

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0015781 (43) 공개일자 2013년02월14일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0078003 (22) 출원일자 2011년08월05일 심사청구일자 2011년08월05일		(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동) (72) 발명자 윤대진 경상남도 사천시 용현면 연호안길 41 박형철 경상남도 진주시 초전동 757-1번지 김외연 경상남도 진주시 신안들말길 47, 주공2차 아파트 203동 203호 (신안동) (74) 대리인 김동완

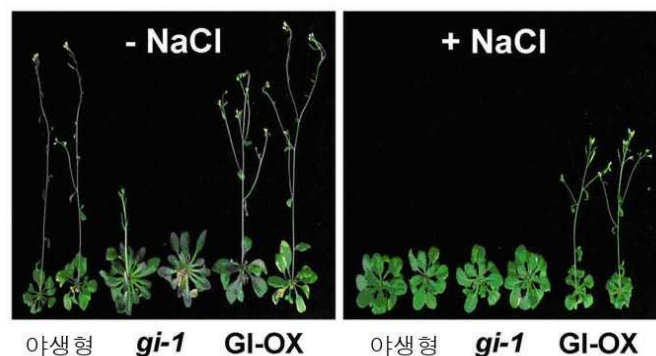
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 염분 스트레스 저항성을 조절하는 지잔티아 단백질

(57) 요약

본 발명은 식물 염분 스트레스 저항성을 조절하는 지잔티아(GIGANTEA) (GenBank 수납번호 : AAF00023.1) 단백질을 관한 것이다. 더욱 상세하게는 식물의 개화와 염분 스트레스에 대한 적응 사이의 관련성을 확인한 것으로 GIGANTEA(GI)가 광 주기 경로와 SOS(염분-과-민감성) 경로 내의 SNF1-관련 단백질 키나제 SOS2와 기능적으로 상호 작용함으로써 염분 스트레스 적응 및 개화 시기를 조절함을 특징으로 하는 지잔티아 핵 단백질에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	03-2011-0341
부처명	농림수산부
연구사업명	차세대 바이오그린 21 사업
연구과제명	시스템생물학 이용 할로필리즘 및 식물 발달전이 통합네트워크 규명을 통한 작물 생산성
최적화 기술 개발	
주관기관	농촌진흥청
연구기간	2011.05.01 ~ 2011.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0637
부처명	교육과학기술부
연구사업명	세계수준의 연구중심대학 육성 사업
연구과제명	기후변화에 대응한 식물 환경생명공학 기술개발
주관기관	한국연구재단
연구기간	2010.10.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

개화 시기를 조절하는 단백질로 여겨진 지잔티아(GIGANTEA) (GenBank 수납번호 : AAF00023.1) 단백질에 있어서, 상기 지잔티아는 식물의 개화뿐만 아니라 식물의 염분 스트레스에 적응에 중요한 역할을 하는 SOS(염분-과-민감성) 경로 내의 SNF1-관련 단백질 키나제 SOS2와 기능적으로 상호 작용함으로써 염분 스트레스 저항성을 조절함을 특징으로 하는 지잔티아 핵 단백질

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 지잔티아 핵 단백질은 염분 스트레스 부재시 지잔티아가 SOS2와 결합하여 불활성인 상태로 존재하여 SOS2 키나제 활성을 억제시켜 SOS1의 활성, 염분의 적응에 매개하는 식물체의 Na^+/H^+ -역수송체의 활성을 억제함을 특징으로 하는 지잔티아 핵 단백질

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 지잔티아 핵 단백질은 염분 스트레스 존재시 지잔티아는 프로테오솜을 통해 분해되고 SOS3와 상호작용을 위해 SOS2를 방출시키며 상기 SOS2는 SOS1의 이온 항상성을 구축하기 위해 원형질막으로 이동하는 SOS2/SOS3 복합체를 생성시킴을 특징으로 하는 지잔티아 핵 단백질

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 프로테오솜을 통한 지잔티아의 분해 감소는 개화의 지연을 유발 뿐 아니라 염분 스트레스 저항성을 유도시킴을 특징으로 하는 지잔티아 핵 단백질

청구항 5

제 1항의 지잔티아 핵 단백질을 과발현하는 염분 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 식물 염분 스트레스 저항성을 조절하는 지잔티아(GIGANTEA) (GenBank 수납번호 : AAF00023.1) 단백질에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 식물의 개화와 염분 스트레스에 대한 적응 사이의 관련성을 확인한 것으로 GIGANTEA(GI)가 광 주기 경로와 SOS(염분-과-민감성) 경로 내의 SNF1-관련 단백질 키나제 SOS2와 기능적으로 상호 작용함으로써 염분 스트레스 적응 및 개화 시기를 조절함을 특징으로 하는 지잔티아 핵 단백질에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

식물의 개체발생에 있어서 중요한 시기는 영양 생장에서부터 생식 생장으로의 전환(transition)이다. 이 전환은 개화를 시작하는 출발점을 포함할 뿐만 아니라 다양한 신진대사 및 생화학 과정의 복잡한 재배치와 관련되어있다. 꽃으로 전환(floral transition)의 타이밍은 생존확률에 유의미한 영향을 미치는데 특히 식물은 환경 조건이 변화함에 따라 변화된다. 전환은 유전적 및 후천적 프로그래밍을 통해 성장 진행을 조절하는 시계에 의해 조절된다. 유전자 로커스가 스트레스 적응 및 개화에 다양한 발현 효과를 나타내는 것을 확인하였지만 이 중요한 발달 조절의 생화학적 기전은 아직 밝혀지지 않았다. 이에 본 발명자들은 스트레스 적응과 개화 조절을 위해 필

수적인 생화학 상호작용을 확인하였다.

[0003] 환경 스트레스는 개화에 부정적인 영향을 미치는 것으로 알려져 왔으며, 특히 염분 스트레스는 용량 의존적으로 아라비도시스의 개화를 지연시키는 것으로 알려져 있다. 광 주기성에 의해 조절되는 핵 징크 핑거 단백질인 CONSTANS (CO)는 개화에 있어서 스트레스 영향을 중요한 프로그래밍 인자로 역할한다. 이와 같은 CO의 상부 스트림에서 작용되는 것이 GIGANTEA (GI)이며, 이는 광 주기성 경로의 중요한 구성요소이다.

[0004] GIGANTEA (GI)는 청색광 수용체 FKF1 (Flavin-Binding, Kelch repeat, F-box1)와 복합체를 형성하며, 이 복합체는 프로테아좀 매개 분해(degradation)에 의해 CO 전사의 억제물질인 Cyclic Dof Factor 1을 목표로 한다. 본 발명자들은 기능적 GIGANTEA 단백질을 결핍시킨 *gi* 삽입 변이의 꽃 전환에 대한 높은 염분량의 영향을 조사하였다. 정상 조건 하에서, 모든 *gi* 라인은 로제트 형상의 잎의 증가와 함께 늦게 개화되었고 야생형(WT)과 비교시 추대(bolting)의 생성에는 몇 일을 더 필요로 하였다(도 1a 및 1b). 그러나 염분 농도에 대한 반응으로 *gi* 및 야생형은 뚜렷하게 늦은 개화 표현형을 나타냈으며 스트레스 받지 않은 식물과 비교하면 추대 생성시 거의 비슷한 수의 로제트 형상의 잎을 생산했으나 반면에 개화의 염분-유도 지연은 GIGANTEA가 과발현된 식물에서 완전히 억제되었다(도 1a 및 1b). 이러한 관찰과 일치하여, 야생형에서 CO 및 FT 전사 수준은 염분 스트레스에 의해서 현저하게 감소되지만, *gi-1*에서 CO 및 FT 전사의 수준은 낮고 염분 스트레스에 의한 영향을 받지 않았다(도 5). 따라서 GIGANTEA는 아라비도시스의 염분-유도 늦은 개화를 조정하는데 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 해결하려는 과제는 핵 단백질 GIGANTEA가 식물의 개화와 염분 스트레스에 대한 적응 사이에 어떠한 관련성을 지니는지를 측정코자 한 것이며, 즉 GIGANTEA(GI)가 광 주기 경로와 SOS(염분-과-민감성) 경로 내의 SNF1-관련 단백질 키나제 SOS2와의 변환 작용을 기능적으로 상호작용함으로써 염분 스트레스 적응에 관여하는지 여부를 측정코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 목적은 개화 시기를 조절하는 단백질로 여겨진 지잔티아(GIGANTEA) (GenBank 수납번호 : AAF00023.1) 단백질에 있어서, 상기 지잔티아는 식물의 개화뿐만 아니라 식물의 염분 스트레스에 적응에 중요한 역할을 하는 SOS(염분-과-민감성) 경로 내의 SNF1-관련 단백질 키나제 SOS2와 기능적으로 상호 작용함으로써 염분 스트레스 저항성을 조절함을 특징으로 하는 지잔티아 핵 단백질을 제공하는 것이다.

[0007] 또한 상기 지잔티아 핵 단백질은 염분 스트레스 부재시 지잔티아가 SOS2와 결합하여 불활성인 상태로 존재하여 SOS2 키나제 활성을 억제시켜 SOS1의 활성, 염분의 적응에 매개하는 식물체의 Na^+/H^+ -역수송체의 활성을 억제함을 특징으로 한다.

[0008] 또한 상기 지잔티아 핵 단백질은 염분 스트레스 존재시 지잔티아는 프로테오솜을 통해 분해되고 SOS3와 상호작용을 위해 SOS2를 방출시키며 상기 SOS2는 SOS1의 이온 항상성을 구축하기 위해 원형질막으로 이동하는 SOS2/SOS3 복합체를 생성시킴을 특징으로 한다.

[0009] 또한 상기 프로테오솜을 통한 지잔티아의 분해 감소는 개화의 지연을 유발 뿐 아니라 염분 스트레스 저항성을 유도시킴을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 또다른 목적은 상기 지잔티아 핵 단백질을 과발현하는 염분 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 효과는 단백질 GIGANTEA가 식물의 개화와 염분 스트레스에 대한 적응 사이의 관련성을 확인한 것이다. 즉 GIGANTEA(GI)가 광 주기 경로와 SOS(염분-과-민감성) 경로 내의 SNF1-관련 단백질 키나제 SOS2와의 변환 작용을 기능적으로 상호작용함으로써 염분 스트레스 적응을 통해 개화 시기를 조절함을 확인한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 GIGANTEA이 아라비돕시스에서 염분 반응과 개화 사이의 조절자로서 작용한다는 것을 나타낸 것이다.

도 1a 및 도 1b 염 처리는 아라비돕시스에서 개화를 지연시킴을 나타낸다. 5주 된 야생형(*Col-0*), *gi-1* 및 GI-OX (35S::HA-GI) 식물은 긴 낮 조건(16시간 명/8시간 암) 하에서 2% 설탕을 보충한 1/2 MS 배지와 NaCl 50 mM 이 존재 또는 부존재 조건(A) 또는 NaCl 25mM이 존재 또는 부존재 조건(B)에서 성장되었다. 개화기의 평균 $\pm$ 표준오차는 개화기의 로제트 형태의 잎의 수에 관해서 나타낸다(B).

도 1c는 GIGANTEA가 프로테오솜-의존적 방식으로 염분에 노출시 분해된다는 것을 나타낸 것이다. 3 일 된 GI-OX 식물의 잎은 Zeitgeber 시간(ZT) 1에서 NaCl (100 mM), MG132 (100 μ M) 또는 NaCl 첨가 MG132로 처리되었으며, 12시간 및 24시간에서 수집되었다. GIGANTEA 단백질 수준 및 GI mRNA 전사 수준은 각각 면역 블로팅 분석(래트 항-HA) 및 RT-PCR에 의해 평가되었다. 튜불린(tubulin) 전사는 로딩 대조군으로서 사용되었다. 모든 실험은 적어도 3회 반복되었다.

도 1d는 도 1c에 나타낸 결과를 정량화한 것이다. 도 1e는 GIGANTEA의 분열은 SOS1-OX에서 염분 내성을 증가시킨다는 것을 나타낸 것이다. 야생형, *gi-1*, 35S::SOS1 (SOS1-OX) 및 35S::SOS1 *gi-1* (SOS1-OX x *gi-1*) 식물은 3주 동안 토양에서 성장되었으며(패널 위쪽), 2주 동안 150 mM NaCl이 없거나(패널 중간) 150 mM NaCl로 처리(패널 아래쪽)되었다. 도 1f는 SOS1 과다가 *gi* 변이체를 증가시킨다는 것을 나타낸 것이다. 3일 된 야생형, SOS1-OX, *gi-1*, 및 SOS1-OX x *gi-1* 식물의 잎은 24시간 동안 100 mM NaCl로 처리되었다. 면역 블롯 분석은 마우스 항-SOS1 항체를 사용하여 실시되었으며, 쿠마시-염색된 막은 로딩 대조군처럼 더 낮은 패널에 존재한다.

