(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0007600
(43) 공개일자 2010년01월22일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0068301
(22) 출원일자 2008년07월14일
심사청구일자 2008년07월14일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
전종성
경기 안양시 동안구 평촌동 인덕원 대우 아파트 115동 1004호
조정일
경기도 용인시 기흥구 보라동 화성파크드림아파트 304동 502호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

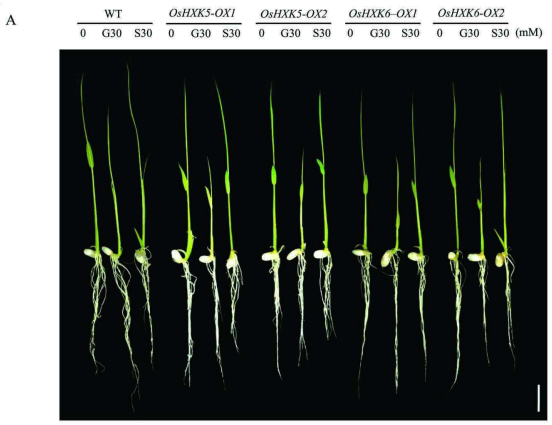
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 글루코스 센서로서 ＯｓＨＸＫ5 유전자의 용도

(57) 요 약

본 발명은 *OsHXK5* (Oryza sativa Hexokinase 5) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물체 및 이의 종자, 상기 유전자를 포함하는 식물체의 글루코스 감지용 조성물, 상기 유전자를 식물에 형질전환하여 식물에 따른 *OsHXK5* 유전자의 글루코스 감지 능력을 결정하는 방법 및 상기 유전자를 이용하여 식물의 성장을 조절하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도7a



(72) 발명자

류나연

경기 수원시 영통구 영통동 벽적골 9단지 롯데아파트 944동 506호

부성희

경기 용인시 기흥구 보라동 민속마을 쌍용아파트 109동 1003호

한태룡

경기 용인시 수지구 상현동 금호베스트빌 251동 1803호

특허청구의 범위

청구항 1

OsHXK5 (Oryza sativa Hexokinase 5) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *OsHXK5* 유전자는 글루코스 센서로서 이용되는 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 3

제1항에 있어서, 글루코스 함유 배지에서 성장이 저해되는 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 성장 저해는 광합성 관련 유전자 발현 억제를 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 5

제1항에 있어서, 애기장대 또는 벼인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 *OsHXK5* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 7

제1항에 따른 식물체의 종자.

청구항 8

OsHXK5 유전자를 포함하는 식물체의 글루코스 감지용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 *OsHXK5* 유전자는 미토콘드리아 및 핵에 대한 이중 타켓팅 능력을 갖고 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

OsHXK5 유전자를 식물에 형질전환하는 단계; 및

글루코스 함유 배지에서 식물의 성장 정도를 측정하는 단계를 포함하는 식물에 따른 *OsHXK5* 유전자의 글루코스 감지 능력 결정 방법.

청구항 11

OsHXK5 유전자를 식물에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물의 성장을 조절는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, *OsHXK5* 유전자를 식물에 형질전환하여 과발현하는 단계를 포함하는 글루코스 함유 배지에서 식물의 성장을 저해하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 글루코스 센서로서 OsHXK5 유전자의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 *OsHXK5* (Oryza sativa

Hexokinase 5) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물체 및 이의 종자, 상기 유전자를 포함하는 식물체의 글루코스 감지용 조성물, 상기 유전자를 식물에 형질전환하여 식물에 따른 *OsHXK5* 유전자의 글루코스 감지 능력을 결정하는 방법 및 상기 유전자를 이용하여 식물의 성장을 조절하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 고등 식물에서 당은 탄소 공급 및 에너지 대사를 위한 기초적인 원료로 이용될 뿐만 아니라, 발아에서 개화 및 노년기까지의 생장 주기 동안과 생물 및 비생물적 스트레스에 대한 방어 반응을 하는 동안의 생리적 과정을 조절하는 신호물질로 알려져 있다(Jang and Sheen (1994) Plant Cell 6: 1665-1679). 그러므로 정상의 식물 성장 및 발달을 유지하기 위해서 정밀한 당의 인지 및 신호전달 시스템은 많은 필수적인 대사 조절을 위해 중요하다.

<3> 광합성의 주요 산물 중 하나인 글루코스는 식물에서 많은 신호전달 경로를 조절하는 당 성분으로 가장 널리 알려져 있다(Koch KE (1996) Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 509-540). 단세포 미생물 효모에서, 헥소키나아제 ScHXK2, 글루코스 수송자 유사 단백질 Snf3 및 Rgt2, 그리고 G 단백질-결합 수용체 Gpr1와 같은 몇 개의 글루코스 센서는 세포 성장 및 유전자 발현을 조절하기 위해 세포의 내부 및 외부 글루코스 상태를 감지한다고 알려져 있다(Rolland et al. (2002) Sugar sensing and signaling in plants. 14: S185-205). 유사하게, 최근 식물 연구에서 내부 글루코스 센서로서 헥소키나아제 또는 외부 글루코스 센서로서 G 단백질-결합 수용체인 GPCR에 의해 매개된 당 감지 및 신호전달 시스템을 밝혔다(Rolland et al. (2001) Trends Biochem Sci 26: 310-317).

<4> 헥소오스를 인산화시켜 헥소오스 6-포스페이트를 만드는 헥소키나아제의 촉매 기능에 더하여, 식물에서 진화적으로 보존된 글루코스 센서로서 헥소키나아제 기능은 애기장대 헥소키나아제1(*AtHXK1*) 형질전환 식물체와 *glucose insensitive* (*gin2*) 돌연변이체의 생화학적, 유전학적, 및 분자적 연구로부터 중요하게 인식되어 왔다(Jang et al. (1997) Plant Cell 9: 5-19). *gin2* 돌연변이 라인에서 효소 활성이 제거된 *AtHXK1* 돌연변이 대립유전자를 발현하는 형질전환 식물체는 애기장대 식물체에서 AtHXK1의 효소활성과 당 인지 기능이 커플링되지 않는다는 강력한 증거를 제공하였다. 게다가, 프로테오믹스 및 효모 two hybrid 상호작용 실험은 핵에서 특이적 광합성 유전자의 발현을 직접적으로 조절하기 위하여 AtHXK1가 액포 H^+-ATPase B1 (VHA-B1) 및 프로테아좀 서브유닛(RPT5B)의 19S 조절 분자인 두 개의 파트너와 상호작용한다는 것을 보여주었고, AtHXK1와 VHA-B1 또는 RPT5B의 상호작용은 AtHXK1의 효소 활성을 필요로 하지 않는다는 것을 보여주었다. 토마토에서, *AtHXK1* 발현은 광합성 조직에서 당 인지 및 신호전달의 특징들인 광합성 감소, 성장 저해 및 빠른 노화의 유도를 야기한다고 알려져 있다. 애기장대 HXK1를 제외하고, 글루코스 센서로서 헥소키나아제의 기능은 다른 식물 종에서 입증된 바가 아직 없다.

<5> 헥소키나아제가 미토콘드리아, 엽록체, 골지체, 소포체, 액틴 필라멘트 및 원형질막과 같은 다양한 세포 기관과 연관이 있는 것으로 밝혀졌다(Schleucher et al. (1998) Plant Physiol 118: 1439-1445). 효모에서, 글루코스 센서 ScHXK2는 핵에서 뿐만 아니라 세포질에서 부분적으로 존재하며, N-말단 도메인에 핵 위치화 신호를 갖고 있는 것으로 밝혀졌다(Herrero et al. (1998) FEBS Lett 434: 71-76). 더욱이, ScHXK2의 핵 위치화는 *SUC2*, *HXK1* 및 *GLK1* 와 같은 몇 개의 유전자의 글루코스 억제에 필수적이다. 미토콘드리아와 많은 관련이 있는 AtHXK1의 일부는 핵에서 위치하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 글루코스-과잉 조건하에서 핵 AtHXK1은 그것의 기질과 결합하고, 목적 유전자의 발현 저해를 야기한다고 알려져 있다(Cho et al. (2006) Cell 127: 579-589).

<6> 본 발명자는 이전에 *OsHXK1*(*Oryza sativa Hexokinase 1*) 부터 *OsHXK10* 까지 10개의 벼 헥소키나아제를 분리하였고, 모든 *OsHXKs*은 헥소키나아제 활성을 갖고 있는 것을 확인하였다(Cho et al. (2006) Planta 224: 598-611). 또한, OsHXK4 및 OsHXK7가 엽록체 스트로마 및 세포질에 각각 존재하는 것을 확인하였다.

<7> 한국특허등록 제10-0660616호에는 남세균 글루코키나제를 이용한 식물의 생장과 발달 조절방법이 개시되어 있으나, 본 발명의 유전자와는 상이하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명자는 서열 유사성과 세포 내 위치를 기초로 하여 OsHXK5 및 OsHXK6의 벼 상동성 헥소키나아제를 동정하였고, 이 유전자들이 당 인지 및 신호전달 기능을 갖고 있는지 조사하기 위해, 옥수수 및 벼의 엽육 원형질체 및 형질전환 벼 식물체에서 OsHXK5 및 OsHXK6의 기능을 관

찰하였으며, 애기장대 *gin2-1* 돌연변이를 야생의 *OsHXK5, OsHXK6* 및 이 유전자들의 효소 활성이 제거된 대립유전자로 형질전환시켰고, 당 인지 및 신호전달 특성을 분석함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

<9> 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 *OsHXK5* (Oryza sativa Hexokinase 5) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

<10> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 식물체의 글루코스 감지용 조성물을 제공한다.

