

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008027

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 고추에서 병저항성관련유전자의 분리와 기능분석

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 고추 유래의 알데하이드 디하이드로나아제1 유전자(*Capsicum annuum* Aldehyde Dehydrogenase, CaALDH1).

청구항 2

서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 고추 유래의 알데하이드 디하이드로나아제1 유전자(*Capsicum annuum* Aldehyde Dehydrogenase, CaALDH1).

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 고추 유래의 알데하이드 디하이드로나아제1 단백질(*Capsicum annuum* Aldehyde Dehydrogenase, CaALDH1).

청구항 4

제2항 기재의 유전자(CaALDH1)를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5

제4항 기재의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 6

병원균 접종 후 식물체로부터 mRNA 분리하여 제2항 기재의 유전자(CaALDH1)의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성을 탐색하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 식물병 저항성에 관련된 신규 유전자인 알데하이드디하이드로나아제 유전자 CaALDH1 (*Capsicum annuum* Aldehyde Dehydrogenase), 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 고추식물의 세균병인 고추 세균성 점무늬병(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되어 세균의 비병원성 단백질 AvrBsT와 상호작용하는 식물병 저항성 관련 신규 유전자인 고추 유래의 CaALDH1 유전자의 염기서열 및 그에 따른 아미노산 서열을 제공하며, 이를 이용한 식물체의 저항성 탐색방법 및 병저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

갑작스런 기후 변화 및 지구온난화에 따른 환경은 지진, 홍수, 폭설 등의 자연재해가 더욱 빈번하게 발생하고 있고 병해충의 발생의 예측이 어려워지면서 인간 및 자연환경에 유해한 화학농약에 대한 의존도가 더욱 증가하고 있다.

[0003]

반면 경제발전과 생활수준의 향상으로 소비자의 소득수준이 증가함에 따라 고품질 청정 농작물에 대한 선호도가 높아짐에 따라 친환경 유기농법에 의한 고품질 작물의 수요가 증가하고 있는 실정이다. 이런 여론의 흐름을 따라서 녹색성장을 위한 국제적으로도 협력방안이 모색되어 가고 있고 모든 산업과 사회의 전반적인 생활 양식이 친환경 지향적으로 전환되어가는 추세이다.

[0004]

농업에 있어서 친환경 녹색성장을 이룩하기 위해서는 전통적 육종이나 분자 육종방법으로 환경 스트레스에 대해 잘 견디어내고 주요 식물병에 대한 병저항성 작물을 개발하여 농약의 사용을 최소한으로 줄여 재배하는 것이 가

장 환경 친화적이고 경제적인 작물재배 방법이다.

- [0005] 식물의 병 저항성 반응 또는 환경적 스트레스에 대한 저항성을 가지는 식물의 방어관련 기작에 대해서는 지금까지 잘 밝혀져 있지 않아 생체 내 식물방어 기작을 규명하는 과학기술적 가치를 지닌다. 또한 식물저항성 관련 유전자의 정보는 작물의 분자적 유전육종의 직접적 재료로서 제공될 수 있을 뿐 아니라 전통적 유전육종에도 사용될 수 있는 장점을 지니고 있다.
- [0006] 우리나라에서 집약적으로 재배되는 고추 (*Capsicum annuum* L.)는 주요 경제 작물중 하나로써 다양한 식물병과 무생물적 환경 스트레스에 의해 피해를 받아 큰 경제적 손실이 일어나고 있으며, 더 효과적인 방제법의 개발을 위해선 병에 대한 식물의 방어 반응을 분자세포학적으로 연구하는 것이 필요하다. 고추 세균성점무늬병원균과 고추와의 상호작용에서 방어반응에 관여하는 유전자를 분자적으로 클로닝하고 기능 분석하는 것은 고추의 병방어 반응 경로의 이해를 증진시키고, 저항성관련 유전자를 고추식물에서 발현시킨 병저항성 형질전환식물의 개발을 위한 유전자원의 토대가 된다.
- [0007] 식물체가 병원균에 감염되면 여러 가지 세포내 대사 시스템을 작동시켜 방어기작을 활성화하는데, 이러한 방어기작은 병원체에 대한 기주세포의 인식을 시발점으로 국부적 세포 사멸과 같은 과민성 반응, 세포벽의 비후화 등의 반응을 나타내며, 여러 종류의 2차 대사산물과 항균성 물질을 생성하고, 병방어 관련 단백질을 생성하는 것으로 알려져 있다. 그러나 현재 과민성 반응을 조절하는 인자와 그것의 메커니즘에 대한 연구가 매우 미흡한 실정이다.
- [0008] 본 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 등록특허 제10-0898054호(2009.05.19)에는 식물의 방어반응과 관련된 고추식물 유래의 CaSDR1 (*Capsicum annuum* Short-chain Dehydrogenase/Reductase 1) 유전자에 관해 기재되어 있고, 일본 특개평 08-103267(1996.04.23.)에는 보리에서 분리된 식물의 내건성 및 내염성에 관련된 새로운 베타인 알데하이드 탈수소 효소에 대해 기재되어 있다. 그러나, 세균의 비병원성 단백질 AvrBsT와 상호작용하는 저항성 관련 유전자인 고추에서 분리된 알데하이드디하이드로나아제 유전자에 대해 개시된 바는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0898054호(2009.05.19)
(특허문헌 0002) 일본 특개평 08-103267(1996.04.23.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 이와 같은 종래기술상의 과제를 해결하기 위한 것으로서, 그 목적은, 고추 세균성 점무늬병 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)에 대한 방어반응에 관여하는 것으로서 식물병 저항성 관련 유전자의 하나인 씨에이알데하이드디하이드로나아제1 (*CaALDH1: Capsicum annuum Aldehyde Dehydrogenase 1*) 유전자를 분리하여 해독함으로써 그 염기서열 정보 및 그에 따른 아미노산 서열 정보를 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명의 목적은 상기 *CaALDH1* 유전자를 이용하여 식물병에 저항성을 가지는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0012] 더 나아가, 본 발명은 상기 *CaALDH1* 유전자를 이용하여 식물병에 대한 저항성 탐색방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 상기 목적은, 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang) 식물이 고추 세균성 점무늬병

(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 비병원성균에 감염될 때 특이적으로 발현이 유도되어 세균의 비병원성 단백질 AvrBsT와 상호작용하는 신규 저항성 관련 유전자 *CaALDH1*을 확인하여 그 염기서열을 결정하고, 이를 이용하여 병원균 처리를 통하여 *CaALDH1*의 발현 여부를 조사하고, 고추식물과 모델식물인 담배(*Nicotiana benthamiana*) 및 형질전환 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에서 *CaALDH1* 유전자의 식물병 저항성 유도 기능을 확인하여 달성하였다.

