(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0110016
(43) 공개일자 2010년10월12일

(51) Int. Cl.
A01N 63/02 (2006.01) *A01P 21/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0028357
(22) 출원일자 2009년04월02일
심사청구일자 2009년04월02일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
백경희
서울 강남구 대치동 쌍용아파트 3-1411
(74) 대리인
이문섭

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 애기장대식물 유래의 UDP-glycosyltransferase UGT74E2의 기능

(57) 요 약

본 발명은 애기장대식물 유래의 Uridindiphosphate(UDP)-glycosyltransferase UGT74E2 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하여 식물의 질병 저항성을 증가시키는 방법, 식물의 저항성 증가용 조성물 및 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 억제 정도를 비교하여 식물의 병원체 저항성제를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로 이는 병저항성 작물 개발에 중요한 정보를 제공할 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도7

ACACAACAAAAACTAGAGTCAGTAACAACACAAGATTAAAAAGAAGGAGAAA**ATG**AGAGAAGGATCTCATCTTATCGTCT
TGCCTTTCCCAGGACAAGGCCACATAACTCCAATGTCCCAGTTCTGCAAACGCTTAGCCTCAAAAGGTCTTAAGCTCACTCT
GGTCCTCGTCTCCGACAAACCCTCTCCTCCATACAAAACAGAGCACGACTCAATCACTGTCTTCCCCATCTCCAACGGCTTC
CAAGAAGGCGAGGAACCATTACAAGACCTCGATGATTACATGGAAAGAGTAGAAACCAGCATCAAAAACACCTTACCGAA
GTTGGTTGAAGACATGAAACTGTCGGGAAATCCACCTAGGGCTATCGTGTACGACTCCACCATGCCATGGCTTCTTGATGTA
GCTCATAGTTATGGATTGAGCGGTGCCGTGTTTTTCACGCAACCTTGGCTTGTCACAGCTATTTACTACCATGTTTTCAAGGG
TTCGTTCTCTGTACCGTCTACAAAGTACGGTCACTCGACATTAGCATCTTTCCCTTCGTTCCCGATGCTGACTGCAAATGATTT
GCCGTCTTTCCTCTGCGAATCGTCCTCATACCCGAATATACTGAGGATTGTGGTGGATCAGCTCTCAAACATTGATCGAGTCG
ACATAGTGTTGTGCAACACTTTCGATAAATTGGAGGAAAAGTTGTTGAAATGGGTCCAAAGCTTGTGGCCAGTCTTGAATAT
TGGACCAACGGTTCCATCGATGTATTTAGACAAACGACTGTCTGAAGACAAGAACTACGGTTTTAGCCTCTTCAATGCGAAA
GTCGCTGAATGCATGGAGTGGCTAAACTCAAAGGAGCCTAATTCTGTTGTCTATTTATCATTCGGAAGTTTGGTGATTCTAAA
AGAAGATCAAATGTTGGAACTCGCTGCGGGTCTGAAACAGAGCGGACGTTTCTTTCTGTGGGTTGTGAGAGAGACAGAGA
CACACAAACTTCCAAGAAACTATGTCGAGGAAATCGGTGAAAAAGGACTTATTGTAAGCTGGAGTCCTCAGCTTGACGTAC
TTGCACATAAATCAATCGGTTGTTTCTTGACACACTGTGGATGGAACTCGACGTTAGAGGGATTGAGTTTGGGAGTTCCAAT
GATTGGTATGCCACACTGGACTGATCAGCCCACGAATGCTAAGTTCATGCAGGATGTGTGGAAGGTTGGGGTAAGGGTTAA
GGCAGAAGGTGATGGGTTTGTGAGAAGAGAAGAGATTATGAGAAGTGTGGAAGAAGTTATGGAGGGAGAGAAAGGGAA
AGAGATTAGAAAGAATGCTGAGAAATGGAAAGTGTTGGCTCAAGAGGCAGTTTCTGAAGGAGGTAGCTCTGATAAGAGCA
TCAATGAGTTTGTTTCTATGTTTTGTTGAA**TGA**TTTAAATTGATATGTTCAAAAGTACATCGTCTTTTGCAAGTCCAATTGTAAT
TCTTGTTGTTGTTGTAGTAATAACTAATAATATAGTTTCTCATTTGTC

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 R11200300804001020008
부처명 한국과학재단
연구관리전문기관
연구사업명 우수연구센터(SRC)
연구과제명 역유전학 및 상호작용에 의한 식물방어조절 신호전달 연구
기여율
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2008년 3월 1일 ~ 2009년 2월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 애기장대식물 유래의 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자의 발현 억제제는 안티센스 핵산 또는 T-DNA인 것을 특징으로 하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 식물의 질병은 세균성점무늬병균에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 애기장대식물 유래의 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하여 식물의 질병 저항성을 증가시키는 방법.

청구항 5

서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 애기장대식물 유래의 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 억제 정도를 비교하여 식물의 병원체 저항성제를 스크리닝하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 애기장대식물 유래의 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase *UGT74E2* 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하여 식물의 질병 저항성을 증가시키는 방법, 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함하는 식물의 저항성 증가용 조성물 및 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 억제 정도를 비교하여 식물의 병원체 저항성제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자연계에서 식물은 다양한 종류의 생물적 및 비생물적 스트레스에 지속적으로 노출되는바, 이를 극복하고 살아남기 위해 다양하고 복잡한 구조의 방어기작을 발전시켜왔다. 식물이 보유한 방어기작은 상당히 복잡한 것으로서 일반적으로 복수유전자(multiple genes)의 조화된 전사활성화(orchestrated transcriptional activation)와 2차 대사산물의 축적을 포함하고, 종종 과민반응(HR)의 활성화와 전신획득저항성(systemic acquired resistance)의 발달을 수반한다 (Ryals et al., 1996; Dangl and Jones, 2001).

[0003] 식물의 병저항성 반응과 관련되어 중요한 역할을 한다고 보고된 이차대사산물에는 살리실 산(salicylic acid), 자스몬 산(jasmonic acid), 에틸렌(ethylene), 아브시스 산(abscisic acid) 등이 있다. 19세기까지 고열, 류마티스, 눈병을 치료하기 위한 민간요법으로 버드나무, 백양나무, 조팝나무 등이 널리 사용되었는데, 19세기 후반에는 위의 식물로부터 살리실 산과 그 analogues이 추출되었고, 화학적으로 생합성되었다. 그 analogues 가운데 아세틸 살리실산은 아스피린(aspirin)이라는 의약품으로 상용화되었다. 식물 병저항성과 관련해서 살리실산이 담배모자이크바이러스(TMV)에 대한 담배식물의 저항성에 중요한 역할을 수행한다는 보고가 있은 후에 살리실 산

에 대한 폭넓게 연구가 진행되어 왔다.

[0004] 식물체 내 살리실 산(salicylic acid)의 양은 병원체의 감염과 함께 급격히 증가하고, 화학적으로 합성된 살리실 산을 식물체에 직접 처리하면 병원체에 대한 넓은 범위의 저항성 반응을 보이며, PR1과 같은 pathogenesis-related 단백질들이 식물체내에 축적된다고 알려져 있다(Kunkel and Brooks, 2002). 특정 병원체가 식물체를 침입하면 살리실 산이 매개하는 방어신호체계가 활성화된다. 일반적으로 biotrophic pathogen에 대한 식물의 저항성 반응은 살리실 산이 매개하는 방어신호체계와 관련된다고 알려져 있다(Loake and Grant, 2007).

[0005] 식물이 침입한 병원체를 인식하면 감염된 부위에 과민성반응(hypersensitive response), 예정세포치사(programmed cell death) 등과 같은 국부저항성 반응을 일으킨다. 과민성 반응(hypersensitive reaction: HR)은 가장 효율적이고 즉각적인 저항 반응인데, 이 반응은 병원균이 침투된 부위에서 세포들이 부분적으로 신속하게 사멸되는 것으로 특징화된다(Lamb et al., Cell, 1989; Dangl et al., Plant Cell, 996). 또한 식물 조직을 통해서 감염되지 않은 부위에서도 넓은 범위의 병원체에 대한 저항성 반응을 활성화 시키는데, 이것을 전신적 획득 저항성(systemic acquired resistance, SAR) 반응이라고 한다. 전신적 획득 저항성(SAR) 반응은 지속적이고, 때때로 식물의 전체 생장기간 동안 지속되는 경향을 보인다. 감염되지 않은 식물조직에서 살리실 산 함량이 증가되었다는 기존의 연구 보고로 인하여 식물의 전신적 저항성 획득에 살리실 산이 주요 조절인자 역할을 한다고 알려져 있다(Ross, 1961; Durrant and Dong, 2004).

[0006] 세균성점무늬병균(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pst* DC3000)은 *Pseudomonas*속에 속하는 그람음성균이고, 비교적 넓은 기주범위를 가진 hemibiotrophic pathogen으로서 애기장대, 콩, 토마토, 강낭콩 등에 점무늬병(bacterial speck disease)을 유발한다. 세균성점무늬병균은 세포와 세포사이의 apoplast에 존재 하면서 typeⅢ secretion system을 이용하여 기주식물의 세포내로 저항성 반응을 억제하는 여러 가지 suppressor를 주입하고, 기주세포 내의 영양분과 수분을 취함으로서 생활환을 연장시킨다. 애기장대에 점무늬병을 유발하는 것으로 알려진 점무늬병균은 *Pst* DC3000이외에 *Psm* ES4326 등이 알려져 있다.

[0007] UDP-glycosyltransferase는 특이적인 공여체(specific donor)로부터 기질(acceptor)로 글라이코실기(glycosyl group)의 전달을 촉진하는 효소의 큰 과(large family)를 구성한다(Mackenzie et al., 1997). 애기장대 genome엔 약 120여개의 UDP-glycosyltransferase member들이 코딩되어져 있다. 그러나, 지금까지 단지 적은 수만이 클론되고 특성화되어 왔다. UDP-glucose를 코딩하는 옥수수(maize) Bronze-1 locus: flavonol 3-O-glycosyltransferase는 transposon tagging에 의해 클론 되었고(Fedoroff et al., 1984; Harborne and Williams., 1988), 그때부터, 다른 식물 종으로부터 몇몇 유전자들이 종간유사성(homology)에 기초하여 클론 되어왔다(Sparvoli et al., 1994; Boss et al., 1996; Ford et al., 1998). 다양한 이차대사산물의 glycosylation과 관련된 몇몇의 UGTs는 다양한 기술들을 사용하여 분리되어 왔다(Szerszen et al., 1994; Moehs et al., 1997; Warnecke et al., 1997; Lee and Raskin 1999; Martin et al., 1999; Yamazaki et al., 1999). 그러나 이러한 기존의 연구에도 불구하고, UDP-glycosyltransferase가 애기장대의 병저항성 기작에서 정확히 어떠한 역할을 하는지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 애기장대의 병저항성 기작에서 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2의 역할을 연구한 결과 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 애기장대식물 유래의 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하였을 때 식물의 질명 저항성이 증진되는 바, 애기장대식물 유래의 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 포함하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

[0010] 일 양태로 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 애기장대식물 유래의 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 억제제를 유효성분으로 포함하는 식물의 질병 저항성 증가용 조성물에 관한 것이다.

