(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0055661
(43) 공개일자 2014년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0122825
(22) 출원일자 2012년11월01일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이호정
서울 광진구 용마산로36길 70, 401호 (중곡동, 엘림빌라)
현우영
경기 과천시 관악산길 2, 1026동 101호 (중앙동, 주공아파트)
(74) 대리인
김순웅

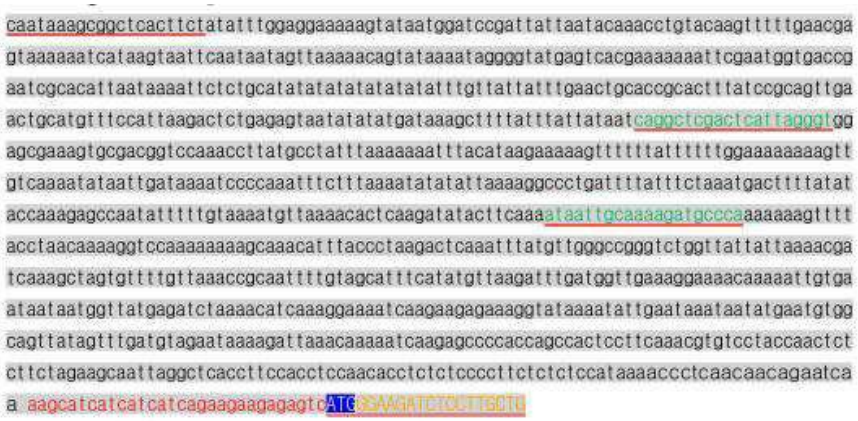
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **종자 특이적 발현 프로모터**

(57) 요 약

본 발명은 종자 특이적 발현을 특징으로 하는 MYB7 유전자 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 종자 특이적 재조합 발현 벡터 및 이를 이용하여 목적 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의하면, 목적 단백질 유전자를 종자 특이적으로 유도함으로써 식물 생육에 영향을 주지 않고, 그 발현을 종자에 국한시키는 효과가 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	112068031SB010
부처명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	[주관] 폴리페놀 대사조절 유채품종 개발을 통한 유채유 항산화능 향상에 관한 연구
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.08.08 ~ 2013.08.07

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터를 포함하는 식물체의 종자 특이적 재조합 발현 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물체의 종자 특이적 재조합 발현 벡터.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 종자 특이적 재조합 발현 벡터로 형질전환된 식물체.

청구항 5

1) AtMYB7 유전자 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및

2) 상기 형질전환된 식물체 종자 내에서 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 종자 특이적 발현 프로모터에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 애기장대의 종자 발아에 관여하는 MYB7 유전자의 프로모터로서 종자 특이적 발현을 특징으로 하는 MYB7 유전자 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 종자 특이적 재조합 발현 벡터 및 이를 이용하여 목적 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 프로모터는 전사조절인자들이 결합하는 모든 DNA 염기서열부위를 말하여, 일반적으로 전사를 조절할 대상이 되는 유전자의 유전정보를 지니고 있는 DNA 염기서열 앞 부분에 위치한다. 진핵생물에서는 전사조절인자(transcription factor)라고 하는 단백질들이 프로모터 부분에 결합함으로써 RNA 중합효소를 이곳으로 이끌고 오는 일에 관여한다. 프로모터는 이러한 전사조절인자들이 결합하는 모든 DNA 염기서열부위를 지칭한다고도 할 수 있다. 그에 비해 원핵생물에서의 프로모터는 대개 RNA 중합효소가 결합하는 전사시작지점(Transcription Start Site) 바로 근처의 결합부위로 정의된다.

[0003] 최근에 유전 공학 기술을 이용하여 식물의 형질을 개량시키고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 과정에서 외래의 유용 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키고자 할 때 유전자 발현에 관여하는 프로모터가 요구된다. 이를 위해 종래에는 식물체의 전 조직에서 발현이 유도되는 꽃양배추 모자이크 바이러스 (cauliflower mosaic virus; CaMV35S) 유전자 유래의 프로모터가 널리 사용되어졌다. 그러나, 이 프로모터는 종자의 특정 조직에만 발현을 조절할 수 없는 단점이 있다. 또한 종자 (Plant Cell Technology, 1991, 3: 568-576), 잎과 꽃 (Science, 1990, 250: 931-936), 괴경 (Plant Cell Technology, 1991, 3: 577-587) 등의 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터가 보고되어 졌다. 그러나, 상기 종자 특이적 발현 프로모터도 그 발현 시기가 종자의 전 발달 단계에 주로 발현되는 것으로서 이는 종자의 특정 발달 시기에만 특이적으로 발현을 조절할 수 없는 단점이 있다.

