

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0125709 (43) 공개일자 2012년11월19일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) C12N 15/55 (2006.01)	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)	
(21) 출원번호 10-2011-0043312	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2011년05월09일	이상열	
심사청구일자 2011년05월09일	경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 삼환나우빌 101동 1801호 (주약동)	
	정영준	
	경상남도 진주시 향교로109번길 6-2, 3층 (옥봉동)	
	(뒷면에 계속)	
	(74) 대리인	
	김동완	

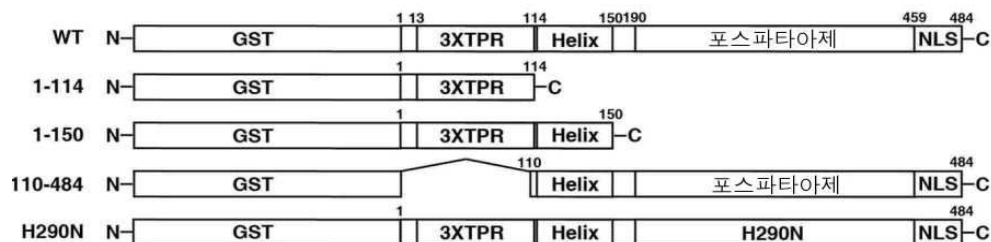
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **A t P P 5 변이 유전자 컨스트럭트를 지닌 열 완충성이 증진된 형질전환 아라비돕시스 식물체**

(57) 요약

본 발명은 AtPP5 변이 유전자 컨스트럭트를 지닌 열 완충성이 증진된 형질전환 아라비돕시스 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5) (AGI Code : At2G42810)의 변이체의 과발현을 통해 열 완충성이 증진되고 분자 샤페론 활성이 유지된 아라비돕시스 형질전환 식물체에 관한 것이다. 또한 상기 아라비돕시스 형질전환 식물체는 고온 충격시 아라비돕시스 탈리아나에서 분리된 세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5) 변이체가 모노머 또는 올리고머 형태의 저분자량 형태에서 고분자량 콤플렉스로 변환되며, 저분자량 형태인 경우 AtPP5는 폴다아제(foldase) 샤페론 및 탈인산화효소 활성을 나타내고 고분자량 콤플렉스 형태인 경우 AtPP5 콤플렉스는 홀다아제(holdase) 샤페론 활성을 나타내어 열 완충성이 증진된 아라비돕시스 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6a



(72) 발명자

박진호

경상남도 진주시 호탄길34번길 5-1 (호탄동)

채호병

경상남도 진주시 서장대로385번길 9 (인사동)

신미림

경상북도 포항시 남구 오천읍 문덕리 부영사랑으로
2차 123동 703호

이균오

경상남도 진주시 내동로348번길 10, 가좌 주공그린
빌아파트 109동 304호 (가좌동)

이선용

경상남도 진주시 호탄길14번길 9, 이룸빌 102호 (호탄동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SSAC-2011

부처명 농촌진흥청

연구사업명 국가핵심연구센터 사업, 차세대 바이오그린 21 사업, 시스템합성농생명공학사업

연구과제명 환경재해내성 유전자 대량발굴 시스템구축

주관기관 경상대학교

연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5) 단백질은 i) 아미노산 잔기 13?110 영역에 3개의 테트라트리카펩티드 리피트(TPR) 도메인; ii) 아미노산 잔기 114?150 영역에 헬릭스; iii) 아미노산 잔기 190?459 영역에 포스파타아제 효소 활성 영역; 및 iv) 아미노산 잔기 459?484 영역에 핵 국소화 시그널(NLS) 영역;을 포함함을 특징으로 하는 서열번호: 1로 표시되는 세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5)에 있어서, 상기 AtPP5 단백질은 고온 충격시 모노머 또는 올리고머 형태의 저분자량 상태에서 고분자량 콤플렉스로 변환되며, 저분자량 형태인 경우 AtPP5는 폴다아제(foldase) 샤페론 및 탈인산화효소 활성을 나타내고 고분자량 콤플렉스 형태인 경우 AtPP5 콤플렉스는 홀다아제(holdase) 샤페론 활성을 나타내어 열 완충성을 지님을 특징으로 하는 AtPP5 단백질

청구항 2

서열번호: 1의 세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5)를 암호화한 cDNA 또는 그의 변이체를 암호화한 cDNA 컨스트럭트를 조립한 후 T-플라스미드 발현 벡터에 삽입하고 이를 아그로박테리움 균주 및 아라비도시스 캘러스와 동시 배양하여 아라비도시스 식물 세포에 상기 AtPP5 단백질 또는 그의 변이체 cDNA 컨스트럭트를 도입하여 형질전환 시킨 후 상기 형질전환된 식물 세포를 성장시켜 제조된 AtPP5 단백질 또는 그의 변이체를 과발현하는 형질전환 아라비도시스 식물체에 있어서, 상기 형질전환 아라비도시스 식물체는 외부 열 충격 완충성을 증진시키고 홀다아제(holdase) 샤페론 및 폴다아제(foldase) 샤페론 기능 및 포스파타아제로서 탈인산화효소 활성을 최대로 증진시킨 AtPP5 단백질 또는 그의 변이체를 과발현하는 형질전환 아라비도시스 식물체

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 AtPP5 단백질의 변이체는 서열번호: 1의 AtPP5 단백질 아미노산 서열 중 아미노산 잔기 110?484로 구성된 단백질 변이체 또는 서열번호: 1의 AtPP5 단백질 아미노산 서열 중 290번 위치의 아미노산 잔기를 히스티딘(H)에서 아스파라긴(N)으로 치환시킨 변이체임을 특징으로 하는 형질전환 아라비도시스 식물체

청구항 4

제 2항 또는 제 3항에 있어서, 상기 외부 열 충격 완충성은 25℃?55℃의 열 충격에 대한 완충성임을 특징으로 하는 형질전환 아라비도시스 식물체

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 AtPP5 변이 유전자 컨스트럭트를 지닌 열 완충성이 증진된 형질전환 아라비도시스 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5) (AGI Code : At2G42810)의 변이체의 과발현을 통해 열 완충성이 증진되고 분자 샤페론 활성이 유지된 아라비도시스 형질전환 식물체에 관한 것이다. 또한 상기 아라비도시스 형질전환 식물체는 고온 충격시 아라비도시스 탈리아나에서 분리된 세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5) 변이체가 모노머 또는 올리고머 형태의 저분자량 상태에서 고분자량 콤플렉스로 변환되며, 저분자량 형태인 경우 AtPP5는 폴다아제(foldase) 샤페론 및 탈인산화효소 활성을 나타내고 고분자량 콤플렉스 형태인 경우 AtPP5 콤플렉스는 홀다아제(holdase) 샤페론 활성을 나타내어 열 완충성이 증진된 아라비도시스 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 식물은 에너지원으로서 태양광을 이용하는 독립영양 고착 생물(sessile organism)이다. 태양광은 그들의 성장과 발달에 영향을 미치는 중요한 환경인자이다. 식물은 고정된 상태이기 때문에 이들은 종종 고온 스트레스를 받으며, 이는 비가역적 손상을 일으킬 수 있다. 증가된 온도에 의해 야기된 막 유동성과 투과성의 변화는 막-연결된 과정에 음성적 영향을 미칠 수 있다. 또한 효소의 기능은 열 충격 스트레스에 의해 손상될 수 있다. 효소의 고온-유도 변성은 완전한 효소 불활성화를 야기할 수 있다. 막과 단백질의 손상은 활성산소(ROS) 생성을 초래하며, 이는 아포토시스와 관련되어 있다. 상기 고온-매개 효과는 지구온난화에 대한 미래 예측을 감안시 특히 중요하다.
- [0003] 식물은 고온 스트레스 극복에 관한 정교한 생리학적 및 생화학적 메커니즘을 지니고 있다. 이 메커니즘은 출엽 방향의 변화, 지질 조성의 변경 및 발산 냉각(transpiration cooling)을 통한 단기 회피 또는 순응을 포함한다. 잠재적인 치사 온도에서 생존하기 위해서 식물은 기초 열 완충성과 고온에서 생존하는 능력인 획득된 열 완충성 모두를 발달시켰으며, 이는 상이한 환경 조건 하에서 막 유동성과 효소 능력 유지를 위한 더욱 일반화된 메커니즘을 나타낸다. 예를 들면 심지어 식물이 서식지에서 성장하고 정상 온도 범위에서 이들은 순응이 없어 치명적일 수 있는 고온과 상온의 주요한 일주 변동에 노출될 수 있다. 열 충격 단백질(HSPs)의 생성은 획득된 열 완충성의 가장 잘-특성화된 측면이다.
- [0004] 매우-보존된 열 충격 단백질(HSPs)이 모든 살아있는 유기체에서 발견되었다. 대부분의 열 충격 단백질은 세포의 샤페론 활성과 연결되어 있었으며, 이는 목적 단백질의 열 스트레스-유도 변성 및 응집 방지에 책임이 있다. 분자 샤페론은 다른 단백질의 비-천연 상태와 상호작용하는 단백질로서 광범위하게 정의될 수 있다. 이 활성은 새로-합성된 폴리펩티드의 폴딩, 멀티-서브 유닛 구조의 조립, 막을 가로질러 트랜스로케인선에 적절한 폴딩되지 않은 상태에서 단백질의 유지, 세포의 신호에 의해 턴 온되는 단백질 불활성 형태의 안정화 및 세포 스트레스 동안 폴딩되지 않은 상태인 단백질의 안정화에 중요하다.
- [0005] 식물에서 많은 세포의 기능은 목표 단백질의 인산화 및 탈인산화에 의해 조절된다. 아라비도시스 단백질 포스파타아제 5(AtPP5)는 세린/트레오닌-특이적 단백질 포스파타아제 군의 일종이며, 이는 광범위하게 분포되며 진핵 생물 중에서 매우 보존된다. 서브 세포의 국소화(localization) 연구는 PP5가 핵과 세포질 모두에 존재한다는 것을 나타낸다. 흥미롭게도 PP5는 PP1 및 PP2A를 포함하는 다른 단백질 포스파타아제와 비교시 특이하게 낮은 포스파타아제 활성을 나타낸다.
- [0006] 패밀리 내의 다른 단백질과는 달리 AtPP5는 C-말단 포스파타아제 도메인과 융합된 N-말단 3개의 테트라트리코펩티드 리피트(TPR) 도메인을 포함한다. 시험관에서 TPR 도메인의 단백질 가수분해의 제거는 포스파타아제 효소 활성의 뚜렷한 증가를 나타내게 하며, 이는 N-말단 영역이 자동-억제 기능을 수행한다는 것을 제안한다. TPR 도메인은 34개의 아미노산 반복체를 포함하며, 이는 단백질-단백질 상호작용에 참여한다. 이 성분(element)의 기능은 명확하지는 않으며, 이는 세포 내에서 특정 지역으로 타겟팅 PP5에 대한 방법(means)을 제공하거나 이는 기질과의 상호작용을 가능케 한다.
- [0007] TPR 도메인을 포함하는 단백질은 여러 가지 세포 주기 조절, 전사 조절, 미토콘드리아와 퍼옥시좀 단백질 이송 및 신호전달(signal transduction)과 같은 생물학적 과정과 관련이 있다. 최근에 PP5가 헬라 세포에서 DNA 손상에 반응한다는 것을 보고되었다. TPR-포함 단백질은 이를 선택적으로 인식하는 것과 비-천연 단백질과 결합하는 것을 가능케 하는 내인성 샤페론 활성을 지닌다. 이 TPR 단백질은 Tom20, p23, SGT1, 40 kDa 이뮤노필린 시클로스포린 A- (CsA) 결합 단백질 (Cyp40), 52 kDa FK506-결합 단백질 (FKBP52), 51 kDa FK506-결합 단백질 (FKBP51) 및 Hsc70-상호작용 단백질 카복실 말단(CHIP)을 포함한다. 최고도-특성화된 TPR 도메인-포함 단백질은 열 충격 단백질(Hsp90) 콤플렉스의 성숙과 관련이 있으며, Hop, p23, SGT1, Cyp40, FKBP52 및 FKBP51를 포함한다. 또한 PP5는 Hsp90과 복합체를 형성하며, 포유류 및 식물 세포에서 FKBP52 및 FKBP51과 유사한 특성을 나타낸다. 따라서 이는 PP5가 분자 샤페론으로서 작용한다는 것을 가능케 한다.

[0008] 본 발명자는 이미 AtPP5가 홀다아제와 폴다아제 활성을 지닌 단백질 포스파타아제와 샤페론으로 작용하는 다기능 단백질이라는 것을 분리 확인하였다. 이 기능은 열 충격-의존 분자량 형태 변화와 밀접하게 관련되어 있다. 열 충격 스트레스를 받으면 아라비도시스 AtPP5는 저분자량 구조에서부터 고분자량 형태까지 전환되며 홀다아제 샤페론 기능은 상당히 증가되며 열 충격 완충성이 달성된다. 이와 같은 아라비도시스 AtPP5 단백질의 열 충격-의존 분자량 형태의 변화와 분자 샤페론 기능은 본 발명자 중 1인인 박진호의 박사학위논문 'Dual functions of Arabidopsis Ser/Thr protein phosphatase 5 as a protein phosphatase and a molecular chaperone'(2008년 간행)에 이미 개시되어있다.

