에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 560 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(C) 쇄: 관련 없음

(D) 형태: 관련 없음

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 18:

[서열 18a]


```

Met Lys Ser Met Ala Leu Ser Asn Cys Ile Pro Gln Thr Gln Cys Met
1           5           10           15

Pro Leu Arg Ser Ser Gly His Tyr Arg Gly Asn Cys Ile Met Leu Ser
          20           25           30

Ile Pro Cys Ser Leu Ile Gly Arg Arg Gly Tyr Tyr Ser His Lys Lys
          35           40           45

Arg Arg Met Ser Met Ser Cys Ser Thr Ser Ser Gly Ser Lys Ser Ala
          50           55           60

Val Lys Glu Ala Gly Ser Gly Ser Gly Ala Gly Gly Leu Leu Asp Cys
65           70           75           80

Val Ile Val Gly Gly Gly Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu
          85           90           95

Cys Thr Lys His Ser Ser Ser Ser Leu Ser Pro Asn Phe Ile Val Thr
          100          105          110

Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly Asn Ile Val Thr Val Glu Ala Asp
          115          120          125

Gly Tyr Ile Trp Glu Glu Gly Pro Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Ala
          130          135          140

Val Leu Thr Met Ala Val Asp Ser Gly Leu Lys Asp Glu Leu Val Leu
145          150          155          160

Gly Asp Pro Asn Ala Pro Arg Phe Val Leu Trp Asn Asp Lys Leu Arg
          165          170          175

Pro Val Pro Ser Ser Leu Thr Asp Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Thr
          180          185          190

Ile Pro Gly Lys Ile Arg Ala Ala Leu Gly Ala Leu Gly Phe Arg Pro
          195          200          205

```

[서열 18b]

```

Ser Pro Pro Pro His Glu Glu Ser Val Glu His Phe Val Arg Arg Asn
 210                215                220

Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly
225                230                235                240

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

Lys Val Trp Lys Leu Glu Gln Lys Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr
 260                265                270

Leu Lys Ala Ile Gln Glu Arg Gly Ser Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp
 275                280                285

Gln Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys
 290                295                300

Gly Leu Val Met Leu Pro Thr Ala Ile Ser Ala Arg Leu Gly Ser Arg
305                310                315                320

Val Lys Leu Ser Trp Thr Leu Ser Ser Ile Val Lys Ser Leu Asn Gly
                325                330                335

Glu Tyr Ser Leu Thr Tyr Asp Thr Pro Asp Gly Leu Val Ser Val Arg
 340                345                350

Thr Lys Ser Val Val Met Thr Val Pro Ser Tyr Val Ala Ser Arg Leu
 355                360                365

Leu Arg Pro Leu Ser Asp Ser Ala Ala Asp Ser Leu Ser Lys Phe Tyr
 370                375                380

Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser Leu Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile
385                390                395                400

Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asn Gly Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu
 405                410                415

His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser
 420                425                430

Ser Leu Phe Pro Gly Arg Ala Pro Pro Gly Arg Ile Leu Ile Leu Ser
 435                440                445

```

[서열 18c]

```

Tyr Ile Gly Gly Ala Lys Asn Pro Gly Ile Leu Asn Lys Ser Lys Asp
450                455                460

Glu Leu Ala Lys Thr Val Asp Lys Asp Leu Arg Arg Met Leu Ile Asn
465                470                475                480

Pro Asp Ala Lys Leu Pro Arg Val Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln
                485                490                495

Ala Ile Pro Gln Phe Ser Ile Gly His Phe Asp Leu Leu Asp Ala Ala
                500                505                510

Lys Ala Ala Leu Thr Asp Thr Gly Val Lys Gly Leu Phe Leu Gly Gly
                515                520                525

Asn Tyr Val Ser Gly Val Ala Leu Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala Tyr
                530                535                540

Glu Ser Ala Ala Glu Val Val Asp Phe Leu Ser Gln Tyr Ser Asp Lys
545                550                555                560

```

(2) 서열 19에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1784 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(vi) 최초 기원:

(A) 유형: 브라사가 나퍼스(유채)

(vii) 직접적인 기원:

(B) 클론: pWDC-17(NRRL B-2164)

(ix) 특징

(A) 명칭/키: misc 특징

(B) 위치: 47..1654

(D) 또 다른 정보: /산물="유채 프로텍스-1 암호화 영역"

(xi) 서열 기술: 서열 19:

[서열 19a]

