



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl. (11) 공개번호 10-2007-0058221
C12N 15/29 (2006.01) (43) 공개일자 2007년06월08일

(21) 출원번호 10-2005-0116579
(22) 출원일자 2005년12월01일
심사청구일자 2005년12월01일

(71) 출원인 세종대학교산학협력단
서울 광진구 군자동 98 세종대학교

(72) 발명자 소문수
서울 광진구 군자동 99 일성아파트 102-710

(74) 대리인 이문섭
양부현
윤여강

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 식물의 발달 조절 유전자 및 이를 이용한 식물의 발달 조절방법

(57) 요약

본 발명은 식물체에서 과발현되는 경우 식물의 발달을 조절하는 단백질 PRE1 및 이를 암호화하는 유전자에 관한 것이다. 본 발명의 PRE1유전자를 이용하여 식물체를 형질전환시킴으로써 지배적인 비의존적 종자의 발아, 조기 개화, 줄기 생장 촉진, 종자 발달 촉진의 표현형을 유도할 수 있으며, 이를 통해 식용작물 및 화훼작물의 생산성 및 상품성 증대를 도모할 수 있다.

대표도

도 1a

특허청구의 범위

청구항 1.

서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 식물의 발달 조절 단백질 PRE1.

청구항 2.

상기 제 1 항의 단백질을 암호화하는 식물의 발달 조절 유전자 PRE1.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, 상기 식물의 발달 조절 유전자는 서열목록 제1서열에 기재된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 식물의 발달 조절 유전자 *PRE1*.

청구항 4.

상기 제 2 항 또는 제 3 항의 식물의 발달 조절 유전자 *PRE1*를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 5.

상기 제 4 항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

청구항 6.

제 5 항에 있어서, 상기 형질전환체는 식물체인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 7.

상기 제 4 항의 재조합 벡터로 식물체를 형질전환시켜 식물의 발달 조절 유전자 *PRE1*을 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 발달을 조절하는 방법.

청구항 8.

제 7 항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리 및 수수로 구성된 군으로부터 선택되는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 구성된 군으로부터 선택되는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 구성된 군으로부터 선택되는 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 구성된 군으로부터 선택되는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 구성된 군으로부터 선택되는 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 구성된 군으로부터 선택되는 사료 작물류로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 식물의 발달을 조절하는 *PRE1* 유전자 및 단백질에 관한 것이다.

식물은 성장과 발달을 조절함으로써 여러 환경 변화에 대처, 적응하는 체계를 갖추고 있다. 종자의 발아에서부터 개화에 이르는 전체 생활환에 걸쳐 환경 자극과 식물의 발달 프로그램은 끊임없는 상호작용을 통해 식물의 생존 적합성을 증가시

키는 것으로 알려져 있다. 그러한 환경 자극에 따른 식물의 발달 조절은 주로 외부 환경과 식물의 내재적 발달 프로그램과의 상호 작용을 통해 일어나는 것으로, 주로 식물 호르몬들이 그러한 상호작용에 필수적인 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다.

지베렐린 (GAs)은 식물 호르몬 중의 하나로서, 종자의 발아, 줄기 생장, 잎의 발달, 꽃과 과실의 발달 등 식물의 전체 생활에 걸친 다양한 생장 및 발달을 조절하는 것으로 알려져 있다(Hooley, 1994). 대부분의 지베렐린-생합성 효소를 암호화하는 유전자들은 클로닝 되었고, 특성의 돌연변이체를 이용한 유전학적 분석을 통하여 분자적 수준에서 심층적으로 연구되었다 (Hedden and Phillips, 2000; Yamaguchi and Kamiya, 2000). 이와는 반대로, GA 시그널링의 분자적 메커니즘은 거의 규명되어 있지 않다(Fleet and Sun, 2005; Olszewski et al., 2002; Richards et al., 2001). 원형질막에 위치하는 지베렐린의 수용체는 규명되어 있지 않다(Gilroy and Jones, 1994). 분자생물학적 접근과 약리학적 접근에 의하여, Ca^{2+} , 칼모둘린, 헤테로트라이메릭 G 단백질, cGMP, 단백질 키나아제 및 GMYB는 곡류의 호분세포에서 지베렐린 신호전달인자로 확인되었다 (reviewed by Lovegrove and Hooley, 2000). 개화 유도 조건하에서 mRNA 레벨 증가를 나타내는 유전자를 밝히기 위한 분자적 연구를 통하여 *FPF1*의 존재가 밝혀졌고, 이 유전자의 과발현이 지베렐린에 대한 감수성을 증가시키며, 이러한 사실은 GA 신호전달 경로에서 포지티브 역할을 수행한다는 것을 나타낸다(Kania et al., 1997). 또한, 애기장대(*Arabidopsis*)에서 지베렐린 신호전달에 관여하는 여러 조절인자들이 규명되었다. SLEEPY1(SLY1) 및 PICKLE(PKL)은 지베렐린 신호전달의 포지티브 조절인자이다. *SLY1* 및 *PKL*은 각각 추정된 F-상자-포함 단백질(F-box-containing protein) 및 염색질 리모델링 인자를 암호화한다(McGinnis et al., 2003; Ogas et al., 1999). 지베렐린 신호전달의 네거티브 조절인자는 SHORT INTERNODE(SHI), SPINDLY(SPY) 및 REPRESSOR OF GA1 (RGA)/GA-INSENSITIVE (GAI)단백질을 포함한다. *SHI*는 RING 핑거 단백질을 암호화하며, *SPY*는 O-GlcNAc 전이효소로 기능하는 것으로 판단된다(Jacobsen et al., 1996; Peng et al., 2000).

RGA 및 GAI는 추정의 전사 조절자로서의 GRAS 패밀리의 서브패밀리인 DELLA 단백질을 대표한다(Koornneef et al., 1985; Peng et al., 1997; Silverstone et al., 1998). DELLA 패밀리의 다른 멤버인 RGL1 및 RGL2은 지베렐린 신호전달을 부가적으로 억제한다(Lee et al., 2002; Wen and Chang, 2002). 지베렐린 신호전달 조절인자들 간의 분자적 상호작용은 현재 연구 중에 있다. 최근의 유전학 연구는 지베렐린이 SLY1/SNE-의존 프로테아좀-매개 분해를 통하여 DELLA 단백질을 타겟으로 하여 파괴한다는 것을 보여준다(Dill et al., 2001, 2004; Fu et al., 2004; McGinnis et al., 2003; Silverstone et al., 2001; Strader et al., 2004). 아주 최근에, 용해성 지베렐린-수용체가 확인되었고 이 수용체는 DELLA 단백질의 분해 조절을 통하여 기능하는 것으로 알려졌다(Ueguchi-Tanaka et al., 2005). 그러나, DELLA 단백질이 GA-의존성 반응을 조절하는 데 관여하는 다운스트림 작용자, 그리고 GA가 분해를 촉발하는 조절 기작은 아직까지 규명되어 있지 않다.

비록 유전학적 접근은 지베렐린 신호전달의 다양한 구성요소를 규명하는데 있어서 성공적이었으나, 지베렐린 신호전달에 관여하는 몇몇 유전자들은 아직까지 동정되거나 특성이 규명되어야 하는 상태로 남아있다. 활성화표지기술(activation tagging technology)을 이용하는 기능획득선별법(Gain-of-function screens)은 유전자 및 유전자 패밀리의 기능적 동정에서 성공적으로 수행되어 왔고(Weigel et al., 2000), 배의 치사(embryonic lethality) 및 기능적 중복과 같은 기능손실선별법의 단점을 극복한다.

활성표지기술을 이용한 기능획득에 기초한 연구에서, 본 발명자들은 헬릭스-루프-헬릭스 모티프를 가진 추정의 전사조절인자 *PRE1*의 기능적인 특징을 보고한다. *PRE1* 과발현 유전자 형질전환 식물의 생리학적 또는 분자적 유전 분석으로부터의 결과는 지베렐린-의존 반응이 *PRE1*의 발현에 의해 영향을 받는다는 것을 보여준다. 또한, 유전자 형질전환 연구는 *PRE1*-관련 유전자는 기능적으로 중복되며 애기장대에서 지베렐린-의존 성장 및 발달의 다양한 양상과 관련되어 있다는 것을 지적한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 지베렐린-비의존적 식물 발달 조절 방법을 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 애기장대에서 분리된 유전자 *PRE1*이 식물의 발달 조절에 관여한다는 것을 발견하고 상기 유전자에 의해 형질 전환된 식물체에서, 야생형에 비하여 종자의 발아, 조기 개화, 줄기 생장 촉진 및 종자 발달 촉진 등 식물의 발달이 상당히 우수하다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 식물의 발달을 조절하는 *PRE1* 단백질을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 식물의 발달을 조절하는 PRE1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 *PRE1*을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 식물의 발달을 조절하는 PRE1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 유전자 *PRE1*을 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 식물의 발달 조절 유전자 *PRE1*을 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 발달을 조절하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 구성

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 식물의 발달 조절 단백질 PRE1을 제공한다.

본 발명자들은 식물 발달 조절 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 애기장대 (*Arabidopsis*)에서 분리된 PRE1 (paclobutrazol-resistant1)이 지베렐린 시그널링에 관여하여 식물의 발달을 조절할 수 있다는 것을 발견하고, 상기 유전자에 의해 형질전환된 식물체에서, 야생형에 비하여 종자의 발아, 초기 개화, 줄기 생장 촉진 및 종자 발달 촉진 등 식물의 발달을 증진시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

본 명세서에서 용어 "식물의 발달"은 종자의 발아, 줄기 생장, 잎의 발달, 꽃과 과실의 발달 등 식물의 전체 생활환에 걸친 다양한 성장 및 생장을 포괄하는 의미로 사용된다. 바람직하게는, 본 명세서에서 PRE1을 언급하면서 사용되는 용어 "식물의 발달"은 식물의 발달을 증진시키는 것을 의미한다.

본 발명의 PRE1 단백질은 지베렐린-비의존성 식물 발달 증진 표현형을 유발할 뿐만 아니라, 지베렐린에 대한 반응성을 더욱 크게 하여 식물 발달을 증진시키는 작용도 한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 식물의 발달을 조절하는 단백질 PRE1을 암호화하는 유전자 *PRE1*을 제공한다.

본 명세서에서 용어 "유전자"는 특정 단백질을 암호화하는 모든 핵산분자 (gDNA, cDNA 및 mRNA)를 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

본 발명의 PRE1 단백질 또는 *PRE1* 유전자는, 상술한 지베렐린-비의존성 식물 발달을 촉진할 수 있다면, 상기한 서열에 한정되지 않고 이 서열에 변화(changes 또는 alterations)가 있는 서열도 포함한다는 것은 당업자에게 명확하다.

뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.

또한, 뉴클레오타이드에서의 변이가 PRE1 자체에 변화를 가져올 수도 있다. PRE1의 아미노산에 변화를 가져오는 변이인 경우에도 본 발명의 PRE1과 거의 동일한 활성을 나타내는 것이 얻어질 수 있다.

본 발명의 PRE1 변이체 범위에 포함될 수 있는 생물학적 기능 균등물은 본 발명의 PRE1과 균등한 생물학적 활성을 발휘하는 아미노산 서열의 변이에 한정될 것이라는 것은 당업자에게 명확하다.

이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

변이를 도입하는 데 있어서, 아미노산의 소수성 인덱스 (hydropathic index)가 고려될 수 있다. 각각의 아미노산은 소수성과 전하에 따라 소수성 인덱스가 부여되어 있다: 아이소루이신 (+ 4.5); 발린 (+ 4.2); 루이신 (+ 3.8); 페닐알라닌(+ 2.8); 시스테인/시스테인 (+ 2.5); 메티오닌 (+ 1.9); 알라닌 (+ 1.8); 글라이신 (-0.4); 쓰레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 타이로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 라이신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).

