



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월18일
 (11) 등록번호 10-1640586
 (24) 등록일자 2016년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 15/8231 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0077866
 (22) 출원일자 2015년06월02일
 심사청구일자 2015년06월02일
 (56) 선행기술조사문헌
 Guo-Wei Tian 등. *Developmental Biology*. Vol. 294, No.1, 페이지 83-91 (2006.02.16.)

(73) 특허권자
주식회사 바이오메딕
 경기도 부천시 원미구 길주로 276, 908호 (중동, 무광오피스빌딩)
 (72) 발명자
김호방
 서울특별시 관악구 성현로 80, 109동 401호 (봉천동, 관악드림타운아파트)
엄윤경
 인천광역시 남동구 만수서로 55, 123동 1303호 (만수동, 향촌휴먼시아아파트)
고승희
 서울특별시 관악구 봉천로 323, 402호 (봉천동)
 (74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

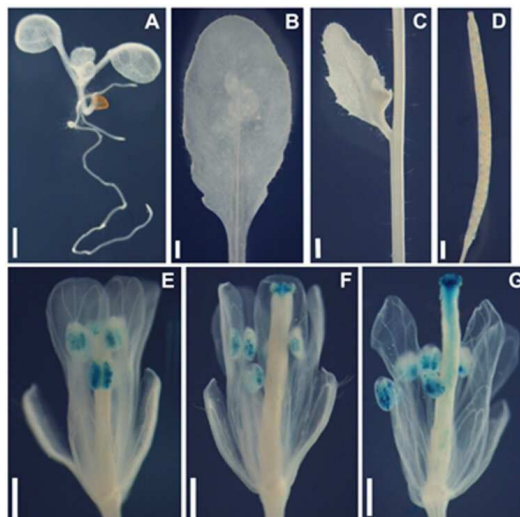
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **키위 유래 화분 또는 화분관 특이적 프로모터 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 키위 유래 화분 또는 화분관 특이적 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 키위 (*Actinidia chinensis*) 유래 화분 또는 화분관 특이적 *KiwiPME1* 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 식물 발현 벡터, 상기 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것으로, 본 발명의 프로모터가 화분 발달단계에서 발현 특이성이 매우 우수하므로, 웅성 불임 식물을 생명공학적으로 육성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0025968
 부처명 중소기업청
 연구관리전문기관 경기지방중소기업청
 연구사업명 산학연공동기술개발사업
 연구과제명 키위 성관별용 분자마커 개발
 기여율 1/2
 주관기관 (주)바이오메딕
 연구기간 2012.06.01 ~ 2013.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213003-04-3-SBS30
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 GSP원예종자사업단
 연구사업명 Golden Seed Project
 연구과제명 감귤 주요형질 연관 분자표지 개발
 기여율 1/2
 주관기관 (주)바이오메딕
 연구기간 2013.07.25 ~ 2017.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 키위(*Actinidia chinensis*) 유래의 화분 또는 화분관 특이적 발현 유도용 *KiwiPME1* 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터를 포함하는 화분 또는 화분관 특이적 식물 발현 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 유전자가 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물 발현 벡터.

청구항 4

제3항의 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체.

청구항 5

제2항의 식물 발현 벡터에 목적 유전자를 재조합하는 단계; 및

상기 재조합된 식물 발현 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 6

제5항의 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항의 형질전환 식물체의 형질전환된 종자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 키위 유래 화분 또는 화분관 특이적 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 키위 (*Actinidia chinensis*) 유래 화분 또는 화분관 특이적 *KiwiPME1* 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 식물 발현 벡터, 상기 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법, 상기 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프로모터(promoter)는 구조유전자(gene)의 상류(upstream)에 연결되어 있는 유전체(genome) 부위로서, 이에 연결된 구조유전자가 mRNA로 전사(transcription)되도록 조절하는 역할을 한다. 식물체로 도입되는 외래 유전자(즉, 트랜스진(transgene))의 발현은 전사적, 후-전사적(post-transcriptional), 번역적 및 후-번역적(post-translational) 요소들에 의해 큰 영향을 받는다. 상기 요소들 중 특히, 전사적 요소에 속하는 프로모터는 외래 유전자의 전사에 직접적인 영향을 끼쳐 결과적으로 발현의 수준을 변화시키며, 외래 유전자가 발현되는 단계, 조직 또는 세포 특이성을 변화시킬 수 있는 가장 중요한 요소이다. 현재까지, 외래 유전자의 발현을 위하여 다양한 식물체로부터 수많은 프로모터들이 분리되었지만, 그들 중 소수만이 식물의 형질전환에 실제로 이용되고 있다.

