



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097867
(43) 공개일자 2017년08월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/8273 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-0019496
- (22) 출원일자 2016년02월19일
 심사청구일자 2016년02월19일

- (71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
- (72) 발명자
윤대진
경상남도 진주시 평거로39번길 9 107동 1106호
백동원
경상남도 진주시 금산면 금산로 123 흥한골든빌아파트 1104동 704호
아크타르 알리
경남 진주시 진주대로 501 경상대학교 27동 321호
- (74) 대리인
김동완

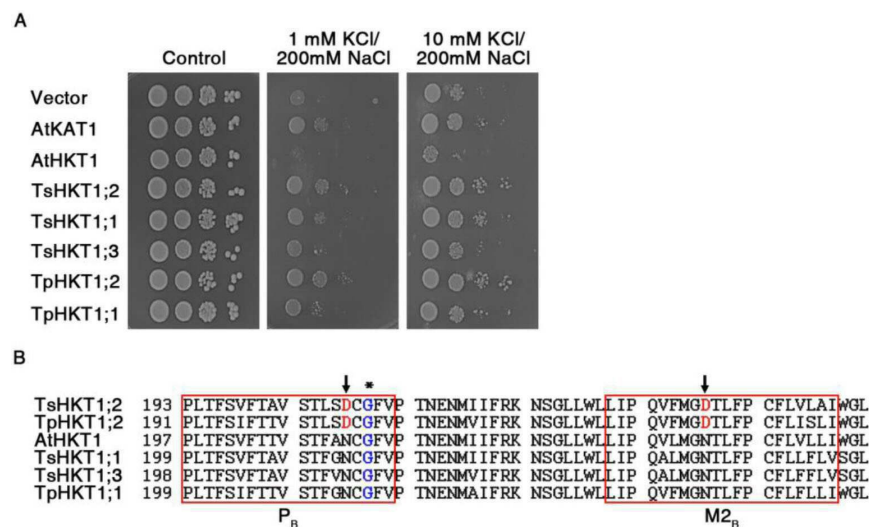
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **고염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체**

(57) 요약

본 발명은 HKT1 수송체 단백질을 과발현하는 고염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니고 207번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지니는 텔루지엘라 살수기니아 TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하여 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유지시킬 수 있는 고염분 스트레스 저항성을 지니는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/415 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015-0403
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	경상대학교산학협력단
연구사업명	세계수준의 연구중심대학 육성 사업
연구과제명	극지생존 식물로부터 유용유전자 확보 및 재해저항성 작물체 개발
기 여 율	1/2
주관기관	식물생명공학연구소
연구기간	2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2015-0409
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	경상대학교산학협력단
연구사업명	세계수준의 연구중심대학 육성 사업
연구과제명	건조 스트레스에 대응하는 식물 생체방어 유전자의 동정 및 친환경 작물체 개발
기 여 율	1/2
주관기관	한국연구재단
연구기간	2015.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 텔룬지엘라 살수기니아 TsHKT1;2 수송체 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 두 번째 포어 루프 도메인 내의 207번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지닌 수송체 단백질은 고 염분 배지 내에서 칼륨 이온에 높은 선택성을 지니는 칼륨 이온 수송체로 기능하는 반면 207번째 아미노산 잔기를 아스파라긴(N)으로 치환할 경우 나트륨 이온 수송체로 기능함을 특징으로 하는 TsHKT1;2 수송체 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 2

서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 탈리아나 AtHKT1 수송체 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 두 번째 포어 루프 도메인 내의 211번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지닌 수송체 단백질은 고 염분 배지 내에서 칼륨 이온에 높은 선택성을 지니는 칼륨 이온 수송체로 기능하는 반면 211번째 아미노산 잔기를 아스파라긴(N)으로 치환할 경우 나트륨 이온 수송체로 기능함을 특징으로 하는 AtHKT1 수송체 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 아라비돕시스 탈리아나 AtHKT1 수송체 단백질 내의 68번째 잔기 세린(S)의 글리신(G)으로의 치환은 칼륨 재흡수를 증가시키는 기능을 수행함을 특징으로 하는 AtHKT1 수송체 단백질을 포함하는 조성물.

청구항 4

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니고 207번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지니는 텔룬지엘라 살수기니아 TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하여 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유지시킬 수 있는 고염분 스트레스 저항성을 지니는 형질전환 식물체.

청구항 5

서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니고 211번째 아스파라긴(N) 아미노산 잔기를 지니는 아라비돕시스 탈리아나 AtHKT1 수송체 단백질을 과발현하여 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유지시킬 수 있는 고염분 스트레스 저항성을 지니는 형질전환 식물체.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 HKT1 수송체 단백질을 과발현하는 고염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니고 207번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지니는 텔룬지엘라 살수기니아 TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하여 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유지시킬 수 있는 고염분 스트레스 저항성을 지니는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 비생물학적 스트레스 중에도 토양의 염분화는 작물의 생산성과 수율을 감소시키는 주요한 요인이다. 염분화된 토양 내에서 농도-의존적으로 식물 성장 및 개화 발달 및 종자 생성의 능력은 심각하게 저해되고 있다. 염분화의 증가는 세포질 액상 삼투압 스트레스와 나트륨 이온 특이 독성을 유발하며 예를 들면 광합성 저해와 같은 생리학적 저해 효과, 단백질 안정성 및 함량 감소와 같은 생화학적 저해 또는 개화 지연과 같은 발달 경로상의 저해를 유발한다.
- [0003] 물 회수시 나트륨 이온 증가에 대처하기 위하여 나트륨 이온의 유입을 식물체가 제한하거나 나트륨 이온을 액포 내로 격자분리 시키는 경로가 존재한다. 또한 나트륨 이온의 유입을 피할 수 없는 경우 재수송시킬 수도 있다. 나트륨 이온 농도와 관계와 없이 식물체가 필수 영양소로 요구하는 칼륨 이온을 흡수할 수 있는 능력이 또한 중요하다.
- [0004] 나트륨 이온의 해로운 효과를 감소시키기 위해 식물체는 자체 보호를 위한 몇 개의 나트륨 수송 경로를 이용한다. 나트륨 이온을 뿌리로부터 분출시켜 전체 조직으로 나트륨 이온을 분배하기 위해서 염분 과다-민감성(SOS) 경로를 통한 수송체를 사용하여 특정 조직 내에 나트륨 독성 농도를 감소시키고 적절한 삼투압을 제공한다.
- [0005]
- [0006] $\text{Na}^+\text{-H}^+$ 교환(NHX)과 같은 다른 패밀리 멤버를 통해 액포 내로 이온을 격리시켜 세포질 나트륨 이온 독성을 감소시킬 수 있다. 상호 수송과는 별개로 HKT1-형 수송체 클래스가 나트륨 이온 독성으로부터 새싹을 보호하기 위해 물관부 스트림으로부터 나트륨 염을 회수한다. 이러한 매커니즘은 어느 정도 뿌리로부터 독성 이온의 순환을 통해 나트륨 이온 독성을 감소시킨다. 따라서 하부 조직의 손상으로부터 보호할 수 있는 것이다.
- [0007] 염분 스트레스 하에 HKT1 수송체의 주요한 역할은 아라비도시스 식물체 모형에서 잘 특성화되어 있다. HKT1-형 수송체는 염분 스트레스 하에서 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유지케 한다. 이러한 기능의 지표로 단자엽 식물 내에서 HKT1 수송체가 보고되고 있다. 다수 HKT1-형 유전자를 지닌 밀 및 쌀과 같은 곡물 내에서 이러한 수송체 패밀리의 일부 멤버가 염분 스트레스 저항성을 부여하는 중요한 요소로서 확인되고 있다.
- [0008] HKT1 수송체는 그 단백질 서열과 이온 선택성에 따라 두 개의 서브클래스로 분류된다. 클래스-1 멤버는 첫 번째 포어 루프 도메인(pB)에 세린 잔기를 포함하고 칼륨 이온보다 나트륨 이온에 더 높은 선택성을 나타낸다. 이와 반대로 클래스-2 멤버는 같은 위치에 글리신 잔기를 지니고 Na^+/K^+ 공동 수송체로 역할하는 것으로 간주된다.
- [0009] 아라비도시스는 클래스-1 멤버를 암호화한 AtHKT1인 HKT1 유전자 단일 카피를 지니고 체노퍼스 속 개구리 난모 세포 및 사카로마이스 속 효모에서 발현 될 때 특정 나트륨의 높은 유입을 나타낸다. 염분 민감성(글리코파이트) 중 내에서 발현하는 클래스-1 HKT1 유전자의 존재와 활성간에 높은 상호관련성을 고려할 때 염분 저항성(할로파이트) 식물체 내에서 HKT1 기능을 조사하는 것은 매우 중요한 것으로 여겨진다.
- [0010]
- [0011] 특히 할로파이트의 고수준의 나트륨 이온에 대한 높은 저항성은 고농도 염분으로부터의 보호를 위한 특정 매커니즘의 존재를 암시하지만 이 매커니즘의 정확한 본질은 규명하지 못하였다. 연구된 범위 내에서 할로파이트는 SOS, NHX 및 HKT1 단백질을 유도하는 유전자를 포함하는 것으로 여겨진다.
- [0012] 그러나 글리코파이트와 비교하여 할로파이트 내에서 평상시와 스트레스 시에 이러한 유전자들이 어떠한 식으로 발현되는지에 대한 차이가 존재한다. 아라비도시스와 가장 관련된 것은 할로파이트 텔룬지엘라 살수기니아(Thellungiella salsuginea)이다. 텔룬지엘라 살수기니아의 게놈 서열은 공지되어 있으나 병렬로 연결시킨 아라

비둡시스 게놈은 상기 식물종의 게놈간에 많은 차이가 있음을 나타낸다.

