



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0050731
(43) 공개일자 2012년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0112134

(22) 출원일자 2010년11월11일

심사청구일자 2010년11월11일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

이동희

서울특별시 종로구 창의문로11길 24 (부암동)

변윤정

충청남도 아산시 탕정면 탕정면로 37, 삼성트라펠리스 202동 1803호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

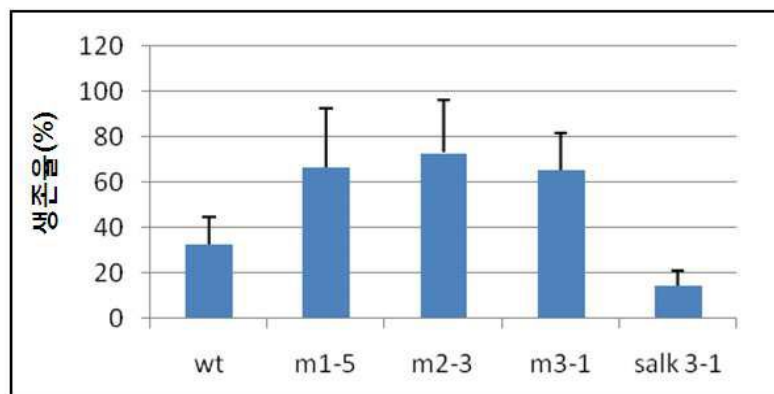
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 식물의 콜드 또는 프리징 저항성을 증가시키는 유전자 및 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 상기 서열이 삽입된 식물 발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 비생물적 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물, 상기 조성물이 도입된 형질전환 식물체, 상기 형질전환 식물체의 제조방법 및 식물체의 비생물적 스트레스 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다. 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 식물체의 저항성 증대에 관여를 하며, 이를 이용하여 식물체를 형질전환 하면 상술한 스트레스에 대한 식물체의 저항성이 증가하여 식물체 재배 지역의 한계 극복할 수 있으며, 배추에 적용될 경우 저온에 강한 배추의 생산이 가능하여 생산력을 극대화시킬 수 있다.

대표도 - 도5c



(72) 발명자

유신애

서울특별시 영등포구 가마산로 540, 바다마을A 10
4동 1305호 (신길동)

주혜준

서울특별시 노원구 한글비석로 332, 205동 510호
(중계동, 주공2단지아파트)

최민경

서울특별시 은평구 은평터널로9길 11, A동 202호
(신사동, 동문 유로빌)

황지혜

서울특별시 서대문구 연세로2마길 35, 403호 (대현
동)

황효주

광주광역시 북구 운암동 나산아파트 103-602

한지학

경기도 여주군 가남면 양화로 113-141

박영수

경기도 여주군 여주읍 홍문리 현대아파트

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1390007489

부처명 농촌진흥청

연구사업명 21세기 프론티어연구개발사업(작물유전체기능연구)

연구과제명 스트레스 반응 네트워크의 규명 및 응용

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2004.07.01 ~ 2007.03.01이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345105760

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 애기장대 근연종에서의 침수 스트레스 반응의 기능유전체학적 비교분석을 통한 내재해성
증진 유망 유전자의 발굴

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2009.05.01 ~ 2012.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 13454075994

부처명 교육과학기술부

연구사업명 국가핵심연구센터사업

연구과제명 세포신호전달계 바이오 의약 Target Validation 및 효능물질 설계

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2006.06.01 ~ 2013.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201004010300390010700

부처명 농림수산부

연구사업명 국책기술개발사업

연구과제명 기후변화 대응 광지역 적용 및 스트레스 저항성 GM 바이오디젤 원료작물 개발

주관기관 국립식량과학원

연구기간 2010.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 비생물성 스트레스 (abiotic stress) 저항성 향상용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 비생물성 스트레스는 콜드 또는 프리징 스트레스인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

(a) 상기 제 1 항 내지 제 3 항의 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합 (operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 비생물성 스트레스 저항성 향상용 조성물.

청구항 5

상기 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된 식물세포.

청구항 6

상기 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물로 형질 전환된 식물체.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 비생물성 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체를 제조하는 방법:

- (a) 상기 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계; 및
- (b) 상기 식물세포로부터 비생물성 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드 클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터

선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

다음의 단계를 포함하는 식물체의 비생물성 스트레스 저항성을 증가시키는 방법:

- (a) 상기 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계; 및
- (b) 상기 식물세포로부터 비생물성 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드 클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 콜드 또는 프리징 저항성을 향상시키는 유전자 및 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 식물은 정상 생장 및 발생을 유지하기 위해 외부 환경 변화에 대해 끊임없이 반응하고 적응한다. 가뭄, 고염 및 저온은 식물의 생장 및 곡물의 생산성에 나쁜 영향을 미치는 환경 조건이다. 이러한 스트레스들에 대해 식물은 생리학적 레벨 및 세포 생화학적 레벨에서 반응할 뿐 아니라, 분자 및 세포 레벨에서 반응하여 적응함으로써 생존할 수 있다.
- [0003] 비생물성(abiotic) 스트레스 반응을 이해하고 조작하기 위해 유의한 과정들이 시도되어 왔다. 3가지 중요한 테마가 있다. 첫째로, 대부분의 스트레스 처리의 개시가 세포질 칼슘 방출과 연관되어 있으며, 몇 가지 경우에는 자극-특이적 진동 패턴을 보인다. 둘째로, 유전자 발현에서 자극-특이적 변화들이 일련의 공유된 스트레스 반응과 함께 관찰된다. 세 번째 중요한 테마는 식물의 증가된 스트레스 저항성 레벨은 내인성 유전자들의 발현을 재프로그래밍함으로써 조작될 수 있다는 것이다.
- [0004] 콜드 스트레스는 식물의 농업적 생산성을 제한하는 주요 환경인자이다. 저온은 식물의 생존 및 지리적 분포에 심대한 타격을 야기한다. 콜드 스트레스는 종종 식물 생장 및 곡물 생산성에 영향을 미쳐 뚜렷한 곡물 손실을 야기한다(Xin and Browse, 2000). 식물은 냉장(chilling) 온도(0-15℃) 및 프리징 온도(0℃ 미만)에 대한 저항성이 다르다. 온화한 지역의 식물들은 냉장 저항성을 가지고, 이들 대부분은 프리징에 대한 저항성이 거의 없지만 비-프리징 온도인 냉장에 노출됨에 따라 프리징 저항성이 증가되는 콜드 순응(cold acclimation)이라는 과정을 겪는다(Levitt, 1980). 상기 콜드 순응은 생화학적 및 생리학적 변화들과 연관되어 있다(Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 1996; Thomashow, 1998; Gilmour et al. 2000).
- [0005] 콜드 순응에서 중요한 역할을 하는 유전자들은 무엇인가? 이들의 기능은 무엇인가? 식물은 저온을 어떻게 인지하여 콜드-순응 반응을 활성화시키는가? 상술한 의문들은 콜드 순응 분야에 종사하는 연구자들이 활발하게 답을 찾고 있는 핵심 질문들이다. 상술한 분야에 대한 이해는 식물이 환경 변화에 대해 어떻게 인지하고 반응하는 지에 대한 전체적인 이해에 중요할 뿐 아니라, 잠재적인 실질적 적용에도 중요하다.
- [0006] 가뭄, 고염 및 저온 같은 환경 스트레스는 식물 생장 및 씨앗 생산에 해로운 영향을 미친다. 식물은 다양한 생화학적 및 생리학적 과정들을 통해 상술한 스트레스에 대해 반응하고 적응함으로써, 스트레스 저항성을 획득

한다. 많은 유전자들이 가뭄, 염 및/또는 콜드 스트레스에 대해 전사 레벨에서 반응하고 이들 유전자들의 산물은 스트레스 반응 및 저항성에 기능한다.

[0007] 대사과정의 활발한 변화는 콜드-조절된 유전자 발현 변화에 의해 이루어지는데, 이러한 변화는 저온 시그널링에 의해 조절된다. 또한, 대사과정의 활발한 변화는 콜드 시그널링 및 콜드-반응성 유전자 발현을 조절할 수 있다. 적어도 3가지 형태의 대사 시그널이 콜드 시그널링에 중요할 것으로 생각된다. 첫째로, 수용성 당이 중요한 시그널링 분자로 작용할 수 있다. 둘째로, 테트라피롤 매개체인 Mg-프로토포피린(Mg-Pro-toIX)이 콜드 조건에서 식물에 축적되고 번역 연장인자 2 단백질(translational elongation factor 2 protein)에 결합한다는 것이 최근에 알려졌다. 세 번째로, 콜드 조절에 대한 대사 시그널 분자는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)일 수 있다.

[0008] 콜드-반응성 유전자의 최대 수는 아라비도시스로부터 분리되었다. Xin 및 Browse(1998)은 콜드 저항성에 주요한 역할을 가지는 중요한 유전자 *esk1*을 동정하였다. 야생형 식물체와 비교하여 *esk1* 돌연변이체는 높은 농도의 프롤린 및 더 높은 프리징 저항성 특징을 가졌다. 아라비도시스의 에스키모1(*esk1*) 돌연변이는 콜드 순응이 없는 상태에서도 프리징 저항성을 야기한다고 알려졌다. 프리징 저항성의 증대는 세포내 탈수화의 유도하는 프리징과 유사한 가뭄 또는 염 스트레스 하에서 생존하는 능력의 증가와 연관되어 있지 않다. *esk1-1*과 야생형 간의 유전자 발현의 유전자-전반에 걸친(genome-wide) 비교 결과는 *esk1*에서의 돌연변이가 전사인자들, 시그널링 구성요소들, 및 일련의 스트레스-반응성 유전자들의 변화된 발현을 초래한다는 것을 보여준다.

