



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0017211

(43) 공개일자 2016년02월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/29 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0098721

(22) 출원일자 2014년08월01일

심사청구일자 2014년08월01일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

배정명

서울 노원구 한글비석로5길 62, 803동 907호 (중계동, 중계8단지주공아파트)

노철아

경기 안양시 동안구 부림로 80, 609동 402호 (평촌동, 초원한양아파트)

신정섭

서울 성북구 길음로9길 50, 910동 2501호 (길음동, 길음뉴타운)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 신규한 유전자 IbENOD93 및 이를 이용한 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 신규한 유전자 IbENOD93 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 IbENOD93 유전자, IbENOD93 유전자의 ORF(open reading frame), IbENOD93 단백질, 상기 유전자 또는 상기 ORF를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다. 또한, 본 발명은 저장 뿌

(뒷면에 계속)

대표도 - 도9a



Control

IbENOD93

리를 갖는 식물체의 뿌리 비대 성장 증진 및 조숙 촉진용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 저장 뿌리의 비대 성장능이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법, 저장 뿌리를 갖는 식물체의 저장 뿌리 비대 성장 및 조숙을 조절 및 증진시키는 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 식물체 저장 뿌리의 비대 성장 발달을 촉진시킬 뿐만 아니라 저장뿌리 발달 시기를 촉진하였다. 따라서, 본 발명은 인삼, 고구마 등 고부가가치의 뿌리 작물의 저장뿌리의 비대 성장속도를 촉진시키고 조숙 시키고자 하는 형질전환 식물체 제작에 유용하게 사용될 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A1A3A04006024
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	(이공)일반연구자-여성과학자(후속연구지원)
연구과제명	괴근형 저장뿌리 발달 관련 분자적 메커니즘 규명
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2015.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PJ00810302
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	직근(taproot) 저장뿌리 발달 조절용 유전자 탐색
기 여 율	1/2
주관기관	서울대학교 산학협력단
연구기간	2014.01.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 IbENOD93 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유전자는 고구마(*Ipomoea batatas*) 유래인 것을 특징으로 하는 IbENOD93 유전자.

청구항 3

서열번호 3의 염기서열을 갖는 IbENOD93 유전자의 ORF(open reading frame).

청구항 4

서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ORF로 코딩되는 IbENOD93 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 IbENOD93 단백질.

청구항 6

제1항의 유전자 또는 제3항의 ORF를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 서열번호 4의 염기서열을 갖는 SRD1 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터.

청구항 8

제6항 또는 제7항의 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 형질전환체는 식물체 또는 미생물인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 식물체는 저장 뿌리를 갖는 초본식물인 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 저장 뿌리를 갖는 초본 식물은 인삼류, 더덕, 강활, 도라지, 쑥, 독활, 방풍, 당귀, 당근, 고구마, 홍당무, 달리아, 비트, 마카, 백합, 튤립 및 카사바로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 12

서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자, 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ORF, 상기 유전자 또는 상기 ORF를 포함하는 벡터, 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질로 구성된 군으로부터 1 종 이상 선택되는 것을 포함하는, 저장 뿌리를 갖는 초본 식물체의 뿌리 비대 성장 증진 및 조숙 촉진용 조성물.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 조성물은 상기 유전자의 발현을 유도하기 위해 오옥신 또는 자스민산을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 14

다음 단계를 포함하는 저장 뿌리의 비대 성장능이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법:

- (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ORF를 식물 발현 벡터에 삽입한 후, 이를 식물체에 도입시키는 단계; 및
- (b) 상기 식물세포로부터 저장 뿌리의 비대 성장능이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 15

다음 단계를 포함하는 저장 뿌리를 갖는 식물체의 저장 뿌리 비대 성장 및 조숙을 조절 또는 증진시키는 방법:

- (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ORF를 식물 발현 벡터에 삽입한 후, 이를 식물체에 도입시키는 단계; 및
- (b) 상기 식물세포로부터 저장근 비대 성장능이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 16

제 15 항에 있어서, 상기 방법은 (b) 단계 이후 상기 식물체에 오옥신 또는 자스민산을 처리하여 상기 유전자 발현을 유도하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

저장뿌리 식물체에 오옥신 또는 자스민산을 처리하여 서열번호 1의 염기서열을 갖는 IbENOD93 유전자 발현을 유도하는 단계를 포함하는 식물체의 저장뿌리 발달을 조절하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 유전자 IbENOD93 및 이를 이용한 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 대부분의 쌍자엽 식물들은 생육 초기에 종자로부터 일차적 뿌리(primary root)를 발달시키며 이 일차적 뿌리로부터 직근 뿌리가 발달하게 된다. 인삼, 당근, 무 등은 일차적 뿌리 발달 이후 지속적인 세포 분열과 분화에 의한 이차 비대 성장을 통해 직근형 저장뿌리를 형성하게 된다. 이런 직근형 저장뿌리는 인간과 동물의 에너지 급원인 탄수화물을 대량으로 저장함과 동시에 인간의 웰빙 라이프를 위해 필수적인 식용 섬유소의 급원일뿐 아니라, 건강보조제의 원료인 이차대사산물 등을 생산함으로 경제적으로 매우 중요한 위치를 차지하고 있다.

[0003] 한편, 인삼 등의 고부가가치 직근형 저장뿌리 작물들은 대부분 다년간에 걸쳐 저장뿌리가 지하에서 성장을 하는데 이 성장기간 동안 저장뿌리는 여러 가지의 병원성 곰팡이에 노출이 되어 수확기가 되기 전에 뿌리 썩음 병으로 재배를 중단해야 되는 경우가 많이 있다. 특히, 우리나라 대표적인 고부가가치 뿌리작물인 인삼의 6년근 발에서는 저장뿌리의 약 50%가 뿌리 썩음 병으로 재배를 중단해야 하는 실정이다. 저장뿌리 작물 재배에 있어서 이러한 피해를 최소화하기 위해서는 뿌리 썩음 병에 강한 내성 품종 육종과 아울러 저장뿌리의 재배기간을 단축시킬 수 있는 분자유종법이 개발되어야 한다. 이러한 분자유종을 위해서는 저장뿌리 발달에 관련되는 유전자원의 확보 및 그 기능 분석에 관한 연구가 선행되어야 한다.

[0004] 최근 이런 직근형 저장뿌리 작물에 대한 분자적 연구는 대부분 인삼 혹은 당근의 직근형 저장뿌리에서 생산되는 고부가가치 이차대사산물(진세노사이드, 카로테노이드 등)의 합성에 관련되는 유전자의 분리 및 기능 연구에 집중되어 왔다 (Jung et al., 2003. Plant Cell Reports 22:224-230; Choi et al., 2005. Plant Cell Reports 23:557-566; Tansakul et al., 2006. FEBS Letter 580:5143-5149; Just et al., 2007. Theoretical and Applied Genetics 114:693-704; Cloutault et al., 2008. Journal of Experimental Botany 59, 3563-3573; Sun et al., 2010. BMC Genomics 11:262; Han et al., 2011. Plant and Cell Physiology. 52:2062-2073, 2012 Plant Cell Physiol. 53:1535-1545; Li et al., 2013. BMC Genomics. 14:245). 하지만 직근형 저장뿌리의 발달에 관련된 분자적 메커니즘에 관해서는 거의 밝혀진 것이 없었으며 관련 유전자 역시 확인 된 바가 없었다. 따라서 직근형 저장뿌리의 발달을 조절하는 분자 육종은 거의 이루어지지 않고 있다.

[0005] 저장뿌리는 당근, 인삼, 무 등의 직근형 저장뿌리와 고구마와 같은 괴근형 저장뿌리로 나누어지는데 이들은 형태 및 발달 과정에서 차이점을 보인다. 당근과 같은 직근형 저장뿌리의 생장은 일차 뿌리의 유관속 형성층 (vascular cambium)의 지속적인 분열에 의해 비대 성장이 이루어지며 이 과정에서 이차 유관속 조직을 형성하게 되며 이차 유관속 조직 외부의 피층 (cortex)과 표피층 (epidermis)은 떨어져 나가게 된다. 따라서 성숙된 직근형 저장뿌리는 대부분 이차 유관속 조직으로 이루어져 있다. 한편, 고구마와 같은 괴근형 저장뿌리는 직근형 저장뿌리의 발달 과정과는 상이하게 일차 유관속 조직 내부에 발달되는 다수의 비정상적인 이차 유관속 조직의 발달에 의해 비대 성장이 이루어진다. 하지만 이런 형태 및 발달 과정이 상이한 두 가지 타입의 저장뿌리도 비대 성장 시에는 유관속 형성층에서 왕성한 세포 분열이 일어난다는 공통점을 가지고 있다.

