

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0130425 (43) 공개일자 2010년12월13일
(51) Int. Cl. C12N 9/80 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01) A01H 1/00 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0049103 (22) 출원일자 2009년06월03일 심사청구일자 2009년06월03일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내 (72) 발명자 박영두 경기도 용인시 수지구 성북동 성동마을 수지자이 1차아파트 108동 702호 이기호 부산광역시 동래구 온천1동 153-8 SK허브스카이 102동 2206호 유재경 경상북도 안동시 노하동 164-1 (74) 대리인 특허법인다울	

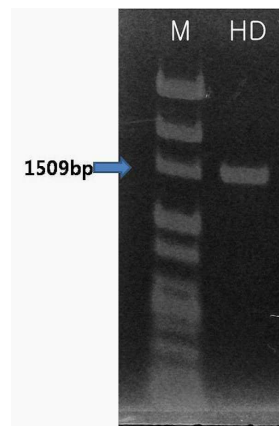
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 배추 유래의 히스톤 디아세틸라아제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자

(57) 요약

본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 유래의 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase) 단백질에 관한 것이다. 또한, 히스톤 디아세틸라아제 단백질 검출용 프라이머를 제작하고 이를 사용하여 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 200901FHT020711394

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 바이오그린21사업

연구과제명 유전자 발현 제어시스템 확립 및 이용기술 개발

기여율

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2009.01.01~2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 유래의 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase) 단백질.

청구항 2

제 1항의 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 핵산 서열로 이루어지는 유전자.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 핵산 서열은 서열번호 5의 핵산 서열을 가지는 것인 유전자.

청구항 4

제 2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 8에 도시된 pB7GWIWG2(II)-HDI 벡터인 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 6

제 4항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 7

제 6항의 형질전환체를 이용한, 식물 종양 발생 억제능이 있는 형질전환 배추.

청구항 8

(i) 서열번호 1 내지 2에 기재된 프라이머를 제작하는 단계; (ii) 배추의 RNA로부터 합성한 cDNA를, 상기 제작된 서열번호 1 내지 2로 이루어지는 프라이머 쌍을 사용하여 RT-PCR을 수행하여 히스톤 디아세틸라아제 단백질에 대한 유전자를 분리하는 단계; 및 (iii) 상기 분리된 유전자를 이용하여 히스톤 디아세틸라아제의 전체 서열을 확인하는 단계를 포함하는, 배추로부터 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법.

청구항 9

서열번호 1 내지 2에서 선택되는 히스톤 디아세틸라아제 단백질 검출용 프라이머.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 DNA 및 히스톤의 메틸화 과정에 관여하는 히스톤 디아세틸라아제(histone deacetylase) 단백질을 배추로부터 분리하는 방법과, 분리된 히스톤 디아세틸라아제 및 이를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 전자 조절 기작을 밝혀내기 위하여 DNA의 메틸화를 연구하는 학문을 후성학(epigenetics)이라고 한다. 과학자들은 연구에서 얻은 정보를 이용하여 의학에 적용하거나 신약 개발에 활용하는 일에 최선을 다하고 있다. 그러나 이를 위해서는 단백질을 만드는 유전자의 기능과 조절 기작이 우선 밝혀져야 한다. 현재까지는 DNA 염기서열의 변화와 재조합에 의해 형질의 변화가 발생한다고 알려져 있다. 그러나 DNA의 염기서열이 변하지 않더라도 유전자 기능이 변하며, 이 변화는 어버이로부터 자손에게 전해진다는 사실이 밝혀졌다. 후성학은 바로 이러한 현상, 즉 DNA염기서열의 변화 없이 유전자 발현과 같은 기능의 변화가 어떻게 일어나는지를 알아내는 새로운 영역의 학문이다.

[0003] 일반적인 유전학 관점에서 중요한 현상은 염기가 바뀌는 돌연변이가 있지만, 후성학에서는 염기에 메틸기가 붙는 메틸화 과정이다. 게놈의 염기서열에 C와 G의 두 염기가 나란히 존재하는 것을 CpG라고 한다. 이 배열에서 시토신이 메틸화되는 경향이 많아 인간 게놈의 경우 전체 시토신 중 3-4%는 메틸화 되어 있다. 유전자의 메틸화는 메틸기 전달효소의 활성보다 히스톤 변형 혹은 염색질 리모델링에 의해 전사 과정을 억제하고 있다.

[0004] 유전자의 전사 과정에 대한 후성학적 조절 기작은 DNA의 메틸화, 히스톤의 메틸화 및 탈아세틸화, 염색질 리모델링이라는 서로 다른 기작이 밀접하게 연결되어 있다. 셋 중 히스톤의 메틸화는 세포분열과 유전자 발현에 중요한 역할을 한다는 최근 보고가 있다. 배아발달 단계 초기에 발현되는 유전자군 중에 HOX군이 있는데, 이 유전자군에 의해 신체의 패턴이 형성되고 그런 다음 영원히 잠재적으로 기능을 상실하게 된다. HOX 유전자 그룹의 잠재화에 중요한 역할을 수행하는 또 다른 유전자군으로 polycomb 유전자군이 있다. 이 유전자군에 돌연변이가 발생하면 HOX가 잠재화되지 않아 배아의 발달은 비정상적이 된다.

[0005] 진핵세포의 DNA는 히스톤(histones)이라는 염기성 단백질에 2번 감겨 있으면서 좁은 핵 내 공간에 압축되어 저장되어 있다. 이같은 압축된 DNA를 유전정보로 활용하기 위하여 세포에는 염색체(chromatin) 구조를 변형 및 조절할 수 있는 기전이 있을 것이라 예상되어 왔으며, 최근 뉴클레오솜(nucleosome) 구조를 변형하여 전사인자와 DNA와의 접근성을 증가시키는 크로마틴 리모델링 인자(chromatin remodeling factor; SWI/SNF, RSC, NURF, NRD 등이 속함)와 히스톤의 아세틸화 상태를 조절하는 히스톤 아세틸트랜스퍼라아제(histone acetyltransferases; HAs)와 히스톤 디아세틸라아제(histone deacetylases; HDs)가 중요한 조절인자임이 밝혀졌다. 특히 히스톤의 아미노 말단에 존재하는 라이신 잔기의 양전하를 아세틸화로 중화시키거나 탈아세틸화로 다시 전하를 유도하는 과정은 가역적인 히스톤 수식반응으로서 히스톤의 아세틸화 수준의 평형을 유도하여 유전자 발현 스위치의 온/오프를 조절한다.