[0009] 따라서 본 발명은 상기 AtPP5 단백질의 구조 분석을 통해 열 충격 저항성을 증진시키고 홀다아제(holdase) 샤페론 및 폴다아제(foldase) 샤페론 기능과 포스파타아제로서 탈인산화효소 활성을 최대로 증진시킨 형질전환 AtPP5 단백질 변이체를 개발하고 상기 단백질을 암호화시킨 cDNA 컨스트럭트를 조립한 후 T-플라스미드 발현 벡터에 삽입하고 이를 아그로박테리움 균주 및 아라비도시스 캘러스와 동시 배양하여 아라비도시스 식물 세포에 상기 AtPP5 단백질 변이체 cDNA 컨스트럭트를 도입하여 형질전환 시킨 후 상기 형질전환된 식물 세포를 성장시켜 제조된 형질전환 아라비도시스 식물체를 제조함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 해결하려는 과제는 열 충격 저항성을 증진시키고 홀다아제(holdase) 샤페론 및 폴다아제(foldase) 샤페론 기능과 포스파타아제로서 탈인산화효소 활성을 최대로 증진시킨 형질전환 AtPP5 단백질 변이체를 개발하고 상기 단백질 변이체를 과발현시키는 아라비도시스 형질전환 식물체를 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 목적은 세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5) 단백질은 i) 아미노산 잔기 13?110 영역에 3개의 테트라트리카펩티드 리프트(TPR) 도메인; ii) 아미노산 잔기 114?150 영역에 헬릭스; iii) 아미노산 잔기 190?459 영역에 포스파타아제 효소 활성 영역; 및 iv) 아미노산 잔기 459?484 영역에 핵 국소화 시그널(NLS) 영역;을 포함함을 특징으로 하는 서열번호: 1로 표시되는 세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5)에 있어서, 상기 AtPP5 단백질은 고온 충격시 모노머 또는 올리고머 형태의 저분자량 형태에서 고분자량 콤플렉스로 변환되며, 저분자량 형태인 경우 AtPP5는 폴다아제(foldase) 샤페론 및 탈인산화효소 활성을 나타내고 고분자량 콤플렉스 형태인 경우 AtPP5 콤플렉스는 홀다아제(holdase) 샤페론 활성을 나타내어 열 완충성을 지님을 특징으로 하는 AtPP5 단백질을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또다른 목적은 서열번호: 1의 세린/트레오닌 단백질 포스파타아제 5(AtPP5)를 암호화한 cDNA 또는 그의 변이체를 암호화한 cDNA 컨스트럭트를 조립한 후 T-플라스미드 발현 벡터에 삽입하고 이를 아그로박테리움 균주 및 아라비도시스 캘러스와 동시 배양하여 아라비도시스 식물 세포에 상기 AtPP5 단백질 또는 그의 변이체 cDNA 컨스트럭트를 도입하여 형질전환 시킨 후 상기 형질전환된 식물 세포를 성장시켜 제조된 AtPP5 단백질 또는 그의 변이체를 과발현하는 형질전환 아라비도시스 식물체에 있어서, 상기 형질전환 아라비도시스 식물체는 외부 열 충격 완충성을 증진시키고 홀다아제(holdase) 샤페론 및 폴다아제(foldase) 샤페론 기능 및 포스파타아제로서 탈인산화효소 활성을 최대로 증진시킨 AtPP5 단백질 또는 그의 변이체를 과발현하는 형질전환 아라비도시스 식물체를 제공하는 것이다.

[0013] 이때 AtPP5 단백질의 변이체는 서열번호: 1의 AtPP5 단백질 아미노산 서열 중 아미노산 잔기 110?484로 구성된 단백질 변이체 또는 서열번호: 1의 AtPP5 단백질 아미노산 서열 중 290번 위치의 아미노산 잔기를 히스티딘(H)에서 아스파라긴(N)으로 치환시킨 변이체임을 특징으로 한다.

[0014] 또한 상기 외부 열 충격 완충성은 25℃?55℃의 열 충격에 대한 완충성임을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 효과는 열 충격 저항성을 증진시키고 홀다아제(holdase) 사페론 및 폴다아제(foldase) 사페론 기능과 포스파타아제로서 탈인산화효소 활성을 최대로 증진시킨 형질전환 AtPP5 단백질 변이체를 개발하고 상기 단백질 변이체를 과발현시키는 아라비도시스 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 시험관 내에서 AtPP5의 열 충격-의존적 올리고머화를 나타낸 것이다.

(A) 자연-PAGE (상부 패널) 및 SDS-PAGE (하부 패널)은 42℃에서 열 충격 전 또는 후에 아라비도시스 세포 현탁액을 분해하기 위해 사용되었다. 열 충격은 나타난 시간 동안 수행되었다. AtPP5는 항-AtPP5 항체를 사용하여 면역 블로팅 분석에 의해 검출되었다.

(B) 아라비도시스 세포 현탁액은 나타난 시간에서 20분 동안 처리되었다. 글루타르알데히드는 상청액 프랙션(최종 농도의 0.05%)으로 첨가되었으며 샘플은 30℃에서 10분 동안 배양되었다. 교차 반응은 샘플 완충용액의 첨가에 의해 중단되었다. 샘플은 13% SDS-PAGE으로 분리되었으며 AtPP5는 항-AtPP5 항체를 사용하여 면역 블로팅 분석이 검출되었다.

(C)는 PP5를 인코딩하는 아라비도시스 게놈 영역으로 T-DNA 삽입을 나타내는 물리적 지도를 나타낸 것이다. 뉴클레오타이드 넘버링은 ATG 개시 코돈으로부터 시작된다. 검은색 박스, 흰색 박스 및 수평선은 각각 엑손, UTR 및 인트론을 나타낸다. UTR 위에 나타난 T-DNA 삽입의 방향은 왼쪽(LB) 및 오른쪽(RB) 경계(border)로 나타내었다.

(D)는 WT, *Atpp5*, *Atpp5*^{OEPP5} 및 *Atpp5*^{OEH290N} (왼쪽)으로부터의 단백질 추출물에서 풍부한 AtPP5를 나타내는 면역 블로팅 분석을 나타낸 것이다. 면역 블로팅은 항-AtPP5 항체를 사용하여 수행되었다. 쿠마시 블루 염색은 각각의 레인에서 로딩되는 동일한 단백질을 확인하기 위해서 사용되었다.

도 2는 크로마토그래피, 전기영동 및 현미경 기술을 사용하여 AtPP5의 올리고머 구조의 분석을 나타낸 것이다.

(A) 크로마토그래피는 Superdex 200 HR 컬럼을 사용하여 실시되었다. 중요한 프랙션은 2개의 그룹으로 나누어졌다(F-I 및 F-II).

(B) (A)에서 각각의 크로마토그래피는 10% 자연-(위의 이미지) 또는 SDS-PAGE(아래의 이미지)에 의해 분리되었으며, 뒤이어 은 염색되었다.

(C), (D)는 AtPP5의 전자 현미경 분석을 나타낸 것이다. (A)에서 F-I 및 F-II는 1% 우라닐 아세테이트로 음성 염색됨으로써 분석되었다. (C)에서 검은색 화살표 및 흰색 화살표는 각각 작은 올리고머 및 구형체의 올리고머를 나타낸다. (D)에서 흰색 및 검은색 화살표는 프랙션 II에서 각각 선형 및 환형 올리고머를 나타낸다. 각각의 클래스를 구성하는 입자의 수는 각 패널의 바닥에 나타내었다. 200 nm 스케일바는 필드에 적용되었고 100 nm 및 20 nm 스케일 바는 각각 평균 이미지(각 필드의 아래에 있는 이미지)에 적용되었다.

(E) 및 (F)는 정제된 재조합 AtPP5 단백질의 동질성(homogeneity)이 전기영동 및 MALDI-TOF 질량 분석기에 의해 확인되었음을 나타낸 것이다.

(E)는 재조합 AtPP5 단백질이 *E. coli*로부터 분리(isolate)되었으며 13% (w/v) SDS-PAGE에 의해 분리(separate)되었음을 나타낸 것이다. 단백질 존재비(abundance)는 쿠마시 블루 염색(왼쪽) 또는 항-AtPP5 항체를 사용하여 면역 블로팅 분석(오른쪽)에 의해 실험되었다.

(F)는 A로부터의 3개의 단백질 밴드가 MALDI-TOF 분석되었음을 나타낸 것이다.

도 3은 재조합 AtPP5는 포스파타아제, 홀다아제 사페론 및 폴다아제 사페론으로 작용하는 다기능을 수행하는 것을 나타낸 것이다.

(A) AtPP5 및 GST의 포스파타아제 활성은 100 μ M 아라키돈산이 있거나(+AA, ■) 없을시(-AA, □) 기질로서 300 mM 파라-니트로페닐포스페이트(pNPP)를 사용하여 측정되었다.

(B)는 AtPP5의 홀다아제 사페론 활성을 나타낸 것이다. 1.8 μ M MDH를 포함하는 샘플은 15분 동안 42°C에서 배양되었다. AtPP5가 상이한 농도로 존재할 때 MDH의 열 응집은 340 nm에서 혼탁도를 측정함으로써 모니터링되었다. AtPP5 대 MDH의 몰 비율은 1: 0.5 (●), 1:1 (◆), 1:2 (▲) 및 1:3 (■)이었다. 음성대조군으로서, 20 μ M GST (△)는 AtPP5 대신에 첨가되었다.

(C)는 AtPP5의 폴다아제 사페론 활성에 관한 것이다. 리폴딩은 다양한 농도의 AtPP5를 포함하는 복원 완충용액에서 변성된 G6PDH (10 μ M)를 희석함으로써 개시되었다. 1 μ M AtPP5 (○), 3 μ M AtPP5 (▲), 5 μ M AtPP5 (◆) 및 자발적 리폴딩 (■). 음성대조군으로, 30 μ M 오브알부민 (○)은 AtPP5 대신에 첨가되었다. 천연 G6PDH의 활성은 100%로 고정되었다.

(D) 및 (E)는 AtPP5 사페론 활성이 기질로서 시트르산 합성효소(CS) 또는 MDH를 사용하여 측정되었음을 나타낸 것이다.

(D)는 1.6 μ M CS의 열 응집은 20분 동안 45°C에서 유도되었음을 나타낸 것이다. 나타낸 응집 커브는 CS 단독 (○), 1:0.25 몰비의 CS:AtPP5 (●), 1:0.5 몰비의 CS:AtPP5 (◆), 1:1 몰비의 CS:AtPP5 (▲) 및 1:2 몰비의 MDH:AtPP5 (■)이다.

(E)는 MDH가 본 명세서에 기술된 바와 같이 6 M 우레아에서 변성되었음을 나타낸 것이다. 리폴딩은 100 mM 포스페이트 완충용액(pH 7.2) 및 다양한 단백질을 포함하는 복원 완충용액에서 MDH를 희석함으로써 개시되었다. AtPP5 (○), *E. coli* Trx (●), 오브알부민 (▲) 및 자발적 리폴딩 (■). 천연 MDH의 활성은 100%로 고정되었다.

도 4는 AtPP5의 상이한 기능이 AtPP5의 올리고머 상태와 관련되어 있다는 것을 나타낸 것이다.

(A) 박테리아에 의해-발현된 AtPP5는 나타낸 온도에서 20분 동안 배양되었다. 처리된 단백질은 크로마토그래피에 의해 분리되었다.

(B) (A)로부터의 단백질 프랙션은 천연- (위의 이미지) 또는 SDS-PAGE (아래의 이미지)에 의해 분리되었고, 뒤이어 은 염색되었다.

(C) AtPP5 소수성에 있어 열 충격-의존적 변화는 비스-ANS 결합을 사용하여 측정되었다. 단백질 샘플은 25°C, 45°C 및 55°C에서 10 μ M 비스-ANS로 열-처리되었다. 비스-ANS 형광의 강도가 측정되었다.

(D) 열-처리 AtPP5의 포스파타아제 (□), 홀다아제 사페론 (■) 및 폴다아제 사페론 (■) 활성이 25°C에서 배양된 AtPP5의 활성과 비교되었다.

도 5는 획득한 열 완충성에 대한 AtPP5의 과발현 효과를 나타낸 것이다. 열 충격 처리 후 5일에 식물의 사진을 찍었다. 각각의 값 아래의 패널은 각각의 열 완충성 테스트에 관한 실험 조건을 나타낸 것이다. 화살표는 침종(seed imbibition)의 끝을 나타낸다.

(A)는 정상 성장 조건을 나타낸 것이다.

