

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0132732 (43) 공개일자 2011년12월09일
(51) Int. Cl. <i>A01H 5/00</i> (2006.01) <i>C12N 15/31</i> (2006.01) <i>C12N 15/82</i> (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	
(21) 출원번호 10-2010-0052227	(72) 발명자 이호정 서울특별시 강남구 역삼동 e편한 세상 106-1402호 홍석환 전남 광주시 신안동 삼익아파트 1-106호 추승희 인천광역시 부평구 부평2동 760-407	
(22) 출원일자 2010년06월03일 심사청구일자 2010년06월03일	(74) 대리인 김선애	

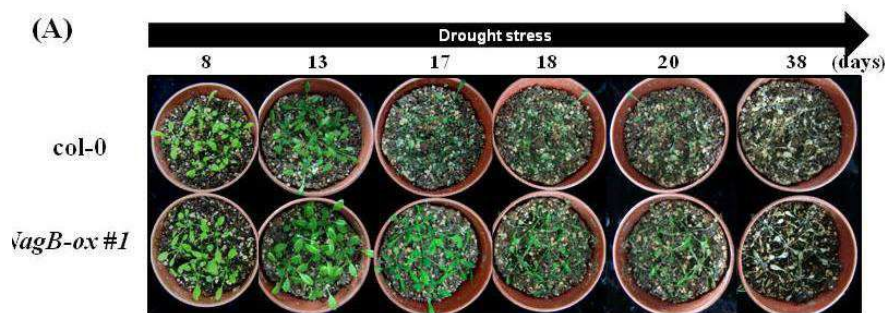
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 글루코사민 수준을 조절하여 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법 및 이에 의해 제조된 스트레스 내성 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 글루코사민 수준을 유전자 조작으로 조절하여 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법 및 이에 의해 제조된 스트레스 내성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 본 발명은 가뭄스트레스, 산화적 스트레스 또는 저온 스트레스 등 비생물 스트레스 내성 작물의 개발뿐만 아니라 항산화 기작에 대한 흐름을 밝히는 데도 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20090065693

부처명 한국학술진흥재단

연구관리전문기관

연구사업명 (이공)일반연구자지원-여성과학자

연구과제명 Myb 등 전사조절자의 과발현체를 이용한 능동적 식물이차대사 조절 기전 연구

기여율

주관기관 한국연구재단

연구기간 2009년 05월 01일 ~ 2010년 04월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

식물체 내 글루코사민 수준을 유전자 조작으로 조절하는 단계를 포함하는 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 대장균 *NagB* (glucosamine-6-phosphate deaminase) 유전자를 식물체에 도입하여 식물체 내 글루코사민 수준을 감소시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 대장균 *GlmS* (glucosamine-6-phosphate synthase) 유전자를 식물체에 도입하여 식물체 내 글루코사민 수준을 증가시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 산화적 스트레스, 가뭄 스트레스 및 저온 스트레스로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 스트레스인 것을 특징으로 하는 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법.

청구항 5

대장균 *NagB* (glucosamine-6-phosphate deaminase) 유전자가 도입된 비생물적 스트레스에 대해 내성을 갖는 형질전환 식물체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 비생물적 스트레스는 산화적 스트레스, 가뭄 스트레스 및 저온 스트레스로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 스트레스인 것을 특징으로 하는 비생물적 스트레스에 대해 내성을 갖는 형질전환 식물체.

청구항 7

대장균 *GlmS* (glucosamine-6-phosphate synthase) 유전자 및 열 충격 단백질101 유전자 (heat shock protein101 gene, *HSP101p*) 프로모터가 도입된 형질전환 식물체.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 글루코사민 수준을 조절하여 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법 및 이에 의해 제조된 스트레스 내성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 비생물적 스트레스 조건하에서 ROS 발생과 관련된 글루코사민의 체내 수준을 유전자 조작으로 조절하여 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법 및 이에 의해 제조된 스트레스 내성 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

식물은 고온, 염해, 건조, 공해, 상처, 냉해, 과도한 광조건, 오존, 과도한 UV 노출 및 삼투압 충격 (osmotic shock)과 같은 각종 비생물적 스트레스 (환경 스트레스)를 받게 되면 반응성이 높은 산소인 슈퍼옥사이드 음이온 라디칼 (superoxide anion radical), 과산화수소 및 수산화 라디칼 등의 활성산소를 축적하게 되며, 이들의

축적은 세포내의 다양한 생리학적 변화를 야기한다. 상기에서 증가된 활성산소에 대한 세포의 반응은 증가된 활성산소의 양에 의존 (dose dependent)한다. 즉, 세포 내에 증가된 활성산소 양이 미량일 때는 이들 활성산소는 세포내의 신호전달 물질로서 작용하여 식물생체 방어에 필요한 유전들 (항산화효소, 열충격 단백질 등)의 발현을 유도하게 되지만, 증가된 활성산소 양이 높을 때에는 반응성이 높은 활성산소가 생리적인 장해를 유발하여 세포를 죽음에 이르게 한다. 최근 많은 연구자들에 의해 식물에서 이들 활성산소에 의하여 매개되어지는 신호전달 경로에 대한 관심이 증가하고 있다. 왜냐하면 이들 경로를 조절하게 되면 세포내의 항산화 효소 및 생체방어 단백질의 발현을 증가시킬 수가 있고 궁극적으로는 각종 환경 스트레스에 저항성을 가진 식물체를 개발할 수가 있기 때문이다 (Kovtun et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000, 97(6):2940-45).

[0003] 한편, 소포체 (Endoplasmic Reticulum, ER)는 다양한 단백질로 구성된 잘 갖추어진 단백질 접힘 조직 (protein folding machinery)을 구비하고, 진핵세포에서 막-관련 및 분비된 단백질의 접힘과 변형을 위한 플랫폼으로서 역할을 한다 (Helenius, 1994). 잘못 접힌 단백질은 소위 ER-관련 분해 프로세스에 의해 세포질 26S 프로테아좀에 의해 분해되지 않는다면, 세포의 생존을 위협할 수 있다. ER 기능장애는 “품질보증 (quality control)” 감시 메커니즘 (surveillance mechanism)인, Unfolded Protein Response (UPR)을 유발하여, 이들 축적을 방지하기 위해 센서 단백질이 잘못 접힌 단백질을 찾고 단백질 샤페론 (chaperone)들이 재-접힘을 도와주게 된다 (Malhotra et al., 2007).

[0004] 동물에서, 글루코오스의 함량이 높으면 아미노당을 생산하는 글리코라이틱 경로 (glycolytic pathway)의 일부인 헥소사민 생합성 경로 (hexosamine biosynthesis pathway, HBP)가 활성화되어 몇몇의 해로운 효과가 발생한다 (Daniels et al., 1993; Du et al., 2000). 글루코사민은 플럭토오스-6-포스페이트의 아미드화에 의해 생성되는 자연발생 아미노당이다. CHO (Chinese hamster ovary), 제노퍼스 A6 (Xenopus A6), 및 백혈구 세포 (leukemic cells)에서, 글루코사민의 수준이 높으면 소포체 (Endoplasmic Reticulum, ER) 스트레스를 유발하고 UPR을 활성화시키는 것으로 나타났다 (Lin et al., 1993; Miskovic et al., 1997; Morin et al., 1993). 또한, 글루코사민은 인슐린-유도 글루코오스 흡수를 감소시켜 골격근 (Bailey and Turner, 2004) 및 지방세포 (Heart et al., 2000)에서 인슐린 저항성을 일으키는 것으로 보고되었다. ER 스트레스는 글루코사민과, 골격근 세포에서의 인슐린 저항성 사이의 분자적 링크를 나타낼 수도 있다 (Racti et al., 2010).

[0005] 식물에서 활성 산소종 (ROS)을 통해 비생물적 스트레스가 ER 스트레스 발달과 관련이 있다는 것을 나타내는 증거들이 증가되고 있다 (Jaspers, 2009). 삼투압 및 염분은 다양한 세포 반응에 유해하며 과도한 축적은 궁극적으로 세포의 사멸을 초래하는 ROS를 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Serrato et al. 2004; Borsani et al. 2005; Miao et al. 2006; Abbasi et al. 2007; Giraud et al. 2008). ROS-유도 세포 손상을 완화하기 위해, 세포는 ROS-제거 시스템을 확립하고 비생물적 스트레스에 대항한다 (Rizhsky et al. 2004b; Wang et al. 2005; Leshem et al. 2006; Abbasi et al. 2007; Koussevitzky et al. 2008).

[0006] 반대로, ROS는 병원균, 비생물적 스트레스 및 다른 발달 신호에 반응하여 유발되는 신호전달 변환을 조정하는 것으로도 알려져 있다 (Mittler et al. 2004; Torres & Dangl 2005). 따라서 비생물적 스트레스에 반응하여 세포 ROS 생성을 조절하는 상세한 메커니즘을 이해하면, 필드에서의 불리한 성장 조건에 대한 작물의 내성을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 중요한 ROS 제거제 (ROS-scavenger)인 구리-아연 수퍼옥사이드 디스무타제 (Cu/Zn-SOD)가 과발현되면, 애기장대에서 염분 스트레스에 대해 목질화 (lignification)가 진행되고, 내성이 생기게 된다 (Gill et al., 2010). 스트레스를 받은 세포에서, 단백질은 종종 적절하게 접힐 수 없고, ER 기능이 손상되어, ER 루멘에 이들이 축적되게 된다 (Liang et al., 2006). 식물체에서, 비생물적 스트레스는 ER 스트레스를 유발하고 UPR을 활성화시킨다. 막과 관련된, 베이직 도메인/루신 지퍼 (basic domain/leucine zipper, bZIP) 전사인자, bZIP28은 전형적으로 애기장대에서 ER 스트레스에 의해 활성화되어, UPR을 유도하며 (Liu and Howell, 2010), 이것은 비생물적 스트레스에 의해 유도된 ER 스트레스가 UPR에 의해 개선될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0007] 이전 연구에서, 본 발명자들은 글루코사민이 ROS의 유의적인 증가와 관련된 과정을 통해 애기장대에서 배축 신장을 저해한다는 증거를 제시하였다 (Ju et al., 2009). 그러나, 글루코사민에 의해 ER 스트레스가 유도되는 분자적 메커니즘은 확인되지 않았고, 식물 세포에서 글루코사민 유도 ER 스트레스와 비생물적 스트레스 반응 사이의 관계에 대해 알려진 바는 거의 없었다.