GGGCCCCCCC CAAAATTGAG GATTCTCCTT CTCGCGGGCG ATCGCCATGG ATTTATCTCT	60
TCTCCGTCCG CAGCCATTCC TATCGCCATT CTCAAATCCA TTTCCTCGGT CGCGTCCCTA	120
CAAGCTCTC AACCTCCGTT GCTCCGTATC CGGTGGATCC GTCGTCGGCT CTTCTACAAT	180
CGAAGGCGGA GGAGGAGGTA AAACCGTCAC GCGGACTGCG GTGATCGTCG GCGGAGGAAT	240
CAGCGGCTG TGCATTGCGC AAGCGCTCGT GACGAAGCAC CCAGACGCTG CAAAGAATGT	300
GATGGTGACG GAGGCGAAGG ACCGTGTGGG AGGGAATATC ATCACGCGAG AGGAGCAAGG	360
GTTTCTATGG GAAGAAGGTC CCAATAGCTT TCAGCCGTCT GATCCTATGC TCACTATGGT	420
GGTAGATAGT GGTTTGAAAG ATGATCTAGT CTTGGGAGAT CCTACTGCTC CGAGGTTTGT	480
GTTGTGGAAT GGGAAAGCTGA GGCCGGTTCC GTCGAAGCTA ACTGACTTGC CTTTCTTTGA	540
CTTGATGAGT ATTGGAGGGA AGATTAGAGC TGGGTTTGGT GCCATTGGTA TTCGACCTTC	600
ACCTCCGGGT CGTGAGGAAT CAGTGAAGA GTTTGTAAGG CGTAATCTTG GTGATGAGGT	660
TTTTGAGCGC TTGATTGAAC CCTTTTGCTC AGGTGTTTAT GCGGGAGATC CTGCGAAACT	720
GAGTATGAAA GCAGCTTTTG GGAAGGTTTG GAAGCTAGAG GAGAATGGTG GGAGCATCAT	780
TGGTGGTGCT TTTAAGGCAA TTCAAGCGAA AAATAAGCT CCCAAGACAA CCCGAGATCC	840
GCGTCTGCCA AAGCCAAAGG GCCAAACTGT TGGTTCTTTC AGGAAAGGAC TCACAATGCT	900
GCCAGAGGCA ATCTCCGCAA GGTGGGGA CAAGGTGAAA GTTTCTTGA AGCTCTCAAG	960
TATCTACTAG CTGGCCAGCG GAGAATATAG CTTAACTTAC GAAACTCCGG AGGGTATAGT	1020
CACTGTACAG AGCAAAAGTG TAGTGATGAC TGTGCCATCT CATGTTGCTA GTAGTCTCTT	1080
GCGCCCTCTC TCTGATTCTG CAGCTGAAGC GCTCTCAAAA CTCTACTATC CGCCAGTTGC	1140
AGCCGTATCC ATCTCATACG CGAAAGAAGC AATCCGAAGC GAATGCTTAA TAGATGGTGA	1200

[서열 19b]

```

ACTAAAAGGG TTCGGCCAGT TGCATCCACG CACGCAAAAA GTGGAAACTC TTGGAACAAT    1260
ATACAGTTCA TCGCTCTTTC CCAACCGAGC ACCGCCTGGA AGAGTATTGC TATTGAACTA    1320
CATCGGTGGA GCTACCAACA CTGGGATCTT ATCAAAGTCG GAAGGTGAGT TAGTGGAAGC    1380
AGTAGATAGA GACTTGAGGA AGATGCTGAT AAAGCCAAGC TCGACCGATC CACTTGTA CT    1440
TGGAGTAAAA TTATGGCCTC AAGCCATTCC TCAGTTTCTG ATAGGTCACA TTGATTGGT    1500
AGACGCAGCG AAAGCATCGC TCTCGTCATC TGGTCATGAG GGCTTATTCT TGGGTGGAAA    1560
TTACGTTGCC GGTGTAGCAT TGGGTCGGTG TGTGGAAGGT GCTTATGAAA CTGCAACCCA    1620
AGTGAATGAT TTCATGTCAA GGTATGCTTA CAAGTAATGT AACGCAGCAA CGATTTGATA    1680
CTAAGTAGTA GATTTTGCAG TTTTGACTTT AAGAACA CTCTGTTGTGAA AAATTCAAGT    1740
CTGTGATTGA GTAAATTTAT GTATTATTAC TAAAAA AAAAAA    1784

```

(2) 서열 20에 대한 정보

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 536 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(C) 쇠: 관련 없음

(D) 형태: 관련 없음

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 20:

[서열 20a]

```

Met Asp Leu Ser Leu Leu Arg Pro Gln Pro Phe Leu Ser Pro Phe Ser
1           5           10          15

Asn Pro Phe Pro Arg Ser Arg Pro Tyr Lys Pro Leu Asn Leu Arg Cys
          20          25          30

Ser Val Ser Gly Gly Ser Val Val Gly Ser Ser Thr Ile Glu Gly Gly
          35          40          45

```

[서열 20b]

Gly Gly Gly Lys Thr Val Thr Ala Asp Cys Val Ile Val Gly Gly Gly
 50 55 60
 Ile Ser Gly Leu Cys Ile Ala Gln Ala Leu Val Thr Lys His Pro Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Lys Asn Val Met Val Thr Glu Ala Lys Asp Arg Val Gly Gly
 85 90 95
 Asn Ile Ile Thr Arg Glu Glu Gln Gly Phe Leu Trp Glu Glu Gly Pro
 100 105 110
 Asn Ser Phe Gln Pro Ser Asp Pro Met Leu Thr Met Val Val Asp Ser
 115 120 125
 Gly Leu Lys Asp Asp Leu Val Leu Gly Asp Pro Thr Ala Pro Arg Phe
 130 135 140
 Val Leu Trp Asn Gly Lys Leu Arg Pro Val Pro Ser Lys Leu Thr Asp
 145 150 155 160
 Leu Pro Phe Phe Asp Leu Met Ser Ile Gly Gly Lys Ile Arg Ala Gly
 165 170 175
 Phe Gly Ala Ile Gly Ile Arg Pro Ser Pro Pro Gly Arg Glu Glu Ser
 180 185 190
 Val Glu Glu Phe Val Arg Arg Asn Leu Gly Asp Glu Val Phe Glu Arg
 195 200 205
 Leu Ile Glu Pro Phe Cys Ser Gly Val Tyr Ala Gly Asp Pro Ala Lys
 210 215 220
 Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Lys Leu Glu Glu Asn
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Ala Phe Lys Ala Ile Gln Ala Lys Asn
 245 250 255
 Lys Ala Pro Lys Thr Thr Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly
 260 265 270
 Gln Thr Val Gly Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Glu Ala
 275 280 285