(B)는 37°C에서 60분 동안 순응기 후 45°C에서 160분 동안 열 충격 처리된 3일 된 Col-0, Atpp5 및 hot1 묘목의 생존을 나타낸 것이다. 열 충격 처리 후 5일에 식물의 사진을 촬영하였다.

(C) 및 (D)는 AtPP5에 부분적으로 획득된 열 완충성이 변이주를 녹아웃(knock out) 시켰음을 나타낸 것이다. 열 충격 처리에 대응하는 WT, Atpp5 및 hot1 식물의 표현형. 실험 조건은 아래 각 섹션에 도식적으로 나타내었다.

(C)는 정상 성장 조건을 나타낸 것이다.

(D)는 획득된 열 완충성을 나타낸 것이다. 화살표는 침종(seed imbibition)의 끝을 나타낸다,

도 6은 AtPP5의 다양한 형태의 기능적 분석을 나타낸 것이다.

(A)는 재조합 AtPP5의 절단된 버전을 나타내는 개략도이다. 변이주의 이름은 왼쪽에 나타내었다.

(B) (A)에서 묘사된 컨스트럭트는 *E. coli*에서 발현되었으며 친화크로마토그래피에 의해 정제되었다. H290N은 점 치환 변이주를 나타내며 His 잔기는 Asn으로 대체된다. 정제된 AtPP5 단백질은 13% SDS-PAGE에 의해 분리되

며 그 다음에 쿠마시 브릴리언트 블루로 염색되었다. M은 분자 마커를 나타낸다.(첫번째 라인).

(C) 다양한 단백질 컨스트럭트의 포스파타아제 (□), 홀다아제 샤페론 (■) 및 폴다아제 샤페론 (■) 활성은 야생형 AtPP5와 비교되었으며, 이는 100% 활성으로 고정되었다.

도 7은 아라비돕시스 탈리아나 WT(야생형), *Atp5*, *hot1*, *AtPP5*^{OEPP5} 및 *AtPP5*^{OEH290N}의 열 스트레스 반응을 나타낸 것이다. 각각의 값의 아래 패널은 각각의 열 완충성 테스트를 위해 사용된 실험 조건을 나타낸 것이다. 화살표는 침종의 끝을 나타낸다.

(A)는 WT 및 형질전환체 식물에서 기초 열 완충성의 비교를 나타낸 것이다. 왼쪽은 정상 성장 조건을 나타낸 것이다. 오른쪽은 55°C에서 20분 동안 열 충격 처리된 7일 된 묘목의 생존을 나타낸 것이다. 열 충격 처리 후 9일에 식물의 사진을 찍었다.

(B) 토양에서 성장된 식물이 열 충격을 받았다. 왼쪽은 정상 성장 조건을 나타낸 것이다. 오른쪽은 55°C에서 5일 동안 열 충격 처리된 2주 된 식물의 생존을 나타낸 것이다. 열 충격 처리 후 5일에 식물의 사진을 찍었다.

도 8은 AtPP5의 열-유도 구조 및 기능적 변화에 관한 종합적 모델을 나타낸 것이다. 정상 조건 하에서 AtPP5는 저분자량 단백질류로서 대부분 존재하며 포스파타아제 및 폴다아제 샤페론으로서 작용한다. 그러나 식물이 열 스트레스에 노출되었을 때, AtPP5는 고분자량 콤플렉스로 전환되고 포스파타아제 및 폴다아제 샤페론에서부터 홀다아제 샤페론까지로 AtPP5의 기능을 변화시킨다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 고온 스트레스는 식물의 모든 성장 단계에 영향을 미치며, 이는 항상성을 유지하고 온도 범위 내에서 생존하는 광범위한 세포 반응과 관련되어 있다. 본 발명은 아라비돕시스 단백질 세린/트레오닌 포스파타아제 5(AtPP5)가 열 스트레스에 대한 저항성 두 가지 가역적 역할을 한다는 것이다.
- [0018] AtPP5의 고분자량 형태가 열-처리된 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 현탁 세포로부터 분리되었다. AtPP5는 다양한 기능을 나타내며, 단백질 포스파타아제, 폴다아제(foldase) 샤페론 및 홀다아제 샤페론으로 작용한다. 이 다용도 단백질의 효소 활성은 낮은 올리고머 단백질류에서부터 고분자량 콤플렉스까지의 범위에 있는 올리고머 상태와 밀접하게 관련되어 있다.
- [0019] AtPP5의 포스파타아제 및 폴다아제 샤페론 기능은 저분자량 형태에서 나타나며, 반면에 고분자량 형태에서는 홀다아제 샤페론 활성을 나타낸다. AtPP5의 형질전환체 과발현은 야생형 아라비돕시스에 증진된 열 충격 저항성을 부여하였으며, T-DNA 삽입 녹-아웃 변이체는 요구되는 열 완충성에 대해 결함이 있었다.
- [0020] 재조합 포스파타아제 변이체(H290N)는 현저하게 증가된 홀다아제 샤페론 활성을 나타냈다. 더욱이 증진된 열 저항성은 형질전환체 식물 과발현 H290N에서 관찰되었으며, 이는 AtPP5의 홀다아제 샤페론 활성이 AtPP5-매개 열 완충성에 대해 기인한다는 것을 제안한다.
- [0021] 따라서 본 발명은 열 충격 저항성을 증진시키고 홀다아제(holdase) 샤페론 및 폴다아제(foldase) 샤페론 기능과 포스파타아제로서 탈인산화효소 활성을 최대로 증진시킨 형질전환 AtPP5 단백질 변이체를 개발하고 상기 단백질 변이체를 과발현시키는 아라비돕시스 형질전환 식물체를 개발한 것이다.
- [0022] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0023] 올리고머 상태에서 AtPP5의 분리 및 열 충격 처리의 효과

- [0024] 이 시험의 목적은 열 충격 스트레스 후에 분자량 형태 변화를 통해 식물에 열 완충성을 부여하는 단백질을 분리하고 특성화하는 것이다. 열-처리 아라비돕시스 세포 배양 현탁액은 크기배제크로마토그래피(SEC) 및 매트릭스-관련 레이저 이탈 이온화 타임-오프-플라이트(MALDI-TOF) 분석을 이용하여 조사되었다. 후보 단백질 세린/트레오닌 단백질 포스포타아제 5(AtPP5)가 확인되었다. AtPP5의 올리고머화 상태가 열-유도 입체형태의 변화를 겪는지 확인하기 위해서 조사되었다(도 1).
- [0025] 식물 세포는 다양한 시간 동안 42℃에서 열 충격을 받았으며, AtPP5의 올리고머 상태는 천연 및 SDS-PAGE 겔에서 AtPP5와 특이적으로 반응하는 항-AtPP5 항체와 면역 블로팅에 의해 분석되었다(도 1D). 자연-PAGE 겔 상에서, 대부분의 처리되지 않은 AtPP5는 모노머로서 관찰되었다; 그러나 열 처리 10부 후, AtPP5의 관찰된 분자량은 AtPP5 트리머 형태와 일치하였다(도 1A, 상부 패널).
- [0026] 시간이 경과하면 AtPP5는 계속해서 고분자량 콤플렉스를 형성할 것이며 열 처리 한 시간 후, 단백질 대부분은 150 kDa 이상의 콤플렉스로 존재할 것이다. SDS-PAGE 겔 상에서 AtPP5는 예상되는 분자량 즉 AtPP5 모노머(54 kDa)로 이동되었다(도 1B, 하부 패널). AtPP5의 열-유도 구조적 이동은 글루타르알데히드 가교(cross-linking)를 사용하여 증명되었고, 뒤이어 항-AtPP5 항체로 SDS-PAGE 및 면역 블로팅이 실시되었다(도 1B). 정상 조건(25℃) 하에서 AtPP5는 모노머 및 트리머 형태로 대부분 발견되었다. 이 단백질의 배열 프로파일의 중요한 차이점이 정상 조건에서 성장된 세포 추출물과 40℃까지 열 처리된 세포 추출물 사이에서 관찰되지는 않았다(자료에 나타내지는 않았음).
- [0027] 그러나 AtPP5의 고분자량 형태는 열 충격 조건에 노출된 세포로부터의 단백질 추출물에서 검출되었다(즉 20분 동안 45, 50 또는 55℃). 이는 홀다아제 사페론 활성이 일반적으로 42℃에서 측정된다는 사실과 일치한다. 증가된 온도에서 관찰된 고분자량 형태의 증가에 비례하는 모노머 AtPP5의 수반되는 감소가 있다.
- [0028] 재조합 AtPP5은 명백한 올리고머화 형태를 생성한다.
- [0029] 열-처리 아라비돕시스 세포 배양 현탁액에서 호모-폴리머 형태가 열 충격을 받았을 때 AtPP5의 고분자량 형태는 입체 형태의 변화를 통해 일어날 것 같다. 하지만 열 충격은 변성된 단백질을 포함하는 추가 세포 단백질을 포함하는 큰 단백질 콤플렉스의 형성을 유도한다. AtPP5의 호모-폴리머 형성 여부를 측정하기 위해서, 재조합 AtPP5가 박테리아에서 발현되었으며 그 다음에 균질하게 정제되었다(도 2E, 및 F). SEC는 모노머, 다이머, 올리고머 및 고분자량 콤플렉스를 포함하는 프랙션으로 AtPP5를 분리하기 위해서 사용되었다(도 2A). 올리고머화 상태는 자연 PAGE를 사용하여 조사되었으며, 뒤이어 은 염색이 실시되었다(도 2B, 상부 패널). 자연 PAGE 상에서 재조합 AtPP5가 100 및 700 kDa 사이에서 관찰되었으며, 반면에 SDS-PAGE 상에서 프랙션이 54 kDa 분자량을 지닌 단일 단백질 밴드로서 이동했다(도 2B, 하부 패널).
- [0030] 투과전자현미경은 SEC에 의해 분리된 피크 프랙션에서 올리고머 구조를 분석하기 위해 사용되었다(도 2C, 2D). 음성 염색에 뒤이어 단일 입자 이미지 프로세싱(single particle image processing)으로 AtPP5의 다르게 올리고머화된 형태의 존재를 확인하였다(도 2C). 회전 및 병진 정렬은 F-I에서 관찰된 공 모양의 고분자량 콤플렉스가 고유벡터-고유치 자료를 기초로 하여 6 그룹으로 분류될 수 있다는 것을 나타낸다(도 2C, 하부 패널). 이 올리고머에 대해 처리된 이미지는 36~75 nm의 범위에 있는 평균 직경을 나타낸다(도 2C, 상부 패널). 도 2C의 검은색 화살표는 올리고머 AtPP5를 나타낸다.
- [0031] 선형 및 환형(각각 흰색 및 검은색 화살표)의 두 개의 단백질 구조는 F-II 프랙션에서 획득되었다. 단일 입자 이미지 프로세싱은 환형 분자의 구조적 특성을 측정하였다(도 2D, 하부 패널). 다양한 올리고머는 헵타머릭 상태로 다이머에 존재하며 전반적으로 구조 및 중심강(central cavity)의 크기는 더 많은 분자 연결부위(join) 집합체를 증가시킨다. 헵타머 상태에서 전반적으로 구조 및 중심강은 각각 직경이 약 16 및 6 nm 이다. 헵타머 올

리고머의 직경은 선형 올리고머의 폭과 비슷하게 보인다(도 2D, 흰색 화살표). 이 발견은 선형 올리고머가 환형 올리고머로부터 연장된다는 것을 제안한다.

[0032] 종합해 보면 크로마토그래피 (도 2A) 및 자연-PAGE (도 2B)의 결과는 AtPP5가 다양한 분자 크기의 올리고머를 형성한다는 것을 증명하며 이 발견은 구조 분석에 의해 확인되었으며, 이는 다양한 올리고머 형태의 존재를 나타낸다.

[0033] AtPP5는 단백질 포스파타아제 및 분자 샤페론으로 작용하는 다양한 기능을 지닌다.

[0034] 단백질 포스파타아제로 작용하는 AtPP5의 능력은 기질로서 p-니트로페닐포스페이트(pNPP)를 사용하여 조사되었다. 예상된 바와 같이 AtPP5의 포스파타아제 활성은 글루타치온- S-트랜스퍼라아제(GST)인 대조군 단백질의 활성보다 상당히 더 높았다(도 3A). PP5 동족체의 흥미로운 효소 특성은 이 단백질이 고도불포화된 긴사슬 지방산 또는 아라키돈산에 의해 활성화된다는 것이다 (Chen and Cohen, 1997; Sinclair et al., 1999; Chinkers, 2001). 예상된 바와 같이 AtPP5 활성은 100 μ M 아라키돈산의 첨가에 의해 2.5 $\pm$ 3 배정도 활성화되었다.