- [0003] 조직 특이적 프로모터는 특정한 세포에서만 유전자가 발현되게 하는 프로모터로 유전자 발현을 특이 조직 또는 세포에 한정시키는 데 이용할 수 있다. 외래 유용 유전자의 식물 조직 특이적인 발현은 식물에 변형된 특성을 나타내도록 할 수 있기 때문에 연구 및 원예 산업 분야에 있어서 중요한 가치를 지닌다.
- [0004] 예를 들어, 꽃의 화분과 약에 특이적으로 발현하는 프로모터로 단백질 합성을 억제하는 유전자를 연결하여 inbred 라인을 만들거나 특정 목적을 위하여 음성 불임 등을 유도하기 위한 목적으로 화분 특이 프로모터가 개발되었고, 꽃의 웅성기관 약의 융단조직 특이 BcA9 프로모터는 세포에 독성을 갖는 Bt 단백질 유전자의 발현을 유도케 함으로써 음성 불임 작물을 개발한 바 있다.
- [0005] 따라서 자가 불화합성인 품종이나, 꽃이 작아 임성의 판별이 어려운 품종에 있어 교배에 의한 종자 생산이 어려운 품종 또는 일대잡종 종자에 의한 우량종자 생산을 위해 활용되고 있는 교배에 의한 음성 불임 유도는 시간 및 노동력이 필요하므로 이의 개선을 위해 화분이 생성되는 시기부터 수분되기까지 화분에서 특이하게 발현하는 새로운 프로모터의 개발이 요구되고 있다.
- [0006] 한편, 한국등록특허 제1185845호에는 '벼의 화분에서 발현하는 pLim3 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현벡터, 이 발현벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이 형질전환체의 제조방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제 0527285호에는 '벼 수술 특이적 발현 시스템인 프로테아제 유전자, 상기 유전자의 수술 특이적 발현 프로모터, 상기 유전자의 발현억제를 이용한 음성 불임 도입 벼의 생산방법'이 개시되어 있으나 본 발명의 키워 유래 화분 또는 화분관 특이적 프로모터 및 이의 용도에 대해서는 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 키워 유래의 화분 또는 화분관 특이적 *KiwiPME1* 프로모터를 포함하는 식물 발현 벡터를 애기장대에 형질전환시킨 결과, 형질전환 식물체에서 목적 유전자가 화분 또는 화분관에서 특이적으로 발현되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 키워(*Actinidia chinensis*) 유래의 화분 또는 화분관 특이적 *KiwiPME1* 프로모터를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 화분 또는 화분관 특이적 식물 발현 벡터를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 벡터에 목적 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합된 식물 발현 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 서열번호 2 및 3의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 키워(*Actinidia chinensis*) 유래의 화분 또는 화분관 특이적 *KiwiPME1* 프로모터 증폭용 프라이머 세트를 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 키워의 꽃가루 발달과정 동안 화분에서 제한적으로 발현을 유도할 수 있는 *KiwiPME1* 프로모터에 관한 것으로, 본 발명의 프로모터는 화분 발달 단계에서만 특이적으로 유전자 발현을 유도할 수 있고, 화분 조직 및 발달 단계에서 발현 특이성이 매우 우수하므로, 음성 불임 식물을 생명공학적으로 육성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 키위 유래 *KiwiPME1* cDNA 클론의 전체 아미노산 서열(A), *KiwiPME1* 단백질 구조의 개략적인 도식(B) 및 *KiwiPME1*과 다른 식물체의 그룹 2에 속하는 PME의 계통분류학적 유연관계 분석(C)을 나타낸 것이다.

도 2는 *KiwiPME1* 유전자의 게놈 염기서열(상) 및 게놈 구조의 개략적인 도식(하)을 나타낸 것이다. 회색 박스는 엑손을 나타낸다.

도 3은 *KiwiPME1* 유전자의 발현양상을 다양한 조직별(Rt; 뿌리, St; 줄기, Lf; 잎, Fr; 열매, Sa; 정단(shoot apex), Pg; 화분립(pollen grains))로 분석한 RT-PCR 결과(A) 및 암꽃/수꽃 각각의 꽃봉오리와 개화된 꽃 조직(꽃잎(petal), 꽃받침(sepal), 암술(pistil), 수술(stamen)) 별로 분석한 RT-PCR 결과(B)를 나타낸 것이다. 액틴; 양성 대조구.

도 4는 *KiwiPME1* 프로모터 지역의 염기서열을 나타낸 것이다. 개시코돈;ATG(밑줄), 3개의 화분 또는 화분관 특이적 시스-조절 모티프인 AGAAA, AATTGA 및 C[A/T]₆G은 회색 상자로 나타낸다.

도 5는 애기장대 형질전환 식물체에서의 *KiwiPME1* 프로모터 활성에 대한 GUS 조직화학적 분석을 나타낸 것이다. A; MS 배지에서 자란 8일령 유묘, B; 로제트 잎, C; 줄기 및 줄기잎(cauline leaf), D; 열매, E; 개화기의 꽃, F 및 G; 수분 후(post-pollination) 단계의 꽃. 5주 동안 자란 형질전환 식물체의 조직을 GUS 염색에 사용하였다(B 내지 G). A-D의 스케일 바=1mm, E-G의 스케일 바=0.5mm.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 키위(*Actinidia chinensis*) 유래의 화분 또는 화분관 특이적 *KiwiPME1* 프로모터를 제공한다.

[0018] 상기 화분 또는 화분관 특이적 *KiwiPME1* 프로모터는 키위(*Actinidia chinensis*)에서 분리된 것으로, 펙틴 메틸 에스테라제(Pectin methylesterase)를 암호화하는 유전자의 개시코돈으로부터 상류(upstream) 약 1.2kb에 해당하는 프로모터이다.

[0019] 펙틴 메틸에스테라제(Pectin methylesterase, PME, EC 3.1.1.11, 이하 PME로 함)는 펙틴의 메틸에스테르 결합을 가수분해하여 펙틴산과 메틸알코올로 분해하는 효소로 고등식물이나 미생물에 존재하며, 특히 고등식물에 존재하는 것은 불용성 세포질 분획에 결합하고 있다. 식물체 PME 유전자는 초기에 pre-protein 또는 pre-protein 단백질로 합성되어 pre-region 또는 신호 펩티드(signal peptide)에 의해 소포체(endoplasmic reticulum)에 위치하였다가, pro-region이 절단된 후 최종적으로 apoplasm으로 분비되어진다. Pro-region은 PME1(PME inhibitor) 도메인과 서열 유사성을 가진다. PME 유전자는 PME1 도메인의 유무에 따라 그룹 1(PME1 도메인이 없는)과 그룹 2(PME1 도메인이 있는)로 나눌 수 있다. 한편, 식물체 PME는 화분 발달을 포함한 다양한 식물의 성장 및 발달 과정에 관여하며, 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 방어 기작과도 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 화분 또는 화분관에서 특이적으로 발현하는 키위 유래 PME 유전자인 *KiwiPME1* 유전자는 본 발명자에 의해 처음으로 밝혀졌다.

[0020] 용어 "특이적"은 프로모터의 발현 활성이 동일한 식물체 내의 적어도 하나 이상의 다른 조직보다 특정한 조직 내에서 더 높다는 것을 의미한다. 프로모터의 발현 활성의 수준은 일반적으로 사용되는 방법을 이용하여 미리 측정된 조직 내에서의 프로모터의 발현수준을 다른 조직 내에서의 것과 비교함으로써 평가된다. 일반적으로 프로모터의 발현수준은 프로모터의 조절 하에서 발현된 유전자 생성물, 예를 들어 단백질 및 RNA 등의 생성량에 의해 측정될 수 있다.

[0021] 본 발명의 *KiwiPME1* 프로모터는 형질전환 식물체에서 도입된 유전자를 화분 또는 화분관 특이적으로 발현시킬 수 있다.

