



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0048199
(43) 공개일자 2019년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 15/67 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8245 (2013.01)
C12N 15/67 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0142861
(22) 출원일자 2017년10월30일
심사청구일자 2017년10월30일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
하선화
경기도 수원시 장안구 정자천로133번길 26, 554동 1402호(정자동, 백설마을 성지, 동양고속아파트)
유민경
경기도 용인시 기흥구 고매로34번길 31, 205동 1003호(고매동, 매화마을우림힐인원아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 9 항

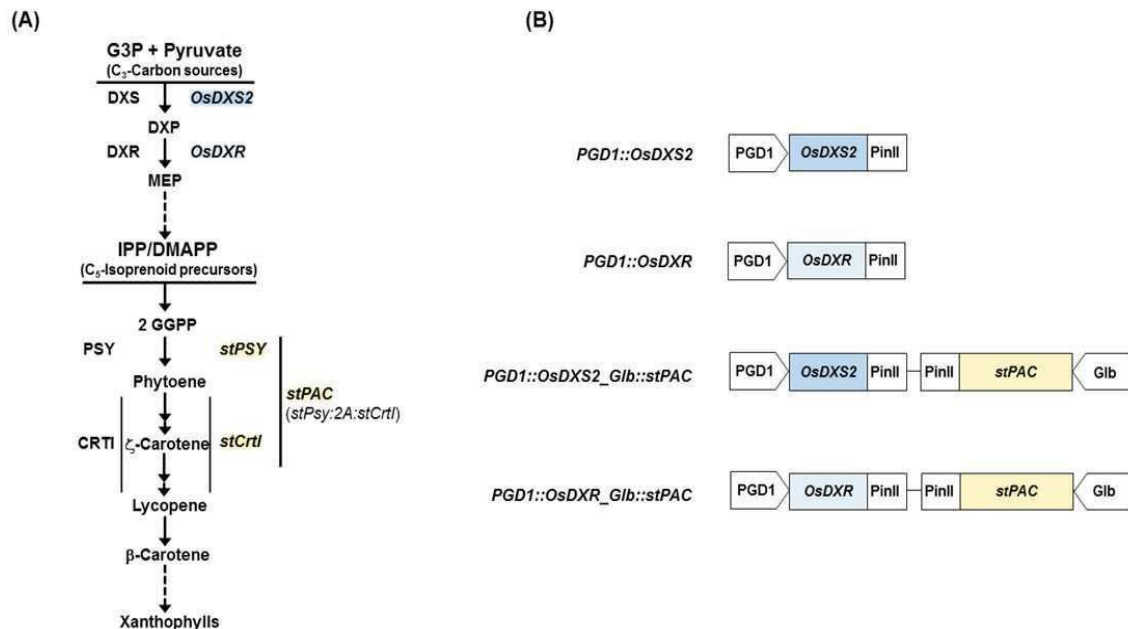
(54) 발명의 명칭 테페노이드의 고효율 생산을 위한 폴리뉴클레오티드 및 이를 이용한 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명자들은 고기능성 테페노이드 물질생산 식물체 개발에 대한 고효율 식물 대사공학의 기반이 되는 주요 기질공급 플랫폼 식물체 구축을 위하여 벼 IPP/DMAPP 기질증진 관련 유용 유전자원을 선별하였고, 특정 유전자 과발현에 의해 테페노이드의 생산성이 현저히 증대될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



본 발명은 터페노이드의 고효율 생산을 위한 형질전환 식물체에 관한 것으로, *OsDXS2* 유전자가 과발현된 터페노이드 생산용 형질전환 벼가 제공된다.

본 발명에 따른 형질전환 벼에 있어서 *OsDXS2* 유전자의 과발현은 식물 생장에 크게 영향을 주지 않으면서 목적 물질 생성에 관한 조건이 충족되었을 때 기질을 증진시키므로 벼 터페노이드 대사공학을 위한 플랫폼 식물체 구축을 위한 용도로서 활용 가능하다.

본 발명의 일 실시예에 따른 베타카로틴 증진 형질전환 벼는 베타카로틴 하류의 카로티노이드, 예컨대, 지아산틴, 아스타산틴, 캡산틴 등의 대사공학 플랫폼 식물체로서 활용 가능하다.

(52) CPC특허분류

C12N 9/1022 (2013.01)

C12Y 202/01007 (2013.01)

C12Y 205/01032 (2013.01)

(72) 발명자

이여진

경기도 성남시 수정구 회망로 472, 1동 1304호(단대동, 미도아파트)

정예술

경기도 수원시 영통구 신원로 118, 702호(신동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011094

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21_차세대바이오그린21(R&D)_시스템합성농생명공학사업

연구과제명 식물 기능성 물질대사 생성기작의 모듈링 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

프로모터, 및 이와 작동 가능하게 연결된 *OsDXS2*(*Oryza sativa* 1-deoxyxylulose-5-phosphate synthase) 유전자를 포함하는 벼의 테페노이드 생합성 증진용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 테페노이드는 모노터펜(monoterpenes), 세스퀴터펜(sesquiterpenes), 디터펜(diterpenes), 트리터펜(triterpene) 또는 카로티노이드(carotenoids)인 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 *OsDXS2* 유전자는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 재조합 벡터.

청구항 4

OsDXS2 유전자가 과발현된 테페노이드 생산용 형질전환 벼.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 테페노이드 생산용 형질전환 벼.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

PSY(phytoene synthase) 및 *CrtI*(carotene desaturase I)가 도입되고, 카로티노이드 생산능이 증진된 형질전환 벼.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 *OsDXS2* 유전자는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 형질전환 벼.

청구항 8

OsDXS2 유전자를 과발현시키는 단계;를 포함하는 형질전환 벼의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 재조합 벡터를 도입하는 단계;를 포함하는 형질전환 벼의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 테페노이드의 고효율 생산을 위한 폴리뉴클레오티드 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자연계에 존재하는 다양한 생물종들은 특유의 기능을 가지는 유용 생리활성 물질을 생성하여 농업, 의약, 산업적으로 활용되고 있다.