[0035] 이전에 본 발명자들은 cPrxI 단백질의 올리고머화가 증진된 홀다아제 샤페론 활성을 초래한다는 것과 열-안정 고분자량 콤플렉스 형성이 홀다아제 샤페론의 잘-보존된 특징이라는 것을 보고하였다. PP5는 FKBP52, FKBP52 및 Cyp40과 같은 결합 TPR-포함 단백질로 알려진 분자 샤페론인 Hsp90과 상호작용한다. Hsp-관련된 TPR-포함 단백질은 FKBP52, p23, Cyp40 및 CHIP을 포함하며, 이들 모두는 선택적인 인식과 비-천연 단백질의 결합이 가능한 고유한 샤페론 활성을 지닌다. 더욱이 PP5는 포유류, 효모 및 식물 세포에서 FKBP52 및 FKBP51과 유사한 특성을 나타낸다.

[0036] AtPP5가 샤페론 활성을 지니는지 여부를 측정하기 위해서, 본 발명자들은 기질, 말산탈수소효소(MDH)의 열 응집을 억제하는 AtPP5의 능력을 조사하였다(도 3B). 반응은 기질의 응집 동안 광 산란 측정에 의해 모니터링되었다. MDH는 AtPP5의 각각 다른 농도의 존재시 42°C에서 배양되었다. 기질의 열 응집은 AtPP5의 증가한 농도와 함께 감소되었으며, 응집은 MDH 대 AtPP5의 1:3 몰비율에서 완전히 방지되었다. 홀다아제 샤페론 활성은 AtPP5 대신에 GST가 음성 대조군으로서 반응 매트릭스에 첨가되었을 때는 검출되지 않았다.

[0037] 리폴딩 에세이는 AtPP5가 폴다아제 샤페론으로서 작용할 수 있는지 여부를 측정하기 위해 우레아-변성된 글루코 오스-6-포스페이트 탈수소효소(G6PDH)를 사용하여 수행되었다(도 3C). 처리되지 않은 대조군 조건 하에서, 자발적인 리폴딩은 약 8%의 G6PDH에서 일어났으며 반면에 리폴딩 효율은 AtPP5의 농도가 증가하였을 때 매우 증가하였다. 중요한 리폴딩은 GroEL의 존재시 관찰되었으며, 이는 양성 대조군으로서 사용되었다. 폴다아제 샤페론 활성은 AtPP5 대신에 오브알부민이 음성 대조군으로서 반응 매트릭스에 첨가되었을 때는 검출되지 않았다. 이 발견은 AtPP5가 다 효소 기능을 수행한다는 것을 제안한다.

[0038] 시트르산 합성효소(CS) 및 MDH가 각각 홀다아제 및 폴다아제 샤페론 활성을 위해 기질로서 사용될 때 비슷한 결과가 관찰되기 때문에 AtPP5가 다양한 단백질을 보호하는 것 같다(도 3D, E). 따라서 단백질 포스파타아제로서 작용하는 것에 더하여, AtPP5는 기질 단백질의 열 응집을 방지하기 위해서 홀다아제 샤페론으로서 작용할 수 있고 화학적 변성 후에 단백질 리폴딩을 증가시키기 위해서 폴다아제 샤페론으로서 작용할 수 있다.

[0039] AtPP5의 효소 활성은 특이적 올리고머 상태와 관련된다.

[0040] 재조합 AtPP5는 올리고머 구조와 이 다목적 단백질의 기능 사이의 관계를 분석하기 위해 균질하게 정제되었다.

sHSP 및 cPrxI와 비슷하게 재조합 AtPP5에 의해 형성된 단백질 구조는 열 충격에 대응하여 매우 변화였다. SEC-분리 프랙션에서 풍부한 AtPP5는 증가한 배양 온도를 지닌 증가된 고분자량 단백질 콤플렉스에서 존재하며, 저분자량 단백질 콤플렉스에서는 수반되는 감소가 관찰되었다(도 4A). 자연-PAGE 분리의 은 염색은 열 충격이 고분자량 콤플렉스에 입체형태의 변화를 촉발시킨다는 것을 확인하였다(도 4B). 예상된 바와 같이 SDS-PAGE은 모든 프랙션에서 54 kDa 분자량을 지니는 단일 단백질 밴드를 밝혔다(도 4B, 하부 패널).

[0041] 이 결과는 열 충격 처리가 고분자량 콤플렉스로 저분자량 AtPP5 단백질의 조립을 유도한다는 것을 제안한다. 이 입체형태의 변화는 4,4'-디아닐리노-1,1'-비나프틸-5,5'-디술포산 (비스-ANS) 및 AtPP5 사이의 결합 친화력을 사용하여 조사되었다(도 4C). 비스-ANS 형광의 강도는 증가된 온도에서 증가되었으며, 이는 이 온도가 AtPP5에서 소수성 패치의 증가된 노출을 야기시킨다는 것을 나타낸다.

[0042] 구조적 변화에 더하여, 열 충격은 AtPP5의 홀다아제 사페론 활성을 매우 증가시켰다(도 4D). 25°C?55°C로의 배양 온도의 변화는 AtPP5 홀다아제 사페론 활성의 3배 정도의 증가를 야기시켰다. 대조적으로 AtPP5의 포스파타아제 및 폴다아제 활성은 증가한 온도에서 급격하게 감소하였다. 25°C에서 처리된 프랙션과 비교하면, 45°C 및 55°C에서 처리된 프랙션은 각각 50% 및 30%의 포스파타아제 활성을 나타내었다. 무시해도 될 정도의 폴다아제 사페론 활성이 55°C에서 처리된 프랙션에서 검출되었다. 저분자량 AtPP5가 25°C 처리에서 관찰된 지배적인 형태이며, 고분자량 단백질 콤플렉스는 45 및 55°C 처리에서 가장 풍부하다는 점에서, AtPP5의 상이한 기능은 시험관에서 열-유도 구조적 변화와 밀접하게 관련되어 있다고 예상된다.

[0043] AtPP5는 아라비도시스에서 획득한 열 완충성에 있어 중요한 역할을 한다.

[0044] AtPP5가 열 충격 스트레스 동안 역할을 하는 생물학적 역할을 연구하기 위해서, 본 발명자들은 AtPP5의 UTR 지역(At2g42820)에서 T-DNA 삽입을 운반하는 아라비도시스 동형접합 돌연변이 라인(SALK-021153)을 분리하고 특성화하였다.

[0045] 이 AtPP5 null 변이주는 AtPP5 단백질을 합성하지는 않는다. 열 완충성 에세이는 AtPP5가 열 충격 조건 하에서 묘목(seedling) 생존을 위해 요구되는지 여부를 알아내기 위하여 실시되었다. 양성 대조군으로서, 본 발명자들은 아라비도시스 HSP101, hot1의 T-DNA 녹-아웃 변이주를 사용하였으며, 이는 기저 및 획득한 열 완충성 모두를 위해 요구된다. HSP101 발현의 랙(lack)은 중요한 열 충격-유도 손상을 일으킬 수 있으며, 이는 단기 및 장기 회복기동안 관찰될 수 있다. 고체 한천 배지에서 성장한 3일 된 아라비도시스 묘목은 60분 동안 37°C에서 배양되었으며, 22°C에서 120분 동안 회복되었으며 그 다음에 상이한 시간 동안 45°C에서 열 충격을 받았다. 순응 처리는 WT, AtPP5 및 hot1 라인에서 증진된 저항성을 비슷한 수준으로 이끌었다. 그러나 140분까지 열 처리 후 WT, AtPP5의 그 다음 성장률과 hot1 사이에 거의 차이가 없었지만 AtPP5는 WT 식물보다 열 스트레스에 더욱 민감하였다(도 5C, D). 더욱이 열 충격기가 160분으로 연장되었을 때 AtPP5 및 hot1 변이주 라인은 획득한 열 완충성을 완전히 잃었다(도 5). 대부분의 변이주 묘목은 표백되었고 그 다음에 5일 이내에 죽었다. 대조적으로 대부분의 WT 식물은 녹색으로 남았고 실험 내내 계속 성장하였다. 종합해 보면, 이 관찰은 AtPP5가 획득한 열 완충성에 있어 중요한 역할을 한다는 것을 제안한다.

[0046] AtPP5의 사페론 기능은 아라비도시스에서 열 완충성을 증진시킨다.

[0047] 다양한 컨스트럭트가 AtPP5의 효소 활성을 담당하는 기능적 도메인을 연구하기 위해 사용되었다(도 6A). *E. coli*의 재조합 단백질의 발현 후(도 6B), 각 변이주의 효소 활성이 측정되었다(도 6C).

[0048] 아미노산 1-114 및 1-150을 포함하는 변이주 단백질은 포스파타아제 도메인이 없었으며 WT 단백질과 비교시

~30% 감소된 홀다아제 샤페론 활성을 나타냈다. 더욱이 포스파타아제 및 폴다아제 샤페론 활성을 완전히 잃었다. 이 발견은 포스파타아제 도메인이 AtPP5의 포스파타아제 및 폴다아제 샤페론 활성 모두를 담당한다는 것을 제안한다. 또한 이것은 이 도메인의 존재는 완전히 활성화된 AtPP5의 홀다아제 샤페론 기능을 요구로 한다는 것을 나타낸다.

[0049] TPR 도메인(110-484)의 제거는 WT 단백질과 비교시 포스파타아제 및 홀다아제 샤페론 활성을 각각 50% 및 20% 정도 증가시킨다. 따라서 포스파타아제 도메인은 AtPP5의 홀다아제 샤페론 기능에 중요한 역할을 하며 TPR-도메인은 포스파타아제 활성화에 대하여 자동-억제 역할을 수행한다. 이 발견은 포스파타아제 도메인이 TPR 도메인보다 상대적으로 높은 소수성을 나타낸다는 사실을 따른다(자료에 나타내지는 않았음).

[0050] 포스파타아제 변이주 H290N이 AtPP5의 샤페론 기능에 관한 포스파타아제 활성화의 효과를 테스트하기 위해서 제조되었다. H290N은 His 290는 Ans에 의해 대체된 변이주이며, AtPP5의 촉매 영역의 이 돌연변이는 매우 감소된 포스파타아제 활성을 초래한다. H290N 변이주는 WT 보다 3배정도 더 높은 홀다아제 샤페론 활성을 나타냈으며, 이는 홀다아제 샤페론 활성이 AtPP5의 포스파타아제 활성화의 제거에 의해 높아질 수 있다는 것을 나타낸다. 예상된 바와 같이 H290N는 검출 가능한 포스파타아제 활성을 나타내지 않는다.

[0051] AtPP5가 열 충격 저항성의 역할을 하는 생리학적 역할을 조사하기 위해서, 본 발명자들은 과발현된 WT(Atp5^{OEPP5})의 형질전환 Atp5 식물체 또는 AtPP5의 H290N 변이주(Atp5^{OEH290N}) 형질전환 Atp5 식물체를 만들었다. 면역 블로팅 분석이 WT, AtPP5 및 2개의 형질전환체 과발현 라인에서 AtPP5 발현을 연구하기 위해서 사용되었다. 정상 조건에서 성장되었을 때, 발아시간 및 성장률에 있어서 확실한 표현형 차이는 WT, AtPP5, AtPP5^{OEPP5}, AtPP5^{OEH290N} 또는 hot1 사이에서 검출되지는 않았다(도 7A 및 자료에는 나타내지 않음). 이 발견은 AtPP5가 정상 성장 및 발달과 관련되어 있지 않다는 것을 제안한다. AtPP5는 장일 조건 하에서 초기 개화 표현형을 나타낸다; 하지만 이 표현형은 다른 곳에서 기술될 것이다.

[0052] 기초 열 완충성 테스트에 있어서 7일 된 묘목이 20 분 동안 55℃에 노출되었으며, 그 다음에 22℃에서 회복되었다. 도 7A에 나타난바와 같이, AtPP5^{OEPP5} 및 AtPP5^{OEH290N} 과발현 라인은 치명적인 열 스트레스에서 생존했다. 비록 이 라인들이 열 충격 후 약간의 성장 지연을 나타냈더라도 대부분의 묘목은 녹색으로 되돌아갔고 회복기 후 성장을 재개하였다. 열 완충성에 있어 AtPP5의 기능성을 확인하기 위해서, 식물은 24일 동안 토양에서 성장되었으며 그 다음에 열 충격 스트레스를 받았다(도 7B). 5일 동안 37℃에서 열 스트레스를 받은 후, 식물은 5일 동안 최적 성장 조건(22℃)으로 되돌아갔다. 예상된 바와 같이 심각한 손상이 WT 및 AtPP5 식물에서 관찰되었으며, 열 처리 후 대부분의 묘목은 죽었다.

[0053] 대조적으로 AtPP5^{OEPP5} 및 AtPP5^{OEH290N} 라인은 WT보다 더 높은 열 완충성을 나타냈으며 포스파타아제 활성화의 존재 또는 부재와 상관없이 대부분의 묘목 생존을 나타냈다(도 7B). 그 외의 확실한 생화학적 차이는 테스트된 식물 중에서는 관찰되지 않았다. 이 결과는 활성 포스파타아제 도메인은 열 완충성을 요구로 하지 않는 반면에 AtPP5의 홀다아제 샤페론 기능은 아라비도시스의 열 스트레스 저항성에 관해서 중요하다는 것을 제안한다.