[0009] 식물을 포함하는 모든 생명체에서 단백질 인산화는 많은 기본적인 세포내 과정을 조절하는 가장 중요한 기작이다. 일련의 특이적인 세린/트레오닌 단백질 키나제 클래스인 미토젠-활성화된 단백질 키나제(MAP kinases)는 세포질 및 핵 모두에서 기능하고, 삼투조절, 세포생장 및 분화 같은 다른 시그널 전달 경로에 포함된다. 일반적으로, MAP 키나제가 MAPKKK 키나제에 의해 활성화되는 MAPK 키나제(MAPKK)에 의해 인산화되어 활성화되는 네트워크 캐스케이드를 통해 기능한다. MAP 키나제 캐스케이드를 통한 시그널링은 다양한 스트레스에 대한 반응뿐 아니라 세포분열, 분화 등을 포함하는 세포내 반응들을 초래한다. 식물에서, MAP 키나제는 다수의 유전자(multigene) 패밀리에 의해 인코딩되고 특정 자극들의 효율적인 전이를 위한 복합체 네트워크로 구성된다. 인산화에 의해 활성화된 MAPK는 전사인자들, 세포골격 구성요소들 및 다른 MAP 키나제 구성요소를 포함하는 다른 키나제들의 기능을 조절할 수 있다. MAPK 경로 구성요소들은 옥신-유도된 세포증식 또는 에틸렌-반응성 과정들, 세포벽 생합성 및 세포 생장 및 분화 같은 식물 세포 시그널 전달 경로에서 매우 다양한 기능을 수행할 수 있다. AtMAPK3 및 AtMAPK6의 가상적인 기질들은 많은 환경 스트레스에 의해 활성화된다. 따라서, 전형적인 방어 반응은 식물 세포 사멸에 대한 저항성 반응, ROS의 생산 및 PR(pathogenesis-related) 단백질 및 항-균과 이토알렉신의 합성에서 관찰된다. 다양한 환경 스트레스인자들이 단독으로 기능하지 않는다는 것이 알려져 있더라도, 비생물 스트레스에 대한 식물 반응의 실험적 연구는 분리된 스트레스 인자들에 대한 식물 반응에 국한되어 있다. 본 발명과 관련된 콜드 스트레스 하의 식물에 대한 생리학적 기능의 수행은 하기에 일반화될 것이다.

[0010] 상술한 바와 같이, MAP 키나제는 다른 형태의 시그널들의 전이에서 중추적인 역할을 한다. MAP 키나제 경로의 활성인자가 다양한 식물 반응을 조절하고 있는 경우, 그 복잡성이 더 하다. 이러한 사실은 많은 수의 세포외 시그널에 대한 식물 반응뿐 아니라, 식물 내의 발생 프로그램을 매개하는 식물성 호르몬(phyto-hormones)에 의해 가장 잘 예증된다. 일반적으로, 하나 이상의 호르몬이 생리학적 이벤트를 조절하는 데 포함된다. 즉, 식물 MAP 키나제 경로는 호르몬 자극 및 환경 자극에 대한 식물 반응에서 다양한 레벨로 관여되어 있음이 명백하다. 따라서, MAP 키나제는 별개의 캐스케이드들로 명백하게 분리되지 않고, 많은 수의 중복 및 크로스-토크를 보인다(도 1). 다른 자극들이 MAP 키나제의 다르지만 연관되어 있는 패턴을 활성화시키는 것처럼 보인다. MAP 키나제의 세 단계(three-tier) 모듈의 구성요소는 동일한 패밀리의 멤버들 간의 기능적 중복성을 허용하는 다수의 유전자 멤버로 이루어져 있다는 사실은 상술한 복잡성을 더욱 증대시킨다. 어떤 MAP 키나제는 다른 반응의 조절에 포함되어 있다는 것이 보고되었는데, 예를 들어 활성 ANP-유사 MAPKKKa는 세포주기 조절 및 산화적 스트레스 시그널의 전이에서 기능하는 2중 기능성을 가진다. 또한, 다른 MAP 키나제는 공통적인 세포외 시그널에 의해 활성화될 수 있지만, 다른 시그널링 경로를 가진다. 예를 들어, 상처, 콜드 및 염 스트레스는 AtMPK4 및 AtMPK6 활성을 유도하지만, AtMAP4는 상처 스트레스에서 AtMEKK1에 의해 활성화되고 콜드 및 염 스트레스에서는 MKK2에 의해 활성화된다.

[0011] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허

문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명자들은 식물체의 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 바람직하게는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열이 식물체의 상술한 스트레스 저항성(예컨대, 콜드 또는 프리징 저항성)을 증가시키고 이를 이용하여 형질전환 식물체를 제조한 경우에 개선된 스트레스 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 획득할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 따라서 본 발명의 목적은 식물체의 비생물성 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 비생물성 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 식물체의 비생물성 스트레스(abiotic stress) 저항성을 증가시키는 방법을 제공하는 데 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 비생물성 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명자들은 식물체의 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, 바람직하게는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열이 식물체의 상술한 스트레스 저항성(예컨대, 콜드 또는 프리징 저항성)을 증가시키고 이를 이용하여 형질전환 식물체를 제조한 경우에 개선된 스트레스 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 획득할 수 있음을 확인하였다.
- [0019] 본 발명에 따르면, 특이적 DNA 마이크로레이를 이용하여 아라비도시스의 저온 저항성에 관련된 유전자 네트워크를 탐구하였다. 그 결과, 비생물성 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 유전자를 삽입(supply)함으로써 비생물성 스트레스에 대한 식물체(바람직하게는, 배추)의 저항성이 증가하였다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 식물체의 스트레스 저항성의 개선을 위하여 사용되는 서열은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열이며, 바람직하게는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열이다. 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.
- [0021] 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.
- [0022] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 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 60%의 상동성, 보다 바람직하게는

70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%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, blastn, 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.

- [0023] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (b)상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c)식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 비생물성 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합”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.
- [0025] 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 있다.
- [0026] 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, PM 프로모터, 옥수수의 유비쿼틴 프로모터, 칼리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 신타아제(nos) 프로모터, 피크위트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤벨리나 엘로우 모틀 바이러리스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카복실라아제 스몰 서브유닛(ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리오스포스페이트 이소머라아제(TPI) 프로모터, 아라비도시스속의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(APRT) 프로모터, 옥토파인 신타아제 프로모터 및 BCB(blue copper binding protein) 프로모터를 포함한다. 가장 바람직하게는 본 발명에 적합한 프로모터는 CaMV 35S 프로모터이다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명에 적합한 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열은 아그로박테리움 투메파시엔스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것(NOS 3' end)(Bevan et al., *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 투메페이선스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분, CaMV 35S 터미네이터 및 OCS 터미네이터(octopine synthase terminator)서열을 포함한다. 가장 바람직하게는 본 발명에 적합한 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-말단 폴리 A 시그널 서열은 NOS 서열이다.
- [0028] 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제(예: 네오마이신, 카바미실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 또는 제초제(예: 바스타) 내성 유전자(예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(*hpt*), 등)를 포함한다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물발현용 재조합벡터는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 바이너리 벡터이다.
- [0030] 본 명세서에서 용어 “바이너리 벡터”는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는데 필요한 유전자를 가진 플라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말한다. 본 발명의 형질전환용 아그로박테리움은 본 발명의 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 것이면 어느 것이라도 좋고, 특히 본 발명에서 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상적인 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1이 바람직하다.

- [0031] 본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method), 열충격법(heat shock) 및 냉동-해빙법(freeze-thaw method) 등이 있으며, 가장 바람직하게는 냉동-해빙법(freeze-thaw method)을 이용한다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 뉴클레오타이드 서열 또는 식물발현용 재조합 벡터로 형질 전환된 식물체를 제공한다.
- [0033] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(*Methods of Enzymology*, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물에 형질전환시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton et al., *Cell* 11:263:271(1977)), 직접 외래성 폴리뉴클레오타이드를 식물 세포내로 도입시켜 식물에 형질전환시킬 수 있다(Lorz et al., *Mol. Genet.* 199:178-182;(1985)). 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다.
- [0034] 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오타이드로 형질전환된 아그로박테리움 투메파시언스로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호). 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환 된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.
- [0035] 본 명세서에서, 용어 “식물(체)”는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.
- [0036] 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물체는 특별하게 제한되지 않는다. 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물로는 상치, 배추, 감자 및 무를 포함하는 대부분의 쌍자엽 식물(dicotyledonous plant) 또는 벼, 보리, 바나나 등의 단자엽 식물(monocotyledonous plant)이 모두 이용될 수 있으며, 특히 토마토와 같이 과피가 얇아 콜드 또는 프리징 스트레스에 따른 품질 저하가 급격히 나타나는 식용 채소 또는 과일 그리고 잎이 주된 상품으로 거래되는 식물 등에 적용할 경우 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 저항성을 높이는 데 효과적이다. 바람직하게는, 본 발명의 방법은 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나 무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 툴페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 식물체에 적용된다. 가장 바람직하게는, 본 발명의 방법은 배추를 포함하는 채소작물류에 적용된다.
- [0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 비생물성 스트레스에 대한 저항성이 증가된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다:
- [0038] (a) 상기 뉴클레오타이드 또는 식물발현용 재조합 벡터를 식물 세포에 도입시키는 단계; 및
- [0039] (b) 상기 식물세포로부터 비생물성 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 형질전환 식물체를 수득하는 단계.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 식물체의 비생물성 스트레스 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다:
- [0041] (a) 상기 뉴클레오타이드 또는 식물발현용 재조합 벡터를 식물 세포에 도입시키는 단계; 및
- [0042] (b) 상기 식물세포로부터 비생물성 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 형질전환 식물체를 수득하는 단계.
- [0043] 식물발현용 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시될 수 있다.
- [0044] 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물세포는 상기한

배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(npt II) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

[0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 상기 식물체는 아라비도시스, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류이다.