[0006] 최근에 발달된 다양한 분자적 차원에서의 접근 방법으로 인하여 고구마의 저장뿌리 발달에 관련된 것으로 추정되는 유전자들을 탐색할 수 있었으며, 결과적으로 발달하고 있는 고구마 저장뿌리에서 차등적인 발현 양상을 보이는 유전자들을 확인할 수 있었다. (You et al., 2003, FEBS Letters 536,101-105; Tanaka et al., 2005, Journal of Plant Physiology 162, 91-102; Tanaka et al., 2008, Journal of Plant Physiology 165,1726-1735). 하지만 이들 유전자에 대한 저장뿌리 발달 관련 기능 분석은 거의 이루어지지 않고 있다. 최근에 본 연구실에서 고구마의 MADS-box 유전자인 SRD1 유전자가 저장뿌리의 형성층과 후생목부층의 세포 분열을 촉진하여 저장뿌리 비대 성장을 촉진하는데 관여함을 밝혔으며 (Noh et al., 2010, Journal of Experimental Botany 61: 1337-1349), IbEXP1 유전자는 저장뿌리의 형성층과 후생목부층의 세포 분열을 저해하여 저장뿌리 비대 성장을 억제하는데 관여함을 밝혔다 (Noh et al., 2013, Journal of Experimental Botany 64:129-142). 이러한 고구마 유전자들은 당근 등의 직근형 저장뿌리의 발달을 조절할 수 있는 유전적 자원으로 활용할 수 있을 것이다.

[0007] 따라서 저장뿌리의 생산성을 높이기 위해 저장뿌리의 발달에 관련되는 유전자 도입을 이용한 조숙성(早熟性) 형질전환 뿌리작물 제작에 대한 요구가 계속적으로 있어 왔다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 IbENOD93 유전자를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 3의 염기서열을 갖는 IbENOD93 유전자의 ORF(open reading frame)를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ORF로 코딩되는 IbENOD93 단백질질을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자 또는 상기 ORF를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 저장 뿌리를 갖는 식물체의 뿌리 비대 성장 증진 및 조숙 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 저장 뿌리의 비대 성장능이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 저장 뿌리를 갖는 식물체의 저장 뿌리 비대 성장 및 조숙을 조절 또는 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명자들은 저장 뿌리를 갖는 식물체의 뿌리 비대 성장을 증진시키고 조숙을 촉진시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 노력한 결과, 고구마로부터 IbENOD93 유전자를 발굴하였고, 상기 유전자에 의해 형질전환된 식물체가 저장 뿌리의 비대 성장 및 현저히 촉진된 성장을 나타낸다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 식물체의 뿌리 비대 성장을 증진시키고 조숙을 촉진시키는, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 IbENOD93 유전자를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 IbENOD93 유전자는 기존에 밝혀지지 않은 신규한 유전자로 본 발명자에 의해 최초로 규명되었다(참조 실시예 1).
- [0021] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 유전자는 고구마(*Ipomoea batatas*)로부터 유래된 유전자이며, 해당 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다.
- [0022] 바람직하게는, 본 발명의 핵산 분자는 cDNA이며, 서열번호 1의 염기서열을 포함한다.
- [0023] 본 발명의 핵산 분자는 상기한 염기서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 염기서열도 포함할 수 있다. 상기의 실질적인 동일성은, 상술한 본 발명의 염기서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 프로그램 (예: DNASIS 및 ClustalX)를 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 염기서열을 의미한다.
- [0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 3의 염기서열을 갖는 IbENOD93 유전자의 ORF(open reading frame)를 제공한다.
- [0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 ORF(open reading frame)는 코딩서열(coding sequence, CDS)을 나타내는 것으로 단백질 합성에서 주형(template)이 되는 부분을 의미한다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ORF로 코딩되는 IbENOD93 단백질을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0028] 보다 상세하게는, 본 발명은 고구마의 어린 괴근에서 총 RNA를 추출하여 EST(Expressed Sequence Tag) 라이브러리를 구축하였다. 상기 라이브러리의 스크리닝에 의해 ENOD93 단백질과 상동성이 높은 cDNA 클론을 분리하고, 이를 IbENOD93라 명명하였다.
- [0029] 또한, 상기 cDNA의 염기서열은 75 bp의 5 비 번역지역, 312 bp ORF(Open Reading Frame; 103개 아미노산), 및 190 bp의 3 비 번역지역을 포함하고 있는 전체 577 bp로서 구성된다. 상기 ORF 염기서열은 NCBI에 cDNA sequence of IbENOD93 cloned from sweetpotato로 등록하였다(NCBI accession no. KC915011).
- [0030] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 유전자 또는 상기 ORF를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0032] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 벡터는 외래 유전자를 도입된 식물체 내에서 영구적으로 발현시킬 수 있는 형질전환용 바이너리 벡터로서, 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물체의 저장뿌리 특이 재조합 발현 벡터이다.
- [0034] 본 발명에 따른 발현 벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입함으로써 제조할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 실시예에서는 pBI101 벡터를 이용하여 제조하였다.
- [0036] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 재조합 벡터는 서열번호 4의 염기서열을 갖는 SRD1 프로모터를 포함한다.

- [0037] 본 발명에 따른 프로모터는 저장뿌리에서 특이적으로 발현을 유도하는 SRD1 프로모터이다. 따라서, 본 발명에 의한 상기 프로모터는 저장뿌리에서 목적 유전자의 발현을 유도시킬 수 있다.
- [0038] 본 발명의 프로모터는 상기 서열번호 4의 염기서열뿐만 아니라 상기 서열번호 4의 염기서열의 일부 염기가 치환, 결실 또는 부가된 변형서열로서 프로모터 활성을 나타내는 염기서열일 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따르면, 본 발명에 의한 고구마 유래 IbENOD93 cDNA는 pBI101 벡터의 GUS 유전자를 제거한 후 동일한 위치에 SRD1 프로모터에 연결된 IbENOD93 유전자가 NOS 터미네이터 앞 부분에 위치할 수 있다. 본 발명에서는 pBI101 벡터를 사용하였으나, 다른 식물 형질전환용 벡터로 치환할 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- [0040] 상기 바이너리 벡터는 아그로박테리움을 이용하는 방법, 혹은 유전자 총을 이용한 방법 등으로 식물체를 형질전환시킬 수 있다. 본 발명에서는 그 예로서 아그로박테리움을 이용하여 당근에 형질전환시킨다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.
- [0042] 본 발명의 형질전환체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(Methods of Enzymology, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 형질전환체는 식물체 또는 미생물이다.
- [0044] 본 발명에 의한 IbENOD93 유전자는 저장뿌리의 비대 성장을 촉진시키고자 하는 어떤 식물에도 도입될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 식물체는 저장 뿌리를 갖는 초본 식물이다.
- [0046] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 저장 뿌리를 갖는 초본 식물은 인삼류, 더덕, 강활, 도라지, 쑥, 독활, 방풍, 당귀, 당근, 고구마, 홍당무, 달리아, 비트, 마카, 백합, 튜립 및 카사바로 구성된 군에서 선택된다.
- [0047] 본 발명에 따르면, IbENOD93 유전자는 식물의 저장 뿌리 비대 성장을 촉진하므로 본 발명의 형질전환된 식물은 야생형 식물에 비해 저장 뿌리 비대 성장이 향상되는 것을 특징으로 한다.
- [0048] 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.
- [0049] 본 명세서에서 사용되는 용어 식물(체)는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.
- [0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자, 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ORF, 상기 유전자 또는 상기 ORF를 포함하는 벡터, 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질로 구성된 군으로부터 1 종 이상 선택되는 것을 포함하는, 저장 뿌리를 갖는 초본 식물체의 뿌리 비대 성장 증진 및 조속 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 조성물을 식물에 투여 및 형질주입을 통하여, 저장 뿌리 비대 성장과 관련된 상기 유전자를 발현시키거나 또는 발현을 증가시킴으로서, 궁극적으로 저장 뿌리 비대 성장과 조속 성장을 증가시킬 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 조성물은 상기 유전자의 발현을 유도하기 위해 상기 옥옥신 또는 자스민산을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0053] 본 발명에 의한 IbENOD93 유전자는 외부에서 처리한 옥옥신 혹은 자스민산에 의해 유전자 발현이 유도되어 저장 뿌리 비대생장을 촉진시킬 수 있다. 상기 옥옥신 혹은 자스민산의 처리는 소정의 농도로 일정 시간 처리하는 것이 바람직하다. 예를 들어 상기 옥옥신과 자스민산 처리농도는 각각 500과 100 M가 바람직하다. 이들 호르몬의 처리시간은 적정 농도로 처리하는 경우 3 시간인 것이 바람직하다.
- [0054] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 저장 뿌리의 비대 성장능이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공한다:
- [0055] (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ORF를 식물 발현 벡터에 삽입한 후, 이를 식물체에 도입시키는 단계; 및

