(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0064458
(43) 공개일자 2022년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 1/06 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01H 1/06 (2021.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0150256
(22) 출원일자 2020년11월11일
심사청구일자 2020년11월11일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
고재훈
경기도 수원시 영통구 영통로154번길 51-16 306동 702호 (망포동, 센트럴하이츠아파트)
김민하
경기도 성남시 중원구 박석로97번길 24-1 302호(상대원동 황제맨션)
조진성
경기도 수원시 권선구 서수원로 99, 109동 603호 (오목천동, 수원권선 꿈에그린 아파트)
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 13 항

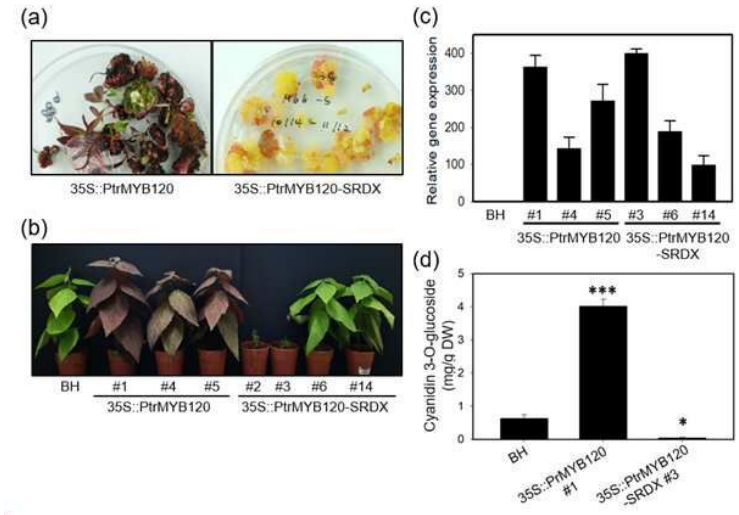
(54) 발명의 명칭 **리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입된 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물, 상기 형질전환 식물의 제조방법, PtrMYB120 유전자에 SRDX 모티프가 결합된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터를 식물체에 도입하여 식물의 리그닌 함량을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질(PtrMYB120-SRDX) 또는 이를 코딩하는 유전자를 도입함으로써 식물의 생장은 억제하지 않으면서, 리그닌 함량은 감소되고, 당화효율은 증가된 식물의 제조를 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 환경친화적이고 재생 가능한 차세대 미래에너지 중 하나인 바이오에탄올 생산을 위한 원료목 제조의 용도로 활용될 수 있으며, 펄프 및 제지 산업에서도 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/8205 (2013.01)
C12N 15/8255 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1405003604
과제번호 2014071G10-1822-AA04
부처명 산림청
과제관리(전문)기관명 한국임업진흥원
연구사업명 임업기술연구개발(R&D)
연구과제명 진화-발달학적 유전체 연구를 통한 유용 목부형성 유전자원 개발 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경희대학교산학협력단
연구기간 2018.03.26 ~ 2018.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711083876
과제번호 2018R1A2B2005362
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 목본식물 목부형성 조절인자 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질(PtrMYB120-SRDX) 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입된, 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PtrMYB120 단백질을 코딩하는 유전자는 *Potri.017G125600* 유전자인 것인, 형질전환 식물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PtrMYB120 단백질은 서열번호 1로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 *Potri.017G125600* 유전자는 서열번호 2로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 SRDX 도메인은 서열번호 3으로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 형질전환 식물은 생장이 억제되지 않으면서 당화 효율이 증가된 것을 특징으로 하는, 형질전환 식물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 형질전환 식물은 포플러(*Populus trichocarpa*)인 것인, 형질전환 식물.

청구항 8

PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질(PtrMYB120-SRDX) 또는 이를 코딩하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는, 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 10

PtrMYB120 유전자에 SRDX 모티프가 결합된 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 리그닌 함량 감소용 발현 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 SRDX 모티프는 *PtrMYB120* 유전자의 종결코돈의 상위 영역에 삽입된 것인, 발현 벡터.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 SRDX 모티프는 서열번호 4로 구성되는 것인, 발현 벡터.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항의 발현 벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는, 식물의 리그닌 함량을 감소시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입된 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물, 상기 형질전환 식물의 제조방법, PtrMYB120 유전자에 SRDX 모티프가 결합된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 및 상기 발현 벡터를 식물체에 도입하여 식물의 리그닌 함량을 감소시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 산업화 이후, 전세계적으로 화석 연료의 편중된 사용으로 인하여 고유가 문제, 대기 환경오염 및 이산화탄소 농도 증가, 이로 인한 기상 변화 등의 심각한 위기가 고조되고 있다. 이에, 친환경적이고 재생 가능한 바이오매스 에너지의 중요성이 부각되고 있다. 그러나, 곡물에 존재하는 녹말 또는 설탕을 분해하고 발효시켜 수득하는 1세대 바이오 연료의 생산은, 농작물의 가격 상승, 식량난 및 경제난을 초래하는 등의 부작용을 낳고 있다. 따라서, 최근에는 비식용 작물인 억새, 포플러 등에 존재하는 목질계의 셀룰로오스를 이용한 2세대 바이오매스 에너지에 대한 연구가 활발이 진행되고 있다. 화석 연료를 대체할 효율적인 바이오매스 에너지의 생산을 위해서는 바이오매스의 생산성과 목질계 셀룰로오스의 당화 효율을 획기적으로 증가시키는 노력이 절실하다.

[0004] 길이 생장인 일차 생장을 하는 초본 식물과는 달리, 목본 식물의 경우, 형성층으로부터 도관 및 체관이 분화되고 목부 (이차물관) 형성이 계속적으로 축적되면서 줄기 및 뿌리의 둘레가 커지는 부피 생장을 한다. 이러한 이차 생장을 통한 목본 식물의 목부 형성은 매년 생성되는 총 육지 바이오매스의 90% 이상을 생산한다. 목부는 셀룰로오스(cellulose), 헤미셀룰로오스(hemicellulose) 및 리그닌(lignin)으로 구성된 이차 세포벽으로 이루어지며, 식물 생장에 필요한 물을 수송하고 중력에 저항하는 기계적인 강도를 부여한다. 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스는 바이오매스 에너지 생산의 연료로 이용된다.

[0005] 리그닌은 페놀성 화합물로, 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 강력하게 연결하여 매우 단단한 이차 세포벽을 형성하는데 기여한다. 그런데, 당화 성분인 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스를 추출함에 있어서는 커다란 장애가 되어, 목질계 바이오에탄올 생산의 현실화에 가장 큰 걸림돌로 알려져 있다. 따라서, 리그닌의 함량을 줄이면서, 동시에 식물 생장을 정상적으로 가능하게 하려는 수많은 노력들이 경주되고 있다.

[0007] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 안토시아닌 및 리그닌의 생합성에 관여하는 페닐프로파노이드 대사 경로를

양성적으로 조절하는 PtrMYB120 단백질을 발견하였고, 상기 단백질의 기능을 음성적 조절자로 변환시키는 SRDX 도메인을 PtrMYB120 단백질에 도입한 결과, 정상적인 생장을 하면서 목질계 리그닌 함량이 감소되고, 당화 효율은 현저히 증가된 형질전환 식물을 제조할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입된 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 PtrMYB120 유전자에 SRDX 모티프가 결합된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 발현 벡터를 식물체에 도입하여 식물의 리그닌 함량을 감소시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0015] 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.

[0017] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입된 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 PtrMYB120은 포플러의 R2R3-MYB 전사조절인자 패밀리 중 하나인 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 의미하며, 안토시아닌과 리그닌을 합성하는 페닐프로파노이드 경로를 양성적으로 조절하는 양성적 전사조절인자이다. 상기 PtrMYB120 단백질을 코딩하는 유전자는 *Potri.017G125600* 유전자이며, 본 발명에서 *PtrMYB120*는 *Potri.017G125600*와 혼용된다.

[0020] 본 발명의 구체적인 일 구현예에서는 상기 PtrMYB120 단백질이 포플러에서 안토시아닌 및 리그닌 생합성 유전자의 발현을 모두 양성적으로 조절하며 (실험예 3), 안토시아닌 및 리그닌 생합성 유전자의 전사를 직접 조절할 수 있음을 확인하였다 (실험예 4). 본 발명자들은 이와 같은 PtrMYB120 단백질의 기능을 확인하고, SRDX 도메인과 함께 도입할 경우 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물을 제조할 수 있음을 최초로 규명하였다.

