



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0024865
(43) 공개일자 2017년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/12 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8283 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0120410
(22) 출원일자 2015년08월26일
심사청구일자 2015년08월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
백경희
서울특별시 종로구 송인동길 21, 105동 1805호 (송인동, 종로청계힐스테이트)
김윤식
서울특별시 강북구 인수봉로68길 25-16 (수유동)
김영진
서울특별시 송파구 올림픽로35길 104, 27동 1112호 (신천동, 장미아파트)
(74) 대리인
김순웅

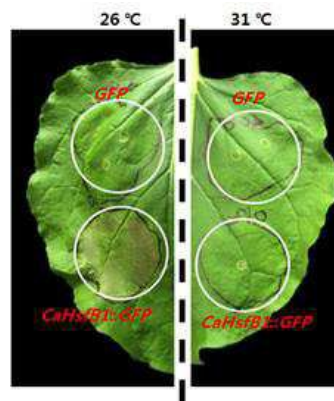
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 식물특이 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1* 및 이를 이용한 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 고추식물의 방어관련 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1* 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 본 발명의 고추 열충격 전사인자는 온도 변화에 따라 바이러스에 의해 유도되는 병 저항성 반응에서 방어 반응의 양성 조절자 역할을 하므로, 이를 이용한 형질전환 식물을 제작함으로써 생산비 절감을 통한 농가소득의 증대효과, 친환경시대에 맞는 고품질 청정작물의 생산 및 이와 연계된 다양한 산업의 활성화에 기여할 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A01H 5/12 (2013.01)

C07K 14/415 (2013.01)

C12N 15/67 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ007850

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청 연구운영과

연구사업명 우장춘프로젝트

연구과제명 가지과작물의 병저항성 인식현상 및 방어신호전달 규명 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2010.11.08 ~ 2015.11.07

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 구성되는 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1*.

청구항 2

서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 단백질.

청구항 3

제1항의 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 4

제3항의 벡터로 형질전환되어 *CaHsfB1*의 발현이 증가된, 바이러스 병 저항성 식물 형질전환세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 식물은 고추, 애기장대 및 담배로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 바이러스 병 저항성 식물 형질전환세포.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 바이러스는 오이 모자이크 바이러스 (*Cucumber mosaic virus*, CMV), 고추열룩바이러스 (*Pepper mottle virus*, PepMoV), 고추연한열룩바이러스 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV), 잠두위조바이러스 2 (*Broad bean wilt virus 2*, BBWV2), 담배연한모자이크바이러스 (*Tobacco mild green mosaic virus*, TMGMV), 토마토반점위조바이러스 (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) 및 TMV-P₀ (*Tobacco mosaic virus*-P₀)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 바이러스 병 저항성 식물 형질전환 세포.

청구항 7

- 1) 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;
- 2) 상기 1) 단계에서 제조된 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제조하는 단계; 및
- 3) 상기 2) 단계에서 제조된 식물 형질전환세포로 식물체를 제조하는 단계; 를 포함하는 바이러스 병 저항성 식물체의 제조방법.

청구항 8

- 1) 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및
- 2) 상기 1) 단계에서 제조된 벡터를 식물체에 도입하여 *CaHsfB1*의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물체

의 바이러스 병 저항성을 증가시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고추식물의 방어관련 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1* 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물 재배 지역에서 낮과 밤의 기온의 차이, 계절의 변화에 따른 온도의 변화는 식물의 성장과 발달에 영향을 주는 중요한 환경적 요소이다 (Long and Woodward 1988). 하지만 하루 중 기온의 변화나 계절에 따른 기온의 변화에 식물이 어떻게 반응하는지는 정확히 알려져 있지 않다 (Penfield 2008). 또한 온도 변화는 세균, 곰팡이, 바이러스, 곤충 등에 대한 저항성 반응에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며 (Garrett *et al.* 2006), 특히 고온은 식물의 면역반응을 억제하는 것으로 알려져 있다 (Dropkin 1969). 이렇게 온도 변화가 식물의 병 저항성에 영향을 주고 농업 생산성에 영향을 줌에도 불구하고, 온도 변화에 따른 식물 면역 반응의 조절에 대한 분자 생물학적 기작은 거의 알려져 있지 않다. 열충격 전사인자 (heat shock transcription factor)는 세균, 곰팡이에서부터 동물까지 공통적으로 보유하고 있는 단백질로서 외부 온도 변화를 인지하여 반응할 뿐만 아니라 생물에 가해지는 다양한 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 한다 (Chen and Parker 2002). 그리고 이 전사인자 단백질을 이루는 기본적인 구조와 목표 DNA 결합 부위 (예컨대 heat shock element)는 세균, 효모에서부터 인간까지 공통적이다 (Wu 1995). 효모와 인간은 각각 1개와 3개의 열충격 전사인자를 가지고 있는 반면 (Nakai 1999), 식물은 많은 수의 전사인자를 가지고 있다. 애기장대는 21개, 벼는 23개의 열충격 전사인자를 가지고 있는 것으로 밝혀졌다 (Nover *et al.* 2001; von Koskull-Doring *et al.* 2007). 최근 연구에 따르면 식물의 열충격 전사인자는 온도 변화 이외에 다양한 환경적 요인에 의해서도 반응한다고 알려졌다 (Baniwal *et al.* 2004; Yokotani *et al.* 2008). 토마토의 HsfA1a의 발현이 억제되면 고온 스트레스에 매우 민감해지며 (Mishra *et al.*, 2002), 벼의 HsfA4d에 이상이 생기면 고온에 매우 민감해져서 괴사증상이 생긴다. 열충격 전사 인자는 무생물적 환경 스트레스에 관여할 뿐만 아니라 생물학적 스트레스에도 관여한다는 사실이 밝혀져 있다. 애기장대의 HsfB1과 HsfB2b는 PDF 1.2의 발현과 병원균에 대한 저항성에 관여한다고 알려져 있다 (Kumar *et al.* 2009). 추가적으로 애기장대의 HsfB1은 식물체의 성장과 병저항성 반응 사이에서 균형을 조절하는 스위치 역할을 한다고 밝혀졌다 (Pajerowska-Mukhtar *et al.*, 2012).