[0011] 상기 UDP-glycosyltransferase UGT74E2 단백질에는 변이체를 포함하며, 변이체는 UDP-glycosyltransferase UGT74E2 단백질과 90%이상의 상동성을 가지는 단백질을 말한다.

[0012] "상동성" 이란 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 UDP-glycosyltransferase UGT74E2 단백질을 코딩하는 아미노산 서열(서열번호 2)과 바람직하게는 90%이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 더욱 바람직하게는 98%이상 동일할 수 있는 아미노산 서열을 포함한다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[0013] 또한 본 발명의 UDP-glycosyltransferase UGT74E2 단백질 또는 이의 상동체는 효소 활성을 가지는 한 아미노산 서열 변이체를 포함한다. 서열 변이체란 천연의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다. 변이체 단백질은 야생형 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내나, 단백질의 특성이 변형된 변이체일 수 있다. 바람직하게는 아미노산 서열상의 변이와 수식으로 단백질의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증대될 수 있다. 예를 들어, 천연의 단백질이 효소 활성을 보이지 않는 강산성이나 강알카리에서도 효소활성을 나타낼 수 있고, 저온이나 고온에서도 효소 활성을 나타낼 수 있다. 또한 아미노산 서열상의 변이와 수식으로 UDP-glycosyltransferase UGT74E2 단백질에 반응하는 기질 특이성을 강화되거나 단백질과 반응하는 기질의 종류가 확대된 변이체일 수 있다.

[0014] 상기 유전자는 UDP-glycosyltransferase UGT74E2 단백질을 코딩하는 유전자라면 어떤 염기서열을 가지는 것이라도 포함되나 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열을 가지는 유전자이다.

[0015] 본원에 사용된 용어, "유전자"는 폴리펩타이드, 전구체, 또는 RNA (예: rRNA, tRNA)를 생산하는데 필요한 코딩 서열을 포함하는 핵산 (예: DNA) 서열을 언급한다. 폴리펩타이드는 완전한 길이의 코딩 서열에 의해 코딩되거나, 완전한 길이 또는 단편의 목적하는 활성 또는 기능적 특성 (예: 효소적 활성, 리간드 결합, 시그널 도입, 면역원성 등)이 유지되는 한, 코딩 서열의 일부분에 의해 코딩 될 수 있다. 또한, 상기 용어는 구조 유전자의 코딩 영역 및 상기 유전자가 완전-길이의 mRNA의 길이에 상응하도록 말단에서 약 1 kb 이상의 거리로 5' 및 3' 말단의 코딩 영역에 인접하게 위치된 서열을 포함한다. 코딩 영역의 5'에 위치되고 mRNA에 존재하는 서열을 5'-비번역 서열로 언급한다. 코딩 영역의 3' 또는 아래에 위치되고 mRNA에 존재하는 서열을 3'-비번역 서열로 언급한다. 용어 "유전자"는 유전자의 cDNA와 게놈 형태 모두를 포함한다. 게놈 형태 또는 유전자의 클론은 "인트론" 또는 "삽입 영역" 또는 "삽입 서열"로 불리는 비-코딩 서열에 의해 방해되는 코딩 영역을 포함한다. 인트론은 핵 RNA (hnRNA)로 전사되는 유전자의 절편이다. 인트론은 조절 요소, 예를 들어 인핸서를 포함할 수 있다. 인트론은 핵 또는 초기 전사물로부터 제거되거나 "스플라이싱"된다. 따라서, 인트론은 mRNA 전사물에는 존재하지 않는다. 번역과정 동안에 mRNA의 기능은 초기 폴리펩타이드의 아미노산의 서열 또는 순서를 특정하는 기능을 한다. 애기장대가 가지고 있는 25,000여 개의 유전자들에 대한 염기서열분석은 이미 완료되어 있다.

[0016] UGT74E2의 coding region은 1362개의 뉴클레오타이드(nucleotide)로 구성되어 있고(도 7), 해당 유전자가 번역되었을 때 약 51 kilodalton 크기의 단백질이 만들어진다 (도 8).

[0017] 식물의 저항성 반응과 관련하여 유전자의 동정과 분석은 식물 방어반응 이면에서 전체 개요를 이해하는데 필수 단계이며, 이러한 것은 병저항성 식물의 생성(generation)에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

[0018] 따라서 실시예에 따르면, 본 발명자는 병저항성과 연관되어서 그 생물학적 기능이 알려지지 않은 유전자들을 선별하기 위해서 애기장대식물의 축적된 microarray data를 가지고, 그 data를 용이하게 분석할 수 있는 분석도구(GENEVESTIGATOR)를 사용하여 Genevestigator 상에서 18가지 각기 다른 biotic-/abiotic stresses 조건에서 약 25% 이상 발현하는 유전자들을 검색하였다. 그 다음, 상기 유전자 군 중에서 주요 식물호르몬인 살리실산(Salicylic acid)과 주요 식물 병원세균인 세균성점무늬병균(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)에 특이적으로 유도되는 42개의 애기장대 유전자들을 선별하였다 (도 1). 이 가운데 21개의 병저항성과 관련되어 그 생물학적 기능이 밝혀지지 않은 애기장대 유전자군을 최종 선발하였다.

[0019] 유전자 발현은 유전자에 코딩된 유전적 정보를 유전자의 (예를 들어, RNA 폴리머레이즈(RNA polymerase)의 효소적 작용에 의한) 전사를 통해 RNA (예: mRNA rRNA, tRNA 또는 snRNA)로 전환시키고, 단백질 코딩 유전자에 대해, mRNA의 "번역과정"을 통해 단백질로 전환시키는 과정을 언급한다. 유전자 발현은 과정 중의 많은 단계에서 조절될 수 있다. "상향-조절" 또는 "활성화는 유전자 발현 산물의 생성을 증가시키는 조절을 언급하며, "하향-조절" 또는 "억제"는 산물을 감소시키는 조절을 언급한다. 상향-조절 또는 하향-조절에 관련되는 분자 (예: 전사 인자)를 종종 각각 "활성화제" 및 "억제제"라 부른다. 인트론을 포함하는 것에 추가하여, 유전자의 게놈 형태는 또한 RNA 전사물에 존재하는 서열의 5' 및 3' 말단 모두에 위치된 서열을 포함할 수 있다. 이들 서열은 "플랭킹 (flanking)" 서열 또는 영역이라 언급된다 (이들 플랭킹 서열은 RNA 전사물에 존재하는 비-번역 서열에 대해 5' 또는 3'로 위치된다). 5' 플랭킹 영역은 조절 서열, 예를 들어 유전자의 전사를 조절하거나 영향을 주는 프로모터 및 인핸서를 포함할 수 있다. 3' 플랭킹 영역은 전사의 종결, 전사후 절단 및 폴리아데닐화를 지시하는 서열을 포함할 수 있다.

[0020] 상기 “유전자 발현의 억제(Inhibition of gene expression)” 란 목적 유전자에서 생성된 mRNA 및/또는 단백질의 수준이 제거 또는 감소된 것을 의미한다.

[0021] 상기 조성물은 *UDP-glycosyltransferase UGT74E2* 유전자 발현 억제제, 단백질 활성 억제제 외에 식물제제에 일반적으로 사용되는 안정화제 또는 부형제를 유효성분으로서 더 포함할 수 있다.

[0022] 바람직하게는 상기 유전자의 발현 억제제는 안티센스 핵산 또는 T-DNA이나 유전자 발현 억제 및 단백질 활성 억제를 위해 당업계에 공지된 다양한 방법 및 물질이 응용될 수 있으며 이들만으로 한정되지는 않는다.

[0023] "안티센스 핵산” 이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 서열은 *UDP-glycosyltransferase UGT74E2* mRNA에 상보적이고 *UDP-glycosyltransferase UGT74E2* mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 UDP-glycosyltransferase UGT74E2 mRNA의 번역, 세포질 내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 핵산의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 8 내지 60 염기이고, 보다 바람직하게는 10 내지 40 염기이다. 안티센스 핵산에는 mRNA의 절단(cleavage)을 통해 일어나는 RNA 간섭(RNAi: RNA interference) 현상도 포함한다.

[0024] 상기 안티센스 핵산은 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., Curr Opin Struct Biol., 5(3):343-55, 1995). 핵산 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 핵산은 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6(6-아미노헥실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다. 또한 본 발명의 안티센스 핵산은 상기 안티센스 핵산의 활성 및 세포 흡착성을 향상시키는 하나 이상의 모이어티(moiety) 또는 컨쥬게이트(conjugate)와 화학적으로 결합될 수 있다. 콜레스테롤 모이어티, 콜레스테릴 모이어티, 콜릭산, 티오에테르, 티오콜레스테롤, 지방

성 사슬, 인지질, 폴리아민, 폴리에틸렌 글리콜 사슬, 아다맨탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 옥타데실아민, 헥실아미노-카르보닐-옥시콜에스테롤 모이어티 등의 지용성 모이어티 등이 있고 이에 제한되지는 않는다. 지용성 모이어티를 포함하는 올리고뉴클레오티드와 제조 방법은 본 발명의 기술 분야에서 이미 잘 알려져 있다(미국특허 제5,138,045호, 제5,218,105호 및 제5,459,255호). 상기 변형된 핵산은 뉴클레이즈에 대한 안정성을 증가시키고 안티센스 핵산과 표적 mRNA와의 결합 친화력을 증가시킬 수 있다.

