



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097866
(43) 공개일자 2017년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8271 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0019488
(22) 출원일자 2016년02월19일
심사청구일자 2016년02월19일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
윤대진
경상남도 진주시 평거로39번길 9 107동 1106호
백동원
경상남도 진주시 금산면 금산로 123 흥한골든빌아파트 1104동 704호
(74) 대리인
김동완

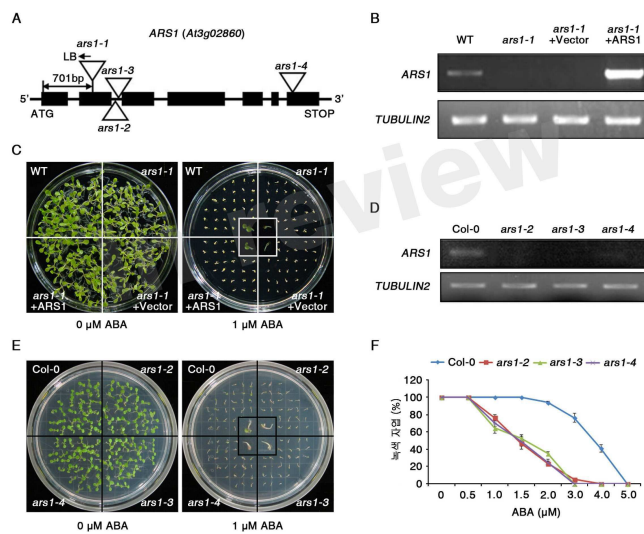
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **ARS1 단백질을 과발현하는 형질전환 식물체**

(57) 요약

본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 ARS1 단백질을 과발현하는 아라비도시스 형질전환 식물체에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 엽시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상성 유지시킴을 특징으로 하는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/8293 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-0403

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 경상대학교산학협력단

연구사업명 세계수준의 연구중심대학 육성 사업

연구과제명 극지생존 식물로부터 유용유전자 확보 및 재해저항성 작물체 개발

기 여 율 1/2

주관기관 식물생명공학연구소

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-0409

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 경상대학교산학협력단

연구사업명 세계수준의 연구중심대학 육성 사업

연구과제명 건조 스트레스에 대응하는 식물 생체방어 유전자의 동정 및 친환경 작물체 개발

기 여 율 1/2

주관기관 한국연구재단

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 ARS1 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 단백질은 핵 편재 시그널(6~22 아미노산 잔기), C2H2-형 징크 핑거 도메인(37~61 아미노산 잔기), 핵 수송 시그널(261~268 아미노산 잔기)과 또 다른 핵 편재 시그널(262~288 아미노산 잔기)로 구성되어 있고 식물체 내에서 앱시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상성 조절에 관여하는 ARS1 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 C2H2-형 징크 핑거 도메인은 앱시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상성 유지에 양성 조절자로서 역할을 함을 특징으로 하는 ARS1 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 C2H2-형 징크 핑거 도메인은 C3 서브세트에 속함을 특징으로 하는 ARS1 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 4

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 ARS1 단백질을 과발현하는 아라비도시스 형질전환 식물체에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 앱시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상성 유지시킴을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 핵-편재된 ARS1이 ABA 또는 산화적 스트레스에 응답하여 세포질로 전위(translocation)함을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 앱시스산(ABA) 및 산화적 스트레스에 응답하여 활성산소종(ROS) 항상성을 유지하는 ARS1 단백질을 과발현하는 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 ARS1 단백질(서열번호: 1)을 과발현시켜 종자 휴면 상태를 중지시키고 앱시스산(ABA)에 대항하는 양성 조절자 기능을 지닌 ARS1 과발현 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

배경 기술

[0002]

식물 호르몬 앱시스산(ABA)은 배아생성, 종자휴면, 식물 성장 및 비-생물적 스트레스에 응답하는 중요한 식물체의 생리학적 신호전달경로를 조절한다. ABA 신호 전달은 세포내 활성산소종(ROS)의 축적에 관련되어 있으며 이는 유전자 발현, 효소 활성화 및 예정된 세포 사멸과 같은 다양한 신호 전달 과정을 초기화시킨다. 비 생물학적 스트레스 조건 하에서도 과산화수소(H_2O_2), 음이온 수퍼옥사이드(O_2^-), 싱글렛 산소(1O_2) 및 하이드록시기(OH^-)와 같은 활성산소종(ROS)은 광합성, 암 호흡 및 광 호흡을 포함하는 대사 과정 중에 유독한 부산물로서 생성된다.

ROS는 최적 성장 조건 하에서 중요한 신호전달 분자로서 작용한다.

[0003] ROS는 주요한 신호전달 인자로서 복합적 ABA 신호전달 네트워크 내에서 결정적 역할을 수행한다. 이러한 네트워크는 예를 들면 NADPH 옥시다제, SNF1-관련 단백질 키나제(SnRK), 타입-2C/A 단백질 포스파타제(PP2C), 칼슘 뉴린 B-유사(CBL) 상호관련 단백질 키나제(CIPK), 칼슘-의존 단백질 키나제 및 미토젠-활성화 단백질 키나제(MAPK)와 같은 다양한 조절인자가 관련되어 있다.

[0004]

[0005] ABA 수용체 RCAR/PYR1/PYL(ABA-수용체의 조절 성분/ Pyrabactin 저항 단백질 /PYR-유사 단백질)는 ABA를 인지하고, ABA와 결합하며, PP2C 그룹과 상호 반응한다. ABA 결합 시, PP2C는 SnRK2/OST1(OPEN STOMATA1)과 상호반응하고 SnRK2를 탈인산화시켜 그의 키나제 활성을 억제시킨다. ABA가 수용체와 결합할 때 SnRK2는 PP2C 기능 결합을 통해 활성화된다. 활성화된 SnRK2는 가드 세포 이온 채널, NADPH 옥시다제 및 전사 요소를 포함하는 다양한 신호전달 하위 단백질을 인산화 및 조절한다. SnRK2 목표물 중에 NADPH 옥시다제가 플라스마 막에 편재하고 SnRK2/OST1에 의한 RBOH의 인산화는 식물 내에서 ROS 생성의 초기화에 매우 주요한 역할을 한다. 또한 RBOH는 CBL/CBL9-CIPK26 콤플렉스에 의해 인산화되고 ROS 생성을 매개한다.

[0006] ROS-생성 및 ROS-제거 시스템 조절을 통해 ROS는 미묘한 균형을 유지한다. 비-효소 항산화제는 싱글렛 산소와 하이드록시 그룹의 독성을 제거시키며 반대로 수퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD), 카탈라제(CAT) 및 아스코르빈 산 과산화수소물(APX)을 포함하는 항산화 효소는 과산화수소의 독성을 제거한다. SOD는 O_2^- 를 H_2O_2 로 불균질화를 조절하고 CAT와 APX는 H_2O_2 와 반응하여 물과 산소를 형성한다.

[0007] 최근 ROS는 식물 세포 내에서 체계적 신호화와 복합체 매개에 역할을 한다. 이러한 ROS 신호는 단독으로 작용하거나 식물 호르몬, Ca^{2+} 신호, 단백질 및 RNA를 포함하는 다른 분자와 상호 작용한다. 또한 ABA와 ROS는 비생물학적 스트레스에 대응하는 체계적인 신호전달을 조절하기 위해 서로 함께 작용한다.

[0008] 본 발명자들은 유전자 스크리닝 시스템을 이용하여 아라비도시스 ARS1 유전자(ABA AND ROS SENSITIVE 1)(서열번호: 2, 아라비도시스 GenBank 데이터베이스 접근번호 At3g02860)를 분리하였으며 ARS1이 종자 발아 및 ABA 또는 다른 산화적 스트레스로부터 식물체 내에서 ROS 항상성 유지에 필수적임을 확인하였다.

