



- (51) 국제특허분류: *A01H 5/00* (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/001380
- (22) 국제출원일: 2012년 2월 23일 (23.02.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2011-0017022 2011년 2월 25일 (25.02.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR];** 경상남도 진주시 가좌동 900, 660-701 Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이균오 (LEE, Kyun Oh) [KR/KR];** 경상남도 진주시 가좌동 가좌주공그린빌 109 동 304 호, 660-779 Gyeongsangnam-do (KR). **이상열 (LEE, Sang Yeol) [KR/KR];** 경상남도 진주시 주

약동 삼환나우빌 101 동 1801 호, 660-290 Gyeongsangnam-do (KR). 유재용 (YOO, Jae Yong) [KR/KR]; 경상남도 밀양시 하남읍 수산리 835-7 번지, 627-894 Gyeongsangnam-do (KR).

- (74) **대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong);** 서울시 구로구 구로동 197-22 번지 에이스테크노타워 5 차 601 호, 152-766 Seoul (KR).
- (81) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

[다음 쪽 계속]

- (54) 발명의 명칭 : 벼로부터 유래한 1 시스테인 퍼옥시시레독신 프로모터

[Fig. 2]

5' GATTCTTCC -1805
 CTTCACATTAACCCAGAGAAGTTTGTACCTTTAAGGGAATGGAGACCTCCACAGSCTCTGCAAAACCCATTCTTTAAACCCCTCAAAACATAGGGCC -1705
 TGGTAAGAGGATTTGGTSTAATAAGAACCTCTCGCATGTCTCGCATGTCCGGTATTTGCATAGTATGGGATCTGGTATCATGATATACCGSAG -1605
 ATGAGGTAAGAAGAGCAGGAGACAGGAGATTTTATACAGGTTCCGGCCGCTGAAITGTTCAGTATGATTAACCAACATCTGTTGGTGGCAGACCGGATATAC -1505
 TCTTATTCAACATAATCACTAGTACATAATTTGGGATAACTATCAAACTGTTGTGCATATGGGGGTGTGAAGGTGTGACTCGTATCGATACATGACATG -1405
 TAGCCCTTCTCTCGAATCGCATCGCGGAGATCAGAGACAGCGGCTATCTCTCTCTCTGACAGTATCGTAGGACACGTAGGAGACATAGCCATGCCT -1305
 ATCTCTGAAGTCAGTAATCGCGGCTCTTGTCTGGGATGTGCAACTATGTATGTGTGGGCTCTTGTTGTCCATGATGTGTGTGGTGGGTGTCTCATAGG -1205
 TGGGTGTGTCTCTCTCTCTCTAGGSGGTCTGTATTTATACCCATAGGTGTCCCTTGTCCAAGTAGAACATAGGCGATACATATGATAACAATCTAAG -1105
 TAGTCTCTGTGCTTCCATGTAAACCTCTGTTATCTCTTATCCGGAACCTCCCTATATCTGTAGTGTGCTTCGGTATAGACATGATGATGATGATG -1005
 GGTCTACCGAGATTTAGTACATGATTTATAGGTATGTGATATCCATAACCTTCACAGACGACAGACTATACGATCTCCAAACATTTGATCTTTATCACC -905
 TGAAGATGAATCTCCCTCAACAAATTAAGTATGTTCTCCCATCTCCCTATCCCTCTCAGAGATPCTCCATGCTATAAACCCAGCTCCCTCAGG -805
 ACCATAAGTTTGTATGTACAGTTTCTTCTGTGCTGCACAAATTTTGTAGATATATGGAACCTGAGTTTTTATAGGSGTGTCTTCTTATCCATATCATCC -705
 CAGACTAGATCTTCTGACCTCCCATCTTTATTTCTTCCCATCTACATGATTTATTTATCTTTGTGATATCGGATGCTATGTACGTATCTGATCTGAC -605
 ATCAATAGCTCTCGGATCTTTTATGACCTTTATATATAGTAAAGTATTCGCGTATGAGAGCTCTCAGACAGATTTCTGTATTAATGTATGATGACAT -505
 CTGGTAGCTATAGGGCTGTTCACCTTTGATGTCACATTTCAATCTTACCAAAATTTGGTAAGTTGTCAAAAATAATGTGCTACATTTGTTTGTGCTTA -405
 AATTTTGTGTAACATATATAGAAATCTCTCCAAAATTTTGCACAGTATACAAAATTTTGCACATATAAATTTGGTATATACAAAATTTGTTGATGTTTT -305
 TTTTTCATCAAAATGATAGGSCCTTGTGCTCTTCTGAGCTAACACCGCTCCAAATCTCAAAAGCTCTCCGACATAGGCGCGCGCATGATCTTTCCNG -205
 TGGCCTGAGAAGATTAAGAAATGACCTGATGAGCTCATGGGATGGGGGATGATGACCTACCAAGGTAATAGTAGAGAGGCGGCGCTGACGAGACGAG -105
 ATGGGCTCCCTGATGCTGACCGCGCTGGGACACCTCTGCACATGTCATCAATCCCATCACTCCTCCTCAGTATGATATGCTTCGATCTGACTCCAG -5
 TCTCACTGGCTCTCTGCTTCGACACGTTTGCATTCGACGACGCTCATAGTTTCTTCTGTGTTCTCTGCCAGTCTAAGCAGCAGACATGCTGTCTGCCG -96
 ATGCGACGGCTCCATCATGGGACACCGTCCCAACCTGGAGCTGACCTACCCACGCAAGATCCGACATCCACGATTCGTCTGGGACACCTCATGTCA -136
 M P G L T I G G C T T D T V P N L E L D S T H G K I R I H D V G D T Y V -193
 TCCCTCTCTCCACCCCGGtatacaacatcacacactacaactcgtcgtgattctccaatctctcattggtagtagtttgtgtggatcgatgtgcatccgatt -239
 I L F S H P -296
 gat tat taaatgccttcgttcgatgcgtcag -328

- (57) Abstract:** The present invention relates to a novel l-cystein peroxiredoxin promoter derived from *Oryza sativa* L., to a recombinant vector comprising the promoter, and to a transgenic plant using the recombinant vector. The l-cystein peroxiredoxin promoter according to the present invention may express high amounts of a target protein in cultured cells derived from a pseudo-embryo, an aleurone layer, and an embryo, and thus may be effectively used in the pharmaceutical and biotechnology fields.

- (57) **요약서:** 본 발명은 벼(*Oryza sativa* L.)로부터 유래한 신규한 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 본 발명에 따른 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터는 수도 배아, 호분층 및 배아로부터 유래된 배양세포에서 표적 단백질을 고발현시킬 수 있어 제약 및 생명공학 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.



KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

— 규칙 91.3(b) 규정에 의한 명백한 잘못의 정정 허가에 관한 정보와 함께 (규칙 48.2(i))

(48) 본 정정판 공개일:

2012 년 10 월 18 일

(15) 정정사항에 관한 정보:

2012 년 10 월 18 일 자 공지 참조

명세서

발명의 명칭: 벼로부터 유래한 1시스테인 퍼옥시레독신 프로모터 기술분야

- [1] 본 발명은 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 분자 생물학이 발전하면서 유전자의 발현을 조절하는 여러 가지 기작이 밝혀져 왔다. 유전자의 발현이라 함은 세포 내에서 일어나는 전사(transcription) 및 번역(translation)을 통해 유전자에 입력되어 있는 코드에 따라 단백질을 합성하는 일련의 과정을 일컫는다. 특히, 전사 과정은 유전자 발현의 초기 단계로서, RNA 중합 효소가 여러 보조 인자들의 도움을 받아서 유전자의 상위에 존재하는 프로모터(promoter) 서열에 결합함으로써 개시가 시작된다. 전사인자(TF, transcription factor)는 보조 인자들 가운데 하나로서, 프로모터 서열에 직접 결합하는 것으로 알려져 있다. 진핵생물에서는 대표적으로 TFIIA, TFIIB 및 TFIID와 같은 전사인자가 밝혀졌으며, TATA box 및 E-box와 같은 여러 종류의 프로모터 서열이 알려져 있고, 연구자들에 의해 계속 새로운 전사인자 및 프로모터 서열이 밝혀지고 있다.
- [3] 육종이란 가축이나 작물의 유전학적 형질을 개선하여 이용가치가 높은 새로운 품종을 육성하는 것으로, 단순히 기존 품종의 개량 또는 새 품종의 육성에만 그치는 것이 아니라 새로운 종을 만들어내는 것도 포함된다. 육종 기술은 새로운 품종의 출현에 의한 재배작물의 다양성 획득, 다수확성 또는 저생산비성 품종으로 인한 경제적 이익, 작물재배의 지리적인 한계나 계절적인 한계의 극복, 품질의 개선, 냉해, 병해, 충해에 대한 저항성의 향상으로 인한 재배안전성의 증대, 그리고 여러 가지 작물의 조생종, 만생종, 단간종 등의 새 품종을 육성함으로써 윤작체계의 조절이나 작업의 분배를 할 수 있게 되어 경영의 합리화에 유리하다기 때문에 농업의 발달과 더불어 시작되었으며 특히 19세기 이후에 활발하게 이루어졌다.
- [4] 육종의 방법으로는 도입, 분리, 교잡, 잡종강세, 배수성, 돌연변이 등이 있으며, 최근 분자생물학 기술의 발전에 따라 분자 육종법이 주목을 받고 있다.
- [5] 분자 육종법은 분자생물학적 기법을 이용하여 새로운 형질을 생물에 도입하고 이를 선별하는 방법으로써 종래의 육종법에 비해서 시간 및 비용이 적게 들어 경제적이며, 종래의 육종법으로는 얻을 수 없는 이종간의 형질 도입이 가능하여 각광을 받고 있다. 이러한 분자 육종을 하기 위해서는 대사 과정에 대한 이해, 유용한 유전자, 이를 발현시킬 수 있는 수단 및 다양한 동식물에 대한 형질전환기법 등의 여러 가지 수단들이 필요하며, 특히 원하는 유전자를 원하는 부위에서 원하는 시기에 발현시키기 위한 다양한 프로모터 및 벡터의 개발의

필요성이 지속적으로 요구되고 있다.

- [6] 이에 본 발명자들은 형질전환 식물의 제조에 이용될 수 있는 새로운 조직 특이적 프로모터를 개발하기 위해 연구를 거듭한 결과, 벼의 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 영역을 분리하고, 상기 프로모터가 수도 배아, 호분층 및 배아로부터 유래된 배양세포에서 특이적으로 발현된다는 점을 확인하고, 이를 이용하여 형질전환 식물체를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 벼로부터 유래한 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 제공하는 것이다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프로모터를 이용하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진, 벼로부터 유래한 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 제공한다.
- [12] 또한 본 발명은, 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [13] 또한 본 발명은, 상기 프로모터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [14] 또한 본 발명은, 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진, 수도 배아 및 호분층에 특이적인 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하는 단계; 및 상기 외래 유전자가 삽입된 재조합 벡터를 벼에 형질전환하는 단계;를 포함하는 외래 유전자를 수도 배아 및 호분층에서 발현시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [15] 본 발명의 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터는 수도 배아, 호분층 및 배아로부터 유래된 배양세포에서 표적 단백질을 고발현 시킬 수 있어 제약 및 생명공학 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [16] 도 1은 ABA로 자극시킨 벼의 배아 유래의 칼루스에서 과발현되는 단백질을 2-DE(Two-dimensional gel electrophoresis)를 통해 분리한 도이다.
- [17] 도 2는 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 부위를 분석한 모식도이다.
- [18] 도 3은 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터

pCAMBIA1301의 모식도이다.

- [19] 도 4는 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 벼의 종자에서 X-Gluc로 염색을 통해 GUS 활성을 비교한 도이다 ((b) CaMV 35S 프로모터, (c) 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 F1, (d) 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 F2, (e) 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 F3).
- [20] 도 5는 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 벼의 벼 종자의 발달과정에서 X-Gluc로 염색을 통해 GUS 활성을 비교한 도이다.
- [21] 도 6은 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 벼의 벼 종자의 발달과정에서 웨스턴 블랏을 통해 GUS 활성을 비교한 도이다.
- [22] 도 7은 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 벼의 종자에서 GUS 활성을 정량적으로 분석한 도이다.
- [23] 도 8은 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 벼의 배아로부터 유래한 칼루스에서 GUS 활성을 정량적으로 분석한 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [24] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [25] 본 발명은 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진, 벼로부터 유래한 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 제공한다.
- [26] 상기 프로모터는 수도 배아, 호분층 및 배아로부터 유래된 배양세포에 특이적인 것을 특징으로 한다.
- [27] 본 발명에서 용어 "프로모터"란 폴리머라제에 대한 결합 부위를 포함하고, 프로모터 하위 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는 암호화 영역의 상위(upstream)의 비해독된 핵산서열, 즉, 폴리머라제가 결합하여 유전자의 전사를 개시하도록 하는 DNA 영역을 말하며, mRNA 전사 개시부위의 5' 부위에 위치한다.
- [28] 본 발명의 프로모터 핵산 분자에 포함되는 서열번호 1 내지 3의 뉴클레오타이드 서열은 최근의 여러 가지 연구기법, 예를 들어 방향성 진화법(directed evolution) 또는 부위특이돌연변이기술(site-directed mutagenesis) 등의 방법을 통해 일정 정도 변형이 가능하다. 즉, 본 발명의 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자는 상기한 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 수행하는 이의 작용성 증가물을 포함하는데, 상기 작용성 증가물은 인위적인 변형에 의해 뉴클레오타이드의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution), 삽입(insertion) 또는 이들의

조합(combination)에 의해 변형된 변이체(variants) 또는 동일한 작용을 수행하는 상기 폴리뉴클레오티드의 작용성 단편(fragments)을 포함할 수 있다.