- [0003] 특히 식물의 주요 2차 대사산물로서 다양한 생리활성 작용을 가지고 있는 터페노이드는 다양한 구조와 물성을 가지고 있고 약 30만종 이상이 발견될 정도로 자연계에서 가장 방대한 신기능 유용 천연물의 보고이다. 터페노이드는 모든 생물계에 있어서 정상적인 성장 및 발달 과정에 필수적인 생물학적 기능들에 관여한다. 예를 들어, 터페노이드에는 진핵 막 안정화제(스테롤), 동물 및 식물 호르몬(스테로이드, 레티노이드, 지베렐린 및 앱시스산), 광합성용 색소(카로티노이드 및 엽록소의 피톨 측쇄), 및 전자 전달용 담체(메나퀴논, 플라스토퀴논 및 유비퀴논)등이 포함된다.
- [0004] 이러한 필수 생물학적 기능 이외에 식물유래 터페노이드 물질의 항암, 항염, 항산화 기능은 면역강화, 항암치료에 대한 신약개발 천연물자원으로 꾸준히 활용되고 있으며, 그중 식물유래 고기능성 터페노이드 물질에 대한 높은 의약을 포함한 다양한 산업에 있어서 그 활용도가 증가되고 있는 추세이다.
- [0005] 예를 들어, 주목에서 생산되는 탁월한 항암효과 물질인 탁솔(Taxol), 약용식물 중의 하나인 개똥쑥에서 생산되는 효과 높은 말라리아 치료제의 주성분인 아르테미시닌(Artemisinin)등이 있고, 이외에도 해충기피제와 항곰팡이제로 사용되는 시트로넬라(citronellal), 세제향에 사용되는 linalool, 화장품과 향료 혹은 강력한 유기용매 등 다용도로 활용되는 리모넨(limonene), 항산화 및 암발생 억제 작용으로 유명한 카로티노이드(carotenoid) 계열 물질등이 있다.
- [0006] 하지만, 터페노이드는 복잡한 구조적 문제로 대부분 화학합성 및 미생물을 활용한 대사공학 대량생산체계 구축에 큰 어려움이 있기 때문에, 대부분 식물에서 추출하여 활용되고 있는데 식물에 존재하는 양이 극소량이기 때문에 활용에 큰 어려움이 있다.
- [0007] 또한, 식물 유래 터페노이드의 생합성 경로는 길고 복잡하기 때문에 생산성 향상을 위한 대사공학 설계가 용이하지 않아 현재까지 관련 식물대사공학 기술 개발이 미흡한 편이다. 이런 이유로, 식물 터페노이드 대사공학에 있어서 적용하는 생합성 경로를 단축 시켜 줄 수 있는 효율적인 기질공급 플랫폼 식물체 구축은 기능성 터페노이드를 대량생산 할 수 있는 고기능성 식물체 개발을 위해 필수적인 단계라고 할 수 있다.
- [0008] 터페노이드(terpenoids)는 탄소가 5개인 이소프렌(isoprene) 물질인 IPP(isopentenyl pyrophosphate, C₅)와 DMAPP(dimethylallyl pyrophosphate, C₅)라는 단위구조(building blocks)로부터 생성된다. 프레닐전달효소(prenyltransferase)에 의해 IPP 및 DMAPP가 연쇄적으로 중합되면서 탄소가 10개인 GPP(Geranyl pyrophosphate, C₁₀), 15개인 FPP(Farnesyl pyrophosphate, C₁₅), 20개인 GGPP(Geranylgeranyl pyrophosphate, C₂₀)라는 터페노이드의 전구물질이 생합성되고, 그로부터 다양한 터펜합성효소(Terpene synthases)에 의해서 고리화(cyclization), 산화(oxidation), 환원(reduction), 당화(glycosylation)등의 다양한 구조변이를 통해, 수십 만종 이상의 다양한 monoterpenes(C₁₀), sesquiterpenes(C₁₅), diterpenes(C₂₀), triterpene(C₃₀), tetraterpenes(C₄₀) 등이 만들어진다.
- [0009] 이러한, 다양한 터페노이드의 단위구조인 IPP 와 DMAPP는 세포질에 존재하는 “메발로네이트(mevalonate) 경로” 와 “색소체(plastid)에 존재하는 MEP(methylerythritol 4-phosphate) 경로”에 의해 생성된다.
- [0010] MEP 경로는 첫번째 단계에서 세포내 당화과정 산물중 하나인 글리세르알데히드-3-포스페이트(G3P) 및 피루베이트가 DXS(1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase)에 의해 중합되면서 DXP(1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate)가 생성 되면서 시작한다.
- [0011] DXP는 DXR(DXP reductase)라는 효소에 의해 MEP으로 환원 되면서 색소체 내 MEP 경로 물질의 기본 구조가 완성된다. 이후 4 종의 구조 효소들(IspD, IspE, IspF, IspG, IspH)의 순차적 작용에 의해 MEP 경로의 최종 산물이자 터페노이드의 단위구조물질인 IPP/DMAPP가 생성된다.
- [0012] 이런 이유로, MEP 경로의 첫번째 두가지 효소 DXS 와 DXR은 박테리아 및 식물에 있어서 터페노이드 형성에 대한 속도-제한 단계(rate-limiting step)으로서의 기능에 관한 연구가 진행되어 왔으며, 보고에 따르면 이러한 DXS 와 DXR의 속도-제한 단계(rate-limiting step)으로서의 기능은 식물종 특이적으로 다른 것으로 나타난다.
- [0013] 본 발명자들은 고기능성 터페노이드 물질생산 식물체 개발에 대한 고효율 식물 대사공학의 기반이 되는 주요 기질공급 플랫폼 식물체 구축을 위하여 IPP/DMAPP 기질증진 관련 유용 유전자원을 선별하였고, 특정 유전자 과발현에 의해 터페노이드의 생산성이 현저히 증대될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 대사공학을 통한 식물유래 고기능성 테페노이드 물질생산 고부가 식물체 개발을 위한 효율적 기질증진 플랫폼 식물체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 측면에 따르면, 프로모터, 및 이와 작동 가능하게 연결된 *OsDXS2*(*Oryza sativa* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase) 유전자를 포함하는 벼의 테페노이드 생합성 증진용 재조합 벡터가 제공된다.

[0016] 일 실시예에 있어서, 상기 테페노이드는 모노터펜(monoterpenes), 세스퀴터펜(sesquiterpenes), 디터펜(diterpenes), 트리터펜(triterpene), 테트라터펜(tetraterpenes)일 수 있다.

[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 *OsDXS2* 유전자는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어질 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 측면에 따르면, *OsDXS2* 유전자가 과발현된 테페노이드 생산용 형질전환 벼가 제공된다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 형질전환 벼는 상기 재조합 벡터로 형질전환될 수 있다.

