



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년06월30일
(11) 등록번호 10-1752654
(24) 등록일자 2017년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8271 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0036585
(22) 출원일자 2016년03월28일
심사청구일자 2016년03월28일
(56) 선행기술조사문헌
GenBank Accession Number NP_200539
(2014.01.22.)

(73) 특허권자
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이상열
경상남도 진주시 진주대로829번길 21 삼환나우빌
101동 1801호
박정훈
대구광역시 동구 신암로16길 33 신천가람타운 10
4동 809호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

전체 청구항 수 : 총 4 항

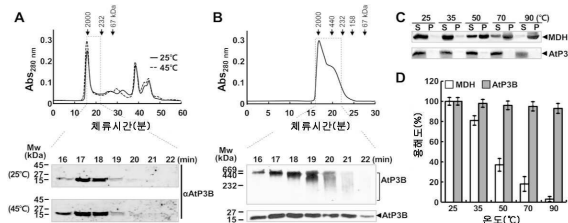
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 AtP3B 단백질을 과발현하는 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 AtP3B 단백질을 과발현하는 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 AtP3B 단백질의 전사 발현을 활성화시켜 더위 충격 하에서는 AtP3B가 단백질 샤페론으로 작용하고 추위 충격 하에서는 RNA 샤페론으로 작용하는 AtP3B 단백질을 과발현하는 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8273 (2013.01)

강창호

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

(72) 발명자

오훈택

부산광역시 영도구 동삼동로 10 경전아파트
101-906

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-0749

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 식물 소포체스트레스 관련 인자의 탐색 및 기능연구

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011379

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 시스템합성농생명공학사업단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 시스템합성생물학기법이용 바이오소재 생산 시스템 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열로 구성된 AtP3B 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 식물체 내의 AtP3B 단백질은 외부 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 AtP3B 단백질의 전사 발현을 활성화시켜 더위 충격 하에서는 AtP3B가 단백질 샤페론으로 작용하고 추위 충격 하에서는 RNA 샤페론으로 작용함을 특징으로 하는 AtP3B 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 AtP3B 단백질은 세포 내 핵 및 리보솜에 편재되어 있고 고분자 복합체 형태로 식물체 내에 존재함을 특징으로 하는 AtP3B 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 3

서열번호: 1의 아미노산 서열로 구성된 AtP3B 단백질을 과발현하는 더위 및 추위의 외부 온도 스트레스 저항성을 지닌 형질전환 식물체에 있어서, 상기 형질전환 식물체 내의 AtP3B 단백질은 외부 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 AtP3B 단백질의 전사 발현을 활성화시켜 더위 충격 하에서는 AtP3B가 단백질 샤페론으로 작용하고 추위 충격 하에서는 RNA 샤페론으로 작용함을 특징으로 하는 외부 온도 스트레스 저항성을 지닌 형질전환 식물체.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 AtP3B 단백질은 세포 내 핵 및 리보솜에 편재되어 있고 고분자 복합체 형태로 식물체 내에 존재함을 특징으로 하는 외부 온도 스트레스 저항성을 지닌 형질전환 식물체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 AtP3B 단백질을 과발현하는 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 AtP3B 단백질의 전사 발현을 활성화시켜 더위 충격 하에서는 AtP3B가 단백질 샤페론으로 작용하고 추위 충격 하에서는 RNA 샤페론으로 작용하는 AtP3B 단백질을 과발현하는 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기후 변화는 식물체의 생존에 큰 위협 중 하나이다. 최근 추세에 비추어 세계적 기온 상승은 10년간 0.2℃씩 증가하는 것으로 예측된다. 이러한 예측은 살아있는 유기체 내에서 열 충격이 생물학적 프로세스에 직접 또는 환경요인의 변형을 통해 영향을 주는 것으로 과학자들 간에 인식되고 있다. 식물체는 토양 등에 고착되어 있기 때문에 이들은 가혹한 환경조건을 피하기보다는 견뎌야 한다. 따라서 식물체는 외부 스트레스로부터 자신을 보호하기 위한 다양한 메커니즘을 개량 발전시켜왔다. 온도 변동은 식물체가 적응하여야 할 가장 위험한 스트레스 중 하나이다.

[0003] 식물체 내의 온도 스트레스는 식물체가 성장 또는 발달하는데 비가역적인 손상을 야기하는 문턱 온도 수준의 변

화로 정의될 수 있다. 온도 스트레스에 대한 저항은 식물체가 외부 온도를 민감하게 인식하고 이러한 정보를 신호전달 경로를 통해 게놈 재프로그램을 활성화시켜 스트레스 응답 단백질을 발현시키는 것이 필요하다.

[0004] 온도 스트레스는 열 또는 냉각 충격의 2개의 타입으로 분류될 수 있다. 더위 또는 추위 스트레스를 극복하기 위해 식물체들은 매우 정교한 스트레스 응답 인자를 지니고 있다. 열-충격 단백질(HSPs)과 추위 충격 단백질(CSPs)이다. CSPs의 기능은 주로 추위 적응에 관련되어 있다. 세포 RNA는 저온 조건 하에서 바람직하지 않은 구조로 접혀져 있고 다수의 CSPs는 이 구조를 리졸브하기 위한 RNA 샤페론으로 작용하고 분자 기능의 회복에 도움을 준다.

[0005] 식물체 내에서 추위 응답은 박테리아 CSPs와 함께 보존 기능을 공유하는 추위 충격 도메인(CSD) 단백질과 관련되어 있다. 식물체 CSD 단백질은 그 C-말단에 다수의 글리신 잔기를 지니고 있으며 RNA-결합 활성을 나타낸다. 또한 이들 단백질은 핵산 듀플렉스를 풀고 대장균의 csp 변이주의 추위 민감 표현형을 보충한다. 첫 번째 기능으로 특성화된 식물체 CSD 단백질은 밀 CSP, WCSP1이었다. WCSP1의 발현은 추위에 응답하여 활성화되었다. 암호화된 단백질은 추위 스트레스 하에서 크라운 조직 내에 축적되었다. 이와는 반대로 ~10 내지 1,000kDa의 분자량 영역을 지닌 HSPs는 열 스트레스 동안에 신호화 트랜스덕션과 관련된 크고 다양한 그룹의 분자 샤페론과 관련되어 있다.

[0006] 스트레스를 통해 다수의 세포간 거대 분자는 변성되기 쉽다. 상승된 온도 하에서 소수성 아미노산 잔기는 일반적으로 천연 단백질 내부로 함몰되는 것으로 나타난다. 이는 단백질 변성과 응집을 야기시킨다. 이러한 조건 하에서 HSPs의 샤페론 활성은 세포를 다수의 외부 스트레스로부터 보호하는데 결정적인 역할을 한다. HSPs는 비-천연 단백질을 위한 친화성을 획득하기 위해 고분자량(HMW) 복합체를 형성하고 이들 복합체가 분자 샤페론으로 작용함으로써 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하는 것이다.

[0007] 따라서 2D-PAGE 및 MALDI-TOF 분석을 사용하여 본 발명자들은 열 충격을 받은 아라비도시스 현탁 세포내의 HMW 복합체내의 신규한 단백질 성분을 스크리닝 하였다. 스크리닝된 식물-특이 산성 리보솜 P3 단백질(ARP3)을 AtP3B(GenBank 접근번호: At5g57290)로 확인하였다. 식물-P-단백질은 P1, P2 및 P3 패밀리를 포함하고 그 중 마지막이 식물체에 특이성을 지닌 것이다. P-단백질은 다수의 리보솜 서브 유니트상에서 측면 돌기부를 형성하고 단백질 번역에 중요한 역할을 한다.

[0008] P-단백질의 단백질 합성, 전사 조절 및 DNA 복구와 같은 다양한 생물학적 기능이 제시되었으나 스트레스 응답에 관한 식물 특이성 P-단백질의 생물학적 효과는 아직 보고되지 않았다.

[0009] 따라서 본 발명자들은 아라비도시스 식물체 내에서 더위 또는 추위 스트레스에 응답하는 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 아라비도시스 특이 산성 리보솜 P3 단백질 AtP3B를 고 분자량 복합체 내에서 분리 동정하고 상기 AtP3B 단백질의 온도 스트레스로부터 식물체 보호 작용을 규명하던 중 AtP3B 단백질이 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 AtP3B 단백질의 전사 발현을 활성화시켜 더위 충격 하에서는 AtP3B가 단백질 샤페론으로 작용하고 추위 충격 하에서는 RNA 샤페론으로 작용함을 발견함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다. 또한 본 발명자들은 AtP3B 단백질이 더위 및 추위 충격에 응답하는 이중 기능을 지닌 단백질을 최초로 확인한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 아라비도시스 식물체 내에서 더위 또는 추위 스트레스에 응답하는 서열번호:

1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 아라비도시스 특이 산성 리보솜 P3 단백질 AtP3B를 고 분자량 복합체 내에서 분리 동정하고 상기 AtP3B 단백질의 온도 스트레스로부터 식물체 보호 작용을 규명코자 한 것이다.

[0011] 또한 AtP3B 단백질이 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 AtP3B 단백질의 전사 발현을 활성화시켜 더위 충격 하에서는 AtP3B가 단백질 샤페론으로 작용하고 추위 충격 하에서는 RNA 샤페론으로 작용함을 확인하고 AtP3B 단백질을 과발현하는 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물을 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 AtP3B 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 식물체 내의 AtP3B 단백질은 외부 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 AtP3B 단백질의 전사 발현을 활성화시켜 더위 충격 하에서는 AtP3B가 단백질 샤페론으로 작용하고 추위 충격 하에서는 RNA 샤페론으로 작용함을 특징으로 하는 AtP3B 단백질을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 또한 상기 AtP3B 단백질은 세포 내 핵 및 리보솜에 편재되어 있고 고분자 복합체 형태로 식물체 내에 존재함을 특징으로 한다.