- [0013] 텔룬지엘라 살수기니아 게놈은 반복적 어레이 내에서 3개 카피의 HKT1 유전자를 포함하는 것이다. 3개의 TsHKT1 동족체 내에서 오직 TsHKT1;2만이 염분 스트레스에 의존하는 전사 수준을 나타낸다. 이와는 반대로 TsHKT1;1 전사체는 염분 스트레스 하에서 AtHKT1과 동일한 방법으로 하향 조절된다. 효모 내에서 발현되었을 때 TsHKT1;2는 칼륨에 높은 특이성을 나타내는 반면 TsHKT1;1은 나트륨에 높은 친화성을 나타낸다.
- [0014] 한편 또 다른 아라비둡시스 할로파이트 친척은 텔룬지엘라 파르불라(*Thellungiella parvula*)이고 이의 게놈 서열은 최근 해독되었다. 이는 두 개의 HKT1 유전자, TpHKT1;1 및 TpHKT1;2를 포함한다. 모든 HKT1 유전자(T.살수기니아로부터 3개 및 T.파르불라로부터 2개)는 첫 번째 포어 루프 도메인 내에 선택적 필터에서 세린 잔기를 포함하고 따라서 클래스-1 수송체로 그룹화된다.
- [0015] 종래로부터 본 발명자들은 효모 K^+ 수송체 ScTRK1과 함께 모든 알려진 HKT의 아미노산 서열 배열이 기능 차이에 관한 실마리를 제공할 수 있는 것으로 판단하였다. TsHKT1;2 및 TpHKT1;2 모두는 그들의 2번째 포어 루프 도메인 내에 보존된 아스파르트산을 지닌다(각각의 207번째 아스파르트산 잔기와 205번째 아스파르트산 잔기).
- [0016] 또한 인접한 트랜스멤브레인 도메인 내에서도 아스파르트산이 보존되어 있다(각각 238번째 아스파르트산 잔기, 236번째 아스파르트산 잔기). 효모 ScTRK1은 칼륨 수송체에 높은 친화성으로 잘 알려진 것으로 이 역시 두 번째 포어 루프 위치 내에 아스파르트산을 운반한다. 그러나 대부분의 알려진 쌍떡잎식물 내에서는 HKT1 단백질은 아스파라긴(예를 들면 AtHKT1 내의 211번째 아스파라긴 잔기)을 포함한다. 반면 SIHKT1;1 및 SbHKT1-4 모두는 그 위치 내에서 세린 잔기(각각 264번째 세린 잔기 및 277번째 세린 잔기)를 지닌다.
- [0017] 이와 같은 관찰은 207번째 아스파르트산 잔기 및 238번째 아스파르트산 잔기가 HKT1 서브클래스-1에 선택성을 부여하는 것이라는 가정을 제시한다. 효모 내의 이형성 발현에 의해 본 발명자들은 TsHKT1;2 내의 207번째 아스파르트산 잔기의 아스파라긴으로의 점 돌연변이는 칼륨 재흡수를 무력화시키고 서브클래스-1 Na^+ 선택적 수송체를 생성시킨다.
- [0018] 본 발명에서 본 발명자들은 AtHKT1^{N211D} 및 AtHKT1^{N242D}이 생성하는 아라비둡시스 athkt1 개체를 통한 결과를 보고한다. 또한 본 발명자들은 AtHKT1과 35S 프로모터 모두를 사용하여 아라비둡시스 athkt1-1 라인 내에서 TsHKT1;2를 발현시켰다. 또한 본 발명자들은 AtHKT1의 첫 번째 포어 루프 내의 글리신(S68G) 잔기가 수송체로서의 본질을 변화시킨다는 것을 제시하였다. 그러나 이러한 변화에 의한 TsHKT1;2 수송체 상의 영향력은 관찰되지 않았다. 마지막으로 TsHKT1;2 내의 D207을 N207로의 변이는 칼륨 선택성을 무력화하였다.
- [0019] 모든 변이 단백질을 효모 내에서 발현시켜 첫 번째 테스트하였고 이어서 아라비둡시스 athkt1 녀아웃 라인 내에서 발현시켰다. 오직 TsHKT1;2(및 TpHKT1;2)만이 나트륨 이온보다 칼륨 이온에 높은 선택성을 나타내었다. AtHKT1의 2번째 포어 루프 도메인 내의 아스파라긴 잔기의 아스파르트산 잔기로의 치환은 수송체가 TsHKT1;2와 유사한 높은 칼륨 수송체 친화성을 부여하였다. AtHKT1N-D를 발현하는 형질 전환된 아라비둡시스는 야생형 AtHKT1보다 더 높은 염분 스트레스 저항성을 나타내었다. 이는 또한 쌍자엽 HKT가 두 번째 포어 루프 도메인 내의 아스파르트산 또는 아스파라긴산 잔기의 존재는 이들이 나트륨 또는 칼륨과 같은 1가 양이온 선택성에 크게 관련되어 있음을 예견한다.
- [0020] 따라서 본 발명자들은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니고 207번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지니는 텔룬지엘라 살수기니아 TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하면 식물체 내에서 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유

지시시킬 수 있음을 확인하고 TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하는 고염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체를 발명함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0021] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니고 207번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지니는 텔룬지엘라 살수기니아 TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하면 식물체 내에서 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유지시킬 수 있음을 확인코자 한 것이다. TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하는 고염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체를 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 텔룬지엘라 살수기니아 TsHKT1;2 수송체 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 두 번째 포어 루프 도메인 내의 207번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지닌 수송체 단백질은 고 염분 배지 내에서 칼륨 이온에 높은 선택성을 지니는 칼륨 이온 수송체로 기능하는 반면 207번째 아미노산 잔기를 아스파라긴(N)으로 치환할 경우 나트륨 이온 수송체로 기능함을 특징으로 하는 TsHKT1;2 수송체 단백질을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

- [0023] 또한 본 발명은 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니는 아라비둡시스 탈리아나 AtHKT1 수송체 단백질을 포함하는 조성물에 있어서, 두 번째 포어 루프 도메인 내의 211번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지닌 수송체 단백질은 고 염분 배지 내에서 칼륨 이온에 높은 선택성을 지니는 칼륨 이온 수송체로 기능하는 반면 211번째 아미노산 잔기를 아스파라긴(N)으로 치환할 경우 나트륨 이온 수송체로 기능함을 특징으로 하는 AtHKT1 수송체 단백질을 포함하는 조성물을 제공하는 것이다.

- [0024] 이때 상기 아라비둡시스 탈리아나 AtHKT1 수송체 단백질 내의 68번째 잔기 세린(S)의 글리신(G)으로의 치환은 칼륨 재흡수를 증가시키는 기능을 수행함을 특징으로 한다.

- [0025] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니고 207번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지니는 텔룬지엘라 살수기니아 TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하여 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유지시킬 수 있는 고염분 스트레스 저항성을 지니는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

- [0026] 또한 본 발명은 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니고 211번째 아스파라긴(N) 아미노산 잔기를 지니는 아라비둡시스 탈리아나 AtHKT1 수송체 단백질을 과발현하여 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유지시킬 수 있는 고염분 스트레스 저항성을 지니는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 효과는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니고 207번째 아스파르트산(D) 아미노산 잔기를 지니는 텔룬지엘라 살수기니아 TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하면 식물체 내에서 나트륨과 칼륨 이온간의 균형을 유지시킬 수 있음을 확인하고 TsHKT1;2 수송체 단백질을 과발현하는 고염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0028]

도 1은 이온 선택성과 HKT1 동족체 간의 서열 비교를 나타낸 도면이다.

도 1A는 S. 세레비지에 효모 균주 AXT3K의 Na^+ -유도 성장 저해를 나타낸 것이다. 공백터를 발현하는 효모 균주 (EV, 음성 대조군), AtKAT1(양성 대조군), AtHKT1, TsHKT1;1, TsHKT1;2, TsHKT1;3, TpHKT1;1 및 TpHKT1;2를 하룻밤 성장시키고 연속적 희석시켜 우라실 없이 SC 드롭아웃 한천 배지 위에 분주시켰다. 사진은 3일 후에 촬영하였다.

도 1B는 Arabidopsis, Thellungiella salsuginea 및 Thellungiella parvula 간의 HKT 동족체의 서열 비교이다. 두 번째 포어 루프 영역(P_B)과 인접한 트랜스멤브레인 도메인($M2_B$)(붉은색 박스) 내의 아미노산 서열을 clustalw에 의해 정렬시켰다. PB 영역 내의 보존된 글리신 잔기를 아스테릭으로 표시하고 TsHKT1;2(D207) 및 TpHKT1;2(D205)에 특이적 아스파르트산 잔기를 화살표로 표시하였다.

도 2는 ProAtHKT1::TsHKT1;2를 발현하는 식물체가 염분 저항성을 지님을 나타내는 도면이다.

도 2A는 지시된 개체의 종자를 표면 살균시키고 75mM NaCl 존재 또는 부재 하에서 0.5X MS 배지에 직접 발아시켰다. 사진은 1주 후에 촬영하였다.

도 2B는 MS 배지에서 10일간 성장한 묘목을 토양에 이송하고 2주간 성장시킨 후 2주간 300mM NaCl 처리 후 더 성장시켰다. 사진은 염분 처리 종료 시에 촬영한 것이다.

도 2D는 야생형(Col-g1), athkt1-1 및 형질전환 개체(athkt1-1 백그라운드 내의 ProAtHKT1::AtHKT1 및 ProAtHKT1::TsHKT1;2)를 1주간 수경 용액에서 성장시키고 20 또는 30mM NaCl로 처리하였다. 사진은 염분 추가 2주 후에 촬영한 것이다.

도 2C 및 도 2E는 도 2B 및 도 2D에서 염분 처리 후 신선한 중량을 측정한 것이다.

도 3은 이온 선택성과 AtHKT1 야생형 및 변이 단백질 내의 칼륨 축적을 나타낸 것이다.

도 3A는 변이된 AtHKT1 내의 보존된 아미노산(아스파라긴) 위치이다. AtHKT1은 두 번째 포어 루프 영역과 그 인접한 트랜스멤브레인 도메인 내에 아스파라긴 잔기를 지닌다. 이에 반해 TsHKT1;2는 같은 위치에서 아스파르트산 잔기를 지닌다.

도 3B는 AtHKT1, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{2N2D}를 발현하는 낮은 칼륨 민감성 효모 균주 CY162(Mat a, ura3-52, his3D200, his44-15, trkD1, trkD2::pcK64)를 지정된 칼륨 농도로 보충하면서 우라실 결핍 SC 드롭아웃 배지에서 성장시켰다. 공백터(EV) TsHKT1;2 및 AtKAT1을 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하였다.