[0006] 히스톤 디아세틸라아제는 크로마틴 구조변환 반응을 담당하는 중요한 인자로서 현재까지 이 분야의 세계적인 연구는 새로운 히스톤 디아세틸라아제의 클로닝과 그와 관련된 인자의 분리 및 기능 해석이 주류를 이루었다. 그러나 앞으로는 히스톤 디아세틸라아제와 관련되는 크로마틴 구조변환인자들(HAT, nucleosome remodeling factor, histone chaperon 등)과의 특이적인 상호작용을 통한 크로마틴 구조변환인자 복합체의 네트워크 해석을 근간으로 다양한 레벨에서의 크로마틴 구조변환 전사체 연구가 전개될 것이다. 이와 같은 해석은 어떻게 히스톤 디아세틸라아제가 특정 DNA에 리크루트되어 특정 유전자의 발현을 조절하는지에 대한 궁금증을 풀어줄 것이다.

[0007] 한편 질병(암, 백혈병, 혈관신생 등)과 연관된 히스톤 디아세틸라아제의 기능조절은 더욱 그 중요성이 증가될 것이다. 특히 크로마틴의 높은 아세틸화 상태가 세포의 증식을 억제하고 분화를 촉진한다면, 히스톤 디아세틸라아제는 히스톤의 탈아세틸화를 통해 증식을 유도하는 데 결정적인 역할을 한다(Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Chung HY, Kim CW, Kim KW, 2001, Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nature Medicine*, in press.). 이같은 사실은 히스톤 디아세틸라아제 저해제 처리시 세포의 증식이나 혈관신생이 억제된다는 결과를 통해 뒷받침하고 있다.

[0008] 따라서 히스톤 아세틸라아제는 유전자 발현 억제 인자로서의 기능 역할 해석에 있어 중요한 연구대상일 뿐만 아

나라 새로운 항암제 개발의 표적분자로서 매우 중요한 의미가 있다. 이미 히스톤 디아세틸라아제 저해제 중 FR901288과 MS-275은 동물실험에서 폭 넓은 항암 활성을 보여 NCI에서 임상실험이 진행 중이다(Kwon HJ, 2001, Histone deacetylase, a key covalent modifier of histone and regulator of gene expression. *Biochemistry News* Vol. 21, No. 1).

[0009] 그러나 아직 배추에서의 히스톤 디아세틸라아제를 코딩(coding)하는 유전자에 관해서는 보고된 바가 없다.

[0010] 본 발명자들은 배추 유래의 히스톤 디아세틸라아제를 코딩하는 유전자를 규명하고, 이를 이용하여 배추에서의 히스톤 디아세틸라아제의 역할을 규명하고, 이를 바탕으로 식물 종양 발생 억제 효과가 높은 기능성 배추를 품종 육성하여 국민 보건 향상을 위한 연구를 계속하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명은 배추 유래의 히스톤 디아세틸라아제 단백질 및 이를 코딩하는 유전자를 제공하기 위한 것이다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 히스톤 디아세틸라아제 단백질 검출용 프라이머 및 이를 이용하여 배추로부터 히스톤 디아세틸라아제를 코딩하는 유전자를 분리하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

[0013] 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는, 배추 유래의 히스톤 디아세틸라아제 단백질에 관한 것이다.

[0014] 본 발명의 "히스톤 디아세틸라아제 단백질" 분리를 위해 프라이머쌍을 제작하여 사용하였다. 제작된 프라이머쌍을 사용하여 배추로부터 히스톤 디아세틸라아제 단백질에 해당하는 유전자를 분리하기 위해 RT-PCR을 수행하여 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 유전자의 전체 서열을 확보하였다.

[0015] 본 발명의 히스톤 디아세틸라아제 단백질은 서열번호 6으로 기재된 아미노산 서열을 가진다. 또한, 하나 이상의 위치에서 일부 아미노산 서열이 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의한 변이된 변이체도 본 발명의 범주에 포함된다.

[0016] 또한, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 배추 유래의 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 유전자에 관한 것이다.

[0017] 본 발명의 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 유전자는, 바람직하게는 서열번호 5의 핵산 서열을 가지는 유전자이다.

[0018] 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 상기 핵산 서열 변이체 또한, 본 발명의 범주에 포함된다.

[0019] 또한, 본 발명은 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터에 관한 것이다.

[0020] 본 발명에서 "재조합 벡터"란 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함한 통상의 모든 벡터를 포함한다.

[0021] 본 발명의 벡터는 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 발현조절 서열과 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며, 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 상기 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있다. 또한, 상기 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조될 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0022] 또한, 본 발명은 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명에 의해 히스톤 디아세틸라아제 단백질과 이에 대한 유전자의 서열을 이용하여, DNA 및 히스톤 메틸화 현상에 관한 연구를 진행하고 식물 종양 발생 억제 효과

가 높은 형질전환 배추를 만들 수 있다.

- [0023] 숙주세포로의 벡터 도입은 숙주 세포에 적합한 방법을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기충격유전자전달법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아 매개된 형질전환, 입자총법, 원형질 세포법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 등의 공지된 방법으로 수행할 수 있다.
- [0024] 숙주세포로는 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 또는 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)와 같은 원핵 숙주 세포가 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 진균(예를 들어, 아스페르길러스(*Aspergillus*)), 효모(예를 들어, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 사카로마이세스 세르비시애(*Saccharomyces cerevisiae*), 쉬조사카로마세스(*Schizosaccharomyces*), 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*), 곤충 세포, 식물 세포, 포유동물 등의 진핵 생물 유래의 세포가 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 또한, 본 발명의 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 유전자는 식물 개체 내로 형질전환 될 수 있다. 식물로의 형질전환법은 바람직하게 아그로박테리움법, 원형질세포법, 입자총법 등이 있다. 형질전환되는 식물은 바람직하게는 배추이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 세포내 발현 수준을 증가 또는 감소시켜 식물, 바람직하게는 배추의 DNA 및 히스톤 메틸화 현상에 관한 연구를 진행하고 식물 종양 발생 억제 효과가 높은 기능성 배추를 제공한다.
- [0027] 예를 들어, 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 재조합 벡터로 식물, 보다 구체적으로 배추를 형질전환시킴으로써 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 세포내 발현 수준을 증가시킬 수 있다. 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 재조합 벡터는 상술한 바와 같다. 또한, 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 게놈 유전자의 엑손으로 하나 이상의 외생 핵산 서열을 도입시켜 유전자를 불활성화시켜 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 세포내 발현 수준을 억제 및 차단시킬 수 있다. 본 발명에서 용어, “외생(Exogenous) 핵산 서열”이란 숙주세포에서 정상적으로 발견되지 않는 핵산 서열을 의미하고, 외생 핵산서열을 유전자 게놈의 엑손으로 삽입함으로써 유전자의 불활성을 유도할 수 있다.
- [0028] 상기에서 예시한 방법으로, 목적에 맞게 식물, 바람직하게는 배추의 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 발현을 효과적으로 조절할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 (i) 서열번호 1 내지 2에 기재된 프라이머를 제작하는 단계; (ii) 배추의 RNA로부터 합성한 cDNA를, 상기 제작된 서열번호 1 내지 2로 이루어지는 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하여 히스톤 디아세틸라아제 단백질에 대한 유전자를 분리하는 단계; 및 (iii) 분리된 유전자를 이용하여 히스톤 디아세틸라아제 유전자의 전체 서열을 확인하는 단계를 포함하는, 배추로부터 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 유전자를 분리하는 방법에 관한 것이다.
- [0030] 각 단계를 각각 살펴보면 다음과 같다.
- [0031] 상기 단계 (i) 전에, 식물에 대한 공지된 히스톤 디아세틸라아제 단백질을 코딩하는 유전자 단백질의 유전자에 대한 서열을 수집하고 유전자 코딩 서열을 정렬하는 단계와 상기 정렬된 서열 중 상동성이 높은 영역을 선택하는 단계를 먼저 수행할 수 있다. 이 때 식물에 대한 공지된 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 유전자에 대한 서열은 NCBI GenBank 등으로부터 획득할 수 있으며, 상동성 비교는 욱안으로나 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0032] 그 다음에 상기 (i) 단계의 프라이머를 제작하게 되는데, 상기 상동성이 높은 영역에 특이적인 프라이머쌍을 제작하게 된다. 본 발명에서, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 프라이머의 길이는 특별히 제한되지 않으며, 10 내지 50, 보다 바람직하게는 10 내지 40개의 염기서열을 가진다. 구체적으로, 본 발명에서 사용된 프라이머의 서열은 서열번호 1 내지 2로 기재되었다.
- [0033] 단계 (ii)에서, 시료로부터 RNA 분리와 PCR은 일반적인 방법으로 수행할 수 있다. 상기 단계 (iii)에서는 분리된 유전자 단편을 이용하여 RT-PCR을 수행하는 방법을 이용할 수 있는데, 상기 RT-PCR은 공지된 일반적인 방법으로 수행할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 방법으로 히스톤 디아세틸라아제 단백질 분리에 사용될 수 있는 식물의 종류는 특별히 제한되지 않는