단백질의 상호적인 생물학적 기능 (interactive biological function)을 부여하는 데 있어서 소수성 아미노산 인덱스는 매우 중요하다. 유사한 소수성 인덱스를 가지는 아미노산으로 치환하여야 유사한 생물학적 활성을 보유할 수 있다는 것은 공지된 사실이다. 소수성 인덱스를 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 소수성 인덱스 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

한편, 유사한 친수성 값 (hydrophilicity value)을 가지는 아미노산 사이의 치환이 균등한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 초래한다는 것도 잘 알려져 있다. 미국 특허 제4,554,101호에 개시된 바와 같이, 다음의 친수성 값이 각각의 아미노산 잔기에 부여되어 있다: 아르기닌 (+ 3.0); 라이신 (+ 3.0); 아스파르테이트(+ 3.0 $\pm$ 1); 글루타메이트 (+ 3.0 $\pm$ 1); 세린 (+ 0.3); 아스파라긴 (+ 0.2); 글루타민 (+ 0.2); 글라이신 (0); 쓰레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 $\pm$ 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 루이신 (-1.8); 아이소루이신 (-1.8); 타이로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4).

친수성 값을 참조하여 변이를 도입시키는 경우, 바람직하게는 ± 2 이내, 보다 바람직하게는 ± 1 이내, 보다 더 바람직하게는 ± 0.5 이내의 친수성 값 차이를 나타내는 아미노산 사이에 치환을 한다.

분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다 (H. Neurath, R.L.Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다.

상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 PRE1 단백질 또는 *PRE1* 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 95%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

본 발명의 PRE1은 다음과 같이 보다 구체적으로 특정될 수 있다: (a) 헬릭스-루프-헬릭스 (helix-loop-helix) 모티프를 포함하는 조절 단백질; (b) 핵내 단백질; 그리고, (c) 지베렐린 작용을 억제하는 네거티브 조절자의 억제자로 작용하거나, 직접적으로 지베렐린의 작용을 매개하는 포지티브 조절자로 작용.

본 발명의 PRE1은 지베렐린 시그널링에 관여하며, 이를 과발현시키는 경우에는 종자의 발아, 초기 개화, 줄기 생장 촉진 및 종자 발달 촉진 등 증진된 발달 양상을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 PRE1은 식물 (특히, 식용작물 및 화훼작물)의 생산성 및 상품성을 증대시키는 데 이용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 식물의 발달 조절 단백질 PRE1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 (a) 식물의 발달 조절 단백질 PRE1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 (b) 상기 뉴클레오타이드에 작동적으로 결합된 (operably linked) 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

본 명세서에서 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.

본 명세서에서 용어 "벡터"는 또 다른 핵산을 그것에 결합시켜 이송시킬 수 있는 핵산 분자를 의미한다.

본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.

예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pL^λ프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, T7 프로모터, *tac* 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pL^λ프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHc79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λgt4·λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 식물의 발달 조절 단백질 PRE1의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질 (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His (hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다. 상기 정제를 위한 추가적인 서열 때문에, 숙주에서 발현된 단백질은 친화성 크로마토그래피를 통하여 신속하고, 용이하게 정제된다.

본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

본 발명의 유전자는 식물에서 분리되었고, 식물의 발달을 조절하는 작용을 할 수 있으므로, 식물에 대하여 가장 바람직한 유용성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 벡터는 (i) 식물의 발달 조절 단백질 PRE1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 식물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 식물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 식물발현용 벡터를 제공한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 카울리폴라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 신타아제 (nos) 프로모터, 피크워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리 폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러리스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카복실라아제 스 물 서브유닛 (ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리오포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라 비둡시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터 및 옥토파인 신타아제 프로모터를 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위는 아그로박테리움 튜메피션스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것 (nos 3' end) (Bevan et al., *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 튜메피션스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로 테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분 및 CaMV 35S 터미네이터를 포함한다.

선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자 (예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반 한다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제 (예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로 마이신 등) 내성 유전자 (예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*hpt*), 등) 를 포함한다.

본 발명의 가장 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 재조합 벡터는 도 8의 유전자 지도를 갖는 pNB96-PRE1이다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 있는 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈팅겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라 티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트 (*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵세포인 경우, CaCl_2 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., *Nucleic. Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-텍스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)) 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현되며, 이러한 경우에는 다량의 식물 발달 조절 단백질 PRE1을 얻게 된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 형질전환체는 식물체인 것을 특징으로 하는 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기의 재조합 벡터로 식물체를 형질전환시켜 식물의 발달을 조절하는 유전자 PRE1을 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 발달을 조절하는 방법을 제공한다.

본 발명에서 이용되는 익스플랜트는 식물 세포 또는 식물 조직이며, 식물 조직을 이용하는 경우에는 캘러스를 이용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 방법에 있어서, 식물세포의 형질전환은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있으며, 이는 전기천공 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 입자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572 (1990)) 및 아그로박테리움-중재 형질전환 (미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호)을 포함한다. 이 중에서, 아그로박테리움-중재 형질전환이 가장 바람직하다.

식물 원형질 또는 다양한 익스플랜트로부터 식물체의 발달시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달은 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다 (미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

본 발명의 방법은 다양한 식물체에 적용가능하며 식물체는, 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리 및 수수로 구성된 군으로부터 선택되는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 구성된 군으로부터 선택되는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 구성된 군으로부터 선택되는 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 구성된 군으로부터 선택되는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 구성된 군으로부터 선택되는 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 툴페스큐 및 페레니얼라이그라스로 구성된 군으로부터 선택되는 사료 작물류로부터 선택될 수 있다.

본 발명에 있어서, 바람직한 형질전환 방법은 아그로박테리움 시스템을 이용하여 실시되며, 보다 바람직하게는 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)-바이너리 벡터 시스템을 이용하여 실시된다.

아그로박테리움 시스템을 이용하는 방법에 있어서, 구체적인 일 실시예는 다음의 단계를 포함한다: (a') 식물 세포의 게놈 DNA에 삽입될 수 있고 다음의 서열을 갖는 벡터가 내재되어 있는 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)로 식물체의 익스플랜트를 감염시키는 단계: (i) 식물의 발달 조절 단백질 PRE1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 식물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; (iii) 식물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위; (b') 상기 감염된 익스플랜트를 재분화 배지에서 재분화하여 형질전환 식물체를 얻는 단계.

식물 세포의 형질전환은 Ti 플라스미드를 포함하는 아그로박테리움 튜머페이션스로 실시된다 (Depicker, A. et al., Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids. In Genetic Engineering of Plants, Plenum Press, New York (1983)).

보다 바람직하게는, pBin19, pRD400, pRD320, pGA1611, pGA1991 및 pNB96과 같은 바이너리 벡터 시스템이 이용된다 (An, G. et al., "Binary vectors" In Plant Gene Res. Manual, Martinus Nijhoff Publisher, New York(1986); An et al., 1988; 및 Lee et al., 1999). 본 발명에 적합한 바이너리 벡터는 (i) 식물에서 작동하는 프로모터; (ii) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 구조 유전자; 및 (iii) 폴리아데닐화 시그널 서열을 포함한다. 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자 (예: 루시페라아제 및 글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 바이너리 벡터에 이용되는 프로모터의 예는 CaMV 35S 프로모터, 1 프로모터, 2 프로모터 및 노팔린 썬타아제 (nos) 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

아그로박테리움 튜머페이션스에 의한 익스플랜트의 감염은 당업계에 공지된 방법을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 감염 과정은 아그로박테리움 튜머페이션스의 배양물에 익스플랜트를 함침시켜 공동배양하는 과정을 포함한다. 이에 의해 아그로박테리움 튜머페이션스는 식물체내로 감염된다.

아그로박테리움 튜머페이션스에 의해 형질전환된 익스플랜트는 재분화 배지에서 재분화되며, 이는 최종적으로 형질전환 식물체를 형성한다.

본 발명에 따라 형질전환된 식물은 당업계에 공지된 방법에 의해 형질전환 여부가 확인된다. 예를 들어, 형질전환된 식물의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 형질전환 식물의 게놈에 삽입된 외래 유전자가 규명될 수 있다. 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯팅을 실시하여 형질전환 여부를 확인할 수 있다 (Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989).)

본 발명의 방법에 따라 형질전환되어 생산된 형질전환 식물은, 종자의 발아 촉진, 조기 개화, 줄기 생장 촉진 및 종자 발달 촉진 등과 같은 증진된 발달 양상을 나타내며, 결국 이렇게 변화된 형질은 식물 (특히, 식용작물 및 화훼작물)의 생산성 및 상품성을 증대시키는 데 크게 기여할 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

식물재료준비 및 성장조건

다르게 표시한 것들을 제외하고는 야생형으로서 애기장대 생태형 (ecotype) Col을 사용하여 실험을 행하였다. *gai-1* (Ler background) 및 *spy-3* (Col background) 돌연변이체는 ABRC(Ohio State University, Columbus)로부터 제공받았다. Col 백그라운드에서 *ga2* 돌연변이체의 새로운 심각한 대립형질체를 앞선 스크리닝으로부터 분리하였고 *ga2-201*라 명명하였다. 비록 활성표지된 라인으로부터 분리되긴 하였으나, *ga2-201*은 활성표지와 관계없는 자연적인 돌연변이로부터 유래하였다. 논문 (Weigel et al., 2000)에서 개시한 바에 따라 pSKI015 벡터를 사용하여 활성-표지 형질전환체를 제조하였다. 애기장대 식물체를 아그로박테리움 튜메페이스스 (*Agrobacterium tumefaciens*)를 사용하여 진공 침윤법 (Bechtold and Ellis, 1993)으로 형질전환 시켰다. *PRE1act* 변이체를 약 5000 T1 세대의 식물체로부터 분리하였다. 식물체를 토양 또는 0.8% 아가를 포함하는 1/2 MS(Murashige-Skoog) 배지(Duchefa)에서 장일 조건 (16시간의 명기/8시간의 암기)에서 성장시켰다. 하배축 길이 측정을 위하여, 종자를 0.8%의 아가 또는 다양한 농도의 GA₃가 포함된 MS 배지에 접종하였다. 4℃에서 3일간 저온처리 후, 발아를 촉진하기 위하여 플레이트를 23℃에서 8시간 동안 백색광 (WL, 3 mWcm⁻²) 하에서 배양하고 이후 광조건 상태로 옮겼다. 발아를 위하여, 고압멸균된 1/2 MS 배지에 필터-살균된 x100 스톱 용액의 파클로부트라졸, ABA 및 GA₃ (Sigma)를 첨가하였다. 배지에 호르몬을 첨가하는 방식으로 GA (50 μM GA₃)를 외래적으로 적용하였다(Bouquin et al., 2003).