[0020] 일 실시예에 있어서, 상기 형질전환 벼는 *PSY*(phytoene synthase) 및 *CrtI*(carotene desaturase I)가 도입되고, 테트라터펜(tetraterpenes) 종류 중 하나인 카로티노이드(carotenoids) 생산능이 증진될 수 있다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 상기 *OsDXS2* 유전자는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어질 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 측면에 따르면, *OsDXS2* 유전자를 과발현시키는 단계;를 포함하는 형질전환 벼의 제조방법이 제공된다.

[0023] 일 실시예에 있어서, 상기 형질전환 벼의 제조방법은 상기 재조합 벡터를 도입하는 단계;를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 형질전환 벼에 있어서 *OsDXS2* 유전자의 과발현은 식물 생장에 크게 영향을 주지 않으면서 목적 물질 생성에 관한 조건이 충족되었을 때 기질을 증진시키므로 벼 테페노이드 대사공학을 위한 플랫폼 식물체 구축을 위한 용도로서 활용 가능하다.

[0025] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 베타카로틴 증진 형질전환체는 베타카로틴 하류의 카로티노이드, 예컨대, 지아산틴, 아스타산틴, 캡산틴 등의 대사공학 플랫폼 식물체로서 활용 가능하다.

[0026] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 벼 테페노이드 대사경로(A) 및 실험에 사용된 발현 벡터의 구조(B)를 도식한 것이다.

도 2는 *OsDXS2* 또는 *OsDXR* 도입 유전자의 발현을 잎(A)과 종자(B)에서 분석한 것이다.

도 3은 *OsDXS2* 또는 *OsDXR* 유전자가 단독으로 과발현된 형질전환체 종자에서 카로티노이드 함량을 비교 분석한 것이다.

도 4는 *stPAC* 가 종자배유 특이적으로 과발현 되는 환경에서 *OsDXS2* 또는 *OsDXR* 유전자 발현에 따른 형질전환체 종자 카로티노이드 함량을 분석한 것이다.

도 5는 형질전환체 종자내 *OsDXS2* 또는 *OsDXR* 유전자 발현에 따른 MEP 경로의 주요 유전자 발현 패턴을 분석한 것이다.

도 6은 *OsDXS2* 또는 *OsDXR* 유전자가 과발현된 형질전환체 잎에서 카로티노이드 및 엽록소의 함량을 비교 분석한 것이다.

도 7은 *OsDXS2* 또는 *OsDXR* 유전자가 과발현된 형질전환체 잎에서 MEP 경로의 주요 유전자 발현 패턴을 분석한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0030] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.
- [0031] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0032] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실험 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 씌여지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카르복실 방향으로 씌여진다.
- [0034] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0035] 본 발명의 일 측면에 따르면, 프로모터, 및 이와 작동 가능하게 연결된 *OsDXS2*(*Oryza sativa* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase) 유전자를 포함하는 벼의 터페노이드 생합성 증진용 재조합 벡터가 제공된다.
- [0036] 상기 "터페노이드(terpenoid)", "터펜 화합물(terpene compound)", "터페노이드 화합물(terpenoid compound)", "이소프레노이드(isoprenoid)" 및 "이소프레노이드 화합물(isoprenoid compound)"은 서로 교환가능하게 사용되며, IPP/DMAPP로부터 유래될 수 있는 임의의 화합물을 의미한다.
- [0037] 상기 터페노이드는 모노터펜(monoterpenes), 세스퀴터펜(sesquiterpenes), 디터펜(diterpenes), 트리터펜(triterpene) 또는 테트라터펜(tetraterpene)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명자들은 터페노이드의 고효율 생산을 위한 위한 플랫폼 식물체를 구축하고자 MEP 경로의 초기 시작단계에 관여하는 두가지 효소에 대한 기질증진 관련 기능을 평가한 결과, 터페노이드를 생산에 있어서 DXS2(1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase)의 기질 증진 관련 역할 및 기능을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다
- [0039] 즉, 상기 *OsDXS2* 유전자의 과발현은 식물 생장에 크게 영향을 미치지 않는 반면, 목적 터펜물질 생성을 위한 조건이 충족되었을 때에만 최종 산물 생산에 요구되는 기질의 공급을 촉진시키므로 *OsDXS2* 유전자가 과발현된 형질전환 벼는 터페노이드 대사공학을 위한 플랫폼 식물체로서 활용 가능하다.
- [0040] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로모터"는 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미하며, "작동 가능하게 연결된다(operably linked)"는 것은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 말한다. 아울러, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0041] 본 명세서에서 사용된 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 의미한다. 상기 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 상기 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0042] 상기 "재조합 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소

(translation control element)를 가질 수 있다.

- [0043] 상기 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시발현(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화 하에서 활성이 있는 프로모터이다.
- [0044] 상기 재조합 벡터는 마커 유전자를 추가로 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자, 제초제 저항성 유전자, 대사관련 유전자, 발광 유전자, GFP(green fluorescence protein) 유전자, GUS(β -glucuronidase) 유전자 및 GAL(β -galactosidase) 유전자로부터 선택될 수 있다. 예컨대, 상기 마커 유전자는 제초제 저항성 Bar 유전자, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(NPT II) 유전자, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자, 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자, 또는 다이하이드로폴레이트 환원효소 유전자를 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 다른 측면에 따르면, *OsDXS2* 유전자가 과발현된 터페노이드 생산용 형질전환 벼가 제공된다. 일 실시예에서, 상기 형질전환 벼는 상기 재조합 벡터로 형질전환될 수 있으며, 상기 *OsDXS2* 유전자는 서열번호 1의 핵산서열로 이루어질 수 있다.
- [0046] 본 발명의 다른 측면에 따르면, *OsDXS2* 유전자를 과발현시키는 단계;를 포함하는 형질전환 벼의 제조방법이 제공된다. 일 실시예에서, 상기 형질전환 벼의 제조방법은 상기 재조합 벡터를 도입하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0047] 상기 "형질전환"은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 형질전환 방법은 반드시 재생 또는 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다.
- [0048] 식물 종의 형질전환은 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다.
- [0049] 상기 형질전환 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrotiu 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 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.
- [0050] 상기 벡터가 도입되는 식물 세포는 식물로 재생될 수 있는 한 특정한 형태로 제한되는 것은 아니다. 예컨대, 상기 세포는 배양된 세포 부유물, 원형질체(protoplast), 잎 절편(leaf section) 및 캘러스(callus)를 포함할 수 있다.
- [0051] 상기 식물세포는 통상적인 방법에 따라 배양되어 액체 배양물, 캘러스, 원형질 배양물이 될 수 있으며, 분화되어 식물의 조직 또는 식물이 될 수 있다.
- [0052] 즉, 상기 재조합 벡터가 도입된 형질전환 세포들은 당업계에 공지된 표준 기술을 사용하여 캘러스 유도, 발근 및 토양 순화와 같은 과정을 거쳐 식물체로 재분화시킬 수 있으며, 꺾꽂이, 접붙이기 등과 같은 무성번식방법 및 종자를 이용하여 유성번식방법에 의해 생산할 수 있다.
- [0053] 상기 식물세포의 배양은 식물의 일부를 모체로부터 분리하여 적당한 조건 아래에서 무균적으로 배양하여 생육시키는 것으로 조직 절편의 액체 배양, 조직 절편의 캘러스 배양, 원형질체 배양 등 당업자에게 공지된 어떠한 방식의 것에 의할 수 있으며, 그 배양 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0054] 상기 배양된 식물세포를 식물로 분화시키는 것은 캘러스, 원형질체 형태의 배양된 식물세포를 적당한 조건아래에서 분화를 유도하여 식물의 조직 또는 식물로 분화시키는 것으로 그 분화 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0055] 구체적으로 상기 형질전환 벼는 *OsDXS2* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환시킨 후 통상적인 방법에 따라 캘러스의 유도, 발근 및 토양 순화의 과정을 통해 수득할 수 있다.
- [0056] 즉, 상기 *OsDXS2* 유전자가 포함된 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입시키고 상기 도입된 아그로박테리움을 이용하여 벼 캘러스에 형질전환시킬 수 있으며, 제초제에 생존하는 개체를 선발하여 터페노이드 생산용 형질전