[0014] 한편 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 AtP3B 단백질을 과발현하는 더위 및 추위의 외부 온도 스트레스 저항성을 지닌 형질전환 식물체에 있어서, 상기 형질전환 식물체 내의 AtP3B 단백질은 외부 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 AtP3B 단백질의 전사 발현을 활성화시켜 더위 충격 하에서는 AtP3B가 단백질 샤페론으로 작용하고 추위 충격 하에서는 RNA 샤페론으로 작용함을 특징으로 하는 외부 온도 스트레스 저항성을 지닌 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0015] 이때 상기 AtP3B 단백질은 세포 내 핵 및 리보솜에 편재되어 있고 고분자 복합체 형태로 식물체 내에 존재함을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 효과는 아라비도시스 식물체 내에서 더위 또는 추위 스트레스에 응답하는 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 아라비도시스 특이 산성 리보솜 P3 단백질 AtP3B를 고 분자량 복합체 내에서 분리 동정하고 상기 AtP3B 단백질의 온도 스트레스로부터 식물체 보호 작용을 확인한 것이다.

[0017] 또한 AtP3B 단백질이 온도 스트레스로부터 식물체를 보호하기 위해 AtP3B 단백질의 전사 발현을 활성화시켜 더위 충격 하에서는 AtP3B가 단백질 샤페론으로 작용하고 추위 충격 하에서는 RNA 샤페론으로 작용함을 확인하고 AtP3B 단백질을 과발현하는 온도 스트레스 저항성 형질전환 식물을 제공코자 한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 AtP3B의 구조적 특성을 나타낸 것이다.

(A) 3주령의 아라비도시스 식물체(Co1-0)를 25℃ 또는 45℃에서 45분간 인큐베이션시킨 조 추출물(50 μg)을 SEC 분석에 사용하였다. 총 단백질(2.5mg)을 Tsk g4000 SW_{XL} 컬럼에 넣고 30 μl의 점선으로 된 박스로 나타난 체류 시간 내 각각의 분획을 SEC 트레이스 위에서 SDS-PAGE를 시행한다. AtP3B를 폴리클로날 항-AtP3B 항체를 사용하여 검출하였다. SEC 내의 AtP3B 단백질 피크를 상부 패널에 나타내고 상응하는 획분 내의 면역 블롯 검출을 SDS-PAGE로 시행한 후 하부 패널에 나타내었다.

(B) SEC(상부 패널) 및 천연 PAGE에 따른 AtP3B의 구조 분석; 정제된 재조합 AtP3B를 SEC로 분석하였다. 점선으로 된 박스로 나타난 채류 시간 내의 각각의 분획을 10% 천연 PAGE(중간 패널) 또는 12% SDS-PAGE(하부 패널)위에 단백질을 분리시킨 후 항-AtP3B 항체를 사용하여 면역 블로팅 시켰다. 화살표는 표준 마커 단백질의 분자량을 나타낸다.

(C, D) AtP3B의 열 안정성; (C) 1 μ g의 AtP3B 또는 MDH를 25°C, 35°C, 50°C, 70°C 또는 90°C에서 30분간 인큐베이션 시켰다. 단백질을 20,000g로 30분간 원심분리 시켰다. 상등액(S)과 펠렛(P) 분획의 샘플을 SDS-PAGE로 분석하고 은으로 염색하였다. (D) C 내의 단백질 밴드의 상대적 강도를 그래프로 표시하였다.

도 2는 AtP3B의 단백질 사페론 활성을 나타낸 것이다.

(A) AtP3B와 양성 대조군으로 사용된 cPrx1의 소수성 도메인의 열 충격 유도 노출에 대한 효과를 분석하기 위한 Bis-ANS-바인딩 에세이의 결과이다. Bis-ANS 형광 스펙트럼을 여기 380nm 및 발광 스캔 400-600nm에서 측정하였다. 샘플은 10 μ M bis-ANS(-○-), 10 μ M bis-ANS(-○-) 플러스 30 μ M AtP3B(-▲-), cPrx1(-■-) 및 GST(-●-)이었다.

(B-D) 단백질 사페론 활성 에세이. 광 산란을 15분간 인큐베이션 시킨 후 340nm에서 모니터링 하였다. (B) 50mM HEPES(pH 7.0) 완충액 내의 1 μ M CS 단독(-○-), 2 μ M GST 첨가(-●-), 2 μ M cPrx1 첨가(-■-), 2 μ M AtP3B 첨가(-▲-)시켜 43°C에서 인큐베이션 시키고 스펙트로포토미터로 측정한다.

(C) 50mM HEPES(pH 7.0) 완충액 내의 1.67 μ M MDH 단독(-○-); 0.84 μ M(-▲-), 1.67 μ M(-▲-) 또는 3.34 μ M(-▲-) AtP3B 첨가; 또는 3.34 μ M GST 첨가(-●-)시켜 45°C에서 인큐베이션 시키고 스펙트로포토미터로 측정한다.

(D) 50mM HEPES(pH 8.0)에 10mM DTT 포함시킨 완충액에 1 μ M 인슐린 단독(-○-); 0.5 μ M(-▲-), 1 μ M(-▲-) 첨가 또는 2 μ M (-▲-) AtP3B 첨가; 또는 2 μ M GST 첨가(-●-)시켜 25°C에서 인큐베이션 시키고 스펙트로포토미터로 측정한다.

도 3은 아라비도시스 내의 AtP3B 매개 열 저항성을 나타낸 것이다.

(A-C) 3일령의 야생형(WT), AtP3B OE 및 AtP3B RNAi 아라비도시스 묘목 간에 열 충격 저항성의 비교. 묘목의 열 충격 처리 과정과 회복을 이미지로 묘사하였다. (A) 묘목을 10일간 최적 온도(22°C)에서 성장시킨다. (B) 3일령 식물체를 37°C에서 1시간 동안 예비-열 처리 노출시키고 최적 온도로 이송시킨 후 2일간 성장시킨다. 약한 열 충격(37°C)에서 예비 처리시킨 후 식물체를 그 보다 더 높은 44°C에서 90분간 처리한다. 그 후 식물체를 22°C로 이송하고 5일간 추가 성장시킨다. (C) 패널 B와 같이 열 충격 후에 아라비도시스 묘목 WT, AtP3B OE 및 AtP3B RNAi의 생존율을 서로 비교한다. 스트레스는 검은색 막대기로 스트레스 없음은 흰색 막대기로 나타낸다. (D-E) 7일령의 야생형(WT), AtP3B OE 및 AtP3B RNAi 아라비도시스 묘목 간에 열 충격 저항성의 비교. 열 민감 hot1 변이 식물체를 대조군으로 사용하였다. 묘목의 열 충격 처리 과정과 회복을 이미지로 묘사하였다. (D) 묘목을 14일간 최적 온도(22°C)에서 성장시킨다. (E) 7일령 식물체를 37°C에서 1시간 동안 예비-열 처리 노출시키고 최적 온도로 이송시킨 후 2일간 성장시킨다. 약한 열 충격(37°C)에서 예비 처리시킨 후 식물체를 그 보다 더 높은 44°C에서 90분간 처리한다. 그 후 식물체를 22°C로 이송하고 5일간 추가 성장시킨다. (F) 열 충격 후에 아라비도시스 묘목 WT(-□-), hot1(-▲-), AtP3B OE(-●-) 및 AtP3B RNAi(-●-)의 이온 누출을 서로 비교한다. 7일령 식물체를 (E)에 나타난 바와 같이 열 처리시킨다. 열 처리 후 시료를 모으고 탈 이온수에 침지시켜 1일간 인큐베이션 시킨다. 전도도를 최소 10개 묘목으로 측정하고 총 전도도를 묘목을 증속시킨 후 측정하였다.

도 4는 AtP3B 발현에 다양한 스트레스의 영향을 나타낸 것이다.

(A-C) 열 처리된 모든 식물체로부터 분리된 총 RNA를 [α -³²P]-표지 전체길이 AtP3B cDNA를 프로브로 사용하여 노던 블롯시켰다. 에티디움 브로마이드(EtBr)-염색 리보솜 RNA를 하부 패널에 나타내었다. (D-F) 총 RNA를 스트레스 처리 전체 식물체로부터 분리하였다. AtP3B 발현을 qRT-PCR를 사용하여 측정하고 APT1, EF1 α 및 UBQ5에 대해 일반화시켰다. 3개의 생물학적 전사체를 평균하였고 에러바는 평균 에러를 나타낸다. (A-D) 열 적응동안의 AtP3B 발현. 14일령 묘목을 37°C에서 1시간 노출시키고 22°C로 되돌린다. 시료를 0, 12, 24, 36 또는 48시간에서 수집하였다. 실험 절차를 A에 묘사하였다. (B, E) 다양한 스트레스에 응답하는 AtP3B 발현. 14일령 묘목을 화학물질(100 μ M 앱시스산 [ABA] 6시간 또는 300mM NaCl[NaCl] 12시간) 또는 환경 스트레스(추위[4°C])에서 6시간 또는 12시간동안 탈수[공기 건조]로 처리하였다. (C, F) 추위 스트레스 응답하는 AtP3B 발현. 14일령의 묘목을 4°C에서 0, 6, 9, 12 또는 24시간 인큐베이션 시켰다. 실험 절차는 (C)에 묘사한 바와 같다.

도 5는 AtP3B의 RNA 샤페론 활성을 나타낸 것이다.