- [0015] 따라서 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 고추 유래의 알데하이드 디하이드로나아제1 유전자(*Capsicum annuum Aldehyde Dehydrogenase, CaALDH1*)를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 고추 유래의 알데하이드 디하이드로나아제1 유전자(*Capsicum annuum Aldehyde Dehydrogenase, CaALDH1*)를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 고추 유래의 알데하이드 디하이드로나아제1 단백질(*Capsicum annuum Aldehyde Dehydrogenase, CaALDH1*)을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 유전자(*CaALDH1*)를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조한 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 병원균 접종 후 식물체로부터 mRNA 분리하여 *CaALDH1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병저항성을 탐색하는 방법을 제공한다.
- [0021] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구성을 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [0022] 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 분리된 유전자(*CaALDH1*)를 제공한다. 본 발명의 *CaALDH1* 유전자에서, 상기 염기서열은 서열번호 2의 아미노산 서열을 코딩하는 어떠한 염기서열일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1인 것을 특징으로 한다.
- [0023] 나아가 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 분리된 단백질(*CaALDH1*)을 제공한다.
- [0024] 보다 구체적으로, 본 발명은 고추 세균성 점무늬병균의 비병원성균주 접종에 대해 과민성 저항성 반응을 나타내는 녹광고추 품종으로부터 mRNA를 분리하여 cDNA 라이브러리를 제작하고 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리를 이용하여 이스트 투-하이브리드 스크리닝(yeast two-hybrid screening)을 수행하여 점무늬병균의 비병원성 단백질인 AvrBsT(NCBI Accession No. GQ266402; Nak Hyun Kim et al., MPMI Vol. 23, No. 8, 2010, pp. 1069-1082.)와 상호작용하는 cDNA 클론을 동정하였다. 이 클론을 이스트(yeast) 세포에서 분리 정제하여 유전자의 염기서열을 해독함으로써, *CaALDH1*으로 명명된 고추 녹광 품종의 알데하이드디하이드로나아제 단백질 코딩 유전자 염기서열(서열번호 1) 및 그에 따른 아미노산 서열(서열번호 2)을 제공한다(도 1 참조).
- [0025] 본 발명에 의한 *CaALDH1* 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 식물의 알데하이드디하이드로나아제에서 전형적으로 나타나는 알데하이드디하이드로나아제 도메인을 가지고 있었고, 벼 (*Oryza sativa*)의 OsALDH (accession no. NP_001043453)와는 단백질 수준에서 66 %, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 의 AtALDH (accession no. NP_566749)와는 단백질 수준에서 68%의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, nucleotide blast program). 확인된 *CaALDH1*의 유전자 염기서열과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 도 1에 나타내었다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 유전자(*CaALDH1*)를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다. 상기 재조합 벡터는 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 pGADT7:*CaALDH1*, pGBKT7:*CaALDH1*, p35S:*CaALDH1*:HA, pBIN35S:*CaALDH1* 또는 TRV:*CaALDH1*이다.
- [0027] 본 발명은, 이스트(yeast)와 담배(*N. benthamiana*)에서 *CaALDH1*과 *AvrBsT* 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 병원균의 비병원성 단백질과 상호작용을 이스트 또는 식물체 내에서 검정하였다(도 2 및 도 3 참조).
- [0028] 나아가, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 재조합 벡터를 이용하여 제조한 형질전환된 식물체를 제공한다. 식물

의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 식물세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법 (Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법 (Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미 주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소 포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

[0029] 다음에, 본 발명은 생물적 처리를 한 식물체로부터 mRNA를 분리하여 *CaALDH1* 유전자의 차별적 발현을 확인하는 단계를 포함하는 식물체의 병 저항성을 탐색하는 방법을 제공한다. 보다 구체적으로는 상기 생물적 처리는 고추 세균성 점무늬병의 병원성, 비병원성 세균 그리고 고추 역병의 난균 등의 병원균을 예로 들 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기의 *CaALDH1* 유전자 발현을 억제하는 재조합 벡터를 이용하여 특이적으로 *CaALDH1* 유전자가 억제된 고추 식물체를 제작하고 병 감수성이 증대되는 것을 확인하고, *CaALDH1* 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물의 식물병 저항성이 증가하는 것을 확인함으로써 새로운 병저항성 형질전환 식물체 및 저항성 분자 육종의 재료를 제공할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 *CaALDH1* 유전자 발현을 증가시키는 재조합 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체에 병 저항성을 부여하는 방법도 제공한다.

[0031] 보다 구체적으로 본 발명은 바이러스 유도 유전자 억제 기술(virus-induced gene silencing (VIGS))에 이용되는 TRV(Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 *CaALDH1* 유전자를 TRV 벡터(참고문헌: Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2:109-113)에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2:*CaALDH1*를 제작하였다. 상기 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 *CaALDH1*의 발현이 억제된 VIGS 식물체를 제조하여 저항성이 감소되는 것을 확인하였다 (도 4 ~ 도 6 참조).

[0032] 나아가 본 발명에 의한 *CaALDH1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터(pBIN35S:*CaALDH1*)와 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101) 균주를 이용하여, 애기장대 식물에서의 형질전환 발현(transgenic expression)을 통한 *CaALDH1* 유전자의 식물체 병저항성 증가를 확인하고 병저항성 형질전환 식물체를 제공할 수 있었다(도 8 ~ 도 10 참조).

[0033] 상술한 바와 같이, 본 발명은 고추 식물 (녹광 품종)로부터 제작된 yeast two-hybridization library로부터 AvrBsT와 상호작용하는 신규 저항성 관련 *CaALDH1* 유전자 cDNA 클론을 분리하여 염기서열을 해독(Sequencing)하여, 여기에서 얻어진 *CaALDH1* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 제공하고, 병원성이나 비병원성 병원균 접종에 대한 차별적 발현에 대한 확인을 통하여 생물적 저항성 유도 처리 시 해당 유전자의 차별적 발현 여부를 탐색하는 저항성 탐색방법을 제공한다. 또한 고추 식물에서 바이러스 유도 유전자 억제(Virus-induced gene silencing) 기술을 통하여 특이적으로 *CaALDH1* 유전자의 발현을 억제시켜 고추식물에서 병저항성에 관한 *CaALDH1*의 역할을 확인하고, 또한, *CaALDH1* 유전자를 이용한 재조합 벡터 pBIN35S:*CaALDH1*과 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101) 균주를 이용하여, 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물에서의 일시적 발현(transient expression) 방법과 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 식물에서의 형질전환 발현(transgenic expression)을 통한 *CaALDH1* 유전자의 식물체 병저항성 활성화기능을 확인한 것으로, 이를 통한 형질전환 식물체 제조에 관한 내용을 포함한다.