[0004] 식물 조직 특이적 또는 기관 특이적 발현에 관여하는 것으로 보고된 프로모터로는, 대한민국 공개특허공보 제

2001-41129호의 옥수수 화분 특이 프로모터인 ZmC5 유전자의 프로모터가 있으며, 대한민국 공개특허공보 제 2001-66718호의 식물 공변세포 특이적 유전자 발현성을 갖는 아라비돕시스에서 분리된 트레할레이즈 유전자의 프로모터가 있으며, 대한민국 공개특허공보 제 2001-106119호의 벼의 꽃밥 및 화분 특이성을 갖는 카타라제 A(CatA) 유전자의 프로모터가 있으며, 대한민국 공개특허공보 제2002-57950호의 아마 종자 특이성을 갖는 올레오신 유전자의 프로모터 및 레구민-유사 종자 저장 단백질의 프로모터가 있으며, 대한민국 공개특허공보 제 2002-93028호의 수박의 종피 특이성을 갖는 Cv20oxP 프로모터가 있으며, 대한민국 공개특허공보 제 2004-41483호의 참깨에서 유래된 식물체 종자 특이성을 갖는 마이크로좀 올레산 불포화제 유전자의 프로모터가 있으며, 대한민국 공개특허공보 제2012-0055913호의 유채 유래 종자 특이 발현 프로모터가 있다. 그러나, 현재 기관 특이적인 특성을 갖는 식물에서 분리된 프로모터에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다.

[0005] 한편, 식물에서 많은 종류의 MYB 단백질들은 염기 특이적인 DNA 결합(binding)을 통해서 특정 유전자들의 발현을 조절하여 대사과정 및 발육 과정의 전사 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 애기장대에는 약 125종이 알려져 있다.

[0006] 본 발명자들은 대한민국 특허등록 제10-1093243호에 애기장대의 공변세포에 특이적인 AtMYB60 프로모터를 사용하여 형질 전환된 식물체에서 목적 단백질을 생산하는 방법 및 상기 방법에 의해 생산된 목적 단백질에 관한 개시한 바 있다. 또한, 대한민국 공개특허 제2012-0097555호는 애기장대 유래 MYB52 유전자로 식물체를 형질전환시킴으로써 식물의 가뭄 내성 및 ABA에 대한 민감성을 조절하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 가뭄 내성 및 ABA에 대한 민감성이 조절된 식물체 및 그의 종자에 관해 기재되어 있다.

[0007] 현재 형질전환 식물에서 외래 유전자의 발현을 종자에만 국한하고자 할 경우 다른 조직에는 발현이 되지 않는 새로운 프로모터에 대한 요구가 계속해서 있으며, 애기장대 MYB7 프로모터의 종자 특이적 발현에 대해 알려진 바는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록 제10-1093243(2011.12.14)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2012-0097555호(2012.09.05)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 외래 유용 단백질 및 물질을 식물 종자 내에서 생성하거나 축적시킴으로써 식물 종자 성분을 변경하고자 할 때 사용가능한 신규한 종자 특이적 발현 MYB7 유전자 프로모터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은, 상기 프로모터를 포함하는 종자 특이적 재조합 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 발현벡터로 형질전환된 식물체 및 상기 식물체를 이용하여 목적단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 제공한다.

[0014] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 식물체의 종자 특이적 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물체의 종자 특이적 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 종자 특이적 재조합 발현 벡터로 형질전환된 식물세포 및 식물체를 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 1) AtMYB7 유전자 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 2) 상기 형질전환된 식물체 종자 내에서 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법을 제공한다.

[0018] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

[0019] 본 발명자들은 애기장대로부터 유래된 MYB7 유전자가 종자 발달 단계 특이적으로 발현되는 것에 착안하여 그의 게놈유전자 및 프로모터를 클로닝한 후, 프로모터를 바이너리(binary) 벡터 및 트랜션트(transient) 발현벡터에 삽입하여 모델 식물체인 애기장대 종자에 도입한 결과, MYB7 유전자의 프로모터는 외래 도입 유전자를 종자 발달 단계 특이적으로 발현시키는 신규 프로모터임을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[0020] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 제공한다.

[0021] 본 발명의 종자 특이적 프로모터는 상기 서열번호 1의 염기서열뿐만 아니라 상기 서열번호 1의 염기서열의 일부 염기가 치환, 결실 또는 부가된 변형서열로서 종자 특이적 프로모터 활성을 나타내는 염기서열을 포함한다.

[0022] 본 발명에 의한 프로모터는 종자 발아에 관여하는 애기장대 MYB7 유전자(At2g16720)의 전사에 관여하는 프로모터이다. 도 1 및 도 2는 MYB 유전자의 종류 및 분류가 나타나 있다.

[0023] 본 발명에 있어, '프로모터(promoter)'란, 일반적으로 전사를 개시하는 지점을 포함하는 암호화 부위의 상류 쪽에 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 있으며, 바람직하게 본 발명에 따른 프로모터는 애기장대의 종자에서 특이적으로 발현하는 MYB7 유전자 프로모터이다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 식물체의 종자 특이적 재조합 발현 벡터를 제공한다. 바람직하게 본 발명은 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물체의 종자 특이적 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0025] 본 발명에 있어, '발현 벡터'란 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 식물체의 종자 발현 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어, '작동 가능하게 연결(operably linked)' 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란, 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0027] 상기 본 발명에 따른 발현 벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 AtMYB7 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입함으로써 제조할 수 있다. 따라서 본 발명에 사용될 수 있는 벡터로 다양한 클로닝 부위를 가지고 있는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 Ti 플라스미드 등의 플라스미드가 있고, 식물 바이러

스 벡터가 있으며, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라면 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 pMDC162 벡터를 이용하여 MYB7 pro::GUS 벡터를 제조하였다.