- [0056] (b) 상기 식물세포로부터 저장 뿌리의 비대 성장능이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.
- [0057] 본 방법에 따라 형질전환된 식물은 당업계에 공지된 방법에 의해 형질전환 여부가 확인된다. 예를 들어, 형질전환된 식물의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 형질전환 식물의 지놈에 삽입된 외래 유전자가 규명될 수 있다. 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯팅을 실시하여 형질전환 여부를 확인할 수 있다 (Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989).).
- [0058] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 저장 뿌리를 갖는 식물체의 저장 뿌리 비대 성장 및 조숙을 조절 또는 증진시키는 방법을 제공한다:
- [0059] (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 ORF를 식물 발현 벡터에 삽입한 후, 이를 식물체에 도입시키는 단계; 및
- [0060] (b) 상기 식물세포로부터 저장근 비대 성장능이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.
- [0061] 또한, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 (b) 단계 이후상기 유전자의 발현을 유도하기 위해 처리하여 상기 유전자 발현을 유도하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0062] 본 발명에 따르면, 본 방법은 IbENOD93 유전자를 식물 발현 벡터에 삽입한 후, 이를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 식물 저장뿌리의 비대성장을 촉진시키는 방법이며, 상술한 바와 같이 저장 뿌리의 비대성장을 촉진시키면 인삼과 같은 고부가가치 뿌리작물의 재배기간을 단축할 수 있고 이에 따라 뿌리병해로 인한 피해를 감소시킬 수 있어 뿌리 작물의 생산성을 개선시킬 수 있다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 저장뿌리 식물체에 오옥신 또는 자스민산을 처리하여 서열번호 1의 염기서열을 갖는 IbENOD93 유전자 발현을 유도하는 단계를 포함하는 식물체의 저장뿌리 발달을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0064] 본 방법은 상술한 본 발명에 의하여 상기 유전자를 발현하도록 제작된 형질전환체 뿐만 아니라, 상기 유전자가 존재하는 고구마와 같은 저장뿌리 식물체에도 적용할 수 있다. 즉, 오옥신 또는 자스민산을 처리하여 상기 유전자의 발현을 유도함으로써, 상기 식물체의 저장뿌리 발달을 조절하는 방법인 것이다.
- [0065] 본 조성물 및 방법은 상술한 유전자, 벡터 및 형질전환체를 이용하므로, 상술한 바와 중복된 내용은 중복된 내용의 기재에 의한 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0066] 본 발명은 고구마(*Ipomoea batatas*) 유래 IbENOD93 유전자에 관한 것으로서, 이 유전자는 식물체 저장 뿌리의 비대 성장 발달을 촉진시킬 뿐만 아니라 저장뿌리 발달 시기를 촉진하였다. 따라서, 본 발명은 인삼, 고구마 등 고부가가치의 조숙성 형질전환 뿌리 작물 개발에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1은 본 발명에 의한 고구마 유래 IbENOD93 유전자의 발현양상을 조사하기 위해 사용하였던 고구마 조직들 (A)과 고구마 식물에서의 발현양상(B)을 나타내는 도면이다.
- 도 2는 본 발명에 의한 고구마 유래 IbENOD93 유전자에 의해 생산된 IbENOD93 단백질의 세포 내 발현 위치를 확인하기 위해 구축하였던 바이너리 벡터의 구조(A)와 발현 위치(B)를 나타내는 도면이다.
- 도 3은 본 발명에 의한 고구마 유래 IbENOD93 유전자의 저장뿌리 내 발현양상을 나타내는 도면으로, (A, B, C) 고구마 어린 저장뿌리의 cross-section, (D, E, F) Sense riboprobe로 혼성화 시킨 cross-section, (G, H, I) Anti-sense riboprobe로 혼성화 시킨 cross-section을 나타내고, PC는 primary cambium; SC는 secondary cambium; PH는 primary phloem이다. (A-C), 어린 고구마 저장뿌리의 단면; (D-F), sense-strand riboprobe로 혼성화시킨 고구마 저장뿌리 단면; (G-F), antisense-strand riboprobe로 혼성화시킨 고구마 저장뿌리 단면;

PC, primary cambium; PH, primary phloem; SC, secondary cambium.

도 4는 본 발명에 의한 고구마 유래 IbENOD93 유전자의 발현이 외부에서 처리하는 IAA, JA, BA에 의해 조절됨을 나타내는 도면이다.

도 5는 본 발명에 의한 고구마 유래 IbENOD93 유전자를 당근에 과다 발현시키기 위해 구축된 바이너리 벡터의 구조를 나타내는 도면이다.

도 6은 본 발명에 의한 고구마 유래 IbENOD93 유전자 cDNA가 삽입된 당근 형질전환체에서 유전자 삽입을 확인한 도면이다. M, 사이즈 마커; C, control(pBI101 벡터만으로 형질전환된 식물체); #2, IbENOD93 형질전환체 라인 #2; #4, IbENOD93 형질전환체 라인 #4.

도 7은 본 발명에 의한 고구마 유래 IbENOD93 유전자 cDNA가 삽입된 당근 형질전환체에서 IbENOD93 유전자의 발현을 확인한 도면이다. C, control (pBI101 벡터만으로 형질전환된 식물체); #2, IbENOD93 형질전환체 라인 #2; #4, IbENOD93 형질전환체 라인 #4.

도 8은 본 발명에 의한 고구마 IbENOD93 cDNA가 삽입된 기내배양 당근 형질전환체의 뿌리 성장을 대조구와 비교한 도면이다. C, control (pBI101 벡터만으로 형질전환된 식물체); #2, IbENOD93 형질전환체 라인 #2; #4, IbENOD93 형질전환체 라인 #4.

도 9는 본 발명에 의한 고구마 IbENOD93 cDNA가 삽입된 토양재배 당근 형질전환체의 뿌리 성장을 대조구와 비교한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0069] 실시예 1: 고구마 IbENOD93 유전자 cDNA의 염기서열 분석

[0070] 고구마의 어린 괴근에서 RNA를 추출하여 EST(Expressed Sequence Tag) 라이브러리를 구축한 후 2,859개의 EST를 클로닝하여 NCBI에 등록하였다(NCBI accession numbers: BU690119 - BU692977, You et al., 2003, FEBS Letters 536, 101-105). 이 들 EST 중, ENOD93 단백질과 상동성이 높은 cDNA가 확인이 되었으며, 이 cDNA의 염기서열을 결정하여 분석한 결과 75 bp의 5' 비 번역지역, 312 bp ORF(Open Reading Frame; 103개 아미노산), 그리고 190 bp의 3' 비 번역지역을 포함하고 있는 전체 577 bp로서 구성되어 있었다. 이 중 ORF 염기서열을 NCBI에 'cDNA sequence of IbENOD93 cloned from sweetpotato'라는 이름으로 등록하였다(NCBI accession no. KC915011).

[0071] 실시예 2: IbENOD93의 발현 양상 분석

[0072] (1) Northern 분석 방법

[0073] IbENOD93의 발현 양상을 확인하기 위해 저장뿌리가 발달하기 전(FR stage)의 개체로부터 실뿌리(FR; Fibrous root (diameter <0.2 cm)), 줄기 및 잎 그리고 저장뿌리 발달 초기(YSR stage)의 개체로부터 뿌리(YSR; Young Storage Root (diameter 0.5 ~ 1.0 cm)), 줄기, 잎, 그리고 저장뿌리가 완전히 성장하고 난 후의 개체(MSR stage)로부터 실뿌리조직(FR-MSR; Mature Storage Root(diameter >5.0 cm))(도 1a 참조)으로부터 전체 RNA를 4.4M guanidinium-SDS lysis buffer (chirgwin et al., 1979)와 5.7M CsCl gradient method (Glisin et al., 1974)를 사용하여 추출한 후 약 25 μ g의 전체 RNA (total RNA)를 1% 아가로즈-포름알데히드 겔(agarose-formaldehyde gel)에 전기영동하고, Tropilon-plusTM (Tropix, USA) 나일론막(nylon membrane)에 전이(transfer)시켰다.