[0021] 본 발명의 PtrMYB120 단백질의 구체적인 아미노산 서열 또는 염기 서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다. 구체적으로, PtrMYB120 단백질은 서열번호 1로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 PtrMYB120 단백질은 상기 서열번호 1과 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 이러한 상동성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 발명의 PtrMYB120 단백질로 사용될 수 있음은 자명하다.

[0022] 또한, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 상기 서열번호 1로 구성된 아미노산 서열을 가지는 단백질 또는 이와 상동성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 또는 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보서열과

엄격한 조건 하에 하이드리드화하여, 서열번호 1로 구성된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 동일/유사한 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.

[0023] 상기 "상동성"은 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 모이어티(moiety) 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 하나의 모이어티로부터 다른 하나의 모이어티까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법으로 결정될 수 있다.

[0024] 본 발명의 *Potri.017G125600* 유전자는 서열번호 2의 염기 서열 또는 서열번호 2와 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 SRDX 도메인은 EAR (ERF-associated amphiphilic repression) 도메인의 하나로서, 식물 특이적인 억제 도메인이다. 상기 SRDX 도메인은 전사조절인자 단백질에 결합하여 dominant repression 기능을 부여할 수 있으며, 양성적 전사조절인자의 기능을 음성적 조절자로 변환시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 SRDX 도메인은 서열번호 3으로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 SRDX 도메인은 PtrMYB120 단백질에 결합하여 PtrMYB120 단백질의 기능을 억제하는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 본 발명의 SRDX 도메인은 PtrMYB120 단백질의 C-말단에 결합되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 PtrMYB120 단백질과 SRDX 도메인의 결합 단백질은 PtrMYB120-SRDX로 표현될 수 있다. PtrMYB120 단백질과 SRDX 도메인은 직접 연결되거나, 링커를 통해 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 구체적인 일 구현예에서는, PtrMYB120 단백질의 C-말단에 SRDX 서열(LDLELRL)을 결합한 단백질이 도입된 형질전환 식물은 안토시아닌 및 리그닌 생합성 유전자의 발현이 억제되는 것을 확인한 바 (실험예 3), SRDX 도메인의 결합에 따라 PtrMYB120 단백질의 기능이 억제된 것을 알 수 있었다.

[0028] 본 발명의 형질전환 식물은 PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입된 것일 수 있으며, 상기 "도입"은 식물체가 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성이 자연적으로 혹은 인위적으로 나타나게 되는 것을 의미한다.

[0029] 본 발명의 리그닌(lignin)은 목질부의 약 25%를 차지하는 지용성 페놀 고분자로서, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 함께 식물에서 가장 단단한 부분인 이차 세포벽을 구성한다. 리그닌은 당화성분인 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스와 공유결합을 통해 매우 단단하게 결합하고 있어, 상기 당화성분의 추출 및 당화성분을 이용한 바이오에탄올의 생산에 큰 장애가 된다. 따라서, 목본 식물에 포함된 리그닌 함량의 감소와 이를 통한 당화 효율의 증가는 바이오매스 산업에 매우 중요한 과제이다.

[0030] 리그닌 함량의 감소는 Wiesner 염색법과 Mδule 염색법을 통하여 확인할 수 있으며, 구체적으로, Wiesner 염색은 전반적인 리그닌 함량을 알 수 있고, Mδule 염색은 S-리그닌의 함량을 알 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 구체적인 일 구현예에서는 PtrMYB120에 SRDX 도메인이 결합한 단백질이 도입된 형질전환 식물의 줄기 단면을 염색한 결과, 염색 정도가 대조군에 비하여 현저히 낮음을 확인한 바, PtrMYB120에 SRDX 도메인이 결합한 단백질의 도입에 따라 식물의 리그닌 함량이 감소한 것을 확인하였다 (실험예 2).

[0032] 본 발명의 구체적인 일 구현예에서는 PtrMYB120에 SRDX 도메인이 결합한 단백질이 도입된 형질전환 캘러스를 확인한 결과, 안토시아닌 축적이 급격하게 감소된 것을 확인하였으며 (실험예 1), PtrMYB120 단백질이 안토시아닌 생합성 유전자의 발현을 직접적으로 조절할 수 있음을 확인한 바 (실험예 4), PtrMYB120 단백질을 이용하여 식물의 안토시아닌 함량을 조절할 수 있다. 따라서, PtrMYB120은 식물의 색소 조건을 변화하는데 이용되거나, 식용 색소 산업에 활용될 수 있다.

[0033] 본 발명의 형질전환은, DNA를 숙주에 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 구체적으로, 본 발명에서는 PtrMYB120에 SRDX 도메인이 결합된 단백질을 코딩하는 유전자를 숙주에 도입하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명의 형질전환 식물이란, 숙주로서 식물을 사용하여 상기 형질전환으로 인해 생성된 식물을 의미한다.

[0034] 본 발명에서 숙주세포로의 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떠한 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 식물에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이러한 방법에는 전기충격 핵산분자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 침전, 염화칼슘 침전, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반, 아그로박테리아로 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 또는, 식물에 내재적으로 존재하는 PtrMYB120 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자에 SRDX 도메인을 도입하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 발명의 목적 상, 상기 형질전환 식물은 PtrMYB120-SRDX의 도입에 의하여 리그닌 함량이 감소될 수 있는 목본 식물은 제한 없이 포함될 수 있다. 일 예로, 포플러가 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 본 발명의 포플러(*Populus trichocarpa*)란, 쌍떡잎식물 버드나무목 버드나무과 사시나무속에 속하는 식물의 총칭이다. 본 발명에서 상기 포플러는 목본 식물의 대표식물로서 사용될 수 있으며, *Poplus alba x P. tremula var.glandulosa*, clone BH 등이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 형질전환 식물은, 생장이 억제되지 않으면서 당화 효율이 증가된 것을 특징으로 할 수 있다. R2R3-MYB 전사조절인자는 식물의 생장, 발달 생식 등 매우 다양한 분야에 기능을 하는 것으로 알려져 있으므로, R2R3-MYB 전사조절인자의 조절은 식물의 생장에 영향을 미칠 가능성이 크다. 본 발명의 구체적인 일 구현예에서는 R2R3-MYB 전사조절인자인 PtrMYB120의 기능을 억제함으로써 식물의 리그닌 함량을 감소시키면서도, 식물의 생장은 억제되지 않음을 확인한 바 (실험예 1), 식물 바이오매스로서 유용하게 활용될 수 있는 형질전환 식물을 제조하였다.

[0039] 본 발명의 구체적인 일 구현예에서는 PtrMYB120-SRDX이 도입된 형질전환 식물의 포도당 생성량이 증가한 것을 확인한 바 (실험예 5), PtrMYB120-SRDX의 도입에 따라 당화 효율이 증가할 수 있음을 확인하였다.

[0041] 본 발명의 다른 하나의 양태는 PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질(PtrMYB120-SRDX) 또는 이를 코딩하는 유전자를 도입하는 단계를 포함하는 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물의 제조방법을 제공한다.

[0042] 본 발명의 "PtrMYB120", "SRDX 도메인", "리그닌 함량 감소" 및 "형질전환 식물"은 상기 기재된 바와 같고, 상기 방법에 의해 본 발명의 형질전환 식물을 제조할 수 있다.

[0044] 상기 제조방법에 의하여 제조된 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 형질전환 식물의 재배는 당업계에 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있고, 재배 온도, 재배 시간 및 배지의 pH 등의 조건은 적절하게 조절될 수 있다.

[0045] 사용되는 배지는 특정한 형질전환식물의 요구 조건을 적절하게 충족시켜야 한다. 배지의 형태로는 고체배지(solid medium), 액체배지(liquid medium), 이중배지(double layer medium)가 있으며, 이에 대한 성분으로는 물, 교질재료로서 한천, 아가로스(agarose), 겔라이트(gelite) 등이 사용될 수 있다.