[0025] "T-DNA"는 Agrobacterium tumefaciens 또는 Agrobacterium rhizogenes와 같은 박테리아 종의 tumor-inducing (Ti) plasmid에 존재하는 transferred DNA를 말한다. T-DNA mutagenesis는 아그로박테리아를 매개체로 이용한 T-DNA transfer는 생명공학에서 폭넓게 사용되는 방법이다. 유전공학적 기술을 통해서 T-DNA 고유의 Tumor-promoting 유전자와 opine-synthesis 유전자가 제거되고 그 대신 관심유전자와 선택표지(selection marker)를 삽입해서 이용한다. 아그로박테리아는 유전적으로 조작된 T-DNA를 식물세포내의 게놈에 도입하는데 vector로써 일반적으로 사용된다. 이러한 방법은 외부 유전자가 도입된 형질전환식물을 제작하는데 이용될 수 있다. T-DNA transfer에서와 동일한 방법으로 insertional mutagenesis를 통한 유전자들의 발현을 저해하거나 정지시킬 수 있다. 도입된 T-DNA 염기서열은 돌연변이(mutation)를 일으킬 뿐만 아니라 영향을 받은 유전자를 분리 할 때 표지(tag) 역할을 한다. 이러한 T-DNA mutagenesis 방법은 애기장대식물과 같은 식물유전체 기능연구에 폭넓게 사용되고 있다. 본 발명에서의 실시예에서 사용된 T-DNA insertion mutant들은 ABRC에서 T-DNA insertional mutagenesis 방법을 이용해 제작한 애기장대 돌연변이 식물들을 구입하여 사용했다.

[0026] 보다 구체적으로 상기 식물의 질병은 세균성점무늬병균(*Pseudomonas syringae*)에 의해 유발되는 것이다. 바람직하게는 상기 세균성점무늬병균은 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000이다.

[0027] 실시예에 따르면, 본 발명자들은 식물의 저항성 반응에 있어서 각각의 유전자들의 역할을 규명하기 위하여 위의 애기장대 돌연변이 식물에 세균성 점무늬병원균 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000), 진균성 검은무늬병원균 (*Alternaria brassicicola*), 그리고 잿빛곰팡이병원균(*Botrytis cinerea*)을 접종했다. 그 중에서 야생형 애기장대와 비교했을 때 5개의 돌연변이 식물에서는 세균성 점무늬병원균(*Pst* DC3000)의 병징이 증가되었고 (> 15%), 5개의 돌연변이 식물에서는 병원균의 병징이 현저히 완화되는 것을 관찰할 수 있었다(> 15%) (도 2). 하지만 진균병원균의 침입에 대해서는 야생형 애기장대와 비교했을 때 병 반응의 차이를 관찰할 수 없었다 (도 3).

[0028] 이에, 세균성 점무늬병원균(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000)을 접종했을 때 병저항성에 변화가 일어난 10개의 돌연변이 식물들 중에서 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase *UGT74E2* 유전체를 선발하여 심층연구를 진행하게 되었다.

[0029] *UGT74E2*가 실제로 *Pst* DC3000에 대해서 발현 되는지 여부를 알아보기 위해서 야생형 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에 *Pst* DC3000를 5 X 10^4 cfu/ml의 농도로 처리한 후에 *UGT74E2*의 발현 여부를 조사했다. 그 결과 접종 후 1일차부터 해당 유전자가 발현되는 모습을 관찰할 수 있었다 (도 4).

[0030] 또한, *UGT74E2*의 발현이 조직 특이성을 갖고 있는지 여부를 알아보기 위해서 병원균을 처리 하지 않은 상태에서 뿌리, 줄기, 꽃, 잎에서의 해당 유전자의 발현 양상을 조사했다. 그 결과 거의 모든 애기장대 조직에서 일정수준 발현하고 특히, 잎에서 일정수준 이상 발현한다는 결과를 얻을 수 있었다 (도 5).

[0031] Microarray자료에서 *UGT74E2*가 SA, MeJA, Auxin 등의 주요 식물병 관련 호르몬 및 chemical에 의해서 발현된다는 자료를 바탕으로 이 결과가 실제로 식물에도 동일하게 발현되는지 여부를 알아보기 위해서, 주요 방어신호 네트워크에 관련되었다고 알려진 살리실 산(Salicylic acid), 메틸 자스몬 산(Methyl jasmonic acid), 그리고 옥신(Auxin)의 analogue인 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)를 야생형 애기장대에 처리한 후에 해당 유전자의 발현 양상을 조사했다. 그 결과 microarray 자료에서의 결과처럼 각각의 호르몬 및 chemical을 처리 하였을 때 빠르고 강하게 발현되는 모습을 확인할 수 있었다 (도 6).

[0032] 병저항성 유전자 선별과정에서 *Pst* DC3000에 대한 약 6배의 국부저항성의 강화를 확인했기 때문에(도 2), 실제로 대표적인 저항성 관련 표지 유전자들(Marker genes)의 발현에 변화가 생겼는지 확인해 보았다. 그 결과 *pathogenesis-related gene1*(*PR1*)과 *4*(*PR4*)의 발현은 UGT74E2 돌연변이 식물에서 감소했다. 반면에 *PR5*와 병저

항성 관련 transcription factor인 *TGA*의 발현은 상당히 증가된 결과를 얻었다(도 9).

[0033] 국부 저항성 검정에서 (도 9) 전신적 획득 저항성(SAR)관련 표지 유전자인 *PR1*, *PR2*, *PR5*의 발현에 변화를 관찰했기 때문에 전신적 저항성획득 검정실험(SAR assay)를 통해서 *UGT74E2*가 애기장대의 전신적 저항성 획득에서 수행하는 역할을 알아보았다. 그 결과 *UGT74E2* 돌연변이 식물에서 전신적 획득 저항성(SAR)이 강화된 모습을 관찰할 수 있었다 (도10).

[0034] 다른 양태로, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 애기장대식물 유래의 *Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2* 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 억제하여 식물의 질병 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0035] 또한 다른 양태로, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 애기장대식물 유래의 *Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2* 단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 억제 정도를 비교하여 식물의 병원체 저항성제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0036] *UDP-glycosyltransferase UGT74E2* 유전자 발현 또는 단백질의 활성 억제 여부를 검토하기 위한 *UDP-glycosyltransferase UGT74E2* 유전자 및 단백질 검출은 당 분야에서 알려진 증폭반응 또는 하이브리드화 반응으로 수행된다. 증폭반응 또는 하이브리드화 반응은 *UDP-glycosyltransferase UGT74E2* 유전자 또는 단백질에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 사용하여 수행될 수 있다. 예컨대 역전사 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 효모 이중 혼성법(Yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 에세이 (in vitro binding assay) 등 이들을 확인하는데 사용되는 통상적인 방법 등을 이용할 수 있다.

[0037] 또는 단백질에 대한 특이적 항체를 사용할 수 있다. 이 경우 항원-항체 복합체를 형성하여 상기 단백질의 존재를 확인할 수 있다.

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

효 과

[0039] 애기장대식물 유래의 Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2단백질의 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 조절을 통해 병저항성 작물 개발에 중요한 정보를 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0040] **실시예 1. 식물 재료 및 처리방법 (Plant materials and treatments)**

[0041] 본 실험에 사용된 애기장대 (Arabidopsis thaliana ecotype Columbia-0), T-DNA가 삽입된 애기장대 돌연변이들 (T-DNA insertion mutants, SALK-line), 애기장대 *npr1-1* 돌연변이, 그리고 애기장대 *NahG* 형질전환식물은 멸균된 흙(SUN SHINE MIX 5)에서 배양했다. 또한 멸균 배지상에서도 애기장대식물을 재배하였는데, 이를 위해서 다음과 같은 방법으로 애기장대 씨앗(seed)의 표면을 세척하였다. 먼저 70% 에탄올에서 3분간 세척한 다음 25% Lax에 0.05%의 계면활성제(Tween20)가 첨가된 용액에서 5분간 씨앗을 세척하였다. 이것을 5회 이상 멸균된 증류수를 사용하여 세척하였다.

[0042] 균일한 씨앗의 발아를 위해서 위에서 기술한 흙과 멸균배지에 씨앗을 파종한 다음 4℃ cold room에서 72시간 동안 춘화처리(Vernalization) 하였다. 그 다음 실험 전까지 23~25℃의 온도와 16 시간의 광 조건(long-day condition)에서 4~5주간 배양했다.

[0043] 호르몬 처리(hormone treatment) 실험에 사용된 chemical은 각각 Salicylic acid (1 mM), Methyl jasmonic acid (50 μM), 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D, 20 μM)의 농도로 사용하였다.

[0044] 21 종류의 살리신산(salicylic acid)에 특이적으로 발현되는 유전자에 T-DNA가 삽입된 애기장대 돌연변이 식물들은 ABRC(The Arabidopsis Biological Resource Center)에서 분양 받았다.

[0045] 위에 서술한 21개의 애기장대 유전자들에 대한 정보는 표1에 구체적으로 기술하였다.

[0046]