다. 예를 들어, 식량작물류, 채소작물류, 특용작물류, 과수류, 화훼류 및 사료작물류에 속하는 다양한 식물체를 시료로 사용할 있다.

[0035] 구체적으로, 본 발명에서 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 분리에 사용된 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 기내의 무균 상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA를 분리하였다.

[0036] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 2에서 선택되는 히스톤 디아세틸라아제 단백질 검출용 프라이머를 제공한다.

[0037] 본 발명에서 제공하는 프라이머들은 식물의 히스톤 디아세틸라아제 단백질 간에 상동성이 높은 영역을 선택적으로 인지하므로, 다양한 식물에서 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 검출에 효율적으로 사용될 수 있는 프라이머들이다.

[0038] 서열번호 1 내지 2의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍은 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 효소 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 cDNA 합성을 개시하게 된다.

[0039] 본 발명의 프라이머 서열은 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지로는 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제 등과 같은 효소; ³²P과 같은 방사성 동위원소; cy3, cy5 등의 형광성 분자; 바이오틴과 같은 화학 그룹을 예로 들 수 있다.

효과

[0040] 본 발명의 방법으로 히스톤 디아세틸라아제 단백질 유전자를 식물체로부터 효과적으로 분리할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 히스톤 디아세틸라아제 단백질은 DNA 및 히스톤 메틸화와 식물 종양 발생 억제 효과와 관계가 있으므로, 이를 이용하여 발현억제 벡터(down-regulation vector)를 만들어 식물 형질전환 시, 식물 종양 발생 억제 효과가 높은 기능성 배추를 제공할 수 있다. 또한 이는 더 나아가 국민 보건에 유용한 배추 품종을 제공하는 효과를 얻을 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0041] 이하에서는, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0042] **실시예 1: 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase) 단백질 유전자를 분리하기 위한 프라이머의 작성**

[0043] 히스톤 디아세틸라아제 단백질 유전자의 공통된 부분을 찾기 위하여 기존에 발표되어 있는 작물별 히스톤 디아세틸라아제 단백질 유전자를 "National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank"에서 검색하였다. 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 Entrez 프로그램을 사용하였다. 검색방법으로는 유전자명으로 히스톤 디아세틸라아제(histone deacetylase)를 검색어로 선정하였다.

[0044] 수집된 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 유전자 가운데, 모델 식물인 배추과의 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 염기서열을 선발, 염기서열의 상동성을 많이 보이는 부분을 BLAST 프로그램으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머들의 서열은 표 1에 기재된 바와 같다.

표 1

프라이머	염기서열
HD-F (서열번호 1)	5'-ATG GAC ACC GGA GGA AAC TCG C-3'
HD-R (서열번호 2)	5'-TTA GGT TTT AGG AAA CAC TTG ATC-3'

[0046] **실시예 2: 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 유전자 분리**

[0047] 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 RNA의 분리는 GibcoBRL회사에서 제공된 트리졸(Trizol) 시약을 사용하여 수행하였다. 배추의 잎을 액체 질소를 이용하여 파쇄한 다음, 1ml 트리졸(Trizol) 용액을 첨가하고 잘 섞은 후 5분 동안 상온에 두었다. 다음, 200 μ l의 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 섞은 다음 다시 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 이소프로페놀(isopropanol)을 500 μ l를 넣고 13,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 침전시켰다. 다음, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시킨 후 DEPC 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0048] 히스톤 디아세틸라아제 단백질 유전자의 분리는 확보된 RNA를 주형으로 올리고 dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용, cDNA를 합성한 뒤 작성한 프라이머로 PCR하여 분리하였다. cDNA합성 프로그램 조건은 1 μ g의 RNA를 올리고 dT 프라이머와 70℃에서 두어 RNA 이차구조를 제거한 뒤 45℃에서 30분간 역전사시키고 그 사용된 역전사효소를 불활성화시키기 위해 94℃에서 5분간 두었다. 그 후 합성된 cDNA 1 마이크로그램을 사용, 작성한 프라이머와 태크 중합효소(tag polymerase)로 PCR하였는데 그 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 2분으로 40 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0049] 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGem-T easy 벡터에 클로닝하고, 올바른 유전자가 삽입되었는지 확인하기 위하여 제한효소 인식 서열인 *EcoRI*을 이용하였다. 그 결과는 도 2와 같다. 이후 상기 유전자가 삽입된 자리에 근접한 T7 프로모터와 SP6 프로모터에 결합하는 T7과 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