[서열 20c]

Ile Ser Ala Arg Leu Gly Asp Lys Val Lys Val Ser Trp Lys Leu Ser
 290 295 300

Ser Ile Thr Lys Leu Ala Ser Gly Glu Tyr Ser Leu Thr Tyr Glu Thr
 305 310 315 320

Pro Glu Gly Ile Val Thr Val Gln Ser Lys Ser Val Val Met Thr Val
 325 330 335

Pro Ser His Val Ala Ser Ser Leu Leu Arg Pro Leu Ser Asp Ser Ala
 340 345 350

Ala Glu Ala Leu Ser Lys Leu Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Ser
 355 360 365

Ile Ser Tyr Ala Lys Glu Ala Ile Arg Ser Glu Cys Leu Ile Asp Gly
 370 375 380

Glu Leu Lys Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Thr Gln Lys Val Glu
 385 390 395 400

Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro
 405 410 415

Pro Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr
 420 425 430

Gly Ile Leu Ser Lys Ser Glu Gly Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg
 435 440 445

Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Lys Pro Ser Ser Thr Asp Pro Leu Val
 450 455 460

Leu Gly Val Lys Leu Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly
 465 470 475 480

His Ile Asp Leu Val Asp Ala Ala Lys Ala Ser Leu Ser Ser Ser Gly
 485 490 495

His Glu Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu
 500 505 510

Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Thr Ala Thr Gln Val Asn Asp
 515 520 525

[서열 20d]

Phe Met Ser Arg Tyr Ala Tyr Lys
 530 535

(2) 서열 21에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1224 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: NO

(iv) 엔티센스: NO

(vi) 최초 기원:

(A) 유기체: 오리재 새티브(쌀)

(vii) 직접적인 기원:

(B) 클론: pWDC-18(NRRL B-21648)

(ix) 특징

(A) 명칭/키: misc 특징

(B) 위치: 1..9936

(D) 또 다른 정보: /산물="쌀 프로토스-1 부분적인 암호화 영역"

(xi) 서열 기술: 서열 21:

[서열 21a]

CGGGCTTTGA AGGCTGCATT TGGGAAGGTG TGGAGGCTGG AGGATACTGG AGGTAGCATT	60
ATTGGTGGAA CCATCAAGAC AATCCAGGAG AGGGGGAAAA ACCCCAAACC GCCGAGGGAT	120
CCCCGCCCTTC CAACGCCAAA GGGGCAGACA GTTGCATCTT TCAGGAAGGG TCTGACTATG	180
CTCCCGGATG CTATTACATC TAGGTTGGGT AGCAAAGTCA AACTTTCATG GAAGTTGACA	240
AGCATTACAA AGTCAGACAA CAAAGGATAT GCATTAGTGT ATGAAACACC AGAAGGGGTG	300
GTCTCGGTGC AAGCTAAAAC TGTGTCATG ACCATCCCAT CATATGTTGC TAGTGATATC	360
TTGCGGCCAC TTTCAAGTGA TGCAGCAGAT GCTCTGTCAA TATTCTATTA TCCACCAATT	420

[서열 21b]


```

GCTGCTGTAA CTGTTTCATA TCCAAAAGAA GCAATTAGAA AAGAATGCTT AATTGACGGA      480
GAGCTCCAGG GTTTCGGCCA GCTGCATCCG CGTAGTCAGG GAGTTGAGAC TTTAGGAACA      540
ATATATAGCT CATCACTCTT TCCAAATCGT GCTCCAGCTG GAAGGGTGTT ACTTCTGAAC      600
TACATAGGAG GTTCTACAAA TACAGGGATT GTTTCCAAGA CTGAAAGTGA GCTGGTAGAA      660
GCAGTTGACC GTGACCTCAG GAAGATGCTG ATAAATCCTA GAGCAGTGGA CCCTTTGGTC      720
CTTGGCGTCC GGGTATGGCC ACAAGCCATA CCACAGTTCC TCATTGGCCA TCTTGATCAT      780
CTTGAGGCTG CAAAATCTGC CCTGGGCAAA GGTGGGTATG ATGGATTGTT CCTCGGAGGG      840
AACTATGTTG CAGGAGTTGC CCTGGGCCGA TCGGTTGAAG GTGCATATGA GAGTGCCTCA      900
CAAATATCTG ACTACTTGAC CAAGTACGCC TACAAGTGAT CAAAGTTGGC CTGCTCCTTT      960
TGGCACATAG ATGTGAGGCT TCTAGCAGCA AAAATTTTCAAT GGGCATCTTT TTATCCTGAT     1020
TCTAATTAGT TAGAATTTAG AATTGTAGAG GAATGTTCCA TTTGCAGTTC ATAATAGTTG     1080
TTCAGATTTC AGQCATTCAA TTTGTGCAGC CATTTACTAT ATGTAGTATG ATCTTGTAAG     1140
TACTACTAAG AACAAATCAA TTATATTTTC CTGCAAGTGA CATCTTAATC GTCAGCAAAT     1200
CCAGTTACTA GTAAAAA AAAA                                     1224