도 2는 GIGANTEA가 SOS2와 상호작용하며 SOS2 키나제 활성을 억제한다는 것을 나타낸 것이다.

도 2a는 GIGANTEA가 체내에서 SOS2 및 SOS3과 상호작용 한다는 것을 나타낸 것이다. 일시적으로 발현된 단백질의 공동-면역 침강(Co-IP)은 토마코 표피 세포 층에서 실시되었다. 3일 된 토마코(*Nicotiana benthamiana*) 식물은 각각 35S::GI-HA 및 35S::SOS1-GFP, 35S::SOS2-GFP 또는 35S::SOS3-MYC이 있는 아그로박테리움에 침윤되었다. 단백질 추출물은 항-GFP 또는 항-MYC 항체와 면역 침강되었다. 막은 GIGANTEA를 감지하는 항-HA, SOS1 또는 SOS2를 감지하는 항-GFP, SOS3을 감지하는 항-MYC와 함께 검출되었다.

도 2b는 ³⁵S-표지된 GIGANTEA 및 GST-태그된 SOS2와 SOS3 사이의 시험관 내 상호작용을 나타낸 것이다. GST는 결합 특이성에 대한 음성 대조군으로서 사용되었다. 쿠마시-염색된 밴드는 수지 상에서 전체-길이 SOS2 및 SOS3 단백질의 수준을 나타낸다. 도 2c는 효모 분할-유비퀴틴 에세이를 나타낸 것이다. SOS2 또는 SOS3 및 GI는 각각 유비퀴틴의 N 말단 및 C 말단과 융합되었다. 양성 및 음성 대조군 효모 세포에는 각각 pMet-SIZ1-Cub + pCup-NuI-SUM01 및 pMet-Cub + pCup-NuI 벡터가 있다. 도 2c는 GIGANTEA가 시험관 내에서 SOS2-매개 SOS1 인산화를 억제한다는 것을 나타낸 것이다. GST-SOS1 (GST-SOS1 CD3, 아미노산 885~1146) 및 GST- T/D SOS2 (Thr¹⁶⁸-to-Asp)의 C 말단 절편을 발현시키는 정제된 박테리아 단백질은 MBP-GIN이 있거나 없는 조건에서 시험관 내 키나제 에세이에 포함되었으며, SDS-PAGE에 의해 용해되었다. BSA는 대조군으로 사용되었다. 신호는 Cyclon 포스퍼-이미지 스크린(위쪽 패널) 및 쿠마시-염색된 겔(아래쪽 패널)을 사용하여 시각화되었다. 도 2d는 인산화된 SOS1 단백질이 염분 스트레스시 *gi* 변이체에서 풍부해진다는 것을 나타낸 것이다. 3주 된 토양-성장 아라비돕시스의 잎은 24시간 동안 100mM NaCl로 처리되었다. *sos1-1*, *gi-1*, *gi-ko*, SOS1-OX 및 야생형 (*Col-gl*) 식물로부터 단백질 추출물은 항-SOS1 항체로 면역 블롯팅되었다. 가장 아래 패널이 로딩 대조군이다. 도 2e는 SOS2-의존적 인산화가 SOS1 단백질 안정성에 중요하다는 것을 나타낸 것이다. 식물은 도 2d와 같이 처리되었다. 단백질은 항-

SOS1 항체와 면역 블롯팅을 위한 *sos1-1*, SOS1-OX-DAPA(SOS2-의존적 인산화 자리의 SOS1-OX 변이체) SOS1-OX 및 *Col-gl* 식물로부터 추출되었다. *SOS1* mRNA 전사 수준은 RT-PCR에 의해 확인되었다. 튜블린 전사물(하단 행)은 로딩 대조군을 제공한다.

도 2f는 SOS2가 *gi-1*-매개 염분 내성을 필요로 한다는 것을 나타낸 것이다. *Col-0*, *sos2-2*, *gi-1* 및 *sos2-2 x gi-1* 이중 변이체의 아라비도시스 식물은 3주 동안 토양에서 성장되었으며(위쪽 패널), 2주 이상 동안 150 mM NaCl이 없는 조건에서 처리(중간 패널), 150 mM NaCl이 있는 조건에서 처리(아래쪽 패널)되었다. 도 2h는 SOS2가 *gi-1*에서 SOS1의 축적을 위해 필수적이라는 것을 나타낸 것이다. 100 mM NaCl로 처리된 *sos2-2*, *gi-1*, *sos2-2 x gi-1* 이중 변이 식물체 및 야생형 식물의 단백질 추출물은 상기(도 2e 및 f)와 같이 면역 블롯팅을 위해 사용되었다. 가장 아래쪽 패널은 로딩 대조군이다.

도 3은 염분 및 SOS3이 GI 및 SOS3 사이의 상호작용에 영향을 미친다는 것을 나타낸 것이다.

도 3a는 Salt 및 SOS3이 체내에서 GI/SOS2 상호작용을 방해한다는 것을 나타낸 것이다. SOS3-MYC이 없거나 있는 조건에서 GI-HA 및 SOS2-GFP와 공동-침윤된 토마코 식물로부터의 단백질 추출물은 항-GFP 항체와 함께 면역 침강되었다. 아그로박테리움 세포에서 있는 컨스트럭트의 다양한 조합이 표시되었다. 침윤된 토마코 식물은 24시간 동안 100mM NaCl이 있거나(오른쪽 패널) 없는(왼쪽 패널) 조건으로 처리되었다. 막은 각각 GIGANTEA를 감지하는 항-HA, SOS2에 관한 항-GFP 및 SOS3에 관한 항-MYC 항체로 검출되었다. 도 3b는 GIGANTEA가 C-말단을 통해 SOS2와 상호작용 한다는 것을 나타낸 것이다. 시험관 내-번역된 ³⁵S-GI는 GST-융합 단백질(I), GST-SOS2의 전체-길이(II; 1-446 aa) 또는 N-말단(III; 1-308 aa)과 함께 배양되었다. 단백질 복합체는 SDS-PAGE에 의해 분리되었으며 X-레이 필름에 노출되었다. 쿠마시-염색된 겔은 로딩 대조군의 역할을 한다. 도 3c는 GIGANTEA가 SOS2 C-말단 부분과 상호작용 한다는 것을 나타낸 것이다. 전체-길이 GIGANTEA 단백질은 효모 투-하이브리드(yeast two-hybrid) 활성화 도메인 벡터 pACT2에서 클로닝되었다. SOS2의 촉매 N-말단 도메인(SOS2-N; 잔기 1~308) 및 조절 C-말단 도메인(SOS2-C, 잔기 309~446)은 GAL4 DNA-결합 도메인과 융합되었으며 GIGANTEA와 상호작용을 테스트하기 위한 미끼(bait)로서 사용되었다. GIGANTEA와 공동-형질전환된 세 개의 독립적 배양 및 SOS2 컨스트럭트의 회색이 플레이트되었다. 빈 벡터는 음성 대조군으로 사용되었다. 보충 히스티딘이 없는 성장(-HIS)은 단백질-단백질 상호작용을 나타낸다.

도 4는 염분 내성의 음성 조절자로서 GIGANTEA에 대한 실용 모델을 나타낸 것이다.

도 5는 개화기-조절된 유전자의 상대적 발현을 나타낸 것이다.

10일 된 식물은 24시간 동안 NaCl (50 mM)이 없거나 있는 조건으로 처리되었다. 검출된 엠프리콘의 수준은 액틴 유전자에 대응하는 증폭된 생성물과 관련하여 정상화되었다. 각 ZT (zeitgeber time) 지점에서 자료는 세 개의 생물학적 복제본으로부터 평균 ± 표준오차이다.

도 6은 *gi* 변이체가 증가된 염 내성과 Na^+/H^+ 교환 활성을 보인다는 것을 나타낸 것이다.

도 6a는 야생형, *gi-1* 및 GI-OX 식물이 3주 동안 토양에서 성장되고(위 패널), 그 다음에 2주 동안 0 mM (중간 패널) 또는 150 mM (아래 패널) NaCl로 처리되었음을 나타낸 것이다. 도 6b는 패널 A에서 나타낸 것처럼 NaCl을 처리하거나 처리하지 않았을 때 끝 지점에서의 생중량(fresh weight)을 나타낸 것이다. 자료는 세 개의 독립적 복제본의 평균 ± 표준오차이다. 도 6c는 에세이 배지에서 Na^+ 농도의 기능처럼 *gi-1* (사각형), *Col-0* (원) 및 *sos1-1* (삼각형) 잎으로부터 분리된 형질막포에서의 Na^+/H^+ 교환 활성을 나타낸 것이다. 활성은 ($\Delta F \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ 단백질)로서 발현되었으며, 막 단백질의 min 및 mg당 형광($\Delta F/F_{\text{max}}$)의 상대적인 변화로서 발현되었다. 각 점은 세 개의 기술적 복제본 ± 표준편차의 평균이다.

도 7은 *Col-0*, *gi-1*, *sos1-1* 및 GI-OX에서 스트레스-반응 유전자의 발현을 나타낸 것이다.

10일 된 식물은 20시간 동안 100 mM NaCl이 있거나(검정 바) 없는(회색 바) 조건으로 처리되었다. *P5CS* (A) 및 *DREB2A* (B)의 전사 수준은 실시간 PCR에 의해 측정되었다. 액틴은 내부 대조군(internal control)으로 사용되었다. 자료는 세 개의 독립적 실험의 ± 표준오차의 평균을 나타낸 것이다.

도 8은 GIGANTEA가 염분 과 민감성(SOS) 신호 전달과 관련이 있다는 것을 나타낸 것이다.

도 8a는 야생형, *gi-1*, *35S::SOS1* (SOS1-OX) 및 *35S::SOS1 gi-1* (SOS1-OX x *gi-1*) 식물을 나타낸 것이다. 도 8b는 야생형, *sos1-1*, *gi-1* 및 *sos1-1 x gi-1* 식물을 나타낸 것이다. 도 8c는 야생형, *sos2-2*, *gi-1* 및 *sos2-2*

x gi-1 식물을 나타낸 것이다. 도 8d는 야생형, *sos3-1*, *gi-1* 및 *sos3-1 x gi-1* 식물을 나타낸 것이다. 식물은 3주 동안 토양에서 성장(맨 위 열)되었으며, NaCl이 없는 조건에서 1주(맨 위로부터 두 번째 열) 동안, 300 mM NaCl이 있는 조건에서 1주(3번째 열) 또는 2주(맨 아래 열)동안 처리되었다.

도 9는 체내 GI와 SOS2 사이의 상호작용을 나타낸 것이다.

도 9a 및 도 9b는 체내 GIGANTEA와 SOS2 또는 SOS3 사이의 상호작용은 BiFC (이분자 형광 상보 분석, bimolecular fluorescence complement analysis)에 의해 측정되었다. 형광 단백질인 Venus의 N-말단 및 C-말단 절편은 각각 SOS2 또는 GIGANTEA 중 하나와 융합되었다. 컨스트럭트의 다양한 조합이 아그로박테리움-매개된 형질전환을 통해 토마코 표피세포 층에서 발현되었다. 토마코 원형질체(protoplast)는 BiFC 벡터를 포함하는 아그로박테리움 스트레인으로 침윤된 잎으로부터 분리되었다(맨 위쪽 패널).

도 10은 포스파타아제 처리에 의한 SOS1의 증가된 세포-프리 분해 속도를 나타낸 것이다.