[29] 본 기술분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 70% 이상의 상동성이 유지되는 염기서열이 본 발명에서 목적하는 유전자 발현을 위한 프로모터 활성을 보유하는 한, 본 발명의 신규한 프로모터와 균등물로서 본 발명의 권리 범위에 속함을 쉽게 이해할 수 있을 것이다.

[30] 따라서, 또 다른 구체적인 일 양태로서, 본 발명의 프로모터 핵산 분자는 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열과 70% 이상의 상동성(homology)을 나타내고, 상기 프로모터와 동등한 프로모터 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인(complementary) 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[31] 본 발명에서 용어 "상동성"은 야생형(wild type) 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 상기 상동성의 비교는 육안 또는 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[32] 본 발명에서 용어, "상보적인"은 뉴클레오타이드 또는 핵산, 예를 들어 이중가닥 DNA 분자의 2개의 가닥간 또는 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 서열분석되거나 증폭될 단일 가닥 핵산 상의 프라이머 결합 부위간의 하이브리드화 또는 염기 짝지음을 의미한다.

[33] 본 발명에서 용어 "특이적"은 프로모터의 발현 활성이 동일한 식물체 내의 적어도 하나 이상의 다른 조직보다 특정한 조직 내에서 더 높다는 것을 의미한다. 프로모터의 발현 활성의 수준은 일반적으로 사용되는 방법을 이용하여 미리 측정된 조직 내에서의 프로모터의 발현수준을 다른 조직 내에서의 것과 비교함으로써 평가된다. 일반적으로 프로모터의 발현수준은 프로모터의 조절 하에서 발현된 유전자 생성물, 예를 들어 단백질 및 RNA 등의 생성량에 의해 측정된다. 본 발명의 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터는 수도 배아, 호분층 및 배아로부터 유래한 배양세포에 특이적이며, 상기 조직 또는 세포는 단백질 함량이 높고 배젖 조직으로부터 기계적 분리가 용이하기 때문에, 본 발명의 프로모터는 바이오 의약품을 포함한 고부가 단백질을 발현시키고 분리하기에 적합하다.

[34] 본 발명의 프로모터는 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 분리 또는 제조할 수 있다. 예를 들어, 적절한 프라이머 서열을 이용하여 PCR을 통해 분리할 수 있다. 또한, 자동화된 DNA 합성기를 이용하는 표준 합성기술을 이용하여 제조할 수도 있다.

[35]

[36] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

- [37] 본 발명에서 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기 용어 "작동 가능하게 연결된"이란 프로모터 서열이 상기 코딩 서열의 전사를 개시 및 매개하도록, 상기 코딩 서열과 프로모터가 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 예컨대 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있으며, 바람직하게는 pCAMBIA 1301을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 벡터는 적당한 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 일부 경우엔 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.
- [38] 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 필요에 따라 선택 마커(selection marker)를 포함할 수 있다. 상기 선택 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제(selective agent)가 처리된 환경에서는 선택 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.
- [39] 본 발명의 재조합 벡터는 1-시스테인 펩티다제 유전자 프로모터를 포함하는 조절 서열과 목적 유전자를 포함하는 코딩서열을 작동적으로 연결시켜 다양한 목적 단백질을 재조합적으로 생산할 수 있다. 상기 코딩서열은 이에 제한되지 않으나, 예를 들면, 전체 유전자, 또는 그의 일정한 영역을 코딩하는 서열일 수 있으며, 아미노산이나 뉴클레오타이드의 대사 산물과 연관되어 있는 유전자의 코딩서열일 수 있다.
- [40] 또한, 본 발명의 재조합 벡터는 정량화할 수 있는 단백질을 코딩하는 유전자(이하, '리포터 유전자'라 함)가 발현되도록 프로모터의 하위(downstream)에 연결시켜 프로모터 활성 정도를 측정할 수 있다. 상기 리포터 유전자로는 이에 제한되지 않으나, GUS(베타-글루쿠론산분해효소)를 이용하는 것이 바람직하다.
- [41] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명에 따른 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진 신규한 프로모터를 삽입하기 위한 벡터로서, 벡터의 형질전환에 사용 가능한 서플벡터인 pCMABIA 1301을 이용하였다. 또한, 상기 벡터에 프로모터 활성을 측정하기 위한 리포터유전자로서 GUS를 코딩하는 gusA 유전자를 포함시키고, 선택마커로서 카나마이신과 하이그로마이신 내성 유전자를 포함시켜, 최종적으로 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진 프로모터를 포함하는 재조합 벡터를 제작하였다.

[42]

[43] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다. 상기 형질전환체는 재조합 벡터를 프로모터가 작용할 수 있는 양태로 숙주세포 내에 도입시키는 것에 의해 구축될 수 있다.

[44] 본 발명에서 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.

[45] 본 발명의 재조합 벡터를 이용하여 형질 전환시키는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘(CaPO_4) 침전, 염화칼슘(CaCl_2) 침전, 미세주입법(microinjection), 폴리에틸렌글리콜(PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있다.

[46] 상기 숙주 세포로는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주를 사용하는 것이 바람직하나, 원핵 및 진핵을 포함한 모든 미생물을 사용할 수 있다.

[47] 본 발명에서 식물의 형질전환이란 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 상기 형질전환을 위한 방법은 반드시 재생 및/또는 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적으로 이루어지고 있으며, 구체적으로는 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol.3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염 등이 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달일 수 있으며, 보다 바람직하게는 이원 벡터 기술을 이용할 수 있다.

[48] 상기 형질전환체는 이에 한정되지는 않으나, 미생물일 수 있으며, 상기 미생물은 대장균(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스(*Proteus mirabilis*), 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*) 또는 아그로박테리움 투머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)일 수 있다.

[49] 또한, 상기 형질전환체는 이에 한정되지는 않으나, 식물 또는 식물세포일 수 있으며, 이 때, 상기 식물이란 전체 식물(whole plant), 식물의 일부분, 캘러스, 식물 조직, 식물 세포 및 식물 종자를 모두 포함한다. 상기 식물체로는 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물이 포함되며, 바람직하게는 벼, 밀, 보리, 애기장대, 담배, 토마토, 고구마일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 벼를 사용하였다.