- [0008] 비생물적 스트레스 중 하나인 가뭄은 전세계적으로 작물 수확량 감소의 주요 요인 중 하나이다. 따라서 가뭄 스트레스 유전자의 조절을 통한 가뭄 저항성의 증가는 많은 물 부족 국가에서 뿐만 아니라 사막화가 진행되고 있는 다른 지역에서도 생산량의 증가를 기대 할 수 있는 기술이다. 세계의 많은 지역에서 물은 이미 비료만큼이나 큰 비용 요인이 되고 있는 상황이다. 현재 애기장대와 옥수수, 벼, 밀, 토마토 등 주요 작물들을 대상으로 하여 가뭄 스트레스 유전자에 대한 연구가 계속되고 있으며, 이를 이용한 품종 또한 계속해서 개발되고 있다.
- [0009] 이와 관련된 유전자로서는 농촌진흥청의 벼 유전자 SnRK2, 연세대 생물학과 김우택 교수팀의 PUB22 및 PUB23, 서울대학교 생물과학부 분자생물학 및 유전학 연구소의 NtHSP70-1, 도쿄대학교 생명과학대학의 배추 LEA 등이 알려져 있다.
- [0010] 가뭄 스트레스를 인지한 식물체 내에서 ABA의 양이 증가하고, ABA의 증가가 가뭄에 저항할 수 있는 유전자들의 발현을 촉진시킨다는 것이 가뭄 저항성을 연구하기 위해 가장 많이 알려진 정론이다. 때문에 ABA 신호전달 (signaling)에 관여하고 있는 유전자들을 조절함으로써 식물의 가뭄 저항성을 개발하는 것이 가장 널리 알려진 방법이다.
- [0011] 그러나 글루코사민(glucosamine)은 이전에는 식물에 어떤 영향을 미치는지 거의 알려지지 않았다. 본 발명자들은 글루코사민이라는 새로운 인자가 가뭄 등 비생물적 스트레스를 인지하는 신호전달 (signaling)에 관여하고 있다는 것을 밝혀내고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0012] (비특허문헌 0001) Abbasi A.R., Hajirezaei M., Hofius D., Sonnewald U. & Voll L.M. (2007) Specific roles of alpha- and gamma-tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco. *Plant Physiology* 143:1720-1738.
- (비특허문헌 0002) Abarca D, Roldin M, Martin M, Sabater B. (2001) *Arabidopsis thaliana* ecotype Cvi shows an increased tolerance to photo-oxidative stress and contains a new chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase isoenzyme, *J Exp Bot*, 52(360):1417-25.
- (비특허문헌 0003) Alvarez-Anorve LI, Bustos-Jaimes I, Calcagno ML and Plumbridge J. (2009) Allosteric regulation of glucosamine-6-phosphate deaminase (NagB) and growth of *Escherichia coli* on glucosamine. *J Bacteriology* 191:6401-6407.
- (비특허문헌 0004) Ashraf M, Ali Q. 2008. Relative membrane permeability and activities of some antioxidant enzymes as the key determinants of salt tolerance in canola (*Brassica napus* L.). *Env Exp Bot* 63: 266-273.
- (비특허문헌 0005) Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol Adv* 27: 84-93.
- (비특허문헌 0006) Bailey CJ, Turner SL (2004) Glucosamine-induced insulin resistance in L6 muscle cells. *Diabetes Obes Metab* 6:293-298
- (비특허문헌 0007) Burow M, Zhang ZY, Ober JA, Lambrix VM, Wittstock U, Gershenzon J, Kliebenstein DJ (2008) ESP and ESM1 mediate indol-3-acetonitrile production from indol-3-ylmethyl glucosinolate in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* 69:663-671
- (비특허문헌 0008) Buse MG (2006) Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *American journal of physiology* 290:E1-E8
- (비특허문헌 0009) Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J Exp Bot* 55: 225-236.
- (비특허문헌 0010) Daniels MC, Kansal P, Smith TM, Paterson AJ, Kudlow JE, McClain DA (1993) Glucose

regulation of transforming growth factor alpha expression is mediated by products of the hexosamine biosynthesis pathway. *Molecular Endocrinol* 7:1041-1048

(비특허문헌 0011) Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M (2000) Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Aca Sci USA* 97:12222-12226.

(비특허문헌 0012) Duan Y, Zhang W, Li B, Wang Y, Li K, Sodmergen, Han C, Zhang Y, Li X (2010) An endoplasmic reticulum response pathway mediates programmed cell death of root tip induced by water stress in *Arabidopsis*. *New Phytologist*. In press

(비특허문헌 0013) Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, Inanaga S, Tanaka K. 2007. Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* 225: 1255-1264.

(비특허문헌 0014) Gill T, Sreenivasulu Y, Kumar S, Singh Ahuja P. (2010) Over-expression of superoxide dismutase exhibits lignification of vascular structures in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiology* (in press)

(비특허문헌 0015) Giraud E., Ho L.H., Clifton R., et al.(2008) The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. *Plant Physiology* 147:595-610.

(비특허문헌 0016) Gupta AS, Heinen JL, Holaday AS, Burke JJ, Allen RD. 1993. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1629-1633.

(비특허문헌 0017) Heart E, Choi WS, Sung CK (2000) Glucosamine-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 278:E103-E112

(비특허문헌 0018) Helenius A. (1994) How N-linked oligosaccharides affect glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum. *Molecular biology of the cell* 5:253-265

(비특허문헌 0019) Jaspers P, Kangasjarvi J (2009) Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiol Plant*.

(비특허문헌 0020) Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO.J.* 20, 3901-3907.

(비특허문헌 0021) Jiang H, Wang S, Dang L, Wang S, Chen H, Wu Y, Jiang X, Wu P.A. (2005) A Novel Short-Root Gene Encodes a Glucosamine-6-Phosphate Acetyltransferase Required for Maintaining Normal Root Cell Shape in Rice, *Plant physiology*, vol. 138m pp. 232-242

(비특허문헌 0022) Ju HW, Koh EJ, Kim SH, Kim KI, Lee H and Hong SW (2009) Glucosamine causes overproduction of reactive oxygen species, leading to repression of hypocotyl elongation through a hexokinase-mediated mechanism in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol*. 166:203-212.

(비특허문헌 0023) Kalamorz F, Reichenbach B, Marz W, Rak B, Gorke B. (2007) Feedback control of glucosamine-6-phosphate synthase GlnS expression depends on the small RNA GlnZ and involves the novel protein YhbJ in *Escherichia coli*. *Mol Microbiology* 65:1518-1533.

(비특허문헌 0024) Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L., Sha W., Cortes D., Shulaev V. & Mittler R. (2008) Ascorbate peroxidase plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *Journal of Biological Chemistry* 283, 34197-34203.

(비특허문헌 0025) Leshem Y., Melamed-Book N., Cagnac O., Ronen G., Nishri Y., Solomon M., Cohen G. & Levine A. (2006) Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America 103, 18008-18013.

(비특허문헌 0026) Liang SH, Zhang W, McGrath BC, Zhang P, Cavener DR (2006) PERK (eIF2 α kinase) is required to activate the stress-activated MAPKs and induce the expression of immediate-early genes upon disruption of ER calcium homeostasis. *Biochem J* 393:201-209

(비특허문헌 0027) Lin H, Masso-Welsh P, Di Y, Cai J, Shen J, Subjeck JR (1993) The 170-kDa glucose-regulated stress protein is an endoplasmic reticulum protein that binds immunoglobulin. *Mol Biol Cell* 4:1109-1119

(비특허문헌 0028) Malhotra J and Kaufman RJ (2007) Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *Antioxidants & redox signaling* 9:2277-2293

(비특허문헌 0029) Miao Y., Lv D., Wang P., Wang X.C., Chen J., Miao C. & Song C.P. (2006) An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *The Plant Cell* 18, 2749-2766.

(비특허문헌 0030) Miskovic D, Salter-Cid L, Ohan N, Flajnik M, Heikkila JJ: Isolation and characterization of a cDNA encoding a *Xenopus* immunoglobulin binding protein, BiP (GRP78). *Comp Biochem Physiol* 116:227-234, 1997

(비특허문헌 0031) Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. & Van Breusegem F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-498.

(비특허문헌 0032) Morin MJ, Porter CW, McKernan P, Bernacki RJ: The biochemical and ultrastructural effects of tunicamycin and D-glucosamine in L1210 leukemic cells. *J Cell Physiol* 114:162-172, 1993

(비특허문헌 0033) Raciti GA, Iadicicco C, Ulianich L, Vind BF, Gaster M, Andreozzi F, Longo M, Teperino R, Ungaro P, Di Jeso B, Formisano P, Beguinot F, Miele C. (2010) Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress affects GLUT4 expression via activating transcription factor 6 in rat and human skeletal muscle cells. *Diabetologia*. 2010 Feb 18. [Epub ahead of print]

(비특허문헌 0034) Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S. & Mittler R. (2004b) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134, 1683-1696.

(비특허문헌 0035) Serrato A.J., Perez-Ruiz J.M., Spinola M.C. & Cejudo F.J. (2004) A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 43821-43827

(비특허문헌 0036) Sharma SS, Dietz KJ. 2009. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. *Trends Plant Sci* 14: 4350.