24시간 동안 100 mM NaCl로 처리된 후 SOS1-OX 식물의 단백질의 추출물은 지정된 시간 동안 30°C에서 람다 포스파타아제로 처리되었다. 도 10a는 면역 블롯팅 분석이 항-HA 항체로 실시되고, 쿠마시-염색된 막이 로딩 대조군(아래 패널)으로서 사용됨을 나타낸 것이다. 도 10b는 도 10a에 나타난 SOS1 단백질 수준의 정량화를 나타낸 것이다. 세 개의 독립적 실험의 평균 $\pm$ 표준오차를 보여주고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 식물의 환경에 대한 반응 결과는 예외 없이 영양생장의 지연 및 개화의 지연 또는 정지를 수반한다. 본 발명자들은 개화기와 염분에 대한 적응 사이의 관련성을 발견하였다. 광 주기 경로의 중요한 작동 경로인 GIGANTEA(GI)와 SOS(염분-과-민감성) 경로의 SNF1-관련 단백질 키나제 SOS2는 기능적으로 상호작용한다. 스트레스가 없으면, GIGANTEA를 지닌 복합체에서 SOS2 키나제 활성의 억제는 SOS1의 활성, 염분의 적응을 매개하는 주 식물(major plant) Na^+/H^+ -역수송체의 활성을 불가능하게 한다. GIGANTEA 과발현으로 조기 개화 식물은 증가된 염분 민감성을 나타냈으나 반면에 GIGANTEA 라인은 강화된 염분 내성을 나타내고 늦게 개화된다. GI-SOS2 상호작용은 분자 측면에서 중요한 환경 적응 반응의 통합에 관한 개화 및 스트레스 인지 사이의 관찰된 연관성을 설명할 수 있는 더 높은 순서 규제 경로를 발견하였다.

[0014] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0015] 염분 스트레스가 없으면, GIGANTEA는 SOS2와 결합하며 이는 불활성인 상태로 존재한다. 염분 스트레스는 GIGANTEA의 분해를 촉발시키며, 활성화 단백질 SOS3과 상호작용 하는 SOS2를 분비시킨다. 활성화인 SOS2/SOS3 단백질 키나제 복합체는 SOS1이 SOS2-특이적 인산화에 의해 활성화되는 원형질막으로 이동한다.

[0016] GI-HA(Hemagglutinin) 태그된 과발현 식물에서 GIGANTEA 전사 수준은 염분 스트레스 후에 유의미하게 변화되지 않았다(도 1c). 하지만 GIGANTEA 단백질 정상 상태 수준은 시간-의존적으로 염분처리에 의해 급격하게 감소하였다(도 1c). 암(dark)-유도 프로테오시스를 통한 후변역 방식으로 GIGANTEA 단백질 안정성 조절을 나타내는 종래의 연구는 GIGANTEA의 염분-의존적 분해가 프로테아좀-의존적 과정과 관련되어있는지 여부를 테스트하는 접근법을 제안하였다. 염분(100 mM NaCl) 및 프로테아좀 억제제인 MG132에 의한 처리는 GIGANTEA 단백질의 NaCl-유도 분해를 막았으며(도 1c 및 1d) 염분 스트레스시 GIGANTEA의 제거는 기능적 프로테아좀 복합체에 의존한다는 것을 나타낸다.

[0017] 특정 스트레스의 인지 또는 염분 내성의 조절에 있어서 GIGANTEA의 역할을 확인하기 위해서, GIGANTEA 활성이 다른 라인의 염분-스트레스 반응이 조사되었다. 2주 동안 150 mM NaCl로 처리된 GIGANTEA 유전자형의 식물은 야생형 식물과 비교시 상당히 높은 염분 내성을 나타내었다(도 1e 및 도 6a 및 6b). 따라서 발달 속도(개화기)를 감소시키는 기능적 GIGANTEA 단백질의 과발현은 NaCl에 적응하는 능력에 크고 부정적인 영향을 미쳤다. 높은 염도에 노출되면 몇 가지 유전자의 전사 수준의 급격한 증가를 유도한다. 하지만 본 발명자들은 표준 스트레스 반응 유전자의 유도에 GIGANTEA가 관련되어 있다는 증거를 찾지 못했으나(도 7), GIGANTEA가 일반적으로 염도의

변화와 관련된 전사 반응의 조절과 관련되어 있지 않은 메커니즘을 통해 염분으로 식물의 성장 반응을 조절한다는 것을 제안하였다.

[0018] 염분-스트레스 반응 유전자 중의 하나는 원형질막 Na^+/H^+ 역수송체 SOS1을 암호화하며, 이는 아라비도시스의 염분 내성을 측정하는 가장 중요한 구성 요소라고 알려져 있다. 반대로 GIGANTEA는 다른 단백질의 기능에 영향을 미치는 단백질-단백질 상호작용으로 알려진 파트너이다. 이는 GI가 직접적 또는 간접적으로 단백질 상호작용을 통해 SOS1 기능에 영향을 미칠 수 있다는 것을 본 발명자들은 인지하였다. 특히 SOS1 단백질 수준이 항-SOS1 항체를 이용하여 *gi* 식물에서 측정되었을 때, 변이체는 염분 스트레스시 야생형에 비해 훨씬 더 높은 수준으로 SOS1 단백질을 축적하는 것으로 밝혀졌다(도 1f). 또한 이러한 결과는 SOS1을 과발현하는 *gi-1* 변이 식물체를 사용하여 확인되었다. 야생형 또는 *gi-1* 라인과 비교해보면, SOS1 과발현 *gi-1* 변이 식물체는 야생형에 비해 염분에 대해 뚜렷한 내성을 나타낼 뿐만 아니라(도 1e 및 도 8) 더 많은 양의 SOS1 단백질을 축적하였다(도 1f). 또한 *gi* 라인에서 SOS1 단백질의 축적은 야생형과 비교시 *gi* 식물의 원형질막포(plasma membrane vesicles)의 증진된 Na^+/H^+ 교환 활성과 관련이 있으며(도 6), 아라비도시스의 염분 내성을 위해 필요하다. 따라서 이것은 GIGANTEA가 SOS1 단백질 불안정성을 유도하여 염분 내성의 음성 조절자로서 작용할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0019] 높은 염도에 노출되었을 때, 식물은 이온의 유입, 세포내 구획화 및 조직 분포를 조절함으로써 세포질의 Na^+ 농도를 낮게 유지한다. Na^+ 의 효율적인 유출은 높은 염도에 노출 후에 이온 및 부분적으로 수분 항상성을 재-확립하는 식물의 특이적 SOS 경로에 의해 달성된다. 이 경로에서 알려진 세 가지의 단백질 중에서, SOS1은 Ca^{2+} 활성 단백질 SOS3 및 키나제 SOS2를 포함하는 단백질 키나제 복합체에 의해 양성적으로 조절되며 이는 염도 스트레스에 대응하여 생체 내 SOS1을 인산화한다.

[0020] 앞에서의 단백질 추출물은 SOS1-GFP, SOS2-GFP 또는 SOS3-myc와 GI-HA의 공동-면역침강(co-IP)을 위해 사용된다. 결과는 GIGANTEA가 복합체에서 양성적으로 SOS2 및 SOS3와 상호작용을 하지만 반면에 SOS1과는 유의미한 상호작용을 하지 않는다는 것을 나타낸다(도 2a). 그 다음에 본 발명자들은 SOS3 또는 SOS2 둘 중 하나와 GIGANTEA의 직접적인 상호작용을 위해 테스트하였다. 시험관 내에서 번역된 GIGANTEA 단백질은 GST-SOS3 또는 GST-SOS2 수지와 결합하기 위해서 사용되었다. ^{35}S -표지된 GIGANTEA는 음성대조군으로서 GST 단독 또는 GST-SOS3와 비교시 SOS2와 강하게 상호 작용하였다(도 2b). 비슷한 결과는 유비퀴틴(Ub)의 N- 및 C-말단 반(Nub 및 Cub)의 조립을 기반으로 하는 효모 분할-유비퀴틴 에세이를 이용하여 얻었다. 세포 공동-발현 SOS2-Cub-RUra3p 및 Nub-GI는 우라실을 포함하는 플레이트 상에서는 성장할 수 없었으나, 5-플루오르오르토산(FOA)을 포함하는 플레이트 상에서는 성장할 수 있었으며, 이는 SOS2가 생체 내에서 GIGANTEA와 안정한 복합체를 효과적으로 형성한다는 것을 나타낸다(도 9a). 또한 이것은 2분자 형광 상보성(BiFC) 실험에 의해 확인되었다. YFP 융합 단백질 쌍과 경계에서 침투되는 토마토 잎의 공초점 현미경을 이용한 관찰은 세포질과 핵에서 SOS2와 GIGANTEA의 특이적 상호작용을 증명하였다(도 9b).

[0021] SOS2는 SOS1을 인산화하고 나트륨 유출을 활성화하는 단백질 키나제를 암호화한다. GI/SOS2 상호작용이 SOS1 인산화에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위해서, 시험관에서 SOS2 키나제-의존적 SOS1 인산화 에세이가 사용되었다. 기질로서 SOS1의 C-말단과 함께 키나제 반응시 SOS2에 첨가된 GIGANTEA의 존재는 BSA 첨가와 비교시 인산화를 차단하였다(도 2c). 이것은 SOS2에 GIGANTEA의 결합이 SOS1의 인산화를 억제한다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는 생체 내 SOS1 인산화 에세이에 의해 확인되었다. 이전에 본 발명자들은 염분 스트레스시 식물체 내에서 SOS2-의존적 SOS1 인산화를 밝혔다. 비록 SOS1의 인산화-의존적 인-겔 지연이 큰 사이즈의 단백질(127 kDa)로 인해 작게 나타났을지라도, 야생형 식물 추출물로부터의 단백질 이동과 비교하면 100 mM NaCl의 처리는 *gi* 라인으로부터 추출된 SOS1의 유의미한 이동 시프트를 야기하였다(도 2d). 종합해 보면 시험관 내 및 생체내의 결과는 SOS1의 SOS2-의존적 인산화시 GIGANTEA의 부정적 효과(negative effect)를 나타냈다.

[0022] 그 다음에 본 발명자들은 SOS1의 안정성이 SOS1의 염분-유도 인산화에 의해 영향을 받는지 여부 및 얼마나 영향을 받는지를 테스트하였다. 세포-제거 분해 에세이는 포스파타아제가 있거나 없는 상태에서 배양된 35S::SOS1-HA 식물로부터의 단백질 추출물로 구성된 것을 사용하였으며, HA-태그된 SOS1의 상대적 저하 속도가 측정되었다. SOS1 단백질 수준은 포스파타아제 처리 후에 더 빠르게 감소하였으며 이는 탈인산화된 SOS1이 인산화된 형태보다 더 불안정하다는 것을 나타낸다(도 10). 이는 SOS1의 인산화-의존적 안정화가 염분 스트레스가 있는 식물에서 발생한다는 것을 강하게 나타낸다. 기능적 SOS2는 인산화를 필요로 한다. 본 발명자들은 이것이 SOS1를 안정화시키고 고 염분 농도로의 축적을 유도한다는 것을 나타냈다. 이는 SOS1의 SOS2-의존적 인산화에 필수적인 것으로 알려진 두 개의 세린 잔기(DAPA 변이체)에서 변이와 SOS1를 일시적으로 발현시키는 아라비도시스 *sos1* 변이주에서 실증되었다. 실제로 SOS1_[DAPA]을 발현하는 라인은 SOS1 단백질의 NaCl-유도 축적을 보이지 않았다(도 2e).

[0023] GIGANTEA가 SOS2와 상호작용하고 SOS2 키나제 활성을 억제하고 이를 통해 SOS1 인산화를 방지하면, GIGANTEA의 변이체에 의해 야기되는 염분 내성 표현형은 SOS2-의존적이다. 실제로 *sos2-2 gi-1* 및 *sos1-1 gi-1* 이중 변이 식물체는 단일 *gi* 변이체의 염분 내성을 보이지 않았다(도 2F 및 도 8). *sos3* 변이체는 동일한 결과를 만들어냈으며 *gi* 의존적 염분 내성을 억제하였다(도 8d). 또한 *gi* 변이체에서 증가된 SOS1 정상-상태 단백질 수준은 *sos2-2 gi-1* 및 *sos1-1 gi-1* 이중 변이체, 및 *sos2-2* 및 *sos1-1* 단일 변이체에서 폐기되었다(도 2g). 이 시점에서, GIGANTEA는 SOS1의 SOS2-의존적 인산화를 억제함으로써 SOS 경로에서 음성 조절자로서 부각되며, 따라서 높은 염도의 부재시 불안정한 SOS1를 만들었다.