도 3C는 0.5, 1 및 2 mM의 외부 염화칼륨 존재 하에 AtHKT1, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{2N2D}를 발현하는 낮은 칼륨 민감성 효모 균주 CY162 내의 칼륨 함량을 집적하였다.

도 4는 AtHKT1에 의한 칼륨 재흡수 및 효모 균주 내의 변이체(CY162)이다.

도 4A는 효모 균주 내에서 나트륨 재흡수에 특이적인 AtHKT1 내의 아스파라긴 잔기 위치 211을 나타낸다. 공백터(pYES2), TsHKT1;2, AtHKT1, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D}, AtHKT1^{2N2D} 및 AtKAT1을 포함하는 효모 균주 CY162(Mat a, ura3-52, his3D200, his44-15, trkD1, trkD2::pcK64)의 성장을 나타낸다. 세포들을 100mM KCl(대조군) 또는 KCl 및 NaCl의 지정된 양을 포함하는 배지 내에 10배 희석하여 도말시킨다. 세포를 공백터로 형질전환 시키고 AtHKT1을 음성 및 양성 대조군으로 각각 포함시켰다.

도 4B는 AtHKT1의 야생형과 변이체를 발현하는 S. 세레비지에 CY162의 성장 곡선을 나타낸다. AtHKT1과 그의 변이체(AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D} 및 AtHKT1^{2N2D})를 발현하는 효모 균주를 하룻밤 성장시키고 200mM NaCl과 1mM KCl을 포함하는 새로운 배지 내에 OD 0.04부터 배양시켰다. 시료를 지정된 시간에 채취하였다.

도 5는 athkt1-1 배경 내에서 ProAtHKT1::AtHKT1 및 그의 변이체를 발현하는 형질 전환 식물체의 염분 스트레스 하의 표현형이다.

도 5A는 Col-g1, athkt1-1, ProAtHKT1::AtHKT1, ProAtHKT1::AtHKT1^{N211D}, ProAtHKT1::AtHKT1^{N242D} 및

ProAtHKT1::AtHKT1^{2N2D}를 발현하는 형질 전환 식물체를 MS 배지에서 10일간 성장시킨 후 묘목을 토양에 이송하였다. 2주간 더 성장시킨 후 또 다른 2주간 300mM NaCl 처리를 행하였다.

도 5C는 야생형 종자, athkt1-1 및 모든 형질전환 개체를 1주간 수경 용액에서 성장시키고 20 또는 30mM NaCl로 처리하였다. 사진은 염분 추가 2주 후에 촬영한 것이다.

도 5B 및 도 5D는 도 5A 및 도 5C에서 염분 처리 후 신선한 중량을 측정한 것이다.

도 6은 염분 스트레스 하에서 athkt1-1 배경 내에 발현된 ProAtHKT1::TsHKT1;2 야생형 및 그의 변이체의 표현형이다.

도 6A는 Col-gl, athkt1-1, ProAtHKT1::TsHKT1;2, ProAtHKT1::TsHKT1;2^{2D207N}, ProAtHKT1::TsHKT1;2^{2D238N} 및 ProAtHKT1::TsHKT1;2^{2D22N}을 발현하는 형질 전환 식물체를 MS 배지에서 10일간 성장시킨 후 묘목을 토양에 이송하였다. 2주간 더 성장시킨 후 또 다른 2주간 300mM NaCl 처리를 행하였다. 사진은 염분 처리 추가 후에 촬영한 것이다.

도 6C는 야생형 종자, athkt1-1 및 모든 형질전환 개체를 1주간 수경 용액에서 성장시키고 20 또는 30mM NaCl로 처리하였다. 사진은 염분 추가 2주 후에 촬영한 것이다.

도 6B 및 도 6D는 도 5A 및 도 5C에서 염분 처리 후 신선한 중량을 측정한 것이다.

도 7은 AtHKT1, TsHKT1;2 및 그의 변이체의 포어 형성 영역에의 정전기 전위(ESP) 분포이다.

WT-AtHKT1(A), Mut-AtHKT1(B), WT-TsHKT1;2(C) 및 Mut-TsHKT1;2(D)의 대표적 구조이다. 포어 형성 영역은 막대형 모델로 표현된다. 야생형(WT), Mut-AtHKT1(E 및 F) 및 Mut-TsHKT1;2(G 및 H)의 정전기 전위 표면은 각각의 포어 형성 영역을 표시한다. 2번째 포어 형성 및 4번째 트랜스멤브레인 도메인 영역의 핵심 잔기는 노란색 및 회색으로 표시되었다. Na⁺ 및 K⁺ 이온은 보라색 및 녹색 구체로 표시되었다.

도 8은 아라비도시스 탈리아나와 이와 근접한 관련 종간의 HKT1 로커스에 인접한 선형 게놈 영역의 비교이다.

아라비도시스의 근접 관련 종은 Thellungiella parvula 및 Thellungiella salsuginea 이다. HKT1 동족체는 1(TpHKT1;2 /Tp6g07110), 2(TpHKT1;1 /Tp6g07120), 3AtHKT1 /At4g10310), 4(TsHKT1;2 /pacid=20197319), 5(TsHKT1;1 /pacid=20197527), 및 6(TsHKT1;3 /pacid=20196940)으로 표시된다. 유전자 모델과 신터니 블록을 GEvo 툴을 이용하여 시각화하였다. 분홍 및 갈색 박스는 At와 Tp 및 At와 Ts간의 신터니 블록을 나타낸다.

도 9는 선별된 식물 종으로부터 HKT1 동족체의 비교이다.

두 번째 포어 루프 영역(P_B)과 인접한 트랜스멤브레인 도메인(M_{2B}) 내의 아미노산 서열을 clustalw에 의해 정렬시켰다. PB 영역 내의 보존된 글리신 잔기를 화살표 끝으로 표시하고 TsHKT1;2에 특이적 아스파르트산 잔기를 붉은색 박스로 표시하였다. 효모 ScTRK1은 두 번째 포어 루프 영역(PB) 내에 아스파르트산을 포함한다.

도 10은 S. 세레비지에 균주(AXT3K)의 Na⁺-유도 성장과 그 저해를 나타내는 도면이다.

공백터(EV, 음성 대조군), AtKAT1, TsHKT1;2(모두 양성 대조군), AtHKT1, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D}, AtHKT1^{2N2D} 및 AtHKT1^{S68G}을 발현하는 효모 세포를 하룻밤 성장시키고 그의 희석액을 우라실을 지니지 않은 SC 드롭아웃 한천 배지에 분주하였다. 지정된 농도의 나트륨과 칼륨 이온을 배지에 첨가하였다. AtHKT1^{S68G}를 레퍼런스로 포함하였다.

도 11은 HKT1 전사 수준에 필적한 형질 전환 개체 선별에 사용된 준-정량적 RT-PCR이다.

A, B는 야생형, athkt1-1 및 모든 형질 전환체를 0.5X MS 배지 내에서 2주간 성장시킨 묘목이다. RT-PCR을 표 1에 목록된 프라이머를 사용하여 3 마이크로그램의 총 RNA로 수행하였다.

도 12는 AtHKT1 및 TsHKT1;2 간의 변이 시스템 구축도이다.

야생형과 AtHKT1(A) 및 TsHKT1;2(B)의 변이 구조를 비교한다. 아스파라긴 또는 아스파르트산 잔기는 볼과 스틱 모델로 표현된다. 두 번째 포어 형성 영역 내의 잔기는 노란색으로 표시하고 4번째 트랜스멤브레인 도메인 영역 내 또 다른 잔기는 회색으로 표시하였다. 변이점은 서열 정렬 내에 붉은색 박스로 표시하였다. Na⁺ 및 K⁺

이온은 각각 보라색과 녹색 구로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 식물 성장 및 생존의 주요한 전제 조건은 Na^+ 스트레스 조건 하에서 칼륨 재흡수의 유지이다. 아라비돕시스 내의 고-친화성 K^+ 트랜스포터 1(HKT1)과 다른 염분-민감 쌍자엽 식물체 내의 그의 동족체는 Na^+ 가 고농도인 경우 의도하지 않게 Na^+ 재흡수를 수행한다. 헤테로고스 발현에 의해 이미 전에 알려진 바와 같이 아라비돕시스와 인접한 T 살수기니아(TsHKT1;2) 내의 3개의 HKT1 중 하나는 고농도 나트륨 이온 하에서 칼륨 수송체 역할을 지속한다.
- [0030] TsHKT1;2와 이미 알려진 HKT1 대부분의 서열간의 아미노산 서열 비교는 2번째 포어 루프 도메인 내의 아스파르트산(D) 잔기의 포함 유무에 대한 차이를 나타낸다. 두 개의 또 다른 T 살수기니아 및 대부분의 다른 HKT1 서열에서는 그 위치에 아스파라긴(N)을 포함한다.
- [0031] 아스파라긴의 아스파르트산으로의 형질 전환 AtHKT1(AtHKT1^{N-D})은 효모 세포에 고농도 나트륨에 대한 저항성을 부여하고 효모 균주 CY162의 칼륨 수송 결핍을 보충한다. 더욱이 AtHKT1^{N-D} 또는 TsHKT1;2에 의해 보충된 athkt1-1 식물체는 야생형 AtHKT1에 의해 보충된 식물체보다 염분 스트레스에 대한 더 큰 저항성을 지닌다. TsHKT1;2^{D-N}을 발현하는 아라비돕시스 athkt1-1 개체는 염분 저항성을 감소시킨다.
- [0032] 본 발명자들은 아스파라긴 또는 아스파라긴산의 존재는 쌍떡잎식물 HKT1형 수송체 내의 양이온 선택성을 한정 수립하는 필수적 특성을 제공하는 것으로 추정하였다.
- [0033] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0034] 1. 아라비돕시스에 비교한 T.살수기니아 및 T.파르볼라 내의 HKT1의 텐덤(tandem) 복제
- [0035] 아라비돕시스 계통은 선택적 나트륨 수송체를 암호화시킨 HKT1 유전자의 단일 카피를 포함한다. T. 살수기니아는 HKT1 동족체의 3개의 카피를 포함하고 T. 파르볼라는 2개의 카피를 포함한다. HKT1 명명법에 근거하여 모든 HKT는 HKT1 수송체 서브클래스-1에 속한다. 모든 텔론지엘라 종은 아라비돕시스보다 높은 염분 스트레스 저항력을 지니고 이는 HKT1 일부 이소폼이 다수의 카피 중에서 할로파이트 특성에 기여하는 것으로 예측된다(도 8 참조).
- [0036] 이러한 HKT 구조에서의 이온 선택성을 확인하기 위하여 본 발명자들은 나트륨 민감성 효모 균주 AXT3K, TsHKT1;2 및 TpHKT1;2를 사용하여 HKT를 발현하였다. 세포 내 발현은 동일한 표현형이었고 나트륨-특이적 민감성을 나타내지 않았다(도 1A). 또한 배지 내 칼륨 농도의 증가는 더욱 이러한 두 개의 단백질을 발현하는 세포의 성장을 촉진하였다(도 1A). 그러나 동일한 조건 하에서 TsHKT1;1, TsHKT1;3 및 TpHKT1;1을 발현하는 효모 세포들은 나트륨 특이적 민감성을 보였다. 이러한 개체들은 HKT1의 아라비돕시스 변이형과 유사한 나트륨 특이 민감성을 나타내었다. 이들은 나트륨 이온 재흡수에 관여한다. 이와 관련없이 TsHKT1;1, TsHKT1;3 및 TpHKT1;1 발현 세포는 AtHKT1-발현 세포보다 더욱 잘 성장하였다. 이는 현재로서는 잘 모르는 추가적 아미노산이 아마도 칼륨 재흡수를 촉진하거나 나트륨 투과를 제한하는 역할을 하는 것으로 추정된다. 이러한 결과는 TsHKT1;2 및 TpHKT1;2가 칼륨과의 높은 친화성을 나타내고 반면 TsHKT1;1, TsHKT1;3 및 TpHKT1;1는 AtHKT1과 유사하게 나트륨 이온과 높은 선택성을 나타낸다.