[0046] 무기 영양소로는 15개의 원소, 즉 C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, B, 및 Mo 등이 형태에 구애받지 않고 첨가되며, 유기 영양소로는 탄수화물, 식물생장 조절물질, 비타민 등이 첨가되고, 아미노산류로는 미오-이노시톨, 글라이신, L-글루타민 등이 첨가될 수 있다.

[0047] 탄소원으로는 글루코스, 프럭토스, 만노스, 리보오스, 자일로스, 수크로스, 멜리비오스, 셀로비오스, 락토오스, 아밀로스, 탄수화물, 라피노스, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤 등이 첨가될 수 있다.

[0049] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 *PtrMYB120* 유전자에 SRDX 모티프가 결합된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 리그닌 함량 감소용 발현 벡터를 제공한다.

[0050] 본 발명의 "*PtrMYB120* 유전자", 및 "리그닌 함량 감소"는 상기 기재된 바와 같다.

[0052] 본 발명의 SRDX 모티프는 상기 SRDX 도메인을 코딩하는 유전자를 의미하며, *PtrMYB120* 유전자에 도입되어

PtrMYB120 단백질의 기능을 억제하는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 본 발명의 SRDX 모티프는 *PtrMYB120* 유전자의 종결코돈의 상위 영역에 삽입되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 SRDX 모티프는 서열번호 4의 염기 서열 또는 서열번호 4와 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 본 발명의 용어 폴리뉴클레오티드는 유전자와 혼용될 수 있으며, 폴리뉴클레오티드 서열과 뉴클레오티드 서열은 혼용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 "*PtrMYB120* 유전자에 SRDX 모티프가 결합된 폴리뉴클레오티드"는 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태로 도입될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0055] 본 발명의 프로모터는 전사조절인자들이 결합할 수 있는 DNA 염기서열을 의미하며, 전사조절인자를 매개로 하여 RNA 중합효소와 결합함으로써, 그 하류에 위치한 open reading frame의 전사를 유도할 수 있다. 일 예로, 35S 프로모터를 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어, 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0057] 본 발명의 발현 벡터는 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 컨스트럭트를 의미한다. 상기 발현 벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 컨스트럭트가 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.

[0058] 본 발명에서는 서열번호 2의 *PtrMYB120* 유전자에 서열번호 4의 SRDX 모티프가 결합된 폴리뉴클레오티드가, 35S 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태로 도입하여 제작된 발현 벡터를 이용하여 리그닌 함량이 감소된 형질전환 식물을 제작하였다.

[0060] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 발현 벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 리그닌 함량을 감소시키는 방법를 제공한다.

[0061] 구체적으로, 본 발명의 식물체의 리그닌 함량을 감소시키는 방법은 상기 발현 벡터를 리그닌을 포함하는 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함한다. 이때, 상기 방법에 사용되는 프로모터, *PtrMYB120* 유전자, SRDX 모티프 등은 상술한 바와 동일하다.

발명의 효과

[0063] 본 발명은 PtrMYB120 단백질에 SRDX 도메인을 결합한 단백질(PtrMYB120-SRDX) 또는 이를 코딩하는 유전자를 도입함으로써 식물의 생장은 억제하지 않으면서, 리그닌 함량은 감소되고, 당화효율은 증가된 식물의 제조를 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 환경친화적이고 재생 가능한 차세대 미래에너지 중 하나인 바이오에탄올 생산을 위한 원료목 제조의 용도로 활용될 수 있으며, 펄프 및 제지 산업에서도 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 PtrMYB120-SRDX 도입에 따른 형질전환 포플러의 안토시아닌 축적에 관한 도이다. 도 1a는 35S::PtrMYB120와 35S::PtrMYB120-SRDX 유전자를 도입한 형질전환 캘러스의 색을 비교한 도이고, 도 1b는 4개월 동안 토양에서 자란 형질전환 포플러의 모습이다. 도 1c는 형질전환 포플러에 도입된 PtrMYB120와 PtrMYB120-SRDX 유전자를 정량 분석한 그래프이며, 도 1d는 Cyanidin 3-O-glucoside를 정량 분석한

그래프이다.

도 2는 4개월 동안 토양에서 자란 형질전환 포플러의 줄기 단면을 염색한 도이다 (검은색 척도: 100㎛, 하얀색 척도: 50㎛).

도 3은 형질전환 포플러의 리그닌 함량에 관한 도이다. 도 3a는 Klason 리그닌 함량을 분석한 그래프이며, 도 3b는 포플러의 줄기 단면을 Wiesner 염색법(왼쪽)과 Mδule 염색법(오른쪽)으로 염색한 모습을 나타낸 도이다 (* *P*-value<0.05, *** *P*-value<0.001).

도 4는 형질전환 포플러에서 안토시아닌 및 리그닌 생합성 관련 유전자의 발현량을 확인한 도이다. 도 4a는 페닐프로파노이드 생합성 경로 시작 단계의 유전자들, 도 4b는 안토시아닌 생합성 관련 유전자들, 도 5c는 리그닌 생합성 관련 유전자들의 발현량을 확인한 그래프이다.

도 5는 일시적 전사활성화 실험을 통한 안토시아닌 및 리그닌 생합성 관련 유전자의 발현량을 확인한 도이다. 도 5a는 일시적 전사활성화 실험의 유전자 컨스트럭트 모식도이다. 도 5b는 일시적 전사활성화 실험에 사용한 유전자 컨스트럭트의 작동을 검증한 그래프이며, 도 5c는 PtrMYB120에 의해 직접적으로 조절되는 유전자를 분석한 그래프이다.

도 6은 형질전환 포플러의 줄기를 이용하여 포도당의 생성량을 측정한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0068] **실시예 1. 식물 재료 및 성장 조건**

[0070] 본 발명에서는 야생형 또는 형질전환체로서 하이브리드 포플러 (*Populus alba* X *P. tremular* var. *glandulosa*, clone BH)을 이용하였다. 상기 식물은 생장실 (16시간 빛; 조도 150 μmol · m^{-2} · sec^{-1}; 23±2℃)에서 토양 또는 1% (w/v) 수크로스의 half strength MS 배지 (Murashige and Skoog, Sigma-Aldrich, MO, USA)에서 재배되었다.

[0072] **실시예 2. 벡터 제작 및 식물 형질전환**

[0074] PtrMYB120 (*Potri.017G125700*)을 암호화하는 전장 cDNA는 하이브리드 포플러의 cDNA로부터 PCR에 의해 증폭되었다. PtrMYB120-SRDX 키메라 유전자 구축을 위하여, SRDX 모티프 (LDLELRL; ctggatctagaactccgtttg)를 PtrMYB120의 종결코돈 이전에 추가한 후, 증폭된 gDNA를 게이트웨이 클로닝 시스템 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 pK2GW7 벡터에서 35S 프로모터의 하위 영역에 삽입하여 35S::PtrMYB120 및 35S::PtrMYB120-SRDX 컨스트럭트를 제작하였다. 상기 벡터 컨스트럭트는 아그로박테리움 튜미파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 C58에 도입하였고, 상기 균주를 이용하여 leaf disk 형질전환-재생 방법에 따라 포플러를 형질전환 시켰다. 본 발명에서 사용된 모든 컨스트럭트는 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였다 (Macrogen, http://dna.macrogen.com/kor/).

[0076] **실시예 3. 안토시아닌의 역상-HPLC 분석**

[0078] 4 주 배양된 캘러스를 3 일간 건조하여 입자화하였다. 상기 분말 20mg은 1ml의 80% 메탄올 및 1N HCl로 추출하여 15분 동안 초음파 처리한 후, 진탕 배양기 (10℃)에서 2시간 동안 교반하였다. 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 되었고, 상층액은 시린지 필터 (0.45㎛)로 여과하였다. 추출물은 octadecylsilane 컬럼 (Kinetex 5㎛ C18 150 X 4.6mm, penomenex, Sungmoon systech, Korea)을 이용하여 HPLC (Waters 2695 Alliance HPLC,

Waters Inc., Milford, MA, USA)로 분석하였다. 520nm에서 물:메타놀:포름산 (75:20:5)을 이용하여 등용매용리 (isocratic elution)에 의해 이동상의 유속은 0.9ml min^{-1} 이었다. 샘플의 주입량은 5㎕이었으며, 형질전환 포플러에서 시아니딘-3-O-글리코사이드의 정량화는 시아니딘-3-O-글리코사이드 클로라이드 (Chengdu SinoStandards Bio-Tech Co., Chengdu, China)를 표준으로 사용하여 수행되었다.