[0054] 식물은 고작 생물이기 때문에, 일주기 온도 변동에 대한 열 완충성 및 빠른 적응은 이들의 생존을 위해 특히 중요한 것 같다. 모든 살아있는 유기체는 분자 샤페론을 이용하며 이들은 열 충격 반응에 있어서 중요한 역할을 한다; 그러나 샤페론이 고등식물에 열 완충성을 부여한다는 메커니즘은 여전히 잘 이해되지 않은 채 남아있다. 따라서 본 연구의 첫 번째 목적은 열 충격 처리에 대응하여 고분자량 콤플렉스를 형성하는 단백질에 관한 아라비도시스 세포 현탁액을 스크리닝하는 것이었다.

- [0055] 고분자량 콤플렉스 구조를 형성하는 열-안정 단백질로 아라비도시스 단백질 포스파타아제 5의 확인은 다양한 생화학적 분석에 의해 확인되었다(도 1, 2 및 4). 체내 고분자량 AtPP5 콤플렉스의 형성은 AtPP5-특이적 항체를 이용한 면역 블로팅 분석에 의해 확인되었다(도 1, 2 및 4). 또한 고순도(highly-purified) 재조합 AtPP5 단백질의 SEC 및 EM 분석은 시험관 내 고분자량 콤플렉스 형성을 증명하였다(도 2). 더욱이 AtPP5의 홀다아제 샤페론 활성은 아라비도시스tm의 열 충격 저항성 대응에 있어 중심적 역할을 한다는 것을 나타내었다(도 5 및 7).
- [0056] AtPP5의 상이한 기능은 저분자량에서부터 고분자량 콤플렉스까지 열 충격-유도 변화 동안 일어나는 분리된-크기(discretely-sized)의 호모-올리고머 상태와 관련되어 있다(도 4). 본 연구의 결과는 AtPP5가 열 스트레스 조건 동안 포스파타아제 및 분자 샤페론으로서 작용할 수 있다는 것을 나타내는 종합적 모델(도 8)로 요약할 수 있다. 정상 조건 하에서, AtPP5는 특이적 기질의 인산화반응 상태를 조절한다. 그러나 열 스트레스에 대응하여, AtPP5는 고분자량 콤플렉스 형성에 의해 홀다아제 샤페론으로서 작용한다. 그 다음에 AtPP5의 폴다아제 샤페론 기능은 후-열 스트레스기 동안 기능상-활성 분자의 재생을 가능하게 한다.
- [0057] 과거에는 AtPP5가 다른 단백질 포스파타아제와 비교시 낮은 포스파타아제 활성을 나타내기 때문에 AtPP5가 광범위하게 연구되지는 않았다. 비록 TPR 도메인의 결손이 AtPP5의 포스파타아제 활성을 증가시킬지라도(도 6C), 이 낮은 수준의 활성은 고등식물에서 AtPP5에 의해 역할을 하는 생리학적 역할을 명확하게 하는 것을 어렵게 만들었다. AtPP5(PAPP5라고도 불림)는 탈인산 생화학적-활성 Pfr-피토크롬 A(PhyA)를 나타냈고 피토크롬-매개 광응답(photoresponse)을 증진시켰다. 피토크롬 분자는 적외선 및 원적외선 광 정보를 감지하였다. PhyA의 AtPP5-매개 탈인산은 PhyA-안정성 및 다운스트림 신호 변환기(transducer) NDPK2에 관한 친화력을 증가시킨다. 이 결과는 AtPP5가 피토크롬 안정성 조절에 관한 생화학적 조절자로서 작용한다는 것을 제안한다. 그러나 상기의 발견이 본 연구의 문맥 내에서 고려될 때 AtPP5의 샤페론 기능이 PhyA 안정성에 있어서 역할을 하며, 이는 다운스트림 변환기에 관한 증가된 친화력을 초래한다는 가설이 가능하다. 근본적으로 본 연구는 왜 AtPP5가 낮은 포스파타아제 활성을 나타내는지에 관한 이해에 대한 단서를 제공하며 AtPP5가 이 단백질 포스파타아제 군의 다른 많은 막에서는 관찰되지 않는 특이적 기능을 수행하는 것 즉 기능상-중요한 호스트 구성요소를 안정화시킨다는 것을 나타낸다.
- [0058] AtPP5는 sHSP, 2-Cys peroxiredoxins (Prxs) 및 AtTDX에 관한 유사한 구조적 특성을 나타내며, 이는 열 충격에 대응하여 저분자량에서부터 고분자량까지 콤플렉스의 입체형태를 변화시킨다. FKBP52, FKBP51, p23, SGT1 및 CHIP와 같은 몇몇의 TPR 도메인-포함 단백질은 비-천연 단백질과 선택적 결합을 가능케 하는 고유한 샤페론 활성을 지님을 나타낸다. 이 단백질과 PP5 사이의 분명한 유사성이 주어질 때 많은 연구원들은 PP5가 샤페론으로 작용할 것이라는 가설을 세웠다. 그러나 이 활성은 시험관 내 분석 시스템 표준으로는 검출되지 않았다. 망간이 AtPP5-매개 기질 보호를 억제하고 AtPP5 샤페론 활성을 확인하는 이전의 문제점은 재조합 단백질 합성 후 망간의 고 농도 잔기 수준으로부터 일어나는 것이 가능하다.
- [0059] 회복 단계 동안, 열 충격에 대한 더 우수한 저항성이 WT 또는 *Atpp5*보다 형질전환체 아라비도시스 식물 과발현 AtPP5에서 관찰되었다(도 7). 이 증진된 열 충격 저항성은 아마도 AtPP5와 부분적으로-변성된 세포 단백질과 회복기 동안 이러한 구성요소의 리폴딩 사이의 안정한 단백질 콤플렉스의 열 스트레스-유도 형성 때문이다. 비슷한 상황이 효모 HSP104을 이용하여 관찰되었으며 이는 열-불활성, 불용성 단백질 집합체(aggregate)의 매개 재가용화(resolubilization)에 의해 고온에서 세포 생존을 개선시킨다. 샤페론 활성이 다른 유기체로부터 PP5 단백질에 공통인지 여부를 측정하기 위해, 본 발명자들은 ScPPT1, AtPP5의 효모 상동성을 연구하였다. 그러나 ScPPT1는 모델 단백질 기질 MDH의 열 응집을 억제하지 않으며(자료에는 나타나지 않음), 따라서 효모에서 샤페론의 기능과 관련되어 있지 않다. 진화론적 관점으로부터 이 발견은 식물에서의 열 스트레스 대응과 다른 유기체에서의 열 스트레스 대응 사이에는 질적인 차이가 있다는 것을 명확하게 나타낸다 (Waters, 2003).
- [0060] 결론적으로 본 연구는 아라비도시스 단백질 세린/트레오닌 포스파타아제 AtPP5에 관한 새로운 기능을 밝혀냈으며, 많은 다른 생리학적 역할을 수행한다는 것을 확인하였다. AtPP5의 샤페론 기능은 열 충격에 의해 증가되기

때문에, 이 단백질은 세포 스트레스 동안 부가적인 역할을 하는 것 같다. AtPP5의 샤페론 기능이 열 충격 동안 변성으로부터 중요한 세포 거대분자(macromolecule)를 보호하기 위해 사용된다는 것과 이 활성이 스트레스 조건에 대하여 식물 반응(plant response)을 촉진시킨다는 것을 제안할 수 있다. 다기능 단백질에 의해 수행되는 역할의 이해 증가에 덧붙여, 더욱이 AtPP5의 연구는 AtPP5가 아직 밝혀지지 않은 생물학적 기능을 수행한다는 것을 근본적으로 나타낸다.

[0061] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다.

[0062] 물질

[0063] Porcine heart mitochondrial MDH, 파라-니트로페닐포스페이트(pNPP), CS 및 비스-ANS는 시그마로부터 구입되었다. 음성 전기영동 및 겔 여과, 오브알부민 및 FPLC(fast performance liquid chromatography) 컬럼 Superdex 200HR 10/30에 대한 분자량 마커는 Amersham Biosciences (Uppsala, 스웨덴)로부터 구입하였다. 다양한 제한 효소는 Boehringer Mannheim(Mannheim, 독일)으로부터 구입되었다.

[0064] (실시예 1) 아라비돕시스 세포 현탁액으로부터 열 안정 단백질의 고-올리고머 형태의 분리

[0065] 아라비돕시스 탈리아나 L. Heynh, ecotype 콜롬비아 세포는 현탁액에서 성장되었다. 세포는 30분 동안 50℃에서 열-처리되었으며 그 다음에 시토줄 추출물은 15분 동안 134,600 g에서 초원심분리법에 의해 준비되었다(Beckman, TLS-55 rotor). 상청액은 Superdex 200 HR 10/30 컬럼을 사용하여 SEC되었다. SEC 공극 부피로부터 용출된 고분자량 콤플렉스가 수집되었고 이전에 기술된 바와 같이 2-D PAGE 및 MALDI-TOF 기술에 의해 확인되었다.

[0066] (실시예 2) *E. coli*에서 AtPP5의 클로닝 및 재조합 단백질 발현

[0067] AtPP5를 인코딩하는 DNA 서열은 아라비돕시스 cDNA 라이브러리로부터 PCR에 의해 증폭되었다. AtPP5 F 프라이머는 *Bam*HI 자리와 시작 코돈 모두를 포함하였다. AtPP5 R 프라이머는 *Sa*II 자리와 정지 코돈 모두를 포함하였다. 본 실험에서 사용된 프라이머는 표 1에 실렸다. N- 또는 C- 말단 절단된(truncated) AtPP5 변이주를 인코딩하는 DNA 서열은 pGEX-AtPP5로부터 증폭되었다.

[0068] 아미노산 잔기 1?114, 1?150 및 110?484를 인코딩하는 절단된 변이주는 다음의 프라이머를 사용하여 증폭되었다: 각각 AtPP5 F 및 114 R; AtPP5 F 및 150 R; 및 AtPP5 110 F 및 AtPP5 R. 정방향(F) 프라이머는 *Bam*HI 자리 및 개시 코돈을 포함하며, 역방향(R) 프라이머는 *Sa*II 자리 및 정지 코돈을 포함한다. PCR 생성물 모두는 pGEM-T Easy 벡터(Promega Co., Madison, USA)로 서브-클론되었다. 각각의 삽입은 *Bam*HI 및 *Sa*II와 함께 분해(digest)되었으며 그 다음에 *E. coli*에서 재조합 발현에 대한 pGEX의 상보적 위치로 결합(ligate)되었다. 과잉 망간은 PD-10(GE Healthcare, Piscataway, NJ)을 사용하여 제거되었으며 완충용액 A (50 mM 포타슘 포스페이트[pH 8.0] 및 300 mM NaCl)를 지닌 컬럼을 탈염시켰다. 모든 컨스트럭트는 뉴클레오타이드 시퀀싱에 의해 확인되었다. 표 1은 본 발명에서 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 나타낸 것이다.

【표 1】

프라이머	서열(5' → 3')
AtPP5 전방	5'-GGATCCATGGAGACCAAGAATGAGAATTCT-3' : 서열번호 2
AtPP5 역방	5'-GTCGACTTAGTTGAACATCCTGAGAAAGTTGTTT-3' : 서열번호 3
114 역방	5'-GTCGACTTAGTTGAACATCCTGAGAAAGTTGTTT-3' : 서열번호 4
150 역방	5'-GTCGACGGACTCAGCTACTGAACGCC-3' : 서열번호 5
110 전방	5'-GGATCCCTTTTCTCCTAATGACCCTGATG-3' : 서열번호 6
AtPP5 UTR 전방	5'-AATCTAATCTAGGGTTTCTAGTCACTGAAGCTTCTCTAAA-3' : 서열번호 7
LBb1	5'-GGATCCATTATTGGCCTCAATGAATT-3' : 서열번호 8

[0069]

[0070]

(실시예 3) 포스파타아제 및 샤페론 활성의 측정

[0071]

단백질 포스파타아제 활성 분석은 이전에 기술된 바와 같이 아라키돈산의 존재 또는 부재시 기질로서 파라-니트로페닐포스페이트를 사용하여 수행되었다. 기질 및 PP5의 최종 농도는 각각 100 mM 및 1 μ g이었다. 이전에 기술된 바와 같이, 홀다아제 샤페론 활성은 50 mM HEPES-KOH (pH 8.0) 완충용액에서 다양한 농도의 AtPP5와 말레이트 탈수소효소(MDH)를 결합시킴으로써 측정되었다. 그 다음에 반응은 15분 동안 42°C에서 배양되었으며 기질 응집에 의한 혼탁도 변화가 자동온도 조절 세포 홀더를 지닌 DU800 분광광도계(Beckman, Fullerton, 미국)를 사용하여 모니터링되었다. 폴다아제 샤페론 활성은 이전에 기술된 바와 같이 기질로서 6 M 우레아-변성된 G6PDH를 사용하여 분석되었다. 간단히 변성된 G6PDH (10 μ M)은 100 mM 나트륨 포스페이트 완충용액(pH 7.2)에서 100 배 희석되었으며, AtPP5의 리폴딩 활성은 G6PDH 활성을 분석함으로써 모니터링되었다.

