(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0027489
(43) 공개일자 2010년03월11일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0086426
(22) 출원일자 2008년09월02일
심사청구일자 2008년09월02일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
박영두
경기 용인시 수지구 성복동 성동마을 수지자이1차 아파트 108동 702호
이기호
부산 동래구 온천1동 153-8 SK 허브스카이 102동 2206호
(74) 대리인
특허법인다울

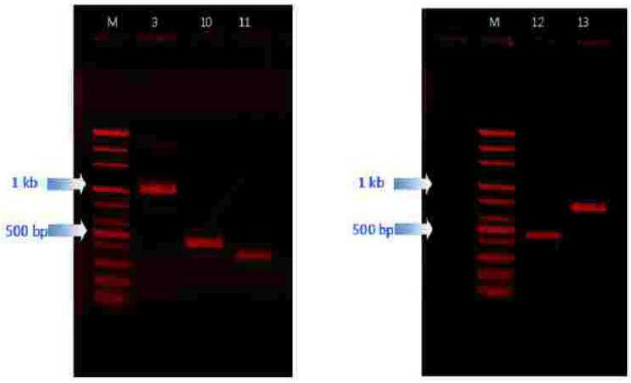
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 배추의 방어기작에 관여하는 에피티오스페시피어 모디파이어를 코딩하는 유전자

(57) 요 약

본 발명은 배추로부터 분리해 낸 식물의 외부 환경에 대한 방어 기작에 관여된 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate)를 생성하는 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 분리에 관한 것으로, 이를 이용하여 과발현 벡터(over-expression vector)를 만들어 식물 형질전환 시, 항암 물질을 많이 보유하는 기능성 배추를 제공 할 수 있는 효과가 있으며, 재배 시 농약의 사용을 줄일 수 있어, 재배 비용의 감소 및 환경오염 감소의 효과가 있다.

대 표 도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20070301034037
부처명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린 21사업
연구과제명	배추 삽입돌연변이 집단의 분석 및 유용 유전자를 이용한 신품종 육성
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2007년 4월 1일 ~ 2010년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 10에 기재된 프라이머 세트를 이용하여 TAIL PCR 과정을 거쳐 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)의 전체 유전자의 gDNA 염기서열을 분리하는 단계를 포함하는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자를 코딩하는 유전자를 분리하는 방법.

청구항 2

서열번호 11과 12에 기재된 프라이머 세트를 이용하여 RT-PCR 과정을 거쳐 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)의 전체 유전자를 분리하는 단계를 포함하는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자를 코딩하는 유전자를 분리하는 방법.

청구항 3

서열번호 13의 gDNA 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자.

청구항 4

서열번호 14의 cDNA 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자.

청구항 5

서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 서열번호 13의 gDNA 염기서열에서 엑손(exon)과 인트론(intron)의 위치가

<64 5'UTR

64-328 Exon

329-461 Intron

462-585 Exon

586-798 Intron

799-999 Exon

1000-1094 Intron

1095-1351 Exon

1352-1505 Intron

1506-1829 Exon

인 것을 특징으로 하는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 방어 기작에 관여하는 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물의 외부 환경 및 해충들로 부터 저항하기 위하여, 여러 가지의 2차 대사산물을 생성해 낸다. 그 중 글루코시놀레이트(glucosinolates)는 마이로시네이즈(myrosinase) 효소와 함께 식물의 방어 기작에서 가장 큰 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Kliebenstein, 2004).

[0003] 그러나 이런 글루코시놀레이트(glucosinolares)는 효소적 가수분해가 되기 전까지는 어떠한 생물학적 작용을 하지 못한다. 식물체가 외부적 환경으로 부터 손상을 받거나, 혹은 해충으로 부터 공격을 받게 되면 내제된 마이로시네이즈(Myrosinase)에 의하여 글루코시놀레이트(glucosinolates)가 분해되면서 방어 기작이 작동하게 되는 것이다(Chew, 1988; Borek 등, 1998; Halkier, 1999; Lambrix 등, 2001). 이때 만들어지는 2차 대사물이 잠재적으로 항궤양성과 항발암물질성을 가지는 니트릴(Nitrile), 이소시아네이트(isothiocyanate), 티오시아네이트(thiocyanate)로 합성되는 것이다(Lambrix 등, 2001). 특히 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate)와 이것으로 인해 합성되는 설퍼라판 (sulforaphane)이라고도 불리는 4-메틸썰페닐부틸 글루코시놀레이트 (4-methylsulfinylbutyl glucosinolate)는 인간의 항암물질로 효과를 인정받고 있으며, 또한 인간의 영양 물질로 많은 연구가 진행되고 있는 물질이다(Zhang 등, 1994; Barcelo 등, 1998; Fahey 등, 2001).

[0004] 이와는 대조적으로 니트릴(Nitrile)은 4-메틸썰페닐알킬 글루코시놀레이트 (4-methylsulfinylalkyl glucosinolate)로 합성이 되는 데, 이는 인간에게 있어서는 항암 물질로의 효과가 적은 것으로 보고되어 있다(Zhang 등, 2006). 즉 글루코시놀레이트(glucosinolates)의 생화학적인 기작은 가수분해 과정으로 인한 구조적인 특이성이 식물 방어기작의 특이적 효과로 나타나게 되는 것이다.

[0005] 배추과 식물에서의 글루코시놀레이트(glucosinolates)의 마이로시네이즈(myrosinase)로 가수분해된 후 니트릴(Nitrile)으로 변할지 혹은 이소시아네이트(isothiocyanate)로 변할지 결정하는데 기여하는 대표적인 효소로 에피티오스페시피어 프로테인(Epithiospecifier Protein, ESP)과 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier, ESM)가 있다.

[0006] ESP는 알킬 글루코시놀레이트(alkenyl glucosinolate) 가수분해가 진행되는 동안 글루코시놀레이트(glucosinolates) 구조 말단의 알킨기(alkene residue)에 황을 전달하면서 에피티오니트릴(epithionitrile)을 형성한다(Lambrix, 2001). 그러나 이런 ESP에 의한 니트릴(nitrile)의 형성은 ESM에 의하여 억제되고, ESM은 니트릴(nitrile) 대신 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate)가 많이 합성되도록 촉진 한다(Burow 등, 2006; Lambrix 등, 2001; Zhang 등, 2006).