- [0037] 본 발명자들은 이미 이러한 수송체들 내의 아스파르트산/아스파라긴 잔기의 존재에 근거하여 AtHKT1과 TsHKT1;2 간에 효모 균주 내에서 이온 선택성의 차이를 나타낸 바 있다.
- [0038] 본 발명자들은 이러한 단백질들의 아미노산 서열을 비교하였다(도 1B 및 도 9). 2번째 포어 루프 도메인 내의 아스파라긴 존재는 TsHKT1;2 및 TpHKT1;2를 제외한 현재까지 알려진 모든 HKT 중에서 보존되고 있다. 이것은 동일한 위치 내에 아스파르트산도 포함하고 있다(도 9). 본 발명자들은 TsHKT1;2 및 TpHKT1;2-발현 세포의 높은 염분 저항성은 아스파르트산 잔기의 존재에 기인한 것일 수 있다는 가설을 수립하였다.
- [0039] 2. TsHKT1;2를 발현하는 식물체는 AtHKT1보다 높은 염분 스트레스 저항성을 지닌다.
- [0040] CaMV 35S 프로모터에 의해 유도된 아라비도시스 HKT1의 과발현은 식물체에 염분 스트레스 민감성을 부여한다.
- [0041] 본 발명자들은 athkt1-1 녹아웃 조건 하에 자연 AtHKT1 프로모터(1.2kb 크기를 지닌 AtHKT1 시작 코돈 DNA 업스트림)를 통한 조절과 칼리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터 조건 하에서 AtHKT1 및 TsHKT1;2 모두를 식물체 내에서 발현시켰다.
- [0042] 35S 프로모터에 의해 조절된 3AtHKT1 및 TsHKT1;2를 발현하는 식물체 모두는 야생형과 비교하여 염분 스트레스에 더 민감하다. 그러나 TsHKT1;2를 발현하는 식물체는 AtHKT1을 발현하는 식물체에 비해 더 낮은 민감성을 나타내었다. 아라비도시스 AtHKT1 천연 프로모터의 조절 하에 AtHKT1 및 TsHKT1;2 라인 모두는 플레이트 상에서 동일한 표현형을 나타내었다(도 2A).
- [0043] 토양에서 테스트한 경우 AtHKT1을 발현하는 식물체는 야생형과 동일한 표현형을 나타내었다. 그러나 야생형 및 AtHKT1과 비교하면 TsHKT1;2를 발현하는 식물체가 더 높은 염분 저항성을 나타내었다(도 2B). 또한 TsHKT1;2를 발현하는 식물체는 다른 모든 라인에 비해 염분 스트레스 하에서 높은 신선도를 측정하였다(도 2C).
- [0044] 본 발명자들은 수경(hydroponic) 에세이를 사용하여 이러한 사실을 확인하였다. AtHKT1 및 TsHKT1;2의 역할을 더욱 확인하기 위해 ProAtHKT1::AtHKT1 및 ProAtHKT1::TsHKT1;2의 종자를 야생형(Col-gl) 및 athkt1-1 녹아웃 전환체의 종자와 함께 표면 살균하고 수경 배양을 통해 1주일간 증류수에서 성장시켰다. 그 후 영양액을 Feki et al의 방법에 따라 배양액에 첨가하였다. 1주일 후부터 2주간 동안 식물체들을 20 내지 30mM NaCl로 2회 처리하였다. ProAtHKT1::AtHKT1 발현 식물체는 야생형과 비교하여 동일한 표현형을 나타내었다. 그러나 athkt1-1 식물체는 염분 스트레스에 과민감성을 나타내었다(도 2D).
- [0045] 놀랍게도 ProAtHKT1::TsHKT1;2를 발현하는 식물체는 염분 스트레스에 더 높은 저항성을 지니고 야생형 및 ProAtHKT1::AtHKT1 발현 식물체에 비해 더 높은 신선도를 측정하였다(도 2D 및 2E). 이러한 결과는 TsHKT1;2가 높은 염분 하에서 K^+/Na^+ 균형을 조절하여 나트륨 이온의 독성을 감소시킨다는 이전의 발견과 일치한다. 염분 스트레스 조건 하에서 세포질 내 Na^+ 가 증가하는 경우 TsHKT1;2 발현 식물체는 칼륨 이온 재흡수에 의해 일부 보호되는 것이 명백하며 이는 나트륨 이온과 칼륨 이온 간의 더욱 적절한 균형을 야기한다.
- [0046] 3. AtHKT1 및 TsHKT1;2의 이온 선택성 및 포어-형성 영역
- [0047] 효모 세포를 이용한 기존의 연구에서 HKT1 수송체의 포어 영역 내의 양이온 선택성을 위한 아스파르트산(D) 잔

기의 중요성을 지적하였다(도 3A). 각기 다른 HKT1 수송체 잔기의 포어 영역 내에 치환된 아미노산의 중요성을 확인하기 위해 본 발명자들은 아스파라긴(N)을 아스파르트산(D)으로 치환하고 라벨링AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D} 시켰으며 AtHKT1^{2N2D}의 경우 N211과 N242 잔기 모두를 D로 치환하였다(도 3A).

[0048] AtHKT1 양이온 선택성에 이러한 변이체의 잠재적 효과를 특정하기 위해 본 발명자들은 K⁺ 재흡수 결핍 효모 균주 CY162(Mat a, ura3^{???}52, his3D200, his44^{???}15, trkD1, trkD2::pcK64; Ko and Gaber, 1991) 내에서 야생형과 AtHKT1 및 TsHKT1;2의 변이체를 발현시켰다. 또한 본 발명자들은 양성 대조군으로 아라비도시스 칼륨 채널 AtKAT1과 음성 대조군으로 pYES2(공백터)를 발현시켰다(도 3B).

[0049] AtHKT1 발현 세포는 낮은 칼륨 조건 하에서는 성장하지 않았다. 칼륨 농도를 증가시켜도 회복되지 않았다. 반대로 TsHKT1;2는 효모 균주의 칼륨 결핍을 보충시켰다. AtHKT1, AtHKT1^{N211D}의 변이체를 발현하는 세포들은 잘 성장하였으며 TsHKT1;2의 경우와 같이 배지에 첨가된 칼륨은 성장을 증진시켰다(도 3B). 이와는 반대로 AtHKT1, AtHKT1^{N242D}의 두 번째 변이체는 낮은 칼륨 하에서 세포 성장을 회복하는 데 실패하였다. 이중 변이체 AtHKT1^{2N2D}는 예상한대로 스트레스 하에서 효모 균주의 칼륨 결핍 표현형을 보충하였다. 그러나 두 번째 변이체에 근거한 추가적 효과는 나타나지 않았다.

[0050] 본 발명자들은 야생형과 AtHKT1 발현 변이체 내의 K⁺ 함량의 축적을 TsHKT1;2 발현 세포와 비교하여 측정하였다. TsHKT1;2 및 AtHKT1, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D}를 발현하는 세포의 변이체는 야생형 AtHKT1에 비해 더 많은 칼륨을 축적하였다(도 3C). 이러한 결과는 AtHKT1과 TsHKT1;2의 차이가 이들 수송체 내의 두 번째 포어 루프 도메인 내의 아스파라긴 또는 아스파르트산의 존재에 근거한 것임을 강하게 암시한다. 또한 이를 통해 나트륨(N211/207) 또는 칼륨(D211/207)의 회수를 선호하는 것을 확인하였다.

[0051] 4. Na⁺ 특이성을 위한 AtHKT1 내의 아스파라긴 잔기의 중요성

[0052] 본 발명자들은 또한 아스파라긴을 아스파르트산으로 치환하는 것이 AtHKT1 나트륨 선택성에 어떤 영향을 줄 수 있는지 더욱 측정하였다. 도 3과 동일한 효모 세포를 200mM NaCl을 존재 또는 부재하에 낮은 칼륨 농도(1 또는 10mM KCl)를 함유한 배지에서 성장시켰다. AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{2N2D}를 발현하는 효모 균주는 잘 성장하였고 칼륨 농도의 증가에 따라 성장이 증진되었다(도 4A). 그러나 야생형 AtHKT1과 AtHKT1^{N242D}를 발현하는 세포는 낮은 칼륨 농도 하에서 성장하지 못하였다(도 4A). 또한 배지 내 나트륨의 첨가는 효모 균주의 성장을 감소시켰으나 AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{2N2D}를 발현하는 세포는 TsHKT1;2 발현 세포와 동일하게 지속적으로 성장하였다(도 4A). TsHKT1;2 및 AtKAT1이 양성 대조군으로 사용하였으며 반면 음성 대조군으로는 공플라스미드인 pYES2를 사용하였다(도 4A).

