



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월22일
(11) 등록번호 10-1820925
(24) 등록일자 2018년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8227 (2013.01)

C12N 15/8257 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0166771

(22) 출원일자 2016년12월08일

심사청구일자 2016년12월08일

(56) 선행기술조사문헌

GenBank Accession Number CP002685
(2016.07.27.)

BMC Bioinformatics. Vol.6, No.169, 페이지1-6
(2005.07.11.)

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

(72) 발명자

신정섭

서울특별시 성북구 길음로9길 50, 910동 2501호(
길음동, 길음뉴타운)

김윤영

서울특별시 성북구 종암로23길 35, 207동 101호
(종암동, 래미안세레니티)

정광욱

서울특별시 성북구 종암로23길 35, 207동 101호
(종암동, 래미안세레니티)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 7 항

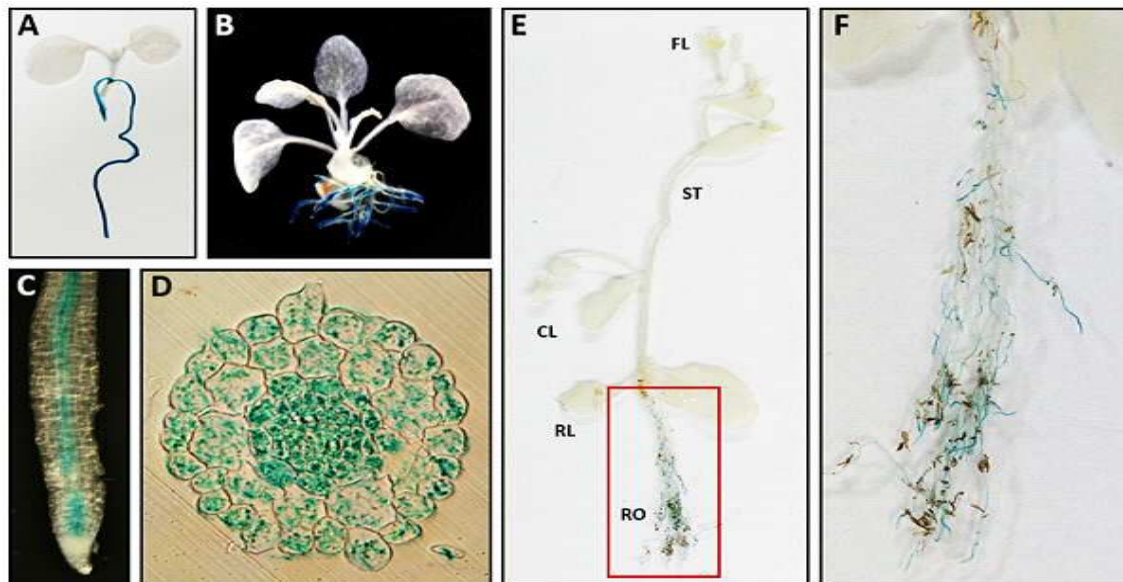
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 뿌리 조직 특이적 발현 프로모터

(57) 요약

본 발명은 식물의 뿌리 조직 특이적 프로모터에 관한 것이다. 본 발명의 식물의 뿌리 조직 특이적 프로모터는 외래 목적 유전자를 식물의 다른 조직에서는 발현시키지 않고, 뿌리 조직에서만 특이적으로 발현되도록 유도하는 장점이 있다. 따라서, 뿌리 조직에서 목적으로 하는 유용 단백질을 생산하고자 하는 형질전환 식물체 개발에 효과적으로 이용될 수 있어, 이와 관련된 형질 개량 산업 등에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011065
 부처명 농촌진흥청
 연구관리전문기관 농촌진흥청
 연구사업명 차세대바이오그린21사업
 연구과제명 생명정보 기반 벼와 애기장대의 비생물적 스트레스 관련 유전자 대량 기능분석
 기 여 율 50/100
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A2A01005974
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구
 연구과제명 티오레독신의 마스터 조절자 메커니즘과 스트레스 반응 네트워크 분석을 통한 식물 세포
 항상성 유지에 대한 시스템적 이해
 기 여 율 50/100
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성되는 식물의 뿌리 조직 특이적 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 식물은 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐, 페레니얼 라이그라스를 포함하는 사료 작물류;로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 식물의 뿌리 조직 특이적 프로모터.