```

(2) 서열 22에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 312 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(C) 쇠: 관련 없음

(D) 형태: 관련 없음

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 22:

[서열 22a]

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

[서열 22b]

1	5	10	15
Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Gly			
20	25	30	
Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Thr Pro Lys Gly			
35	40	45	
Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys Gly Leu Thr Met Leu Pro Asp Ala			
50	55	60	
Ile Thr Ser Arg Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr			
65	70	75	80
Ser Ile Thr Lys Ser Asp Asn Lys Gly Tyr Ala Leu Val Tyr Glu Thr			
85	90	95	
Pro Glu Gly Val Val Ser Val Gln Ala Lys Thr Val Val Met Thr Ile			
100	105	110	
Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile Leu Arg Pro Leu Ser Ser Asp Ala			
115	120	125	
Ala Asp Ala Leu Ser Ile Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr			
130	135	140	
Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly			
145	150	155	160
Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu			
165	170	175	
Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro			
180	185	190	
Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ser Thr Asn Thr			
195	200	205	
Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg			
210	215	220	
Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Arg Ala Val Asp Pro Leu Val			
225	230	235	240
Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Ile Gly			

[서열 22c]

245	250	255
His Leu Asp His Leu Glu Ala Ala Lys Ser Ala Leu Gly Lys Gly Gly		
260	265	270
Tyr Asp Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu		
275	280	285
Gly Arg Cys Val Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ser Gln Ile Ser Asp		
290	295	300
Tyr Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys		
305	310	

(2) 서열 23에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 1590 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: cDNA

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(vi) 최초 기원:

(A) 유기체: 소르콤 비컬러(수수)

(vii) 직접적인 기원:

(B) 클론: pWDC-19(NRRL B-21649)

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: misc 특징

(B) 위치: 1..1320

(D) 또 다른 정보: /산물="소르콤 프로토스-1 부분적인 암호화 영역"

(xi) 서열 기술: 서열 23:

[서열 23a]

TCCACCGTCG AGCGCCCCGA GGAAGGGTAC CTCTGGGAGG AGGGTCCCAA CAGCTTCCAG 60

[서열 23b]

CCATCCGACC CCGTTCTCTC CATGGCCGTG GACAGCGGGC TGAAGGATGA CCTGGTTTTT 120

GGGGACCCCA ACGCGCCACG GTTCGTGCTG TGGGAGGGGA AGCTGAGGCC CGTGCCATCC 180

AAGCCCGCCG ACCTCCCGTT CTTGATCTC ATGAGCATCC CTGGCAAGCT CAGGGCCGGT 240

CTCGGCGCGC TTGGCATCCG CCCGCCTGCT CCAGGCCGCG AGGAGTCAGT GGAGGAGTTT 300

GTGCGCCGCA ACCTCGGTGC TGAGGTCTTT GAGCGCCTAA TTGAGCCTTT CTGCTCAGGT 360

GTCTATGCTG GCGATCCTTC CAAGCTCAGT ATGAAGGCTG CATTGGGAA GGTGTGGCGG 420

TTAGAAGAAG CTGGAGGTAG TATTATTGGT GGAACCATCA AGACGATTCA GGAGAGGGGC 480

AAGAATCCAA AACCACCGAG GGATCCCCGC CTCCGAAGC CAAAAGGCA GACAGTTGCA 540

TCTTTCAGGA AGGGTCTTGC CATGCTTCCA AATGCCATCA CATCCAGCTT GGGTAGTAAA 600

GTCAAACTAT CATGGAACT CACGAGCATG ACAAATCAG ATGGCAAGGG GTATGTTTTG 660

GAGTATGAAA CACCAGAAGG GGTGTTTTTG GTGAGGCTA AAAGTGTAT CATGACCATT 720

CCATCATATG TTGCTAGCGA CATTGTGCT CCACTTCAG GTGATGCTGC AGATGTTCTA 780

TCAAGATTCT ATTATCCACC AGTTGCTGCT GTAACGGTTT CGTATCCAAA GGAAGCAATT 840

AGAAAAGAAT GCTTAATGA TGGGAACTC CAGGGTTTG GCCAGTTGCA TCCACGTAGT 900

CAAGGAGTTG AGACATTAGG AACAATATAC AGCTCATCAC TCTTTCCAAA TCGTGCTCCT 960

GCTGGTAGGG TGTACTTCT AACTACATA GGAGGTGCTA CAAACACAGG AATTGTTTCC 1020

AAGACTGAAA GTGAGCTGGT AGAAGCAGTT GACCGTGACC TCCGAAAAAT GCTTATAAAT 1080

CCTACAGCAG TGGACCCTTT AGTCCTTGGT GTCCGAGTTT GGCCACAAGC CATACTCAG 1140

TTCTTGCTAG GACATCTGA TCTTCTGGAG GCCGAAAAT CTGCCCTGGA CCAAGGTGGC 1200

TATAATGGGC TGTTCTTAGG AGGGAATAT GTTGCAGGAG TTGCCCTGGG CAGATGCATT 1260

GAGGGCGCAT ATGAGAGTGC CGCGCAAATA TATGACTTCT TGACCAAGTA CGCCTACAAG 1320

TGATGGAAGA AGTGGAGCGC TGCTTGTTAA TTGTTATGTT GCATAGATGA GGTGAGACCA 1380

GGAGTAGTAA AAGGCGTCAC GAGTATTTTT CATCTTATT TTGTAAATTG CACTTCTGTT 1440

[서열 23c]