[0022] 또한, 상기 프로모터 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상동체의 염기 서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, 상기 프로모터 서열은 서열번호 1의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제체를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0023] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 키위(*Actinidia chinensis*) 유래의 화분 또는 화분관 특이

적 *KiwipME1* 프로모터를 포함하는 화분 또는 화분관 특이적 식물 발현 벡터를 제공한다.

- [0024] 본 발명의 화분 또는 화분관 특이적 식물 발현 벡터는 목적 유전자를 도입한 식물체 내에서 일시적으로 발현시킬 수 있는 일시적(transient) 발현 벡터 및 목적 유전자를 도입된 식물체에서 영구적으로 발현시킬 수 있는 식물 발현 벡터로 사용할 수 있다.
- [0025] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서(enhancer), 종결 신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0026] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- [0027] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, phaseolin(Phaseolin) 터미네이터, 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 Ti 플라스미드와 함께 존재시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 RB(right border)와 LB(left border)를 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 자주 사용되는 pBI101(Cat#: 6018-1, Clontech, 미국), pBIN19(Genbank 수탁번호 U09365), pBI121, pCambia 벡터를 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 상기 식물 발현 벡터는 본 발명의 프로모터의 하류(downstream)에 목적 유전자를 작동가능하게 연결시켜 제조된 것일 수 있다. 본 발명에서, "작동가능하게 연결된"은 이중 단백질을 발현하기 위한 단위로서 기능하는 발현 카세트의 성분을 말한다. 예를 들면, 단백질을 코딩하는 이중 DNA에 작동가능하게 연결된 프로모터는 이중 DNA에 해당하는 기능적 mRNA의 생산을 촉진한다.
- [0031] "목적 유전자"는 목적하는 생성물을 암호화하는 일정 길이의 핵산 서열로서 정의될 수 있다. 목적하는 생성물은 그 자체가 생물학적으로 활성인 단백질이거나 전사 후 특정 유전자의 불활성에 관여하는 RNA(예컨대 RNAi에 관여하는 siRNA)일 수 있다. 이러한 목적 유전자는 일반적으로 센스 방향으로 벡터 내에 존재할 것이지만, 특정 유전자를 불활성화시키기 위하여 안티센스 방향으로 존재할 수도 있다. 목적 유전자가 생물학적으로 활성인 단백질을 암호화하는 유전자라면 그 유전자는 통상 5' 비번역리더서열(5'UTR), 코딩 서열 및 3' 비번역서열(3'UTR)을 포함할 것이다.
- [0032] 또한 목적 유전자는 절단된 형태의 단백질, 융합된 형태의 단백질, 태그된 형태의 단백질을 암호화하는 서열일 수 있으며, cDNA 또는 게놈 DNA일 수 있고, 천연 형태의 생성물을 암호화하는 서열이거나 원하는 돌연변이 형태의 생성물을 암호화하는 서열일 수 있다. 이러한 목적 유전자는 그 목적 생성물이 인간에게 직·간접적으로 유용한 것이라면 임의의 것이라도 무방하다. 또한 이러한 목적 유전자는 임의의 것으로부터 기원할 수 있는데, 예컨대 식물, 세균, 동물, 바이러스 등으로부터 기원할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 키위(*Actinidia chinensis*) 유래의 화분 또는 화분관 특이

적 *KiwipME1* 프로모터를 포함하는 화분 또는 화분관 특이적 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

- [0034] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체는 다래나무과의 키위를 포함하여 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물일 수 있다.
- [0035] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물종의 형질전환은 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 수행하는 것이 가능하다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 형질전환 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코딩된) 입자충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 화분의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 더욱 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 바이너리 벡터 기술을 이용하는 것이다.
- [0036] 식물의 형질전환에 이용되는 식물 세포는 어떠한 식물 세포도 가능하며, 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관, 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 사용할 수 있다.
- [0037] 식물의 형질전환에 이용되는 식물 조직은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 열매, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 또는 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 또는 캘러스 조직을 포함하지만 이에 한정되진 않는다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은
- [0039] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 키위(*Actinidia chinensis*) 유래의 화분 또는 화분관 특이적 *KiwipME1* 프로모터를 포함하는 화분 또는 화분관 특이적 식물 발현 벡터에 목적 유전자를 재조합하는 단계; 및
- [0040] 상기 재조합된 식물 발현 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0041] 상기 목적 유전자는 식물체 화분에서 발현을 원하는 어떤 유전자도 될 수 있으며, 본 발명의 화분 또는 화분관 특이적 발현 벡터에서 상기 프로모터의 하류(downstream)에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다. 상기 재조합된 화분 또는 화분관 특이적 발현 벡터를 식물체에 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같이 실시할 수 있다. 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 식물체는 전술한 바와 같다.
- [0042] 또한, 본 발명의 방법에 의해 제조된 목적 유전자가 화분 또는 화분관 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 상기 형질전환 식물체는 화분 또는 화분관 특이적 발현 프로모터에 의해 목적 유전자를 화분 또는 화분관 특이적으로 발현시킬 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 서열번호 2 및 3의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 키위(*Actinidia chinensis*) 유래의 화분 또는 화분관 특이적 *KiwipME1* 프로모터 증폭용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0044] 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 2의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상, 27개 이상, 28개 이상, 29개 이상, 30개 이상, 또는 31개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다.
- [0045] 또한, 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 3의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상, 27개 이상, 28개 이상, 29개 이상, 30개 이상, 31개 이상, 32개 이상, 33개 이상, 34개 이상, 35개 이상, 36개 이상, 또는 37개

이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0046] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 프라이머 세트는 키위로부터 분리한 게놈 DNA로부터 *KiwiPME1* 프로모터를 증폭할 수 있도록 설계된 각각 32bp, 38bp로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 구성될 수 있다. 상기 프라이머는 화분 또는 화분관 특이적 *KiwiPME1* 프로모터를 증폭하기 위해 사용된다.