[0003] 한편, 고추, 담배는 한국에서 가장 많이 재배되는 경제작물의 하나로서 환금성이 좋아 많은 농민들이 재배를 선호하는 중요한 작물이다. 이러한 고추, 담배 식물에서 병원균으로 바이러스, 세균, 진균 등이 다양하게 보고되어 있으며 실제로 우리나라에서는 장마 이후에 다양한 병 발생에 의한 생산량 감소가 빈번히 일어난다. 또한 전 지구적인 온난화에 따른 기온 상승은 작물 재배지역에서 기존 병원균에 의한 병 발생 증가와 새로운 병원균의 발생이라는 이중적 문제를 일으키고 있으나, 아직까지는 작물보호를 위해서 화학적 방제에 전적으로 의존하고 있는 실정이다. 특히 고추식물에서 과민성 세포사멸 및 전신획득저항성 관련유전자가 아직 분리되어 있지 않고 있어 이들 유전자를 분자적으로 클로닝하여 식물방어신호전달경로 (signal transduction pathway)에서 이들 유전자의 분자적 발현조절, 기능을 규명해야할 필요가 있다. 전통적인 육종을 이용한 새로운 저항성 작물 개발의 단점을 보완할 수 있는 생명공학적인 기법을 이용한 효과적인 방어관련 유전자의 분리 방법을 통하여 획득한 고추식물의 열충격 전사인자의 특성을 파악하고 형질전환 식물을 제작함으로써 생산비 절감을 통한 농가소득의 증대 효과 및 친환경시대에 맞는 고품질 청정작물의 생산을 가능하게 하며 이와 연계된 다양한 산업의 활성화에 기여할 수 있다. 따라서 생명공학적인 기법을 이용하여 병 저항성이 향상된 고추, 담배, 애기장대 등의 식물을 제작할 수 있는 방법에 대한 연구가 절실하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 TMV-P₀에 의해 유도되는 병 저항성 반응에서 고추식물의 방어관련 식물특이 열충격 전사인자 유전

자 *CaHsfB1*을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [0005] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1*을 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 벡터를 제조하여 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 바이러스 병 저항성 식물체의 제조방법 및 식물체의 바이러스 병 저항성을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1*을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 단백질을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 1) 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 2) 상기 1) 단계에서 제조된 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제조하는 단계; 및 3) 상기 2) 단계에서 제조된 식물 형질전환세포로 식물체를 제조하는 단계; 를 포함하는 바이러스 병 저항성 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 1) 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및 2) 상기 1) 단계에서 제조된 벡터를 식물체에 도입하여 *CaHsfB1*의 발현을 증가시키는 단계; 를 포함하는 식물체의 바이러스 병 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 고추 열충격 전사인자는 온도 변화에 따라 바이러스에 의해 유도되는 병 저항성 반응에서 방어 반응의 양성 조절자 역할을 하므로, 이를 이용한 형질전환 식물을 제작함으로써 생산비 절감을 통한 농가소득의 증대효과, 친환경시대에 맞는 고품질 청정작물의 생산 및 이와 연계된 다양한 산업의 활성화에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 *CaHsfB1* 유전자의 염기서열을 나타낸 도이다.
- 도 2는 담배의 *NbHsfB1*의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸 도이다.
- 도 3은 고추에서 유래한 *CaHsfB1*과 애기장대에서 유래한 *AtHsfB1*, *AtHsfB2a*, *AtHsfB2b*, *AtHsfB3*, *AtHsfB4* 및 담배에서 유래한 *NbHsfB1*의 아미노산 서열을 대비한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 고추에서 유래한 *CaHsfB1*과 애기장대에서 유래한 *AtHsfB1*, *AtHsfB2a*, *AtHsfB2b*, *AtHsfB3*, *AtHsfB4* 및 담배에서 유래한 *NbHsfB1*의 아미노산 서열을 비교하여 계통수로 나타낸 도이다.
- 도 5는 고온(45℃) 처리에 의한 *CaHsfB1* 유전자의 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 TMV-P₀ 바이러스의 감염에 의한 *CaHsfB1* 유전자의 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 *CaHsfB1* 유전자의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 8은 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 DAB 염색 및 트리판 블루(TPB) 염색을 통해 과민성 세포 사멸을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 TMV-P₀ 바이러스 감염에 의한 고추 병 관련 유전자(*CaPR1*, *CaPR10*)의 발현을 qRT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 *NbHsfB1*-침묵 식물체에서 CaL²와 TMV-P₀ CP의 상호작용이 유도하는 과민성 세포 사멸을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 *CaHsfB1* 유전자의 과발현체의 표현형을 확인한 도이다.