환 버를 수득할 수 있다.

- [0057] 한편, 상기 형질전환 버는 *PSY*(phytoene synthase) 및 *CrtI*(carotene desaturase I)가 도입되고, 카로티노이드 생산능이 증진될 수 있다.
- [0058] 식물체 내 카로티노이드 생합성 경로는 두분자의 GGPP(geranylgeranyl pyrophosphate)가 파이토엔 합성효소(phytoene synthase, *PSY*)에 의해 촉매되는 중합반응을 통해 탄소 40개의 테트라테펜(tetraterpene) 물질 중 하나인 파이토엔(phytoene) 물질을 합성하면서 시작된다.
- [0059] 파이토엔 불포화 효소(phytoene desaturase, *PDS*)에 의한 두 단계의 불포화 반응 후에 ζ -카로틴(ζ -carotene)이 만들어지고 ζ -카로틴 불포화 효소(ζ -carotene desaturase, *ZDS*)에 의해 두 단계의 불포화 반응이 더 진행되면 그 결과 뉴로스포렌(neurosporene)를 거쳐 라이코펜(lycopene)이 생성된다.
- [0060] 비환형 카로티노이드로서 최종물질인 라이코펜은 두 종류의 환형 카로틴 물질로 전환되는데, 하나는 라이코펜- β -사이클라제(lycopene- β -cyclase, β -LCY)의 두 단계 작용에 의해 베타카로틴(β -carotene)이고, 다른 하나는 β -LCY와 라이코펜- ϵ -사이클라제(lycopene- ϵ -cyclase, ϵ -LCY)의 공동작용에 의해 만들어지는 알파카로틴(α -carotene)이다.
- [0061] 파이토엔 물질로부터 카로틴 물질생성 기작에 대해, 미생물 유래 카로틴 불포화 효소(carotene desaturase, *CrtI*)는 상기 복잡한 여러단계 효소의 도움 없이 파이토엔으로부터 라이코펜 형성능이 있는 단일효소로 보고되었으며, 식물에 *CrtI* 과발현시 *CrtI* 효소에 의해 생성된 라이코펜 물질이 카로틴(carotene) 물질생성에 소진되며, 그 중 베타카로틴(β -carotene) 물질생성 증진 효과가 증명이 되어 다양한 베타카로틴 대사공학에 활용되고 있다.
- [0062] 벼 종자 배유에서는 카로티노이드 생합성의 첫 단계인 파이토엔 합성효소(*PSY*)가 발현이 낮아 카로틴(carotene)이 생성되지 않는다.
- [0063] 따라서, 파이토엔 합성 효소(phytoene synthase, *PSY*), 와 미생물 유래 카로틴 불포화 효소(carotene desaturase, *CrtI*)를 함께 발현시킴으로써 벼 종자 배유에서 베타카로틴을 합성할 수 있다.
- [0064] 상기 형질전환 버는 *OsDXS2* 유전자가 과발현되어 있으므로 프로모터와 작동 가능하게 연결된 벼 코돈에 최적화 합성 *stPAC*(synthetic*Psy-2A-stCrtI*) 다중 발현 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환시킴으로써 카로티노이드 생산능이 현저히 증대될 수 있다.
- [0065] 즉, 카로티노이드의 생성을 증대시키는 유전자 카세트인 *stPAC*이 식물체에 도입됨으로써 카로티노이드의 생산능이 증대될 수 있으나, *OsDXS2* 유전자가 함께 과발현되는 경우 터펜 물질 생성에 요구되는 기질의 공급을 증가시키므로 *stPAC*가 단독으로 도입된 형질전환체와 비교하여 카로티노이드의 생산능이 현저히 증대될 수 있다.
- [0066] 또한, 베타카로틴 가수분해효소(β -carotene hydroxylase) 및 베타카로틴 케톨레이즈(β -carotene ketolase)를 암호화하는 유전자를 추가로 발현시킴으로써 지아산틴 및 아스타산틴을 고효율로 생산할 수 있다.
- [0067] 이하 실시예를 통해, 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.
- [0068] **실험예**
- [0069] 본 발명자들은 MEP 경로의 초기단계 유전자 *OsDXS* 및 *OsDXR*를 선택하고, 전신발현 프로모터를 이용하여 *PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR* 형질전환체를 제조하였다.
- [0070] 종자 특이적으로 베타카로틴의 생성을 증대시키는 유전자 카세트인 *stPAC* 및, *OsDXS2* 또는 *OsDXR* 전신발현 유전자 카세트가 함께 발현 되도록 구축된 *PGD1::OsDXS2_G1b::stPAC* 및 *PGD1::OsDXR_G1b::stPAC* 형질전환체를 제조하고, 상기 형질전환체들 각각에 대한 카로티노이드 함량을 측정하였다.
- [0071] 상기 *OsDXS2* 유전자가 과발현된 *PGD1::OsDXS2* 종자의 카로티노이드 함량을 일반 재배벼와 비교하면, *PGD1::OsDXS2*의 경우 약 1.5배, *stPAC*만 발현되는 베타카로틴 생성 벼 형질전환체 *G1b::stPAC* 대비 종자 카로티노이드 함량이 *PGD1::OsDXS2_G1b::stPAC* 에서 약 6배까지 증가되었다.
- [0072] 반면, *OsDXR*의 경우에는 재배벼에 비해 *PGD1::OsDXR* 종자의 카로티노이드가 전혀 영향을 받지 않았으며, *G1b::stPAC* 종자 대비시에도 카로티노이드 함량에 차이가 없다는 것을 확인 할 수 있었다.
- [0073] 즉, MEP 기작의 주요 유전자인 *OsDXS2* 유전자의 과발현은 *stPAC*와 같이 특정 터펜 물질 생성 관련 유전자의 과발현시에 한하여 기질 공급을 증진시키는 기능을 하지만, *OsDXS2* 및 *OsDXR* 유전자의 과발현 만으로는 식물의 내

제 터펜 물질 생성 관련 기작에는 큰 영향을 미치지 않았다.