청구항 3

제1항의 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현 벡터.

청구항 4

제3항의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 식물의 뿌리 조직 특이적 형질 전환 세포.

청구항 5

제3항에 따른 벡터 또는 제4항에 따른 형질 전환 세포로 형질 전환된 형질전환 식물체.

청구항 6

- (1) 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성되는 프로모터를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및
- (2) 상기 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는, 뿌리 조직 특이적 형질전환 식물체 제조 방법.

청구항 7

- (1) 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성되는 프로모터 및 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및
- (2) 상기 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는, 외래 유전자를 식물 뿌리 조직 특이적으로 발현시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 식물의 뿌리 조직 특이적 프로모터에 관한 것이다.

배경 기술

작물분자육종은 모든 종(種)의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 계통 단위로만 가능하던 육종기술을 유전자 단위로 끌어내려 무한대의 육종 효과를 미세하게 조절할 수 있다는 측면에서 차세대 농업을 이끌어 갈 핵심적인 기술이다. 이러한 작물분자육종 기술을 이용한 유전자변형 작물의 재배면적과 재배량이 전 세계적으로

지속적으로 증가하고 있으며, 상업화된 유전자변형 신종자의 세계 시장 규모는 2002년 40억 달러에서 2010년 100억 달러(종자와 기술료 포함)로 전체 세계 종자 시장규모 300억 달러 대비 15% 수준이며 종류로는 대두, 옥수수, 면화, 유채가 주 시장을 형성하고 있다. 유전자변형 작물의 효과를 극대화하기 위해서는 외부에서 삽입된 유전자의 발현을 식물의 발달 시기별, 조직별로 미세하게 조절할 수 있어야하며 이를 위해 다양한 프로모터의 개발이 이루어져야 한다. 프로모터는 유전자의 발현을 조절하는 조절 유전자로서 특정 프로모터를 사용했을 경우 유용한 유전자를 적절한 시기에 또는 식물체의 특정한 부위에서 발현시킬 수 있어 생명공학을 이용한 새로운 품종 개발에 있어 중요한 기술이라고 할 수 있다. 특히나 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터의 개발은 그 활용도 및 중요성이 매우 크다 할 것이다. 따라서 관련 지적 재산권 확보를 위한 경쟁이 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 광범위하게 이루어지고 있다.

[0003] 이에 1980년대 초반부터 식물 유전자의 발현을 조절하는 프로모터에 대한 연구가 진행되어 왔다. 꽃양배추 모자이크 바이러스(Cauliflower mosaic virus)의 프로모터가 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도할 것이라고는 가능성이 제시되고(Hohn et al., 1982, Curr. Topics Microbiol. Immunol. 96: 193-236), 상기 프로모터의 염기서열이 밝혀지고(Odell et al., 1985, Nature 313:810-812), 식물체내에서 강한 발현이 증명되었다(Sanders et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 1543-58). 그 후 CaMV 35S(특허번호: JP1993192172-A1) 프로모터는 식물에서 가장 많이 쓰이는 보편적인(universal) 프로모터가 되었다.

[0004] 한편, 식물의 특정 조직 특이적으로 발현을 유도하는 조직 특이 프로모터의 발현에 대한 연구가 꾸준히 진행되었고, 구체적으로, 꽃 조직 특이 프로모터(van der Meer et al., 1990, Plant Mol. Biol. 15: 95-109; Ruiz-Rivero and Prat, 1998, Plant Mol. Biol. 36: 639-648; Chiou and Y도, 2008, Plant Molecular Biology, 66: 379-388; Verdonk et al., 2008, Plant Biotechnology Journal 6: 694-701; Liu et al., 2011, Plant Cell Reports 30: 2187-2194), 약 (anther) 특이 프로모터(van Tunen et al., 1990, Plant Cell 2: 393-401; Kato et al., 2010, Plant Molecular Biology Reports 28: 381-387), 종자 특이 프로모터(Bustos et al., 1989, Plant Cell 1: 839-853; Kridl et al., 1991, Seed Sci Res. 1: 209-219; Washida et al., 1999, Welham and Domoney, 2000, Plant Sci. 159: 289-299; Plant Mol. Biol. 40: 1-12; Furtado et al., 2008, Plant Biotechnology Journal 6: 679-693; Chung et al., 2008, Plant Cell Reports, 27: 29-37) 등이 개발되었다.