도 12는 *CaHsfB1* 유전자의 과발현체에서 CaHsfB1 단백질의 세포내 위치를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0018] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1*을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 *CaHsfB1* 유전자의 cDNA 핵산 서열은 1881 bp 이며, 담배 모자이크 바이러스-P₀(TMV-P₀)의 감염에 의해 발현이 증가한다.
- [0020] 본 발명에서 용어 "열충격 전사인자(heat shock transcription factor)"는 열충격에 의한 전사촉진을 지배하는 전사조절인자이다. 정상 상태의 진핵생물의 세포에는 열충격 전사인자는 비활성형으로 세포기질에 존재하는데, 세포가 열충격을 받으면 활성화되어 핵 내로 이동하여 열충격 유전자의 전사를 촉진함으로써 기능한다.
- [0021] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 *CaHsfB1* 유전자, 그 상동형 유전자(homolog) 및 그 변이형 유전자(variant)를 포함한다. 또한 열충격 전사인자 CaHsfB1은 서열번호 2의 아미노산 서열로 구성되는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. 상기 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. 또한, 본 발명의 열충격 전사인자 CaHsfB1에는 이의 천연형 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 이의 변이체가 또한 본 발명의 범위에 포함된다. 상기 변이체란 열충격 전사인자 CaHsfB1의 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 단백질을 의미한다.
- [0022] 본 발명의 고추 열충격 전사인자 CaHsfB1은 담배 모자이크 바이러스-P₀(TMV-P₀)에 의해 유도되는 병 저항성 반응에서 온도 변화에 따른 방어 반응의 조절자 역할을 하며 특히 고온에서 발현 수준이 증가한다. 본 발명의 일 실시예에서는 고추에 45℃의 고온을 처리하여 *CaHsfB1* 유전자의 발현 수준이 증가함을 확인하였다. 또한 본 발명의 CaHsfB1은 바이러스 저항성에 관여하여 식물체의 세포사멸을 조절하는 중요한 인자이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1*을 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0024] 본 발명에서 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 벡터는 목적한 코딩 서열과 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는 데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1*을 삽입하기 위하여 사용되는 벡터로는 일반적인 식물 형질전환용 발현 벡터이면 pCAMBIA2300 벡터 또는 pGWB 벡터 등 어느 것이든 무방하나, 본 발명의 일 실시예에서는 *CaHsfB1* 유전자를 삽입하기 위해 식물 형질전환용 pGWB405 벡터를 사용하였다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1*을 포함하는 벡터로 형질전환되어 CaHsfB1의 발현이 증가된 바이러스 병 저항성 식물 형질전환세포를 제공한다. 본 발명에서 벡터가 도입되는 식물 세포는 세포가 식물로 재생될 수 있는 한 특별히 특정한 형태로 제한되는 것은 아니며 예컨대 배양된 세포 부유물, 원형질체(protoplast), 잎 절편(leaf section) 및 캘러스(callus)일 수 있다. 상기 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1*을 포함하는 벡터는 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 방법, 전기천공법(electroporation), 아그로박테리움(Agrobacterium)에 의해 매개되는 전달 및 입자 충격(particle bombardment) 방법과 같은 공지

의 방법에 의하여 식물 세포에 도입될 수 있다.

- [0026] 본 발명에서 식물 형질전환세포의 제조에 이용되는 식물은 쌍자엽 또는 단자엽 식물에 상관없이 어떤 식물도 가 능하나, 바람직하게는 고추, 애기장대 또는 담배일 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 바이러스는 고추를 감염시켜 병을 유발할 수 있는 오이 모자이크 바이러스(Cucumber mosaic virus, CMV), 고추열룩바이러스(Pepper mottle virus, PepMoV), 고추연한열룩바이러스(Pepper mild mottle virus, PMMoV), 잠두위조바이러스 2(Broad bean wilt virus 2, BBWV2), 담배연한모자이크바이러스(Tobacco mild green mosaic virus, TMGMV), 토마토반점위조바이러스(Tomato spotted wilt virus, TSWV) 및 TMV-P₀(tobacco mosaic virus-P₀) 등의 담배모자이크바이러스 군에 속하는 바이러스를 제한 없이 포함할 수 있으나, 바람직하게는 TMV-P₀ 바이러스일 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 1) 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 2) 상기 1) 단계에서 제조된 벡터로 형질전환된 식물 형질전환세포를 제조하는 단계; 및 3) 상기 2) 단계에서 제조된 식물 형질전환세포로 식물체를 제조하는 단계; 를 포함하는 바이러스 병 저항성 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명에서 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 열충격 전사인자 유전자 *CaHsfB1*을 삽입하기 위하여 사용되는 벡터로는 일반적인 식물 형질전환용 발현 벡터이면 어느 것이든 무방하나, 본 발명의 일 실시예에서는 *CaHsfB1* 유전자를 삽입하기 위해 식물 형질전환용 pGWB405 벡터를 사용하여 *CaHsfB1*이 과발현된 식물체를 제조하였다.
- [0030] 본 발명에서는 상기 식물 형질전환세포를 조직배양 방법으로 재분화시켜 바이러스 병 저항성 식물체의 제조방법 을 제공한다. 본 발명의 조직배양을 통한 재분화는 일반적인 형질전환 식물체 제조 공정을 통해 수행하는 것이 바람직하다.
- [0031] 또한, 본 발명은 1) 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및 2) 상기 1) 단계에서 제조된 벡터를 식물체에 도입하여 *CaHsfB1*의 발현을 증가시키는 단계; 를 포함하는, 식물체의 바이 러스 병 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 식물체의 바이러스 병 저항성을 증가시키는 방법에 따르면, 고온 처리에 따른 열충격에 의해 과민성 세포 사멸을 조절함으로써 식물체의 바이러스 병 저항성을 증가시킬 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 "과민성 세포 사멸(hypersensitive cell death)"은 국부적 세포 죽음으로서, 식물의 방어 기작 중 하나이다. 식물은 여러 가지 저항성 기작을 발현시켜 병원균의 공격에 대해 자신을 방어하는데, 병원균 감염 부 위에서 과민성 세포 사멸을 유도하여 병원균에 대한 방어를 가능하게 한다. 본 발명의 방법에 따르면 *CaHsfB1* 열충격 전사인자가 바이러스에 의해 유도되는 병의 방어 반응에서 온도에 따른 병 저항성을 증가시키는 효과가 있다.
- [0034] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0036] **실험예 1 - DNA 분리 및 서열분석**
- [0037] 담배 모자이크 바이러스-P₀(TMV-P₀)를 감염시킨 고추에서의 마이크로어레이 결과, 일부 인자가 저항성 반응 동안 특이적으로 발현이 증가하였는데, 이들 중 TMV-P₀에 반응하여 발현이 크게 증가한 *CaHsfB1* 유전자를 선별하였다.
- [0038] PCR 기법을 이용하여 *CaHsfB1* 유전자의 cDNA 조각을 획득하여 염기서열을 결정하였다. 서열결정 결과, 이 염기 서열은 서울대학교 고추지놈연구실 (최도일 교수 연구실)에서 수행한 고추지놈의 서열 정보와 동일한 것으로 확

인하였으며 서열결정 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에 나타낸 바와 같이 *CaHsfB1* cDNA 핵산 서열은 1881 bp 이다.