[50] 식물세포의 배양은 식물의 일부를 모체로부터 분리하여 적당한 조건 아래에서 무균적으로 배양하여 생육시키는 것으로 조직 절편의 액체 배양, 조직 절편의 캘러스 배양, 원형질체 배양 등 당업자에게 공지된 어떠한 방식의 것에 의할 수 있으며, 그 배양 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 배양된 식물세포를 식물로 분화시키는 것은 캘러스, 원형질체 형태의 배양된 식물세포를 적당한 조건아래에서 분화를 유도하여 식물의 조직 또는 식물로 분화시키는 것으로 그 분화 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에 의해 수행될 수 있다.

[51] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명에 따른 서열번호 1의 프로모터를 포함하는 벡터 pCAMBIA1301를 아그로박테리움에 형질전환시켜 목적 유전자를 과발현시킬 수 있는 형질전환체를 제조하였다.

[52]

[53] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 목적 유전자의 발현 방법을 제공한다.

[54] 본 발명에서 "목적 유전자의 발현"이란, 상기 목적 유전자를 발현시켜 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서 목적 유전자를 발현하는 방법은 상기 목적 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체(숙주세포)를 배양하여 상기 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 발현시키는 방법이며, 이를 통해 상기 단백질이 관여되는 생합성 경로의 최종산물을 제조할 수 있다.

[55]

[56] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 통하여 구체적으로 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[57]

[58] 실시예 1. 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터의 확인

[59] 식물 호르몬인 ABA (abscisic acid)는 배발생 (embryogenesis)의 말기에 종자 저장 (seed storage) 단백질의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. ABA로 자극시킨 벼의 배아 유래의 칼루스 (calluse)에서 과발현되는 단백질을 분리하기 위하여, 대조군 (무처리)과 ABA가 처리된 칼루스의 단백질을 2-DE(Two-dimensional gel electrophoresis)로 분리하고, 은 염색 후 PDQuest software를 이용하여 발현량을 비교하였다. 먼저 최소 2배 이상의 현저한 차이를 나타내는 단백질 32개를 선별하고, 그 중에서 ABA 처리에 의해 현저하게 증가된 10 개의 단백질 스팟을 MALDI-TOF MS 분석을 통해 동정하였다 (도 1). 그 중 스팟 6가 과거 연구를 통해 식물에서 종자 휴면 (seed dormancy)의 조절자(regulator) 및 종자에서 항산화 단백질의 역할을 하는 것으로 알려진 1-시스테인 퍼록시페독신으로 확인되었다. 그러나 현재까지 약학적 단백질의

생산을 위한 효율적인 유전자의 발현을 조절하는 조직 특이적인 프로모터로서의 벼로부터 유래한 1-시스테인 퍼록시레독신 유전자의 5' flanking region의 유효성 및 실용성은 밝혀진 바가 없었다.

- [60] 따라서 상기에서 확인된 ABA 처리에 의해 발현이 크게 증가되는 1-시스테인 퍼록시레독신 유전자의 프로모터를 확인하고, 이의 조직 특이적인 활성을 분석하기 위하여, 1-시스테인 퍼록시레독신 유전자의 AUG 번역 시작 코돈으로부터 1,920bp 업스트림을 포함하고 있는 5' flanking region을 분리하고, 5' RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' cDNA ends)를 이용하여 벼로부터 유래한 1-시스테인 퍼록시레독신의 전사 개시 위치를 확인하였다. 상기 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터의 서열을 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)를 이용하여 분석하고 cis-regulatory element 서열로 추정되는 부위를 확인하였다.
- [61] 실험 결과, 도2에 나타난 바와 같이, TATA 박스, CAAT 박스 및 ABRE, ARE, CAT-box, CCGTCC-box, RYE 및 W-box 등 cis-regulatory element 서열을 포함하는 영역을 확인하였으며, 1-시스테인 퍼록시레독신의 5' flanking 부위의 생물정보학적인 분석을 통해 전사 개시 위치로부터 업스트림방향 (-)으로 1814, 1007, 606bp의 영역을 프로모터 후보 부위로 선택하였다. 이하, -1814~96 bp까지의 서열을 F1, -1007~96 bp까지의 서열을 F2, -606~96 bp까지의 서열을 F3로 표시하였다.
- [62]
- [63] 실시예 2. 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터 및 형질전환 식물체의 제작
- [64] 상기 실시예 1에서 확인한, 96 bp 5'-UTR을 포함하고 있는 F1, F2, F3 각각의 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 후보 부위의 시-공간적 (temporal and spatial)인 활성을 확인하기 위하여, 이를 포함하는 재조합 벡터 및 형질전환 식물체를 제조하였다.
- [65] 구체적으로는 벼의 genomic DNA로부터 PCR 을 통해 F1, F2, F3 각각의 프로모터 후보 부위를 증폭하였다. 상기 프로모터 후보 부위를 EcoRI과 NcoI 제한효소를 이용하여 GUS (베타-글루쿠론산분해효소) 리포터 유전자 (정량화할 수 있는 단백질을 코딩하는 유전자)와 연결하여 이원벡터인 pCAMBIA 1301에 삽입하였다 (도 3). 이후 상기 재조합 벡터를 아그로박테리움 매개의 형질전환을 통해 벼로 도입하여, 형질전환 식물체를 제조하였다.
- [66]
- [67] 실시예 3. 형질전환 식물체에서 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터에 의한 리포터 유전자의 활성 확인
- [68] 상기 실시예2에서 제조한 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터 후보 부위를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환한 벼의 종자에서, GUS (베타-글루쿠론산분해효소)의 시-공간적인 발현 양상을 확인하기 위하여, 상기

벼의 종자를 조직화학적 방법으로 염색 (histochemical staining)하였다.