[0005] 뿌리는 식물을 지탱해주는 줄기와 함께 식물체를 지탱해주는 지지작용과 토양 속에 있는 물과 무기 양분을 흡수하는 흡수작용, 또한 식물의 광합성 결과 만들어진 양분이 뿌리에 저장되는 저장작용이 일어난다. 이러한 뿌리의 중요성 우수한 형질의 작물의 뿌리를 생육과정 중 건강하게 유지시키는 것은 중요하며 특히, 뿌리 작물들은 생산량과 수확량에 밀접한 관계를 가진다. 따라서, 뿌리 조직에서만 특이적으로 발현하는 프로모터 및 상기 프로모터를 이용하여 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 연구가 지속적으로 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 식물의 뿌리 조직에만 특이적으로 발현되는 프로모터를 발굴하던 중, 애기장대 At2g32910 유전자의 프로모터인 *DCD1*를 확인하고, 이를 포함하는 벡터를 제작한 후, 상기 벡터를 식물체에 형질전환 시킨 결과, 꽃, 줄기 및 잎 등과 같은 다른 조직에서는 발현하지 않고, 뿌리에서만 특이적으로 상기 *DCD1* 프로모터가 발현되고, 또한, 본 발명의 *DCD1* 프로모터는 목적 유전자의 발현을 뿌리에서만 발현되게 유도함을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 식물의 뿌리 조직 특이적 프로모터를 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명의 목적은 상기 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 목적은 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 식물의 뿌리 조직 특이적 형질 전환 세포를 제공하는 것이다.

[0010] 또한 본 발명의 목적은 뿌리 조직 특이적 형질전환 식물체 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 또한 본 발명의 목적은 외래 유전자를 식물 뿌리 조직 특이적으로 발현시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 식물의 뿌리 조직

특이적 프로모터를 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현 벡터를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 식물의 뿌리 조직 특이적 형질 전환 세포를 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 (1) 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및 (2) 상기 벡터를 식물 또는 식물 세포 내에 도입하여 배양하는 단계;를 포함하는, 뿌리 조직 특이적 형질전환 식물체 제조 방법을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 (1) 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및 (2) 상기 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는, 외래 유전자를 식물 뿌리 조직 특이적으로 발현시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 식물의 뿌리 조직 특이적 프로모터는 외래 목적 유전자를 식물의 다른 조직에서는 발현시키지 않고, 뿌리 조직에서만 특이적으로 발현되도록 유도한다. 따라서, 뿌리 조직에서 목적으로 하는 유용 단백질을 생산하고자 하는 형질전환 식물체 개발에 효과적으로 이용될 수 있어, 이와 관련된 형질 개량 산업 등에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 애기장대의 At2g32910 유전자의 프로모터인 *DCD1*를 포함하는 발현 벡터를 나타낸 모식도이다.

도 2는 본 발명의 벡터로 형질전환된 애기장대의 각 조직 별 *DCD1* 유전자 발현을 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다(FL는 꽃, ST는 줄기, CL는 줄기 잎, RL는 로제트 잎, RO는 뿌리, SE는 꼬투리를 의미함).

도 3은 본 발명의 벡터로 형질전환된 애기장대의 각 조직 별 *DCD1* 유전자발현을 조직 화학적 염색으로 분석한 결과를 나타낸 도이다(A는 발아 7일 차 식물, B는 발아 20일 차 식물, C는 B의 뿌리 확대, D는 C의 뿌리의 횡단면, E는 발아 4주 차 식물, F는 E의 뿌리 확대를 나타내고, FL는 꽃, ST는 줄기, CL는 줄기 잎, RL는 로제트 잎, RO는 뿌리를 의미함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 식물의 뿌리 조직 특이적 프로모터를 제공한다.