[0053] AtHKT1 양이온 선택성을 더욱 측정하기 위해 본 발명자들은 야생형 AtHKT1을 발현하는 효모 균주를 성장시키고 200mM NaCl과 1 mM KCl을 포함하는 액상 SD 배지 내에서 그의 변이체를 성장시켰다. 세포 성장을 2시간 간격으로 광도계로 모니터링하였다. AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{2N2D}를 발현하는 세포는 AtHKT1 및 AtHKT1^{N242D}를 발현하는 세포보다 더욱 빨리 현격하게 성장하였다(도 4B).

[0054] AtHKT1 내의 68번 잔기인 세린을 글리신으로 치환하는 것은 칼륨 재흡수를 증가시키는 것으로 보고되고 있다. 본 발명자들은 본 발명에서 AtHKT1^{S68G}와 다른 변이체를 비교하였다. 그러나 S68G 및 N211D 치환간의 명백한 차

이는 발견되지 않았다. 또한 두 군데 위치 모두에서의 변이가 야생형 AtHKT1에 비해 높은 칼륨 재흡수를 나타내는 것은 N211D 및 S68G 모두가 AtHKT1 양이온 선택성에 영향을 주는 것으로 여겨진다(도 10). 이러한 결과들로부터 AtHKT1 내의 아스파라긴 잔기는 나트륨 이온 특이 선택성에 중요한 것인 반면 아스파라긴을 아스파르트산으로 치환할 경우 AtHKT1 양이온 선택성은 크게 변화되는 것으로 판단된다.

[0055] 5. AtHKT1^{N211D} 변이체는 염분 스트레스 하에서 성장을 증진시킨다.

[0056] 효모로부터 식물체로 가설을 확장시키기 위해 AtHKT1, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D} 및 AtHKT1^{2N2D} 형질전환체를 생성시키고 아스파라긴 하나 또는 모두를 아스파르트산으로 치환하였다. 모든 서열 변이는 athkt1-1 변이체 내에서 발현되었으며 아라비돕시스 AtHKT1 천연 프로모터, ProAtHKT1으로 조절되었다. 유사한 HKT1 전사 수준을 지닌 T3 호모자이코트를 상세한 분석을 위해 선별하였다(도 11). AtHKT1^{N211D} 또는 AtHKT1^{2N2D}를 발현하는 식물체는 염분 스트레스 하에서 향상된 성장을 나타내었으나 AtHKT1^{N242D}를 포함하는 형질 전환체의 염분 스트레스 응답은 야생형 AtHKT1 발현 식물체와 유사하였다(도 5A 및 5B). 도 5A에 나타난 라인들은 2주간 수정재배 하에서 성장하였으며 추가 2주간 20mM 및 30mM NaCl로 처리하였다(도 5C). AtHKT1^{N211D} 또는 AtHKT1^{2N2D}를 발현하는 식물체는 염분 처리 후에 신선도의 증가를 나타내었다(도 5C 및 5D). 이와 반대로 야생형 AtHKT1 및 AtHKT1^{N242D}를 발현하는 식물체는 유사한 염분 응답을 나타내었으며 athkt1-1 녹아웃 식물체는 야생형 Col-g1 식물체에 비해 더 적은 신선도의 축적을 나타내었다(도 5C 및 5D).

[0057] 6. TsHKT1;2의 두 번째 포어 영역 내의 아스파르트산의 아스파라긴으로의 치환은 염분 저항성을 감소시킨다.

[0058] 이전 효모 보충 실험은 TsHKT1;2가 높은 칼륨 친화력을 지니고 낮은 나트륨 친화성을 지니는 공동 수송체임을 제시하였다 TsHKT1;2 내의 2개의 특이 아스파르트산 잔기의 치환은 효모 칼륨 수송 변이체를 보충하는 단백질의 능력의 손실을 야기한다. 이러한 식물체 내의 치환 효과를 분석하기 위하여 본 발명자들은 TsHKT1;2와 그의 변이체인 TsHKT1;2^{D207N}, TsHKT1;2^{D238N} 및 TsHKT1;2^{2D2N}를 athkt1-1 녹아웃 배경 하에서 ProAtHKT1 조절 하에 발현시켰다. 도 6에 나타난 바와 같이 TsHKT1;2를 발현하는 형질 전환 아라비돕시스 식물체는 황백화 잎을 나타내는 Col-g1 및 AtHKT1 모두에 비해 300mM NaCl 염분 스트레스 하에서 신선도의 증가된 축적을 나타내고 생존하였다.

[0059] TsHKT1;2 내의 D207N 변이는 염분 스트레스 하에서 신선도의 감소를 나타낸다. 한편 TsHKT1;2^{D238N}은 측정 가능한 방법 내에서 TsHKT1;2의 기능에 영향을 주지 못하였다(도 6A 및 6B). 본 발명자들은 TsHKT1;2 표현형을 확인하고 수정 재배 내에서 이들의 변이형을 확인하였다. 이들 라인의 종자를 표면 살균시키고 수정 용액에서 성장시켰다. 2주령 식물체를 2주간 20 또는 30mM NaCl로 처리하였다. TsHKT1;2를 발현하는 식물체는 Col-g1에 비해 염분 스트레스 하에서 향상된 성장을 나타내었다. 이와는 반대로 변이체형은 Col-g1 식물체가 나타내는 것과 유사한 표현형을 나타내었다(도 6C 및 6D).

[0060] 7. AtHKT1 및 TsHKT1;2의 분자 모델링

[0061] 본 발명자들은 AtHKT1과 TsHKT1;2 단백질 간의 구조적 특성을 실험 데이터를 통해 이해하기 위하여 모델링 연구를 수행하였다. AtHKT1 및 TsHKT1;2를 위한 트랜스멤브레인 및 포어 형성 영역의 3차원 구조를 맴브레인-포어-멤브레인(MPM) 모티프와 같은 K⁺ 채널의 공통적 구조 특성을 고려하여 생성하였다. 이에 따른 동족체 모델 구조를 2ns 분자 다이내믹스 시뮬레이션에 의해 정리하였다.

- [0062] 단백질 내의 두 번째 포어 루프와 네 번째 트랜스멤브레인 도메인 내에서 특이적 아스파르트산 잔기의 중요성을 확인하기 위해 본 발명자들은 정제된 구조를 사용하여 인 실리코 변이 연구를 수행하였다(도 12). AtHKT1을 위해 아스파라긴(N) 잔기(2번째 포어 루프 내의 N211과 4번째 트랜스멤브레인 내의 N242)를 아스파르트산(D)으로 변이시켰다(도 12A). 반면 TsHKT1;2 내의 아스파르트산(D207 및 D238) 잔기는 아스파라긴(N)으로 치환시켰다(도 12B). 야생형(WT)과 WT-AtHKT1, Mut-AtHKT1(N211D/N242D), WT-TsHKT1;2 및 Mut-TsHKT1;2(D207N/D238N)과 같은 변이 시스템을 도 7에 나타내었다.
- [0063] 각각의 시스템은 5 ns MD 시뮬레이션을 멤브레인 환경 하에서 수행하였다. Na^+ 및 K^+ 이온을 포어 형성 영역에 배치시켜 야생형과 변이 잔기 각각에 대한 상호 작용을 조사하였다. 마지막 2 ns 동안에 평균 구조와 가장 근접한 프레임을 대표 구조로 선택하였다. 정전기 전위(ESP) 분포는 AtHKT1 및 TsHKT1;2 모두에서 야생형과 변이 단백질 모델 간에 상이하였다(도 7A-D). 정전기 전위의 차이를 야생형과 변이 시스템 간에 비교하였다. AtHKT1 모델에서 강한 음성 전하 전위를 변이 시스템 내에서 측정하였으나 이러한 전하 전위는 야생형 내에서 관찰되지 않았다(도 7E 및 7F). 두 개의 아스파르트산 잔기를 지닌 WT-TsHKT1;2는 포어 형성 영역 내에서 강한 음성 전하 표면을 나타내었다(도 7F 및 7G). 이것은 Mut-AtHKT1과 매우 유사한 양상이었다.
- [0064] 이와는 대조적으로 변이 TsHKT1;2 모델은 WT-AtHKT1 내의 표면과 유사하였다(도 7H). 아스파르트산 잔기를 지닌 모든 모델 내에서 K^+ 이온은 시뮬레이션 전 영역에서 단백질의 포어 영역에 한정되어 있고 이는 아스파르트산 잔기 내에서 K^+ 이온과 산소 원자 간에 강한 염-브릿지 상호 작용에 근거한 것임을 확인하였다.
- [0065]
- [0066] AtHKT1과 TsHKT1;2 간의 비교는 아스파르트산 또는 아스파라긴 잔기의 존재에 의존하여 거의 일치되는 ESP 분포와 이온 간의 상호작용 패턴을 나타내었다. 더 강한 K^+ 잔류는 아스파르트산 잔기의 존재에 의존한다. 아스파라긴 잔기 모델 내의 약한 K^+ 결합은 명백하게 K^+ 이온을 충분히 대체할 수 있는 Na^+ 이온의 결합을 가능케 한다. 따라서 모델링 연구는 HKT1-형 수송체 내의 칼륨 선택성을 위한 중요한 잔기로서 포어 영역 내의 아스파르트산 잔기의 역할로 충분히 지탱되는 것을 확인한 것이다.
- [0067] 이하 본 발명의 특징을 더욱 상세히 설명한다.
- [0068] HKT1-형 수송체는 식물 염분 적합성에 중요한 역할을 한다. 그 기능의 하나는 짝에 도달한 Na^+ 함량이 더 쉽게 관리될 수 있도록 특히 뿌리 내에서 물관부로부터 반복적인 패턴으로 Na^+ 를 제거함에 의해 식물체 내에 Na^+ 의 분포를 조절하는 데 관여하는 것이다. HKT1 유전자 및 단백질의 동족체는 아라비도시스를 포함하는 다수의 식물 종 내에서 확인되고 있다. 특히 이들의 이온 선택성은 효모 및/또는 개구리 난모 세포 내에서 특징지어진다.
- [0069] 단백질 구조 및 이온 선택성에 근거하여 HKT1-형 수송체는 선택적 나트륨 수송체인 서브클래스-1과 나트륨/칼륨 공동 수송체인 서브클래스-2로 분류될 수 있다. 쌍자엽 식물로부터 알려진 모든 HKT1 단백질은 단백질의 포어-루프 A의 예측되는 필터 위치에 세린을 포함하고 있다. AtHKT1과 같이 TsHKT1;2 역시 서브클래스-1에 속하고 포어 루프 도메인 내의 선택적 필터 위치에 보존된 세린 잔기를 지니고 있다. TsHKT1;2 유전자와 단백질의 근본적으로 상이한 행태에 의해 나타나는 의문점은 HKT1 도그마의 검토를 요청하는 것 같다. 모든 단백질이 나트륨 이온보다 칼륨 이온에 대한 더 높은 친화성을 나타낸다.
- [0070] 세포액 내의 높은 Na^+ 함량은 식물체가 다른 보충을 하지 않는 한 K^+ 결핍을 야기시킨다. 하나의 전략으로 세포 수준에서 이온 균형을 유지하기 위해 높은 칼륨 선택성을 지닌 높은 친화성 수송체를 활성화시키는 것이다. 세