[0039] 또한 *CaHsfB1* 유전자는 분자량 33.7 kDa을 가지는 하나의 단백질을 인코딩하고 이 단백질에는 HSF DNA binding 도메인, 1개의 nuclear localization signal 도메인과 전사 억제 (repressor) 도메인을 가지는 것으로 확인하였다. 고추의 *CaHsfB1*과 상동성을 가지는 담배의 *NbHsfB1*의 염기서열 및 아미노산 서열을 Sol genomic network (<http://solgenomics.net/>)에서 찾아 도 2에 나타내었으며, 두 유전자의 아미노산 서열을 비교한 결과, 88.2 %의 상동성을 가짐을 확인하였다.

[0040] 또한, 고추에서 유래한 *CaHsfB1*과 애기장대에서 유래한 *AtHsfB1*, *AtHsfB2a*, *AtHsfB2b*, *AtHsfB3*, *AtHsfB4* 및 담배에서 유래한 *NbHsfB1*의 아미노산 서열을 대비한 결과를 도 3에 나타내었다. 상기 유전자 사이의 유사성을 도 4에 계통수로 나타내었으며 여기서 수평선의 길이는 연관된 서열 사이의 비유사성을 나타내고, 선 아래의 숫자는 근접한 노드로부터의 상대적 거리를 나타낸다. 도 4에 나타낸 바와 같이 애기장대에서 유래한 유전자 중 *AtHsfB1*이 본 발명의 *CaHsfB1*과 가장 유사함을 확인하였다. 서로 다른 식물체에서 유래한 두 염기서열 및 아미노산 서열이 유사하다는 것은 단백질의 구조가 유사하다는 것을 뜻한다. 단백질의 구조는 그 기능을 결정하는 주요한 요소이므로, 애기장대에서 유래한 *AtHsfB1*과 담배에서 유래한 *NbHsfB1*의 염기서열 및 아미노산 서열이 고추에서 유래한 *CaHsfB1*의 염기서열 및 아미노산 서열이 유사하다는 것은 서로 다른 식물체가 유사한 기능을 가진 유전자를 가지고 있음을 말해준다. 이는 식물체에 있어 이 유전자가 가지는 중요성을 대변하며, 고추에서 *CaHsfB1* 유전자가 중요한 기능을 함을 시사한다.

[0041] 실험예 2 - 고온 처리에 의한 *CaHsfB1* 유전자의 발현 확인

[0042] *CaHsfB1* 유전자가 열에 의해 발현 변화를 나타내는지 확인하기 위해, 2달 된 고추를 챔버 내에서 45℃ 환경에 노출시킨 후 0, 1, 2, 6, 12, 24, 48 및 72 시간 후에 잎을 수거하였고, 액체 질소에서 급속 냉동한 후 -80℃에서 보관하였다. 대조군으로 26℃ 환경에 노출시킨 고추 잎을 사용하였다. 상기 실험예 2.2의 방법과 같이 고추 잎 시료에서 qRT-PCR을 수행하였고, qRT-PCR 결과 얻은 상대적 발현 수준을 *CaActin* 유전자의 발현으로 표준화하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0043] 도 5에 나타낸 바와 같이 26℃에 비하여 45의 고온을 처리한 경우 *CaHsfB1* 유전자가 과발현됨을 확인하였다. 따라서, *CaHsfB1* 유전자가 고온에 의해 유도되는 열충격 인자임을 확인하였다.

[0044] 실험예 3 - 바이러스 감염에 의한 온도에 따른 *CaHsfB1* 유전자의 발현 확인

[0045] 3.1 TMV-P₀ 바이러스 접종

[0046] TMV-P₀ 바이러스 확보를 위해 바이러스 감수성인 야생 담배 (*Nicotiana benthamiana*)를 식물 재료로 이용하였다. 담배 식물체를 16h 광/ 8h 암의 광주기로 26℃, 31℃, 34℃의 생장 챔버에서 생장시켰다. 4주 된 담배 식물체로부터 수거된 건강하고 잘 벌어진 잎을 TMV-P₀ 바이러스로 감염시켰고 핵산 추출에 이용하였다. 10 mM 인산칼륨 완충액 (Potassium Phosphate buffer)과 함께 TMV-P₀를 감염시킨지 3주된 야생 담배 (*Nicotiana benthamiana*) 잎을 갈아서 TMV-P₀를 함유하는 잎 수액을 준비하였다.

[0047] 고추 식물에 접종하기 위해, TMV-P₀ 바이러스를 함유하는 수액 10 ml와 카보런덤 (Hayashi Chemical, Japan) 0.5 g을 섞어서 고추 식물체의 4 또는 5번째의 완전히 전개된 잎의 표면에 문질렀으며, 이를 통해 TMV-P₀ 바이러스에 감염된 고추 식물체를 얻었다. 대조군으로는 모조-접종 식물체(Mock)는 인산칼륨 완충액 및 카보런덤만으로 문지른 고추 식물체를 사용하였다.

[0048] 3.2 바이러스 감염에 의한 *CaHsfB1* 유전자의 발현 확인

[0049] 상기 3.1에서 제조한 바이러스에 감염된 고추 식물체에서 TMV-P₀의 접종에 의한 *CaHsfB1* 발현 수준을 분석하기 위하여 RT-PCR 및 qRT-PCR을 이용하였다.

[0050] 구체적으로, 50 mg의 고추 잎을 액체 질소에서 연한 녹색 분말이 되도록 막자사발 및 막자로 갈았다. 이 분말을 QIAGEN RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74106)를 사용하여 집중 후 0, 72시간에 전체 RNA(total RNA)를 추출하였다. 추출한 전체 RNA 5 µg 을 M-MLV 역전사효소 (Promega, USA) 처리하고 RT-PCR을 수행하여 cDNA를 얻었다. RT-각 첫 번째-가닥 (first-strand) cDNA 산물을 PCR 기법으로 증폭시켰다. 증폭시킨 cDNA에 대해 KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPA BIOSYSTEM) 및 하기의 표 1에 제시된 유전자-특이 프라이머로 LightCycler 480 (Roche, Germany)를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다.