발명의 효과

[0046] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0047] (a) 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 상기 서열이 삽입된 식물 발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 비생물성 스트레스(abiotic stress) 저항성 향상용 조성물, 상기 조성물이 도입된 형질전환 식물체, 상기 형질전환 식물체의 제조방법 및 식물체의 비생물성 스트레스 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0048] (b) 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 콜드 또는 프리징 스트레스에 대한 식물체의 저항성 증대에 관여를 하며, 이를 이용하여 식물체를 형질전환 하면 상술한 스트레스에 대한 식물체의 저항성이 증가하여 식물체 재배 지역의 한계 극복할 수 있으며, 배추에 적용될 경우 저온에 강한 배추의 생산이 가능하여 생산력을 극대화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 다른 식물 MAK 키나제-시그널링 경로 간의 크로스-토크를 도식적으로 보여준다(Form N.S. Mishra et al. 2006).

도 2는 MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체를 확인한 결과이다. 도 2a는 MPK3의 벡터 맵이다. 콜드 스트레스에 대한 식물 반응의 유전적 컨트롤을 연구하기 위해, MPK3 유전자를 바이너리 벡터인 pCAMBIA 1304(농우바이오)에 클로닝한 후, 아라비도시스에 형질전환시켰다. 도 2b는 RT-PCR 분석 결과이다. MPK3 과다-발현 라인 및 SALK-라인의 RT-PCR 분석이다. 연속 광 조건 하에서 2주 동안 성장된 식물체의 잎으로부터 총 RNA를 분리하였다. 두 번의 독립적인 실험을 실시하였으며, 각 실험은 두 개의(duplicate) 실험군으로 구성되고 이들의 결과는 일치되었다.

도 3은 야생형, MPK3 과다-발현 라인 및 SALK-라인의 잎 길이를 비교한 결과이다. 도 3a는 형태학적인 비교 결과이다. 3주된 Col-0 식물체(위쪽) 및 MPK3 과다-발현 돌연변이 식물체(아래쪽)의 성숙한 잎을 나타낸다.

모든 이미지에 대한 눈금 막대(scale bar)는 1 cm이다. 도 3b는 Col-0 야생형과 비교하여 MPK3 과다-발현 돌연변이 라인의 잎, 엽신 및 엽병의 길이, 그리고 엽신 면적을 측정한 결과이다. 모든 데이터는 평균값±표준편차(n = 5)로 표시된다.

도 4는 MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체 및 녀-아웃 라인의 성장을 나타내는 결과이다. 도 4a는 Col-0 야생형과 비교하여 MPK3 돌연변이 라인들의 하이포코틸 길이를 비교한 그래프이다. 모든 데이터는 평균값±표준편차(n = 8)로 표시된다. 도 4b는 Col-0 야생형과 비교하여 MPK3 돌연변이 라인들의 뿌리 길이를 비교한 그래프이다. 모든 데이터는 평균값±표준편차(n = 8)로 표시된다.

도 5는 MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체 및 SALK-라인의 프리징 저항성을 조사한 결과이다. 도 5a는 3주된 아라비도시스 식물체, MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체 및 SALK-라인의 프리징 저항성 어세이 과정을 나타내

는 그래프이다. 본 연구에서 이용된 프리징 테스트의 실험적인 도식을 보여주며, 도식 내에 이용되는 프리징의 온도 변화를 포함하고 있다. 도 5b는 프리징 동안 MPK3 과다-발현 형질전환체 라인, SALK-라인 및 아라비도시스의 표현형을 비교한 사진이다. 프리징 처리 후, 2주 후에 사진을 찍었다. 도 5c는 도 5b에 상응하는 프리징에 대한 노출로부터 2주 동안의 회복 후 MPK3 과다-발현 형질전환체 라인, SALK-라인 및 아라비도시스의 프리징 저항성에서의 생존율을 나타내는 그래프이다. 실험은 네 번에 걸쳐서 서로 독립적으로 반복하였다. 모든 데이터는 평균값±표준편차(n = 10)로 표시된다.

도 6은 콜드 반응성 유전자들의 계층적 군집을 보여주는 마이크로어레이 결과이다. 콜드 처리 조건 하에서 MPK3 돌연변이 라인의 유전자 발현 패턴을 아라비도시스 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이를 이용하여 모니터링하였다.

도 7은 MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체에서 콜드 처리에 의해 서로 다르게 발현된 유전자들의 수를 나타내는 그래프이다. 시간별 실험에서 각 시간별로 서로 다르게 발현된 유전자들의 총수가 보여진다. 유의하게 변화된 발현 및 2배 이하의 변화를 보이는 알려진 유전자들에 대한 시간별 실험 결과이다. 빨간색 막대는 상향-조절된 유전자들의 수를 나타내며, 파란색 막대는 하향-조절된 유전자들의 수를 지시하는데, 이때 상향 또는 하향은 인자(예컨대, 콜드)에 대해 유전자의 변화가 정상과 비교하여 2배 이상으로 스코어링된 것이다(MT_00, 콜드 처리 0 h; MT_03, 콜드 처리 3 h; 및 MT_72, 콜드 처리 72 h).

도 8은 MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체에서 콜드 반응의 변화를 나타내는 결과이다(MT_00/MT_03 및 MT_00/MT_72). 도 8a는 MT_00 I/MT_03에 관계된 공동 발현 분석에서 풍부화된 유전자 세트를 나타낸다. MT_00 I은 전사의 RNA 조절, 시그널링 또는 전달(transport) 경로에 관계된 유전자 세트를 나타낸다. MT_03 I은 미토콘드리아 전자전달/ATP 합성, 아미노산 대사, 보조인자(co-factor) 또는 비타민 대사에 관계된 유전자 세트를 나타낸다. MT_03 II는 마이너 CHO 대사, 뉴클레오타이드 대사 또는 단백질에 관계된 유전자 세트를 나타낸다. MT_03 III는 시그널링, 레독스/티레독스 또는 단백질에 관계된 유전자 세트를 나타낸다. MT_03 I, MT_03 II 및 MT_03 III가 발현이 증가하였다. 도 8b는 MT_00 I/MT_72에 관계된 공동 발현 분석에서 풍부화된 유전자 세트를 나타낸다. MT_00 I은 misc.플라스토시아닌-유사Bifunctional 전사체, 세포벽, 전달, 펩타이드 또는 올리고펩타이드에 관계된 유전자 세트를 나타낸다. MT_72 I은 테트라피롤 합성, 메이저 CHO 대사, 보조인자(co-factor) 또는 비타민 대사에 관계된 유전자 세트를 나타낸다. MT_72 II는 메이저 CHO 대사, 레독스 또는 해당과정에 관계된 유전자 세트를 나타낸다. MT_72 I 및 MT_72 II가 발현이 증가하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 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.

[0051] 실시예

[0052] 실험 재료 및 실험 방법

[0053] MPK3 과다발현 아라비도시스의 제작

[0054] MPK3 과다발현 플라스미드의 형질전환

[0055] 35S 프로모터를 가지는 pCambia 플라스미드에 MPK3 ORF 염기서열을 클로닝해서 제작한 35S::MPK3(U15582/NW1304) 플라스미드를 아그로박테리움-매개된 floral-dipping 방법을 이용하여 아라비도시스 살리나나 콜롬비아(Col-0)로 형질전환시켰다. 4주간 키운 애기장대 야생형의 화경(flower stalk)을 약 0.8의 최종 OD₆₀₀에 맞춰진 아그로박테리움 접종액에 담겨 형질전환을 유도한 뒤 플라스틱 트레이에 옮겨 습도 유지를 위해 화분을 클린 랩으로 덮었다. 성장 챔버에서 암조건으로 2일 동안 처리 후 랩을 제거하고 정상 조건에서 식물체를 키웠다. 식물체는 플라스틱 필름을 이용하여 주변 식물체의 화분과 격리한 채로 실리크(siliques)가 성숙될 때까지 3-5주 동안 추가적으로 생장시켰다. 깨끗한 장갑을 낀 손으로 꽃대에 붙은 실리크를 부드럽게 당겨서 수확 한 후 줄기 및 화분 재료는 체를 통해 제거하여 씨앗을 얻었다. 씨앗은 튜브(microfuge tubes)에 저장하고 탈수를 위해 4℃에서 유지하였다.

[0056] **MPK3 과다발현 식물체의 선택**

[0057] T0 씨앗을 0.05% 트라이톤-X 100으로 5분 동안 표면살균한 후, 증류수로 세척하고, 다량의 씨앗을 30 mg/ μ l의 하이그로마이신을 포함하는 MS 플레이트(0.5x Murashige-Skoog salts; 1% 수크로오스; 및 1% 아가)에 심었다. 23°C 생장 챔버에서 발아시킨 후 10일 동안 연속적인 광조건 하에서 생장시켰다. 하이그로마이신(Duchefa biochemie)에 저항성을 가지고 살아남은 식물체를 흙으로 옮겨 23°C, 연속적인 광 조건 하에서 6주간 생장시켰다. 상술한 T0 식물체의 각 라인으로부터 얻은 씨앗(T1)을 T0 씨앗과 동일한 방법으로 하이그로마이신을 포함하는 배지에 각 라인별로 100개 이상의 씨앗을 발아시켰다. 하이그로마이신 저항성으로부터 75% 생존율을 나타내는 형질전환체 라인을 선별한 후, 생존한 T2 형질전환체를 흙으로 옮겨 정상조건에서 6주간 키운 후, T3 씨앗을 얻는다. 동형접합체(homozygote)인 T3 MPK3 과다발현 라인을 얻기 위해, T2 선별과정과 같이 실시하였고, 그 결과 100% 생존율을 가지는 세 개의 T3 라인을 얻었다.