TTTTTTCCT GTCAGTAATT AGTTAGATT TAGTTATGTA GGAGATTGTT GTGTTCACTG 1500

CCCTACAAAA GAATTTTAT TTTGCATTCG TTTATGAGAG CTGTGCAGAC TTATGTAACG 1560

TTTACTGTA AGTATCAACA AAATCAAATA 1590

(2) 서열 24에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 440 아미노산

(B) 유형: 아미노산

(C) 쇠: 관련 없음

(D) 형태: 관련 없음

(ii) 분자 유형: 단백질

(xi) 서열 기술: 서열 24:

[서열 24a]

Ser	Thr	Val	Glu	Arg	Pro	Glu	Glu	Gly	Tyr	Leu	Trp	Glu	Glu	Gly	Pro	1	5	10	15
Asn	Ser	Phe	Gln	Pro	Ser	Asp	Pro	Val	Leu	Ser	Met	Ala	Val	Asp	Ser	20	25	30	
Gly	Leu	Lys	Asp	Asp	Leu	Val	Phe	Gly	Asp	Pro	Asn	Ala	Pro	Arg	Phe	35	40	45	
Val	Leu	Trp	Glu	Gly	Lys	Leu	Arg	Pro	Val	Pro	Ser	Lys	Pro	Ala	Asp	50	55	60	
Leu	Pro	Phe	Phe	Asp	Leu	Met	Ser	Ile	Pro	Gly	Lys	Leu	Arg	Ala	Gly	65	70	75	80
Leu	Gly	Ala	Leu	Gly	Ile	Arg	Pro	Pro	Ala	Pro	Gly	Arg	Glu	Glu	Ser	85	90	95	
Val	Glu	Glu	Phe	Val	Arg	Arg	Asn	Leu	Gly	Ala	Glu	Val	Phe	Glu	Arg	100	105	110	
Leu	Ile	Glu	Pro	Phe	Cys	Ser	Gly	Val	Tyr	Ala	Gly	Asp	Pro	Ser	Lys	115	120	125	

[서열 24b]

Leu Ser Met Lys Ala Ala Phe Gly Lys Val Trp Arg Leu Glu Glu Ala
 130 135 140
 Gly Gly Ser Ile Ile Gly Gly Thr Ile Lys Thr Ile Gln Glu Arg Gly
 145 150 155 160
 Lys Asn Pro Lys Pro Pro Arg Asp Pro Arg Leu Pro Lys Pro Lys Gly
 165 170 175
 Gln Thr Val Ala Ser Phe Arg Lys Gly Leu Ala Met Leu Pro Asn Ala
 180 185 190
 Ile Thr Ser Ser Leu Gly Ser Lys Val Lys Leu Ser Trp Lys Leu Thr
 195 200 205
 Ser Met Thr Lys Ser Asp Gly Lys Gly Tyr Val Leu Glu Tyr Glu Thr
 210 215 220
 Pro Glu Gly Val Val Leu Val Gln Ala Lys Ser Val Ile Met Thr Ile
 225 230 235 240
 Pro Ser Tyr Val Ala Ser Asp Ile Leu Arg Pro Leu Ser Gly Asp Ala
 245 250 255
 Ala Asp Val Leu Ser Arg Phe Tyr Tyr Pro Pro Val Ala Ala Val Thr
 260 265 270
 Val Ser Tyr Pro Lys Glu Ala Ile Arg Lys Glu Cys Leu Ile Asp Gly
 275 280 285
 Glu Leu Gln Gly Phe Gly Gln Leu His Pro Arg Ser Gln Gly Val Glu
 290 295 300
 Thr Leu Gly Thr Ile Tyr Ser Ser Ser Leu Phe Pro Asn Arg Ala Pro
 305 310 315 320
 Ala Gly Arg Val Leu Leu Leu Asn Tyr Ile Gly Gly Ala Thr Asn Thr
 325 330 335
 Gly Ile Val Ser Lys Thr Glu Ser Glu Leu Val Glu Ala Val Asp Arg
 340 345 350
 Asp Leu Arg Lys Met Leu Ile Asn Pro Thr Ala Val Asp Pro Leu Val
 355 360 365

[서열 24c]

Leu Gly Val Arg Val Trp Pro Gln Ala Ile Pro Gln Phe Leu Val Gly
 370 375 380

His Leu Asp Leu Leu Glu Ala Ala Lys Ser Ala Leu Asp Gln Gly Gly
 385 390 395 400

Tyr Asn Gly Leu Phe Leu Gly Gly Asn Tyr Val Ala Gly Val Ala Leu
 405 410 415

Gly Arg Cys Ile Glu Gly Ala Tyr Glu Ser Ala Ala Gln Ile Tyr Asp
 420 425 430

Phe Leu Thr Lys Tyr Ala Tyr Lys
 435 440

(2) 서열 25에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 93 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본출