- [69] 실험 결과, 도4에 나타낸 바와 같이 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터 F1 (도 4 (c)), F2 (도 4 (d)), F3 (도 4 (e))에 의한 GUS 활성은 모두 수도 배아와 호분층에서 특이적으로 높게 나타남을 확인하였다. 이는 대조군인 CaMV 35S 프로모터 (도 4 (b))에 의한 GUS 활성보다 더 강력한 것이었다.
- [70] 또한, 벼 종자의 발달과정에서 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터 후보 부위에 의한 GUS 발현을 확인하기 위하여, 개화기 (WAF)가 지나고 2-8주 후 수득된 형질전환 벼의 종자를 세로로 자르고 X-Gluc로 염색하였다.
- [71] 실험 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 종자의 발달 (2~8 WAF) 과정에서 GUS 활성은 X-Gluc 염색을 통해 시각적으로 비교하기에는 너무 강하게 나타났다. 그러나, 도 6에 나타낸 바와 같이, 폴리클로날 1-시스테인 퍼옥시레독신 항체를 이용하여 내생의 1-시스테인 퍼옥시레독신을 웨스턴 블랏을 통해 분석하였을 때, 벼의 종자에서 1-시스테인 퍼옥시레독신의 발현은 3 WAF에 가장 높은 수준에 다다르며, 이 수준은 성숙 단계 (8 WAF)까지 유지됨을 확인하였다.
- [72] 또한, 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터 후보 부위를 각각 포함하는 형질전환체와 함께 독립적인 싱글-카피 T-DNA 계통으로부터 성숙한 종자에서의 GUS 발현을 분석하였다.
- [73] 실험 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터 후보 부위의 평균적인 GUS 활성은 21.9 ± 1.8 , 24.9 ± 3.3 및 23.4 ± 3.4 pmol (4-MU/min/ μ g protein)로 나타났다 (F1, F2, F3 각각 3, 4, 4개의 독립적인 계통의 평균값). 이는 지난 연구를 통해 밝혀진 수도 배아 및 호분층 특이적 프로모터인 REG-2 (2.4 ± 1.2 pmol) 및 Ole18 (2 ± 4.6 pmol) 프로모터 보다 높은 수치였다.
- [74] 또한, 상기와 같이, 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터가 수도 배아 및 호분층에서 특이적으로 발현되기 때문에, 배아로부터 유래된 칼루스에서도 발현이 이루어지는지를 확인하였다.
- [75] 실험 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 배아로부터 유래된 칼루스에서 F1, F2 또는 F3 프로모터 부위에 의한 GUS 활성은 40.5 ± 2.1 , 36.8 ± 1.6 , 및 38.5 ± 1.1 pmol (4-MU/min/ μ g protein)로 각각 나타났으며, 이는 전체 종자에서 관찰되는 것 (도 7)보다 두 배 이상 되는 수치였다. 또한, 36시간 동안 ABA 처리 시 45.7 ± 0.4 , 44.9 ± 2.2 , 및 46.5 ± 1.6 pmol (4-MU/min/ μ g protein)로 더욱 증가함을 확인하였다.
- [76]
- [77] 이상의 실험 결과를 통해, 벼로부터 유래한 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터 후보 부위로 선정된 F1, F2, F3는 모두 1-시스테인 퍼옥시레독신 프로모터로 작동함을 확인하였다. 또한, 상기 프로모터는 지금까지 알려진 수도 배아 및 호분층 특이적 프로모터 중에서 가장 높은 전사 유도 활성을 나타냈으며, 상기 수도 배아 및 호분층은 단백질 함량이 높고 배젖 조직으로부터 기계적 분리가 용이하기 때문에, 상기 프로모터는 제약 및 생명공학 분야에서 유용하게 이용될 수 있음을 확인하였다.

산업상 이용가능성

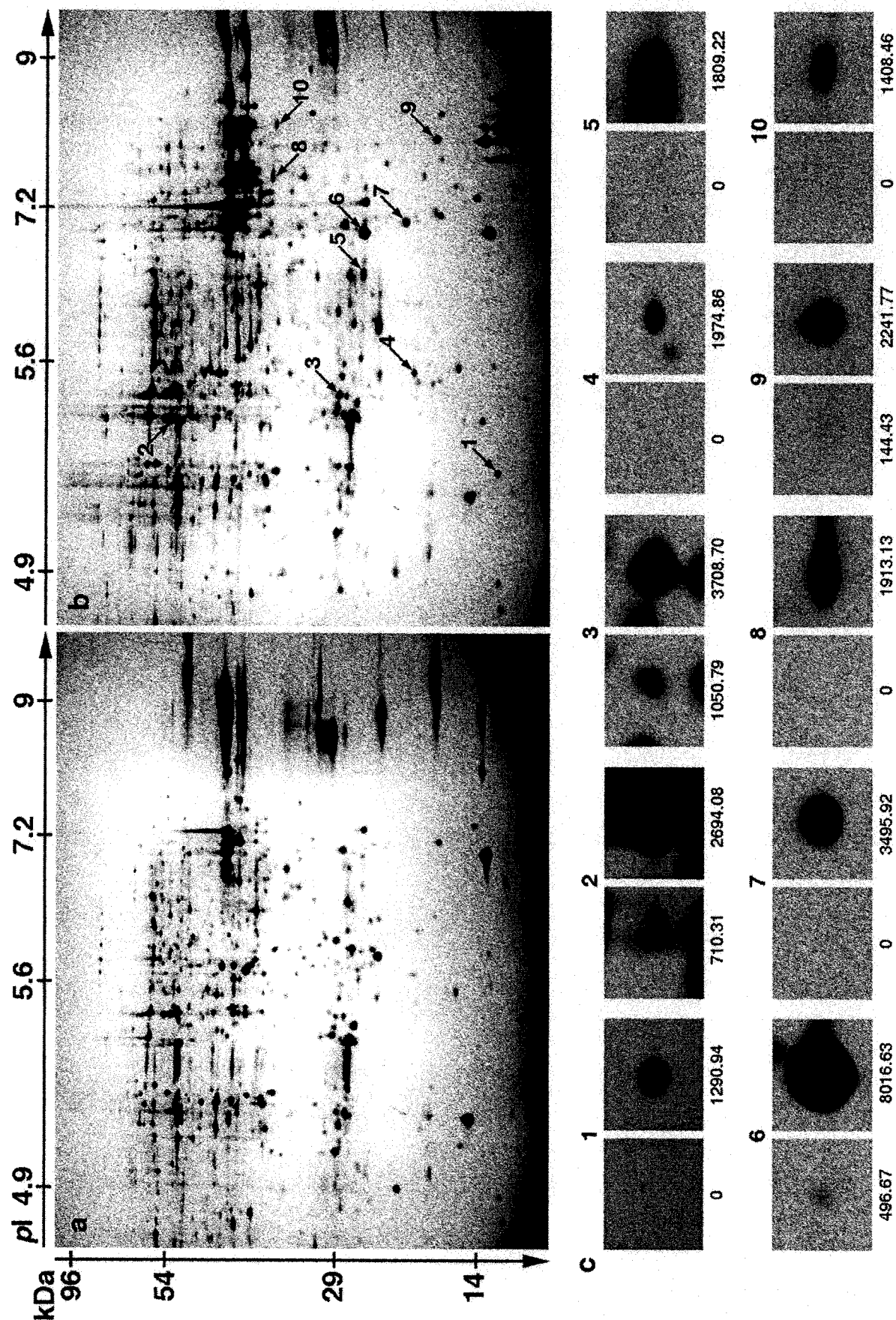
- [78] 본 발명의 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터는 수도 배아, 호분충 및 배아로부터 유래된 배양세포에서 표적 단백질을 고발현 시킬 수 있어 제약 및 생명공학 분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

[79]