<11> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 식물에 형질전환하여 식물에 따른 *OsHXK5* 유전자의 글루코스 감지 능력을 결정하는 방법을 제공한다.

<12> 또한, 본 발명은 상기 유전자를 이용하여 식물의 성장을 조절하는 방법을 제공한다.

효 과

<13> 본 발명에 따르면, 본 발명의 *OsHXK5* 유전자는 미토콘드리아 및 핵에 대한 이중 타켓팅 능력을 갖고 있으며, 또한 식물에서 글루코스 센서로서 역할을 할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<14> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *OsHXK5* (Oryza sativa Hexokinase 5) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

<15> 상기 형질전환된 식물체에 포함되는 *OsHXK5* 유전자는 글루코스 센서로서 이용될 수 있다. 즉, 식물체 내의 글루코스 함량에 따라 식물의 성장이 조절될 수 있는 것이다.

<16> 상기 식물체는 글루코스 함유 배지에서 성장이 저해될 수 있으며, 상기 성장 저해는 광합성 관련 유전자 발현 억제를 통해 이루어질 수 있다. 광합성 관련 유전자는 예를 들면, *RbcS*, 엽록소 a/b 결합 단백질 2 (*CAB2*), 세도헵툴로스-비스포스페이트(sedoheptulose-biphosphatase, *SBP*), 탄산 탈수 효소(carbonic anhydrase, *CAA*) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

<17> 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로써 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

<18> 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

<19> 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

<20> 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자,

카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<21> 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

<22> 상기 터미네이터는, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

<23> 본 발명에 따른 상기 식물체는 벼, 보리, 옥수수, 밀, 호밀, 귀리, 잔디, 마초, 기장, 사탕수수, 라이그래스, 오차드그래스 등의 단자엽 식물 또는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 또는 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있으나, 바람직하게는 애기장대 또는 벼이다.

<24> 본 발명에 따른 헥소키나제 유전자는 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 변이체는 염기 서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, 헥소키나제 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.

<25> 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

<26> 본 발명은 또한, 상기 식물체의 종자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 종자는 애기장대 또는 벼의 종자이다.

<27> 본 발명은 또한, *OsHXK5* 유전자를 포함하는 식물체의 글루코스 감지용 조성물을 제공한다. *OsHXK5* 유전자는 식물체에서 글루코스 센서로서 역할을 수행하므로 식물체 내의 글루코스를 감지할 수 있는 것이다. 상기 *OsHXK5* 유전자는 바람직하게는 서열번호 1의 염기 서열로 이루어질 수 있다. 상기 식물체는 바람직하게는 벼이다. *OsHXK5* 유전자는 미토콘드리아 및 핵에 대한 이중 타켓팅 능력을 갖고 있는 것을 특징으로 한다 (도 1 및 도 2 참고).

<28> 본 발명은 또한, *OsHXK5* 유전자를 식물에 형질전환하는 단계; 및

<29> 글루코스 함유 배지에서 식물의 성장 정도를 측정하는 단계를 포함하는 식물에 따른 *OsHXK5* 유전자의 글루코스 감지 능력 결정 방법을 제공한다.

<30> 본 발명의 식물에 따른 *OsHXK5* 유전자의 글루코스 감지 능력 결정 방법은 먼저 *OsHXK5* 유전자를 식물에 형질전환하는 단계를 포함한다.

<31> 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 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 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움

매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

<32> 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다. 바람직하게는, 상기 식물체는 벼이다.

<33> "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

<34> 본 발명의 식물에 따른 *OsHXK5* 유전자의 글루코스 감지 능력 결정 방법은 글루코스 함유 배지에서 식물의 성장 정도를 측정하는 단계를 포함한다. 식물의 성장 정도는 예를 들면, 신초의 길이 등을 측정함으로써 판단할 수 있으며, 대조구에 대한 형질전환체의 신초의 길이를 비교함으로써 식물에 따른 *OsHXK5* 유전자의 글루코스 감지 능력을 결정할 수 있다. 즉, 형질전환 식물체의 대조구와 대비한 신초의 길이 변화가 크면 *OsHXK5* 유전자의 글루코스 감지 능력은 크다고 판단할 수 있는 것이다.

<35> 본 발명은 또한, *OsHXK5* 유전자를 식물에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물의 성장을 조절하는 방법을 제공한다. *OsHXK5* 유전자는 글루코스 센서로서 역할을 수행하므로, 글루코스 처리에 따라 식물의 성장을 조절할 수 있는 것이다. 본 발명의 일 구현예에 따른 방법은 *OsHXK5* 유전자를 식물에 형질전환하여 과발현하는 단계를 포함하는 글루코스 함유 배지에서 식물의 성장을 저해하는 방법을 제공한다. *OsHXK5* 유전자로 형질전환된 식물체는 글루코스 함유 배지에서 식물의 성장을 현저하게 저해한다 (도 7 참고). 상기 식물의 성장 저해는 엷은 황색 잎 및 감소된 식물의 길이와 같은 표현형으로 나타난다.

<36> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<37> **실시예**

<38> **재료 및 방법**

<39> **식물 재료 및 성장**

<40> ABRC(Ohio State University, Columbus, OH; www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/)에 의해 제공된 애기장대 야생형(L*er* ecotype) 및 *gin2-1* 식물체와 형질전환 식물체는 22℃에서 16h 명/8 h 암인 광주기로 토양에서 키웠다. 야생형 벼(*Orysa sativa* L. cv. Dongjin) 및 형질전환 식물체는 몇 세대 동안 14h 명/10h 암 주기로 낮에는 30℃이고, 밤에는 20℃인 온실에서 키웠다. 원형질체 분리를 위해, 야생형 옥수수(*Zea mays* L. cv. Yeonnong) 및 벼 식물체는 각각 7일 및 8~10일 동안 25℃에서 암조건인 성장챔버에서 키운 후 어린 잎을 사용하였다.

<41> **벡터 구축**

<42> OsHXK5 및 OsHXK6의 세포내 위치를 조사하기 위해, 종결코돈 및 3'-UTR을 포함하는 각각의 총 길이 cDNA 절편을 *Xba*I 및 *Xho*I 자리를 첨가하여 증폭시킨 후 pJJ1450 벡터의 *CaMV35S* 프로모터 및 *sGFP* (Chiu et al. (1996) Curr Biol 6: 325-330) 사이에 클로닝하였다. *OsHXK5ΔmTP* (아미노산 25-507, GenBank no.DQ116387) 및 *OsHXK6ΔmTP* (아미노산 29-506, GenBank no. DQ116388)은 그것의 N-말단에 있는 미토콘드리아 타켓팅 신호를 결핍시켜 제조하였고 pJJ1450 벡터에 서브클론 하였다. PCR 증폭을 위해 사용한 프라이머 쌍은 다음과 같다. *OsHXK5*은 5'-GCTCTAGAAGGGAAGGCGGAGCAGCGGTG-3'(서열번호 2) 및 5'-CCCTCGAGAGTCGATCTCGGCATACTGGGA-3'(서열번호 3), *OsHXK6*은 5'-GCTCTAGAGGAAGGAGGAGGAGTAGGACGC-3'(서열번호 4) 및 5'-CCCTCGAGACTCGACGCTAGCATACTGGGA-3'(서열번호 5), *OsHXK5ΔmTP*은 5'-GCTCTAGAATGCGGAGGCGGAGGAGGAGGGAC-3'(서열번호 6) 및 *OsHXK5*의 역방향 프라이머, *OsHXK6ΔmTP*은 5'-GCTCTAGAATGCGGAGGAGGAGGAGCAAGCGG-3'(서열번호 7) 및 *OsHXK6*의 역방향 프라이머를 사용하였다.

<43> 애기장대 및 벼에서 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*을 각각 과발현시키기 위해, cDNAs는 pPZP2Ha3(+) 벡터를 사용하여 *CaMV35S* 프로모터의 조절하에 위치시켰다. *OsHXK5* 및 *OsHXK6*의 효소 활성이 제거된 돌연변이체를 제작하기 위해 ATP 결합 자리에서 보존된 Gly(G)와 포스포릴 전달 자리의 Ser(S)은 PCR-매개 표적화된 돌연변이 유발(PCR-mediated targeted mutagenesis)에 의해 각각 Asp(D) 및 Ala(A)으로 변경시켰다. PCR 증폭을 위해 사용한 프라

이머 쌍은 다음과 같다. *OsHXK5-G113D*은 5'-GGAAGTTGGTGTCTCCAAGATCCAATGCAT-3'(서열번호 8) 및 5'-GATCTTGGAGACACCAACTTCCGCGTCCTG-3'(서열번호 9), *OsHXK5-S186A*은 5'-CACTGGGAAGGCAAAGGTGAAGCCCAGCTC-3'(서열번호 10) 및 5'-GCTTCACCTTTGCCTTCCCAGTGAGCCAGA-3'(서열번호 11), *OsHXK6-G112D*은 5'-GGAAATTGGTGTCCCCAAGATCGAGAGCAT-3'(서열번호 12) 및 5'-CGATCTTGGGGACACCAATTTCCGTGTTAT-3'(서열번호 13), *OsHXK6-S185A*은 5'-CACTGGGAAAGCAAAGGTGAAGCCTAACTC-3'(서열번호 14) 및 5'-GCTTCACCTTTGCTTTCCCAGTGCACCAAA-3'(서열번호 15) 을 사용하였다. *Xba*I 및 *Xho*I으로 절단한 증폭된 돌연변이 대립유전자는 pPZP2Ha3(+) 벡터로 클로닝하였고, 생성된 구축물은 *OsHXK5-G113D*, *OsHXK5-S186A*, *OsHXK6-G112D* 및 *OsHXK6-S185A*라 명명하였다.

