



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0035543
(43) 공개일자 2012년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 5/00 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0097120

(22) 출원일자 2010년10월06일

심사청구일자 2010년10월06일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

윤대진

경상남도 사천시 용현면 연호안길 41

박형철

경상남도 진주시 초전동 757-1번지

(74) 대리인

김동완

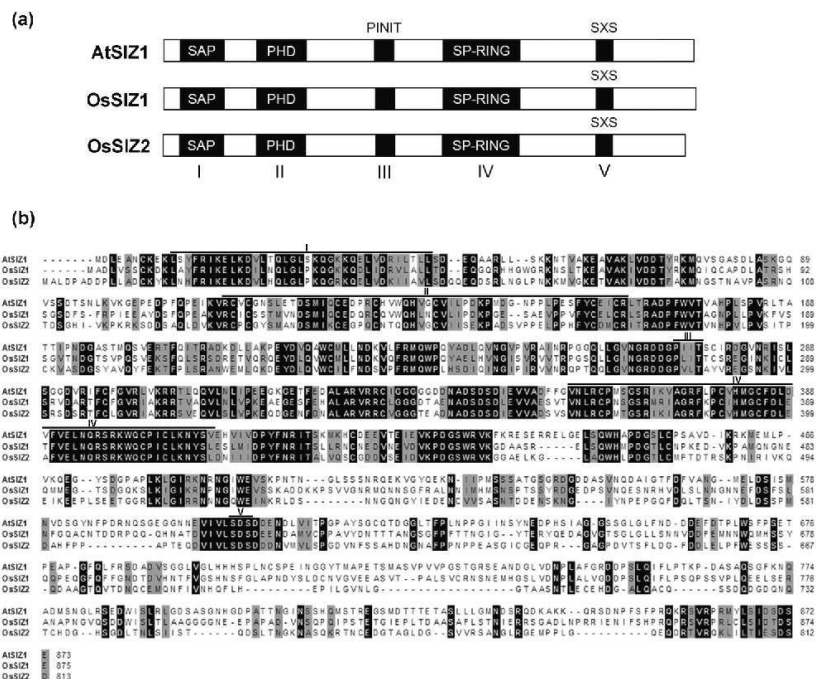
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질 발현을 통한 벼 식물의 스트레스 적응 방법

(57) 요약

본 발명은 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질 발현을 통한 벼 식물의 스트레스 적응 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 벼 식물체 내에서 고온, 저온, NaCl 및 ABA와 같은 환경적 스트레스에 적응하기 위하여 수모 접합(Sumoylation)에 관련된 단백질 OsSIZ1 및 OsSIZ2 발현을 통한 스트레스 적응방법에 관한 것이다.

대표도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20080401034023
부처명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린21사업
연구과제명	인산 흡수 신호 전달 관련 유전자의 확보 및 특성 규명
주관기관	동아대학교 산학협력단
연구기간	2010.01.01 ~ 2010.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	R32-10148
부처명	교육과학기술부
연구사업명	세계수준의 연구중심대학 육성사업
연구과제명	기후변화에 대응한 식물 환경생명공학 기술개발
주관기관	한국연구재단
연구기간	2008.12.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

벼 식물에서 유래된 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 OsSIZ1 단백질에 있어서, 상기 단백질 OsSIZ1은 i) DNA 결합에 관여하는 SAP 도메인(12?45번째 아미노산 잔기), ii) 식물 Siz/PIAS 단백질 내에만 존재하는 식물 호메오도메인-핑거(PHD) 도메인(116?167번째 아미노산 잔기), iii) 핵의 보존에 필수적인 PINIT 도메인(274?277번째 아미노산 잔기), iv) SUMO E3-리가아제 활성화에 필요한 SIZ/PIAS-RING (SP-RING) 도메인(360?412번째 아미노산 잔기) 및 v) SUMO 결합을 증진시키는 SXS 모티프(606?608번째 아미노산 잔기)를 포함함을 특징으로 하는 OsSIZ1 단백질

청구항 2

벼 식물에서 유래된 서열번호: 2로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 OsSIZ2 단백질에 있어서, 상기 단백질 OsSIZ2는 i) DNA 결합에 관여하는 SAP 도메인(18?52번째 아미노산 잔기), ii) 식물 Siz/PIAS 단백질 내에만 존재하는 식물 호메오도메인-핑거(PHD) 도메인(124?177번째 아미노산 잔기), iii) 핵의 보존에 필수적인 PINIT 도메인(284?287번째 아미노산 잔기), iv) SUMO E3-리가아제 활성화에 필요한 SIZ/PIAS-RING (SP-RING) 도메인(370?422번째 아미노산 잔기) 및 v) SUMO 결합을 증진시키는 SXS 모티프(598?600번째 아미노산 잔기)를 포함함을 특징으로 하는 OsSIZ2 단백질

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질은 수모화 경로에 있어서 SUMO E3-리가아제 활성을 나타냄으로써 목적단백질에 대한 수모화를 활성화시킴을 특징으로 하는 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질은 세포 내 핵에 편재되어있음을 특징으로 하는 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질

청구항 5

OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질 발현을 통한 벼 식물의 스트레스 적응 방법에 있어서, 벼 식물 내에서 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질 발현을 통해 고온, 저온, NaCl 및 앱식산(ABA)과 같은 스트레스에 적응하기 위하여 고온 또는 앱식산 스트레스 시 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 강한 발현을 유도하여 목적단백질과 SUMO 접합을 활성화시키고, 저온, NaCl 스트레스 시는 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 약한 발현을 유도하여 목적단백질과 SUMO 접합을 부분 활성화시킴을 특징으로 하는 벼 식물의 스트레스 적응방법

명세서

기술분야

본 발명은 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질 발현을 통한 벼 식물의 스트레스 적응 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 벼 식물체 내에서 고온, 저온, NaCl 및 ABA와 같은 환경적 스트레스에 적응하기 위하여 수모 접합(Sumoylation)에 관련된 단백질 OsSIZ1 및 OsSIZ2 발현을 통한 스트레스 적응방법에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 다수의 진핵세포 단백질은 번역 후 모디피케이션에 의해 조절된다. 예를 들면 가역적인 유비퀴틴(Ub), 유비퀴틴 유사 단백질(Ub1) 공유결합 부착을 들 수 있다(Novatchkova et al. 2004; Kerscher et al. 2006). 이와 같은 번역 후 모디피케이션(modification)은 세포 내 국소화 및 목적단백질의 안정화와 같은 생물학적 활성에 결정적인 변화를 부여한다(Dohmen 2004). SUMO(작은 유비퀴틴-유사 모디파이어)는 그 3차원 구조에 있어서 유비퀴틴과 높은 상동성을 지닌다. 그러나 SUMO는 그 아미노산 1차 서열에 있어서 유비퀴틴과는 오직 20% 정도의 유사성을 지니고 N-말단 아미노산 잔기의 경우 약 15개의 추가적 잔기를 포함한다(Hay 2005).
- [0003] 목적단백질에 대한 SUMO 접합(Sumoylation)은 활성화(E1), 접합(E2) 및 라이게이션(E3) 효소화를 통한 일련의 반응을 통해 유비퀴틴을 접합시킬 수 있다. 유비퀴티네이션과 다른 대조적인 특성으로는 수모화는 짧은 콘센서스 서열 Ψ -K-X-E/D (Ψ 는 큰 소수성 아미노산; K는 라이신 억제터; X는 임의의 아미노산; E/D는 글루타메이트 또는 아스파테이트)이다 (Schmidt & Muller 2003).
- [0004] 유비퀴티네이션은 목적단백질의 프로테아소말(proteasomal) 분해와 일반적으로 관련되어있다. 반면 수모화는 전사 조절, 세포 주기 내의 시그널 트랜스덕션, DNA 복구, 핵 형성 및 서브-핵 컴파트먼트화와 같은 역할과 밀접히 관련되어 있다(Johnson 2004; Hay 2005). 이와 같은 경로는 효모와 동물세포 내에서 적절히 이해될 수 있다.
- [0005] 아라비도시스 게놈 내에서 수모화에 필요한 모든 성분은 생화학적 및 유전학적으로 특성지어져있다(Novatchkova et al. 2004; Colby et al. 2006). 이와 같은 성분은 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 식물 발달과 적응에 매우 중요한 요소이다(Saracco et al. 2007; Miura et al. 2009). 이와 유사하게, 수모화 경로는 벼 게놈에서도 코드화된다. 물론 아직까지 생화학적 유전학적 연구가 벼 게놈에 대해서는 완벽히 이루어지지 않았다.
- [0006] SUMO E3-리가아제는 SUMO를 E2 접합 효소로부터 기질로 특이적으로 전달하는데 중요한 역할을 한다. 이는 생체 내에서 수모화 경로에 있어서 매우 중요한 성분이다(Johnson 2004). 그러므로 SUMO E3-리가아제 활성을 모디피케이션시키는 것은 수모화에 의해 조절되는 일련의 경로에 대해 매우 중요한 충격을 가할 것으로 예측된다. 몇 종류의 SUMO E3-리가아제, 예를 들면 SIZ/PIAS, RanBP2, Pc2 및 HDAC4 등은 효모 및 포유동물에서 특성화되어져있다.
- [0007] 그러나 현재까지 오직 2개의 SUMO E3-리가아제, 즉 SIZ1과 HPY2 만이 아라비도시스 내에서 확인되었다. 또한 이와 같은 단백질은 SP-RING 구조 도메인을 포함하고 이는 SUMO E3-리가아제 활성에 영향을 주는 것으로 알려져있다. 아라비도시스 SIZ1은 원형 매달리언 PIAS(활성화 시그널 트랜스듀서 및 전사 활성화제의 저해 단백질)이고 또한 이의 구조는 SUMO E3-리가아제 계통의 효모 Siz (SAP 및 Miz)와 유사하다(Miura et al. 2005).
- [0008] 이와는 대조적으로, HPY2는 MMS21-형 효소, SP-RING 도메인만을 포함하는 불완전한 PIAS 단백질을 포함한다 (Ishida et al. 2009; Huang et al. 2009). 생화학적 및 유전학적 분석에 근거하여 스트레스-응답형 아라비도시스 내에서 SUMO 접합은 SIZ1 SUMO E3-리가아제에 의해 주로 매개된다. 수모화와 관련되어있는 스트레스로는 인산염 결핍, ABA 처리, 살리실산(SA)-의존적 병리학적 저항반응, 개화 시기 조절, 온도 내성 및 가뭄 및 추위 내성 등을 들 수 있다. 그러나 오직 4개의 수모화 관련 목적 단백질만이 확인되었다(Miura et al. 2005; 2007b; 2009; Yoo et al. 2006; Catala et al. 2007; Lee et al. 2007; Saracco et al. 2007; Jin et al. 2008).
- [0009] SIZ1은 아라비도시스 내에서 잘 특성화되었지만 다른 식물체 내에서 수모화에 있어서 SUMO E3-리가아제와의 관련성은 아직 밝혀져 있지 않다.
- [0010] 본 발명에서 본 발명자들은 벼에 있어서 여러 가지 스트레스에 대한 응답 반응이 수모화에 의해 조절됨을 발견

하고 이때 벼 내에 있어서 수모화 반응의 활성화에 필요한 SUMO E3 리가아제 활성 추정 물질인 OsSIZ1과 OsSIZ2 단백질을 분리하고 그 기능을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

[0011] 또한 본 발명자들은 OsSIZ1/-2는 SUMO E3 리가아제 활성을 지님과 동시에 핵에 편재되어 있음을 확인하였으며 SIZ1-넉아웃 아라비돕시스(atsiz1-2) 식물체 내에 OsSIZ1 또는 OsSIZ2 과발현을 위한 CaMV35S 프로모터를 포함하는 컨스트럭트에 의해 형질전환된 식물체는 아라비돕시스 SIZ1 활성화에 보완적인 기능을 지님을 확인하였다.