(A,B) AtP3B의 RNA-바인딩 활성. (A) 재조합 AtP3B를 250 또는 500mM의 NaCl을 포함하는 완충액 내에서 ssDNA, dsDNA 또는 4개의 서로 다른 리보뉴클레오타이드 호모-중합체 중 하나와 컨주게이션 시킨 아가로스 비드와 혼합시킨다. 결합된 단백질을 SDS-PAGE 분리시킨 후 항-AtP3B 항체로 번역 블로팅 시킨다. MBP를 대조군으로 사용하였다. (B) AtP3B와 MBP의 지시된 양을 250ng의 시험관 전사 루시퍼라아제 mRNA와 함께 인큐베이션 시킨다. 겔 쉬프트 에세이를 1% 아가로스 겔에서 수행하였다. (C) AtP3B와 CspA의 핵산-멜팅 에세이 결과를 나타낸다. 반응 혼합물은 32nM 분자 비콘 단독(대조군, -○-) 또는 5 μ g AtP3B 첨가(-▲-), CspA(-■-) 또는 MBP 첨가(-●-)된 것이다. (D-F) pINIII-CspA(CspA), pINIII-AtP3B(AtP3B) 또는 벡터(대조군)를 포함하는 대장균 BX04 변이주를 항생제가 보충된 LB 배지에서 하룻밤 성장시켰다. 분자 비콘의 형광 스펙트럼을 여기 파장 555 및 575nm에서 측정하였다. (D) 대장균 형질 전환체 내의 AtP3B 또는 CspA 단백질의 발현 확인. 하룻밤 배양시킨 배양액을 계대 배양을 위해 신선한 LB 배지로 접종시키고 단백질 발현을 IPTG 처리로 유도하였다. 총 단백질 추출물(5 μ g)을 SDS-PAGE로 분획화 시킨 후 CBB 염색(상부 패널) 또는 항-AtP3B 항체로 번역 브로팅(중간 패널) 또는 항-CspA 항체(하부 패널)로 더 분석하였다. 검은색 화살표 머리는 AtP3B를 나타내고 하얀색 화살표 머리는 CspA를 나타낸다. (E) 패널 D의 다양한 대장균을 하룻밤 배양시켜 계대 배양을 위해 신선한 LB 배지에 접종시켰다. 광학 광도가 600nm에서 0.8에 도달했을 때 5 μ l의 연속적 희석물을 항생제 및 IPTG가 보충된 LB 플레이트 위에 분주시켰다. 플레이트를 37°C에서 하루(상부 패널) 또는 17°C에서 5일간(하부 패널) 인큐베이션 시켰다. 그 후 사진을 촬영하였다. (F) 대장균의 하룻밤 배양물을 600nm에서 광학 광도가 0.3이 되도록 항생제와 IPTG를 보충시킨 신선한 LB 배지에 접종하였다. 성장 곡선은 17°C에서 수득하였다.

도 6은 AtP3B 매개 아라비도시스의 추위 스트레스 저항성을 나타낸 것이다.

(A, B) 낮은 온도(12°C)에서 아라비도시스 묘목의 WT, AtP3B OE 및 AtP3B RNAi 라인에서의 성장 비교. 식물체를 1×MS 플레이트에서 수직 성장시켰다. (A) 사진을 3주 성장 후 촬영하였다. (B) WT(-□-), AtP3B OE (-●-) 및 AtP3B RNAi(-○-) 라인의 추위 스트레스하의 뿌리 성장; 뿌리 길이를 지정된 시간에 측정하였다. (C, D) WT, AtP3B OE 및 RNAi 식물체의 동결 저항성 비교. 3주령 식물체를 포트에서 성장시킨 후 -5°C 동결 스트레스에서 5시간 노출시킨다. 그 후 일반 성장 조건(22°C)으로 이송시킨다. (C) 사진을 동결 처리 후 4일간 회복시켜 촬영하였다. (D) 묘목의 추위-충격 처리와 회복을 묘사하였다. (E) 동결 처리 후 WT(-□-), AtP3B OE(-●-) 및 AtP3B RNAi(-○-) 식물체 잎으로부터 전해질 누출. 충분히 성장된 4주령 로제트 잎을 -10°C 내지 0°C의 1년의 추위 스트레스에 30분간 노출시켰다. 잎으로부터 전해질 누출을 추위 스트레스 후 전도도와 잎을 증속시킨 후 총 전도도와와의 비교로 측정하였다.

도 7은 AtP3B 이중적 역할을 위한 제안 모델이다.

AtP3B의 발현은 열 및 추위 스트레스 모두에서 전사를 활성화시킨다. AtP3B 단백질은 리보솜과 관련되어 있으며 핵 내 또는 주위에서 안정한 HMW 복합체를 형성한다. 집적된 AtP3B는 단백질 및 RNA 샤페론 활성을 나타낸다. AtP3B의 단백질 샤페론 기능은 열 스트레스하에 세포의 열 저항성을 증진시키고 단백질 응집을 방지하며 RNA 샤페론 활성은 RNA를 안정화 시켜 추위 스트레스로부터 세포를 보호한다. 단백질 또는 RNA 샤페론은 각각 AtP3B가 추위 또는 열 충격과 같은 환경 스트레스에 대해 식물체를 보호하는데 관련되어 있음을 나타내는 것이다.

도 8은 AtP3B 단백질의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 다양한 식물 종에서 수득된 P-단백질의 서열을 나타낸다.

(A) AtP3B 단백질의 뉴클레오타이드 및 아미노산 서열. 글리신-풍부 영역(GRR)은 이탤릭체로 나타내었고 밑줄로 표시하였다. (B) 아라비도시스 탈리아나로부터 수득된 AtP1-1(At1g01100), AtP2-1(At2g27720), AtP3A(At4g25890) 및 AtP3B(At5g57290); 캐스터 콩(Ricinus communis)으로부터 수득된 RcP3(EEF34674); 옥수수(Zea mays)로부터 수득된 ZmP3(LOC100280997); 벼(Oryza sativa)로부터 수득된 OsP3(P56724); 밀(Aegilops tauschii)로부터 수득된 AeP3(EMT30344); 수수(Sorghum bicolor)로부터 수득된 SbP3(EER90326) 등의 다양한 식물체로부터 선별된 P-단백질로부터의 서열을 나타낸다. 변화 가능한 N-말단 영역, 산성 힌지 영역 및 보존된 C-말단 영역을 나타내었다.

도 9는 아라비도시스 내의 AtP3B 단백질의 세포 내 편재를 나타낸다.

(A) 본 실험에 사용된 컨스트럭트의 개략도이다. P_{35S}와 T_{NOS}는 CaMV 35S 프로모터를 나타내고 아그로박테리움 투

메파시엔스로부터 노팔린 신타제(NOS) 터미네이터를 나타낸다.

(B) 아라비도시스 엽록체 세포 내의 GFP-AtP3B 융합 단백질의 일시적 발현을 나타낸다. 엽록체는 smGFP-AtP3B 및 RFP-NLS를 위한 컨스트럭트와 함께 동시-형질전환되고 융합 단백질의 국소화를 동일 초점 레이저 스캐닝 현미경에 의해 48시간 후에 측정하였다. 적어도 세 번 독립적으로 형질전환 시험을 수행하였으며 대표적 이미지를 나타내었다. RFP-NLS 융합 단백질을 핵 편재를 위한 양성 대조군으로 사용하였다.

도 10은 AtP3BOE와 RNAi의 분자 확인을 나타낸 것이다.

(A) AtP3BOE(P35S:AtP3B) 및 RNAi(P35S:AtP3B Invert. Rept.) 형질전환 식물체를 생성하기 위해 사용된 컨스트럭트의 개략도이다. P_{35S}와 T_{NOS}는 CaMV 35S 프로모터를 나타내고 아그로박테리움 투메파시엔스로부터 노팔린 신타제(NOS) 터미네이터를 나타낸다.

(B) 야생형(WT)과 비교하여 OE 및 RNAi 식물체의 호모자이그시티를 확인한 실험이다. 표시된 한 TKd의 프라이머를 RT-PCR 분석을 위해 사용하였다. 액틴2 유전자(ACT2)를 대조군으로 사용하였다.

(C) 항-AtP3B 및 항-6xHis 항체와 함께 WT, OE 및 RNAi 식물체의 면역 블로트 분석을 나타낸 것이다. 항-히스톤 H3 항체를 검출을 위한 대조군으로 사용하였다.

도 11은 AtP3B의 1Kb 이하 프로모터 영역 내의 시스-엘레먼트 존재를 나타낸 것이다.

(A) AtP3B의 프로모터 분석을 식물 시스 활성 조절 엘레먼트의 두 개의 데이터베이스 PLACE 및 PlantCARE를 사용하여 수행하였다. 비생물학적 스트레스 응답 관련 엘레먼트를 선별하였다. 색상 화살표머리는 다양한 엘레먼트의 상대 위치를 나타낸다. 일시적 개시 코돈(ATG)을 나타내었다. 서열 정렬은 상부 룰러에 의해 제공되었다.

