

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0071753

(43) 공개일자 2022년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 1/06 (2006.01) *A01H 6/82* (2018.01)*C07K 14/415* (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01H 1/06 (2021.01)*A01H 6/823* (2022.05)

(21) 출원번호 10-2020-0159229

(22) 출원일자 2020년11월24일

심사청구일자 2020년11월24일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

고재홍

경기도 수원시 영통구 영통로154번길 51-16 306동 702호 (망포동, 센트럴하이츠아파트)

김민하

경기도 성남시 중원구 박석로97번길 24 - 1 302호 (상대원동 황제맨션)

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 12 항

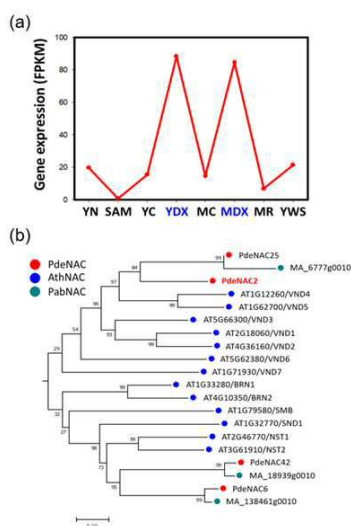
(54) 발명의 명칭 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물, 상기 형질전환 식물의 제조방법, PdeNAC2 유전자를 포함하는 가도관 형성 증진용 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터를 식물체에 도입하여 식물의 가도관 형성을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 가도관 형성이 증진된 식물의 제조를 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 침엽수의 목재를 구성하는 가도관 형성 유전자들의 발현을 제어할 수 있으므로, 침엽수 바이오매스의 질적인 개선에 활용될 수 있으며, 펄프 및 제지 산업에서도 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 활엽수에 도입하여 바이오연료 생산 효율이 개선된 바이오매스를 생산할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/415 (2013.01)

C12N 15/8243 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1405004413
과제번호	2014071G10-2022-AA04
부처명	산림청
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	임업기술연구개발(R&D)
연구과제명	진화-발달학적 유전체 연구를 통한 유용 목부형성 유전자원 개발 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711113548
과제번호	2018R1A2B2005362
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	목본식물 목부형성 조절인자 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PdeNAC2 단백질은 서열번호 1로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PdeNAC2 유전자는 서열번호 2로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 발현 증가는 PdeNAC2 유전자가 도입되어 증가된 것인, 형질전환 식물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 도입되는 PdeNAC2 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 형질전환 식물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 프로모터는 35S 프로모터인 것인, 형질전환 식물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 형질전환 식물은 담배, 애기장대 또는 포플러인 것인, 형질전환 식물.

청구항 8

PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 10

PdeNAC2 유전자를 포함하는, 가도관 형성 증진용 발현 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 PdeNAC2 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 발현 벡터.

청구항 12

제10항 또는 제11항의 발현 벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는, 가도관 형성을 증진시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물, 상기 형질전환 식물의 제조방법, PdeNAC2 유전자를 포함하는 가도관 형성 증진용 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터를 식물체에 도입하여 식물의 가도관 형성을 증진하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 나무는 크게 침엽수와 활엽수로 구분되며, 일반적으로 침엽수(conifer)는 바늘잎나무라고 하여 잎이 가늘고 뾰족하고, 활엽수는 넓은잎나무라 하여 넓고 평평하다. 침엽수는 비교적 연하고 가벼운 종류가 많아 소프트 우드라고 하고, 활엽수는 단단하고 무거운 종류가 많아 하드 우드라고 한다. 이러한 차이는 목재를 구성하는 도관의 종류 및 특성에 기인한다. 도관(물관, xylem)이란 뿌리로부터 지상부 모든 부위로 물을 수송하는 통로로서 잎의 증산을 통해 생기는 수분 포텐셜의 압력 차이로 물을 수송하는 바, 도관세포는 매우 단단하고 두꺼운 이차세포벽으로 둘러싸여 있다.

[0004] 활엽수 도관 조직은 도관세포, 섬유세포 및 가도관으로 구성된 반면, 침엽수는 도관 조직에 가도관(tracheid)만이 존재한다. 가도관은 폭이 좁고 길이가 길며, 끝부분이 서로 겹쳐져 연결되어 도관을 구성한다. 물은 가도관 끼리 겹친 부위에 존재하는 막공을 통해 수송된다.

[0005] 활엽수의 도관세포 발달은 지난 십여년간 많은 연구가 이루어졌다. 애기장대 모델 식물의 엽육세포를 이용한 도관세포 분화 유도 과정의 전사체 분석을 통해 VND (Vascular NAC Domain) 유전자들(VND1~VND7)이 발견되었다. VND는 NAC 전사조절인자 패밀리에 속하며, 이 중 VND6와 VND7은 각각 metaxylem과 protoxylem 분화의 마스터 스위치로 알려져 있다 (The Plant Journal 66(4), 2011, 579-590). VND6는 이차세포벽 형성의 마스터 스위치로 알려진 MYB46와 예정세포죽음(Programmed Cell Death)을 조절하는 여러 유전자들을 직접적으로 전사적 발현 조절을 통해 도관을 형성한다고 보고되었다. MYB46는 MYB 전사조절인자 패밀리에 속하며, 이차세포벽을 구성하는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌을 생합성하는 유전자들의 전사를 직접적으로 조절함이 애기장대를 포함한 여러 식물 (포플러, 담배, 벼, 옥수수 등)에서 알려져 있다 (The Plant Cell 19, 2007, 2776-5792).

[0006] 그러나, 침엽수의 경우 가도관 형성 관련 연구는 많이 부족한 실정이다. 소나무는 유전체의 크기가 약 24 Gb로 추정되며, 이형성이 많아 유전체 연구가 매우 어렵고, 아직까지도 유전체 염기서열 분석이 되지 않은 상황이다. 또한, 삼목 및 재분화가 현재로서는 가능하지 않아 유전 연구가 매우 미진하다.