<44> 일시적인 유전자 발현 분석을 위한 작동 벡터를 구축하기 위해, 벼 헥소키나아제의 *OsHXK5*, *OsHXK6* 및 이 유전자들의 효소 활성이 제거된 돌연변이 대립 유전자는 pJJ1549 벡터의 *CaMV35S* 프로모터의 조절하에 위치시켰다. 리포터 벡터를 구축하기 위해, *RAmy3D* 의 프로모터는 5'-CGGGATCCGATCTTCAACCACCTGTGCTAGCT-3'(서열번호 16) 및 5'-TGCCATGGATCTGTGTAAGCTGAAACCGTGTT-3'(서열번호 17)인 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였다. *Bam*HI 및 *Nco*I으로 절단시킨 증폭 산물은 *OsRAmy3D*::*LUC*을 제조하기 위해 반딧불이 *LUC* 유전자에 연결시켰다. *ZmRbcS*::*CAT*로부터 유도된 옥수수 *RbcS* 프로모터::*LUC* 구축물 (*ZmRbcS*::*LUC*)은 추가적인 리포터 분자로서 사용되었다. 내부 대조구 리포터 구축물인 *ZmUBQ*::*GUS* 를 생성하기 위해 *Hin*dIII 및 *Bam*HI으로 절단된 pGA1611 바이너리 벡터로부터 유도된 옥수수 유비퀴틴 프로모터는 노팔린 합성효소 유전자의 터미네이터와 연결된 β-글루쿠로니다제(*GUS*) 유전자에 연결시켰다. *OsHXK-Myc* 융합 구축물은 *OsHXK5*, *OsHXK6* 및 돌연변이 대립유전자의 C-말단에 Myc 서열을 연결시켜 제조하였다.

<45> *OsHXK5*, *OsHXK6* 및 이들 유전자의 효소 활성이 제거된 돌연변이 대립유전자의 총 길이 cDNAs는 PCR로 *Xba*I 및 *Xho*I 자리를 첨가하여 증폭시켰고, 효모 셔틀 벡터 pDR196의 *Spe*I 및 *Xho*I 자리로 서브클로닝하였다(Wipf et al. (2003) Genome 46: 177-181).

<46> **OsHXK-GFP 단백질의 세포내 위치**

<47> *GFP* 융합 구축물은 폴리에틸렌 글리콜(PEG)-칼슘 매개 방법(Hwang and Sheen (2001) Nature 413: 383-389)을 사용하여 옥수수 및 애기장대 엽육 원형질체에 전달시켰고, 일시적인 발현을 하도록 12-24시간 동안 배양하였다. 미토콘드리아는 MitoTracker Orange CMTMRos (Molecular probes)로 염색하여 관찰하였고, 핵은 Cyto 염색액(Molecular probes)으로 염색하여 관찰하였다.

<48> 엽록소 자가형광은 엽록체 마커로 사용되었다. 이러한 융합 구축물의 발현은 공초점 현미경(LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 관찰하였다.

<49> **효모 상보성 분석**

<50> 헥소키나아제-결핍 효모 삼중 돌연변이체 YSH7.4-3C(*hxk1*, *hxk2*, *glk1*; De Winde et al. (1996) Eur J Biochem 241: 633-643)은 *OsHXK5*, *OsHXK6* 및 이들 유전자의 효소 활성이 제거된 돌연변이 대립유전자의 총길이 cDNAs를 이용한 형질전환에 이용하였다. 효모 상보성 분석 방법은 이전에 기재되었다(Cho et al. (2006) Planta 224: 598-611).

<51> **옥수수 및 벼 엽육 원형질체를 이용한 일시적인 발현분석**

<52> 옥수수 엽육 원형질체(1~2 x 10^5 세포/시료)는 Sheen (2001)의 방법(Plant Physiol 127: 1466-1475)에 따라 황화된 식물의 두 번째 잎으로부터 분리하였다(http::://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb). 벼 원형질체(3~6x10^5 세포/시료)는 변형된 Chen 등 (2006)의 방법(Mol Plant Pathol 7: 417-427)으로 황화된 잎으로부터 분리하였다. 일시적인 발현분석을 위해서 분리된 원형질체는 PEG-칼슘 매개 방법(Hwang and Sheen (2001) Nature 413: 383-389)으로 글루코스 반응성 리포터 구축물 및 작동 구축물로 동시에 트랜스펙션시켰다. *ZmUBQ*::*GUS*은 내부 대조구로 각각의 시료에 포함시켰고 글루코스 처리에 의해 영향을 받지 않았다. 트랜스펙션된 원형질체는 0.5 mM 또는 5 mM 글루코스로 6시간동안 배양시킨 다음 수확하였다. 수확된 원형질체는 용균 버퍼로 현탁하고 LUC 및 GUS 분석에 이용하였다. LUC 분석은 LUC 분석 시스템(Promega)을 이용하여 수행하였고, GUS 분석은 앞서 기재한 방법으로 수행하였다(Jefferson (1987) EMBO J 20: 3901-3907). LUC 및 GUS 활성으로 생성되는 형광은 VICTOR2 1420 multilabel counter (PerkinElmer life sciences)로 측정하였다. 각각의 시료에서, 측정된 LUC 활성은 실험조건에서 변이 데이터 평준화를 위해 GUS 활성으로 나누었고, 모든 일시적인 발현 실험은 같은 결과로 3번 반복하였다. *OsHXK5, OsHXK6* 또는 이 유전자들의 효소 활성이 제거된 돌연변이 대립유전자로 트랜스펙션된 옥수수 원형질체에서 작동 단백질의 발현은 항-Myc 항체(Upstate, Clone A46)를 이용하여 단백질-블럿 분석

으로 확인하였다.

<53> **애기장대 형질전환**

<54> *OsHXK5, OsHXK6* 및 이 유전자들의 효소 활성이 제거된 돌연변이 대립유전자를 과발현하는 형질전환 식물체를 제조하기 위해, 각각의 벡터 구축물을 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스 GV3101 균주를 25 mg/L 카나마이신이 포함된 LB 액체 배지에서 28℃에서 250rpm으로 정지기까지 배양하였고, *gin2-1* 식물체는 앞서 기재한 플로랄 딥 방법(Clough and Bent (1998) Plant J 16: 735-743)으로 형질전환 시켰다. 모든 형질전환 식물은 25 mg/L 하이그로마이신을 포함하는 Gamborg B5 배지에서 선별하였다.

<55> **벼 형질전환**

<56> *OsHXK5* 및 *OsHXK6*를 과발현하는 형질전환 벼를 제조하기 위해, 각각의 벡터 구축물을 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스 LBA4404 균주를 25 mg/L 카나마이신이 포함된 AB 배지에서 28℃에서 3일 동안 배양하였다. 벼 형질전환은 앞서 기재한 아그로박테리움-매개인 공동배양 방법(Jeon et al. (2000) Plant J 22: 561-570)으로 수행하였다. 형질전환 벼 식물체는 50 mg/L 하이그로마이신 및 250 mg/L 세포탁심을 포함하는 선별 배지에서 형질전환 캘러스로부터 재분화시켰다. *OsHXK5* 또는 *OsHXK6*를 갖는 동형접합의 형질전환 벼 식물체를 제조하기 위해 형질전환 식물체는 여러 세대에 걸쳐 온실에서 키웠다.

<57> **글루코스 억제 분석**

<58> 애기장대에서 글루코스 억제 분석을 위해, 유묘를 6% 글루코스 또는 만니톨이 포함된 1/2 MS 배지에서 6일동안 키웠다. 성장 표현형을 조사하기 위해, *OsHXK5, OsHXK6* 또는 이 유전자들의 효소 활성이 제거된 돌연변이 대립유전자를 발현하는 형질전환체는 낮은 광조건(70 $\mu molm^{-2}s^{-1}$) 및 높은 광조건(240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$)에 18일 동안 토양에서 키웠다.

<59> 벼에서, 야생형 및 형질전환 벼 식물체의 외피가 벗겨진 종자는 70% EtOH에서 10분 및 0.8% NaOCl에서 각각 30분동안 멸균시킨 후, 멸균된 증류수로 세정하였다. 표면-살균된 종자는 글루코스가 없거나, 30 mM 글루코스 및 30 mM 소르비톨이 각각 포함된 워터 아가 배지에서 발아시켰다. 멸균된 종자의 침윤을 위해, 페트리 디쉬를 37℃에서 암조건으로 24시간 동안 위치한 후, 25℃에서 7~10일 동안 일정한 명조건하에 성장 챔버에 위치하였다. 질소원에 의한 당 신호전달 반응의 간섭을 배제하기 위해 MS 배지 대신 워터 아가 배지를 사용하였다. *RbcS* 유전자의 저해를 조사하기 위해, 유묘의 두 번째 및 세 번째 잎에서 RNA를 분리하였다.

<60> **RNA 분리 및 PCR 분석**

<61> 총 RNA는 트리졸 시약을 이용하여 유묘로부터 분리하였고, RT-PCR을 위해 올리고-dT 프라이머와 First-Strand cDNA 합성 키트(Roche)를 이용하여 역전사하였다. 애기장대 식물체에서, PCR은 다음과 같은 프라이머를 사용하여 Moore 등 (2003) 방법(Science 300: 332-336)으로 수행하였다. *CAB* (At3g27690)는 5'-ATGGCCACTTCAGCAATCCAA-3'(서열번호 18) 및 5'-CACAACTTGACACGCCCATAT-3'(서열번호 19), *SBP* (At3g55800)은 5'-ATGGAGACCAGCATCGCGTG-3'(서열번호 20) 및 5'-CTTCCACTGGACCTCCCAT-3'(서열번호 21), *CAA* (At5g14740)는 5'-TGAATACGCTGTCTTGCACC-3'(서열번호 22) 및 5'-TGTGATGGTGGTGGTAGCGA-3'(서열번호 23), 내부적 대조구로서 *ubiquitin4* (*UBQ*, At5g20620)은 5'-GTGGTGCTAAGAAGAGGAAGA-3'(서열번호 24) 및 5'-TCAAGCTTCAACTTCTTCTTT-3'(서열번호 25)인 프라이머를 사용하였다.