[0007] 즉, 식물이 해충에 의한 공격이나, 상처 유기 시 식물 방어기작으로 미로시나아제(myrosinase)가 활성화 되어 글루코시놀레이트(glucosinolates)는 효소적 가수분해한다. 분해된 글루코시놀레이트는 불안정한 상태인 어클리콘으로 변하고, 이 물질은 보통의 상태에서는 에피티오스페시피어 단백질(epithiospecifier protein; ESP)이 작용하면서 저독성 물질인 니트릴 또는 에피티오니트릴로 바뀌게 되지만, 방어 시스템이 작동할 때에는 에피티로스페시피어 모디파이어 1(epithiospecifier modifier 1; ESM1)이 작동하여 ESP를 억제하고 이소티오시아네이트의 함량을 높여 주게 된다(Meike 외, 2008). 이후 증가된 이소시아네이트는 글루타치온-S-트랜스퍼라아제(glutathione-S-transferase; GST)에 의하여 방어 시스템의 핵심 물질인 글루타치온을 만들게 된다.

[0008] 특히 글루코시놀레이트의 가수분해 산물에 의한 식물의 방어 기작은 이러한 ESP와 ESM이 핵심적으로 작용하며, ESP의 넉아웃(Knock-out)과 ESM의 과발현(over-expression)이 배추 자벌래(*Trichoplusia ni*)에 의한 피해 정도로 실험한 결과, 잎의 피해가 대조군에 비하여 약 6배 정도 적게 피해 받은 것으로 확인되었다(Zhang 등, 2006).

[0009] 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 한국에서 소비되고 있는 4대 작물 중 하나로 특히 김치의 주재료로써 한국인의 식생활 속에서 빠질 수 없는 식품이다.

[0010] 특히 배추를 포함한 브로콜리(*Brassica oleracea*), 워터크레스(*Roripa nasturtium*), 유채(*Brassica napus*)와 같은 가식성 배추과(*Brassica*) 채소들은 유기 이소티오시아네이트(oranic isothiocyanates) 자연적인 합성이 매우 뛰어난 식물들이다 (Conaway 등, 2002). 이런 이소티오시아네이트(isothiocyanates)는 항세균성, 항진균성,

항병충해성 등의 작용을 가지는 대표적인 기능성 물질로 알려져 있으며, 이들의 섭취가 낮을 경우 발암 위험률이 높아질 수 있다는 보고가 있다(Olsen 등, 1991; Mehta 등, 1995; Soledade 등, 1998; Morimitsu, 2000; Han 등, 2007).

[0011] 특히 배추에 존재하는 이소티오시아네이트(isothiocyanates) 형태인 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate)는 사람의 백혈병 세포주인 HL-60 세포주에 대한 가한 세포독성 및 세포자살(apoptosis)를 유도한다고 보고되어 인간에게 효과적으로 작용하는 항암물질로 보고 되어있다(Adesida 등, 1996; Conaway 등, 2002; Han 등, 2007).

[0012] 이와 같은 항암물질을 이용한 기능성 작물의 육성은 기존에 유전자 전환 동물 또는 발효나 생물 반응기를 이용에 비하여 현저히 낮은 생산 원가를 가지고 유용한 항암물질을 대량 생산할 수 있으며, 식물 소재의 재배, 수확 및 처기 기술의 전문지식은 이미 확보되어 있기 때문에 그 지속 발전성이 크다고 할 수 있다. 또한 식물은 프리온(prion)이나 바이론(Viron)과 같은 인간 병원체를 가지고 있지 않기 때문에 최종 제품의 오염을 방지하여 기능성 식품으로써의 안정성을 기대할 수 있다.

[0013] 농약은 각종 병해충으로부터 작물을 보호하고 그 생산성을 향상시킴에 그 목적이 있다고 할 수 있다. 그러나 한국 농업의 고령화 및 근시안적인 대처로 인하여, 증산위주의 고투입 농업으로 농업환경이 악화되어 지속가능한 농업생산을 위협하고 있는 현실이다. 이는 단순히 작물에 유해한 병해충만을 제거하기만 하면 된다는 사고방식과 병충해와 작물간의 관계를 기주와 숙주로 단순화하던 시각으로 작물보호를 위해 농약을 과량 사용함에 따라 토양미생물 및 천적감소 등 생태계 파괴 뿐 만이 아니라, 수질오염 및 농산물의 농약잔류 문제가 야기되게 되었다. 1970년대 이후로 농약 사용의 절대량은 감소하고 있지만, 경작지 단위 면적당(kg/ha) 사용량은 유의성 있게 감소하지 않고 있다(농림부, 농림수산통계연보; Lee 등, 2002).

[0014] 특히 최근에 문제시 되는 잔류 농약으로 인한 소비자들의 불안감은 날로 상승하여, 한국 소비자의 50.1%가 국내 농산물의 농약오염에 대하여 불안해 한다는 보고가 있다(통계청, 사회통계조사 보고서, 2001). 또한 잔류 농약에 의한 농산물의 해외 수출의 규제로 인한 피해는 급증하고 있어 농약 사용의 감소가 절실히 요구되는 실정이다.

[0015] 이에 따라 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate)의 다량 합성을 유도하는 기능성 배추의 육성은 안정적인 항암물질을 다량 생산 및 공급 가능하게 하는 식물 분자 농장 운영이 가능하며, 또한 배추 재배 시 외부 환경 및 병해충으로 부터 강한 저항력을 가지게 되어, 재배 시 농약의 사용을 줄일 수 있게 된다. 그 결과 재배 비용의 감소 및 환경오염 감소의 효과를 도모할 수 있다. 그러나 배추에서의 중요 방어 기작에 속하는 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate) 합성에 관여하는 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩(coding)하는 유전자에 관해서는 보고된 바 없다.