[0074] *OsDXS2* 및 *OsDXR* 발현에 따른 총 카로티노이드 함량의 변화 측정

[0075] *OsDXR*, *OsDXS2* 유전자에 대한 형질전환체의 분자생물학적 분석을 수행하였다.

[0076] 유전자 과발현 벡터의 독립적 도입 위치 3종의 T4 형질전환체의 잎 및 종자에 대한 도입유전자의 수준을 확인하였다(도 2).

[0077] *Glb::stPAC* 형질전환 식물의 대표적인 라인인, *Glb::stPAC-25* 형질전환체를 *PGD1::OsDXS2_Glb::stPAC* 및 *PGD1::OsDXR_Glb::stPAC* 형질전환체에 대한 대조군으로 사용하였다.

[0078] 발현 수준이 가장 높은 형질전환체 및 가장 낮은 형질전환체의 간의 발현 차이는 2배 이내로 차이가 크지 않았으며, T4 형질전환체의 게놈 내 도입 유전자는 1 내지 2의 낮은 카피수로 존재하였다.

[0079] 형질전환체 종자에서 카로티노이드 성분 함량 측정을 통한 기질 공급 효율을 분석하였다(도 3). *OsDXS2* 또는 *OsDXR*이 종자에서 카로티노이드의 축적에 영향을 미치는지 조사하기 위해, 벼 식물체 T4 세대 종자(40 DAF)를 샘플링하여 카로티노이드계 성분 함량을 분석하였다.

[0080] *PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR* 형질전환체의 종자에서 카로티노이드 평균 총 함량은 각각 0.24 $\mu\text{g/g}$ 및 0.17 $\mu\text{g/g}$ 으로 분석되었으며, *PGD1::OsDXS2* 종자에서 1.3 내지 1.4배 높은 수준으로 나타났다($p<0.01$).

[0081] 또한, *PGD1::OsDXS2* 종자에서 루테인의 함량은 0.16 $\mu\text{g/g}$ 으로, NT 및 *PGD1::OsDXR* 종자와 비교하여 1.2 내지 1.3배 높은 수준인 반면, 베타카로틴 및 제아잔틴의 수준은 NT, *PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR* 간 큰 차이가 나타나지 않았다.

[0082] 카로티노이드 총량의 증가가 주로 루테인의 증가에 기인하였으며, *OsDXS2*의 과발현만이 총 카로티노이드의 ?t량을 일부 증가시킬 수 있었으나, 크게 영향을 주지 않음을 확인 하였다.

[0083] 카로티노이드는 종자배유에서 검출되지 않음이 보고된 바 있으며, 외피나 배아에서 제한적으로 축적되고 있음이 보고된 바 있다. 즉, 상기 결과는 *OsDXS2* 및 *OsDXR* 유전자가 단독으로 벼의 종자에서 과발현되더라도 카로티노이드 생성을 위한 IPP/DMAPP 전구체를 증대시킬 수 없음을 시사한다.

[0084] 반면, *OsDXS2* 및 *Glb::stPAC* 유전자의 공동 발현은 종자 배유에서 베타카로틴 생산에 밀접한 영향을 미쳤다(도 4).

[0085] 도 4를 참조하면, *PGD1::OsDXS2_Glb::stPAC*가 도입된 형질전환체의 종자는 오렌지 색으로 관찰되었으며 높은 수준의 카로티노이드가 축적되었음이 확인되었다.

[0086] 반면, *PGD1::OsDXR_Glb::stPAC* 종자는 *Glb::stPAC* 종자와 유사하게 노르스름한 색을 나타내었으며, *PGD1::OsDXS2_Glb::stPAC* 종자 대비 카로티노이드 생성량이 현저히 낮은 수준인 것으로 분석되었다.

[0087] *PGD1::OsDXS2_Glb::stPAC* 종자에서 총 카로티노이드 함량은 21.67, 8.66 및 10.55 $\mu\text{g/g}$ 이었으나, *PGD1::OsDXR_Glb::stPAC* 종자의 경우 3.08, 1.58 및 1.38 $\mu\text{g/g}$ 에 불과하였다.

[0088] 전자의 최대값은 후자 대비 7배 이상 높았으며, 최소값은 6.3배 높은 수준으로 측정되었다.

[0089] 분석 결과 *PGD1::OsDXR_Glb::stPAC* 종자의 경우 총 카로티노이드 함량이 *Glb::stPAC* 형질전환체 종자(벼 배유특이적으로 베타카로틴 생성이 유도된 형질전환체 종자)에 비해 큰 차이가 없었으나 *PGD1::OsDXS2_Glb::stPAC* 형질전환체 종자의 경우 *Glb::stPAC* 보다 총 카로티노이드 함량이 약 2 내지 5배 높은 수준으로 측정되었으며, α -carotene은 약 6.8배, β -carotene은 약 3.4 배 증가되었다.

[0090] 도 3 및 4를 비교하면, 총 카로티노이드의 함량은 *OsDXR*에 의해 증대되지 않는 반면, *OsDXS2*에 의해 현저히 증대될 수 있으며, 상기 결과는 *OsDXS2*은 MEP 경로에서 기질 공급을 증대시키는 기능이 있지만, *OsDXR*은 그 기능이 없음을 의미한다.

[0091] *OsDXS2* 및 *OsDXR*이 MEP 경로상 주요 유전자의 발현 패턴에 미치는 조절 기능 분석

[0092] 베타카로틴 생성을 위한 조합 유전자 과발현체의 종자에서 카로티노이드 생성 관련 주요 유전자의 발현을 분석하였다(도 5).