[0012] 또한 열 충격 스트레스에 의해 상기 아라비돕시스 형질전환체의 SUMO 접합이 증진되었다. 이와 같은 실험결과는 OsSIZ1 또는 OsSIZ2에 의한 SUMO 변형은 벼의 환경적 스트레스에 대한 순응 또는 보호에 중요한 역할을 함을 확인한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 벼에 있어서 여러 가지 스트레스에 대한 응답 반응이 수모화에 의해 조절되는지 여부를 측정하고, 이때 벼 내에 있어서 수모화 반응의 활성화에 필요한 SUMO E3 리가아제 활성 추정 물질인 OsSIZ1과 OsSIZ2 단백질을 분리하고 그 기능을 확인코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 목적은 벼 식물에서 유래된 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 OsSIZ1 단백질에 있어서, 상기 단백질 OsSIZ1은 i) DNA 결합에 관여하는 SAP 도메인(12?45번째 아미노산 잔기), ii) 식물 Siz/PIAS 단백질 내에만 존재하는 식물 호메오도메인-핑거(PHD) 도메인(116?167번째 아미노산 잔기), iii) 핵의 보존에 필수적인 PINIT 도메인(274?277번째 아미노산 잔기), iv) SUMO E3-리가아제 활성화에 필요한 SIZ/PIAS-RING (SP-RING) 도메인(360?412번째 아미노산 잔기) 및 v) SUMO 결합을 증진시키는 SXS 모티프(606?608번째 아미노산 잔기)를 포함함을 특징으로 하는 OsSIZ1 단백질을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또다른 목적은 벼 식물에서 유래된 서열번호: 2로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 OsSIZ2 단백질에 있어서, 상기 단백질 OsSIZ2는 i) DNA 결합에 관여하는 SAP 도메인(18?52번째 아미노산 잔기), ii) 식물 Siz/PIAS 단백질 내에만 존재하는 식물 호메오도메인-핑거(PHD) 도메인(124?177번째 아미노산 잔기), iii) 핵의 보존에 필수적인 PINIT 도메인(284?287번째 아미노산 잔기), iv) SUMO E3-리가아제 활성화에 필요한 SIZ/PIAS-RING (SP-RING) 도메인(370?422번째 아미노산 잔기) 및 v) SUMO 결합을 증진시키는 SXS 모티프(598?600번째 아미노산 잔기)를 포함함을 특징으로 하는 OsSIZ2 단백질을 제공하는 것이다.

[0016]

[0017] 상기 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질은 수모화 경로에 있어서 SUMO E3-리가아제 활성을 나타냄으로써 목적단백질에 대한 수모화를 활성화시킴을 특징으로 한다.

[0018] 한편 본 발명의 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질은 세포 내 핵에 편재되어있음을 특징으로 한다.

[0019] 또한 본 발명의 또다른 목적은 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질 발현을 통한 벼 식물의 스트레스 적응 방법에 있어서, 벼 식물 내에서 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질 발현을 통해 고온, 저온, NaCl 및 앱식산(ABA)과 같은 스트레스에 적응하기 위하여 고온 또는 앱식산 스트레스 시 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 강한 발현을 유도하여 목적단백질과 SUMO 접합을 활성화시키고, 저온, NaCl 스트레스 시는 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 약한 발현을 유도하여 목적단백질과 SUMO 접

합을 부분 활성화시킴으로써 벼 식물의 스트레스 적응방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 효과는 벼에 있어서 여러 가지 스트레스에 대한 응답 반응이 수모화에 의해 조절됨을 확인하고, 이때 벼 내에 있어서 수모화 반응의 활성화에 필요한 SUMO E3 리가아제 활성 추정 물질인 OsSIZ1과 OsSIZ2 단백질을 분리하고 그 기능을 확인한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 벼 SIZ1 및 SIZ2의 아미노산 서열 및 구조를 나타내는 도면이다. (a)는 SIZ 도메인 구조이다. 도메인은 I로 표시되는 N-말단 SAP(스캐폴드 부착인자 -A/B/ 아시너스/ PIAS); II로 표시되는 PHD(식물 호미오도메인); III로 표시되는 추정 PINIT 코어 도메인; IV로 표시되는 SP-RING(SIZ/PIAS-RING) 도메인; 및 V로 표시되는 SXS(Ser-X-Ser) 도메인이다. (b)는 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) (At)로부터 유래된 SIZ 단백질의 아미노산 서열, 벼(*Oryza sativa*) (Os)로부터 유래된 SIZ 단백질의 아미노산 서열을 나타낸다. 서열 동일부분은 검은 박스로 나타내었으며 유사 부분은 회색 박스로 나타낸다.

도 2는 OsSIZ1 및 OsSIZ2 발현을 RT-PCR 분석한 도면이다. 총 RNA는 각각의 조직으로부터 추출되었으며 이는 뿌리, 싹초 정단분열조직(shoot apical meristem), 재생 상태의 노드, 잎집(leaf sheath), 잎새(leaf blade) 및 꽃이다. 벼 액틴(OsActin2)이 대조물질로 사용되었다.

도 3은 OsSIZ1과 OsSIZ2의 세포 내 국소화를 나타낸 도면이다. (a)는 벼 원형의 일시적 발현을 위한 컨스트럭트의 개략도이다. CaMV35S, 칼리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터; sGFP, 녹색형광단백질; RFP, 적색형광단백질; NLS, 핵 국소화 시그널; Nos T, 노팔라인 신타제 유전자 터미네이터 등으로 구성되어 있다. (b)는 GFP와 SIZ를 융합시킨 컨스트럭트와 NLS::RFP 컨스트럭트의 동시 발현을 나타낸다. 2개의 컨스트럭트 OsSIZ1::GFP와 NLS::RFP 또는 OsSIZ2::GFP와 NLS::RFP가 원형 벼에 각각 형질전환 되었다. 시그널은 형광현미경을 통해 관찰하였으며 노란색은 핵 내의 동시 편재화를 나타낸다. 스케일 바는 20 μ m를 나타낸다.

도 4는 벼 식물체내에 여러 종의 스트레스로 유발된 SUMO 접합체의 확인을 나타내는 도면이다. (a)는 여러종의 스트레스에 의해 유도된 SUMO 접합체를 나타낸다. 각각의 레인은 10일 지난 벼 묘목에서 추출된 총 단백질 20 μ g을 적하하고 45°C의 열, 4°C의 추위, 250 mM NaCl 및 100 μ M ABA에 노출시킨다. 벼 묘목은 스트레스 처리 후 적당한 시간간격으로 채취되었으며 조추출물을 SDS-PAGE 상에 놓고 AtSUMO-1에 대한 항체를 사용하여 면역분석하였다. 상기 항체는 OsSUMO1과 OsSUMO2를 검출할 수 있다. (b)는 벼 식물체의 스트레스 처리 후에 유발 마커 유전자의 발현 프로파일이다. 벼 액틴(OsActin2)이 일정한 발현을 나타내는 대조군으로 사용되었다.

도 5는 OsSIZ1 및 OsSIZ2에 의해 유발되는 AtSUMO1-단백질 접합체의 축적을 나타낸 것이다. 담배(*N. benthamiana*) 잎에 AtSIZ1, OsSIZ1 또는 OsSIZ2 함께 침투되었으며 플래그 태그 AtSUMO1의 존재를 (+)로 나타내었고 부존재를 (-)로 나타내었다. 접종 3일 후에 총단백질 추출되었으며 AtSUMO1-단백질 결합체를 검출하기 위해 항-플래그 항체를 사용하였다.

도 6은 *siz1* 변이 식물체 내의 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 발현을 보완함을 나타냄을 도면이다. (a)는 OsSIZ1을 발현시키는 *atsiz1-2* 식물체의 발현 원형이다. (b)는 OsSIZ2를 발현시키는 *atsiz1-2* 식물체의 발현 원형이다. 총 RNA는 5주령 식물체로부터 추출되었으며 유전자특이 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 사용하였다. 튜블린이 DNA 주형의 양을 일반화시킬 수 있는 내부 대조 물질로 사용되었다. (c)는 OsSIZ1 또는 OsSIZ2를 발현시키는 잎의 형태를 나타낸다. 잎들은 각각 한 줄로 정렬시켰으며 *atsiz1-2* 변이 아라비돕시스 내의 OsSIZ1 및 OsSIZ2를 발현시키는 식물체를 Col-0, *siz1-2* 및 벡터 대조군과 비교하였다. (d)는 (c)에서 나타난 잎의 길이에 대한 통계적 분석을 나타낸다. 각각의 열에 가장 큰 잎의 길이를 측정한다. 이 데이터는 3번 실험하여 잎 길이에 관한 각각의 형질전환 식물체의 길이를 %로 나타낸다. *atsiz1-2*(asterisk 표시)로부터 유의적인 차이를 나타낸다.

도 7은 OsSIZ1의 OsSIZ2 보완에 의한 *siz1-2*의 ABA 과민감성 억제를 나타내는 도면이다. 야생형 (*col-0*), *siz1-2* (*atsiz1-2*) 및 각각의 보완된 라인 (OsSIZ1 #97-3 및 OsSIZ2 #41-7)의 씨앗을 ABA 첨가된 또는 첨가되지 않은 MS 배지에 파종시킨다. (a)는 0.75 μ M ABA 첨가 또는 비첨가한 배지에서 10일 후 묘목의 떡잎 성장을 나타낸다. (b)는 파종 후 7일 후에 묘목의 발아 속도를 나타낸다. 녹색 떡잎의 수를 세고 측정한다. 데이터는 3

변의 독립적 실험의 평균치를 나타내며 녹색 먹잎의 묘목의 비율을 나타낸다. 유의적 차이가 *atsiz1-2* (asterisk 표시)에서 나타난다.