[0047] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 복제하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥의 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity) 뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0048] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드 유사체(analogue)일 수 있으며, 이에 한정하지 않는다. 뉴클레오티드 유사체(analogue)는 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] **실시예 1. 키위 유래 펩틴 메틸에스테라제를 암호화하는 *KiwiPME1* 전장 cDNA 및 게놈 유전자 분리**

[0051] 본 발명자는 이전 연구에서 분리하였던 *KiwiDEG1* 유전자 단편(Kim 등, 2010, African J. Biotech. 9:6684-94)으로부터 DNA walking 방법을 통하여 전장(full length) cDNA를 클로닝하였으며 이를 *KiwiPME1*으로 재명명하였다. *KiwiPME1* 전장 cDNA를 클로닝하기 위해서 DNA Walking SpeedUp™ Premix Kit(Seegene)을 사용하였다. 수그루(male plant)의 꽃봉오리에서 추출한 전체 RNA로부터 합성한 제1 가닥 cDNA를 PCR 증폭의 주형으로 사용하였다. 전장 cDNA는 하기의 프라이머 세트로부터 PCR를 통해 수득하였다: *KiwiPMEoxF*, 5'-CGGGATCCGCTTGTTCAGAGAGCTAGGGAGA-3' (서열번호 4); 및 *KiwiPMEoxR*, 5'-CGGGATCCTTGAATGAACAGACACATCATTAGGCA-3' (서열번호 5). PCR 산물은 pGEM-T vector로 클로닝하고 ABI3730 DNA analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

[0052] *KiwiPME1* 단백질의 전장 아미노산 서열(서열번호 6) 분석 결과 *KiwiPME1*은 589개의 아미노산을 갖는 pre-pro-PME 단백질로 신호 펩티드(SP), TM 도메인(transmembrane(TM) domain), PME1 도메인(PME inhibitor domain, Pfam04043), 프로세싱 모티프(processing motif, PM), PME 활성 도메인(PME activity domain, Pfam01095)를 포함하는 단백질을 암호화함을 보여주었다(도 1A, B).

[0053] *KiwiPME1*의 계통발생학적 관계를 규명하기 위해 계통수 분석을 한 결과 *KiwiPME1*은 그룹 2 PME에 속하며, *AtPME1*(At1g69940)은 그룹 1 PME로 아웃그룹(outgroup)에 해당하였다(도 1C).

[0054] *KiwiPME1* 전장 cDNA 염기서열로부터 디자인한 프라이머 세트를 이용하여 *KiwiPME1* 게놈 유전자 염기서열(서열번호 7)을 확보하였다. 이 때 사용된 게놈 DNA는 GeneAll® Exgene™ Plant SV mini kit (GeneAll Biotechnology Co.)을 사용하여 잎 조직으로부터 추출한 것이다. 그 결과 73개 뉴클레오티드를 가지는 한 개의 인트론(5' 말단에는 GU, 3' 말단에는 AG를 가짐)을 함유하는 게놈 클론을 획득하였다(도 2). *KiwiPME1* 게놈 분석 결과 역시 *KiwiPME1* 유전자는 인트론 1 내지 2개를 함유하는 그룹 2 PME 유전자 특성을 나타내었다.

[0055] **실시예 2. 키위 유래 *KiwiPME1* 유전자의 발현양상 분석**

[0056] *KiwiPME1* 유전자의 발현양상을 조사하기 위하여 RT-PCR 분석을 수행하였다. 키위(kiwifruits) 식물체의 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 등 여러 조직으로부터의 전체 RNA를 RNeasy Plant Mini kit(Qiagen)을 이용하여 추출하여 RQ1 RNase-free DNase(Promega)를 처리한 후 RNeasy Mini Kit(Qiagen)로 정제하였다. 추출한 전체 RNA 5µg를 MMLV-역전사효소((Moloney Murine Leukemia Virus-reverse transcriptase; Invitrogen)를 이용하여 제1 가닥 cDNA 합성에 이용하였다. PCR 증폭 조건은 하기와 같다: 96°C, 5분 초기변성에 이은 94°C/15초, 55°C/30초, 및 72°C /1분의 25-30 사이클 후, 72°C에서 10분 동안 최종 연장. 액틴(actin)을 코딩하는 전사체를 양성 대조군으로서

증폭하였다. RT-PCR에 대한 프라이머는 Kim 등(2010, African J. Biotech. 9:6684-6694)에서와 동일하게 사용하였다.

[0057] RT-PCR 분석을 통해 조직별 발현 양상을 살펴본 결과, *KiwiPME1* 전사체는 뿌리, 줄기, 잎, 열매, 정단(shoot apex)에서 전혀 나오지 않았으나, 화분립(pollen grain)에서 관찰되었다(도 3A). 꽃 조직에서의 발현양상을 좀 더 구체적으로 조사하였다. 그 결과 수그루(male plant) 꽃봉오리와 개화된 꽃 단계 모두에서의 수술(stamen)에서 강하게 발현되었으며 암술(pistil)에서 약하게 관찰되었다. 암술에서의 *KiwiPME1* 전사체 발현은 암술머리(stigma)에 부착된 화분립(pollen grain)에 기인한 것으로 추정된다. 암그루(female plant)에서는 개화기(anthesis) 전 꽃봉오리의 수술(stamen)에서만 관찰되었다(도 3B). *KiwiPME1*이 암그루의 개화기(anthesis) 전 수술에서 발현되지만, 개화기 후 수술(stamen)에서는 발현되지 않는 것은 성 분화(sex differentiation) 동안 응성 불임을 야기시키는 PCD(programmed cell death) 현상과 관련있는 것으로 추정된다.

[0058] 실시예 3. 키위 유래 *KiwiPME1* 프로모터 분리, 식물 발현 벡터 제작 및 이를 이용한 애기장대 형질전환

[0059] 본 발명자는 DNA walking SpeedUp™ Premix kit(Seegene)을 이용하여 *KiwiPME1* 프로모터 영역을 클로닝하였다. 약 1.2kb 크기의 *KiwiPME1* 프로모터는 표 1의 서열번호 2와 3의 프라이머 세트를 제작하여 PCR를 통해 분리하였다.