표 1

표1. 애기장대 AGI number, SALK number,유전자 특이적인 primer 염기서열 정보

AGI	Polymorphism	Sequence
At3g53150	CS25006	Forward: GAAGACAGTTGACCGAGCAAG
		Reverse: ATGTTCAAAACCTCCACGATG
At5g11920	SALK_152299	Forward: AAGTCACAGTTGTTGCCGAAC
		Reverse: TGGTTTTACTGCATTTACCTCAAG
At1g29020	SALK_062045	Forward: GGTTTCTTTGGCGGAATTATC
		Reverse: CAGAATCAAATAAAAAGAGCGTTTC
At5g45070	SALK_143717	Forward: TATGGTTCGCGTTTGCAG
		Reverse: TTCATGAACTCTCTTTCGTTCC
At1g50090	SALK_070362	Forward: CAACTTTGAGGTTCAAGCCTG
		Reverse: ATGCGAATGTAAAATGGGATG
At4g35180	SALK_027033	Forward: TTGACCAAAACATCCGAAGAG
		Reverse: AAACCAAGAAGCATTGCACTG
At4g10500	SALK_059907	Forward: ATTCCATCCCTCTGATCGATC
		Reverse: ATCACTGCATCTGTTGAAGGG
At3g23190	SALK_123883	Forward: CTACAAAACGTGAGAATCCCG
		Reverse: CAACACAAATGATCGGTTGTG
At3g56400	SALK_025198	Forward: GGTGTTACACGTGTGGTTTCC
		Reverse: CAAACCACACCAAGAGGAAAG
At1g17170	SALK_034472	Forward: CAGTGGCCTAAGCAACTAACG
		Reverse: TAACTCCTTGGCTGCTTCTTG
At5g05900	SALK_137521	Forward: CTCCTCAACTGGATCATCACC
		Reverse: AATGGCCTACGAGTGATTCTG
At1g44050	SALK_011264	Forward: GAACATTTTATCTTCGCCGTG
		Reverse: CAGACGTTTGTAAGCTCCCTG
At1g15640	SALK_001121	Forward: AAAATTATCCAAAATAACCTAGATATCCC
		Reverse: CAGCCACCGGTATAACAGATG
At5g59490	SALK_080547	Forward: GAGGGACTTTTAGGAATCTTCTTG
		Reverse: GCTCTCACAAGACTTGGCATC
At2g40750	SALK_095417	Forward: ACTTTTCCGGCGTTTTTAATG
		Reverse: TGGATTTCGTGTTGTTACTATTCG
At2g04050	SALK_142350	Forward: GAGAGAAAGGAGTCCACGACC
		Reverse: AAAATACTGAACCCGGAAACG
At1g05680	SALK_016116	Forward: TCTTGGAAACCATTGGAGATG
		Reverse: TAAGCTGGAGTCCTCAGCTTG
At1g02450	SALK_086460	Forward: TCAACCTTTTCAAGCATTATGG
		Reverse: TCCTTGTGATCCGAAACAAAC
At3g53480	SALK_035704	Forward: TTTGTTAAAGGCCTTGTCTGG
		Reverse: GCGAAACAAGTACAGTAGCGC
At3g53480	SALK_063955	Forward: GTTTCGAACCGTCCTCTTCTC
		Reverse: GTTTTTGTTGTGGCATCGATC
At2g14560	SALK_039201	Forward: GCACAACAATAACGAGCATACTC
		Reverse: TTTGATACATCTGGAATAAACATGTG

[0047]

[0048] **실시예 2. 애기장대 돌연변이식물들의 유전형 검정 (Mutant genotyping)**

[0049] 애기장대 잎에서 genomic DNA를 추출 하기 위하여 다음과 같은 방법을 사용하였다. 우선 2~3장의 애기장대 잎을 잘라내어 1.5ml tube에 넣은 다음 pestle을 사용하여 즙을 냈다. 여기에 400 μl의 CTAB buffer(3% CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, 200 mM β-Mercaptoethanol)를 첨가하고 pestle을 사용하여 완전하게 갈아줬다. 이것을 65℃에서 30분간 배양한 다음 400 μl의 chloroform를 첨가한 후 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 했다. 원심분리 후의 tube내의 상등액을 취해서 새로운 tube에 옮긴 다음 250 μl의 isopropanol을 첨가한 다음 16 시간 동안 상온에서 배양했다. 그 혼합액을 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 다음 상등액을 버리고 ethanol을 첨가하여 pellet을 침전시켰다. 위의 pellet을 TE buffer에 녹였다.

[0050] SALK에서 분양 받은 애기장대 돌연변이식물의 동형접합체 (homozygote) 여부의 확인은 T-DNA 특이적인 primer (LBa1 5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3')와 애기장대 유전자 특이적인 primer를 사용하여 PCR 분석을 통해 확인했다. 위에 기술한 애기장대 유전자 특이적인 primer에 관한 정보는 표1에 구체적으로 기술하였다.

[0051] **실시예 3. 사용된 병원체들과 병원체 감염방법 (Pathogens and inoculation procedures)**

[0052] 본 실험에 사용된 병원체는 다음과 같다. 세균성 점무늬병균으로 병원성인 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000(이하 *Pst* DC3000)과 비병원성 유전자인 *AvrRpm1*을 보유한 *Pst* DC3000 (이하 *Pst* DC3000 *avrRpm1*) 그리고 진균성 병균으로 병원성인 검은무늬병균(*Alternaria brassicicola*)과 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)을 사용하였다.

[0053] *Pst* DC3000과 *Pst* DC3000 *avrRpm1*은 다음과 같은 조건에서 배양했다. *Pst* DC3000은 50 μg mL^{-1} 농도의 rifampicin이 첨가된 King's B 액체배지에서, *Pst* DC3000 *avrRpm1*은 50 μg mL^{-1} 농도의rifampicin과 50 μg mL^{-1} 농도의 kanamycin이 첨가된 king's B 액체배지에서 28℃에서 16시간 동안 배양하였다. 애기장대에 접종하기 위해서 세균을 원심분리하여 배지와 분리한 후에 10 mM 농도의 $MgCl_2$ buffer를 첨가하여 접종원을 만들었다. 그 접종원 원액을 각각의 실험목적에 따른 농도로 만든 다음 4~5주간 배양된 애기장대식물의 잎에 침지(dipping), 주사기 주입(syringe infiltration), 진공펌프 주입(vacuum infiltration)법 등을 사용하여 접종(inoculation)했다.

[0054] 검은무늬병균(*Alternaria brassicicola*)과 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)은 PD (Potato Dextrose) 고체배지에서 28℃에서 12일 이상 배양하였다. 애기장대에 접종하기 위하여 각각의 병원균의 균사체(conidia)를 취한 다음 PD 액체배지를 첨가해 실험목적에 따른 포자의 농도(5 X 10^4 spores mL^{-1})를 만들었다. 이 진균포자 현탁액을 4~5주간 배양한 애기장대식물의 잎의 중앙에 pipette을 사용하여 접종(dropping)하였다.

[0055] **실시예 4. 전신적 획득 저항성 검정 (Systemic acquired resistance assay)**

[0056] 애기장대의 전신적 저항성 획득 여부는 다음과 같은 방법을 사용하여 검정했다.

[0057] 4~5주간 배양한 애기장대식물의 하위잎 1~2장에 1 X 10^6 cfu mL^{-1} 농도의 비병원성 점무늬병균(*Pst* DC3000 *avrRpm1*)과 대조구로 사용하기 위하여 10 mM L^{-1} 농도의 $MgCl_2$를 주사기를 사용하여 접종했다. 접종 후 3일차에 병원균을 접종하지 않은 상위잎에서의 애기장대 병저항성 관련 표지유전자(marker)인 *PR1* (*Pathogenesis-related gene1*)의 발현 여부를 대조구와 비교하거나 상위잎에 5 X 10^4 cfu/mL^{-1} 농도의 병원성 *Pst* DC3000을 접종한 다음 세균의 성장 정도를 대조구와 비교함으로써 애기장대 식물의 전신적 저항성 획득 여부 및 정도를 검정했다.

[0058] **실시예 5. RNA 추출 (Extraction of total RNA)**

[0059] 약 3~4장의 애기장대 잎을 2 ml tube에 표본 추출하여 액체질소상에서 pestle을 사용하여 고운 분말로 만든다. 그 애기장대식물 분말에 400 μl의 RNA extraction buffer (0.2 M Tris-HCl pH 8.0, 0.4 M $LiCl_2$, 25 mM EDTA 그리고 1% SDS), 400 μl의 Phenol 그리고 400 μl의 chloroform을 첨가하고 잘 혼합한 다음 4℃, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 했다. 그 상등액을 분리한 다음 여기에 400 μl의 chloroform을 첨가하고 잘 혼합한 다음 다시 4℃, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 했다. 다시 상등액을 분리한 다음 400 μl의 4M $LiCl_2$를 첨가하여 16시간 동안 RNA를 침전시켰다. 다시 4℃, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 해서 얻은 pellet을 ethanol로 washing한 다음 DEPC를 처리한 증류수에 녹였다.

[0060] **실시예 6. RT-PCR 분석 (Reverse transcription- Polymerase chain reaction analysis)**

[0061] Complementary DNA(cDNA)는 3 μg의 total RNA, oligo(dT) primer, Superscript Reverse transcriptase Kit(Promega, USA)를 사용하여 합성하였다.

[0062] Semiquantitative RT-PCR은 DNA polymerase kit, dNTP mixture, 애기장대 유전자 특이적인 primer를 사용하여 수행했다. 애기장대 유전자인 UGT74E2, *AtPR1*, *AtPR2*, *AtPR3*, *AtPR4*, *AtPR5*, *AtNPR1*, *AtTGA1*, *AtIAA1*, *AtPDF1.2*, *AtActin7* 의 Rt-PCR 분석을 위한 유전자 특이적인 primer의 염기서열에 대한 정보는 표2에 구체적으

로 기술하였다.

[0063] 모든 RT-PCR 분석에 있어서 *AtActin7*은 동일양의 RNA 여부를 나타내는 표지(marker) 유전자로 사용했다.

표 2

[0064]

표2. RT-PCR 분석을 위한 애기장대 유전자 특이적인 primer의 염기서열 정보

AGI	Sequence
At1g05680 (UGT74E2-level)	Forward AGAAAGAATGCTGAGAAATGGAA Reverse:TGGACTTGCAAAAGACGATG
At1g05680 (UGT74E2-cDNA)	Forward:GGATCCATGAGAGAAGGATCTCATC Reverse:GGATCCTCAACAAAACATAGAAAC
At2g14610 (*AtPR1*)	Forward CGGAGCTACGCAGAACAACT Reverse CGTTCACATAATTCCCACGA
At3g57260 (*AtPR2*)	Forward:TCCTTAGAGACTTGTGGGCTTT Reverse:CCTATAGGCCCATGCTATTTTT
At3g12500 (*AtPR3*)	Forward:CTTCGTTAACGGCCTCCTC Reverse:GGGAAATAAAATCGCAACATAAA
At3g04720 (*AtPR4*)	Forward:CCATTGATCGCGTTTGATATT Reverse:CGAAACATATATCCCTCGACAA
At1g75040 (*AtPR5*)	Forward:TCGGGTTTAATTATCTCTCACG Reverse:TCCGTAGATCAATCATTTTGTTTT
At1g64280 (*NPR1*)	Forward:TCTTGCCTCTTAGTGTAATTTT TGC Reverse:CAACATTTGTTTGAAGCACACC
At1g02450 (*TGA*)	Forward:AAGGTGGAACAAGAAGAAGATCA Reverse:AAATGAAGGATTTAATAATCACAACG
At5g09810 (*AtActin7*)	Forward:AATGGTGAAGGCTGGTTTTG Reverse:TGCCTCTGTGAGTAGAACTG
At4g14560 (*AtIAA1*)	Forward : TGGTCGAGGCAAAAACAAAT Reverse : AAACTTCGTATAATCAAAACTCATCTT
At5g44420 (*AtPDF1.2*)	Forward : TCTTTGGTGCTAAATCGTGTG Reverse : AACAACAACGGGAAAATAAACA

[0065] **실시예 7. 애기장대 유전자 UGT74E2의 분리 및 염기서열 분석 (Isolation and sequence alignment of UGT74E2 cDNA fragments)**

[0066] 애기장대 유전자 UGT74E2의 cDNA를 분리하기 위하여 *Pst* DC3000을 처리한 애기장대 잎에서 RNA를 추출했다. cDNA는 3 μg의 total RNA, oligo(dT), reverse transcriptase를 사용하여 합성했으며, 합성한 cDNA와 UGT74E2 유전자 특이적인 primer(표2)를 사용하여 PCR을 통해 UGT74E2의 full cDNA 절편(fragment)을 증폭시켰다. PCR을 통해서 증폭시킨 애기장대 UGT74E2 cDNA 절편을 pGEM-T Easy vector에 삽입한 후 염기서열을 확인했다. 확인된 염기서열은 NCBI의 BLAST 프로그램을 이용하여 분석을 수행했다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 Genevestigator를 이용하여 애기장대 microarray data를 바탕으로, 각기 상이한 생물적 또는 비생물적 자극조건(Biotic- 또는 abiotic- stresses) 처리에 따른 42개 애기장대 유전자의 발현 양상을 나타낸 것이다.