(B) 도 A에서 사용된 색상 화살표머리는 AtP3B의 1kb 이하 프로모터 영역 내에 시스-엘레먼트가 다양하게 존재함을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] P3 단백질은 식물체 특이성 리보솜 P-단백질이나 이 단백질의 기능은 특성화되지 않았다. 열-안정성 고분자량(HMW) 복합체의 성분을 스크리닝하면서 본 발명자들은 열처리된 아라비도시스 현탁 배양물로부터 AtP3B P3 단백질을 분리 동정하였다.
- [0020] 크기 배제 크로마토그래피(SEC), SDS-PAGE 및 일반 PAGE를 통해 항-AtP3B 항체를 면역 블로팅하였으며 본 발명자들은 AtP3B 단백질은 열 충격 후에도 고분자량(HMW) 복합체를 안정하게 유지하고 있음을 확인하였다.
- [0021] AtP3B mRNA의 전사 수준은 고온 및 저온 스트레스에 응답하여 증가하였다. 박테리아에서 발현된 재조합 AtP3B 단백질은 단백질과 RNA 모두에서 샤페론 활성을 나타내었다. RNAi에 의해 AtP3B의 녹다운은 고온 및 저온 스트레스에 식물체를 더욱 민감하게 하였다. 반면, AtP3B의 과발현은 모든 조건에서 저항성을 증가시켰다.
- [0022] 본 발명의 결과는 AtP3B 단백질이 고온 및 저온 스트레스 모두에 대해 식물세포를 보호하는 것이다. 이러한 발견은 산성 리보솜 P-단백질의 분자기능 및 생체 내 역할에 비추어 볼 때 신규한 것이다.
- [0023] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0024] 1. AtP3B의 구조적 특성
- [0025] 본 발명자들은 열 처리 아라비도시스 현탁 배양물로부터 크기-배제 크로마토그래피(SEC)를 통해 HMW 복합체의 열 안정 성분으로 AtP3B를 분리하고 이어서 2D-PAGE 및 MALDI-TOF 분석을 행하였다. 아라비도시스 게놈은 AtP3A로 지정된 AtP3B의 또 다른 이소타입을 암호화한다. AtP3A와 AtP3B는 119개 및 120개의 아미노산 잔기를 각각

포함하며 또한 이들은 아미노산 수준에서 83% 동일성 및 93% 유사성을 지닌다(도 8). 아미노산 서열 정렬은 AtP3A 및 AtP3B가 다른 유기체 내의 P3 단백질과 유사하게 다양한 N-말단을 지닌에 이어 산성 힌지와 보존된 C-말단 영역을 지닌다.

[0026] 본 발명자들이 조사하는 AtP3A와 AtP3B의 대부분의 특성이 구별되기 어려운 것이기 때문에 여기서 본 발명자들은 아라비도시스 P1 및 P2 단백질인 경우의 AtP3B, AtP1-1 및 AtP2-1로부터 얻어진 결과만을 설명하고 P3 단백질과 유사한 산성 힌지와 보존된 C-말단 영역을 또한 포함하는 것으로 한다. 그러나 P1, P2 및 P3 단백질의 N-말단 영역은 다양하다. P-단백질이 주로 리보솜과 핵에서 발견되기 때문에 본 발명자들은 녹색 형광 단백질 (GFP) 융합 단백질로 형질 전환시킨 아라비도시스 원형질체의 직접 공초점 현미경 관찰에 의해 AtP3B 단백질의 편재화를 측정하였다. GFP-AtP3B가 핵과 주변 영역 모두에서 관찰되었으며(도 9), 이는 핵과 리보솜 모두에 AtP3B가 편재한다는 종래의 결과와 일치하는 것이다.

[0027] 생체 내에서 HMW 분획 내의 AtP3B 존재를 확인하기 위해 3주령 아라비도시스 식물체(Co1-0)를 22℃ 또는 45℃에서 두 시간 노출시키고 총 단백 추출물을 SEC 분석에 놓이게 하였다(도 1A). 16 내지 22분의 SEC 체류 시간에 수득된 분획을 SDS-PAGE에 놓고 단백질을 항-AtP3B 항체와 함께 면역 블로팅시켜 놓는다(도 1A). AtP3B 단량체 크기와 일치하는 18kDa의 단일 단백질 밴드를 주로 17 내지 18분에 수득된 샘플 내에서 검출하였으며 온도와 관계없이(도 1A) AtP3B가 HMW 복합체 내에 높은 온도에서도 매우 안정하게 존재함을 나타내는 것이다. AtP3B의 구조를 SEC로 동종 정제시킨 재조합 AtP3B를 사용하여 분석하였다. 다수의 AtP3B는 공극 볼륨 분획 내에서 용출되었으며 이들은 단백질과 분자량 200kDa 이상의 복합체를 포함하는 것이다(도 1B). 이러한 관찰은 AtP3B가 HMW 복합체의 하나의 성분임을 천연 PAGE 겔을 통해 확인한 바와 같다(도 1B, 중간 패널). AtP3B가 SDS-PAGE 상에 나타내는 단일 18kDa 밴드는 이것의 단량체 크기와 상응하는 것을 통해(도 1B, 바닥 패널) 본 발명자들은 재조합 AtP3B가 호모 중합 단백질 구조로 존재함을 결론지었다.

[0028] 또한 본 발명자들은 AtP3B의 열 안정성을 다양한 온도에서 정제된 재조합 단백질을 인큐베이션함으로써 조사하였다(도 1C-1D). 20,000g로 30분간 원심분리 후 열-처리 단백질을 상등액과 침전물로 분획시키고 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. 다수의 AtP3B를 상등액 분획에서 90℃까지에도 검출하였으나 비교로 사용된 대다수의 MDH는 침전되었다. 이러한 특성은 AtP3B가 매우 열 안정함을 의미하는 것이다.

[0029] 2. AtP3B는 열충격 조건하에서 단백질 샤페론 활성을 나타낸다.

[0030] AtP3B는 열충격 조건하에서 잘 보존된 특성인 분자 샤페론 기능을 HMW 복합체내에 유지한다. AtP3B의 샤페론 기능을 조사하기 위하여 본 발명자들은 정제된 단백질의 표면 소수성과 열 유도된 단백질 응집 방지 능력을 분석하였다. 열 처리이후 표면 소수성의 변화를 단백질 위에 소수성 패치와 ~470nm에서 최대 발광 형광체를 결합시킨 bis-ANS를 이용하여 측정하였다(도 2A). 본 발명자들은 bis-ANS를 이용하여 특성화된 분자 샤페론인 cPrx1과 AtP3B의 소수성을 비교하였다. AtP3B에 결합된 bis-ANS 형광 신호가 cPrx1에 결합된 형광 신호보다 크게 나타났다. AtP3B가 더 큰 표면 소수성을 나타내는 것은 AtP3B가 HMW 복합체를 형성함으로써 통상적 분자 샤페론 특성을 증대시킨 것으로 판단된다.

[0031] 이러한 판단의 근거로 본 발명자들은 cPrx1을 양성 대조군으로 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(GST)를 음성 대조군으로하여 CS의 열 응집 저해 능력을 판단함으로써 AtP3B의 샤페론 활성을 조사하였다. 본 발명자들은 AtP3B(1 μM)과 cPrx1(1 μM) 모두가 43℃에서 CS(1 μM)의 열 응집을 저해하는 반면 GST (1 μM)은 전혀 응집을 저해하지 않음을 확인하였다(도 2B). 또한 MDH(1.67 μM)를 그 자체 또는 그와 함께 2배 초과 물(3.34 μM)의 GST로 가열하였을 때 광 산란이 급격히 증가하였다(도 2C). MDH(1.67 μM)를 AtP3B의 증가된 함량(0.5-, 1- 및 2배 초과)과 함께 가열 시 응집은 농도 의존적으로 저해되었으며 이는 AtP3B의 샤페론 활성을 확인하는 것이다. AtP3B가 2배 초과 물(3.34 μM)로 존재하였을 때 약 90%의 MDH는 15분 인큐베이션 동안에 열 유도 응집으로부터 보호되었다. AtP3B는 농도 의존적 방법으로 DTT-유도 인슐린 응집을 저해하였다(도 2D). 이러한 관찰 결과는 AtP3B

의 분자 샤페론 활성을 확인하는 것이다.

[0032] 3. 열 충격하에 AtP3B의 생리학적 역할

[0033] AtP3B의 생리학적 역할을 조사하기 위해 본 발명자들은 칼리플라워 모자이크 바이러스의 35S 프로모터(P_{35S})의 조절하에 설계된 이중 컨스트럭트로 형질 전환시킨 아라비도시스 OE 및 RNAi 라인을 생성하였다. 야생형(WT), OE, 및 RNAi 식물체 내의 AtP3B 전사 수준을 RT-PCR으로 비교하였다(도 10B). 예측한대로 AtP3B 신호는 야생형에 비해 OE에서 더욱 강렬하였으며 RNAi 개체에서는 아무런 신호가 감지되지 않았다. 이와는 대조적으로 대조군으로 사용된 액틴-2 유전자(ACT2; AT3G18780)의 신호는 모든 시료내에서 거의 일치하였다. 다음으로 본 발명자들은 면역 블롯 분석에 의해 WT-OE 및 RNAi 식물체내의 AtP3B 단백질 발현을 측정하였다(도 10C). 재조합 AtP3B 단백질에 대한 항체 특이성을 면역 블로팅으로 확인하였다. AtP3B 단백질 수준은 야생형보다 OE에서 더 높았으나 RNAi 식물체는 아무런 감지할 수 있는 단백질을 생성하지 못하였다. 이와는 대조적으로 대조 단백질인 AtL3 레벨은 모든 식물체 라인에서 거의 일정하였다. 6xHis-표지 AtP3B 단백질에 상응하는 밴드는 오직 OE 식물체 샘플에서 감지되었다.