(비특허문헌 0037) Shi QH, Zhu ZJ. 2008. Effects of exogenous salicylic acid on manganese toxicity, element contents and antioxidative system in cucumber. *Environ Exp Bot* 63: 317-326.

(비특허문헌 0038) Taylor N.L., Yew-Foon Tan YF., Jacoby R.P. and A. Harvey Millar A.H. (2008) Abiotic environmental stress induced changes in the *Arabidopsis thaliana* chloroplast, mitochondria and peroxisome proteomes. *Journal of Proteomics* 72: 367-378

(비특허문헌 0039) Torres M.A. & Dangel J.L. (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 397-403.

(비특허문헌 0040) Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R. 2009. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat Res* 681: 134-149.

(비특허문헌 0041) Wang F.Z., Wang Q.B., Kwon S.Y., Kwak S.S. & Su W.A. (2005) Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *Journal of Plant Physiology* 162, 465-472

(비특허문헌 0042) Yamasaki H, Abdel-Ghany SE, Cohu CM, Kobayashi Y, Shikanai T, Pilon M. (2007)

Regulation of Copper Homeostasis by Micro-RNA in Arabidopsis, J Biol Chem, 282:16369-16378.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명자들은 체내 글루코사민 (endogenous glucosamine)의 수준을 형질전환에 의해 조작하여 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성에 영향을 미칠 수 있다는 것을 확인하였다. 체내 글루코사민의 수준을 유전적으로 조절하면 비생물적 스트레스에 내성인 형질전환 작물을 효과적으로 제공할 수 있다고 할 수 있다.
- [0014] 따라서 본 발명의 목적은 식물체 내의 글루코사민의 수준을 조절하여 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적은 대장균 *NagB* (glucosamine-6-phosphate deaminase) 유전자가 도입된 비생물적 스트레스에 대한 내성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 식물체 내 글루코사민 수준을 유전자 조작으로 조절하는 단계를 포함하는 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0018] 본 발명자들은 식물체내의 글루코사민이 비생물적 스트레스의 조건 하에서 ROS-유도 식물 세포 사멸의 조정자인 것을 최초로 발견하였다. 본 발명은 형질전환 식물체를 제조하여 글루코사민-유도 ROS 스트레스와 애기장대의 비생물적 스트레스 반응과의 관계를 확인하였다. 보다 구체적으로 대장균 글루코사민-6-포스페이트 디아미나제 (*E.coli* glucosamine-6-phosphate deaminase, *NagB*)의 에토픽 발현 (etopoic expression)에 의해 체내 글루코사민이 제거되면 산화적, 가뭄 및 저온 스트레스에 대한 내성이 향상되는 것이 관찰되었다. 이 결과와 일치되게, 대장균 글루코사민-6-포스페이트 신타제 (*E.coli* glucosamine-6-phosphate synthase, *GlmS*)의 에토픽 발현에 의해 글루코사민이 과발현되면 초기 단계에서 세포 사멸이 유도되었다.
- [0019] 이런 결과들을 종합해 보면 식물체 체내에 글루코사민이 감소하면 비생물적 스트레스에 대한 내성이 증가하는 반면, 식물체 체내에 글루코사민이 증가하면 비생물적 스트레스에 대한 내성이 감소하여 사멸할 수도 있는 것으로 나타났다. 따라서 상기 식물체 내의 글루코사민의 수준을 조절하면 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성을 조절할 수 있다. 이를 이용하여 식물체 내의 글루코사민의 수준을 감소시켜 비생물적 스트레스에 내성인 식물체를 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 식물체 내의 글루코사민의 수준을 증가시켜 세포사멸을 유도하여 원하지 않는 작물을 제거할 수도 있다.
- [0020] 상기 식물체 내의 글루코사민 수준을 유전자 조작으로 감소시키는 것은 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 공지된 다양한 방법을 통해 글루코사민의 생성을 억제하거나 분해를 촉진하는 유전자를 도입하여 이루어질 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 대장균 *NagB* (glucosamine-6-phosphate deaminase) 유전자 (Accession No. AF052007)를 식물체에 도입하여 식물체 내 글루코사민 수준을 감소시켰다. *NagB* 유전자는 대장균에서 *nagEnagBACD* 오페론의 디버전트 (divergent) 부분 (Alvarez-Anorve et al., 2009) 이고, 글루코사민-6P (glucosamine-6P, GlcN6P)의 분해에 관여한다.
- [0021] 상기 식물체 내의 글루코사민 수준을 유전자 조작으로 증가시키는 것은 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 공지된 다양한 방법을 통해 글루코사민의 합성과 관련된 유전자를 도입하여 이루어질 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 대장균 *GlmS* (glucosamine-6-phosphate synthase) 유전자 (Accession No. AY616611)를 식물체에 도입하여 식물체 내 글루코사민 수준을 증가시켰다. 상기 *GlmS*는 글루코사민의 생합성에서 속도조절 반응을 촉매 시킨다.
- [0022] 본 발명에서, 상기 비생물적 스트레스는 이에 한정되는 것은 아니나 산화적 스트레스, 가뭄 스트레스 및 저온 스트레스로 이루어진 그룹에서 선택되는 하나 이상의 스트레스일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선

택된 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료작물류일 수 있다. 바람직하게는, 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 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, 또는 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있으며, 가장 바람직하게는 애기장대이다.

[0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 대장균 *NagB* (glucosamine-6-phosphate deaminase) 유전자가 도입된 비생물적 스트레스에 대한 내성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.

[0025] 상기 대장균 *NagB* (glucosamine-6-phosphate deaminase) 유전자를 도입하는 방법은 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 공지된 다양한 방법을 이용할 수 있다. 상기에서 식물 형질전환용 발현벡터가 이용될 수 있으며 상기 발현벡터는 콜리플라워 모자이크 바이러스의 35S 프로모터를 갖는 식물 형질전환용 발현벡터일 수 있고, *pCambia* 1300 또는 *pBI121* 등의 벡터를 사용하는 것이 바람직하다. 상기에서 식물체에 형질전환시키는 방법은 일반적인 식물 형질전환 방법이 사용될 수 있고 (Horsch et al., Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1985, 50:433-7; Rogers et al., 1986), 식물 형질전환용 발현벡터를 아그로박테리아를 이용하거나 입자 충격 방법으로 식물체에 도입하여 형질전환 식물체를 제조하는 것이 바람직하다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 대장균 및 애기장대의 게놈 DNA의 증폭된 DNA는 바이너리 벡터 *pBI121* (Promega Corp., WI, USA)로 도입되었고, 플로라 딥 방법 (floral dipping method)에 의해 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101 (*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101)을 이용하여 애기장대를 형질전환 시켰다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 대장균 *GlmS* (glucosamine-6-phosphate synthase) 유전자 및 열 충격 단백질101 유전자 (heat shock protein101 gene, *HSP101p*) 프로모터 (Accession No. AF133840)가 도입된 형질전환 식물체를 제공한다. 상기 글루코사민의 과발현에도 불구하고 생존이 가능하다. 정상 성장 중의 식물에 원하는 시기에 글루코사민이 과발현을 유도하여 식물의 변화양상을 관찰할 수 있다. 이는 *GlmS*로 인한 글루코사민의 과발현으로 초기 발육과정에서 죽는 형질전환 식물체의 단점을 보완하여 생체 내에서 과발현된 글루코사민에 대한 식물체의 반응 메커니즘 연구에 유용하게 활용될 수 있다.

[0027] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

[0028] 본 발명은 글루코사민에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 대장균 *NagB* 과발현의 효과 등을 확인하여 비생물적 스트레스에 대한 식물체의 내성과 관련된 글루코사민의 기능을 밝혀냈다. 본 발명자들은 체내 글루코사민의 수준을 조절하기 위해 *NagB-ox* 및 *GlmS-ox* 형질전환 애기장대를 제조하였고 (도 1 및 도 9), *E. coli NagB*의 에토픽 발현 (etopoic expression)을 이용하여 체내 글루코사민을 제거하여 염분 스트레스를 제외한 산화, 가뭄 또는 저온 스트레스에 대한 내성이 향상되는 것을 관찰하였다 (도 4, 도 6 및 도 7). 이 발견과 부합되게, *E.coli GlmS*의 에토픽 발현 (etopoic expression)에 의한 글루코사민 과발현은 초기 유묘 단계에서 세포의 사멸을 초래하였다 (도 10).

[0029] 일반적으로 환경적 요소들에 의해 식물의 성장 및 발달이 영향을 받는다. 스트레스를 받는 상황을 접하게 되면, 식물 세포는 이온 균형 및 삼투압 항상성에 손상을 받아 세포 항상성을 재정립하고 손상된 단백질 또는 막 시스템을 개선하기 위해 신호전달 변환 캐스케이드 (signal transduction cascade)가 일어나게 된다 (Chinnusamy et al., 2004; Tuteja et al., 2009). 삼투압 스트레스는 ROS 수준을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (Serrato et al. 2004; Borsani et al. 2005; Miao et al. 2006; Abbasi et al. 2007; Giraud et al. 2008). 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 (superoxide dismutase), 카탈라아제 (catalase), 아스코르베이트 퍼옥시다제 (ascorbate peroxidase), 글루타치온 리덕타제 (glutathione reductase), 아스코르브산 (ascorbic acid), 토코페롤 (tocopherol), 글루타치온 (glutathione), 및 페놀 화합물 (phenolic compounds)과 같은 효소 및 비효소 항산화제는 ROS 생성 및 항산화제 방어 사이의 불균형에 의해 초래된 해로운 ROS를 제거하는 것과 관련되어 있다

(Shi and Zhu, 2008; Sharma and Dietz, 2008; Ashraf, 2009).