포액 내의 과량의 $[Na^+]$ 는 최적의 세포액 Na^+/K^+ 비율에 최적의 영향을 주어 K^+ 결핍으로 인식하게 한다. 이와 같은 K^+ 결핍 조건 하에서 HKT1을 유도하는 것은 마치 HKT1 단백질이 나트륨 특이성을 지닌 것과 같이 인식하는 것이다.

[0071] 염분 스트레스 하에서 세포액 나트륨 농도가 독성 수준에 이르렀을 때 식물체는 세포 내 $[Na^+]/[K^+]$ 균형에 도달하기 위해 칼륨 재흡수에 필요한 고칼륨 친화성 수송체를 활성화시킨다. TsHKT1;2는 높은 염도에 응답하여 활성화되는 텔론지엘라 살수기니아 내의 단백질이다.

[0072] TaHKT1, HvHKT1 또는 AtHKT1을 함께 정렬하였을 때 TsHKT1;2는 AtHKT1과 매우 높은 유사성을 지니는 것으로 보인다. AtHKT1은 효모 및 개구리 난모 세포에서 선택적 나트륨 수송체로 작용하는 반면 TsHKT1;2는 고칼륨 친화성을 지닌 낮은 나트륨 친화성 공동 수송체로 작용한다. 서브클래스-1 단백질로 분류되었지만 TsHKT1;2는 이 클래스에 설립규칙을 따르지 않는다(도 1A).

[0073] 본 발명의 결과는 HKT1 수송체의 양이온 선택성이 단일 아미노산 교환에 의해 변화될 수 있는 것을 나타낸다. 첫 번째 포어 루프 도메인 내의 세린은 K^+ 재흡수에 필요한 필수 아미노산은 아닌 것 같으나 보조 잔기로서 역할하는 것 같다. 이와는 대조적으로 본 발명자들은 아스파라긴 잔기(N)를 대체하는 아스파르트산(D)의 존재가 AtHKT1의 Na^+ 단독 수송체를 Na^+/K^+ 공동 수송체로 전환시키는 데 필수적임을 확인하였다. 따라서 TsHKT1;2 단백질 내의 아스파라긴(N)을 아스파르트산(D)로 치환하는 것은 칼륨 수송을 저해하여 TsHKT1;2를 Na^+ 단독 수송체로 전환시킨다.

[0074] 본 발명자들은 TpHKT1;2 뿐만 아니라 TsHKT1;2 역시 두 번째 포어 루프 도메인 내에 하나의 보존된 아스파르트산(D)(D207/205)과 인근 트랜스멤브레인 도메인 내의 두 번째 보존된 아스파르트산(D)(D238/236)을 지니는 것을 확인하였다.

[0075]

[0076] 명백하게 D207 하나만이 TsHKT1;2 내에서 K^+ 이온의 선택성 결정에 가장 큰 역할을 한다. TsHKT1;2 및 TpHKT1;2와는 다르게 모든 다른 알려진 HKT는 D207/205 대신에 아스파라긴(N) 또는 덜 빈번하게 세린(S)을 포함한다(도 1B, 도 9). AtHKT1 내의 아스파라긴을 대응하는 아스파르트산(N211D)로의 변이는 이 잔기의 중요성을 입증하는 것으로 효모 균주 발현시(도 3B 및 4A) 뿐만 아니라 식물체 내에서 변이 단백질의 발현 시(도 5)에도 중요성을 지니는 것이다.

[0077] AtHKT1과는 달리 AtHKT1^{N211D}(AtHKT1^{N242D}이 아닌)은 효모 균주 내에서 CY162 변이체의 칼륨 결핍 표현형을 보충한다(도 3B 및 4A). 효모 칼륨 수송체 ScTRK1 역시 포어 루프 도메인 내에 아스파르트산 잔기를 지니나 트랜스멤브레인 도메인 내에는 결핍되어 있다(도 9). 이는 포어 루프 도메인 내의 아스파르트산 잔기가 칼륨 선택성에 필수적인 것을 확인한 것이다.

[0078] 염분 스트레스 하에서 나트륨과 칼륨 이온 간의 균형은 식물체의 생존에 필수적이나 삼투압 스트레스와 이온 불균형을 야기시키는 Na^+ 이온 축적 조건 하에서 어떻게 균형을 이루는 지는 아직 명백하지 않다. 고 칼륨 친화성 수송체가 염분 스트레스 내에 작용하는 것으로 여겨진다. Na^+/H^+ 안티포터의 존재 및 스트레스 유발 활성이 나타난다. 그러나 다른 수송체는 Na^+ 이온을 분할시키는 역할을 하며 이는 나트륨 이온의 침작으로 작용하는 것이다. 이러한 시나리오 내에서 AtHKT1과 동일한 특성을 지닌 수송체의 기능은 명백하지 않다. 물론 유조직 세포 내의 AtHKT1 국소화는 그 해답을 제공하는 것으로 보이며 그 이유는 이러한 활성이 과량의 Na^+ 조건 하에서 싹

끝으로부터 나트륨 이온의 흡수를 감소시키기 때문이다.

[0079]

[0080]

과량의 나트륨 이온에 노출된 식물체의 경우 HKT1 이소폼의 기능이 식물 전체 내에서 Na^+ 의 낮은 유입 분포로부터 K^+ 수송체로서의 보조 역할로 변경되는 것으로 여겨진다. 텔룬지엘라 종이 높은 염분 스트레스 존재 하에서 시토플 Na^+/K^+ 비율을 유지시키는 기능을 나타낸 바 있다.

[0081]

간접 RNA에 의한 텔룬지엘라 살수기니아 내의 HKT1 발현 억제는 새싹 내에 높은 나트륨 축적을 야기시킨다. 반면 야생형에 비해 뿌리 내의 나트륨 농도의 저하를 나타낸다. 이는 텔룬지엘라 살수기니아 내의 HKT1이 염분 스트레스 하에서 나트륨 이온 재흡수를 조절함을 나타내는 것이다. Na^+/K^+ 비율은 TsHKT1 RNAi 라인의 분포와 유사하였다. 간접 RNA가 모든 TsHKT1 카피를 목표로 한 반면 RNAi 라인의 표현형은 TsHKT1;2의 기능과 유사한 것으로 보이고 이는 텔룬지엘라 살수기니아 게놈 내의 세 개의 텐덤 반복되는 HKT1 과발로그 내에서 높게 발현되기 때문이다.

[0082]

[0083]

본 발명자들은 천연 TsHKT1;2 수송체와 같이 AtHKT1^{N-D}가 효모 내에서 AtHKT1^{N-D}의 표현형에 근거하여 염분 저항성에 기여하는 것을 가정하였다(도 3B 및 4A). AtHKT1 천연 프로모터를 야생형 AtHKT1과 그의 변이체인 AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D}, 또한 이중 변이체인 AtHKT1^{2N2D}에 융합시키고 athkt1-1 식물체에 형질 전환시켰다. 이와 유사하게 athkt1-1 배경 내에서 TsHKT1;2, TsHKT1;2^{D207N}, TsHKT1;2^{D238N} 및 이중 변이체 TsHKT1;2^{2D2N}로 형질 전환시킨 라인을 생성시키고 실험하였다. AtHKT1^{N211D}를 발현하는 식물체는 야생형 AtHKT1을 발현하는 식물체보다 염분 스트레스에 대한 더 많은 저항성을 나타내었다.

[0084]

이와는 반대로 TsHKT1;2^{D207N}을 발현하는 식물체는 야생형 TsHKT1;2를 발현하는 식물체보다 염분 스트레스에 대한 더 낮은 저항성을 나타내었다(도 5 및 6). 이러한 각각의 경우의 효과는 신선도의 차이로 명백히 기록될 수 있다(도 6). 이러한 결과는 향상된 K^+ 재흡수가 이미 지적인 바와 같이 나트륨 이온 독성을 감소시키는 것을 나타내는 것이다.

[0085]

본 발명의 결론은 분자 모델링 연구에 의해 지지될 수 있다(도 7 및 도 12). AtHKT1과 TsHKT1;2 모두 및 이들의 변이 형태의 구조는 야생형 AtHKT1과 변이된 TsHKT1;2가 포어에서 유사한 전하 분포를 지니는 것을 암시한다. 또한 변화된 AtHKT1은 TsHKT1;2 야생형의 전하 분포와 유사한 전하 분포를 나타낸다. 분자 다이내믹스 시뮬레이션은 아스파르트산 잔기가 포어 내의 음성 전하 표면으로의 분포에 근거하여 K^+ 이온과 강한 상호작용에 관여함을 나타내는 것이다. 이러한 모델링 연구는 아스파르트산 잔기의 중요성 역시 나타낸다(도 7 및 도 12).