[0034] 단백질 샤페론은 열 손상으로부터 식물체를 보호하는 것과 관련되어있기 때문에 이러한 결과는 AtP3B가 생체내에서 매우 효율적인 단백질 샤페론 기능을 지님을 나타내는 것이다(도 2). 본 발명자들은 3일령(도 3A-3C) 및 7일령(도 3D-3F)의 아라비도시스 식물체를 열 충격 조건하에 놓이게 하고 AtP3B의 생리적 기능을 조사하였다. 통상조건(22℃)에서는 OE 및 RNAi 식물체 모두가 종자 발아 또는 식물 성장 측면에서 야생형 식물체에 비해 특이한 표현형의 변화를 나타내지 않았다(도 3A, 3D). 그러나 44℃에서 1.5시간 3일령 또는 7일령 식물체를 인큐베이션 시킨 후 37℃에서 1시간 순화시킨 후에는 OE 식물체는 현저한 열 저항성을 나타낸 반면 RNAi 식물체는 열 민감하였다(도 3B, 3E). 열 스트레스 조건하에서 야생형(WT), RNAi 및 OE 식물체의 생존률은 각각 47.6%±5.1%, 16.3%±2.0% 및 76.4%±4.0% 이었다(도 3C). 이와는 대조적으로 아무런 스트레스가 없는 조건 하에서는 3개의 라인 묘목이 거의 비슷하게 모두 생존하였다. 열 충격 후 회복 5일 후에 거의 모든 RNAi 묘목은 백화되고 사멸하게 되었으나 야생형의 절반 OE 식물체의 거의 대부분은 녹색을 유지하고 성장을 지속하였다. 열 충격은 채널 및 수송체 단백질에 심각한 손상을 야기하기 때문에 유동성 및 다른 막 특성이 전해질을 누출하게 야기한다. 따라서 본 발명자들은 WT, OE 및 RNAi 식물체간에 이온 누출 수준을 비교하였다. 44℃에서 인큐베이션 시킨 후에는 3개의 라인의 이온 누출이 모두 증가하였다. 그러나 RNAi 식물체가 야생형(WT) 식물체에 비해 더 높은 이온 누출을 나타내었으나 OE 및 hot1 대조 식물체는 명백히 낮은 수준으로 누출하였다(도 3F). WT, RNAi, hot1 및 OE 각각의 식물체가 50% 이온 누출에 필요한 시간은 각각 52, 33, 35 및 72분이었다. 이와 함께 본 시험 결과는 AtP3B가 열 충격으로부터 생존에 매우 중요한 역할을 나타냄을 확인한 것이다.

[0035] 4. 아라비도시스 내의 추위 유도 AtP3B 발현

[0036] 상기한 바와 같이 AtP3B 단백질은 HMW 복합체로써 존재하고 단백질 샤페론 활성을 나타낸다. 따라서 본 발명의 데이터는 약한 열 충격 적응 후에 RNAi 식물체가 야생형 식물체보다 더 열에 민감함을 나타내는 반면 OE 식물체는 열 충격에 저항성을 지니고 이는 AtP3B가 열 스트레스 적응에 관여함을 나타내는 것이다. 분자 샤페론 활성이 획득된 열 저항성에 매우 중요한 역할을 하기 때문에 본 발명자들은 노던 블롯 및 정량 RT-PCR(qRT-PCR)을 통해 열 적응에 관한 AtP3B 발현을 분석하였다. 본 발명자들은 노던 블로팅을 위해 프로브로서 ³²P를 랜덤하게 표지화시킨 AtP3B cDNA 전체 길이를 사용하였다. 본 발명자들은 AtP3B를 위한 특정 프라이머 세트를 사용하였다. 37℃에서 1시간 동안 열 스트레스에 노출시킨 후 AtP3B 발현은 24시간 회복 후에 큰 변화를 나타내지 않았다(도 4A, 4D). 그러나 AtP3B 전사체 수준은 그 후 크게 증가하여 36시간 회복 시 기저선(0시간)에 비해 5.3배 이상 증가하였다.

[0037] 리보솜 단백질이 다양한 역할을 수행하기 때문에 본 발명자들은 다양한 스트레스 조건하에서 AtP3B 발현을 모니

터링 함으로써 AtP3B의 또다른 기능을 조사하였다(도 4B, 4E). 그 다음 실험으로 14일령 아라비도시스 묘목을 ABA 처리 유도 및 염분 스트레스 유도를 위해 100 μ M ABA 및 300mM NaCl에 노출시키고 4°C에서 12시간 동안 인큐베이션시켜 추위 충격을 유도시킨 후 탈수 유도를 위해 12시간 동안 공기 건조시켰다. AtP3B의 발현은 4°C에서 크게 증가하였으며 탈수에 의해서는 약하게 증가하였다. AtP3B 발현이 추위 스트레스에 응답하여 크게 증가하기 때문에 본 발명자들은 4°C에서 인큐베이션 시킨 후 다양한 시간동안 이의 발현을 모니터링 하였다(도 4C, 4F). AtP3B 발현은 4°C에서 크게 증가되었으며 그 상대적 수준은 9시간 후에 기저선(0시간)에 비해 17.2배 증가한 것이었다(도 4F).

[0038] 본 발명자들은 공공에게 알려진 PLACE 및 PlantCARE 데이터베이스를 사용하여 ~1kb의 프로모터 영역을 분석함으로써 AtP3B의 온도 응답점 발현을 조사하였다. 열 충격 엘레먼트(HSE)와 다중 CAATBOX1 모티프가 프로모터 영역에 존재하고 이는 AtP3B 유전자가 열 스트레스 응답적임을 제시하는 것이다. C-반복 결합 인자(CBF)-결합사이트(CBFHV)가 존재하였으며 이는 AtP3B가 추위 순화 및 동결 저항성에 관한 경로에 관여됨을 나타내는 것이다. 또한 본 발명자들은 MYB 전사 인자(MYB2CONSENSUSAT) 및 MYC 전사 인자 다중 사이트(MYCCONSUSAT)의 2개의 결합사이트를 발견하였으며 이는 AtP3B가 추위 또는 가뭄과 같은 비생물적 스트레스 동안에 MYB 및 MYC 전사 인자의 조절하에 있음을 나타내는 것이다.

[0039] 5. AtP3B는 추위 충격 조건하에서 RNA 샤페론 활성을 나타낸다.

[0040] 대장균 내에서 리보솜은 열 충격 또는 추위 충격과 같은 온도 스트레스를 인지 및 반응할 수 있다. 식물체-특이 P3 단백질 또한 리보솜 구성 요소이며 AtP3B 유전자 발현이 추위 스트레스 하에서 상향 조절되기 때문에 본 발명자들은 추위 충격에 응답하는 AtP3B의 기능을 조사하였다. 이를 위해 본 발명자들은 먼저 추위와 관련된 기능에 관한 단서를 찾기 위해 AtP3B의 아미노산 서열을 분석하였고 이를 통해 AtP3B의 단백질 서열이 글리신-풍부 및 산성 반복 영역을 포함하고 있음을 확인하였다(도 8). 이러한 모티프들은 추위 충격 조건 하에서 RNA 샤페론 활성을 나타내는 RNA-결합 단백질의 필수적 특성이다. 또한 글리신-풍부 RNA-결합 단백질(GRPs)은 핵산 결합/멜팅, 유전자 발현의 후-전사 조절 및 다수의 외부 자극에 응답하는 RNA 프로세싱 등과 같은 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어 RNA 샤페론을 암호화하는 GRP2와 GRP7 유전자는 아라비도시스 내에서 동결 저항성을 증진시키기 위하여 추위 스트레스에 응답하여 현격하게 상향 조절된다.

[0041] AtP3B의 구조적 특성 및 추위-응답 특성에 기반하여 본 발명자들은 Electrophoric Mobility Shift Assay(EMSA)를 통해 AtP3B의 핵산 결합 활성을 측정하였다. 정제된 재조합 AtP3B를 각각 단일가닥 DNA, 이중가닥 DNA 또는 4중 RNA 호모-중합체와 함께 인큐베이션 시켰을 때 AtP3B는 높은 염분 농도 하에서도 폴리(A) 및 폴리(C) RNA에 특이적 밀착 결합됨을 확인할 수 있었다(도 5A).

[0042] 이와는 반대로 MBP(대조군으로 사용)는 핵산과 전혀 결합하지 않았다. AtP3B의 RNA-결합 활성을 루시페라아제 mRNA 및 아라비도시스 총 RNA를 사용하여 확인하였다. RNA를 포함한 AtP3B의 복합체 형성은 아가로스 겔 내에서 RNA의 전기영동 이동성을 분명하게 감소시켰다.

[0043] 대부분의 RNA 샤페론은 RNA-멜팅 활성을 지니고 있기 때문에 본 발명자들은 5'- 말단 및 3'- 말단에 각각 표지되어진 형광 분자(TAMRA) 및 퀀쳐 분자(DABSYL)가 서로 컨쥬게이트된 스템-및-루프 구조의 단일 가닥 핵산 분자로 구성된 헤어핀-형상 분자 비콘을 이용하여 AtP3B의 핵산-멜팅 활성을 조사하였다.

[0044] DABSYL 퀀쳐는 두 개의 기질이 어닐링되고 발색단이 서로 인접하여 위치하였을 때 TAMRA의 형광을 효과적으로 억제한다. 양성 대조군으로 사용한 CspA의 경우와 같이 RNA 비콘과 함께 AtP3B를 인큐베이션했을 때 TAMRA 형광체가 현격히 증가되었다. 이와는 반대로 MBP는 RNA 비콘의 헤어핀 구조와 분리될 수 없기 때문에 이는 TAMRA 형광체를 생성할 수 없다(도 5C). 이러한 결과는 AtP3B가 이중가닥 RNA 분자와 멜트될 수 있어 RNA 샤페론 활성을

나타내는 것이다.