[0020] 본 발명에 있어서, "프로모터(promoter)"는 일반적으로 전사를 개시하는 지점을 포함하는 암호화 부위의 상류쪽에 위치하는 유전자 부위로, 흔히 유전자 발현을 조절하는 TATA 박스, CAAT 박스 부위, 외부 자극에 반응하여 유전자 발현에 영향을 주는 부위 및 위치와 방향에 상관없이 거의 모든 유전자의 발현을 촉진하는 인핸서 등으로 이루어져 있다. 또한, 이러한 프로모터 중에는 모든 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터 및 시간 또는 위치 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터가 있다. 본 발명의 목적 상, 본 발명에 따른 프로모터는 뿌리 조직 특이적으로 발현하는 애기장대의 At2g32910 유전자의 *DCD1* 프로모터이고, 상기 프로모터는 뿌리 조직에서 목적 유전자의 발현을 유도시킬 수 있다. 상기 프로모터의 DNA 염기서열(서열번호 1)은 애기장대 At2g32910 유전자의 코딩 시퀀스의 번역개시 부위로부터 -1 내지 -482bp에서 유래된 것을 특징으로 한다.

[0021] 상기 서열번호 1의 염기서열 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 서열번호 1의 염기서열 및 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, 서열번호 1의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 서열번호 1의 염기서열 및 이를 구성하는 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 구체적으로, 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 염기 서열에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 염기 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0022] 상기 식물은 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 쌀, 귀리, 수수를 포함하는 식량 작물류; 인삼, 담배, 목

화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐, 페레니얼 라이그라스를 포함하는 사료 작물류;로 이루어진 군으로부터 선택하고, 본 발명의 *DCD1* 프로모터를 이용하여 목적으로 하는 외래 유전자를 도입하여 이의 발현이 유도될 수 있는 식물의 뿌리 조직이라면, 제한되지 않는다.

[0024] 또한 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현 벡터를 제공한다.

[0025] 본 발명에 있어서, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 유전자 적체물을 의미하는 것으로, 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 상기 "작동가능하게 연결된 (operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 말한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 재조합 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 사용한다.

[0027] 본 발명에서 상기 "목적 유전자의 발현"은 상기 목적 유전자를 발현시켜 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서 목적 유전자를 발현하는 방법은 상기 목적 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체(숙주세포)를 배양하여 상기 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 발현시키는 방법일 수 있으며, 이를 통해 상기 단백질이 관여되는 생합성 경로의 최종산물을 제조할 수 있다.

[0028] 본 발명의 벡터는 또한 선택 마커, 외래 유전자, 프로모터 및 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 사용 가능한 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다.

[0030] 본 발명의 벡터는 세포 내에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않고 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 따라서, 본 발명에 사용될 수 있는 벡터로 다양한 클로닝 부위를 가지고 있는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119 등), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5 등), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50 등) 및 Ti 플라스미드 등의 플라스미드가 있고, 식물 바이러스 벡터가 있으며, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCambia 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라면 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터로 발현하고자 하는 목적 유전자의 염기 서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있으나, 바람직하게는, pBI101 벡터를 이용한다. 상기 벡터는 GUS 리포터 유전자가 포함된 벡터로, GUS(beta-glucuronidase) 리포터 유전자는 외래 유전자의 한 예로서, 본 발명의 *DCD1* 프로모터를 상기 외래 유전자 앞에 위치하도록 하여, *DCD1* promoter::GUS(이하 Pro*DCD1*라 함)를 제조하였다. 상기 GUS 리포터 유전자는 다른 목적으로 하는 유용한 외래 유전자로 치환될 수 있다.

[0031] 상기 외래 유전자는 식물 뿌리 조직에서 발현을 원하는 어떤 유전자도 될 수 있으며, 본 발명의 식물 뿌리 조직 특이 발현벡터에서 상기 프로모터 부위의 뒤에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 "형질전환"은 DNA의 세포내로의 도입을 말한다.세포는 "숙주 세포"로 명명되며, 이는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 대표적인 원핵 숙주 세포는 E. coli의 각종 균주를 포함한다. 도입된 DNA는 일반적으로 DNA가 삽입된 조각을 함유하는 벡터의 형태이다. 도입된 DNA 서열은 숙주 세포와 동일한 종, 또는 숙주 세포와는 상이한 종으로부터 기원할 수 있거나, 또는 이는 숙주 종으로부터 기원한 일부 DNA 및 일부 외부 DNA를 함유하는 하이브리드 DNA 서열일 수 있다.