- [0030] ROS-제거 효소들을 과발현시키거나 억제시켜 항산화 시스템에서의 그 기능이 조사하여 왔다 (Gupta et al., 1993; Ashraf., 2009; Eltayeb et al., 2007). 이것은 비생물적 스트레스에 반응하여 생성된 ROS 수준의 조작용은 비생물적 스트레스-내성 작물의 유전적 엔지니어링에 있어서 효과적인 수단일 수 있다는 것을 의미한다. 관련하여 본 발명자들은 글루코사민이 심각한 비생물적 스트레스의 조건하에서 ROS-유도 세포 사멸의 조정자로 역할을 한다는 것을 최초로 확인하였다.
- [0031] 플럭토스-6-포스페이트 아미도트랜스페라제 (fructose-6-phosphate amidotransferase, *GFAT*) 전사는 스트레스 유도 식물호르몬인 ABA에 의해 유도되었고 (도 8), 엽록체 구리/아연 슈퍼옥사이드 디스뮤티아제 (chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase, *CSD2*) 유전자 발현은 마니톨로 처리된 형질전환 식물체에서 감소되었다. 그러나 *Cor15a* (참고문헌 Osakabe Y, Mizuno S, Tanaka H, Maruyama K, Osakabe K, Todaka D, Fujita Y, Kobayashi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. *J Biol Chem.* (2010) 285(12):9190-201)는 마니톨로 처리된 *NagB-ox* 식물체에서 정상적으로 발현되었다 (도 9). 이것은 *NagB* 과발현에 의한 글루코사민의 감소가 *Cor15a* 발현을 촉진하는 스트레스 신호전달 경로에 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. *GlmS-ox* 형질전환 식물체가 종자를 남기지 않고 초기에 고사하기 때문에 글루코사민은 식물 생장에서 결정적인 역할을 한다고 할 것이다 (도 10).
- [0032] 최근 연구에 따르면, 수분 스트레스에 반응하여 뿌리 정단부에 ROS가 많이 축적되고 BAX inhibitor-1 (AtBI1)의 발현이 증가되는 것과, *atbi1-1* 돌연변이에서 세포 사멸이 촉진되는 것이 보고되었다 (Duan et al., 2010). 이들 결과들은 AtBI1 및 ER 스트레스-반응 경로가 스트레스에 의해 유도된 프로그램된 세포 사멸 (programmed cell death, PCD)을 조정하는 것을 암시하여 본 발명을 뒷받침한다. 도 9에서 나타난 바와 같이, ABA에 반응하여 *GFAT*의 발현이 증가되는 것은 글루코사민이 고 위험 비생물적 스트레스에 반응하여 ROS 발생을 통해 신호전달 PCD에 연계되는 것을 나타낸다.
- [0033] 야생형과 비교하여 *NagB-ox* 형질전환 식물체에서 증가되거나 감소되게 조절되는 단백질을 확인하기 위해, 단백질 분석을 실시하였다. 리불로즈-1,5-바이포스페이트 카르복실라제/옥시게나제 큰 서브유닛 (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit)가 야생형에 비해 *NagB-ox* 식물체에서 많이 증가하였다. 최근 단백질체학 연구에서 세포기관 프로테오믹스에 대한 비생물적 스트레스의 영향이 평가되었다 (For a review, Taylor et al., 2008). 그 결과 전체 애기장대의 단백질 분석으로부터, 전체 256개의 단백질이 스트레스에 반응하는 것으로 확인되었다. 세포기관에 위치하는 것으로 알려진 이들 단백질들 중, 73%가 엽록체 단백질이었고, 이것은 비생물적 스트레스에 의해 유발된 위기 상황에서 엽록체를 보호하기 위해 많은 유전자들이 유도되는 것을 명백하게 나타낸다 할 것이다. 따라서 *NagB-ox* 식물체에서 리불로즈-1,5-바이포스페이트 카르복실라제/옥시게나제 큰 서브유닛 단백질의 높은 수준으로 발현되는 것이 관찰된 것은 타당하며, 산화적 스트레스 하에서 야생형 식물체에 비해 높은 생존능력을 나타낸다고 할 수 있다. 또한, 글루코사민 처리 시 에피티오스페서파이어 모디파이어 (Epithiospecifier modifier 1, ESM1), 미로시나제-관련 (myrosinase-associated) 단백질이 야생형 식물체에서 보다 *NagB-ox* 식물체에서 높은 수준으로 관찰되었다 (도 11). 최근 연구에 의해 ESM1이 인돌 글루코시놀레이트 (indole glucosinolate)에 대한 세미-도미넌트 로커스 (semi-dominant locus)로서 보고되었는데, 산화적 스트레스 내성과의 관계는 아직 밝혀지지 않았다 (Burow et al., 2008).

발명의 효과

- [0034] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의하면 식물체 내의 글루코사민의 수준을 유전자 조작으로 조절하여 가뭄 스트레스, 산화스트레스 또는 저온스트레스 등 비생물적 스트레스에 대한 내성을 조절할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명에 의하면 식물체 체내 글루코사민의 유전적 조작으로 가뭄 등 비생물적 스트레스 내성 형질전환 식물체를 효과적으로 제공할 수 있다.
- [0036] 나아가, 본 발명은 식물체 내에 글루코사민을 높은 수준으로 유도하여 비생물적 스트레스에 의해 원하지 않은 식물체를 제거하기 위해 이용될 수 있다.
- [0037] 따라서 본 발명은 가뭄 등 비생물 스트레스 내성 작물의 개발과 항산화 기작에 대한 흐름을 밝히는 데도 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 *NagB-ox* 형질전환 식물체를 제조한 결과를 나타낸 도면이다.

도 1a는 *CaMV 35S* 프로모터의 제어 하에서 구성적 발현을 위한 *pBI121* 바이너리 벡터에 *E. coli NagB* 오픈 리딩 프레임 (open reading frame)이 클로닝 된 결과를 나타낸다. 10개 이상의 독립적 동질적인 T₃계통 중, 계통 #1, 2, 3, 4, 및 5가 *NagB* 발현 여부를 조사하기 위해 선택되어 RNA 하이브리다이제이션 되었다. 발아 촉진을 위해 4℃에서 3일 동안 저온처리 한 후, 종자가 발아되어 샘플링 하기 전에 14일 동안 제시된 조건하에서 성장되었다. *rRNA*가 로딩 대조군으로 나타나 있다.

도 1b 및 도 1c는 글루코사민에 대한 이들 형질전환 식물체들의 민감도를 조사하기 위해, Col-0, lines #1, 3, 및 4를 정규 MS 배지에서 발아시킨 다음, 0, 0.25, 0.5, 12.5, 또는 5 mM 글루코사민을 함유하는 배지로 옮겨서, 5일 이상 성장시킨 후 촬영한 사진(도 1b)과 측정된 뿌리 길이를 나타낸 그래프(도 1c)이다.

도 2는 야생형 및 *NagB-ox* 식물체에서 글루코사민 수준을 측정한 결과를 나타낸다. 글루코사민 함량은 HPLC 분석에 의해 측정되었고, 분석을 위해 토양에서 4주 동안 성장한 야생형 및 *NagB-ox* 식물체로부터 잎, 꽃 또는 장각과 (siliques)가 채취되었다.

도 3은 ER 스트레스 마커인 *BiPI*이 글루코사민에 의해 유도된 것을 나타내는 도면이다. 야생형 및 *NagB-ox* 유묘가 2주일 동안 통상의 성장 배지에서 성장된 후 옮겨져 0, 0.5, 또는 1 mM 글루코사민과 함께 제시된 대로 배양된 후 RNA가 추출되었다. ER 스트레스-반응 유전자 *BiPI*의 전사 수준이 나타나 있고 *rRNA*가 로딩 대조군으로 나타나 있다.

도 4는 야생형 및 *NagB-ox* 식물체의 산화적 스트레스 내성을 나타내는 도면이다.

도 4a는 0, 0.1, 0.5, 또는 1 μM 파라쿼트(paraquat)가 보충된 MS 배지에서의 산화적 스트레스 내성을 종자 발아율로 나타낸 그래프이다.

도 4b는 0, 0.1, 0.5, 또는 1 μM 파라쿼트(paraquat)가 보충된 MS 배지에서의 산화적 스트레스 내성을 전체적 성장 정도로 나타낸 사진이다. Student's T-test에 따라 유의수준은 $P < 0.05$ 이다. 수직 바는 SE를 나타낸다 ($n=100$).

도 5는 파라쿼트에 노출된 야생형 및 *NagB-ox* 식물체에서 ROS 수준을 나타낸다. 파라쿼트 처리 6시간 전에 MS 배지에서 성장된 2주 된 유묘에서 ROS 함량을 측정하는 것으로 ROS 검출 에세이를 실행하였다.

도 6은 야생형 및 *NagB-ox* 식물체의 가뭄 스트레스 내성을 나타낸다.

도 6a는 토양에서 21일 동안 성장된 식물체를 38일 동안 수분 공급을 차단하여 수분 스트레스를 준 결과를 나타낸 사진이다. 사진은 수분 공급 중단 기간이 종료된 때 촬영되었다.

도 6b는 일부 식물에 수분 공급 중단 17일 쯤 되는 날 재-급수하여 스트레스로부터 회복 여부를 조사한 결과를 나타내는 사진이다.

도 7은 야생형 및 *NagB-ox* 식물체의 저온 스트레스 내성을 나타낸다.

도 7a는 실온에서 성장한 7일 된 유묘의 플레이트를 7일 동안 광 조건의 4 ℃의 챔버로 옮기고, 저온 처리 종료 시 촬영한 사진이다.