[0034] 따라서 본 발명에서 *CaALDH1*가 고추 식물의 병저항성 조절에 중추적 역할을 한다는 것을 확인하고 *CaALDH1*의 병에 대한 반응 및 이와 관련된 병생성 관련 단백질(PR protein)의 유전자 정보를 추적할 수 있게 되어 식물의 병에 대한 신효전달에 대한 흥미로운 모형을 제공해 줄 수 있으며, 저항성을 일으키는 생화학적 변화를 이해함으로써, 병저항성이 증진되는 생명공학적 식물을 개발하는 데에 실용적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0035]

상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 신규 저항성 관련 유전자인 *CaALDH1*는 세균성 점무늬병균의 비병원성 단백질인 AvrBsT와 직접 상호작용하여 과민성 세포사멸반응을 조절하는 인자이다. 따라서 본 발명은 과민성 세포사멸 반응 기작을 연구하고 주요 식물병에 저항성인 작물 품종을 육종하는데 실질적으로 기여할 수 있다. 특히 발명에 의한 *CaALDH1* 유전자의 발현을 억제하거나, 과발현시켜 식물병 저항성에 기여함을 확인하여 본 발명에 의한 *CaALDH1*는 병 저항성 식물체의 육종을 위한 재료로서 저항성 품종 개발을 촉진할 수 있는 효과가 있으므로 본 발명은 식물육종 산업상 매우 유용한 발명이라 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0036]

도 1은 본 발명에 의하여 고추 녹광 품종 (*Capsicum annuum* L. cv. Nockwang)으로부터 클로닝한 고추 *CaALDH1* 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도면이고,

도 2는 *CaALDH1*과 AvrBsT의 물리적 상호작용을 확인하기 위한 이스트 투-하이브리드디제이션(yeast two-hybridization) 결과를 나타낸 도면이고,

도 3은 *CaALDH1*과 AvrBsT의 식물체 내에서의 상호작용 확인하기 위해, 담배(*N. benthamiana*) 세포에서 추출한 단백질로 Co-IP한 결과를 나타낸 도면이고,

도 4는 바이러스 유도 유전자 억제(virus-induced gene silencing: VIGS)의 방법을 사용하여 본 발명에 의한 *CaALDH1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)의 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, 병 감수성이 증대되어 과민성 반응이 사라진 것을 나타낸 도면이고,

도 5는 *CaALDH1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때 감염 고추 잎 조직에서의 세균 생장을 나타낸 그래프이고,

도 6은 본 발명에 의한 *CaALDH1* 유전자의 발현이 억제된 고추 녹광 품종의 식물에 병원성 균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)의 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하였을 때, *CaALDH1*의 효과적인 발현 억제와 저항성 관련 유전자의 발현 차이를 나타낸 결과를 나타낸 그래프이고,

도 7은 본 발명에 의한 재조합벡터 pBIN35S:*CaALDH1* 그리고 pBIN35S:*avrBsT* 와 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101) 균주를 이용하여 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물에서 *CaALDH1* 그리고 *avrBsT* 유전자를 여러 조합으로 과발현시켰을 때 사진과 세포사멸에 따른 전해질 유출로 인한 전도율 변화를 측정한 결과를 나타낸 도면이고,

도 8은 형질전환 애기장대 식물에서 본 발명에 의한 *CaALDH1* 유전자가 과발현되는 것을 관찰한 결과를 나타낸 도면이고,

도 9는 본 발명에 의한 *CaALDH1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 세균성 흑반병원균인 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, *Pst* DC 3000) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 생장, 과산화수소 (H_2O_2), 그리고 세포 사멸을 검정한 결과를 나타낸 그래프이고,

도 10은 본 발명에 의한 *CaALDH1* 유전자를 과다발현시킨 형질전환 애기장대 식물에서 노균병균 하이알로페로노스포라 아라비도프시디스 노코2 (*Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2) 균주 접종시 식물체 내에서 병원균 생장을 검정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037]

이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0038]

[실시예 1] *CaALDH1* 유전자의 염기/아미노산 서열 결정

- [0039] 고추 세균성 점무늬병에 대한 병저항성 관련 단백질 중 하나인 씨에이알데하이드디하이드로나아제1 (*CaALDH1: Capsicum annuum Aldehyde Dehydrogenase 1*) 단백질 코딩 유전자 염기서열 및 그로부터 추론되는 아미노산 서열을 제공하기 위하여 하기와 같은 시험을 수행하였다.
- [0040] 고추 녹광 품종(*Capsicum annuum* cv. Nockwang)에 고추 세균성 점무늬병균(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)을 접종하고 18시간 동안 습실 처리한 후 저항성 병반인 과민성세포사멸반응이 나타난 식물체를 습실에서 꺼내어 잎을 수거하였다.
- [0041] 다음에, 이 잎 표본으로부터 mRNA를 추출하여 역전사한 후 이를 PCR (Polymerase Chain Reaction) 증폭함으로써 cDNA 라이브러리를 제작하였다. 그리고 이렇게 제작된 cDNA 라이브러리를 이용하여 이스트 투-하이브리드 스크리닝(yeast two-hybrid screening)을 수행하여 점무늬병균의 비병원성 단백질인 AvrBsT와 상호작용하는 cDNA 클론을 동정하였다. 이 클론을 이스트(yeast) 세포에서 분리 정제하여 수득하였다.
- [0042] 수득된 클론들을 해독(Sequencing)한 후, 블라스트 프로그램을 이용하여 그 5'-말단 서열을 GenBank에 등록된 유전자 데이터베이스와 비교함으로써 ALDH 단백질 코딩 유전자를 확인하고 씨에이알데하이드디하이드로나아제1 (*CaALDH1*) 유전자로 명명하였다. *CaALDH1* 단백질의 아미노산 서열을 분석한 결과 식물의 알데하이드디하이드로나아제에서 전형적으로 나타나는 알데하이드디하이드로나아제 도메인을 가지고 있었고, 벼 (*Oryza sativa*)의 OsALDH (accession no. NP_001043453)와는 단백질 수준에서 66 %, 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 의 AtALDH (accession no. NP_566749)와는 단백질 수준에서 68%의 상동성을 나타냄으로서 신규임을 알 수 있었다 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, nucleotide blast program). 확인된 *CaALDH1*의 유전자 염기서열 (서열번호 1)과 상기 염기서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열(서열번호 2)을 도 1에 나타내었다.
- [0043] **[실시예 2] *CaALDH1*과 AvrBsT의 물리적 상호작용 확인**
- [0044] 상기 실시예 1에서 수득한 *CaALDH1* 단백질과 AvrBsT 상호작용을 확인하기 위해 다음과 같이 시험하였다.
- [0045] **[단계 1]**
- [0046] AvrBsT가 *CaALDH1*의 상호작용을 알아보기 위하여, *CaALDH1*의 cDNA를 Yeast two-hybrid vector에 삽입하여 AvrBsT와 상호작용하는지 알아보았다. pGADT7:*CaALDH1* 과 pGBKT7:*AvrBsT*를 동시에 도입시킨 이스트를 알라닌, 히스티딘, 로이신, 트립토판이 없는 선발 배지(SD-AHLT)에서 생육시키고 알파-갈락토시다아제 활성 정도를 확인하여 상호작용 강도를 결정하였다 (도 2). 음성 대조군인 Lam과 SV40-T는 선발배지에서 생장을 못하고 갈락토오스를 분해하지 못하여 발색반응이 나타나지 않았다. 양성 대조군인 Lam과 SV40-T는 선발배지에서 왕성히 생장하고 갈락토오스를 분해하여 푸른 발색반응을 보였다. AvrBsT와 온전한 *CaALDH1*은 선발배지에서 왕성히 생장하고 푸른 발색을 보였다.
- [0047] **[실시예 3] *CaALDH1*과 AvrBsT의 식물체 내에서의 상호작용 확인**
- [0048] *CaALDH1*과 AvrBsT가 식물체 내에서 상호작용하는지 알아보기 위하여, *CaALDH1*과 AvrBsT로 Co-IP(coimmunoprecipitation analysis)를 수행하였다. Co-IP 기법은 유전자에 각각 다른 에피토프 태그를 퓨전시켜 발현시킨 후 한쪽의 태그 단백질들로 침강을 시킨 후 그 침강 산물에서 다른 쪽의 단백질이 검출되는 지를 확인하여 단백질간의 상호작용을 검정하는 기법이다. *CaALDH1* 유전자를 pSCYCE의 형광단백질을 제거한 벡터에 도입하여 p35S:*CaALDH1:HA*를 제작하였다. *AvrBsT* 유전자를 pVYNE의 형광단백질을 제거한 벡터에 도입하여 p35S:*avrBsT:cMyc*을 제작하였다. 이들 벡터를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* strain GV 3101)에 전기천공법 (electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 담배(*Nicotiana benthamiana*)의 잎에 주사기를 이용, 엽육주사(infiltration) 방법으로 접종하여 일시적으로 유전자의 발현을 유도시켰다. Co-IP는 단백질을 추출하여 cMyc 항원-아가로스로 침강시켜 상대 단백질의 존재여부를 조사하였다.
- [0049] **[단계 1]**
- [0050] Co-IP 벡터를 가지고 있는 GV3101 균주를 담배(*N. benthamiana*) 잎에 균을 침투시킨 후 48시간 후에 Co-IP 실험결과 *CaALDH1:HA* 단백질이 AvrBsT:cMyc이 같이 발현되었을 때만 cMyc 항원-아가로스에 같이 침강되는 것으로