[0028] 본 발명에 있어서, '목적 단백질'이란 본 발명의 프로모터에 의해 식물체에 특이적으로 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 단백질을 말하며, 바람직하게는 외인성 단백질이거나 또는 내인성 단백질 및 리포터 단백질일 수 있다. 상기 외인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연적으로 존재하지 않는 단백질을 말하며, 상기 내인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연적으로 존재하는 유전자에 의해 발현된 단백질을 말한다. 또한, 상기 리포터 단백질은 리포터 유전자에 의해 발현된 단백질로서 그 존재에 의해서 세포 내에서의 그의 활성을 알려주는 표지 단백질을 말한다. 본 발명의 일 실시예에서는 청색 발색 유전자인 GUS가 연결된 형태의 리포터 시스템이 내재되어 있는 pMDC162 벡터에 본 발명의 애기장대 AtMAB7 프로모터를 GUS 유전자의 상류부분에 작동가능하게 연결한 재조합 발현 벡터를 제조하였다.

[0029] 본 발명의 종자 특이적 프로모터의 전사활성에 의하여 발현되는 목적 단백질 유전자의 예로는, 형질전환 대상 식물체가 유채, 들깨 및 참깨 등의 유지작물인 경우 지방산 생합성 및 조절 관련 유전자 등을 들 수 있고, 단백질의 생성 및 축적량이 다른 식물에 비해 상대적으로 높은 콩 및 알팔파 등의 두과식물인 경우 경제적으로 부가가치가 높은 항체 유전자 등을 들 수 있고 사료작물로 대표적인 옥수수의 경우 돼지 설사병, 구제역 바이러스 등의 경구 백신(edible vaccine) 유전자 등을 들 수 있고, 종자로 장기간 보관, 유통되는 대부분의 작물의 경우 수확 후 저장성을 높이도록 각종 병 저항성에 관련된 유전자 등을 들 수 있으며, 그 외에도 토코페롤, 베타카로틴 등과 같이 특정 영양 성분을 작물의 종자에서 강화하려는 경우에는 관련 물질대사경로의 생합성 유전자 등을 들 수 있으나, 여기에 한정되지 않고, 본 발명의 종자 특이적 프로모터를 사용하여 조절될 수 있는 각종 목적 단백질을 코딩하는 유전자들이 포함될 수 있다.

[0030] 그러므로 본 발명의 프로모터를 이용한다면 식물체의 종자 등을 섭취하는 작물의 경우, 유용한 목적 단백질을 식물체의 종자에서 발현시킴으로써 종자와 함께 목적 단백질을 함께 섭취할 수 있는 작물을 개발할 수 있다. 또는, 식물체 내에서 생산된 목적 단백질을 당업계에 알려진 적절한 방법에 따라 추출하여 사용할 수도 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 종자 특이적 재조합 발현 벡터로 형질전환된 식물세포 및 식물체를 제공한다. 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현 벡터는 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 식물 세포내로 도입할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터를 식물 세포내로 도입하는 방법으로는, 제한 없이 당해 공지된 방법이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 염화칼슘($CaCl_2$) 및 열 쇼크(heat shock) 방법, 입자 총 충격법(particgunbombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공(electroporation) 및 PEG(Polyethylenglycol)에 의한 침전법 등과 같은 방법들이 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 AtMYB7 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 종자에 특이적으로 발현시키는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0033] 본 발명은 또한, 1) AtMYB7 유전자 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 2) 상기 형질전환된 식물체 종자 내에서 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명에서 상기 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물일 수 있으며, 상기 쌍자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 샐러리 및 유채일 수 있고, 상기 단자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 벼,보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파일 수 있다.

[0035] 본 발명의 바람직한 일 양태로서, 상기와 같은 방법으로 발현 벡터가 도입된 식물체 내에 목적 단백질을 생산하기 위한 조건으로 식물 호르몬 등 화학적/물리적 스트레스가 AtMYB7 프로모터에 미치는 영향을 확인하기 위해, 각각의 식물 호르몬 등을 처리하여 프로모터의 발현 양상을 확인하였다. 본 발명에서 화학적/물리적 스트레스에는 앱시스산 (ABA), 생장조절 호르몬(IAA, 인돌아세트산, 옥신), 저온, 마니톨, 염분 등이 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0036] 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명에 의한 종자 특이적 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터로 형질전환된 식물체는 유전공학적 방법으로 변경된 단백질 또는 외래 유용 유전자 도입에 의한 단백질 등과 같은 목적 단백질 유전자를 종자 특이적으로 유도함으로써 식물 생육에 영향을 주지 않고, 그 발현을 종자에 국한하는 효과가 있다.