[0008] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 소나무의 발달목부 조직 특이적으로 발현이 증가하는 NAC 패밀리의 유전자들을 발견하였고, 그 중에서도 가도관 형성을 조절하는 핵심 유전자인 PdeNAC2 유전자를 발굴하였다. 나아가, PdeNAC2 유전자가 이차세포벽 형성 유전자의 발현을 조절할 수 있음을 확인하였으며, PdeNAC2 유전자의 과발현을 통해 도관-유사 세포들이 이소적으로 형성됨을 확인한 바, 식물의 가도관 형성이 증진된 식물을 제조할 수

있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 PdeNAC2 유전자를 포함하는 가도관 형성 증진용 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 발현 벡터를 식물체에 도입하여 식물의 가도관 형성을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0016] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0018] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 PdeNAC2는 소나무의 NAC 전사조절인자 패밀리 중 하나인 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 의미한다. 본 발명에서는 상기 PdeNAC2 유전자가 소나무의 발달목부 조직 특이적인 발현을 나타내는 것을 확인한 바(실험예 1), 식물체의 가도관 형성을 조절하는 핵심 유전자임을 최초로 규명하였다.
- [0021] 본 발명의 PdeNAC2 단백질의 구체적인 아미노산 서열 또는 염기 서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다. 구체적으로, PdeNAC2 단백질은 서열번호 1로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 PdeNAC2 단백질은 상기 서열번호 1과 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 이러한 상동성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 발명의 PdeNAC2 단백질로 사용될 수 있음은 자명하다.
- [0022] 또한, 코돈 축퇴성(codon degeneracy)에 의해 상기 서열번호 1로 구성된 아미노산 서열을 가지는 단백질 또는 이와 상동성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 또는 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1로 구성된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 동일/유사한 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0023] 상기 "상동성"은 두 개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 모이어티(moiety) 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 하나의 모이어티로부터 다른 하나의 모이어티까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수

(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법으로 결정될 수 있다.

- [0024] 본 발명의 PdeNAC2 유전자는 서열번호 2의 염기 서열 또는 서열번호 2와 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 용어 "발현 증가"란, PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입되어 발현되거나, 식물체가 가진 내재적 발현 또는 변형 전 발현에 비하여 발현이 증가된 것을 의미한다. 상기 단백질의 "도입"은, 식물체가 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성이 자연적 혹은 인위적으로 나타나게 되는 것을 의미한다. 예를 들어, 상기 발현 증가는 외래의 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 도입하여 발현을 증가시키는 것; 또는 내재적 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 것을 모두 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 발현 증가 방법으로는,
- [0026] 1) 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,
- [0027] 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,
- [0028] 3) 상기 단백질의 발현이 증가되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 또는
- [0029] 4) 이의 조합에 의해 발현이 증가되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 대상 식물체의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 또한 카피수 증가의 한 양태로, 단백질의 활성을 나타낼 수 있는 폴리뉴클레오티드를 대상 식물체 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 대상 식물체 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질의 발현이 증가될 수 있다.
- [0031] 다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 하는 발현조절 서열을 변형시킬 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절 하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [0032] 구체적으로, 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이중 프로모터가 연결될 수 있다. 본 발명에서는 상기 프로모터로서 35S 프로모터를 사용할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오티드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [0034] 마지막으로, 4) 상기 1) 내지 3)의 조합에 의해 발현이 증가되도록 변형하는 방법은, 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가, 이의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 염색체 상의 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 변형 중 하나 이상의 방법을 함께 적용하여 수행될 수 있다.
- [0035] 상기 폴리뉴클레오티드는 기능을 할 수 있는 폴리뉴클레오티드 집합체인 경우 유전자로 기재될 수 있다. 본원에서 폴리뉴클레오티드와 유전자는 혼용될 수 있으며, 폴리뉴클레오티드 서열과 뉴클레오티드 서열은 혼용될 수 있다.
- [0036] 본 발명은 PdeNAC2 유전자를 도입하여 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물을 제조하였다. 또한, 상기 PdeNAC2 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태로 도입될 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 상기 "프로모터"란, 전사조절인자들이 결합 할 수 있는 DNA 염기서열을 의미하는데, 상기 프로모터는 전사조절 인자를 매개로 하여 RNA 중합효소와 결합함으로써, 그의 하류에 위치한 개방해독틀(ORF)의 전사를 유도할 수 있다. 구체적으로 35S 프로모터를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 또한, 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을