<62> 정량적 실시간 PCR을 위해, 유전자 특이적 PCR 프라이머 및 TaqMan 분석을 위한 형광 프로브는 Assays-by-Design Service (Applied Biosystems, Forester City, CA)로 디자인하였다. 유전자 발현은 TaqMan Universal PCR Master Mix 및 ABI PRISM 7000 서열 검출기(Applied Biosystems)를 이용하여 제조사의 지시대로 분석하였다. 벼 식물체의 분석을 위해 유전자 특이적 프라이머 및 정량적 실시간 PCR에 사용된 프로브는 다음과 같다. *RbcS*은 RbcS-정방향 5'-AGCAATGGCGGCAGGAT-3'(서열번호 26), RbcS-역방향 5'-GAACTTCTTGATGCCCTCAATCG-3'(서열번호 27) 및 RbcS-프로브 FAM-CACACCTGCATGCACC-NFQ(서열번호 28)를 사용하였고, *ubiquitin5* (*UBQ5*)은 UBQ5-정방향 5'-CCGCCTCCGCAAGGA-3'(서열번호 29), UBQ5-역방향 5'-AAGTGGTTGGCCATGAAGGT-3'(서열번호 30) 및 UBQ5-프로브 FAM-CCAACGCCGAGTGCG-NFQ(서열번호 31)를 사용하였다. *UBQ5* 유전자 발현은 실시간 PCR 결과를 평준화하는데 사용하였다(Jain et al. (2006) Biochem Biophys Res Commun 342: 645-651).

<63> **실시예 1: 애기장대 글루코스 센서 *AtHXK1*와 동등한 벼 헥소키나아제의 동정**

<64> 미토콘드리아와 주로 연관이 있다고 잘 알려진 글루코스 센서 AtHXK1은 핵에서 어느 정도 검출이 가능한 것으로

알려져 있고, 글루코스와 결합하고 전사적 저해자로서 그들의 파트너와 함께 작용한다고 알려졌다. *AtHXK1*의 벼 상동성 헥소키나아제를 분리하기 위해, 미토콘드리아 타켓팅 펩티드를 포함하는 N-말단 프리 시퀀스의 존재를 결정하기 위해서는 TargetP 프로그램(Emanuelsson et al. (2000) J Mol Biol 300: 1005-1016; http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP)을 이용하고, 핵 위치화 신호를 결정하기 위해 predictNLS 프로그램(Cokol et al. (2000) EMBO Rep 1: 411-415; http://cubic.bioc.columbia.edu/services/predictNLS)을 이용하여 OsHXKs의 세포내 위치를 예상하였다. 10개의 OsHXKs중에서, OsHXK5 및 OsHXK6은 예상되는 N-말단 미토콘드리아 타켓팅 펩티드인 OsHXK5에 대해 1MGKAAAVGTAVVVAAAVGVAVVLA24(서열번호 32) 및 OsHXK6에 대해 1MGKGTVVGTAVVVCAAAAAAVGVAVVVS28(서열번호 33)이 가장 높은 신뢰도 클라스 값 1로 분석 결과 얻어졌다. 또한 2가지 단백질은 N-말단 도메인 내에 예상되는 핵 위치화 신호인 OsHXK5에 대해 25RRRRR29(서열번호 34) 또는 28RRRDLELVEGAAAERKRK45(서열번호 35)를 보유하고, OsHXK6에 대해 29RRRRSKREAEEERRRR44(서열번호 36)을 보유하는 것을 나타내었다. 앞서 벼 HXKs의 계통 발생 분석과 함께, 이러한 사실은 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*이 애기장대 글루코스 센서 *AtHXK1*와 진화적으로 밀접하게 연관이 있는 것을 암시한다.

<65> AtHXK1에 대한 두 개의 벼 상동성 단백질의 세포내 위치를 결정하기 위해, CaMV35S 프로모터 조절하에 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*의 *GFP* 융합체를 제조하였다. 세포 내 위치 실험은 MitoTracker로 공동위치 실험으로 확인한 결과 OsHXK5-GFP 및 OsHXK6-GFP 융합 단백질의 신호는 옥수수 원형질체의 미토콘드리아(도 1)와 애기장대 원형질체의 미토콘드리아(데이타 미제시)에서 주로 관찰되었고, 이것은 두 개의 헥소키나아제가 미토콘드리아와 연관이 있다는 것을 의미한다. 두 개의 OsHXKs가 미토콘드리아와 핵에 이중 타켓팅 능력을 갖는지 조사하기 위해, 본 발명자는 예상되는 N-말단 미토콘드리아 타켓팅 펩티드 서열을 제거하고 *GFP*에 연결시켜 OsHXK 돌연변이인 OsHXK5 ΔmTP 및 OsHXK6ΔmTP를 제조하였다. 흥미롭게도 OsHXK5ΔmTP-GFP 및 OsHXK6ΔmTP-GFP의 신호는 Cyto 염색으로 공동 위치 연구로 확인한 결과 미토콘드리아에서는 관찰되지 않았고 핵과 세포질에서 관찰되었다(도 2). 상기 결과는 OsHXKs가 미토콘드리아에 타겟팅되고, 또한 핵으로도 타켓팅될 수 있는 가능성을 제시하고, *OsHXK5* 및 *OsHXK6*은 애기장대 글루코스 센서 *AtHXK1*의 동등물이라는 가능성을 높여준다.

<66> **실시예 2: 옥수수 및 벼의 엽육 원형질체에서 *OsHXK5*, *OsHXK6* 및 이 유전자들의 돌연변이 대립유전자의 발현**

<67> AtHXK1의 당 인지 및 신호전달 기능은 그것의 글루코스 인산화 활성에 의존하지 않는 것으로 나타났다(Moore et al. (2003) Science 300: 332-336). 글루코스 인산화 효소 활성으로부터 당 인지 및 신호전달에 대한 그들의 능력을 알아보기 위해서, 벼 글루코스 센서에 대한 후보인 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*의 효소 활성이 제거된 돌연변이체를 제조하기 위해 표적화된 돌연변이유발 실험을 수행하였다. 돌연변이 대립유전자에서, ATP 결합을 제거하기 위해 ATP-결합 자리의 인산 1 도메인에 보존된 Gly(G)과 포스포릴 전달을 막기 위해 당-결합 도메인에서 보존된 Ser(S)을 Asp(D) 및 Ala(A)으로 각각 변경시켰다(Kraakman et al. (1999) Biochem J 343 Pt 1: 159-168). 이러한 돌연변이 대립유전자는 그들의 돌연변이 자리에 따라서 *OsHXK5-G113D*, *OsHXK5-S186A*, *OsHXK6-G112D*, 및 *OsHXK6-S185A*로 명명하였다(도 3A). 그들의 효소 활성이 돌연변이 대립유전자에서 소멸되었는지 확인하기 위해, 내생의 헥소키나제 활성이 결핍된 효모 삼중 돌연변이체인 YSH7.4-3C (*hxk1*, *hxk2*, *glk1*)에서 각각의 cDNA 클론이 상보적 기능이 있는지 테스트하였다. *OsHXK5* 및 *OsHXK6*의 야생형 cDNA로 형질전환된 효모 세포가 선별 배지에서 자랄 수 있는 반면에, *OsHXK* 돌연변이 대립유전자 또는 빈 pDR196 벡터로 형질전환된 효모 세포는 유일한 탄소원으로 글루코스를 포함하는 선별 배지에서 자라지 못했다(도 3B). 이것은 돌연변이 OsHXKs의 효소 활성이 결핍되었다는 것을 말해준다.

<68> 본 발명자는 옥수수와 벼의 엽육 원형질체에서 글루코스 억제 분석을 이용하여(Sheen, 2001), 두 개의 *OsHXKs*와 이 유전자의 효소 활성이 제거된 대립유전자가 단자엽 식물종에서 글루코스 감지 및 신호전달 기능을 보유하고 있는지를 테스트하였다. 본 발명에서, 글루코스 억제성 유전자로 잘 알려진 옥수수 리불로스-1,6-비스포스페이트 카르복실라제의 작은 서브유닛 유전자(*ZmRbcS*)의 프로모터 뒤에 리포터 유전자 루시퍼라제(*LUC*)를 연결시켜 리포터 구축물을 제작하였다. α-아밀라제를 코딩하는 벼 *amy3D* (*RAmy3D*) 유전자의 발현은 글루코스 처리에 반응하여 빠르게 억제된다는 것이 알려져 있다 (Yu et al. (1996) Plant Mol Biol 30: 1277-1289). 따라서, 추가적인 리포터 구축물로서 *RAmy3D 프로모터::LUC* 융합물을 제작하였다. 우선, 높은 글루코스 처리(5 mM)는 옥수수 및 벼의 엽육 원형질체에서 *ZmRbcS* 또는 *RAmy3D* 프로모터에 연결된 리포터 유전자 발현을 감소시킨 반면, 낮은 글루코스 처리(0.5 mM)에서는 감소시키지 않았는데 (도 4 A 및 B), 이는 엽육 원형질체를 이용한 일시적 유전자 발현 분석이 당 감지 및 신호전달의 분석에 효과적이라는 이전의 실험을 지지한다(Sheen (2001) Plant Physiol 127: 1466-1475). 다음으로, *OsHXK5* 또는 *OsHXK6*의 발현은 0.5 mM 글루코스에 반응하여 *ZmRbcS* 또는 *RAmy3D* 프로모터에 의해 유도된 *LUC* 발현을 급격하게 감소시켰는데 (도 4, A 및 B), 이는 옥수수 및 벼의 엽육 원형질체에서 이러한 유전자의 글루코스-의존적 억제가 증가하였다는 것을 나타낸다. 더욱이, *OsHXK5* 및 *OsHXK6*에 대한

효소 활성이 제거된 *OsHXK* 대립유전자의 발현은 글루코스 처리에 반응하여 리포터 유전자의 발현을 억제시켰다(도 4, A 및 B). *CaMV35S::OsHXK-Myc* 융합 구축물을 이용한 단백질 젤-블럿 분석은 OsHXK5, OsHXK6 및 이의 돌연변이 대립유전자가 엽육 원형질체에서 유사한 수준으로 발현되는 것을 나타낸다(도 4C). 게다가, 이러한 Myc 융합 구축물은 *ZmRbcS* 또는 *RAmy3D* 프로모터에 의해 글루코스-의존적 *LUC* 발현에서 거의 동일한 발현 억제 효과를 나태내는 것으로 밝혀졌다(데이타 미제시). 이러한 결과는 옥수수 및 벼에서 OsHXK5 및 OsHXK6 이 보존된 글루코스 센서로 기능한다는 것을 강하게 암시한다.