나타났다 (도 3). 이 결과는 CaALDH1이 AvrBsT와 식물체내에서 서로 결합하여 상호작용하는 것을 의미한다.

[실시예 4] CaALDH1 유전자 발현의 억제에 의한 병 저항성의 변화

고추식물에서 CaALDH1 유전자의 발현이 특이적으로 억제되었을 때 병 발생과 관련 다른 유전자들의 발현감소 여부 및 병에 대한 감수성의 증가 여부를 알아보기 위하여, 실시예 1에서 수득한 CaALDH1 유전자를 바이러스 유도 유전자 억제(VIGS, virus-induced gene silencing)에서 이용되어지는 TRV (Tobacco Rattle Virus)를 이용하여 CaALDH1 유전자를 TRV2 벡터에 도입시켜 재조합 벡터인 TRV2:CaALDH1을 제조하였다 (참고문헌 : Baulcombe D. C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 109-113).

이렇게 제조한 재조합벡터 TRV:CaALDH1를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기천공법 (electroporation)을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 고추 유묘 (seedling)의 떡잎에 주사기를 이용, 엽육주사 (infiltration) 방법으로 접종하여 고추식물에 도입함으로써 CaALDH1 유전자의 발현의 억제를 유도시켰다.

[단계 1]

CaALDH1의 발현이 억제된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성의 변화를 알아보기 위하여, 상기의 CaALDH1의 유전자의 발현이 억제된 고추 식물과 대조구로서 TRV2:00 벡터를 접종한 고추 녹광품종에 고추 세균성 점무늬병균 (*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*)의 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Ds1 (*avrBsT*)를 10^8 cfu ml⁻¹의 농도로 접종한 후 2일 이후 접종 잎의 병징을 관찰하였고, 5×10^4 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 후 0, 1, 3일에 감염 식물조직에서의 세균 생장을 측정하였다. 그리고 병원균을 10^7 cfu ml⁻¹로 접종하여 접종 이후 12, 24시간 후에 실험구와 대조구의 감염 잎을 잎에서 RNA를 추출하여 양적 실시간 알티-피시알 (quantitative realtime RT-PCR)을 통해 CaALDH1의 특이적인 유전자 억제 효과와 함께 병 접종시 대조구 식물과 비교하여 병저항성 관련 유전자의 발현 차이를 관찰하였다 (도 6).

도 4에서와 같이 실험결과 VIGS로 CaALDH1의 발현이 억제된 식물에서 병원성균주 Ds1과 비병원성 균주 Bv5-4a의 접종 후 병징을 관찰한 결과, 비병원성 균주 접종시 대조구 식물에서 2일째 국부적 저항성 반응으로 세포사멸이 나타나지만 CaALDH1의 발현이 억제된 식물에서는 국부적 세포사멸이 현저히 감소한 것을 관찰하였다. 그리고 도 5에서와 같이 감염조직에서 병원성 균과 비병원성 균의 세균 생장을 측정한 결과 대조구에 비교하여 CaALDH1의 발현이 억제된 식물에서 비병원성 세균의 생장이 현저히 증가하였다. 알티-피시알 시험 결과 도 6과 같이, CaALDH1이 억제된 식물에서 효과적으로 유전자의 억제가 나타나는 것이 관찰되었고, *CaPR1*, *CaPR10* 등(Young Jin Kim et al., *PHYSIOLOGIA PLANTARUM* 108: 51-60. 2000; Chang-Jin Park et al., *The Plant Journal* (2004) 37, 186-198)과 같은 병 저항성 마커 유전자의 발현이 줄어든 것으로 나타났다.

[실시예 5] CaALDH1과 AvrBsT 동시발현시 세포사멸 변화

모델식물로 사용되는 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물체에서 AvrBsT 단백질은 세포사멸을 일으켰다. AvrBsT와 상호작용하는 CaALDH1이 AvrBsT가 일으키는 세포사멸에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 동시에 발현시켜서 세포사멸의 변동사항을 확인하였다. 실시예 1에서 수득한 CaALDH1 유전자를 식물 과발현용 pBIN35S 벡터에 도입시켜 pBIN35S:CaALDH1을 제조한 후 이렇게 제조된 재조합 벡터인 pBIN35S:CaALDH1을 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)에 전기 천공법을 통하여 도입하고 다시 재조합벡터가 들어가 있는 GV3101 균주를 기존의 pBIN35S:avrBsT 함유 균주와 섞어 4주차 담배(*Nicotiana benthamiana*) 잎에 접종하여 일시적으로 CaALDH1과 *avrBsT* 유전자의 과다발현을 유도시켜 시험을 수행하였다.