표 1

KiwiPME1 프로모터 증폭용 프라이머

프라이머명	염기서열
KiwiPMEpF	5'-CGGGATCCTCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGG-3'(서열번호 2)
KiwiPMEpR	5'-CATGCCATGGTTTTTCTTTCTTATTATTTTTTGGG-3'(서열번호 3)

[0061] 증폭된 PCR 산물들은 pGEM-T easy vector(Promega)에 클로닝한 후 ABI3730 DNA analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 약 1.2kb의 *KiwiPME1* 프로모터의 염기서열(서열번호 1)을 획득하였다(도 4). 상기 *KiwiPME1* 프로모터에 대해 PLACE(Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements) 데이터베이스(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)를 이용하여 전사조절부위를 분석하였다. 특히 기존에 알려져 있던 화분-특이적 시스 조절인자(cis-acting regulatory element)인 AGAAA, AATTGA 또는 C[A/T]₈G 모티프 여부를 확인하였다. 그 결과 본 발명의 *KiwiPME1* 프로모터에서도 이들 모티프가 존재하였다; AGAAA 모티프의 경우, 개시코돈으로부터 상류 293(+ 가닥), 426(- 가닥), 706(+), 1061(-), 1081(-), 1163(+), 및 1168(+에 존재; AATTGA 모티프의 경우, 개시코돈으로부터 상류 380(+), 404(+), 522(+), 및 607(-)에 존재; C[A/T]₈G 모티프의 경우, 개시코돈으로부터 상류 979(±)에 존재(도 4). 이는 *KiwiPME1*의 화분 또는 화분관 특이적 발현이 애기장대 같은 다른 식물 중에서 작용하는 보존적인 화분 특이적 시스 조절인자에 의해 작용할 수 있음을 시사한다.

[0062] 실시예 4. *KiwiPME1* 프로모터가 삽입된 발현 벡터 제작 및 이를 이용한 애기장대 형질전환

[0063] 약 1.2kb의 *KiwiPME1* 프로모터를 포함하는 *Bam*HI/*Nco*I 절편을 GUS-GFP 리포터 유전자와 융합한 후, pCAMBIA1301 바이너리 벡터(<http://www.cambia.org>)에 서브클로닝하여 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 GV3101에 형질전환하였으며, 최종적으로 플로랄 딥핑(floral dipping) 방법에 따라 애기장대 생태형 콜롬비아-0에 도입하였다.

[0064] 애기장대 형질전환 식물체는 40 µg/mL의 하이그로마이신(hygromycin)를 포함하는 MS 플레이트에서 선별하였다. GUS 조직화학적 분석은 Stomp의 방법(1992, GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression)으로 수행하였다. 즉 형질전환 식물체의 각 조직을 진공하에서 3분 동안 GUS 염색 용액(0.1 M 인산 나트륨완충액(sodium phosphate buffer)(pH 7.0), 0.1%(v/v) Triton X-100, 10mM EDTA, 0.5mM K₃Fe(CN)₆, 0.5mM K₄Fe(CN)₆, 및 1mM X-gluc)에 침윤시키고 37°C에서 12시간 동안 반응시키고, 에탄올을 사용하여 탈색시켰다. 올림푸스 디지털 카메라(Model C5060)가 장착된 올림푸스 SZX9 스테레오 현미경을 사용하여 이미지를 얻었다.

[0065] 실시예 5. 형질전환 식물체의 GUS 발현 분석

[0066] 상기 실시예 4에서 프로모터 영역과 GUS-GFP 리포터 유전자가 융합된 벡터를 애기장대에 형질전환하였다. 형질전환 애기장대의 각 조직에서의 GUS 활성을 조직화학적 염색 방법으로 분석하였다. 그 결과 형질전환 애기장대의 유효와 로제트 잎, 줄기, 열매 같은 영양 조직(vegetative tissues)에서는 GUS 발현이 전혀 관찰되지 않았다(도 5A-D). 개화기(anthesis) 또는 수분 후(post-pollination) 단계의 화분(pollen)에서 GUS 활성이 강하게 확인되었다(도 5E-G). 또한 암술머리(stigma)와 stilar transmitting tract에서도 GUS 활성이 확인되었다(도 5F, G). 이의 결과를 통해 *KiwiPME1* 프로모터는 화분립(pollen grain)과 발아 중인 화분관(pollen tube)에서 특이적으로 발현을 유도하는 것을 확인하였다.

도면

도면1

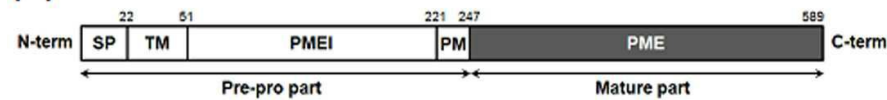
(A)

▼

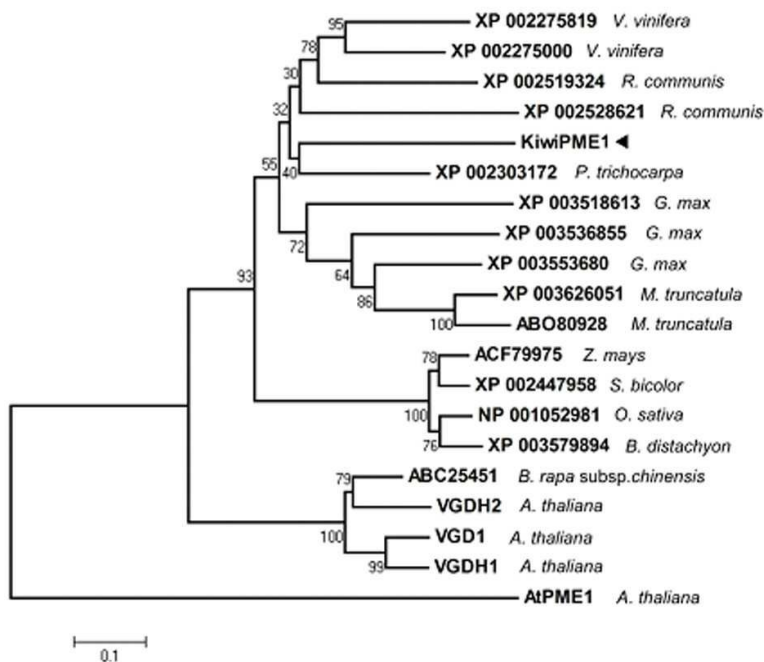
```

MAVGKVVAS FVS ILLVVG VVIGV VAFANRRNGANANKETATVSTSSKAVTS ICATINYKD 60
ACMNSLGNVAKNESATPKDYILAAIQAAIEEAQXSFNITESIKFD FEKNPTQKMAVDDCK 120
DLLESAVEDLQA AF SMVGDSELHTLNDRVFEVLNWF TAVVSYQQSCLDELEVPELKSPIE 180
NGMLNATQLT SNAINIVAKITEILQAFNINIDSFKTNSTNSRKLLQVTEVGHG DYPTWFP 240
VADRKLLLEAHGGHRHGGHHQAAGGARVT PNAVVAQD GSGQYKTI SAAVAAIPTKHQGRW 300
IIYVKAGIYSE YVT IPKSATDV FMYGDGPTRT IVT GSKNFAIRKIPTMQTAT FAVVGKGF 360
IAKMGFRNTAGTQGHQAVAFRSQSDMSAYVDCR FEGYQDTLYYQSNRQLYRNCFISGTV 420
DFIFGRGTALIQNSEIQLRMPPEPQQNTVTADGNHEENGIAGLVLQNCRITAEPELFPKR 480
LTIKNYLGRFWDKFSITAVIESEIGDLIQPEGWVWATAPNHETATVVEYGNRGAGANTD 540
KRVKWRNFKAI TNKNEVLKYTASILLEGGKTPSKWLAGTGV PVDMSLIH 589
    
```