PRE1 유전자의 클로닝

동형접합 *PRE1act* 돌연변이체와 야생형 Col-0간의 교배로 발생한 106 개의 F2 세대를 분석함으로써 *PRE1act* 돌연변이의 표현형이 T-DNA 삽입 마커와 함께 분리되는지 확인하였다. *PRE1act*는 우성이었고 원래의 변이체는 단일의 T-DNA 삽입부위를 포함하였다. 이어지는 생리학적 실험을 위하여, 돌연변이체를 두번 역교배하였다. *PRE1act* 돌연변이체에서 T-DNA 삽입부위를 TAIL(thermal asymmetric interlaced)-PCR을 통해 규명하였다(Liu et al., 1995). T-DNA 좌측 보더에 인접한 게놈 DNA 서열을 축퇴성 (degenerate) 프라이머 (Liu et al., 1995)를 이용하여 얻었다: LBoligo-2 (5'-TGCAGGCATGCAAGCTTAT-3'), LBoligo-3 (5'-ACGTCGAAATAAAGATTTCCGAA-3') 및 LBoligo-4 (5'-AATAACGCTGCGGACATCTA-3'). 서열 분석과 데이터베이스 서치는 The Arabidopsis Information Resource (www.tair.org)에서 NCBI BLAST 프로그램으로 행하였다. T-DNA는 *At5g39850*와 *At5g39860* 두 유전자 사이에 삽입되어 있었다. 상기 두 유전자의 오픈 리딩 프레임 전체에 해당하는 게놈 DNA를 교정 능력이 있는 PWO 중합효소 (Boehringer Mannheim)를 이용한 PCR로 획득하였고, 이를 RNA 겔 블롯 분석을 위한 프로브로 이용하였다. 조사된 데이터에 의하면, *PRE1act* 돌연변이에서 *At5g39860*의 발현량이 높다는 것을 알 수 있었다. *PRE1act* 표현형이 상기 유전자의 과발현 때문이라는 것을 확인하기 위하여, *At5g39860*의 전체 게놈 부위를 남홍길 박사 (POSTECH, Pohang, Republic of Korea)로부터 입수한 식물 발현 벡터 pNB96 (참조: 도 8)에 삽입하였고, 이 경우 상기 유전자의 발현은 CaMV 35S 프로모터의 조절 하에 놓이도록 하였다. 이렇게 하여 얻어진 바이너리 벡터를 아그로박테리움 튜메페이스스 GV3101에 도입시켰고, 야생형 애기장대 식물체를 형질전환시키는데 사용하였다. 40주 이상의 독립된 T1 형질전환 식물체를 선별하였다. 적어도 15주의 독립된 단일의 T-DNA 삽입 라인을 이용하여 표현형 분석을 행하였다.

PRE1-GUS의 세포 내 분포확인

PRE1-GUS 융합 단백질을 구축하기 위하여, 잎 RNA 유래의 cDNA 라이브러리를 이용하여 교정능력이 있는 PWO 중합효소(Boehringer Mannheim)로 *PRE1* cDNA를 증폭한 후, pBI221 벡터(Clontech)의 *Bam*HI 부위에 클로닝 하였다. 다음의 프라이머 세트를 이용하였다: 5'-GAGGGATCCCATGTCTGAACAGAAGATCAAGGCAATC-3'(개시 코돈의 업스트림); 및 *PRE1*의 3'부분 (종결코돈 대체)의 증폭을 위한 5'-GAGGGATCCCATGAGTAGGCTTCTAATAACGGC-3'. 밑줄은 도입된 *Bam*HI 부위를 나타낸다. Shieh et al. (1993)의 방법에 따라, 헬륨 바이오리스팅 입자 운반 시스템(BIO-

RAD)을 이용하여 PRE1-GUS 및 pBI221 플라스미드를 양과 표피세포에 도입시켰다. 23℃에서 24시간 동안 반응시킨 후, 광학현미경(Olympus)을 이용하여 X-gluc로 GUS 활성을 측정하였다. 핵을 관찰하기 위하여, 1 mg/ml DAPI (Sigma)으로 동일한 세포를 염색하고 형광현미경(Olympus)을 이용하여 가시화하였다.

PRE1- PRE5에 대한 발현 벡터 제조

발현 컨스트럭트를 제조하기 위하여, *PRE1* 내지 *PRE5* 유전자의 추정의 오픈 리딩 프레임의 개시코돈으로부터 종결코돈까지의 게놈 DNA를 증폭 하였다. 하기의 유전자-특이 프라이머를 이용하였다: *PRE1*, 5'-AGTTAGGGTCTTTTCTTGCCACATTG-3' 및 5'-TTAAGATTACATGGATAGGCTTGTC-3'; *PRE2*, 5'-ATGTCTTCTAGCAGAAGGTCGAGAC-3' 및 5'-TTATCCATTAATCAAGCTCCTAATA-3'; *PRE3*, 5'-ATGTCGGGAAGAAGATCACGTTCTGA-3' 및 5'-TTATTGGGTAAGTAAGCTTCTGATT-3'; *PRE4*, 5'-ATGTCTAGCAGAAAATCACGTTCA-3' 및 5'-CTACTGCATAAGCAAACCTTCGGATT-5'; *PRE5*, 5'-ATGTCTAACAGAAGATCAAGAC-3' 및 5'-TTACATGAGTAAGCTTCTAATC-3'.

PCR 산물을 Topo TA벡터인 pCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen)에 클로닝 한 다음, 시퀀싱 하였다. *EcoRI*로 절단한 후, 결과물 단편들을 용출하였고 이를 pNB96 발현 벡터에 삽입하였다. 이어, 컨스트럭트를 아그로박테리움 튜메피이션스 균주 GV3101에 도입시킨 다음, 상기 균주를 애기장대에 형질전환시켰다. 40주 이상의 독립적인 T1 유전자 도입식물을 선별하였다. 적어도 15주 이상의 독립적인 단일 T-DNA 삽입 라인으로 표현형 분석을 행하였다.

이중 돌연변이체 제조

ga2-201PRE1ox-17 이중 돌연변이체를 제조하기 위하여, *ga2-201* 돌연변이체와 *PRE1ox-17* 식물체를 교잡시킨 후, F1 세대를 자가 수정시켜서 F2 종자를 생성시켰다. *PRE1ox-17*를 동정하기 위하여, F2 개체군으로부터 바스타-내성(basta-resistant) 식물체를 선별하고 F3 종자를 생산할 수 있을 정도로 성장시켰다. *ga2-201*와 동형접합성이지만 바스타 저항성과 함께 분리되는 F3 라인을 동정하고 F4 종자를 생산할 수 있도록 성장시켰다. 이러한 F4 라인으로부터 이중 동형접합 *ga2-201PRE1ox-17* 돌연변이를 분리하고 증식시켰다.

gai-1PRE1ox-17 이중 돌연변이체를 생성하기 위하여, *gai-1* 돌연변이와 *PRE1ox-17* 식물체를 교잡시켰다. F2 종자를 생산할 수 있도록 F1 종자를 성장시켰다. F2 개체군에서 바스타-저항성 식물체를 선별하고 더욱 성장시켜서 F3 종자를 생산하도록 하였다. 바스타-저항성 F2 식물체 중에서 짙은 녹색의 잎과 긴 하배축을 나타내는 추정의 이중 돌연변이체를 선별할 수 있었다. F3 라인에 대하여 바스타-저항성 및 *gai-1* 대립유전자에 대한 동형접합성 테스트를 행하였다. *gai-1* 돌연변이체 대립유전자는 암호화 부위에 51-염기 결실 부위를 포함하고 있기 때문에, 상기의 결실서열에 인접하여 위치하는 프라이머 (5'-TAGAAGTGGTAGTGG-3' 및 5'-GTGAACAGTCTCAGTAGC-3')를 이용하여 PCR 분석으로 *gai-1*의 존재를 조사하였다 (King et al., 2001). *gai-1* 및 *PRE1ox*는 다른 유전적 백그라운드로부터 기원하지만, 하배축 표현형에 대한 본래 백그라운드의 영향은 거의 없다. 본 실시예에서 이중 돌연변이체 라인의 하배축 표현형을 연구하였다.

RNA 겔 블롯 분석

RNeasy Miniprep kit (Qiagen)을 사용하여 전체 묘목으로부터 세포 내 총 RNA를 추출하였다. Soh et al. (2000)에 개시된 절차를 이용하여 노던 블롯 분석을 행하였다. 전장 *PRE1* cDNA를 프로브로 이용하였다. *Brassica* 18S rRNA 프로브가 Park et al. (1993)에 개시되어 있다.

RT-PCR 분석

2 µg 총 RNA를 이용하여 RT-PCR 분석을 행하였다. 상세하게는, 총 RNA에 RNase-결여 DNase를 처리하고 Omniscript RT-PCR 키트(Qiagen)를 이용하여 역전사하였다. 발아가 진행되는 동안 지베렐린-반응 유전자의 발현을 측정하기 위하여, 종자를 4℃에서 48시간 동안 층화시킨 후, 50 µM GA3 또는 모크(mock) 처리하기에 앞서 24시간 동안 W 조명 아래에서 배양 하였다(Ogawa et al., 2003). RNAqueous RNA 분리 키트(Ambion)를 사용하여 불린 종자 (건조중량 50 mg)로부터 총 RNA를 추출하였다. 추정의 수용체-유사 키나아제 (*At1g08590*), 지방 운반 단백질(LTP)-유사체(*At2g45180*), *AtEXPI*(*At1g69530*), *AtEXP2*(*At5g05290*), *AtXTH3I*(*At3g44990*) 및 *GA20ox1*를 포함하는 지베렐린-반응성 유전자들에 대한 프라이머 세트는 Ogawa et al. (2003)에 개시되어 있다.

반정량 RT-PCR 발현 연구를 위하여, 다음의 프라이머들을 이용하였다: *PRE1*, 5'-AGTTAGGGTCTTTTCTTGCCACATTG-3' 및 5'-TTAAGATTACATGGATAGGCTTGTC-3' *PRE2*, 5'-

ATGTCTTCTAGCAGAAGGTCGAGAC-3' 및 5'-TTATCCATTAATCAAGCTCCTAATA-3' *PRE3*, 5'-ATGTCGGGAAGAAGATCACGTTCTGA-3' 및 5'-TTATTGGGTAAGTAAGCTTCTGATT-3' *PRE4*, 5'-ATGTCTAGCAGAAAATCACGTTCA-3' 및 5'-CTACTGCATAAGCAAACCTTCGGATT-5' 및 *Ubiquitin*, 5'-GATCTTTGCCGGAACAAATTGGAGGATGGT-3' 및 5'-CGACTTGTCATTAGAAAGAAAGAGATAACAGG-3'.

실험결과

PRE1 유전자의 동정

애기장대에서 활성-표지라인을 생성하는 과정에서, 백색광 조건하에서 긴 하배축을 가진 T1 세대 돌연변이체를 선별하였다. 다음은 *PRE1act* (paclobutrazol-resistant1 activation-tagged) 돌연변이체에 대한 생리학적 및 분자적 연구결과를 보여준다. 돌연변이 식물체는 열은 녹색의 잎, 긴 줄기 및 절간(internodes)을 보였다(도 1a). 또한 장일 및 단일 조건하에서 야생종에 비하여 빠른 개화를 하였다(도 1b). 유전학 연구를 통하여, *PRE1act*은 하나의 T-DNA가 삽입된 단일 우성 돌연변이임을 밝혀내었다(결과는 생략함).

다음으로, 돌연변이체의 표현형과 T-DNA 선별 표지의 바스타-저항성의 공동-분리를 조사하였다. 돌연변이체 표현형은 바스타 저항성과 밀접하게 연관되어 있으며(결과는 생략함), 이러한 특성은 T-DNA 삽입에 의한 결과인 것으로 판단된다. T-DNA의 우측 및 좌측 보더에 인접해있는 게놈 서열을 TAIL PCR로 분리하였다(Liu et al., 1995). BLAST 서열 분석을 통해 40S 리보솜 단백질 S9를 암호화하는 유전자(*At5g39850*)와 염색체 5의 DNA 결합 단백질-유사체를 암호화하는 유전자(*At5g39860*) 사이의 부위에 T-DNA가 삽입된다는 것을 밝혔다(도 2a). 이후의 RNA 겔 블롯팅을 통해 *PRE1act* 돌연변이체에서 *At5g39850*의 전사발현은 변화 없었지만 *At5g39860*의 전사 발현이 향상된다는 것을 알 수 있었다(도 2b). 카울리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터의 조절 하에서 *At5g39860* 유전자를 발현하는 형질전환 식물체를 제조하였다. 형질전환 식물은 긴 하배축과 같은 돌연변이 표현형을 나타내었다(도 3a 및 3b). 이러한 결과는, *At5g39860* 유전자 (*PRE1*로 지정)의 발현은 *PRE1act* 돌연변이체 표현형의 원인이 된다는 것을 보여준다. 뒤 이은 생리학적 연구들 대부분에서, *PRE1*의 가장 높은 전사를 나타내는 *PRE1ox-6* 또는 *PRE1ox-17* 형질전환 식물주들을 이용하였다(도 3c).