[단계 1]

CaALDH1을 과발현하는 재조합벡터 (35S:CaALDH1), *avrBsT*를 과발현하는 재조합벡터 (35S:avrBsT)와 어떠한 유전자도 과발현하지 않는 대조구 벡터 (35S:EV)를 이용하여 형질전환시킨 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101)을 Yeast-Peptone (YEP: yeast extract 10g, peptone 10g,

sodium chloride 5g/L) 배지에서 진탕배양 한 뒤 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 균주현탁액 농도를 흡광도 600(optical density 600, OD₆₀₀) 0.05와 0.2로 맞추고 이를 여러 조합으로 섞어 담배(*Nicotiana benthamiana*) 잎에 각각 접종하고 0, 24 그리고 48시간 뒤에 세포사멸에 의한 전해질 유출로 인한 전도율 증가를 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다. 접종 2일째, *avrBsT*를 발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 접종한 잎에서 세포사멸이 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. *CaALDH1*을 발현하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 접종한 잎에서는 세포사멸이 일어나지 않았다. 그런데 *avrBsT*와 *CaALDH1*를 섞어 접종한 잎에서 세포사멸이 *avrBsT* 혼자 접종한 수준 보다 높게 나타났다 (도 7).

- [0061] [실시예 6] *CaALDH1* 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조 및 *CaALDH1* 유전자의 과다발현에 의한 애기장대 식물의 병 저항성 변화
- [0062] 모델식물로 사용되는 애기장대 식물체에서 *CaALDH1* 유전자의 과다발현시 병에 대한 저항성의 증가 여부에 대하여 알아보기 위하여, 실시예 5에서 제작한 pBIN35S:*CaALDH1*이 형질전환된 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciense* strain GV 3101) 균주를 꽃침지(floral dipping) 방법을 통하여 애기장대 식물에 도입함으로써 *CaALDH1* 유전자의 과다발현을 유도시킨 형질전환 애기장대를 제작하고 아래와 같은 시험을 수행하였다.
- [0063] *CaALDH1* 유전자가 과다 발현된 식물체에서 세균성 병에 대한 저항성이 증가하였는지의 여부를 알아보기 위하여 상기 *CaALDH1* 유전자가 과다 발현된 애기장대와 대조구로서의 야생형 애기장대 식물체에서 *CaALDH1* 유전자의 발현을 관찰하였으며 그 결과를 도 8에 나타내었다. #5, #6, #9 는 사용된 형질 전환 식물의 계통번호를 나타내고, 실험결과 *CaALDH1* 유전자가 과다 발현됨을 관찰할 수 있었다.
- [0064] 상기와 같이 *CaALDH1*이 과다 발현된 식물에 슈도모나스 시링게 패소바 토마토 DC3000 균주를 접종하고 감염조직에서 세균생장을 관찰한 결과 *CaALDH1* 유전자가 과다발현된 식물에서 세균 생장이 야생형 식물 감염조직에서의 세균생장보다 적은 것을 알 수 있었다 (도 9).
- [0065] 상기와 같이 *CaALDH1*이 과다 발현된 식물에 하이알로페로노스포라 아라비돕시디스 노코2 노균병 균주를 접종하고 감염조직에서 노균병 생장을 관찰한 결과 *CaALDH1* 유전자가 과다발현된 식물에서 노균병 생장이 야생형 식물 감염조직에서의 세균생장보다 적은 것을 알 수 있었다 (도 10).
- [0066] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