(B)



(C)



도면2

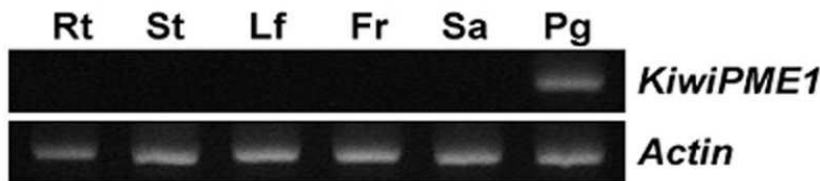
```

GCTTGTTC CAGAGAGCTAGGGAGAGAGATTGAGTGAATCACCCCAAAATAAATAAATA      60
ATAATAATAAAAAGCAAAAATGGCTGTGGGAAGGTGGTTGCTTCGTTCTGTCAATCCT      120
GCTGGTAGTAGGAGTGGT GATCGGTGTGGTTGCGTTTGCAAATAACCGCAATGGGCGAA      180
TGCGAACAGGAAACAGCGACGGTGTCCACGTGTCCTCAAGGCGGTTACGAGCATTTCGCGC      240
AACCACCAATTACAGGACGCTTGCATGAACAGCCTTGCCAACGTGGCCAAAGAACGAAAG      300
CGCCACCCCTAAGGACTACATCTTGGCTGCCATT CAGGCAGCCATTGAGGAGGCCAGAA      360
GTCCTTCAACATTACGAAATCCATCAAGTTTGACTTTGAGAAGAACCCAACCCAAAAAAT      420
GGCTGTGACGATTGTAAGGATTTGTGGAAATCCGCTGTGGAGGACCTCCAGGCCGCCCTT      480
CTCCATGGTGGGTGACAGCGAATTGCACACCCCTCAACGATCGTGTCTTTGAAGTTTGA      540
CTGGTTCACCGCGTGGTCTCTACCAACAATCCTGCCCTGACGAACTCGAAGTGCCCGA      600
ACTCAAGAGCCCTATCGAGAATGGTATGCTCAACGCCAACCAGCTCACTAGCAATGCCAT      660
CAACATTTGTTGCCAAGATCACCGAGATCCTTCAAGCCTTCAACATCAACATCGATAGTTT      720
CAAAACCAATTCACCAACTCCCGCAAGCTTCTTCAAGTGACCGAGGTTGGCCACGACGG      780
CTACCCCACTGGTCCCGGTGGCAGATCGCAAGCTTCTGGAAGCAGATGGCGGCCACAG      840
ACATGGCGGCCACCACCACCAAGCTGCTGGCGGAGCCAGAGTAACACCCCAATGCTGTGGT      900
TGCCCAAGACGGGAGCGGACAGTACAAGACTATTCGGCTGGGTTGCTGCAATCCCCAC      960
GAAGCACCAAGGAAGATGGATCATCTACGTAAAGGCCGGCATCTACAGTGAGTACGTAC      1020
CATCCCAAGAGCGCTACCGAGCTCTCAATGTACGGAGATGGACCCACCAGGACCATCGT      1080
CACCGGTTCCAAAAACTTTGCCATCGCAAAAATCCCAACCATGCAAACTGCCACATTCGg      1140
tacgcaattttttgtttttgactgattcactaactaatcaaatagcagtcattaat      1200
gcatgcatgagCTGTTGTTGGAAAAGGGTTCATCGCCAAGGGAATGGGATTCGGCAACA      1260
CAGCAGGTACACAGGGT CATCAGGCGGTGGCATT CAGAAGCCAGTCCGATATGTCTGCGT      1320
ACGTCGACTGCAGGTTCGAGGGCTACCAAGACACTCTATACTACCAGAGCAACCCTCAGC      1380
TGTACCGCAACTGCTTCATCAGCGGCACCGTTGACTTCATCTTCGGCAGAGGCACAGCTT      1440
TGATTCAAACAGCGAGATT CAGCTAAGGATGCCCGAGCTAACCCAGCAGAACACAGTCA      1500
CTGCTGACGGAAACCACGAGGAGAACGGCATTGCTGGATTGGTTCTCCAGAACTGCAGGA      1560
TCACAGCGGAGCCCGAATTGTTCCCCAAAAGGCTTACCATCAAGAACTACCTGGGACGCC      1620
CTTGGGACAAAATTCTCAACCAAGCTGTGATTGAGAGCGAGATCGGAGATTTGATCCAAC      1680
CTGAGGGATGGATGGTTTGGGCCACC GCCCCCAACCACGAAACAGCAACCGTGGTTGAGT      1740
ACGGCAACAGGGGAGCCCGTGTAAACACCACAAAAGGTC AATGAGGAACTCAAGG      1800
CCATACCAACAAGAAGCAGGTTCTCAAATACACTGCTTCCATCTCTCGAAGGAGGCA      1860
AGACCCCTAGCAAGTGGCTGGGCGGTACCGGTGTCCAGTCGATATGAGTCTTATCCAT      1920
AAATTAATCAACATGCCTACCAAGAGATCGAGAGTTACTGAAAGAGAGAGAAAGATAG      1980
ATAGAACGTCCTGAGAGAAACAATCAATTGTAATTAGCCCGGCAACCTAATCCTAAGA      2040
ACTGCTCTGTTTGGGCGGCTATCTACGTCTCTTCTTTCGCTAATGATGTGCTGTTCA      2100
TTGCAA      2106
    
```