PRE1 과발현 식물에서의 지베렐린-의존 반응

PRE1 과발현 식물(*PRE1ox*)은 긴 하배축을 가지며, 야생형과 비교할 때 개화가 빠르는데, 이것은 증가된 지베렐린 시그널링을 나타내는 돌연변이의 특징적인 표현형이다. 따라서, 지베렐린 생합성 저해제인 파클로부트라졸(PAC)을 사용하여 *PRE1ox* 돌연변이에서 지베렐린 신호전달이 활성화되는지 여부를 조사하였다. 내인성의 지베렐린은 PAC가 존재하면 감소되는데, 이로 인해 야생형 식물에서는 종자 발아가 저해되는 결과가 초래된다(Jacobsen and Olszewski, 1993). 배지에 첨가된 PAC 농도가 증가함에 따라 야생형 종자의 발아율도 감소된다. PAC가 20 μ M 첨가되면 종자를 뿌린 후 7일째 되었을 때 전체 야생 종자의 단지 20%만이 발아하였다.

증가된 지베렐린 신호전달을 나타내는 *spy-3(spindly-3)* 돌연변이 종자는 발아하는 동안 PAC에 대한 저항성을 나타낸다. 동일한 조건하에서 *PRE1ox* 종자는 야생종과 비교할 때 더 높은 빈도로 발아하였다(도 4a). 또한, *PRE1ox*의 지베렐린-비의존적 발아는 종자발아의 ABA-매개성 저해의 결손 때문이 아니다(결과는 생략함). 실험 결과에 따르면, *PRE1* 단백질은 지베렐린-의존성 반응에 관여한다는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 *At5g39860* 좌위를 "*PRE1* (paclobutrazol-resistance1)"라 명명하였다.

*PRE1*의 발현이 외인성 지베렐린에 대한 반응에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여, 하배축 신장에서 양-의존성 반응을 측정하였다. 야생형과 비교하였을 때, 외인성 지베렐린 존재시 *PRE1ox* 식물의 하배축 신장이 더 현저하였다(도 4b). 이러한 사실은, *PRE1* 과발현이 내재성 지베렐린 양을 향상시키거나 혹은 포화 지베렐린 신호전달을 유발하는 것이 아니라, 지베렐린-반응성을 강화시킨다는 것을 나타낸다.

다음으로, *PRE1* 과발현이 지베렐린 신호전달에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 유전적으로 접근하였다. GA_2 는 지베렐린 생합성 경로에서 두 번째 단계를 촉매하는 *ent-kaurene* 켄타아제를 암호화한다(Yamaguchi et al., 1998). *ga2-201* 돌연변이체는 상기된 바와 같이 지베렐린 없이는 발아하지 못하고 심각한 왜소증을 나타내는 등 격심한 지베렐린-결핍 표현형을 나타낸다(Yamaguchi et al., 1998). 본 발명자들은 이중 돌연변이 *ga2-201PRE1ox* 식물을 제조하였다. *PRE1ox*는 *ga2-201* 돌연변이의 종자 발아 결점을 완벽하게 억제하였다(도 4c). 또한, *PRE1ox*는 변이체의 단축된 하배축 신장, 손상된 영양 성장, 지연된 개화 및 감소된 생식력을 어느 정도 억제한다(도 4e-4g).

지베렐린 신호전달이 유전자 발현에서 큰 변화를 수반한다(Ogawa et al., 2003)는 관점에서, 본 발명자들은 *PRE1ox* 식물에서 *GA20ox1*, *AtEXP1*, *AtEXP2*, *AtXTH31*, 지방 운반 단백질(LTP)-유사체 및 수용체-유사 키나아제(RLK)를 포함한 여러 유전자들을 고찰하였으며, 이들 유전자들은 *ga2-201* 돌연변이체 백그라운드에서 지베렐린-의존성 발현을 보였다. *ga2-201PRE1ox* 이중 돌연변이체는 외인성 호르몬의 부존재시에도 지베렐린-반응 유전자들의 증가된 발현을 나타내었다(도 4d). 따라서, *PRE1ox*의 지베렐린-비의존적 발아는 몇몇의 지베렐린-반응 유전자들의 발현증가와 연관되어 있다. *AtEXP2*와 *GA20ox1*의 발현 시에도 *PRE1ox*는 여전히 지베렐린에 대하여 반응성을 보인다는 것은 주목할만하다. 이러한 결과들을 총괄하면, 유전자 조절의 지베렐린 신호전달은 *PRE1*에 의해 활성화된다는 것을 나타낸다.

PRE1 및 관련 유전자들의 분자적 분석

*PRE1*은 HLH(helix-loop-helix) 모티프를 포함하는 92개의 잔기를 가진 단백질을 암호화하며, 전사 조절자로서의 역할을 하는 것으로 예측되어 있다. BLAST 데이터는, *PRE1*이 *PRE2-6*으로 명명되는 애기장대에서의 다섯 가지 다른 동종 유전자를 포함하는 작은 패밀리에 속한다는 것을 나타낸다. 모든 멤버들은 서열이 크게 보존되어 있고, 특징적인 HLH 모티프를 포함한다(도 5a). 단백질 위치화 프로그램인 *PLOC*는 *PRE1*은 핵 내 단백질이라는 것을 보여준다(<http://www.genome.jp/SIT/plocdir>). 핵 내의 위치화에 대한 실험적 증거를 확보하기 위하여 입자포격(particle bombardment) 방법을 이용하여 *PRE1*-GUS 융합 컨스트럭트를 양과 표피세포에 도입하였다. *PRE1*-GUS 단백질은 오직 핵 내에만 존재하지는 않지만 주로 핵 내에 위치하였다(도 7). 다른 기관 내 및 광조건 또는 암조건에서 성장한 식물내의 *PRE1*과 *PRE1*-관련 유전자들의 전사 정도를 더 조사하였다. *PRE* 유전자들은 광조건에 반응하지 않고 조사된 모든 기관에서 도처에서 발현되었다(도 5e). 기관들 사이에서 *PRE* 전사 정도의 작은 차이는 *PRE*의 발현과 기능에 대한 서로 다른 조절 방식들이 있음을 의미한다. 다른 *PRE* 유전자가 식물 발달에 있어서 *PRE1*과 유사한 역할을 하는지 테스트하기 위하여, *PRE2* 내지 *PRE5* 형질전환식물을 만들었다. RT-PCR 분석으로, 각각의 *PRE*-과발현 식물에서 형질전환 유전자가 과발현된다는 것을 입증하였다. 상기 네 가지의 *PRE1* 동족체는, 앞에서 제시한 *PRE1* 과발현 현상인, PAC-저항성 발아, 긴 하배축 및 조기 개화를 유도하였다(도 5b-5d). 상기 결과는 *PRE* 유전자들이 기능적으로 중복(redundancy)되어 있다는 사실을 보여준다.

PRE1의 발현 및 상위성 분석

PRE1 및 다른 *PRE* 유전자의 과발현이 지베렐린-의존 반응들에 영향을 미치고, 지베렐린 결핍을 (만일 부분적이라면) 억제하기 때문에, 야생형 식물의 *PRE* 유전자 발현에 대한 지베렐린의 영향을 검토하였다. 도 6a에 나타난바와 같이 *PRE1*의 전사 정도는 지베렐린에 반응하여 증가하였으나 다른 *PRE* 유전자들은 지베렐린에 영향을 받지 않았다. 다음으로, 야생형 식물에서 *PRE1*의 동역학적 발현을 조사하였다. *PRE1*은 지베렐린 처리 후에 빠르게(한 시간 이내) 유도되었다(도 6b).

현재까지, 지베렐린 신호전달에서의 몇몇 신호전달 관여 물질들이 동정되었다. 그들 중에서, DELLA 단백질은 지베렐린 신호전달의 네거티브 조절자로서 잘 알려져 있다. 지베렐린 신호전달-관련 돌연변이체인 *gai-1(gibberellin insensitive-1)*에서 *PRE1* 발현이 변화되는지 더 조사하였다. GAI는 DELLA 단백질이며, 지베렐린 신호전달에서 네거티브 조절자로서 작용한다. *gai-1* 대립유전자는 기능-획득 돌연변이이며, 이의 변이된 단백질은 지베렐린-매개 파괴에 내성을 갖는다. 도 6c에 나타난바와 같이, *PRE1*의 지베렐린-의존성 발현은 *gai-1* 돌연변이체에서 감소되었다. 상기 실험 결과는, *PRE1* 발현이 초기-지베렐린 유도성이고, 신호전달의 네거티브 조절자인 GAI의 조절 하에 있다는 것을 지적한다.

*gai-1*과 *PRE1* 사이의 유전적 상호작용을 테스트하기 위하여, 이중돌연변이체인 *gai-1* 및 *PRE1ox*를 만들었고, 외인성 지베렐린이 있는 또는 없는 배지에서 성장한 종자의 하배축 표현형을 비교하였다. 도 6d에 나타난바와 같이, 외인성 지베렐린의 결여 상태에서 이중돌연변이체의 하배축 신장은 *PRE1ox* 식물의 하배축 신장과 유사 하였으며, 이것은 *PRE1*이 GAI의 하위에서 작용하고 있음을 암시한다. 흥미롭게도, 외인성 지베렐린에 대한 반응에서 *PRE1ox* 식물의 과도하게 긴 하배축 표현형은 *gai-1* 돌연변이에 의해 억제된다. GAI-의존성 발현 결과와 더불어, 상기의 결과는 *PRE1*이 GAI의 하위에서 작용하며 다른 GAI-의존성 경로와 상호작용 한다는 것을 보여준다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 식물의 발달을 조절하는 단백질 *PRE1*, 이를 암호화하는 유전자 *PRE1*, 유전자 *PRE1*을 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 재조합 벡터를 이용하여 유전자 *PRE1*을 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 발달 조절 방법을 제공한다.