[0009] 본 발명자들은 ARS1이 ABA 또는 산화적 스트레스에 응답하여 핵으로부터 세포질로 전위됨을 확인하였다. 또한 본 발명자들은 ARS1이 종자 휴면 상태를 중지시켜 ABA에 대항하는 양성 조절자 기능과 ABA 및 산화적 스트레스에 응답하여 ROS 항상성을 유지하는 기능을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 아라비도시스 ARS1(서열번호: 1)을 분리하고 ARS1이 종자 발아 및 ABA 또는 다른 산화적 스트레스로부터 식물체 내에서 ROS 항상성 유지에 필수적임을 확인하고자 한 것이다. 또한 ARS1이 ABA 또는 산화적 스트레스에 응답하여 핵으로부터 세포질로 전위됨과 ARS1이 종자 휴면 상태를 중지시켜 ABA에 대항하는 양성 조절자 기능과 ABA 및 산화적 스트레스에 대응하는 신호전달을 통하여 ROS 항상성을 유지하는 기능을 확인하고자 한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 ARS1 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 단백질은 핵 편재 시그널(6~22 아미노산 잔기), C2H2-형 징크 핑거 도메인(37~61 아미노산 잔기), 핵 수출 시그널(261~268 아미노산 잔기)과 또 다른 핵 편재 시그널(262~288 아미노산 잔기)로 구성되어 있고 식물체 내에서 앱시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상성 조절에 관여하는 ARS1 단백질을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 이때 상기 C2H2-형 징크 핑거 도메인은 앱시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상성 유지에 양성 조절자로서 기능역할을 특징으로 한다.
- [0013] 또한 상기 C2H2-형 징크 핑거 도메인은 C3 서브세트에 속함을 특징으로 한다.
- [0014] 한편 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 ARS1 단백질을 과발현하는 아라비도시스 형질전환 식물체에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 앱시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상성 유지시킴을 특징으로 하는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0015] 이때 상기 형질전환 식물체는 핵-편재된 ARS1이 ABA 또는 산화적 스트레스에 응답하여 세포질로 전위(translocation)됨을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 효과는 ARS1이 종자 휴면 상태를 중지시켜 ABA에 대항하는 양성 조절자 기능과 ABA 및 산화적 스트레스에 대응하여 ROS 항상성을 유지하는 기능을 지닌 ARS1 과발현 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 ARS1의 부재는 ABA-과민감성 종자 발아를 야기함을 나타낸 것이다.
- 도 1A는 *ars1* 변이 대립 형질체에 T-DNA의 삽입을 나타낸 것이다.
- 도 1B는 WT, *ars1-1*, *ars1-1*+벡터 및 *ars1-1*+ARS1 식물체 내의 ARS1 발현의 RT-PCR 분석한 것이다. TUBULIN2는 RNA 함량의 대조군으로 사용하였다.
- 도 1C는 WT, *ars1-1*, *ars1-1*+벡터 및 *ars1-1*+ARS1 식물체 간에 0 또는 1 μ M ABA에 노출 시 종자 발아를 비교한 것이다. 사진은 ABA 처리 5일 후 아라비도시스 묘목을 나타낸다.
- 도 1D는 RT-PCR에 의해 결정된 WT Col-0와 *ars1* 대립 형질 변이체 내의 ARS1의 발현을 나타낸 것이다. TUBULIN2는 RNA 함량의 대조군으로 사용하였다.
- 도 1E는 0 또는 1 μ M ABA 노출 시 WT Col-0와 *ars1* 변이체 간의 종자 발아를 비교한 것이다. 사진은 ABA 처리 5일 후 아라비도시스 묘목을 나타낸다.
- 도 1F는 다양한 농도의 ABA 하에 5일간 성장한 WT Col-0와 *ars1* 변이체의 녹색 떡잎을 정량한 그래프이다. 데이터는 3번 실험 후 평균과 표준오차를 나타낸다. 실험 당 50개의 종자를 사용하였다.
- 도 2는 ARS1 유전자의 특징을 나타낸 것이다.
- 도 2A는 BAR Expressolog Tree 프로그램을 이용하여 생성된 ARS1 동족체의 계통도이다.
- 도 2B는 ARS1은 2개의 NLS 도메인, 한 개의 NES 도메인 및 한 개의 C2H2형 징크 핑거 도메인을 지닌 단백질을 코드화하는 것이다.
- 도 2C는 ARS1 단백질 핵으로의 세포 내 편재를 나타낸 것이다. 아라비도시스 묘목으로부터 준비된 원형질체를

ARS1::sGFP 및 NLS::RFP와 함께 동시 형질 전환시켰다. 형질 전환된 원형질체를 형질 전환 12시간 후 형광 현미경으로 관찰하였다. GFP와 RFP 신호가 각각 녹색 및 적색 이미지로 나타난다. 바는 20 μm 를 나타낸다.

도 2D는 아라비도시스 다양한 조직 내의 ARS1 발현의 RT-PCR 분석을 나타낸 것이다. TUBULIN2는 RNA 함량의 대조군으로 사용하였다.

도 3은 ARS1은 ABA-유도 ROS 형성을 저해함을 나타낸 것이다.

도 3A는 형광 염료 DCFH-DA로 나타낸 ROS 생성의 대표 이미지이다. ABA(100 μM)로 1시간 처리시킨 WT Col-0 및 *ars1-2* 변이체의 3주령 묘목으로부터 원형질체이다. 바는 100 μm 를 나타낸다.

도 3B는 ABA 1(100 μM)과 MV(5 μM)로 처리하고 NBT로 염색시킨 후의 WT Col-0와 *ars1* 변이체 묘목이다. 짙은 청색은 NBT가 수퍼옥사이드와 반응하여 생성되는 불용성 포르마잔 침적을 나타낸다.

도 3C는 WT Col-0와 *ars1* 변이체 내의 내부 H_2O_2 생성 측정 분석방법이다. 시험은 2번 수행하였고 발광된 형광 물질을 530 nm 여기 및 590 nm 발광 조건 하에 측정하였다. 아스테릭스는 WT로부터 주요한 차이를 나타낸다.

도 3D는 MS 배지에서 4일간 성장된 묘목을 MV(5 μM) 을 포함하거나 포함하지 않는 MS 배지에 이송시켜 3일 간 더 배양시킨 사진이다.

도 4는 ARS1은 ABA-유도 ROS 생성을 저해함을 나타낸 것이다. *ars1* 변이체 묘목으로부터 분리된 원형질체에 공 sGFP 벡터 또는 ARS1::sGFP로 형질 전환하였다. 형질 전환 12시간 후에 원형질체는 ABA(100 μM)로 1시간 처리하고 디하이드로로다민123(Rh123)으로 15분간 염색하였다. 이미지는 원형질체 일부 시료의 녹색(GFP) 및 적색(Rh123) 형광 이미지이다. 바는 20 μm 를 나타낸다. 황색 화살표는 비-발현 원형질체를 가리키며, 백색 화살표는 sGFP 및 ARS1::sGFP 단백질이 발현하는 원형질체를 가리킨다.

도 5는 ABA 처리에 응답하는 ROS-제거 유전자의 발현을 나타낸 것이다. 3시간 동안 ABA(100 μM)를 처리 또는 비처리한 WT 및 *ars1* 변이체의 10일령 묘목으로부터 총 RNA를 분리하였다. qRT-PCR에 의해 결정된 Col-0 및 *ars1* 변이체 내에서 CCS(A), CSD3(B), APX1(C) 및 APX2(D)의 상대적인 전사 수준이다. 전사 수준은 TUBULIN2로 일반화한 것이다. 바는 3개의 전사체의 평균과 표준편차를 나타낸다.

도 6은 ARS1은 ABA와 산화적 스트레스에 응답하여 핵으로부터 세포질로 전위됨을 나타낸 것이다.

도 6A는 3주령 WT Col-0 식물체의 잎으로부터 분리된 원형질체에 ARS1::sGFP를 형질 전환시켰다. 형질 전환 12시간 이후에 원형질체를 지정된 시간에 ABA(100 μM), H_2O_2 (1.5 mM) 또는 MV(3 μM)로 처리하였다. 바는 20 μm 를 나타낸다.

도 6B는 도 6A에 나타난 ABA, H_2O_2 및 MV에 응답하여 세포질 내로 이송된 ARS1 단백질의 백분율이다. 바는 3개의 전사체의 평균과 표준편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 ARS1 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 상기 단백질은 핵 편재 시그널(6-22 아미노산 잔기), C2H2-형 징크 핑거 도메인(37-61 아미노산 잔기), 핵 수출 시그널(261-268 아미노산 잔기)과 또 다른 핵 편재 시그널(262-288 아미노산 잔기)로 구성되어 있고 식물체 내에서 앱시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상성 조절에 관여하는 ARS1 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 이때 상기 C2H2-형 징크 핑거 도메인은 앱시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상성 유지에 양성 조절자로서 역할한다.
- [0020] 또한 상기 C2H2-형 징크 핑거 도메인은 C3 서브세트에 속한다.
- [0021] 한편 본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 ARS1 단백질을 과발현하는 아라비도시스 형질전환 식물체에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 앱시스산 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 활성산소종 항상