<69> **실시예 3: OsHXK5, OsHXK6, 또는 이의 돌연변이 대립유전자를 발현하는 형질전환 *gin2-1* 식물체의 분석**

<70> 글루코스 센서로서 두 개의 벼 헥소키나아제 이성질형인 OsHXK5 및 OsHXK6의 가능한 역할을 조사하기 위해, 본 발명에서는 이런 *OsHXKs*이 애기장대 *glucose insensitive2-1* (*gin2-1*)을 보완할 수 있는지 조사하였다. *OsHXK5, OsHXK6*와 효소적 불활성 돌연변이 대립유전자인 *OsHXK5-G113D, OsHXK5-S186A, OsHXK6-G112D* 및 *OsHXK6-S185A*을 발현시키기 위해, CaMV35S 프로모터 조절하에 유전자들의 cDNA를 위치시켰다. 생성된 구축물들은 플로랄-딥 방법으로 *gin2-1* 돌연변이체 내로 형질전환시켰다. 각 구축물에 대해 10개 이상의 독립적인 형질전환 식물체를 하이그로마이신 저항성 배지에서 선별하였다. 형질전환 식물체에서 형질전환 유전자의 발현 정도는 RNA 젤-블럿 분석으로 측정하였다(데이타 미제시).

<71> 상기 *OsHXK5, OsHXK6* 및 이의 돌연변이 대립유전자가 *gin2-1* 배경에서 글루코스-민감성 반응을 회복하는지를 알아보기 위해, *OsHXKs*을 갖는 모든 선별된 형질전환 *gin2-1* 식물체의 자손을 높은 글루코스 (6%)를 포함하는 1/2 MS 배지에 심었다. 임의의 OsHXKs 를 갖는 형질전환 식물체의 성장은 짧은 길이의 배축 및 안토시아닌 축적으로 6% 글루코스에 반응하여 급격하게 억제된다는 것을 나타내었다(도 5). 테스트한 모든 형질전환 식물은 6% 만니톨의 처리에 반응하여 어떤 차이점도 나타내지 않았다. 이것은 *OsHXK5, OsHXK6* 또는 이의 돌연변이 대립유전자를 발현하는 형질전환 *gin2-1* 식물체에서 높은 글루코스 효과가 삼투 스트레스에 기인하지 않는 것을 의미한다.

<72> 글루코스 센서 *AtHXK1*은 높은 글루코스 처리에 반응하여 *RbcS*, 엽록소 a/b 결합 단백질 2 (*CAB2*), 세도헵툴로스-비스포스페이트(sedoheptulose-biphosphatase, *SBP*) 및 탄산 탈수 효소(carbonic anhydrase, *CAA*)와 같은 글루코스-의존적 유전자 발현을 억제한다고 널리 알려져 있다. 유사한 방법으로 벼 *OsHXKs*가 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는지 조사하기 위해, 형질전환 *gin2-1* 식물체에서 *CAB*, *SBP* 및 *CAA* 유전자의 mRNA 발현량을 조사하였다(도 5). 결과는 야생형 및 *OsHXK5, OsHXK6* 또는 이의 돌연변이 대립유전자를 발현하는 형질전환 식물체는 광합성 유전자 발현을 현저하게 억제하는 것을 나타내었다. 대조적으로, *gin2-1*은 글루코스-의존적 유전자 발현을 억제시키지 않았다. 이러한 결과는 이 유전자들 중 어떤 유전자도 *gin2-1* 배경에서 글루코스-의존적 유전자 발현을 회복시킨다는 것을 의미한다.

<73> 높은 광조건에서 성장 결핍 표현형이 관찰됨으로써 AtHXK1은 성장 증진의 기능을 갖고 있는 것으로 관찰되었다. 벼 헥소키나아제의 과발현이 *gin2-1*의 성장 결핍 표현형을 보완할 수 있는지 조사하기 위해, *OsHXK5, OsHXK6* 또는 이의 돌연변이 대립유전자를 발현하는 형질전환 *gin2-1* 식물체를 낮은 광조건(70 $\mu molm^{-2}s^{-1}$) 및 높은 광조건(240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$) 하에서 키웠다. 낮은 광조건 하에서 야생형, *gin2-1* 및 형질전환 식물체는 그들의 성장에 있어서 중요한 차이점을 보이지 않았다(도 6). 대조적으로, 높은 광조건에서 *gin2-1* 식물체가 심각한 성장 결핍 표현형을 보인 반면, *OsHXK5, OsHXK6* 및 이의 돌연변이 대립유전자를 발현하는 형질전환 식물체는 야생형 식물체만큼 식물성장 및 잎 팽창을 회복할 수 있었다 (도 6). 이것은 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*이 애기장대에서 성장의 증진에 있어서 *AtHXK1*의 기능을 대체할 수 있다는 것을 보여준다.

<74> **실시예 4: *OsHXK5* 또는 *OsHXK6*을 발현하는 형질전환 벼 식물체의 분석**

<75> 벼 식물체에서 글루코스 센서로서 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*의 기능을 추가로 조사하기 위해, *CaMV35S::OsHXK5* 또는 *CaMV35S::OsHXK6*를 발현하는 형질전환 벼 식물체를 제작하였다. 각각의 *OsHXK* 유전자에 대한 두 개의 독립적인 형질전환 벼 식물체는 형질전환 유전자의 높은 발현에 기초한 추가 분석을 위해 선별하였다(데이타 미제시). 선별된 식물체의 동형 접합의 식물체로부터의 개체는 30 mM 글루코스를 포함하는 워터 아가(water agar) 배지에서 발아하였다. *OsHXK5* 및 *OsHXK6*을 발현하는 형질전환 벼 유묘 식물체의 성장은 야생형 벼 식물체보다 글루코스 포함 배지에서 심각하게 저해되었다(도 7A). 형질전환 벼 식물체는 야생형 대조구와 비교하여 엷은 황색 잎 및 감소된 식물체 길이와 같은 글루코스-의존적인 성장 저해를 증가시키는 것으로 나타났다(도 7, A 및 B). 표현형 관찰에 더하여, 벼 *RbcS* 유전자의 발현은 글루코스 처리에 반응하여 야생형보다 형질전환 벼 식물체가 좀 더 민감하게 저해되었다(도 7C). 삼투 스트레스에 의해 야기되는 일반적인 영향을 제거하기 위해 대조구로서 소르비톨을 처리하였다. 결과에서는 벼에 소르비톨을 처리한 경우 심각한 식물 성장 저해 및 *RbcS* 유전자 발현의 억제

되는 현상을 관찰할 수 없었다. 이것은 글루코스 처리에 의해 얻어진 결과가 삼투 스트레스에 기인하지 않는다는 것을 의미한다. 그러므로, 글루코스-억제 실험은 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*이 벼 식물체 뿐만 아니라 애기장대 *gin2-1* 돌연변이체 배경에서 글루코스 센서 역할을 수행하는 것을 추가로 지지한다.

도면의 간단한 설명

<76> **도 1**은 트랜스펙션된 옥수수의 엽육 원형질체에서 OsHXK5-GFP 및 OsHXK6-GFP 융합 단백질의 세포내 위치를 나타내는 그림이다. A, OsHXK5-GFP. B, OsHXK6-GFP. C, GFP. 엽록소 자가 형광 및 MitoTracker은 엽록체 및 미토콘드리아 마커로 각각 사용되었다. 푸른색은 MitoTracker의 형광으로부터 엽록소를 구별하기 위해 엽록소 자가 형광을 나타내었고, 녹색은 GFP 신호 및 붉은색은 MitoTracker로 염색된 미토콘드리아 신호를 나타낸다. 또한 엽록소 자가형광, GFP 및 MitoTracker의 합쳐진 이미지(merged images) 뿐만 아니라 광 영역 이미지(light-field images)를 나타내었다.

<77> **도 2**는 옥수수의 엽육 원형질체에서 OsHXK5ΔmTP-GFP 및 OsHXK6ΔmTP-GFP 융합 단백질의 세포내 위치를 보여준다. A, OsHXK5ΔmTP-GFP. B, OsHXK6 mTP-GFP. OsHXK5ΔmTP-GFP 및 OsHXK6ΔmTP-GFP 융합단백질은 핵 뿐만 아니라 세포질에도 존재한다. 엽록소 자가형광 및 Cyto 염색은 엽록체 및 핵 마커로 각각 사용되었다. 푸른색 빛은 Cyto 염색의 형광으로부터 엽록소를 구별하기 위해 엽록소 자가형광으로 사용되었다. GFP 신호는 녹색을 나타내고, Cyto 염색액으로 염색된 핵 신호는 붉은 색으로 나타난다. C, OsHXK5ΔmTP-GFP. OsHXK5ΔmTP-GFP 및 미토콘드리아 사이의 상호작용은 검출되지 않았다. OsHXK6 mTP-GFP 융합 단백질에서 유사한 결과가 나타났다(데이타 미제시).