[0045] 또한 추위 저항성 AtP3B의 역할을 생체 내에서 4개의 CSP 유전자(CspA, CspB, CspE 및 CspG)가 결실된 추위 스트레스에 매우 민감한 대장균 BX04 추위-민감 변이 세포 내에 개별적으로 CspA와 AtP3B 유전자를 코딩시킨 플라스미드로 형질 전환시켜 확인하였다. 대장균 변이체 내의 CspA 및 AtP3B 단백질의 발현은 상응하는 항체를 면역블로팅시켜 확인하였다(도 5D, 바닥 패널). 최적 온도(37℃)에서 성장시킨 대장균(도 5E, 상위 패널)과는 대조적으로 낮은 온도(17℃)에서 BX04 세포의 성장은 급격하게 저하되었다(도 5E, 바닥 패널). 그러나 BX04 세포의 성장은 CspA에서와 같이 AtP3B의 발현을 통해 현저하게 회복되었다. BX04 세포 내에서 AtP3B의 보충 활성을 형질 전환된 BX04 세포의 성장률을 측정함으로써 확인하였다(도 5F). AtP3B를 BX04 세포에 형질 전환시킴으로써 pINIII로 형질 전환시킨 대조군 세포에 비해 액체 배지 내에서 추위 스트레스 하에도 향상된 성장을 나타내었다(도 5F). 이러한 결과로부터 본 발명자들은 AtP3B의 생약적 활성이 RNA 샤페론 기능에 매개되어 추위 스트레스 저항성에 관련되어 있는 것으로 확인하였다.

[0046] 6. AtP3B는 아라비도시스 추위 저항성을 증가시킨다.

[0047] 추위 충격 하에서 AtP3B의 전사체 수준이 상향 조절됨과 AtP3B가 추위 스트레스 조건 하에서 RNA 샤페론 활성을 나타냄을 근거로 하여 본 발명자들은 저온 스트레스에 대해 아라비도시스 세포를 보호하는 AtP3B의 생리학적 중요성을 조사하였다. 이러한 목적으로 본 발명자들은 12℃에서 다양한 시점에 WT-RNAi 및 OE 아라비도시스 묘목의 뿌리 길이를 비교하였다(도 6A, 6B). 추위 스트레스 조건 하에서 RNAi 묘목의 뿌리는 20일간 성장시킨 야생형 묘목의 뿌리보다 약 30% 짧았으나 OE 묘목의 뿌리는 야생형 뿌리보다 약 35% 길었다(도 6B). 본 발명자들은 또한 동결 조건 하에서 AtP3B의 생체 내 역할을 조사하였다(도 6C-6E). 토양에서 성장시킨 3주령 아라비도시스 묘목을 -5℃에서 5시간 인큐베이션 시키고 22℃에서 4일간 회복시켰다. 그 후 생존율을 측정하였다(도 6C, 6D). 오직 38%의 야생형 식물체가 생존하였으나 거의 100%의 OE 식물체는 동결 스트레스로부터 회복되었다. 이와는 반대로 RNAi 식물체의 경우 아무도 생존하지 못하였다(도 6C). 이러한 결과는 AtP3B가 아라비도시스의 추위 및 동결 저항성에 중요한 역할을 함을 나타내며 AtP3B OE는 식물체의 추위 저항성을 크게 증진시킨다.

[0048] 본 발명의 시험 결과를 통해 본 발명을 평가하면 다음과 같다.

[0049] 열 처리 아라비도시스 현탁 배양액내의 신규한 열 안정성 샤페론 단백질을 스크리닝 하기 위해 본 발명자들은 식물-특이 P3 단백질, AtP3B(At5g57290)을 분리 동정하였다. AtP3B는 핵 부근에 편재되어 있었다(도 9). 좀 전의 연구는 식물 P3 단백질은 세포질, 핵 및 리보솜에 편재되어 있다는 것이다. 리보솜은 대장균 내에서 열 및 추위 스트레스에 일차적인 감지체로 알려져 왔다. 이러한 정보에 근거하여 본 발명자들은 식물-특이 리보솜 P3 단백질이 온도 스트레스에 대한 리보솜 응답에 필수적 역할을 함을 가정하였고 이에 따라 우리의 가설을 시험하기 위한 연구를 수행하였다.

[0050] 본 발명을 통해 HMW 구조가 AtP3B의 고유한 특성에 관련되어 있다는 것을 확인하였다(도 1). cPrx1, Ypt1, AtTdx 및 AtPP5와 같은 분자 샤페론은 열 충격 또는 산화 스트레스에 대해 HMW 복합체를 형성한다. 이에 따라 그들의 샤페론 활성을 증진시킨다. 이와 동시에 본 발명자들은 AtP3B가 샤페론 기능을 지님을 확인하였다. AtP3B는 고유하게 매우 안정한 HMW 구조를 형성한다. 그러나 스트레스에 응답하여 구조 또는 기능의 변화를 나타내지 않는다(도 1, 2). 또한 AtP3B는 추위 스트레스 하에서 RNA 샤페론 활성을 나타낸다. 그러므로 이 단백질은 서로 다른 온도 스트레스 조건하에서 단백질 샤페론으로 작동하거나 RNA 샤페론으로 작용하는 2개의 역할을 수행하는 것이다.

[0051] 전사 조절인자에 관한 우리의 조사에 따라 AtP3B 프로모터는 HSE와 몇 개의 CCAATBOX1을 포함한다. HSE는 이것을 지닌 프로모터 상에서 열 스트레스 응답을 부여하는 시스-행동 요소인 것이다. 또한 CCAATBOX1은 열 충격 유

전자프로모터 내의 통상 존재하는 것이다. 따라서 우리의 생리학적 데이터는 AtP3B RNAi 식물체가 야생형 식물체에 의해 나타난 수득된 열 저항성을 소실하는 것을 확인하였다(도 3). 또한 식물체는 상승된 열 안정성에 의해 AtP3B를 과발현 시키는 것이다(도 3). 이러한 데이터는 AtP3B가 열 스트레스에 대한 순응에 관련되어 있음을 나타내는 것이다. 몇몇 논문들이 식물체가 열 스트레스에 적응하는 동안 필수적인 분자 샤페론 기능을 설명하였다. 따라서 본 발명자들은 AtP3B의 발현이 열 스트레스에 노출된 이후에 연장된 시간동안 서서히 활성화됨을 가정하였다. 또한 수득된 단백질이 몇몇 열 충격에 의해 단백질 응집 또는 불활성화 방지에 기인함을 제시하였다.

[0052] 본 발명자들의 가상 실험 분석은 AtP3B 프로모터가 추위 또는 가뭄과 같은 비생물학적 스트레스에 응답하는 역할을 하는 MYB 및 MYC 전사 인자를 위한 다중 결합 사이트를 포함하고 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 AtP3B의 발현은 낮은 온도 및 탈수 모두에 의해 유도된다(도 4B). 특히 AtP3B 전사체 수준은 추위 스트레스 동안 극적으로 상향 조절되었다(도 4C, 4F). 또한 AtP3B RNAi 식물체는 추위 스트레스에 대해 야생형 식물체보다 더 민감하였으나 AtP3B OE 식물체는 더 큰 저항성을 나타내었다. 이러한 결과에 비추어 BX04 대장균 내의 AtP3B의 비정상 발현이 변이 세포의 추위 민감성을 회복시키는 관찰은(도 5E, 5F) 본 발명자들에게 AtP3B의 RNA 샤페론 기능이 추위 스트레스 하에서 식물 세포 생존에 필수적인 것으로 판단되게 하였다.

[0053] 이러한 실험 결과에 근거하여 본 발명자들은 변하는 환경 내에서 AtP3B의 이중 역할 모델을 가정하였다. AtP3B의 발현은 추위 및 더위 스트레스 모두에 의해 유도된다. AtP3B 단백질의 축적은 핵 내 또는 그 주위에 편재된다. AtP3B는 리보솜 콤플렉스와 관련 있거나 HMW 형태로 존재하는 구조를 지닌다. AtP3B는 단백질 및 RNA 샤페론 활성을 지니고 열 스트레스에 대해 단백질의 응집을 방지하고 추위 스트레스에 대해 단백질을 안정화시킨다. 따라서 본 발명자들은 AtP3B의 OE형은 단백질의 이중 기능을 통해 열 및 추위 스트레스에 대한 저항성을 증진시킨다. 또한 본 발명자들은 다양한 영역의 온도 스트레스에 저항성을 지니는 형질 전환 작물을 개발하기 위해 AtP3B 유전자의 적용을 예측한다.

[0054] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0055] (실시예 1) 재료

[0056] 시트르산 신타제(CS), 돼지 심장 미토콘드리아 말레인산 탈수소효소(MDH), 인슐린 및 4,4'-디아닐리노-1,1'-비나프틸-5,5'-디술폰산(bis-ANS)을 시그마사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 자연 전기영동 및 겔 여과를 위한 분자량 마커, 오발부밍, Superdex 200 HR 10/30 신속 단백질 액체 크로마토그래피(FPLC)컬럼을 Amersham Biosciences(Uppsala, Sweden)로부터 구매하였다. 다양한 제한 효소는 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany), New England Biolabs(Ipswich, MA, USA) 및 Stratagene(La Jolla, CA, USA)으로부터 공급받았다. 올리고뉴클레오타이드를 바이오니어(대전, 한국)로부터 합성하였으며 PCR 시약을 Takara(Otsu, Japan)로부터 구입하였다. 항-히스톤 H3 폴리크로날 및 항-6xHis 태그 모노클로날 항체를 Abcam(Cambridge, MA, USA)으로부터 수득하였다. 안티-AtP3 항체를 면역화시킨 토끼로부터 생성하였다. PVDF 막은 Millipore Co.(Santa Clara, CA, USA)로부터 수득하였으며 EZ-ECL 홀스라디쉬 퍼옥시다아제(HRP) 화학 형광 검출 키트를 Biological Industries(Kibbutz Beit Haemek, Israel)로부터 구매하였다.