도 7b는 도 7a의 식물체의 뿌리 길이를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 *GFAT* 유전자 프로모터가 ABA에 반응하는 것을 나타낸 도면이다. *GFAT* 유전자 프로모터가 스트레스 호르몬 ABA에 반응하는 지 여부를 확인하기 위해, β-글루쿠로니다제 (β-glucuronidase)를 코딩하는 리포터 유전자 GUS 코딩 부분에 융합된 *GFAT* 프로모터 부위를 함유하는 플라스미드에 의해 형질전환 식물체가 제조되었다. 0, 1, 5, 또는 10 μM ABA와 함께 배양된 후 6시간 후 형질전환 식물체에서 β-글루쿠로니다제 (β-glucuronidase, *gus*) 활성 발현을 가시화하기 위해, 히스토케미컬 에세이 (histochemical assay)가 수행되었다.

도 9는 만니톨 처리 후 3주 된 야생형 및 *NagB-ox* 식물체에서의 *NagB*, *Cor15a*, 및 *CSD2* 발현 프로파일을 나타낸다. RNA 하이브리다이제이션에 의해 3주 된 야생형 및 *NagB-ox* 식물체에서의 *NagB*, *Cor15a*, 및 *CSD2* 전사가 확인되었다. 종자는 정규 MS 배지에서 발아되었고, 유묘는 제시된 시간 동안 0, 100, 또는 300 mM 만니톨이 보충된 액체 배지로 옮겨졌다. *rRNA*가 로딩 대조군으로 나타나 있다.

도 10은 *GlmS* 과발현 형질전환 식물체의 성장 정도를 나타낸 도면이다.

도 10a는 *35S CaMV*, 열 충격 단백질101 유전자 (heat shock protein101 gene, *HSP101p*) 또는 *GFA1* (*GFA1P*) 프로모터에 *E. coli* *GlmS* cDNA이 융합되어, 각 플라스미드 (*pBI121* vector)가 아그로박테리움 인필트레이션을 이용하여 애기장대로 도입된 결과를 나타낸다.

도 10b는 10개 이상의 독립된 T₁ 형질전환 계통이 수득된 후 토양으로 옮겨졌으나, 모든 *35S::GlmS-ox* 계통이 종자를 생산하기 전에 고사한 결과를 나타낸 사진이다.

도 10c는 37℃ 열 충격을 처리하기 전 10일 동안 Col-0, *HSP101p:glmS*, 및 *GFA1P:glmS* 유묘가 정규의 MS 배지에서 성장된 결과를 나타낸 도면이다.

도 11은 글루코사민이 처리된 Col-0 및 *NagB-ox* 식물체의 2-DE 분석 결과를 나타낸다. 2주 된 Col-0 및 *NagB-ox* 묘목이 무처리 배지에서 성장된 후 샘플링되거나 1 mM 글루코사민으로 4시간 동안 처리되었다. MALDI-TOF를 이용하여 발현상 큰 차이를 보이는 특정 단백질이 분석되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0040] 재료 및 방법

[0041] 1. 식물재료 및 성장 조건

[0042] 본 발명에서는 야생형으로 애기장대의 Col-0 에코타입이 사용되었다. 유묘는 16 h 광/8 h 암 주기 (cycle)로 23 ± 1℃의 항온 생장 챔버 (growth chamber), 2% 수크로오스가 함유된 0.5% MS 배지 (Murashige and Skoog (MS) medium, Murashige and Skoog, 1962)에서 수직으로 성장되었다. 유묘는 발아를 촉진하기 위해 4℃에서 3일 동안 층적 (stratification)한 후 파종되었다. 몇 가지 스트레스 하에서의 식물의 성장 및 발달 시 표현형을 확인하기 위해, 4일 동안 MS 배지에서 성장한 유묘는 스트레스 플레이트로 옮겨졌다. 파라쿼트를 이용한 발아 실험에서, 유묘는 수평판에서 성장되었다.

[0043] 2. 형질전환 식물체

[0044] 클로닝을 위한 프라이머 세트는 다음과 같이 고안되었다.

[0045] *E. coli* *NagB*:

[0046] forward 5'-GC GGATCCATGAGACTGATCCCCCT-3' (서열번호 1)

[0047] reverse 5'-GC GAGCTCAGGGCAGGGATAACAA-3' (서열번호 2)

[0048] *E. coli* *GlmS*:

[0049] forward 5'-GC GGATCC AGGTTGACCG ACAACGA-3' (서열번호 3)

[0050] reverse 5'-GC GAGCTC TTACTCAACC GTAACCG-3' (서열번호 4)

[0051] *Hsp101P* 프로모터의 ~1.5-kb 단편 (fragment):

[0052] forward 5'-TT GGATCC AGCTTTTGTAATCCCTG-3' (서열번호 5)

[0053] reverse 5'-GGTCTACGATCAACCC-3' (서열번호 6).

[0054] 대장균 또는 애기장대의 게놈 DNA의 증폭된 DNA는 바이너리 벡터 *pBI121* (Promega Corp., WI, USA)로 도입되었다. 꽃 침지 방법 (floral dipping method)에 의해 아그로박테리움 튜메파시엔스 GV3101 (*Agrobacterium tumefaciens* strain *GV3101*)을 이용하여 애기장대를 형질전환 시켰다.

[0055] **3. RNA 하이브리다이제이션**

[0056] Col-0 및 돌연변이 애기장대의 ~100-mg 샘플에서 전체 mRNA를 추출하였다. 샘플은 각각의 스트레스에 의해 3, 6 또는 24시간 동안 처리된 10일 된 유묘들이었다. 추출된 RNA는 1.5% 아가로오즈 겔에 로드되었고 20X SSC에서 막으로 옮겨졌다. RNA와 막의 크로스링크 (crosslink)를 위해, 최대 999.9 분 동안 1200 X 100 $\mu\text{J}/\text{CM}^2\text{UV}$ 로 충격이 가해졌다. mRNA를 검출하기 위해, 프라이머 및 애기장대 게놈 DNA를 이용하여 PCR에 의해 수득되고 MEGA-spin™ Agarose Gel Extraction Kit (INTRON, Korea)에 의해 정제된 프로브가 DNA labeling kit (INTRON, Korea)에 의해 표지되고 65℃에서 밤새 막과 하이브리다이제이션 되었다. 막은 24℃에서 15분 동안 1 X SSC, 0.5% SDS로 세척된 후 42℃에서 0.1 X SSC, 0.5% SDS로 두번 15분 동안 세척되었다.

[0057] **4. ROS 측정**

[0058] 스트레스로 처리된 10일 된 유묘 (100 mg)를 갈아서, PRO-PREP™ Protein Extraction Solution (Intron)을 이용하여 세포 추출물을 수득하였다. 세포 추출물의 단백질 농도는 브래드포드 단백질 에세이 (Bradford protein assay)로 정량되었고, 샘플을 표준화하기 위해 이용되었다. 동일한 단백질 농도를 갖는 샘플에서의 ROS의 양은 Bioxytech H202-560 kit (Oxis International Inc., Portland, OR, USA)로 측정되었다. 총 200 μl 의 부피의 세포 추출물 혼합물은 마이크로플레이트에 준비되어, 마이크로플레이트 스펙트로포토미터 (microplate spectrophotometer)로 560nm에서 흡광도가 측정되었다.

[0059] **5. GUS를 위한 히스토케미컬 스테이닝 (Histochemical staining)**

[0060] *GFA::GUS* 형질전환 식물체에서 β -글루쿠로니다제 (β -glucuronidase, *gus*) 활성 발현을 확인하기 위해, 50 mM NaH_2PO_4 (pH7), 0.01% Tween20, 10mM Na_2EDTA , 및 0.3% (w/v) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide 을 함유하는 반응 버퍼에 모든 유묘들이 침적되었다 (Jefferson et al., 1987). 유묘들은 37 °C에서 밤새 배양되었고, 엽록소를 제거하기 위해 70% 에탄올로 3회 세척되었다. 블루 스테이닝은 입체현미경 (stereomicroscope)으로 확인되었다.

[0061] **6. GlcN-6-P의 HPLC 분석**

[0062] 균질화된 신선한 샘플들 (0.25 g)은 0.5 ml의 증류수에 용해된 후, 10분 동안 볼텍스 (vortex) 되었고, 4 °C에서 10분 동안 12,000 X *g*로 원심분리 되었다. 상층액은 0.45- μm 막으로 여과된 후 HPLC 분석을 위해 유리 바이얼 (glass vial)로 옮겨졌다 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). 추출방법은 이전 연구 (Jiang et al., 2005)에 의해 변경되었다. 분석은 Hypersil ODS columns (5 mm, 4.6 x 100 mm, Thermo Electron Corporation, Bellefonte, PA, USA) 상에서 25℃에서 수행되었다. 크로마토그래피에 의한 분리를 위해, 버퍼 A (15 mM sodium phosphate, pH 7.2, 2.5% propanol, 2.5% acetonitrile) 및 버퍼 B (15 mM sodium phosphate, 6% propanol, 6% acetonitrile)로 구성된 바이너리 이동상이 이용되었다. 용매의 농도 구배에 의한 용리는 다음과 같이 프로그램 되었다: 0-5 분 동안 100% A, 5-6 분 동안 100-0% A, 및 6-25 분 동안 100% B. 유속 (flow rate)은 100 μl 주입량으로 1.0 ml/min이었다. UV/Vis detector (Agilent Technologies)를 이용하여 254 nm에서 피크가 검출되었다.