<78> **도 3**은 효모 헥소키나아제 돌연변이체 내로 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*의 효소 활성이 제거된 돌연변이체의 형질전환 결과이다. A, *OsHXK5, OsHXK6* 및 이들 유전자의 효소 활성이 제거된 돌연변이 자리의 도식이다. 미토콘드리아 타켓팅 신호 및 핵 위치화 신호는 백색(M) 및 흑색(N) 직사각형으로 나타내었다. 1, 2 및 A는 각각 보존된 포스페이트 1, 2 및 ATP-결합 자리 내의 아데노신 상호작용 영역을 나타낸다. 영역 S는 보존된 당 결합 도메인을 나타낸다. B, *OsHXK5, OsHXK6* 및 이들 유전자의 효소 활성이 제거된 돌연변이 대립 유전자를 이용한 헥소키나아제-결핍 효모 삼중 돌연변이체 YSH7.4-3C (*hxk1*, *hxk2*, *glk1*)의 상보성 실험 결과이다. 형질전환 콜로니는 유일한 탄소원으로 2% D-글루코스를 포함하는 배지에 도말하여 30℃에서 3일 동안 배양하였다. pDR196 벡터로 형질전환된 YSH7.4-3C 돌연변이 균주는 대조구로 사용되었다.

<79> **도 4**는 글루코스 처리에 반응하여 *CaMV35S* 프로모터 조절하의 *AtHXK1*, *OsHXK5*, *OsHXK6* 또는 *OsHXK* 돌연변이 대립 유전자로 트랜스펙션된 옥수수 엽육 원형질체에서 글루코스 반응 유전자인 *ZmRbcS* (A) 및 *Ramy3D* (B)의 발현을 나타내는 결과이다. *ZmUBQ*::*GUS*은 내부 대조구로서 각각의 시료에 포함시키고 대조구 원형질체는 빈 벡터로 트랜스펙션시켰다. 글루코스 반응성 리포터 구축물의 프로모터 활성은 상대적 LUC/GUS 활성으로 나타내었고 모든 일시적인 발현 실험은 유사한 결과로 세 번 반복하였다. C, 작동 단백질의 일정한 발현은 항-Myc 항체를 사용한 단백질-블럿 분석으로 검출하였다.

<80> **도 5**는 효소적 불활성 *OsHXK5* 및 *OsHXK6* 돌연변이 대립유전자의 발현에 의한 애기장대 *gin2-1* 돌연변이체의 상보성 결과이다. (상단) 6% 글루코스 또는 만니톨을 포함하는 1/2 MS 배지에서 6일동안 키운 형질전환 유전자, *gin2-1* 및 야생형(WT)의 동형 접합의 유묘. (하단) *CAB*, *SBP* 및 *CAA*의 발현 양은 형질전환체, *gin2-1* 및 야생형 식물체에서 RT-PCR로 분석하였다. *UBQ*은 대조구로 사용되었다.

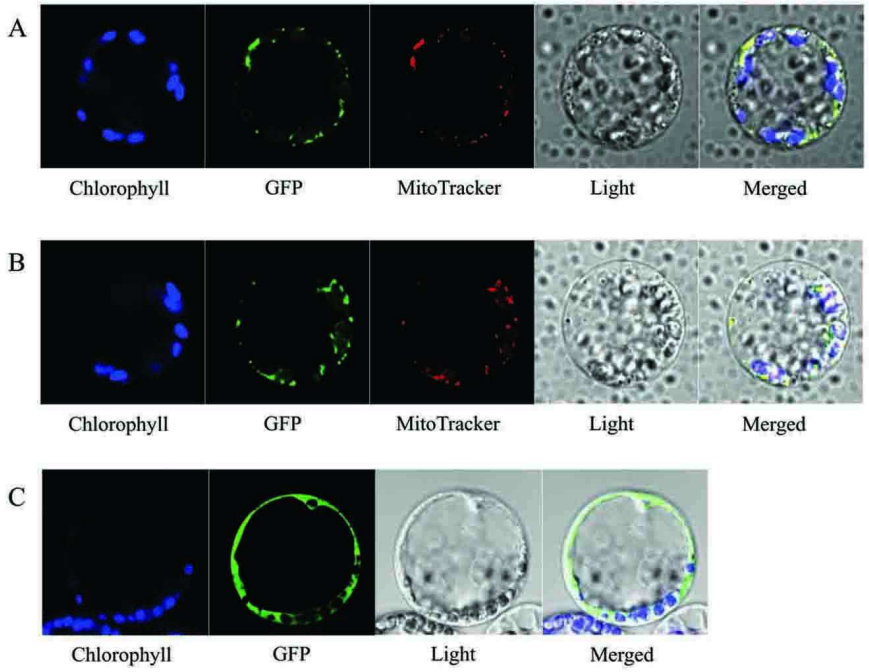
<81> **도 6**은 *gin2-1* 배경에서 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*의 효소 활성이 제거된 대립유전자의 과발현에 의한 애기장대 *gin2-1*의 성장 결핍 표현형의 상보성 결과이다. A, 낮은 광조건(70 $\mu molm^{-2}s^{-1}$) 또는 높은 광조건(240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$) 하에서 야생형(WT), *gin2-1* 및 형질전환 식물체의 성장 표현형을 나타내는 결과이다. B, 낮은 광조건 및 높은 광조건의 토양에서 키운 야생형(WT), *gin2-1* 및 형질전환 식물체에서 같은 연령의 6번째 잎의 표현형을 비교한 것이다.

<82> **도 7**은 글루코스 처리에 반응하여 *OsHXK5* 또는 *OsHXK6* 유전자를 발현하는 야생형(WT) 및 형질전환 벼 유묘의 성장 표현형을 나타내는 결과이다. A, 글루코스가 없거나(0), 30 mM 글루코스 (G30) 및 30 mM 소르비톨(S30)을 각각 포함하는 워터 아가 배지에서 키운 유묘의 성장 표현형을 나타낸다. 막대 = 1 cm. B, 다른 배지에서 키운 야생형 및 형질전환 벼 식물의 신초의 길이이다. 각각의 데이터 점은 세 개의 별도의 실험으로부터 평균을 나타낸다(ㅁ SD). C, 다른 배지에서 자란 야생형 및 *OsHXK5* 및 *OsHXK6*을 과발현하는 형질전환 벼 유묘의 두 번째 및 세 번째 잎에서 벼 *RbcS* 유전자의 상대적인 발현을 나타낸다. 각 식물에 대한 글루코스가 없는 워터 아가 플레

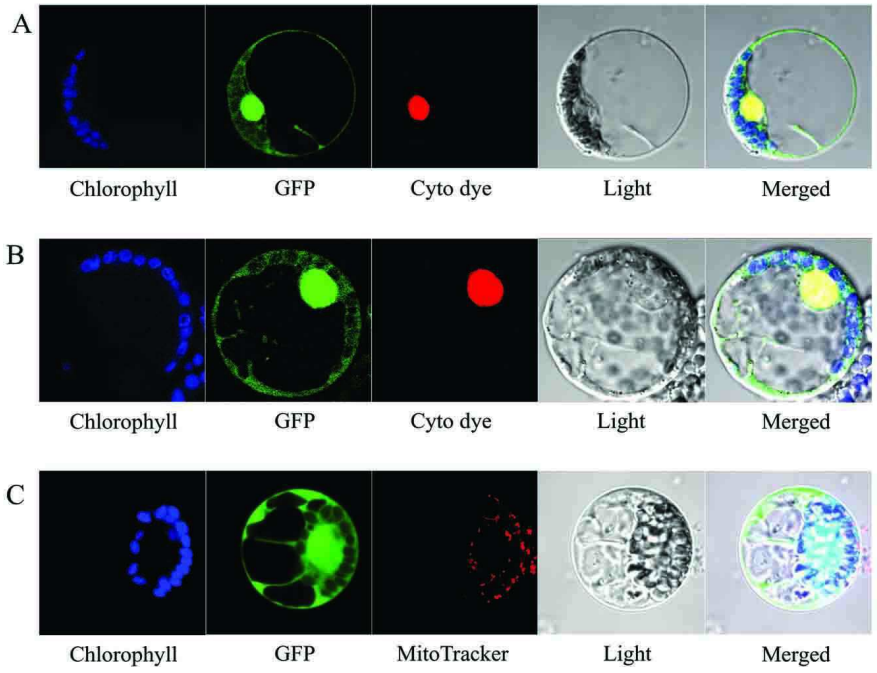
이트에서 키운 유묘의 발현 값은 임의로 1로 잡았다.