청구범위

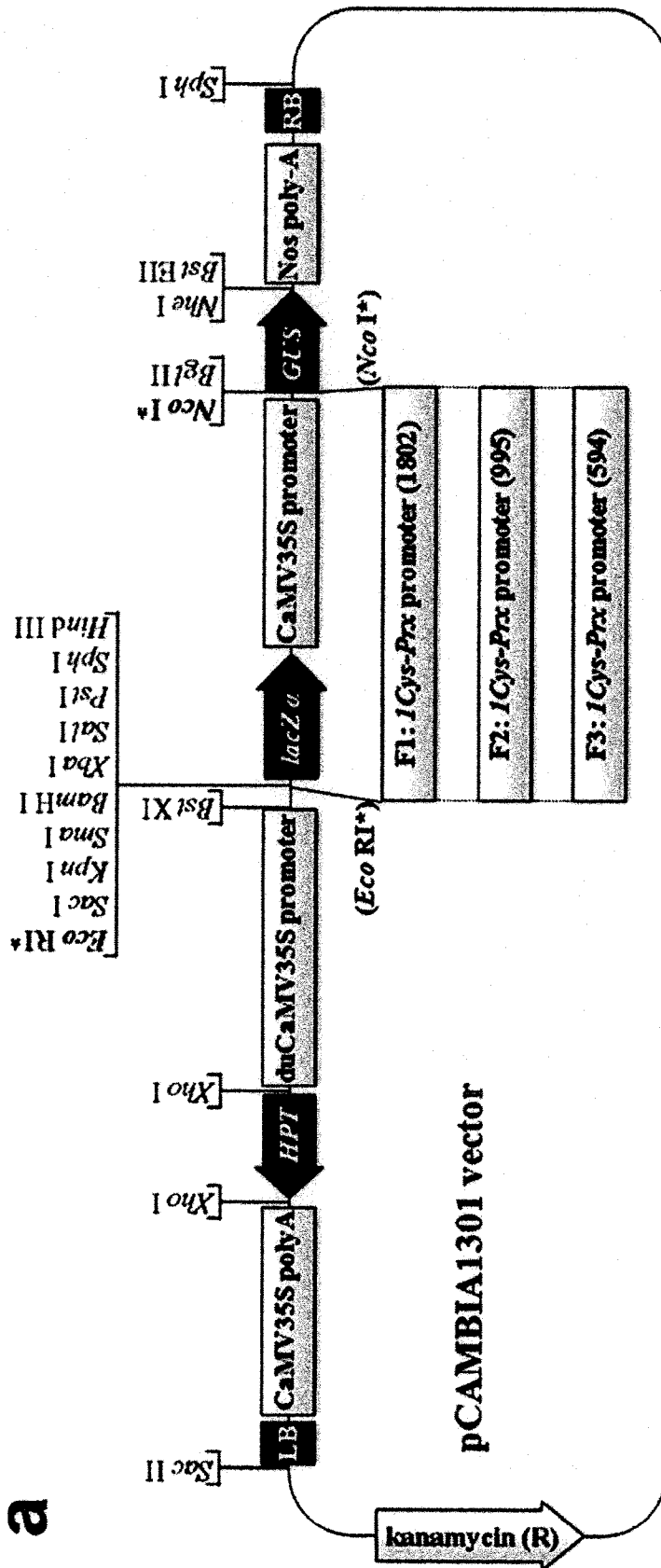
- [청구항 1] 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진, 수도 배아 및 호분층에 특이적인 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터는 베타로부터 유래한 것을 특징으로 하는 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터.
- [청구항 3] 제 1항에 따른 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터.
- [청구항 4] 제3항에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 식물체.
- [청구항 5] 서열번호 1 내지 3으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 염기서열로 이루어진, 수도 배아 및 호분층에 특이적인 1-시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하는 단계; 및 상기 외래 유전자가 삽입된 재조합 벡터를 베타에 형질전환하는 단계;를 포함하는 외래 유전자를 수도 배아 및 호분층에서 발현시키는 방법.

[Fig. 1]