[0072]

(실시예 4) SEC, PAGE 및 면역 블로팅 분석

[0073]

SEC는 100 mM NaCl을 포함하는 50 mM HEPES-KOH (pH 8.0) 완충용액으로 평형이 유지된 Superdex 200 HR 컬럼을 사용하여 FPLC에 의해 25°C에서 수행되었다. SDS-PAGE, 자연-PAGEb 및 면역 블로팅은 이전에 기술된 바와 같이 (Moon et al., 2005)수행되었다. 도 1B에 관해, 아라비도시스 세포 현탁액은 20분 동안 25, 45, 50 또는 55°C에서 처리되었다. 세포는 여과에 의해 수집, 액화질소로 동결되고, 그 다음에 모르타르에서 분쇄되었다. 샘플은 추출 완충용액(50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 2 mM EDTA, 1 mM PMSF)에서 재 현탁되었으며, 4°C에서 20분 동안 12,000 g로 원심분리되었다. 글루타르알데히드가 상청액 프랙션으로 첨가되었고(최종 농도의 0.05%) 샘플은 30°C에서 10분 동안 배양되었다. 교차 반응은 샘플 완충용액의 첨가에 의해 중단되었다. 샘플은 13% SDS-PAGE를 사용하여 분해되었으며 AtPP5는 항-AtPP5 항체를 지닌 면역 블로팅에 의해 시각화되었다.

[0074]

(실시예 5) 전자현미경 및 단일 입자 이미지 프로세싱

[0075]

정제된 AtPP5는 50 mM HEPES-KOH (pH 8.0)를 포함하는 용액으로 10배 희석되었다. AtPP5의 열-의존적 구조의

변화를 분석하기 위해, 샘플은 그리드(grid) 제조 이전에 30분 동안 수조(55℃)에서 배양되었다. 처리된 단백질 샘플(5 μ l)은 즉시 대기에서 3분 동안 글로 방전(Harrick Plasma, Ithaca, NY)된 탄소-코팅 그리드에 적용되었으며, 그 다음에 그리드는 1% 우라닐 아세테이트를 사용하여 음성적으로 염색되었다. 이 그리드는 120 kV에서 작동하는 항-오염기(contaminator)(FEI, 미국)를 지닌 Technai G2 Spirit Twin 투과 전자 현미경으로 연구되었다. 이미지는 1Kx1K CCD, 45,000 (0.37 nm/pixel)의 배율에서 멀티스캔 카메라 모델 794(Gatan, 미국)로 기록되었다. 단일 입자 이미지 프로세싱은 SPIDER, 'reference free method' (Frank et al., 1996)를 사용하여 수행되었다.

[0076] (실시예 6) 체내 열 충격 후 AtPP5 구조의 변화

[0077] 아라비도시스 세포 현탁액은 JPL 배지를 포함하는 삼각 플라스크에서 성장되었다. 세포는 22℃에서 계속 흔들려 주면서(120 rpm) 지속적인 백생광($40 \times 100 \mu\text{E/s/m}^2$) 아래에서 배양되었다. 열 충격 실험을 위해, 4일이 지나 배양은 부드럽게 교반되면서 42℃ 수조로 이동되었으며 그 다음에 열-처리 샘플이 일정한 시간 간격으로 빼내졌다. 세포는 여과에 의해 수집, 액화질소로 동결되고, 그 다음에 모르타르에서 분쇄되었다. 샘플(0.1 g)은 추출 완충용액(50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 2 mM EDTA, 1 mM PMSF)에서 재 현탁되었으며, 4℃에서 30분 동안 14,000 g로 원심분리되었다. 상청액 프랙션은 4% CHAPS로 보충된 2x SDS 샘플 완충용액 100 μ l에서 추출되었다. 그 결과로 생기는 상청액 프랙션은 항-AtPP5 항체를 사용하여 면역 블로팅 분석에 의해 조사되었다.

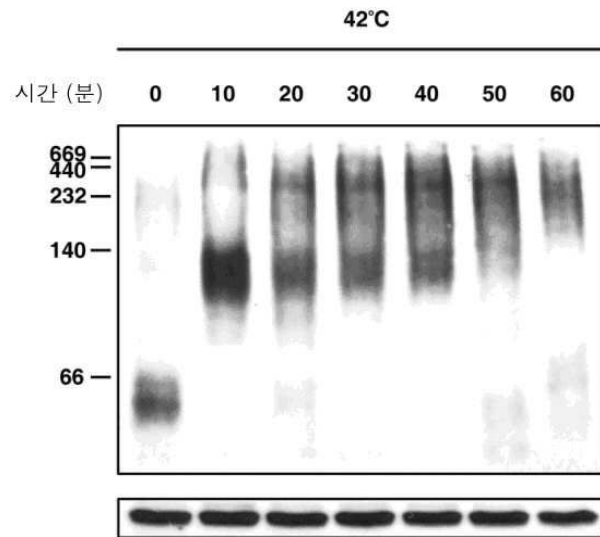
[0078] (실시예 7) 열 완충성 테스트

[0079] 획득한 열 완충성 테스트를 위해, 아라비도시스 묘목이 2% (w/v) 수크로오스를 포함하는 25 ml 고체 영양 배지 (Larkindale et al., 2005) 상의 펠트리 접시(90 x 3 x 15 mm)에서 성장되었다. 성장 조건은 상술한 바와 같다. 3일 된 묘목이 있는 플레이트가 플라스틱 절연 테이프로 봉해졌으며, 수조 속으로 잠기었다. 상이한 배양 온도는 도면에 나타내었다. 열 충격 처리로부터 회복 동안, 플레이트를 수조에서 빼냈고 플레이트는 동일한 명/암 주기를 사용하여 이전의 성장 조건 하에서 유지되었다.

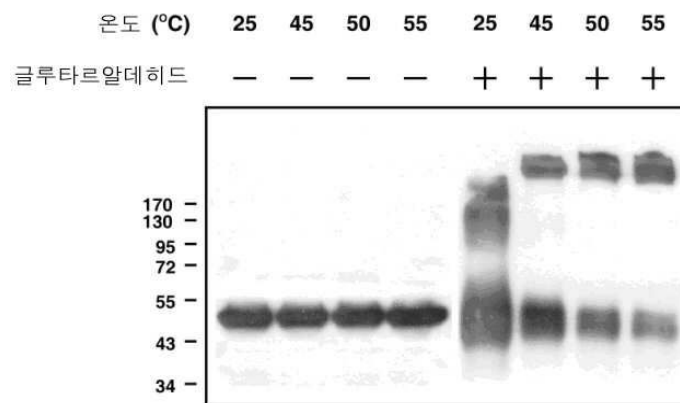
[0080] 기초 열 완충성 테스트를 위해, 플레이트가 빠른 가열 및 냉각을 위해 25 ml 고체 배지를 포함한다는 것을 제외 하고는 묘목은 상술한 것과 유사한 방법으로 성장되고 처리되었다. 플레이트는 20분 동안 55℃의 수조에서 가열 되었으며, 그 다음에 팬으로 빠르게 냉각되었다. 기초 열 완충성은 생존율로 측정되었다.