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테스크="옥수수 프로토스-1 인트론 서열"

(xi) 서열 기술: 서열 25:

[서열 25]

GTACGCTCCT CGCTGGCGCC GCAGCGTCTT CTTCTCAGAC TCATGCGCAG CCATGGAATT 60

GAGATGCTGA ATGGATTTTA TACGCGCGCG CAG 93

(2) 서열 26에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 2606 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본출

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: DNA(계놈)

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(vi) 최초 기원:

(A) 유기체: 베타 불가리스(슈거 비트)

(vii) 직접적인 기원:

(B) 클론: pWDC-20(NRRL B-21650)

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: misc 특징

(B) 위치: 1..6

(D) 또 다른 정보: /주석="3'-5' 방향의 슈거 비트 프로토스-1의 부분적인 cDNA"

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: miso 특징

(B) 위치: 539..2606

(D) 또 다른 정보: /주석="3'-5' 방향으로 나타낸 슈거 비트 프로토스-1 프 로모터 영역(pWDC-20으로부터 서브클로닝된 3Kb PstI-

SalI 단편의 부분적인 서열

(xi) 서열 기술: 서열 26:

[서열 26a]

GTTCGACCTAC GCACATGCCA CATTCCACAT TCCACGTTAG GAATTGAATT GAATTGAATT	60
ATGATTATGA ATAATGAAGA GACAGAATTA CCGCCATGGT GAGCACCGCG TCGGAAGGCT	120
GGAAGCTATT GGGTCCCTCC TCCCAGATAT AGCCATCGGC CTCCACAGTG ACGATGTTGC	180
CGCCAACTCT GTCTTTGGCC TCTGTCACTA TAAAATTTGG GGATAAAGAG GACTGTTTTC	240
TACAAAGAGC CTGCGCGATG CAAAGCCCGC TAATTCCACC TCCAACGATT ACGCAGTCTA	300
GCAATCCTCC TGCTCCTGAT CCTGATCCTG ATCCTGCTTC TTAAACCGCT GACTTTGAGC	360

[서열 26b]

CTGAGCTTGT GCTGCAATC ATGCTCATCC TCCTCTTCTT ATGTGAATAA TAACCTCGTC	420
TTCCAATTAA ACTACATGGA ATTGACAACA TGATACAATT GCCCCTGTAA TGCCCGCTGC	480
TGTGCAATGG CATGCACTGT GTCTGTGGAA TGCAGTTTGA TAACGCCATT GATTTCATCT	540
CTCTCTCGCT CTCTCGCCCT CCTTATCCTC TATATCCCCT TCTTGCTTGC TCGGGAATTC	600
TAATTAACCT TATATCAAAA TGAAACAACCT GTTCTAGTT AAAAAGTTTT TTATAAATAG	660
TACTCTAAAT AAACGATTAC ATGTATCTTC TAACCATACT TGTTTGGTGG AGGTGGTGCG	720
TAACCGGTAA CTTACCTTTG TAACACCTT CAATACCTAC TTATGCTTAA GGATACGGAT	780
TCTTTTAAAC TCTCAGGCAT TGACCTATGT AGCTGGACTG ACTAACATCT GAATTTGTTT	840
CTCTGGTTAT ATATGCAATT TTAAGTGAAT CGAAATTTCT CTGGATGCTA AAAATGTCTT	900
TAACGGGGTT TATGAGGACT AAATTATCTC CTTCAATGAG GAGGTTCTTG ATTTGCATGT	960
ATGAGCGTGA AAATGCATTC TTAACGGCTA TAGATTCACT AATAAGTGGT GTTAAAAGTA	1020
AAAAGTACTT GGMAAAATGA TTAAGCGACT TAATTTTTTT TATTGTGTTG AAAGTGCCT	1080
TTTCTTGGCT ATCTTAACAT GTATTTATCA AACACCTTTT TTAATTACAT GGAAATCGAA	1140
AAGTTTGAAA AAAAAAATC ATACTCACTA ACCGCCCTAA AATATAAGCT GAAGATGTCT	1200
CACTAACAGA GTGCATGTGA AGCACCCCCA AAGCAATTAT AACACAACAT CTCCGCCTCT	1260
TCAAATTC TACAAATACA TCTAATAAAC TTGTTGAAAC AATCAAAGTA ACATGGTGTG	1320
TCAATTGCGG ATGCTTCTCA TTCCAGACTT TATATAGTGA TTTTGTGTTA TCCATAGTCA	1380
ACAACTCACA TAATGGTACC CAAAGAATAC CCAAATTTTT TGCTCAAAAT CCCTAAACAT	1440
TGTAGCTGTG TAAGTTTGAC TAACATGTTT CAGCATGCTT GCCATGGGTA AATAAGACTT	1500
AGGGGCAAAT CTCGAATCCA CAACTCATC ATTGGTTTTA GTTGTCTCC AACGTAAAAC	1560
AATGATGTGA AATACACCAC AAAATTCATA CAATCTCGTT ATCTTGAAG CTGAAAGCC	1620
ATAATCTTGT TTGTACTTTC ACTACGTCGA GAAGACAAAA TTACAATAA GAAGAGGTCA	1680

[서열 26c]