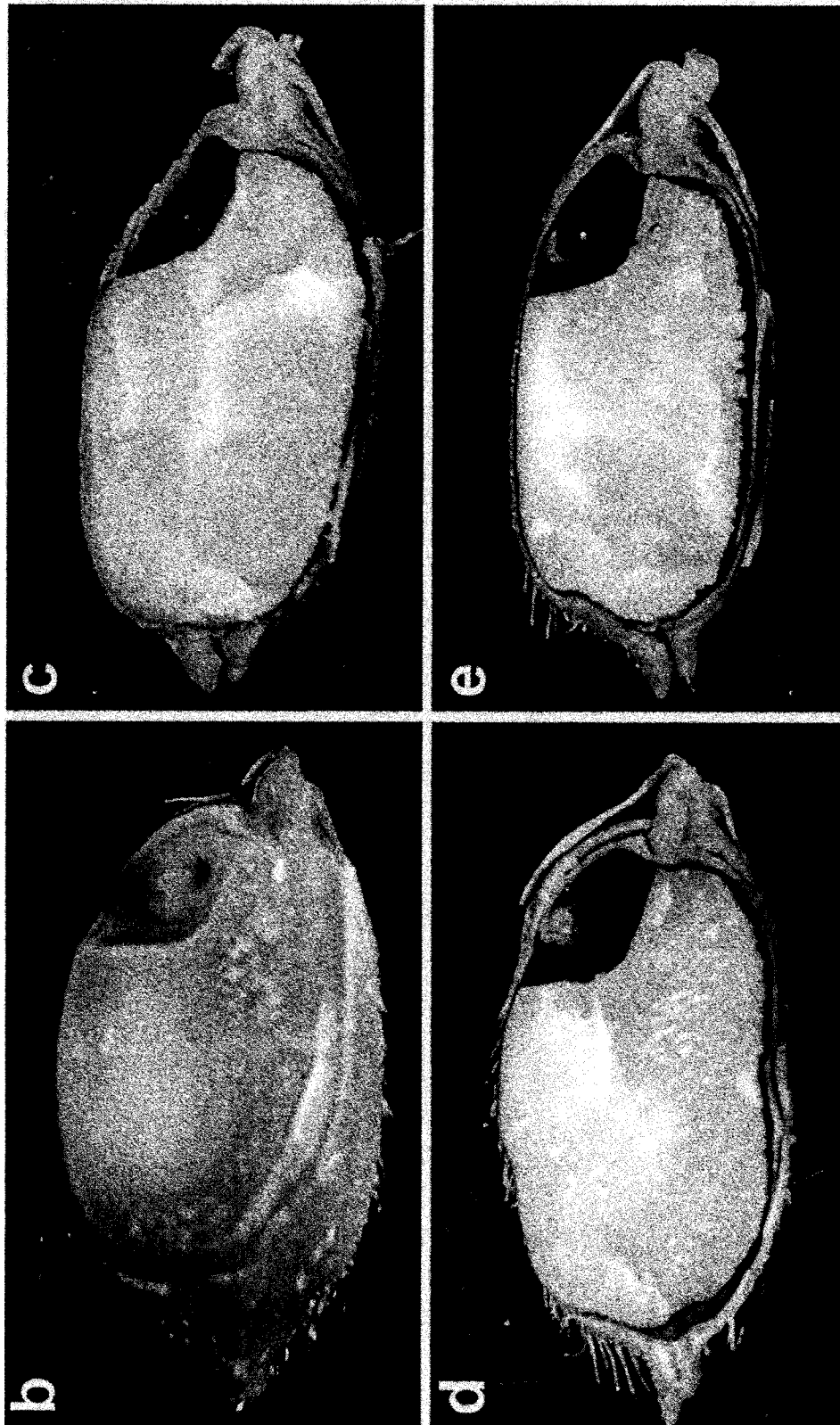


GAATTTCTTCC -1805
F1
CTTCAACATTAAACCAAGAAGATTTTGACTTTTAAAGGAATGGAGGACCTCCACAGGTCTGCAAAACCCCTATCTTTAAACCCCTCCAAACATAGGGCC -1705
TGGTAAAGGGAATTTGGTAGTATAAGAGCCTGTCGATGTTTGATGTCGCGATTCCCGGTATTTCATAGTATGGGATCGTTGGTACTATGATATACCGGAG -1605
ACTGAGGTAAAAGAGACGGAGACAGGGAATTTATACAGGTTCCGGGCCCTGAATTGTCAGGTAATAACCCAAACATCCTGTTGGCCGAAGCCGGTATTAC -1505
TCTTATTACCAATAATCACACTAGTACAATAATTGGGATAAACCATCAAACTGTTGCGATATGGCGGTGTAAGGTCTGACTCGTAGTCGATAACACAGTG -1405
TAGCCTTCCCTCGAATCCGCATCCGGCGAGATCAGAGACAGCGCTATATCTCTCTGCTGACAGTATCCGTAGGCACCCGTAAAGGACTAGCCATGCCT -1305
ATCTCTGAAGTCGATATCTGGCGTCTGTCCTGGCGTATGTCAACTTGATGTTGTGGCTTCTGTTGTTCCATGTATGTTGTGGTGGTGTCTTCCATGG -1205
TGGGTGTGTCCTCTCTCTTAGGGGGTCTGTATTTATACCCATAGGTGTCCCTTGTCGAAGTAGAACCTAGGGTAAACCAATATGAATACAATCTAAG -1105
TAGTCCTTGTGCTTCCATGTAAACTCTGGTTATCTTTTCTATCCGGAACCTCTCCCTATATCTGTAGGTGCTTCCGTATAGGACATGGTATGTAGTG F2
GGTCTACCGAGATTTAGTCAACTATATTAGGTATGTGATATCCATAACCCGTGACAGAGCCAGACTTATCAGCTTCCAAACAATTTGATCTTTATCACC -905
TGAAAGATGAATCTCCCTACAAATATATGATGTTCTTCCCATCTCCCTTCACTCAGAGATCTCCTCAACTCTATATACCCAGCTCCCTCAGG -805
ACCATAAGTTTGATGTACAGTTTCTCTGCTGCTGCACAAATTTGTAGATATATGAAAACTGAGTTTTTAGGGGTGTCTTTCTCTATCCATACATCATCC -705
CAGACTAGGATTTGACCTCCACATTTTATTTCTTCCCACTTACATGATTTATTTTATTTCTTTGCTAATCGGATGCTATGTCAGTGAAACCAAGC F3
ATCAATACTACCTCGGATCTTTTGTGACGGTTTTTATATAGTTAAGGATTTCCGGTTAGGAGACCTCAGACAGATTTCTGTTGTAATAAATTGAGGGACGT -505
CTGGTGAACCTAGGGCCTGTTTCACTTTTGATGCCATTTTCAATCTTACCAATTTTGTGTAAGTTGTCAAAAAAATGTGGCTACATTTAGTTTGTCTGCTA -405
AATTTTGGTAATATATAAGAAATCTGCCCCAAAATTTTGACAAAGTTATCAAAATTTGSCCACTATAAATTTGGTAATACCAAAATTTGGTAAGGTTTT -305
TTTTTTTCAIAAAGTGAATAGGGCTTGGTCCCTTTCTGAGCTAAACCGAGTCCAAATTCCAAAGCTCTCCCGACATGGCCCGCCACGATCAGTTTTCAGG -205
TGCCCGTGAGAAGATTCAGAAATGACCGTTCATGCGGATGGGGATGGTCAACACGACTCAAAAGGTATAGTAGGGCGCGGCTGCCACGAGACAGT F1
ACGTGGCCCATGCAACACGCGGTGGCGACACCTCTGCACTGATCAACTCCACTCCACTCACTCCCTCAGCTTAAATGCTTCGATCTCACTCCAG -5
ABRE RYE
TCTCCAGTGCCTCGTCTCGACACGTTTGCAATGTCAGCAGCTCATAAGTTTCTTCTCTGTTTCTGCTCCAGTGTCTAAGGCAGCACAGTCTGTTCTGTCGCC 96
+1
ATGCCAGGGTCAACCATCGGGACACCGTCCCCAACCTGGAGCTGGACTCCACCCAGGCAAGATCCCGATCCACGACTTCTGTCGGCGACACCTATGTCA 196
M P G L T I G D T V P N L E L D S T H G K I R I H D F V G D T Y V (33)
TCCTCTTCTCCACCCCGGtatatacacactacacactacgctcgattctcacattctcattcgtagtagttgtgtgtagatgtgcatccgatt 296
I L F S H P (39)
gattgattgaatgatccgtcgatcgatcag 326