[0058] **MPK3 과다발현 플라스미드의 염색체 통합 확인**

[0059] 정량적 전사 레벨의 검출을 위해, 2주된 식물체의 잎으로부터 추출된 5 μ g의 총 RNA를 2 μ l의 5X 반응완충액, 0.5 μ l의 10 mM dNTPs, 1 μ l의 0.1M DTT(dithiotreitol), 1 유닛의 Superscript II enzyme(Invitrogen) 및 1 pmole의 올리고(dT)₁₈ 프라이머를 포함하는 10 μ l의 반응 혼합물에서 2시간 동안 42°C에서 역전사시켰다. MPK3 과다발현을 확인하기 위해, RT-PCR(역전사 PCR) 분석을 실시하였다: 정방향 프라이머, 5' -CATGAATAAAAGAACAAGCAAAG-3' ; 및 역방향 프라이머, 5' -TTGGTGTGTTTGTGTCATGG-3' .

[0060] **MPK3 넉-아웃 아라비도시스 라인**

[0061] T-DNA 삽입 라인(SALK_151594 라인) 씨앗을 연세대학교 이명민 교수로부터 얻었다. 정량적 전사 레벨의 검출을 위해, 2주된 식물체의 잎으로부터 추출된 5 μ g의 총 RNA를 2 μ l의 5X 반응완충액, 0.5 μ l의 10 mM dNTPs, 1 μ l의 0.1M DTT(dithiotreitol), 1 유닛의 Superscript II enzyme(Invitrogen) 및 1 pmole의 올리고(dT)₁₈ 프라이머를 포함하는 10 μ l의 반응 혼합물에서 2시간 동안 42°C에서 역전사시켰다. MPK3 SALK-라인을 확인하기 위해, RT-PCR(역전사 PCR) 분석을 실시하였다: 정방향 프라이머, 5' -GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3' ; 및 역방향 프라이머, 5' -TTGGTGTGTTTGTGTCATGG-3' . PCR 조건은 25 사이클(한 사이클이 94°C에서 30초 동안의 변성단계, 58°C에서 30초 동안의 어닐링 단계 및 72°C에서 30초 동안의 연장단계로 구성)로 실시하였다.

[0062] **생장 및 발달의 조사**

[0063] MPK3 과다발현 라인은 야생형보다 더 빠르고 더 크게 자라는 경향을 보인다. 하이포코틸 및 뿌리 길이를 비교하기 위해, MPK3 과다발현 돌연변이체 및 야생형 아라비도시스(Col-0)를 MS(Murashige and Skoog) 배지에서 23°C로 유지된 연속 광주기의 생장 챔버에서 8일 동안 생장시켜 흙으로 옮겼다. 식물체를 17일 동안 키운 후, 엽병을 포함하는 잎을 절단하여 0.8% 아가-플레이트(Duchefa biochemi)에 고정된 다음 사진을 찍고, 식물체의 하이포코틸과 뿌리의 길이는 scion 소프트웨어로 측정하였다. 또 다른 실험 방법으로 야생형 Col-0와 MPK3 돌연변이 라인의 잎 면적, 하이포코틸 길이 및 뿌리 길이를 비교하기 위해, 수크로오스가 없는 MS 배지에서 23°C로 유지된 연속 광주기의 생장 챔버에서 24시간 동안 생장시킨 후, 2.5일 동안 암조건 상태에서 생장시켰다. 배지 상태에서 식물체의 사진을 찍고, 하이포코틸과 뿌리의 길이는 scion 소프트웨어로 측정하였다.

[0064] **콜드 민감성 어세이**

[0065] 아라비도시스 씨앗(아라비도시스 살리어나 생태형 콜롬비아 및 MPK3 형질전환체)를 0.15% 트라이톤-X 100으로 5분 동안 표면살균한 후, 증류수로 세척하고 MS 배지(1X Murashige-Skoog salts; 1% 수크로오스; 및 1% 아가)를 포함하는 페트리 디쉬에 심었다. 형질전환체의 콜드 민감성을 테스트하기 위해, 아라비도시스를 23°C 생장 챔버에서 8일 동안 16시간 광/8시간 암 사이클로 MS 배지에서 생장시킨 후 흙으로 옮긴 후, 23°C 생장 챔버에서 3주간 장일 광주기(photoperiod)로 생장시켰다.

[0066] 형질전환체 아라비도시스의 프리징 민감성 어세이를 위해, 식물체를 다음과 같은 프리징 온도 변화를 가지는 프

리징 챔버에서 실험하였다: 암 조건에서 8시간 동안 -1°C 처리; 빛 조건에서 1시간 마다 1°C 를 낮추면서 -1°C 부터 -11°C 까지 처리한 후 -11°C 에서 30분 동안 처리; 다시 암 조건에서 12시간 동안 4°C 처리. 프리징 후, 식물체들을 정상 23°C 생장 챔버에서 10일 동안 회복 시킨 후 식물체의 생존율을 계산하여 프리징 민감성을 평가하였다.

[0067] **RNA 분리 및 프로브 표지**

[0068] 형질전환체를 23°C 연속 광 조건 하에서 2주 동안 생장시켰다. 비-처리구(0시간) 및 각 MPK3 형질전환체 라인을 0°C 에서 3시간 및 72시간 처리 한 처리구의 식물체로부터 곧바로 잎 조직을 수득한 후, 액체질소에서 동결시켜 -80°C 에 저장하였다. 각 시료를 동결시킨 상태로 막자사발을 이용하여 간 후, RNeasy 식물 미니 키트(QuiaGen, Vaencia, CA, USA)의 방법에 따라 RLT 완충액으로 용해시킨 다음 RNeasy 컬럼에 로딩하여 원심분리한 후 에탄올을 포함하는 완충액으로 세척하고 RNeasy 컬럼에 추출 용액을 넣어 총 RNA를 용출하였다. 시료로부터 얻은 총 RNA는 아가로오스 젤을 이용하여 RNA 양과 상태를 확인하였다.

[0069] **데이터 획득 및 기본 분석**

[0070] 마이크로 어레이에서 각 스팟의 시그널 강도 및 국소적 백그라운드는 ImaGene 5.0 이미지 소프트웨어(BioDiscovery, Los Angeles, CA)를 이용하여 정량하였다. 보다 자세한 분석을 위해, 얻어진 데이터를 ImaGene으로부터 GeneSight 4.0(BioDiscovery, Los Angeles, CA)으로 옮겼다. 각 슬라이드에서, 국소적인 백그라운드를 시그널 강도에서 공제하여 시그널/백그라운드 비가 2이하인 스팟을 분석에서 제외시켰다. GeneSight에서 실시된 바와 같이, 각 어레이의 데이터를 국소-선형 회귀 방법(Lowess)로 표준화시켰다. 이중 채널로부터 표준화된 시그널 값을 조절 네트워크 및 GSEA 분석의 구축에 이용하였다. 계층적 군집(hierarchical clustering) 분석은 GeneSight 소프트웨어를 이용한 유클리언 디스턴스 메트릭(Euclidean distance metric)을 통해 실시하였다.

[0071] **GSEA를 이용한 마이크로어레이 데이터 분석**

[0072] 마이크로어레이 데이터의 결과를 보다 유의하게 얻기 위해, 유전자 세트의 레벨에서 마이크로어레이 데이터를 평가하는 GSEA(Gene Set Enrichment Analysis; Subramanian et al., 2005))를 실시하였다. 이러한 유전자 세트를 이용하여 GSEA 소프트웨어(<http://www.broad.mit.edu/gsea>)를 실시하였다.

[0073] 인리치먼트 값(enrichment score, ES)의 중요성을 판단하기 위해, 텍 표지들이 임의적으로 변경되어 ES를 2000번 반복적으로 계산(recalculate)하였다. 공동-발현된 유전자 세트에서 적용되는 ES의 중요성을 위한 컷오프는 0.05의 p -값 및 0.25의 오류발견률(false discovery rate, FDR)에 상응하는 값으로 정의되었으며, 네트워크 유전자 세트에서 적용되는 ES의 중요성을 위한 컷오프는 50% 정밀도로 0.10의 p -값 및 0.40의 FDR에 상응하는 값으로 정의되었다.

[0074] **실험결과 및 추가논의 사항**

[0075] **MPK3의 발현 증감 확인**

[0076] MPK3 과다-발현(O/E) 또는 녹-아웃 식물체의 동형접합 라인은 항생제 마커를 이용하여 T3 세대에서 선택한 후, MPK3에 대해 특이적인 프라이머(OLE 4035 및 OLE 4036)를 이용한 RT-PCR를 실시하였다. RT-PCR 분석을 통해, MPK3 과다-발현(O/E) 동형접합 라인은 야생형보다 2배 이상의 높은 MPK3 발현 레벨을 가진 반면에 녹-아웃 식물체는 MPK3를 거의 발현하지 않았다(도 2B).

[0077] **MPK3 과다-발현 식물체의 생장 및 발달**

[0078] **잎의 형태적 변화**

[0079] MPK3 형질전환체 식물체는 Col-0 야생형과 비교하여 형태적 차이를 나타냈다. MPK3 과다-발현 형질전환체 식

물체의 크기는 Col-0 야생형과 비교하여 약간 더 컸다. 영양생장시기에서, MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체의 로제트 잎은 Col-0 야생형과 비교하여 약간 더 큰 특징을 보였으며, 이러한 특징은 형질전환체 식물체의 잎의 엽신(blade) 뿐 아니라 엽병의 길이가 더 빠르게 성장한 것으로 확인하였다(도 3). 세 번째 및 네 번째 잎의 엽신 길이의 평균값은 다음과 같았다: 야생형, 0.5 ± 0.1 cm; AtMPK3-OE #1-5 식물체, 0.56 ± 0.1 cm; AtMPK3-OE #2-3 식물체, 0.80 ± 0.2 cm; AtMPK3-OE #3-1 식물체, 0.68 ± 0.1 cm; 및 AtMPK3-SALK #3-1 식물체, 0.58 ± 0.1 cm. 세 번째 및 네 번째 잎의 엽신 길이의 평균값은 다음과 같았다: 야생형, 0.45 ± 0.1 cm; AtMPK3-OE #1-5 식물체, 0.66 ± 0.03 ; AtMPK3-OE #2-3 식물체, 0.66 ± 0.2 cm; AtMPK3-OE #3-1 식물체, 0.46 ± 0.04 cm; 및 AtMPK3-SALK #3-1 식물체, 0.548 ± 0.01 cm. 상술한 결과들은 과발현된 MPK3가 식물체의 초기 라이프 사이클 단계에서 잎의 성장 속도를 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[0080] **MPK3 과다-발현 식물체에서 콜드 스트레스 저항성의 증대**

[0081] MPK3 과다-발현 식물체, SALK_151594 식물체 및 아라비도시스의 프리징 저항성을 비교하기 위해, 3주 동안 키운 식물체들을 다음과 같이 처리하였다: 암 조건에서 8시간 동안 -1°C 처리; 빛 조건에서 1시간 마다 1°C 를 낮추면서 -1°C 부터 -11°C 까지 처리; 다시 암 조건에서 12시간 동안 4°C 처리(도 5). 유전자 발현 및 생존율을 비교하기 위해 야생형의 아라비도시스를 대조군으로 사용하였다. 정상 성장 조건 하에서 2주 동안 회복시킨 후, 식물 생존율을 관찰하였다. 그 결과, t-검정($P < 0.01$)에 기반하여 평가된 식물체의 생존율은 다음과 같았다: 야생형, 32.7%; 과발현 형질전환체, #1-5, 66.6%; #2-3, 72.9%; #3-1, 65.2%; 및 넉-다운 형질전환체 #SALK 3-1, 14.5%. AtMPK3-과다-발현(O/E) 형질전환체 아라비도시스는 가장 높은 생존율을 보였다.