[0037] 또한, 본 발명에 의한 프로모터에 GUS 유전자가 붙은 벡터를 식물에 형질전환하여 식물이 받는 환경 스트레스에 대한 표지 식물종자로 이용이 가능하며, 또한 본 발명에 의한 프로모터는 애기장대의 종자 발아에 관여하는 MYB7 유전자의 프로모터로서 이를 이용한 식물체의 형질전환을 통해 환경 스트레스 속에서도 인위적 발아 지연, 혹은 촉진할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1 및 도 2는 MYB 유전자의 종류 및 분류를 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 3은 본 발명에 의한 MYB7 프로모터의 염기서열을 나타내는 도면이다.

도 4는 본 발명에 의한 MYB7 GUS 벡터 구조를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 5a 및 도 5b는 본 발명에 의한 애기장대 식물체 발현벡터 MYB7 pro::GUS로 형질전환된 애기장대의 종자 성숙 과정 중 침윤시간에 따른 GUS 발현양상을 관찰한 결과를 나타낸 사진이다.

도 6은 본 발명에 의한 애기장대 식물체 발현벡터 MYB7 pro::GUS로 형질전환된 애기장대의 종자의 침윤시간에 따른 GUS 발현양상과, 화분 발달 과정 중의 GUS 발현양상을 관찰한 결과를 나타낸 사진이다.

도 7은 본 발명에 의한 애기장대 식물체 발현벡터 MYB7 pro::GUS로 형질전환된 애기장대의 유묘 발달 과정 중 환경 스트레스 및 식물 호르몬 처리에 따른 GUS 발현양상을 관찰한 결과를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 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.

[0040] **실시예 1. 본 발명에 의한 애기장대 MYB7 클로닝(MYB7 cloning)**

[0041] 발아 후 2주일 된 야생형(Wild-type) 애기장대 성체의 gDNA 추출하였다. 이 gDNA을 주형으로 MYB7 1kb 프로모터 양끝 자리 20bp와 같은 서열을 갖는 프라이머(F-CAATAAAGCGGCTCACTTCT(서열번호 2), R-CAGCAAGGAGATCTTCCCAT(서열번호 3))를 이용하여 PCR 하였다. 이때 PCR 조건은 denaturation 95℃ 5분, annealing 57℃ 1분, polymerization 70℃ 1분, 총 35cycle로 진행하였다.

[0042] 그 후 전기영동을 통하여 증폭된 MYB7의 프로모터를 확인하고, 젤에서 용출하였다. 용출된 DNA조각(1kb)을 topo vector(pCR 8/GW/TOPO : invitrogen)에 삽입하고 이를 다시 GUS vector인 pMDC162 vector에 LR reaction(LR Clonase : invitrogen)하였다. 이후 E.coli cell(TOP10 cell : invitrogen)에 heat-shock transformation 방법으로 형질전환한 후 colony가 생성될 때까지 배양하였다(37도, 12시간). 이후 생성된 colony를 다시 LB 배지에 다시 배양 후 플라스미드 벡터(plasmid vector)를 추출하였다.

[0043] **실시예 2. 식물에 MYB7 형질전환**

[0044] 위와 같이 준비된 MYB7 pro::GUS 벡터를 Agrobacteria에 electric shock transformation방법으로 형질전환한 후 배양하였다. 형질전환된 Agrobacteria를 floral dipping transformation을 통해 준비된 야생형(wild-type) 애기장대에 형질전환하였다. 이후 형질전환된 식물로부터 씨를 수확하고 3세대까지 selfing하여 homologous

line을 확보하였다. 이후 GUS staining solution을 이용하여 씨를 염색하였다.

[0045] **실시예 3. 식물호르몬 등 화학적/물리적 처리에 따른 목적 단백질 발현양상**

[0046] 본 발명에 의한 프로모터를 포함하는 각 벡터의 프로모터 뒤에 GUS 유전자를 삽입하였고, 이를 1.2%-아가 배지에 파종하여 4일간 생육한 애기장대 col-0에 형질전환하였다. 형질전환된 식물을 파종하여 2, 3, 4일간 생육한 뒤 각 10μM ABA, 10μM IAA, 300mM Mannitol, 200mM NaCl, 4℃ 저온에 6시간 동안 스트레스 처리 후 GUS 염색을 진행하였다. 그 결과, 2일째 된 식물에서는 대조군과 비교해 실험군에서 떡잎에 특이적으로 많이 발현되는 것을 확인하였다. 하지만 3일째 식물에서는 대조군과 실험군에서 차이가 없었으며, 4일째 된 식물에서는 대부분 비슷한 양상을 보였지만, NaCl 처리군에서만 떡잎에서 많이 발현되는 것을 관찰할 수 있었다(도 7).