[0080] **실시예 4. 조직학적 분석**

[0082] 포플러 줄기의 횡단면은 절단하여 준비하고, 0.05% 톨루이딘 블루 O 또는 2% 플로로글루시놀/HCl로 1분 동안 염색하였다. Mδule 염색은 Prajakta Pradhan Mitra 및 Dominique Loque 2014의 방법에 따라 수행되었다. 줄기 단면을 절단 후, 섹션을 1.5ml microcentrifuge 튜브로 옮기고, 0.5% (w/v) 과망간산 칼륨 용액 1ml를 추가하였다. 파이펫팅으로 부드럽게 용액을 혼합하고, 2분 배양 후 파이펫팅을 반복하였다. 그 후, 700㎕의 0.5% 과망간산 칼륨 용액을 제거하고 700㎕의 증류수를 추가하여 세척하였다. 상기 과정을 용액이 깨끗해질 때까지 3-4회 반복 후, 용액을 버리고 3% HCl 1ml을 추가하여 섹션에서 진한 갈색을 추출한 후, 3% HCl 용액을 제거하고 즉시 14.8M 수산화암모늄 용액 1ml를 추가하여 섹션을 관찰하였다.

[0084] **실시예 5. RNA 추출 및 qRT-PCR**

[0086] 애기장대 및 포플러의 총 RNA는 TRIZOL 시약(Life Technologies, Carlsbad, CA) 및 CTAB 방법을 이용하여 추출되었다. 식물 조직의 미세한 분말을 CTAB 완충액과 혼합한 후, 페놀:클로로포름:이소아밀알코올 (25:24:1) 추출을 수행하였다. RNA를 분리하기 위하여 이소프로판올을 혼합물에 첨가하였으며, 1㎍의 총 RNA를 20㎕의 반응물에서 Superscript III 역전사 효소 (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 역전사하였다. 후속 RT-PCR은 1㎕의 반응 생성물을 주형으로 사용하여 수행하였다. 정량적 RT-PCR은 AriaMx Real-Time PCR (G8830A) (Agilent, TX, USA) 및 Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent, TX, USA)를 사용하여 수행하였다. 포플라 ACTIN2 유전자를 대조군으로 사용하였고, $2^{-\triangle\triangle}$ Ct 방법을 이용하여 상대적 발현 수준을 계산하였다. 실시예에서 사용한 모든 프라이머는 Primer3 software (http://fokker.wi.mit.edu)를 이용하여 설계하였다.

[0088] **실시예 6. 일시적 활성화 어세이 (TAA) 및 DEX-유도 활성화 시스템**

[0090] 포플러 잎의 원형질체의 준비, 리포터 및 이펙터 컨스트럭트의 일시적 트랜스펙션은 [*Plant J*. 60, 649-665]에 기술된 방법으로 수행하였다. 이펙터 컨스트럭트를 제조하기 위해, pTrGUS 벡터에서 GUS를 제거한 후 PtrMYB120의 전장 DNA를 CaMV 35S 프로모터 및 노파린 합성효소 터미네이터 사이에 연결시켰다. 리포터 컨스트럭트는 pTrGUS 벡터로부터 35S 프로모터를 제거한 후, GUS 리포터 유전자 앞에 프로모터 단편(PtrANS2pro)을 배치하여 제작하였다. 플라스미드 DNA는 ExprepTM Plasmid SV Midi kit (GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 준비하였고, 트랜스펙션을 위해 5㎍의 리포터 플라스미드 및 5㎍의 이펙터 플라스미드를 사용하였다. GUS 활성 표준화를 위한 내부 대조구로 사용하기 위해, 1㎍의 PtrNAN 플라스미드를 첨가하였다. 그 다음, 10㎕ 플라스미드 혼합물(10㎍) 및 원형질체 100㎕를 [*Nat Protoc.*, 2, 1565-1572]에 개시된 방법에 따라 2ml microcentrifuge 튜브로 옮겼다. PtrMYB120-GR을 활성화하기 위하여 원형질체를 10㎛M DEX (Sigma-Aldrich, MO, USA)로 5시간 동안 처리하였고, 대조구 원형질체는 DEX를 용해하는데 사용된 동일한 농도 (0.01%)의 에탄올로 처리하였다. 새로운 단백질 합성을 억제하기 위하여 단백질 합성 억제제인 CHX (Sigma-Aldrich, MO, USA) 2㎛M을 DEX를 첨가하기 30분 전에 첨가하였다. 처리 후, GUS 활성 분석 및 qRT-PCR 분석을 위하여 원형질체를 수거하였다. GUS 활성 분석을 위하여, β-글루쿠로니다아제(β-Glucuronidase) 및 NAN 효소 어세이는 [*Plant J*, 32, 391-400]에 개시된 방법에 따라 수행하였다. NAN 및 GUS 활성은 각각 MUN (Sigma-Aldrich, MO, USA) 및 MUG (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 기질로 하여 측정되었으며, Hoefer TK 100 형광계 (여기 파장: 355 nm, 방출 파장: 460nm)에서 MU 표준에 대해 측정하였다. GUS 및 NAM 활성의 비율은 상대적인 GUS/NAN 단위로 계산하였다.

상기 실험들은 3회 반복 실험으로 수행하였다.

[0092] **실시예 7. 형질전환 포플러의 리그닌 함량 측정**

[0094] 줄기 조직을 65℃에서 1주간 건조하고 미세한 분말로 분쇄하였다. glass-screw-cap 튜브에 재료를 갈아서 72% (v/v) 황산을 추가하고 샘플이 완전히 혼합될 때까지 혼합하였다. 튜브를 45±3℃로 설정된 수조에 놓고 모든 샘플이 가수분해 될 때까지 샘플을 90±5분 동안 배양하였다. 탈이온수 28ml를 첨가하여 산을 4% 농도로 희석하고, 상분리를 완전히 제거하기 위하여 튜브를 여러 번 뒤집어 샘플을 혼합하였다. 밀봉된 샘플을 121℃에서 1시간 동안 오토클레이브하고 오토클레이브 가수분해 용액을 진공 여과하였다. 일정한 무게가 될 때까지 105℃에서 여과지와 산-불용성 잔류물을 건조시킨 후, 여과지를 실온으로 식히고 여과지 및 건조 잔류물의 무게를 기록하였다.

[0096] **실시예 8. 형질전환 포플러의 당화 효율 측정**

[0098] 줄기 조직을 65℃에서 1주간 건조하고 미세한 분말로 분쇄하였다. 분말을 2ml screw-cap 튜브에 옮기고 물 200 μl 또는 NaOH 180μl와 함께 30℃에서 30분 동안 배양하였다. 120℃에서 60분 동안 오토클레이브 후 실온으로 식히고, 20μl의 2.5N HCl을 이용하여 1% NaOH 처리된 샘플을 중화시켰다. 그 후, 테트라사이클린 40μg, 셀룰라아제 10mg 및 β-글루코시다아제 1mg을 함유하는 0.1M 아세트산나트륨 완충액 (pH 5.0) 300μl을 첨가하고, 37℃에서 교반(180rpm)하면서 24, 48, 72시간 배양 후 시료를 원심분리하고 DNS (3,5-dinitrosalicylate) 어세이를 이용한 감소된 당 측정을 위하여 상층액 5μg을 수집하였다. DNS 반응은 시료 5μl와 물 5μl, DNA 시약 90μl을 PCR 튜브에 넣고 95℃에서 6분간 배양하여 수행하였다. 감소된 당은 λ550 nm에서 흡광도를 측정하여 정량화되었으며, 포도당 용액이 표준으로 사용되었다.