[0082] **GSEA 방법을 이용한 마이크로어레이 데이터의 군집 분석(Cluster analysis)**

[0083] 형질전환체 식물체인 #2-3 라인이 다른 시간에 처리된 자극에 의해 동시에 발생하는 변화의 이유를 조사하기 위해, 스캐터 블롯(scatter blot)을 실시하였다. 그 결과, 각 시간별 실험(time course; 0 h, 3 h 및 72 h)의 시그널 강도가 약간 변화하였다. 각 시간 경과와 형질전환체 식물체 간의 유전자 발현 레벨의 상대적으로 연속적인 변화를 분석하기 위해, 계층적 군집 분석을 실시하였다. 군집된 데이터의 시각적 고찰은 콜드 반응이 MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체와 Col-0 야생형 간의 다른 발현 패턴 뿐 아니라 각 시간 경과에 따른 형질전환체 식물체 간의 차별화된 발현 패턴을 활성화시켰다. 이러한 분석 결과는 시간별 실험의 특정 시간 포인트에서 개개의 발현이 특징적인 피크를 가지는 다른 유전자 군들이 있다는 것을 보여준다. 우선, 콜드 처리의 시간별 실험을 각각 클러스터링한 후, MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체 및 아라비도시스를 마지막으로 클러스터링하였다(도 6).

[0084] 상향- 또는 하향-조절된 유전자들의 수를 카운팅하였고, 데이터 변이성에 관계된 거짓-양성(false positives)의 수를 최소화시키기 위해 2배 이상 증가 또는 억제된 유전자들만을 선택하였다. 비-콜드 처리에 반응하여 상향- 또는 하향-조절된 유전자들의 수는 MPK3 과다-발현 돌연변이체에서 각각 2,026 및 1,978개였다(도 7). 돌연변이체에서 콜드-반응성 상향-조절된 유전자의 수는 3시간의 콜드 처리에 의해 1,522개의 유전자로 증가하였으며, 72시간의 콜드 처리에 의해 1,335개의 유전자로 증가하였다. 또한, 돌연변이체에서 콜드-반응성 하향-조절된 유전자의 수는 3시간의 콜드 처리에 의해 1,506개의 유전자로 증가하였으며, 72시간의 콜드 처리에 의해 2,407개의 유전자로 증가하였다. 시간별로 서로 다르게 발현하는 것은 MPK3 돌연변이체에서 콜드 처리의 효과가 상대적일 수 있다는 것을 나타낸다. 상술한 결과를 토대로, 각 시간별로 비교된 MPK3 형질전환체 식물체는 큰 차이를 보이는 유전자 발현을 나타낸다.

[0085] 도 8은 공동-발현된 유전자 맵에서 3시간 및 72시간 동안 콜드 처리된 MPK3 형질전환체 식물체에서의 위치를 나타낸 결과이다. 콜드 처리의 주요 기능을 3시간째에 맵에 표시하였다. 9,104개의 공동-발현된 유전자와 관련된 MT_03 I의 클러스터링에서, 대부분의 유전자들은 마이트콘드리아 전자전달/ATP 합성, 아미노산 대사, 보조인자(co-factor) 및 비타민 대사, 마이너 CHO 대사, 지질 대사 및 RNA와 관련되어 있었다. 3,963개의 공동-발현된 유전자와 관련된 MT_03 II의 클러스터링에서, 대부분의 유전자들은 마이너 CHO 대사, 뉴클레오타이드 대사, 단백질, 호르몬 대사, 스트레스 비생물학적 스트레스, 가뭄, 시그널링 및 전달(transport) 경로와 관련되어 있었다. 2,977개의 공동-발현된 유전자와 관련된 MT_03 III의 클러스터링에서, 대부분의 유전자들은 레독스 반응, 테트라피롤 합성, 시그널링 및 전달 경로와 관련되어 있었다.

[0086] 콜드 처리에 특이적인 인리치먼트(enrichment)를 72시간째에 맵에 표시하였다. 950개의 공동-발현된 유전자와

관련된 MT₇₂ I의 클러스터링에서, 대부분의 유전자들은 테트라피롤 합성, 메이저 CHO 대사, 보조인자(co-factor) 및 비타민 대사 및 뉴클레오타이드 대사와 관련되어 있었다. 1,139개의 공동-발현된 유전자와 관련된 MT₇₂ II의 클러스터링에서, 대부분의 유전자들은 메이저 CHO 대사, PS, 해당과정 레독스 반응 및 테트라피롤 합성과 관련되어 있었다.

[0087] 예상된 유전자의 기능 변화는 3시간 및 72시간 처리에 따라 폭넓게 나타난다. 광합성, 테트라피롤 합성, 세포벽, 지질 및 뉴클레오타이드 대사에 포함된 유전자들의 전사 레벨은 프리징 저항성과 연관되어 있다. 지질 조성 변화, 수크로오스 및 다른 간단한 당(sugars), 그리고 디하이드린(예컨대, ERD 14; Uemura et al. 2006) 및 리포칼린(Charron et al. 2005; Uemura et al. 2006) 같은 단백질이 저온 노출에 따라 세포막에 축적되어 막 안정화에 기여할 것으로 생각된다. 당은 인지질의 극성 군과 상호작용하고 단백질과의 소수성 결합을 통해 막을 안정화시킴으로써, 산소의 활성 형태의 주요 공급자인 엽록체 및 미토콘드리아를 포함하는 막의 고유구조(native structure) 및 기능성 상태를 유지시킨다. 미토콘드리아는 세포내 에너지 항상성 및 레독스 균형의 조절 센터이고, 극단적인 환경 조건에 적응하는 반응에서 중요한 수많은 대사 경로를 가지고 있다. 예를 들어, 호흡 및 산화적 인산화; Pro, Cys, 아스코베이트 및 폴레이트 대사; 및 레독스 균형의 조절 등은 스트레스 적응 과정 동안 세포내 대사의 공동조절(coordination)에서 미토콘드리아의 중요성을 예측하는 예이다(Sweetlove et al., 2007). MPK3에 의해 생산된 유전자 세트의 인리치먼트는 콜드 스트레스에 대해 더 높은 저항성을 야기하는 것으로 나타났다. 따라서, 인리치먼트된 유전자들로 인해 MPK3 돌연변이체는 야생형보다 더 높은 저항성을 가진다.

[0088] GSEA의 결과는 MPK3의 과다-발현이 산화적 DNA 손상을 복구(repair)하는 레독스 관련된 유전자들의 발현을 유도함으로써 레독스 인자로서 기능한다는 것을 보여준다. MPK3는 다기능성이고 DNA 복구 및 전사 조절 모두에 포함될 수 있다. 인접한 유전자들의 분석은 MPK3 유전자가 콜드 및 복구 시스템을 포함하는 스트레스 반응에서 중요한 역할을 한다는 것을 나타냈다. 광합성, 테트라피롤 합성, 세포벽, 지질 및 뉴클레오타이드 대사에 포함된 유전자들의 전사 레벨은 프리징 저항성과 연관되어 있다.

[0089] 결론

[0090] 식물 콜드 반응은 생화학적 변화 및 생리학적 변화를 포함하는 매우 복잡한 과정으로, 이는 유전자 발현 상에 변화를 통해 조절되는 것으로 알려져 있다. 콜드 반응의 기작을 이해하기 위해, 본 연구에서는 콜드 반응 상에 미토겐-활성화된 단백질 키나제 3(MPK3)의 기능 및 저온에 대한 아라비돕시스의 컴퓨터 분석을 실시하였다.

[0091] MPK3 과다-발현 형질전환체 식물체의 콜드 스트레스 저항성은 야생형 식물체와 비교하여 크게 증가하였는데, 이는 MPK3가 콜드 스트레스 반응에서 핵심적인 구성요소들 중 하나라는 것을 의미한다. 콜드 반응 과정을 이해하기 위해, 마이크로어레이 실험을 실시하였다. 유전자 발현 분석 결과, MPK3의 과다-발현은 레독스 반응 및 미토콘드리아와 관련된 유전자들을 유도하였다. 레독스 반응은 잘 알려진 DNA 복구 시스템이다. 미토콘드리아는 세포내 에너지 항상성 및 레독스 균형의 조절 센터이고, 극단적인 환경 조건에 적응하는 반응에서 중요한 수많은 대사 경로를 가지고 있다.

[0092] 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.