도 8은 *siz1-2* 묘목에서 열충격으로 유발된 SUMO 접합은 OsSIZ1과 OsSIZ2를 각각 요구함을 나타내는 도면이다. 10일 후의 묘목 Col-0 (야생형), *siz1-2* (*atsiz1-2*), 벡터 및 각각의 보완 라인 (OsSIZ1으로 보완된 #1-11, #8-2 및 #97-3 및 OsSIZ2으로 보완된 #22-3, #35-10, #41-7)을 암소에서 39℃로 30분간 열충격에 노출시킨다. 열 충격 처리한 묘목(b)와 처리시키지 않은 묘목(a)으로부터 총 단백질을 추출한다. 20 μ g의 단백질을 SDS-PAGE를 위해 로딩시키고 항-AtSUMO1 항체를 프로브로 하여 면역분석한다. 아라비도시스 튜블린 유전자(Tubulin)를 형질전환 식물체 내의 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 발현을 나타내는 대조 물질로 사용한다.

도 9는 여러종의 환경 스트레스 및 호르몬 처리에 대한 OsSIZ1 및 OsSIZ2 발현 패턴을 RT-PCR 분석한 도면이다. (a)는 각종의 비생물학적 스트레스에 대한 OsSIZ1 및 OsSIZ2 유전자의 발현 패턴을 나타낸다. 총 RNA는 10일 후의 묘목에서 추출되었으며 각각의 묘목은 추위(4℃에서 12 시간 또는 24 시간), 0.1 mM ABA (4 시간), 400 mM NaCl(4 시간) 또는 가뭄으로 처리한 후 주형으로서 cDNA 가닥에 특이적인 프라이머를 사용하였다. OsActin2 전사체의 RT-PCR 산물이 정량분석을 위한 대조군으로 사용되었다. (b)는 벼 블라스트 균 감염에 의한 생물학적 스트레스에 반응하는 OsSIZ1 및 OsSIZ2 유전자 발현 패턴을 나타낸다. 벼 블라스트에 배합불가(KJ401) 또는 배합가능(KJ101) 균주를 1×10^5 스포어/ml 접종하고 총 RNA를 추출한다. (c)는 각종 호르몬에 의한 OsSIZ1 및 OsSIZ2 유전자의 발현 패턴을 나타낸다. 총 RNA는 10일 후의 묘목에서 분리되었으며 각각의 묘목은 1% DMSO(디메틸 술폰사이드), 1 μ M NAA(나프탈렌아세트산), 1 μ M BR(브라시노스테로이드), 1 μ M 키네티ن, 10 μ M GA(기벨레린), 10 μ M ACC(1-아미노사이클로프로판-1-카르복실산), 0.1 mM ABA(앱식산), 50 mM JA(자스몬산) 및 50 mM SA(살리실산)에 각각 처리하였다.

도 10은 담배 상피세포 내의 OsSIZ1과 OsSIZ2의 세포 내 국소화를 나타내는 도면이다. (a)는 일시적 발현을 위한 컨스트럭트를 나타낸다. SIZ cDNA가 CaMV35 프로모터 조절하에 담배 상피세포 내에서 일시적으로 발현된다. 각각의 심볼은 다음을 의미한다: CaMV35S는 칼리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터를 의미한다; smGFP는 녹색형광단백질을 의미한다; RFP는 적색형광단백질을 의미한다; NLS는 핵 편재 시그널을 의미한다; TNos는 노팔 라인 신타제 유전자 터미네이터를 의미한다; HPT는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자를 의미한다. (b)는 OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질의 세포 내 편재화를 나타낸다. 담배 상피세포 내에 아그로박테리아를 함유하는 2개의 컨스트럭트 OsSIZ1::GFP와 NLS::RFP 또는 OsSIZ2::GFP와 NLS::RFP에 각각 침투시켰다. 일시적 형질전환된 담배 상피세포는 형질전환 후에 형광 현미경에 의해 측정되었다. 밝게 빛나는 부분의 이미지는 밝은 영역의 필터를 사용하여 얻어진 것이고 녹색 및 적색이미지는 GFP 및 RFP 시그널을 이용하여 각각 얻어진 것이다. GFP와 RFP가 함께 편재된 곳은 노랑게 나타난다. 상기 융합 컨스트럭트는 3개의 각각의 형질전환 실험에 사용된다.

도 11은 AtSUMO1 및 OsSUMO1에 대한 항-SUMO1 항체의 교차 반응성을 나타내는 도면이다. (a)는 항-SUMO1 항체를 지닌 벼와 아라비도시스 내의 유리 SUMO를 검출한다. 아라비도시스(*col-0* 및 *atsiz1-2*) 및 벼(야생형 및 *Ossiz1*)의 2주령 묘목이 사용된다. 벼 묘목은 45℃에서 1시간동안 열충격에 노출된다. 얻어진 조추출물은 SDS-PAGE에 사용되고 항-SUMO1 항체를 사용하여 면역분석 한다. (b)는 항-SUMO1 항체를 지닌 AtSUMO1 및 OsSUMO1 변이체의 인식을 나타낸다. 재조합된 GST 또는 히스 융합 AtSUMO1 및 OsSUMO1 단백질이 대장균에서 발현되었다. 이를 SDS-PAGE로 분리한다. 항-SUMO1 및 항-GST 항체를 각각 사용하여 면역분석을 행한다. (c)는 항-SUMO1 항체를 지닌 담배의 일시적 발현 시스템 내의 AtSUMO1 및 OsSUMO1의 인지를 나타낸다. 담배잎은 플래그 태그 AtSUMO1 및 OsSUMO1으로 침투시킨다. 총 단백질은 추출되고 SDS-PAGE를 행하며 항-플래그 및 항-SUMO1 항체를 각각 이용하여 면역분석을 행한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 수모화(Sumoylation)는 진핵 생물체의 다양한 세포 경로에서 번역 후 조절 경로의 하나이다. 이는 SUMO(작은 유비퀴틴-유사 모디파이어) 단백질의 접합/탈접합을 통해 다른 단백질로서 그 기능을 변형시키는 과정이다. PIAS(활성화된 STAT[시그널 트랜스듀서 및 전사 활성화제])의 단백질 저해제/SIZ 단백질은 SUMO E3-리가아제 활성화를 나타낸다. 이를 통해 SUMO 단백질의 목적 기질에 대한 접합을 용이하게 한다.

[0023] 이를 통해 본 발명자들은 아라비도시스 SIZ1의 벼 호몰로그인 *Oryza sativa* SIZ1 (OsSIZ1) 및 SIZ2 (OsSIZ2)의 분리 및 분자적 특성을 보고하였다. 벼 SIZ 단백질은 핵에 편재되었으며 담배 시스템 내에서 수모화 활성을 나

타내었다.

[0024] 본 발명자들은 SUMO 접합의 증가는 벼 식물체 내에서 고온, 저온, NaCl 및 ABA와 같은 환경적 스트레스에 관련되어 있음을 확인하였다. 넉아웃 *siz1-2* 아라비도시스 식물체 내의 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 과발현은 형태학적으로 아라비도시스 넉아웃 변이체의 특성을 보완시키며, 열 충격 조건 하에서 SUMO 접합의 수준을 증가시킴을 확인하였다.

[0025] 또한 넉아웃 *siz1-2* 아라비도시스 씨앗 발아의 ABA-과민감성은 OsSIZ1 및 OsSIZ2에 의해 부분적으로 억제되었다. 이와 같은 결과는 벼 SIZ1 및 SIZ2가 아라비도시스 SIZ1과 SUMO 접합 경로에 있어서 기능적으로 보완적임을 나타낸다. 아라비도시스 변이체를 통한 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 발현에 따른 효과는 이들 단백질이 스트레스 응답과 스트레스 적응에 관련되어 있음을 암시한다.

[0026] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0027] OsSIZ1 및 OsSIZ2의 1차 구조와 발현 패턴

[0028] AtSIZ1은 PIAS 타입의 SUMO E3-리가아제의 원형이다. 이는 호르몬에 응답하는 식물체의 조절작용과 병원체 방어 작용 및 발화 조절 작용에 관련되어 있다(Miura et al. 2007a; Catala et al. 2007; Miura et al. 2009). 벼 SUMO E3-리가아제의 생물학적 역할을 조사하기 위해 Rice Genome Annotation Project BLAST Search (<http://rice.plantbiology.msu.edu/blast.shtml>) 데이터베이스를 이용하여 AtSIZ1과의 cDNA 상동성을 조사하였다. OsSIZ1 (LOC_Os05g03430) 및 OsSIZ2 (LOC_Os03g50980)의 추정 발현 유전자 cDNA 서열과 2종의 유전자가 일치함을 나타낸다. 2 종의 SIZ 유전자는 875 및 813개의 아미노산 길이를 지니는 단백질을 벼에서 발현할 수 있는 유전자로서 각각의 분자량은 97kDa 및 90kDa이다(Suzuki et al. 2009; 도 1b).

[0029] OsSIZ의 추정 아미노산 서열은 AtSIZ1 유전자 내에 보존된 4개의 예측 도메인을 포함한다. 또한 아라비도시스 내에서 이 서열과 유사한 PINIT 코어 모티프가 확인되었다(Miura et al. 2007a; Suzuki et al. 2009).

[0030] 5개의 예측 도메인 구조는 i) DNA 결합에 관여하는 SAP 도메인, ii) 식물 Siz/PIAS 단백질내에만 존재하는 식물 호메오도메인-핑거(PHD) 도메인, iii) 핵의 보존에 필수적인 PINIT 도메인, iv) SUMO E3-리가아제 활성화에 필요한 SIZ/PIAS-RING (SP-RING) 도메인, v) SUMO 결합을 증진시키는 SXS 모티프 등이다. 이와 같은 도메인은 도 1(a)에 나타낸다. OsSIZ1과 OsSIZ2의 AtSIZ1 아미노산 서열과의 비교는 각각 51% 및 43%의 상동성을 나타낸다. 이는 도 1(b)에 나타낸다.

[0031] OsSIZ1과 OsSIZ2가 조직 특이성 발현을 나타내는지 여부를 결정하기 위해 여러 종의 벼 조직 내에서 이들 발현 수준을 측정하였다. 도 2에 나타난 바와 같이 OsSIZ1과 OsSIZ2의 전사체가 벼의 모든 조직에서 검출되었으나 뿌리에서는 낮은 정도로 검출되었다. 또한 본 발명자들은 OsSIZ 유전자의 발현이 생물학적, 비생물학적 및 호르몬 자극에 대한 반응으로 유발될 수 있는지를 조사하였다. 그러나 이들 중 어떠한 처리도 OsSIZ 유전자의 전사체를 유발하지 못하였다.