[0074] 프로브(Probe)는 577bp IbENOD93 cDNA를 함유하고 있는 2.5ng의 플라스미드(plasmid), dCTP를 제외한 100 μ M dNTP mix, 100 μ M의 dCTP-biotin, 10 μ M의 벡터(pBluescript II) 프라이머 T3 (5'-AATTAACCTCACTAAAGGG-3', 서열번호 5) 와, T7 (3'-CGGGATATCACTCAGCATAATG-5', 서열번호 6), 1 PCR 버퍼(buffer)와 1 unit의 Taq 폴리머라제(polymerase)를 각각 첨가하여 최종부피가 10 μ l되도록 조정하고, 95 에서 5분간 처리하여 95 $^{\circ}$ C 30초, 58

℃ 20초, 72℃ 30초를 30회 증폭하여 제작하였다.

[0075] 상기 PCR로 증폭된 비오틴으로 표지된 프로브(biotinylated probe)는 QIAquick™ PCR purification kit (QIAGEN, Germany)로 정제하였고, 약 100ng을 막(membrane)에 첨가하여 65℃ 혹은 68℃에서 18시간 동안 혼성화(hybridization)하였다. 2X SSC/1% SDS를 실온에서 5분 2차례, 0.1 SSC/1% SDS로 15분 2차례, 그리고 1X SSC로 실온에서 5분 2차례 처리하였다. 프로브 검출(Probe detection)은 Southern-star™ kit(Tropix, USA)를 사용하여 실시하였다. 블롯(Blot)을 블로킹 버퍼(blocking buffer) (1 PBS, 0.2% I-Block™ Reagent와 0.5% SDS)로 처리한 후, 스트렙타비딘 결합 알칼리성 포스파타제(Alkaline phosphatase conjugated streptavidin)를 붙여준 다음 CDP-Star™ Ready-to-Use를 처리해 주었다. 막(Membrane)은 X-ray film (Fujifilm, Japan)에 10분-1시간 30분간 노출하였다.

[0076] (2) IbENOD93의 발현 양상 확인

[0077] IbENOD93은 저장뿌리 발달 전 개체의 실뿌리 (fibrous root) 조직에서 확인되었으며, 저장뿌리 발달 초기의 어린 저장뿌리에서 그 발현 양이 증가하였다. 하지만, 저장뿌리가 완전히 성장한 개체의 실뿌리에서는 발현하지 않았다. 지상부에서는 저장뿌리 발달 전 개체의 잎 조직, 어린 저장뿌리 단계의 줄기 조직에서 약하게 발현하였다(도 1b). 즉 이러한 발현 양상은 IbENOD93이 주로 뿌리에서 발현하고 있으며, 그 발현 양이 저장뿌리 발달 초기에 더욱 더 증가함을 나타낸다.

[0078] 실시예 3: 세포내 IbENOD93 유전자의 발현 위치 분석

[0079] IbENOD93의 세포내 발현 부위를 확인하기 위해 담배 식물을 이용한 Agroinfiltration 실험을 수행하였다. CaMV 35S 프로모터와 GFP가 삽입되어 modify된 pCambia1300 벡터(pCambia1300-smGFP)의 멀티클로닝 사이트의 제한효소 *Xba* I과 *Bam* HI 사이에 IbENOD93 유전자를 삽입 하였다. IbENOD93의 코딩 염기서열 (309 bp)을 PCR을 이용해 증폭시키기 위해 5' 방향 프라이머는 *Xba* I 제한효소 인식부위를 첨가시키고 (ENOD(1)F-*Xba*I 5'-GTCTCTAGAATTGAACAAACATAGCTTTTCTTGAATTT-3', 서열번호 7), 3' 방향 프라이머에 *Bam* HI 제한효소 인식부위를 첨가시켜 (ENOD(373)R-BamHI 5'-GTAGGATCCCATCAATGTTGGCGGAG-3', 서열번호 8) PCR로 증폭시켰다. 이 PCR 산물을 smGFP와 프레임에 맞게 pCambia1300-smGFP 벡터에 삽입 시킨 후(도 2a), Agroinfiltration 실험을 위해 아그로박테리움 GV3101에 형질전환하였다. Agroinfiltration 분석을 위하여 한 달 동안 온실에서 키운 담배가 사용되었다. 상기와 같이 제작된 타겟팅용 벡터를 포함하고 있는 *Agrobacterium*을 50 mg/L kanamycin과 25mg/L rifampicin이 포함된 3 mL YEP 액체배지에서 하루 동안 28℃에서 키운 후 배양액의 500 μ L를 취하여 50 mL YEP 액체배지에서 배양하여 OD₆₀₀ 값이 1.0이 되도록 키운 후 5000g, 상온에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 침전물에 50 mL infiltration buffer [10 mM MgCl₂, 10 mM MES-KOH (pH 5.7), 200 μ M Acetosyringone]를 넣어 현탁 시킨 후 다시 동일 조건에서 원심분리하고 상층액을 제거한 후 다시 infiltration buffer를 OD₆₀₀ 값이 1.0이 첨가하였다. OD₆₀₀ 값이 1.0으로 맞춰진 배양액을 상온에서 2-4 시간동안 방치한 후 주사기를 이용하여 담배 식물의 잎에 infiltration을 실시하였다. Agroinfiltration 실시 후 2-3일에 잎을 채취하여 공초점 현미경(LSM 700; Carl Zeiss)을 이용하여 GFP의 위치를 확인하였다. 대조구(GFP)에서는 세포질과 핵에서 GFP 단백질의 형광이 관찰되었으나, IbENOD93 단백질은 대조구와는 상이한 양상을 보였으며, 엽록체를 염색하는 Rhodamine 염색에 의한 엽록체의 위치와 IbENOD93 단백질의 발현 위치가 일치하고 있음을 알 수 있었다(도 2b). 이 결과는 IbENOD93 단백질이 식물의 색소체에 위치하고 있음을 시사한다.

[0080] 실시예 4: 저장뿌리에서 IbENOD93 유전자의 발현 부위 분석

[0081] IbENOD93의 저장뿌리 조직 내 발현 부위를 확인하기 위해 in situ hybridization을 실시하였다. 이를 위해 직경이 0.5 cm 인 저장뿌리의 횡단면을 잘라서 FAA 용액 (50% ethanol, 5% acetic acid, 3.7% formaldehyde)에 4℃에서 10일간 처리한 후, 샘플을 연속적으로 높아지는 농도의 에탄올로 (50, 60, 70, 80, 90, 95, 100%) 30분씩 탈수시킨 후 파라핀에 5일간 임베딩 (embedding) 시켜 10 μ m 두께로 섹션 (section) 하였다. 섹션을 일련의 처리 (hydration, proteinase K 처리, acetylation, dehydration)를 거친 후 크실렌 (xylene)으로 처리하였다. In situ hybridization 을 위하여 사용된 IbENOD93 probe는 전체 시퀀스를 DIG RNA labeling kit (Roche,

Germany)의 digoxigenin-UTP로 sense와 antisense로 각각 만들었다. 이를 위하여 IbENOD93 cDNA가 삽입된 pBluescriptII SK vector로부터 sense 프로브는 BamHI으로 antisense 프로브는 KpnI으로 처리한 후 각각 T3와 T7 polymerase로 2시간 동안 RNA를 합성하고 Na₂CO₃와 NaHCO₃를 이용하여 60℃에서 40분 동안 shearing하여 원하는 크기를 얻어 probe를 준비하였다. 42℃에서 2시간동안 humid chamber에서 prehybridization을 실시하고 IbENOD93의 sense와 antisense probe를 포함한 hybridization buffer를 넣어 42℃에서 16시간 동안 humid chamber에서 hybridization을 실시하였다. Alkaline phosphatase가 결합된 anti-DIGbody(Roche, Germany)를 이용하여 immunological detection 하였다. 보라색으로 발색된 슬라이드는 광학현미경(OLYMPUS BX51, Japan)으로 촬영하였다.