[0068] 도 2는 애기장대 돌연변이 식물에 병원성 *Pst* DC3000을 처리 하였을 때 일정수준 이상 (> 15%) 병징을 보인 10개의 애기장대 돌연변이 식물의 병원균 생장 차이를 나타낸 것이다.

[0069] 도 3은 도 2에서 나타낸 10개의 애기장대 돌연변이 식물에 진균성 검은무늬병균 (*Alternaria brassicola*) 또는 잿빛곰팡이병균(*Botrytis cinerea*)을 처리하고 병징의 크기의 변화를 야생형 애기장대의 것과 비교했을 때의 차이를 나타낸 것이다.

[0070] 도 4는 세균성점무늬병원균(*Pst* DC3000) 처리에 따른 애기장대 *UGT74E2* 유전자의 발현양상을 RT-PCR 분석한 결과이다. *AtPR1* 밴드는 병원균 감염에 따른 저항성 표지(Marker) 유전자이고, *AtActin7*은 loading control로 나타낸 것이다.

[0071] 도 5는 RT-PCR 분석에 의해 다양한 애기장대식물 기관에서 *UGT74E2*의 발현 형태를 나타낸 것이다. 레인: R, 뿌리; S, 줄기; F, 꽃; Ro, 잎을 나타내며, ethidium bromide 염색된 겔에서 *AtActin7* 밴드는 loading control로 나타낸 것이다.

[0072] 도 6은 RT-PCR 분석에 의한 대표적인 phytohormone인 salycilic acid와 methyl jasmonic acid, 그리고 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D) 처리에 대한 애기장대 *UGT74E2* 유전자의 발현 여부를 나타낸 것이다. *AtPR1*, *PDF1.2* 그리고 *IAA1*은 각각의 물질처리에 대한 표지(Marker) 유전자이고, *AtActin7*은 loading control로 나타낸 것이다.

[0073] 도 7는 *UGT74E2*의 뉴클레오타이드 서열이다. *UGT74E2*의 길이는 5' region, ATG 번역 개시 코돈 (굵은 글자), TGA 번역 종결 코돈 (굵은글자), 3' region을 포함하는 1519 bp 이다.

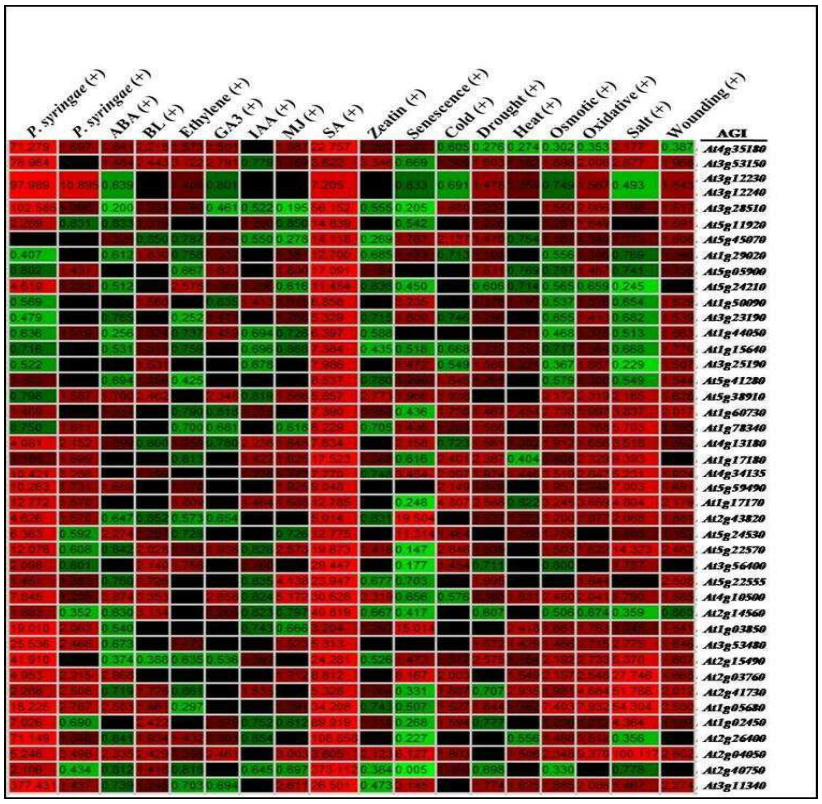
[0074] 도 8은 *UGT74E2*의 아미노산 염기 서열이다.

[0075] 도 9는 RT-PCR 및 RT-qPCR 분석에 의해, 세균성점무늬병원균(*Pst* DC3000) 처리 후, *UGT74E2* 돌연변이 식물의 병원균 처리 주변에서의 병저항성 관련 표지유전자(Marker gene)들의 발현양상을 나타낸 것이다. ethidium bromide 염색된 겔에서 *AtActin7* 밴드는 loading control을 나타낸다.

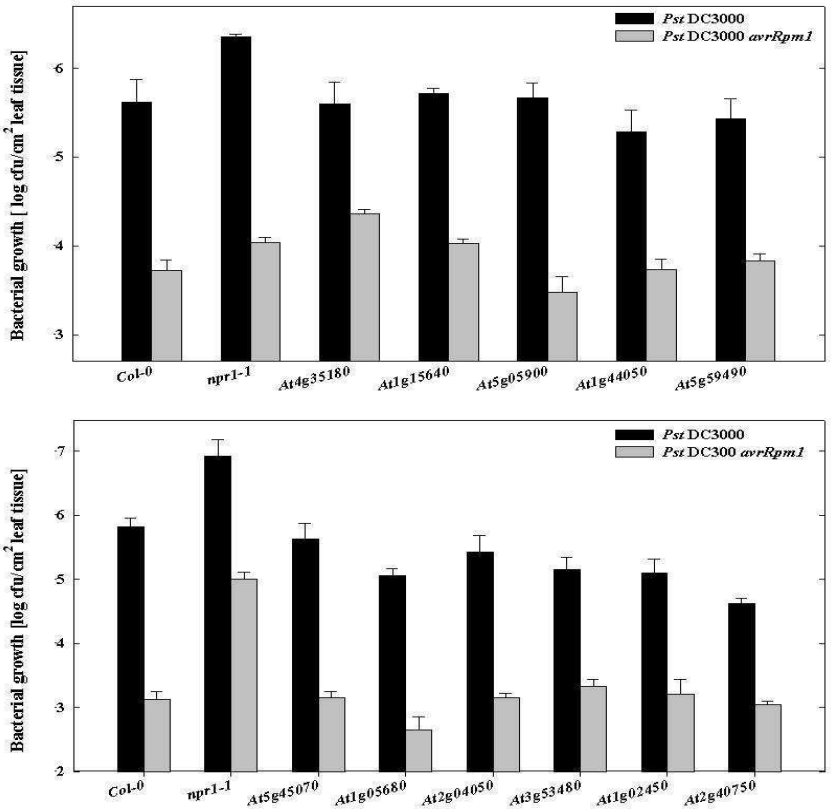
[0076] 도 10은 SAR assay 실험을 이용하여 하위잎에 비병원성 세균성점무늬병균(*Pst* DC3000 *avrRpm1*)을 접종하여 애기장대에 전신적 획득 저항성(Systemic acquired resistance)을 유도한 후에 상위잎에서 애기장대 병저항성 관련 표지(Marker) 유전자의 발현량 변화를 나타낸 결과와, 상위잎에 병원성 세균성점무늬병균(*Pst* DC3000)을 처리하였을 때 병원균의 성장정도의 변화를 나타낸 결과이다. Mock은 하위잎에 버퍼(10 mM $MgCl_2$)만을 처리한 것을 지시하고 이것을 대조군으로 사용하였다.

도면

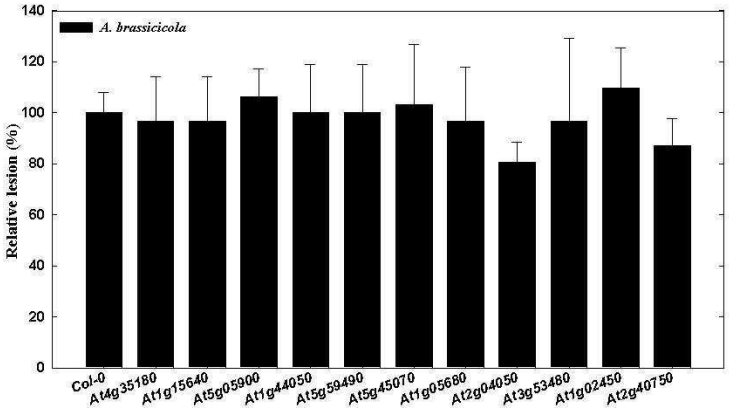
도면1



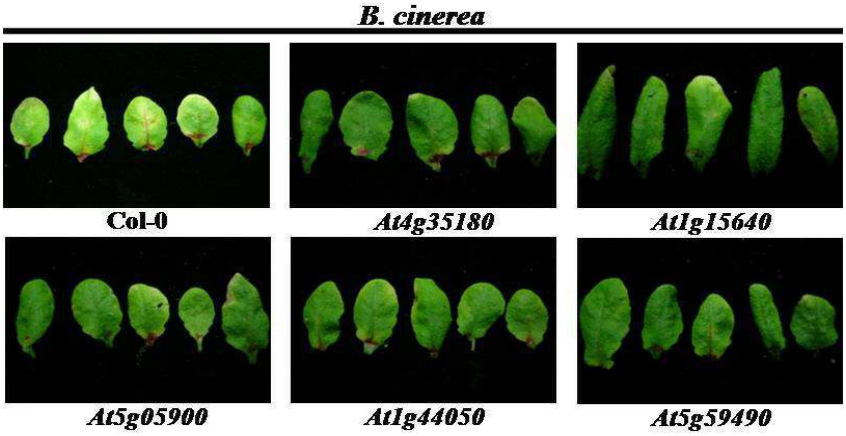
도면2


Pst DC3000
Pst DC3000 avrRpm1
Bacterial growth [log cfu/cm2 leaf tissue]
Col-0
npr1-1
At4g35180
At1g15640
At5g05900
At1g44050
At5g59490
Pst DC3000
Pst DC300 avrRpm1
Bacterial growth [log cfu/cm2 leaf tissue]
Col-0
npr1-1
At5g45070
At1g05680
At2g04050
At3g53480
At1g02450
At2g40750