[0100] **실험예 1. PtrMYB120-SRDX 유전자의 과발현이 식물 생장 및 안토시아닌 생성에 미치는 영향 확인**

[0102] PtrMYB120에 의한 안토시아닌 생합성의 분자 조절 작용기작을 구체적으로 확인하기 위하여, ERF-associated Amphiphilic Repression (EAR) 모티프를 사용하여 PtrMYB120 기능을 억제하는 35S::PtrMYB120-SRDX 형질전환 포플러를 제작하였다. 35S::PtrMYB120와 35S::PtrMYB120-SRDX 유전자를 도입한 형질전환 캘러스를 관찰한 결과, 35S::PtrMYB120 캘러스는 진한 빨간색이나, 35S::PtrMYB120-SRDX 형질전환 캘러스는 색소가 거의 없어서 노란색으로 보이는 것을 확인하였다 (도 1a). 또한, 4개월 동안 토양에서 자란 포플러의 모습을 확인한 결과, 35S::PtrMYB120 형질전환 포플러는 빨간색을 띄고 35S::PtrMYB120-SRDX 형질전환 포플러는 대조구(BH)와 유사한 것을 알 수 있었다 (도 1b). 즉, 35S::PtrMYB120 형질전환 포플러의 경우 안토시아닌 축적이 급격하게 감소된 것을 알 수 있었다. 나아가, 형질전환 포플러에 도입된 PtrMYB120와 PtrMYB120-SRDX 유전자를 정량 분석한 결과, #1 라인과 같이 PtrMYB120 유전자의 발현량이 클수록 식물의 빨간색이 진해지는 것을 확인하였다 (도 1c 및 도 1b). 포플러에서 가장 많이 생성되는 안토시아닌 중 하나인 시아니딘 3-O-글루코사이드(Cyanidin 3-O-glucoside)를 정량 분석한 결과, 35S::PtrMYB120 포플러에서는 안토시아닌의 함량이 크게 증가하였으나 35S::PtrMYB120-SRDX 형질전환 포플러에서는 대조구보다 적음을 확인하였다 (도 1d).

[0103] 또한, 형질전환 포플러의 생장과 관련하여, PtrMYB120-SRDX의 발현량이 매우 큰 #3 라인의 경우 생장이 크게 저해되는 반면, #6 라인은 정상적인 생장을 보이는 것을 확인하였다 (도 1c 및 도 1b). 즉, 상이한 표현형의 결과는, 도입된 35S::PtrMYB120-SRDX의 발현량과 밀접하게 관련되어 있음을 알 수 있었다.

[0105] **실험예 2. PtrMYB120-SRDX 유전자의 과발현이 식물의 이차세포벽 발달 및 리그닌 함량에 미치는 영향 확인**

[0107] 4개월 동안 토양에서 자란 형질전환 포플러의 줄기 단면을 통하여 이차세포벽 형성을 확인하였다. 그 결과, 도

2에서 알 수 있듯이, 35S::PtrMYB120-SRDX 형질전환 포플러의 경우 물관이 약간 찌그러진 모습인 것을 확인하였다 (노란색 화살표). 실험예 1의 결과를 고려하면, 도입된 PtrMYB120-SRDX 유전자의 양이 많을수록 찌그러지는 정도가 큰 것을 알 수 있었다.

[0108] 형질전환 포플러의 리그닌 함량을 확인하기 위하여 줄기 단면의 Wiesner 및 Mδule 염색을 수행하였다. Wiesner 염색법은 전반적인 리그닌의 함량을 알 수 있고, Mδule 염색법은 S-리그닌의 함량을 알 수 있다. Wiesner 염색에서 35S::PtrMYB120-SRDX (#3)은 대조구(BH)보다 염색 정도가 적었으며, 특히 Mδule 염색의 경우 염색 정도가 크게 차이나는 것을 확인하였다 (도 3a). 이를 통해, 35S::PtrMYB120-SRDX 형질전환 포플러의 경우 특히 S-리그닌 함량이 대조구 대비 현저히 감소하였음을 알 수 있었다.

[0109] 나아가, 형질전환 포플러의 Klason 리그닌 함량을 측정하였다. 35S::PtrMYB120-SRDX 포플러(#3)의 리그닌 함량은 대조구(BH)에 비하여 58.9% 현저히 감소한 반면, 35S::PtrMYB120 포플러(#1)의 경우, 약간 증가하였다 (도 3b).

[0111] **실험예 3. PtrMYB120-SRDX 유전자의 과발현이 안토시아닌 및 리그닌 생합성 관련 유전자 발현에 미치는 영향 확인**

[0113] 다음으로, 35S::PtrMYB120 및 35S::PtrMYB120-SRDX 포플러에서 페닐프로파노이드 경로에 관여하는 유전자의 발현을 분석하였다. 페닐프로파노이드 경로 초기 단계의 PtrPAL1 및 Ptr4CL2 유전자는, 35S::PtrMYB120 포플러에서 매우 상향 조절되는 반면, 35S::PtrMYB120-SRDX 포플러에서는 크게 억제되었다 (도 4a). 또한, 안토시아닌 생합성 경로의 PtrCHS1, PtrF3H1 및 PtrANS1 유전자 역시 35S::PtrMYB120 포플러에서는 발현이 증가하였으나, 35S::PtrMYB120-SRDX 포플러에서는 현저히 억제되었다 (도 4b). 마찬가지로, 리그닌 생합성 경로의 PtrCCoAOMT1, PtrF5H, PtrCOMT2 및 PtrCAD1 유전자는 35S:: PtrMYB120 포플러에서 그 발현량이 증가하나, 35S::PtrMYB120-SRDX 포플러에서는 현저히 억제되었다 (도 4c).

[0114] 종합하면, PtrMYB120이 안토시아닌과 리그닌 생합성 유전자를 모두 양성적으로 조절한다는 사실을 알 수 있으며, 이는, 35S::PtrMYB120 포플러에서는 안토시아닌이 과다하게 축적되나, 35S::PtrMYB120-SRDX 포플러에서는 안토시아닌 및 리그닌 함량이 모두 감소한 실험예 1 및 2의 결과와 상응한다.

[0116] **실험예 4. PtrMYB120 단백질의 직접적인 안토시아닌 및 리그닌 생합성 관련 유전자 조절 효과 확인**

[0118] PtrMYB120의 직접적인 하위 표적 유전자를 확인하기 위하여, 단백질 합성 억제제와 결합된 스테로이드 호르몬 수용체-기반 유도 활성화 시스템을 사용하였다 (*Cell* 92.1 (1998): 93-103). Effector로 PtrMYB120-GR 융합유전자를 35S 프로모터로 발현시킬 수 있는 벡터 플라스미드를 사용하였으며, Reporter로는 PtrANS2 유전자 프로모터-GUS 융합유전자가 포함된 벡터 플라스미드를 사용하였다 (도 5a). 이 두 종류의 플라스미드를 포플러 엽육 세포에서 유래한 원형질체에 형질전환시켜 그 발현량을 확인하였다. DEX (dexamethasone)는 글루코코르티코이드 호르몬으로, 세포에 처리 시 GR (Glucocorticoid Receptor) 도메인과 결합하면 PtrMYB120-GR 융합 단백질이 핵 내로 이동하여 전사조절인자로서 기능을 하게 된다.

[0119] 일시적 전사활성화 실험에 사용한 유전자 컨스트럭트의 작동을 검증한 결과, PtrMYB120-GR 키메라 단백질은 대조군과 비교하여 PtrANS2 프로모터에 의해 작동하는 GUS 리포터를 약 3.7배 활성화하였다 (도 5b의 +DEX). 그러나, DEX-활성화된 PtrMYB120-GR에 의해 유도된 GUS 활성은 단백질 합성 억제제인 사이클로헥시마이드(CHX)에 의해 완전히 제거되었으며, 이는 새로운 단백질 합성이 CHX 처리에 의하여 효과적으로 억제되었음을 나타낸다 (도 5b의 +CHX+DEX).

[0120] 상기 시스템을 이용하여, 안토시아닌과 리그닌 생합성 관련 핵심 유전자들의 발현을 분석하였다 (도 5c). 페닐프로파노이드 경로의 초기 단계 유전자인 PtrPAL1 및 Ptr4CL1은 DEX 처리에서만 상향 조절되었으나, PtrCHS1, PtrF3H 및 PtrANS2와 같은 안토시아닌 경로 유전자는 CHX의 존재 하에서도 DEX-활성화된 PtrMYB120-GR에 의해 상향 조절되었다. 또한, 리그닌 경로 유전자 중 PtrF5H와 PtrCOMT2는 '+CHX +DEX' 처리에서 PtrMYB120-GR에 의해 상향 조절되었다. 즉, 새로운 단백질의 생성을 억제하는 CHX의 존재 하에서도 DEX에 의한 유전자 발현 증가

가 나타난 PtrCHS1, PtrF3H, PtrANS2, PtrF5H, PtrCOMT2의 경우, PtrMYB120에 의해 직접적으로 전사가 조절되는 유전자로 확인되었으며, 이는 PtrMYB120이 특히 리그닌 생합성 유전자의 전사를 직접 조절할 수 있음을 의미한다.