[0063] **7. 2차원 겔 전기영동 (2DE)**

[0064] 10일 된 col-0 및 *nagB #1* 유묘가 3, 6, 또는 24 시간 동안 글루코사민이 함유된 MS 액체 배지에서 배양되었다. 분쇄된 샘플들은 7M 우레아 (urea), 4% (w/v) 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 함유 2M 티오우레아 (thiourea), 1% (w/v) 디티오프레이트 (dithiothreitol, DTT), 2% (v/v) 파말라이트 (pharmalyte), 및 1 mM 벤자미딘 (benzamidine)으로 구성된 샘플 용해 용액에서 모터-구동 호모자이너 (PowerGen125, Fisher Scientific)에 의해 바로 균질화 되었다. 효모와 바실러스 샘플의 냉해동 단계가 1일 5회 반복되었다. 때때로 딱딱한 세포를 용해하기 위해 비드 비터 (bead beater)가 사용되었다. 실온에서 1시간

동안 볼텍싱하여 단백질이 추출되었다. 15℃에서 1시간 동안 15,000 X *g*로 원심분리된 후, 불용성 물질이 제거되고, 용해된 분획이 2차원 겔 전기영동에 사용되었다. 단백질 로딩은 브래드포드 에세이 (Bradford et al., *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248)에 의해 정규화 되었다.

[0065] IPG 건조 스트립 (IPG dry strips)은 7M 우레아 (urea), 2% 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) 함유 2M 티오우레아 (thiourea), 1% DTT, 및 1% 파말라이트 (pharmalyte)로 12-16 시간 동안 평형화된 후 200mg 샘플이 로드되었다. 이소일렉트릭 포커싱 (Isoelectric focusing, IEF)을 제조자의 지시에 따라 Multiphor II electrophoresis unit 및 EPS 3500 XL power supply (Amersham Biosciences)를 이용하여 20 °C에서 실시하였다. IEF 동안, 샘플 주입을 위해 전압을 3시간 동안 150에서 3,500 V까지 연속적으로 증가시킨 다음, 3500 V를 일정하게 유지하여, 96 kVh 후 포커싱이 완료되었다. 이차원 겔 전기영동하기 전에 스트립은 평형 버퍼 (50 mM Tris-Cl, pH 6.8, containing 6M urea, 2% SDS, and 30% glycerol)에서 10분 동안 배양되었고, 먼저 1% DTT로 그리고 두 번째로 2.5% 요오드아세트아미드 (iodoacetamide)로 처리되었다. 평형화된 스트립을 SDS-PAGE gels (20 X 24 cm, 10-16%)에 삽입되었다. SDS-PAGE가 Hoefer DALT 2D system (Amersham Biosciences)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 수행되었다. 2D 겔은 20℃에서 1,700 Vh 로 런 (run)한 다음 Oakley et al. (*Anal. Biochem.* 1980, 105:361-363)에 의해 기술된 대로 은 염색 (silver staining)되었으나, 고정 및 글루타르알데하이드에 의한 감광 단계는 생략되었다.

[0066] 8. 이미지 분석

[0067] 제조자에 의해 제공된 프로토콜에 따라 PDQuest software (version 7.0, BioRad)를 이용하여 디지털화된 이미지의 정량적 분석을 수행하였다. 각 스폿(spot)의 양은 전체 유효 스폿 강도에 의해 정규화 되었다. 단백질 스폿들은 대조군 또는 정상 샘플들에서의 발현 수준에 2배 이상 벗어나는 유의적인 발현 변동을 기준으로 선택되었다.

[0068] 실시예 1. 애기장대의 체내 글루코사민을 감소시키기 위한 *NagB-ox* 형질전환 식물의 제조

[0069] *nagB* 유전자는 대장균에서 디버전트 (divergent) *nagEnagBACD* 오페론의 부분 (Alvarez-Anorve et al., 2009)이고, 글루코사민-6P (glucosamine-6P, GlcN6P)의 분해에 관여한다. 애기장대의 체내 글루코사민 (endogenous GlcN)을 감소시키기 위해, 본 발명자들은 35S *CaMV* 구성적 프로모터에 의해 조절되는 *E. coli nagB* 유전자를 포함하는 형질전환 식물체를 제조하였다. 5개의 독립적 T₃계통이 확립되었고, *NagB* 발현이 RNA 하리브리디제이션에 의해 확인되었다 (도 1a). 도 1a에 도시된 바와 같이, 계통 (line) #1 및 #5는 높은 *NagB* 발현을 나타내어, 이후 모든 분석에서 이용되었다. 일반적인 생장 조건하에서, 전반적으로 *NagB-ox* 형질전환 계통의 생장은 야생형 애기장대의 생장과 유사하였다. MS 배지에서 발아된 후 1주일 동안 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 또는 5 mM GlcN을 함유하는 배지로 옮겨진 *NagB-ox* 및 야생형 식물에서의 뿌리 생장 및 생존에 대한 글루코사민의 영향이 비교되었다 (도 1b 및 1c). 5 mM GlcN에서 정상적으로 생장한 *NagB-ox* line #1 식물체가 가장 높은 글루코사민 내성을 나타낸 반면, 다른 형질전환 식물 및 야생형은 고사하였다.

[0070] 애기장대의 다양한 조직들에서의 체내 글루코사민의 수준은 이전에 알려진 바가 없었다. 따라서 1개월 동안 토양에서 생장된 애기장대로부터 여러 조직들이 채취되어 HPLC 분석을 이용하여 GlcN 수준을 측정하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 애기장대에서의 글루코사민 존재가 확인되었고, 흥미롭게도 야생형 식물에서 꽃 조직에서 가장 높은 수준으로 관찰되었고 잎 조직에서는 거의 발견되지 않았다. 예상한 대로, 글루코사민은 *nagB-ox* 식물체에서는 감소되어, *NagB* 단백질이 형질전환 식물체에서 발현된 것이 확인되었다.

[0071] 다음, 글루코사민의 농도가 증가되면 애기장대에서 ER 스트레스가 유도되는지를 확인하기 위해, 야생형 유묘에 0, 3, 6, 또는 24 시간 동안 0, 0.5, 또는 1 mM 글루코사민을 처리하였다. 상기 글루코사민의 농도는 애기장대에서 삼투압 스트레스를 야기할 수 없기 때문에, 삼투압 스트레스를 유발하기 위해 200 Mm 이상의 만니톨이 필요하다. RNA 하리브리디제이션을 통해 애기장대에서 글루코사민에 반응하여 ER 스트레스 마커 유전자인 *BiP*

mRNA가 축적되는 것을 확인할 수 있었고, 이 결과로 ER 스트레스가 글루코사민에 의해 유도되고 있다는 것을 알 수있다. (도 3). 이와 대조적으로 동일한 처리를 해도 *NagB-ox* 식물체에서는 *BiP*의 발현이 동일한 정도로 유도되지 않아, *NagB-ox* 식물체에서는 오히려 글루코사민에 의한 ER 스트레스 유도가 감소되는 것으로 나타났다.

[0072] 실시예 2. *NagB-ox* 형질전환 식물체의 산화, 가뭄 및 저온 스트레스에 대한 저항성

[0073] 글루코사민은 식물세포에서 ROS를 발생시키는 것이 발견된 바 있어 (Ju et al., 2009), 산화적 스트레스에 대한 *NagB-ox* 계통의 내성을 테스트하였다. 세포에서 ROS를 유도하는 것으로 알려진 파라쿼트(paraquat)가 0, 0.1, 0.5, 또는 1 μ M로 보충된 배지에서 야생형 및 *NagB-ox* 애기장대를 발아시켰다. 도 4b에 나타난 바와 같이, 야생형 유묘가 생장을 정지한 시점인 발아 후 3주 후에도 *NagB-ox* 계통은 0.1 또는 0.5 μ M 파라쿼트를 함유하는 배지에서 계속 생장을 하였다.

[0074] *NagB-ox* 식물체의 생존력이 증가한 것이 야생형 식물체에 비해 ROS가 적게 생산된 결과인지를 알아보기 위해, 산화적 스트레스에 반응하여 생산된 ROS의 양을 야생형 식물체 및 *NagB-ox* 식물체에서 측정하였다. 10 μ M 파라쿼트가 처리된 야생형 식물체에서 ROS가 120% 생성되는 반면, *NagB-ox* 계통에서는 무처리 대조군과 유사한 수준으로 80%의 ROS가 축적되었다 (도 5).

[0075] 삼투압 및 염분 스트레스는 ROS 생성과 관련되어 있기 때문에 (Serrato et al. 2004; Borsani et al. 2005; Miao et al. 2006; Abbasi et al. 2007; Giraud et al. 2008), 비생물적 스트레스의 다양한 형태에 대한 야생형 및 *NagB-ox* 계통의 내성을 알아보기 위해, 1개월 동안 토양에서 생장한 식물에 수분 공급을 중단하여 비교하였다. 수분 공급 중단 기간이 길어짐에 따라, 야생형은 심각한 피해를 나타냈지만, *NagB-ox* 식물체는 생장을 계속하였고 심지어 웃자랐다 (도 6a). 도 6b에 나타난 바와 같이, 17일째 다시 수분을 공급한 후 야생형 식물체는 회복되지 못하고 결국 고사하였으나, *NagB-ox* 식물체는 생생하게 성장하여 라이프 사이클을 정상적으로 마쳤다. 또한, *NagB-ox* 식물체는 저온 스트레스에 대해 야생형에 비해 내성이 큰 것으로 나타났다 (도 7a 및 7b).