본 발명의 *PRE1* 유전자를 이용하여 식물체를 형질전환시킴으로써 지베렐린 비의존적 종자의 발아, 조기 개화, 줄기 생장 촉진, 종자 발달 촉진의 표현형을 유도할 수 있으며, 이를 통해 식용작물 및 화훼작물의 생산성 및 상품성 증대를 도모할 수 있다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참고문헌

- Amador, V., Monte, E., Garcia-Martinez, J.L. and Prat, S. Gibberellins signal nuclear import of PHOR1, a photoperiod-responsive protein with homology to *Drosophila* armadillo. *Cell*, 10, 343-354 (2001).
- Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D.C. and Harberd, N.P. Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development*, 131, 3357-3365 (2004).
- Bechtold, N. and Ellis, J. *In planta Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of *adult Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* 316, 1194-1199 (1993).
- Benezra, R., Davis, R.L., Lockshon, D., Turner, D.L. and Weintraub, H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell*, 61, 49-59 (1990).
- Bouquin, T., Mattsson, O., Naested, H., Foster, R. and Mundy, J. The *Arabidopsis* lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *J. Cell Sci.* 116, 791-801 (2003).
- Dill, A., Jung, H.-S. and Sun, T.-P. The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98, 14162-14167 (2001).
- Dill, A., Thomas, S.G., Hu, J., Steber, C.M. and Sun, T.P. The *Arabidopsis* F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell*, 16, 1392-1405 (2004).
- Ellis, H.M., Spann, D.R. and Posakony, J.W. Extramacrochaetae, a negative regulator of sensory organ development in *Drosophila*, defines a new class of helix-loop-helix proteins. *Cell*, 61, 27-37 (1990).
- Fleet, C.M. and Sun, T.P. A DELLAcate balance: the role of gibberellin in plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 77-85 (2005).
- Fu, X., Richards, D.E., Fleck, B., Xie, D., Burton, N. and Harberd, N.P. The *Arabidopsis* mutant *sleepy1^{gar2-1}* protein promotes plant growth by increasing the affinity of SCF^{SLY1} E3 ubiquitin ligase for DELLA protein substrates. *Plant Cell*, 16, 1406-1418 (2004).
- Gilroy S. and Jones R.L. Perception of gibberellin and abscisic acid at the external face of the plasma membrane of barley (*Hordeum vulgare* L.) aleurone protoplasts. *Plant Physiol.* 104, 1185-1192 (1994).
- Hedden, P. and Phillips, A.L. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* 5, 523-530 (2000).
- Hooley, R. Gibberellins: perception, transduction and responses. *Plant Mol. Biol.* 26, 1529-1555 (1994).
- Jacobsen, S.E., Binkowski, K.A. and Olszewski, N.E. SPINDLY, a tetratricopeptide repeat protein involved in gibberellin signal transduction in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9292-9296 (1996).

- Jacobsen, S.E. and Olszewski, N.E. Mutations at the SPINDLY locus of Arabidopsis alter gibberellin signal transduction. *Plant Cell* 5, 887-896 (1993).
- Jones, N. Transcriptional regulation by dimerization: two sides to an incestuous relationship. *Cell*, 61, 9-11 (1990).
- Kania, T., Russenberger, D., Peng, S., Apel, K. and Melzer, S. FPF1 promotes flowering in Arabidopsis. *Plant Cell*, 9, 1327-1338 (1997).
- King, K.E., Moritz, T. and Harberd, N.P. Gibberellins are not required for normal stem growth in Arabidopsis thaliana in the absence of GAI and RGA. *Genetics*, 159, 767-776 (2001).
- Koornneef, M., Korna, M.L., Brinkhorst-van der Swan, D.L.C. and Karssen, C.M. The isolation and analysis of abscisic acid (ABA)-deficient mutants by selection of induced revertants in non-germinating gibberellin sensitive lines of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. *Theor. Appl. Genet.* 61, 385-393 (1982).
- Koornneef, M., Elgersma, A., Hanhart, C.J., van Loenen-Martinet, E.P., van Rijn, L. and Zeevaart, J.A.D. A gibberellin-insensitive mutant of Arabidopsis thaliana. *Physiol. Plant.* 65, 33-39 (1985).
- Lee, S., Cheng, H., King, K.E., Wang, W., He, Y., Hussain, A., Lo., J., Harverd, N.P. and Peng, J. Gibberellin regulates Arabidopsis seed germination via RGL2, a GAI/RGA-like gene whose expression is upregulated following imbibition. *Genes Dev.* 16, 646-658 (2002).
- Liu, Y.G., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whittier, R.F. Efficient isolation and mapping of Arabidopsis thaliana T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* 8, 457-463 (1995).
- Lovegrove, A. and Hooley, R. Gibberellin and abscisic acid signaling in aleurone. *Trends Plant Sci.* 5, 102-110 (2000).
- McGinnis, K.M., Thomas, S.G., Soule, J.D., Strader, L.C., Zale, J.M., Sun, T.-P. and Steber, C.M. The Arabidopsis SLEEPY1 Gene Encodes a Putative F-Box Subunit of an SCF E3 Ubiquitin ligase. *Plant Cell*, 15, 1120-1130 (2003).
- Meier, C., Bouquin, T., Nielsen, M.E., Raventos, D., Mattsson, O., TWRoche, A., Schomburg, F., Amasino, R.M. and Mundy, J. Gibberellin response mutants identified by luciferase imaging. *Plant J.* 25, 509-519 (2001).
- Norton, J.D. ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. *J. Cell Sci.* 113, 3897-3905 (2000).
- Ogas, J., Cheng, J.-C., Sung, Z.R. and Sommerville, C. Cellular differentiation regulated by gibberellin in the Arabidopsis thaliana pickle mutant. *Science*, 277, 91-94 (1997).
- Ogas, J., Kaufmann, S., Hendersin, J. and Sommerville, C. PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13839-13844 (1999).
- Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y. and Yamaguchi, S. Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant Cell*, 15, 1591-1604 (2003).
- Olszewski, N., Sun, T.P. and Gucler, F. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 14 (suppl.), S61-S80 (2002).

- Park, K.J. and Kanehisa, M. Prediction of protein subcellular locations by support vector machines using compositions of amino acids and amino acid pairs. *Bioinformatics*, 19, 1656-1663 (2003).
- Park, Y.S., Kwak, J.M., Kwon, O.Y., Kim, Y.S., Lee, D.S., Cho, M.J., Lee, H.H. and Nam HG. Generation of expressed sequence tags of random root cDNA clones of Brassica napus by single-run partial sequencing. *Plant Physiol.* 103, 359-370 (1993).
- Peng, J., Carol, P., Richards, D.E., King, K.E., Cowling, R.J., Murphy, G.P. and Harberd, N.P. The Arabidopsis GAI gene defines a signalling pathway that negatively regulates gibberellin responses. *Genes Dev.* 11, 3194-3205 (1997).
- Richards, D.E., King, K.E. Ait-ali, T. and Harberd, N.P. How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signalling. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52, 67-88 (2001).
- Shieh, M.W., Wessler, S.R. and Raikhel, N.V. Nuclear targeting of the maize R protein requires two nuclear localization sequences. *Plant Physiol.* 101, 353-361 (1993).
- Silverstone, A.L., Ciampaglio, C.N. and Sun, T.-P. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell*, 10, 155-169 (1998).
- Silverstone, A.L., Jung, H.-S., Dill A., KawPREe, H., Kamiya, Y. and Sun, T.-P. Repressing a repressor: gibberellin-induced rapid reduction of the RGA protein in Arabidopsis. *Plant Cell*, 13, 1555-1565 (2001).
- Soh, M.S., Kim, Y.M., Han, S.J. and Song, P.S. REP1, a basic helix-loop-helix protein, is required for a branch pathway of phytochrome A signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*, 12, 2061-2073 (2000).
- Steber, C.M., Cooney, S.E. and McCourt, P. Isolation of the GA-response mutant sly1 as a suppressor of abi1-1 in Arabidopsis thaliana. *Genetics*, 149, 509-521 (1998).
- Strader, L.C., Ritchie, S., Soule, J.D., McGinnis, M. and Steber, C.M. Recessive-interfering mutations in the gibberellin signaling gene SLEEPY1 are rescued by overexpression of its homologue, SNEEZY. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 34, 12771-12776 (2004).
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E. and Quail, P.H. The Arabidopsis basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15, 1749-1770 (2003).
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow T., Hsing, Y., Kitano, H., Yamaguchi, I. and Matsuoka, M. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437, 693-698 (2005).
- Yamaguchi, S., Sun, T., Kawaide, H. and Kamiya, Y. The GA2 locus of Arabidopsis thaliana encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol.* 116, 1271-1278 (1998).
- Yamaguchi, S. and Kamiya, Y. Gibberellin biosynthesis: its regulation by endogenous and environmental signals. *Plant Cell Physiol.* 41, 251-257 (2000).
- Yu, H., Ito, T., Zhao, Y., Peng, J., Kumar, P. and Meyerowitz, E.M. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101, 7827-7832 (2004).
- Weigel, D., Ahn, J.H., Blazquez, M.A., Brevitz, J.O., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E.J., Neff, M.M., Nguyen, J.T., Sato, S., Wang, Z.Y., Xia, Y., Dixon, R.A., Harrison, M.J., Lamb, C.J., Yanofsky, M.F. and Chory, J. Activation tagging in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122, 1003-1013 (2000).

Wen, C.K. and Chang, C. Arabidopsis RGL1 encodes a negative regulator of gibberellin responses. *Plant Cell*, 14, 87-100 (2002).

도면의 간단한 설명

도 1a 및 1b는 액티베이션 태깅 기법으로 선별된 *PRE1act*의 표현형을 나타낸다. 도 1a는 액티베이션 태깅된 돌연변이 *PRE1act*의 잎의 형태(위쪽 패널) 및 성숙 식물체(아래쪽 패널)를 나타낸다. 식물은 장일조건에서 30일 동안 성장되었으며, 눈금 바(bar)는 5 mm를 나타낸다. 도 1b는 야생형과 *PRE1act* 식물의 개화시기를 나타낸다. 장일조건(16시간 명기/8시간 암기)에서 성장시킨 식물(LD)과 단일조건(8시간 명기/16시간 암기)에서 성장시킨 식물(SD)에 대한 결과이다. 그래프상의 에러 바는 표준편차(n=14)를 나타낸다. 그래프의 세로 값은 종자를 뿌린 후 경과한 날짜를 나타낸다.

도 2a 및 2b는 *PRE1act* 돌연변이에서 DNA-결합 단백질 유사 유전자가 과발현되는 것을 나타낸다. 도 2a는 *PRE1act* 돌연변이에서 T-DNA의 게놈 구조를 나타낸다. pSKI015의 T-DNA 부위는 염색체 5의 *At5g39850* 유전자와 *At5g39860* 유전자 사이에 삽입된다. 도 2b는 *PRE1act* 돌연변이에서 T-DNA의 두 인접 유전자에 대한 RNA 겔 블롯 분석결과를 나타낸다. 총 RNA를 14일간 성장한 야생형과 *PRE1act* 돌연변이 종자로부터 분리하였다. 리보솜 RNA의 EtBR 염색 결과는 동일한 양이 로딩되었음을 나타낸다.

도 3a-3c는 *PRE1act* 돌연변이 표현형을 재확인한 *PRE1*의 과발현을 나타낸다. 도 3a는 *PRE1act*와 *PRE1ox* 형질전환 발아유식물(seedlings)의 표현형을 나타낸다. 종자들을 5일 동안 백색광이 비치는 조건에서 생장시켰으며, 눈금 바는 5 mm이다. 도 3b는 5일 동안 백색광에서 자란 *PRE1act*와 *PRE1ox* 형질전환 발아유식물의 하배축 생장을 나타낸다. 결과는 적어도 20개의 발아유식물에 대한 평균값으로 나타내었으며, 에러 바는 표준편차를 나타낸다. 도 3c는 야생형, *PRE1act* 및 *PRE1ox* 식물에서의 *PRE1* 유전자의 발현정도를 RNA 겔 블롯 분석한 결과를 나타낸다. 총 RNA를 7일 동안 자란 종자로부터 분리하였으며, 총 RNA의 10 μ g을 RNA 겔 블롯팅에 사용하였다. 리보솜 RNA에 대한 EtBR 염색은 동일한 양으로 로딩되었음을 나타낸다.