[0050] **실시예 3: 히스톤 디아세틸라아제 단백질 유전자의 전체 염기서열 확인**

[0051] 염기서열 분석용 pGem-T easy 벡터 내부에 클로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST 프로그램을 사용하여 이루어졌다. 그 결과 HD-F(서열번호 1)와 HD-R(서열번호 2) 프라이머로 증폭된 1509bp 산물의 염기서열(도 1)과 아미노산 서열을 분석한 결과, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)와 벼(*Oryza sativa*) 식물의 히스톤 디아세틸라아제 유전자와 상동성을 보였으며(도 3 및 4 참고), 특히 애기장대의 히스톤 디아세틸라아제 1 유전자와는 86%의 상동성을 보였다. 즉, RNA를 대상으로 HD-F(서열번호 1)와 HD-R(서열번호 2) 프라이머를 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 배추의 히스톤 디아세틸라아제 유전자의 전체 유전자가 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0052] 또한 NCBI Conserved Domain 프로그램을 이용하여(도 5 참고), 분리한 히스톤 디아세틸라아제 유전자에 히스톤 디아세틸라아제 도메인(histone deacetylase domain)과 효모의 히스톤 디아세틸라아제와 아세트인 이용 단백질이 포함된 디아세틸라아제(deacetylases, including yeast histone deacetylase and acetoin utilization protein) 부분이 각각의 E-값이 7e-85, 1e-85로 정확하게 포함되는 것을 통해, 그 정확도가 높음을 확인하였다. 확인된 히스톤 디아세틸라아제 유전자 염기서열을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정한 후, 이를 배추로부터 분리된 전체 히스톤 디아세틸라아제 유전자로 결정하고, 히스톤 디아세틸라아제 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 6에 나타내었다. 그리고 상기 단백질에 대한 유전자 서열은 서열번호 5에 나타내었다.

[0053] **실시예 4: 히스톤 디아세틸라아제 단백질 유전자를 이용한 재조합 벡터 제작**

[0054] 식물발현용 벡터 중 유전자 발현 조절 벡터를 만들기 위하여, 발현 억제 RNAi 벡터로는 Gateway® system(invitrogen, USA)을 포함하고 있는 pB7GWIWG2(II) 벡터(VIB-Ghent University, USA)를 이용하였다. 발현 억제 RNAi 벡터로는 효과적인 발현 억제를 위하여, NCBI Conserved Domain 프로그램을 이용한 분석 결과를 바탕으로(도 5 참고) 분리한 히스톤 디아세틸라아제 유전자에 히스톤 디아세틸라아제 도메인(histone deacetylase domain)과 효모의 히스톤 디아세틸라아제와 아세트인 이용 단백질이 포함된 디아세틸라아제(deacetylases, including yeast histone deacetylase and acetoin utilization protein) 부분을 효과적으로 억제할 수 있는 프라이머를 제작하였다. 제작된 프라이머들의 서열은 표 2에 기재된 바와 같다.

표 2

[0055]	프라이머	염기서열
	HD-i-F (서열번호 3)	5'-AGC GTG TTC TGT ACG TTG ATA TC-3'
	HD-i-R (서열번호 4)	5'-GCA ACT CCA GTC TCG TAG CAC C-3'

[0056] 실시예 2에서 염기서열 분석용 pGem-T easy 벡터 내부에 클로닝 된 히스톤 디아세틸라아제 단백질 유전자의 염기서열을 작성한 프라이머로 PCR하여 분리하였다. 합성 프로그램 조건은 플라스미드 1 마이크로그램을 사용, 작성한 프라이머와 태크 중합효소(tag polymerase)로 PCR하였는데, 그 프로그램은 표 2에서 제시한 프라이머를 이용한 발현 억제 RNAi 벡터 단편의 경우 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0057] 그 결과, 도 6과 같이 발현 억제 RNAi 벡터 단편의 경우 453 bp를 획득하였다. 이후, 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각을 Gateway® system(invitrogen, USA)을 적용하기 위하여, pCR 8/GW/TOPO TA 벡터에 클로닝하고, 올바른 유전자가 삽입되었는지 확인하기 위하여 제한효소 인식 서열인 *EcoRI*을 이용하였으며, 이는 도 7과 같다. 이후 상기 유전자가 삽입된 자리에 근접한 T7 프로모터와 T3 프로모터에 결합하는 T7과 T3 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 이후 Gateway® LR Clonase™ II enzyme mix (invitrogen, USA)를 이용하여, 발현 억제 RNAi 벡터는 pB7GWIWG2(II) 벡터에 센스 및 안티센스 방향으로 삽입되도록 하였다. 이 재조합 벡터는 pB7GWIWG2(II)-HDI로 명명하였으며, 도 8에 나타내었다. 상기 도 8의 벡터에서, Sm/SpR은 streptomycin/spectinomycin 저항성 Sm/SpR 유전자 이고, LB와 RB는 T-DNA의 좌측 보더와 우측 보더를 나타내며, BAR 는 제초제 저항성 BAR 유전자이고, p35S는 콜리프라이워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터를 나타내는 p35S이며, T35S는 CaMV 35S의 종결자를 나타내는 T35S이다. CmR은 콜로람페니콜(chloramphenicol) 저항성 CmR 유전자이다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 각 HD-F와 HD-R을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 히스톤 디아세틸라아제(histone deacetylase)를 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

[0059] 도 2는 HD-F(서열번호 1)와 HD-R(서열번호 2)을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 히스톤 디아세틸라아제(histone deacetylase)를 코딩하는 유전자를 pGem-T easy 벡터에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 *EcoRI*을 처리하여 확인한 사진이다.

[0060] 도 3은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase)를 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX 프로그램을 사용하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 시퀀스 간에 상동성 비교 결과이다.

[0061] 도 4는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase)를 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX 프로그램을 사용하여 벼(*Oryza sativa*) 시퀀스 간에 상동성 비교 결과이다.

[0062] 도 5는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase)를 코딩하는 유전자를 NCBI Conserved Domain 프로그램을 이용하여 분석한 결과이다.

[0063] 도 6은 각 HD-i-F와 HD-i-R을 사용한 PCR에 의해 배추로부터 증폭된 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase)를 코딩하는 유전자의 RNAi 벡터 단편을 전기영동한 사진이다.

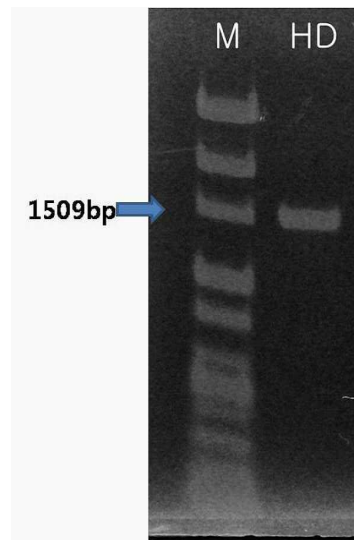
[0064] 도 7는 HD-i-F(서열번호 3)와 HD-i-R(서열번호 4)을 사용한 PCR에 의해 배추의 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase)를 코딩하는 유전자를 pCR 8/GW/TOPO TA 벡터에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 *EcoRI*을 처리하여 확인한 사진이다.