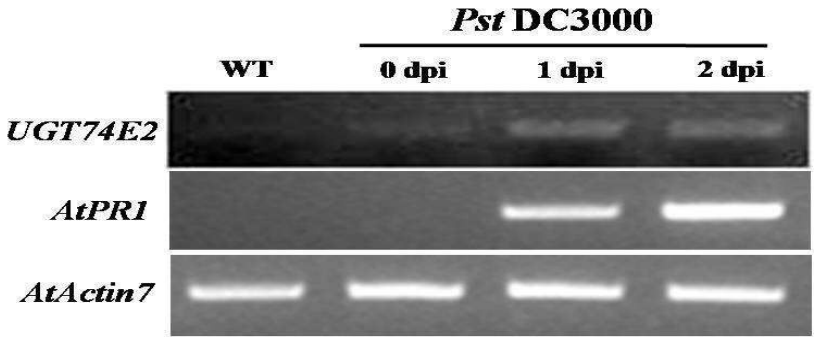
도면3a


A. brassicicola
Relative lesion (%)
Col-0
At4g35180
At1g15640
At5g05900
At1g44050
At5g59490
At5g45070
At1g05680
At2g04050
At3g53480
At1g02450
At2g40750

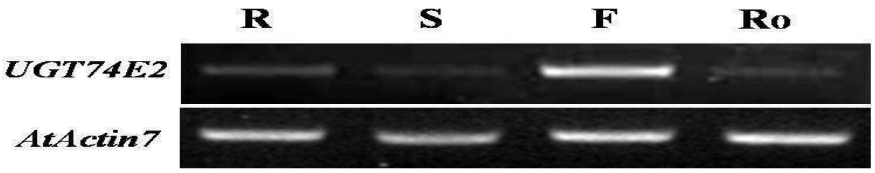
도면3b


B. cinerea
Col-0
At4g35180
At1g15640
At5g05900
At1g44050
At5g59490

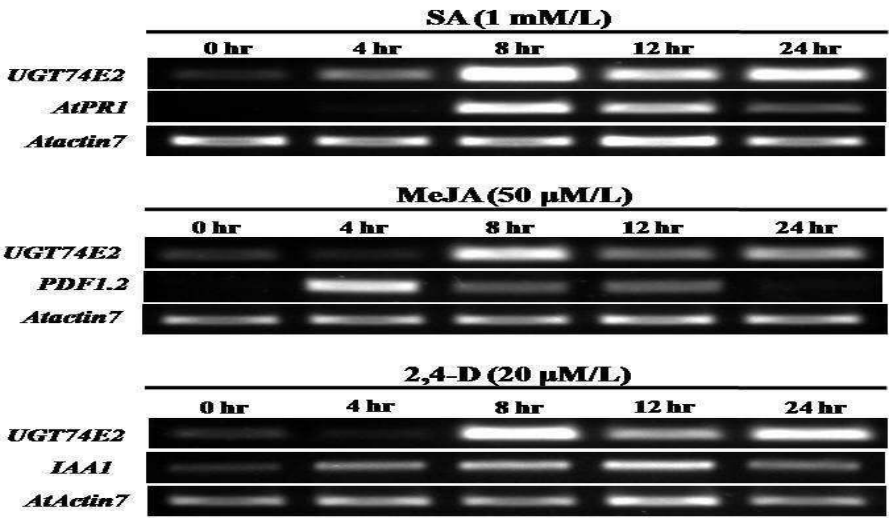
도면4


Pst DC3000
WT
0 dpi
1 dpi
2 dpi
UGT74E2
AtPR1
AtActin7

도면5


R
S
F
Ro
UGT74E2
AtActin7

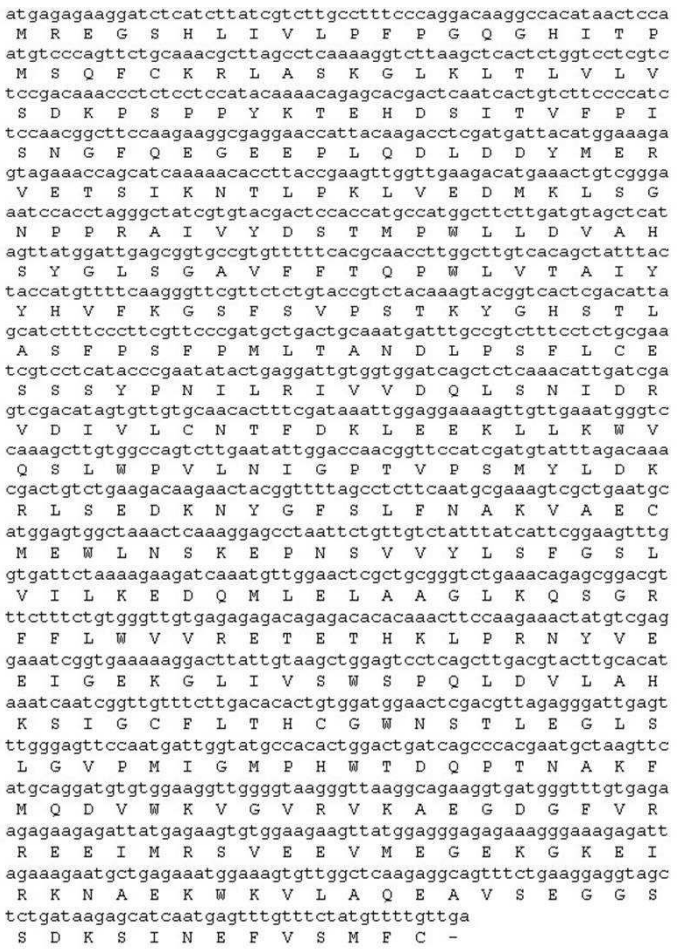
도면6



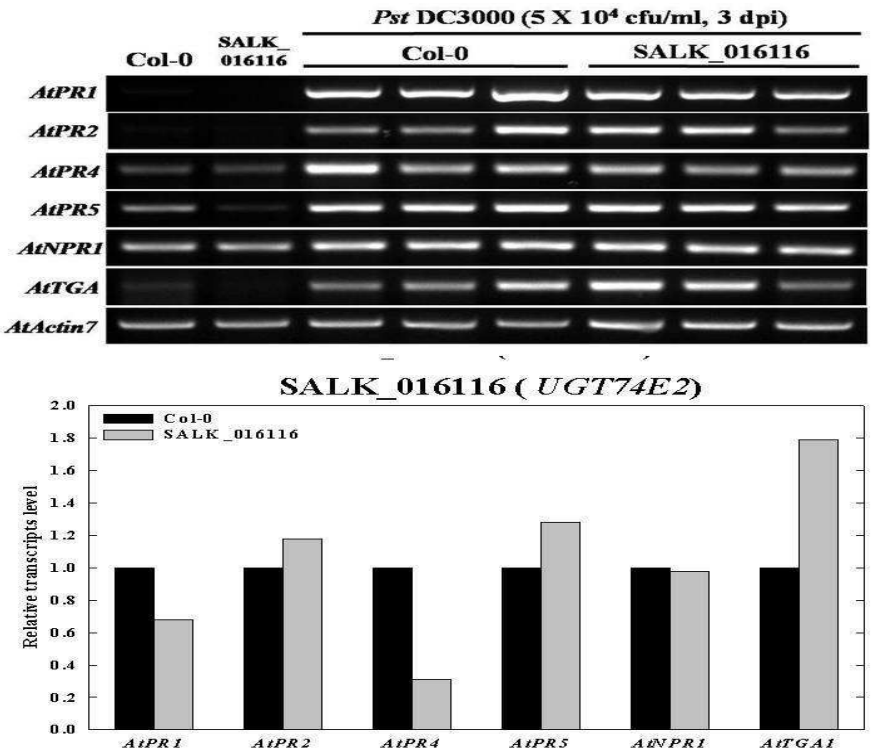
도면7

ACACAACAAAAACTAGAGTCAGTAACAACACAAGATTAAAAAGAAGGAGAAA**ATG**AGAGAAGGATCTCATCTTATCGTCT
TGCCTTTCCCAGGACAAGGCCACATAACTCCAATGTCCCAGTTCTGCAAACGCTTAGCCTCAAAAGGTCTTAAGCTCACTCT
GGTCCTCGTCTCCGACAAACCCTCTCCTCCATACAAAACAGAGCACGACTCAATCACTGTCTTCCCCATCTCCAACGGCTTC
CAAGAAGGCGAGGAACCATTACAAGACCTCGATGATTACATGGAAAGAGTAGAAACCAGCATCAAAAACACCTTACCGAA
GTTGGTTGAAGACATGAAACTGTCGGGAAATCCACCTAGGGCTATCGTGTACGACTCCACCATGCCATGGCTTCTTGATGTA
GCTCATAGTTATGGATTGAGCGGTGCCGTGTTTTTCACGCAACCTTGGCTTGTCACAGCTATTTACTACCATGTTTTCAAGGG
TTCGTTCTCTGTACCGTCTACAAAGTACGGTCACTCGACATTAGCATCTTTCCCTTCGTTCCCGATGCTGACTGCAAATGATTT
GCCGTCTTTCCTCTGCGAATCGTCCTCATACCCGAATATACTGAGGATTGTGGTGGATCAGCTCTCAAACATTGATCGAGTCG
ACATAGTGTTGTGCAACACTTTCGATAAATTGGAGGAAAAGTTGTTGAAATGGGTCCAAAGCTTGTGGCCAGTCTTGAATAT
TGGACCAACGGTTCCATCGATGTATTTAGACAAACGACTGTCTGAAGACAAGAACTACGGTTTTAGCCTCTTCAATGCGAAA
GTCGCTGAATGCATGGAGTGGCTAAACTCAAAGGAGCCTAATTCTGTTGTCTATTTATCATTCGGAAGTTTGGTGATTCTAAA
AGAAGATCAAATGTTGGAACTCGCTGCGGGTCTGAAACAGAGCGGACGTTTCTTTCTGTGGGTTGTGAGAGAGACAGAGA
CACACAAACTTCCAAGAAACTATGTCGAGGAAATCGGTGAAAAAGGACTTATTGTAAGCTGGAGTCCTCAGCTTGACGTAC
TTGCACATAAATCAATCGGTTGTTTCTTGACACACTGTGGATGGAACTCGACGTTAGAGGGATTGAGTTTGGGAGTTCCAAT
GATTGGTATGCCACACTGGACTGATCAGCCCACGAATGCTAAGTTCATGCAGGATGTGTGGAAGGTTGGGGTAAGGGTTAA
GGCAGAAGGTGATGGGTTTGTGAGAAGAGAAGAGATTATGAGAAGTGTGGAAGAAGTTATGGAGGGAGAGAAAGGGAA
AGAGATTAGAAAGAATGCTGAGAAATGGAAAGTGTTGGCTCAAGAGGCAGTTTCTGAAGGAGGTAGCTCTGATAAGAGCA
TCAATGAGTTTGTTTCTATGTTTTGTTGAA**TGA**TTTAAATTGATATGTTCAAAAGTACATCGTCTTTTGCAAGTCCAATTGTAAT
TCTTGTTGTTGTTGTAGTAATAACTAATAATATAGTTTCTCATTTGTC

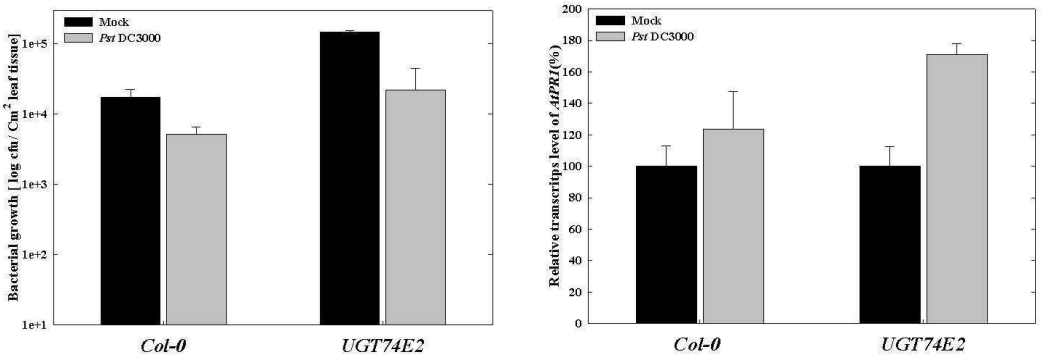
도면8


atgagagaaggatctcatcttatcgtcttgcctttcccaggacaaggccacataactcca
M R E G S H L I V L P F P G Q G H I T P
atgtcccagttctgcaaacgcttagcctcaaaaggtcttaagctcactctggtcctcgtc
M S Q F C K R L A S K G L K L T L V L V
tccgacaaaccctctcctccatacaaaacagagcacgactcaatcactgtcttccccatc
S D K P S P P Y K T E H D S I T V F P I
tccaacggcttccaagaaggcgaggaaccattacaagacctcgatgattacatggaaaga
S N G F Q E G E E P L Q D L D D Y M E R
gtagaaaccagcatcaaaaacaccttaccgaagttggttgaagacatgaaactgtcggga
V E T S I K N T L P K L V E D M K L S G
aatccacctagggctatcgtgtacgactccaccatgccatggcttcttgatgtagctcat
N P P R A I V Y D S T M P W L L D V A H
agttatggattgagcggtgccgtgtttttcacgcaaccttggcttgtcacagctatttac
S Y G L S G A V F F T Q P W L V T A I Y
taccatgttttcaagggttcgttctctgtaccgtctacaaagtacggtcactcgacatta
Y H V F K G S F S V P S T K Y G H S T L
gcatctttcccttcgttcccgatgctgactgcaaatgatttgccgtctttcctctgcgaa
A S F P S F P M L T A N D L P S F L C E
tcgtcctcatacccgaatatactgaggattgtggtggatcagctctcaaacattgatcga
S S S Y P N I L R I V V D Q L S N I D R
gtcgacatagtgttgtgcaacactttcgataaattggaggaaaagttgttgaaatgggtc
V D I V L C N T F D K L E E K L L K W V
caaagcttgtggccagtcttgaatattggaccaacggttccatcgatgtatttagacaaa
Q S L W P V L N I G P T V P S M Y L D K
cgactgtctgaagacaagaactacggttttagcctcttcaatgcgaaagtcgctgaatgc
R L S E D K N Y G F S L F N A K V A E C
atggagtggctaaactcaaaggagcctaattctgttgtctatttatcattcggaagtttg
M E W L N S K E P N S V V Y L S F G S L
gtgattctaaaagaagatcaaatgttggaactcgctgcgggtctgaaacagagcggacgt
V I L K E D Q M L E L A A G L K Q S G R