표 1

[0051]

유전자	서열	
<i>CaHsfB1</i>	정방향	CGTCAGCTTAACACCTATGG
	역방향	ACCTATCTCATCCCAGAAT
<i>CaActin</i>	정방향	GTGCTGAGAGATTCCGTTGC
	역방향	ATGGTTGAGCCACCACTGAG

[0052] qRT-PCR 결과 얻은 *CaHsfB1* 유전자의 상대적 발현 수준을 고추에 존재하는 하우스 키핑 (house keeping) 유전자인 *CaActin* 유전자의 발현으로 표준화하여 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타낸 바와 같이 고추에 TMV-P₀를 접종했을 때 대조군과 비교하여 26℃, 31℃, 34℃에서 모두 *CaHsfB1* 발현이 증가하였다. 한편, 그 증가의 폭이 34℃에서는 감소함을 확인하였다. 이를 통해 *CaHsfB1* 유전자가 TMV-P₀ 바이러스 감염에 의해 발현이 유도되며, 온도에 따라 발현 수준이 특이적으로 변화하는 유전자임을 확인하였다. 특히 바이러스에 대한 고추의 저항성이 감소하는 온도(34℃)에서 바이러스 저항성에 관련된 *CaHsfB1* 유전자의 발현 또한 비례하여 감소하는 것은, 34℃에서 고추가 바이러스 저항성을 나타내는데 *CaHsfB1* 유전자의 발현양이 중요한 역할을 함을 의미한다.

[0053] 실시예 1 - *CaHsfB1*의 침묵에 의한 과민성 세포 사멸의 확인

[0054] 1.1 바이러스 유도 유전자 침묵 (virus-induced gene silencing, VIGS)을 이용한 *CaHsfB1*-침묵 식물체의 제조

[0055] PCR에 의해 증폭된 *CaHsfB1*의 324-bp ORF와 3' UTR을 포함하는 단편을 TRV2 벡터 (Liu *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2004)의 *Bam*H1 위치에 하기의 표 2에 기재된 프라이머를 이용하여 클로닝하였다. pTRV2 및 pTRV2-*CaHsfB1*을 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)에 형질전환 시켰고, 형질전환된 아그로박테리움을 50 mg 카나마이신 (kanamycin) 및 100 mg 리팜피신 (rifampicin)을 함유하는 YEP 배지에서 선별하였다. 형질전환체를 28℃에서 이틀간 생장시키고, 원심분리 후 아그로박테리움을 10 mM MES-KOH (pH 5.7), 10 mM MgSO₄ 및 200 µM 아세토시링곤 (acetosyringone)을 함유하는 완충액에서 A₆₀₀ 0.15이 될 때까지 재현탁하였고, pTRV2 및 pTRV2-*CaHsfB1*을 포함하는 형질전환체 배양물은 TRV1 벡터를 포함하는 아그로박테리움 투메파시엔스 (*A. tumefaciens*)와 1:1 비율로 혼합하였다. 실온에서 2 내지 4 시간 동안 배양시킨 혼합물을 2주된 고추 식물에 아그로인필트레이션 (agroinfiltration)에 의해 pTRV2(대조군) 및 pTRV2-*CaHsfB1* 벡터를 접종하였다.

표 2

[0056]

	서열
정방향	5'-GGATCCTAGAAGAACAAGGTAGTTACAATGA-3'
역방향	5'-GGATCCGAAATCCAAATGAAATTACTAAATC-3'

[0057] 1.2 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 과민성 세포 사멸의 확인

[0058] *CaHsfB1* 유전자의 기능을 확인하기 위해서 상기 실시예 1.1에서 제조한 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 DAB(3,3'-Diaminobenzidine) 염색 및 트리판 블루 염색을 하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1.1에서 아그로인필트레이션 한 뒤 한 달 후에, 상부 잎에 TMV-P₀를 접종하였고, 접종하고 3일 후 대조군 식물체(TRV2) 및 *CaHsfB1*-침묵 식물체(TRV2-*CaHsfB1*)로부터 잘라낸 잎을 트리판 블루(TPB) 용액 (10 g 페놀, 10 ml 글리세롤, 10 ml 젖산, 10 ml 물 및 0.02 g 트리판 블루)을 함유하는 50 ml 튜브로 옮겼다. 다음 트리판 블루 용액을 5분 동안 끓인 후 5분 동안 진공 상태에 노출시켰다. 하룻밤 동안 암 상태에서 보관한 후, 수화 클로랄 (chloral hydrate) 용액

2.5 g/ml에 옮겨 일주일 동안 탈색시켰고 그 결과를 도 7 및 도 8에 나타내었다. 식물체는 26℃에서 배양하였다.

[0059] 도 7에 나타난 바와 같이 *CaHsfB1*-침묵 식물체와 대조군에서 얻은 시료에서 표 1에 제시된 유전자-특이 프라이머를 이용하여 qRT-PCR을 수행한 결과, *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 *CaHsfB1* 유전자 발현 수준이 대조군에 비해 낮으므로 실험에 사용한 식물체가 *CaHsfB1* 침묵-식물체임을 확인하였다.

[0060] 트리판 블루 염색을 이용하면 TMV-P₀의 감염에 의해 유발된 과민성 세포 사멸 (hypersensitive cell death)을 시각화할 수 있다. 도 8에 나타난 바와 같이, 26℃의 정상 온도에서는 대조군에 비해 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 점 모양으로 나타난 과민성 세포 사멸이 감소함을 확인하였다. 고추가 가지는 대표적인 바이러스 저항성 반응인 과민성 세포 사멸이 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 감소하였다는 것은 *CaHsfB1*이 프로그램된 세포 사멸 조절을 통해 TMV-P₀에 대한 저항성에 기여함을 의미한다.