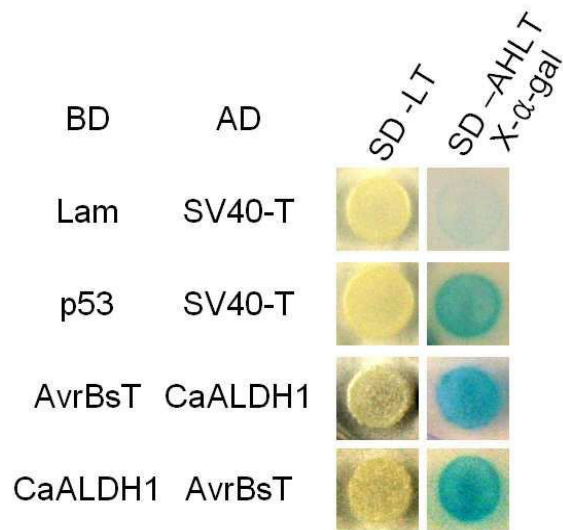
도면1

```

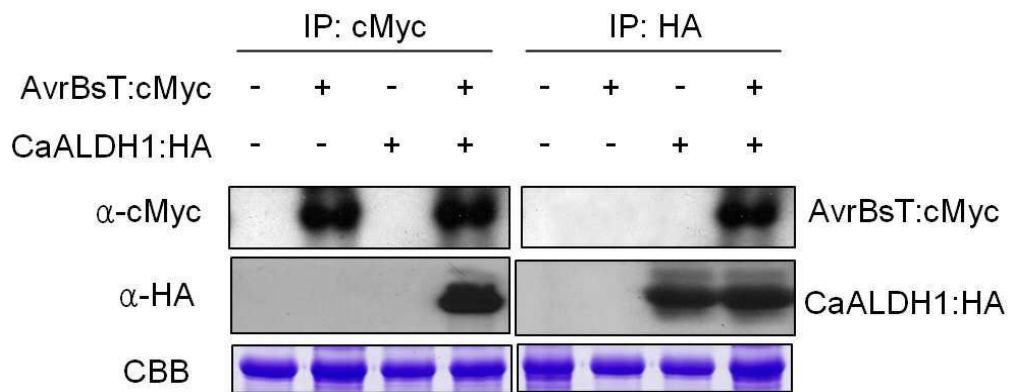
acagtcacaaatttaatttgccatttccccctgtgtgaagcttttataaaagaaaaaaaaa 60
ATGGTGGAAATCAAATGGAAATTTAGAAATCATGTCCAAATTCACAAAATTAAGTTCACC 120
M V E S N G N L E N H V Q I P K I K F T
AAGCTCTTTATCAATGGAGAATTTCGTGATTCCGTTTCAGGAAATACGTTTCGAGACGATA 180
K L F I N G E F V D S V S G N T F E T I
GATCCAAGAAATGGGGAGATAATTGCAAGAAATTAGTGAAGGTGACAAAAGAGGATATTAAT 240
D P R N G E I I A R I S E G D K E D I N
TTGGCTGTCAAAGCTGCTCGTGAAGCTTTTCGATAATGGCCCTTGGCCTCGTTTACACCT 300
L A V K A A R E A F D N G P W P R L A P
TCGGAGAGGAGAAGGATAATGCTGAAGTTTCGCGGACTTAATCGTAGAAAATGCAGAGGAA 360
S E R R R I M L K F A D L I V E N A E E
ATTGCAGCATTGGATGCAATGGATGCAGGAAAGTTATTGTCTCCTTTAAAGAACATGGAA 420
I A A L D A M D A G K L F A P L K N M E
ATCCCGTCAGCAGCAGAACTATTTCGTTATTATGCTGGTGCAGCCGATAAAATTCATGGG 480
I P S A A E T I R Y Y A G A A D K I H G
ACGACTCTTAAATGTACGCGAGATACAAGGGTACACTTTGCTCGAGCCAAATGGTGTT 540
T T L K M S R E I Q G Y T L L E P I G V
GTCCGACACATTATTCTTGGAAATTCGCCGACACAGATGTTTACTCTGAAGGTGGCCCT 600
V G H I I P W N F P T Q M F T L K V G P
GGCTAGCAGCCGGTTGTACTATGATTGTCAAACCTGCTGAACAACTCTCTTTCCGCT 660
A L A A G C T M I V K P A E Q T P L S A
CTCTACTACGCTCACTTGGCTAAGCAGGAGGTGTTCCCGATGGAGTGATCAATGTCGTA 720
L Y Y A H L A K Q A G V P D G V I N V V
ACAGGATTGGATCTACTGCTGGTGTGCACTTTGCTCGCATATGCACGTAGACAAGATA 780
T G F G S T A G A A L C S H M H V D K I
AGCTTCACAGGCTCGACAGAAGTTGGACGACTAGTAATGCAGGCTGCAGCGTTAAGCAAT 840
S F T G S T E V G R L V M Q A A A L S N
TTAAAACCTGTCTCGCTAGAGCTGGGAGGGAAGTCGCCCTTTATAGTATTTCGATGATGA 900
L K P V S [L E L G G K S P] F I V F D D V
GATGTTGACAAAAGTTGCACCACTTGTCTTTATCGGAATCCTATACAACAAGGGAGAAATT 960
D V D K V A P L A L I G I L Y N K G E I
TGTGTGGCTGGATCTCGTCTTTTCATCCAAGAAGGAATTTACGATAAATTTGTCAAGAAA 1020
C V A G S R L F I Q E G I Y D K F V K K
TTGGAGGCGATGGCAAAAACATGGGTTGTTGGCGATCCTTTTGATCCAAATTCCTATCAA 1080
L E A M A K T W V V G D P F D P N S H Q
GGACCTCAAGTTGATAAAAACAGTTCGAGAGAGTACTTTCATACATTGAACATGGCAAG 1140
G P Q V D K K Q F E R V L S Y I E H G K
AAGGAGGAGCGAAATGCTAACCGGAGGCAAGGCATTGGATAGGAAAGGTTATTTCATC 1200
K E G A K L L T G G K A L D R K G Y F I
GAGCCAACCATATTTCATTGATGTTGAAGACGATATGAAAATTGCAAAAGAAAGAAATATTT 1260
E P T I F I D V E D D M K I A K E E I F
GGACCTGTTTTATCAGTAATGAAGTTCAAGACGGTAGAGGAGGTAATCAAGAGAGCTAAC 1320
G P V L S V M K F K T V E E V I K R A N
TGTAACAAATTATGGGACTAGCAGCGGGTGAATGACCAATGCCTTGAACATTGCTACACA 1380
C T N Y G T S S G C N D Q C L E H C Y T
GTTTCAAGATCGATACGTGCTGTGTCATCTGGATAAACTGTTACTTTGCTTTTCGATGCG 1440
V S R S I R A G V I W I N C Y F A F D A
GATTGTCCGTATGGAGGATACAAAGCAGTGGATTTGAAAGAGATTGGGAATGGAAGGA 1500
D C P Y G G Y K S S G F E R D L G M E G
CTTCATAAGTATTTTCAAGTTAAATCTGTAGCTACTCTCTATTACAACTCTCCTTGGCTG 1560
L H K Y F Q V K S V A T P I Y N S P W L
TAAatttgcagaaaaaaagtgcacacatattagattttttattactattggccatagtatt 1620
*
ttcatgttatataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1670