[0032] 핵 내의 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 편재

[0033] 대부분의 수모화 과정이 동물과 효모의 핵에서 발생하고 여기에서 이들 반응은 다양한 세포 과정에 영향을 준다

(Matunis et al. 1996; Johnson & Blobel 1999; Hardeland et al. 2002; Geiss-Friedlander & Melchior 2007; Martin et al. 2007). 아라비도시스 SIZ1이 핵 내에 편재되어있음은 이미 알려져있으며 이들은 핵의 반점에 의해 부분화되어져왔다. 이는 또한 PIAS 단백질로 알려져있다(Miura et al. 2005; Cheong et al. 2009).

[0034] OsSIZ1과 OsSIZ2의 벼 식물체 내에서 세포 내의 편재를 확인하기 위해 벼 원형에 녹색형광단백질과 적색형광단백질의 레포터 유전자를 융합시킨 컨스트럭트를 사용하였다. 녹색형광단백질 서열이 OsSIZ1과 OsSIZ2의 cDNA C 말단에 CaMV35S 프로모터 조절하에 융합되었다(도 3a). 각각의 카이메릭 OsSIZ1/-2::GFP 컨스트럭트는 진정한 핵 편재마커를 나타내는 NLS::RFP 컨스트럭트와 함께 벼 원형에 도입되었다. 헤테로고스 시스템을 사용하여 외자엽/쌍자엽 차이점을 측정 모니터링하기 위하여 녹색형광단백질 융합 컨스트럭트를 담배 표피세포에서 발현시킨다(도 10). 또한 아라비도시스 원형에서도 발현시킨다. OsSIZ1/-2::GFP 시그널이 세포 내의 분포에 따라 NLS::RFP 적색형광시그널과 함께 명확하게 오버래핑되었다. 이는 OsSIZ1/2가 핵에 편재됨을 나타낸다(도 3b).

[0035] 벼 식물 내의 스트레스 유발 SUMO 접합체의 추적

[0036] AtSUMO1의 서열과 87% 아미노산 상동성을 지닌 AtSUMO2 단백질에 폴리클론 AtSUMO1 항체를 교차 반응시킨다(Atcam5316; Kurepa et al. 2003). OsSUMO1과 OsSUMO2의 아미노산 보존 서열은 AtSUMO1과 각각 89% 및 84%의 상동성을 지닌다. 이는 AtSUMO1 항체가 벼 단백질과 교차 반응할 수 있는 가능성을 나타낸다. 항-AtSUMO1 항체를 사용하여 벼 및 아라비도시스 조추출물에서 SUMO를 검출하려할 때 항-AtSUMO1 항체로 벼와 아라비도시스 모두에서 풍부한 14 kDa 단백질을 인지한다(도 11a). 이 단백질은 벼에서 OsSUMO1과 OsSUMO2가 제거된 것 같이 보인다. 또한 항-AtSUMO1 항체로 대장균과 담배 잎에서 발현되는 AtSUMO1과 OsSUMO1 단백질 형질전환체를 인지한다(도 11b, 도 11c). 이러한 결과는 항-AtSUMO1 항체가 벼에서 OsSUMO1과 교차 반응됨을 나타내는 것이며 항-AtSUMO1 항체는 OsSUMO1에 특이적인 것으로 예측된다.

[0037] 본 발명에서 비생물학적 스트레스 처리를 통한 수모화 반응 프로파일의 변화를 측정하기 위해 고온(45°C), 저온(4°C), 고염(NaCl) 및 ABA로 처리한 표본으로부터 총 단백질을 추출하였다. AtSUMO1 항체를 이용한 면역분석은 스트레스 처리후에 접합체의 증가를 나타낸다(도 4a). 유사한 수모화 반응패턴이 아라비도시스에서 열충격후에 보고되었다(Kurepa et al. 2003). 본 발명자들은 벼에 여러 종의 스트레스 처리를 통한 발현 마커를 사용하였다(도 4b). SUMO 접합체는 열 또는 ABA 처리된 벼 표본에서 강하게 유도되었으나 추위 또는 NaCl 처리에 있어서는 약하게 유도되었다. 그러나 벼 표본에 1시간 동안 증가된 H₂O₂ 농도를 처리하였을 때 SUMO 접합체는 거의 변화되지 않았다. 이와 같은 행태는 아라비도시스와는 상이한 것이며 이는 벼의 수모화를 위한 다른 SUMO 단백질의 존재 또는 시간의존적 반응 패턴의 상이함을 의미하는 것이다.

[0038] SUMO E3-리가아제로서 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 기능

[0039] OsSIZ1과 OsSIZ2가 SUMO E3 리가아제와 같이 작용할 수 있는지 여부를 측정하기 위하여 플래그-태그 AtSUMO1과 결합시킨 OsSIZ1 또는 OsSIZ2 컨스트럭트를 담배잎에 아그로박테리움을 매개로 일시적인 형질전환과 발현을 위해 함께 잠입시켰다. 벼 SIZ는 각각 35S CaMV 프로모터의 조절하에 발현되었다. 아라비도시스 내의 SUMO E3 리가아제인 AtSIZ1과 플래그-AtSUMO1을 SUMO 활성화의 비교를 위한 대조군으로 함께 잠입시킨다. 담배잎으로부터 제조된 총 단백질 추출물은 SDS-PAGE에 의해 분리되었고 플래그-AtSUMO1 단백질을 인식하는 항-플래그 안티세럼과 함께 면역분석시킨다. 도 5에 나타난 바와 같이 AtSUMO1, AtSIZ1, OsSIZ1 또는 OsSIZ2를 단독으로 발현시켰을 때 고분자량 영역에서 수모화의 정도는 실질적으로 낮아진다. 그러나 AtSIZ1, OsSIZ1 또는 OsSIZ2를 AtSUMO1과 함께 발현시켰을 때 고분자량 영역에서 수모화는 상당히 증가하였다(도 5). 이는 OsSIZ1과 OsSIZ2가 모두 SUMO E3 리가아제로 작용될 수 있음을 암시하는 것이다. 또한 OsSIZ1의 수모화 활성화는 OsSIZ2 또는 AtSIZ1의 활성화보다 높음을 입증하였다. 이와 같은 결과는 OsSIZ1이 벼 식물체 내의 주요한 SUMO E3 리가아제로 작용할 수 있음을 나타낸다.

[0040] OsSIZ1과 OsSIZ2는 *atsiz1-2*를 부분적으로 보완한다

[0041] OsSIZ1과 OsSIZ2의 기능을 더욱 이해하기 위하여 CaMV35S 프로모터 조절하에 OsSIZ1 및 OsSIZ2 유전자를 함유하는 형질전환 아라비도시스 *siz1-2* 식물체를 조립하였다. *siz1-2* 식물체 내에서 OsSIZ 단백질이 발현될 때 *atsiz1-2*의 형태학적 원형은 흙에서 5주간 성장시킨 식물체 내의 OsSIZ1 및 OsSIZ2에 부분적으로 보완적이다(도 6a, b). 도 6의 c에 나타난 바와 같이 *atsiz1-2* 원형은 잎이 켄 모양 또는 적은 길이의 왜소증을 나타내지만 형질전환 아라비도시스 식물체인 OsSIZ1(#97-3) 및 OsSIZ2(#41-7)에서는 부분적으로 성장하였다. 또한 OsSIZ1/-2 형질전환 아라비도시스 식물체의 잎 길이는 각각의 식물체의 최대 잎을 관찰할 때의 크기를 기준으로 15% 내지 27% 정도 증가되었다(도 6d). 이는 AtSIZ1이 씨앗 발아 및 씨앗 성장시 앱식산(ABA) 시그널링을 음성적으로 조절한다는 것이다. OsSIZ1과 OsSIZ2의 발현이 ABA 과민감성 원형 *atsiz1-2*에 기능적으로 보완적임을 측정하기 위하여 형질전환 아라비도시스 OsSIZ1(#97-3)과 OsSIZ2(#41-7)에 ABA 외인성 적용에 대한 반응을 시험하였다. 도 7에 나타난 바와 같이 ABA를 포함하지 않는 배지에서 성장하는 식물체에서는 *atsiz1-2* 및 OsSIZ1/-2 형질전환 식물체의 발아와 묘목 성장은 차이를 나타내지 않았다. 그러나 ABA가 보충된 배지에서는 OsSIZ1/-2 묘목은 *atsiz1-2* 묘목에 비해 ABA에 덜 민감하였다. 이때 OsSIZ1/-2 묘목은 야생형보다는 더 민감하였다(도 7a, b). 이와같은 관찰은 OsSIZ1과 OsSIZ2에 의해 *atsiz1-2*에서 나타난 형태학적 원형이 부분적으로 보완적임을 나타낸다. 이와같은 결과는 OsSIZ1/-2 단백질이 아라비도시스 내의 SIZ1에 부분적으로 보완적인 기능을 지님을 의미하는 것이다.

[0042] *siz1-2* 식물체 내에서 발현된 OsSIZ1 또는 OsSIZ2 내의 열 충격으로 유발된 SUMO 접합체

[0043] 종전의 연구는 아라비도시스에서 열충격으로 수모화를 유도한다고 알려져있으며 아라비도시스 *siz1-2* 묘목은 이보다 낮은 정도임이 알려져 있다(Kurepa et al. 2003; Yoo et al. 2006). 본 발명에서 SUMO 접합체가 열처리된 묘목에서 강하게 유발됨을 나타낸다(도 4a). 열 스트레스에 의해 유도되는 SUMO E3-리가아제 활성을 OsSIZ1과 OsSIZ2가 나타내는지 측정하기 위해 항-SUMO1 항체를 대조군으로 사용하여 열처리된 OsSIZ1/-2 형질전환 아라비도시스 식물체를 면역분석 하였다. 도 8에 나타난 바와 같이 SUMO 접합체는 열충격후에 벡터 및 *atsiz1-2* 묘목에 비해 OsSIZ1/-2 묘목에서 증가되었다. 물론 OsSIZ1/-2 내의 SUMO 접합체의 정도는 *col-0*에 비해 낮았다. OsSIZ 모두에 의해 전사된 양은 열충격 처리 후에 변화되지 않았다. 이와는 무관하게 SUMO 접합체 생성물은 전사체와 상호 연관적이며 모든 OsSIZ의 높은 발현 라인(#97-3 및 #41-7)에서 측정되었다. 반면 상당히 낮은 축적이 낮은 발현라인(#1-11 및 #22-3)에서 열 처리후에 측정되었다(도 8b). 이러한 결과는 OsSIZ1/-2의 활성 조절은 환경 스트레스 후에 전사 변화에 의한 것이 아니라 단백질 수준의 조절에 의한 것임을 암시한다. 또한 이와같은 결과는 OsSIZ1과 OsSIZ2가 식물체 내에서 SUMO E3 리가아제 활성을 포함함을 나타내는 것이다.