성 유지시킴을 특징으로 하는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

- [0022] 이때 상기 형질전환 식물체는 핵-편재된 ARS1이 ABA 또는 산화적 스트레스에 응답하여 세포질로 전위(translocation)한다.
- [0023] 식물 호르몬인 앱시스산(ABA)은 종자 휴면 상태 및 식물 발달을 저해하는 활성산소종(ROS)의 축적을 야기시킨다. 본 발명자들은 종자 발아 시 ABA 및 묘목 상태에서 메틸 바이올로겐(MV)에 대한 과민감성을 나타내는 *ars1(aba and ros sensitive 1)*이라 명명된 아라비돕시스 탈리아나 형질전환체의 분리와 특성을 확인하였다.
- [0024] ARS1 유전자는 하나의 징크 핑거 도메인, 2개의 핵-편재 신호(NLS) 도메인 및 하나의 핵외수송신호(NES) 도메인으로 구성된 핵 단백질을 코드화시킨 것이다.
- [0025] *ars1* 변이체는 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제(CSD3) 유전자의 감소된 발현과 ABA 처리 후 ROS의 증가된 축적을 나타낸다. 아라비돕시스 원형질체 내의 ARS1의 일시적 발현은 ABA-매개 ROS 생성을 강하게 억제한다.
- [0026] 또한 핵-편재된 ARS1은 ABA, 과산화수소 또는 MV 처리에 응답하여 세포질 내로 전위되어진다. 이러한 결과는 ARS1이 식물체 내에서 ABA 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 ROS 항상성 조절에 관여하는 것으로 판단된다.
- [0027] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0028] 식물 호르몬 ABA는 중요한 생리적 과정을 조절하고 다양한 생리적 및 환경적 요인 내에서 시작되는 신호의 이전을 위한 세포 내 ROS 축적에 밀접히 관련되어 있다. 본 발명에서 본 발명자들은 ABA 과민감성 변이체로서 다수의 아라비돕시스 내에 T-DNA 삽입된 *ars1* 변이체를 선별하고 분리하였다.
- [0029] 본 발명자들은 ARS1이 C2H2형 징크 핑거 도메인을 암호화하고 ABA 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 ROS 항상성 유지에 양성 조절자로서 역할하며 또한 ARS1이 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제(CSD3) 유전자의 조절을 통해 세포 내의 독성 ROS의 유도를 초기화함을 확인하였다.
- [0030] 흥미롭게도 본 발명자들은 핵-편재된 ARS1이 ABA 또는 산화적 스트레스에 응답하여 세포질로 전위됨을 확인하였다. ROS 신호에 의해 유도된 ARS1의 전위는 식물 스트레스 반응에 중요한 역할을 하는 ROS-의존 엔테로그래이드 신호화 경로의 역할을 규명하는 데 도움을 줄 것이다. 또한 이러한 결과는 ARS1이 아라비돕시스 내에서 ABA 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 ROS 항상성 유지를 조절하는데 필수적임을 암시하는 것이다.
- [0031] (1) ABA-과민감성 *ars1* 변이체의 분리 및 동정
- [0032] RD29Apro::LUC 유전자가 형질전환된 아라비돕시스 C24 에코타입 식물체에 T-DNA를 삽입한 대다수 돌연변이체 군집으로부터 ABA 또는 비생물학적 스트레스에 반응하는 돌연변이체를 선별하였다. 본 발명에서 야생형(WT, C24 ecotype)과 비교하여 ABA에 대한 종자 발아 민감성이 증진된 T₂ 자손을 스크리닝하였다. 표현형은 T₃ 자손에서 더욱 명확히 동정되었다. *ars1-1* 변이체는 감소된 종자발아와 함께 ABA에 과민감성을 나타내었으며 WT(야생형)에 비해 녹색 떡잎의 퇴화된 표현형을 나타낸다.

- [0033] TAIL-PCR 분석을 통하여 본 발명자들은 *ars1-1* 변이체가 *ARS1*(At3g02860) 내에 T-DNA가 삽입되었고 두 번째 엑손 내에 위치하며 ATG 번역 시작부위로부터 701 bp 상부에 위치함을 확인하였다. 유전자형 분석은 *ARS1* 내의 T-DNA 삽입이 *ars1-1* 변이체 표현형과는 별개이며 모든 시험된 F₂ 호모자이그트는 동일한 표현형을 나타내었다($n = 100$, 데이터 나타나지 않음).
- [0034]
- [0035] *ARS1*은 도 1A에 나타난 바와 같이 징크 이온-결합 단백질을 암호화시킨다. 그러나 *ARS1* 단백질의 생물학적 특성은 아직 밝혀지지 않았다. ABA 응답에 대한 *ARS1*의 기능적 역할을 규명하기 위해 본 발명자들은 칼리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터의 조절 하에 *ARS1*을 과발현시키는 플라스미드 유전자를 구축하고, 이 플라스미드 유전자를 *ars1-1* 변이체(*ars1-1+ARS1*)에 형질 전환시켰다.
- [0036] RT-PCR 분석을 통해 *ars1-1+ARS1* 식물체가 야생형(WT)에 비해 *ARS1* 전사가 과발현됨을 규명하였다. 그러나 *ARS1* 전사 발현은 *ars1-1*과 공벡터(*ars1-1+Vector*)를 포함하는 *ars1-1* 모두에서 존재하지 않았다(도 1B). 또한 ABA 스트레스에 반응하여 *ars1-1+ARS1* 식물체는 *ars1-1*의 ABA 과민감성을 조절하였으며 종자 발아시 야생형(WT) 표현형이 나타났다. 반면 *ars1-1* 벡터는 *ars1-1*과 유사하게 발아가 억제되는 표현형이 나타났다(도 1C).
- [0037] 다양한 대립 형질 내에서 ABA 응답에 대한 *ARS1*의 역할을 동정하기 위하여 본 발명자들은 아라비도시스 Col-0 야생형 내에서 3개의 서로 다른 T-DNA 대립 형질인 *ars1-2*, *ars1-3* 및 *ars1-4* 변이체를 확보하였다(도 1A). *ARS1* 전사는 Col-0 식물체에 의해 *ars1-2* 및 *ars1-3*에서 발현되지 않았으나 *ars1-4* 내에서는 약하게 발현됨을 확인할 수 있었다(도 1D). Col-0 야생형 내의 모든 *ars1* 대립형질 변이체는 Col-0 식물체에 비해 퇴화된 녹색 떡잎의 출현과 ABA 과민성 표현형을 나타내었다(도 1E, 도 1F).
- [0038] 뿌리 길이의 측정을 통해 ABA 민감성을 확인할 수 있다(도 8). MS 배지에서 성장된 4일령 식물체를 ABA를 포함하는 MS 배지에 이전시키고 뿌리 성장을 11일 후에 모니터링 하였다. 30 및 40 μ M ABA에서 *ARS1* 전사체가 결핍된 *ars1-2* 및 *ars1-3* 식물체의 뿌리 성장은 Col-0 식물체에 비해 상당히 낮게 나타났다. 그러나 *ars1-4* 변이체는 Col-0와 상당한 차이를 나타내지 않았다. 비록 *ars1-4*의 ABA-의존 뿌리 성장 표현형은 발아 표현형과 상이하지만 데이터도 이들 변이체 내의 *ARS1* 발현의 차이에 상응하는 것이다(도 1D, 도 8). 이러한 결과는 *ARS1*이 발아 씨앗 휴면 상태를 중지시키는데 필수적이고 ABA에 의해 주로 저해받는 것이다.
- [0039] (2) *ARS1*의 특성 확인
- [0040] 식물체 내의 *ARS1*의 잠재적 기능을 예측하기 위해 본 발명자들은 아라비도시스 *ARS1*과 다른 식물체 내의 동족체 간의 BLAST-P 검색으로 조회하여 단백질 서열을 비교하였다. BAR Expressolog Tree 프로그램을 이용한 계통 발생 분석(http://bar.utoronto.ca/expressolog_treeviewer/)은 *ARS1*이 *Medicago truncatula* 내의 징크 핑거 단백질과 가장 높은 서열 유사성(53.1%)을 지니고 *Glycine max*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum*, *Oryza sativa*, and *Zea mays* 와 같은 식물종 내의 동족체와의 유사성은 32.4-49.9%를 나타내었다(도 2A). 계통도는 서로 다른 계통 가지에 속하는 쌍떡잎 또는 외떡잎식물간의 *ARS1* 동족체가 명확히 구분됨을 나타낸다.
- [0041] 그러나 이들의 생물학적 기능은 식물체 내에 존재한다. *ARS1*은 313개의 아미노산 단백질을 암호화하고 있으며 예측되는 분자량은 35.2kDa(<http://www.arabidopsis.org/>; 도 2B)이다. *ARS1* 단백질은 핵 편재 시그널(NLS; 6 - 22 a.a.)을 함유하고 있고 N-말단 영역 내에 C2H2-형 징크 핑거 도메인(37 - 61 a.a.)을 지니며 핵 수출 시그널(NES; 261 - 268 a.a.)과 또 다른 NLS(262 - 288 a.a.)를 C-말단 영역에 지닌다.

