



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0058796
(43) 공개일자 2022년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8222 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0143816
(22) 출원일자 2020년10월30일
심사청구일자 2020년10월30일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
전북대학교산학협력단
전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1가)
(72) 발명자
김경민
전라북도 완주군 이서면 이서로 90-18
강천식
전라북도 전주시 완산구 오공로 70, 102동 603호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

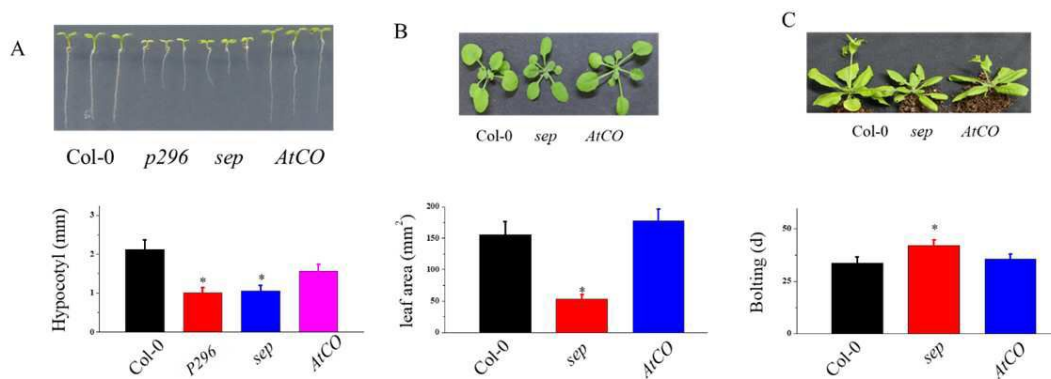
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 종자 식물 특이 익스텐신 모티브를 포함하는 단백질을 코딩하는 식물 성장조절 유전자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 종자 식물 특이 익스텐신 모티브를 포함하는 단백질을 코딩하는 식물 성장조절 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따라 조직/발달단계 비특이적 프로모터와 종자 식물 특이 익스텐신 모티브를 포함하는 단백질 (seeds plant specific extensin motif containing proteins, SEP) 코딩 서열이 연결된 재조합 벡터를 사용하여 지질분해, 글리옥실산 회로, 글리옥시즘/퍼옥시즘 발생 조절이 가능하므로, 식물의 유지 함량과 조성을 제어할 통한 유지식물 및 유지작물의 개량 또는 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 15/8247 (2013.01)

C12N 15/827 (2013.01)

C12N 15/8271 (2013.01)

(72) 발명자

김경훈

전라북도 완주군 갈산1로 71-0 이노힐스 807동 1503호

박태일

전라북도 완주군 정농대농길 62

최창현

광주광역시 북구 호동로 100 현대아파트 103동 903호

박진희

전라북도 완주군 이서면 갈산1로 72 904동 2003호

최명구

전라북도 완산구 범안2길 21 은하수빌 202호

박연일

대전광역시 유성구 은구비남로 34 열매마을 808동 601호

김의중

대전광역시 유성구 지족북로 60 한화꿈에그린 203동 1802호

정석원

대전광역시 유성구 학하남로 10, 209동 1201호 (계산동, 오투그란데 미학)

박철수

전라북도 전주시 완산구 유연로 217, 109동 1602호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395063935

과제번호 PJ01279203

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 신농업기후변화대응체계구축

연구과제명 장수형 밀 이삭길이 및 농업형질관련 유전자 기능 검정

기 여 율 1/1

과제수행기관명 충남대학교 산학협력단

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

sep 유전자를 포함하는 식물체 생장 조절용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 sep 유전자는 애기장대 또는 밀 유래인, 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 sep 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 sep 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 식물체 생장 조절은 다음 중 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 가지는 것인, 조성물:

- i) 식물체의 지방산 함량 조절;
- ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 조절;
- iii) 식물세포의 크기 조절;
- iv) 식물체 내 지질 분해 조절;
- v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 조절;
- vi) 식물체의 개화시기 조절; 및
- vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 조절.

청구항 6

sep 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 7

식물체 내에서 sep 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생장 촉진 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식물체는 애기장대, 담배, 가지, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두,

녹두, 강낭콩, 완두, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 및 양파로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 식물체의 생장 촉진 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 sep 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것인, 식물체의 생장 촉진 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 sep 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 식물체의 생장 촉진 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 식물체 생장 촉진은 다음 중 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 가지는 것인, 식물체의 생장 촉진 방법:

- i) 식물체의 지방산 함량 감소;
- ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 증가;
- iii) 식물세포의 크기 증가;
- iv) 식물체 내 지질 분해 증가;
- v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 증가;
- vi) 식물체의 개화시기 촉진; 및
- vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 증가.

청구항 12

식물체 내에서 sep 유전자의 발현을 저해시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생장 저해 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 식물체는 애기장대, 담배, 가지, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 및 양파로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 식물체의 생장 저해 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 sep 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것인, 식물체의 생장 저해 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 sep 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 것인, 식물체의

생장 저해 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 식물체 생장 저해는 다음 중 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 가지는 것인, 식물체의 생장 저해 방법:

- i) 식물체의 지방산 함량 증가;
- ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 감소;
- iii) 식물세포의 크기 감소;
- iv) 식물체 내 지질 분해 감소;
- v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 감소;
- vi) 식물체의 개화시기 지연; 및
- vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 감소.

청구항 17

제6항의 벡터로 형질전환된 식물체.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 식물체는 애기장대, 담배, 가지, 고추, 토마토, 우엉, 쪽갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 및 양파로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 식물체.

청구항 19

제6항의 벡터로 형질전환된 식물체의 종자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 종자 식물 특이 익스텐신 모티브를 포함하는 단백질을 코딩하는 식물 생장조절 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 애기장대 유래 종자 식물 특이 익스텐신 모티브를 포함하는 단백질 (seeds plant specific extensin motif containing proteins, SEP)을 코딩하는 sep 유전자 (atr7, At5G21280) 또는 밀 유래 SEP 단백질을 코딩하는 sep 유전자 (TraesCS5B02G518900.1)를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 sep 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 지방산 함량과 조성을 조절하는 방법, 식물체의 생장과 개화시기를 조절하는 방법, 종자발아를 조절하는 방법, 식물세포 크기를 조절하는 방법, 식물체 내 지질분해를 조절하는 방법, 식물체 내 글리옥실산 회로를 조절하는 방법, 글리옥시좀/퍼옥시좀 생산을 조절하는 방법 및 상기 제조된 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 익스텐신 (extensin, EXT) 모티브는 세린 1개와 연이어 3~5개의 프롤린으로 구성된 펩티드 (SerPro3~5)로서, 애기장대의 경우 177개의 유전자가 알려져 있다. 이중 42개는 SerPro3~5 모티브 주위에 Tyr-Val-Tyr 모티브를 갖

는 익스텐신이다. 11개는 익스텐신 모티브 외에 Leu과 Cys이 반복되는 도메인 (LRR)을 포함하는데 이를 LRR-EXT라 한다. 이외에 아라비노갈락탄 (arabinogalactan) 단백질-EXT (4개), PERK (15개), 포르민 (액신-미세소관 결합도메인, 11개)가 있다. 이들은 세포신장, 신호감지 및 전달, 세포골격 형태조절에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Borassi, Cecilia & Sede, Ana & Mecchia, Martin & Salter, Juan & Marzol, Eliana & Muschietti, Jorge & Estevez, Jose. (2015). An update on cell surface proteins containing extensin-motifs. J. Exp. Bot. 67).

[0004] 애기장대 유래의 At5g21280(atr7) 유전자는 안토시아닌 (anthocyanin) 생합성 조절에 관여하는 전사인자 PAP1과 프로그램화세포사멸을 유도하는 AAL-toxin 저항성 유전자를 발굴하는 과정에서 보고되었다. 안토시아닌은 식물의 영양 및 생식기관의 색깔, 곤충 등의 꽃가루 매개자 유인, 종자 분산 및 활성산소 등에 의한 손상을 막는 항산화제로 작용한다. R2R3 MYB 전사인자인 PAP1 (production of anthocyanin pigment 1)은 WD-40 단백질인 TTG1 (transparent testa glabra 1) 그리고 bHLH (basic helix-loop-helix) 전사인자인 TT8, GL3 및 EGL3와 함께 MBW (MYB-bHLH-WD40) 전사복합체가 구성되면 안토시아닌 생합성 유전자 발현이 활성화된다. 반면, R3 MYB 전사인자인 MYB12는 LBW (MYB12-bHLH-TTG1) 복합체를 형성하여 안토시아닌 생합성을 억제한다. 상기 복합체 이외에 MYB11, 12, 111, 113 및 114는 복합체를 형성하지 않고 독립적으로 안토시아닌 생합성 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려졌다. 안토시아닌이 과량축적되는 표현형인 PAP1D 모본에서 T-DNA가 At5G21280의 엑손에 삽입될 시 돌연변이 (보라색) 표현형을 나타내어 *p296*으로 명명되었으나 At5G21280가 안토시아닌의 조절 혹은 식물의 생장과 분화에 미치는 영향은 알려진 바 없다.

[0005] At5g21280 돌연변이체는 정상적인 성장조건에서는 잎의 크기나 유식물 생체량 등 바이오매스가 감소하는 표현형을 보이고 다른 생장과 발달에 표현형을 보이지 않지만 프로그램화 세포사멸을 유도하는 AAL-toxin, 캐탈라제 억제제인 아미노트리아졸 (aminotriazole)과 제초제의 일종인 파라콰트(paraquat)에 의해 유도되는 산화스트레스에 내성을 보이는 것으로 알려져 있으며, 이러한 산화스트레스 저항성은 비생물학적 스트레스 관련 전사인자 DREB19, HSF2, ZAT10 등의 축적과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 상기 보고는 At5g21280가 식물의 생장과 항산화 반응에 관여함을 시사하나, 단백질 서열상의 정보로는 그 정확한 작용 메커니즘을 추정하기 쉽지 않을 뿐만 아니라 생장과 발달 그리고 환경변화에 대한 반응과정에서 생리학적 기능을 유추하기 어렵다.