이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

- [0039] 본 발명의 가도관(tracheid)은 침엽수 목재의 대부분을 차지하는 세포로서, 매우 높게 자라는 침엽수의 가지 끝까지 물을 운반할 수 있도록 길이가 길고 가늘며 끝이 뾰족한 형태를 가진다. 가도관은 끝 부분이 서로 겹쳐져 연결되어 도관을 구성하게 되며, 물은 가도관끼리 겹친 부위에 존재하는 막공을 통해 수송된다.
- [0040] 침엽수 목재의 경우, 이러한 가도관 세포로 구성됨으로써, 줄기가 곧고 큰 가지의 발달이 적어 목재로 이용률이 높으며, 가볍고, 강도가 비교적 낮아 가공하기 쉬운 경향이 있다. 반면, 대부분 도관세포(vessel element)로 구성된 활엽수의 경우, 대체로 줄기가 잘 굽고 굵은 가지가 많아 목재로 이용률이 낮다. 더불어 이차세포벽을 구성하는 화학성분에서도 커다란 차이가 있다. 활엽수는 헤미셀룰로스가 주로 5탄당인 자일란(xylan)으로 구성되나 침엽수는 주로 6탄당인 갈락토글루코만난(galactoglucomannan)으로 구성된다. 따라서 침엽수의 경우, 6탄당이 많아 바이오에탄올 생산시 수율이 훨씬 크다. 또한 리그닌의 경우, 활엽수는 G, S 리그닌 모노머로 구성되나, 침엽수는 G 리그닌 모노머로만 구성된다.
- [0041] 본 발명에서 가도관 형성 증진은 야생형(표준형)에 비해 식물의 가도관 형성이 증가 또는 촉진된 것을 의미한다. 따라서, 가도관 형성이 증진된 식물은 잎 등에서 도관-유사 세포의 형성이 증가함에 따라 식물의 정상적인 신장이 억제될 수 있으며, 두꺼운 이차세포벽을 가진 세포로 변형된 표현형을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명의 구체적인 일 구현예에서는, PdeNAC2이 과발현된 형질전환 식물은 도관-유사 세포들이 이소적으로 형성된 것을 확인한 바 (실험예 4), PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 증가를 통해 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물을 제조할 수 있음을 확인하였다.
- [0043] 본 발명의 형질전환 식물은 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입되거나, 또는 내재적으로 존재하는 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 과발현된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 형질전환은, DNA를 숙주에 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서는 PdeNAC2 유전자를 숙주에 도입하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명의 형질전환 식물이란, 숙주로서 식물을 사용하여 상기 형질전환으로 인해 생성된 식물을 의미한다.
- [0045] 본 발명에서 숙주세포로의 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떠한 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 식물에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이러한 방법에는 전기충격 핵산분자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 침전, 염화칼슘 침전, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반, 아그로박테리아로 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 목적 상, 상기 형질전환 식물은 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 증가에 의하여 가도관 형성이 증진될 수 있는 식물은 제한 없이 포함될 수 있다. 일 예로, 담배, 애기장대 또는 포플러가 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0048] PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물의 제조방법을 제공한다.
- [0049] 본 발명의 "PdeNAC2", "가도관 형성 증진" 및 "형질전환 식물"은 상기 기재된 바와 같고, 상기 방법에 의해 본 발명의 형질전환 식물을 제조할 수 있다.
- [0051] 상기 제조방법에 의하여 제조된 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 형질전환 식물의 재배는 당업계에 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있고, 재배 온도, 재배 시간 및 배지의 pH 등의 조건은 적절하게 조절될 수 있다.
- [0052] 사용되는 배지는 특정한 형질전환식물의 요구 조건을 적절하게 충족시켜야 한다. 배지의 형태로는 고체배지(solid medium), 액체배지(liquid medium), 이중배지(double layer medium)가 있으며, 이에 대한 성분으로는 물, 교질재료로서 한천, 아가로스(agarose), 겔라이트(gelrite) 등이 사용될 수 있다.

- [0053] 무기 영양소로는 15개의 원소, 즉 C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, B, 및 Mo 등이 형태에 구애 받지 않고 첨가되며, 유기 영양소로는 탄수화물, 식물생장 조절물질, 비타민 등이 첨가되고, 아미노산류로는 미오-이노시톨, 글라이신, L-글루타민 등이 첨가될 수 있다.
- [0054] 탄소원으로는 글루코스, 프럭토스, 만노스, 리보오스, 자일로스, 수크로스, 멜리비오스, 셀로비오스, 락토오스, 아밀로스, 탄수화물, 라피노스, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤 등이 첨가될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 PdeNAC2 유전자를 포함하는 가도관 형성 증진용 발현 벡터를 제공한다.
- [0057] 본 발명의 "PdeNAC2 유전자", 및 "가도관 형성 증진"은 상기 기재된 바와 같다.
- [0059] 본 발명의 발현 벡터는 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 의미한다. 상기 발현 벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 컨스트럭트가 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.
- [0060] 본 발명에서는 서열번호 2의 PdeNAC2 유전자를 pB2GW7 벡터에 도입하여 제작된 발현 벡터를 이용하여 가도관 형성이 증진된 형질전환 식물을 제작하였다. 또한, 본 발명에서 상기 PdeNAC2 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태로 벡터에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 발현 벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는 가도관 형성을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0063] 구체적으로, 본 발명의 식물체의 가도관 형성을 증진시키는 방법은 상기 발현 벡터를 가도관이 형성될 수 있는 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함한다. 이때, 상기 방법에 사용되는 프로모터, PdeNAC2 유전자 등은 상술한 바와 동일하다.

발명의 효과

- [0065] 본 발명은 PdeNAC2 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 가도관 형성이 증진된 식물의 제조를 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 침엽수의 목재를 구성하는 가도관 형성 유전자들의 발현을 제어할 수 있으므로, 침엽수 바이오매스의 질적인 개선에 활용될 수 있으며, 펄프 및 제지 산업에서도 유용하게 활용될 수 있다. 또한, 활엽수에 도입하여 바이오연료 생산 효율이 개선된 바이오매스를 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1은 가도관 형성을 조절하는 핵심 유전자인 PdeNAC2 유전자 발굴에 관한 도이다. 도 1a는 소나무의 목부 형성-조직 특이적 전사체 분석을 통한 PdeNAC2 유전자의 발현에 관한 도이고, 도 1b는 소나무의 NAC 패밀리 유전자들과 도관 형성 관련 애기장대 및 독일가문비나무 유전자들과의 아미노산 서열을 이용한 계통 분석 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 PdeNAC2 유전자와 애기장대 VND 유전자의 아미노산 서열을 비교한 도이다.
- 도 3은 PdeNAC2 유전자의 이차세포벽 형성 유전자 발현 조절에 관한 도이다. 도 3a는 일시적 전사활성화 실험의 유전자 컨스트럭트 모식도이다. 도 3b는 PdeNAC2의 과발현이 셀룰로스, 자일란 및 리그닌 생합성 유전자의 발현에 미치는 영향에 관한 그래프이다.
- 도 4는 PdeNAC2 유전자가 일시적으로 과발현된 담배 및 애기장대 잎 표피세포를 관찰한 도이다 (scale bar = 100 μ m).

도 5는 PdeNAC2 유전자가 영구적으로 과발현된 애기장대 식물체의 표현형을 관찰한 도이다 (scale bar = 100 μ m).