- [0042] C2H2 징크 핑거 단백질은 A, B, C 3개의 세트로 분류되고 세트 C는 다시 C1, C2, C3와 같은 세 개의 서브 세트로 분류된다. 본 발명자들은 ARS1이 C3 서브세트의 서브패밀리에 속하는 것을 확인하였다(도 9). 이는 ARS1도 C2H2 징크 핑거 단백질과 같이 핵 또는 세포질에 존재하고 어떤 경우 서로 전위됨을 나타내는 것이다.
- [0043] ARS1의 세포 내 편재를 밝혀내기 위해 본 발명자들은 sGFP 녹색형광 도메인이 포함된 ARS1::sGFP 플라스미드 유전자를 사용하였다. 핵 표지로서 RFP(NLS::RFP)가 NLS 도메인에 융합된 키메라 플라스미드 유전자이다. 도 2C에 나타난 바와 같이 녹색 및 적색 형광 신호의 세포 내 분포가 서로 동일한 위치에 존재하였으며 이는 ARS1이 핵에 편재됨을 나타낸다.
- [0044]
- [0045] 본 발명자들은 RT-PCR 분석에 의해 다른 장기 내의 ARS1 전사체의 발현을 측정하였다(도 2D). 흥미롭게도 ARS1 전사는 열매와 뿌리 내에서 높게 발현되었으며 ABA에 대해 높게 발현되었다. ARS1 발현은 묘목, 2차 개화 및 꽃과 같은 높은 증식 기관 내에서 보다 로제트 잎 및 줄기 내에서 약간 더 높게 나타났다.
- [0046] (3) ARS1은 ABA-유도 ROS 생성을 저해한다.
- [0047] ABA는 가뭄 저항성과 같은 비생물학적 스트레스 저항성과 깊은 연관을 나타낸다. 따라서 본 발명자들은 수분감소 분석 방법을 통해 ABA 존재 또는 부재 시 Col-0 식물체와 *ars1-2* 식물체 간에 특별히 주요한 차이를 나타내지 않음을 확인하였다(도 10).
- [0048] 또한 본 발명자들은 ROS-민감, 세포-투과 형광 염료, 2',7'-디클로로플루오레센 디아세테이트(DCFH-DA)를 사용하여 Col-0와 *ars1-2* 원형질체 내에서 ABA-유도 ROS 생성을 측정하였다. 도 3A에 나타난 바와 같이 형광 신호가 이전 보고와 동일하게 ABA 스트레스에 대해 Col-0 식물체에서는 ROS 형광이 증가되는 것을 확인하였다. 흥미롭게도 ABA에 노출된 *ars1-2* 식물체 내에서는 ROS 형광이 급격히 증가됨을 발견하였다. 또한 *ars1-3* 및 *ars1-4* 내의 ABA-유도 ROS 생성은 *ars1-2* 변이체 내의 생성과 유사하였다(데이터 나타나지 않음).
- [0049] 본 발명자들은 니트로블루 테트라졸리움(NBT)으로 슈퍼옥사이드 음이온을 염색함으로써 식물체 내의 ABA 또는 MV-유도된 ROS 생성을 측정하였다. ABA와 MV 스트레스에 대해 모든 *ars1* 변이 식물체 내에서 짙은 보라색으로 염색되어지는 슈퍼옥사이드가 증가되어지는 수준을 나타내었다. 반면 Col-0 식물체에서는 ABA 또는 MV의 존재 또는 부재 시 일정하게 유지되었다. 흥미롭게도 스트레스 부재 시에도 *ars1* 변이체는 Col-0 식물체보다 더 염색됨을 나타내었으며 ARS1의 부재는 식물체 내의 ROS가 증가되어 있음을 나타내었다(도 3B).
- [0050] *ars1* 변이체 내의 ROS 축적을 확인하기 위하여 본 발명자들은 Col-0 및 *ars1* 변이체의 과산화수소 함량을 비교하였다(도 3C). 도 3B에 나타난 바와 같이 모든 *ars1* 변이체 내의 과산화수소 함량은 스트레스 부재시에도 Col-0 식물체 내의 함량보다 높았다. *ars1-2* 및 *ars1-3* 변이체는 *ars1-4*보다 높은 ROS를 나타내었다. 이는 *ars1* 변이체 중에 ARS1 전사체의 서로 다른 수준과 일치하는 것이다(도 1D). 더욱이 *ars1* 변이체는 Col-0에 비해 백화된 잎을 나타내고 MV-민감 표현형을 나타내었다(도 3D).
- [0051] ARS1이 직접 ABA-유도 ROS 생성에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위하여 본 발명자들은 ROS 생성을 모니터링하기 위하여 형광 염료 디하이드로로다민123(Rh123)을 사용하여 원형질체 내에서 상보성 검사를 실시하였다. Rh123은 ROS에 의해 산화되어 형광 클로모포어 Rh123으로 된다. 공 sGFP 백터와 ARS1::sGFP 플라스미드 유전자를 *ars1* 변이체로부터 분리된 원형질체 내에 서로 독립적으로 형질전환 시켰다. 약 40%의 원형질체가 두 개의 플라스미드 유전자의 발현을 나타내었다(데이터 나타나지 않음). 본 발명자들은 모든 *ars1* 변이체로부터 분리된 원형질체내에서 ARS1::sGFP가 핵을 목표로 명확히 편재되어짐과 공백터는 세포질내에 편재되어 있음을 확인한 후 ABA를 1시간 동안 처리하고 Rh123을 15분 동안 처리하였다(도 4). Rh123에 의한 ROS의 형광 신호는 공백터가

형질 전환된 것에 비해 ARS1::sGFP가 형질 전환된 원형질체에서 명확히 감소되었다(도 4). 이러한 결과는 ARS1이 ABA-유도 ROS 생성을 저해하는 것을 의미한다.

[0052] (4) ARS1 결핍은 SOD 발현을 감소시킨다

[0053] 어떻게 ARS1이 ABA 스트레스 신호전달 기작을 조절하는지 확인하기 위해 본 발명자들은 ABA에 응답하는 ARS1의 전사 수준을 qRT-PCR 분석을 통해 관찰하였다. ARS1 전사는 ABA를 1시간 및 3시간 처리되었을 때 약간 증가(1.2배 유도)하였다(도 11A). 이러한 결과는 Englbrecht 등에 의해 C2H2 징크 핑거 단백질이 스트레스에 응답하여 보존된 생물학적 프로세스 내에서 전사 조절자로 역할한다는 것을 보고되었다.

[0054] 따라서 본 발명자들도 *ars1* 변이체 내의 RD29A 유전자의 발현이 ABA 신호 경로 내에서 ARS1의 가능한 용도를 탐구하기 위해 조사하였다. RD29A 발현은 스트레스 신호전달 하위 유전자로서 ABA에 의해 크게 유도되었으나 과산화수소에 대해서는 큰 변화가 없다고 보고되어져 있다. 그러나 RD29A 전사는 ABA의 존재 또는 부재 시 Col-0 식물체 내의 발현 증가와 비교하여 *ars1* 변이체 내에서의 발현 변화는 나타나지 않았다(도 11B). 따라서 ARS1 활성은 ABA 신호 경로 내에서 전사 수준의 조절을 위해 반드시 필요한 것은 아니다.

[0055] ABA-유도 ROS 생성 조절 기능을 가진 ARS1을 근거하여 본 발명자들은 *ars1* 변이체 내의 ROS 제거 효소의 전사 발현을 조사하였다(도 5). 수퍼옥사이드 디스뮤타아제(SOD)는 O_2^- 를 O_2 와 H_2O_2 로 디스뮤타이션 시키는 효소이다. 본 발명자들은 ABA 존재 또는 부재 시 2개의 SOD 유전자(CCS 및 CSD3)와 2개의 APX 유전자(APX1 및 APX2)의 전사 발현을 qRT-PCR 방법을 통해 분석하였다.

[0056] CCS(구리/아연 수퍼옥사이드 디스뮤타아제), APX1 및 APX2의 전사 발현은 Col-0 및 *ars1* 변이체 간에 ABA 스트레스에 의하여 큰 차이를 나타내지 않았다(도 5A, C, D). 그러나 구리/아연 수퍼옥사이드 디스뮤타아제 3을 코드화한 CSD3의 전사 발현은 ABA 스트레스에 의하여 모든 *ars1* 변이체 내에서 크게 감소하였다(도 5B). 이러한 결과는 ARS1이 특히 CSD3와 같은 SOD 전사발현을 저해함으로써 ABA-유도 ROS 축적을 억제하는 것으로 판단된다.

[0057] (5) ARS1 단백질은 ABA 및 산화적 스트레스에 의하여 핵에서 세포질로 전위된다.

[0058] 단백질 서열 분석은 ARS1이 C 말단 부근에 추정 NES 모티브를 가지고 있는 것으로 나타났(도 2B). 추정 NES 신호의 존재는 ARS1이 특정 스트레스 신호전달에 의해 핵으로부터 이송될 수 있음을 암시하는 것이다. 이러한 사실을 바탕으로 본 발명자들은 ARS1 단백질의 아라비도시스 세포 내 편재 변화를 조사하였다.

[0059] 스트레스 조건 하에 ARS1의 세포 내 편재를 분석하기 위해 본 발명자들은 아라비도시스(Col-0) 원형질체 세포 내에 ARS1::sGFP를 형질전환 시켰다. 형질전환 시킨 뒤 12 시간 후, 형질 전환된 원형질체에 ROS 생성을 촉진시키는 ABA, H_2O_2 또는 메틸 바이올로젠(MV) 스트레스를 처리하였다. 스트레스 부재 시 ARS1은 명확히 핵에 편재되어 있다(도 2C, 6A, 도 11). 놀랍게도 ABA, H_2O_2 또는 메틸 바이올로젠(MV) 스트레스를 처리했을 때 핵-편재 ARS1이 세포질 내로 전위되었다(도 6, 보충 도 S6).

[0060] 세포질 내의 ARS1의 전위 패턴은 스트레스 지속 시간 5시간까지 현저히 증가하였다(도 6B). 이러한 결과는 추정 NES 모티브가 스트레스 신호전달에 있어서 ARS1 기능에 중요함을 나타내는 것이다. 또한 이러한 증거는 ARS1이 핵 내에 불활성화 형태로 존재하고 식물 세포 내에서 ABA-유도 또는 스트레스-유도 ROS 생성 및 축적 억제자와 같은 기능을 가지기 위해 세포질로 전위됨을 암시한다.