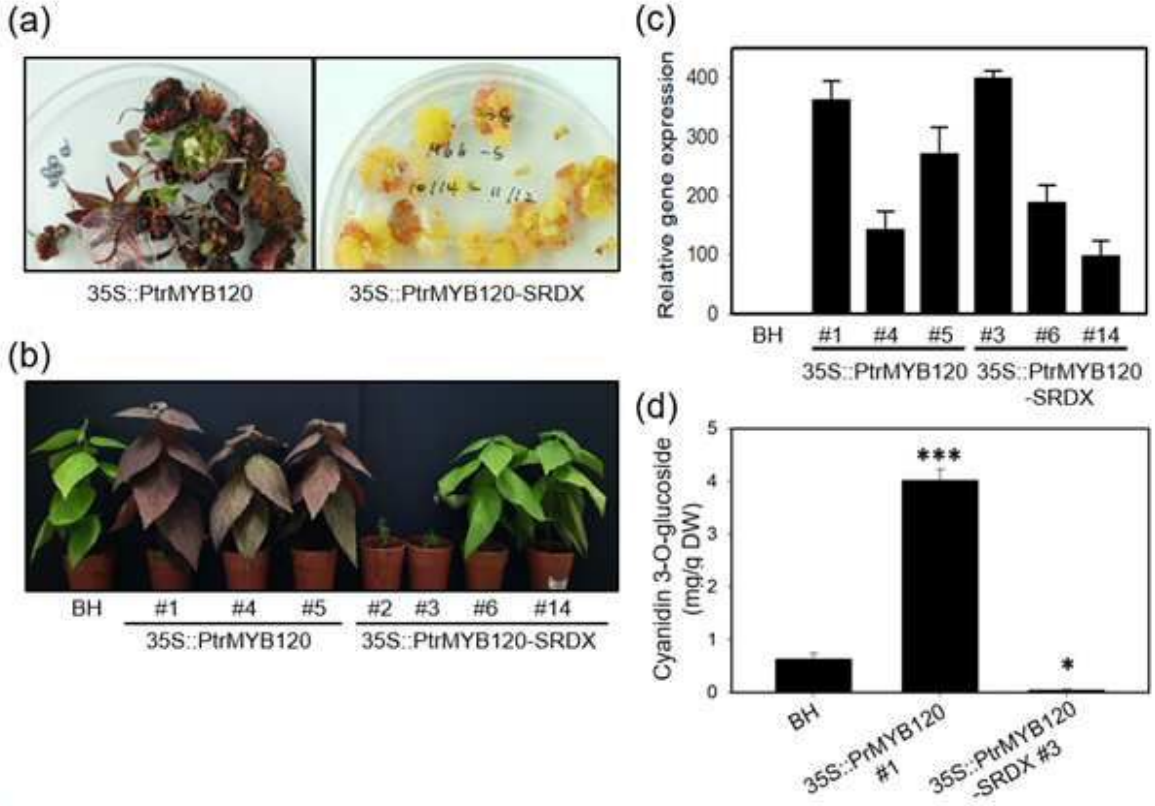
[0122] **실험예 5. PtrMYB120-SRDX 유전자의 과발현이 당화 효율 증가에 미치는 영향 확인**

[0124] 4개월 토양 재배 포플러에서 얻은 포플러의 줄기의 당화 효율은 온수 또는 알칼리(NaOH) 전처리 후, 다양한 배양 시간에서 포도당 생성량을 정량화하여 측정하였다. 도 6에서 알 수 있듯이, 72시간 배양에서 대조구에 비해 NaOH 처리된 35S::PtrMYB120-SRDX (#6)은 당화 효율이 약 45% 정도 현저하게 증가한 것을 확인하였다. 반면에, 35S::PtrMYB120 (#1)은 당화 효율이 다소 감소하였다. 상기 결과는, 35S::PtrMYB120-SRDX 형질전환 포플러에서의 리그닌 함량 감소가 당화 효율의 증가로 이어진 것임을 시사한다.

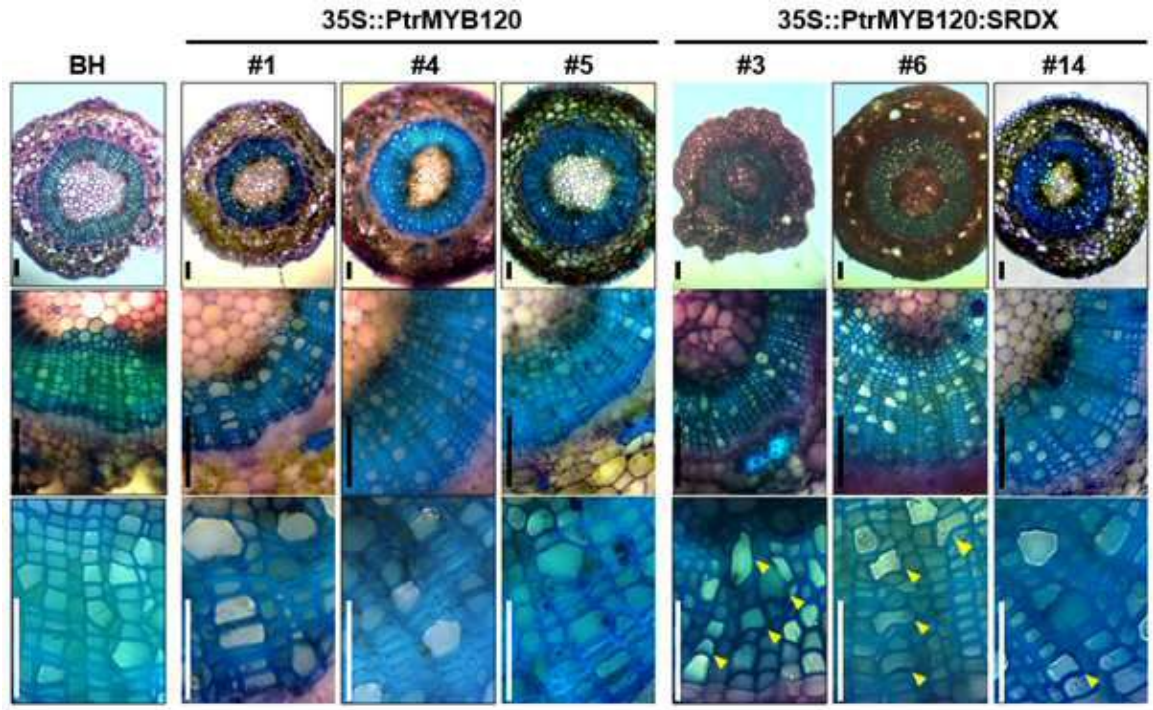
[0127] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