[0061] 1.3 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 고추 병 관련 유전자의 발현 수준 확인

[0062] *CaHsfB1* 유전자의 기능을 확인하기 위해서 *CaHsfB1*-침묵 식물체에 TMV-P₀를 처리하고 3일 후에 상기 실험에 3에 제시된 방법에 따라 고추 병 관련 *CaPR* (*Capsicum annuum* pathogenesis-related) 유전자의 발현 양상을 확인하였으며, 이때 하기 표 3에 기재된 유전자 특이적 프라이머를 사용하였다. 대조군으로서 인산칼륨 완충액 및 카보르딤만으로 접종한 모조-접종 식물체(Mock)를 이용하였으며, 고추 병 관련 유전자의 발현 수준을 *CaActin* 유전자의 발현으로 표준화하여 결과를 도 9에 나타내었다.

표 3

[0063]

유전자	서열	
<i>CaPR1</i>	정방향	ATCCAGCAGTACTATGCTAT
	역방향	AACAGTAACGTACTCCACAG
<i>CaPR10</i>	정방향	CTGTCTATGTTTAAGCCAATGACC
	역방향	AAAGTTCCTTCCATGACAACCAAT

[0064] 도 9에 나타난 바와 같이 대조군에 비해 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서 TMV-P₀의 접종시 고추 병 관련 유전자인 *CaPR1* 및 *CaPR10* 유전자의 mRNA 발현 수준이 모두 감소하였다. 따라서, *CaHsfB1*의 타겟 유전자가 *CaPR1* 및 *CaPR10*임을 확인하였다.

[0065] 실시예 2 - 담배에서 *NbHsfB1* 유전자의 기능 확인

[0066] 실험예 1에서 확인한 바와 같이, *CaHsfB1* 유전자와 담배의 *NbHsfB1* 유전자가 높은 상동성이 있으므로, *NbHsfB1* 유전자도 *CaHsfB1* 유전자와 유사한 기능을 하는지 확인하기 위하여, 상기 실시예 1.1과 같이 VIGS를 이용하여 *NbHsfB1*-침묵 식물체를 제조하였다. 고추에서 TMV-P₀에 대한 바이러스 저항성 반응으로 나타나는 과민성 세포 사멸을 야생 담배에서 유도시키기 위하여, 3 주된 야생 담배 (*Nicotiana benthamiana*) 잎에 아그로인필트레이션한 뒤 3 주 후에, CaL²와 TMV-P₀ CP 단백질을 발현시킬 수 있는 아그로박테리움을 전개된 잎에 인필트레이션하였다.

[0067] 인필트레이션한 뒤, *NbHsfB1*-침묵 식물에 CaL²와 TMV-P₀ CP의 상호작용이 유도하는 과민성 세포 사멸을 관찰하였으며 그 결과를 도 10에 나타내었다. 그 결과 고추 *CaHsfB1*-침묵 식물체에서와 같이 야생 담배 *NbHsfB1*-침묵 식물체에서도 과민성 세포 사멸이 감소되는 표현형을 관찰하였다. 따라서 *NbHsfB1*-침묵 식물체도 *CaHsfB1*-침묵 식물체와 유사한 기능을 가지고 바이러스에 대한 저항성 반응에 기여함을 알 수 있다.

[0068] 실시예 3 - *CaHsfB1* 유전자의 과발현에 따른 과민성 세포 사멸 증가 확인

[0069] 3.1 *CaHsfB1* 유전자의 과발현 효과 확인

[0070] *CaHsfB1* 유전자의 기능을 확인하기 위해, CaHsfB1::GFP 융합 단백질을 이용해 *CaHsfB1* 유전자의 과발현체를 제조하여 이의 표현형을 관찰하였다.

[0071] 구체적으로, 주형으로는 *CaHsfB1* cDNA를 사용하였고 하기의 표 4와 같은 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 종료 코돈이 없는 *CaHsfB1* 오픈 리딩 프레임 (ORF)을 준비하였다. Gateway BP clonase를 이용한 반응을 통해 pDONR201 벡터 (Invitrogen, USA)에 삽입시켰다. 삽입된 pDONR201-*CaHsfB1*과 데스티네이션 벡터 (destination vector) pGWB405와 Gateway LR clonase를 이용한 반응을 통해 삽입된 유전자를 교환하였다. 최종적으로 pGWB405-*CaHsfB1*을 획득하였다. 획득한 벡터 pGWB405-*CaHsfB1*을 사용하여 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)를 형질전환 시켰다. 형질전환된 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 야생 담배 (*Nicotiana benthamiana*)에 아그로인필트레이션 (agroinfiltration) 방법으로 접종하였다. 담배는 26℃, 31℃에서 각각 배양하였다.

표 4

	서열
정방향	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGTCGAAAGGACAGCGCC
역방향	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCCGTTACAAACCTTGCTGC

[0073] 아그로박테리움의 접종 2일 후에 과발현된 CaHsfB1::GFP의 표현형을 도 11에 나타내었다.

[0074] 도 11에 나타난 바와 같이 26℃에서는 GFP만 과발현된 부위와 달리 CaHsfB1::GFP이 과발현된 부위에서 세포사멸 반응이 나타나며 31℃에서는 CaHsfB1::GFP이 과발현된 부위에서 세포사멸이 사라짐을 확인하였다. CaHsfB1의 과발현을 통해 나타나는 세포사멸 반응이 과민성 세포사멸로 나타나는 반응과 유사하며, 과민성 세포사멸이 CaHsfB1의 과발현만으로 도출되므로 CaHsfB1이 바이러스 병 저항성에 기여함을 알 수 있다.