ttctttctgtgggttgtgagagagacagagacacacaaacttccaagaaactatgtcgag
F F L W V V R E T E T H K L P R N Y V E
gaaatcggtgaaaaaggacttattgtaagctggagtcctcagcttgacgtacttgcacat
E I G E K G L I V S W S P Q L D V L A H
aaatcaatcggttgtttcttgacacactgtggatggaactcgacgttagagggattgagt
K S I G C F L T H C G W N S T L E G L S
ttgggagttccaatgattggtatgccacactggactgatcagcccacgaatgctaagttc
L G V P M I G M P H W T D Q P T N A K F
atgcaggatgtgtggaaggttggggtaagggttaaggcagaaggtgatgggtttgtgaga
M Q D V W K V G V R V K A E G D G F V R
agagaagagattatgagaagtgtggaagaagttatggagggagagaaagggaaagagatt
R E E I M R S V E E V M E G E K G K E I
agaaagaatgctgagaaatggaaagtgttggctcaagaggcagtttctgaaggaggtagc
R K N A E K W K V L A Q E A V S E G G S
tctgataagagcatcaatgagtttgtttctatgttttgttga
S D K S I N E F V S M F C -

도면9



도면10



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Cooperation Foundation

<120> Function of Uridindiphosphate (UDP)-glycosyltransferase UGT74E2 from Arabidopsis Plant

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 1518
<212> DNA
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1
acacaacaaa aactagagtc agtaacaaca caagattaaa aagaaggaga aaatgagaga 60

aggatctcat cttatcgtct tgcctttccc aggacaaggc cacataactc caatgtccca 120

gttctgcaaa cgcttagcct caaaaggtct taagctcact ctggtcctcg tctccgacaa 180

accctctcct ccatacaaaa cagagcacga ctcaatcact gtcttcccca tctccaacgg 240

cttccaagaa ggcgaggaac cattacaaga cctcgatgat tacatggaaa gagtagaaac 300

cagcatcaaa aacaccttac cgaagttggt tgaagacatg aaactgtcgg gaaatccacc 360

tagggctatc gtgtacgact ccaccatgcc atggcttctt gatgtagctc atagttatgg 420

attgagcggt gccgtgtttt tcacgcaacc ttggcttgtc acagctattt actaccatgt 480

tttcaagggt tcgttctctg taccgtctac aaagtacggt cactcgacat tagcatcttt 540

cccttcgttc ccgatgctga ctgcaaatga tttgccgtct ttcctctgcg aatcgtcctc 600

atacccgaat atactgagga ttgtggtgga tcagctctca aacattgatc gagtcgacat 660

agtgttgtgc aacactttcg ataaattgga ggaaaagttg ttgaaatggg tccaaagctt 720

gtggccagtc ttgaatattg gaccaacggt tccatcgatg tatttagaca aacgactgtc 780

tgaagacaag aactacggtt ttagcctctt caatgcgaaa gtcgctgaat gcatggagtg 840

gctaaactca aaggagccta attctgttgt ctatttatca ttcggaagtt tggtgattct 900

aaaagaagat caaatgttgg aactcgctgc gggtctgaaa cagagcggac gtttctttct 960

gtgggttgtg agagagacag agacacacaa acttccaaga aactatgtcg aggaaatcgg 1020

tgaaaaagga cttattgtaa gctggagtcc tcagcttgac gtacttgcac ataaatcaat 1080

cggttgtttc ttgacacact gtggatggaa ctcgacgtta gagggattga gtttgggagt 1140

tccaatgatt ggtatgccac actggactga tcagcccacg aatgctaagt tcatgcagga 1200

tgtgtggaag gttggggtaa gggttaaggc agaaggtgat gggtttgtga gaagagaaga 1260

gattatgaga agtgtggaag aagttatgga gggagagaaa gggaaagaga ttagaaagaa 1320

tgctgagaaa tggaaagtgt tggctcaaga ggcagtttct gaaggaggta gctctgataa 1380

gagcatcaat gagtttgttt ctatgttttg ttgaatgatt taaattgata tgttcaaaag 1440

tacatcgtct tttgcaagtc caattgtaat tcttgttgtt gttgtagtaa taactaataa 1500

tatagtttct catttgtc 1518

<210> 2
<211> 1518
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Ala Cys Ala Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys Thr Ala Gly
1 5 10 15

Ala Gly Thr Cys Ala Gly Thr Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Cys Ala
20 25 30

Ala Gly Ala Thr Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala
35 40 45

Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala
50 55 60

Thr Cys Thr Cys Ala Thr Cys Thr Thr Ala Thr Cys Gly Thr Cys Thr
65 70 75 80

Thr Gly Cys Cys Thr Thr Thr Cys Cys Cys Ala Gly Gly Ala Cys Ala
85 90 95

Ala Gly Gly Cys Cys Ala Cys Ala Thr Ala Ala Cys Thr Cys Cys Ala
100 105 110

Ala Thr Gly Thr Cys Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys Thr Gly Cys Ala
115 120 125