[0082]

IbENOD93의 mRNA는 저장뿌리의 형성중에 주로 분포하고 있었는데, 그 중에서도 일차 형성층(PC; primary cambium)과 이차 형성층(SC; secondary cambium)에서 강하게 발현하고 있었다(도 3). 일차 형성층과 이차 형성층은 고구마의 저장뿌리가 초기 비대 성장을 할 때 가장 활발히 세포 분열이 일어나는 곳을 감안할 때 이러한 발현 양상은 IbENOD93의 기능이 고구마 저장뿌리 비대 성장 초기에 관련되어 있음을 시사하고 있다.

[0083]

실시예 5 : 식물 호르몬 처리에 의한 IbENOD93의 발현 조절 분석

[0084]

IbENOD93 유전자의 오옥신(Indole-3-acetic acid; IAA), 자스민산(JA), 그리고 사이토신(6-benzylaminopurine; BA) 처리에 의한 전사 조절을 조사하기 위해 IbENOD93-특이적인 프라이머를 (서열번호 9인 IbENOD93(360)F 5'-CATCATCTCATTACTCATACATCCAAACA-3' 과 서열번호 10인 IbENOD93(512)R 5'-CAGTCTCCGCCAACATTGATG-3') 사용하여 실시간(real-time) RT-PCR을 수행하였다.

[0085]

고구마 뿌리에 다음과 같은 방법으로 호르몬을 처리하였다. 단일 엽병에 단일 잎이 달린 고구마를 채취하여 물이 채워진 플라스크에 3 주간 담가 두었다. 엽병의 말단에서 싹뿌리가 발달하면 이것들을 다양한 농도(0, 50, 100, 200, 500, 1000, μM)의 IAA, JA, BA 용액으로 옮겨 25℃, 암 상태에서 3시간 동안 방치하였다. 처리 후 RNeasy Plant Mini Kit™ (Qiagen)를 사용하여 전체 RNA를 추출하여 실시간 RT-PCR 분석에 이용하였다.

[0086]

전체 RNA(5 μg)를 SuperScript III first-strand cDNA synthesis kit (Invitrogen)를 사용하여 first strand cDNA를 합성한 후 30 μl TE에 희석하여 PCR에 사용하였다. 합성된 cDNA는 실시간 RT-PCR 분석을 위하여 총 20 μl중 1 μl를 사용하였으며 반응 부피는 총 16 μl이 되도록 1KAPA SYBR FAST Master mix(KAPABIOSYSTEMS)을 사용하였다. 실시간 PCR은 LightCycler 480 quantification system (Roche diagnostics)를 사용하여 실시하였으며, 발현 정도는 5' -CACTACCAGCCACCACTGT-3' (서열번호 11) 와 5' -CAGATCCTCACGAGCTTCAC-3' (서열번호 12) 프라이머를 사용하여 증폭되는 고구마 β-tubulin 발현 양으로 보정(normalize)하였다. 실시간 PCR은 처음에 95℃에서 10분간 처리한 후, 45회의 95℃ 10초, 58℃ 10초, 72℃ 20초를 반복하였다. Melting 곡선 분석은 65℃-97℃에서 수행하였으며, LightCycler 480 quantification software(Roche Diagnostics)의 second derivative maximum method를 사용하여 데이터를 취하였다.

[0087]

다양한 농도(0, 50, 100, 200, 500, 1000 μM)의 IAA, JA, 그리고 BA를 3 시간동안 처리하였을 경우 IbENOD93 mRNA 수준이 조절되는 양상을 보였는데 (도 4), 500 μM의 IAA와 200 μM의 JA에서 IbENOD93의 전사물 수준이 강하게 증가하였다. 반면에 BA 처리에서는 100 μM 이상에서 IbENOD93의 전사물 수준이 약하게 증가하였다. 한편, 고구마 저장뿌리의 초기 비대성장을 촉진한다고 밝혀진 MADS-box 유전자들은 (SRD1, IbMADS1) IAA 혹은 JA 처리 시에 그 전사물의 수준이 강하게 증가한다고 보고되었다(Noh et al., 2010, Journal of Experimental Botany 61, 1337-1349; Ku et al., 2008, Annals of Botany 102, 57-67). 이런 결과들을 참고할 때, IAA와 JA의 처리에 의해 IbENOD93 전사물의 수준이 강하게 증가함은 IbENOD93 유전자가 고구마의 저장뿌리 비대 성장을 촉진할 수 있는 가능성을 시사하고 있다.

[0088]

실시예 6 : 바이너리 벡터 제작 및 당근 형질전환

[0089]

당근에서 IbENOD93 유전자의 저장뿌리 발달 관련 기능을 분석하기 위해 과다발현용 바이너리 벡터를 제작하였다. 저장뿌리 특이적으로 IbENOD93의 발현을 유도하기 위해 본 실험실에서 개발된 바 있는 뿌리 특이 발현 프로모터인 SRD1 프로모터(Noh et al., 2012, Transgenic Research 21, 265-278; 국내특허등록번호 10-0604186; 미국특허등록번호 US7,273,967; 일본특허등록번호 4233569; 중국특허등록번호 ZL200480024420.8; 캐나다특허등록번호 2,544,798)에 IbENOD93을 연결하여 pBI101에 삽입하여 형질전환용 바이너리 벡터를 제작하

였다. 이를 위해 기 제작된 3.0 kb SRD1 프로모터가 삽입된 pBI101 벡터에서 GUS 유전자를 삭제하고 그 자리에 고구마의 IbENOD93 유전자를 삽입 하였다. IbENOD93 유전자의 5' 방향 프라이머(5'-CATCCGGGATTGAACAAACATAGCT-3', 서열번호 13)는 SmaI 제한효소 인식부위를 첨가시키고, 3' 방향 프라이머(5'-CATGAGCTCCATTGTTGGTCATACAACA-3', 서열번호 14)에 SacI 제한효소 인식부위를 첨가시켜 PCR로 증폭시켰다. 이 PCR 산물을 SRD1 프로모터가 삽입된 pBI101 벡터에 삽입 시키고, SmaI 과 SacI을 처리하여 확인하였다(도 5).

[0090]

이렇게 제작된 벡터 P_{SRD1}-IbENOD93을 아그로박테리움 LBA4404에 transformation 시킨 후 M9 배지에 이들 동안 배양한 후 형질전환을 위해 공동배양에 사용하였다. 기내에서 키운 하파5촌당근(신젠타종묘)은 하배축이 자라나도록 MS 배지에 키운 후 하배축이 0.5-1.0 cm 크기로 자라나면, 하배축을 절단하여 암상태로 25℃에서 이들 동안 MS 액체 배지에서 배양하였다. M9배지에서 배양된 *Agrobacterium* LBA4404를 원심분리하여 수확한 후 배양된 하배축과 함께 5-10분 동안 MS 액체배지 내에서 공동 배양한 후 새로운 MS 액체배지로 세척하여, 2,4-D가 함유된 MS 배지로 옮겨서 배발생 캘러스를 유도하였다. 유도된 배발생 캘러스는 카나마이신(kanamycin)과 2,4-D가 함유된 배지로 옮겨 3-4주 간격으로 계대배양을 하면서 형질전환 캘러스를 선별하였다. 형질전환 캘러스에서 배발생 캘러스를 유도 한 후 2,4-D를 제거시킨 MS 배지에서 당근 식물체를 재분화시킨 후 식물체의 지상부가 5-10 cm로 자라면 흙으로 옮긴 후 순화 과정을 거쳐 25℃, 16/8 시간(빛/암) 조건으로 growth chamber에서 재배하였다.