[0086]

결론적으로 아라비도시스 내의 AtHKT1 단백질을 정상적으로 발현하는 세포 및 조직 내에서 TsHKT1;2의 발현은 칼륨 이온의 증가를 야기시키고 이에 따라 높은 농도의 Na^+ 이온의 해로운 영향력을 상쇄시키는 것이다.

[0087]

이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다.

[0088]

(실시예 1) 식물 재료

- [0089] Ali 등에 의해 개시된 Col-gl 내의 Col-gl(WT), athkt1-1의 아라비도시스 종자를 본 실험에 사용하였다.
- [0090] (실시예 2) 형질 전환 아라비도시스 식물체의 생성
- [0091] 표1에 기록된 프라이머를 사용하여 TsHKT1;2 및 AtHKT1의 cDNA를 증폭시켰다. 이미 Ali 등에 의해(2012) 개시된 방법에 따라 35S-AtHKT1 또는 35S-TsHKT1;2을 발현하는 아라비도시스 athkt1-1 변이 라인을 생성한다. pCAMBIA 1302 바이너리 벡터 내에서 AtHKT1 및 TsHKT1;2 cDNA를 PCR에 의해 AtHKT1의 프로모터 영역의 1.2Kb 단편과 융합시키고 그 사이에 PstI 및 SpeI를 삽입시켰다. athkt1-1 녹아웃 식물체를 형질 전환 시켜 제조하였다.
- [0092] 하이그로마이신 저항성에 의해 형질전환 식물체를 선별하고 표 3에 목록된 프라이머로 PCR 하여 확인하였다. 하이그로마이신 저항성(43 mg/L)을 3:1 세그리게이션으로 나타내는 라인을 선별하고 TsHKT1;2 또는 AtHKT1의 유사한 전사 수준을 나타내는 T3 호모자이그트 식물체를 사용하였다(도 11).
- [0093] (실시예 3) 염분 스트레스에 대한 형질 전환 식물체의 성장 응답
- [0094] 염분 스트레스에 대한 성숙한 식물체의 성장 응답을 시험하기 위해 ProAtHKT1::AtHKT1, ProAtHKT1::TsHKT1;2 및 그의 변이체(N-D 또는 D-N)를 발현하는 형질 전환 식물체의 종자를 Col-gl 및 athkt1-1과 함께 표면 살균하고 0.5X MS 배지 내에서 22~24℃에서 각각 1일간 16시간, 8시간, 130 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 강도로 광선을 조사시켜 성장 챔버에서 성장시킨다. 10일 후 묘목을 토양에 이전하고 2주간 더 성장시켰다. 2주 후에 식물체를 격일간으로 300 mM NaCl을 물에 용해시켜 2주간 더 처리하였다. 사진은 염분 처리 후 2주 후에 촬영한 것이다. 식물체의 신선한 중량을 염분 처리 후에 즉시 측정하였다.
- [0095] 수경 재배 내의 염분 처리를 위해 지적된 라인의 종자를 표 2에 나타난 영양 배지를 보충시켜 Feki 등이 개시한(2014) 수경 플레이트 내에서 직접 성장 시켰다. 정해진 농도로 1주일간 염분 처리를 행한다. 사진은 2주 후에 촬영하였다. 식물체의 신선한 중량을 염분 처리 후에 즉시 측정하였다.
- [0096] (실시예 4) RNA 추출 및 RT-PCR
- [0097] 2주령의 Col-gl1, athkt1-1 및 모든 다른 형질 전환 식물체로부터 RNA를 Qiagen RNeasy로 추출하고 plant mini kit(Qiagen, Maryland, U.S.A.)를 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. 이 때 3 마이크로그램의 총 RNA를 사용하여 표 1에 나타난 프라이머로 ThermoScript™ RT-PCR 시스템으로 수행하였다.
- [0098] (실시예 5) 효모 발현 및 성장
- [0099] 효모 균주 AXT3K(ena1::HIS3::ena4, _nha1::LEU2, _nhx1::KanMX4) 및 CY162(Mat a, ura3-52,his3D200, his44-15, trkD1,trkD2::pcK64)를 사용하였다. cDNA를 표 1에 나타난 프라이머로 증폭시키고 pYES2 벡터의 GAL1 프로모터와 CYC1 터미네이터 서열 사이의 BamHI 및 NotI 부위에 클로닝시켰다. 효모 세포는 LiAc 절차에 따라 형질 전환되었으며 -Ura S.D. 배지에서 선별하고 지시된 나트륨 및 칼륨 농도를 지닌 SC 배지에서 성장시켰다.

- [0100] (실시예 6) 효모 내의 이온 분석과 액상 배양 내의 효모 세포 성장
- [0101] 효모 내에서 이온 재흡수에 관한 분석 방법은 타카하시 프로토콜(2007년)을 일부 수정하여 사용하였다. 간략하게 pYES2(공백터)에 AtHKT1, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D}, AtHKT1^{2N2D} 및 TsHKT1;2로 형질 전환시킨 효모 균주(*S. cerevisiae* 균주 AXT3K)를 우라실 없이 0.7(1.0×10⁸ 세포) OD600이 될 때까지 SD 드롭아웃 배지에서 성장시켰다. 세포를 우라실 없이 2.0% 포도당, 10 mM MES를 첨가시키고 트리스 염기로 pH 6.0으로 조절시킨 드롭아웃 배지 10ml에 현탁시켰다. 지시된 KCl 농도가 되도록 보충하였다. 세포를 2시간 인큐베이션시킨 후 5분간 1250 rpm으로 원심분리시켜 수득하고 하룻밤 10 ml의 0.1 M HCl로 산추출하였다. 시료를 5분간 5000 g로 원심분리시켜 잔해를 제거하고 상등액 내의 이온 함량을 ICP-OES OPTIMA 4300DV/5300DV(Perkin Elmer)로 측정하였다.
- [0102] 효모 균주 CY162의 성장 곡선을 위해 AtHKT1, AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D} 및 AtHKT1^{2N2D}을 발현하는 세포를 우라실 없이 SD 드롭아웃 액상 배지 내에서 하룻밤 성장시켰다. 그 다음날 새로운 배양물을 OD 0.04로부터 출발시켜 준비하였다. 그 뒤 1 mM KCl을 지닌 200 mM NaCl을 배양액에 첨가하였다. 시료를 지정된 시간에 수집하고 세포 성장 속도를 스펙트로포토미터로 측정하였다.
- [0103] (실시예 7) AtHKT1 및 TsHKT1;2의 자리 지정 돌연변이
- [0104]
- [0105] 아라비도시스 HKT1 내에서 두 번째 포어 루프 도메인과 그 인접한 트랜스멤브레인 도메인 내의 두 개의 아스파라긴(N) 잔기를 TsHKT1;2에 존재하는 것과 같이 보존된 아스파르트산(D)으로 치환시켰다(도 1C, 도 8). 각각의 아미노산 변이체(AtHKT1^{N211D}, AtHKT1^{N242D})를 pYES2-AtHKT1 cDNA를 주형으로 하여 표 1에 나타난 각각의 프라이머를 통해 증폭시켰다. N211과 N242 이중 변이체(AtHKT1^{2N2D})를 제조하기 위해 변이된 pYES2-AtHKT1^{N211D}를 주형으로 사용하여 AtHKT1^{242D}를 위해 설계된 프라이머로 증폭시켰다. 또한 세린(S) 잔기의 글리신(G)으로의 AtHKT1 내의 첫 번째 포어 루프 도메인 위치 68에서 치환을 도입하기 위해 이와 유사한 밀 HKT1을 도입하였다. 이러한 증폭은 표 1 및 도 9에 기록된 프라이머로 수행하였다.
- [0106] (실시예 8) 분자 모델링 연구
- [0107] 두 개의 HKT 단백질의 트랜스멤브레인 영역을 CBS(Center for Biological Sequence analysis)를 사용한 트랜스멤브레인 헬릭스 예측방법인 TMHMM v2.0을 통해 예측하였다. AtHKT1과 TsHKT1;2의 3차원 구조를 Build homology model protocol에 의한 호몰로지 모델링 기법을 사용하여 생성시켰다. NaK 채널(PDB: 2AHZ), Na⁺ 및 K⁺수송 채널의 결정 구조를 주형으로 사용하였다. 서열 정렬을 목표 단백질과 DS3.5 내의 정렬 툴을 이용한 주형을 사용하여 시행하였다. HKT 단백질의 트랜스멤브레인 영역을 M1A-PA-M2A, M1B-PB-M2B, M1C-PC-M2C, 및 M1D-PD-M2D와 같은 4개의 서로 다른 서브 유니트로 분리하였다. 그 후 주형의 하나의 서브 유니트로 정렬시켰다.
- [0108] K⁺ 채널의 이온 흡수에 관여하는 포어 영역을 형성하기 위하여 AtHKT1과 TsHKT1;2를 위한 트랜스멤브레인 영역의 각각의 네 개의 서브 유니트를 테트라머로 코디네이트 시켰다. 동족-모델 구조를 GROMACS 53a6과 함께 GROMACS 프로그램(버전 4.5.3)을 사용하여 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC) 지질 이중층을 지닌 분자 다이내믹스(MD) 시뮬레이션을 통해 분석하였다.

[0109] 표 1은 본 발명에 사용된 PCT 프라이머 서열을 나타낸 것이다.