```

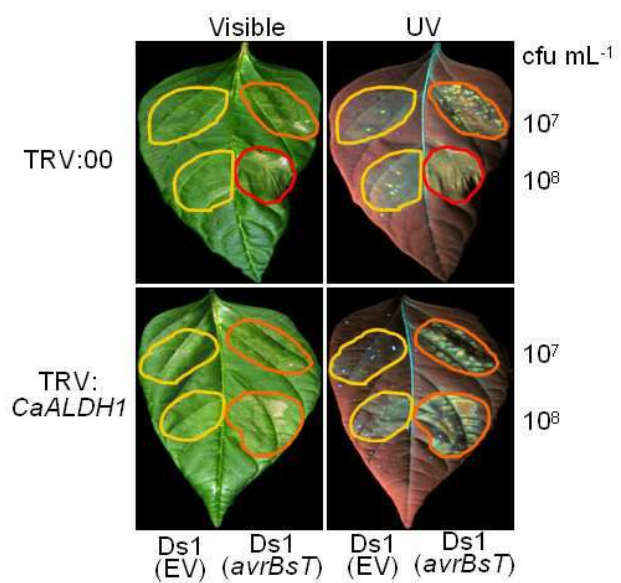
도면2



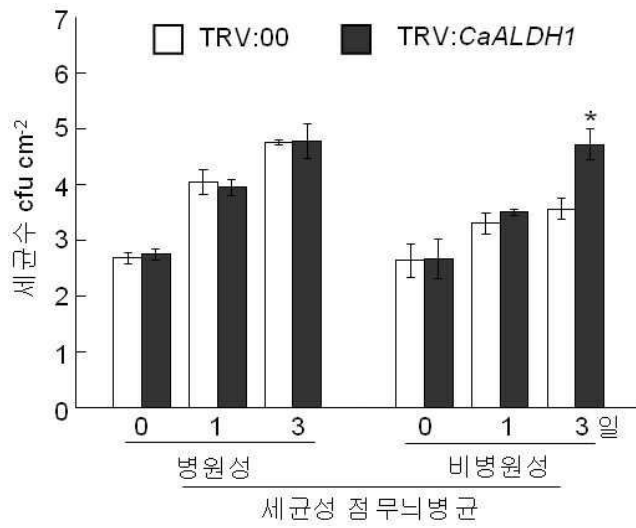
도면3



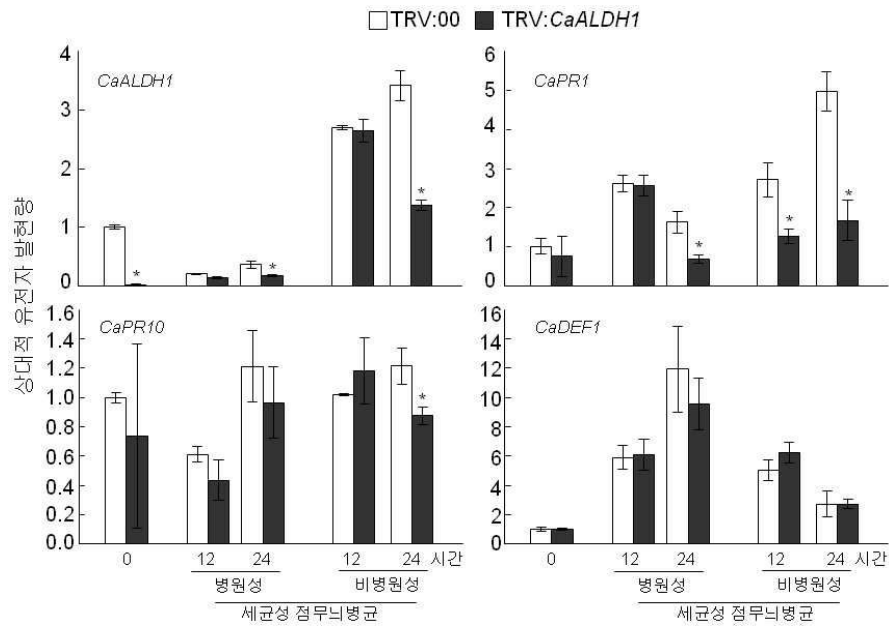
도면4



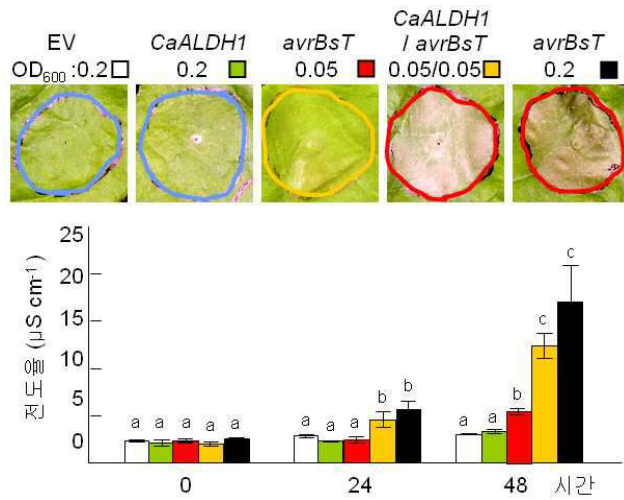
도면5



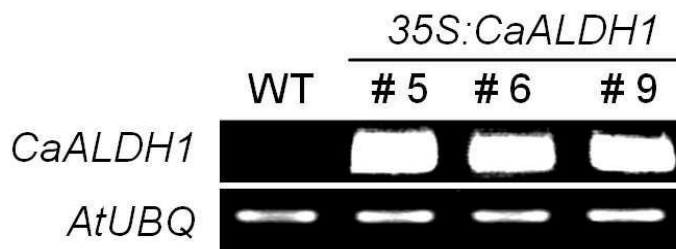
도면6



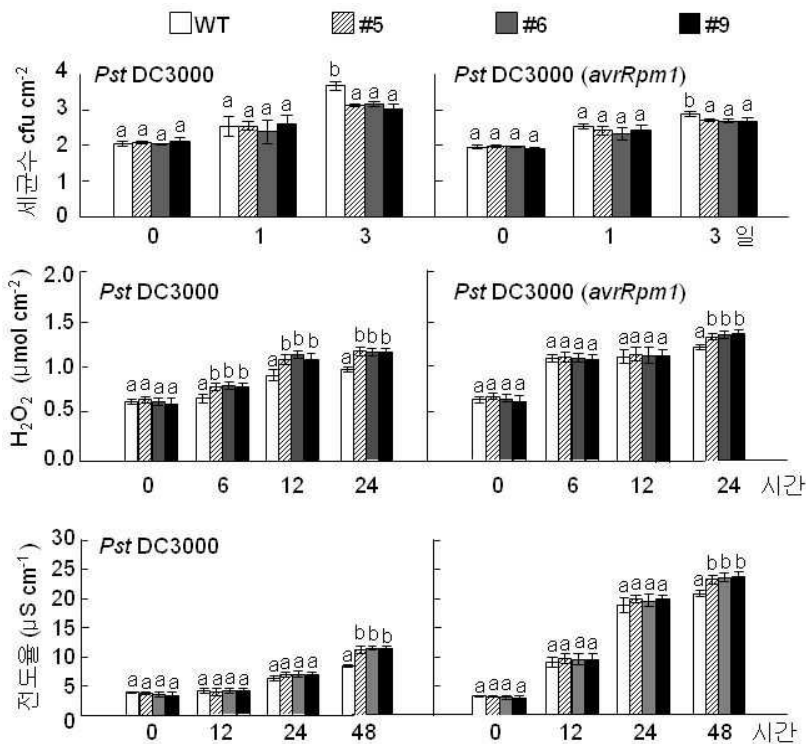
도면7



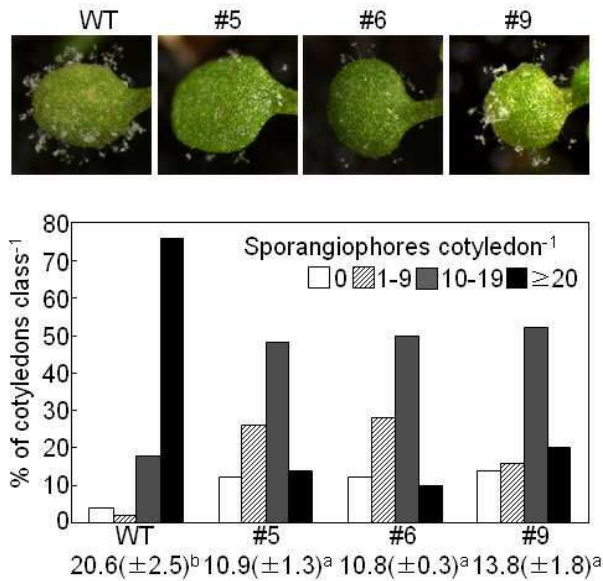
도면8



도면9



도면10



서열목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Disease resistance-related gene CaALDH1, and transgenic plants using the same
- <130> P11-130910-01
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1670
- <212> DNA
- <213> Capsicum annuum cv. Nockwang
- <400> 1

```

acagtcaaat ttaatttgcc atttccctg tgtgaagctt ttaaaagaaa aaaaaaaaaa    60
atggttgaat caaatggaaa tttagaaat catgtccaaa ttccaaaaat taagttcacc    120
aagctcttta tcaatggaga attcgtcgat tccgtttcag gaaatacgtt cgagacgata    180

gatccaagaa atgggggat aattgcaaga attagtgaag gtgacaaaga ggatattaat    240
ttggctgtca aagctgctcg tgaagcttgc gataatggcc cttggcctcg tttagcacct    300
tcggagagga gaaggataat gctgaagttc gcggacttaa tcgtagaaaa tgcagaggaa    360
attgcagcat tggatgcaat ggatgcagga aagttatttg ctcttttaa gaacatggaa    420
atccctcgag cagcagaac tattcgttat tatgctggtg cagccgataa aattcatggg    480
acgactctta aaatgtcacg cgagatacaa gggtacactt tgctcgagcc aattggtgtt    540