[0047] **실시예 4. 현미경 관찰**

[0048] 애기장대를 GUS 염색한 후 슬라이드 글라스 위에 표본을 만들어 Carl-Zeiss사의 역상 현미경(InvertedMicroscope) (모델명: Axio Observer D1)을 사용하여 200x 혹은 400x로 관찰하였다. 그 결과, MYB7 pro::GUS는 특히 종자에서 가장 뚜렷하게 염색되어 있었고 종자 표피에서는 관찰되지 않았다(도 4).

[0049] **실시예 5. 스트레스 처리와 침윤 시간에 따른 씨의 GUS 발현 양상**

[0050] MYB7 pro::GUS로 형질전환한 애기장대를 2% MS 아가 배지에 심은 후 1주일 후에 흙으로 옮겨 심고 꽃이 핀 후 1, 3일 후의 화분과, 수정 후 각 3, 6, 9, 12일 경과된 꼬투리를 잘라 씨를 GUS 염색한 실시예 4와 같은 방법으로 현미경을 이용하여 관찰하였다(도 5a ~ 도 6). 또한 건조한 씨를 6, 12, 24, 48, 72, 96시간 침윤 후 껍질을 제거하고 GUS의 발현 양상을 확인하였고, 10 μM ABA, 200mM NaCl을 24, 48, 72, 96시간 처리하여 껍질을 제거 후 GUS의 발현 양상을 관찰하였다.(도 5a ~ 도 6)

[0051] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1

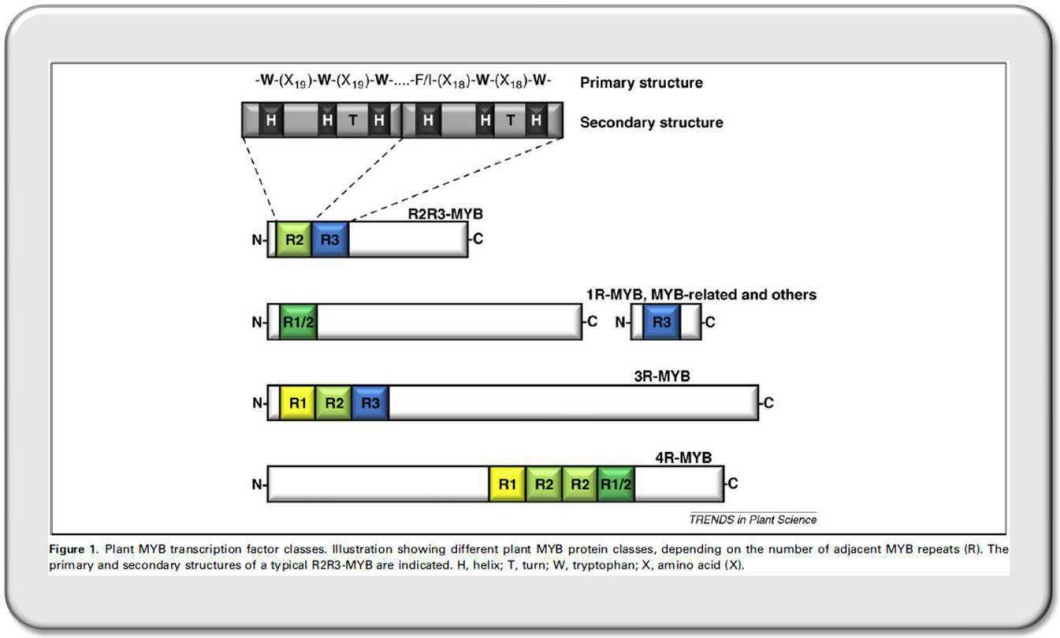
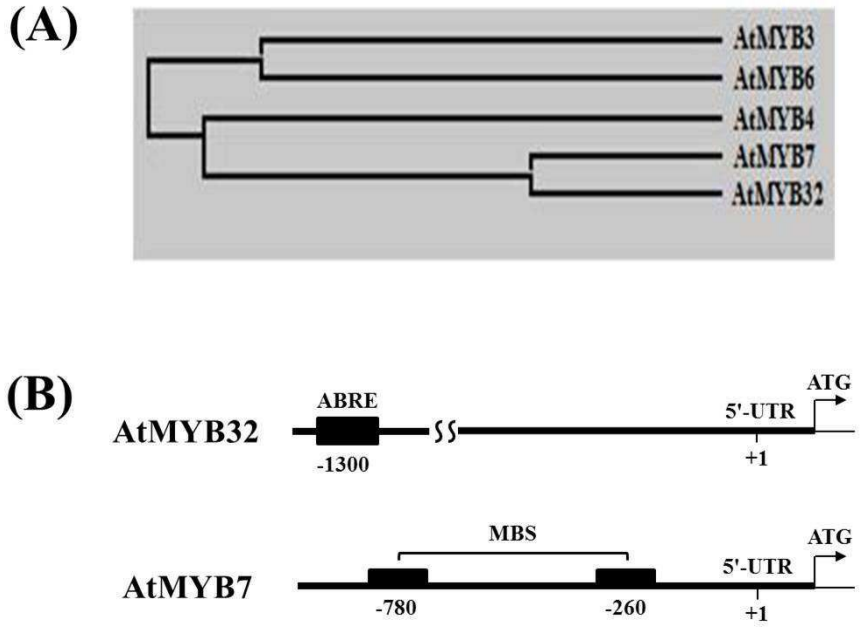
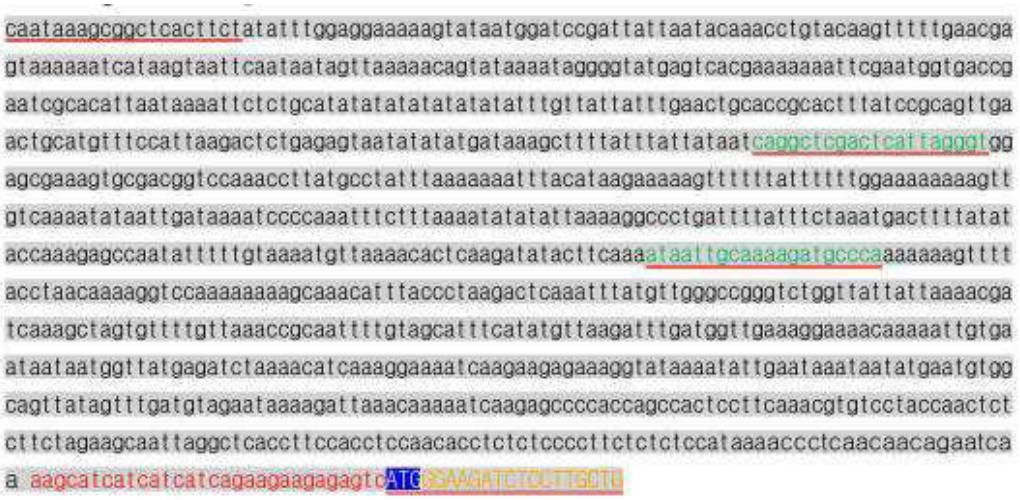