[0024] 염분 스트레스 하에서, 칼슘 센서 SOS3는 SOS2와 결합하며 함께 이들은 세포의 이온 항상성을 재-확립하기 위해서 SOS1을 활성화한다. 공동-면역침강된 SOS2는 100 mM NaCl 처리된 식물의 잎 추출물에서 GIGANTEA 단백질이 더 적기 때문에 GI-SOS2 단백질 복합체의 형성은 염분 스트레스에 의해 감소된다(도 3a). SOS2는 GI(도 2a 및 2b, 도 9a) 및 SOS3과 상호 작용할 수 있기 때문에, 본 발명자들은 SOS3가 SOS2-GI 상호작용에 영향을 미칠 수 있는지 여부를 실험하였다. 실제로 이 상호작용은 SOS3의 과발현에 의해 폐기되었다(도 3a). 이것은 SOS3가 SOS2의 자동-억제를 완화시키는 C-말단 조절 도메인을 통해 단백질 키나제 SOS2와 물리적으로 상호 작용하는 것으로 알려져 있다. 따라서 SOS3이 SOS2의 C-말단 조절 도메인을 통해 SOS2와 결합하기 위해 GIGANTEA와 경쟁하는 것이 가능한 것으로 보인다. 실제로 BiFC, 효모 투-하이브리드(yeast two-hybrid) 및 풀-다운(pull-down) 실험은 GIGANTEA가 이러한 도메인을 통해 SOS2와 상호작용한다는 것을 밝혔다(도 3b 및 3c, 도 9b). *sos3-1 gi-1* 식물에서 *gi-1*의 내성 표현형의 완전한 억제에 의해 SOS3은 GI-매개된 염분 내성을 필요로 하는 것으로 여겨진다(도 8d).

[0025]

[0026] 본 명세서에서 나타난 자료는 스트레스 내성과 개화의 연결에 있어 GIGANTEA에 관한 중요한 후-전사 역할을 나타냈다. 본 발명자들은 GIGANTEA가 SOS1의 SOS2-의존적 인산화를 억제한다는 모델(도 4)을 제안한다. GIGANTEA는 모든 조직의 세포질 및 핵에서 낮은 수준으로 존재한다. 염분 스트레스가 없으면 GIGANTEA는 SOS2와 결합하고 SOS2 기능을 억제하며 이에 의해 휴지 상태에서 SOS 계를 유지한다. 염분 스트레스시, GIGANTEA는 프로테오솜을 통해 분해되며, SOS3과 상호작용을 위해 SOS2를 방출한다. 이것은 SOS1이 이온 항상성을 재-확립하기 위해 활성화되는 원형질막으로 이동하는 SOS2/SOS3 복합체의 생성을 가능하게 한다. 또한 GIGANTEA의 스트레스-의존적 감소는 개화의 시작을 지연시키며, 따라서 두 과정을 연결한다.

[0027] 염분 스트레스는 영양기를 확장하고 개화를 억제하는 ABA- 및 GA-매개된 메커니즘에 의해 성장 감소를 유발할 수 있지만 중요한 메커니즘은 아직 알려지지 않았다. GIGANTEA는 영양 생장 속도, 개화기 및 스트레스 내성을 조절하는 것으로 알려진 다른 조절 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 단백질-단백질 상호작용을 통해 GIGANTEA는 다양한 신호 증개물을 조절하는 스위치 역할을 한다. GIGANTEA의 안정성은 상호작용하는 파트너를 격리 또는 방출시킴으로써 이들 경로의 배출량을 차례대로 결정한다.

[0028] 발아 및 개화는 식물의 일생 중에 일어나는 생존에 가장 중요한 두 가지 사건이다. 이 두 가지 과정을 조절하는

많은 유전적 요소가 지금 밝혀졌다. 발아 시기 및 특히 개화의 비-동시적 유도는 극단적인 환경 조건에 적응할 때 중요한 역할을 한다. 사실 스트레스 내성은 개화기에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 비록 개화기 유전자의 다면 발현성 효과가 반복적으로 관찰되었을지라도, 이들 상호작용에 관련된 생화학적 과정은 잘 알려지지 않았다. 본 명세서에서, 본 발명자들은 GIGANTEA가 엽분 스트레스 적응 경로의 중요한 구성 요소라는 것을 확인하였다. SOS2와 GIGANTEA의 조건-의존적 상호작용은 개화와 스트레스 적응 사이의 연결을 설명할 수 있는 새로운 관련성을 제공한다. 본 발명자들은 발달의 비-동시적 스위프트가 식물이 극한의 환경에서 적응도(fitness)를 획득하는 방법에 있어서 근본적인 역할을 한다는 것을 제안한다.

[0029] 발달 상태의 변화는 유전자 조작 활동과 이전 상태로 불활성화시키는 유전자의 보충(recruitment)에 의해 개시된다. 계절 변화와 같은 환경 변화를 통해 GIGANTEA의 중요한 구성요소인 내부 시계에 연결되어 있는 상태의 연속(succession)을 조절하는 모듈이다. 이에 따라 시계의 타이밍은 외부 조건 변화로 조정되어야 한다. 본 발명자들은 본 명세서에서 생화학적 기초를 제공한 시계-의존적 및 환경 스트레스-유도 과정의 역동적 상호작용은 식물 발달, 엽분 환경에서 성장의 중요한 개체발생 매개자로서 개화 타이밍의 중요한 단계 중 하나라고 확인하였다. 개화기에 영향을 미치는 것이 분명한 GIGANTEA의 비-동시적 효과는 *gi* 식물에서 나타나는 엽분 내성 단계의 확립을 막는 것으로 여겨진다. 엽분 에피소드의 기억(memory)이 얼마나 오래 지속될 수 있는지 아직 밝혀지지 않았다. 개화로의 전이(transition)의 환경적 조절이 가장 많이 연구된 온도와 빛으로 광범위하게 조사되었다. 개화 원인에 있어 엽도의 전후관계(context)는 새로운 관점을 요구로 한다. "겨울의 기억"과 같이 엽분 농도의 주기적 또는 계절적 기억이 있다면, 이러한 인식은 상이한 환경 조건이 표현형에 영향을 미치는 다능성 정단분열조직(apical meristems)의 준안정 효과에 어떻게 영향을 미치는지 새로운 관점을 열게 한다.

[0030] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0031] (식물 재료 및 성장 조건)

[0032] 본 발명에서 사용된 야생형 및 변이 아라비도시스 식물은 콜롬비아(*Col*) 생대형으로부터 유래되었다. 변이 *sos1-1*, *sos2-1*, *sos3-1*, SOS1-OX 및 SOS1HA-OX는 J-K Zhu에 의해 제공되었다. 변이 *gi-1*, *gi-2*, *gi-ko* 및 GIHA-OX는 이전에 K. M. David, U. Armbruster, N. Tama, J. Putterill, FEBS letters 580, 1193-1197 (2006)에 기술되었다. 이중 변이체의 F1 모집단은 *gi-1* 및 *sos* 변이체인 *sos1-1*, *sos2-1*, *sos3-1*, 및 SOS1-OX를 교차시킴으로써 생성되었다. 변이체의 F2 종자(seeds)는 늦은 개화 표현형에 대해 스크리닝되었으며 이들의 유전자형은 PCR에 의해 확인되었으며 NaCl을 포함하는 배지 상에서 엽분-민감성 표현형에 대해 스크리닝되었다. 종자는 표면-멸균되었으며 0.25% 피타겔 또는 1.2% 한천 및 2% 설탕이 보충된 1/2 MS 배지 상에 뿌려졌다. 식물은 통제된 배양실에서 긴 낮 조건(16시간 명/8시간 암 광 주기, 80-100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 유량률) 하에서 성장되었다.

[0033] (실시예 1) 엽분 스트레스 처리

[0034] 개화기의 지연(도 1a 및 1b) 및 엽분-내성 표현형(도 1e, 2g, 도 5a, 5b, 및 7a~d)을 연구하기 위해서, 종자는 NaCl이 없거나 있는 조건(지시된 농도)에서 발아되었다. 토양에서 성장된 식물에 대해서, 종자는 표준 물주기 방법(예를 들면 일주일에 한번 물주기)으로 토양에서 3주 동안 성장되었다. 그 다음에 식물에 2 주 동안 일주일에 한번씩 지시된 농도의 NaCl(150 mM or 300 mM)과 물을 뿌렸다.

[0035] (실시예 2) 원형질막 분리

[0036] 원형질막포는 Q.-S. Qiu, B. J. Barkla, R. Vera-Estrella, J.-K. Zhu, K. S. Schumaker, Plant Physiology 132, 1041-1052 (2003)에 기술된 바와 같이 두-상 분배에 의해 5일 된 식물로부터 분리되었다. 모든 단계는 4℃ 또는 얼음 위에서 실시되었다. 잎은 0.33 M 설탕, 10%(wt/vol) 글리세롤, 0.2%(wt/vol) BSA, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 5 mM 아스코르베이트, 0.2%(wt/vol) 카세인, 0.6% 폴리비닐피롤리돈, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml 웨스타틴 A 및 50 mM Hepes-KOH (pH 7.5)을 포함하는 분리 배지에서 균질화되었다. 균질 완충용액의 4 ml는 조직의 g당 사용되었다. 균질액은 미라클로스(miracloth) 하나의 층을 통해 여과되었으며, 10분 동안 10,000 g에서 원심분리되었다. 그 다음에 상층액은 미소체 펠렛을 얻기 위해서 100,000 g에서 50분 동안 원심분리되었으며, 0.33 M 설탕, 3 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml 웨스타틴 A 및 5 mM 인산칼륨 (pH 7.8)을 포함하는 완충용액에서 재현탁되었다. 서스펜션은 5 mM 인산칼륨 (pH 7.8), 0.33 M 수크로오스, 3 mM KCl에서 6.2% (wt/vol) dextran T-500 and 6.2% (wt/vol) polyethylene glycol 3350으로 구성된 상 계(system)를 얻기 위해 상 혼합물에 첨가되었으며, 상 분리는 1000 g에서 원심분리에 의해 촉진되었다. 그 다음에 위쪽 상은 계에서 재분배되었다. 최종 위쪽 상이 수집되었으며, 재현탁 완충용액[0.33 M 설탕, 10% (wt/vol) 글리세롤, 0.1 mM EDTA, 2mM DTT, 1 μ g/ml 웨스타틴 A, 20 mM Hepes-KOH (pH 7.5)]으로 희석되었으며, 100,000 g에서 50분 동안 원심분리되었다. 이 결과로 만들어지는 펠렛이 수집되었으며 상기에 기술된 1 mM EDTA를 포함하는 재현탁 완충용액으로 재현탁되었으며 액화 질소로 동결, -80℃에서 저장되었다.

[0037] (실시예 3) 원형질막 Na^+/H^+ 역수송체 에세이

[0038] Na^+/H^+ 역수송체 활성은 야생형, *gi-1* 및 *sos1-1* 식물의 잎으로부터 분리된 인사이드-아웃 원형질막포에서 원형질막 H^+ -ATPase의 활성화에 의해 확립되는 pH 기울기의 Na^+ -유도 소실로 30℃에서 측정되었다. 에세이 동안 pH의 변화는 R. Olias et al., Plant Cell Environ. 32, 904-916 (2009)에 기술된 바와 같이 pH-민감성 형광성 프로브 9-아미노-6-클로로-2-메록시아크리딘(ACMA)의 퀀칭으로 모니터링되었다. 에세이(1 mL)는 원형질막 단백질, 1 μ M ACMA, 3 mM ATP-BTP pH 7.5, 50 mM 1,3-비스[트리스(하이드록실메틸) 메틸아미노]프로판 (BTP)-HEPES (pH 7.5), 250 mM 마니톨, 50 mM KNO_3 및 0.075% Brij58 20 μ g을 포함하였다. 반응은 형광 모니터링을 시작하기 이전에 5분 동안 교반하고 어둠 속에서 평형이 이루어졌으며, 에세이는 3 mM MgSO_4 의 첨가에 의해 시작되었다. 최대 ΔpH 가 형성되었을 때(정상 상태에 도달했을 때), NaCl은 Na^+ 수송 개시를 위해 첨가되었다. 각 반응의 종료 시점에서, 10 mM(최종 농도)의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 가 남아있는 ΔpH 를 소멸시키기 위해서 첨가되었다. 특이적인 활성은 처음의 소실 속도(예를 들면 Na^+ 첨가 후 처음 10초 동안 측정된 형광의 변화)로부터 계산되었다. 활성은 막 단백질의 min 및 mg당 형광($\Delta F/F_{\text{max}}$)의 상대적인 변화로서 알비트러리 단위(arbitrary units)로 발현되었다. 형광은 들뜸 파장 415 nm 및 방출 파장 485nm에서 온도 조절(thermostated)되고 교반된(stirred) 세포(모델 FL-2500; <http://www.hitachi.com>)를 포함하는 히타치 형광 분광광도계를 사용하여 기록되었다.