```

gtcggacaca ttattccttg gaatttcccg acacagatgt ttactctgaa ggttggccct 600

gcgctagcag ccggttgtag tatgattgtc aaacctgctg aacaaactcc tctttccgct 660

ctctactacg ctcacttggc taagcaggca ggtgttcccg atggagtgat caatgtcgta 720

acaggatttg gatctactgc tgggtgctgca ctttgctcgc atatgcacgt agacaagata 780

agcttcacag gctcgacaga agttggacga ctagtaatgc aggctgcagc gttaagcaat 840

ttaaaacctg tctcgctaga gctgggaggg aagtcgcctt ttatagtatt cgatgatgta 900

gatgttgaca aagttgcacc acttgctctt atcggaatcc tataacaaca gggagaaaatt 960

tgtgtggctg gatctcgtct tttcatccaa gaaggaatth acgataaatt tgtcaagaaa 1020

ttggaggcga tggcaaaaac atgggttggt ggcgatcctt ttgatccaaa ttctcatcaa 1080

ggacctcaag ttgataaaaa acagttcgag agagtacttt catacattga acatggcaag 1140

aaggaggag cgaaattgct aaccggaggc aaggcattgg ataggaaagg ttatttcac 1200

gagccaacca tattcattga tgttgaagac gatatgaaaa ttgcaaaaga agaaatattt 1260

ggacctgttt tatcagtaat gaagttcaag acggtagagg aggtaatcaa gagagctaac 1320

tgtacaaatt atgggactag cagcgggtgt aatgaccaat gccttgaaca ttgctacaca 1380

gtttcaagat cgatacgtgc tgggtgcatc tggataaact gttactttgc tttcgatgcg 1440

gattgtccgt atggaggata caaaagcagt ggatttgaaa gagatttggg aatggaagga 1500

cttcataagt attttcaagt taaatctgta gctactccta tttacaactc tccttggctg 1560

taaatttgca gaaaacaaag tgccaacata ttagattttt attactattg ccatagtatt 1620

ttcatgttat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1670

<210> 2

<211> 500

<212> PRT

<213> Capsicum annuum cv. Nockwang

<400> 2

Met Val Glu Ser Asn Gly Asn Leu Glu Asn His Val Gln Ile Pro Lys

1 5 10 15

Ile Lys Phe Thr Lys Leu Phe Ile Asn Gly Glu Phe Val Asp Ser Val

20 25 30

Ser Gly Asn Thr Phe Glu Thr Ile Asp Pro Arg Asn Gly Glu Ile Ile

35 40 45

Ala Arg Ile Ser Glu Gly Asp Lys Glu Asp Ile Asn Leu Ala Val Lys

50 55 60
 Ala Ala Arg Glu Ala Phe Asp Asn Gly Pro Trp Pro Arg Leu Ala Pro
 65 70 75 80
 Ser Glu Arg Arg Arg Ile Met Leu Lys Phe Ala Asp Leu Ile Val Glu

 85 90 95
 Asn Ala Glu Glu Ile Ala Ala Leu Asp Ala Met Asp Ala Gly Lys Leu
 100 105 110
 Phe Ala Pro Leu Lys Asn Met Glu Ile Pro Ser Ala Ala Glu Thr Ile
 115 120 125
 Arg Tyr Tyr Ala Gly Ala Ala Asp Lys Ile His Gly Thr Thr Leu Lys
 130 135 140
 Met Ser Arg Glu Ile Gln Gly Tyr Thr Leu Leu Glu Pro Ile Gly Val
 145 150 155 160

 Val Gly His Ile Ile Pro Trp Asn Phe Pro Thr Gln Met Phe Thr Leu
 165 170 175
 Lys Val Gly Pro Ala Leu Ala Ala Gly Cys Thr Met Ile Val Lys Pro
 180 185 190
 Ala Glu Gln Thr Pro Leu Ser Ala Leu Tyr Tyr Ala His Leu Ala Lys
 195 200 205
 Gln Ala Gly Val Pro Asp Gly Val Ile Asn Val Val Thr Gly Phe Gly
 210 215 220
 Ser Thr Ala Gly Ala Ala Leu Cys Ser His Met His Val Asp Lys Ile

 225 230 235 240
 Ser Phe Thr Gly Ser Thr Glu Val Gly Arg Leu Val Met Gln Ala Ala
 245 250 255
 Ala Leu Ser Asn Leu Lys Pro Val Ser Leu Glu Leu Gly Gly Lys Ser
 260 265 270
 Pro Phe Ile Val Phe Asp Asp Val Asp Val Asp Lys Val Ala Pro Leu
 275 280 285
 Ala Leu Ile Gly Ile Leu Tyr Asn Lys Gly Glu Ile Cys Val Ala Gly
 290 295 300

Ser Arg Leu Phe Ile Gln Glu Gly Ile Tyr Asp Lys Phe Val Lys Lys
 305 310 315 320
 Leu Glu Ala Met Ala Lys Thr Trp Val Val Gly Asp Pro Phe Asp Pro
 325 330 335
 Asn Ser His Gln Gly Pro Gln Val Asp Lys Lys Gln Phe Glu Arg Val
 340 345 350
 Leu Ser Tyr Ile Glu His Gly Lys Lys Glu Gly Ala Lys Leu Leu Thr
 355 360 365
 Gly Gly Lys Ala Leu Asp Arg Lys Gly Tyr Phe Ile Glu Pro Thr Ile

 370 375 380
 Phe Ile Asp Val Glu Asp Asp Met Lys Ile Ala Lys Glu Glu Ile Phe
 385 390 395 400
 Gly Pro Val Leu Ser Val Met Lys Phe Lys Thr Val Glu Glu Val Ile
 405 410 415
 Lys Arg Ala Asn Cys Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Gly Cys Asn Asp
 420 425 430
 Gln Cys Leu Glu His Cys Tyr Thr Val Ser Arg Ser Ile Arg Ala Gly
 435 440 445

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