도 6은 PdeNAC2 유전자가 영구적으로 과발현된 애기장대 식물체에서 도관-유사 세포들의 미세 형태를 관찰한 도이다 (scale bar = 100 μ m).

도 7은 PdeNAC2 유전자가 영구적으로 과발현된 포플러 식물체의 표현형을 관찰한 도이다 (scale bar = 100 μ m).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 식물 재료 및 성장 조건

본 발명에서는 조직 샘플링을 위하여 국립산림과학원 (수원, 대한민국)에서 재배된 우리나라 고유 소나무 (적송, *Pinus densiflora*)를 이용하였다. 또한, 형질전환 과발현 분석을 위하여, 담배 (*Nicotiana benthamiana*) 및 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)를 생장실 (25°C, 12시간 빛, 조도 150 μ mol $\cdot$ m⁻² $\cdot$ sec⁻¹)의 토양에서 4주간 재배하였다.

실시예 2. 목부 형성 조직 샘플링 및 RNA 시퀀싱

목부 형성 조직 샘플은 5-6년생 소나무로부터 수득하였다. 구체적으로, 목부 형성 관련 조직들 (YN, Young Needle(어린 솔잎); SAM, Shoot Apical Meristem(정단부); YC, Young Cambium(어린 형성층); YDX, Young Developing Xylem(어린 발달 목부); MC, Mature Cambium(성숙한 형성층); MDX, Mature Developing Xylem(성숙한 발달 목부); MR, Mature Roots(성숙한 뿌리); YWS, Young Whole Stem(어린 줄기 전체))을 채취하였다. 각 조직의 전체 RNA 추출은 'Total RNA Purification' 키트 (Nanohelix, Daejeon, Republic of Korea)를 이용하였으며, RNA 분석은 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 수행하였다. 각 조직에서 채취한 전체 RNA 중 1 μ g이 TruSeq RNA sequencing libraries (Illumina, San Diego, CA, USA) 구축을 위해 사용되었으며, Agilent 2100 Bioanalyzer를 이용하여 정량화하였다. RNA 시퀀싱 데이터는 NCBI에 제공되었다.

실시예 3. 반-정량적 RT-PCR

First strand cDNA의 합성을 위하여 1 μ g의 총 RNA를 20 μ l의 반응물에서 Superscript III 역전사 효소 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 역전사하였다. 후속 RT-PCR은 1 μ l의 반응 생성물을 주형으로 사용하여 수행하였다. 증폭된 DNA 절편은 1% 아가로스 겔에서 분리되어 시각화되었다. 소나무(*P. densiflora*)의 *PdeUBC11* 유전자를 대조군으로 사용하였으며, 실시예에서 사용한 모든 프라이머는 Primer3 software (<http://fokker.wi.mit.edu>)를 이용하여 설계하였다.

실시예 4. 벡터 제작 및 식물 형질전환

PdeNAC2 (DN199449_c0_g1_i7) 및 *AtVND6* (AT5G62380)을 암호화하는 전장 cDNA는 소나무 및 애기장대의 cDNA로부터 PCR에 의해 증폭되었다. 증폭된 cDNA를 게이트웨이 클로닝 시스템 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 pK2GW7 벡터에서 35S 프로모터의 하위 영역에 삽입하여 35S::PdeNAC2 및 35S::AtVND6 컨스트럭트를 제작하였다.

상기 벡터 컨스트럭트는 아그로박테리움 튜미파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 C58에 도입하였고, 상기 균주를 이용하여 floral-dip 방법 및 leaf disk 형질전환-재생 방법에 따라 각각 애기장대 및 포플러를 형질전환 시켰다. 본 발명에서 사용된 모든 컨스트럭트는 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였다 (Macrogen, <http://dna.macrogen.com/kor/>).

[0086] **실시예 5. 일시적 활성화 어세이 (Transcription activation assay, TAA)**

[0088] 애기장대 잎의 원형질체의 준비, 리포터 및 이펙터 컨스트럭트의 일시적 트랜스펙션은 [Plant J. 60, 649-665]에 기술된 방법으로 수행하였다. 이펙터 컨스트럭트를 제조하기 위해, pTrGUS 벡터에서 GUS를 제거한 후 PdeNAC2의 전장 DNA를 CaMV 35S 프로모터 및 노파린 합성효소 터미네이터 사이에 연결시켰다. 리포터 컨스트럭트는 pTrGUS 벡터로부터 35S 프로모터를 제거한 후, GUS 리포터 유전자 앞에 위치하여 제작하였다. 플라스미드 DNA는 Exprep™ Plasmid SV Midi kit (GeneA11, Seoul, Korea)를 이용하여 준비하였고, 트랜스펙션을 위해 4 µg의 리포터 플라스미드 및 5 µg의 이펙터 플라스미드를 사용하였다. GUS 활성 표준화를 위한 내부 대조구로 사용하기 위해, 1 µg의 NAN 플라스미드를 첨가하였다. 그 다음, 10 µl 플라스미드 혼합물 및 원형질체 100 µl를 2ml microcentrifuge 튜브로 옮겼다. NAN 및 GUS 활성은 각각 MUN (Sigma-Aldrich, MO, USA) 및 MUG (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 기질로 하여 측정되었으며, Fluo-100 형광계 (여기 파장: 365 nm, 방출 파장: 480nm)에서 MU 표준에 대해 측정하였다. GUS 및 NAN 활성의 비율은 상대적인 GUS/NAN 단위로 계산하였다. 상기 실험들은 3 회 반복 실험으로 수행하였다.