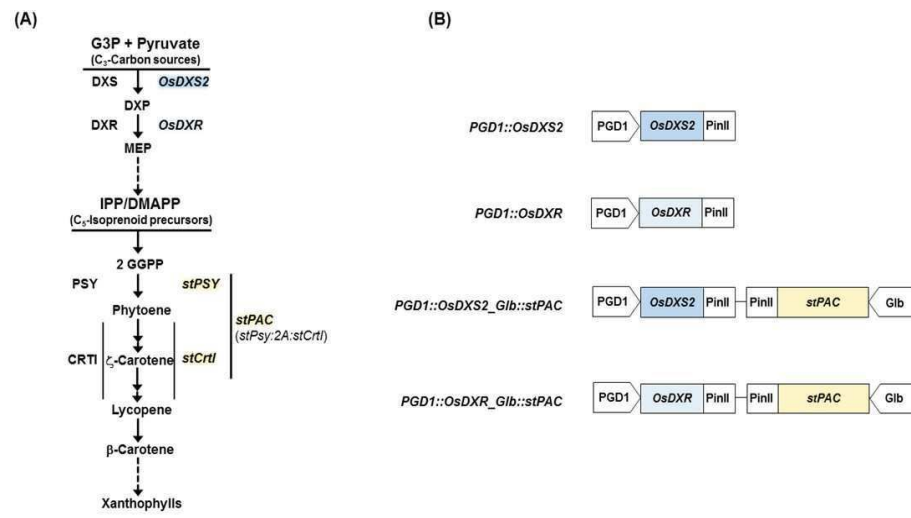
[0093] 베타카로틴 생성 *stPAC* 유전자와 함께 *OsDXS* 및 *OsDXR* 유전자 각각을 과발현하는 식물체 종자에서 카로티노이드

생성 관련 주요 유전자는 잎과 달리 *OsDXS2* 및 *OsDXR* 과발현에 의해 일부 하향 조절(down-regulation)되었으나 큰 차이는 나타나지 않았다.

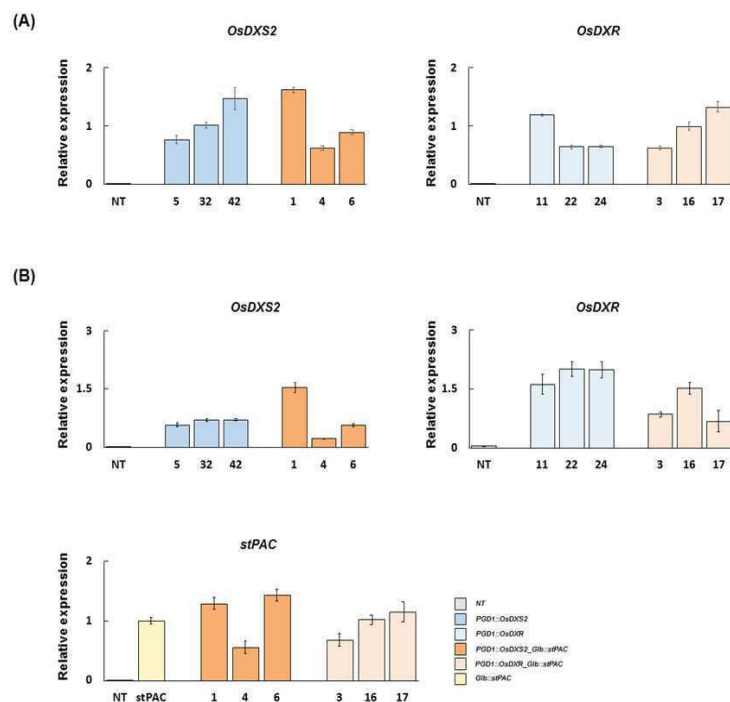
- [0094] 도 5를 참조하면, MEP 경로의 5종의 유전자(*OsDXS1*, *OsDXS2*, *OsDXS3*, *OsDXR* 및 *OsIsph1*)는 종자 내 *OsDXS2*의 과발현에 의해 일반 재배벼에 비해 조금 하향 조절되는 경향을 보이나 그 차이가(10-20% 내외) 크지 않고 과발현 정도에 따라 이와 같은 하향 조절 경향은 극복될 수 있었고, 이러한 경향은 계통간의 변이정도 일 뿐 우수계통 선발에 의해 충분히 극복될 수 있으며 *OsDXS2* 과발현에 의한 주요 변이는 아닌 것을 시사한다.
- [0095] 또한, 이러한 경향은 *OsDXS2*, *OsDXR* 및 *stPAC* 과발현 종자내 카로티노이드 함량 변화와 상관관계가 낮은 것으로 보아 *OsDXS2*에 의한 기질공급 기능 만이 카로티노이드 대사에 영향을 줄 수 있다는 것을 시사한다.
- [0096] *OsDXS2* 또는 *OsDXR*의 과발현이 잎 카로티노이드 및 엽록소의 함량에 미치는 영향 평가
- [0097] 유전자 과발현 형질전환체 종자의 카로티노이드 및 엽록소의 함량을 비교 분석하였다.
- [0098] 유전자 과발현 식물체(*PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR*)의 종자에서 카로티노이드(carotenoid), 엽록소(chlorophylls)의 함량 및 성분을 분석한 결과, *OsDXS2* 및 *OsDXR*의 과발현은 차별적으로 종자의 카로티노이드 함량에 영향을 미쳤다.
- [0099] *PGD1::OsDXS2_Glb::stPAC* 과발현 종자의 경우 *Glb::stPAC* 과발현 종자와 비교하여 카로티노이드 함량이 증대된 반면, *PGD1::OsDXR_Glb::stPAC* 과발현 종자의 카로티노이드 함량은 전혀 증가하지 않았다.
- [0100] *OsDXS2* 및 *OsDXR*이 카로티노이드 함량과 관련하여 종자와 마찬가지로 상호 구별되는 역할을 수행하는지 조사하기 위해, *PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR* 잎의 카로티노이드 및 엽록소의 함량을 분석하였다(도 6).
- [0101] NT, *PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR* 잎에서 카로티노이드 함량간 유의적인 차이는 나타나지 않았으며, *PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR* 잎의 엽록소 a(chlorophyll-a)의 함량은 야생형(NT)과 비교하여 유의적으로 감소되었다($p < 0.01$).
- [0102] 그러나, *PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR* 간 엽록소 b(chlorophyll-b)의 함량은 유의적인 차이가 나지 않았다.
- [0103] 즉, *PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR* 간의 카로티노이드 및 엽록소의 함량의 차이가 없었으며, 상기 결과는 잎의 카로틴 및 엽록소 생성에 있어서 *OsDXS2* 및 *OsDXR*의 역할은 서로 큰 차이가 없음을 시사한다.
- [0104] 또한, 형질전환체 잎에서 카로티노이드 생성 관련 주요 유전자의 발현을 분석하였다(도 7).
- [0105] *OsDXS* 및 *OsDXR* 과발현체 *PGD1::OsDXS2* 및 *PGD1::OsDXR* 잎에서 카로티노이드 생성 관련 주요 유전자 발현을 분석한 결과 *OsDXS2* 및 *OsDXR* 과발현에 의해 상향 조절(up-regulation)되는 경향을 보이나 잎 카로티노이드 함량 분석 결과 전혀 차이가 없는 것으로 보아 유전자의 발현 변화는 카로티노이드 대사에 크게 영향을 주지 않는다는 것을 의미한다.
- [0106] 또한, 카로티노이드 대사가 활발히 일어 나고 있는 잎에서 *OsDXS2* 과발현이 카로티노이드 함량에 전혀 영향을 주지 않았다는 것은 *OsDXS2* 과발현에 의해 벼 식물 내제 카로티노이드 대사 흐름이 전혀 영향을 받지 않았음을 시사한다.
- [0107] 상기 결과는 MEP 경로의 주요 유전자 중 *OsDXS2*가 벼 종자 카로티노이드 생성 경로의 기질 공급을 증가시키는데 중요한 역할을 하지만, 목적 형질 과발현 조건 이외에는 내제 카로티노이드 및 엽록소 생성관련 대사 흐름에 전혀 영향을 주지 않기 때문에, *OsDXS2*의 벼 카로티노이드를 포함한 테페노이드 대사공학에 있어서 높은 활용가능성을 시사한다.
- [0108] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0109] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