[0039] (실시예 4) GIGANTEA의 RNA 분리 및 발현 분석

[0040] RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Maryland, USA)를 사용하여 2주 된 야생형 종자로부터 추출되고 DNase (SIGMA Chemical Co., St. Louis, MO, USA)로 처리된 전체 RNAs (1 μ g)는 ThermoscriptTM RT-PCR 시스템 (Invitrogen, Paisley, UK)을 사용하여 퍼스트-스트랜드 cDNA의 합성을 위해 사용되었다. PCR 증폭은 e-Taq DNA polymerase (Solgent, Daejeon, 대한민국)를 사용하여 실시되었다. RT-PCR 또는 실시간(real-time) PCR에 사용된 프라이머는 표 1S에 나타났다. RT-PCR 조건은 다음과 같다: 2분 동안 94℃, 30초 동안 94℃에서 25 (GI) 또는 30 (SOS1) 사이클, 30초 동안 54℃ 및 1분 동안 72℃, 뒤이어 5분 동안 72℃. 실시간(real-time) PCR의 조건(*CO*, *FT*, *P5CS* 또는 *DREB2A*)는 다음과 같다: 5분 동안 95℃, 10초 동안 95℃ 및 30초 동안 60℃에서 45 사이클, 뒤이어 10초 동안 95℃, 5초 동안 65℃ 및 5초 동안 95℃.

[0041] (실시예 5) SOS1의 포스파타아제 에세이

[0042] 단백질 추출물은 2.5 mM $MnCl_2$, 0.5% 트리톤 X-100 및 0.4% Nonidet P-40으로 보충된 1X 포스파타아제 완충용액이나 5 $\mu g/ml$ 안티파인, 5 $\mu g/ml$ 키모스타틴, 1 $\mu g/ml$ 펩스타틴, 5 $\mu g/ml$ 류펩틴, 5 $\mu g/ml$ 아프로티닌, 1 mM 페닐메틸설포닐 플로라이드 (PMSF), 50 μM MG132, 50 μM MG115, and 50 μM ALLN으로 보충된 New England Biolabs 완충용액 3에 의해 준비되었다. 이 결과로 만들어지는 단백질 추출물의 분취량(50 μl)은 포스파타아제 억제제(NaF/Na_3VO_4 각각 2 mM)가 없거나 있는 조건에서 5분 동안 30°C에서 람다 단백질 포스파타아제 (New England Biolabs, Beverly, MA, 미국)의 400 유닛이거나 5분 동안 37°C에서 송아지 장 알칼리 포스파타아제 (CIP; New England Biolabs, Beverly, MA, 미국)의 10 유닛과 함께 배양되었다. 면역 블롯팅 분석은 래트 α -HA 항체(1:2000; Roche, Indianapolis, IN, 미국)로 실시되었다.

[0043] (실시예 6) 재조합 단백질의 제조

[0044] 재조합 SOS 단백질을 발현시키기 위해서, SOS1 C-말단 절편(SOS1 CD3; 885~1146 aa), 전체-길이 SOS2 (1~446 aa), 점 변이된 SOS2 (T/DSOS2; Thr168-to-Asp), 트렁케이티드된 SOS2 (1~308 aa) 및 전체-길이 SOS3 은 각각 표 S1에 나타난 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)를 사용하여 *Pfu* DNA 폴리머라아제로 증폭되었다. SOSs의 PCR 생성물은 GST 융합 단백질을 생성하기 위해서 각각 *pGEX-5X-3* (SOS1 CD3), *pGEX-2T* (SOS2s) 및 *pGEX-4T-3* (SOS3)으로 클로닝되었다. 이 결과로 만들어지는 플라스미드는 각각 SOS1 CD3에 대해서 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS 및 SOS2s와 SOS3에 대해서 BL21 (DE3)으로 형질전환되었다.

[0045]

[0046] GST-융합 재조합 단백질을 생성하기 위해 사용된 게이트웨이 목적 벡터인 *pGEX-4T-3*은 Dr. Hong Gil Nam으로부터 기증받았다. GST-SOS 단백질을 발현시키는 세포는 0.5 mM 이소프로필-1-티오- β -D-갈락토포라노사이드 (IPTG)를 30°C에서 4시간 동안 (GST-SOS1 CD3), 1 mM (IPTG)를 16°C에서 16시간 동안(GST-SOS2s) 또는 30°C에서 4시간 동안(for GST-SOS3)의 첨가에 의해 유도되었다. GST-SOS 단백질은 1% Triton X-100 및 1 mM DTT와 초음파처리에 의해 분해되었으며, 글루타치온-엑스셀룰로오스 친화 크로마토그래피(Bioprogen, Daejeon, South Korea)를 사용하여 정제되었다.

[0047] 재조합 GIGANTEA 단백질을 발현시키기 위해서, GIGANTEA의 N-말단(1~391aa)은 *pGEM-T* easy vector (Promega, Madison, WI, 미국)로 서브클로닝되었으며, 그 다음에 *BamH* I 및 *Not* I에 의해 분해되는 GIN의 삽입은 말토오즈-결합 단백질-융합 GIN 단백질(MBP-GIN)을 생성하기 위해 *pIH1119* (New England Biolabs, Beverly, MA, 미국)으로 유도되었다. 플라스미드는 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS으로 형질전환되었으며, MBP-GIN 단백질은 30°C에서 4시간 동안 1 mM IPTG의 첨가에 의해 유도되었다. MBP-GIN을 발현시키는 세포는 프로테아제 억제제 (1 mM PMSF, 5 $\mu g/ml$ 류펩틴, 1 $\mu g/ml$ 아프로티닌 A 및 1 $\mu g/ml$ 펩스타틴), 1 mM DTT 및 1% Triton X-100를 지닌 1X PBS에서 현탁되었으며, 초음파처리에 의해 분해되었다. MBP-GIN은 아밀로오즈 수지(New England Biolabs, Beverly, MA, 미국)를 사용하여 친화 크로마토그래피에 의해 정제되었으며 20 mM 말토오스로 희석되었다.

[0048] (실시예 7) 시험관 내 결합 에세이

[0049] GIGANTEA의 전체-길이 ORF가 증폭되었으며 *BamHI* 및 *KpnI*로 분해 및 pTriEX-1 벡터(Novagen, La Jolla, CA, 미국)의 대응 자리로 클로닝되었다. 방사능-표지된 GIGANTEA 단백질은 제조업자의 지침에 따라 메티오닌(TNT Quick Coupled Transcription/Translation System, Promega, Madison, WI, 미국)의 출처로서 ^{35}S -메티오닌과 시험관 내 전사 및 번역 에세이 키트를 사용하여 *pTriEx-GI* 플라스미드로부터 합성되었다. ^{35}S -표지된 GI 단백질은 결합 완충용액(20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM KCl, 50 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% 글리세롤, 5 $\mu g/ml$ BSA,

1% Triton X100, 1 mM PMSF, 5 $\mu\text{g/ml}$ 류펩틴, 5 $\mu\text{g/ml}$ 아프로티닌, 1 $\mu\text{g/ml}$ 펩스타틴, 5 $\mu\text{g/ml}$ 키모스타틴, 5 $\mu\text{g/ml}$ 안티파인, 50 μM MG132, 1 mM DTT 및 포스파타아제 억제제 (NaF 및 Na_3VO_4 각 1 mM)) 100 μl 에서 4°C에서 1시간 동안 동일한 양의 GST, GST-SOS2 또는 GST-SOS3 (또는 GST-SOS2 1~308 aa. 도 3b) 및 글루타치온 셀룰로오즈 비즈(beads)와 함께 배양되었다. 비즈는 결합 완충용액(BSA를 포함하지는 않음)과 1X PBS로 두 번 세척되었으며, 2X SDS 샘플 완충용액 15 μl 에서 재-현탁되었다. 단백질은 10% SDS-PAGE 겔 상에서 분리되는 수치로부터 분리되었다. 겔은 진공-건조되었으며, 신호는 Cyclone (Perkin Elmer, Downers Grove, IL, 미국)에 의해 검출되었다.

[0050] (실시예 8) 키나제 에세이

[0051] 재조합 GST-SOS1 CD3 (기질), GST-SOS2 T/D (키나제) 및 MBP-GIN은 상술한 것처럼 제조되었다. 키나제 에세이 (전체 부피 20 μl)는 키나제 완충용액 (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 , 0.5 mM CaCl_2 , 2 mM DTT)에 GST-SOS1 CD3 (1.5 μg), GST-SOS2 T/D (1 μg), MBP-GIN (1.5 μg), BSA (1.5 μg ; 대조군으로서) 및 0.6 μl [γ - ^{32}P] ATP (6 μCi)의 첨가에 의해 개시되었으며 혼합물은 1시간 동안 실온에서 배양되었다. 반응은 6X SDS 로딩 완충용액의 첨가에 의해 종결되었다. 단백질은 8% SDS-PAGE 겔 상에서 분리되었으며, 20분 동안 쿠마시 블리리언트 블루 R 250으로 염색되었다. 오물이 제거된 겔은 1시간 동안 진공-건조되었으며 신호는 Cyclone (Perkin Elmer, Downers Grove, IL, 미국)을 사용하여 시각화되었다.

[0052] (실시예 9) 이분자 형광 컴플리멘테이션(BiFC) 및 토마코 침윤

[0053] SOS2에 관한 전체-길이 ORF 서열은 엔트리 벡터를 생성하기 위해 표 S1에 나타난 프라이머로 증폭되었다 (*pDONRTM/Zeo* 벡터 (Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)에서 종결 코돈이 있거나 없는 조건에서 SOS2). *pENTR-1A-Amp-GI*인 GI 엔트리 벡터는 남 박사 (Postech, Korea)으로부터 기증받았다. BiFC 실험을 위해, SOS2 및 GI는 Venus aa 1~173 및 Venus aa 156~239로 인-프레임(in-frame) 융합되었으며, 이는 각각 *pDEST-VYNE(R)^{GW}* 및 *pDEST-VYCE(R)^{GW}* 벡터에서 eYFP 형광 단백질의 N- 및 C- 말단을 포함하였다. 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 스트레인 GV 3101은 컨스트럭트로 형질전환되었다. 아그로박테리움은 10 mM MES, 20 μM 아세트시린곤 및 적절한 항생제(트랜스펙션을 위해 사용된 컨스트럭트에 의존적)로 보충된 LB 배지에서 성장되었으며, 배양 배지는 항생제의 독성을 제한하는 침윤 용액(10 mM MgCl_2 , 10 mM MES 및 100 μM 아세트시린곤)으로 두 번 세척되었다. p19 사일런싱 플라스미드로 형질전환된 아그로박테리움 세포가 포함되었다. 공동-침윤을 위해, 각각의 아그로박테리움 배양은 최종 침윤 용액에서 OD₆₀₀ 0.5로 조절되었다. 4주 된 식물의 침윤된 잎은 2일 동안 배양되었으며, 요청이 있으면 양 쪽 면(배측 및 향측) 상에 적절한 항생제 용액으로 분사되었다. 10시간 후, 염분-처리된 토마코 잎에 NaCl 용액을 다시 분사하였다. 추가로 6시간 후, 형광이 공초점 레이저 현미경(Olympus FV1000; Tokyo, 일본)을 사용하여 검출되었다. GFP, YFP 및 4',6-디아미노-2-페닐인돌 (DAPI; 핵 염색을 위한)에 관한 들뜸 파장은 각각 488, 515 및 405 nm이었다. 레이저 세기를 포함하는 동일한 세팅이 형광 검출을 위해 사용되었다.

[0054] (실시예 10) 면역 블로팅 분석 및 면역침전

[0055] 염분으로 처리되거나 처리되지 않은 3~4주 된 식물의 잎이 사용되었다. 단백질은 기술된 바와 같이 소수의 변형에 의해 추출되었다. 면역 블로팅 분석은 SOS1-HA에 대한 래트 α -HA 및 GI-HA 검출 또는 마우스 α -SOS1 (1:250) 항체를 이용하여 실시되었다. 항원 단백질은 제조업자의 프로토콜에 따라 ECL-검출 시약(Thermo scientific, Rockford, IL, 미국)을 사용하여 화학발광에 의해 검출되었다.