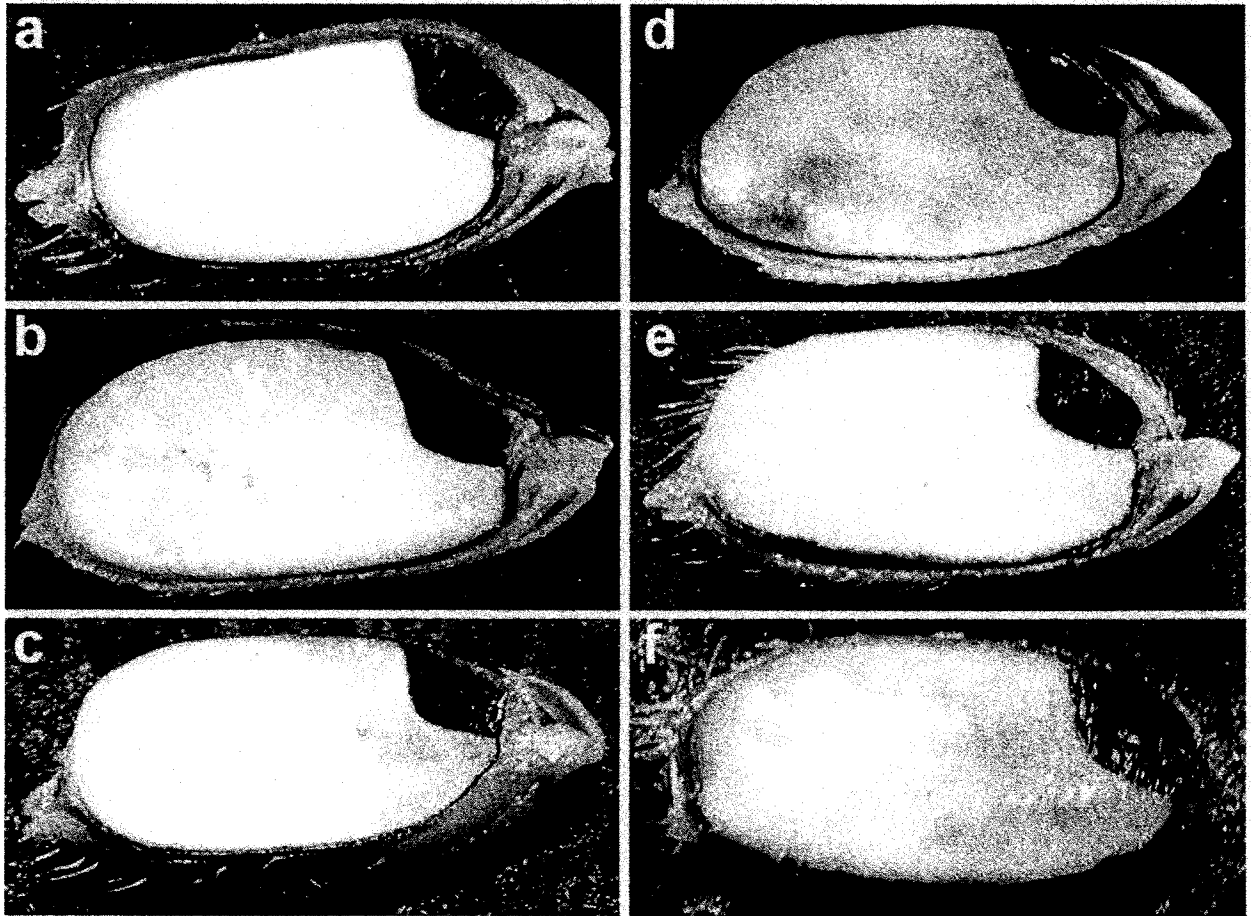
[Fig. 3]



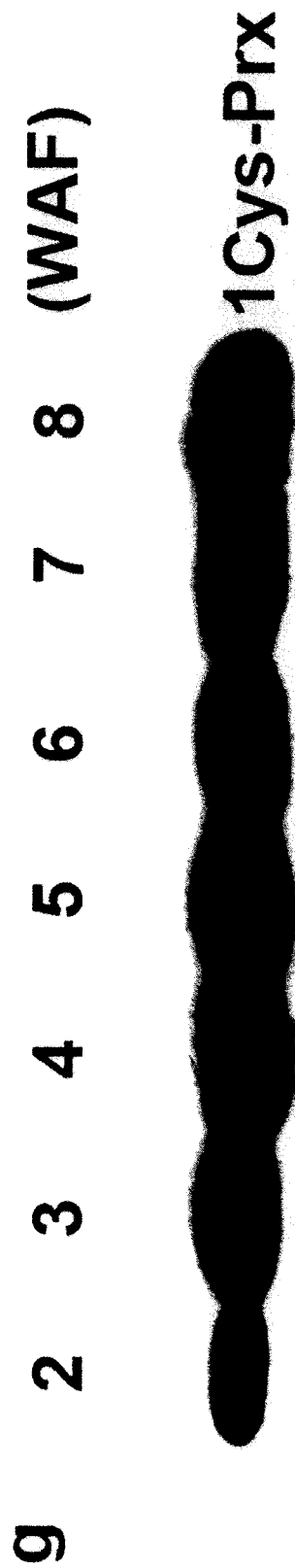
[Fig. 4]



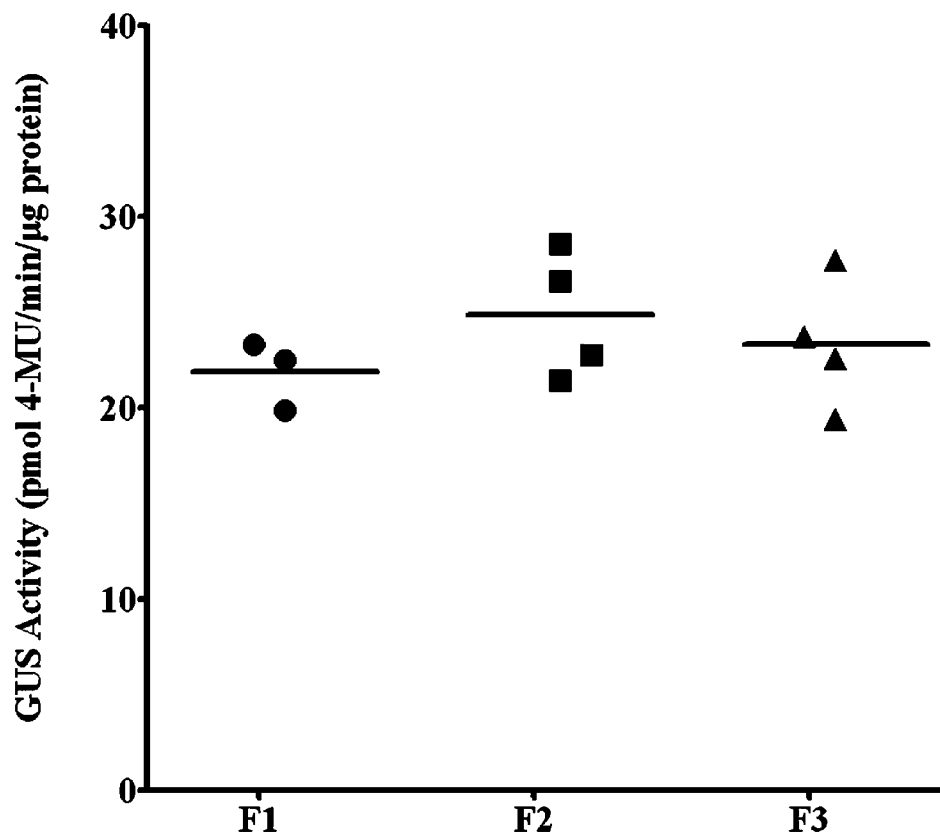
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]