[0006] 그러나, 아직까지 상기 애기장대 유래의 At5g21280를 이용하여 형질전환된 식물체 제조방법 및 그에 따른 식물체에 관해서는 알려진 바가 없다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 애기장대 밑에서 종자식물 특이 익스텐신형 단백질 (seeds plant specific extensin motif containing proteins, SEP)을 코딩하는 sep 유전자를 새롭게 발굴하였으며, 상기 sep 유전자에 변이가 있는 경우 식물체가 잘 자라지 못하여 생장 및 개화시기가 지연되는 것을 확인하고, 상기 sep 유전자에 변이가 있는 식물체에 sep 유전자를 과발현시키는 경우, 정상적으로 생장 및 개화하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 하나의 목적은 sep 유전자를 포함하는 식물체 생장 조절용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 sep 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 식물체 내에서 sep 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생장 촉진 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 식물체 내에서 sep 유전자의 발현을 저해시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생장 저해 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 한편, 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의

범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다. 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

- [0016] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 sep 유전자를 포함하는 식물체 생장 조절용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명에서, 용어 "종자식물 특이 익스펜신형 단백질 (seeds plant specific extensin motif containing proteins, SEP)"은 쌍자엽과 단자엽 등 종자식물의 핵 단백질로서 비결정형 구조 (intrinsically disordered proteins) 일종이다. 생화학적 기능은 알려지지 않았으며, 돌연변이체 표현형 분석을 통해서 항산화 메커니즘에 관여하는 것으로 알려졌다. 본 발명에 있어서, 상기 sep 유전자는 SEP 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있다.
- [0018] 상기 sep 유전자는 애기장대 또는 밀 유래일 수 있고, 구체적으로 상기 sep 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하거나 이로 표시되는 애기장대 유래 At5G21280 유전자위 (atr7 유전자) 또는 서열번호 2의 염기서열을 포함하거나 이로 표시되는 밀 유래 TraesCS5B02G518900.1일 수 있다. 또한 상기 유전자 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 상동체의 염기서열은 변화될 수 있으나, 서열번호 1 또는 서열번호 2와 유사한 기능적 특성을 가질 수 있다. 구체적으로, 상기 sep 유전자의 염기서열은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열과 각각 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상, 100% 미만의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 sep 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 SEP 단백질을 코딩할 수 있다.
- [0021] 상기 "식물체 생장 조절"은 다음 중 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 가지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] i) 식물체의 지방산 함량 조절;
- [0023] ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 조절;
- [0024] iii) 식물세포의 크기 조절;
- [0025] iv) 식물체 내 지질 분해 조절;
- [0026] v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 조절;
- [0027] vi) 식물체의 개화시기 조절; 및
- [0028] vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 조절.
- [0030] 상기 i) 식물체의 지방산 함량 조절과 관련하여, 본 발명의 일 구현예에서, 애기장대 야생종 (Col-0), At5F21280 유전자에 대한 T-DNA 삽입 돌연변이체 (Salk_006796) 및 At5F21280 유전자를 포함하는 벡터로 형질 전환되어 sep 유전자가 보상발현된 Salk_006796 (AtC0)를 압조건에서 7일 생육하고 총 지방산 함량을 확인한 결과, Salk_006796 (sep)의 총 지방산 함량은 Col-0에 비해 약 377% 높았으며, AtC0의 총 지방산 함량은 Col-0와 유사하였다 (도 4b). 이는 sep 유전자 발현을 조절함으로써 식물체 내 지방산 함량을 조절할 수 있음을 시사한다.
- [0031] 본 발명에서, 상기 "지방산"은 식물체 내 포함되어 있는 지방산이라면 제한되지 않으나, 예를 들면, C16, C18, 및 C20로 이루어지는 군으로부터 선택되는 지방산일 수 있다.
- [0033] 상기 ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 조절 및 iv) 식물체 내 지질 분해 조절과 관련하여, 본 발

명의 일 구현예에서, Salk_006796 (*sep*)은 포도당 처리한 배지에서는 Col-0 대비 각각 90% 수준으로 회복된 반면, 과당, 이당류, 오스모티쿰인 소비톨과 만니톨 처리한 배지에서는 생장 회복현상이 나타나지 않았다 (도 4c). 이는 종자에 저장된 지질은 글리옥시좀/퍼옥시좀이 관여하는 분해대사 경로를 통해서 하배축을 포함하는 생장축 (growing axis)에서 필요로 하는 탄소원과 에너지원으로 사용됨에 따라, Salk_006796 (*sep*) 돌연변이 식물에서 유적의 축적에 의해서 포도당 신생성이 억제되고, 결과적으로 하배축 등 유식물이 억제되었기 때문에 외부에서 포도당 공급 시 돌연변이체 생장이 야생종 수준으로 회복된 것으로, SEP가 저장 지질 분해에 관여하는 것을 나타내고, 나아가 *sep* 발현을 조절함으로써 지방산 분해 의존성 에너지 및 탄소대사를 통해서 세포길이 조절이 가능함을 시사한다.

[0034] 본 발명에서, 용어 "글리옥시좀 (glyoxysome)"은 많은 고등식물의 오일을 많이 갖고 있는 종자 내에서 단일막으로 둘러싸여 지방산의 베타 산화 (β -oxidation)와 글리옥실산 (glyoxylate)의 대사를 위해 전문화된 미소체 (microbody)이다. 퍼옥시좀 (peroxisome)에서 특화된 소기관이다.

[0035] 본 발명에서, 용어 "퍼옥시좀 (Peroxisome)"은 진핵세포의 세포질 내에 존재하는 세포 소기관으로, 리소좀 (lysosome)과 유사하게 막에 둘러싸인 구조물이다. 식물 세포 종자발아 및 영양생장기에 엽록체와 미토콘드리아와 협동적으로 지질분해, 옥신, 지베렐린, 자스몬산을 포함하는 식물호르몬 생합성, 및 광호흡 경로에 관여하며, 세포내 소포체 (ER)에서 출아 (budding)된 후 전구체 프리퍼옥시좀 (preperoxisome)의 확장과 분열에 의해서 성숙되는데 이는 페록신 (peroxin, PEX) 단백질에 의해서 매개된다. 퍼옥시좀의 수, 구조 및 크기는 일정하지 않고 발달단계나 환경변화에 따라서 가변적이며, 펙소파지 (pexophagy)에 의해서 선택적으로 분해된다.

[0037] 상기 iii) 식물세포의 크기 조절과 관련하여, 본 발명의 일 구현예에서, Col-0, Salk_006796 (*sep*) 및 AtCO의 유식물 하배축 세포크기를 측정한 결과, Salk_006796 (*sep*)는 Col-0에 비해서 하배축 표피 장축 길이가 54% 수준으로 감소하였으나 AtCO에서는 77-80% 수준의 길이를 보였다 (도 4a 아래). 이는 *sep* 유전자 발현을 조절함으로써 식물세포의 크기를 조절할 수 있음을 시사한다.

[0038]

[0039] 상기 v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 조절과 관련하여, 본 발명의 일 구현예에서, Salk_006796 (*sep*)에서 TAG 모빌라이제이션 (SDP1), 베타 산화 (PXA1, ACX2-4, KAT2), 글리옥실산 회로 (CSY3, ACO3, MLS, PMDH1) 그리고 퍼옥시좀 생성 (PEX11A, D, E)과 관련된 유전자량이 야생종에 비해서 2~8배 정도 감소하였으며, 이러한 유전자량 감소는 AtCO에서는 Col-0 수준으로 회복되었다 (도 5). 이는 *sep* 유전자 발현을 조절함으로써 글리옥실산 회로 관련 유전자의 발현을 조절할 수 있음을 시사한다.

[0040] 본 발명에서, 용어 "글리옥실산 회로 (glyoxylate cycle)"는 시트르산 회로 (TCA 회로)의 변형 회로로서 식물과 세균, 원생생물, 균류 등에 존재하는 동화 (anabolic) 경로이다. 글리옥실산 회로에서 시트르산 회로와 차이가 나는 반응은 이소시트르산으로부터 숙신산과 글리옥실산이 생성되는 것과 아세틸-CoA 일부가 글리옥실산과 반응하여 말산이 생성되는 것이다. 글리옥실산 회로는 시트르산 회로의 탈탄산 (decarboxylation) 반응을 우회하는 경로로서, 식물과 미생물이 아세트산으로부터 탄수화물을 합성하고 에너지를 생산할 수 있도록 하는 경로이다.

[0041] 식물에서 글리옥실산 회로가 진행되는 장소는 글리옥시좀 (glyoxysome)이라 불리는 특별한 미소체 구획이다. 가장 대표적인 글리옥시좀 연관 발생 과정으로 종자의 발아 과정을 들 수 있다. 종자는 주로 트리글리세리드 (triglyceride; 중성지방의 기본 단위) 형태로 지방을 저장하고 있다가, 종자가 발아를 시작하게 되면, 저장 지방로부터 발아 과정에서 필요한 에너지와 탄소원을 공급하기 위한 일련의 대사과정을 진행하게 되는데, 이 과정의 중심에 글리옥실산 회로가 존재한다. 광합성 등을 통해 에너지를 공급받지 못하는 종자가 발아해서 유식물로 성장하고 발달하기 위한 과정에서 필요한 에너지를 공급하기 위하여, 트리글리세리드가 분해되고, 글리옥실산 회로 및 포도당신생합성 (gluconeogenesis) 과정을 거치게 되면 식물이 직접 이용가능한 에너지원인 포도당, 설탕 등의 탄수화물이 생성된다.

[0043] 상기 vi) 식물체의 개화시기 조절과 관련하여, 본 발명의 일 구현예에서, Salk_006796 (*sep*)는 37일 생육한 식물체에서 꽃대 및 꽃의 발달이 야생형에 비해 지연되었으나, 이러한 발아 및 생장 지연 표현형은 AtCO에서 *sep* 도입에 의해 야생형 수준으로 회복되었다 (도 3c). 상기 결과는 생식 단계에서 *sep* 유전자에 의해 식물체의 종자 발아 지연과 왜소성 및 개화 조절이 가능함을 시사한다.

- [0045] 상기 vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 조절과 관련하여, At5g21280 돌연변이체는 정상적인 생장조건에서는 잎의 크기나 유식물 생체량 등 바이오매스가 감소하는 표현형을 보이고 다른 생장과 발달에 표현형을 보이지 않지만 프로그램화 세포사멸을 유도하는 AAL-toxin, 캐탈라제 억제제인 아미노트리아졸 (aminotriazole)과 제초제의 일종인 파라콰트(paraquat)에 의해 유도되는 산화스트레스에 내성을 보이고, 이러한 산화스트레스 저항성은 비생물학적 스트레스 관련 전사인자 DREB19, HSFA2, ZAT10 등의 축적과 밀접한 연관이 있는 것으로 알려져 있다.
- [0047] 즉, 본 발명에 따른 sep 유전자는 i) 식물체의 지방산 함량 조절; ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 조절; iii) 식물세포의 크기 조절; iv) 식물체 내 지질 분해 조절; v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 조절; vi) 식물체의 개화시기 조절; 및 vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 조절로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 가지고, 식물체 생장을 조절할 수 있다. 또한, 상기 "식물체 생장 조절"은 추가로 종자발아, 유식물 생체량, 하배축과 잎 크기, 개화시기를 조절하는 것을 특징으로써 가질 수 있다.
- [0049] 본 발명의 다른 하나의 양태는 sep 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0050] 상기 재조합 벡터는 sep 유전자의 발현이 증가하거나, sep 유전자의 발현이 억제되도록 제작한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 유전자의 발현을 증가 또는 억제시키는 벡터의 제조방법은 당업계에 알려져 있는 방법이면 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서, 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 것을 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 단편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0052] 본 발명에서, 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편 (들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0053] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현 또는 클로닝을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 용어 "프로모터"란 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. 본 발명의 벡터에 포함되는 프로모터는 상기 조직 및 발달단계 비특이적 프로모터일 수 있고, 구체적으로 35S CaMV 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 본 발명의 재조합 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [0056] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜메피aciens (*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0116718 B1 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0120516 B1 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리 벡터이다. 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스 (예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등 으로부터 유래될 수 있는

것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0057] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 상기 마커 유전자는 항생제 내성 유전자 (antibiotics resistance gene)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0058] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제 (NOS), 베타 α -아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린 (phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 튜메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토판인 합성 (Octopine synthase) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 본 발명의 벡터를 진행 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모 (*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 본 발명에 있어서, 숙주세포는 구체적으로 식물세포일 수 있다.