[0016] 본 발명자들은 배추 유래의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자를 규명하고, 이를 이용하여 항암물질인 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate)를 다량 생성하는 기능성 배추를 제공하고, 또한 병충해로부터 강한 저항력으로 농약 사용량을 감소 및 환경 보전 효과를 증진 할 수 있는 유용한 배추 품종 육성을 도모하고자 한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0017] 따라서 본 발명의 목적은, 한국의 4대 채소 가운데 하나인 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 방어기작과 관련 있으며, 인간에 유용한 항암물질인 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate) 합성과 관련이 있는 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자를 분리하여 그 염기서열을 제공하는 것이다.

[0018] 또한 본 발명의 목적은, 배추의 메에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자를 크로닝 할 수 있는 프라이머 및 이를 이용하여 배추로부터 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0019] 본 발명은 서열번호 13의 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자의 gDNA의 서열 및 엑손(exon)과 인트론(Intron)

부분의 위치를 제공한다.

[0020] 본 발명은 서열번호 14의 염기서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0021] 본 발명은 서열번호 15의 아미노산 서열을 갖는, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0022] 또한 본 발명은 상기 유전자를 크로닝 할 수 있는 프라이머 및 이를 이용하여 배추로부터 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 분리하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명에서는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자를 분리하기 위해, 우선 프라이머를 작성하고, 상기 프라이머를 이용하여 RT-PCR 과정 및 TAIL PCR 방법을 이용한 gDNA walking 방식을 거쳐 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 전체 유전자의 염기서열을 밝혔다.

[0024] 본 발명은, 기존에 발표되어 있는 채소작물의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 염기서열들의 상동성을 기초로, 배추의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자를 클로닝할 수 있는 프라이머를 작성하는 단계; 상기 프라이머를 이용하여 Liu와 Whittier(1995)에 의해 보고된 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 방법을 이용한 gDNA walking PCR 방법으로 배추로부터 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)의 gDNA 염기 서열의 단편을 얻는 단계; 확인된 gDNA 염기서열을 바탕으로 RT-PCR 방법을 이용한 전체 유전자를 얻는 단계로 이루어진다.

[0025] 본 발명에 사용된 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 DNA 및 RNA 분리에 사용하였다. 본 발명의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)의 유전자를 분리하는 과정은 다음과 같다.

[0026] 첫째, 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자 조사는 하기와 같이 수행하였다.

[0027] (1) NCBI GenBank를 통해 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 시퀀스를 수집한다.

[0028] (2) 수집된 유전자 시퀀스 중 채소작물에 속하는 작물들을 우선 대상으로 하여 코딩 지역만을 분리한 뒤 유전자 코딩 지역만을 정렬(alignment)한다.

[0029] (3) 정렬(alignment)한 결과 중 상동성 빈도가 높은 곳을 택하여 gDNA walking 용 특이 프라이머를 작성한다. 상기와 같이 작성된 프라이머 세트는 프라이머 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10에 해당한다.

[0030] (4) TAIL PCR 방법으로 확인된 gDNA 염기 서열 정보를 바탕으로 완전장의 유전자를 분리할 수 있는 프라이머 세트를 작성한다. 상기와 같이 작성된 프라이머 세트는 프라이머 11, 12에 해당한다.

[0031] 둘째, 배추로부터 DNA의 분리는 McCouch 등(1988)에 의해 제시된 gDNA 분리 방법을 이용하여 하기와 같이 수행하였다.

[0032] (1) 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 잎을 액체질소를 이용하여 파쇄 한다.

[0033] (2) 분리 용액(Extraction buffer; 0.5M NaCl, 0.1M Tris-HCl/pH8.0, 1.25% SDS)을 첨가하고 잘 섞은 후 65에 30분 동안 가열한다.

[0034] (3) 페놀(phenol)과 클로로폼(cloroform)을 1:1 비율로 처리한 후 18 13,000rpm으로 18분 동안 원심분리 한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮긴다.

[0035] (4) 상등액에 클로로폼(cloroform)과 이소아밀 알콜(isoamyl alcohol)을 24:1 비율로 처리 후 18 13,000rpm으로 18분 동안 원심분리 한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮긴다.

[0036] (5) 상등액에 이소프로필 알콜(isopropyl alcohol)를 처리 후 뭉쳐진 gDNA를 멸균된 유리막대를 이용하여 건진 후 70% EtOH로 소독한다.

[0037] (6) 진공 상태로 충분히 말린 후 1X TE 버퍼(buffer)를 이용하여 녹인 후 사용하였다.

[0038] 셋째, 배추로부터 RNA의 분리는 GibcoBRL회사에서 제공된 트리졸(Trizol) 시약을 사용하여 하기와 같이 수행하

였다.

[0039] (1) 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 잎을 액체질소를 이용하여 파쇄 한다.

[0040] (2) 1mL 트리졸(Trizol) 용액을 첨가하고 잘 섞은 후 5분 동안 상온에 둔다.

[0041] (3) 그것에 200㎕의 클로로포름(chloroform)을 넣고 섞은 다음 다시 4에서 13,000rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮긴다.

[0042] (4) 이소프로페놀 (isopropanol)을 500㎕를 넣고 13,000rpm으로 15분간 원심 분리하여 침전시킨다.

[0043] (5) 그 후, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시킨 후 DEPC 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용한다.

[0044] 넷째, *E.coli* DH5a의 형질전환은 하기와 같이 수행하였다.

[0045] (1) 대장균 DH5a를 LB 50mL에 접종시켜 37에서 OD_{570}= 0.375~0.400이 되도록 배양한다.

[0046] (2) 균주배양액을 3000rpm에서 10분간 원심분리하고 얻어진 침전물은 0.1M $CaCl_2$ 용액으로 풀어준 후 30분간 얼음에 둔다.

[0047] (3) 3000rpm에서 7분간 원심분리한 후 0.1M $CaCl_2$ 에 침전물을 녹인다.

[0048] (4) 재조합 플라스미드를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42에서 90초간 열 충격을 준다.

[0049] (5) 10분간 얼음에 두었다가 LB 배지 700㎕를 첨가하여 37에서 1시간 진탕배양한다.

[0050] (6) 배양액을 12000rpm으로 수초간 원심분리한 후 100㎕만 남기고 상등액을 제거하였으며 그 상등액으로 침전물을 녹인다.