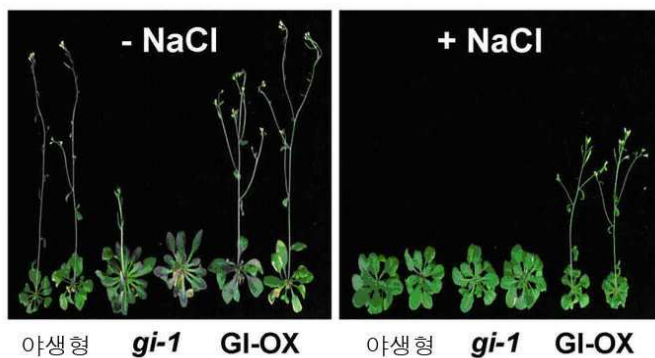
- [0056] 면역 침전 연구는 GI-HA와 SOS1-GFP, SOS2-GFP 또는 SOS3-MYC와 공동-침윤된 토바코 조직을 사용하여 실시되었다. GI-HA의 면역 침전 및 SOS 단백질의 공동-침전에 관하여, 항-GFP 토끼 폴리클론(1:250; Abcam, Cambridge, MA, 미국) 또는 항-MYC 마우스 모노클론(1:250; Cell signaling technology, Danvers, MA, 미국) 항체는 4℃에서 단백질 A 한천(Invitrogen, Carlsbad, CA, 미국)으로 사전 배양되었으며, 이 후 단백질 추출물은 부드럽게 회전하면서 1시간 동안 배양되었다. SDS-PAGE에 대한 면역 단백질 복합체의 분리 및 면역 블롯팅은 Q.-S. Qiu, B. J. Barkla, R. Vera-Estrella, J.-K. Zhu, K. S. Schumaker, Plant Physiology 132, 1041-1052 (2003)의 이전에 기술된 바와 같이 실시되었다. 각각의 면역 블롯팅은 실온에서 4시간 동안 또는 4℃에서 밤새 적절한 일차 항체(항-HA 항체, 1:2000; 항-GFP 항체, 1:5000; 항-MYC 항체, 1:1000)와 배양되었다. 막은 퍼옥시다아제-컨쥬게이트된 이차 항체(1:1000-3000) (항-랫 IgG (Sigma, St. Louis, MO, USA), 항-마우스 IgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 미국) 및 항-토끼 항체(GE, Little Chalfont, Buckinghamshire, 영국)를 사용하여 발달되었다. 항원 단백질은 상술한 바와 같이 검출되었다.
- [0057] (실시예 11) 효모 분할-유비퀴틴 투 하이브리드 에세이
- [0058] GIGANTEA는 *pMet-GWY-Cub-RUra3*으로 클로닝되었으며, SOS2 및 SOS3은 분할 유비퀴틴화 에세이를 위해 *pCup-NuI-GWY*로 클로닝되었다. 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*) 스트레인 JD53은 분할 유비퀴틴화 에세이를 위해 사용되었다. 플라스미드는 PEG 및 Clontech 프로토콜 후에 열 충격을 이용하여 형질전환되었다. 단백질의 각 쌍 사이의 상호작용은 1.5 mg/ml 5-FOA (5-플루오르오르토산 모노하이드레이트; Zymo Research, Orange, CA, 미국)를 포함하는 선택적 배지 및 우라실이 결핍된 선택적 배지 상에서 테스트되었다. 플레이트는 3~5일 동안 30℃에서 배양되었다. 효모 투-하이브리드 에세이는 각각 두 번씩 실시되었으면 각 실험은 세 개의 생물학적 복제본을 포함하였다.
- [0059] (실시예 12) 효모 투-하이브리드
- [0060] 전체-길이 GIGANTEA 단백질은 효모 투-하이브리드 활성화 도메인 벡터 pACT2 (CLONTECH Laboratories, Inc)에서 클로닝되었다. SOS2(아미노산 1~308)의 촉매 N-말단 도메인 및 조절 C-말단 도메인(아미노산 309~446)은 plasmid pAS2.1에서 서브클로닝되었다. 이들 플라스미드는 효모 스트레인 HF7c로 형질전환되었다. 각 SOS2 컨스트럭트 세 개의 독립적 형질전환주는 GIGANTEA와의 상호작용에 대해 테스트되었다. 빈 pACT2는 음성 대조군으로서 사용되었다.
- [0061] 표 1은 본 발명의 실시예에 사용된 플라스미드 구축 및 PCR을 위해 사용된 프라이머이다.

【표 1】 플라스미드 구축 및 PCR을 위해 사용된 프라이머

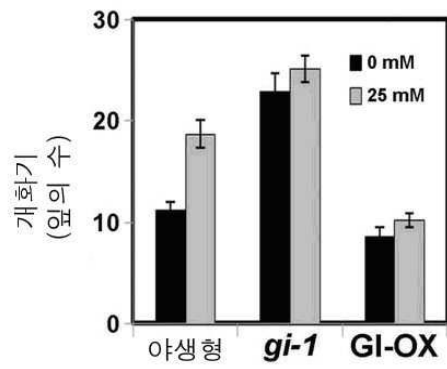
프라이머	서열	목적
GI-RT-f	CTGTCTTTCTCCGTTGTTTCACTGT (서열번호: 1)	RT-PCR
GI-RT-r	TCAITCCGTTCTTCTCTGTTGTTGG (서열번호: 2)	RT-PCR
SOS1(1281)-f	CGTGAAGCAATCAAGCGGAAATT (서열번호: 3)	RT-PCR
SOS1(1398)-r	AAATTGGGTAGTGGATCCATTAAAC (서열번호: 4)	RT-PCR
TuB-F(qRT)	TGGCATCAACTTTCATTGGA (서열번호: 5)	RT-PCR
TuB-R(qRT)	ATGTTGCTCTCCGCTTCTGT (서열번호: 6)	RT-PCR
GST-SOS1C-f	CGCGGATCCCGTTCTACGCCCTTCTTCGCATGG (서열번호: 7)	플라스미드 구축
GST-SOS1C-r	ACGCGTCGACTAGATCGTTCTGAAACGATT (서열번호: 8)	플라스미드 구축
GST-SOS2-f	CGCGGATCCATGACAAAGAAATG (서열번호: 9)	플라스미드 구축
GST-SOS2-r	ACGGTCGACTCAAAACGTGATTGTTCTGAG (서열번호: 10)	플라스미드 구축
GST-SOS2/268-r	ACGGTCGACTCAATAATTTAATCTGAACCAAGG (서열번호: 11)	플라스미드 구축
GST-SOS2/308-r	ACGCGTCGACTCACAGGGCCCTTCATCATTTC (서열번호: 12)	플라스미드 구축
GST-SOS2/329-r	ACGCGTCGACTCAGTCAAAATAGTGCAGATAAAT (서열번호: 13)	플라스미드 구축
GI-f(pTriEX)	GGATCCGATGGCTAGTTCATCTTC (서열번호: 14)	시험관 내 결합 에세이
GI-r(pTriEX)	GGTACCATTTGGGACAAGGATATAG (서열번호: 15)	시험관 내 결합 에세이
SOS2-GW-f-p	AAAAAGCAGGCTTCATGACAAAGAAATGAGAAG (서열번호: 16)	BIFC와 효모 투하이브리드
SOS2-GW-r (종결코돈과함께)	AGAAAGCTGGGTCAAAACGTGATTGTTCTGAG (서열번호: 17)	BIFC와 효모 투하이브리드
SOS2-GW-r (종결코돈없이)	AGAAAGCTGGGTCAAAACGTGATTGTTCTGAGAAT (서열번호: 18)	BIFC
SOS3-GW-f	AAAAAGCAGGCTTCATGGGCTGCTCTGTATCGAA (서열번호: 19)	BIFC, GST-SOS3 및 효모 투 하이브리드
SOS3-GW-r (종결코돈과함께)	AGAAAGCTGGGTCTTAGGAAGATACGTTTTGCAAT (서열번호: 20)	BIFC, GST-SOS3 및 효모 투 하이브리드
SOS3-GW-r (종결코돈없이)	AGAAAGCTGGGTGGGAAGATACGTTTTGCAAT (서열번호: 21)	BIFC
attB1 adapter	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT (서열번호: 22)	게이트웨이
attB2 adapter	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT (서열번호: 23)	게이트웨이
DREB2A(qRT)-F	CTGGAGAATGGTGCGGAAGA (서열번호: 24)	실시간-PCR
DREB2A(qRT)-R	CAGATAGCGAATCCTGCTGTTGT (서열번호: 25)	실시간-PCR
액틴(qRT)-F	TATCGCTGACCGTATGAGCAAAG (서열번호: 26)	실시간-PCR
액틴(qRT)-R	TGGACCTGCCTCATCACTCG (서열번호: 27)	실시간-PCR