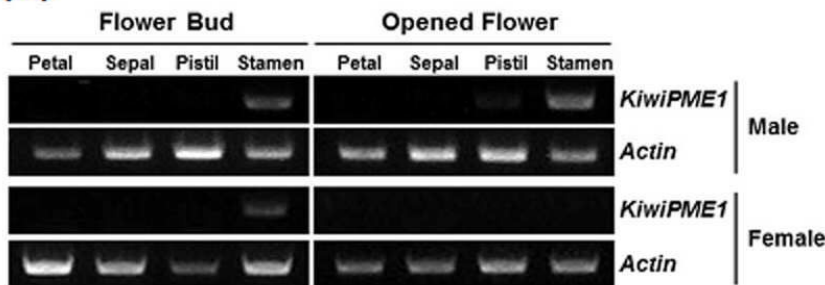


도면3

(A)



(B)

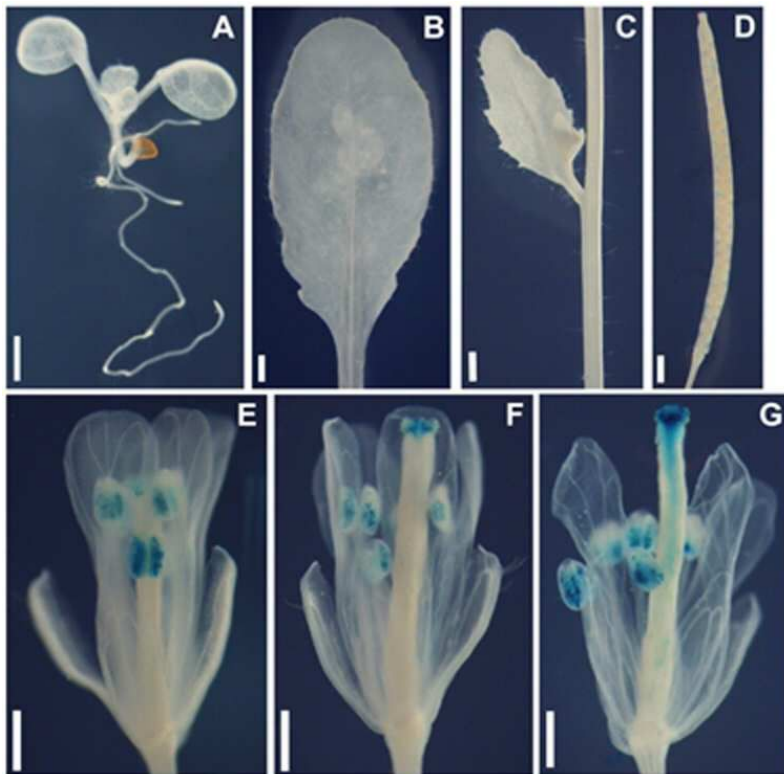


도면4

```

-1175 TCACAGAAGTATGCCAAGCGAGGGGGGGGCCCACTATTTTTGGGATACGGGCACGAACA
-1115 CAACATAAGGCATGTCACGGCATGACTATGCTATATCCCAATTCGTTTAAAAATATCCAAA
-1055 ACCTTTAGGCATTATAACCTCTTTCATTGGAAATAAATTAAAGAAGTCATCATTATACTT
-995 CATAATTGCAAAAATACTCTGGCCACATTATCTTTATGAATTTGTTTTTTATAAAAAG
-935 TCCATCTAACTAGTATTTTCGAGGCCCCATCTCCTGCAACCCACCCCTTTCAGAAAAAT
-875 TACAACAAGATTCTAGTATTTATTGATTGGCCAGGACTAGTAAATTTTAGTTTTGACAA
-815 CAATAAAATATATCGATCAAAATTGATT CAGT TAATCGTAGGAAAATTGAAACCACACACA
-755 CAATTTTTCTGAGTAATATGCTTCTGGGTATAGCATTTAAGACAACATGCATGATATAT
-695 ACGTTGATCCGTTGTA AAAAGACAAAGGAAGAGTTTAGCTAGAATTGATCCGTTGATCCGT
-635 GTGCATGGTGGGTGGT GATCTATCCAAGATTAGATTGTCATTAGAGTCATTTTATCCG
-575 AATGGGTCAATTCATTAATGAAGCCACACAATGTTGGCCACTTTCCTATTCATGGTAAAA
-515 TCATGGTTACATATTCACAAGGAAGAGTTTCAAATGAACTTTACAAGAAATTGGAAATGAA
-455 AATATGTGCTTGTGCTTGTGCCTGTGCCTGTGCCTGTGGTGCATCGATCCAAGTCGAACAA
-395 AAAATTTTAGTTCGTTGGAGGCAGTTTTGATATCCTATTTTTGAGGTGAGCTGTGAACCA
-335 GTCATCTTTAAGATGGATTTGCGATGATCCACAACATGCAAACGGAATGGATCAAATCAA
-275 AGTCGTTGTGCGAAAACCATGCACACATAAGAGGACGTT CATCAATACTCATCGACCTAT
-215 TTTGGTACTTGGAAACCCTATATAAAGCAACATCTTCATTCCATTGCGATCAGTATACA
-155 GGCAAAGAGAGGGGAAGATCTCTCTCTCTCTCCCGCCATTTTTTCTCTCATCCAATAAAAT
-95 TTTCTCATCTCTCTTCCATTCTTAAGCTTGTGCCAGAGAGCTAGGGAGAGAGATTGAGA
-35 GAATCCCCCAAAAAAATAATAAGAAAAGAAAAAATG
    
```

도면5



서열 목록

- <110> Biomedic Co.,LTD
- <120> Pollen- or pollen tube-specific promoter from kiwifruit and uses thereof
- <130> PN15103