- [0061] 종자 발아는 식물 호르몬과 이차 산물체 간의 광범위한 상호 교신에 관련 있다. ABA와 지벨렐린(GA)은 종자 발아에 있어서 역기능을 가지고, ROS와 Ca^{2+} 같은 이차 산물체는 발아에 대해 서로 다른 신호전달 기작으로 작용한다. 휴면 종자 내에서 높은 ABA에 의하여 종자 표면 내의 DELLA 유전자 RGL2와 ABA 생합성 유전자 ABA1의 발현을 통해 발아를 저해하고 따라서 ABI5의 유도를 야기한다.
- [0062] 종자 휴면은 추위에 대한 노출, 또는 산소 및 물과 같은 환경적 신호에 의해 깨질 수 있다. 종자 발아 시 ABA 효과와 상호 반대 작용으로 발아 증진을 증가시키기 위해 내부의 ROS와 세포질 액상의 Ca^{2+} 농도가 증가되어진다. 외부의 ROS와 Ca^{2+} 처리 시 역시 종자 발아를 향상시킨다. 그러나 종자휴면을 중지하는데 필수적인 '발아의 산화적 윈도우'라 명명되어지는 ROS 항상성 유지에 의해 이루어지는 발아는 부족하거나 과도한 ROS에 의해 지연되거나 저해되어진다.
- [0063] 본 발명에서 본 발명자들은 아라비도시스 내의 ABA-유도되는 종자 휴면으로부터 탈피하기 위해 종자 발아에 필수적인 것으로 징크 핑거 도메인 단백질을 코드화시킨 ARS1을 동정하였다(도 1 및 도 2, 도 7). 흥미롭게도 *ars1* 변이체는 ABA 부재 또는 존재 시 더 높은 ROS 축적을 나타내며 이는 ARS1이 ROS 생성을 저해하는 역할을 하는 것을 나타낸다(도 3 및 도 4). 더욱이 이러한 발견은 종자 휴면을 중지시키는 기간 동안에 과도한 ROS 축적을 방지하기 위하여 ARS1이 '발아의 산화적 윈도우'를 조절하는 것이다.
- [0064] *in silico* 분석을 통해 본 발명자들은 211 개의 C2H2-형 징크 핑거 단백질이 아라비도시스 내의 추정 전사 조절자의 가장 풍부한 패밀리를 구성하는 것을 확인하였다(<http://www.arabidopsis.org/>). 이들 단백질의 일부는 특정 ABA 또는 산화적 스트레스 신호화 내에서 비생물학적 스트레스 응답에 작용한다.
- [0065] SAZ(SA- 및 ABA-하위조절 징크 핑거 유전자), ZFP3(징크 핑거 단백질 3), AZF1(아라비도시스 C2H2 징크 핑거 단백질 1) 및 AZF2는 종자 발아 및 초기 묘목 성장 기간 내의 ABA 신호화에 음성 조절자로 작용한다.
- [0066] SAP12(스트레스-관련 단백질 12)는 두 개의 AN1 징크 핑거를 포함하며 징크 핑거 구조 사이에 위치하는 시스템인 잔기의 산화 환원 상태에 기인한 변화를 통해 그 활성을 조절한다. ZAT10(아라비도시스 징크 핑거 10)은 MPK3와 MPK6에 의해 인산화되고 ROS-의존적인 ABA 신호전달 기작에 관련되어 있다. C2H2 징크 핑거 단백질 중에 고도로 보존된 기능적 모티프는 이들 단백질이 다양한 생물학적 과정 내에서 전사체 조절에 관해 유사한 분자 기능을 지니는 것을 암시한다.
- [0067] ROS는 발아, 성장, 발달 및 비생물학적 스트레스 반응을 포함하는 다양한 생물학적 과정을 조절하는 중요한 신호 분자로 작용한다. 다양한 비생물학적 스트레스는 독성 수준의 ROS의 생성을 야기하고 이는 식물 세포 내의 엽록소 및 미토콘드리아와 같은 세포 내 소기관에 산화적 손상을 야기시킨다.
- [0068] 독성 ROS의 축적을 조절하기 위하여 식물체는 효소적 및 비-효소적 ROS 제거 항산화 시스템을 포함하는 세포로부터 ROS의 제거를 위한 효과적이고 잘 보존된 매커니즘을 지니고 있다. 예를 들면 SOD, CAT 및 APX는 ROS-제거 효소로 작용한다. ABA 및 비생물학적 스트레스 모두는 플라즈마 멤브레인-편재된 NADPH 옥시다제를 통해 산소 라디칼 및 과산화수소와 같은 ROS의 생성을 유도한다. *ars1* 변이 식물체 내의 ROS 축적은 SOD 유전자 CDS3의 저하된 발현에 의해 야기되는 것이다(도 5). 이러한 결과는 ARS1의 스트레스 저항성 기능이 항산화 능력의 조절과 관련되어 있음을 나타내는 것이다. 그러나 어떻게 ARS1이 CDS3 발현을 조절하는지는 아직 밝혀지지 않았다. 이러한 매커니즘의 상세한 이해를 위해 ARS1, ROS 제거 시스템 및 항산화 효소 활성 상호간에 더 깊은 연구가 요구된다.

- [0069] ROS는 엽록소, 미토콘드리아 및 페록시좀을 포함하는 다양한 세포 소기관 내에서 생성되며 스트레스 동안에 핵 전사 내의 변화를 야기시킨다. ROS 신호화는 두 개의 서로 다른 경로를 통해 서로 교환될 수 있도록 연결되어 있으며 이는 레트로그레이드(소기관으로부터 핵)와 엔테로그레이드(핵으로부터 소기관) 신호화이며 이는 스트레스에 대한 순응, 적응 또는 저항성과 관련되어 있는 것이다. ROS 항상성 유지를 파괴하는 것은 엽록소 또는 미토콘드리아에서 발생하며 이들 신호가 신호화 카스케이드의 레트로그레이드에 의해 핵으로 전사되기 때문이다.
- [0070] 본 발명자들은 핵 내의 ARS1이 ROS 신호에 응답하여 ABA의 노출 또는 산화적 스트레스에 의해 세포질로 전위됨을 발견하였다(도 6). 본 발명자들은 레트로그레이드 조절에 관련된 단백질이 무엇인지 확인할 수 없었으며 이는 조건에 따라 서로 다른 두 곳에 위치하거나 그 중 한 곳에 편재하기 때문이다. 그러나 ARS1은 ROS-의존적 방법으로 핵으로부터 세포질로 전위한다(도 6). 이는 ARS1이 ABA에 응답하거나 스트레스 조건 하에서 핵과 세포질 사이에 ROS-의존적인 엔테로그레이드 신호전달 기작에 영향을 미치는 것으로 판단된다.
- [0071] 식물 호르몬 ABA는 중요한 생리적 과정을 조절하고 다양한 생리적 및 환경적 요인 내에서 시작되는 신호의 이전을 위한 세포 내 ROS 축적에 밀접히 관련되어 있다. 본 발명에서 본 발명자들은 ABA 과민감성 변이체로서 다수의 아라비도시스 내에 T-DNA 삽입을 통해 *ars1* 변이체를 분리하고 지정하였다. 본 발명자들은 ARS1이 C2H2형 징크 핑거 도메인 단백질을 암호화하고 ABA 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 ROS 항상성 유지에 양성 조절자로서 역할하며 또한 ARS1이 수퍼옥사이드 디스무타아제(CSD3) 유전자의 조절을 통해 세포 내의 독성 ROS의 유도를 시작함을 확인하였다. 흥미롭게도 본 발명자들은 핵-편재된 ARS1이 ABA 또는 산화적 스트레스에 응답하여 세포질로 전위함을 확인하였다. ROS 신호에 의해 유도된 ARS1의 전위는 식물 스트레스 반응에 중요한 역할을 하는 ROS-의존적인 엔테로그레이드 신호전달 기작에서의 역할을 규명하는 데 도움을 줄 것이다. 또한 이러한 결과는 ARS1이 아라비도시스 내에서 ABA 및 산화적 스트레스에 응답하여 종자 발아 및 ROS 항상성 유지를 조절하는데 필수적임을 암시하는 것이다.
- [0072] (실시예 1) 식물 재료 및 성장 조건
- [0073] 아라비도시스 탈리아나 C24 RD29A::LUC 야생형(WT)에 활성화된 T-DNA 벡터 pSKI015를 형질전환 시켜 T1 변이체 군집을 구축하였다. T1 식물체는 10개씩 그룹화하고 T2 자손은(세대는) 야생형(WT)에 비해 ABA 과민감성 표현형을 가진 돌연변이체를 선별하였다. ARS1(*At3g02860*)의 T-DNA 삽입 변이체인, *ars1-2* (SALK_009596), *ars1-3* (SALK_030445) 및 *ars1-4* (SALK_126300)를 아라비도시스 생물자원센터(ABRC)로부터 확보하였다. 종자를 표면 멸균화시킨 후 ABA 첨가 또는 비첨가 된 MS 배지(1/2 Murashige and Skoog(MS) 염, 1.5% 설탕 및 0.6% 한천, pH 5.7)에 파종시켰다. 식물체를 22℃에서 명 16시간, 암 8시간 주기를 가진 식물생장 챔버에서 생장시켰다.
- [0074] (실시예 2) 열 비대칭 인터레이스 PCR 분석
- [0075] *ars1-1* 변이체 내에 삽입된 T-DNA의 왼쪽 경계 DNA 인접부위를 열 비대칭 인터레이스 PCR(TAIL-PCR)로 분리하였다. 전체 분리 단편의 서열을 분석하였다. TAIL-PCR에 사용된 프라이머는 T-DNA 왼쪽 경계 특이적 프라이머(LB1, LB2 및 LB3)와 퇴화된 프라이머(DP1, DP2 및 DP3)였다. PCR 생성물의 뉴클레오타이드 서열은 BLAST 분석으로 결정하였다.
- [0076] (실시예 3) 전사 수준의 결정
- [0077] RNeasy kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 10일령의 묘목으로부터 총 RNA를 분리하였다. 분리된 총

RNA에 DNase I(Qiagen, Valencia, CA, USA) 처리를 통해 게놈 DNA를 제거하였다. 20- μ l 반응량으로 총 RNA 2 μ g을 cDNA 합성 kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 PCR을 통해 첫 번째 가닥 cDNA를 합성하였다. ARS1 서열에 의해 특이 프라이머를 설계하였다. TUBULIN2를 본 실험에서 대조군으로 사용하였다. RT-PCR 분석에 사용된 프라이머는 표 S1에 기입하였다.