[0033] 상기 식물은 전체 식물, 식물 기관(예: 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 등), 종자 및 식물 세포(조직 배양 세포 포함) 및 이의 자손을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 식물의 부류는 일반적으로 형질전환 기술에 적용 가능한 고등 식물의 부류, 및 조류와 같은 특정의 하등 식물과 같이 광범위하다. 이는 배수체, 이배체 및 반수체를 포함하는 각종의 배수성 수준의 식물을 포함한다.

[0034] 예를 들어, 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) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등 으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

[0035] 아그로박테리움 벡터에 의한 식물체의 형질전환을 위한 최적 절차는 형질전환될 식물체의 종류에 따라 다양하다. 아그로박테리움 매개 형질전환을 위한 대표적인 방법은 멸균된 묘목 및/또는 작은 식물체로부터 유래 된, 배축, 정단(shoot tip), 줄기, 잎 또는 꽃 조직의 외식편의 형질전환을 포함한다. 그와 같은 형질전환된 식물체는 유성생식으로 또는 세포 또는 조직 배양에 의해 번식될 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환은 이전에 다수의 상이한 종류의 식물체를 위해 기재되었으며 그와 같은 형질전환을 위한 방법은 당업계에 공지된 문헌에서 찾을 수 있다. 본 발명에서 사용 가능한 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 이용되는 어떠한 균주라도 사용이 가능하다.

[0037] 또한 본 발명은 상기 발현 벡터에 의해 형질 전환된 식물의 뿌리 조직 특이적 형질 전환 세포를 제공한다.

[0038] 상기 발현 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 식물 세포, 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙 토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용 가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.

[0040] 또한 본 발명은 (1) 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및 (2) 상기 벡터를 식물 또는 식물 세포 내에 도입하여 배양하는 단계;를 포함하는, 뿌리 조직 특이적 형질전환 식물체 제조 방법을 제공한다.

[0041] 본 발명에 있어서, "배양"은 식물 또는 식물 세포를 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다.

[0042] 상기 식물 세포는 통상의 배지에서 생육 가능하다. 배지는 특정 식물 세포를 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 식물 세포가 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.

[0043] 또한 본 발명은 (1) 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 및 (2) 상기 벡터를 식물체에 도입하는 단계;를 포함하는, 외래 유전자를 식물 뿌리 조직 특이적으로 발현시키는 방법을 제공한다.

[0045] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 자세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0047] **실시예1. 애기장대의 At2g32910 유전자의 프로모터인 DCD1(Development and cell death domain containing protein 1)프로모터 클로닝**

[0048] 애기장대(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)의 총 gDNA(genomic DNA)을 주형으로 하여 양 말단에 Sal(5' 말단) 및 Sma(3' 말단)를 포함하는 S 프라이머(5'-CATGTCGACGTAAGAGTTCTTCGAGCAGACTCTAGATTC-3', 서열번호 2) 및 AS 프라이머(5'-CATCCGGGTTTCAAGGAACAAGCAGATTCAAAGC-3', 서열번호 3)를 이용하여 At2g32910 유전자의 프로모터인 DCD1의 482 bp를 PCR 기법을 이용하였으며, 구체적으로, 증폭은 95도에서 2분동안 초기변성과정을 거친 후, 95도에서 20초, 57도에서 20초, 72도에서 50초의 과정을 33회 수행하였고, 이 후 PCR 산물을 확보하였다. PCR 산물 말단을 각 제한 효소로 절단 한 후, 레프트보더(left boarder) 및 라이트보더(right boarder) 사이에 GUS(beta-glucuronidase)를 포함하는 식물 형질전환용 바이너리벡터(binary vector)인 pBI101 벡터에 클로닝 하였고, 이를 도 1에 나타내었다. 클론을 해독(sequencing)한 결과 정확한 염기서열이 클로닝(cloning)되었음을 확인하였고, DCD1 프로모터의 전체 염기서열은 서열번호 1로 나타내었다.