[0091]

실시예 7 : 당근 형질전환체 확인 및 발현 분석

[0092]

당근 형질전환체에서 IbENOD93 유전자의 삽입을 확인하기 위해 게놈 DNA를 추출하였다. 기내배양 형질전환 당근의 본엽이 3-4 장 나오면 잎 (100 mg)으로부터 extraction buffer (200 mM Tris- pH7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) 600 μ l를 넣어, LN2에 얼린 뒤, 조직을 갈았다. 원심분리하여 상층액 500 μ l와 isopropanol 500 μ l를 넣어 침전한 후 원심분리하여 pellet은 washing 후에 30 μ l TE buffer에 녹였다. 프라이머를 제작하여 게놈 PCR을 수행하여 형질전환체 여부를 확인하고 기내에서 지속적으로 재배하였다. 형질전환체 확인을 위한 PCR은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 게놈 DNA 3 μ l를 주형 DNA로 이용하고 iTaq polymerase (Intron) 2 Unit을 전체 20 μ l 반응 volume에 사용하였다. 형질전환체를 확인하기 위해 각각 당근 EF1a(elongation factor 1-alpha) 프라이머와(서열번호 15인 5'-GGAACCTCTCAGGCTGATTGTG-3'과 서열번호 16인 5'-ACAATTTCTCAAACTAGACTTGAA-3') 삽입된 IbENOD93 유전자 특이 프라이머 (서열번호 13인 5'-CATCCGGGATTGAACAAACATAGCT-3'과 서열번호 14인 5'-CATGAGCTCCATTGTTGGTCATACAACA-3')를 사용하여 형질전환체를 확인하였다. PCR 증폭은 95℃에서 3분간 충분히 게놈 DNA를 denature 시킨 후, 35 사이클의 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초를 수행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 extension을 실시하였다. PCR 산물을 1.3% 아가로스 젤에서 전기영동하여 EF1a 유전자(400 bp)와 SRD3 유전자(530 bp)에 해당하는 PCR 산물을 확인하였다. 당근 EF1a 유전자는 대조구(C: pBI101 벡터만으로 형질전환된 당근)와 IbENOD93 이 삽입된 형질전환체 2번과 4번에서 모두 관찰 된 반면, IbENOD93 유전자는 대조구에서는 확인되지 않고 IbENOD93 당근 형질전환체 2번과 4번에서 확인되었다(도 6). 이 결과는 당근 형질전환체 2번과 4번의 게놈에 IbENOD93 유전자가 삽입되었음을 시사한다.

[0093]

당근 형질전환체에 삽입된 IbENOD93 유전자의 발현을 확인하기 위해 3개월간 기내 배양한 형질전환체로부터 약 100 mg의 뿌리조직을 취하여 Trizol 500 μ l를 넣어, LN2에 얼린 뒤 조직을 마쇄하였다. Choroform 250 μ l를 첨가하여 원심분리하여 상층액 250 μ l와 isopropanol 250 μ l를 넣어 침전하였다. 원심분리한 후 pellet을 washing 후에 30 μ l RNase-free water에 녹였다. 각 샘플 당 전체 RNA 5 μ g을 RevertAid Reverse Transcriptase (MBI Fermentas, # EP0441)로 cDNA를 합성하였다. 합성 후 1/5 dilution하여 PCR에 이용하였다. 상기 EF1a 프라이머와 삽입된 IbENOD93 유전자 특이 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭은 95℃에서 3분간 denature 시킨 후, 35 사이클의 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 30초를 수행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 extension을 실시하였다. PCR 산물을 1.3% 아가로스 젤에서 전기영동하여 EF1a 유전자(400 bp)와 IbENOD93 유전자(530 bp)에 해당하는 PCR 산물을 확인하였다. IbENOD93 유전자의 mRNA가 대조구(C: pBI101 벡터만으로 형질전환된 당근)에서는 확인되지 않고 당근 형질전환체 2번과 4번에서만 확인되었다(도 7). 이 결과는 삽입된 IbENOD93 고구마 유전자가 당근의 뿌리 조직에서 발현하고 있음을 나타낸다.

[0094]

실시예 8 : 형질전환 당근의 뿌리 성장 분석

[0095]

P_{SRD1}-IbENOD93 벡터로 형질전환 시킨 당근의 하배축을 Kanamycin과 2,4-D가 함유된 선발배지에서 배양하여 배발생 캘러스를 유도하고, 선발된 배발생 캘러스는 2,4-D를 제거시킨 MS 배지에서 당근 식물체로 재분화시켰다. 캘러스로부터 어린 식물체의 지상부가 재분화되면 한 개체씩 분리하여 약 200 ml의 동일한 MS 배지를 함유하는 마젠타박스로 옮겨 지속적으로 재배하여 직근을 유도하였다. 3개월의 기내배양을 거친 후 배지를 제거하고 형질전환 식물체와 대조구의 직근 발달의 차이를 관찰하였다. 이때 대조구 (C) 식물은 P_{SRD1}-IbENOD93 벡터 제작 시에 사용되었던 pBI101 벡터로 형질전환된 당근 식물체를 사용하였다. 지상부 성장을 대조구와 IbENOD93-형질전환체에서 비교했을 때, IbENOD93 형질전환 당근 식물체 직근의 직경이 대조구 뿌리의 직경에 비해 현저히 커져 있음을 확인할 수 있었다(도 8). IbENOD93 형질전환체 직근의 직경은 11.0±2.0 mm인 반면 대조구의 직경은 2.7±0.7 mm였다(표 1). 이 결과는 IbENOD93 형질전환체 직근의 비대성장이 대조구 직근의 비대성장에 비해 현저히 빨리 진행되었음을 시사하며 이러한 직근 비대성장 촉진 양상은 IbENOD93 형질전환체 2개 라인 (#2, #4)에서 공통적으로 나타나는 일관된 표현형이었다.

[0096]

표 1

	Control	IbENOD93
Root diameter (mm) ^a	2.7 ± 0.7	11.0 ± 2.0

[0097]

^a Determined by measuring the largest diameter

[0098]

실시예 9: 형질전환 당근의 저장뿌리 생산 분석

[0099]

형질전환 당근의 저장뿌리 생산을 비교하기 위해, 재분화된 어린 형질전환 식물체를 토양으로 옮겨 순화 과정을 거친 후 생장상에서 3 개월 동안 재배하였다. IbENOD93 형질전환체의 경우 대조구(pBI101 벡터가 삽입된 형질전환체)에 비해 저장뿌리 비대 성장이 촉진되어 있음을 알 수 있었다(도 9a). 결과적으로 대조구의 저장뿌리 직경(1.83±0.13 cm)에 비해 IbENOD93 형질전환체의 직경(3.1±0.1 cm)이 약 1.7배 정도 증가하였다(도 9b). 또한, 지상부의 성장도 IbENOD93 형질전환체가 대조구에 비해 더 왕성하여서 형질전환체의 잎 길이(42.0±5 cm)가 대조구의 잎 길이(26.5±1.5 cm)에 비해 1.6배 정도 증가하였다(도 9c). IbENOD93 형질전환체에서 IbENOD93 유전자가 당근의 저장뿌리 특이적 발현을 유도하는 SRD1 프로모터의 조절 하에 있음을 상기할 때 이러한 결과는 저장뿌리 조직에서 IbENOD93 유전자의 발현이 저장뿌리의 비대 성장을 촉진하였으며, 그 결과 지상부의 성장도 아울러 촉진하였음을 시사한다. 결과적으로 저장뿌리의 비대 성장에 관여하는 IbENOD93 유전자를 발현시켜 조숙성의 당근 형질전환체를 생산하였다.

[0100]

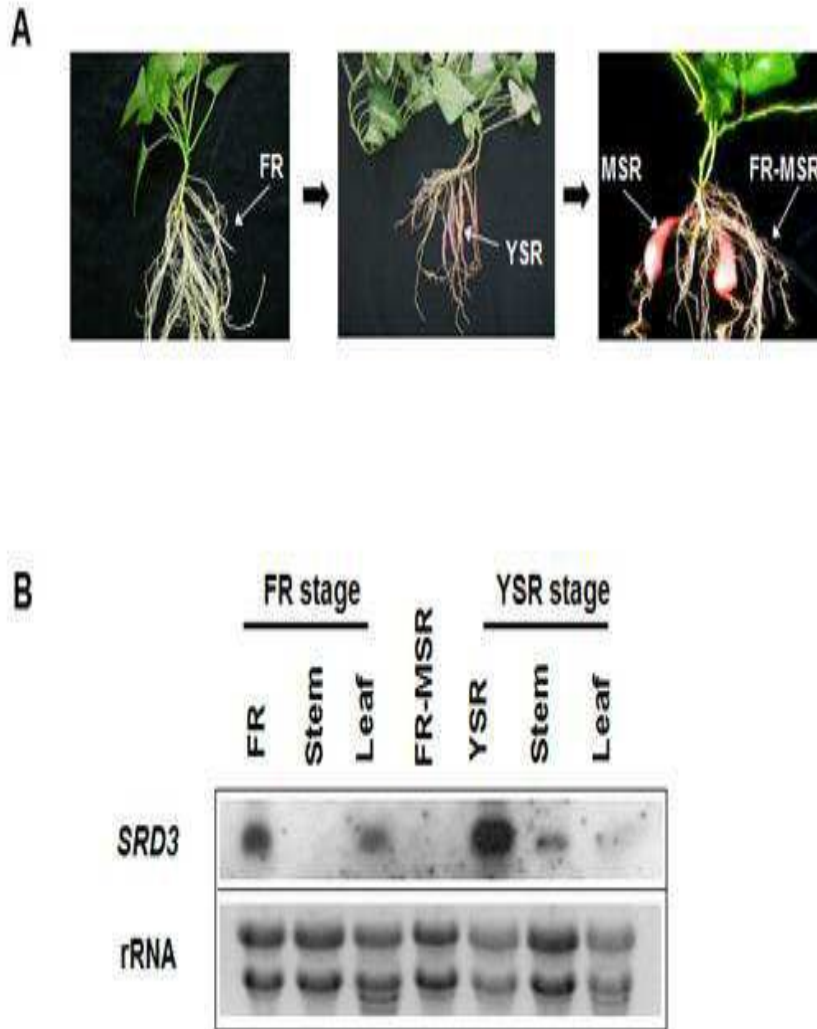
따라서 본 발명에 의한 IbENOD93 cDNA는 저장뿌리 및 지상부의 발달이 촉진된 형질전환 식물체 생산에 효과적으로 이용될 수 있다.