도면

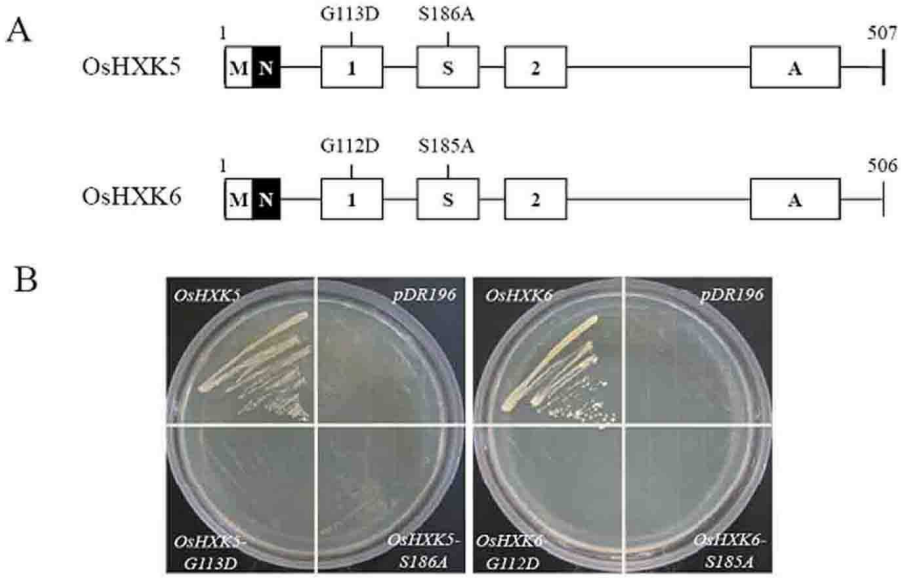
도면1



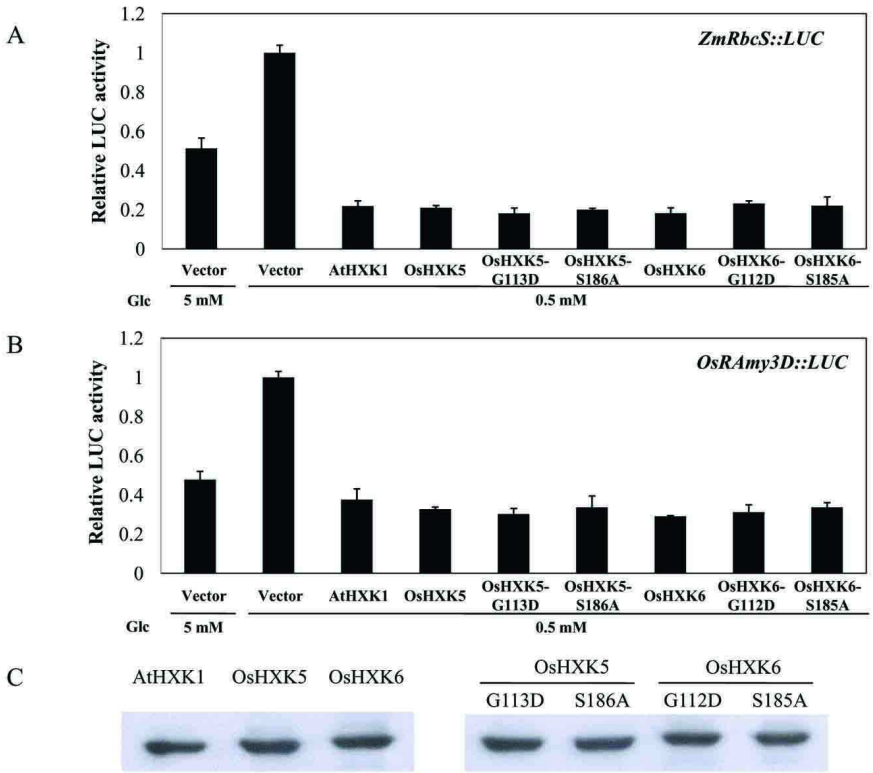
도면2



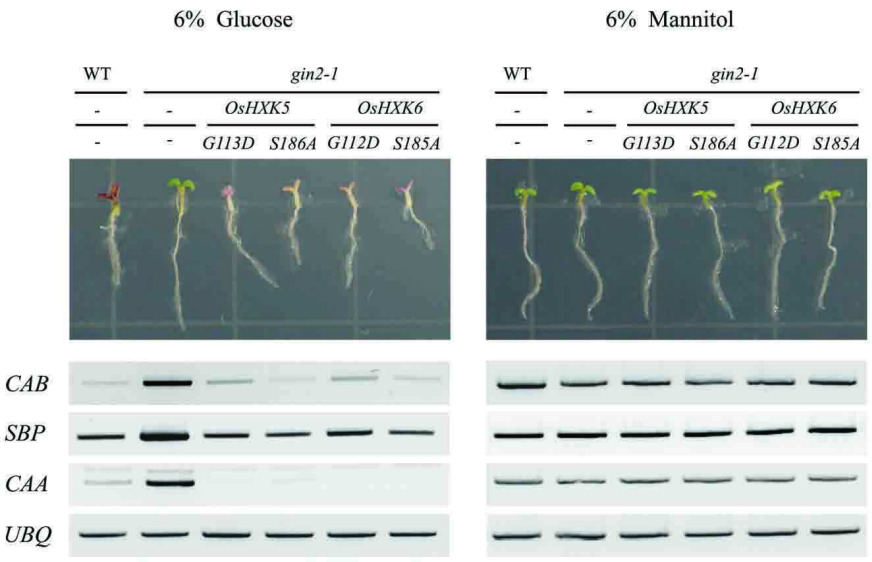
도면3


A
OsHXK5
1
M N
G113D
1
S186A
S
2
A
507
OsHXK6
1
M N
G112D
1
S185A
S
2
A
506
B
OsHXK5
pDR196
OsHXK6
pDR196
OsHXK5-G113D
OsHXK5-S186A
OsHXK6-G112D
OsHXK6-S185A

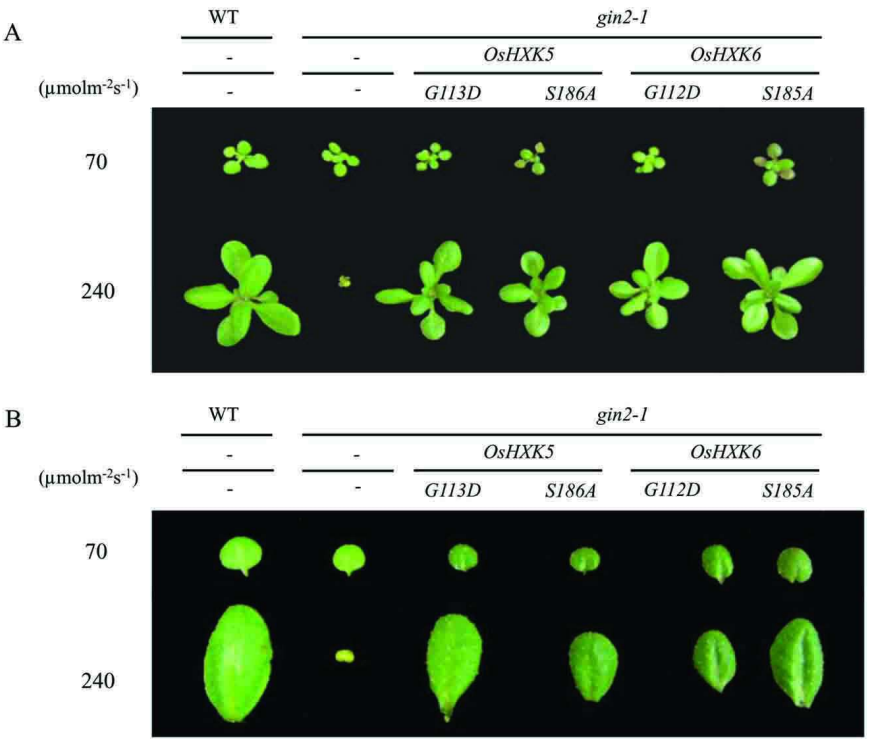
도면4


A
ZmRbcS::LUC
Relative LUC activity
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Vector
Vector
AtHXK1
OsHXK5
OsHXK5-G113D
OsHXK5-S186A
OsHXK6
OsHXK6-G112D
OsHXK6-S185A
Glc
5 mM
0.5 mM
B
OsRAmy3D::LUC
Relative LUC activity
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Vector
Vector
AtHXK1
OsHXK5
OsHXK5-G113D
OsHXK5-S186A
OsHXK6
OsHXK6-G112D
OsHXK6-S185A
Glc
5 mM
0.5 mM
C
AtHXK1
OsHXK5
OsHXK6
OsHXK5
G113D
S186A
OsHXK6
G112D
S185A

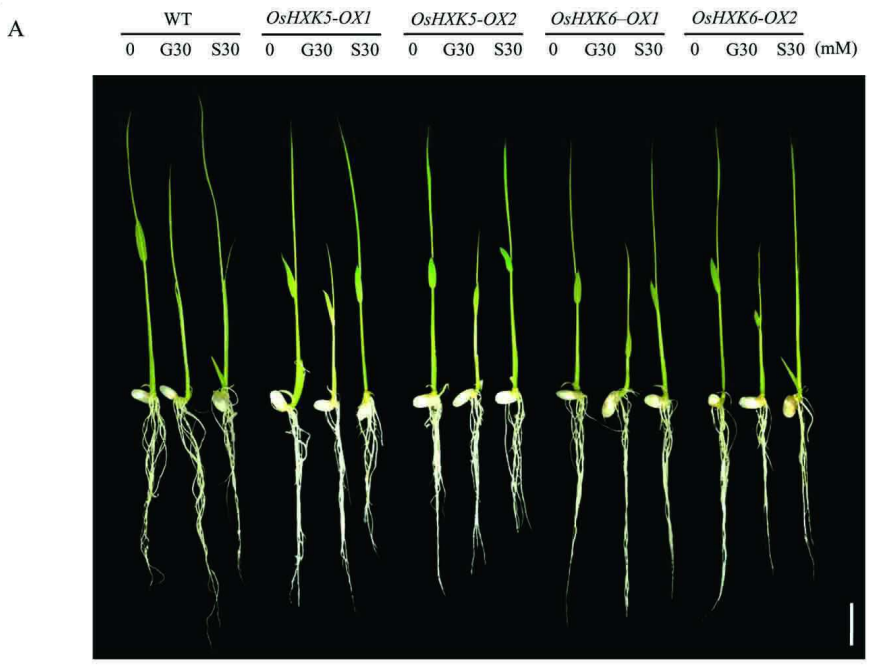
도면5


6% Glucose
6% Mannitol
WT
gin2-1
-
OsHXK5
OsHXK6
G113D
S186A
G112D
S185A
CAB
SBP
CAA
UBQ