[0060] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법 (Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology. 1983;166(4):557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 발바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명의 다른 하나의 양태는 식물체 내에서 sep 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생장 촉진 방법을 제공한다.

[0063] 상기 sep 유전자의 과발현은 식물세포에 sep 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 운반하여 식물체 내에서 sep 유전자가 과발현 되도록 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 sep 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 이를 숙주세포인 식물세포 내로 운반하는 방법 등에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0064] 상기 sep 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것일 수 있고, 상기 sep 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다. 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0065] 상기 sep 유전자가 과발현되는 대상 식물체는 구체적으로 애기장대, 담배, 가지, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 깻무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 및 완두인 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 및 양과 등의 단자엽 식물일 수 있고, 보다 구체적으로 쌍자엽 식물일 수 있으며, 더욱 구체적으로 애기장대일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0066] 상기 식물체 생장 촉진은 다음 중 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 가지는 것인, 식물체의 생장 촉진 방법:

[0067] i) 식물체의 지방산 함량 감소;

[0068] ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 증가;

[0069] iii) 식물세포의 크기 증가;

[0070] iv) 식물체 내 지질 분해 증가;

[0071] v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 증가;

[0072] vi) 식물체의 개화시기 촉진; 및

[0073] vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 증가.

[0075] 전술한 본 발명의 구현예에서는 상기 sep 유전자에 변이가 있는 경우 식물체가 잘 자라지 못하여 생장 및 개화시기가 지연되는 것을 확인하고, 상기 sep 유전자에 변이가 있는 식물체에 sep 유전자를 과발현시키는 경우, 야생

형 수준으로 정상적으로 생장 및 개화하는 것을 확인하였는 바, 이에 따라 식물체에서 sep 유전자를 과발현할 경우 i) 식물체의 지방산 함량 감소; ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 증가; iii) 식물세포의 크기 증가; iv) 식물체 내 지질 분해 조절; v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 증가; vi) 식물체의 개화시기 증가; 및 vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 증가로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 가지고, 식물체 생장을 촉진할 수 있다.

[0076] 또한, 상기 "식물체 생장 성장"은 추가로 종자발아를 촉진하고, 유식물 생중량, 하배축과 잎 크기를 증가시키는 것을 특징으로써 가질 수 있다.

[0078] 본 발명의 다른 하나의 양태는 식물체 내에서 sep 유전자의 발현을 억제시키는 단계를 포함하는, 식물체의 생장 저해 방법을 제공한다.

[0079] 상기 sep 유전자의 발현 억제는 식물세포에 sep 유전자를 억제하도록 제작한 재조합 벡터를 운반하여 식물체 내에서 sep 유전자의 발현이 억제되도록 유도하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 sep 유전자를 억제하도록 제작한 재조합 벡터 및 이를 숙주세포인 식물세포 내로 운반하는 방법 등에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0080] 상기 sep 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 것일 수 있고, 상기 sep 유전자는 서열번호 3 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 코딩하는 것일 수 있다. 이에 대해서는 전술한 바와 같다.

[0081] 상기 sep 유전자 발현이 억제되는 대상 식물체는 구체적으로 애기장대, 담배, 가지, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 및 완두인 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 및 양과 등의 단자엽 식물일 수 있고, 보다 구체적으로 쌍자엽 식물일 수 있으며, 더욱 구체적으로 애기장대일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 상기 식물체 생장 저해는 다음 중 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 가지는 것인, 식물체의 생장 저해 방법:

[0083] i) 식물체의 지방산 함량 증가;

[0084] ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 감소;

[0085] iii) 식물세포의 크기 감소;

[0086] iv) 식물체 내 지질 분해 감소;

[0087] v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 감소;

[0088] vi) 식물체의 개화시기 지연; 및

[0089] vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 감소.

[0091] 전술한 본 발명의 구현에서는 상기 sep 유전자에 변이가 있는 경우 식물체가 잘 자라지 못하여 생장 및 개화시기가 지연되는 것을 확인하였는 바, 이에 따라 식물체에서 sep 유전자의 발현을 억제할 경우 i) 식물체의 지방산 함량 증가; ii) 식물체 내 글리옥시좀 또는 퍼옥시좀 발현 감소; iii) 식물세포의 크기 감소; iv) 식물체 내 지질 분해 감소; v) 식물체 내 글리옥실산 회로 관련 유전자 발현 감소; vi) 식물체의 개화시기 지연; 및 vii) 식물체의 산화스트레스 저항성 감소 로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 가지고, 식물체 생장을 억제할 수 있다.

[0092] 또한, 상기 "식물체 생장 저해"는 추가로 종자발아를 지연시키고, 유식물 생중량, 하배축과 잎 크기를 감소시키는 것을 특징으로써 가질 수 있다.

[0094] 본 발명의 다른 하나의 양태는 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

[0096] 본 발명의 다른 하나의 양태는 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 식물체의 종자를 제공한다.

- [0097] 상기 재조합 벡터에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0098] 상기 식물체는 애기장대, 담배, 가지, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 및 양파로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 구체적으로 애기장대일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0100] 본 발명의 또 하나의 양태는 본 발명의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는 식물체 생장이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0101] 상기 재조합 벡터에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0102] 상기 제조방법은 본 발명의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하며, 식물세포로의 형질전환은 DNA를 식물세포에 전이시키는 임의의 방법을 사용할 수 있다. 식물 종의 형질전환은 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 상기 방법은 원형질체에 대한 갈슘/폴리에틸렌 글리콜 방법, 원형질체의 전기천공법, 식물 요소로의 현미주사법, 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법, 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및(또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다.
- [0103] 또한, 본 발명의 제조방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

발명의 효과

- [0105] 본 발명에 따라 조직/발달단계 비특이적 프로모터와 종자 식물 특이 익스텐신 모티프를 포함하는 단백질 (seeds plant specific extensin motif containing proteins, SEP) 코딩 서열이 연결된 재조합 벡터를 사용하여 지질 분해, 글리옥실산 회로, 글리옥시좀/퍼옥시좀 발생 조절이 가능하므로, 식물의 유지 함량과 조성을 제어를 통한 유지식물 및 유지작물의 개량 또는 개발에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0107] 도 1a는 종자 식물 특이 익스텐신 모티프를 포함하는 단백질 (seeds plant specific extensin motif containing proteins, SEP) 동원체(ortholog)의 계통수 분석 결과이다. 단자엽 클레이드가 애기장대를 포함하는 쌍자엽 클레이드와 나누어진다.
- 도 1b는 애기장대와 밀 및 대표적인 작물 (A.thaliana: 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), C.sativa: 삼 (*Cannabis sativa*), B.rapa: 배추 (*Brassica rapa*), T.hassleriana: 풍접초 (*Tarenaya hassleriana*), J.regia: 가래나무 (*Juglans regia*), N.nucifera: 연꽃 (*Nelumbo nucifera*), T.aestivum: 밀 (*Triticum aestivum*), O.sativa: 벼 (*Oryza sativa*))의 SEP 동원체의 다서열 배열을 시도한 결과이다. 핵으로 이동하는 서열 NLS가 매우 잘 보존되어 있다.
- 도 2a는 TAIR로부터 분양받은 애기장대 Salk_006796 라인이 엑손1에 T-DNA가 삽입위치를 RT-PCR로 결정한 결과이다. 2개의 엑손과 1개의 인트론으로 구성되어 있다. 인트론이 제거되고 엑손 1과 2가 연결된 변이체 1 (variant 1, Chr5:7263828..7265874)과 엑손1 염기서열 말단에 위치하는 종료코돈에 의해서 엑손 1만 발현되는 변이체 2 (variant 2, Chr5:7263880..7265851) 두 종류의 유전자 모델을 갖고 있다 (<https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?name=AT5G21280&type=locus>).
- 도 2b는 서열번호 1 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 3 및 서열번호 4가 연결된 재조합 벡터를 나타낸 모식도이다. 프로모터는 35S CaMV를 사용하여 조직과 발달단계 비특이적으로 발현시켰으며, 세포

내 위치와 항원항체 반응을 위해 GFP 태깅하였다.

도 2c는 애기장대 원형질체에서 GFP 표진된 AtSEP가 DAPI가 염색되는 세포내 위치인 핵에 존재함을 확인하였다.

도 2d는 호모와 헤테로 보상 발현체 계통에서 AtSEP가 발현됨을 GFP를 항원항체 반응으로 확인하였다.

도 3은 유식물 (a)과 영양생장 (b) 및 생식생장기 (c)의 야생형 애기장대 식물체 (Col-0), Atsep 엑손 1에 T-DNA가 삽입된 돌연변이체 Salk_006796 (sep), Salk_006796의 유전적 배경에 애기장대 Atsep를 과발현시킨 보상 발현체 (AtCO)의 표현형 (하배축 길이, 잎 면적 및 개화시기)를 조사한 결과이다.

도 4a와 b는 상기 도 3a에서 관찰된 유식물 하배축을 대상으로 세포길이와 lipid body를 Nile red 염색약으로 관찰한 후 지방산 대사물을 정량한 결과이다. 도 4c는 상기 식물체를 대상으로 포도당 처리에 의해 sep 돌연변이 식물체의 유식물 생장이 회복됨을 확인한 결과이다.

도 5는 상기 도 4에서 관찰된 유식물을 대상으로 전사체 발현 분석을 하여 지방분해 경로와 글리옥시좀/퍼옥시좀 생성에 관여하는 유전자 발현을 야생종과 비교하여 상대적으로 계산한 결과이다.

도 6은 상기 도 3의 조건에서 sep 돌연변이체 유전적 배경에 밀 sep 유전자를 보상발현한 식물체 (TaCO)에서 하배축 길이, 잎 면적, 개화시기 및 표피세포 길이가 야생종 수준으로 부분 혹은 완전히 회복됨을 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0108] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0110] 실시예 1. 애기장대 및 밀의 익스텐신(extensin, EXT) 모티프 분석

[0111] EXT 모티프는 세린 1개와 연이어 3~5개의 프롤린으로 구성된 펩티드 (SerPro3~5)로서, 애기장대의 경우 177개의 유전자가 알려져 있다. 이중 42개는 SerPro3~5 모티프 주위에 Tyr-Val-Tyr 모티프를 갖는 익스텐신이다. 11개는 익스텐신 모티프 외에 Leu과 Cys이 반복되는 도메인 (LRR)을 포함하는데 이를 LRR-EXT라 한다. 이외에 아라비노 갈락탄 (arabinogalactan) 단백질-EXT (4개), PERK (15개), 포르민 (액신-미세소관 결합도메인, 11개)가 있다. 이들은 세포신장, 신호감지 및 전달, 세포골격 형태조절에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Borassi, Cecilia & Sede, Ana & Mecchia, Martin & Salter, Juan & Marzol, Eliana & Muschietti, Jorge & Estevez, Jos v. (2015). An update on cell surface proteins containing extensin-motifs. J. Exp. Bot. 67).