[0051] (7) 엠피실린(Ampicillin) (50mg/L), X-gal (200mg/L in N-N dimethylformamide) IPTG (200mg/L)가 첨가된 고체 LB 배지에 전개하여 37에서 12시간 배양한다.

[0052] (8) 고체배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질 전환된 것을 선발하여 배양한다.

[0053] (9) 재조합 플라스미드 DNA를 분리, 정제하여 PCR과 제한 효소처리로 벡터 내 유전자 삽입여부를 확인한다.

[0054] 다섯째, 플라스미드 DNA의 분리는 하기와 같이 수행하였다.

[0055] (1) 항생제가 첨가된 LB배지 3mL에 콜로니를 감염시킨 후 37에서 12시간 배양한다.

[0056] (2) 콜로니가 진탕배양된 배양액을 4에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리한다.

[0057] (3) Solution I(200㎕/mL)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초간 실행한다.

[0058] (4) Solution II(200㎕/mL)를 첨가하여 조심스럽게 섞은 후 실온에서 5분간 방치한다.

[0059] (5) Solution III(200㎕/mL)를 첨가하여 잘 섞은 후 얼음에서 10분간 둔 뒤 12000rpm, 4에서 10분간 원심분리한다.

[0060] (6) 이에서 얻어진 상등액을 취하여 1/10양의 NaOAC를 첨가한 후 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20에서 2시간 침전시킨 후 원심 분리하여 침전물을 70% 에탄올로 세척한 후 멸균 증류수에 녹인 후 사용한다.

[0061] 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)을 코딩하는 유전자의 gDNA를 클로닝 할 수 있는 프라이머는 프라이머 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10로 나타내었다.

[0062] 또한 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)을 코딩하는 유전자를 클로닝 할 수 있는 프라이머는 프라이머 11, 12로 나타내었다.

[0063] 또한 상기 프라이머를 이용하여 얻어진 배추의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자를 코딩하는 유전자의 전체 gDNA 염기서열은 서열번호 13에 기재되었으며, cDNA 염기 서열은 서열번호 14에 기재하였다. 이를 바탕으로 한 아미노산 서열은 서열번호 15에 기재되었다.

[0064] 또한 확인된 배추의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 gDNA 및 cDNA 염기서열을 바탕으로 엑손(exon)과 인트론(intron)의 정보를 서열번호 16에 기재하였다.

효 과

[0065] 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)로부터 분리해낸 식물의 방어 기작과 관련이 있으며, 항암 물질인 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate) 합성에 관여하는 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 분리에 관한 것으로, 이를 이용하여 과발현 벡터(over-expression vector)를 만들어 식물 형질전환 시, 항암물질인 페닐에틸 이소시오시아네이트(phenylethyl isothiocyanate)를 다량 생성하는 기능성 배추를 제공하고, 또한 병충해로부터 강한 저항력으로 농약 사용량을 감소 및 환경 보전 효과를 증진 할 수 있어, 식물육종산업상 매우 유용한 발명이라 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0066] 이하에서는, 본 발명의 구성을 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

[0067] **실시예 1: 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)의 유전자 효소가 위치한 gDNA 염기서열을 분리하기 위한 프라이머의 작성**

[0068] 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 공통된 부분을 찾기 위하여 기존에 발표되어 있는 작물별 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)의 유전자를 "National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank"에서 검색하였다. 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 Entrez program을 사용하였다. 검색방법으로는 유전자명을 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 검색어로 선정하였다.

[0069] 수집된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자 가운데, 같은 배추과 식물인 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 염기서열을 선발, 염기서열의 상동성을 많이 보이는 부분을 BLAST program으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 gDNA walking 프라이머를 제작하였다. 작성된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

[0070] <표 1>

[0071]

프라이머	염기서열
eSP1 (서열번호 1)	5'-CGT TAG TAT TGG CTC CAT AGA GAA G-3'
eSP2 (서열번호 2)	5'-CGT CCG TCA AAG AAG AAG TAA GAT-3'
eSP3 (서열번호 3)	5'-CGT TAG CCA TTC CAC AAC CA-3'
eSP4 (서열번호 4)	5'-AGC CAT TCC ACA ACC ATA CG-3'
eSP5 (서열번호 5)	5'-TGA GCA GAA GCA GAA GCA GTG-3'
eSP6 (서열번호 6)	5'-GTT CAC TTG TTG ATT CAG TGT CAT C-3'

[0072] **실시예 2: 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)의 유전자 효소를 분리하기 위한 gDNA walking**

[0073] 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 공통된 부분을 바탕으로 작성된 특이적 primer를 바탕으로 gDNA walking을 실시하였다.

[0074] PCR 반응은 1×PCR buffer, 200 μM dNTPs, genomic DNA(20 ng), 1 unit EX taq™ DNA polymerase(TaKaRa, Japan), 0.2 μM long gene-specific primer(SP) 1, 3.0 μM arbitrary degenerate(AD) primer를 첨가하여 실시하며, 2차 반응은 eSP1 대신 eSP2로 바꾸어 1×PCR buffer, 200 μM dNTPs, genomic DNA(20 ng), 1 unit EX taqTM DNA polymerase, 0.2 μM SP 2, 3.0 μM AD primer 반응물을 만들어 실시하며, 모든 반응은 1/100 희석하여 다음 반응의 template로 이용하였다. 최초 PCR 반응은 92 3분간 처리하여 초기 변성을 충분히 시킨 후, 94 30초, 64 1분, 72 2분 처리를 5 반복(cycle) 하였다. 이후 94 30초 처리 후 25에서 72까지 2분에 걸쳐 천천히 온도를 올려 주어 프라이머의 결합율을 상승시킨 후, 72 2분간 처리하였다.