[0090] **실시예 6. 일시적 과발현 분석**

[0092] 실시예 4의 방법으로 제작된 35S::PdeNAC2 및 35S::AtVND6 컨스트럭트는 아그로박테리움 튜미파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 C58에 도입되어, 아그로박테리움-침입 (*Agrobacterium*-infiltration)에 사용되었다. 형질전환된 아그로박테리움 세포를 50 mg/L의 스펙토마이신 및 40 mg/L의 리팜피신을 포함하는 LB 배지에서 배양한 후, 10분간 원심분리(2,500g) 하였다. 생성된 펠렛은 infiltraton 용액 (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 150 µM acetosyringone, 20 µM 5-azacytidine, 0.56 mM ascorbic acid, 0.03% Tween-20, pH = 5.6)에서 풀어준 후, 0.5의 OD₆₀₀으로 조절되었다. 풀어진 아그로박테리움 세포는 담배 및 애기장대 잎의 배측면에 200 µl 및 50 µl씩 주입되었다. 빈 플라스미드 pB2GW7를 가진 아그로박테리움 세포 또는 35S::AtVND6 컨스트럭트가 각각 음성 대조구 및 양성 대조구로 사용되었다.

[0094] **실시예 7. 조직학적 분석**

[0096] 이차세포벽의 시각화를 위하여, 애기장대, 담배 및 포플러의 잎을 에탄올 처리를 통해 엽록소 제거 후 2% 플로로글루시놀/HCl로 1분 동안 염색하였다. 형광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 리그닌 자가형광을 검출함으로써 애기장대의 배측의 이차세포벽 세포를 관찰하였다. Microtome (Leica RM2025, Leica, <http://www.leica.com>)을 사용하여 파라핀 삽입 후 횡단 및 세로 절편으로 줄기의 세부 구조를 관찰하였다.

[0098] **실험예 1. 목부 조직 특이적인 발현을 나타내는 PdeNAC2 유전자의 규명**

[0100] RNA-sequencing과 PacBio-isosequencing 방법을 이용하여 목부 형성 관련 조직들 (YN, Young Needle(어린 솔잎); SAM, Shoot Apical Meristem(정단부); YC, Young Cambium(어린 형성층); YDX, Young Developing Xylem(어린 발달 목부); MC, Mature Cambium(성숙한 형성층); MDX, Mature Developing Xylem(성숙한 발달 목부); MR, Mature Roots(성숙한 뿌리); YWS, Young Whole Stem(어린 줄기전체))을 대상으로 비교 전사체 분석을 수행하였다 (도 1a). 그 결과, PdeNAC2는 발달 목부(DX) 조직 특이적으로 발현이 증가함을 확인할 수

있었다. 상기 PdeNAC2 유전자의 염기서열을 이용한 계통분석을 수행한 결과, 애기장대에서 알려진 도관형성 유전자들과 유연관계가 존재하는 것을 알 수 있었다 (도 1b).

[0101] 나아가, 소나무와 애기장대의 도관 형성과 관련된 NAC 단백질의 아미노산 서열을 비교한 결과, NAC 도메인은 보존되어 있으나, C-말단 부위에 가까울수록 그 서열이 매우 상이한 것을 알 수 있었다 (도 2).

[0103] 실험예 2. PdeNAC2 유전자가 이차세포벽 형성 유전자 발현에 미치는 영향 확인

[0105] PdeNAC2가 전사조절인자(이펙터)로서 타겟 유전자(리포터)의 발현을 조절하는 기능을 확인하기 위하여, 식물 세포(애기장대 원형질체)에 각 2 종류(이펙터, 리포터)의 유전자 컨스트럭트를 도입하고, GUS 활성 측정을 통해 전사 활성을 정량화하였다 (도 3a). 그 결과, PdeNAC2 유전자는 이차세포벽 생합성의 마스터 스위치인 MYB46를 포함하여, 셀룰로스 생합성 유전자 (AtCesA4, AtCesA7, AtCesA8), 자일란 생합성 유전자 (AtIRX8, AtIRX9), 및 리그닌 생합성 유전자 (AtCOMT, AtPAL4)의 발현을 양성적으로 조절하였다 (도 3b). 대조구로 사용된 애기장대 도관 형성의 마스터 스위치로 알려진 AtVND6 유전자와 비교하여, PdeNAC2는 타겟 유전자에 대한 전사 활성화 능력이 더 강력한 것을 확인하였다.

[0107] 실험예 3. PdeNAC2 유전자의 일시적 과발현이 도관 형성에 미치는 영향 확인

[0109] PdeNAC2 유전자의 기능을 식물체에서 알아보기 위한 첫 단계 실험으로, 상기 실시예 6의 방법으로 담배와 애기장대 잎의 표피세포에 형질전환된 아그로박테리아를 주입하여 일시적으로 PdeNAC2 유전자를 과발현 시켰다. 형질전환된 아그로박테리아를 주입하고 3일 후에 각 식물의 표피세포 관찰한 결과, 유전자가 없는 빈 벡터를 가진 아그로박테리아가 주입된 식물은 아무런 변화가 없었으나 (도 4a), AtVND6 유전자 컨스트럭트로 형질전환한 아그로박테리아를 주입한 경우, 이소적으로 도관과 유사한 세포들이 형성된 것을 확인하였다 (도 4b). PdeNAC2 유전자 컨스트럭트로 형질전환한 아그로박테리아를 주입한 경우, AtVND6의 경우와 유사하게 이소적으로 도관과 유사한 세포들이 많이 형성된 것을 알 수 있었다 (도 4c).

[0111] 실험예 4. PdeNAC2 유전자의 영구적 과발현이 도관 형성에 미치는 영향 확인

[0113] PdeNAC2 유전자의 기능을 더욱 구체적으로 확인하기 위하여, 형질전환 애기장대 식물체를 제작하고 그 표현형을 관찰하였다. PdeNAC2 유전자를 과발현 시킨 애기장대와 AtVND6 유전자를 과발현 시킨 애기장대는 모두 잎이 위로 말리고 생장 저해가 나타난 것을 확인하였다 (도 5a). 이러한 결과는 잎을 포함한 식물 전체에 이소적으로 도관과 유사한 세포들이 형성됨으로써 식물의 정상적인 신장이 억제되어 나타난 현상인 바, PdeNAC2 유전자의 과발현이 도관-유사 세포 형성에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 상기 형질전환 애기장대 잎 표피세포의 이차세포벽을 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. Phloroglucinol-HCl 염색을 통해 붉은색으로 염색된 이차세포벽을 관찰한 결과, 두꺼운 이차세포벽을 가진 도관과 유사한 세포들로 빈번하게 바뀌었음을 확인하였다 (도 5b). 나아가, 형광현미경을 통하여 상기 표피세포를 관찰한 결과, 대조구(WT) 대비 PdeNAC2 유전자를 과발현 시킨 형질전환 식물체에서 도관과 유사한 세포들이 형성된 것을 확인하였다 (도 5c).