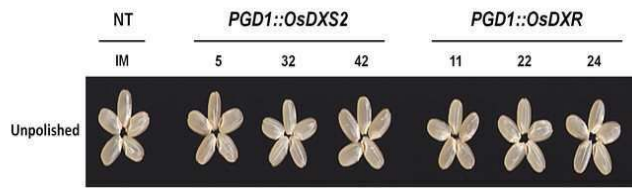


도면2

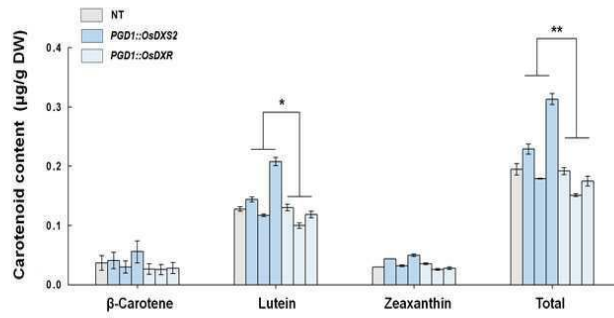


도면3

(A)

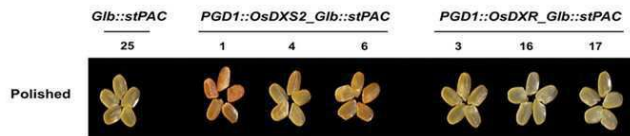


(B)

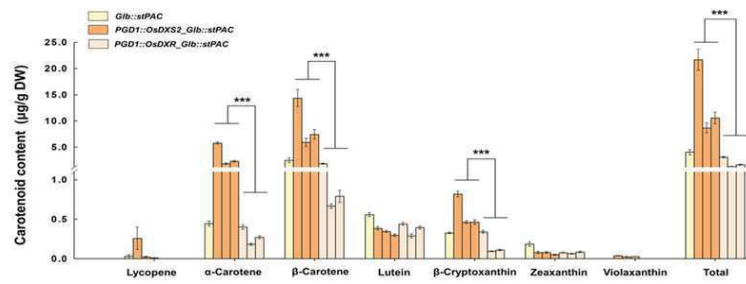


도면4

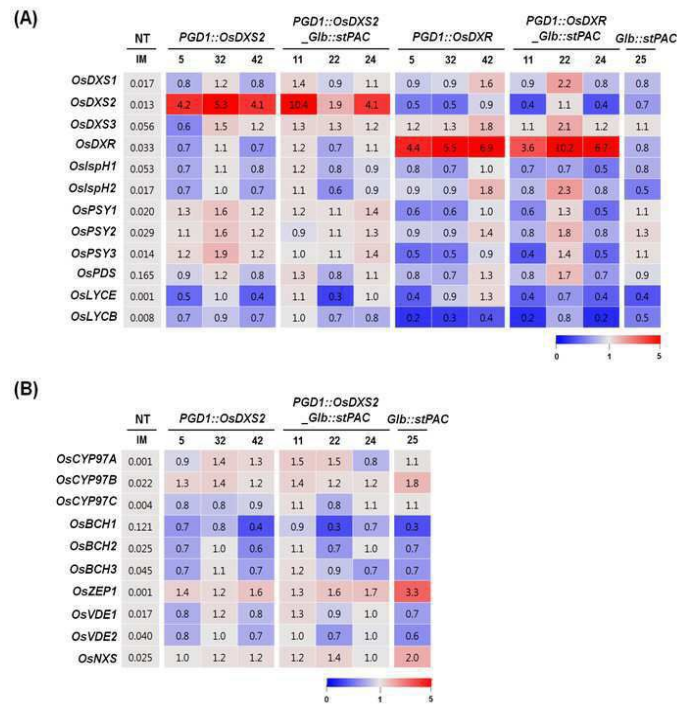
(A)



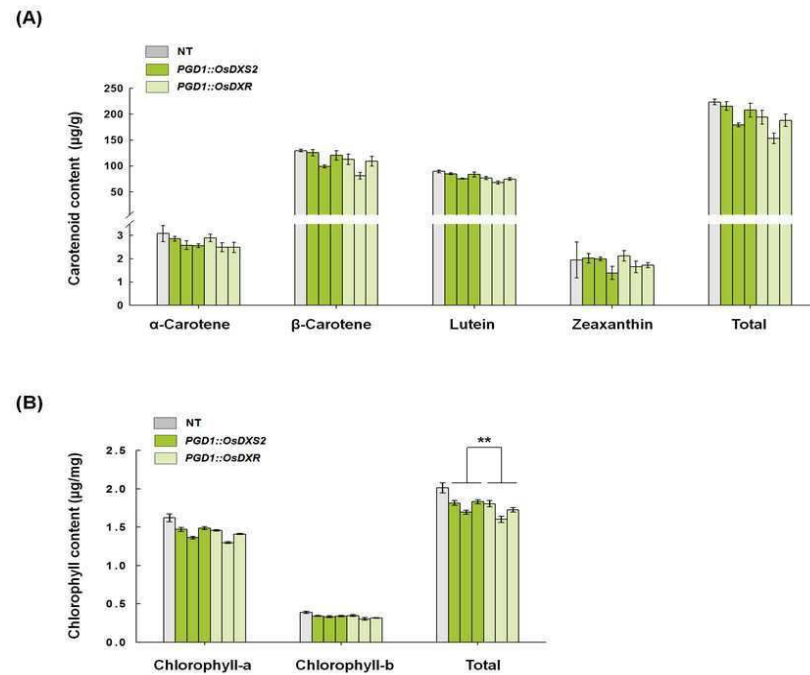
(B)