[0065] 도 8은 히스톤 디아세틸라아제 (histone deacetylase)를 코딩하는 유전자를 조절하는 발현 억제 RNAi 벡터인

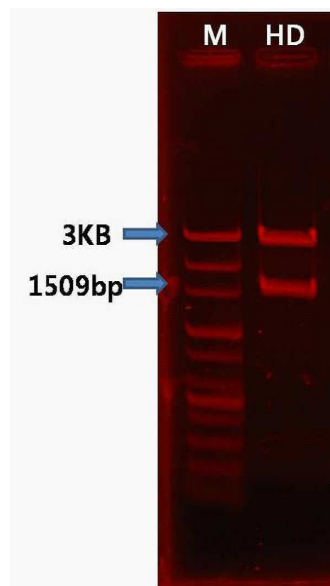
pB7GWIWG2(II)-HDI를 나타내는 모식도이다.

도면

도면1



도면2



도면3

```
>[ref|NP_195526.1|] HD1 (HISTONE DEACETYLASE19); histone deacetylase [Arabidopsis thaliana]
sp|O22446.2|HDA19_ARATH RecName: Full=Histone deacetylase 19; Short=HD; Short=AtHD1
emb|CAB37553.1| Histone deacetylase [Arabidopsis thaliana]
emb|CAB80478.1| Histone deacetylase [Arabidopsis thaliana]
gb|AAM13152.1| histone deacetylase [Arabidopsis thaliana]
gb|AAF68312.1| At4g38130 [Arabidopsis thaliana]
db|BAE98535.1| Histone deacetylase [Arabidopsis thaliana]
Length=501

GENE ID: 829969 HD1 | HD1 (HISTONE DEACETYLASE19) [Arabidopsis thaliana]
(Over 10 PubMed links)

Score = 972 bits (2512), Expect = 0.0
Identities = 476/500 (95%), Positives = 487/500 (97%), Gaps = 2/500 (0%)
Frame = +1

Query 1 MDTGGNSLASGPDGVKRVKVCYFYDPEVGNYYYGQGHFMKPHRIRMTHALLAHYGLLQHMQ 180
Sbjct 1 MDTGGNSLASGPDGVKRVKVCYFYDPEVGNYYYGQGHFMKPHRIRMTHALLAHYGLLQHMQ 60

Query 181 VLKPPFARDRDLRCRFHADDYVSFLRSITPETQQDQIRQLKRFNVGEDCPVFDGLYSFCQT 360
Sbjct 61 VLKPPFARDRDLRCRFHADDYVSFLRSITPETQQDQIRQLKRFNVGEDCPVFDGLYSFCQT 120

Query 361 YAGGSVGGSVKLNHGLCDIAINWAGGLHAKKCEASGFCYVNDIVLAILELLKQHERVLY 540
Sbjct 121 YAGGSVGGSVKLNHGLCDIAINWAGGLHAKKCEASGFCYVNDIVLAILELLKQHERVLY 180

Query 541 VDIDIHHGDGVVEEAFYATDRVMTVSFHKFGDYFPFGTGHQDIDYGSCKYYSLNVPDDGI 720
Sbjct 181 VDIDIHHGDGVVEEAFYATDRVMTVSFHKFGDYFPFGTGHQDIDYGSCKYYSLNVPDDGI 240

Query 721 DDESYHLLFKPIMGKVMEIFKPGAVVLQCGADSLSGDRLGCFNLSIKGHAECVKFMRSFN 900
Sbjct 241 DDESYHLLFKPIMGKVMEIFKPGAVVLQCGADSLSGDRLGCFNLSIKGHAECVKFMRSFN 300

Query 901 VPLLLLGGGGYTIRNVARCWCYETGVALGIEVEDKMPHEYYYEYFGPDYTLHVAPSNMEN 1080
Sbjct 301 VPLLLLGGGGYTIRNVARCWCYETGVALGIEVEDKMPHEYYYEYFGPDYTLHVAPSNMEN 360

Query 1081 KNSRQMLEVIRNDLLNLSKLQHAPSVPFQERPPDTETPEVDEDQEDGDKRWdadsmdmv 1260
Sbjct 361 KNSRQMLEVIRNDLLNLSKLQHAPSVPFQERPPDTETPEVDEDQEDGDKRWDPDSMDMV 420

Query 1261 dddRKPIPSRVKREAVEPDGKDKGVKGVMERGKGFVGMEESSGTTKVSGVNSVGMDEA 1440
Sbjct 421 DDDRKPPIPSRVKREAVEPD KDKDG+KG+MERGKG +V ++ESGS TKV+GVN VG++EA 479

Query 1441 GVKMEEEGTTNKSGGDQVFP 1500
Sbjct 480 SVKMEEEG-TNKGGAEQAFP 498
```