[0057] (실시예 2) 식물 재료

[0058] 아라비도시스 탈리아나 에코타입 Col-0을 22℃ 에서 70% 습도로 장-일 조명 조건(16시간 명/8시간 암) 조건 하에서 $100-120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 합성 광 플럭스 강도로 조사시킨 후 성장시켰다. 동시 발아를 유도하기 위해 종자를 4℃에서 3일간 암소에서 발아를 촉진하였으며 그 후 성장 챔버로 이송하였다. 원하는 열 저항성을 실험하기 위해 아라비도시스 묘목을 MS 염(Duchefa Biochemicals, Haarlem, the Netherlands), 3% 설탕 및 0.8% 한천을 포함하는 1×Murashige-Skoog(MS) 고체 배지로 채워진 펠트리 디쉬에서 성장시켰다. 3일 또는 7일령 묘목을 포함하

는 플레이트를 파라필름으로 밀봉하고 호일로 랩핑한 후 37℃(약한 스트레스) 또는 44℃(심각한 스트레스)조건 하에 수육상으로 침지시켰다. 열 충격으로부터 회복을 위해 플레이트를 수육으로부터 제거하고 상기한 명-암 사이클 조건 하에 성장 챔버에서 인큐베이션 시켰다.

[0059] 뿌리 성장에 추위 스트레스 영향을 측정하기 위해 묘목을 12℃에서 수직으로 성장 챔버내에서 성장시켰다. 뿌리의 길이를 추위 온도로 이송시킨 후 지정된 시간에 측정하였다. 동결 저항성 시험을 위해 22℃ 토양에서 성장시킨 3주령 묘목을 -5℃에서 5시간 동안 인큐베이션 시켰다. 그 후 정상적 성장 배지로 이송하였다. 4주령 식물체로부터 발달된 로제트 잎을 통해 전해질 유출을 Ristic 및 Ashworth의 방법(Ristic & Ashworth, 1993)을 통해 측정하였다.

[0060] (실시예 3) 재조합 단백질의 발현 및 폴리클로날 항체의 생성

[0061] 전체 길이 AtP3B cDNA를 아라비도시스 cDNA 라이브러리로부터 PCR 증폭시켰다. PCR 생성물을 pGEM-Teasy(Promega, Madison, WI, USA)내에 우선 클로닝시키고 보충 정보 내에 기재된 방법으로 pMAL-c2X(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)내로 서브클로닝 시켰다. 얻어진 플라스미드를 단백질 발현을 위해 대장균 BL21(DE3)에 형질 전환시켰다. MBP-융합된 AtP3B 단백질을 아밀로오즈 수지를 사용하여 정제시키고 MBP 성분을 인자 Xa(New England Biolabs)로 분해시켜 제거하였다. AtP3B 단백질을 TSK 헤파린-5PW HPLC (7.5×75mm)을 사용하여 더욱 정제시켰다. 아밀로오즈 수지내의 가능한 정제 오염물질인 DnaK를 ATP-아가로즈 컬럼(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)을 사용하여 제거시켰다. 정제된 AtP3B 단백질을 사용하기 전에 20mM HEPES (pH 8.0)로 투석시켰다. 정제된 AtP3B 단백질을 폴리클로날 항체를 생성하기 위해 토끼 면역에 사용하였다. 아라비도시스 현탁 배양액으로부터 HMW 복합체의 열-안정 단백질 성분을 분리하기 위한 절차는 이미 개시된 바 있다 (Jang et al., 2004).

[0062] (실시예 4) GFP와 융합된 AtP3B 생체 내 타겟팅

[0063] 단백질 일시적 편재 분석을 위해 이중 플라스미드를 구축하였다. pSM-GFP-AtP3B는 AtP3B 전체 길이 서열을 포함하며 pSM-RFP-NLS는 핵 편재된 시그널 서열을 포함한다. 융합 컨스트럭트를 폴리에틸렌글리콜-매개 형질전환을 통해 잎에서 제조된 아라비도시스 세포질에 도입시켰다. 융합 컨스트럭트의 발현을 공초점 레이저-스캐닝 생물학 현미경(IX71 현미경에 형상화된 FV500V, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 형질 전환 후에 수 차례 모니터링 하였다. GFP와 RFP의 필터 세트는 U-MGFPHQ(여기, 460-480HQ; 디클로익, 485; 발광, 495-540HQ)와 U-MWIG2(여기, 520-550HQ; 디클로익, 565; 발광, 580IF)이었다.

[0064] (실시예 5) AtP3B의 과발현체(OE)의 생성 및 아라비도시스 RNA 간섭(RNAi)개체

[0065] AtP3B OE 및 RNAi를 생성하기 위해 이중 플라스미드 pMDC32-6xHis-AtP3B와 pFGC-AtP3B RNAi를 보충 정보에 기재한 방법으로 구축하였다. 2개의 컨스트럭트로 플로랄-딤 방법을 통해 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 GV3101을 통해 아라비도시스 형질 전환시켰다. 형질 전환된 종자를 10 µg/ml 하이그로마이신(Duchefa)과 250 µg/ml 세프트락심(Duchefa)을 보충시킨 MS 한천 배지에서 선별하였다.

[0066] (실시예 6) 생화학적 연구

[0067] 홀다제 사페론 활성을 CS, MDH 또는 인슐린을 기질로써 다양한 농도의 AtP3B 단백질을 통해 측정하였다. CS 또는 MDH 변성은 50mM HEPES(pH 8.0) 완충액 내의 43℃에서 인큐베이션시킨 샘플을 통해 유도되었다. 기질의 열

응집을 340nm에서 탁도 증가를 모니터링 함으로써 측정하였다. 인슐린 변성을 단백질을 50 mM HEPES(pH 8.0) 완충액 내에서 10mM DTT에 노출시킴으로써 유도하였다.

[0068] 소수성 도메인의 노출은 SFM25 스펙트로플루오로미터(Kontron Instruments SpA, Milan, Italy)를 사용하여 bis-ANS 형광을 통해 측정하였다. 여기 파장은 380nm로 고정시키고 발광을 400 및 600nm사이에서 스캔시켰다. SEC를 50mM HEPES-KOH(pH 8.0) 완충액과 함께 균등화시킨 Superdex 200 HR 컬럼을 사용하여 FPLC를 25℃에서 수행하였다. SDS-PAGE, 천연 PAGE 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0069] 핵산-결합과 -멜팅 분석을 위해 10 µg의 정제된 재조합 AtP3B를 50 µl의 폴리(A), 폴리(G), 폴리(C) 및 폴리(U) 부착시킨 아가로스 비드와 함께 인큐베이션 시키고 핵산 농도 1mg/ml의 500 µl의 RHPA-결합 완충액(10mM Tris-HCl [pH 7.4], 2.5mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100, and 125-1,000mM NaCl) 내의 이중 및 단일 가닥 송아리 가슴 샘 DNA에 부착시킨 셀룰로오스 비드(Sigma)로 인큐베이션 시켰다. 4℃에서 30분간 혼합물을 인큐베이션 시킨 후 비드를 RHPA 완충액으로 5번 세척하고 SDS 로딩 완충액 내에서 비딩시켰다. SDS-PAGE로 분리된 단백질을 항-AtP3B 항체로 면역 블로팅 시켰다. mRNA 기질로 겔 쉬프트를 전술한 방법으로 수행하였다.(Nakaminami et al., 2005) 루시페라아제 mRNA 기질(250ng)을 15 µl의 결합 완충액(10mM Tris-HCl, pH 7.5)내에서 15분간 단백질과 함께 인큐베이션 시키고 1% 아가로스겔 상에서 분리시켰다.

[0070] 본 연구에서 사용된 분자 비콘은 78-뉴클레오타이드 헤어핀-형상 분자로서 형광 표지시키고 소광시킨 것이다. 테트라메틸 로다민-AGGGTTCTTTGTGGTGTTTTATCTGTGCTTCCTATGCACCGCGACGACAGTCGCTAACCTCTCGCTAAGAACCCCT-DABCYL이었다. 여기와 발광 파장을 555nm 와 575nm로 보정시켰다. 32nM 분자 비콘을 10mM Tris-HCl(pH 7.5)과 1mM MgCl₂에 용해시킨 100 µl 용액 형광체를 AtP3B, MBP 또는 CspA 단백질을(각각 5 µg)에 첨가시켜 모니터링 하였다.

[0071] (실시예 7) 대장균 내의 추위 충격 에세이

[0072] 전체 길이 AtP3B의 cDNA를 pIN111에 클로닝시키고 대장균 내에서 추위 충격 테스트를 Kim, JY et al., 2007에 개시된 방법으로 수행하였다. pIN111 발현 벡터로 대장균 BX04 변이 세포로 형질 전환시키고 세포를 Luria-Bertani (LB)배지에서 성장시켜 600nm에서 옵티컬 덴시티가 0.8 이 되게 한다. 세포 배양물을 계대 희석시켜 LB-한천 플레이트에 스포팅 시키고 17℃ 낮은 온도로 인큐베이션 시켰다. 대장균 BX04 세포 내의 AtP3B 단백질을 측정하기 위해 박테리아 추출물로부터 용해성 단백질을 SDS/12% PAGE에 의해 분리시키고 면역 블로트 측정을 상기한 바와 같이 항-AtP3B 항체를 이용하여 수행하였다.

[0073] (실시예 8) 유전자 발현 분석

[0074] AtP3B 유전자 발현 상의 비생물학적 스트레스 영향을 측정하기 위하여 1×MS 배지에서 14일간 성장시킨 아라비도시스 식물체를 다양한 비생물학적 스트레스에 노출시켰다. 추위 스트레스를 위해 4℃에서 6시간 노출시키고 ; 가뭄 스트레스를 위해 12시간 동안 필터 페이퍼 위에서 공기 건조시키고 ; 염분 스트레스를 위해 300mM NaCl로 처리하고 ; ABA 처리를 위해 100 µM 앱시스산 100 µM (ABA; Sigma-Aldrich)로 처리하였다. 열 스트레스에 대한 적응 시 유전자 발현을 분석하기 위하여 14일령 묘목을 37℃에서 1시간 노출시켰다. 샘플을 22℃로 낮추어 다양한 시점에서 수집하였다. 추위 스트레스 동안 시간 의존적 유전자 발현을 분석하기 위해 묘목을 다양한 시간 동안 4℃에서 인큐베이션 시켰다. 총 RNA를 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 추출하였다. RNA 농도와 순도를 NanoDrop ND-1000 스펙트로포토미터를 사용하여 평가하였다.