[0049]

[0050]

실시예 2. *DCD1* 프로모터의 애기장대 형질전환

[0051]

상기 실시예 1에서 제작한 도 1로 나타내는 벡터를 아그로박테리움 (*Agrobacterium* GV3101)에 냉-해동(Freeze-thaw) 방법(An, G. 1987, Methods in Enzymology)으로 도입하였다. 형질전환된 아그로박테리움을 꽃침지방법(flower dipping, Clough와 Bent, 1998, The Plant Journal)으로 애기장대에 형질전환 시켰다. 상기 형질전환시킨 애기장대를 카나마이신(Kanamycin)이 50 mg/ml 함유된 식물용 MS(Murashige and Skoog) 배지에 스크리닝(screening)하여 형질전환된 식물체를 확보하였다.

[0053]

실시예 3. 형질전환된 애기장대 각 조직의 *DCD1* 프로모터의 발현 분석

[0054]

상기 실시예 1에서 제작한 벡터로 형질전환된 애기장대의 조직에서 *DCD1* 유전자 발현을 확인하기 위하여, real-time PCR을 수행하였고, *DCD1* 프로모터 발현을 확인하기 위해 화학적 염색을 수행하여 이를 확인하였다.

[0055]

3-1. 형질전환된 애기장대 각 조직의 *DCD1* 유전자 발현 분석을 위한 real-time PCR 수행

[0056]

구체적으로, 상기 실시예 2에서 확보한 4주 차 형질전환된 애기장대의 로제트(Rosette) 잎, 줄기 잎(cauline leaf), 줄기(stem), 꽃(flower) 및 꼬투리(silique)를 조직별로 샘플링하여 RNA를 추출하였다. 각각의 RNA를 이용하여 cDNA로 합성한 후 S 프라이머(5'-GACATACATGGTTCTCCAGGTAGA-3', 서열번호 4) 및 AS 프라이머(5'-CCATATCCAAGATACATTAACATCAGATAAATTC-3', 서열번호 5)를 이용하여 95도에서 5분 동안 초기변성과정을 거친 후, 95도에서 10초, 54도에서 10초, 72도에서 20초의 조건으로 real-time PCR을 수행하여 *DCD1* 유전자의 발현을 관찰하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0057]

도 2에 나타난 바와 같이, 다른 조직보다 뿌리에서 상대적으로 *DCD1* 유전자의 발현이 높음을 확인하였다.

[0059]

3-2. 형질전환된 애기장대 각 조직의 *DCD1* 프로모터의 발현 분석을 위한 조직 화학적 염색 분석

[0060]

구체적으로, 상기 실시예 2에서 확보한 발아 7일 차, 20일 차 및 4주 차 형질전환된 애기장대의 각 조직을 수득하였다. 그 후, 상기 각 조직을 DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-glu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronidase) 1 mM, 100 mM sodium phosphate(pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5mM potassium ferrocyanide 및 0.1 % 트리톤(Triton) X-100을 함유하는 용액에 담가 37도에서 12시간 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 100% 에탄올을 계속적 갈아주면서 조직에 존재하는 색소를 제거하여 형질전환된 애기장대의 GUS(beta-glucuronidase)의 활성을 분석하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0061]

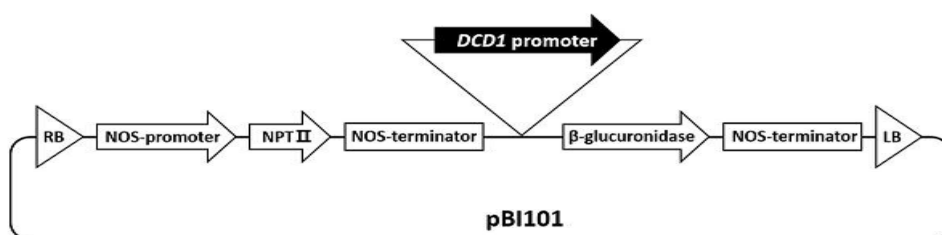
도 3의 A 및 B에 나타난 바와 같이, 발아 7일 차(A) 및 발아 20일 차(B)의 형질전환된 애기장대의 뿌리조직에서 특이적으로 GUS가 발현됨을 확인하였다. 또한, 도 3의 C 및 D에 나타난 바와 같이, 발아 20일 차 형질전환된 애기장대의 뿌리 조직을 확대한 사진(C) 및 이의 횡단면을 관찰한 결과(D), 전체적으로 뿌리 조직에 GUS가 발현됨을 확인하였다. 또한, 도 3의 E 및 F에 나타난 바와 같이, 발아 4주 차 형질전환된 애기장대의 뿌리(RO), 꽃(FL), 줄기(ST), 줄기 잎(CL) 및 로제트 잎(RL) 조직과 GUS의 발현을 비교한 결과, 뿌리 조직에서만 특이적으로 GUS가 발현됨을 확인하였다.