[0093] 참조 문헌

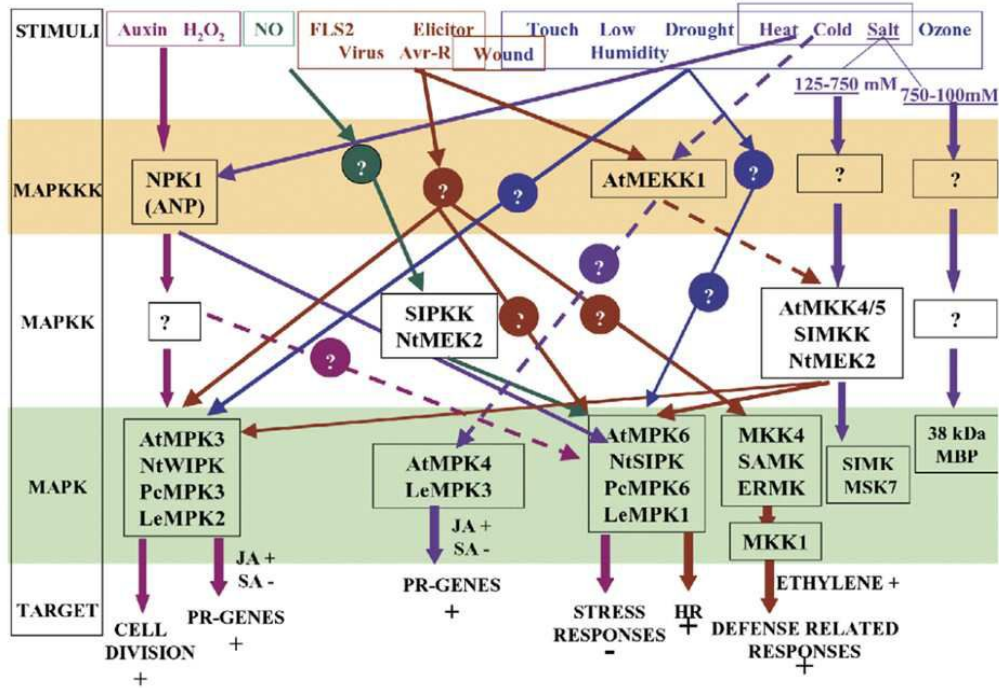
- [0094] Amolkumar U, Solanke and Arun K, Sharma (2008) Signal transduction during cold stress in plants *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 14: 69-79
- [0095] A.S. N. Reddy, Vaka S. Reddy, and Maxim Golovkin (2000) A Calmodulin Binding Protein from Arabidopsis is Induced by Ethylene and Contains a DNA-Binding Motif. *Science Direct* 279: 762-769
- [0096] Astrid Wingler (2006) Effect of sugar-induced senescence on gene expression and implications for the regulation of senescence in Arabidopsis. *Planta* 224: 556-568

- [0097] Byun YJ, ph.D. thesis (2006) Transcriptome Analysis of Cold Stress Response in Arabidopsis
- [0098] Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275: 1723-30
- [0099] Chong Liu Æ Lan Zhang Æ Jie Sun Æ Yanzhong Luo Æ Ming-Bo Wang Æ Yun-Liu Fan Æ Lei Wang (2009) A simple artificial microRNA vector based on ath-miR169d precursor from Arabidopsis. Springer Science+Business Media B.V. 2009
- [0100] Donson J, Fang Y, Espiritu-Santo G, Xing W, Salazar A, Miyamoto S, Armendarez V, Volkmuth W (2002) Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol* 48: 75-97
- [0101] GK, KK, Gabriella S, Marie-Pierre D, ZoltB, GG (2004) Abiotic stress-induced changes in glutathione and thioredoxin h levels in maize. *Environ. Exp. Bot* 52: 101-112
- [0102] Gilmour SJ, Sebolt AM, Salazar MP, Everard JD, Thomashow MF (2000) Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol* 124: 1854-65
- [0103] Guy CL (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 187-223
- [0104] Hirofumi Nakagami, Andrea Pitzschke and Heribert Hirt (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends in Plant Science* 10: 339-346
- [0105] Jianhua Zhu, Chun-Hai Dong, Jian-Kang Zhu (2007) Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. *Plant Biol.* 10: 290-295
- [0106] Joel A. Kreps, Yajun Wu, Hur-Song Chang, Tong Zhu, Xun Wang, and Jeff F. Harper (2002) Transcriptome Changes for Arabidopsis in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant physiol* 130: 2129-2141
- [0107] Kazuko Yamaguchi-Shinozaki and Kazuo Shinozaki (2006) Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold. *Annual Review of Plant Biology* 57: 781-803
- [0108] Kazuo Shinozaki, Kazuko Yamahuchi-Shinozaki and Motoaki Seki (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Science Direct* 6: 410-417
- [0109] Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17: 287-91
- [0110] Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF (2002) Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol* 130: 2129-41
- [0111] Leila Heidarvand, Reza Maali Amiri (2010) What happens in plant molecular responses to cold stress? *Springerlink* 32: 419-431
- [0112] Liming Xiong, Karen S. Schumaker and Jian-Kang Zhu (2002) Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress *The Plant Cell*, 14: S165-S183
- [0113] Min Seok Bae, Eun Ju Cho, Eun-Young Choi and Ohkmae K.Park (2003) Analysis of the Arabidopsis nuclear proteome and its response to cold stress. *The Plant Journal* 36: 652-663
- [0114] Motoaki Seki, Mari Narusaka, Junko Ishida, Tokihiko Nanjo, Miki Fujita, Youko Oono, Asako Kamiya, Maiko Nakajima, Akiko Enju, Tetsuya Sakurai, Masakazu Satou, Kenji Akiyama, Teruaki Taji, Kazuko Yamaguchi Shinozaki, Piero Carninci, Jun Kawai, Yaoshihide hayashizaki and Kazuo Shinozaki (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31(3): 279-292
- [0115] Min Chul Kim, WooSik Chung, Dae-Jin Yun and Moo Je Cho (2009) Calcium and Calmodulin-Mediated Regulation of Gene Expression in Plants. *Molecular Plant* 2: 13-21

- [0116] Neeti Sanan Mishra, Renu Tuteja, Narendra Tuteja (2006) Signaling through MAPkinases networks in plants. Archives of Biochemistry and Biophysics 452 : 55-68
- [0117] Rebecca Schwab, Stephan Ossowski, Markus Riester, Norman Warthmann and Detlef Weigel (2006) Highly Specific Gene Silencing by Artificial MicroRNAs in Arabidopsis. The Plant Cell 18: 1121-1133
- [0118] Roman Ulm, Kazuya Ichimura, Tsuyoshi Mizoguchi, Scott C. Peck, Tong Zhu, Xun Wang, Kazuo Shinozaki and Jerzy Paszkowski (2002) Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by Arabidopsis MAP kinase phosphatase. The EMBO Journal 21: 6483 - 6493
- [0119] Sargent TD (1987) Isolation of differentially expressed genes. Methods Enzymol 152: 423-32
- [0120] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Curr Opin Plant Biol 3: 217-23
- [0121] Shuqun Zhang and Daniel F Klessig (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. Trends in Plant Science 6: 520-527
- [0122] Teige M, Scheikl E, Eulgem T, DR, Ichimura K, Shinozaki K, Dangel JL, Hirt H. (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. Mol Cell 15(1): 141-52
- [0123] Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbig J, Muller LA, Rhee SY, Stitt M. (2004). MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. Plant J 37: 914-939.
- [0124] Thomashow MF (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. Plant Physiol 118: 1-8
- [0125] Tsuyoshi Mizoguchi, Kazuya Ichimura and Kazuo Shinozaki (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases . Trends in Biotechnology 15:15-19
- [0126] Viswanathan Chinnusamy, Jianhua Zhu and Jian-Kang Zhu (2007) Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends in Plant Science 12: 1360-1385
- [0127] Vaka S. Reddy, Gul S. Ali and A. S. N. Reddy (2002) Genes Encoding Calmodulin-binding Proteins in the Arabidopsis Genome. JBC 277: 9840-9852
- [0128] Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1-14
- [0129] Xin Z. and Browse J. (2000). Cold comfort farm: the acclimation of plants of freezing temperature. Plant, Cell and Environment. 23: 893-902
- [0130] Zhanguo Xin and John Browse (1998) eskimo1 mutants of Arabidopsis are constitutively freezing-tolerant .PNAS 95: 7799-7804
- [0131] Zhang JZ, Creelman RA, Zhu JK (2004) From laboratory to field. Using information from Arabidopsis to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. Plant Physiol 135: 615-21
- [0132] Zhu JK (2001) Cell signaling under salt, water and cold stresses. Curr Opin Plant Biol 4: 401-6