[0078] 정량 RT-PCR(qRT-PCR) 분석을 위해 총 RNA 2 μ g을 cDNA 합성 kit(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 PCR을 통해 첫 번째 가닥 cDNA를 합성하였다. QuantiSpeed SYBR No-Rox Mix(PhileKorea, Seoul, Korea)를 다음과 같은 qRT-PCR을 위해 사용하였다. 50°C 10분, 95°C 2분, 40 주기, 95°C 5초, 60°C 30초의 조건으로 반복시켰다. TUBULIN2를 RNA 일반화에 사용하였다. 모든 시료의 상대적 발현 수준을 CFX 관리 프로그램(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 자동적으로 계산하고 세 번의 생물학적 전사를 수행하였다. qRT-PCR 분석에 사용된 프라이머는 표 1에 기입하였다.

표 1

프라이머 명칭	서열(5'-3')	목적
LB1	ATACGACGGATCGTAATTTGT (서열번호: 2)	TAIL-PCR
LB2	TAATAACGCTGCGGACATCTAC (서열번호: 3)	TAIL-PCR
LB3	TTGACCATCATACTCATTGCTG (서열번호: 4)	TAIL-PCR
DP1	NTCGASTWTSWGTT (서열번호: 5)	TAIL-PCR
DP2	NGTCGASWGANAWGAA (서열번호: 6)	TAIL-PCR
DP3	WGTGNAGWANCANAGA (서열번호: 7)	TAIL-PCR
ARS1-RT-F	ATGGATGCTCAAGCGAAG (서열번호: 8)	RT-PCR
ARS1-RT-R	AAGATGTTGAGCTCT (서열번호: 9)	RT-PCR
TUBULIN2-RT-F	CGTGGATCACAGCAATACAGAGCC (서열번호: 10)	RT-PCR
TUBULIN2-RT-R	CCTCCTGCACTTCCACTTCGCTCTC (서열번호: 11)	RT-PCR
ARS1-F-XbaI	GCTCTAGAATGGATGCTCAAGCGAAG (서열번호: 12)	Plasmid 구축
ARS1-R-BamHI	GCGGATCCAAGATGTTGAGCTCT (서열번호: 13)	Plasmid 구축
TUBULIN2-qRT-F	TGGCATCAACTTTCATTGGA (서열번호: 14)	qRT-PCR
TUBULIN2-qRT-R	ATGTTGCTCTCCGCTTCTGT (서열번호: 15)	qRT-PCR
ARS1-qRT-F	CCTGAAGTGATCGATGCACCAG (서열번호: 16)	qRT-PCR
ARS1-qRT-R	TGGTGTAATCGGAAGACACGAC (서열번호: 17)	qRT-PCR
RD29A-qRT-F	CCTGAAGTGATCGATGCACCAG (서열번호: 18)	qRT-PCR
RD29A-qRT-R	TGGTGTAATCGGAAGACACGAC (서열번호: 19)	qRT-PCR
CCS-qRT-F	CCTCTACCAACCCCAATCTC (서열번호: 20)	qRT-PCR
CCS-qRT-R	GATCAGAAGTGAGAGCAGTCG (서열번호: 21)	qRT-PCR
CDS3-qRT-F	TCCGAGGCTGTCTTCAATTC (서열번호: 22)	qRT-PCR
CDS3-qRT-R	GAAGTGAGGTCCAGTAGAGATG (서열번호: 23)	qRT-PCR
APX1-qRT-F	TGACATTCCTTTCCACCCCTG (서열번호: 24)	qRT-PCR
APX1-qRT-R	CTTGGTAGCATCAGGAAGACG (서열번호: 25)	qRT-PCR
APX2-qRT-F	TTGCTGTTGAGATCACTGGAG (서열번호: 26)	qRT-PCR
APX2-qRT-R	TCCGACCAAACATCTCTTAG (서열번호: 27)	qRT-PCR

[0080] (실시예 4) 원형질체내에서의 일시적 발현 분석

[0081] ARS1을 암호화하는 cDNA를 PCR에 의해 식물의 총 cDNA 라이브러리로부터 분리하였다. PCR 생성물을 뉴클레오타이드 서열 분석으로 확인하였으며 sGFP 벡터의 *XbaI* 및 *BamHI* 부위로 삽입시켜 35S 프로모터 조절 하에 키메라 GFP-융합 플라스미드 유전자를 제조하였다. sGFP 플라스미드 벡터는 원형질체 발현을 위한 CaMV35S-sGFP-NOS3를 포함하는 pUC-기반 벡터이다.

[0082] 아라비도시스 잎으로부터 분리된 원형질체에 형질전환 시켰다. 융합 플라스미드 유전자의 발현은 형질 전환 후 다양한 시점에서 모니터링 되었으며 Zeiss Axioplan 형광 현미경(Carl Zeiss Co., Jena, Germany)을 통해 이미

지를 캡처하였다. 사용된 필터 세트는 녹색형광단백질(GFP) 및 적색형광단백질(RFP)에는 각각 XF116(여기, 474AF20; 디크로익, 500DRLP; 및 발광기, 605DF50) 및 XF137(여기, 540AF30; 디크로익, 500DRLP; 및 발광기, 585ALP; Omega, Inc., Brattleboro, VT)을 사용하였다. 데이터는 어도비 포토샵 소프트웨어(Adobe System, Mountainview, CA)를 사용하여 처리하였으며 유사-색상 포맷 내에 나타내었다.

[0083] (실시예 5) 세포질 내의 ROS 검출

[0084] 세포 내 ROS 수준을 측정하기 위해 원형질 현탁액($\sim 2 \times 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$)을 $5 \mu\text{M}$ 2,7-디클로로하이드로플루오로세인 디아세테이트(DCFH-DA, 분자 프로브, Eugene, Oregon, USA)를 첨가하여 5분간 반응 시키고, $20 \mu\text{M}$ 디하이드로 로다민123(Rh123, 분자 프로브, Eugene, Oregon, USA)으로 15분간 반응시켜 XF116(DCFH-DA; 여기, 474AF20; 디크로익, 500DRLP; 및 발광기, 605DF50)과 XF33/E(Rh123; 여기, 535DF35; 디크로익, 570DRLP; 및 발광기, 605DF50; Omega, Inc., Brattleboro, VT, USA)를 사용하여 Zeiss Axioplan 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0085] (실시예 6) O_2^- 의 조직화학적 검출

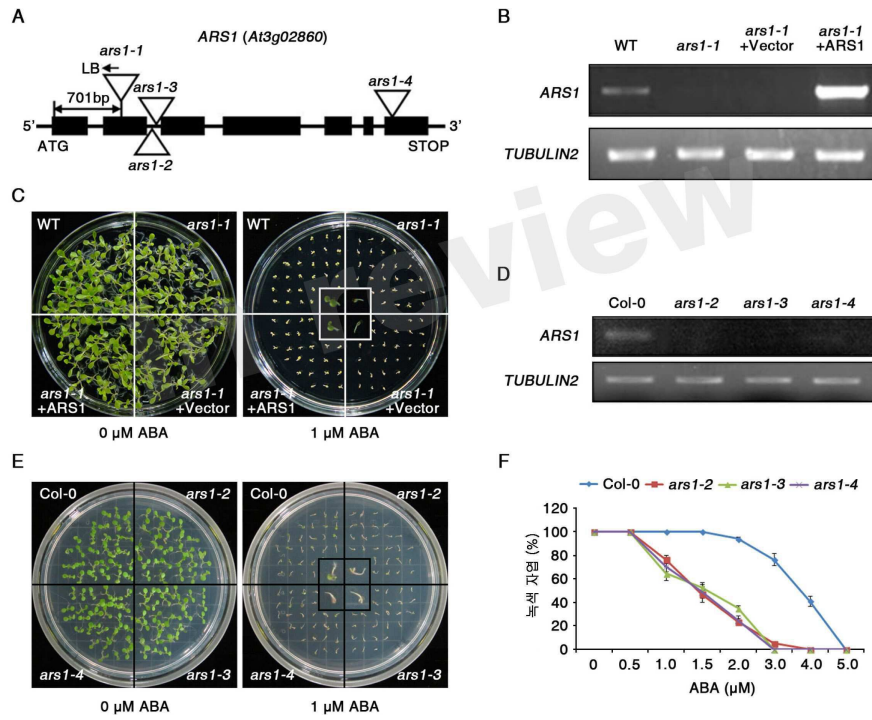
[0086] 조직 내에 축적된 O_2^- 를 검출하기 위해 NBT(nitro blue tetrazolium; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) 염색을 사용하였다. O_2^- 는 조직 내에 짙은 청색 포르마잔 화합물로 시각화하였다. 7일 동안 키운 묘목을 0.1% NBT 및 10 mM 아자이드 나트륨을 포함하는 50 mM 인산 칼륨 완충액(pH 7.8)에 담그고 암조건에서 2시간 반응시켰다. 락토-글리세롤-에탄올(1: 1: 4 부피)을 첨가하고 5분간 끓임으로서 이미지 촬영을 하기 전에 염색된 묘목 으로부터 염색소를 제거하였다(Bournonville and D'Amaz-Ricci, 2011).