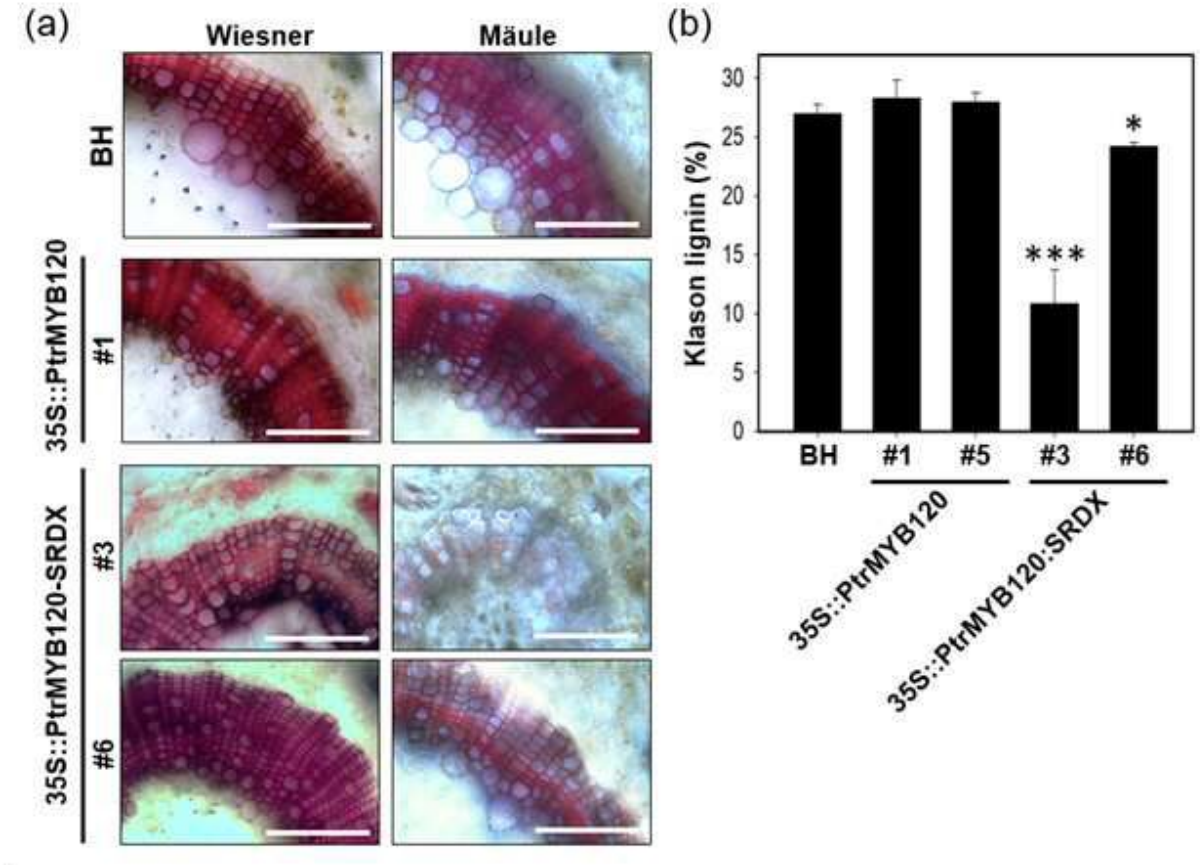
도면1



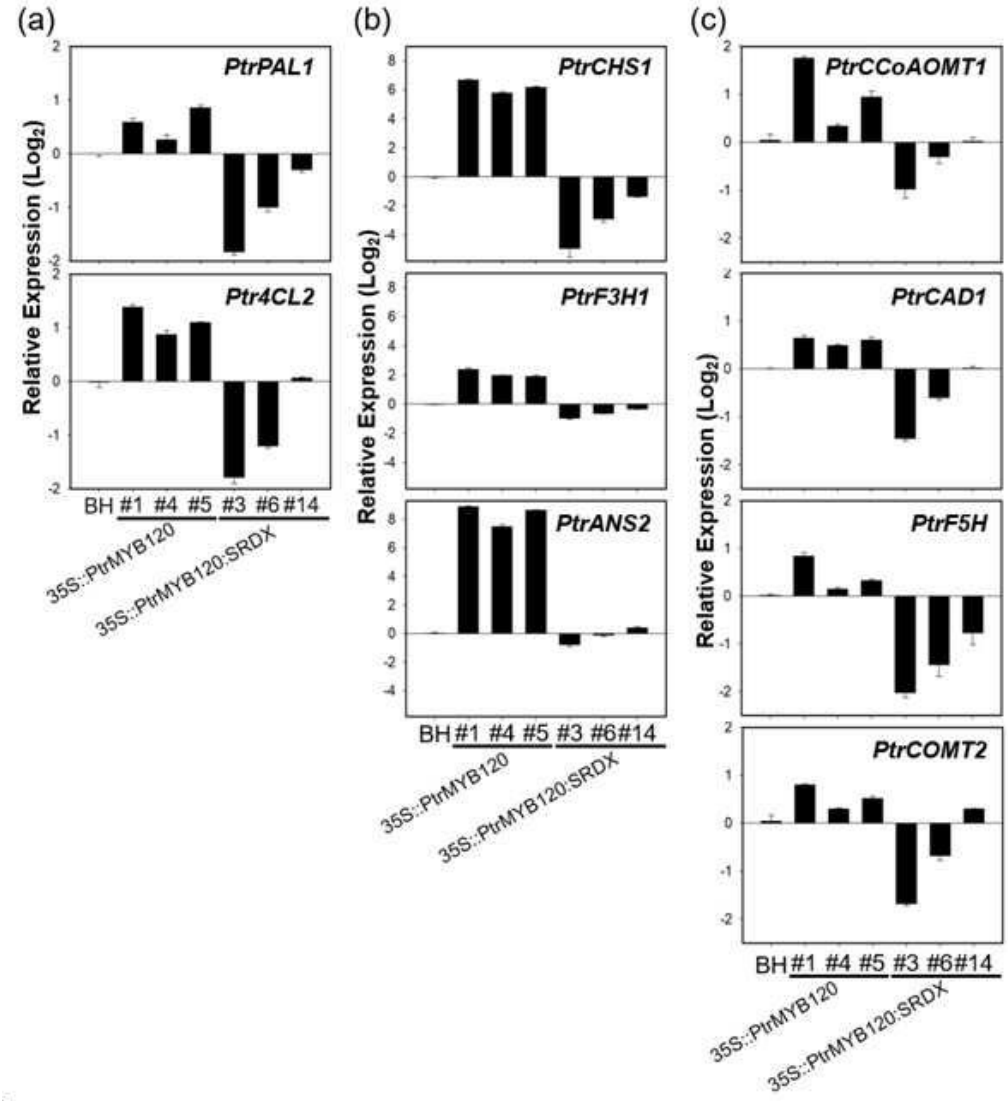
도면2


35S::PtrMYB120
35S::PtrMYB120:SRDX
BH
#1
#4
#5
#3
#6
#14

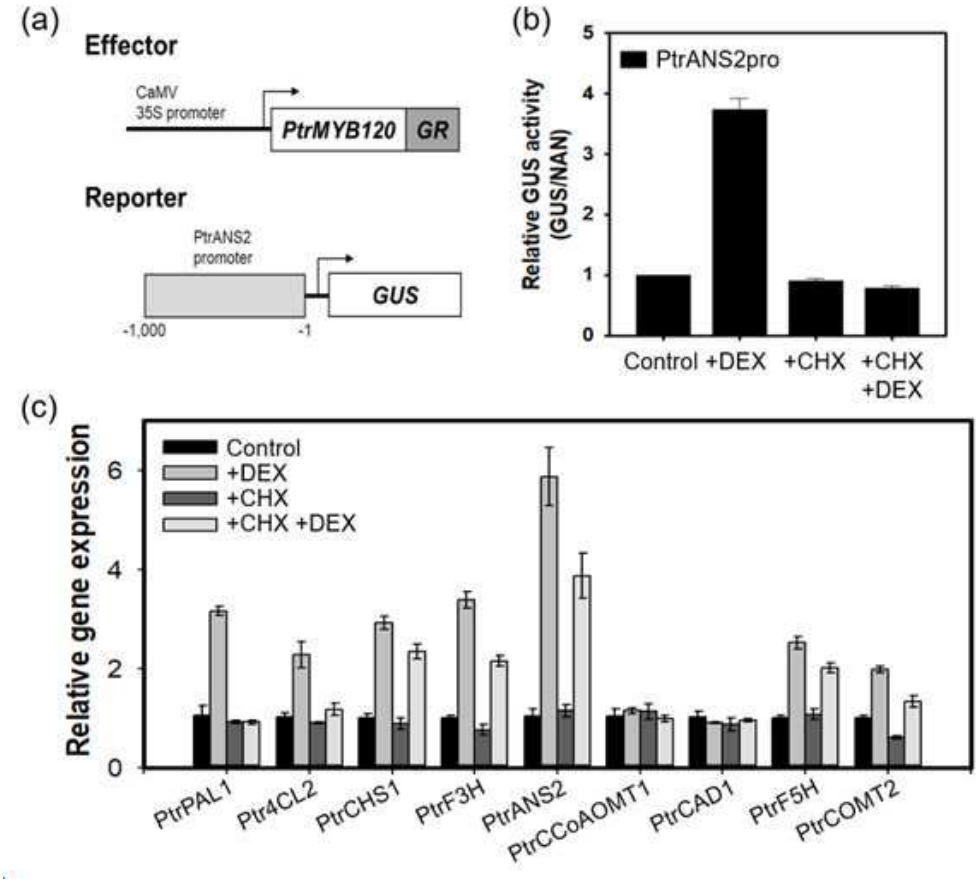
도면3


(a)
Wiesner
Mäule
BH
35S::PtrMYB120
#1
35S::PtrMYB120-SRDX
#3
#6
(b)
Klason lignin (%)
30
25
20
15
10
5
0
*
***
BH
#1
#5
#3
#6
35S::PtrMYB120
35S::PtrMYB120:SRDX