[0076] 진핵 세포에서 들어온 글루코즈 6-포스페이트 (Glc-6P)의 대략 1-3%만이 HBP로 들어가고, 글루코사민 6-포스페이트 (GlcN-6P)는 속도조절 효소 (rate-limiting enzyme) 글루타민 : 프럭토즈-6-포스페이트 아미도트랜스퍼라제 (fructose-6-phosphate amidotransferase : GFAT)에 의해 생성된다. GFAT 조절의 결함은 근육 및 지방 조직에서 당뇨병과 관련되어 있지만 (Buse, 2006), 애기장대에서 유사한 결과가 보고된 바는 없었다. 글루코사민-관련 비생물적 스트레스 반응의 역할을 확인하기 위해, 본 발명자들은 *GFAT* 유전자 (salk_092218)의 녹아웃 돌연변이를 얻으려고 시도하였다. 그러나, 동종접합 *GFAT* 녹아웃 계통을 발견할 수 없어, 이 돌연변이는 배아에 치사를 일으키는 것으로 나타났다 (미도시). 이러한 발견은 체내 글루코사민이 종자 발달에 필수적이라는 것을 제시한다. *GFAT* 유전자 프로모터가 스트레스 호르몬인 아브시스산 (abscisic acid: ABA)에 반응하는 지를 알아보기 위해, *GFAT*의 프로모터 부위를 포함하는 플라스미드를 β -글루루로니다제 (β -glucuronidase)를 코딩하는 리포터 유전자 GUS의 코딩 부위에 융합시켰다. 도 8에 나타난 바와 같이, *GFAT* 프로모터는 10 μ M ABA에 의해 유도되었다. 흥미롭게도, GUS은 유묘의 뿌리조직에서만 발현되는 것으로 관찰되었다.

[0077] 식물체 세포가 비생물적 스트레스를 접하게 되면, 식물체 세포는 상해로부터 자신들을 보호하기 위해 신호전달 경로 정렬을 활성화시킨다. 삼투압 스트레스 원인으로 간주되는 만니톨을 처리한 20일된 야생형 및 *NagB-ox* 유묘에서 스트레스 내성과 관련된 비생물적 스트레스 마커 유전자인 *Cor15a* 발현을 조사하였다 (도 9). *Cor15a* 발현에 있어서 유의적인 차이는 관찰되지 않았는데, 이는 *NagB-ox* 형질전환 계통에서 *Cor15a* 발현을 유도하는 비생물적 신호전달 경로는 만니톨 처리에 의한 삼투압 스트레스로 인해 방해되지 않는다는 것을 나타낸다.

[0078] *NagB-ox* 형질전환 계통에서 글루코사민을 제거하여 ROS를 감소시킬 수 있다면, ROS에 의해 활성화된 마커 유전자들도 감소될 것이다 (Abarca et al., 2001; Yamasaki et al., 2007). 엽록체 구리/아연 수퍼옥사이드 디스뮤타아제 (chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase, *CSD2*) 전사가 *NagB-ox* 형질전환 식물체에서 훨씬 낮은 수준으로 축적되어 상기 가설이 확인되었다 (도 9). 이것은 글루코사민이 비생물적 스트레스에 노출된 식물 세포에서 ROS 생산을 조정하는 데 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

[0079] 실시예 3. 애기장대 *GFAT* 녹아웃 식물체 (knock-out plants) 및 글루코사민-6-포스페이트 신타제 (*G1ms*)-ox 형질전환 식물체의 유묘기 고사

[0080] 글루코사민의 역할을 역으로 확인하기 위해, 글루코사민 생합성에서 속도조절 반응을 촉진시키는 대장균 글루코사민-6-포스페이트 신타제 유전자 (*GlmS*)를 애기장대에 도입하여 체내 글루코사민 수준을 증가시켰다 (Kalamorz et al., 2007). 그러나, 구조적으로 *GlmS* 고발현을 나타내는 수득된 35::*GlmS-ox* 형질전환 계통은 모두 초기 단계에서 고사하였다 (도 10a). 따라서 T_2 또는 T_3 는 확보할 수 없었다. 그러나 *GlmS ORF*가 열 스트레스에 반응하는 열충격단백질 101 (heat shock protein 101: *HSP101*) 유전자 프로모터의 제어 하에 있을 때는 형질전환 계통이 눈에 뜨는 손상 없이 생존하였다 (도 10b).

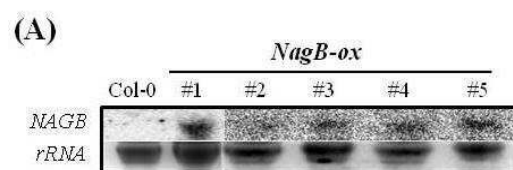
[0081] 실시예 4. 글루코사민의 노출 후 야생형 식물에서의 광합성 관련 단백질의 급격한 감소 및 *NagB-ox* 형질전환 식물에서의 무변화

[0082] 산화적 스트레스에 노출된 야생형 및 *NagB-ox* 식물체 사이의 차이를 확인하기 위해, 이들 식물체의 단백질 프로파일을 분석하였다. 야생형 및 *NagB-ox* 유묘는 MS 배지에서 14일 동안 성장된 후 1 mM 글루코사민 배지에 옮겨져 6시간 동안 두었다. 2DE 분석을 통해, 본 발명자들은 *NagB-ox* 식물체에서 고발현되는 단백질 스폿 (spots)을 선택하였고, 그런 다음 MALDI/TOF-MS (commercial service)로 처리하였다. 적어도 3개의 생물학적 리플리케이트 (replicates)로부터 유효한 비율 데이터가 이용 가능한 단백질 서브세트가 확인되었다. 도 11은 야생형 및 *NagB-ox* 식물체에서 발현된 대표적인 단백질의 2DE 분석결과를 나타낸다. 리불로즈-1,5-비스포스페이트 카르복실라제/옥시게나아제 큰 서브유닛 단백질 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit protein)은 글루코사민에 노출되었을 때 야생형에서는 감소되나, *NagB-ox* 식물체에서는 증가하였다. 에피티오스페서파이어 모디파이어 1 (epithiospecifier modifier 1, ESM1), 미로시나제-관련 단백질의 수준도 글루코사민 처리 후 야생형 식물체에 비해 *NagB-ox* 식물체에서 높았다 (도11).

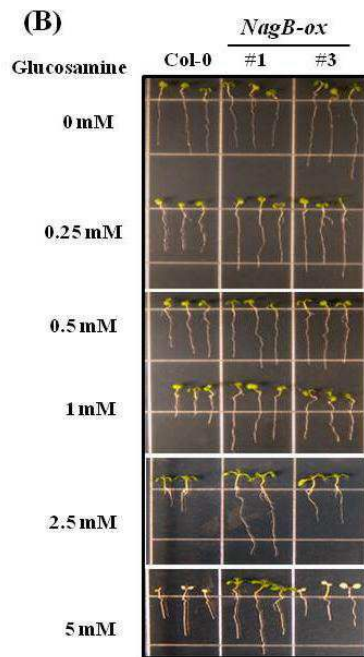
[0083] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