[0087] (실시예 7) H_2O_2 의 측정

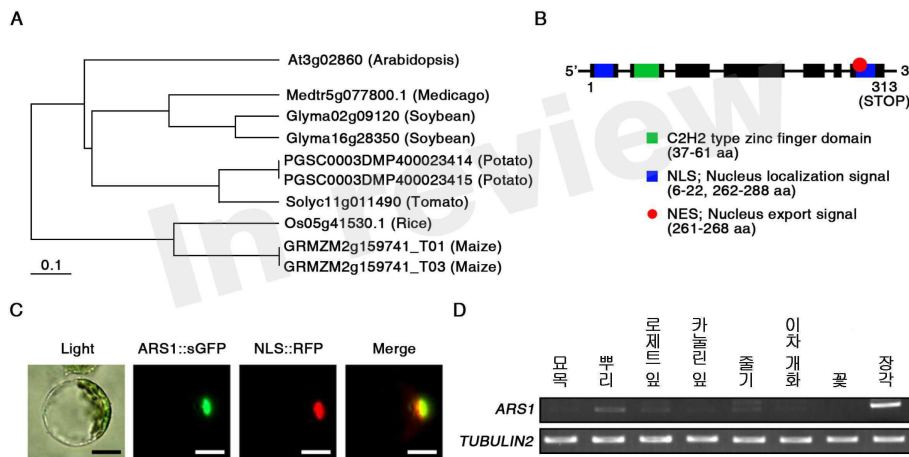
[0088] Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit(Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 사용하여 조직 내에 함유되어있는 H_2O_2 를 측정하였다. 여기 상태 530nm 형광 상태 590nm인 형광 물질을 사용하였다. H_2O_2 농도는 표준 곡선에 근거하여 계산하였고 생체 중량 당 H_2O_2 로 표시하였다(Bournonville and D'Amaz-Ricci, 2011).