[0112] 애기장대 At5G21280 유전자위 (atr7 유전자)가 코딩하는 단백질 또한 2개의 익스텐신 모티프를 갖는 단백질 (서열번호 3)이지만 상기 서술한 5가지의 익스텐신형 세포표면 단백질에는 포함되지 않는다.

[0113] 이에, SeqNLS 분석(<http://mleg.cse.sc.edu/seqNLS/>) 결과 애기장대 At5G21280 유전자위가 코딩하는 단백질은 핵 수송 서열 (KKQVRRR)을 포함하고 있어 세포외로 분비되는 세포표면 단백질에 포함되지 않을 것이라는 견해를 뒷받침한다. 애기장대 At5G21280 유전자위에 해당하는 서열은 애기장대 이외에 다수의 쌍자엽 식물과 밀을 포함하는 단자엽 식물에서만 발견되고 조류나 하등식물에서는 발견되지 않는다 (도 1a).

[0114] 다서열배열(multiple sequence analysis, MSA) 분석 결과 애기장대 At5G21280 유전자위가 코딩하는 단백질 내 두 영역 (KQVRRRLHTSRPYQERLLNMAEARREIVTALK (서열번호 16) 및 LNFLLPNQLGLNLFQDFNDFiQT (서열번호 17))이 애기장대를 포함하는 다양한 식물 (A.thaliana: 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), C.sativa: 삼 (*Cannabis sativa*), B.rapa: 배추 (*Brassica rapa*), T.hassleriana: 풍접초 (*Tarenaya hassleriana*), J.regia: 가래나무 (*Juglans regia*), N.nucifera: 연꽃 (*Nelumbo nucifera*), T.aestivum: 밀 (*Triticum aestivum*), O.sativa: 벼 (*Oryza sativa*)) 내에서 잘 보존되어 있음을 확인하였다 (도 1b).

[0115] 애기장대 At5G21280 유전자위가 코딩하는 단백질을 2차 구조 예측 프로그램으로 분석한 결과 막통과 나선 (transmembrane helices)이 없는 수용성 단백질인 것을 알 수 있으나, Pfam 도메인 서치를 통해서는 특정한 도메인이 예측되지 않았으며, 특정 3차원 구조 분석 (<https://iupred2a.elte.hu/>)에서도 예측되지 않는 본질적으로 구조화되지 않은 단백질 (Intrinsically unstructured protein)으로 분류되었다.

[0116] 한편, OrthoDB v10.1 (<https://www.orthodb.org/>) 분석 결과에서는 애기장대 At5G21280 유전자위가 코딩하는 단백질에서는 프롤린 잔기가 다수 발견되어 하이드록시 프롤린이 풍부한 당단백질 계열 단백질

(hydroxyproline-rich glycoprotein family protein)로도 분류되지만, 프롤린 풍부 단백질 (Pro-rich Protein, PRP)의 특징인 펜타펩타이드 모티프 (pentapeptide motif, PPVX(K/T))를 포함하고 있지 않기 때문에 이미 4종이 알려져 있는 애기장대 PRP에는 포함되지 않는다.

[0117] 상기 결과를 바탕으로 이하에서 애기장대 At5G21280 유전자위가 코딩하는 단백질은 애기장대 유래 종자 식물 특이 익스텐신 모티프를 포함하는 단백질 (seeds plant specific extensin motif containing proteins, SEP), 즉, AtSEP로 명명하고, 애기장대 At5G21280 유전자위는 애기장대 유래 sep 으로 명명하였다.

[0119] 한편, EnsemblPlants (<http://plants.ensembl.org/index.html>)에서 AtSEP 아미노산 서열을 캐리로 BLASTP를 수행하여 밀 (*Triticum aestivum*)로부터 선발된 6종 단백질 (> 60% 동일성) 중에서 AtSEP와 가장 큰 아미노산 서열 동일성을 보이는 단백질 (서열번호 4)을 선별하고, 이를 코딩하는 유전자인 TraesCS5B02G518900의 염기서열 (서열번호 2)을 갖는 DNA를 합성하였다 (Bioneer). 상기 AtSEP와 아미노산 서열 동일성이 큰 단백질 및 이를 코딩하는 유전자인 TraesCS5B02G518900.1을 각각 밀 유래 SEP (TaSEP) 및 sep로 명명하였다.

[0121] 실시예 2. Salk_006796 라인의 T-DNA 삽입 위치 및 변이체 1과 2의 발현량 분석

[0122] ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center, ABRC)에서 At5g21280 유전자에 대한 T-DNA 삽입 돌연변이체 (Salk_006796, Salk_081956, 및 cs820583) 3종을 제작하고, 이중 엑손1이 삽입되어 있는 Salk_006796을 실험에 사용하였다 (도 2a).

[0123] 0067LP (서열번호 5)와 0067RP (서열번호 6) 프라이머로 RT-PCR한 결과, 애기장대 야생종 (Col-0)에서는 밴드가 관찰되었으나 Salk_006796 돌연변이체에서는 밴드가 관찰되지 않았다. 반면 T-DNA 상의 프라이머 LBb1.3 (서열번호 7)과 0067R과의 RT-PCR에서는 Salk_006796 돌연변이체에서만 밴드가 관찰되었다 (도 2a).

[0124] sep 전장과 3'UTR을 포함하는 프라이머 (서열번호 8 및 서열번호 9)를 이용한 RT-PCR 결과에서 Col-0에서는 sep cDNA 밴드가 관찰되었으나 Salk_006796 돌연변이체에서는 관찰되지 않았다. 이때 PCR 산물은 분자량 크기와 서열 분석 결과 변이체 1 (variant 1)에 해당하였다 (도 2a).

[0126] 실시예 3. 애기장대 SEP 또는 밀 유래 SEP 코딩 서열을 포함하는 벡터 제작

[0127] 35S CaMV 프로모터가 결합된 애기장대 SEP 또는 밀 SEP 코딩 서열을 각각 포함하는 재조합 벡터인 35SCsMV:AtSEP:GFP 또는 35SCsMV:TaSEP:GFP를 제작하여 애기장대 SEP 돌연변이체 (SALK_006796)에 형질전환하였다.

[0128] 애기장대의 경우, Col-0 에서 식물 총 RNA 추출 키트 (Spectrum™ Plant Total RNA extraction kit, Sigma-Aldrich)를 이용하여 RNA를 500 ng 추출한 뒤, 이를 cDNA 합성 키트 (iScript™ cDNA synthesis kit, Bio-rad)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. AtSEP 스플라이싱 변이체 1에 해당하는 cds를 PCR로 증폭한 뒤, AtSEP에 GFP (Green Fluorescent Protein), myc, flag을 표지하여 CaMV35S 프로모터로 발현시킬 수 있는 JJ461 벡터에 클로닝하였다.

[0129] 밀의 경우, TaSEP에 GFP를 표지하여 CaMV35S 프로모터로 발현시킬 수 있는 JJ461 벡터에 클로닝하였다 (도 2b). 여기에서 사용되는 프라이머 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

Primer	Direction	Sequence (5'→ 3')
클로닝		
AtSEP_GFP	F	CCTCTAGAATGGTCAGATCAAACAAGCAAG (서열번호 10)
	R	CCCTCGAGAAGCAAGCCAGTCGTCTCCAT (서열번호 11)

TaSEP_GFP	F	AATCTAGAATGAGGAATCAAAGATTAGCT (서열번호 12)
	R	AAGGATCCACGATAACCACTCCTCATC (서열번호 13)
T-DNA		
0067LP	F	ATCCATGCCTTCAATTCTCC (서열번호 5)
0067RP	R	TTCACACAAGCCGTCCTTATC (서열번호 6)
	LB1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC (서열번호 7)
RT-PCR		
AtSEP	F	CCTCCACTTCATCTTCCTCATC (서열번호 8)
	R	CGCAGGCTTGTTGTTATTTT (서열번호 9)
beta-Tublin	F	AAGATCCGTGAAGAGTACCC (서열번호 14)
	R	GACTGTGAGGAACGGTAC (서열번호 15)

[0133] 실시예 4. 애기장대 형질전환 식물체 제작

[0134] 실시예 3에서 벡터에 클로닝한 유전자는 아그로박테리움 GV3101에 형질전환 후 플로럴 딥 방법 (floral dip method (Clough and Bent, 1998))을 이용하여 애기장대에 도입하였다. 형질전환된 애기장대는 항생제를 함유한 1/2 MS 배지(1/2 MS, 1% 수크로스, 20 ug/ml 하이그로마이신 (hygromycin), 1% 피토아가 (phytoagar), pH 5.8)에서 3:1로 분리된 라인을 선별 후, T3 이상의 동형접합 식물체를 실험에 사용하였다. 식물 배양시 종자 표면은 70% EtOH로 5분, 0.8% 차아염소산 나트륨 (sodium hypochlorite)으로 10분간 살균한 후, 증류수로 5회 세척하였다. 종자 휴면을 깨기 위해 48시간 동안 암실에서 저온 처리 (4℃)하였다. 배양실 온도는 22℃, 16/8 시간의 광주기, 빛 세기는 $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 이었다. 실험에 사용한 모든 종자는 수확한 후 22℃에서 2주간 후숙하여 사용하였다.

[0135] 전사량이 확인된 ATSEP (2 라인)와 TaSEP (3 라인) 형질전환체의 5 라인을 GFP 단클론 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 구체적으로, 7일 자란 식물체에서 단백질을 추출하였으며, 50 μg 단백질을 8% SDS-PAGE 겔에서 분리하여 PVDF (Polyvinylidene fluoride) 막 (Merck, Darmstadt, Germany)에 옮기고 GFP 단클론 항체 (Sigma, St. Louis, MO, USA), 염소 항 마우스 IgG-HRP (horseradish peroxidase) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) 및 웨스턴 ECL 기질 (BIO-RAD clarity Max western ECL substrate, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 웨스턴 블롯 분석하였다.

[0136] 그 결과, 형질전환 식물체에서 SEP 단백질은 실시예 1에서의 핵 수송 모티브 존재의 확인 및 기준에 보고된 바 (Sujeeth, Neerakkal et al. (2019). A novel seed plants gene regulates oxidative stress tolerance in Arabidopsis thaliana. Cellular and Molecular Life Sciences. 77))와 같이 핵에 위치하는 것을 확인하였다 (도 2d).