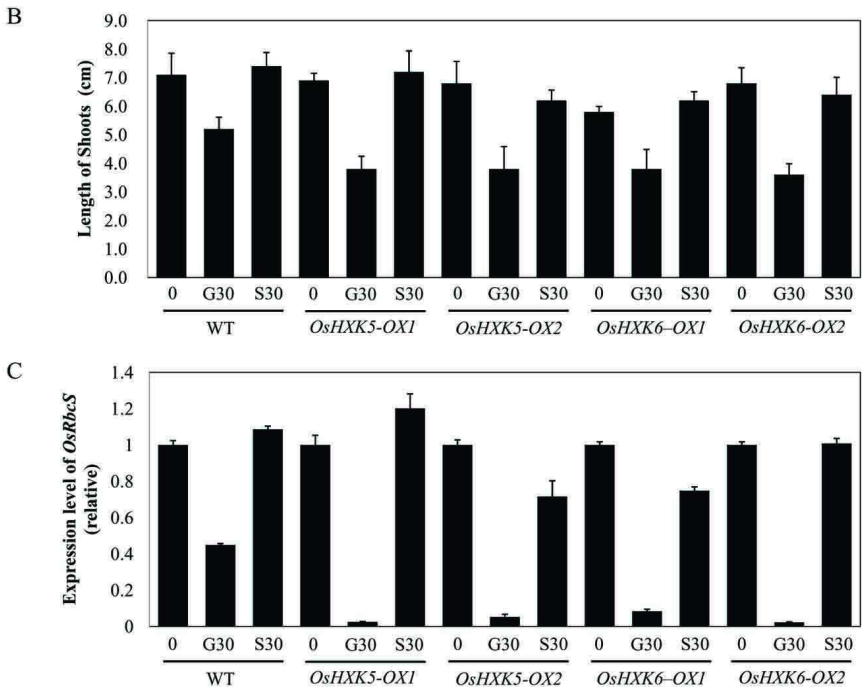
도면6


A
B
WT
gin2-1
-
OsHXK5
OsHXK6
G113D
S186A
G112D
S185A
(μmolm-2s-1)
70
240

도면7a



도면7b



서 열 목 록

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

<120> Use of OsHXK5 gene as glucose sensor

<130> PN08131

<160> 36

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 2058
<212> DNA
<213> Oryza sativa

<400> 1
ctctcgtcct cctttctcct acgcggccgg agagaggagg ggggaagaga ggatctcgca 60

gagcgccata gcctcggatc cagaagcgga attcggtgga ggtctcgggc acctggatcg 120

atcggaggaa gggaaggcgg agcagcggtg atggggaagg cggcggcggt ggggacggcg 180

gtggtggtgg ccgcggcggt cggggtggcg gtggtgctgg cgcggaggcg gaggaggagg 240

gacctggagc tggtggaggg agccgcggcg gagaggaaga ggaaggtggc ggcggtgatc 300

gaggacgtgg agcacgcgct gtcgaccccg acggcgctgc tgcggggcat ctcggacgcc 360

atggtcaccg agatggagcg aggcctgcgc ggggacagcc acgccatggt taagatgctc 420

atcacctacg tcgacaacct ccccaccgga aatgaacagg ggttgtttta tgcattggat 480

cttggaggaa ccaacttccg cgtcctgcga gtccaactcg gtggcaagga gaaacgtgtc 540

gtccaacaac agtacgagga agtctcaatt ccaccacatc tgatggttgg aacttccatg 600

gaactgtttg attttattgc ttctgcattg tcaaaatttg ttgatactga aggtgatgat 660

ttccacctcc cagaagggag acagagagag ctgggcttca ccttttcctt cccagtgagc 720

cagacatcaa tatcgtcagg aacgctcatc aagtggacaa agggtttctc catcaatgac 780

gcggttggcg aagatgttgt atctgagttg ggcaaggcca tggagaggca gggattagat 840

atgaaaattg cagcattggt taatgacact gtcggcacat tggctggtgg gaggtatgcg 900

gataacagtg ttgttgctgc tataatattg ggcactggta caaatgcagc atatgttgag 960

aatgctaatg caattcctaa atggaccggt ttactgccta ggtccggaaa tatggtaatc 1020

aacacagaat gggggagctt taaatcagat aagcttcctc tttcagaatt cgataaagca 1080

atggattttg aaagcttgaa tcctggagag cagatatatg aaaagttgat ttctggcatg 1140

tatcttggag agatagtgcg aagaatcttg ctgaagcttg ctcatgatgc agctttgttt 1200

ggggatgttg ttccatctaa gctagagcaa ccgtttgtac taaggacacc ggatatgtca 1260

gccatgcatc atgactcgtc acatgacctt aaaactgttg gagctaagct aaaggatatc 1320

gtcggggtcc cagatacttc cctggaagta agatacatta ccagtcacat ttgtgacata 1380

gttgcagagc gtgctgcacg cttggctgct gctggcatat atggggtcct aaagaagcta 1440

ggtcgggaca agatgccaaa agacggcagt aagatgccta ggactgtcat tgccttggat 1500

ggtgggctct atgaacatta caagaagttc agcagttgct tagaatcaac tctaacagac 1560

cttcttgggg atgatgtctc gtcttcggtg gttaccaagc tggccaacga tggttctggc 1620

attggagctg ctcttctcgc agcctcgcac tcccagtatg ccgagatcga ctagctttaa 1680

ggatgatctt gatgaatgat gaatcaaact ccgtttgtag gttctcattt ccccccttcaa 1740

aatccacata atactcctgg ctccccccctt gaaatcttac catctttttt tggctattct 1800

gagggcaaac ataagtgcct ctgcagcggg atatagctag tatagcgcca atgagtttgg 1860

aggttttcta atggcataaa acgttggatg gcagtagcag actaacaggg aaatggaggc 1920

acaggcaatt tccattcctg ttctgtcaga ttcttttccc ccttaattga tgttgagaac 1980

caagattttt ttgctctgta ttttctcttc gtaataaaga aggggacata atctaattgc 2040

tcttgtttga tctcataa 2058

<210> 2
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 2
gctctagaag ggaaggcgga gcagcggtg 29

<210> 3
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 3
ccctcgagag tcgatctcgg catactggga 30

<210> 4
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 4
gctctagagg aaggaggagg agtaggacgc 30

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 5
ccctcgagac tcgacgctag catactggga 30

<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 6
gctctagaat gcggaggcgg aggaggaggg ac 32

<210> 7
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 7
gctctagaat gcggaggagg aggagcaagc gg 32

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 8
ggaagttggt gtctccaaga tccaatgcat 30

<210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 9
gatcttggag acaccaactt ccgcgtcctg 30

<210> 10
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 10
cactgggaag gcaaaggtga agcccagctc 30

<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 11
gcttcacctt tgccttccca gtgagccaga 30

<210> 12

<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 12
ggaaattggt gtccccaaga tcgagagcat 30

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 13
cgatcttggg gacaccaatt tccgtgttat 30

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 14
cactgggaaa gcaaaggtga agcctaactc 30

<210> 15
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 15
gcttcacctt tgctttccca gtgcaccaaa 30

<210> 16
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 16
cgggatccga tcttcaacca cctgtgctag ct 32

<210> 17
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 17
tgccatggat ctgtgtaagc tgaaaccgtg tt 32

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 18
atggccactt cagcaatcca a 21

<210> 19
<211> 21

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 19
cacaacttga cacgcccata t 21

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 20
atggagacca gcatcgcgtg 20

<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 21
cttccactgg acctcccat 19

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 22
tgaatacgct gtcttgcacc 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 23
tgtgatggtg gtggtagcga 20

<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 24
gtggtgctaa gaagaggaag a 21

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 25
tcaagcttca acttcttctt t 21

<210> 26
<211> 17
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 26
agcaatggcg gcaggat 17

<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 27
gaacttcttg atgccctcaa tcg 23

<210> 28
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> RbcS probe

<400> 28
cacacctgca tgcacc 16

<210> 29
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Forward primer

<400> 29

ccgcctccgc aagga 15

<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Reverse primer

<400> 30
aagtggttgg ccatgaaggt 20

<210> 31
<211> 15
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> UBQ5 probe

<400> 31
ccaacgccga gtgcg 15

<210> 32
<211> 24
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mitochondria targeting peptide for OsHXK5

<400> 32
Met Gly Lys Ala Ala Ala Val Gly Thr Ala Val Val Val Ala Ala Ala
1 5 10 15

Val Gly Val Ala Val Val Leu Ala
20

<210> 33
<211> 28
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Mitochondria targeting peptide for OsHXK6

<400> 33
Met Gly Lys Gly Thr Val Val Gly Thr Ala Val Val Val Cys Ala Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ala Val Gly Val Ala Val Val Val Ser
20 25

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nuclear localization signal for OsHXK5

<400> 34
Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

<210> 35
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nuclear localization signal for OsHXK5

<400> 35
Arg Arg Arg Asp Leu Glu Leu Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Arg Lys
1 5 10 15

Arg Lys

<210> 36
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Nuclear localization signal for OsHXK6

<400> 36
Arg Arg Arg Arg Ser Lys Arg Glu Ala Glu Glu Glu Arg Arg Arg Arg
1 5 10 15