도면

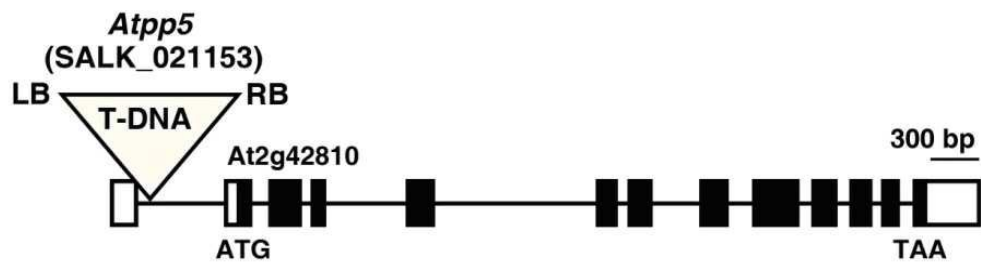
도면1a



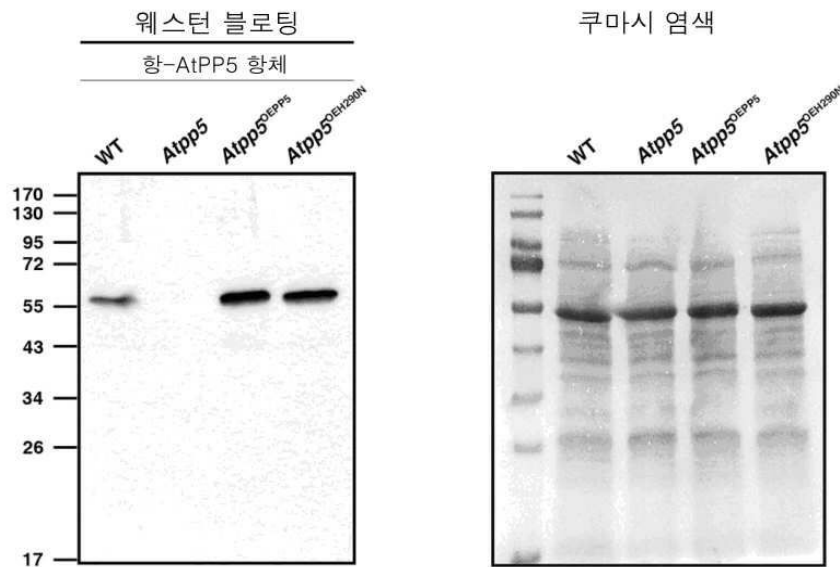
도면1b



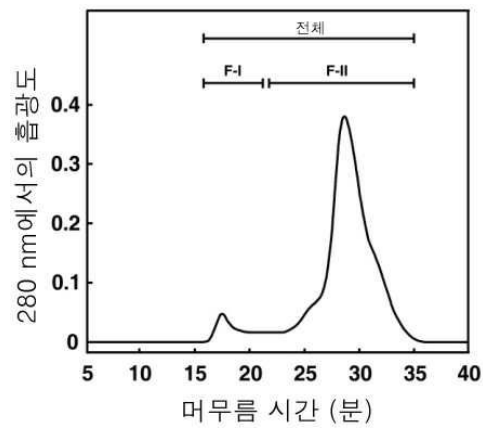
도면1c



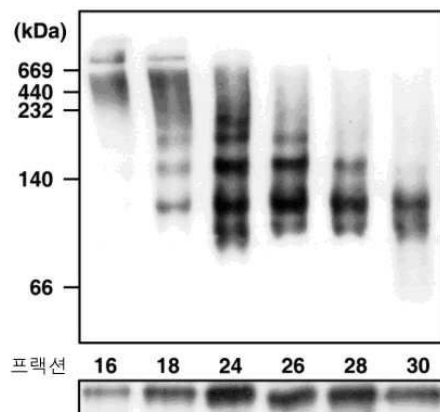
도면1d



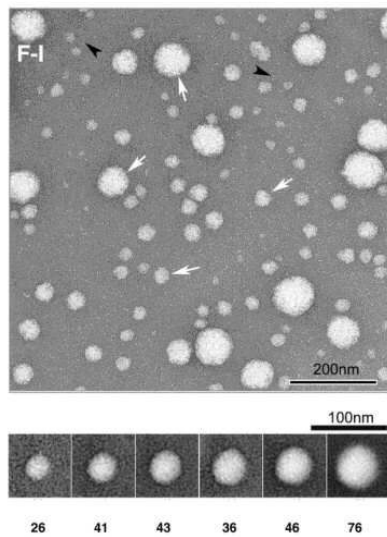
도면2a



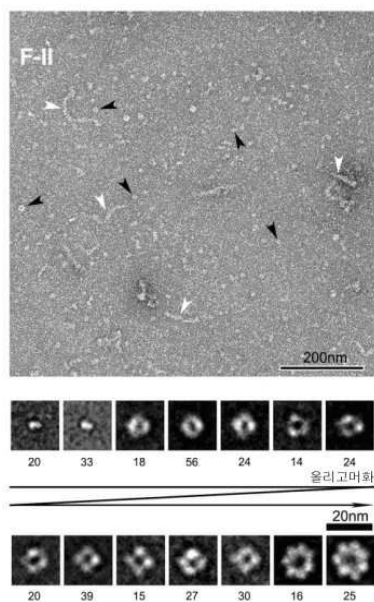
도면2b



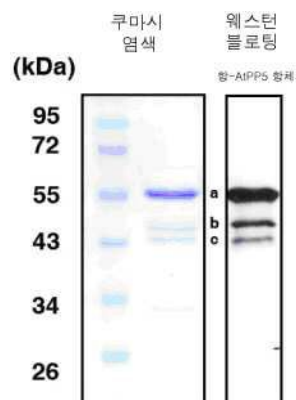
도면2c



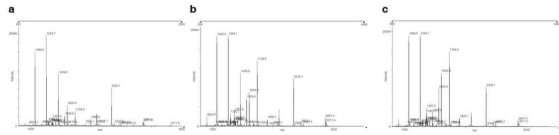
도면2d



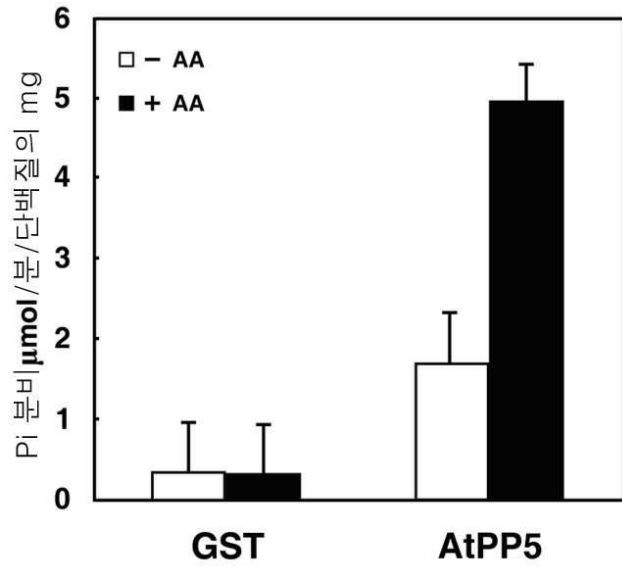
도면2e



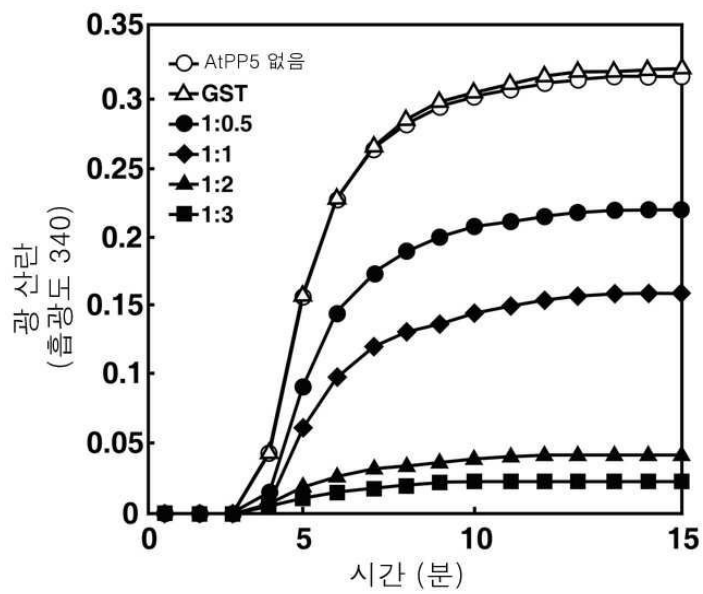
도면2f



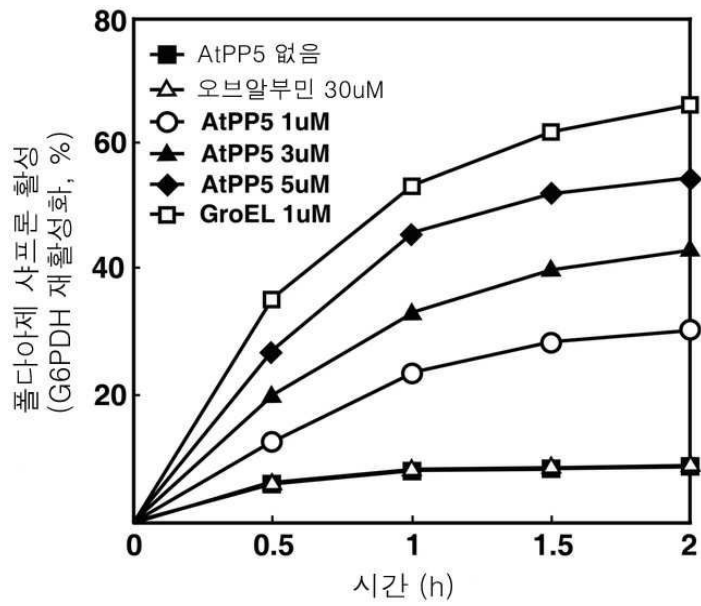
도면3a



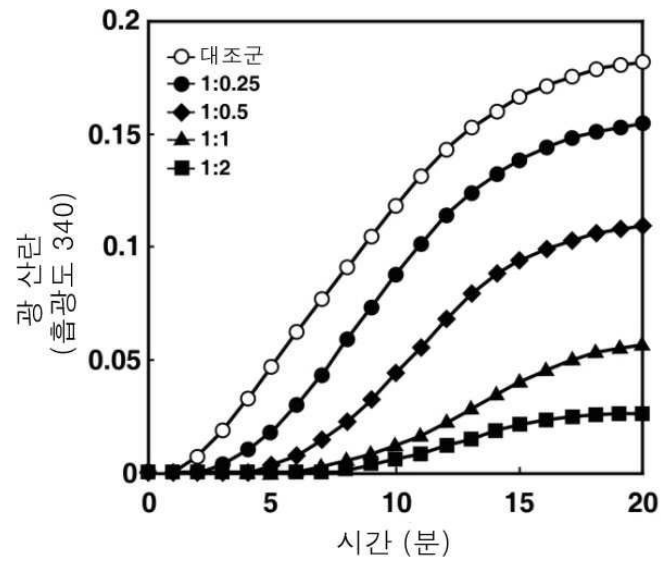
도면3b



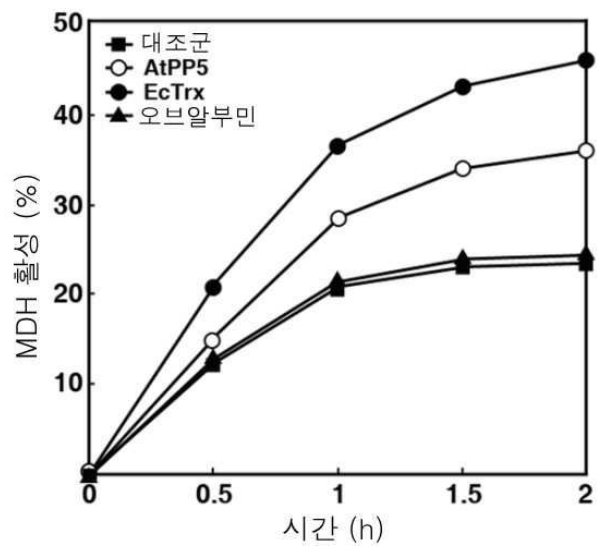
도면3c



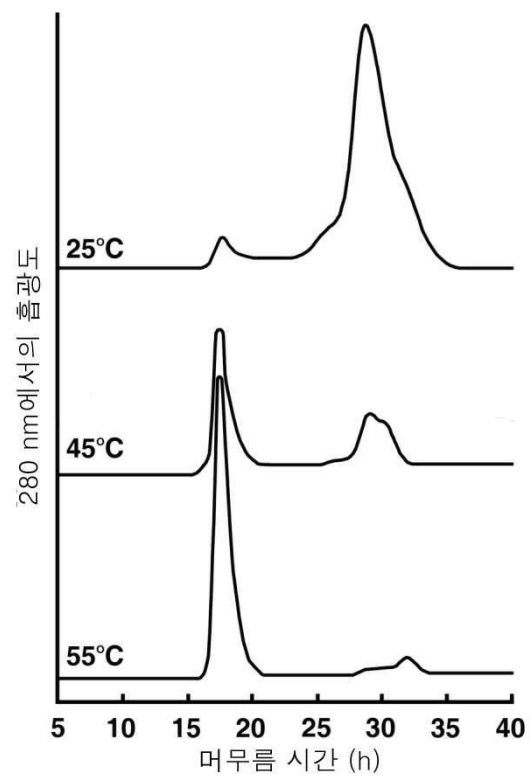
도면3d



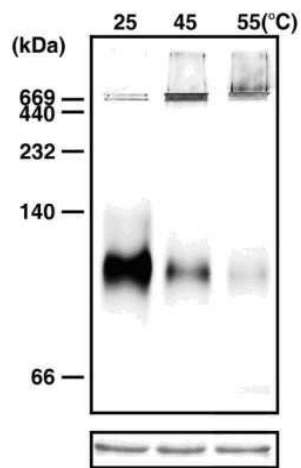
도면3e



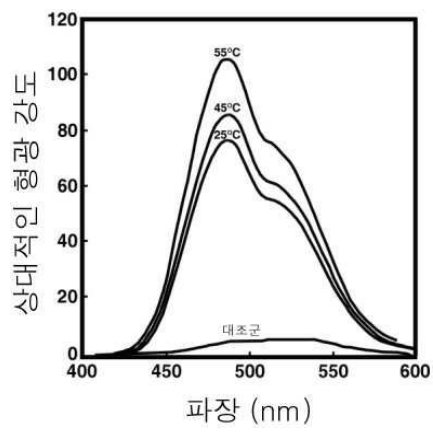
도면4a



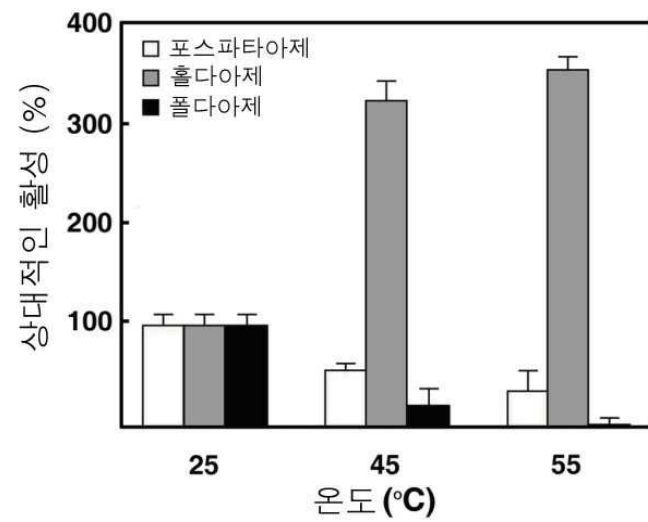
도면4b



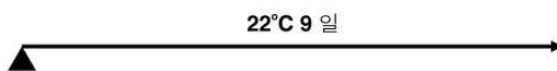
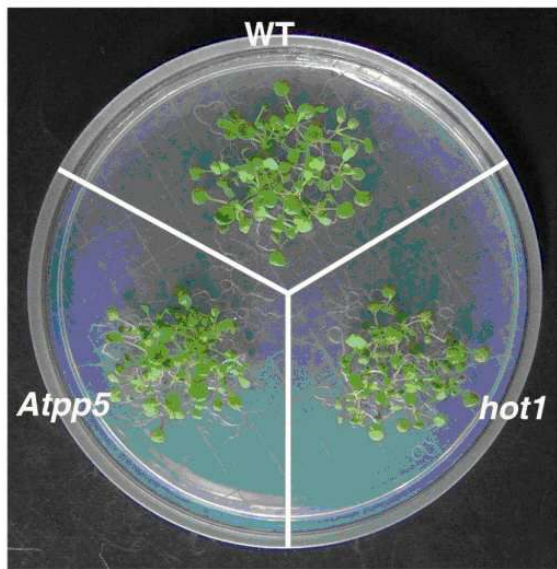
도면4c



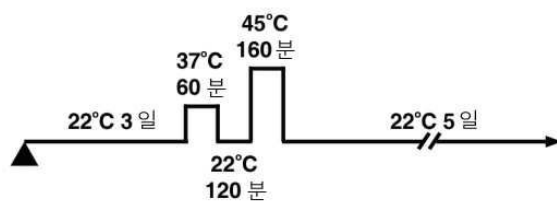
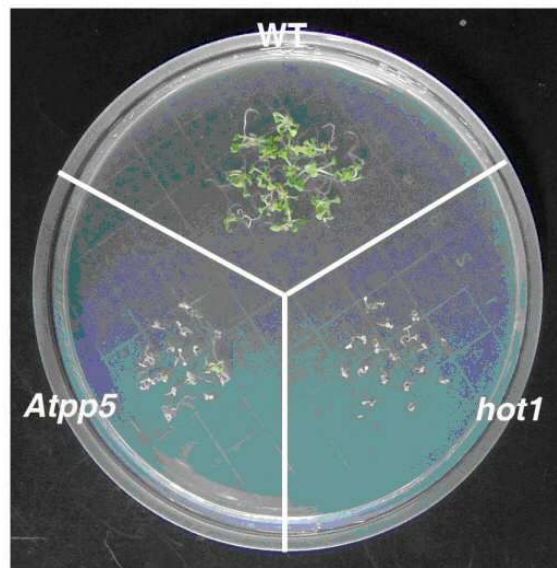
도면4d