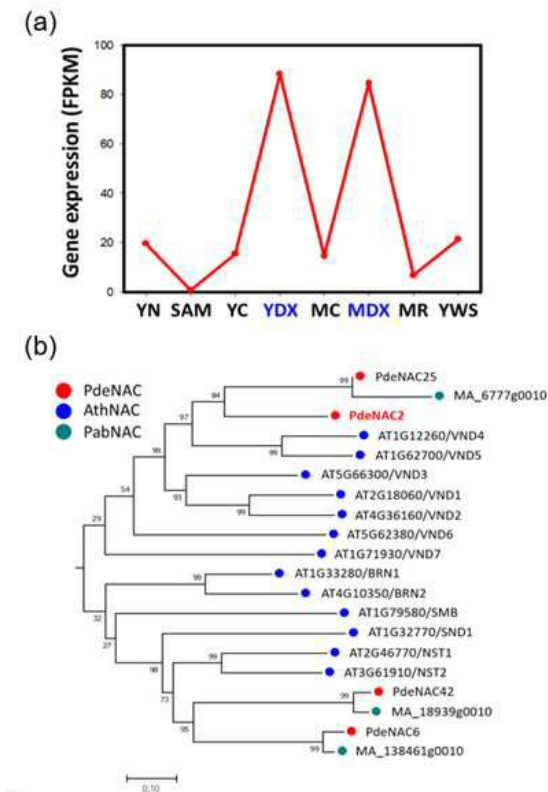
[0114] PdeNAC2 유전자의 과발현으로 형성된 도관-유사 세포들의 미세 형태를 관찰하기 위하여, 마이크로톰 절편을 제작하여 실험하였다. 그 결과, 형질전환 하지 않은 대조구(WT)의 줄기 횡단면 및 종단면에서는 관다발과 관다발 사이의 섬유세포들만 관찰되었으나 (도 6a), AtVND6 과발현체의 경우, 줄기 횡단면에서 이소적으로 줄기 표피, 피층, 수세포층에 도관-유사 세포들이 많이 생성되었으며, 종단면에서도 도관요소와 유사한 세포들이 이소적으로 생성된 것을 확인하였다 (도 6b). PdeNAC2 과발현체의 경우, AtVND6 과발현체와 유사하게, 줄기 횡단면에서 이소적으로 표피, 피층, 수세포층에 도관-유사 세포들이 많이 생성되었으며, 종단면에서도 도관요소와 유사한 세포들이 이소적으로 생성된 것을 확인하였다 (도 6c). 즉, PdeNAC2 유전자의 과발현으로 형성된 도관-유사 세포들의 미세 형태를 관찰한 결과, AtVND6에 의해 생성된 도관 세포들과 매우 유사한 것을 알 수 있었다.

[0115] 나아가, 형질전환 포플러 식물체를 제작하고 상술한 애기장대 식물체와 동일한 방법으로 그 표현형을 관찰하였다. AtVND6 유전자를 과발현 시킨 포플러(35S::AtVND6)는 대조구(BH) 대비 잎 표피 세포에 이소적으로 도관-유사 세포들이 발달한 것을 확인하였다 (도 7a). PdeNAC2 유전자를 과발현 시킨 포플러(35S::PdeNAC2) 역시 마찬가지로, 대조구(BH) 대비 잎 표피세포에 이소적으로 도관-유사 세포들이 발달한 것을 확인하였다 (도 7b).

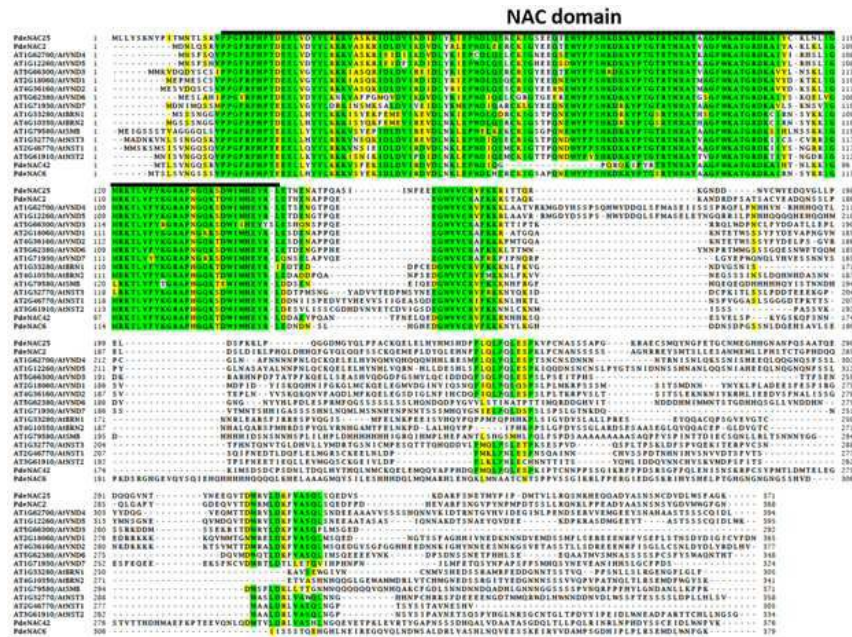
[0118] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