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1175

<212> DNA

<213> Actinidia chinensis

<400> 1

tcacagaagt atgccaagcg agggggggggg cccactatth ttgggatacg ggcacgaaca 60

caacataagg catgtcacgg catgactatg ctatatccca ttcgtttaaa aatatccaaa 120

acctttaggc attataacct ctttcattgg aaataaatta aagaagtcatt cattatactt 180

cataattgca aaaataactct ggccacatta ttctttatga atttgthttt ttataaaaag 240

tccatctaac tagtatthtc gaggcccat ctctgcaac ccacccctt tcagaaaat 300

tacaacaaga ttctagtatt tattgatttg gccaggacta gtaaatttha gthttgacaa 360

caataaaata tatcgatcaa attgattcag ttaatcgtag gaaaattgaa accacacaca 420

caathtttct gagtaatatt gcttctgggt atagcattta agacaacatg catgatatat 480

acgttgatcc gttgtaaaaa gacaaggaag agtttagcta gaattgatcc gttgatccgt 540

gtgcatggtg ggtggtgatc tatccaagat tagattcgtc atttagagtc atthttatccg 600

aatgggtcaa ttcattaatg aagccacaca atgttgcca ctttctatt catggtaaaa 660

tcatggttac atattcacia ggaagagtht caaatgaact ttacaagaaa ttggaatgaa 720

aatatgtgct tigtcttgtg cctgtgcctg tgctgtggt gatcgatcca agtcgaacaa 780

aaaathtttag ttcgttgag gcagthttga tathctatth ttgaggtgag ctgtgaacca 840

gtcatcttha agatggattt gcgatgatcc acaacatgca aacggaatgg atcaaatcaa 900

agtcgttgtg cgaaaacct gcacacataa gaggacgttc atcaatactc atcgacctat 960

thttggtaact tgaaccct atataagca acatcttcat tccattcgca tcagtataca 1020

ggcaaagaga gggaagatct ctctcttctc cccgccatth tttctctcat ccaataaaat 1080

thttctatct ctcttcatt cthaagcttg ttgccagaga gctagggaga gagattgaga 1140

gaaatcccc aaaaaataa taagaaaaga aaaaa 1175

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2
 cgggatcctc acagaagtat gccaaagcgag gg 32

<210> 3
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 catgccatgg ttttttcttt tcttattatt tttttggg 38

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 cgggatccgc ttgtttccag agagctaggg aga 33

<210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 cgggatcctt gcaatgaaca gacacatcat taggca 36

<210> 6
 <211> 589
 <212> PRT
 <213> Actinidia chinensis
 <400> 6
 Met Ala Val Gly Lys Val Val Ala Ser Phe Val Ser Ile Leu Leu Val

1 5 10 15
 Val Gly Val Val Ile Gly Val Val Ala Phe Ala Asn Asn Arg Asn Gly
 20 25 30
 Ala Asn Ala Asn Lys Glu Thr Ala Thr Val Ser Thr Ser Ser Lys Ala

Val Ala Ala Ile Pro Thr Lys His Gln Gly Arg Trp Ile Ile Tyr Val
 290 295 300
 Lys Ala Gly Ile Tyr Ser Glu Tyr Val Thr Ile Pro Lys Ser Ala Thr
 305 310 315 320
 Asp Val Phe Met Tyr Gly Asp Gly Pro Thr Arg Thr Ile Val Thr Gly
 325 330 335
 Ser Lys Asn Phe Ala Ile Arg Lys Ile Pro Thr Met Gln Thr Ala Thr
 340 345 350
 Phe Ala Val Val Gly Lys Gly Phe Ile Ala Lys Gly Met Gly Phe Arg
 355 360 365

 Asn Thr Ala Gly Thr Gln Gly His Gln Ala Val Ala Phe Arg Ser Gln
 370 375 380
 Ser Asp Met Ser Ala Tyr Val Asp Cys Arg Phe Glu Gly Tyr Gln Asp
 385 390 395 400
 Thr Leu Tyr Tyr Gln Ser Asn Arg Gln Leu Tyr Arg Asn Cys Phe Ile
 405 410 415
 Ser Gly Thr Val Asp Phe Ile Phe Gly Arg Gly Thr Ala Leu Ile Gln
 420 425 430
 Asn Ser Glu Ile Gln Leu Arg Met Pro Glu Pro Asn Gln Gln Asn Thr
 435 440 445
 Val Thr Ala Asp Gly Asn His Glu Glu Asn Gly Ile Ala Gly Leu Val
 450 455 460
 Leu Gln Asn Cys Arg Ile Thr Ala Glu Pro Glu Leu Phe Pro Lys Arg
 465 470 475 480
 Leu Thr Ile Lys Asn Tyr Leu Gly Arg Pro Trp Asp Lys Phe Ser Thr
 485 490 495
 Thr Ala Val Ile Glu Ser Glu Ile Gly Asp Leu Ile Gln Pro Glu Gly
 500 505 510

 Trp Met Val Trp Ala Thr Ala Pro Asn His Glu Thr Ala Thr Val Val
 515 520 525
 Glu Tyr Gly Asn Arg Gly Ala Gly Ala Asn Thr Asp Lys Arg Val Lys

tacgcaattt tttgtttttt gactgattca ctaactaatc aaatcagagt cattaatttt	1200
gcatgcatgc agctgttgtt ggaaaagggt tcatcgccaa gggaatggga ttccgcaaca	1260
cagcaggtag acagggatcat caggcgggtgg cattcagaag ccagtcggat atgtctgcgt	1320
acgtcgactg caggttcgag ggctaccaag aactctata ctaccagagc aaccgtcagc	1380
tgtaccgcaa ctgcttcacg agcggcaccg ttgacttcat cttcggcaga ggcacagctt	1440
tgattcaaaa cagcgagatt cagctaagga tgcccagacc taaccagcag aacacagtca	1500
ctgctgacgg aaaccacgag gagaacggca ttgctggatt ggttctccag aactgcagga	1560
tcacagcgga gccgaattg ttccccaaaa ggcttaccat caagaactac ctgggacgcc	1620
cttgggacaa attctcaacc acagctgtga ttgagagcga gatcggagat ttgatccaac	1680
ctgagggatg gatggtttgg gccaccgccc ccaaccacga aacagcaacc gtggttgagt	1740
acggcaacag gggagccggt gctaacaccg acaaaagggt caaatggagg aacttcaagg	1800
ccatcaccaa caagaacgag gttctcaaat aactgcttc cattctcctc gaaggaggca	1860
agaccctag caagtggctg gcgggtaccg gtgttcagat cgatatgagt cttatccatt	1920
aaattaatca acatgcgtac accaagagat cgagagttac tgaaagagag agaaagatag	1980
atagaacgtc cctgagagaa acaatcaatt gtaattagcc ccggcaacct aatcctaaga	2040
actgctctgt tttgggcggg ctatctacgt ctcttctttg cctaattgat tgtctgttca	2100
ttgcaa	2106