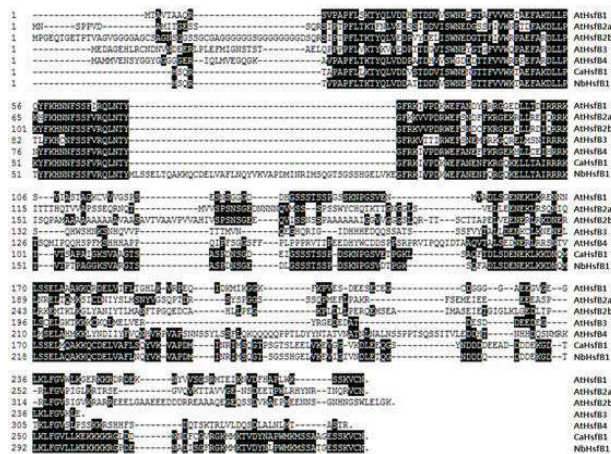
[0075] 3.2 CaHsfB1 단백질의 세포내 위치 확인

[0076] 상기 실시예 3.1에서 얻은 *CaHsfB1* 유전자의 과발현체의 GFP를 이용해 CaHsfB1 단백질의 세포내 위치를 확인하였다.

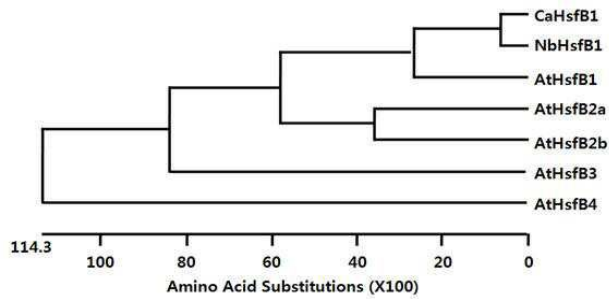
[0077] 아그로인필트레이션 방법으로 접종하여 과발현을 유도한 후 2일에 세포내 위치 관찰을 위해 형광이미지를 fluorescein isothiocyanate filters (excitation filter 520 nm emission filter 488)가 장착된 UV light incident fluorescence microscope (Zeiss, Axioskop, Germany)를 이용하여 캡처 하였고 그 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12에 나타난 바와 같이, CaHsfB1 단백질이 세포의 핵 내에 위치하고 있는 것을 확인하였으며 이로부터 CaHsfB1이 전사조절 인자로서 기능함을 알 수 있다.

[0078] 따라서, 30℃ 이하 온도에서는 CaHsfB1이 핵 안에서 전사 조절인자로 작용하여 식물체의 바이러스에 의한 병 저항성을 증가시키는 기능을 하고, 31℃ 초과 온도에서는 *CaHsfB1* 유전자 발현양의 감소를 통해 그 기능이 저하됨을 확인하였다.