[0075] 이후 TAIL 반복(cycle)로 높은 결합(annealing)으로 65 2번(94 30초, 65 1분, 72 2분), 낮은 결합으로 42 1번(94 30초, 42 1분, 72 2분)으로 15 반복을 실시하였다. 이후 최종 합성으로 72 5분을 처리하여 반응을 종료 시켰다. 2차 반응은 위의 TAIL 반복을 12 반복(cycle) 실시하였다. 3차 반응은 94 30초, 42 1분, 72 2분 처리를 40 반복(cycle) 하였다. 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하고 삽입된 자리에 근접한 T7, SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

[0076] 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 크로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 이루어졌다. 분석된 결과를 중심으로 2차 gDNA walking 프라이머를 제작하였다. 작성된 프라이머는 하기 표 2과 같다. 작성된 프라이머를 이용하여 PCR 후 표 2의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하고 삽입된 자리에 근접한 T7, SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

[0077] <표 2>

[0078]

프라이머	염기서열
UTR-F (서열번호 7)	5'-ACT GAA CGT CTG TGA AGT TCA C-3'
UTR-R (서열번호 8)	5'-CTA ATA ATA AGC TGA TAA ATC GAG GT-3'
Ep-B-F (서열번호 9)	5'-CCA AGT TTA ATC CCA CTG CTT CTG C-3'
Ep-B-R (서열번호 10)	5'-CTA ATA ATA AGC TGA TAA ATC GAG GT-3'

[0079] **실시예 3: 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)의 유전자의 gDNA 염기서열의 확인**

[0080] 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 크로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 이루어졌다. 그 결과 EP-B-F(서열번호 9)와 Ep-B-R(서열번호 10) 프라이머로 증폭된 619bp 산물의 염기서열, UTR-F(서열번호 7)와 eSP5(서열번호 5) 프라이머로 증폭된 630bp, EP-B-F(서열번호 9)와 UTR-R(서열번호 8) 프라이머로 증폭된 913bp의 단편을 바탕으로 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 전체 gDNA 연기서열을 확인하였으며, 이를 BlastN으로 분석한 결과, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자와 상동성을 보였으며, 특히 애기장대의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자와는 79%의 높은 상동성을 보였다. 확인된 염기서열을 바탕으로 배추로부터 분리된 전체 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 전체 gDNA 염기서열로 결정, 서열번호 13에 그 염기서열을 제시하였다.

[0081] **실시예 4: 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)의 유전자 효소를 분리하기 위한 프라이머의 작성**

[0082] 확인된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 gDNA 염기 서열을 바탕으로 전체 유전자를 분리하기 위한 프라이머를 제작하였다. 작성된 프라이머는 하기 표 3과 같다.

[0083] <표 3>

[0084]

프라이머	염기서열
ESM-RTf (서열번호 11)	5'-ATG GCA TGC AAG TTT AGT TTT-3'
ESM-RTr (서열번호 12)	5'-CTA ATA ATA AGC TGA TAA ATC GAG GT-3'

[0085] **실시예 5: 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자 의 분리**

[0086] 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 분리는 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용, cDNA를 합성한 뒤 작성한 프라이머로 PCR하여 분리하였다. cDNA합성 프로그램 조건은 1의 RNA를 oligo dT primer와 70에서 두어 RNA 이차구조를 제거한 뒤 45에

서 30분간 역전사 시키고 그 사용된 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 94에서 5분간 두었다.

[0087] 그 후 합성된 cDNA 1 마이크로그램을 사용, 작성한 프라이머와 태크 중합효소(tag polymerase)로 PCR하였는데 그 프로그램은 94에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94에서 30초, 56에서 30초, 72에서 2분으로 40 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72에서 10분간 최종 연장시킨 후 4를 유지하여 전체 반응을 종료하였다. 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하고 삽입된 자리에 근접한 T7, SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

[0088] **실시예 6: 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 전체의 확인**

[0089] 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 크로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 이루어졌다. 그 결과 ESM-RTf(서열번호 11)와 ESM-RTr(서열번호 12) 프라이머로 증폭된 1176bp 산물의 염기서열과 아미노산 서열을 분석한 결과, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자와 상동성을 보였으며, 특히 애기장대의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자와는 80%의 높은 상동성을 보였다.

[0090] 즉, RNA를 대상으로 ESM-RTf와 ESM-RTr 프라이머를 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 배추의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 전체 유전자가 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다. 확인된 염기 서열을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정한 후, 그것이 배추로부터 분리된 전체 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자로 결정, 서열번호 14에 그 염기서열을 제시하고 서열번호 15에 아미노산 서열을 제시하였다.

[0091] 이후 확인된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자의 gDNA 염기서열 (서열번호 13)과 cDNA 염기서열 (서열번호 14)를 비교하여 배추의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier) 유전자 내부의 엑손(exon)과 인트론(intron) 영역을 결정하고, 이것을 서열번호 16에 제시하였다.

도면의 간단한 설명

[0092] 도 1a의 사진은 TAIL PCR의 과정에 의해 배추로부터 증폭된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자의 gDNA 단편을 전기영동한 사진이다.

[0093] 도 1b의 사진은 배추의 TAIL PCR의 과정에 의하여 확인된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자의 gDNA 단편을 바탕으로 제작한 프라이머로 PCR 후 전기영동한 사진이다.

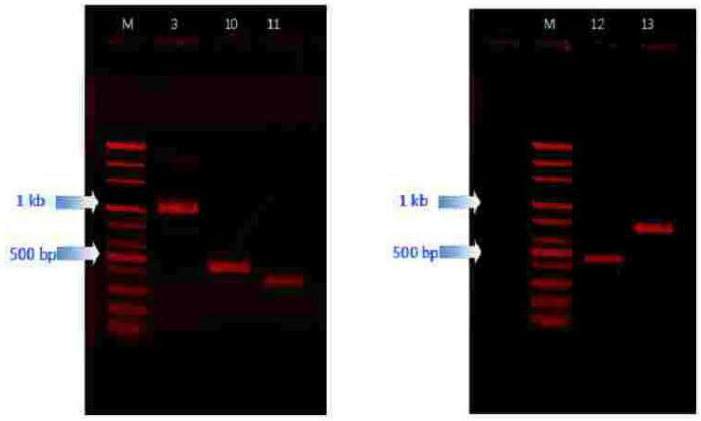
[0094] 도 1c의 사진은 각 ESM-RTf와 ESM-RTr을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

[0095] 도 1d의 사진은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX program을 사용하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 시퀀스간에 상동성 비교 결과이다.