도면

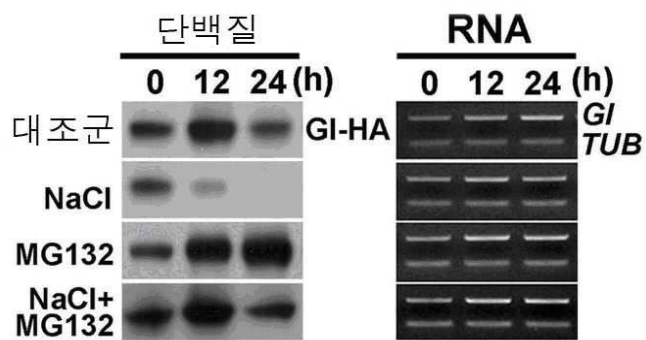
도면1a



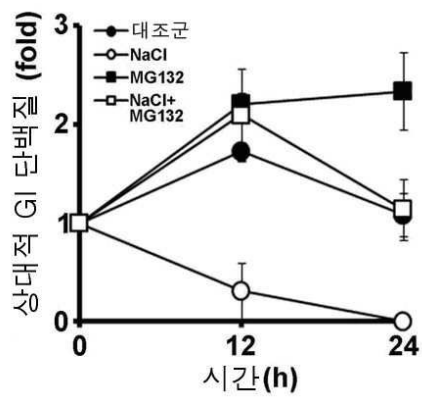
도면1b



도면1c



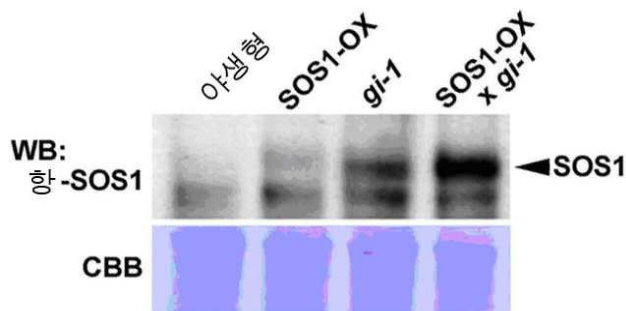
도면1d



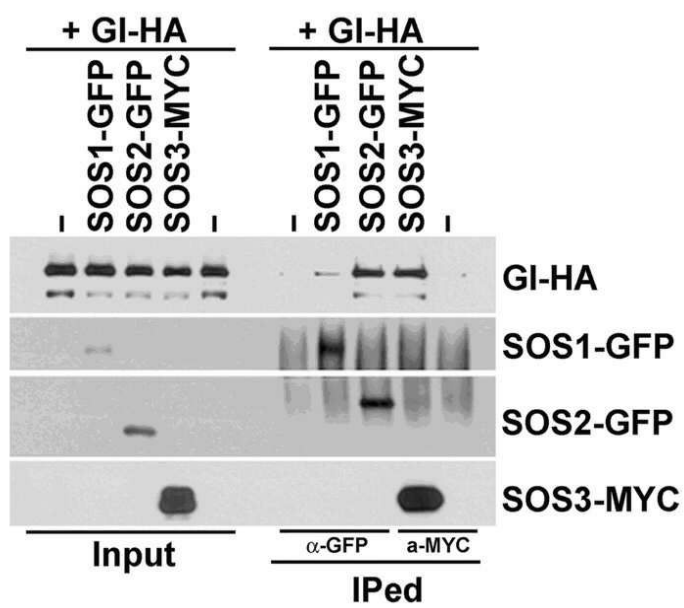
도면1e



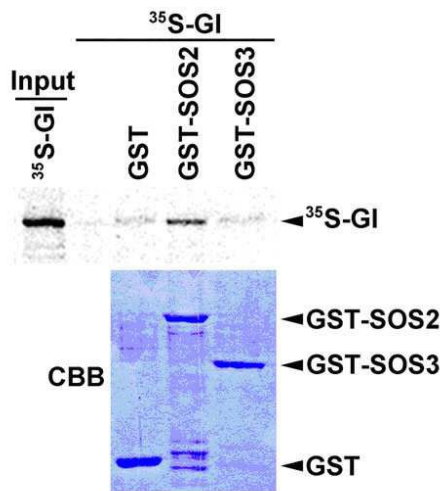
도면1f



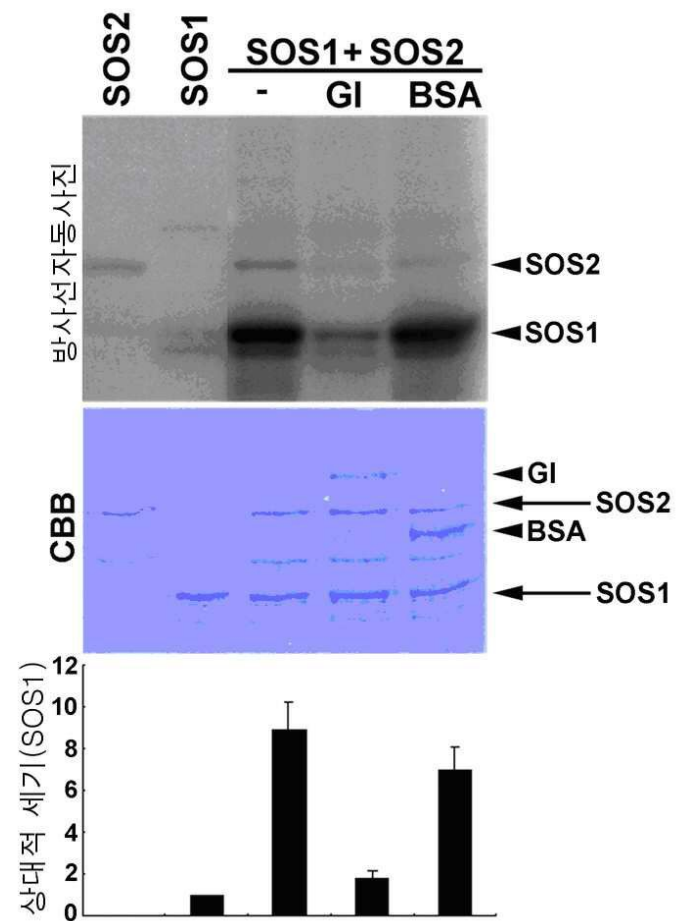
도면2a



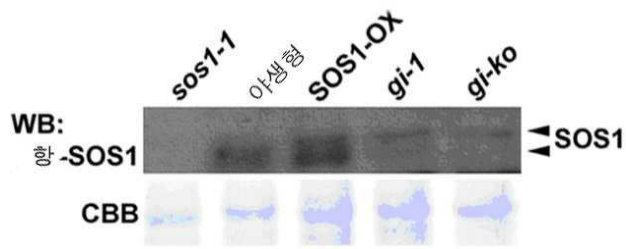
도면2b



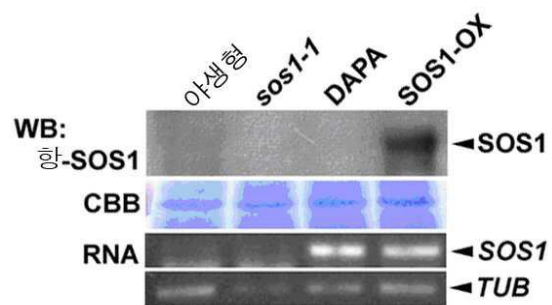
도면2c



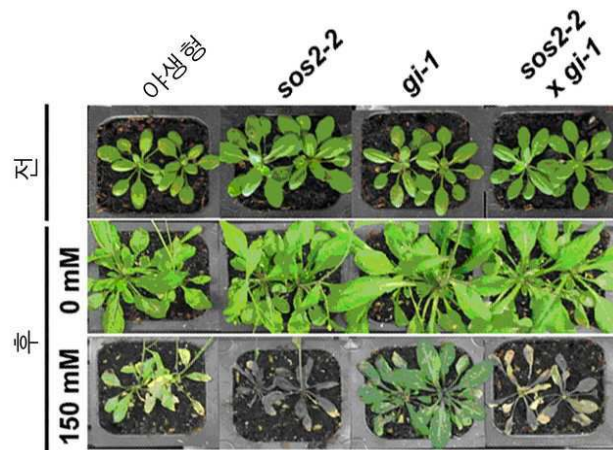
도면2d



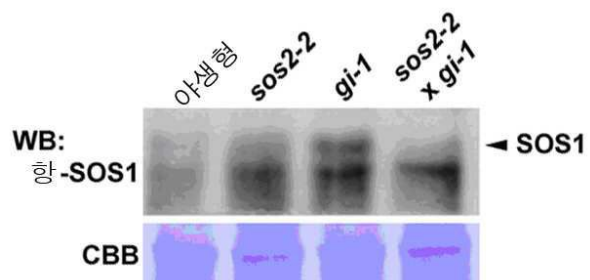
도면2e



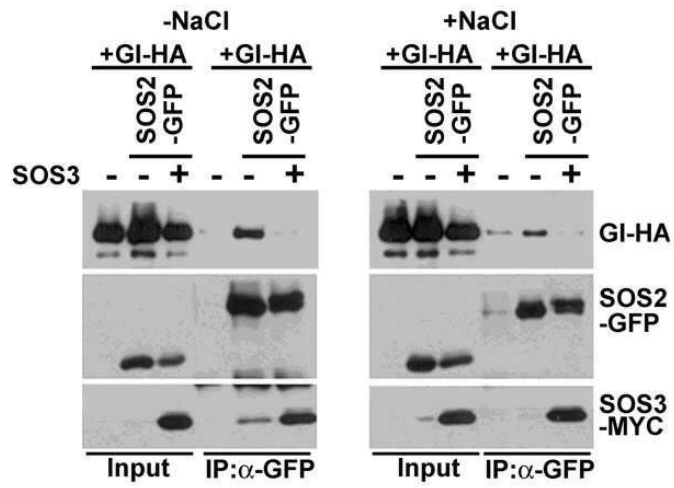
도면2f



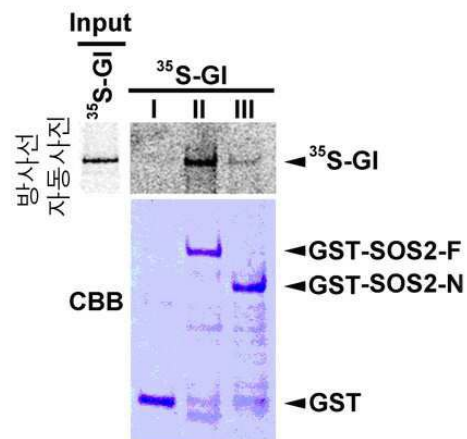
도면2g



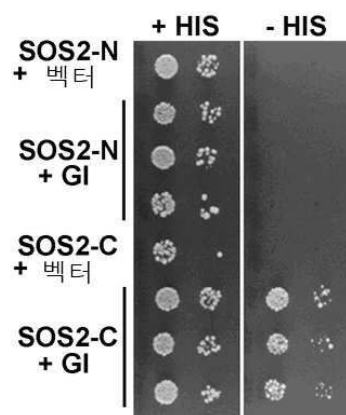
도면3a



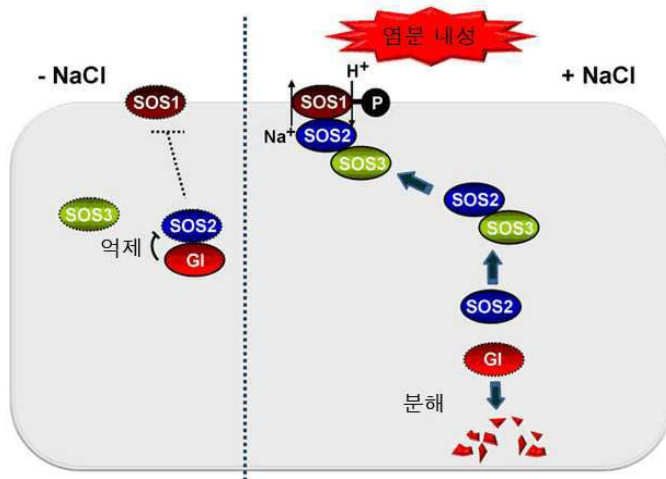
도면3b



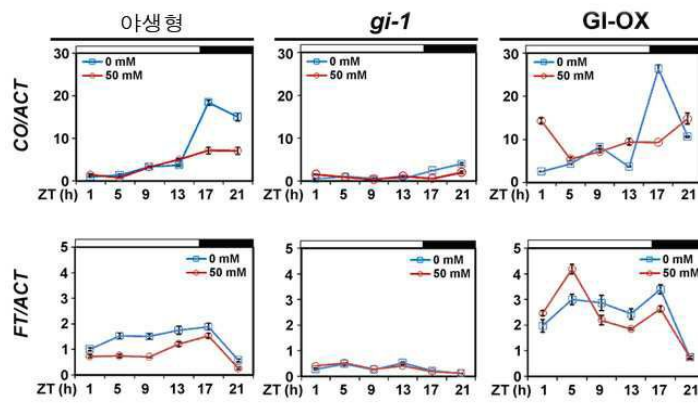
도면3c



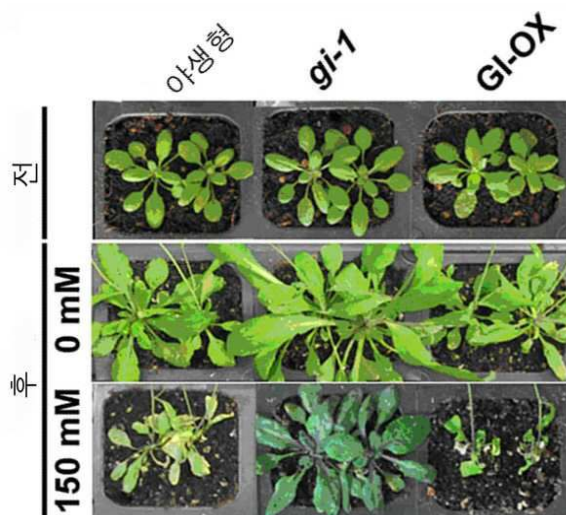
도면4



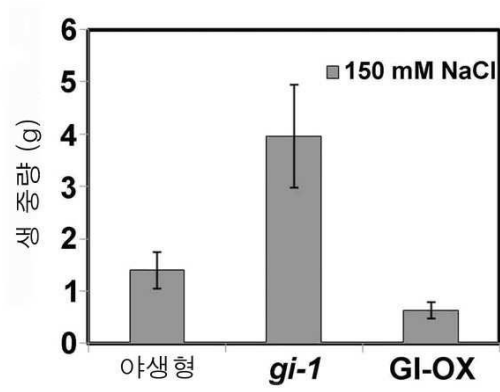
도면5



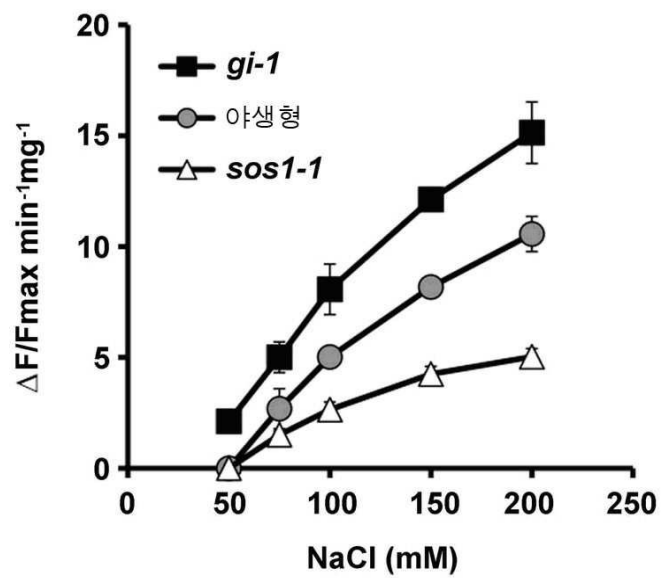
도면6a



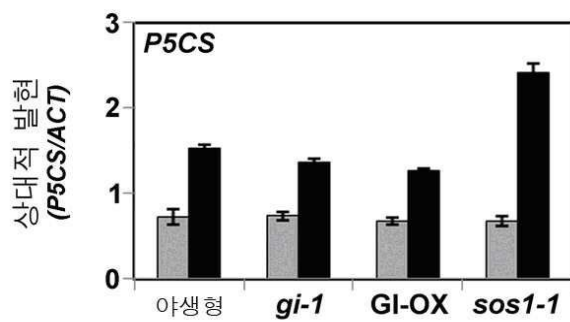
도면6b



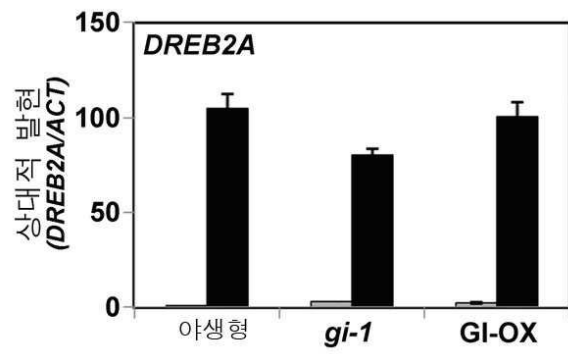
도면6c



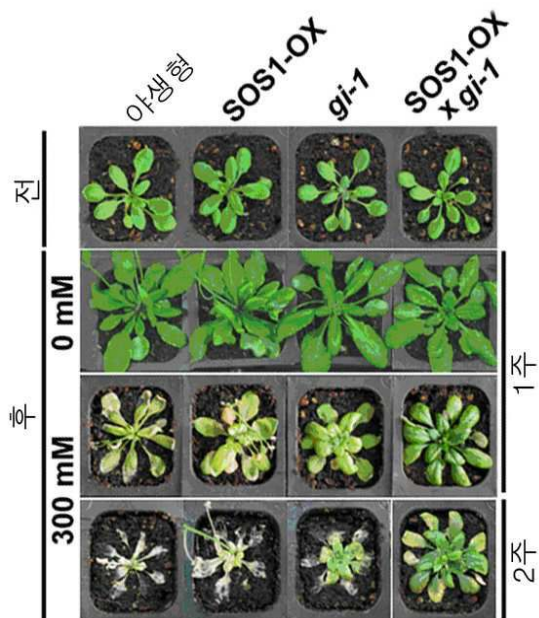
도면7a



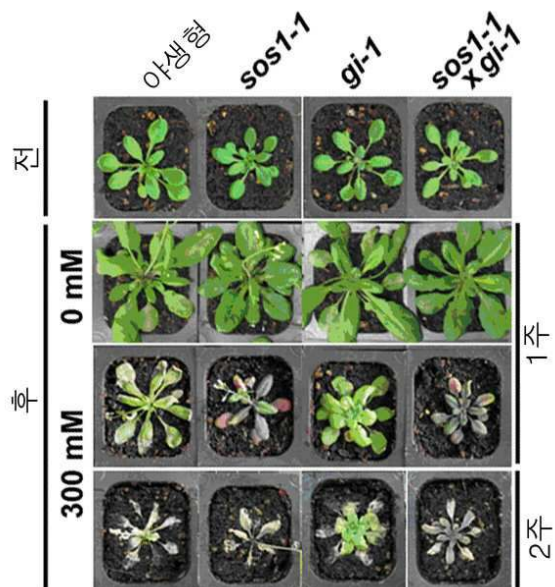
도면7b



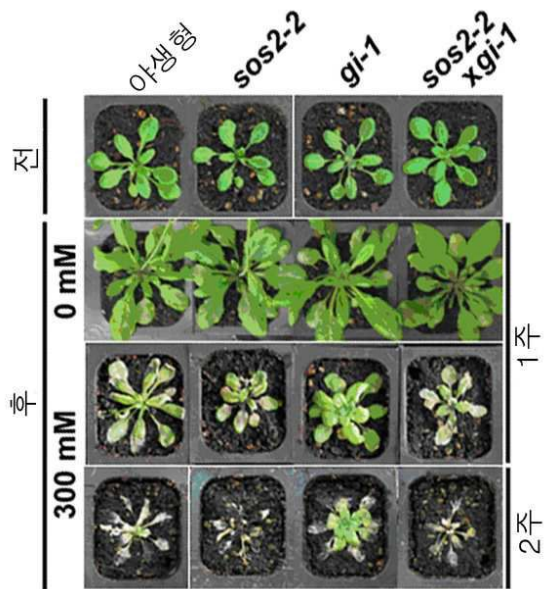
도면8a



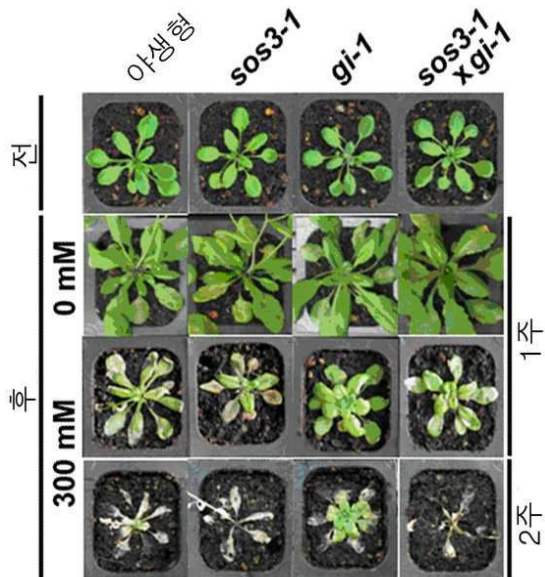
도면8b



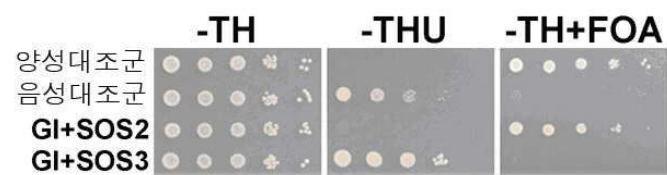
도면8c



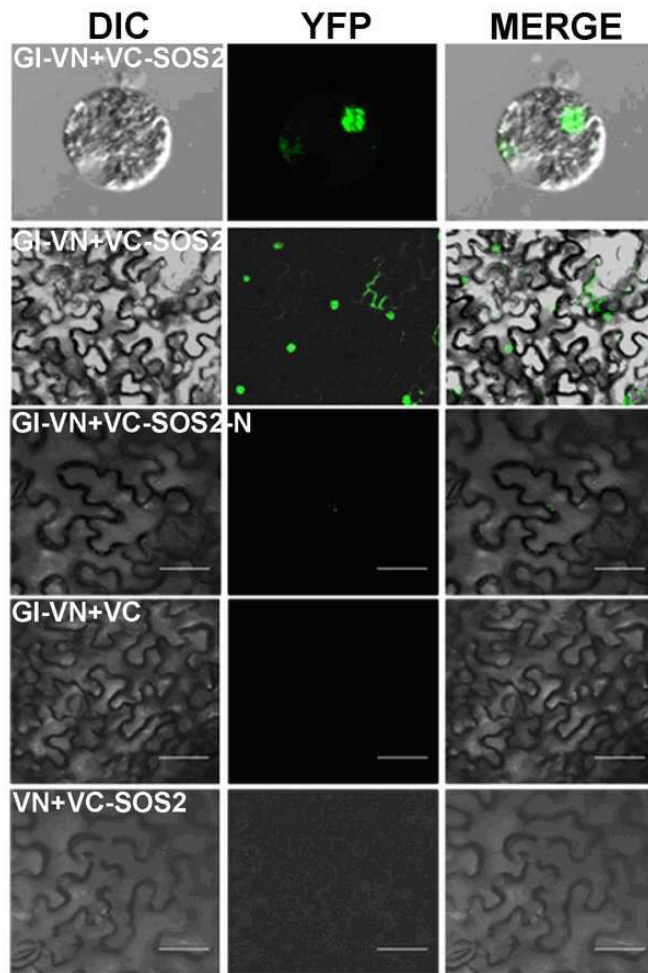
도면8d



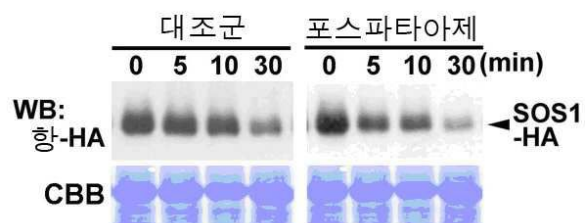
도면9a



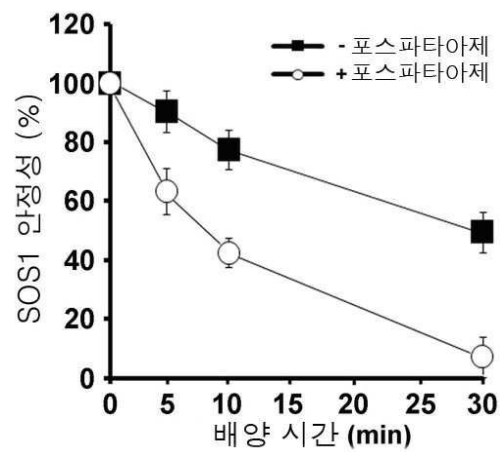
도면9b



도면10a



도면10b



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> GIGANTEA protein for regulating salt stress adaptation

<130> KP-880

<160> 27

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 1

Cys Thr Gly Thr Cys Thr Thr Thr Cys Thr Cys Cys Gly Thr Thr Gly

1 5 10 15

Thr Thr Thr Cys Ala Cys Thr Gly Thr

20 25

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 2

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

1 5 10 15

Thr Gly Thr Thr Gly Thr Thr Gly Gly

20 25

<210> 3

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 3

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

1 5 10 15

Gly Gly Ala Ala Ala Thr Thr

20

<210> 4

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

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

1 5 10 15

Cys Cys Ala Thr Thr Ala Ala Cys

20

<210> 5

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

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

1 5 10 15

Thr Gly Gly Ala

20

<210> 6

<211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 6
 Ala Thr Gly Thr Thr Gly Cys Thr Cys Thr Cys Cys Gly Cys Thr Thr
 1 5 10 15
 Cys Thr Gly Thr
 20

<210> 7
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 7