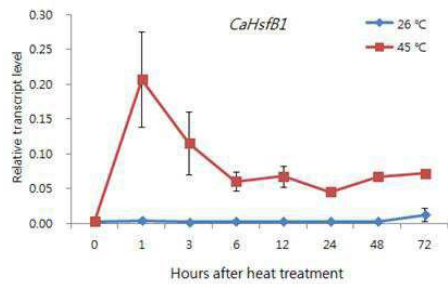
도면3



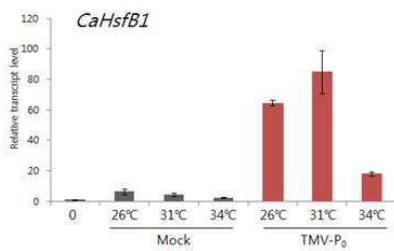
도면4



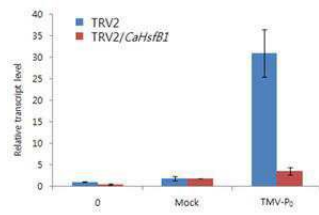
도면5



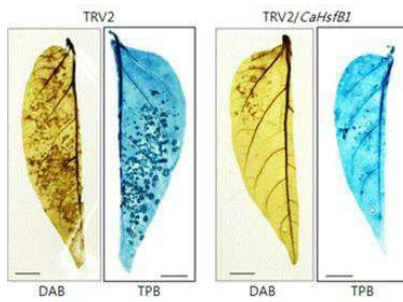
도면6



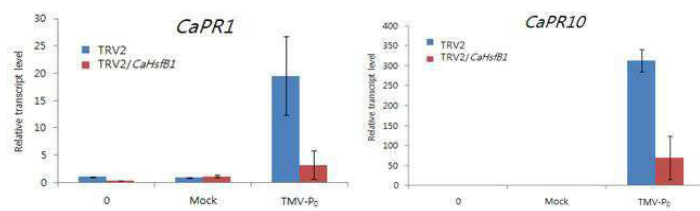
도면7



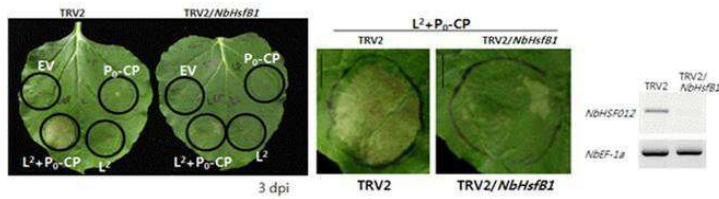
도면8



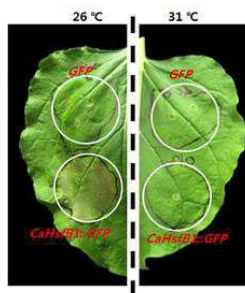
도면9



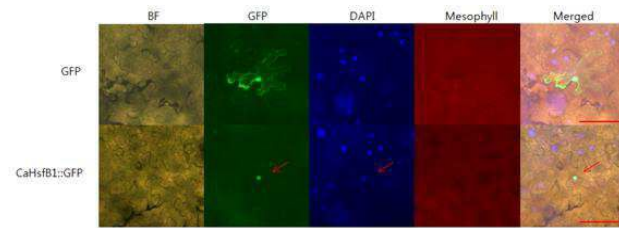
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> A heat shock transcription factor gene, CaHsfB1 and transgenic plants using the same gene
- <130> 1_53P
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1881
- <212> DNA
- <213> Capsicum annuum
- <400> 1

```

agtatagagt accctttttt agttcctctt cgaaaagtct tctaaatatt tctagaacct      60
cttagtactt gtattaaatt attctattccc attcgttttt ctcttcatt accactact      120
atttctttct atccatcaat ttttatactc aaatcttcaa gaagagagag agagagagag      180

agaaaaggca gaaatttctg agctttttat tagagaacat atagatagtt atggtcgtgt      240
tgttcctggt gaagtttggc aaagttgtag ccaatggaag attctaagat catcatcagt      300
cgtcacaaaa acaatctcgt tcattctatt gtctttcttt tcggttttta ttgttgggat      360
tggaattcc tactgctct tttgcttttc agttactgct ccttctaatt taatttcctc      420
cttaggatct tgtcaattaa aattacagct aactcgtaat aagcccaaaa atctccaaag      480
gggatttttt tttttccaaa atttcacaaa gttcgataga tttagtatag caagggatgt      540
cgcaaaggac agcgccggcg ccttttctgt tgaagacgta tcagttgggt gatgatgtgt      600

ccactgacga tgtaatatct tggaatgaaa atggcacaac gtttgtggtt tggaaaactg      660
ctgaatttgc aaaggatttg ctgccaaggt acttcaagca caataatttc tccagctttg      720
ttcgtcagct taacacctat ggatttcgca agatttgtcc tgacaagtgg gaattcgcca      780
acgagaactt caaaagagga cagaaggagc tcctcacagc aatacgccgt cggaagaccg      840
tgacatcagc ccagccatt ggaaagtctg tggcagctgg gacttcagca tctccggaca      900

```

attctgggga tgagataggt tcaagttcaa cctcgtcccc tgactccaag aaccctgggt	960
ccgttgaaac ccttggaag ttgtcggcac aattcacaga cttgtcggac gagaacgaga	1020
agctaaagaa agacaaccag atgctgagct cagagctgat gcaggcgaag aaacaatgtg	1080
atgagttggt tgctttcttg agccagtacg tgaaggttgc acccgatatg atcaatcgaa	1140
tcatgagcca aggaacccca tcggggacaa gccttgaaga gttggtcaag gaggttggtg	1200
gtgttaaaga cttagaagaa caaggtagtt acaatgacga tgatgatgaa gaagctgatg	1260
atgatgacga aaagggtgat actctgaaac tatttggcgt gttattgaaa gaaaagaaga	1320
agaaaagggg tctggatgac aataatgatt ttgcgggggt acgtgggaaa atgatgaaaa	1380
ctgtggacta taatgctcct tggatgaaaa tgcatacggc agctggagag agcagcaagg	1440
tttgtactg aggtgaactt gatgtgttaa ggtggagcag tgcagagcag agtatttagc	1500
ttctcccttt tgatttagta atttcatttg gatttcaaaa gtttgttatt atgaataaat	1560
agagaatctc attagtacga gtagcattgg ggtaagatta ctgctaagag tagtaatctc	1620
aacccccaa tagaactata tacatatcaa ttatcaggac agatgctgca gcccgaagt	1680
ttggtttgca tcgtcgaaac tcataatgat aataataatg gtttctgatt tacgacttcg	1740
tgttcgtgtt gataatggat ctgtaattaa aggccctgca tgacttttta aatcttattc	1800
agtgggaagc acttcatttt agccgagttt ctttctggga accaaccaat cgacctttta	1860
cacaaggga ggacagggtt t	1881
<210> 2	
<211> 304	
<212> PRT	
<213> Capsicum annuum	
<400> 2	
Met Ser Gln Arg Thr Ala Pro Ala Pro Phe Leu Leu Lys Thr Tyr Gln	
1 5 10 15	
Leu Val Asp Asp Val Ser Thr Asp Asp Val Ile Ser Trp Asn Glu Asn	
20 25 30	
Gly Thr Thr Phe Val Val Trp Lys Thr Ala Glu Phe Ala Lys Asp Leu	
35 40 45	
Leu Pro Lys Tyr Phe Lys His Asn Asn Phe Ser Ser Phe Val Arg Gln	
50 55 60	
Leu Asn Thr Tyr Gly Phe Arg Lys Ile Val Pro Asp Lys Trp Glu Phe	

65 70 75 80
 Ala Asn Glu Asn Phe Lys Arg Gly Gln Lys Glu Leu Leu Thr Ala Ile
 85 90 95
 Arg Arg Arg Lys Thr Val Thr Ser Ala Pro Ala Ile Gly Lys Ser Val
 100 105 110
 Ala Ala Gly Thr Ser Ala Ser Pro Asp Asn Ser Gly Asp Glu Ile Gly

 115 120 125
 Ser Ser Ser Thr Ser Ser Pro Asp Ser Lys Asn Pro Gly Ser Val Glu
 130 135 140
 Thr Pro Gly Lys Leu Ser Ala Gln Phe Thr Asp Leu Ser Asp Glu Asn
 145 150 155 160
 Glu Lys Leu Lys Lys Asp Asn Gln Met Leu Ser Ser Glu Leu Met Gln
 165 170 175
 Ala Lys Lys Gln Cys Asp Glu Leu Val Ala Phe Leu Ser Gln Tyr Val
 180 185 190

 Lys Val Ala Pro Asp Met Ile Asn Arg Ile Met Ser Gln Gly Thr Pro
 195 200 205
 Ser Gly Thr Ser Leu Glu Glu Leu Val Lys Glu Val Gly Gly Val Lys
 210 215 220
 Asp Leu Glu Glu Gln Gly Ser Tyr Asn Asp Asp Asp Asp Glu Glu Ala
 225 230 235 240
 Asp Asp Asp Asp Glu Lys Gly Asp Thr Leu Lys Leu Phe Gly Val Leu
 245 250 255
 Leu Lys Glu Lys Lys Lys Lys Arg Gly Leu Asp Asp Asn Asn Asp Phe

 260 265 270
 Cys Gly Val Arg Gly Lys Met Met Lys Thr Val Asp Tyr Asn Ala Pro
 275 280 285
 Trp Met Lys Met Ser Ser Ala Ala Gly Glu Ser Ser Lys Val Cys Asn
 290 295 300