[0138] 실시예 5. 애기장대 sep 돌연변이 식물체의 표현형 분석

[0139] 실시예 3의 벡터로 형질전환되어 보상발현된 sep 돌연변이 식물체의 분자유전학적 기능을 확인하기 위해, Col-0, 이전 연구에서 제작된 *p296* (Dong Ho Shin, et al., Identification of genes that may regulate the expression of the transcription factor production of anthocyanin pigment 1 (PAP1)/MYB75 involved in Arabidopsis anthocyanin biosynthesis, Plant Cell Rep (2015) 34:805-815.), 실시예 2의 Salk_006796 (*sep*) 및 실시예 3의 벡터로 형질전환되어 보상발현된 sep 돌연변이 식물체 (AtCO)를 22℃, 16/8 시간의 광주기 조건에서 종자발아, 유식물, 영양생장 및 생식생장 전 발달 단계의 표현형을 분석하였다.

[0140] 야생형을 비롯한 sep 돌연변이체(*p296*, *sep*)과 보상발현된 sep 돌연변이 식물체 (AtCO)의 유식물 (5일 생육한 식물체, 도 3a)에서 영양생장 (19일 생육한 식물체, 도 3b) 및 생식생장 단계(37일 생육한 식물체, 도 3c)의 sep 발현에 따른 발달 및 성장속도를 관찰한 결과, Salk_006796 (*sep*)는 5일 생육한 유식물의 뿌리 및 식물체의 크기와 19일 생육한 식물체의 자엽 및 rosette 잎의 크기가 Salk_006796 (*sep*)가 Col-0에 비해 작았으며, 37일 생육한 식물체에서 꽃대 및 꽃의 발달이 야생형에 비해 지연되었다. 이러한 발아 및 성장 지연 표현형은 sep 도입에 의해 야생형 수준으로 회복되었다 (AtCO).

- [0141] 상기 결과는 조직 혹은 발단 단계에서 sep 유전자에 의해 식물체의 종자 발아 지연과 왜소성 및 개화 조절이 가능함을 시사한다.
- [0143] **실시예 6. 애기장대 SEP의 세포길이 생장 조절 기전 분석**
- [0144] 식물길이는 세포의 분열 (division)과 신장 (elongation)에 의해서 결정된다. 실시예 5에서 sep 돌연변이체인 Salk_006796에서 확인된 생장 억제는 세포분열보다 세포신장 억제에서 기인하는 것으로 예상되었다. 이를 확인하기 위해, 1/2 MS, 1.5% 피토아가 함유 배지에서 온도와 빛 조건을 달리하여 7일 생육한 Col-0, Salk_006796 (sep) 및 실시예 3의 벡터로 형질전환되어 보상발현된 sep 돌연변이 식물체 (AtCO)의 유식물 하배측 세포크기를 측정하였다.
- [0145] 그 결과, Salk_006796 (sep)는 Col-0에 비해서 하배측 표피 장측 길이가 54% 수준으로 감소하였으나 AtCO에서는 77-80% 수준의 길이를 보였다 (도 4a 아래). 상기 하배측 표피 세포 길이 관찰 시 sep 돌연변이 식물체에서 물방울 모양의 액체성 물체가 관측되었는데, Nile Red로 염색되는 유적 (oil droplet)으로 확인되었다 (도 4a 위).
- [0147] 상기 배양조건에서 7일 생육한 Col-0, p296, Salk_006796 (sep) 및 AtCO의 유식물 하배측을 0.0025% 나일 레드 (Nile Red, N3013, Sigma-aldrich) 용액으로 37℃에서 10분간 처리한 후 공초점현미경(LSM800, CarlZeiss)으로 관찰한 결과, Col-0과 AtCO에서는 소량 형광이 관찰된 반면 p296과 Salk_006796 (sep)에서는 현저히 많은 유적이 관찰되었다 (도 4b). 암소에서 7일 생장되었을 경우에도 유사한 형광분포를 보였다.
- [0149] 생육한 Col-0, Salk_006796 (sep) 및 AtCO 내 지방산 함량 및 구성 성분을 밝히고자 가스크로마토그래피로 분석하였다. 동결 건조된 종자 및 암조건에서 7일 생육한 유식물 10 mg을 2.5% 황산과 톨루엔을 넣고 90℃에서 1시간 30분간 처리하였다. 1M NaCl과 헥산을 넣고 원심분리하여 상층액 900ul 분리하였고, 이를 화염 이온화 검출기 (Flame Ionization Detector) 와 INNOWAX 모세관 컬럼 (INNOWAX capillary column, 30 m x 0.32 mm x 0.5 um, Agilent Technologies)을 이용하여 가스크로마토그래피 (YL-6100GC, YoungLin Science) 분석에 사용하였다. 표준시료로 펜타데칸산 (C15:0) 10 mg을 사용하였다 (Meesapyodsuk, Dauenpen & Qiu, Xiao. (2008). An Oleate Hydroxylase from the Fungus Claviceps purpurea: Cloning, Functional Analysis, and Expression in Arabidopsis. Plant physiology. 147. 1325-33; Siloto, Rodrig, et al. (2006). The Accumulation of Oleosins Determines the Size of Seed Oilbodies in Arabidopsis. The Plant cell. 18. 1961-74).
- [0150] 그 결과, 암조건에서 7일 생육한 Salk_006796 (sep)의 총 지방산 함량은 Col-0에 비해 약 377% 높았으며, AtCO의 총 지방산 함량은 Col-0과 유사하였다 (도 4b).
- [0152] 종자에 저장된 지질은 글리옥시좀/퍼옥시좀이 관여하는 분해대사 경로를 통해서 하배측을 포함하는 생장축 (growing axis)에서 필요로 하는 탄소원과 에너지원으로 사용된다. 이에, Salk_006796 (sep) 돌연변이 식물에서 유적의 축적에 의해서 포도당 신생성이 억제되고, 결과적으로 하배측 등 유식물이 억제되었을 경우에 외부에서 탄소원을 공급하면, 돌연변이체 생장이 야생종 수준으로 회복될 것으로 예상되었다. 1/2 MS, 1.5% 피토아가 각 1%의 단당류와 이당류를 처리하였다 (Glu: 포도당, Fru: 과당, Suc: 수크로스, Mal: 말토오스). 삼투압에 대한 대조군으로 만니톨 (Man)과 소비톨 (Sor)을 처리하였다.
- [0153] 그 결과, 대조군 탄소원을 처리한 배지에서 7일 생장한 Salk_006796 (sep)의 생중량은 야생형의 26% 수준이었으나 포도당 처리한 배지에서 Salk_006796 (sep)의 생중량은 Col-0 대비 각각 90% 수준으로 회복되었다. 그러나 과당, 이당류, 오스모티쿰인 소비톨과 만니톨 처리에 의해서는 이러한 생장 회복현상이 나타나지 않았다 (도 4c).
- [0155] 상기 결과는 SEP가 저장 지질 분해에 관여하는 것을 나타내고, 나아가 sep 발현을 조절함으로써 지방산 분해의 존성 에너지 및 탄소대사를 통해서 세포길이 조절이 가능함을 시사한다.

[0157] **실시예 7. 애기장대 SEP의 지질 대사 유전자 발현 조절 분석**

[0158] TAG (triacylglycerol)와 같은 중자 저장 지질이나 엽록체에서 생성된 지방산은 글리옥시좀/퍼옥시좀의 베타-산화경로에 의해서 아세틸 코에이 (acetyl-CoA) 로 분해된다. 아세틸 코에이는 글리옥실산 회로, 포도당 신생성 경로와 시트르산 회로를 통해서 메발론산 경로 등 유식물 생장에 필요한 탄소골격 전구체와 에너지를 생성하는 것으로 알려져 있다. 잎 퍼옥시좀에 의한 베타-산화경로는 지방산 수준을 일정하게 유지할 뿐만 아니라 일시적인 녹말 결핍 조건에서 대사 항상성을 유지하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 베타산화 경로 유전자 돌연변이 식물체에서 볼 수 있는 유식물 생장 저해나 지방산 축적에 의한 엽록체 손상이 외부에서 공급된 포도당에 의해서 억제된다는 결과는 지질 분해 대사의 중요성을 시사한다.

[0159] 즉, 도 3에서 확인된 Salk_006796 (*sep*)에서 세포길이 생장 저해는 유전의 집적과 연관되어 있으며, 도 4에서 확인된 외부에서 공급된 포도당에 의해 표현형이 야생형인 Col-0 수준으로 복구되는 결과는 SEP의 작용표적이 글리옥시좀/퍼옥시좀에 의해서 매개되는 지방산 분해 경로임을 시사한다. 특히, SEP가 핵 소재 단백질 시그널을 포함하고 있는 핵 단백질이므로 (도 1b, 도 2d), 퍼옥시좀이 관여하는 지방산 분해 경로에 관여할 것으로 예상되었다.

[0160] 이에, 퍼옥시좀이 관여하는 지방산 분해 경로 유전자 발현을 분석하였다. 발아 직후 (2일 켜) 및 7일 생장된 식물에서 실시예 3의 방법으로 총 RNA를 추출한 후, mRNA 샘플 준비 키트 (Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit, Illumina) 로 mRNA 라이브러리를 제작하였다. 이어서 RNA 시퀀스 분석 (NextSeq500 sequencers, Illumina)을 수행한 결과, 예상한 바와 같이 Salk_006796 (*sep*)에서 TAG 모빌라이제이션 (SDP1), 베타 산화 (PXA1, ACX2-4, KAT2), 글리옥실산 회로 (CSY3, ACO3, MLS, PMDH1) 그리고 퍼옥시좀 생성 (PEX11A, D, E)과 관련된 유전자량이 야생종에 비해서 2~8배 정도 감소하였다. 이러한 유전자량 감소는 AtCO에서는 Col-0 수준으로 회복되었다 (도 5).

[0162] **실시예 8. 밀 SEP에 의한 애기장대 *sep* 돌연변이 표현형의 야생형으로의 회복**

[0163] 밀 SEP는 애기장대 SEP와 달리 단자엽 클레이드에 포함되며, 잘 보존되어 있는 도메인 사이에 변이가 매우 크다 (도 1). 이러한 서열상의 변이에도 불구하고 실시예 3의 밀 SEP 백터를 이용하여 애기장대 *sep* 돌연변이체에 밀 SEP를 이형발현 (heterologous expression) 시켰을 경우 하배축 길이와 세포길이와 잎의 길이 및 개화시기가 부분 혹은 온전히 회복되었다 (도 6).