[0101]

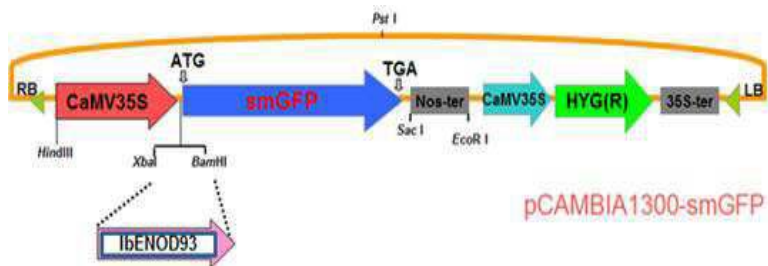
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

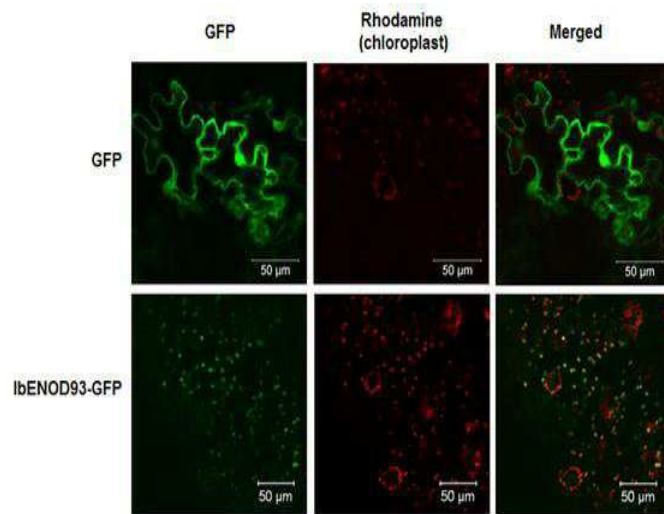
도면1



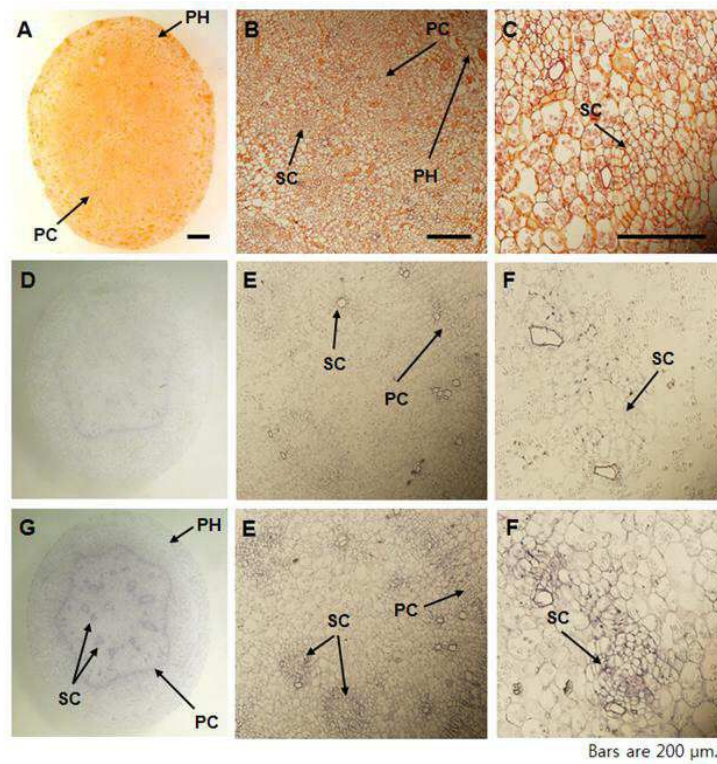
도면2a



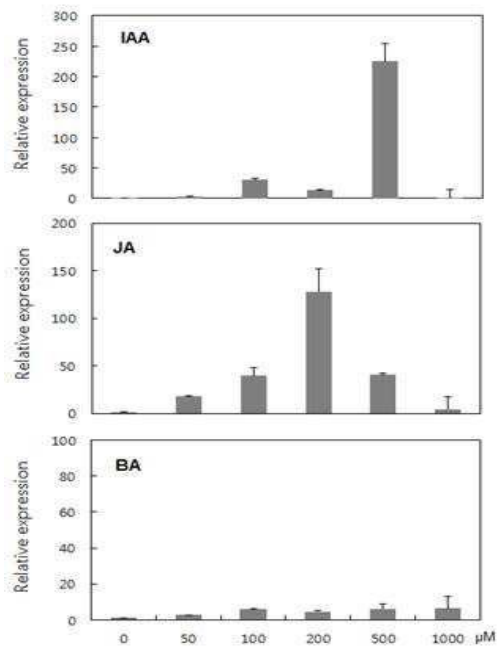
도면2b



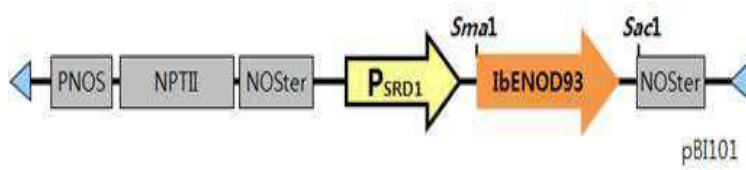
도면3



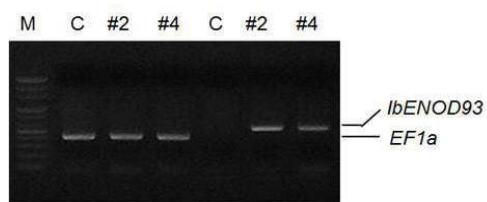
도면4



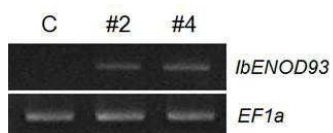
도면5



도면6



도면7



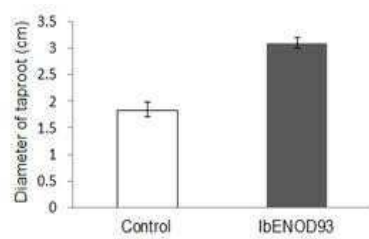
도면8



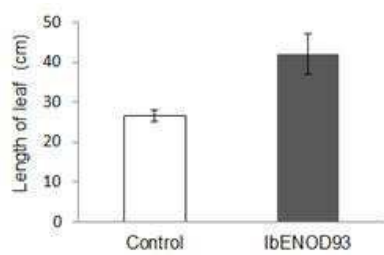
도면9a



도면9b



도면9c



서열목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Novel Gene IbENOD93 and Transgenic Plants Using the Same