도면

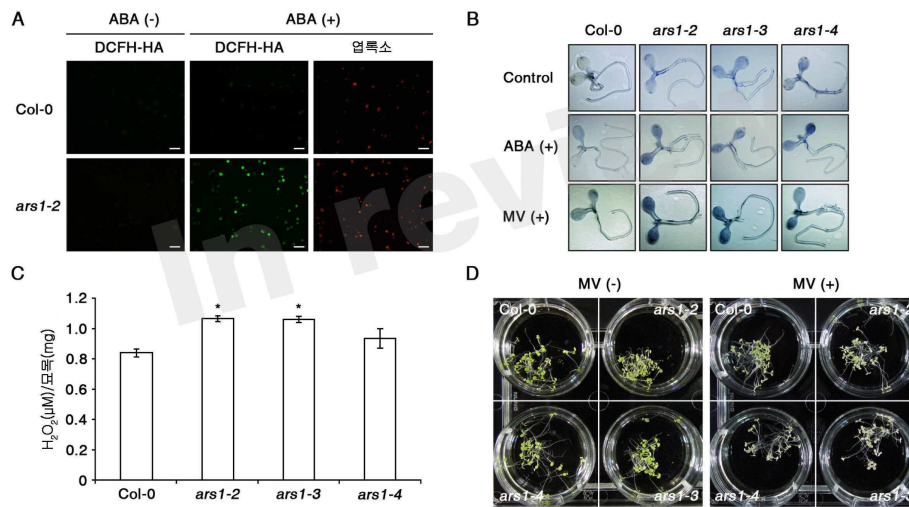
도면1



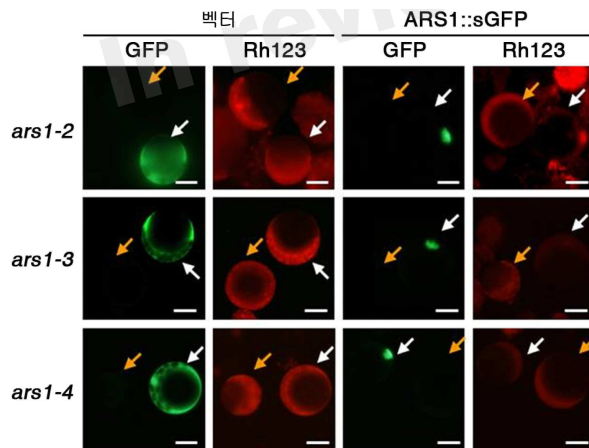
도면2



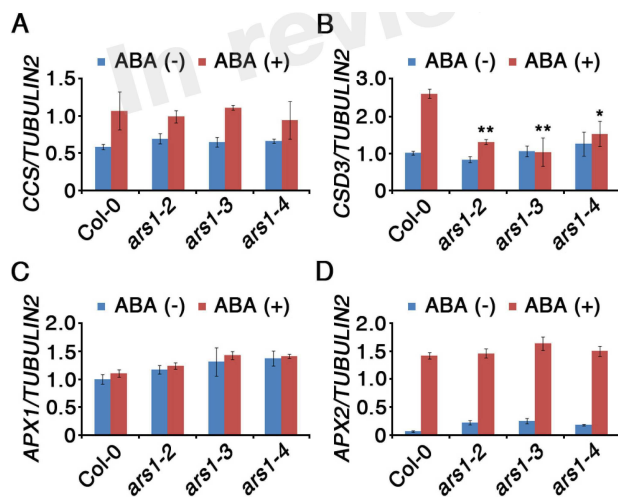
도면3



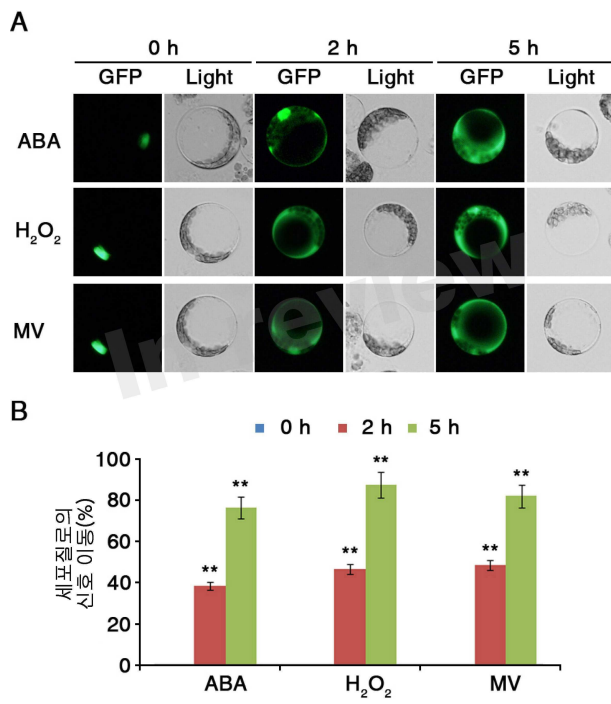
도면4



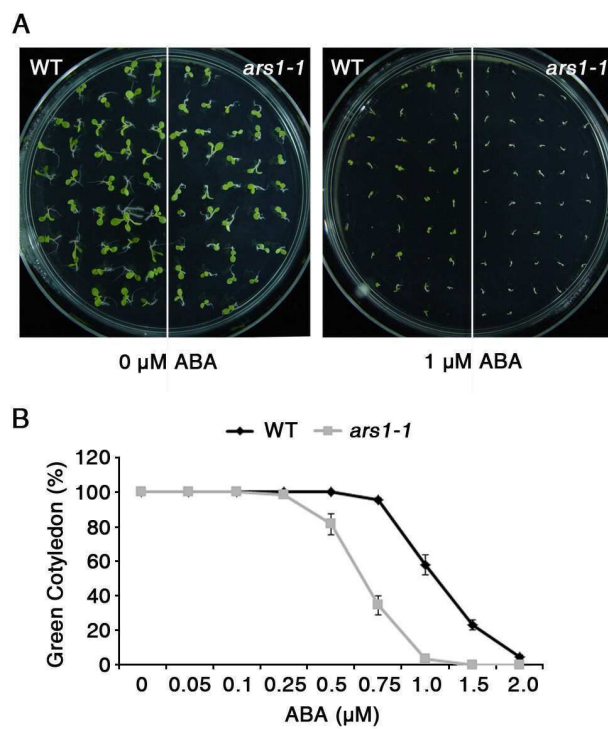
도면5



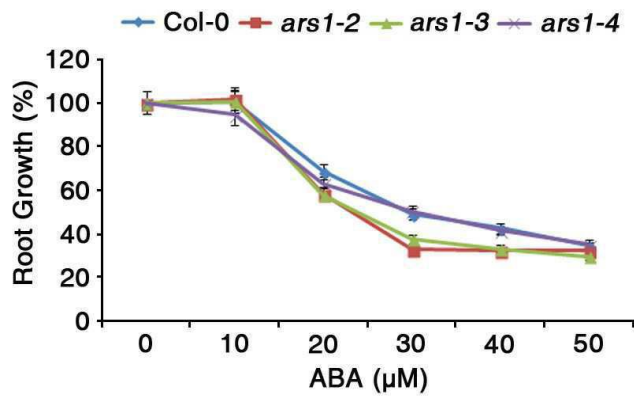
도면6



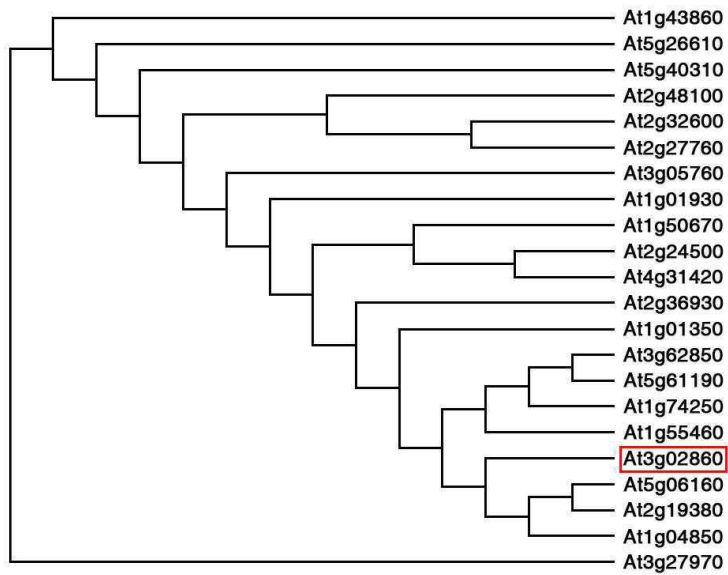
도면7



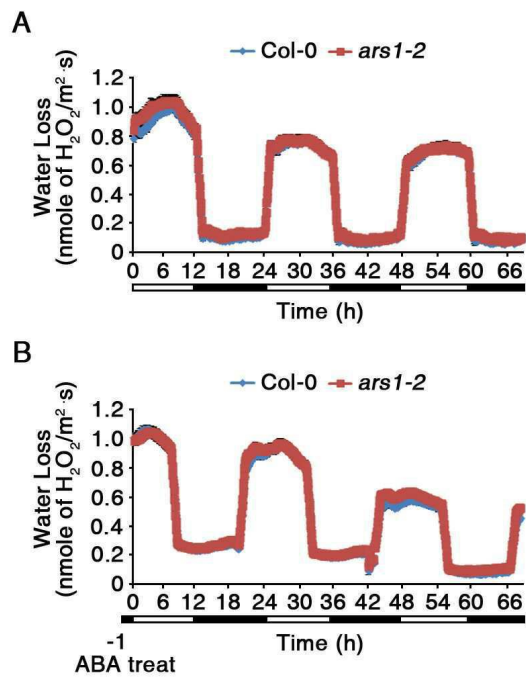
도면8



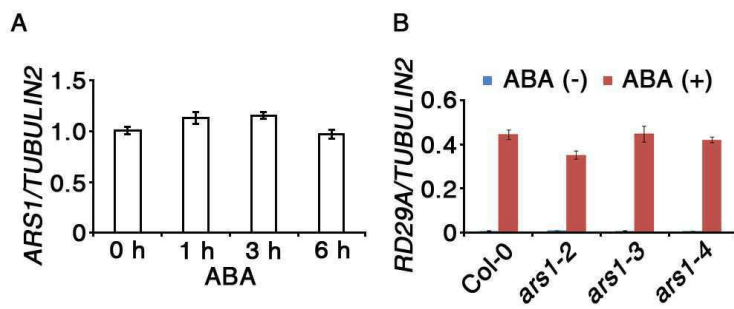
도면9



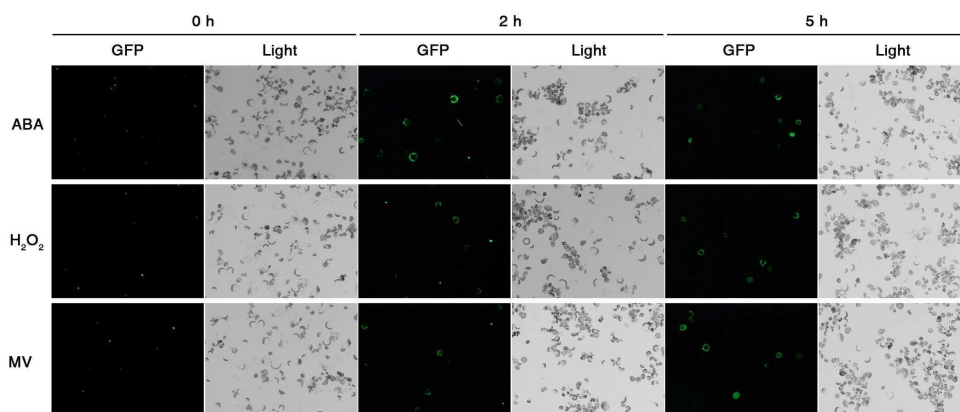
도면10



도면11



도면12



서열목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> YUCCA6 over-expressing transgenic plant having enhanced drought
 resistance due to the thioredoxin reductase activity
 <130> KP-947
 <160> 27
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 312
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis
 <400> 1

Met Asp Ala Gln Ala Lys Lys Lys Ala Met Phe Arg Ser Lys Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Lys Lys Lys Asp Thr Arg Ile Asp Ser Pro Leu Val Arg Tyr Asn
 20 25 30

Glu Ser Asp Gln Pro Val Cys Arg Val Cys Asn Val Val Leu Lys Ser
 35 40 45

Glu Ser Leu Trp Asp Val His Gln Ala Ser Arg Lys His His Glu Ala
 50 55 60

Ile Asp Ser Leu Lys Ala Ser Ala Ala Gly Val Gln Arg Gly Ser Lys
 65 70 75 80

Pro Ala Glu Thr Arg Pro Thr Lys Ile Glu Ala Leu Ala Lys Ser Ser
 85 90 95

Asn Ser Gln Thr Ser Ser Gly Leu Pro Pro Asn Phe Phe Glu Asn Arg
 100 105 110

Glu Pro Ala Arg Glu Val Glu Pro Ala Lys Ser Lys Asn Leu Glu Gln
 115 120 125

Ser Lys His Thr Ile Gly Ser Glu Thr Asn Lys Ser Lys Gly Pro Leu
 130 135 140

Pro Ala Gly Phe Phe Asp Asn Gln Lys Thr Asp Ser Ser Asn Thr Lys
 145 150 155 160

Thr Thr Ser Glu Pro Lys Gln Ser Gln Thr Gln Thr Thr Gly Pro Glu

165 170 175
 Thr Lys Pro Met Val Asn Gly Asn Leu Pro Thr Gly Phe Phe Asp Asn
 180 185 190
 Lys Glu Ala Asp Leu Leu Ala His Gly Ile Lys Leu Val Lys Pro Asp
 195 200 205
 Ile Lys Asp Glu Tyr Lys Glu Phe Glu Lys Leu Ile Gln Asp Asp Leu
 210 215 220
 Gln Val Val Asp Ser Arg Met Glu Glu Glu Glu Val Asp Ala Ala Glu
 225 230 235 240

 Thr Ile Glu Glu Glu Glu Gln Arg Glu Gln Arg Ser Tyr Lys Glu Lys
 245 250 255
 Val Glu Ile Leu Lys Arg Lys Lys Met Glu Leu Lys Ala Ala Arg Leu
 260 265 270
 Ala Lys Arg Ser Lys Thr Ser Glu Gly Ser Val Lys Lys Pro Lys Lys
 275 280 285
 Thr Glu Glu Glu Ser Pro Ser Asp Glu Glu Asp Asp Glu Asp Ser Ala
 290 295 300
 Val Asp Trp Arg Ala Gln His Leu

305 310
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 atacgacgga tcgtaatttg t
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 taataacgct gcggacatct ac

21

22

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4

ttgaccatca tactcattgc tg 22

<210> 5
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5

ntcgastwts gwggtt 15

<210> 6
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6

ngtcgaswga nawgaa 16

<210> 7
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

wgtgnagwan canaga 16

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400>	8	
atggatgctc aagcgaag		18
<210>	9	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
aagatgttga gctct		15
<210>	10	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
cgtggatcac agcaatacag agcc		24
<210>	11	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
cctcctgcac ttccacttcg tcttc		25
<210>	12	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
gctctagaat ggatgctcaa gcgaag		26
<210>	13	
<211>	23	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gcggatccaa gatgttgagc tct 23

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

tggcatcaac ttccattgga 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

atgttgctct ccgcttctgt 20

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

cctgaagtga tcgatgcacc ag 22

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

tggtgtaatc ggaagacacg ac 22

<210> 18

<211> 22

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 cctgaagtga tcgatgcacc ag 22

<210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 tgggtgtaatc ggaagacacg ac 22

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 cctctaccaa ccccaaattc c 21

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 gatcagaagt gagagcagtc g 21

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 22
 tccgaggctg tcttcaattc 20

<210>	23	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	23	
	gaagtgaggt ccagtagaga tg	22
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	24	
	tgacattcct ttccaccctg	20
<210>	25	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	25	
	cttggttagca tcaggaagac g	21
<210>	26	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	26	
	ttgctgttga gatcactgga g	21
<210>	27	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Primer	
<400>	27	

tccgaccaaa cacatctctt ag

22