도 4a-4g는 *PRE1* 과발현 형질전환 유전자의 지베렐린-연관 표현형을 나타낸다. 도 4a는 지베렐린 생합성 저해제인 20 μ M 파클로부트라졸을 포함하는 1% MS-suc 배지에서 야생형, *spy-3*, *PRE1ox-6* 및 *PRE1ox-17*의 발아 표현형을 나타낸다. 도 4b는 4.5일 동안 다양한 농도의 GA₃을 포함한 1% MS-suc 배지에서 자란 야생형, *spy-3*, *PRE1ox-6* 및 *PRE1ox-17*의 하배축 생장을 나타낸다. 결과는 적어도 20개의 종자에 대한 평균값으로 나타내었으며, 에러 바는 표준편차를 나타낸다. 도 4c는 1% MS-suc 배지에서 자란 야생형, *ga2-201*, *PRE1ox-17* 및 *ga2PRE1ox*의 발아 표현형을 나타낸다. 각각의 발아정도 측정은 적어도 200개의 종자로 행하였다. 두 가지의 독립적인 실험으로부터 유사한 결과가 나왔다. 도 4d는 *ga2-201* 및 *ga2-201PRE1ox-17* 이중 돌연변이(*ga2PRE1ox*)식물에서 GA₃ 처리시 지베렐린-반응 유전자에 대한 RT-PCR 분석결과를 나타낸다. 12시간 동안 50 mM GA₃ (+) 또는 모크-처리(-)에 의해 GA₃나 모크를 흡수한 종자로부터 총 RNA를 추출하였다. *UBQ*를 대조군으로 사용하였다. 도 4e는 장일 조건에서 자란 16일된 야생형, *ga2-201*, *PRE1ox-17* 및 *ga2PRE1ox* 식물의 표현형을 나타낸다. 눈금 바는 5 mm이다. 도 4f는 장일 조건에서 자란 28일된 야생형, *ga2-201*, *PRE1ox-17* 및 *ga2PRE1ox* 식물의 표현형을 나타낸다. 도 4g는 장일 조건에서 자란 야생형, *ga2-201*, *PRE1ox-17* 및 *ga2PRE1ox* 식물의 첫 번째 개화 줄기를 나타낸다.

도 5a-5e는 *PRE* 유전자들의 기능적 중복을 나타낸다. 도 5a는 애기장대에서 *PRE1* 및 그 유사체들의 아미노산 서열을 나타낸다. 동일하거나 유사한 아미노산 잔기는 음영으로 표시되어 있다. 애기장대에서의 상기 여섯 종의 멤버 및 이들의 TAIR 동정 번호들이 표시되어 있다. 도 5b는 20 μ M 파클로부트라졸을 포함하는 MS 배지에서 야생형, 과발현 *PRE1*, *PRE2*, *PRE3*, *PRE4* 및 *PRE5* 형질전환식물의 발아 표현형을 나타낸다. 식물들을 5일간 성장시켰으며, 각각의 측정은 적어도 100개의 종자로 행하였다. 에러 바는 세 번의 독립적인 측정에 대한 표준 편차이다. 도 5c는 야생형, 과발현 *PRE1*, *PRE2*, *PRE3*, *PRE4* 및 *PRE5* 형질전환식물의 하배축 생장정도를 나타낸다. 결과는 1/2 MS 배지에서 4일 동안 백색광 (2.8 mW/cm²)이 조사되는 조건에서 자란 적어도 20개의 종자로부터 행한 평균을 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다. 도 5d는 야생형, 과발현 *PRE1*, *PRE2*, *PRE3*, *PRE4* 및 *PRE5* 형질전환식물의 개화 표현형을 나타낸다. 식물들을 장일조건에서 30일 동안 성장시켰다. 에러 바는 적어도 15주의 식물에 대한 표준편차를 나타낸다. 도 5e는 다른 기관 및 광조건에서의 *PRE1* - *PRE4* 전사체에 대한 RT-PCR 분석결과를 나타낸다. 종자들을 5일 동안 암 조건에서 성장시킨 뒤 총 RNA를 추출하기 전에 추가 12시간 동안 백색광 조건으로 옮겨지거나(L) 암 조건을 계속 유지(D)시켰다. 다른 기관에서 RNA를 추출하려고 할 때에는 성장한 식물을 이용하였다. *UBQ*를 대조군으로 이용하였다.

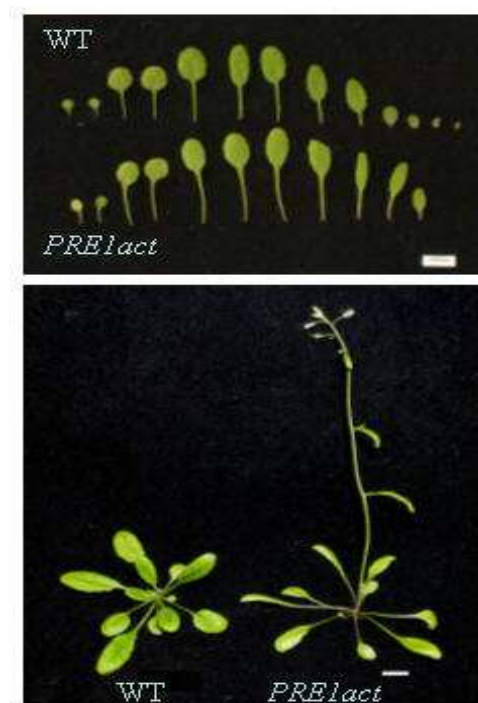
도 6a-6d는 *PRE1*의 지베렐린-의존 발현을 나타낸다. 도 6a는 *PRE1* - *PRE4*의 지베렐린-유도성을 나타낸다. 14일된 야생형 및 *PRE1act* 돌연변이 종자를 24시간 동안 모크-처리(-)하거나 50 μ M GA_3 처리(+)하였다. 총 RNA를 추출하였고 *PRE1* - *PRE4*의 발현을 RT-PCR로 분석하였다. *UBQ*를 대조군으로 사용하였다. 도 6b는 야생형 식물에서의 *PRE1* 유전자의 GA 처리 후 시간에 따른 발현을 나타낸다. 7일된 종자를 50 μ M GA_3 로 0, 0.5, 1, 3 및 6시간 동안 처리하였다. 총 RNA를 분리하고, 그중 10 μ g을 RNA 겔 블롯팅 분석에 사용하였다. 18S rRNA 프로브에 대한 블롯팅을 로딩 대조군으로 사용하였다. 도 6c는 6시간 동안 50 μ M GA_3 처리(+)하거나 모크-처리(-)한 후 야생형(Ler) 및 *gai-1* 돌연변이에서의 *PRE1* 유전자 발현을 RNA 겔 블롯 분석한 결과를 나타낸다. 총 RNA를 7일된 야생형 및 돌연변이 종자로부터 분리하였고 10 μ g을 RNA 겔 블롯팅 분석에 사용하였다. 리보솜 RNA에 대한 EtBR 염색은 동일한 양으로 로딩되었음을 나타낸다. 도 6d는 *gai-1PRE1ox-17*이중 돌연변이의 하배측 표현형을 나타낸다. 종자를 10 μ M GA_3 이 첨가되거나 첨가되지 않은 (대조군) 1% MS-suc 배지에서 5일 동안 장일처리 조건에서 성장시켰다. 결과는 적어도 20개 종자로부터의 하배측 길이를 평균하여 나타내었다. 에러 바는 표준 편차를 나타내며, *dbl*은 *gai-1PRE1ox-17*이중 돌연변이를 나타낸다.

도 7은 *PRE1*-GUS의 세포내 위치화 실험 결과를 나타낸다. 입자포격 방법(particle bombardment)을 이용하여 *PRE1*-GUS 융합구조물을 양과 표피세포에 도입하였다. 16시간 반응시킨 후, GUS활성을 위해 세포를 염색하였다(위). 화살표는 핵을 지시하며, 이는 DAPI-염색으로 확인된다(아래).

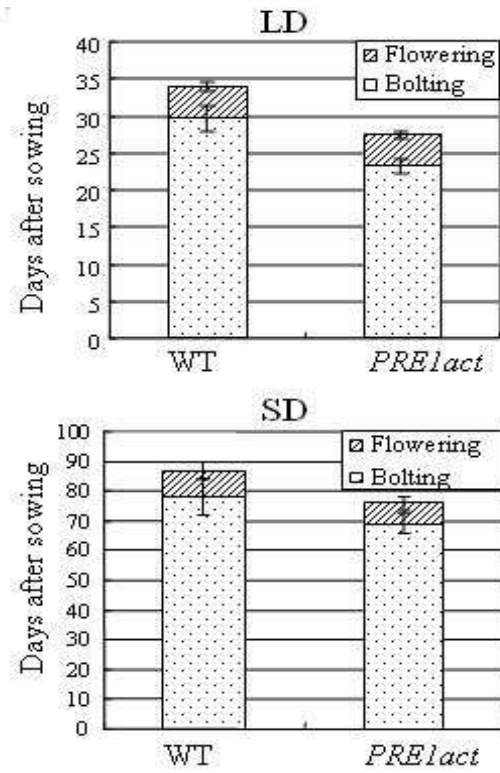
도 8은 식물 형질전환에 이용한 pNB96-*PRE1* 벡터의 유전자 지도이다. Pnos (노팔린 신타아제 유전자의 프로모터), NPTII (니오마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자), Tnos (노팔린 신타아제 유전자의 터미네이터), T35S (CaMV 35S RNA의 터미네이터), P35S (CaMV 35S RNA의 프로모터), BAR (바스타 내성 유전자, 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라아제), Dual P35S (CaMV 35S RNA의 이중 프로모터), RB (우측 보더) 및 LB (좌측 보더).