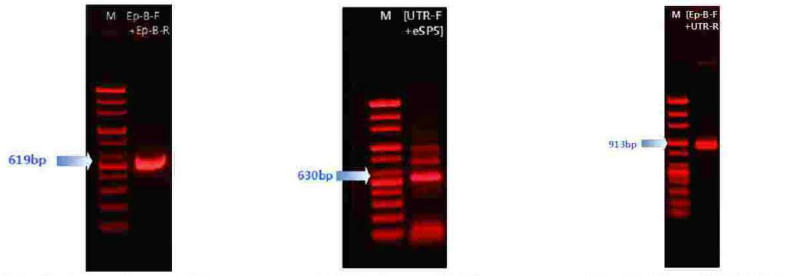
[0096] 도 2a는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 에피티오스페시피어 모디파이어(Epithiospecier modier)를 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 시퀀스 결과이다.

도면

도면1a

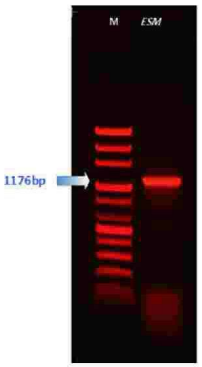


도면1b



[Ep-B-F ~ Ep-B-R] [UTR-F ~ eSP5] [Ep-B-F ~ UTR-R]

도면1c



도면1d

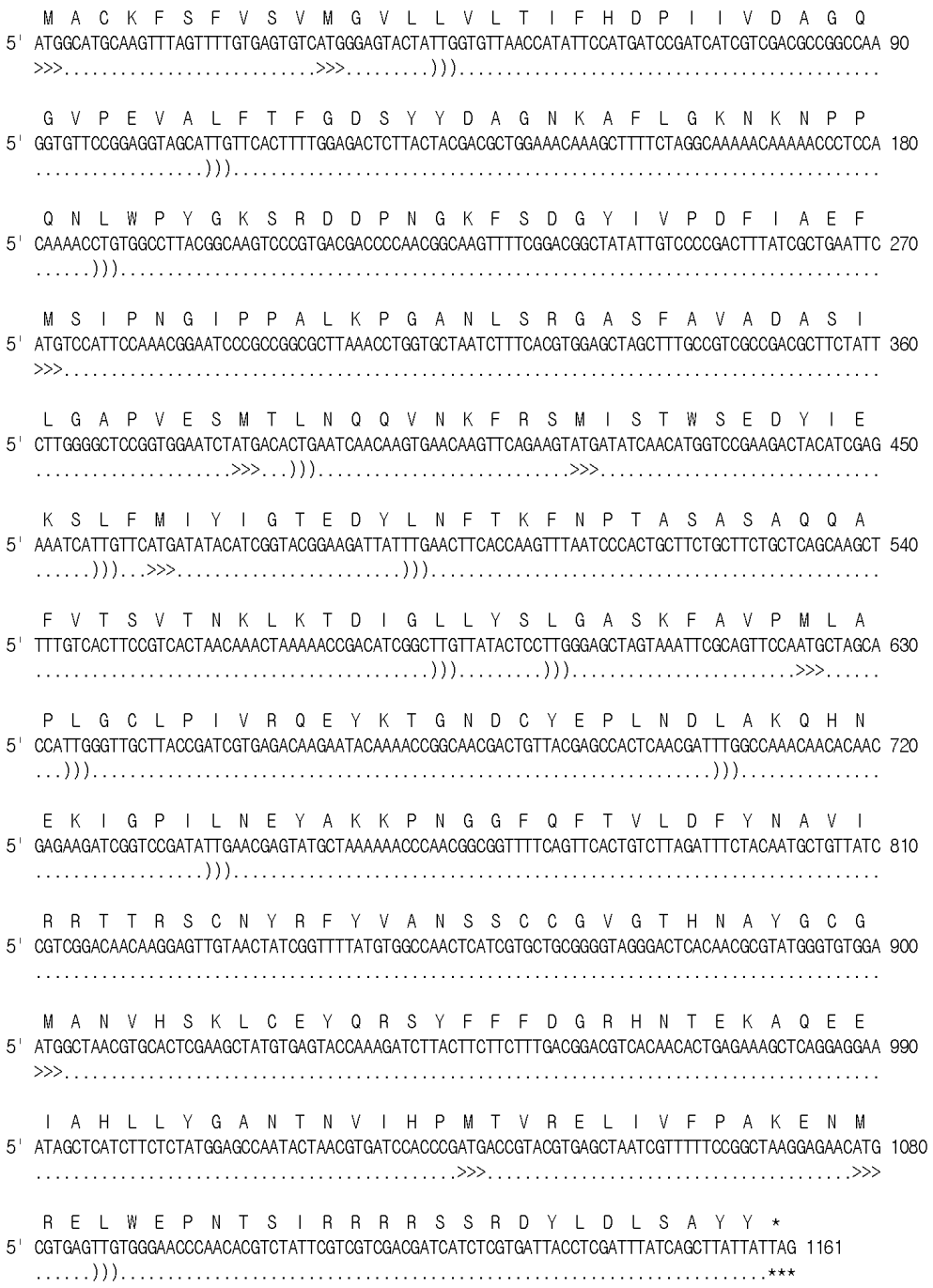


GENE ID: 820639 ESM1 | ESM1 (EPITHIOSPECIFIER MODIFIER 1); carboxylesterase [Arabidopsis thaliana] (10 or fewer PubMed links)