[0044] 수모화는 진핵생물체에서 스트레스 응답, 전사조절 및 게놈 기능유지에 관련되어있다. 그러나 동물 및 효모세포에서 상당한 연구가 이루어진 반면 식물체 내에서는 오직 아라비도시스에서만 연구가 진행되어 왔다. 특히 벼와 같은 작물종에 있어서 수모화의 생물학적 기능의 조서와 특정화는 크게 부족하다. 우리는 벼(*Oryza sativa*)에서 2 종류의 SIZ 유전자, 즉 OsSIZ1과OsSIZ2를 아라비도시스 SIZ1의 상동성에 근거하여 분리하였다. 이 2개의 단백질은 5개의 추정 도메인(SAP, PHD, PINIT, SP-RING 및 SXS 도메인)을 포함하는 SIZ/PIAS-형 SUMO E3-리가아제를 코드화하며 보존된 SIZ/PIAS SUMO E3-리가아제 영역을 지닌다 (도 1a). 또한 이와같은 벼의 추정 SUMO E3-리가아제는 다른 SIZ/PIAS 단백질에 존재하는 핵 보지를 위한 PINIT 핵 모티프를 포함한다(도 1a, b). SIZ와 수모화 경로에 대한 환경적 깊음 연구가 행해진다면 AtSIZ1과 같은 벼 단백질은 환경적 자극에 반응할 것으로 예측되나 복사된 SIZ 상동체의 존재만으로는 이와같은 사실을 확인하기는 어렵다.

[0045] 벼 식물체내의 OsSIZ1/-2 유전자의 발현 패턴을 검증하기 위해 여러 조직으로부터 분리된 RNA를 사용하여 RT-PCR 분석을 행하였다(도 2). OsSIZ1/-2 유전자는 여러 조직에서 발현되었으나 뿌리에서는 낮은 정도로 발현되었다. 또한 생물학적, 비생물학적 및 호르몬 자극에 대한 OsSIZ1/-2 유전자의 발현 수준을 측정하였다. 그러나 본

발명자들은 이와 같은 처치에 유발되는 획기적인 발현 전사는 관측되지 않았다(도 9). 따라서 OsSIZ1/-2의 활성은 전사 시 수준보다 전사 후 수준에 의해 조절되는 것이다. OsSIZ1과 OsSIZ2는 AtSIZ1 단백질에 존재하는 모든 보존된 도메인을 포함한다. 이는 OsSIZ1과 OsSIZ2가 AtSIZ1과 같이 SUMO E3 리가아제 활성을 나타내는 것을 확립할 수 있는 것이다. 본 발명자들은 OsSIZ1과 OsSIZ2가 실제로 담배 일시적 발현 시스템내에서 수모화를 나타냄을 SUMO 에세이를 통해 측정하였다(도 5). 이 결과는 OsSIZ1과 OsSIZ2가 벼 식물체 내에서 SUMO E3-리가아제와 같은 기능을 나타냄을 확인한다. OsSIZ1/-2의 핵 내 편재를 벼 원형과 담배 표피세포를 통해 확인하였다(도 3 및 도 10). 이는 많은 전사요소가 SIZ/PIAS 단백질에 의해 매개되는 SUMO 접합의 직접적 타겟임을 의미한다. SUMO 접합은 활성화, 억제 또는 단백질 안정화를 통해 전사 요소 기능에 영향을 줄을 나타낸다. 아라비돕시스 내에서 SIZ1의 타겟으로 PHR1, ICE1, ABI5 및 FLD와 같은 전사요소가 확인되었다. 이들 전사요소는 낮은 인산염 및 낮은 온도조건 하에서 유전자 발현을 변형시켜 ABA에 반응하고 개화시기를 조절한다. 본 발명의 결과는 SIZ 의존 SUMO 접합을 통한 OsSIZ1과 OsSIZ2의 핵 국소화는 관련되어있으며 아라비돕시스 상동체와 같이 다양한 환경 조건에 응답하여 전사 인자를 조절하는 것이다.

[0046] 세계적인 작물중의 하나인 벼는 영양 결핍, 열, 추위, 가뭄, 침수 또는 병원체와 같은 환경적 스트레스에 종종 노출되어있다. 아라비돕시스 내에서 고온, H₂O₂ 또는 에탄올에 응답하여 SUMO 접합이 증가하는 것은 이미 밝혀져 있다(Kurepa et al. 2003). 또한 SIZ1은 인산염 결핍 응답, 추위 저항, 기본 열 저항, 살리실산 의존 병원체 방어 및 개화시기 조절에 중요한 수모화인자 중에 하나로 알려져 있다 (Miura et al. 2005; 2007b; Yoo et al. 2006; Lee et al. 2007; Jin et al. 2008).

[0047] 그러므로 본 발명자들은 항-SUMO1 안티세럼을 사용하여 생체 내에서 열, 추위, NaCl 및 ABA 처리를 포함하는 각종 스트레스에 대한 벼 모목의 SUMO 접합체의 활성 패턴을 분석하였다(도 3a). SUMO 접합체는 H₂O₂ 처리 후 1시간 후에는 농도를 50mM까지 증가시켜도 거의 반응을 나타내지 않았으나 고온 및/또는 ABA 처리 후에는 벼 모목에서 강한 접합체 증가 패턴을 나타내었으며 상대적으로 추위 또는 NaCl 처리에는 낮게 반응하였다. 이와 같은 결과는 벼 식물체의 수모화는 적대적인 환경조건 하에서 적응하기 위한 일련의 반응의 일부로 판단되고 환경적 스트레스에 반응하는 중요한 역할을 함을 나타낸다.

[0048] SIZ1은 SAP, PINIT, SP-RING 및 SXS 도메인을 포함하는 SIZ/PIAS-형 단백질의 모든 원형 도메인을 포함하는 유일한 아라비돕시스 단백질이다. siz1을 녹아웃시킨 변이식물체는 잎의 컬링과 짧은 잎폭지를 지닌 드와프(dwarf) 형질의 잎을 나타낸다(Miura et al. 2005; Lee et al. 2007; Catala et al. 2007). 그러므로 본 발명자들은 CaMV35S 프로모터 조절하에 OsSIZ1/-2 컨스트럭트를 조립하였고 이 컨스트럭트로 atsiz1-2 변이 식물체에 형질전환시켜 아라비돕시스 내에서 OsSIZ1/-2의 SUMO E3-리가아제 원형 기능을 조사하였다(도 6 및 7). 그 결과 atsiz1-2의 형태학적 형질과 ABA 민감성은 OsSIZ1과 OsSIZ2 모두에 의해 부분적으로 보완되었다. OsSIZ1/-2가 생체 내에서 SUMO E3-리가아제 기능을 지닌다는 또 다른 증거는 처리하지 않거나 OsSIZ1/-2 형질전환 아라비돕시스 식물체를 열처리한 조건하에 항 SUMO1 항체를 사용함으로써 SUMO 접합체를 유발시키는 분석을 통해서도 알 수 있다. CaMV35S 프로모터 조절하에 OsSIZ1 또는 OsSIZ2를 과발현시키는 형질전환 atsiz1-2 식물체는 SUMO 접합체 수준을 증가시켰으며 열충격 처리에 응답하여 OsSIZ1과 OsSIZ2 식물체 각각의 라인에서 관측된 전사 수준과 관련된 증가를 나타내었다 (도 8). 또한 벼 내의 SUMO E2 효소인 OsSce1의 전사수준은 열충격 처리에 의해 함께 증가하였다.

[0049] 결론적으로 본 발명자들은 벼 식물체 내에서 OsSIZ1과 OsSIZ2의 SUMO E3-리가아제 기능을 확인하였다. 본 발명은 아라비돕시스 내에서 OsSIZ1과 OsSIZ2의 과발현에 의한 atsiz1-2 원형의 부분적 보완임을 나타낸다. 이들 유전자는 여러종의 스트레스 조건하에서 조절된 SUMO E3-리가아제 활성을 나타내었으며 모든 조직에서 거의 비슷한 수준을 발현하였다. 따라서 OsSIZ1/-2는 환경 스트레스에 대해 벼 식물체의 보존 및 적응을 위해 매우 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. SIZ/PIAS-형 SUMO E3-리가아제 모두는 벼 식물체 내에서 생물학적 활성을 나타내었으며 쌍자엽/단자엽 모두에 실질적으로 환경적으로 진화, 보존된 기능을 나타낸다. 벼 식물체내의 OsSIZ1/-2 기능을 더욱 확인하기 위해 T-DNA 태그 변이체 라인을 사용하여 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 기능을 분석하였다. 이와같은 실험은 벼 식물체내에서 호르몬 및 환경적 반응에 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 조절적 기능을 명백히

한다.

[0050] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0051] (실시예 1) 식물 원료 및 성장 조건

[0052] 아라비도시스 탈리아나 콜럼비아-0(Arabidopsis thaliana Columbia-0) (Col-0)가 사용되었다. 씨앗은 살균되고 4℃에서 3일간 계층화되고 Murashige 및 Skoog 기초염 혼합물, 3% 수크로스, 2.5 mM MES, pH 5.7 및 0.8% 한천 또는 흙을 함유한 펠트리 플레이트내의 배지에서 발아되었다. 식물체는 22℃에서 16/8 명/암 조건으로 성장되었으며 광 강도는 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이고 상대 습도는 58~80%이었다. 벼(Oryza sativa L. cv. Dongjin)이 원형질체 분리를 위해 사용되었고 현탁 세포 배양되었다. 벼 현탁 세포 배양은 30℃에서 연속적인 광 하에서 130 rpm으로 교반시키면서 인큐베이션시킨다.

[0053] (실시예 2) RNA 분리와 RT-PCR

[0054] 총 RNA 는 TRIZOL 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 제조자 프로토콜에 의해 아라비도시스 또는 벼 묘목으로부터 분리되었다. 이때 수득된 총 RNA는 DNase I(디옥시리보뉴클레아제 I, Sigma)로 실온에서 15 분간 처리하고 70 μl 에서 10분간 처리하였다. RT-PCR 분석을 위해 cDNA 첫 번째 가닥이 ReverTra Ace 역전사 효소(100 unit/ml, TOYOBO)로 합성되었으며 이때 25 μl 의 반응 혼합물 중에는 2 μg 의 총 RNA를 포함하고 올리고 (dT)20 프라이머를 포함한다. 역전사 반응은 제조자 지침에 의해 수행되었으며 하기 표 1에 나타난 프라이머를 이용하여 EF-Taq DNA 중합효소(2.5 unit/ml, Solgent)를 사용하여 이미 기술한 (Lee & An 2009) 방법에 의해 RT-PCR 분석을 수행하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 2분간 95℃에서 예열시킨 후 95℃에서 30초간 22 또는 25 회 사이클링을 통해 변성시키고 57℃에서 30초간 어닐링 시킨 후 또다시 72℃에서 30초간 연장시킨다. 이어서 최종 10분간 연장시킨다. PCR 생성물의 각각의 알리쿼트는 아가로스 겔 상에 분리시키고 자외선 하에서 에티딘 브로마이드를 통해 시각화시킨다. 아라비도시스 튜블린(Arabidopsis tubulin) 또는 벼 액틴(rice actin) 유전자가 내부대조군으로 사용되었다.