TTGCTCAGTG TCGTGACTA CTTATCTTTC AACTCATAGA AACAAAGCAA CCAATTGTCA	1740
CCTATATACT GTACTTCTCC ATCATATACT TCCAACTTGC CTTAAACTCA ATACTATCAT	1800
AAAAACCACA AAGACATTTC ATAAAAGCAT AATAAAAATG TGTCATCACT CTTCAAAGTT	1860
CCAAAGTGAT TCTAACTACA TTCTAATGAA AATGACATTG GTGTAAACCT AATCCTTGTG	1920
TTATAAAACA CCTACATACC ACGATTATGT TAGAAATATA TTTATGAATG CAGTACCTAC	1980
ATAAAGCCAT TAAATAACCA GTTTTATGTT ATTTCTGTGAC CAACATAGTT CCTAAAGATT	2040
ACGAAGTAAT TTATAGTCAT TTTGTGGCCA CTTAATTCAT TTAATACCCA GTATATTTAT	2100
AAGTTACCAG CTTAAGTAGT TTTGTGACCA TCTCTACATA CTTCTCCGG TCCATAATAA	2160
GGGGGCGTTT GGTGCAACG GGTAAAGGG AATGGAATCA AGAAAGGGAG AGGAGAGGAA	2220
AGGAAAAGAA AACCCCTAGA TTTAGAGTGG TGTTTGGTTA AGATAATGTT AATTCTCTTT	2280
CTTCCTCTTT CTTACCCTTC TTCCACCCTA GCACCACCAC TCCTCCCTCT GTTACTATTC	2340
TCCACGCCGC CTCTCCCTAC CCCAGTAACA CCACCTTGTC GGCCCCCGG TCTTCCCTT	2400
CCCGCGACGG TTCCCCCTC CCCTGCGCG TCACGTCGTC CCCCTCACCT CCCTGCACCG	2460
TCGAGTTATC CCCCTCCCT GCGCGTCGCG TTCTCCCTC CCTCACCATC GCGTTCTCCC	2520
CTCCCTCACC GTCGCGTTCT CCCCTCCCT ACCGTCGCG TCTCCCTCC CTCACCGTCG	2580
CGGTCTCTCT TTCCCTCCCC CTGCAG	2606

(2) 서열 27에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 31 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본출

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테스크="Pclp-Pla-색소체 ClpP 유전자 프로모터 탐

스트랜드 pCR 프라이머"

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: misc_ 특징

(B) 위치: 4..9

(D) 또 다른 정보: /주석="Eco RI 제한 부위"

(xi) 서열 기술: 서열 27:

[서열 27]

GCGGAATTCA TACTTATTTA TCATTAGAAA G

31

(2) 서열 28에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 32 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테스크="pclP_Plb-색소체 clpP 유전자 프로모터 하부 스트랜드 PCR 프라이머

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(ix) 특징

(A) 명칭/키: misc-특징

(B) 위치: 4..9

(D) 또 다른 정보: /주석="XbaI 제한 부위"

(xi) 서열 기술: 서열 28:

[서열 28]

GCGTCTAGAA AGAACTAAAT ACTATATTTT AC

32

(2) 서열 29에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 3-염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본출처

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테스크="Pclp-P2b-플라스미드 clpP 유전자 프로모터 하부 스트랜드 PCR 프라이머"

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티젠스: No

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: misc_특징

(B) 위치: 4..9

(D) 또 다른 정보: /주석="NcoI 제한 부위"

(xi) 서열 기술: 서열 29:

[서열 29]

GCGCCATGGT AAATGAAAGA AAGAACTAAA

30

(2) 서열 30에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 30 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본출처

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테스크="Trpslb Pb-색소체 rpslb 유전자 3' 비해독 영역 XbaI/HindIII 탭 스트랜드 PCR 프라이머"

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: misc_ 특징

(B) 위치: 4..9

(D) 또 다른 정보: /주석="XbaZ 제한 부위"

(xi) 서열 기술: 서열 30:

[서열 30]

GGTCTAGAT CAACCGAAAT TCAATTAAGG

30

(2) 서열 31에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 27 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테스크="Trps 16 plb-색소체 rps16 유전자 3' 비해독 영역

XbaI/HindIII 하부 스트랜드 PCR 프라이머"

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(ix) 특징

(A) 명칭/키: misc_ 특징

(B) 위치: 4..9

(D) 또 다른 정보: /주석="HindIII 제한 부위"

(xi) 서열 기술: 서열 31:

[서열 31]

CGCAAGCTTC AATGGAAGCA ATGATAA

27

(2) 서열 32에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 36 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테스크=ATG 개시 코돈을 포함하는 "minps'b_U-색소체 psbA

유전자 5' 비해독 영역 38nt(blunt/NCOI) 탐 스트랜드 프라이머"

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(xi) 서열 기술: 서열 32:

[서열 32]

GGGAGTCCCT GATGATTAAA TAAACCAAGA TTTTAC

36

(2) 서열 33에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 40 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 출처: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테스크="ATG 개시 코돈(하부 스트랜드 프라이머) minpsb-L-

색소체 psbA 유전자 5' 비해독 영역 38nt(blunt/NcoI)

(iii) 추정 서열: No

(iv) 안티센스: No

(xi) 서열 기술: 서열 33:

[서열 33]