Score = 598 bits (1541), Expect = 3e-169
Identities = 303/392 (77%), Positives = 334/392 (85%), Gaps = 6/392 (1%)
Frame = +1

```
Query  1     MACKFSFVSVMGVLLVLTIFHDPIIVDAGQGVPEVALFTFGDSYYDAGNKAFLGKNKNPP  180
             MA    + VSV+GVLLVLTIFH+PIIV AG+GVP VALFTFGDSYYDAGNK FL + K+ P
Sbjct  1     MADNLMLVSVLGVLLVLTIFHNPIIVYAGEGVPNVALFTFGDSYYDAGNKVFLSQRKDLP  60

Query  181   QNLWPYGKSRDDPNGKFSDGYIVPDFIAEFMSIPNGI-PPALKPGANLSRGASFAVADAS  357
             Q  WPYGKSRD PNGKFSDG+IVPDFIA+F+SIPNG+ PP LKPG ++SRG SFAVADAS
Sbjct  61    QTYWPYGKSRDYPNGKFSDGHIVPDFIADFISIPNGVLPPVLKPGVDISRGVSFAVADAS  120

Query  358   ILGAFVESMTLNQQVNKFRSMISTWSEDYIEKSLFMIYIGTEDYLNFTKFNPTASASAQQ  537
             ILGAFVESMTLNQQV KF++M S W++ YIEKSLFMIYIGTEDYLNFTK NP A ASAQQ
Sbjct  121   ILGAFVESMTLNQQVVKFKNMKSNWNDSYIEKSLFMIYIGTEDYLNFTKANPNADASAQQ  180

Query  538   AFVTSVTNKLKTDIGLLYSLGASKFAVPMLAPLGCLPIVRQEYKTGNDCYEPLNDLAKQH  717
             AFVT+V N+LK DI LLYSLGASKF V +LAPLGCLPIVRQEYKTGN+CYE LNDLAKQH
Sbjct  181   AFVTNVINRLKNDIKLLYSLGASKFVVQLLAPLGCLPIVRQEYKTGNECYELLNDLAKQH  240

Query  718   NEKIGPILNEYAKKPNG--GFQFTVLDFYNAVIRR--TTRSCNYRFYVANSSCCGVGTHN  885
             N KIGP+LNE+AK      GFQFTV DFYNAV+RR  T RS NYRF+V N+SCCGVGTHN
Sbjct  241   NGKIGPMLNEFAKISTSPYGFQFTVFDFYNAVLRRIATGRSLNYRFFVINTSCCGVGTHN  300

Query  886   AYGCGMANVHSKLCEYQRSYFFFDGRHNTEKAQEEIAHLLYGANTNVIHPMTVRELIVFP  1065
             AYGCG  NVHSKLCEYQRSYFFFDGRHNTEKAQEE+AHLLYGA+ +V+ PMTVRELIV+P
Sbjct  301   AYGCGKGNVHSKLCEYQRSYFFFDGRHNTEKAQEEMAHLLYGADPDVVQPMTVRELIVYP  360

Query  1066  AKENMRELWEPNTSIrrrrssrD-YLDLSAYY  1158
               E MRE WEPN    RRR SRD YL L+AYY
Sbjct  361   TGETMREYWEPMNLAIRRRPSRDFYLGLAAYY  392
```

도면2a



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University

<120> A gene for coding Epithiospecier modier gene involved in defence system of Brassica rapa sp. pekinensis

<160> 15

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<400> 1
000

<210> 2
<400> 2
000

<210> 3
<400> 3
000

<210> 4
<400> 4
000

<210> 5
<400> 5
000

<210> 6
<400> 6
000

<210> 7
<400> 7
000

<210> 8
<400> 8
000

<210> 9
<400> 9
000

<210> 10
<400> 10
000

<210> 11
<400> 11
000

<210> 12
<400> 12
000

<210> 13
<211> 1829
<212> DNA
<213> A gene for coding Epithiospecier modier of Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 13
actgaacgtc tgtgaagttc accaccacca cttccctctc tagctctaat acctaatata 60

ttggagatgg catgcaagtt tagttttgtg agtgtcatgg gagtactatt ggtgttaacc 120

atattccatg atccgatcat cgtcgacgcc ggccaaggtg ttccggaggt agcattgttc 180

acttttggag actcttacta cgacgctgga aacaaagctt ttctaggcaa aaacaaaaac 240

cctccacaaa acctgtggcc ttacggcaag tcccgtgacg accccaacgg caagttttcg 300

gacggctata ttgtccccga ctttatcggt acgttcttta ttaataattt aatactctta 360

agataatttg ttttaatatc tgcgtatata acgatataaa cgttgacaaa aaacgataaa 420

acatgctaaa tttgtttaat ttgttttaat catgatgatt atatcgctga attcatgtcc 480

attccaaacg gaatcccgcc ggcgcttaaa cctggtgcta atctttcacg tggagctagc 540

tttgccgtcg ccgacgcttc tattcttggg gctccggtgg aatctgtaag ttagctttca 600

ctaaagctcg caaatttgga tttatttata tatgagagat atataatata ccttttaagg 660

ttttatcttt ttttttatat aacatctgaa gtatgcagct ttaattttta ataatgtcga 720

aaatattatg ttgtatttgt taagggctag ttgaaaagaa aagttgcatt cgatttatat 780

attgttatgt atatccagat gacactgaat caacaagtga acaagttcag aagtatgata 840

tcaacatggt ccgaagacta catcgagaaa tcattgttca tgatatacat cggtacggaa 900

gattatttga acttcaccaa gtttaatccc actgcttctg cttctgctca gcaagctttt 960

gtcacttccg tcactaacaa actaaaaacc gacatcggcg taagttgtcg atacaaacaa 1020

attatatgcg gtttgctata tatactttat gttcatttgg ctcactatat agtatacgtt 1080

aattcatttt acagttgtta tactccttgg gagctagtaa attcgcagtt ccaatgctag 1140

caccattggg ttgcttaccg atcgtgagac aagaatacaa aaccggcaac gactgttacg 1200

agccactcaa cgatttggcc aaacaacaca acgagaagat cggtccgata ttgaacgagt 1260

atgctaaaaa acccaacggc ggttttcagt tcactgtctt agatttctac aatgctgtta 1320

tccgtcggac aacaaggagt tgtaactatc gtaagtcaac accactaaca gtaatcgttg 1380

catacatttt tagtacattt gagaaaattt caggtatttt gttattatta aaagaaaaga 1440

taagagatac caaactatac gtaaaccgta cgtgaagata taatgaagtt caatgattct 1500

ctatagggtt ttatgtggcc aactcatcgt gctgcggggt agggactcac aacgcgtatg 1560

ggtgtggaat ggctaacgtg cactcgaagc tatgtgagta ccaaagatct tacttcttct 1620

ttgacggacg tcacaacact gagaaagctc aggaggaaat agctcatctt ctctatggag 1680

ccaatactaa cgtgatccac ccgatgaccg tacgtgagct aatcgttttt ccggctaagg 1740

agaacatgcg tgagttgtgg gaacccaaca cgtctattcg tcgtcgacga tcatctcgtg 1800

attacctcga tttatcagct tattattag 1829

<210> 14
<211> 1165
<212> DNA
<213> A gene for coding Epithiospecier modier of Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 14
ttatggcatg caagtttagt tttgtgagtg tcatgggagt actattggtg ttaaccatat 60