표 1

[0055] 본 발명의 RT-PCR에 사용된 프라이머 쌍

프라이머 명칭	서열 (5'→3')
OsSIZ1-F	TTGGCTTAGCACCAATGACTA (서열번호: 3)
OsSIZ1-R	ACAGAGTCGAGGCCTAACAGAC (서열번호: 4)
OsSIZ2-F	ATTTCTTGACGGTTTCGATGAT (서열번호: 5)
OsSIZ2-R	TAACTGTACGATCCTGCTCCTG (서열번호: 6)
Tubulin2-F	CCAACAACGTGAAATCGACAG (서열번호: 7)
Tubulin2-R	TCTTGGTATTGCTGGTACTCT (서열번호: 8)
OsActin2-F	GTAAGCAACTGGGATGACATGGAGAA (서열번호: 9)
OsActin2-R	CCTCCAATCCAGACACTGTACTTCCTC (서열번호: 10)
OsHSP71.1-F	GCGAACGGCATCCTGAAC (서열번호: 11)
OsHSP71.1-R	ATTGGTGTAAAACGAACGA (서열번호: 12)
OsDREB1B-F	ATGGCGACGAAGAAGAAGAC (서열번호: 13)
OsDREB1B-R	AGTAGCTCCAGAGCGGCATA (서열번호: 14)

[0056] (실시예 3) 플라스미드 컨스트럭트 및 식물 형질전환

- [0057] *atsiz1-2* (SALK_065379) 식물체 내에서 OsSIZ1 또는 OsSIZ2를 과발현시키는 형질전환 아라비도시스 식물체를 생성하기 위해 상기 표 1에 나타난 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 통해 단백질 코딩 영역을 증폭시킨다. 이때 사용된 cDNA 클론은 OsSIZ1 (2,628 bp)를 위해서는 AK105290이고 OsSIZ2 (2,442 bp)를 위해서는 AK065127이다. 이는 RIKEN 인스티튜트로부터 알려져 있다(<http://www.riken.jp/eng/index.html>).
- [0058] 증폭된 단편은 pGEM-T Easy vector (Promega, Madison, WI, USA)에 연결되었으며 정확한 DNA 서열이 입증되었고 적절한 제한효소를 통해 pCambia1300-멀티 벡터 속으로 서브클론되었다. 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 스트레인은 OsSIZ1 또는 OsSIZ2를 과발현시키는 각각의 컨스트럭트를 포함하고 이는 50 mg/L의 겐타마이신, 50 mg/L의 리팜피신 및 50 mg/L의 가나마이신을 포함하는 LB 액상 배지에서 30°C로 성장시킨다. *atsiz1-2* 식물체는 이미 전술한 플로럴 딥 방법으로 형질전환시킨다(Clough & Bent 1998; Park et al. 2009). 하이그로마이신 저항성 형질전환 식물체가 30 mg/L 하이그로마이신을 포함하는 1x MS 배지에서 선별되었다.
- [0059] (실시예 4) 세포 내 국소화의 분석
- [0060] OsSIZ1 및 OsSIZ2 단백질의 세포 내 국소화를 측정하기 위해 각각 녹색 형광 단백질(GFP) 서열과 적절한 제한효소 부위를 이용하여 OsSIZ1 및 OsSIZ2의 C 말단을 융합시켰다. 벼 프로토플라스트(4×10^6 /mL)가 이미 기술한 방법에 의해 준비되었다(Kyozuka & Shimamoto 1991). 프로토플라스트는 10 μ g의 DNA 컨스트럭트와 혼합시키고 PEG-매개 트랜지언트 형질전환을 이용하여 트랜스팩션 시킨다. 48 내지 72시간의 인큐베이션 후에 녹색 형광 단백질(GFP)와 적색형광 단백질(RFP)을 형광 현미경(Olympus AX-70, DP-70)을 통해 형광 시각화시킨다.
- [0061] (실시예 5) SUMO 접합체의 생체 내 스트레스 처리 분석
- [0062] 야생형 벼 씨앗을 각각 96% 에틸 알코올로 5분간 3번 세척하여 1차 표면 멸균시킨다. 이어서 3% 소듐 하이포클로라이트로 2시간 처리한 후 10배의 멸균수로 5번 세척시킨다. 물세척 후에 씨앗은 플라스틱 박스(25 x 18 x 9 cm³)에서 발아시키고 이때 플라스틱 박스 내에는 0.5x MS 배지를 포함시키고 동일한 박스로 밀봉시킨다. 샘플 박스는 25°C 16/8 시간 명/암 조건 하에서 성장 챔버에서 인큐베이션 시킨다. 비 생물학적 스트레스에 적용시키기 위해 10일간 성장된 묘목을 사용한다. 이와같은 스트레스는 45°C의 열 스트레스, 4°C의 추위 스트레스 및 250 mM의 NaCl 스트레스이고 덧붙여 100 μ M의 ABA를 사용하여 처리한다.
- [0063] SUMO 접합체의 분석을 위해 10일간 상기 배지 및 조건에서 성장된 묘목으로부터 총 단백질을 추출하고 식물조직(0.2g)을 그라인딩 완충액(100 mM Na-MOPS, pH 7.5, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 10% 수크로스, 5% β -머캅토에탄올, and 4% SDS) 내에서 모르타르 및 페스틀을 통해 추출시킨다. 단백질 농도는 Bio-Rad Protein Assay Kit(No. 500-0006, Bio-Rad)를 사용하여 측정하고 단백질은 SDS-PAGE로 분리되었다. 그 후 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(No. 162-0177, Bio-Rad)에 이전시키고 항-SUMO1 항체(ab5316, Abcam)로 프로브시킨 후 ECL Western blot detection system (Amersham Biosciences)을 사용하여 측정한다.
- [0064] (실시예 6) 담배식물체 내에서 아그로박테리움 매개 일시적 수모화 에세이
- [0065] 35S::flag-AtSUMO1, 35S::AtSIZ1, 35S::OsSIZ1 및 35S::OsSIZ2의 상기 컨스트럭트를 포함하는 아그로박테리움 튜메파시엔스(strain GV3101) 박테리아의 결합체는 담배 잎(*N. benthamiana*) 식물체 상에 침투시킨다. 침투된 담배 잎인 At 3 DAI(접종 후 일자)을 채취하고 단백질은 단백질 추출 완충액[50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.5% NP40, 1 mM EDTA, 3 mM DTT, 1 mM PMSF, 5 μ g/ml 류페틴, 1 μ g/ml 아프로티닌, 1 μ g/ml 캡스테인, 5 μ g/ml 안티페인, 5 μ g/ml 키모스테틴, 2 mM Na₂VO₄, 2 mM NaF, 50 μ M MG132] 내에서 추출한다. 약 50 μ g의 단백

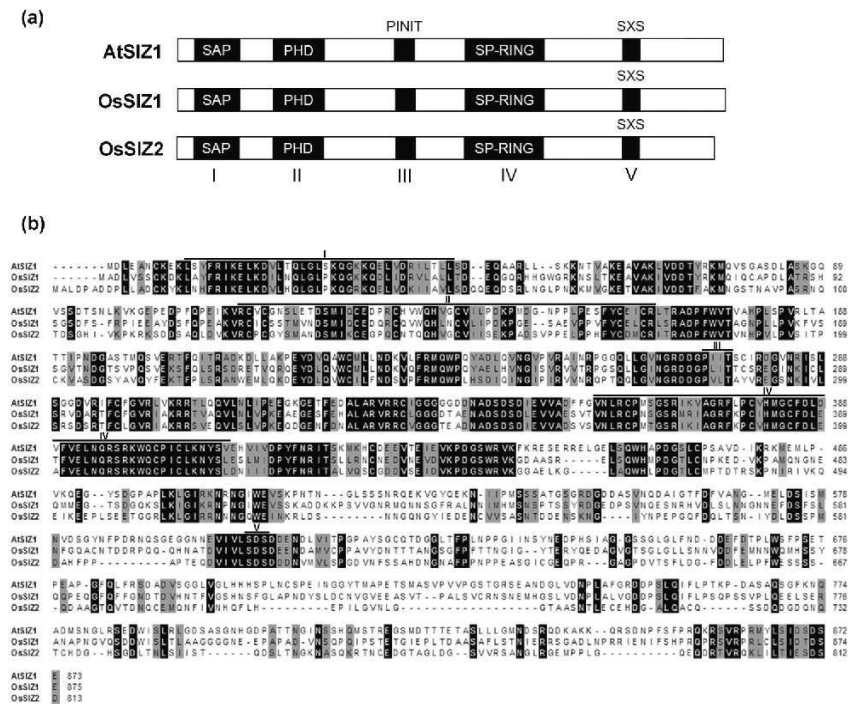
질이 담배잎에서 flag-AtSUM01 접합체를 인식할 수 있는 항 플래그-항체를 사용하여 면역분석에 사용되었다.

[0066] (실시예 7) ABA 발아 에세이

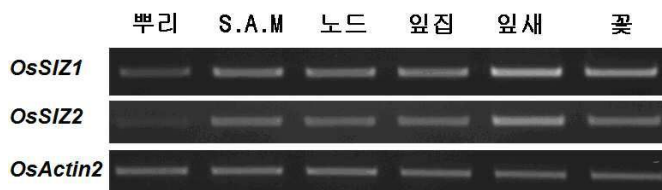
[0067] ABA 민감성을 측정하기 위해 아라비도시스 씨앗을 0, 0.2, 5, 0.75, 1 μ M의 여러 농도의 ABA를 함유하는 0.5x MS 배지에서 발아시킨다. ABA에 의한 발아 속도를 조사하기 위해 7일후의 묘목의 녹색 떡잎을 측정한다. 10일 후의 묘목은 사진을 찍어 확인하고 그 차이점을 분석하기 위해 모든 데이터를 측정한다.