CATGGTAAAA TCTTGGTTTA TTAAATCATC AGGGACTCCC

40

(2) 서열 34에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 32 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테크="APRTXPla-돌연변이 아라비도프시스 프로토스 유전자의
5' 부분을 증폭시키기 위한 탑 스트랜드 PCR 프라이머"

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(ix) 특징:

(A) 명칭/키: misc_ 특징

(B) 위치: 5..10

(D) 또 다른 정보: /주석="NcoI 제한 부위/ATG 개시 코돈

(xi) 서열 기술: 서열 34:

[서열 34]

GGGACCATGG ATTGTGTGAT TGTCGGCGGA GG

32

(2) 서열 35에 대한 정보:

(i) 서열 특징:

(A) 길이: 24 염기쌍

(B) 유형: 핵산

(C) 채: 일본채

(D) 형태: 선형

(ii) 분자 유형: 또 다른 핵산

(A) 기술: /테스크="APRTXP16-돌연변이 아라비도프시스 프로토스 유전자의

5' 부분을 증폭시키기 위한 하부 스트랜드 PCR 프라이머"

(iii) 추정 서열: No

(iv) 엔티센스: No

(xi) 서열 기술: 서열 35

[서열 35]

CTCCGCTCTC CAGCTTAGTG ATAC

24

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열 10에 나타난 아미노산 서열을 갖는 밀 프로토포르피리노겐 옥시다제(프로토스)를 암호화하는 분리된 DNA 분자.

청구항 2.

제2항에 있어서, 서열 9에 나타난 뉴클레오티드 서열을 갖는 분리된 DNA 분자.

청구항 3.

제2항에 있어서, 상기 프로토스 효소가 서열 10의 아미노산 356에 해당하는 위치의 발린의 류신으로의 치환, 서열 10의 아미노산 421에 해당하는 위치의 세린의 프롤린으로의 치환, 서열 10의 아미노산 502에 해당하는 위치의 발린의 알라닌으로의 치환, 서열 10의 아미노산 211에 해당하는 위치의 알라닌의 발린 또는 트레오닌으로의 치환, 서열 10의 아미노산 212에 해당하는 위치의 글리신의 세린으로의 치환 및 서열 10의 아미노산 466에 해당하는 위치의 이소류신의 트레오닌으로의 치환으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 변형을 갖고, 상기 아미노산 변형이 상기 효소에 게 프로토스-억제 제조제에 대한 내성을 부여하는, 분리된 DNA 분자.

청구항 4.

제3항에 있어서, 서열 10의 아미노산 356에 해당하는 위치의 발린이 류신으로 치환되는 분리된 DNA 분자.

청구항 5.

제3항에 있어서, 서열 10의 아미노산 421에 해당하는 위치의 세린이 프롤린으로 치환되는 분리된 DNA 분자.

청구항 6.

제3항에 있어서, 서열 10의 아미노산 502에 해당하는 위치의 발린이 알라닌으로 치환되는 분리된 DNA 분자.

청구항 7.

제3항에 있어서, 서열 10의 아미노산 211에 해당하는 위치의 알라닌이 발린 또는 트레오닌으로 치환되는 분리된 DNA 분자.

청구항 8.

제3항에 있어서, 서열 10의 아미노산 212에 해당하는 위치의 글리신이 세린으로 치환되는 분리된 DNA 분자.

청구항 9.

제3항에 있어서, 서열 10의 아미노산 466에 해당하는 위치의 이소류신이 트레오닌으로 치환되는 분리된 DNA 분자.

청구항 10.

식물 내에서 작용하는 이중성 프로모터에 기능적으로 결합되어 있는 제3항, 제4항, 제1항 내지 제9항에 따른 분리된 DNA 분자를 포함하는 키메릭 유전자.

청구항 11.

제10항에 있어서, 상기 DNA 분자에 의해 암호화되는 단백질을 엽록체 내로 표적화시킬 수 있는, 상기 DNA 분자에 기능적으로 결합되어 있는 시그널 서열을 추가로 포함하는 키메릭 유전자.

청구항 12.

제10항에 있어서, 상기 DNA 분자에 의해 암호화되는 단백질을 미토콘드리아내로 표적화시킬 수 있는, 상기 DNA 분자에 기능적으로 결합되어 있는 시그널 서열을 추가로 포함하는 키메릭 유전자.

청구항 13.

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 따른 분리된 DNA 분자를 함유하는 식물 세포.

청구항 14.

(i) 식물 재료를 제3항, 제4항, 제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 따른 분리된 DNA 분자 또는 제10항 내지 제12항 중의 어느 한 항의 키메릭 유전자로 형질전환시키는 단계;

(ii) 형질전환된 재료를 선택하는 단계; 및

(iii) 선택된 재료를 형태적으로 정상인 번식가능한 완전한 식물로 재생시키는 단계로 이루어지는, 프로토포르피리노겐 옥시다제를 억제하는 제초제에 대해 실질적으로 저항력이 있거나 실질적으로 내성이 있는 식물을 생산하는 방법.

청구항 15.

프로토포르피리노겐 옥시다제를 억제하는 제조제를 제14항의 방법에 의해 수득한 식물에 실질적으로 영향을 미치지 않으면서 원하지 않는 식물의 성장을 억제하기에 충분한 양으로 상기 식물에 적용시킴을 포함하여, 원하지 않는 식물의 성장을 억제하는 방법.