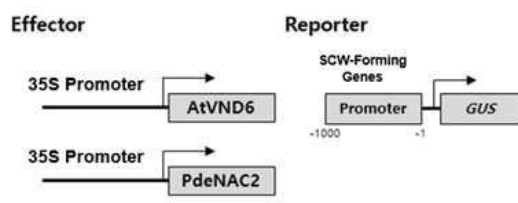


도면2

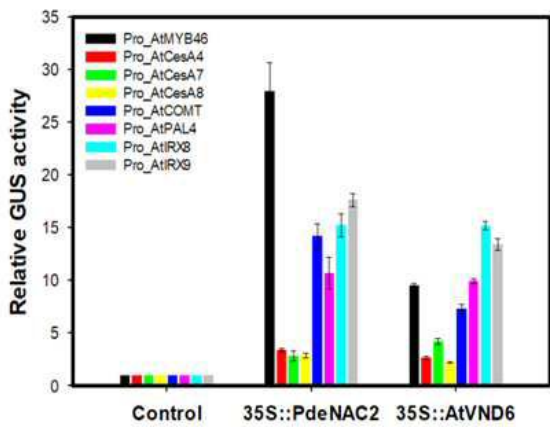


도면3

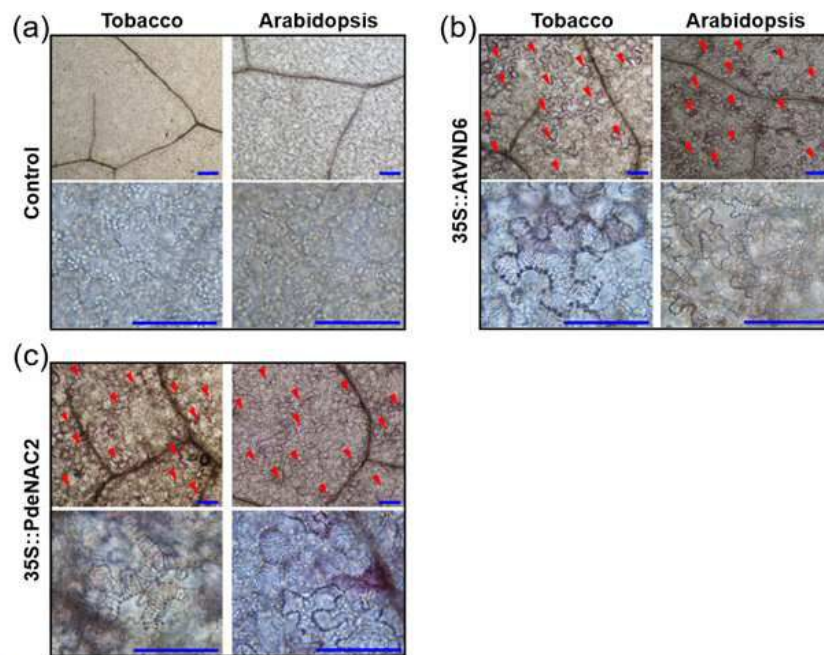
(a)



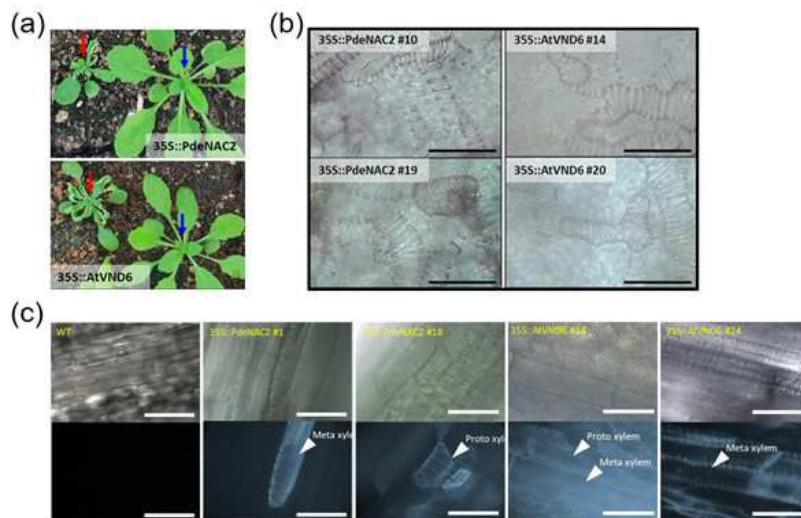
(b)