도면

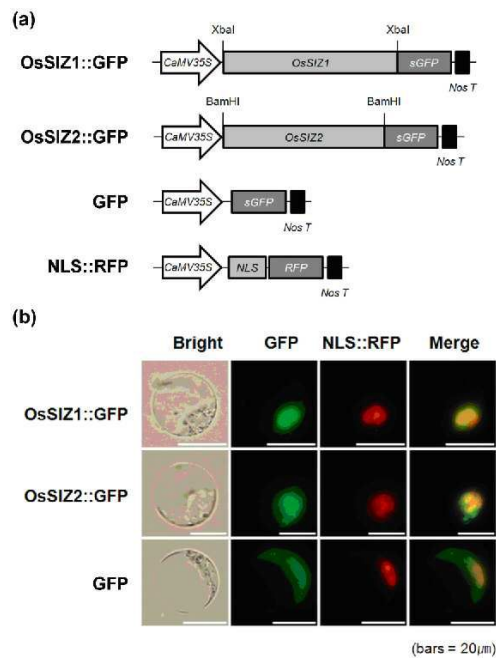
도면1



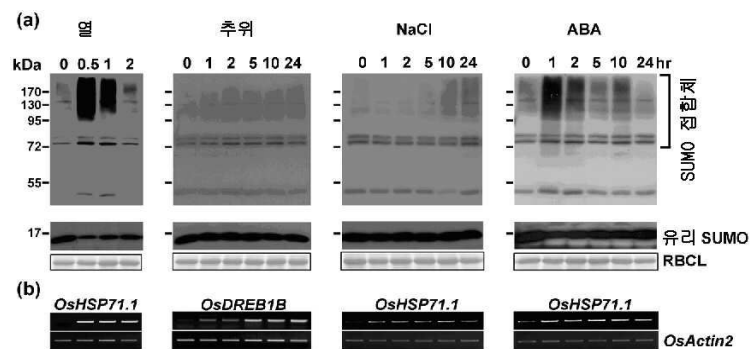
도면2



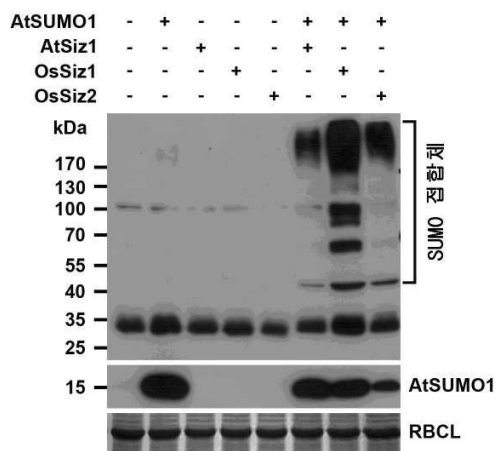
도면3



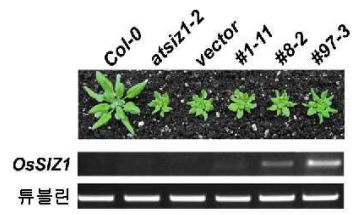
도면4



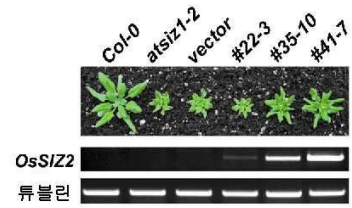
도면5



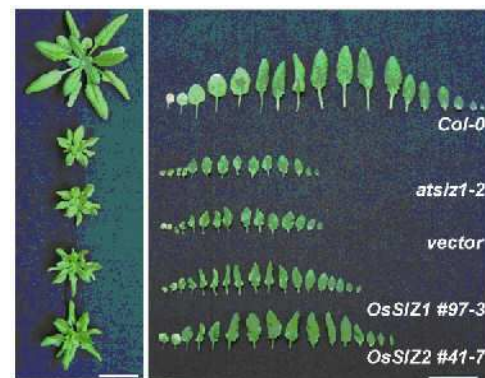
도면6a



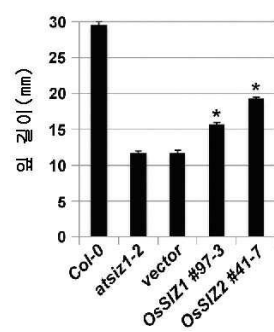
도면6b



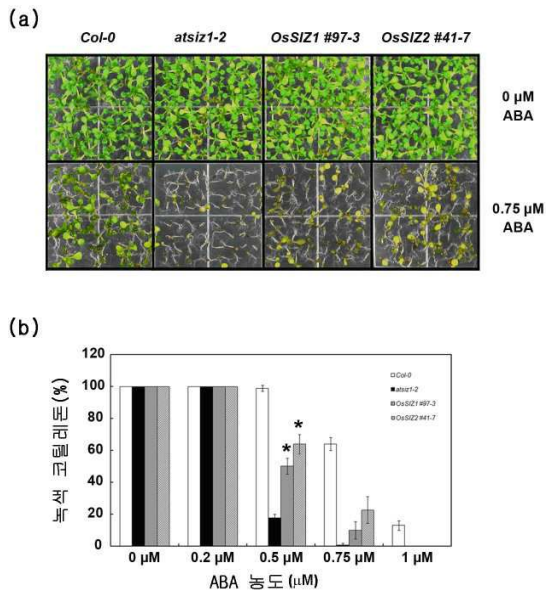
도면6c



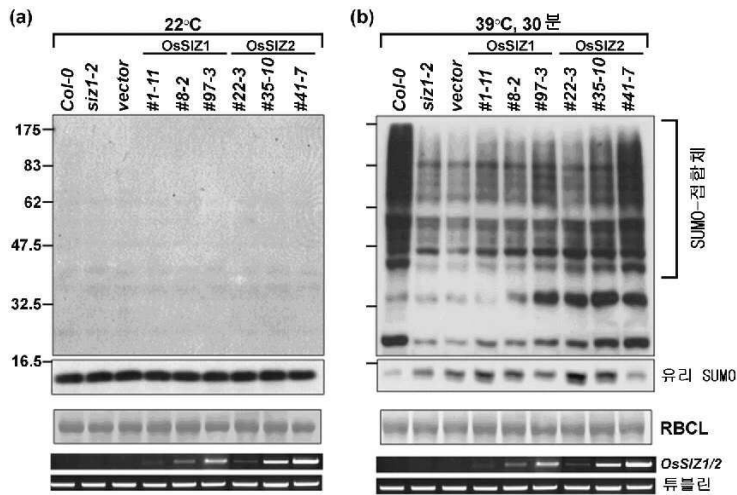
도면6d



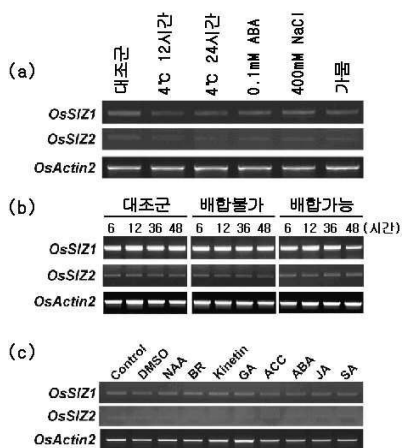
도면7



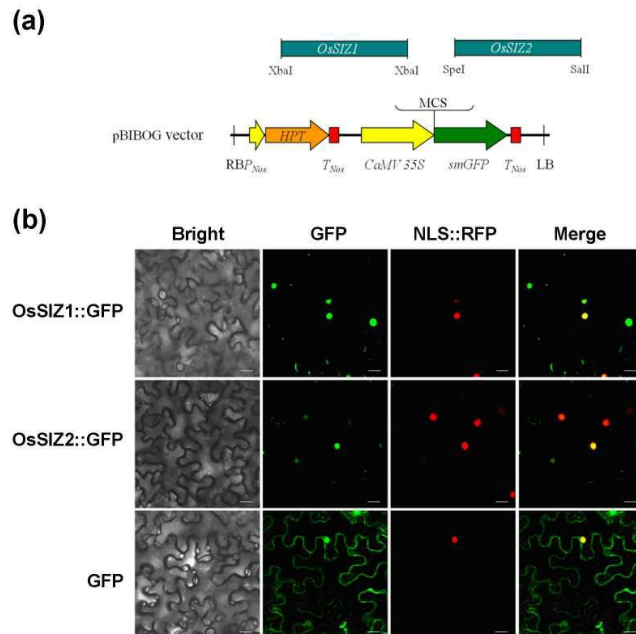
도면8



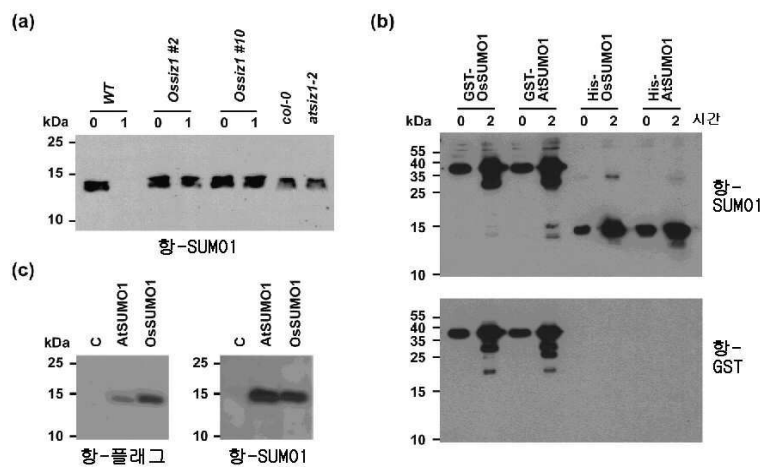
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Method for adapting the stress of rice by expression of OsSIZ1 and OsSIZ2 protein
- <160> 14
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 875
- <212> PRT
- <213> Oryza sativa
- <400> 1

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

245 250 255
 Val Thr Arg Pro Gly Ser Gln Leu Leu Gly Ile Asn Gly Arg Asp Asp
 260 265 270
 Gly Pro Leu Ile Thr Thr Cys Ser Arg Glu Gly Ile Asn Lys Ile Cys
 275 280 285
 Leu Ser Arg Val Asp Ala Arg Thr Phe Cys Phe Gly Val Arg Ile Ala
 290 295 300
 Lys Arg Arg Thr Val Ala Gln Val Leu Asn Leu Val Pro Lys Glu Ala
 305 310 315 320

 Glu Gly Glu Ser Phe Glu His Ala Leu Ala Arg Val Arg Arg Cys Leu
 325 330 335
 Gly Gly Gly Asp Thr Ala Glu Asn Ala Asp Ser Asp Ser Asp Leu Glu
 340 345 350
 Val Val Ala Glu Ser Val Thr Val Asn Leu Arg Cys Pro Asn Ser Gly
 355 360 365
 Ser Arg Met Arg Ile Ala Gly Arg Phe Lys Pro Cys Ile His Met Gly
 370 375 380
 Cys Phe Asp Leu Glu Thr Phe Val Glu Leu Asn Gln Arg Ser Arg Lys

 385 390 395 400
 Trp Gln Cys Pro Ile Cys Leu Lys Asn Tyr Ser Leu Glu Ser Leu Met
 405 410 415
 Ile Asp Pro Tyr Phe Asn Arg Ile Thr Ser Leu Leu Arg Asn Cys Asn
 420 425 430
 Glu Asp Val Asn Glu Val Asp Val Lys Pro Asp Gly Ser Trp Arg Val
 435 440 445
 Lys Gly Asp Ala Ala Ser Arg Glu Leu Ser Gln Trp His Met Pro Asp
 450 455 460