[0075] 노던 블로트 분석을 위해 20 µg의 RNA를 포름알데하이드에 의해 크기 분별화시키고 1.2% 아가로스 겔 전기영동

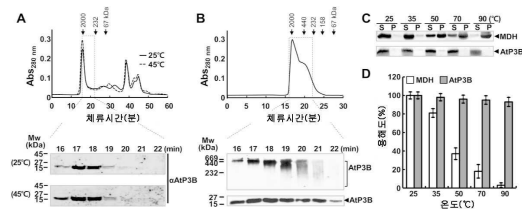
으로 변형시킨 후 Hybond N+막(GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, USA)으로 이송시켰다. 필터를 UV 가교 결합시킨 후 ^{32} P-표지 전체 길이 AtP3B cDNA와 함께 65℃에서 하룻밤 인큐베이션 시키고 고 스트레인전 시 조건 하에서 세척시켰다.

[0076]

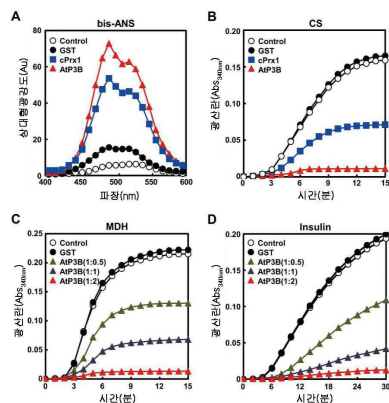
정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)분석을 위해 게놈 DNA 오염물을 1 μg의 RNA와 DNase I(RNase-free)를 통해 처리 제거시킨 후 첫 번째 가닥 cDNA를 oligo(dT)₁₈ 프라이머와 Revart Aid M-MuLV Reverse Transcriptase(Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 합성하였다. qRT-PCR 분석을 CFX 384 Touch™ Real-Time PCR Detection System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 방법으로 TOP real™ qPCR 2X Pre MIX(SYBR Green with high ROX) Kit(Enzynomics, Daejeon, Korea)를 사용하여 수행하였다. AtP3B의 발현을 APT1(아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 1; At1 g27450) F1α(인장 인자 1-α; At5g60390) 및 UBQ5(유비퀴틴 연장 단백질; At3g62250)에 대해 일반화 시켰다.

도면

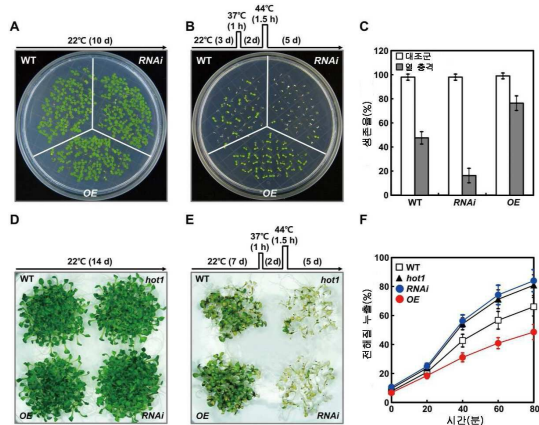
도면1



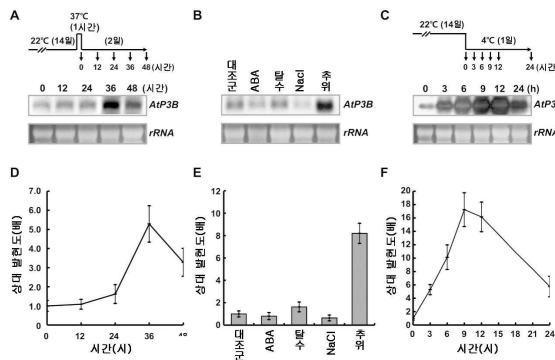
도면2



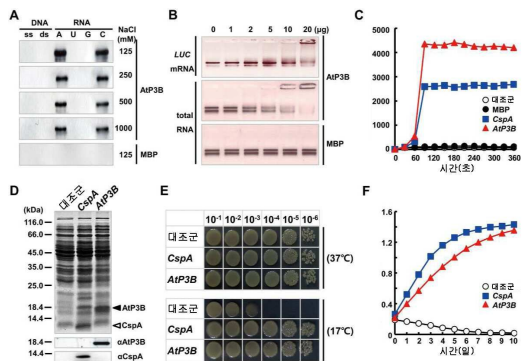
도면3



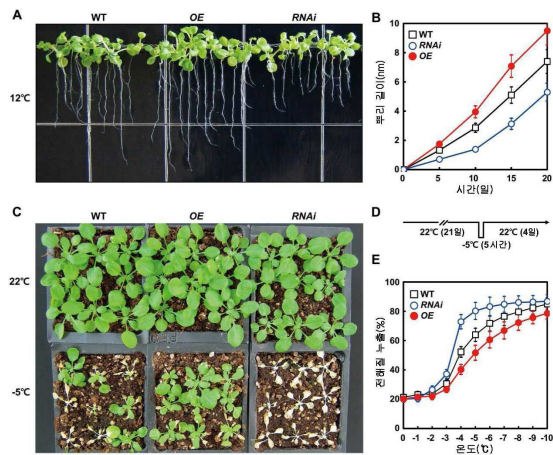
도면4



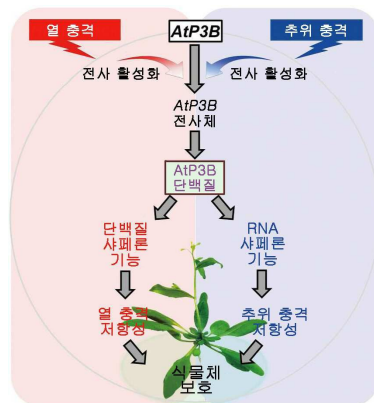
도면5



도면6



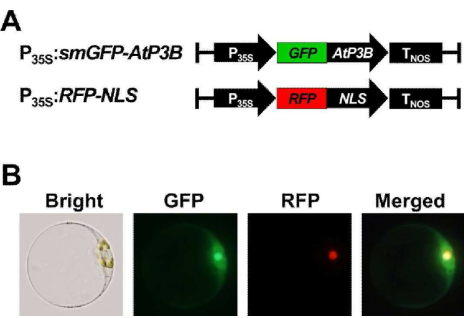
도면7



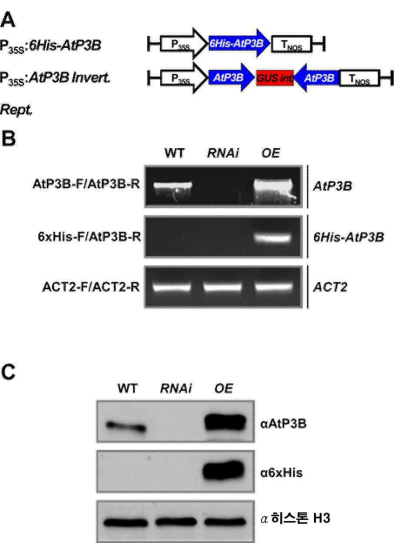
도면8

[illegible]

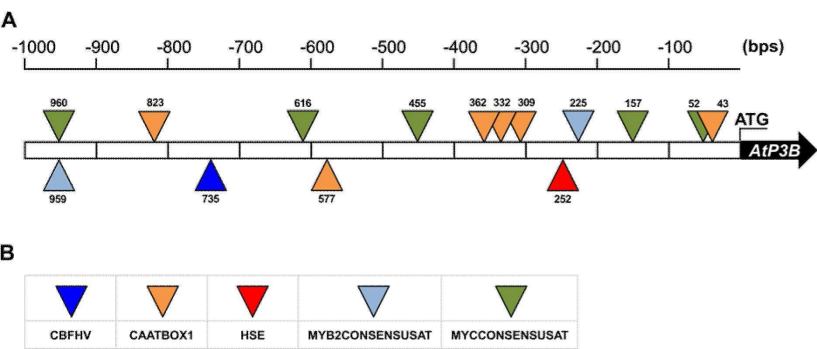
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Transgenic plant overexpressing AtP3B protein resistant to temperature stress
- <130> KP-983
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 1

Met Gly Val Phe Ser Phe Val Cys Lys Ser Lys Gly Gly Glu Trp Thr
 1 5 10 15
 Ala Lys Gln His Glu Gly Asp Leu Glu Ala Ser Ala Ser Ser Thr Tyr

20 25 30
 Asp Leu Gln Arg Lys Leu Val Gln Thr Ala Leu Ser Ala Asp Ser Ser
 35 40 45
 Gly Gly Val Gln Ser Ser Phe Ser Leu Val Ser Pro Thr Ser Ala Val
 50 55 60
 Phe Val Val Val Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Phe Ala Ala Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Ala Ala Ala
 85 90 95

Thr Lys Glu Glu Glu Lys Lys Lys Glu Glu Ser Glu Glu Glu Glu Gly
 100 105 110
 Asp Phe Gly Phe Asp Leu Phe Gly
 115 120

<210> 2
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Oligonucleotide
 <400> 2

agggttcttt gtggtgtttt tatctgtgct tcctatgca ccgccgacga cagtcgctaa 60
 cctctcgcta agaaccct 78