도면4

```
>[ref|NP_001057943.1|] [UG] Os06g0583400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
gb|AAP47171.1| [G] histone deacetylase HDAC1 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
dbj|BAD68730.1| [G] histone deacetylase HDAC1 [Oryza sativa Japonica Group]
dbj|BAF19857.1| [G] Os06g0583400 [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]
dbj|BAG91027.1| [G] unnamed protein product [Oryza sativa Japonica Group]
Length=518

GENE ID: 4341387 Os06g0583400 | Os06g0583400 [Oryza sativa Japonica Group]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 773 bits (1996), Expect = 0.0
Identities = 388/502 (77%), Positives = 425/502 (84%), Gaps = 15/502 (2%)
Frame = +1

Query 10 GGNLS-ASGPDGVKRVVCYFYDPEVGNYYYQGHPMKPHRIRMTALLAHYGLLQHMQLV 186
Sbjct 8 GGNLS +G DG KR+VCYFYD EVGNYYYQGHPMKPHRIRMTALLAHYGLL MQVL 67
GGNSLPTAGADGAKRRVCYFYDAEVGNYYYQGHPMKPHRIRMTALLAHYGLLDQMQLV

Query 187 KPFPARDRLCRFHADDYVFLRSITPQTQDQIRQLKRFNVGEDCPVFDGLYSFCQTYA 366
Sbjct 68 KP PARDRLCRFHADDYV+FLRS+TPQTQDQIR LKRFNVGEDCPVFDGLYSFCQTYA 127
KHPFARDRLCRFHADDYVAFRLSVTPQTQDQIRALKRFNVGEDCPVFDGLYSFCQTYA

Query 367 GGSVGGSVKLNHGLCDIAINWAGGLHHAKKCEASGFCYVNDIVLAILELLKQHERVLYVD 546
Sbjct 128 GGSVGG+VKLNHG DIAINWAGGLHHAKKCEASGFCYVNDIVLAILELLK H+RVLYVD 186
GGSVGGAVKLNHGH-DIAINWAGGLHHAKKCEASGFCYVNDIVLAILELLKYHQRVLYVD

Query 547 IDIHHGDGVVEEAFYATDRVMTVSFHKFGDYFPFGTGHIDIGYSGKYYSLNVPLDDGIDD 726
Sbjct 187 IDIHHGDGVVEEAFY TDRVMTVSFHKFGDYFPFGTG I+DIG+ GKYYSLNVPLDDGIDD 246
IDIHHGDGVVEEAFYTDRVMTVSFHKFGDYFPFGTGDIRDIGHSGKYYSLNVPLDDGIDD

Query 727 ESYHLLFKPIMGKVMEIFKPGAVVLQCGADSLSGDRLGCFNLSIKGHAECVFMRSFNVP 906
Sbjct 247 ESY LFKPIMGKVM+E+PGAVVLQCGADSLSGDRLGCFNLSI+GHAECV+FMRSFNVP 306
ESYQSLFKPIMGKVMFVRPGAVVLQCGADSLSGDRLGCFNLSIRGHAECVFMRSFNVP

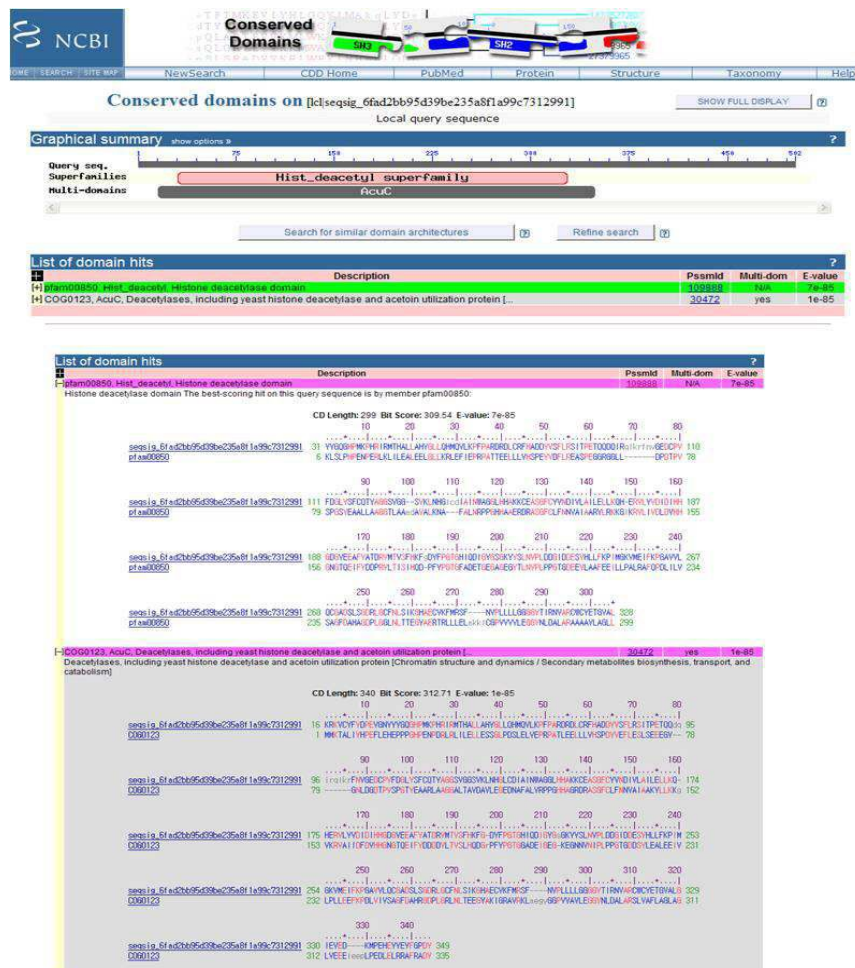
Query 907 LLLGGGGYTIRNVARCWCYETGVALGIEVEDKMPHEHYEYFGPDYTLHVAPSNMENKN 1086
Sbjct 307 LLLGGGGYTIRNVARCWCYETGVALGHELTDMPPNEYFEYFGPDYTLHVAPSNMENKN 366
LLLGGGGYTIRNVARCWCYETGVALGHELTDMPPNEYFEYFGPDYTLHVAPSNMENKN

Query 1087 SRQMLEVIRNDLLQNLQKQHAPSVFPQERPPDTETPEVDEDQEDGDKRWdadsdmdvdd 1266
Sbjct 367 +RQ L+ IR+ LL NLSKL+HAPSV FQERFP+ E PE DEDQED +R ADSD+++DD 426
TRQQLDDIRSRLLDNLSKLHAPSVQFQERFPPEAELPEQDEDQEDPDERHHADSDVEMDD

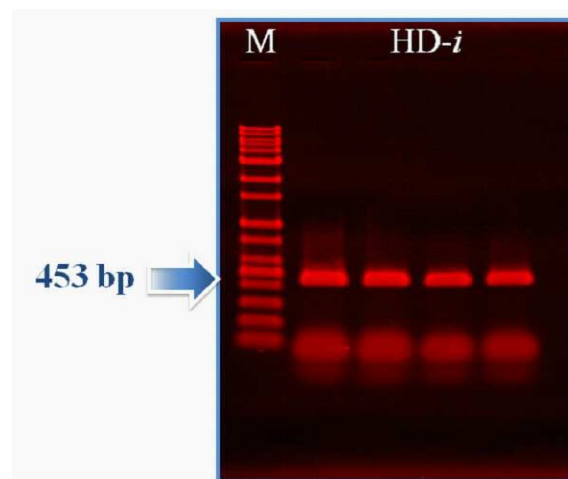
Query 1267 dRKPIPS-----RVKREAVEPDGDKDGVKGVMERGKGFVGMEEESGST--TKVS 1410
Sbjct 427 KP+ RVKRE+ E D D+DG + E KG + + GS+ T + 485
V-KPLDDSGRRSSIQNVVRKRESAETDAADQDGNRVAAENTKGTPEAADGVGSSKQTVPT

Query 1411 GVNSVGMDEAGVKMEEEGTINK 1476
Sbjct 486 +++ +DE G E +NK 507
DASAMAIDEFGSLKVEPDNSNK
```