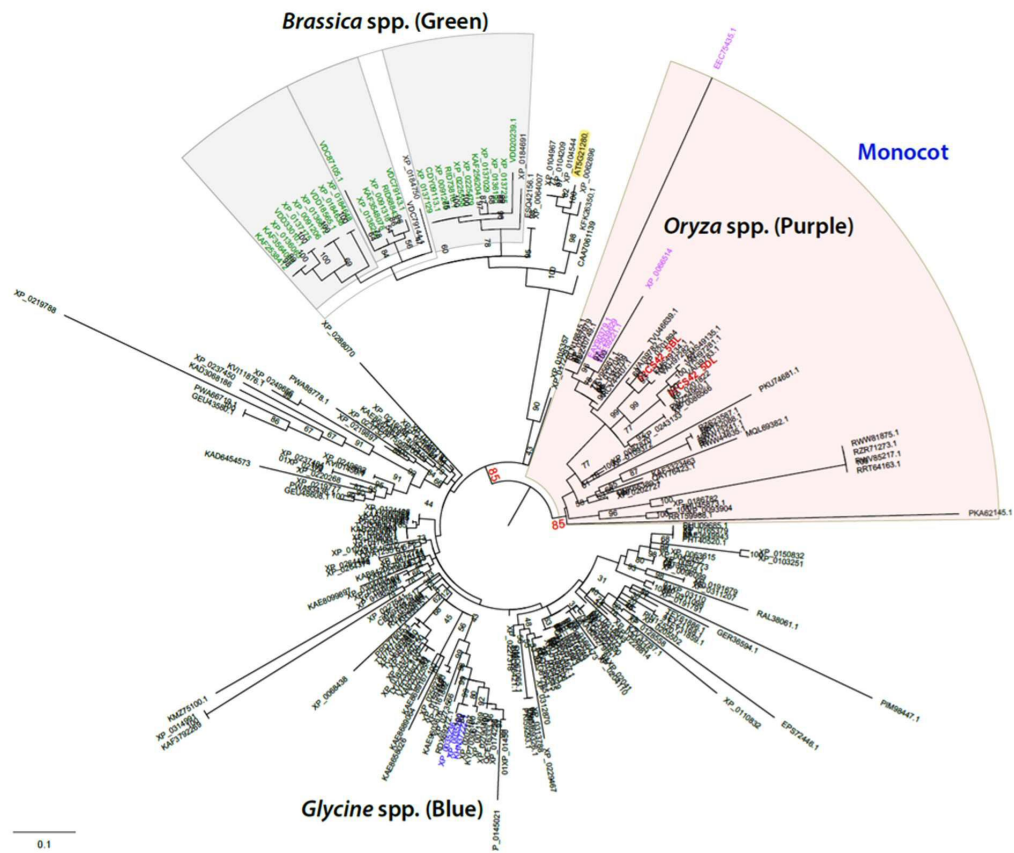
[0164] 상기 결과는 변이 지역보다는 보존서열 영역이 SEP 생화학적 기능에 중요함을 시사하였다.

[0166] 상기 실시예의 결과로부터, 애기장대 또는 밀 유래의 핵 단백질 SEP가 지방산 분해와 퍼옥시좀 생성에 관여하는 유전자량을 조절함으로써 식물의 생장과 개화시기 등을 조절하는 것을 확인하였으며, *sep* 돌연변이 시 지방산 분해대사가 저해되어 식물체 하배축, 잎 면적, 생체량, 개화시기, 세포길이 생장이 지연되는 바, *sep* 유전자를 포함하는 재조합 백터로 식물세포를 형질전환시켜 *sep* 유전자의 발현을 조절함으로써, 식물체의 지방산 함량과 조성, 생장과 개화시기, 종자발아, 식물세포 크기, 식물체 내 지질분해, 식물체 내 글리옥실산 회로, 및 글리옥시좀/퍼옥시좀 생산을 조절할 수 있다.

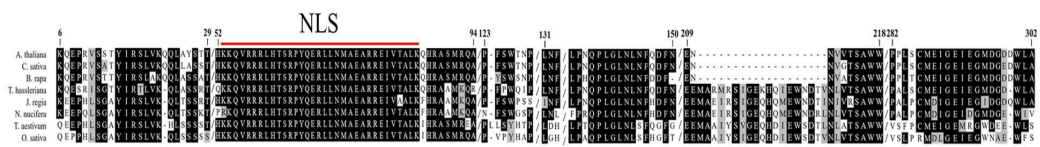
[0168] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