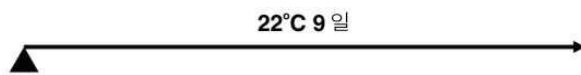
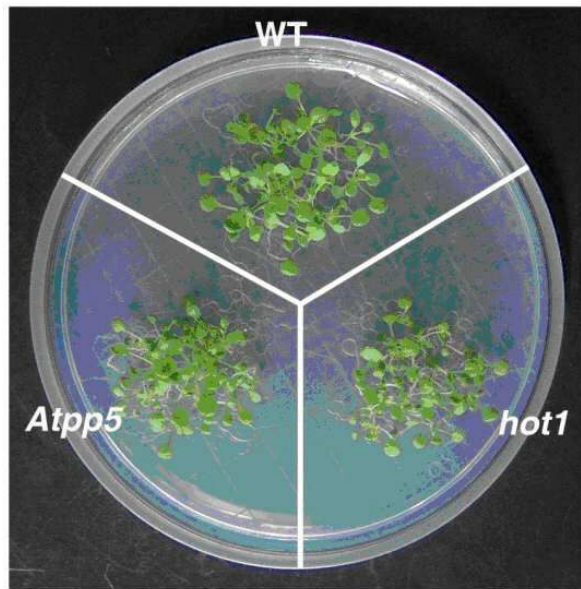
도면5a



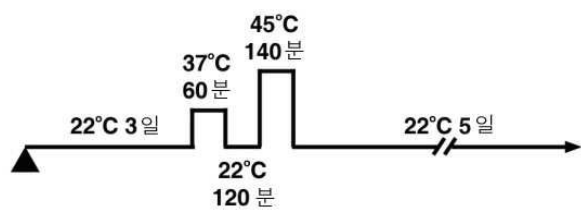
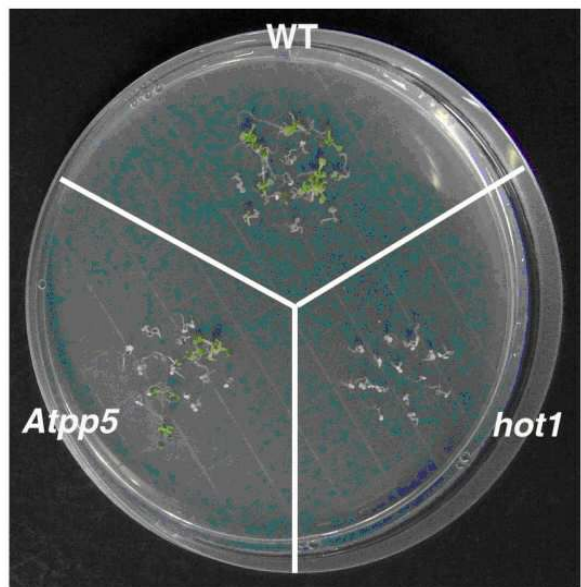
도면5b



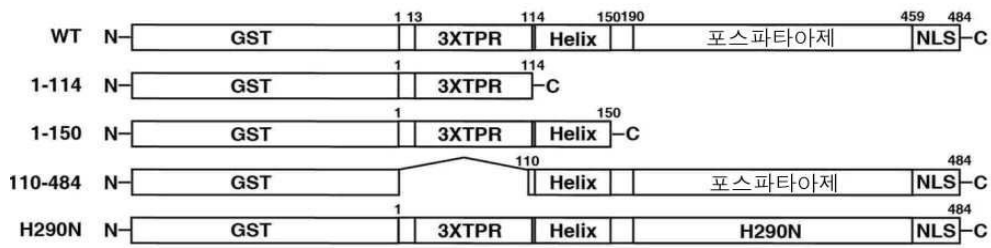
도면5c



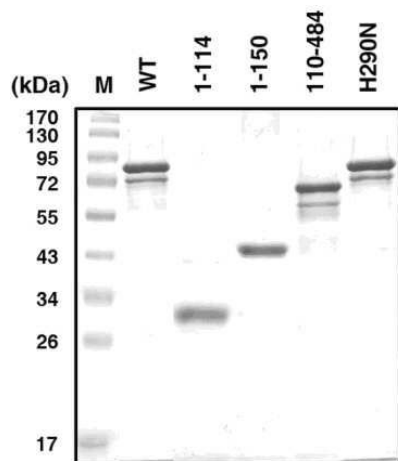
도면5d



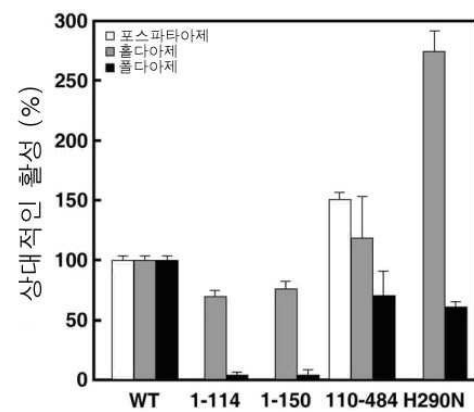
도면6a



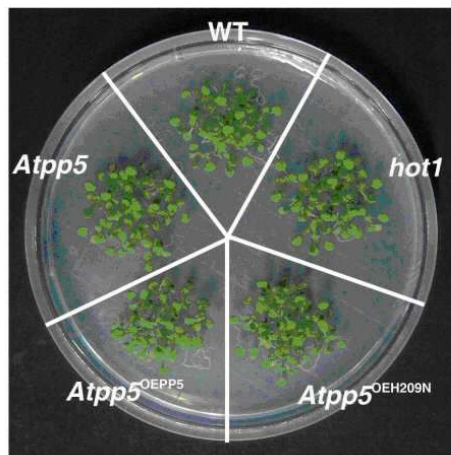
도면6b



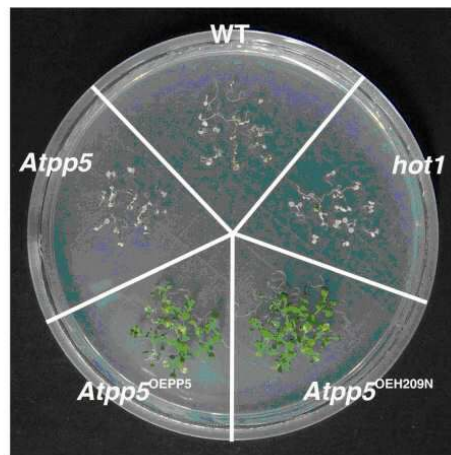
도면6c



도면7a



22°C 13 일

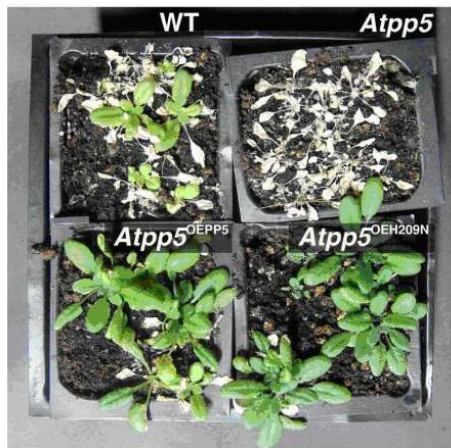


55°C 20 분
22°C 7 일 22°C 9 일

도면7b

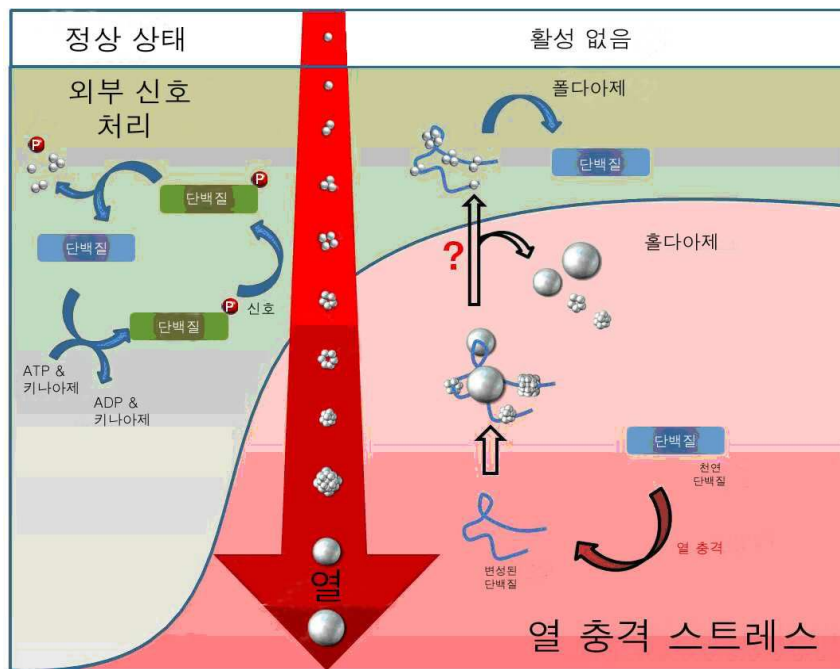


22°C 24 일



37°C 5 일
22°C 14 일 22°C 5 일

도면8



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Arabidopsis transgenic plant harboring AtPP5 mutated gene
construct for enhancing thermotolerance

<160> 8

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 484

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Glu Thr Lys Asn Glu Asn Ser Asp Val Ser Arg Ala Glu Glu Phe

1 5 10 15

Lys Ser Gln Ala Asn Glu Ala Phe Lys Gly His Lys Tyr Ser Ser Ala

20 25 30

Ile Asp Leu Tyr Thr Lys Ala Ile Glu Leu Asn Ser Asn Asn Ala Val

35 40 45

Tyr Trp Ala Asn Arg Ala Phe Ala His Thr Lys Leu Glu Glu Tyr Gly

50 55 60

Ser Ala Ile Gln Asp Ala Ser Lys Ala Ile Glu Val Asp Ser Arg Tyr

65	70						75						80					
Ser	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Gly	Ala	Ala	Tyr	Leu	Ala	Met	Gly	Lys			
				85				90				95						
Phe	Lys	Asp	Ala	Leu	Lys	Asp	Phe	Gln	Gln	Val	Lys	Arg	Leu	Ser	Pro			
				100				105				110						
Asn	Asp	Pro	Asp	Ala	Thr	Arg	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Glu	Lys	Ala	Val			
				115				120				125						
Met	Lys	Leu	Lys	Phe	Glu	Glu	Ala	Ile	Ser	Val	Pro	Val	Ser	Glu	Arg			
				130				135				140						
Arg	Ser	Val	Ala	Glu	Ser	Ile	Asp	Phe	His	Thr	Ile	Glu	Val	Glu	Pro			
145				150				155				160						
Gln	Tyr	Ser	Gly	Ala	Arg	Ile	Glu	Gly	Glu	Glu	Val	Thr	Leu	Asp	Phe			
				165				170				175						
Val	Lys	Thr	Met	Met	Glu	Asp	Phe	Lys	Asn	Gln	Lys	Thr	Leu	His	Lys			
				180				185				190						
Arg	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Ile	Val	Leu	Gln	Thr	Arg	Gln	Ile	Leu	Leu	Ala			
				195				200				205						
Leu	Pro	Ser	Leu	Val	Asp	Ile	Ser	Val	Pro	His	Gly	Lys	His	Ile	Thr			
				210				215				220						
Val	Cys	Gly	Asp	Val	His	Gly	Gln	Phe	Tyr	Asp	Leu	Leu	Asn	Ile	Phe			
225				230				235				240						
Glu	Leu	Asn	Gly	Leu	Pro	Ser	Glu	Glu	Asn	Pro	Tyr	Leu	Phe	Asn	Gly			
				245				250				255						
Asp	Phe	Val	Asp	Arg	Gly	Ser	Phe	Ser	Val	Glu	Ile	Ile	Leu	Thr	Leu			
				260				265				270						
Phe	Ala	Phe	Lys	Cys	Met	Cys	Pro	Ser	Ser	Ile	Tyr	Leu	Ala	Arg	Gly			
				275				280				285						
Asn	His	Glu	Ser	Lys	Ser	Met	Asn	Lys	Ile	Tyr	Gly	Phe	Glu	Gly	Glu			
290				295				300										
Val	Arg	Ser	Lys	Leu	Ser	Glu	Lys	Phe	Val	Asp	Leu	Phe	Ala	Glu	Val			
305				310				315				320						

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

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

450 455 460
Val Pro His Pro Asp Val Lys Pro Met Ala Tyr Ala Asn Asn Phe Leu
465 470 475 480
Arg Met Phe Asn

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Primer
<400> 2
ggatccatgg agaccaagaa tgagaattct
<210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220><223> Primer

<400> 3

gtcgacttag ttgaacatcc tgagaaagtt gttt

34

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 4

gtcgacttag ttgaacatcc tgagaaagtt gttt

34

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

gtcgacggac tcagctactg aacgcc

26

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

ggatcccttt ctctaatga ccctgatg

28

<210> 7

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 7

aatctaattc agggtttcta gtcacttgaa gcttctctta aa

42

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 8

ggatccattt attggcctca atgaatt

27