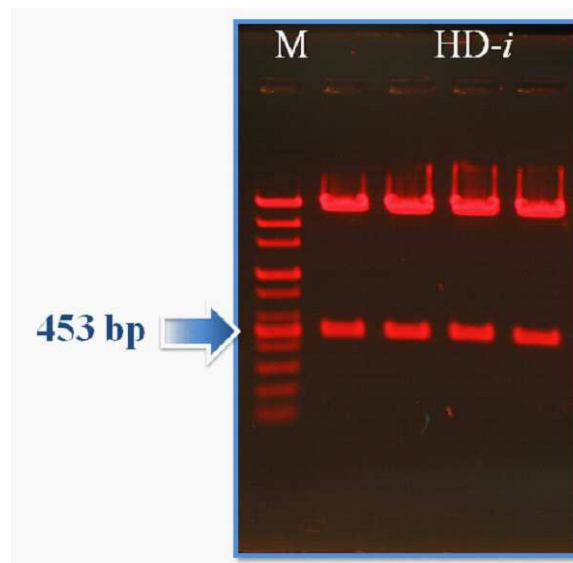
도면5



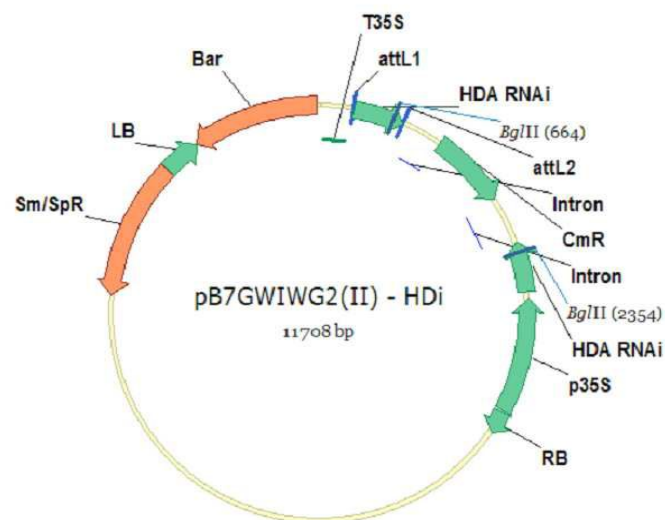
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY
- <120> HISTONE DEACETYLASE PROTEIN OF Brassica rapa ssp. pekinensis AND A GENE ENCODING THE SAME
- <130> P09-139
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HD-F Primer

<400> 1
 atggacaccg gaggaactc gc 22

<210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HD-R Primer

<400> 2
 ttaggtttta ggaacactt gatc 24

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> HD-i-F Primer

<400> 3
 agcgtgttct gtacgtgat atc 23

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> HD-i-R Primer

<400> 4

gcaactccag tctcgttagca cc

22

<210> 5

<211> 1509

<212> DNA

<213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1506)

<400> 5

atg gac acc gga gga aac tcg ctg gcc tct gga cca gac ggt gtg aag
Met Asp Thr Gly Gly Asn Ser Leu Ala Ser Gly Pro Asp Gly Val Lys
1 5 10 15

48

agg aaa gtg tgc tac ttc tac gac cca gag gtt ggg aac tac tac tac
Arg Lys Val Cys Tyr Phe Tyr Asp Pro Glu Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr
20 25 30

96

ggc caa ggc cac ccc atg aag cct cac cgc atc cgc atg acg cac gct
Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Ile Arg Met Thr His Ala
35 40 45

144

ctc ctc gct cac tac ggt ctc ctc cag cac atg caa gtc ctc aag cct
Leu Leu Ala His Tyr Gly Leu Leu Gln His Met Gln Val Leu Lys Pro
50 55 60

192

ttc ccc gcc cgt gac cgt gac ctc tgc cgc ttc cac gcc gac gac tac
Phe Pro Ala Arg Asp Arg Asp Leu Cys Arg Phe His Ala Asp Asp Tyr
65 70 75 80

240

gtc tcc ttt ctc cgc agc att acg ccc gag act cag cag gat cag atc
Val Ser Phe Leu Arg Ser Ile Thr Pro Glu Thr Gln Gln Asp Gln Ile
85 90 95

288

cgc cag ctc aag cgg ttc aac gtt ggt gaa gac tgt cct gtc ttt gac
Arg Gln Leu Lys Arg Phe Asn Val Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp
100 105 110

336

ggg ctt tat tcc ttt tgt cag acg tat gct ggt ggc tct gtt ggt ggt Gly Leu Tyr Ser Phe Cys Gln Thr Tyr Ala Gly Gly Ser Val Gly Gly 115 120 125	384
tct gtt aag ctt aac cat ggg ctt tgt gat att gct att aac tgg gct Ser Val Lys Leu Asn His Gly Leu Cys Asp Ile Ala Ile Asn Trp Ala 130 135 140	432
ggt ggt ctt cat cat gct aag aag tgt gag gcc tct ggc ttc tgc tac Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys Cys Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr 145 150 155 160	480
gtt aat gat atc gtc tta gct atc ctt gag ctg ctt aag cag cat gag Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile Leu Glu Leu Leu Lys Gln His Glu 165 170 175	528
cgt gtt ctg tac gtt gat atc gac att cac cac ggg gac gga gtg gag Arg Val Leu Tyr Val Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly Val Glu 180 185 190	576
gag gcg ttt tac gct acc gac agg gtc atg acc gtc tcg ttc cat aag Glu Ala Phe Tyr Ala Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe His Lys 195 200 205	624
ttc gga gac tac ttc ccc ggt aca ggc cac ata caa gac att ggc tac Phe Gly Asp Tyr Phe Pro Gly Thr Gly His Ile Gln Asp Ile Gly Tyr 210 215 220	672
gga agt gga aag tac tat tca ctc aac gta cca ctg gac gat ggt atc Gly Ser Gly Lys Tyr Tyr Ser Leu Asn Val Pro Leu Asp Asp Gly Ile 225 230 235 240	720
gac gat gag agc tat cat ctc ttg ttc aaa ccc atc atg ggg aaa gtg Asp Asp Glu Ser Tyr His Leu Leu Phe Lys Pro Ile Met Gly Lys Val 245 250 255	768
atg gaa att ttc aaa cca ggt gcg gtc gta ctc caa tgc ggc gct gat Met Glu Ile Phe Lys Pro Gly Ala Val Val Leu Gln Cys Gly Ala Asp 260 265 270	816
tcc ttg tct ggc gat agg ctg gga tgc ttt aac ctc tcc atc aaa ggc Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser Ile Lys Gly 275 280 285	864
cat gcc gag tgt gtc aag ttc atg aga tct ttc aac gtt ccg tta ctg	912