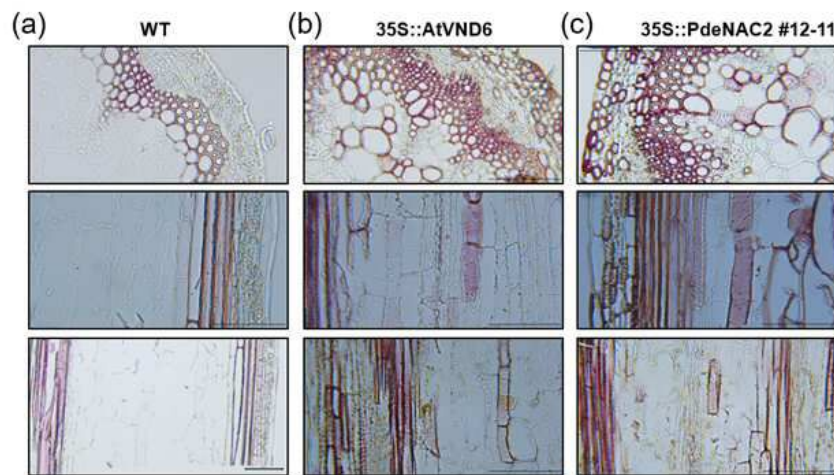
도면4



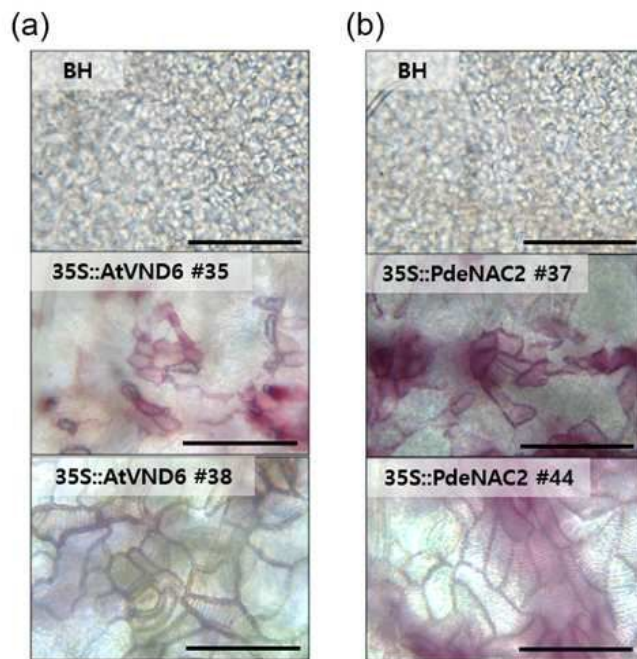
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Transgenic plants for enhancing tracheid formation and method for producing the same
- <130> KPA201449-KR
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PdeNAC2

<400> 1

Met Asp Asn Leu Gln Ser Arg Val Pro Pro Gly Phe Arg Phe His Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Arg Ile Asp Leu Asp Val Ile Lys Asp Val Asp Leu Tyr Arg Leu

35 40 45

Glu Pro Trp Asp Leu Glu Glu Arg Cys Lys Ile Gly Tyr Glu Glu Gln

50 55 60

Thr Glu Trp Tyr Phe Phe Ser His Lys Asp Lys Lys Tyr Pro Thr Gly

65 70 75 80

Thr Arg Thr Asn Arg Ala Thr Val Ala Gly Phe Trp Lys Ala Thr Gly

85 90 95

Arg Asp Lys Ala Ile Tyr Ala Lys Leu Lys Leu Ile Gly Met Arg Lys

100 105 110

Thr Leu Val Phe Tyr Lys Gly Arg Ala Pro Asn Gly Gln Lys Thr Asp

115 120 125

Trp Ile Met His Glu Tyr Arg Leu Glu Thr Asn Glu Asn Ala Pro Pro

130 135 140

Gln Glu Glu Gly Trp Val Val Cys Arg Ala Phe Lys Lys Arg Ser Thr

145 150 155 160

Ala Gln Lys Lys Ala Asn Asp Arg Asp Phe Ser Ala Thr Ser Ala Cys

165 170 175

Tyr Glu Ala Asp Gln Asn Ser Ser Leu Pro Glu Leu Asp Ser Leu Asp

180 185 190

Ile Lys Leu Pro His Gln Leu Asp His His Gln Phe Gly Tyr Gln Leu

195 200 205

Gln Gln Phe Ser Ser Cys Lys Gln Glu Met Glu Pro Leu Asp Tyr Gln

210 215 220

Leu Glu His Asn Pro Phe Leu Gln Leu Pro Gln Leu Glu Ser Pro Lys
225 230 235 240

Leu Pro Cys Asn Ala Asn Ser Ser Ser Ser Ser Ala Gly Asn Arg Arg
245 250 255

Glu Tyr Ser Met Thr Ser Leu Leu Glu Ser Ala Asn Met Glu Met Leu
260 265 270

Leu Pro His Ser Thr Cys Thr Gly Pro His Asp Gln Gln Gln Leu Gly
275 280 285

Ala Phe Tyr Gly Asp Glu Gln Val Tyr Thr Asp Trp Arg Met Leu Asp
290 295 300

Lys Phe Val Ala Ser Gln Leu Ser Gln Glu Asp Phe Pro Asp His Glu

305 310 315 320

Val Ala Arg Phe Ser Asn Gly Val Pro Tyr Asn Pro Met Pro Asp Thr
325 330 335

Ser Ser Leu Leu Arg Gln Asn Lys Leu Pro Pro Glu Ala Asp Tyr Ala
340 345 350

Ala Ser Asn Ser Asn Ser Tyr Gly Asp Val Met Trp Gly Phe Gly Asn
355 360 365

<210> 2

<211> 1107

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PdeNAC2

<400> 2

atggacaacc tacaatcccg tgttctcca ggtttcagat tccatccac ggacgaggag	60
cttgtggatt attatctgaa aaagaaagt gcttcaaaa ggattgatct agacgtcatc	120
aaagatgtgg atctttacag gcttgagcct tgggatcttg aagaacgatg taaaataggt	180
tacgaggaac aaacagaatg gtatttcttc agtcacaagg ataagaagta tccaacgggc	240
acacgaaca acagagccac agtggcgggc ttctggaag ccacgggacg ggacaaagca	300
atctatgcta agctgaagct catcgcatg aggaagacgt tgggtttcta caaagggcgt	360
gcaccaacg ggcagaaaac tgactggatc atgcacgaat acaggcttga gacgaacgag	420

aacgctcctc ctcaggaaga aggatgggtg gtttgccgtg cttcaagaa acgatcaact	480
gcccagaaga aagcaaatga tagggacttc tctgcaactt cagcttgcta tgaagctgat	540
cagaatagtt cgttacctga attagattct ctggatatca aacttctca tcaactagat	600
caccaccagt ttggatacca attgcagcaa tttcaagct gcaaacagga gatggagcca	660
ctcgactacc aactcgagca caaccattt cttcaacttc ctcaactgga gagcccaaaa	720
cttccttgca atgctaactc ctctccagt tctgctggga ataggcgca atactccatg	780
acaagtttac tggaatctgc aaacatggag atgcttttac cacactcaac atgcacaggg	840
cctcatgata aacaacaact aggtgcattt tatggtgatg agcaggttta cacagactgg	900
agaatgttag ataaattcgt ggcatcacag ctcagccagg aagattttcc agatcatgaa	960
gttgcaagat ttccaatgg ggtgccctac aatccaatgc cagacacgag ctcgcttctg	1020
cgccagaata aattgccacc agaagcagac tatgcagctt caaactccaa ctctatggc	1080
gacgtgatgt ggggttttgg gaattga	1107