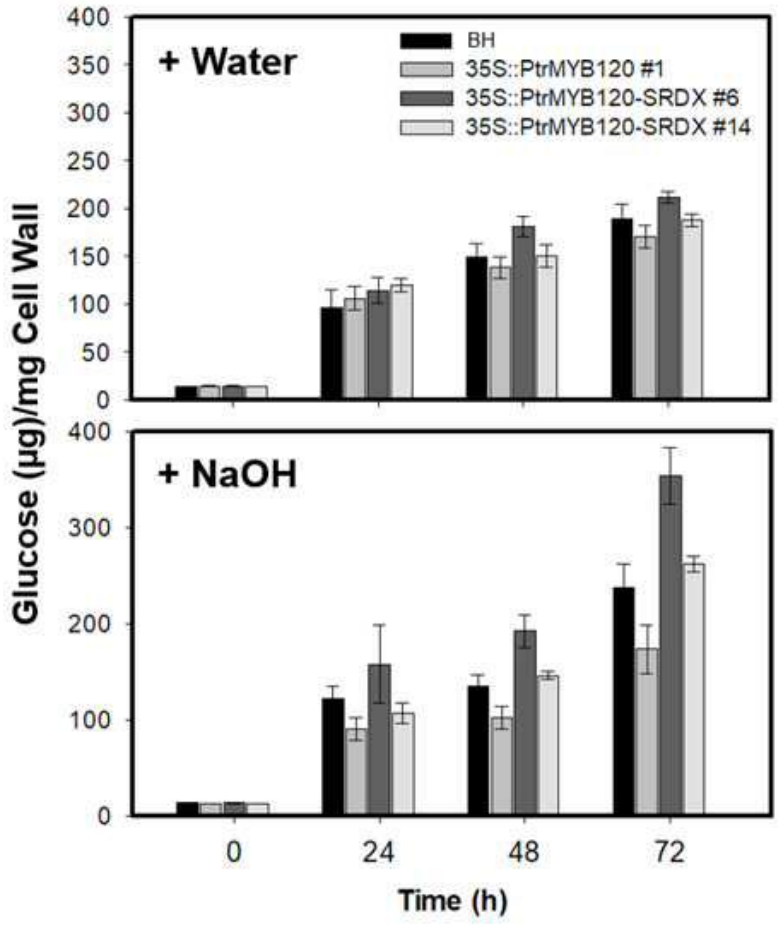
도면4


(a)
(b)
(c)
PtrPAL1
Ptr4CL2
PtrCHS1
PtrF3H1
PtrANS2
PtrCCoAOMT1
PtrCAD1
PtrF5H
PtrCOMT2
Relative Expression (Log2)
BH #1 #4 #5 #3 #6 #14
35S::PtrMYB120
35S::PtrMYB120:SRDX

도면5


(a)
Effector
CaMV
35S promoter
PtrMYB120
GR
Reporter
PtrANS2
promoter
GUS
-1,000
-1
(b)
PtrANS2pro
Relative GUS activity
(GUS/NAN)
0
1
2
3
4
5
Control
+DEX
+CHX
+CHX
+DEX
(c)
Relative gene expression
Control
+DEX
+CHX
+CHX +DEX
0
2
4
6
PtrPAL1
Ptr4CL2
PtrCHS1
PtrF3H
PtrANS2
PtrCCoAOMT1
PtrCAD1
PtrF5H
PtrCOMT2

도면6



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Transgenic plants for reduced lignin and method for producing the same

<130> KPA201365-KR

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 280

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PtrMYB120

<400> 1

Met Val Gly Ser Leu Gly Val Arg Lys Gly Ala Trp Thr Glu Glu Glu

1 5 10 15

Asp Ile Leu Leu Arg Lys Cys Val Glu Lys Tyr Gly Glu Gly Arg Trp

20 25 30

His Glu Val Pro Ser Arg Ala Gly Leu Asn Arg Cys Arg Lys Ser Cys

35 40 45

Arg Met Arg Trp Leu Asn Tyr Leu Lys Pro Asn Val Lys Arg Gly Gln

50 55 60

Phe Ser Val Asp Glu Val Asp Leu Ile Ile Arg Leu His Lys Leu Leu

65 70 75 80

Gly Asn Arg Gln Val Lys Met Trp Ser Leu Ile Ala Gly Arg Leu Ser

85 90 95

Gly Arg Thr Ala Asn Asp Val Lys Asn Tyr Trp Asn Ser Asn Gln Arg

100 105 110

Lys Lys Val Ile Ser Ser Thr Asp Glu Val Gln Ser Lys Pro Lys Ala

115 120 125

Lys Ser Ile Thr Arg Asp Asn Ile Ile Lys Pro Gln Pro Trp Lys Phe

130 135 140

Arg Asn Leu Phe Trp Leu Arg Gly Lys Ser Thr Pro Leu Ile Asn Val

145 150 155 160

Gly Ser Gln Tyr Gly Asp Asp Leu Cys Lys Pro Cys Tyr Ser Thr Val

165 170 175

Ser Pro Pro Ser Asp Ile Asn Glu Val Glu Ser Ile Trp Trp Glu Ser

180 185 190

Ser Leu Asp Asp Lys Glu Ile Asn Gln Thr Ile Asn Ser Ser Cys Leu

195 200 205

Gly Ser Val Ser Val Ser Ala Ala Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Ser Glu

210 215 220

Ser His Phe Val Lys Asn Asn Ala Pro Arg Gly Ile Lys Thr Gly Asp

225 230 235 240

Val Phe Tyr Glu Gln Gly Gln Asn Cys Trp Ser Asp Ile Ser Leu Asp

245 250 255

Ala Asp Leu Trp Asn Leu Ile Asn Thr Glu Leu Asp Gln Gln Gln Pro

260 265 270

Glu Gly Leu Gln Ser Ile Met Leu

275 280

<210> 2

<211> 843

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Potri.017G125600

<400> 2

atggtaggct cattaggagt aaggaaaggt gcatggacgg aggaggaaga tatacttcta 60

aggaagtgcg ttgagaaata tggtgaagga agatggcatg aagttccttc cagagcaggc 120

ttgaatcgat gcaggaaaag ctgcagaatg aggtggttga attatcttaa gccaaatgtc 180

aagagaggac agttttcggt ggacgaagtg gacttgatta tcagactaca caagttgctt 240

ggcaataggc aagtgaaaat gtggtcattg atagctggta gactttcagg aagaacagcg 300

aatgatgtaa agaattattg gaactcaaac cagcgtaaga aggtgatttc tagcactgat 360

gaagttcaat caaaaccaaa agcaaaatca atcacaagag acaacataat aaagcctcaa 420

ccttggaagt tcagaaattt attctggtta agaggaaaaa gtactccact tattaatgtt 480

ggttctcaat atggggacga tctttgtaag ccatgttatt caacagtatc gccaccttcc 540

gacattaatg aagttgaaag tatatggtgg gaaagctcgt tagatgacaa agaaattaat 600

caaacgatca acagcagttg tctgggttct gtttctgttt cagcagcagc agcttaccta 660

gagtccagcg aaagtcattt tgtaaagaac aacgcaccaa gagggataaa aactggggac 720

gtgttctatg aacaaggaca aaattgttgg agtgacattt ctttggatgc agacctttgg 780

aatctaatca atacagaact agatcaacaa caacctgaag gacttcagtc tataatgttg 840

taa 843

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SRDX domain

<400> 3

Leu Asp Leu Glu Leu Arg Leu

1 5

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SRDX motif

<400> 4

ctggatctag aactccgttt g 21