 Cys Gly Cys Gly Gly Ala Thr Cys Cys Cys Cys Gly Thr Thr Cys Thr
 1 5 10 15
 Ala Cys Gly Cys Cys Thr Thr Cys Thr Thr Cys Gly Cys Ala Thr Gly
 20 25 30
 Gly

<210> 8
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 8
 Ala Cys Gly Cys Gly Thr Cys Gly Ala Cys Thr Ala Gly Ala Thr Cys
 1 5 10 15
 Gly Thr Thr Cys Cys Thr Gly Ala Ala Ala Ala Cys Gly Ala Thr Thr
 20 25 30

<210> 9
 <211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 9

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

1 5 10 15

Ala Gly Ala Ala Ala Ala Thr Gly

20

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 11

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys

<210> 13

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr

<210> 14

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 14

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

1 5 10 15

Thr Cys Ala Thr Cys Thr Thr Cys

20

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 15

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

1 5 10 15

Gly Gly Ala Thr Ala Thr Ala Gly

20

<210> 16

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Gly

<210> 17

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly

<210> 18

<211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 18

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Cys Gly Thr Gly Ala Thr Thr Gly Thr Thr Cys Thr Gly Ala Gly Ala
 20 25 30
 Ala Thr

<210> 19
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 19

Ala Ala Ala Ala Ala Gly Cys Ala Gly Gly Cys Thr Thr Cys Ala Thr
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Cys Thr Gly Cys Thr Cys Thr Gly Thr Ala Thr Cys Gly
 20 25 30
 Ala Ala

<210> 20
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 20

Ala Gly Ala Ala Ala Gly Cys Thr Gly Gly Gly Thr Cys Thr Thr Ala
 1 5 10 15
 Gly Gly Ala Ala Gly Ala Thr Ala Cys Gly Thr Thr Thr Thr Gly Cys
 20 25 30

Ala Ala Thr

35

<210> 21

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 22

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 22

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 23

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 24

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

1 5 10 15

Ala Ala Gly Ala

20

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 25

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

1 5 10 15

Cys Thr Gly Thr Thr Gly Thr

20

<210> 26

<211> 0

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<210> 27

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 27

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

1 5 10 15

Thr Ala Cys Thr Cys Gly

20