tccatgatcc gatcatcgtc gacgccggcc aaggtgttcc ggaggtagca ttgttcactt 120

ttggagactc ttactacgac gctggaaaca aagcttttct aggcaaaaac aaaaaccctc 180

cacaaaacct gtggccttac ggcaagtccc gtgacgaccc caacggcaag ttttcggacg 240

gctatattgt ccccgacttt atcgctgaat tcatgtccat tccaaacgga atcccgccgg 300

cgcttaaacc tggtgctaat ctttcacgtg gagctagctt tgccgtcgcc gacgcttcta 360

ttcttggggc tccggtggaa tctatgacac tgaatcaaca agtgaacaag ttcagaagta 420

tgatatcaac atggtccgaa gactacatcg agaaatcatt gttcatgata tacatcggta 480

cggaagatta tttgaacttc accaagttta atcccactgc ttctgcttct gctcagcaag 540

cttttgtcac ttccgtcact aacaaactaa aaaccgacat cggcttgtta tactccttgg 600

gagctagtaa attcgcagtt ccaatgctag caccattggg ttgcttaccg atcgtgagac 660

aagaatacaa aaccggcaac gactgttacg agccactcaa cgatttggcc aaacaacaca 720

acgagaagat cggtccgata ttgaacgagt atgctaaaaa acccaacggc ggttttcagt 780

tcactgtctt agatttctac aatgctgtta tccgtcggac aacaaggagt tgtaactatc 840

ggttttatgt ggccaactca tcgtgctgcg gggtagggac tcacaacgcg tatgggtgtg 900

gaatggctaa cgtgcactcg aagctatgtg agtaccaaag atcttacttc ttctttgacg 960

gacgtcacaa cactgagaaa gctcaggagg aaatagctca tcttctctat ggagccaata 1020

ctaacgtgat ccacccgatg accgtacgtg agctaatcgt ttttccggct aaggagaaca 1080

tgcgtgagtt gtgggaaccc aacacgtcta ttcgtcgtcg acgatcatct cgtgattacc 1140

tcgatttatc agcttattat tagaa 1165

<210> 15
<211> 387
<212> PRT
<213> A gene for coding Epithiospecier modier of Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 15
Met Ala Cys Lys Phe Ser Phe Val Ser Val Met Gly Val Leu Leu Val
1 5 10 15

Leu Thr Ile Phe His Asp Pro Ile Ile Val Asp Ala Gly Gln Gly Val
20 25 30

Pro Glu Val Ala Leu Phe Thr Phe Gly Asp Ser Tyr Tyr Asp Ala Gly
35 40 45

Asn Lys Ala Phe Leu Gly Lys Asn Lys Asn Pro Pro Gln Asn Leu Trp
50 55 60

Pro Tyr Gly Lys Ser Arg Asp Asp Pro Asn Gly Lys Phe Ser Asp Gly
65 70 75 80

Tyr Ile Val Pro Asp Phe Ile Ala Glu Phe Met Ser Ile Pro Asn Gly
85 90 95

Ile Pro Pro Ala Leu Lys Pro Gly Ala Asn Leu Ser Arg Gly Ala Ser
100 105 110

Phe Ala Val Ala Asp Ala Ser Ile Leu Gly Ala Pro Val Glu Ser Met
115 120 125

Thr Leu Asn Gln Gln Val Asn Lys Phe Arg Ser Met Ile Ser Thr Trp
130 135 140

```
Ser Glu Asp Tyr Ile Glu Lys Ser Leu Phe Met Ile Tyr Ile Gly Thr
145                 150                 155                 160

Glu Asp Tyr Leu Asn Phe Thr Lys Phe Asn Pro Thr Ala Ser Ala Ser
                165                 170                 175

Ala Gln Gln Ala Phe Val Thr Ser Val Thr Asn Lys Leu Lys Thr Asp
            180                 185                 190

Ile Gly Leu Leu Tyr Ser Leu Gly Ala Ser Lys Phe Ala Val Pro Met
        195                 200                 205

Leu Ala Pro Leu Gly Cys Leu Pro Ile Val Arg Gln Glu Tyr Lys Thr
    210                 215                 220

Gly Asn Asp Cys Tyr Glu Pro Leu Asn Asp Leu Ala Lys Gln His Asn
225                 230                 235                 240

Glu Lys Ile Gly Pro Ile Leu Asn Glu Tyr Ala Lys Lys Pro Asn Gly
                245                 250                 255

Gly Phe Gln Phe Thr Val Leu Asp Phe Tyr Asn Ala Val Ile Arg Arg
            260                 265                 270

Thr Thr Arg Ser Cys Asn Tyr Arg Phe Tyr Val Ala Asn Ser Ser Cys
        275                 280                 285

Cys Gly Val Gly Thr His Asn Ala Tyr Gly Cys Gly Met Ala Asn Val
    290                 295                 300

His Ser Lys Leu Cys Glu Tyr Gln Arg Ser Tyr Phe Phe Phe Asp Gly
305                 310                 315                 320

Arg His Asn Thr Glu Lys Ala Gln Glu Glu Ile Ala His Leu Leu Tyr
                325                 330                 335

Gly Ala Asn Thr Asn Val Ile His Pro Met Thr Val Arg Glu Leu Ile
            340                 345                 350

Val Phe Pro Ala Lys Glu Asn Met Arg Glu Leu Trp Glu Pro Asn Thr
        355                 360                 365

Ser Ile Arg Arg Arg Arg Ser Ser Arg Asp Tyr Leu Asp Leu Ser Ala
```

370 375 380

Tyr Tyr ***
385