Ala Ala Cys Gly Cys Thr Thr Ala Gly Cys Cys Thr Cys Ala Ala Ala
130 135 140

Ala Gly Gly Thr Cys Thr Thr Ala Ala Gly Cys Thr Cys Ala Cys Thr
145 150 155 160

Cys Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Cys Gly Thr Cys Thr Cys Cys Gly
165 170 175

Ala Cys Ala Ala Ala Cys Cys Cys Thr Cys Thr Cys Cys Thr Cys Cys
180 185 190

Ala Thr Ala Cys Ala Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Cys
195 200 205

Gly Ala Cys Thr Cys Ala Ala Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr
210 215 220

Thr Cys Cys Cys Cys Ala Thr Cys Thr Cys Cys Ala Ala Cys Gly Gly
225 230 235 240

Cys Thr Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Cys Gly Ala Gly
245 250 255

Gly Ala Ala Cys Cys Ala Thr Thr Ala Cys Ala Ala Gly Ala Cys Cys
260 265 270

Thr Cys Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Ala Cys Ala Thr Gly Gly Ala
275 280 285

Ala Ala Gly Ala Gly Thr Ala Gly Ala Ala Ala Cys Cys Ala Gly Cys
290 295 300

Ala Thr Cys Ala Ala Ala Ala Ala Cys Ala Cys Cys Thr Thr Ala Cys
305 310 315 320

Cys Gly Ala Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Thr Gly Ala Ala Gly Ala
325 330 335

Cys Ala Thr Gly Ala Ala Ala Cys Thr Gly Thr Cys Gly Gly Gly Ala
340 345 350

Ala Ala Thr Cys Cys Ala Cys Cys Thr Ala Gly Gly Gly Cys Thr Ala
355 360 365

Thr Cys Gly Thr Gly Thr Ala Cys Gly Ala Cys Thr Cys Cys Ala Cys
370 375 380

Cys Ala Thr Gly Cys Cys Ala Thr Gly Gly Cys Thr Thr Cys Thr Thr
385 390 395 400

Gly Ala Thr Gly Thr Ala Gly Cys Thr Cys Ala Thr Ala Gly Thr Thr
405 410 415

Ala Thr Gly Gly Ala Thr Thr Gly Ala Gly Cys Gly Gly Thr Gly Cys
420 425 430

Cys Gly Thr Gly Thr Thr Thr Thr Thr Cys Ala Cys Gly Cys Ala Ala
435 440 445

Cys Cys Thr Thr Gly Gly Cys Thr Thr Gly Thr Cys Ala Cys Ala Gly
450 455 460

Cys Thr Ala Thr Thr Thr Ala Cys Thr Ala Cys Cys Ala Thr Gly Thr
465 470 475 480

Thr Thr Thr Cys Ala Ala Gly Gly Gly Thr Thr Cys Gly Thr Thr Cys
485 490 495

Thr Cys Thr Gly Thr Ala Cys Cys Gly Thr Cys Thr Ala Cys Ala Ala
500 505 510

Ala Gly Thr Ala Cys Gly Gly Thr Cys Ala Cys Thr Cys Gly Ala Cys
515 520 525

Ala Thr Thr Ala Gly Cys Ala Thr Cys Thr Thr Thr Cys Cys Cys Thr
530 535 540

Thr Cys Gly Thr Thr Cys Cys Cys Gly Ala Thr Gly Cys Thr Gly Ala

545 550 555 560

Cys Thr Gly Cys Ala Ala Ala Thr Gly Ala Thr Thr Thr Gly Cys Cys
565 570 575

Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Cys Thr Cys Thr Gly Cys Gly Ala Ala
580 585 590

Thr Cys Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala Thr Ala Cys Cys Cys Gly Ala
595 600 605

Ala Thr Ala Thr Ala Cys Thr Gly Ala Gly Gly Ala Thr Thr Gly Thr
610 615 620

Gly Gly Thr Gly Gly Ala Thr Cys Ala Gly Cys Thr Cys Thr Cys Ala
625 630 635 640

Ala Ala Cys Ala Thr Thr Gly Ala Thr Cys Gly Ala Gly Thr Cys Gly
645 650 655

Ala Cys Ala Thr Ala Gly Thr Gly Thr Thr Gly Thr Gly Cys Ala Ala
660 665 670

Cys Ala Cys Thr Thr Thr Cys Gly Ala Thr Ala Ala Ala Thr Thr Gly
675 680 685

Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Ala Gly Thr Thr Gly Thr Thr Gly Ala
690 695 700

Ala Ala Thr Gly Gly Gly Thr Cys Cys Ala Ala Ala Gly Cys Thr Thr
705 710 715 720

Gly Thr Gly Gly Cys Cys Ala Gly Thr Cys Thr Thr Gly Ala Ala Thr
725 730 735

Ala Thr Thr Gly Gly Ala Cys Cys Ala Ala Cys Gly Gly Thr Thr Cys
740 745 750

Cys Ala Thr Cys Gly Ala Thr Gly Thr Ala Thr Thr Thr Ala Gly Ala
755 760 765

Cys Ala Ala Ala Cys Gly Ala Cys Thr Gly Thr Cys Thr Gly Ala Ala
770 775 780

```
Gly Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys Gly Gly Thr Thr
785                 790                 795                 800

Thr Thr Ala Gly Cys Cys Thr Cys Thr Thr Cys Ala Ala Thr Gly Cys
                805                 810                 815

Gly Ala Ala Ala Gly Thr Cys Gly Cys Thr Gly Ala Ala Thr Gly Cys
            820                 825                 830

Ala Thr Gly Gly Ala Gly Thr Gly Gly Cys Thr Ala Ala Ala Cys Thr
        835                 840                 845

Cys Ala Ala Ala Gly Gly Ala Gly Cys Cys Thr Ala Ala Thr Thr Cys
    850                 855                 860

Thr Gly Thr Thr Gly Thr Cys Thr Ala Thr Thr Thr Ala Thr Cys Ala
865                 870                 875                 880

Thr Thr Cys Gly Gly Ala Ala Gly Thr Thr Thr Gly Gly Thr Gly Ala
                885                 890                 895

Thr Thr Cys Thr Ala Ala Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Thr Cys Ala
            900                 905                 910

Ala Ala Thr Gly Thr Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Cys Gly Cys Thr
        915                 920                 925

Gly Cys Gly Gly Gly Thr Cys Thr Gly Ala Ala Ala Cys Ala Gly Ala
    930                 935                 940

Gly Cys Gly Gly Ala Cys Gly Thr Thr Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr
945                 950                 955                 960

Gly Thr Gly Gly Gly Thr Thr Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
                965                 970                 975

Ala Cys Ala Gly Ala Gly Ala Cys Ala Cys Ala Cys Ala Ala Ala Cys
            980                 985                 990

Thr Thr Cys Cys Ala Ala Gly Ala Ala Ala Cys Thr Ala Thr Gly Thr
        995                1000                1005

Cys Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Thr Cys Gly Gly Thr Gly Ala Ala
   1010                1015                1020
```

Ala Ala Ala Gly Gly Ala Cys Thr Thr Ala Thr Thr Gly Thr Ala Ala
1025 1030 1035 1040

Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Thr Cys Cys Thr Cys Ala Gly Cys Thr
1045 1050 1055

Thr Gly Ala Cys Gly Thr Ala Cys Thr Thr Gly Cys Ala Cys Ala Thr
1060 1065 1070

Ala Ala Ala Thr Cys Ala Ala Thr Cys Gly Gly Thr Thr Gly Thr Thr
1075 1080 1085

Thr Cys Thr Thr Gly Ala Cys Ala Cys Ala Cys Thr Gly Thr Gly Gly
1090 1095 1100

Ala Thr Gly Gly Ala Ala Cys Thr Cys Gly Ala Cys Gly Thr Thr Ala
1105 1110 1115 1120

Gly Ala Gly Gly Gly Ala Thr Thr Gly Ala Gly Thr Thr Thr Gly Gly
1125 1130 1135

Gly Ala Gly Thr Thr Cys Cys Ala Ala Thr Gly Ala Thr Thr Gly Gly
1140 1145 1150

Thr Ala Thr Gly Cys Cys Ala Cys Ala Cys Thr Gly Gly Ala Cys Thr
1155 1160 1165

Gly Ala Thr Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala Cys Gly Ala Ala Thr Gly
1170 1175 1180

Cys Thr Ala Ala Gly Thr Thr Cys Ala Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala
1185 1190 1195 1200

Thr Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ala Ala Gly Gly Thr Thr Gly Gly Gly
1205 1210 1215

Gly Thr Ala Ala Gly Gly Gly Thr Thr Ala Ala Gly Gly Cys Ala Gly
1220 1225 1230

Ala Ala Gly Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Gly Thr Thr Thr Gly Thr
1235 1240 1245

Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ala Gly Ala Thr Thr

1250 1255 1260

Ala Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Thr Gly Thr Gly Gly Ala Ala Gly
1265 1270 1275 1280

Ala Ala Gly Thr Thr Ala Thr Gly Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala
1285 1290 1295

Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala Thr Thr
1300 1305 1310

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Thr Gly Cys Thr Gly Ala Gly Ala
1315 1320 1325

Ala Ala Thr Gly Gly Ala Ala Ala Gly Thr Gly Thr Thr Gly Gly Cys
1330 1335 1340

Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Gly Cys Ala Gly Thr Thr Thr Cys Thr
1345 1350 1355 1360

Gly Ala Ala Gly Gly Ala Gly Gly Thr Ala Gly Cys Thr Cys Thr Gly
1365 1370 1375

Ala Thr Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Thr Cys Ala Ala Thr Gly Ala
1380 1385 1390

Gly Thr Thr Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Ala Thr Gly Thr Thr Thr
1395 1400 1405

Thr Gly Thr Thr Gly Ala Ala Thr Gly Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala
1410 1415 1420

Thr Thr Gly Ala Thr Ala Thr Gly Thr Thr Cys Ala Ala Ala Ala Gly
1425 1430 1435 1440

Thr Ala Cys Ala Thr Cys Gly Thr Cys Thr Thr Thr Thr Gly Cys Ala
1445 1450 1455

Ala Gly Thr Cys Cys Ala Ala Thr Thr Gly Thr Ala Ala Thr Thr Cys
1460 1465 1470

Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Ala Gly Thr
1475 1480 1485

```
Ala Ala Thr Ala Ala Cys Thr Ala Ala Thr Ala Ala Thr Ala Thr Ala
   1490                1495                1500

Gly Thr Thr Thr Cys Thr Cys Ala Thr Thr Thr Gly Thr Cys
1505                1510                1515
```