도면

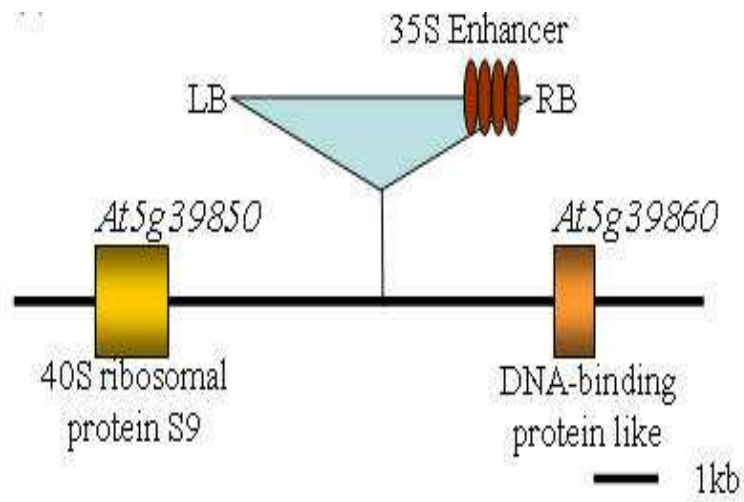
도면1a



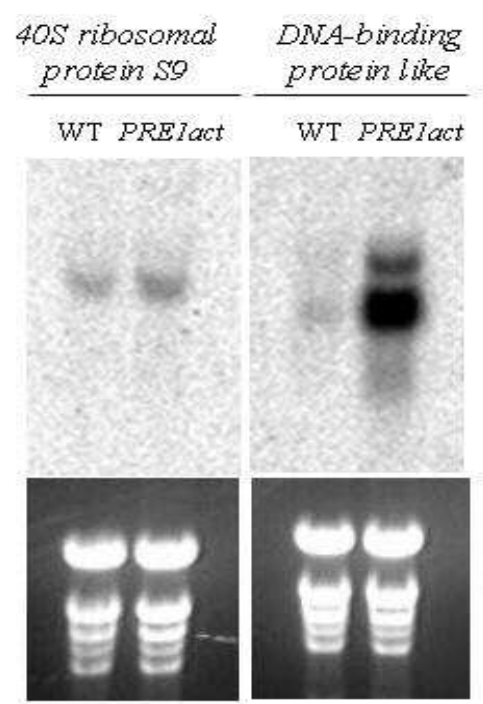
도면1b



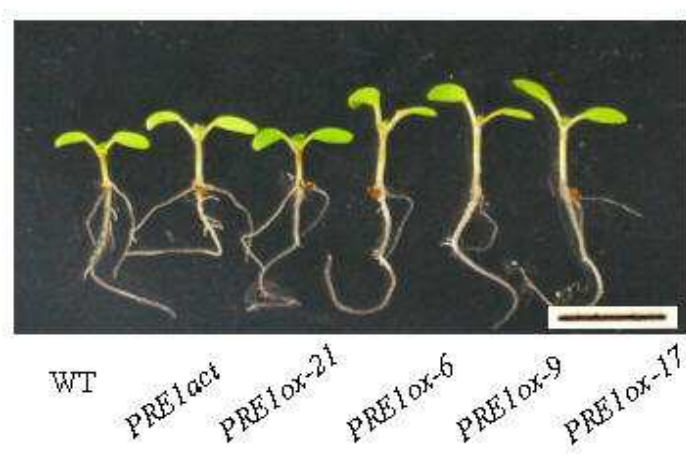
도면2a



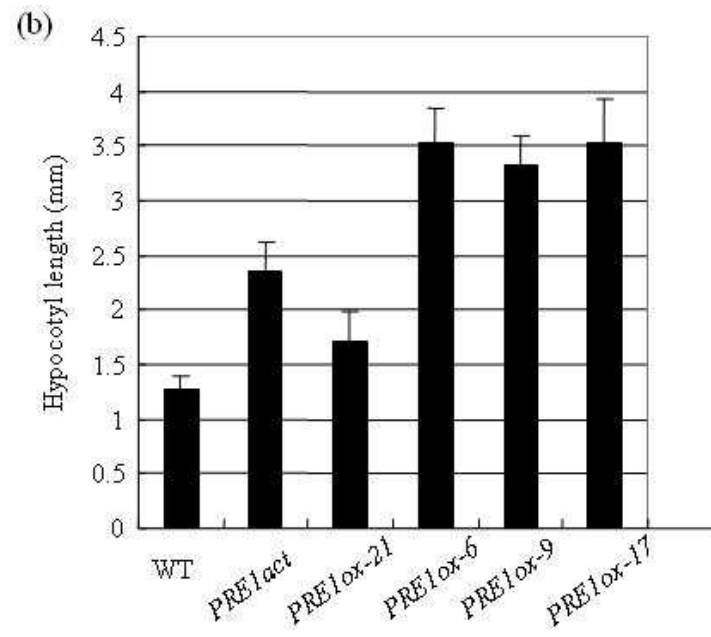
도면2b



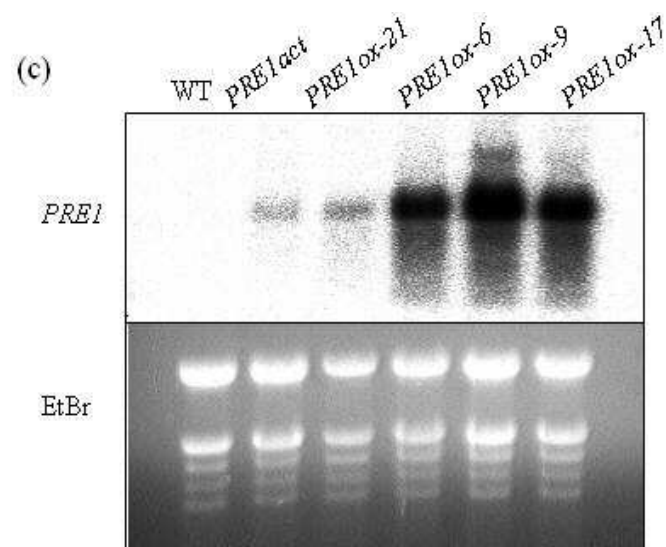
도면3a



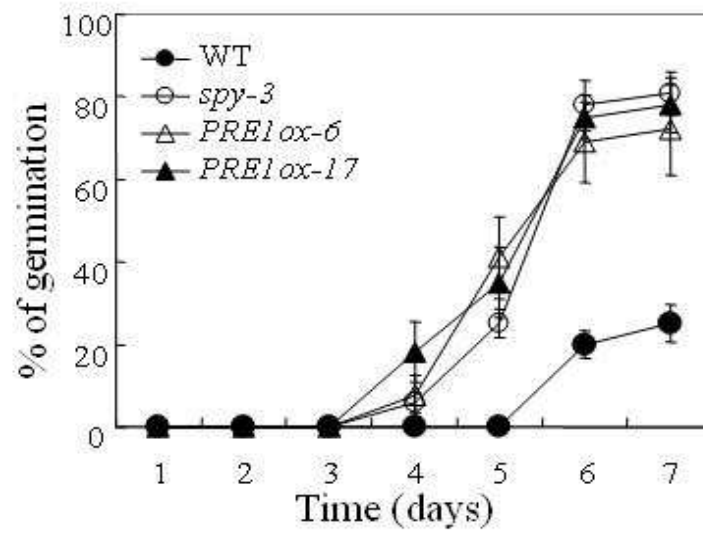
도면3b



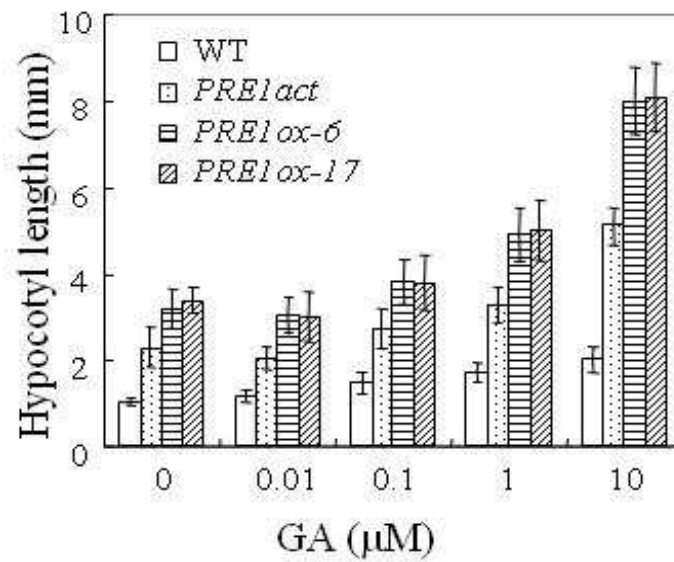
도면3c



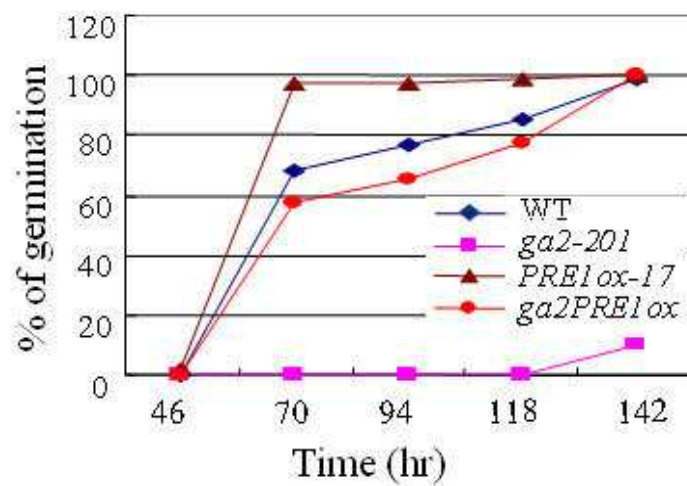
도면4a



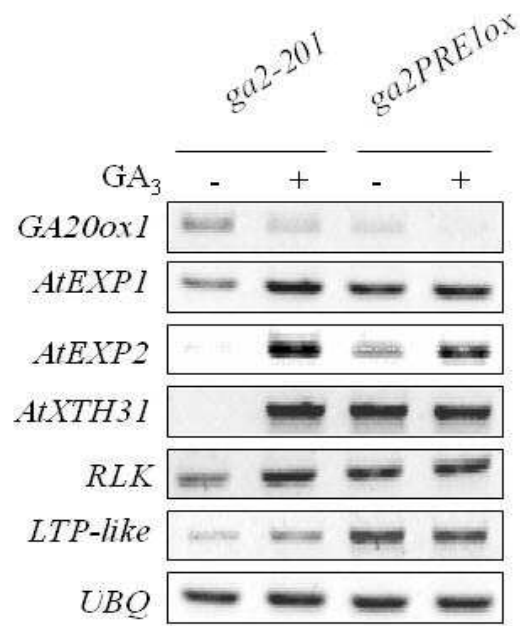
도면4b



도면4c



도면4d



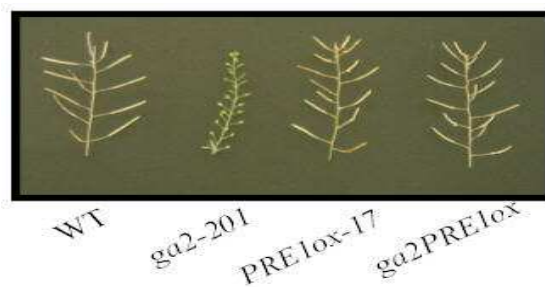
도면4e



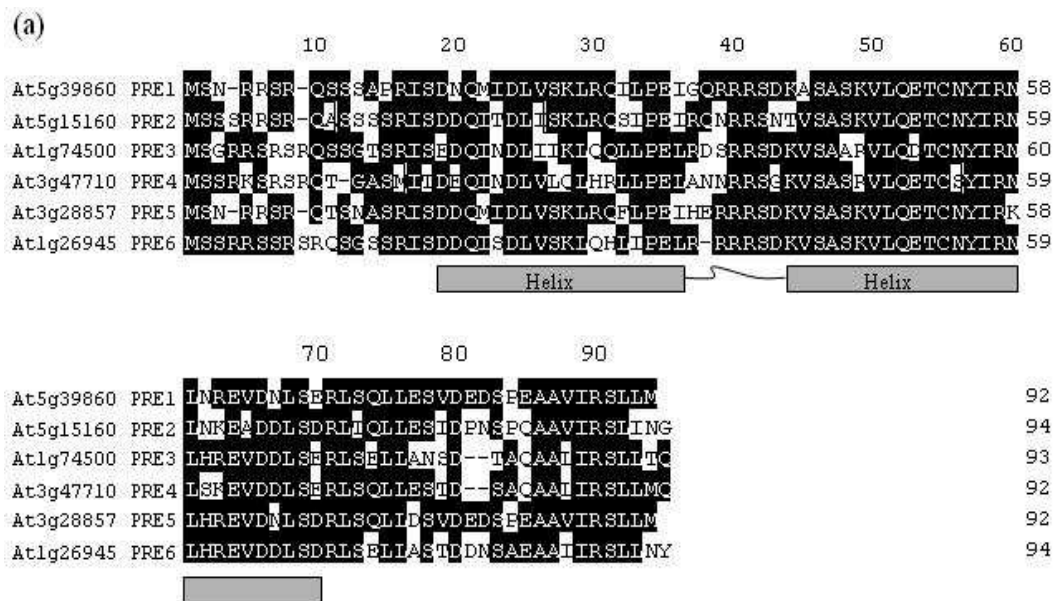
도면4f



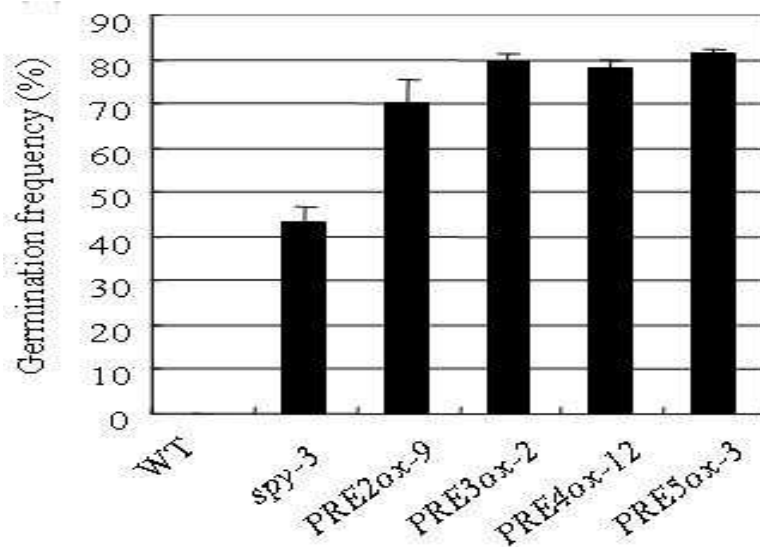
도면4g



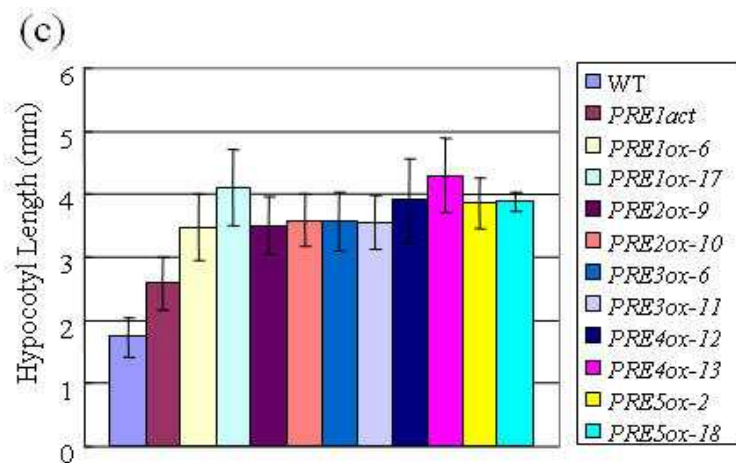
도면5a



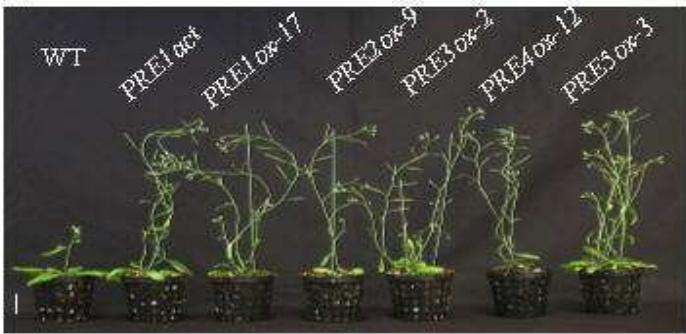
도면5b



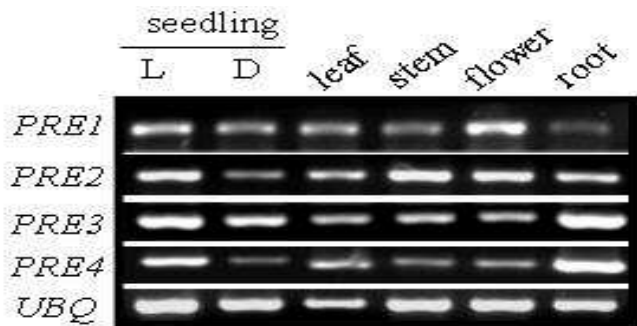
도면5c



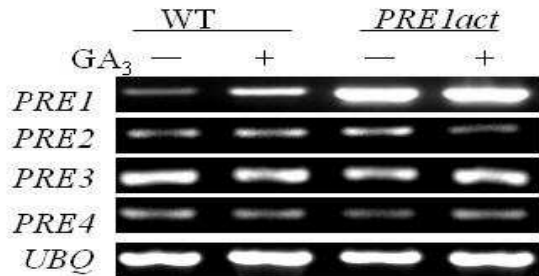
도면5d



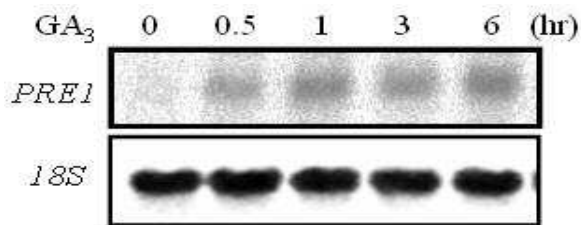
도면5e



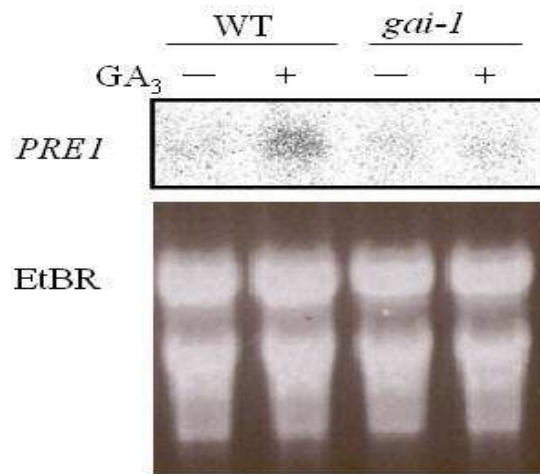
도면6a



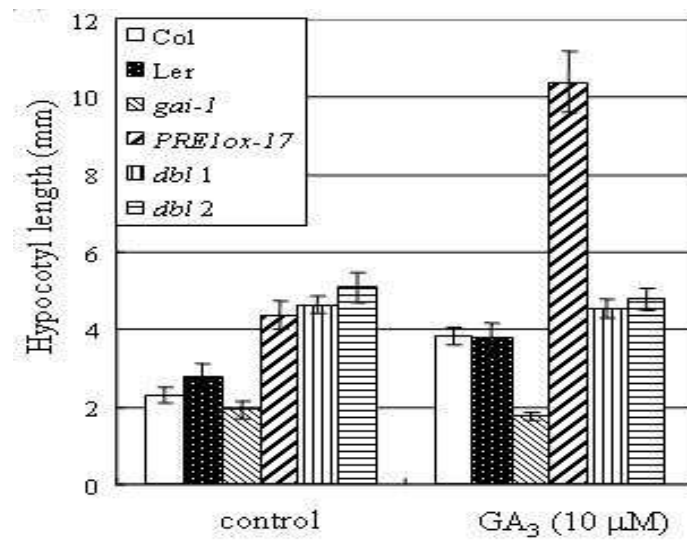
도면6b



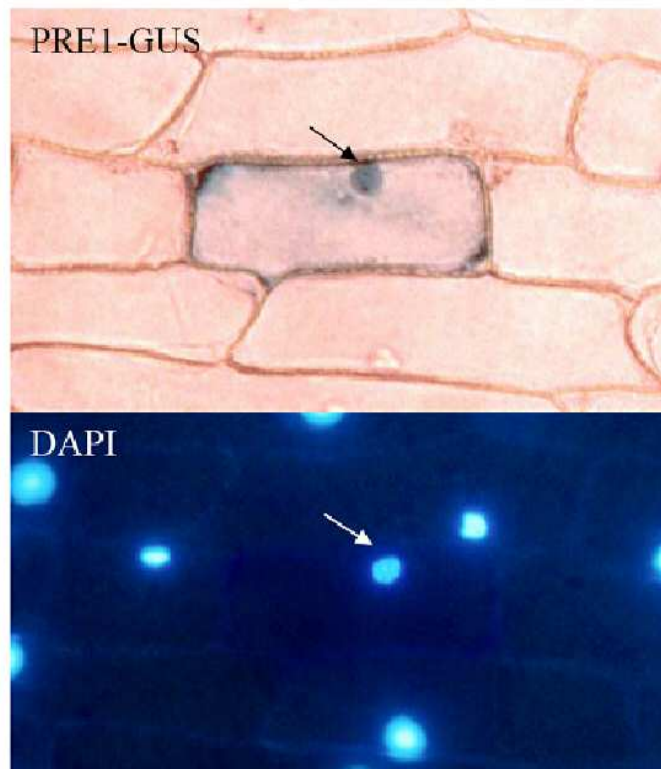
도면6c



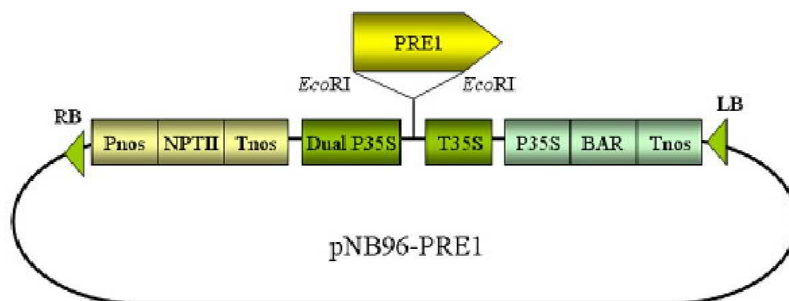
도면6d



도면7



도면8



서열목록

- <110> Industry-Academia Cooperation Group Of Sejong University
- <120> Gene Involved in Modulating Plant Development and Method for Modulating Plant Development Using the Same
- <160> 2
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 279
- <212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (276)