His Ala Glu Cys Val Lys Phe Met Arg Ser Phe Asn Val Pro Leu Leu 290 295 300	
ctc ctt ggt ggt ggt ggt tac acc atc cgc aac gtt gcg cgt tgc tgg Leu Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Trp 305 310 315 320	960
tgc tac gag act gga gtt gcg ctt ggg atc gag gtc gag gac aag atg Cys Tyr Glu Thr Gly Val Ala Leu Gly Ile Glu Val Glu Asp Lys Met 325 330 335	1008
ccg gag cat gag tac tat gag tac ttt ggt ccg gac tat acg ctc cac Pro Glu His Glu Tyr Tyr Glu Tyr Phe Gly Pro Asp Tyr Thr Leu His 340 345 350	1056
gtt gct ccg agt aac atg gag aac aag aac tct cgg cag atg ctc gaa Val Ala Pro Ser Asn Met Glu Asn Lys Asn Ser Arg Gln Met Leu Glu 355 360 365	1104
gtg att cgt aat gac ttg ctc cag aat ctc tcg aag ctt cag cat gct Val Ile Arg Asn Asp Leu Leu Gln Asn Leu Ser Lys Leu Gln His Ala 370 375 380	1152
cct agt gtg ccg ttt cag gaa agg ccg cca gat act gag act cct gag Pro Ser Val Pro Phe Gln Glu Arg Pro Pro Asp Thr Glu Thr Pro Glu 385 390 395 400	1200
gta gat gaa gac caa gaa gat gga gat aaa aga tgg gat gca gat tct Val Asp Glu Asp Gln Glu Asp Gly Asp Lys Arg Trp Asp Ala Asp Ser 405 410 415	1248
gac atg gat gta gat gat gat cgt aaa cct ata cca agc aga gtg aaa Asp Met Asp Val Asp Asp Asp Arg Lys Pro Ile Pro Ser Arg Val Lys 420 425 430	1296
aga gaa gct gtt gag cct gat gga aag gac aag gat gga gtg aaa gga Arg Glu Ala Val Glu Pro Asp Gly Lys Asp Lys Asp Gly Val Lys Gly 435 440 445	1344
gtg atg gag cgt ggg aaa ggt ttt gat gtg ggc atg gag gag agt gga Val Met Glu Arg Gly Lys Gly Phe Asp Val Gly Met Glu Glu Ser Gly 450 455 460	1392
agc acc acc aag gtt tca gga gta aac tca gtg gga atg gat gaa gca Ser Thr Thr Lys Val Ser Gly Val Asn Ser Val Gly Met Asp Glu Ala	1440

465 470 475 480

ggt gtg aaa atg gaa gag gaa ggc aca aca aac aag tca ggg gga gat 1488
Gly Val Lys Met Glu Glu Glu Gly Thr Thr Asn Lys Ser Gly Gly Asp

 485 490 495

caa gtg ttt cct aaa acc taa 1509
Gln Val Phe Pro Lys Thr

500

```
<210> 6
<211> 502
<212> PRT
<213> Brassica rapa ssp. pekinensis
```

<400> 6
Met Asp Thr Gly Gly Asn Ser Leu Ala Ser Gly Pro Asp Gly Val Lys
1 5 10 15

Arg Lys Val Cys Tyr Phe Tyr Asp Pro Glu Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr
20 25 30

Gly Gln Gly His Pro Met Lys Pro His Arg Ile Arg Met Thr His Ala
35 40 45

Leu Leu Ala His Tyr Gly Leu Leu Gln His Met Gln Val Leu Lys Pro
50 55 60

Phe Pro Ala Arg Asp Arg Asp Leu Cys Arg Phe His Ala Asp Asp Tyr
65 70 75 80

Val Ser Phe Leu Arg Ser Ile Thr Pro Glu Thr Gln Gln Asp Gln Ile
85 90 95

Arg Gln Leu Lys Arg Phe Asn Val Gly Glu Asp Cys Pro Val Phe Asp
100 105 110

Gly Leu Tyr Ser Phe Cys Gln Thr Tyr Ala Gly Gly Ser Val Gly Gly
115 120 125

Ser Val Lys Leu Asn His Gly Leu Cys Asp Ile Ala Ile Asn Trp Ala
130 135 140

Gly Gly Leu His His Ala Lys Lys Cys Glu Ala Ser Gly Phe Cys Tyr
145 150 155 160

Val Asn Asp Ile Val Leu Ala Ile Leu Glu Leu Leu Lys Gln His Glu
165 170 175

Arg Val Leu Tyr Val Asp Ile Asp Ile His His Gly Asp Gly Val Glu
180 185 190

Glu Ala Phe Tyr Ala Thr Asp Arg Val Met Thr Val Ser Phe His Lys
195 200 205

Phe Gly Asp Tyr Phe Pro Gly Thr Gly His Ile Gln Asp Ile Gly Tyr
210 215 220

Gly Ser Gly Lys Tyr Tyr Ser Leu Asn Val Pro Leu Asp Asp Gly Ile
225 230 235 240

Asp Asp Glu Ser Tyr His Leu Leu Phe Lys Pro Ile Met Gly Lys Val
245 250 255

Met Glu Ile Phe Lys Pro Gly Ala Val Val Leu Gln Cys Gly Ala Asp
260 265 270

Ser Leu Ser Gly Asp Arg Leu Gly Cys Phe Asn Leu Ser Ile Lys Gly
275 280 285

His Ala Glu Cys Val Lys Phe Met Arg Ser Phe Asn Val Pro Leu Leu
290 295 300

Leu Leu Gly Gly Gly Gly Tyr Thr Ile Arg Asn Val Ala Arg Cys Trp
305 310 315 320

Cys Tyr Glu Thr Gly Val Ala Leu Gly Ile Glu Val Glu Asp Lys Met
325 330 335

Pro Glu His Glu Tyr Tyr Glu Tyr Phe Gly Pro Asp Tyr Thr Leu His
340 345 350

Val Ala Pro Ser Asn Met Glu Asn Lys Asn Ser Arg Gln Met Leu Glu
355 360 365

Val Ile Arg Asn Asp Leu Leu Gln Asn Leu Ser Lys Leu Gln His Ala
370 375 380

Pro Ser Val Pro Phe Gln Glu Arg Pro Pro Asp Thr Glu Thr Pro Glu
385 390 395 400

Val Asp Glu Asp Gln Glu Asp Gly Asp Lys Arg Trp Asp Ala Asp Ser
405 410 415

Asp Met Asp Val Asp Asp Asp Arg Lys Pro Ile Pro Ser Arg Val Lys
420 425 430

Arg Glu Ala Val Glu Pro Asp Gly Lys Asp Lys Asp Gly Val Lys Gly
435 440 445

Val Met Glu Arg Gly Lys Gly Phe Asp Val Gly Met Glu Glu Ser Gly
450 455 460

Ser Thr Thr Lys Val Ser Gly Val Asn Ser Val Gly Met Asp Glu Ala
465 470 475 480

Gly Val Lys Met Glu Glu Glu Gly Thr Thr Asn Lys Ser Gly Gly Asp
485 490 495

Gln Val Phe Pro Lys Thr
500