Figure 1. Plant MYB transcription factor classes. Illustration showing different plant MYB protein classes, depending on the number of adjacent MYB repeats (R). The primary and secondary structures of a typical R2R3-MYB are indicated. H, helix; T, turn; W, tryptophan; X, amino acid (X).

도면2

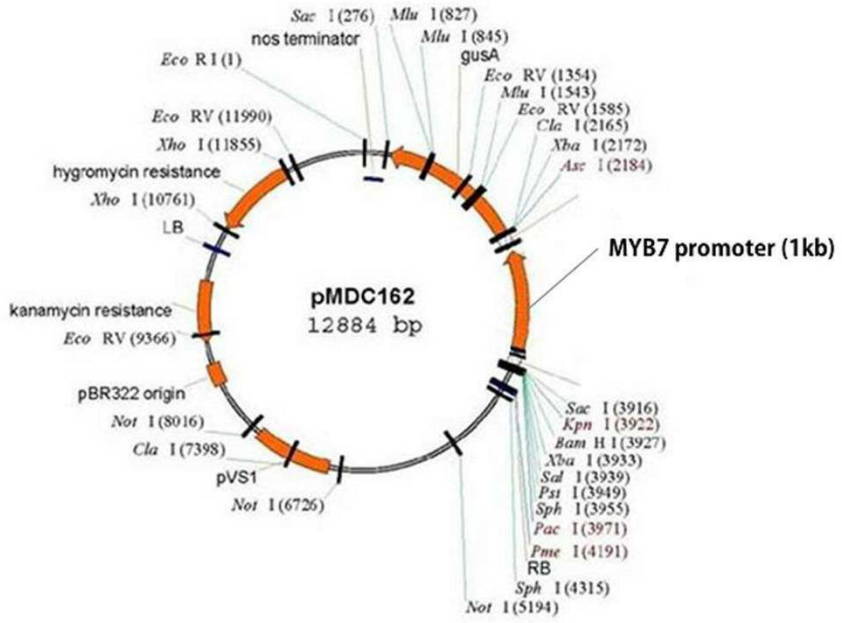


도면3

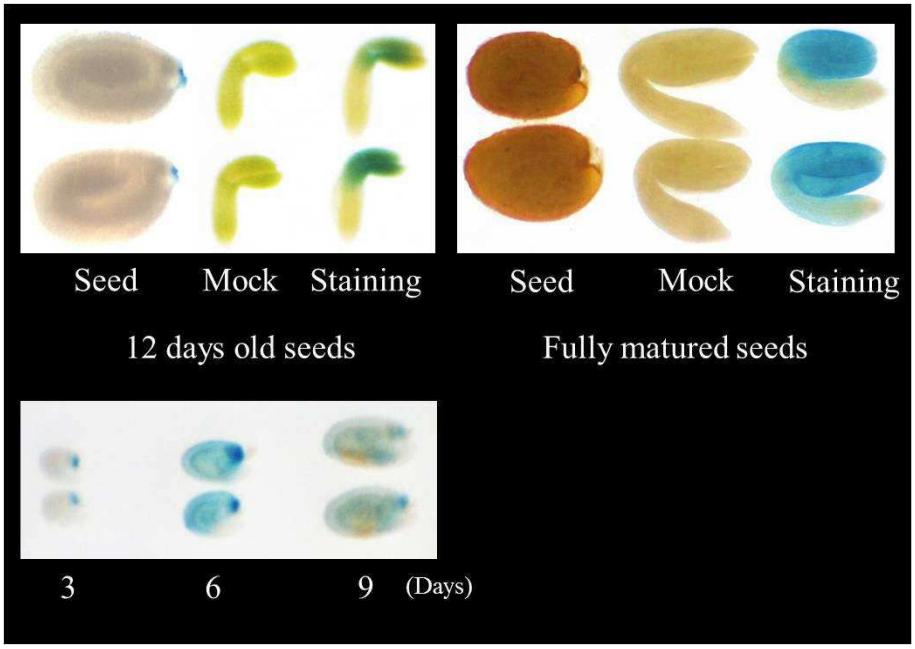


도면4

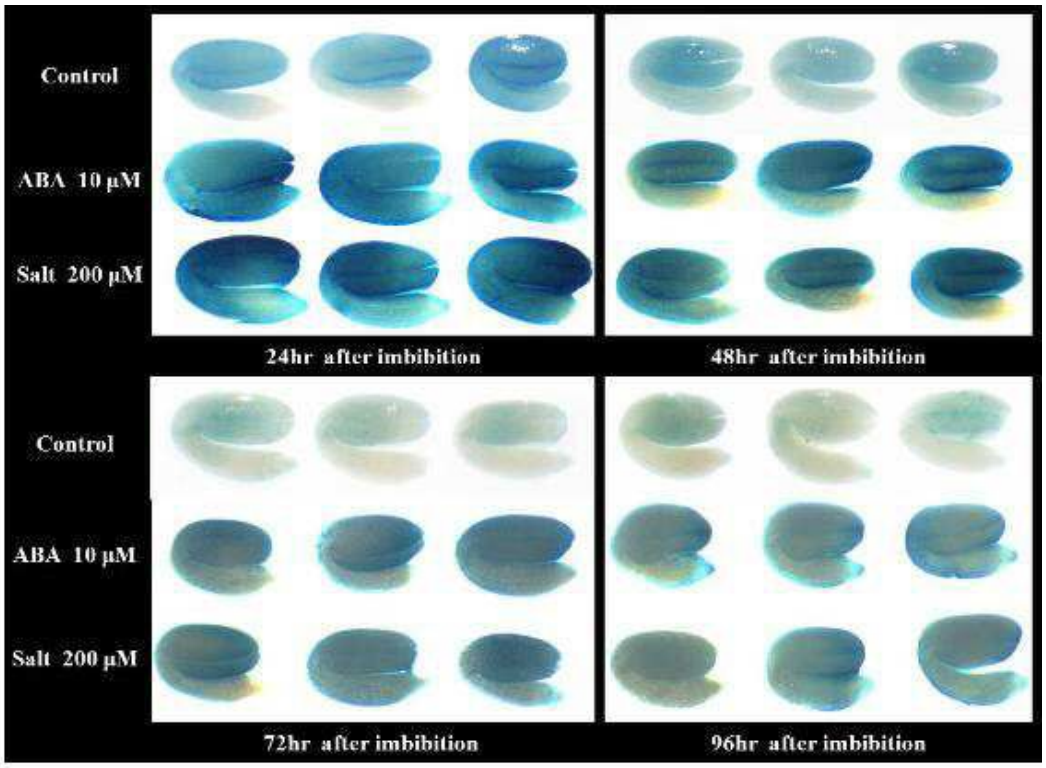
- MYB7 GUS vector structure



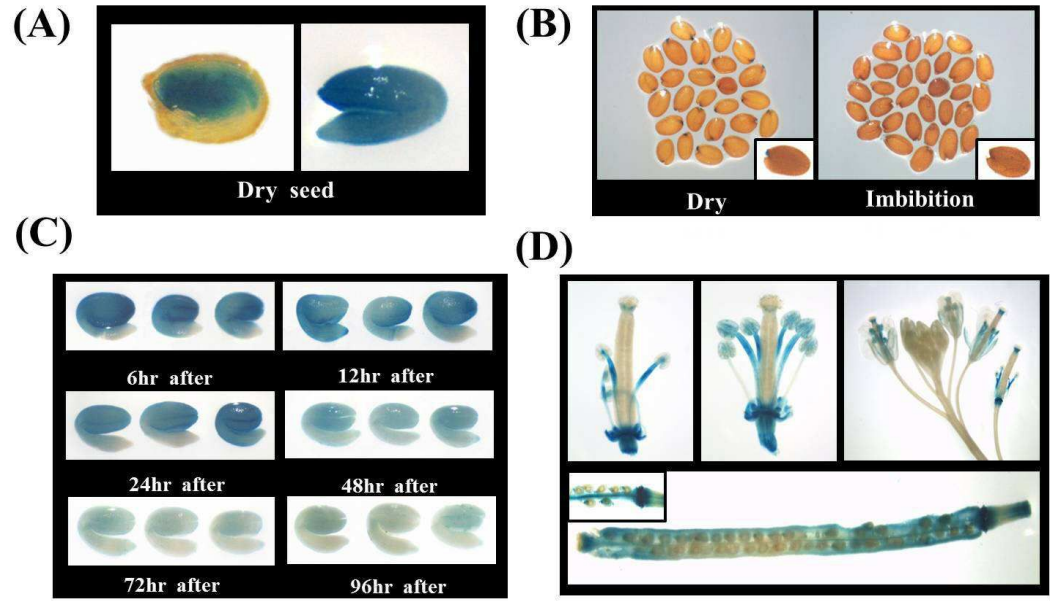
도면5a


Seed
Mock
Staining
Seed
Mock
Staining
12 days old seeds
Fully matured seeds
3
6
9
(Days)

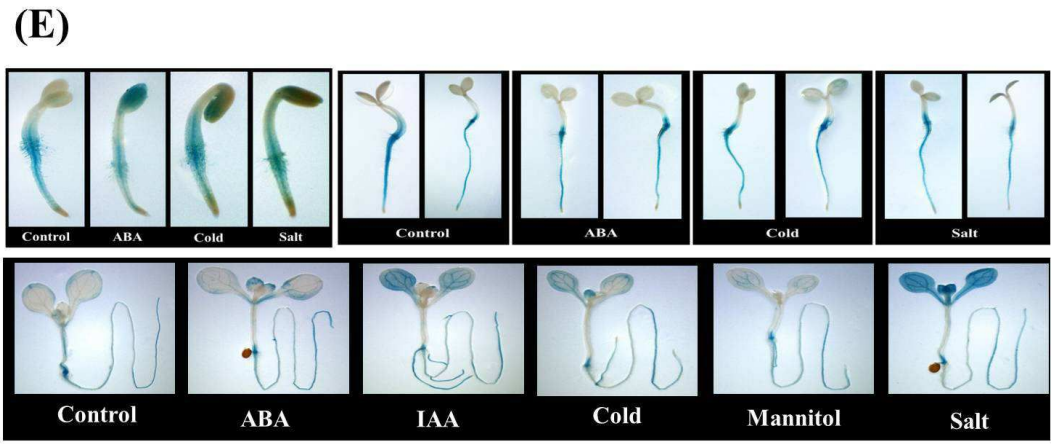
도면5b


Control
ABA 10 μM
Salt 200 μM
24hr after imbibition
48hr after imbibition
Control
ABA 10 μM
Salt 200 μM
72hr after imbibition
96hr after imbibition