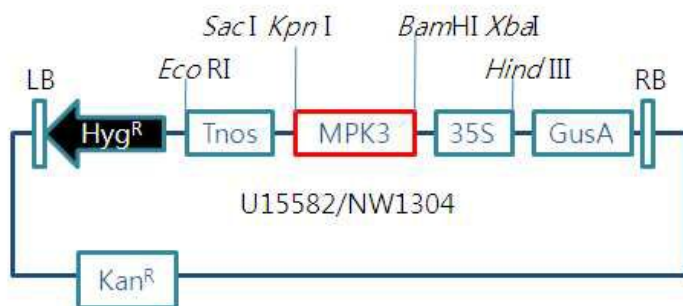
도면

도면1



도면2

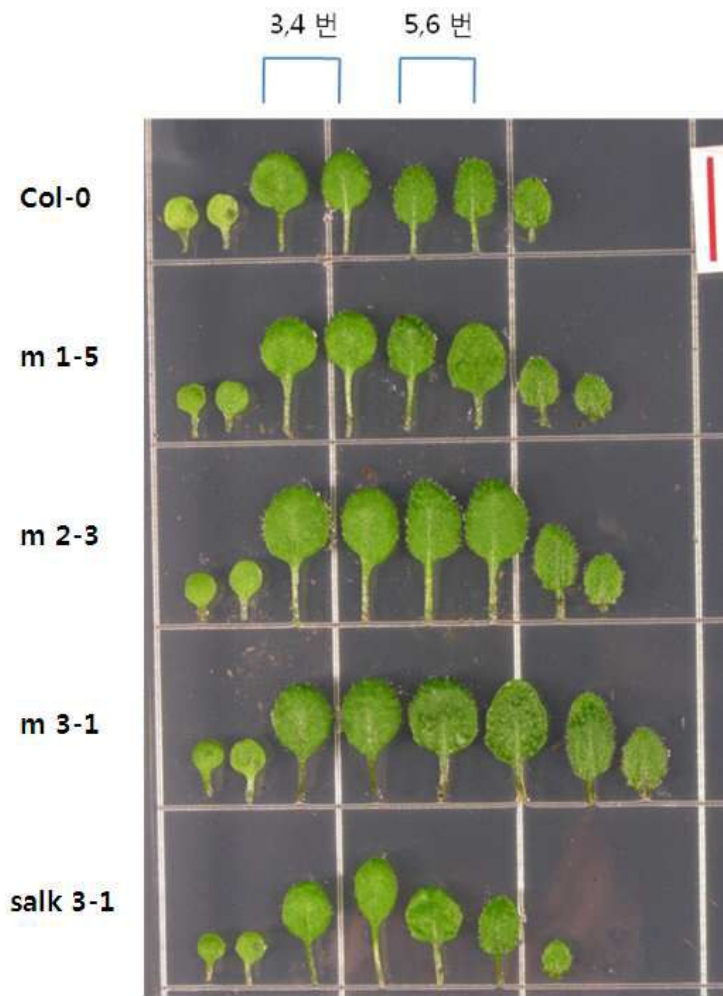
a



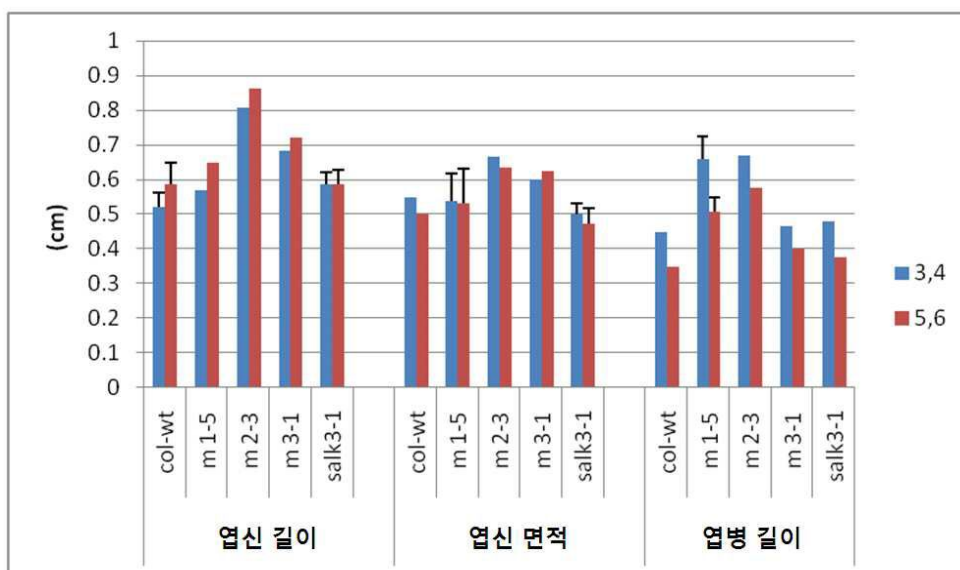
b



도면3a

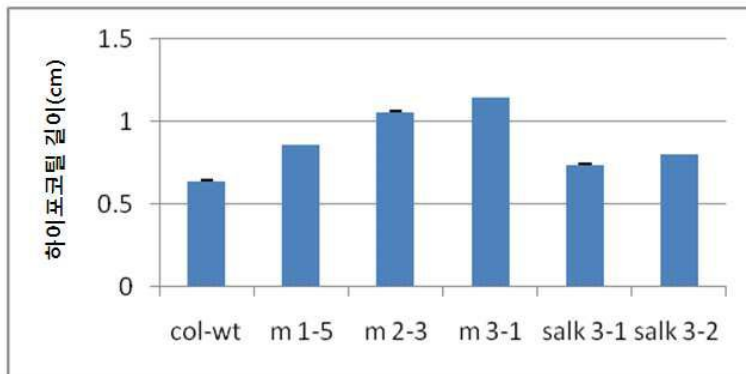


도면3b

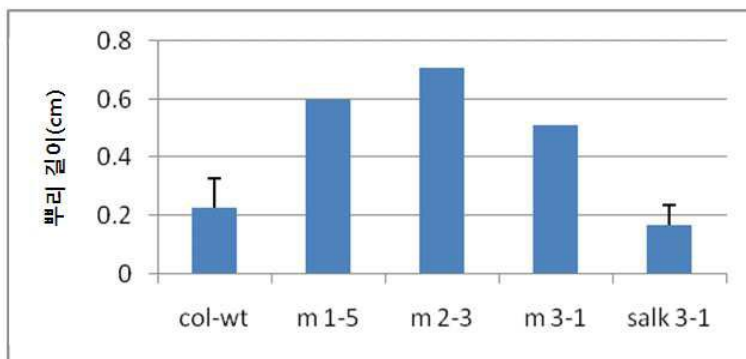


도면4

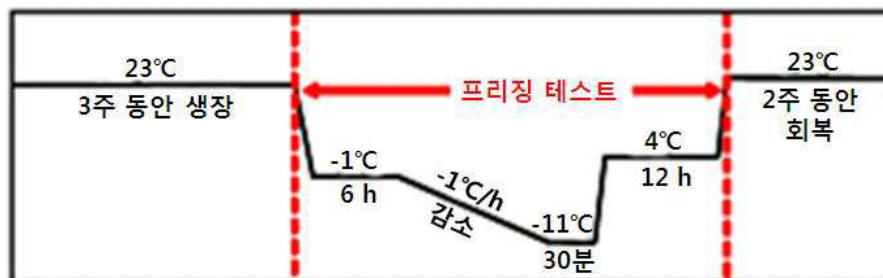
a



b

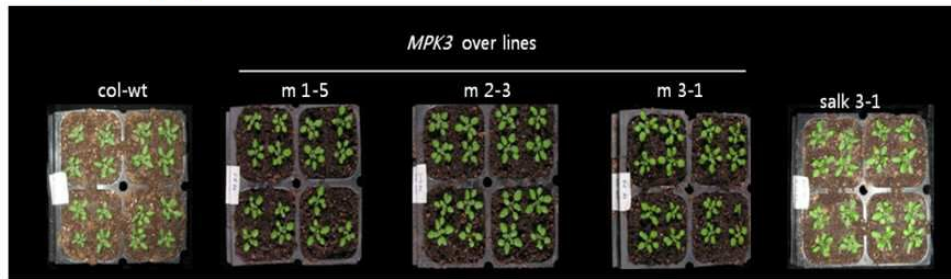


도면5a

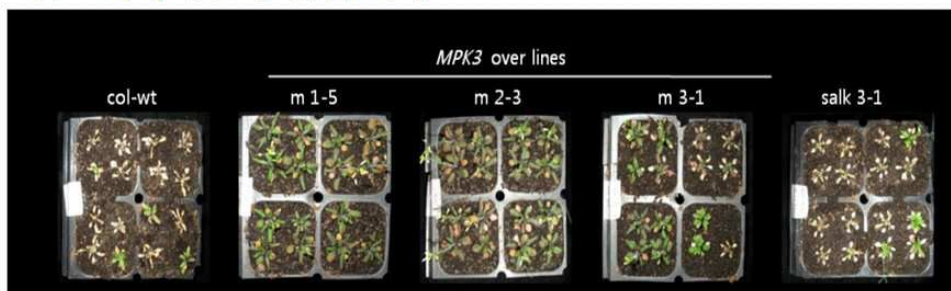


도면5b

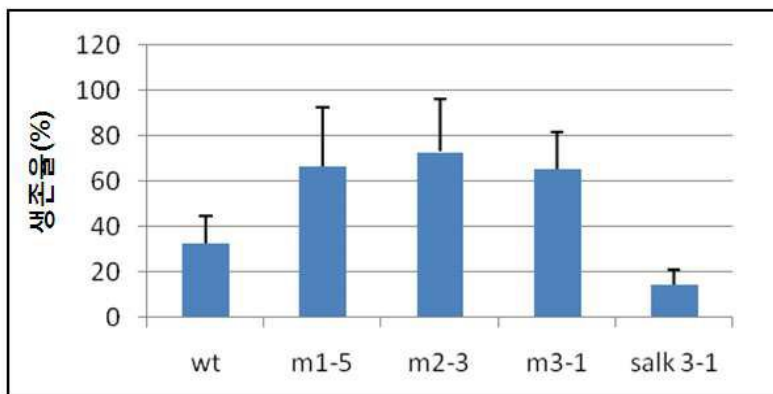
콜드 처리 전



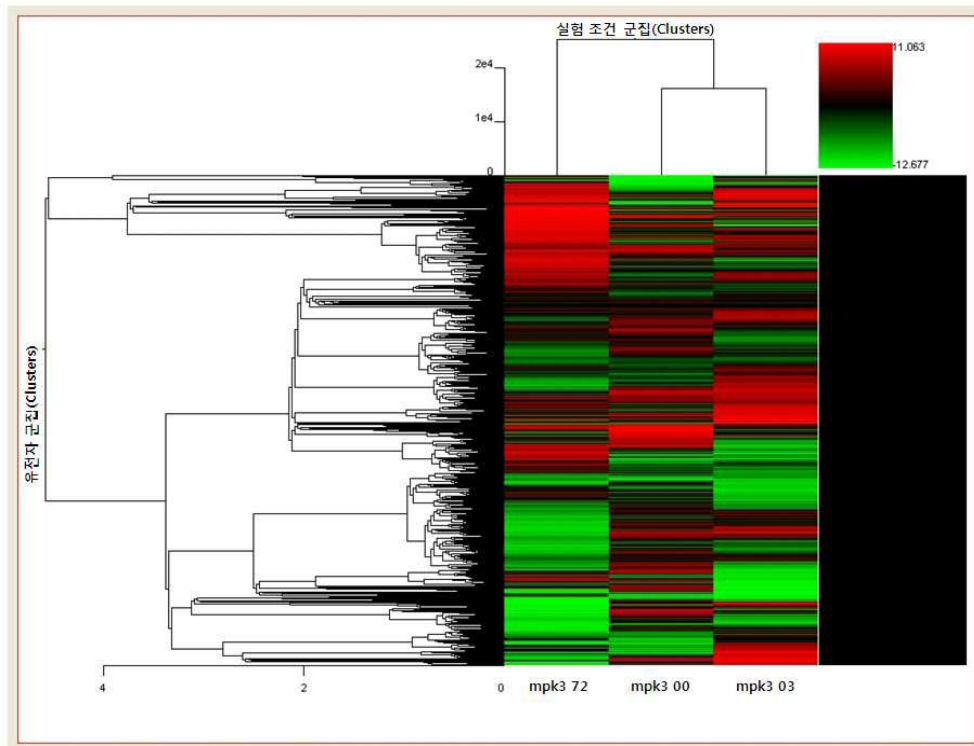
콜드 처리 후, 2주 동안 회복



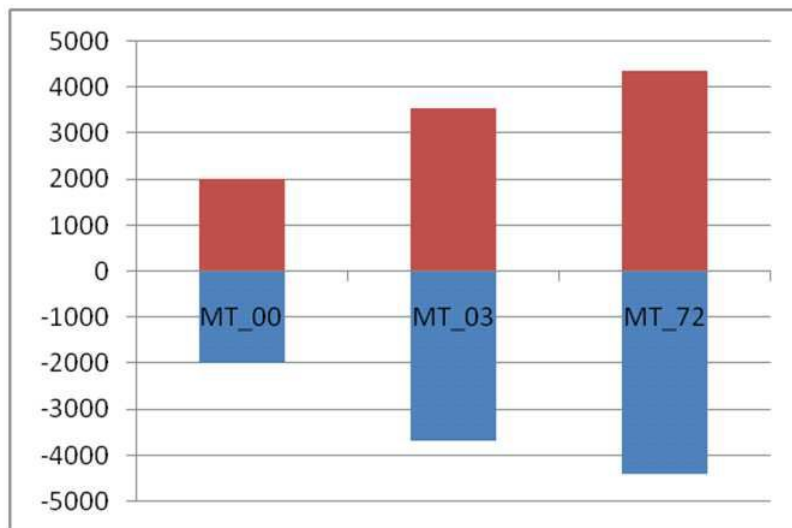
도면5c



도면6

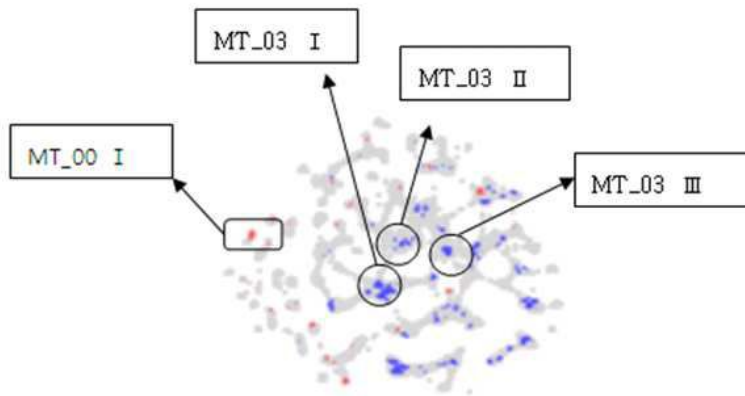


도면7

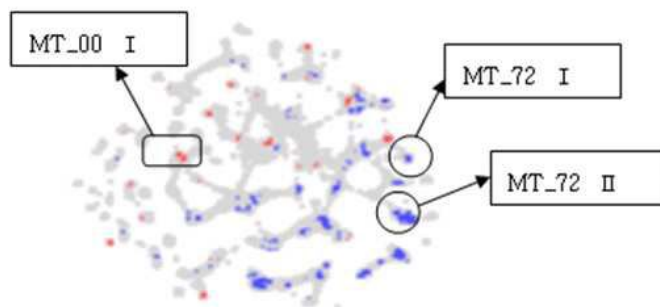


도면8

a



b



서열 목록

<110>	Ewha Womens University	
<120>	Genes Implicated in Enhancement of Cold or Freezing Tolerance and Transgenic Plants Using the Same	
<130>	PN100017	
<160>	2	
<170>	Kopatent In 1.71	
<210>	1	
<211>	1110	
<212>	DNA	
<213>	Arabidopsis thaliana	
<400>	1	
	atgaacaccg gcggtggcca atacacggat ttccggcgg tggaaactca cggaggacag	60
	ttcataagtt acgatatctt cggtagttta ttcgagatca catctaagta tcgtcctccg	120
	attataccaa ttggtcgtgg agcttatgga atcgtttgct ctgtgttgga tacggagacg	180

aacgagctag tagcgatgaa gaagatagct aatgcttttg ataatacatat ggatgctaag 240
 cgtacgcttc gtgagatcaa gcttcttcgt catcttgatc atgaaaacat tatagctata 300
 agagatgttg ttccaccacc actaagaaga cagttcagtg atgtttatat ctctactgaa 360
 ttaatggata ctgatcttca tcaaatac atgacttaacc agagttttatc agaagaacac 420
 tgtcagtact tcttgtagca gctacttcga ggactgaagt atatccactc agctaacatt 480
 attcataggg atttaaagcc gagcaatctt ctgttgaacg cgaattgcga tttaaagatt 540
 tgtgatttcg gtcttgctag acctacttca gagaatgatt ttaigactga gtatgttgtt 600

acgagatggg atagagcacc tgagcttctg ttgaactctt cagattacac agctgctatt 660
 gatgtttggg ctgttggttg tatctttatg gagcttatga atagaaagcc ttgttccct 720
 ggtaaagacc atgttcatca aatgcgctta ttgacagagt tgcttggcac accgacagaa 780
 tctgatctcg gttttactca caatgaggat gcgaaaagat acatccggca acttcccaac 840
 ttcccacgtc agcccttagc taaacttttc tctcatgtta acccaatggc cattgatctt 900
 gttgacagaa tgttgacgtt tgaccccaac agaagaatca ctgttgaaca agctctgaat 960
 caccagtacc ttgctaaatt gcacgaccgc aatgatgagc caatctgtca aaagccattc 1020