[0062]

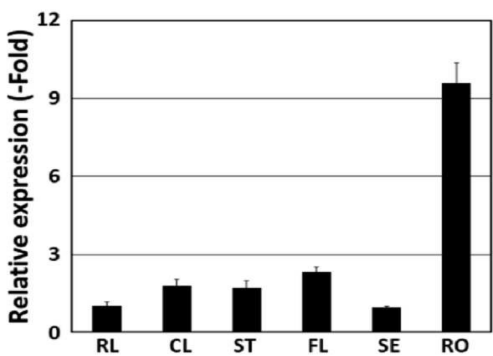
따라서, 상기와 같은 일련의 결과를 통하여, 서열번호 1로 표시되는 *DCD1* 프로모터가 뿌리특이적으로 발현하는 프로모터임을 확인하였다.

도면

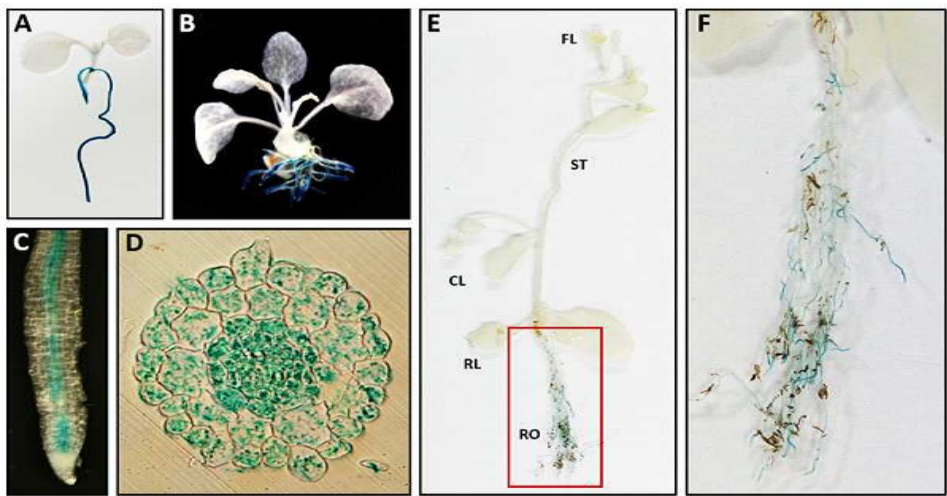
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110>	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	Root tissue-specific promoter	
<130>	1-76	
<160>	5	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	482	
<212>	DNA	
<213>	Unknown	
<220><223>	DCD1 promoter	
<400>	1	
gtaagagttc ttcgagcaga ctctagattc gatttgtttt tttccttttc gggtttgttt		60
caaatcaatc tcaatttcag ggtaaccaa gtttagactt attcatttg attctgcccg		120

gatctctata catgtcaatt acagtccttt tacattttct tgatttggaa accttttcgg	180
gatttaattg attagcttaa gattacaagt gatgaaaaa aagacagaga ctttagcaaa	240
tgttttctct catctcttaa ttgcgtctt aattacaatc ttcttgttc agttactgtt	300
ttgtaagaca ttgacattat aatctacttg ttggagatt ggaattatga gaagagaatc	360
tttctgatgc caaatgtcat tgaataatca ttgctaatag tttcttttac catatgattc	420
atgatctctt tticgtttta tgttcagcg actaagcttt gaaatctgct tgttccttga	480
aa	482
<210> 2	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer 1	
<400> 2	
catgtcgacg taagagttct tcgagcagac tctagattc	39
<210> 3	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Reverse primer 1	
<400> 3	
catcccggtt ttcaaggaac aagcagattt caaagc	36
<210> 4	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer 2	
<400> 4	
gacatacatg gtttctccag gtaga	25
<210> 5	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Reverse primer 2

<400> 5

ccatatccaa gatacattaa acatcagata aattc

35