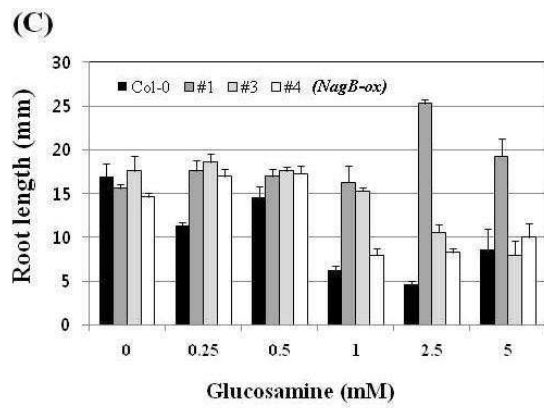
도면1a



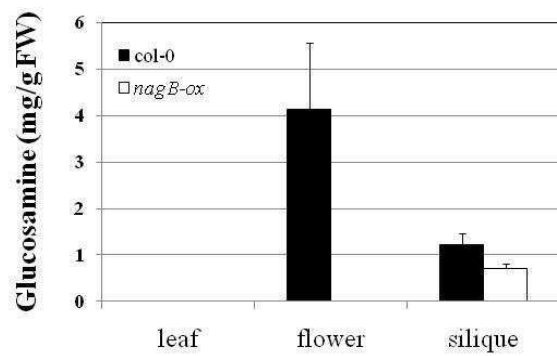
도면1b



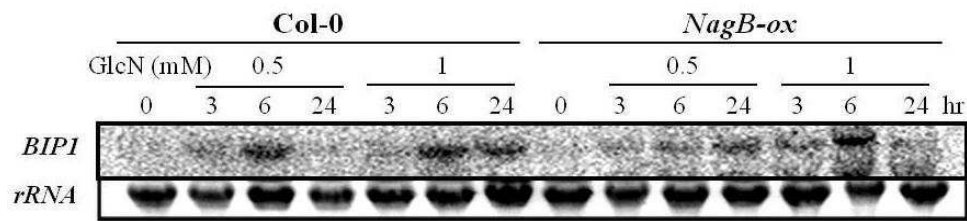
도면1c



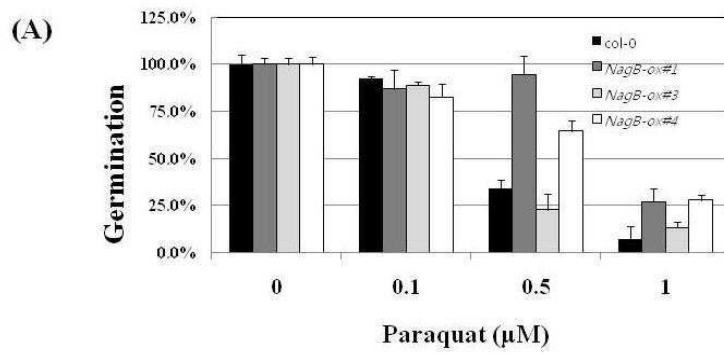
도면2



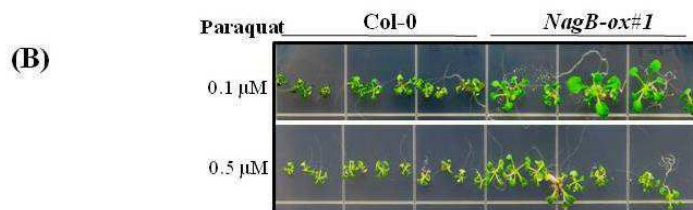
도면3



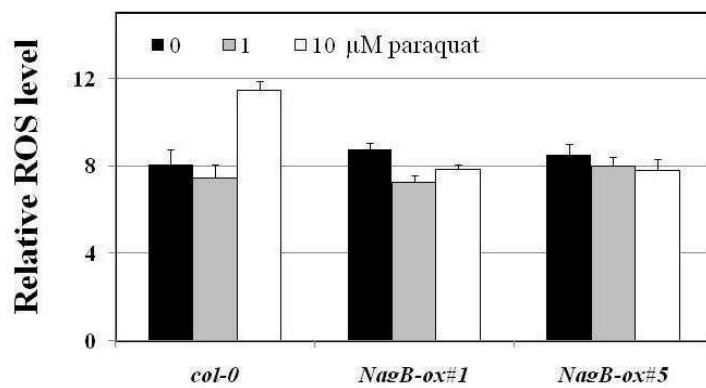
도면4a



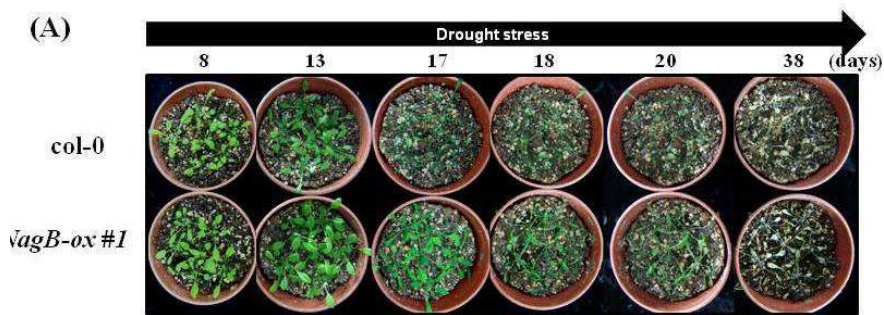
도면4b



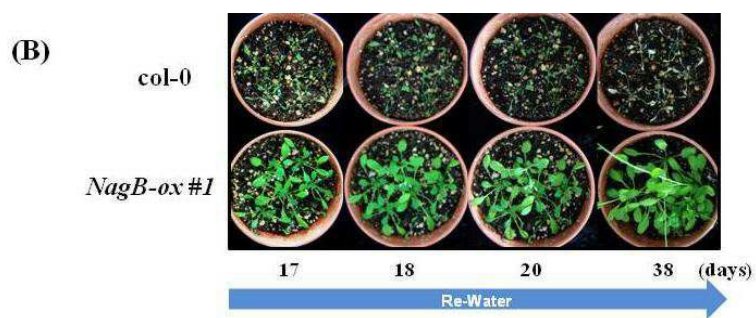
도면5



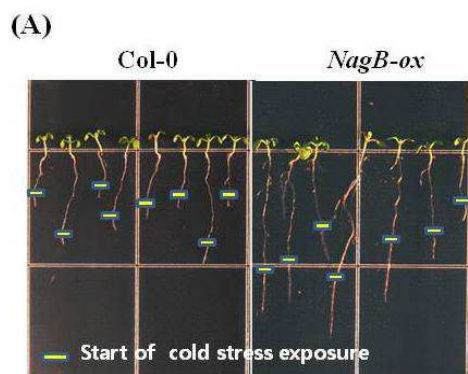
도면6a



도면6b

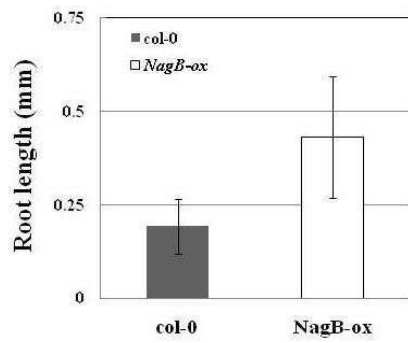


도면7a

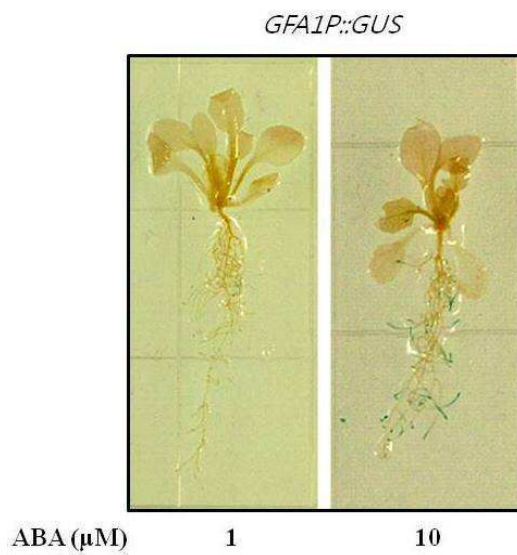


도면7b

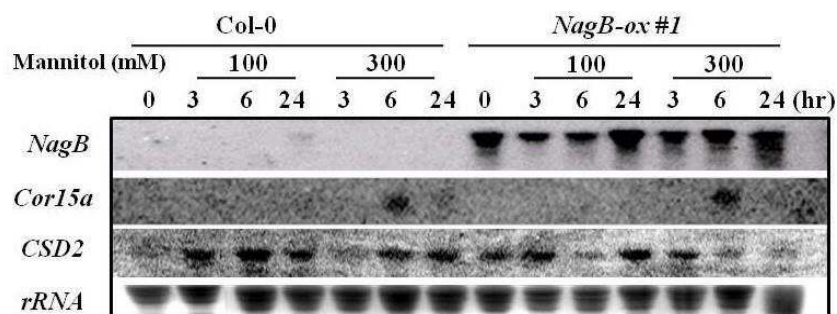
(B)



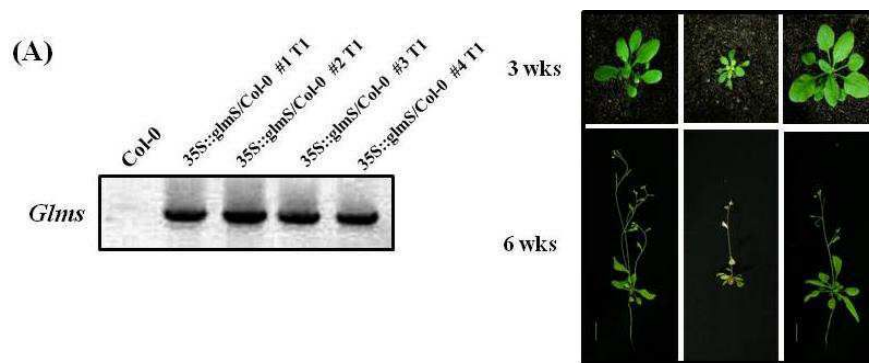
도면8



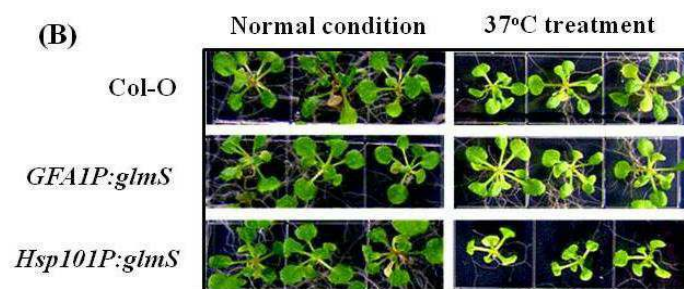
도면9



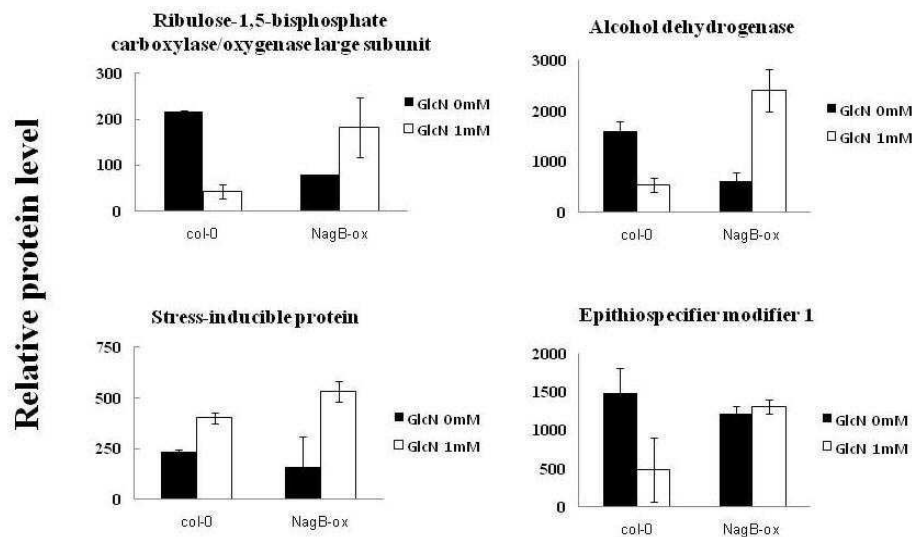
도면10a



도면10b



도면11



서열목록

- <110> Korea University Industrial and Academic Collaboration Foundation
- <120> Method for controlling plant tolerance to abiotic stresses by manipulating glucosamine level and transgenic plant developed using the same
- <130> P11-100417-01

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 1

gcggatccat gagactgac cccct 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 2

gcgagctcca gggcagggat aacaa 25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 3

gcggatccag gttgaccgac aacga 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 4

gcgagctctt actcaaccgt aaccg 25

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 5

ttggatccag cttttgtaat ccctg

25

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 6

ggttctacga tcaaccc

17