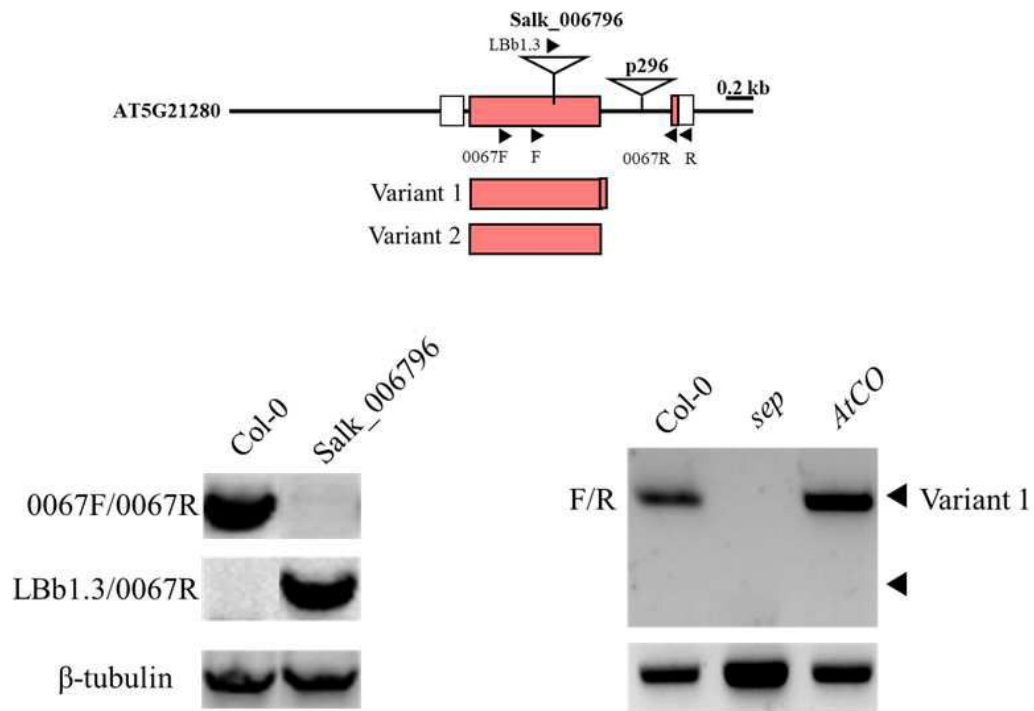
도면1a



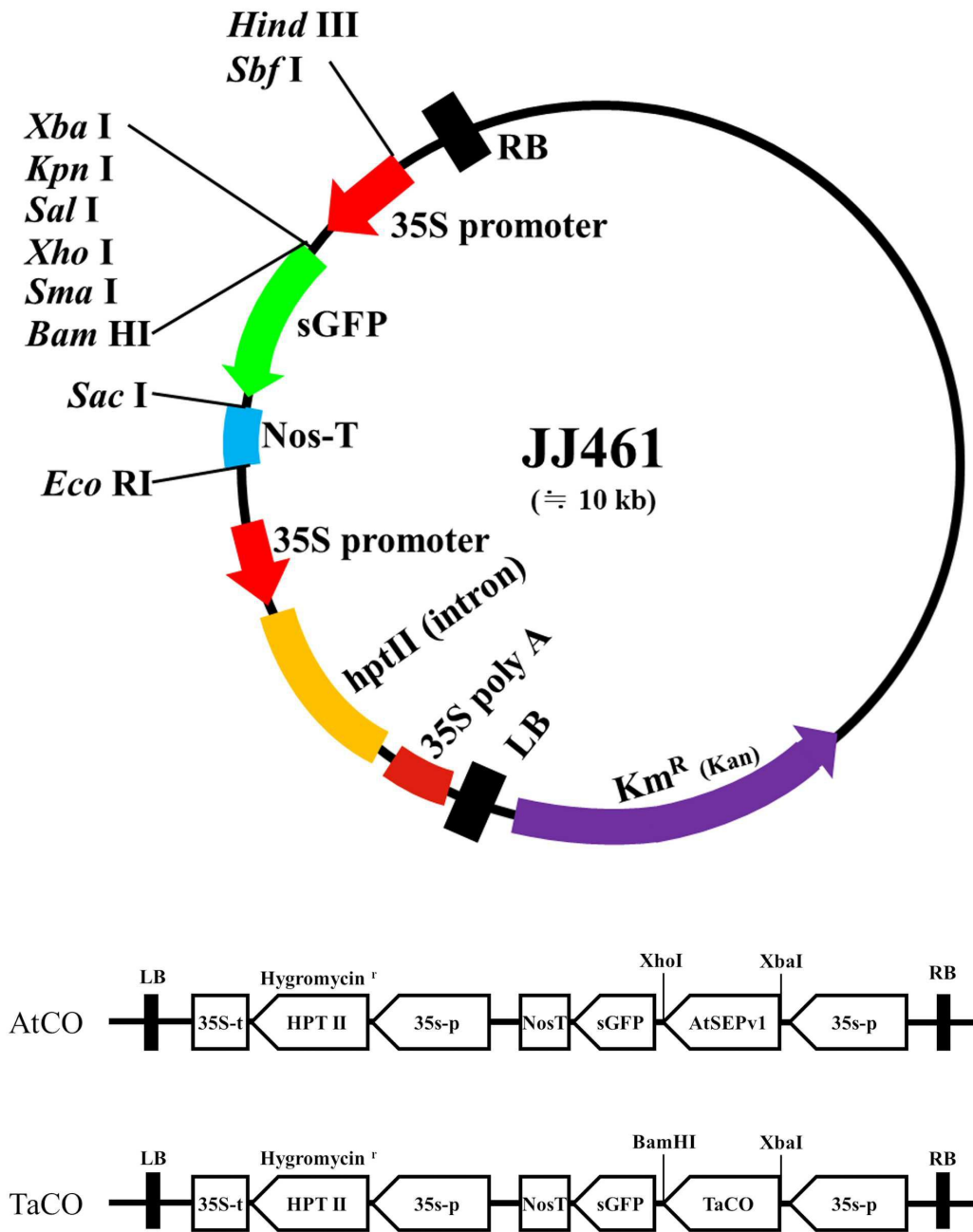
도면1b



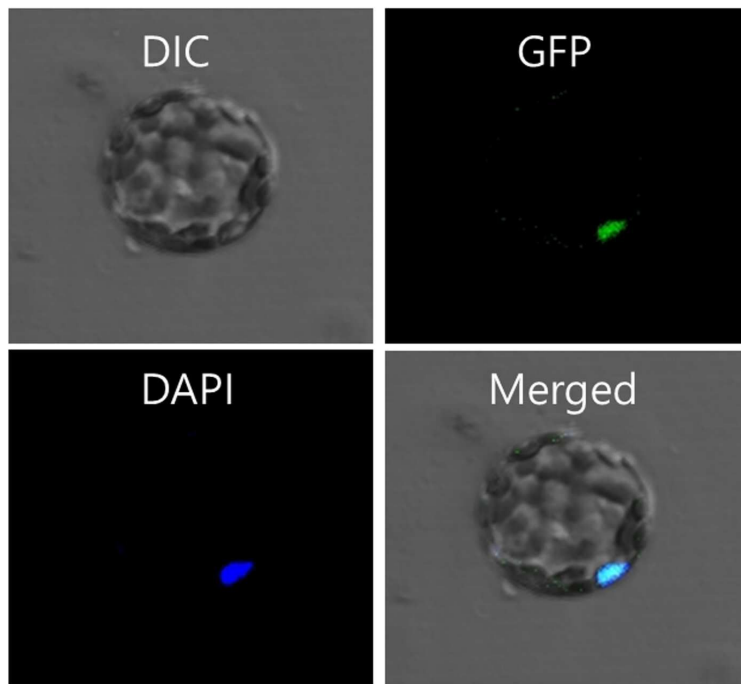
도면2a



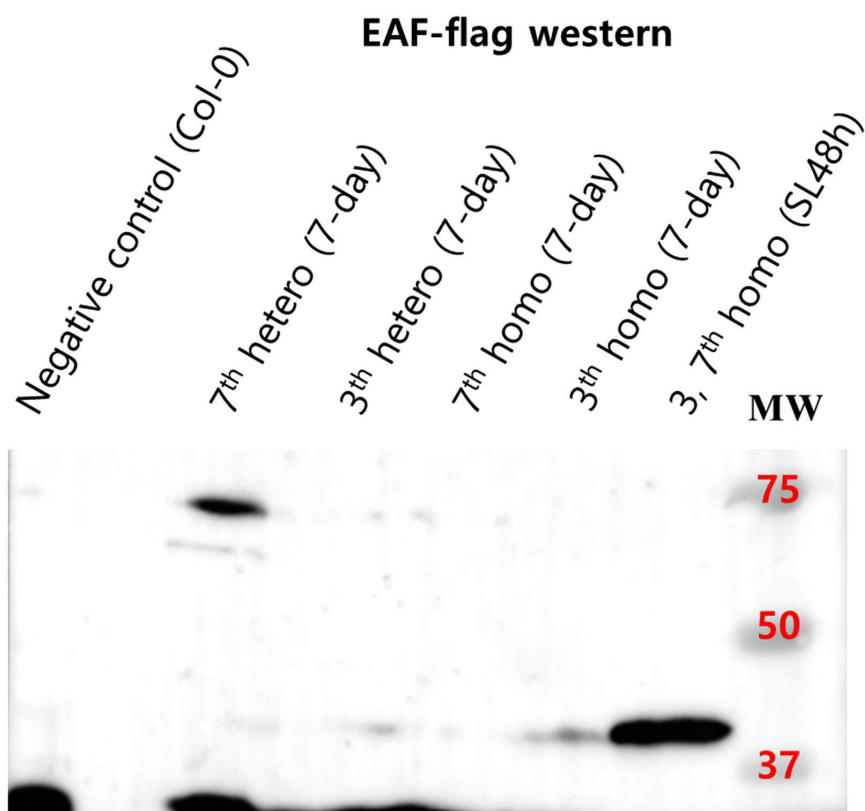
도면2b



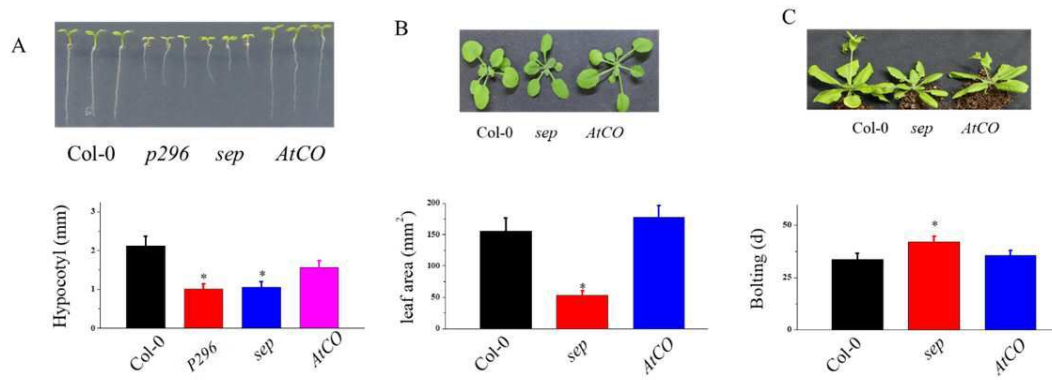
도면2c



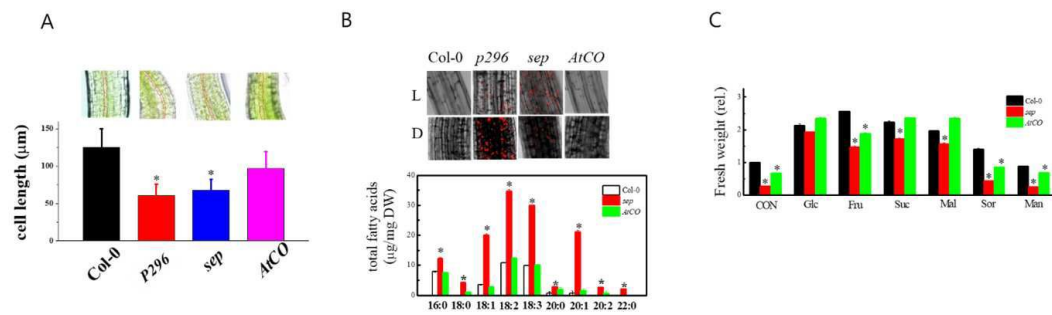
도면2d



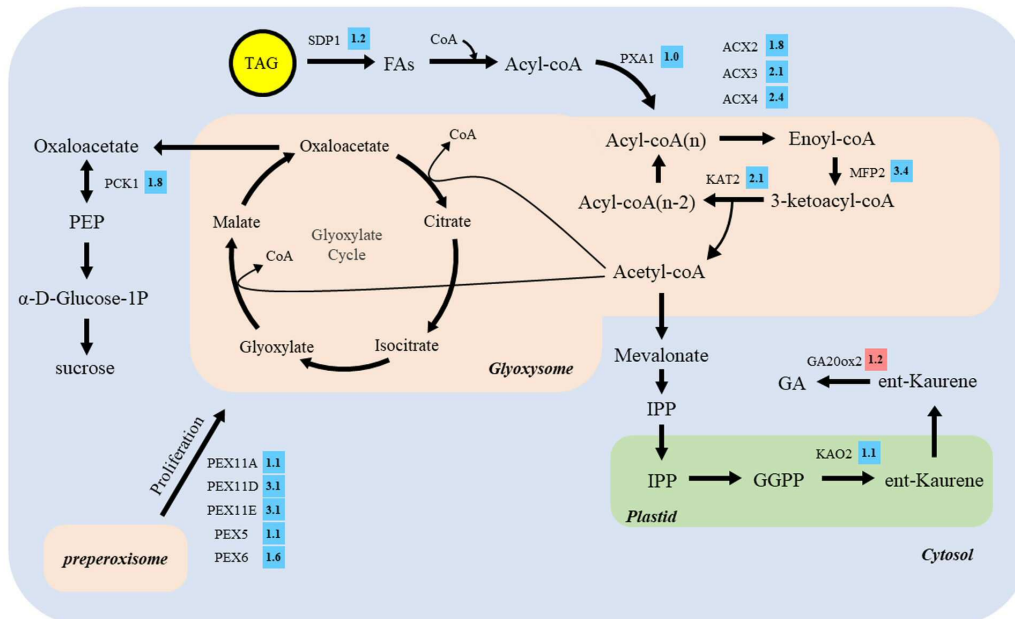
도면3



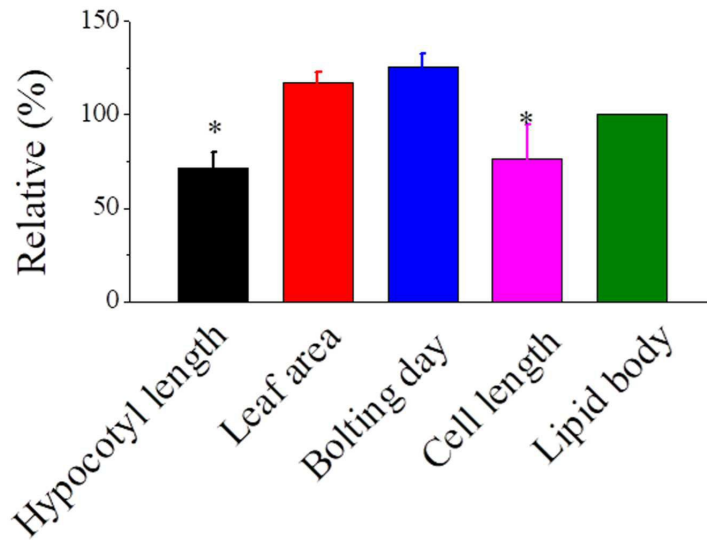
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)

<120> Plant growth regulatory genes encoding seeds plant specific
extensin motif containing proteins and uses thereof

<130> KPA200896-KR

<160> 17

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2047

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> At5G21280 nucleotide

<400> 1

caaaagtaca cacagagaca ctgttagctc ttaagtaata tgtcatcgta agcaacaaaa 60

aaaaatgaaa gagcaactaa ttctcatttc tgataatatt ttctgatttt tcacaaaaat 120

aaaattctgt aaaattgggc tagagcagag tatttatatc acccagagc ctttgccttc 180

tcttccttct tcatcacctc tcttcttctt tctgttctct ttccggagac atttgtctaa 240

atctcatcat cattcacaat ttactcaaac aaaaccttga gaaagagaaa aaaatgatcc 300

aagagaagaa gaaaaacctt ttaatgtctt ctcaagtga aaccataact aaaatcttta 360

atggtcagat caacaagca agaaccacgc gtctcttcta cttacatccg atctctcgtg 420

aagcaacaac ttgcttattc caccactatg accaccacca ccacaacaac aacaaacgat 480

ggtagcggcg gcggaaaaac gcaaacgcaa acgcacaaga aacaagtgag gaggcgactt 540

 cacacaagcc gtccttatca agaacgtctc ctaaacaatgg ctgaagctcg tcgcgaaatc 600
 gtcaccgctt taaaacaaca tcgtgcttcc atgagacaag ccacaagaat cccaccgcct 660
 caaccacccc caccaccgca gcctctaaat cttttctctc cgccgcctcc tctcctcct 720
 ccgcatccat tttcttggac gaatccatct ctcaatttcc tctcctctaa tcaaccctta 780
 gggttaaacc taaacttcca agatttcaac gacttcatcc aaacctctc aacaacatct 840
 tcatcatcat ctctctccac ttcatcttcc tcctcctcga ttttccgac gaatcctcat 900
 atctactctt ccccttcacc tctcctccact ttcaccaccg ccacttcaga ttcagctcct 960

 caactaccgt ctctctctaa tggagaaaaac aacgtggtga cgtcagcttg gtggtcagaa 1020
 ctcatgttga agacggttga gccggagatt aaaccgaaa cggaagaagt catcgtatgc 1080
 gaagatgacg tgtttccaaa gtttagtgac gtcattggaat ttccttcgtg gttaaaccaa 1140
 acagaggaag aattatttca tcttataat ctactgatc attactcatc atctcctcat 1200
 aatcctccat tatcctggta attattttgt atttattttt cactacttag aattaaagtt 1260
 attttgatcg gtgttgtttt tctcctcgga tcaccggtgg cgaaaattgc ggcggttctt 1320
 gcataaactt cagtgtattga gtttgagaca gaacacagaa aaaacagaat cgttcttttg 1380

 tttggttttg ataattaat cggagtattt ggattaaaaa tatgtgaaag ctgtggtat 1440
 gagaaggatc cacataggtt tattgcacga tctgaagctg tccatttttt tcttttagta 1500
 tatggtccaa tgataaataa tatcgccgac atctataaaa cactatcctt acccattttt 1560
 tctgaactgt cccaaaaccg tcttgacgtc accgatata aattatattt ttgttatgtt 1620
 atcattgcac ttgcattatt caaatttggg tgttacttgt taggtaaatt atatatctct 1680
 tttgtgtgtt ctaatgaaac atttttgatg tgtgatattc tttttacagt atggagattg 1740
 gagaaattga aggcatggat ggagacgact ggcttgcttg aaccacaaag attgattact 1800

 gttttttttt tcagacatga tgaatcaact ctttggttat tttcttatta tttttacctt 1860
 attttatttg tttttcttta taattttttc tttttgtttg gtgacatttt aatgaatctt 1920
 taaaaataac aacaagcctg cggagagaaa atgttcgatt tggcaaagcc acatgaatga 1980
 agtaaaactt tcattttcgt tgattgactt tgttttttgt taataactta ttattagact 2040
 ttaaatg 2047