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Seed specific expression promoter

<130> P11-120919-01

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1069

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

caataaagcg gctcacttct atatttggag gaaaaagtat aatggatccg attattaata 60

caaacctgta caagtttttg aacgagtaaa aaatcataag taattcaata atagttaaaa 120

acagtataaa ataggggtat gagtcacgaa aaaaattcga atggtgaccg aatcgcacat 180

taataaaatt ctctgcatat atatatatat atatttgtta ttatttgaac tgcaccgcac 240

tttatccgca gttgaactgc atgtttccat taagactctg agagtaatat atatgataaa 300

gcttttattt attataatca ggctcgactc attagggtgg agcgaaagtg cgacggtcca 360

aaccttatgc ctatttaaaa aaatttacat aagaaaaagt tttttatttt ttggaaaaaa 420

aagttgtcaa aatataattg ataaaatccc caaatttctt taaaatatat attaaaaggc 480

cctgatttta tttctaaatg acttttatat accaaagagc caatattttt gtaaaatgtt 540

aaaacactca agatatactt caaaataatt gcaaaagatg cccaaaaaaa gttttaccta 600

acaaaaggtc caaaaaaaag caaacattta ccctaagact caaatttatg ttgggccggg 660

tctggttatt attaaaacga tcaaagctag tgttttgtta aaccgcaatt ttgtagcatt 720

tcatatgtta agatttgatg gttgaaagga aaacaaaaat tgtgaataat aatggttatg 780

agatctaaaa catcaaagga aaatcaagaa gagaaaggta taaaatattg aataaataat 840

atgaatgtgg cagttatagt ttgatgtaga ataaaagatt aaacaaaaat caagagcccc 900

accagccact ccttcaaacg tgtcctacca actctcttct agaagcaatt aggctcacct 960

tccacctcca acacctctct ccccttctct ctccataaaa ccctcaacaa cagaatcaaa 1020

agcatcatca tcatcagaag aagagagtca tgggaagatc tccttgctg 1069

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 2

caataaagcg gctcacttct 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 3

cagcaaggag atcttcccat 20