<130> KU1.42p

<160> 16

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 577

<212> DNA

<213> Ipomoea batatas

<400> 1

ggcacgagga ttgaacaaaa catagctttt tcttgaattt gactacttca gctcttcgtt 60

tgtatcagca atataatggc gggcaagaat gtgagtttgg cttcttttga ccagaggttg 120

gccaatggcca aacgttgctc tcatgagggt gtagttgcag gcgctaaagc agctgtggct 180

gccaccattg caacagctat tccaacattg gctagtgtga gaatgctgcc atgggcaaga 240

gccaatttaa acccaacagc acaggcactg atagtctcaa cagccgctgg gatggcttac 300

ttcatttggt ctgacaagac tgttcttgct acggctcgcc gcaactcctt caagaatggc 360

tcagtctccg ccaacattga tgcctgatct tgattatata ttattatatg catcatattt 420

tatctgatct ccctgctact caatccatt catttcaaga aggggggtag ggggtggagt 480

tctgttttga tgtatgacta ctgagtatga tgaatgatga atactgttgt atgaccaaca 540

atgtcctgtg aatataaaca aaaagtttgt ttttccc 577

<210> 2

<211> 103

<212> PRT

<213> Ipomoea batatas

<400> 2

Met Ala Gly Lys Asn Val Ser Leu Ala Ser Leu Asp Gln Arg Leu Ala

1 5 10 15

Met Ala Lys Arg Cys Ser His Glu Gly Val Val Ala Gly Ala Lys Ala

20 25 30

Ala Val Ala Ala Thr Ile Ala Thr Ala Ile Pro Thr Leu Ala Ser Val

35 40 45

Arg Met Leu Pro Trp Ala Arg Ala Asn Leu Asn Pro Thr Ala Gln Ala

50 55 60

Leu Ile Val Ser Thr Ala Ala Gly Met Ala Tyr Phe Ile Val Ala Asp
 65 70 75 80
 Lys Thr Val Leu Ala Thr Ala Arg Arg Asn Ser Phe Lys Asn Gly Ser
 85 90 95
 Val Ser Ala Asn Ile Asp Ala

100

<210> 3

<211> 312

<212> DNA

<213> Ipomoea batatas

<400> 3

atggcgggca agaatgtgag ttggtcttct ttggaccaga ggttggccat ggccaaacgt 60

tgctctcatg aggtgttagt tgcaggcgct aaagcagctg tggtgccac cattgcaaca 120

gctattccaa cattggctag tgtgagaatg ctgccatggg caagagccaa tttaaaccce 180

acagcacagg cactgatagt ctcaacagcc gctgggatgg cttacttcat tgtggctgac 240

aagactgttc ttgtacggc tcgccgcaac tccttcaaga atggctcagt ctccgccaac 300

attgatgcct ga 312

<210> 4

<211> 3010

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SRD1 promoter

<400> 4

ggctggtttc taagacattt ttggtttta tccaaaccta attacaaata ttcccaacaa 60

gatcgaatga tctatggcta caaacctat cccaacaaaa aactacattt agtacatcaa 120

attaagtggc atgattattt tattttgttc gacaaagtag catcaaataa actacaaaaa 180

aaactacatc attacaaaaa gactaattat caggcatcaa tgtagtata tgggaggtgg 240

tgggttcgag cctcagtggg ggcgttgctg tctctttgtt cttcagtagg ttgagagagt 300

aatttatgaa cagatactac actgtaatag agtcagtagc aatcaaaaaa aaatttgttt 360

taataatata ctaatatatt atttttctaa ccagtactat gctttcggtt ttccagaagg 420

cagaagccta aaaaattcaa ttaagtttat aaactttaat ccacttggtt gagtaattga 480

gtatctttca gaacggttgt agatttaggt gggatgacaa atggtattcc aaagttcaag 540

atatttcttt ttagatttag gaattttag tcttttaagg ttagaggta cttaaaagga	600
tgaacaaatt ttttatccca ttctatttct aggaagaatt tataatccgt acgtgtgacg	660
gctgccatta attatagtc ccattcattt ttattgggaa aaagtactca tccattattt	720
cattggcagc gcaacccagt tttaaatatt ttataacaat aataacatat ggaaccaa	780
tgtaaccttt atatccaca gaccacaca ttacacatcc aataaaactt gagccaaatt	840
atatattagc gttactgagt actgactaaa atatattttt aaaatatact aaaatattat	900
taaaaaaata ttaaaatagt aaaattatat taaatagaaa atttaattta atcaaagaat	960
accaactaaa acgtataaaa tgagaaaata taggtatata atattgatga ttccttttga	1020
tttttttttt atgatccgaa aattcttttg ccataagaag agtaaatgaa caatttaaac	1080
taagaaaata agtaagtgtc tcctatgtga ttaatatata aagtgagatt tgagctgttg	1140
atctatatta ttgaattaga tcaacgactc aaaatgaagg ataatttttt taaaaaatcg	1200
cttctgtta atattaatgc tttaaaatta agcacattaa actttaaaat aatgcacctt	1260
tttttttaat actattgacc ttgttacatg tagtatctga agtccaacaa agtcaacatt	1320
gtccccactg aggcctcaaac ccgtgacctc ccactaggga gaatcgcttc atgccgcttg	1380
accacaagtc ctttggtaaa aataatgcac cttaaagatg taaacttacg catcttcgat	1440
gaactgacca ctttgagctt gcaacttata cttttttgaa gataagcttg taacttatta	1500
taatgggtcta ttaacattaa aaaaaaaaa agtttcacaa tcaaattata atattttag	1560
ccaaatgaat ttaccgctgg tgtgactatt caggaattta aatacactaa agttggaggg	1620
gtagtacact caatacacta ttgctcatga cttttttctt cttttttttt tagattagct	1680
aatatattaa tcccaaatag aaacgtttac accaaagtgc gaaaaaatgt tgtgtcattt	1740
cttacagtta gacacaaaaa taacattttt agctaagtta cagtaaaactt gattggcaga	1800
ctgtttcaca aattggggagc ttggatcctt gaaggaactt actgctttct tagagtcatt	1860
aatggtttgg ccaacatag aaaagattag ttgagcagtc ttgcacacta cttgagtaat	1920
catctccatt cttctactta ttgacaatat tctcttatga aaaaacacac ttgatcttat	1980
atcagttagg gatttgaccg gtttattaaa ggatagccta ccaactttgt tgaacgacat	2040
atcatcatat catgattcaa aagatgctct tttttattgt catatttgtg gcacaggatg	2100
agtacagttt cgcatacacc atgatcattt ttatcaaate atactctata aaaccctgtc	2160
aaagaaaaga gaggaagaaa cgagaagaag aaactcatcc aagaacaag aggaacatta	2220
ttgctcatga ttagatcgac ttgaacatgt actaatgcca atctcaaatt acctacatag	2280
gtgtgttaga caaatatttg ttaattagct gattgactta atggatttga ctagttgtta	2340
acattaattg attgtaggaa attgttttgt aaattagtgt ttagttgata gttgattaca	2400

tgaaaattac ttctcaaaa agcttatcga aaaaactatt ttgaacagct tttgaattt	2460
taacatttta taacaataag ttgttacaaa aagctaatta atcaaatact catatccatt	2520
gtttaacat gtcaacaac taataataat taaataattt gtttttaaaa tataagttaa	2580
atttaattga taagctaact atattacca acataccgta atatcttctt aaccgcggtg	2640
tgggctaaga tatgattgta tactatcttt gtgagcagca tgattaatac agtaatacca	2700
tcatcttaaaa gtggaacca cattcgagc gtgttcgaa agcaaacagc taacatttgc	2760
taggttctta cttatgcatt aatctgggtt ataaaatccc catttccatg ttggtgtgaa	2820
caaccaccta aacctagcgt cttcaacaat tctaccctac tatcatcccc caagacttcc	2880
ccgaccagta aataaccgcg tttctctctt cagtgatttc ttcatttgac ttgctatat	2940
atatatataa tctgatctgc tttcatcttt cagtgatttc ttcatttgga tttcttcagg	3000
gaggagaagg	3010
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
aattaaccct cactaaaggg	20
<210> 6	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
cgggatatca ctcagcataa tg	22
<210> 7	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
gtctctagaa ttgaacaaaa catagctttt tcttgaattt	40

<210>	8	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	8	
	gtaggatccc atcaatgttg gcggag	26
<210>	9	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
	catcatactc attactcata catccaaaca	30
<210>	10	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
	cagtctccgc caacattgat g	21
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
	caactaccag ccaccaactg t	21
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	

cagatcctca cgagcttcac

20

<210> 13

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

catcccgga ttgaacaaa catagct

27

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

catgagctcc attgttggtc atacaaca

28

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

ggaacctctc aggtgattg tg

22

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

acaatttcct caaatctaga cttggaa

27