 <210> 2
 <211> 1155
 <212> DNA
 <213> Unknown

<220><223> TraesCS5B02G518900.1 nucleotide

<400> 2

atgaggaacc agaggctagc tcctatcact tgcctctctt caaagaccaa caacaccaag	60
cgagaggagc cacacctctc cggggcttac attaggagcc ttgtgaagca tcttagctcc	120
tcctctacgg cgagatccaa agaccacat cacatcacca tgggctccaa atcacaccaa	180
gaagagcaac aagccccaca aaccacacca tcctctctac agcaacagca gccacacaag	240
aagcaggtga ggaggaggct ccacacgagc aggccatc aggagaggct actcaacatg	300
gcggaggcca ggcgagagat cgtcaccgct ctcaagatcc acagagcctc catgagagaa	360
gccaaggagc agcagcagca tcaacaactt gtgcaacaat tgcagcatca gcaagaagtc	420
caggtagtgc aagatcatag ggtagctttt agtgcacca acatgagctc atatggttcc	480
ttctcagatt acttgacaaa tagttacceca ttgaacact ccacagcacc aagcaacagt	540
ggttgctcat attattcctc tctccactc ctcccttacc acacaccagt cgttgcaccc	600
atggttccca tggtagatgc tttagatcag ttgctgtcgc tgcctacgca gccactaggg	660
ctcaacctga cattcgatgg ctccaatggt ggtgttgctg ccgaagatgc caagaactgc	720
actgctacta gccccttga tctccttcg ttggtccaac aaccatcacc tgcctcctcc	780
tactctgtct actcctctcc accgtggcg acgatggtga gccaggacat ggcgtccgct	840
gctgccgaga acacctcaca gttgctgcac cgggtgctgg acgaggagga gatggcggcg	900
atccactcgg ccggggagcg gcatgacatc gattggagcg acaccgtgaa cctggccacg	960
tcggcgtggt ggagcaggct actcagagat gtggaaggcg gtgaagacga tgatggggcc	1020
gcggcggcgc agcagactaa cacggtggac gccatgggga tgcatctgag tgatgagtgc	1080
tacggccaag acgtgtcctt tccatgtatg gacatcggag agatcgaagg atgggacgcc	1140
gagtgtttct catga	1155

<210> 3

<211> 302

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> At5G21280 amino acid

<400> 3

Met	Val	Arg	Ser	Asn	Lys	Gln	Glu	Pro	Arg	Val	Ser	Ser	Thr	Tyr	Ile
1															
Arg	Ser	Leu	Val	Lys	Gln	Gln	Leu	Ala	Tyr	Ser	Thr	Thr	Met	Thr	Thr

20					25					30						
Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Asn	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Lys	Thr	Gln
35					40					45						
Thr	Gln	Thr	His	Lys	Lys	Gln	Val	Arg	Arg	Arg	Leu	His	Thr	Ser	Arg	
50					55					60						
Pro	Tyr	Gln	Glu	Arg	Leu	Leu	Asn	Met	Ala	Glu	Ala	Arg	Arg	Glu	Ile	
65					70					75					80	
Val	Thr	Ala	Leu	Lys	Gln	His	Arg	Ala	Ser	Met	Arg	Gln	Ala	Thr	Arg	
85					90					95						
Ile	Pro	Pro	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Gln	Pro	Leu	Asn	Leu	Phe	
100					105					110						
Ser	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro	Asp	Pro	Phe	Ser	Trp	Thr	Asn	
115					120					125						
Pro	Ser	Leu	Asn	Phe	Leu	Leu	Pro	Asn	Gln	Pro	Leu	Gly	Leu	Asn	Leu	
130					135					140						
Asn	Phe	Gln	Asp	Phe	Asn	Asp	Phe	Ile	Gln	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	
145					150					155					160	
Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ile	Phe	Pro	
165					170					175						
Thr	Asn	Pro	His	Ile	Tyr	Ser	Ser	Pro	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	Phe	Thr	
180					185					190						
Thr	Ala	Thr	Ser	Asp	Ser	Ala	Pro	Gln	Leu	Pro	Ser	Ser	Ser	Asn	Gly	
195					200					205						
Glu	Asn	Asn	Val	Val	Thr	Ser	Ala	Trp	Trp	Ser	Glu	Leu	Met	Leu	Lys	
210					215					220						
Thr	Val	Glu	Pro	Glu	Ile	Lys	Pro	Glu	Thr	Glu	Glu	Val	Ile	Val	Val	
225					230					235					240	
Glu	Asp	Asp	Val	Phe	Pro	Lys	Phe	Ser	Asp	Val	Met	Glu	Phe	Pro	Ser	
245					250					255						
Trp	Leu	Asn	Gln	Thr	Glu	Glu	Glu	Leu	Phe	His	Pro	Tyr	Asn	Leu	Thr	
260					265					270						

Asp His Tyr Ser Ser Ser Pro His Asn Pro Pro Leu Ser Cys Met Glu

275 280 285
Ile Gly Glu Ile Glu Gly Met Asp Gly Asp Asp Trp Leu Ala

290 295 300

<210> 4

<211> 384

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> TraesCS5B02G518900.1 amino acid

<400> 4

Met Arg Asn Gln Arg Leu Ala Pro Ile Thr Cys Ser Ser Ser Lys Thr

1 5 10 15

Asn Asn Thr Lys Arg Glu Glu Pro His Leu Ser Gly Ala Tyr Ile Arg

20 25 30

Ser Leu Val Lys His Leu Ser Ser Ser Ser Thr Ala Arg Ser Lys Asp

35 40 45

His His His Ile Thr Met Gly Ser Lys Ser His Gln Glu Glu Gln Gln

50 55 60

Ala Pro Gln Thr Thr Pro Ser Ser Leu Gln Gln Gln Gln Pro His Lys

65 70 75 80

Lys Gln Val Arg Arg Arg Leu His Thr Ser Arg Pro Tyr Gln Glu Arg

85 90 95

Leu Leu Asn Met Ala Glu Ala Arg Arg Glu Ile Val Thr Ala Leu Lys

100 105 110

Ile His Arg Ala Ser Met Arg Glu Ala Lys Glu Gln Gln Gln His Gln

115 120 125

Gln Leu Val Gln Gln Leu Gln His Gln Gln Glu Val Gln Val Val Gln

130 135 140

Asp His Arg Val Ala Phe Ser Ala Pro Asn Met Ser Ser Tyr Gly Ser

145 150 155 160

Phe Ser Asp Tyr Leu His Asn Ser Tyr Pro Phe Glu His Ser Thr Ala

	165	170	175
Pro Ser Asn Ser Gly Cys Ser Tyr Tyr Ser Ser Pro Pro Leu Leu Pro			
	180	185	190
Tyr His Thr Pro Val Val Ala Pro Met Val Pro Met Val Asp Ala Leu			
	195	200	205
Asp Gln Leu Leu Ser Leu Pro Thr Gln Pro Leu Gly Leu Asn Leu Thr			
	210	215	220
Phe Asp Gly Phe Asn Gly Gly Val Ala Ala Glu Asp Ala Lys Asn Cys			
225	230	235	240
Thr Ala Thr Ser Pro Phe Asp Pro Pro Ser Leu Val Gln Gln Pro Ser			
	245	250	255
Pro Ala Ser Ser Tyr Ser Val Tyr Ser Ser Pro Pro Leu Ala Thr Met			
	260	265	270
Val Ser Gln Asp Met Ala Ser Ala Ala Ala Glu Asn Thr Ser Gln Leu			
	275	280	285
Leu His Arg Val Leu Asp Glu Glu Glu Met Ala Ala Ile His Ser Ala			
	290	295	300
Gly Glu Arg His Asp Ile Glu Trp Ser Asp Thr Val Asn Leu Ala Thr			
305	310	315	320
Ser Ala Trp Trp Ser Arg Leu Leu Glu Ser Val Glu Gly Gly Glu Asp			
	325	330	335
Asp Asp Gly Ala Ala Ala Ala Gln Gln Thr Asn Thr Val Asp Ala Met			
	340	345	350
Gly Met His Leu Ser Asp Glu Cys Tyr Gly Gln Asp Val Ser Phe Pro			
	355	360	365
Cys Met Asp Ile Gly Glu Ile Glu Gly Trp Asp Ala Glu Trp Phe Ser			
	370	375	380
<210>	5		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		

<220><223> 0067LP

<400> 5

atccatgcct tcaatttctc c 21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 0067RP

<400> 6

ttcacacaag ccgtccttat c 21

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LB1.3

<400> 7

atTTTgccga tttcggaac 19

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtSEP F

<400> 8

cctccacttc atcttcctca tc 22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtSEP R

<400> 9

cgcaggttg ttgtatTTT 20

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtSEP_GFP F

<400> 10

cctctagaat ggtcagatca aacaagcaag

30

<210> 11

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtSEP_GFP R

<400> 11

ccctcgagaa gcaagccagt cgtctccat

29

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TaSEP_GFP F

<400> 12

aatctagaat gaggaatcaa agattagct

29

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TaSEP_GFP R

<400> 13

aaggatccac gataaccact cctcatc

27

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-Tublin F

<400> 14

aagatccgtg aagagtaccc

20

<210> 15

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> beta-Tublin R

<400> 15

gactgtgagg gaacggtac

19

<210> 16

<211> 32

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> At5G21280 conserved sequences 1

<400> 16

Lys Gln Val Arg Arg Arg Leu His Thr Ser Arg Pro Tyr Gln Glu Arg

1 5 10 15

Leu Leu Asn Met Ala Glu Ala Arg Arg Glu Ile Val Thr Ala Leu Lys

20 25 30

<210> 17

<211> 25

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> At5G21280 conserved sequences 2

<400> 17

Leu Asn Phe Leu Leu Pro Asn Gln Pro Leu Gly Leu Asn Leu Asn Phe

1 5 10 15

Gln Asp Phe Asn Asp Phe Ile Gln Thr

20 25