 Gly Thr Leu Cys Asn Pro Lys Glu Asp Val Lys Pro Ala Met Gln Asn
 465 470 475 480
 Gly Asn Glu Gln Met Met Glu Gly Thr Ser Asp Gly Gln Lys Ser Leu
 485 490 495
 Lys Ile Gly Ile Lys Arg Asn Pro Asn Gly Ile Trp Glu Val Ser Ser

500 505 510
 Lys Ala Asp Asp Lys Lys Pro Ser Val Val Gly Asn Arg Met Gln Asn
 515 520 525
 Asn Ser Gly Phe Arg Ala Leu Asn Asn Ile Met His Met Ser Asn Ser

 530 535 540
 Pro Thr Ser Ser Tyr Arg Asp Gly Glu Asp Pro Ser Val Asn Gln Glu
 545 550 555 560
 Ser Asn Arg His Val Asp Leu Ser Leu Asn Asn Gly Asn Asn Glu Phe
 565 570 575
 Asp Ser Phe Ser Leu Asn Phe Gly Gln Ala Cys Asn Thr Asp Asp Arg
 580 585 590
 Pro Gln Gln Gln His Asn Ala Thr Asp Val Ile Val Leu Ser Asp Ser
 595 600 605

 Asp Glu Glu Asn Asp Ala Met Val Cys Pro Pro Ala Val Tyr Asp Asn
 610 615 620
 Thr Thr Thr Ala Asn Gly Ser Gly Phe Pro Phe Thr Thr Asn Gly Ile
 625 630 635 640
 Gly Tyr Thr Glu Arg Tyr Gln Glu Asp Ala Gly Val Gly Thr Ser Gly
 645 650 655
 Leu Gly Leu Leu Ser Asn Asn Val Asp Asp Phe Glu Met Asn Asn Trp
 660 665 670
 Gln Met His Ser Ser Tyr Gln Gln Pro Glu Gln Gly Phe Gln Phe Phe

 675 680 685
 Gly Asn Asp Thr Asp Val His Asn Thr Phe Val Gly Ser His Asn Ser
 690 695 700
 Phe Gly Leu Ala Pro Asn Asp Tyr Ser Leu Asp Cys Asn Val Gly Val
 705 710 715 720
 Glu Glu Ala Ser Val Thr Pro Ala Leu Ser Val Cys Arg Asn Ser Asn
 725 730 735
 Glu Met His Gly Ser Leu Val Asp Asn Pro Leu Ala Leu Val Gly Asp
 740 745 750

Asp Pro Ser Leu Gln Ile Phe Leu Pro Ser Gln Pro Ser Ser Val Pro
755 760 765
Leu Gln Glu Glu Leu Ser Glu Arg Ala Asn Ala Pro Asn Gly Val Gln
770 775 780
Ser Asp Asp Trp Ile Ser Leu Thr Leu Ala Ala Gly Gly Gly Gly Asn
785 790 795 800
Glu Glu Pro Ala Pro Ala Asp Val Asn Ser Gln Pro Gln Ile Pro Ser
805 810 815
Thr Glu Thr Gly Ile Glu Pro Leu Thr Asp Ala Ala Ser Ala Phe Leu

820 825 830
Ser Thr Asn Ile Glu Arg Arg Ser Gly Ala Asp Leu Asn Pro Arg Arg
835 840 845
Ile Glu Asn Ile Phe Ser His Pro Arg Gln Pro Arg Ser Val Arg Pro
850 855 860
Arg Leu Cys Leu Ser Ile Asp Thr Asp Ser Glu
865 870 875

<210> 2
<211> 813
<212> PRT
<213> Oryza sativa
<400> 2

Met Ala Leu Asp Pro Ala Asp Asp Pro Leu Leu Ala Asp Cys Lys Tyr

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

Asp Asp Thr Phe Ala Lys Met Asn Gly Ser Thr Asn Ala Val Pro Ala

85	90	95	
Ser Arg Asn Gln Thr Asp Ser Gly His Ile Val Lys Pro Lys Arg Lys			
100	105	110	
Ser Asp Asp Ser Ala Gln Leu Asp Val Lys Val Arg Cys Pro Cys Gly			
115	120	125	
Tyr Ser Met Ala Asn Asp Ser Met Ile Lys Cys Glu Gly Pro Gln Cys			
130	135	140	
Asn Thr Gln Gln His Val Gly Cys Val Ile Ile Ser Glu Lys Pro Ala			
145	150	155	160
Asp Ser Val Pro Pro Glu Leu Pro Pro His Phe Tyr Cys Asp Met Cys			
165	170	175	
Arg Ile Thr Arg Ala Asp Pro Phe Trp Val Thr Val Asn His Pro Val			
180	185	190	
Leu Pro Val Ser Ile Thr Pro Cys Lys Val Ala Ser Asp Gly Ser Tyr			
195	200	205	
Ala Val Gln Tyr Phe Glu Lys Thr Phe Pro Leu Ser Arg Ala Asn Trp			
210	215	220	
Glu Met Leu Gln Lys Asp Glu Tyr Asp Leu Gln Val Trp Cys Ile Leu			
225	230	235	240
Phe Asn Asp Ser Val Pro Phe Arg Met Gln Trp Pro Leu His Ser Asp			
245	250	255	
Ile Gln Ile Asn Gly Ile Pro Ile Arg Val Val Asn Arg Gln Pro Thr			
260	265	270	
Gln Gln Leu Gly Val Asn Gly Arg Asp Asp Gly Pro Val Leu Thr Ala			
275	280	285	
Tyr Val Arg Glu Gly Ser Asn Lys Ile Val Leu Ser Arg Ser Asp Ser			
290	295	300	
Arg Thr Phe Cys Leu Gly Val Arg Ile Ala Lys Arg Arg Ser Val Glu			
305	310	315	320
Gln Val Leu Ser Leu Val Pro Lys Glu Gln Asp Gly Glu Asn Phe Asp			
325	330	335	
Asn Ala Leu Ala Arg Val Arg Arg Cys Val Gly Gly Gly Thr Glu Ala			

340 345 350
 Asp Asn Ala Asp Ser Asp Ser Asp Ile Glu Val Val Ala Asp Ser Val
 355 360 365

 Ser Val Asn Leu Arg Cys Pro Met Thr Gly Ser Arg Ile Lys Ile Ala
 370 375 380
 Gly Arg Phe Lys Pro Cys Val His Met Gly Cys Phe Asp Leu Glu Ala
 385 390 395 400
 Phe Val Glu Leu Asn Gln Arg Ser Arg Lys Trp Gln Cys Pro Ile Cys
 405 410 415
 Leu Lys Asn Tyr Ser Leu Asp Asn Ile Ile Ile Asp Pro Tyr Phe Asn
 420 425 430
 Arg Ile Thr Ala Leu Val Gln Ser Cys Gly Asp Asp Val Ser Glu Ile

 435 440 445
 Asp Val Lys Pro Asp Gly Ser Trp Arg Val Lys Gly Gly Ala Glu Leu
 450 455 460
 Lys Gly Leu Ala Gln Trp His Leu Pro Asp Gly Thr Leu Cys Met Pro
 465 470 475 480
 Thr Asp Thr Arg Ser Lys Pro Asn Ile Arg Ile Val Lys Gln Glu Ile
 485 490 495
 Lys Glu Glu Pro Leu Ser Glu Glu Thr Gly Gly Arg Leu Lys Leu Gly
 500 505 510

 Ile Arg Arg Asn Asn Asn Gly Gln Trp Glu Ile Asn Lys Arg Leu Asp
 515 520 525
 Ser Asn Asn Gly Gln Asn Gly Tyr Ile Glu Asp Glu Asn Cys Val Val
 530 535 540
 Ser Ala Ser Asn Thr Asp Asp Glu Asn Ser Lys Asn Gly Ile Tyr Asn
 545 550 555 560
 Pro Glu Pro Gly Gln Phe Asp Gln Leu Thr Ser Asn Ile Tyr Asp Leu
 565 570 575
 Asp Ser Ser Pro Met Asp Ala His Phe Pro Pro Ala Pro Thr Glu Gln

 580 585 590

Asp Val Ile Val Leu Ser Asp Ser Asp Asp Asp Asn Val Met Val Leu
595 600 605

Ser Pro Gly Asp Val Asn Phe Ser Ser Ala His Asp Asn Gly Asn Ala
610 615 620

Phe Pro Pro Asn Pro Pro Glu Ala Ser Gly Ile Cys Gly Glu Gln Pro
625 630 635 640

Arg Gly Ala Gly Pro Asp Val Thr Ser Phe Leu Asp Gly Phe Asp Asp
645 650 655

Leu Glu Leu Pro Phe Trp Glu Ser Ser Ser Ser Gln Asp Ala Ala Gly
660 665 670

Thr Gln Val Thr Asp Asn Gln Cys Glu Met Gln Asn Phe Ile Val Asn
675 680 685

His Gln Phe Leu His Glu Pro Ile Leu Gly Val Asn Leu Gly Gly Thr
690 695 700

Ala Ala Ser Asn Thr Leu Glu Cys Glu His Asp Gly Ala Leu Gln Ala
705 710 715 720

Cys Gln Ser Ser Asp Gln Asp Gly Asp Gln Asn Gln Thr Cys His Asp
725 730 735

Gly His Ser Gly Asp Leu Thr Asn Leu Ser Ile Ile Ser Thr Gln Asp
740 745 750

Ser Leu Thr Asn Gly Lys Asn Ala Ser Gln Lys Arg Thr Asn Cys Glu
755 760 765

Asp Gly Thr Ala Gly Leu Asp Gly Ser Val Val Arg Ser Ala Asn Gly
770 775 780

Leu Arg Gly Glu Met Pro Pro Leu Gly Gln Glu Gln Asp Arg Thr Val
785 790 795 800

Arg Gln Lys Leu Ile Leu Thr Ile Glu Ser Asp Ser Asp
805 810

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer
 <400> 3
 ttggcttagc accaaatgac ta 22
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 4
 acagagtcga ggcctaacag ac 22
 <210> 5
 <211> 22
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 5
 atttcttgac ggtttcgatg at 22
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 6
 taactgtacg atcctgctcc tg 22
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 7
 ccaacaacgt gaaatcgaca g 21
 <210> 8
 <211> 21

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	8	
tcttggtatt gctggtagctc t		21
<210>	9	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	9	
gtaagcaact gggatgacat ggagaa		26
<210>	10	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	10	
cctccaatcc agacactgta cttcctc		27
<210>	11	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	11	
gcgaacggca tcctgaac		18
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	12	
attcggtgta aaacgaacga		20
<210>	13	

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 13
 atggcgacga agaagaagac 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 14
 agtagctcca gagcggcata 20