도면5

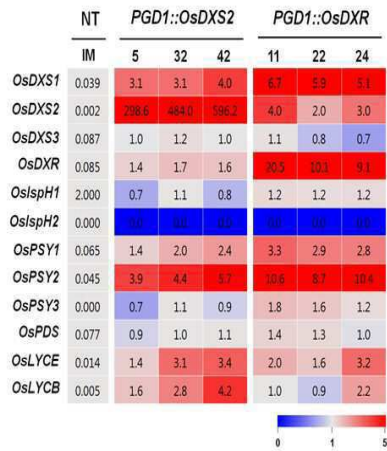


도면6

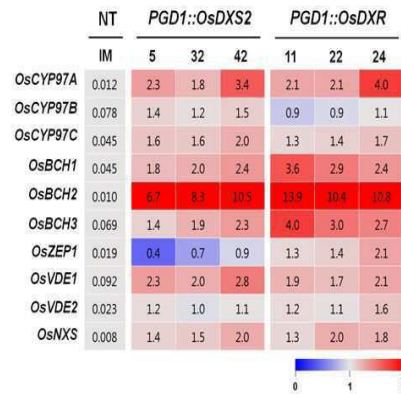


도면7

(A)



(B)



서열 목록

- <110> KYUNGHEE UNIVERSITY
- <120> A POLYNUCLEOTIDE FOR PRODUCING HIGH-EFFICIENCY TERPENOID AND TRANSFORMED CELL USING THE SAME
- <130> 17pp11405
- <150> KR 2016-0140839
- <151> 2016-10-27
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 2142
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> OsDXS2
- <400> 1

```

atggcgctcc aggcacgtgc gtcgccgtcc atgttcgcgc cgatcccgac gaacaccaac      60
gcttcttgcc ggcgaaggtt gcaggtcagg gcgagcgccg cggcgccggc ggcgaacggc      120

ggcgggggatg ggaaggtgat gatgaggaag gaggcggcgt cggcgccgtg gaagatcgac      180
tactccggcg agaagccggc gacgcctctg cttgacacgg tgaactaccc ggtccacatg      240
aagaacctct cgacgccgga gctggagcag ctggcgccgg agctccgggc ggagatcgtg      300
cacacggtgt ccaagaccgg gggccacctg agctccagcc tggcgctcgt cgagctcgcc      360
gtggcgctgc accacgtgtt cgacacgccg gaggacaaga tcattctgga cgtcgggcac      420
caggcgtacc cgcacaagat cctgacgggg cggcgttcgc ggatgcacac catccggcag      480

```

acctccgggc tcgccgggtt cccgaagcgc gacgagagcg cgcacgacgc gttcggcgcg	540
ggccacagct cgacgagcat ctccggcgcg ctccggatgg cggcggcgag ggacctctc	600
gggaagaaga accacgtcat ctccgtgacg ggcgacggcg ccatgaccgc cggccaggcg	660
tacgaggcga tgaacaactc gggctacctc gactccaaca tgatcgtggt gctcaacgac	720
aacaagcagg tgtccctccc gacggcgacg ctcgacggcc ccgccacgcc cgtcggcgcg	780
ctgagcaagg cgtgacgaa gctccagtcg agcaccaagc tccgccgcct ccgcgaggcg	840
gcgaagacgg tgacgaagca gatcggcggg caggcgcacg aggtggcggc gaaggtggac	900
gagtacgcgc gcggcatggt gagcgcgctc ggctcgacgc tgttcgagga gctcgggctc	960
tactacatcg gccccgtcga cggccacagc gtcgacgacc tcgtcgccat cttcaacaag	1020
gtgaagtcga tgccggcgcc ggggcccgtg ctctccaca tcgtgacgga gaagggaag	1080
ggctaccgc cggcggaggc cggcccgac cggatgcacg gcgtggtcaa gttgacccg	1140
acgacgggga ggcagttcaa gtccaagtgt tcgacgttgt cctacacca gtacttcgcc	1200
gaggcgctga tccgggaggc cgaggccgac gacaaggtgg tcggcatcca cggcccatg	1260
ggcgcgcgca cggggtcaa ctacttccac aagaggttcc cggagcggtg cttcgacgtg	1320
gggatcgcg agcagcacgc cgtgacgttc gcccgggggc tcgccgccga ggggctcaag	1380
ccgttctgcg ccatctactc gtcgttctg cagcgagggt acgaccaggt ggtgcacgac	1440
gtcgacctgc agcggctgcc ggtgaggttc gccatggaca gggcggggct cgtcggcgcc	1500
gacgggcccc cgcactgcgg cgcgttcgac gtcgcctaca tggcgtgcct gccgaacatg	1560
gtcgtcatgg cggccgccga cgaggccgag ctcatgcaca tggtcgccac cggcgagcc	1620
atcgacgacc gccctagctg ctcccgcttc ccccgcgga atggcattgg cggcgtctc	1680
cctccaacc acaagggcac acctctcgag gtcgggaagg ggagggtgct cgtaggagg	1740
aacagggtgg cgtgctagg gtacggcacg atggtgcagg catgcatgaa ggcggcagag	1800
gcgtgaagg agcacggcat ctacgtcacc gtcgccgacg cgcgttctg caagccgctc	1860
gacacagggc ttatccggga gtcgctgcc gacgacgagg tctcgtcac tgtgaggag	1920
ggctccatcg gagggttcgg ttctcacgtc gccactacc tcagcctcag cggcctctc	1980
gatggcccc tcaagttgag gtccatgttc ttgccagaca ggtacataga ccatggtgca	2040
ccagtagacc agcttgagga ggcaggattg acaccaaggc acattgctgc cactgtgctg	2100
tccttgcttg ggaggccatt ggaggcactt cagctcagct ga	2142