<400> 1

atg tcg aac aga aga tca agg caa tct tca agt gct cca agg atc tcc 48
Met Ser Asn Arg Arg Ser Arg Gln Ser Ser Ser Ala Pro Arg Ile Ser
1 5 10 15

gat aat caa atg att gac ctc gta tct aag ctc cgt caa att ttg ccg 96
Asp Asn Gln Met Ile Asp Leu Val Ser Lys Leu Arg Gln Ile Leu Pro
20 25 30

gag att ggt caa cga cgt cgt tct gat aag gca tca gcc tcg aaa gta 144
Glu Ile Gly Gln Arg Arg Arg Ser Asp Lys Ala Ser Ala Ser Lys Val
35 40 45

ttg caa gag aca tgc aat tac ata cga aat ttg aac aga gaa gtt gac 192
Leu Gln Glu Thr Cys Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asn Arg Glu Val Asp
50 55 60

aat ctg agc gag cgt ttg tct cag ctt ctc gaa tct gtc gat gaa gat 240
Asn Leu Ser Glu Arg Leu Ser Gln Leu Leu Glu Ser Val Asp Glu Asp
65 70 75 80

agc cct gaa gcc gcc gtt att aga agc cta ctc atg taa 279
Ser Pro Glu Ala Ala Val Ile Arg Ser Leu Leu Met
85 90

<210> 2

<211> 92

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ser Asn Arg Arg Ser Arg Gln Ser Ser Ser Ala Pro Arg Ile Ser
1 5 10 15

Asp Asn Gln Met Ile Asp Leu Val Ser Lys Leu Arg Gln Ile Leu Pro
20 25 30

Glu Ile Gly Gln Arg Arg Arg Ser Asp Lys Ala Ser Ala Ser Lys Val
35 40 45

Leu Gln Glu Thr Cys Asn Tyr Ile Arg Asn Leu Asn Arg Glu Val Asp
50 55 60

Asn Leu Ser Glu Arg Leu Ser Gln Leu Leu Glu Ser Val Asp Glu Asp
65 70 75 80

Ser Pro Glu Ala Ala Val Ile Arg Ser Leu Leu Met
85 90