tcttttgagt tcgaacaaca gcctctggat gaggaacaga taaaagagat gatctacaa 1080
 gaagccatag cactcaatcc aacatacggg 1110

<210> 2

<211> 370

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Asn Thr Gly Gly Gly Gln Tyr Thr Asp Phe Pro Ala Val Glu Thr

1 5 10 15

His Gly Gly Gln Phe Ile Ser Tyr Asp Ile Phe Gly Ser Leu Phe Glu

20 25 30

Ile Thr Ser Lys Tyr Arg Pro Pro Ile Ile Pro Ile Gly Arg Gly Ala

35 40 45

Tyr Gly Ile Val Cys Ser Val Leu Asp Thr Glu Thr Asn Glu Leu Val

50 55 60

Ala Met Lys Lys Ile Ala Asn Ala Phe Asp Asn His Met Asp Ala Lys

65 70 75 80

Arg Thr Leu Arg Glu Ile Lys Leu Leu Arg His Leu Asp His Glu Asn

85	90	95	
Ile Ile Ala Ile Arg Asp Val Val Pro Pro Pro Leu Arg Arg Gln Phe			
100	105	110	
Ser Asp Val Tyr Ile Ser Thr Glu Leu Met Asp Thr Asp Leu His Gln			
115	120	125	
Ile Ile Arg Ser Asn Gln Ser Leu Ser Glu Glu His Cys Gln Tyr Phe			
130	135	140	
Leu Tyr Gln Leu Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala Asn Ile			
145	150	155	160
Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Leu Leu Asn Ala Asn Cys			
165	170	175	
Asp Leu Lys Ile Cys Asp Phe Gly Leu Ala Arg Pro Thr Ser Glu Asn			
180	185	190	
Asp Phe Met Thr Glu Tyr Val Val Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu			
195	200	205	
Leu Leu Leu Asn Ser Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Ile Asp Val Trp Ser			
210	215	220	
Val Gly Cys Ile Phe Met Glu Leu Met Asn Arg Lys Pro Leu Phe Pro			
225	230	235	240
Gly Lys Asp His Val His Gln Met Arg Leu Leu Thr Glu Leu Leu Gly			
245	250	255	
Thr Pro Thr Glu Ser Asp Leu Gly Phe Thr His Asn Glu Asp Ala Lys			
260	265	270	
Arg Tyr Ile Arg Gln Leu Pro Asn Phe Pro Arg Gln Pro Leu Ala Lys			
275	280	285	
Leu Phe Ser His Val Asn Pro Met Ala Ile Asp Leu Val Asp Arg Met			
290	295	300	
Leu Thr Phe Asp Pro Asn Arg Arg Ile Thr Val Glu Gln Ala Leu Asn			
305	310	315	320
His Gln Tyr Leu Ala Lys Leu His Asp Pro Asn Asp Glu Pro Ile Cys			
325	330	335	

Gln Lys Pro Phe Ser Phe Glu Phe Glu Gln Gln Pro Leu Asp Glu Glu
 340 345 350
 Gln Ile Lys Glu Met Ile Tyr Gln Glu Ala Ile Ala Leu Asn Pro Thr
 355 360 365
 Tyr Gly
 370