표 1

[0110]

프라이머 명	서열(5' - 3')
AtHKT1 RT-PCR For	TCTTCTTGGAGTGACGGTGC(서열번호:3)
AtHKT1 RT-PCR Rev	ACGTTGAAATTTATCGGATC(서열번호:4)
TsHKT1;2 RT-PCR For	TATTCATGCCGTTGACCGTA(서열번호:5)
TsHKT1;2 RT-PCR Rev	CTACGAAGATGAAGGATAAAG(서열번호:6)
ACTIN2 RT-PCR For	CCTTGCTGGACGTGACCTTA(서열번호:7)
ACTIN2 RT-PCR Rev	AACCACCGATCCAGACACTG(서열번호:8)
pYES2-AtHKT1-For	GATCGGATCCATGGACAGAGTGGTGGCA(서열번호:9)
pYES2-AtHKT1-Rev	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGGAAGACGAGGGGTAAAG(서열번호:10)
pYES2-TsHKT1;2-For	GATCGGATCCATGGAGAGAGTTGTGGAC(서열번호:11)
pYES2-TsHKT1;2-Rev	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGGAAGATGAAGGATAAAG(서열번호:12)
pYES2-TsHKT1;1-For	GATCGAATTCATGGAGAGAGTTGGGGCA(서열번호:13)
pYES2-TsHKT1;1-Rev	AGAATGCGGCCGCTCAGAAAGAGGAGGATAAAGAATC(서열번호:14)
pYES2-TsHKT1;3-For	GATCGGATCCATGGAGAGAATTGATGCAAAATTCGCTAAACTCGGTTCCC(서열번호:15)
pYES2-TsHKT1;3-Rev	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGGAAGAGGAGGATAAAGTATCCA(서열번호:16)
pYES2-TpHKT1;1-For	GATCGGATCCATGGAGAGAGTTGTAGCAAAATTAGCTAG(서열번호:17)
pYES2-TpHKT1;1-Rev	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTAAGAAGAGGATGGATAAAGTATCCAC(서열번호:18)
pYES2-TpHKT1;2-For	GATCGGATCCATGGAGAGAGTTGTGGCAAAATTAGCTAAACTTCG(서열번호:19)
pYES2-TpHKT1;2-Rev	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTATGAAGTATCCATGCTCGGCCAGA(서열번호:20)
pYES2-AtKAT1-For	GATCGGATCCATGTCGATCTCTTGGACTCG(서열번호:21)
pYES2-AtKAT1-Rev	ATAAGAATGCGGCCGCTCAATTTGATGAAAAATAC(서열번호:22)
TsHKT1;2.1302 For	CCATGGAAATGGAGAGAGTTGTGG(서열번호:23)
TsHKT1;2.1302 Rev	ACTAGTCGAAGATGAAGGATAAAG(서열번호:24)
AtHKTSpeIHAR	GGACTAGTGAAGACGAGGGGTAAAG(서열번호:25)
AtHKT1promF	AAAAGTGCAGAGCTCGAATCTACATTACAATT(서열번호:26)
AtHKT1promR	CGCGGATCCTTTAGTTCTCGAGTCGGTTTAAG(서열번호:27)
AtHKT1-FL-F	ATGGACAGAGTGGTGGCAAAATAGCA(서열번호:28)
AtHKT1-180-R	AGAAGTGAAGAAAAGGTCAAAG(서열번호:29)
AtHKT1N211D-For	TCCACGTTGCAGACTGCGGATTTGTC(서열번호:30)
AtHKT1N211D-Rev	GACAAATCCGCAGTCTGCAACGTGGA(서열번호:31)
AtHKT1N242D-For	AGTACTGATGGGAGACATTTGTTCCCT(서열번호:32)
AtHKT1N242D-Rev	AGGGAACAAAGTGCTCTCCATCAGTACT(서열번호:33)
AtHKT1S68G-For	CATCACCGTCTCTGGCATGTCTACCGTC(서열번호:34)
AtHKT1S68G-Rev	GACGGTAGACATGCCAGAGACGGTGATG(서열번호:35)
TsHKT1;2D207N-For	TCTACGTTATCAAAGTGTGGATTGTC(서열번호:36)
TsHKT1;2D207N-Rev	GACAAATCCACAGTTTGATAACGTAGA(서열번호:37)
TsHKT1;2D237N-For	GTATTCATGGGAAACACTTTGTTTCCT(서열번호:38)
TsHKT1;2D237N-Rev	AGGAAACAAAGTGTTTCCCATGAATAC(서열번호:39)

[0111] 표 2는 1L 수경 재배를 위한 영양배지의 조성을 나타낸 것이다.

표 2

[0112]

	사용 농도(g/L)
KH ₂ PO ₄	13.609
MgSO ₄ · 7H ₂ O	24.648
MnSO ₄ · H ₂ O	0.249
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.024
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.0296

H ₃ BO ₃	0.186
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0.0035
Sequeshen 138Fe	4.0

[0113]

[0114] 표 3은 아미노산 서열 비교에 사용된 HKT1 유사 단백질 서열을 나타낸 것이다.

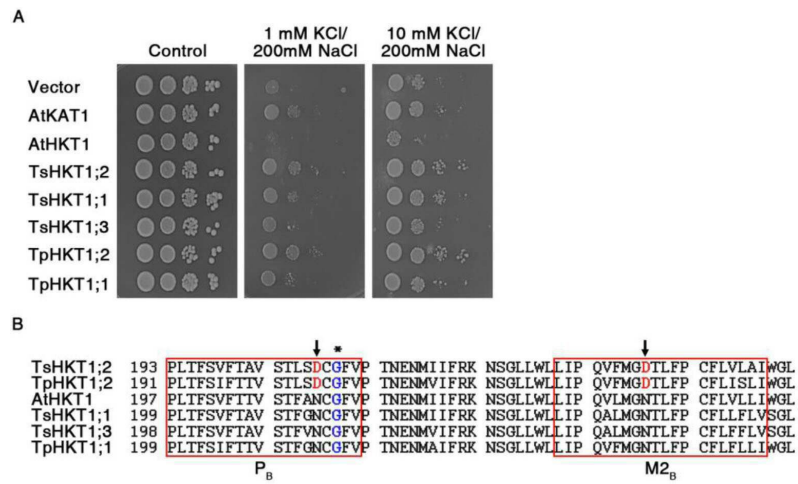
표 3

[0115]

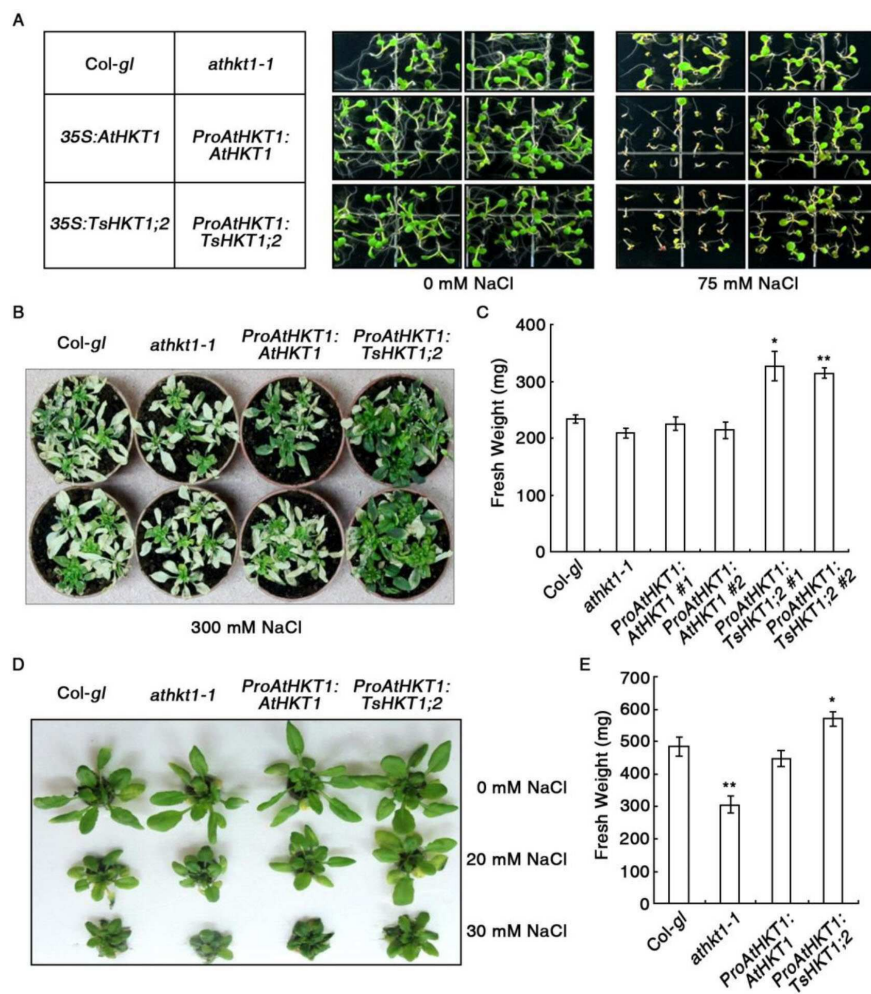
단백질명	종명	서열고유번호
AtHKT1	Arabidopsis lyrata	XP_002872505
AtHKT1	Arabidopsis thaliana	AAF68393
HvHKT1;5	Hordeum vulgare	ABK58096
HvHKT2;1	Hordeum vulgare	CAJ01326
OsHKT1;1	Oryza sativa	CAD37183
OsHKT1;3	Oryza sativa	CAD37185
OsHKT1;4	Oryza sativa	CAD37197
OsHKT1;5	Oryza sativa	BAB93392
OsHKT2;1	Oryza sativa	BAB61789
OsHKT2;2	Oryza sativa	BAB61791
OsHKT2;3	Oryza sativa	CAD37187
OsHKT2;4	Oryza sativa	CAD37199
PhaHKT2;1	Phragmites australis	BAE44385
PtHKT1;1	Populus trichocarpa	XP_002325229
PutHKT2;1	Puccinellia tenuiflora	ACT21087
SbHKT1;3	Sorghum bicolor	Sb04g005010
SbHKT1;4	Sorghum bicolor	Sb06g027900
SbHKT1;5	Sorghum bicolor	Sb03g012590
SbHKT2;1	Sorghum bicolor	Sb10g029000
ScTRK1	Saccharomyces cerevisiae	AAA34728.1
SlHKT1;1	Solanum lycopersicum	ASINS et al., 2013
SlHKT1;2	Solanum lycopersicum	ASINS et al., 2013
TpHKT1;1	Thellungiella parvula	Tp6g07120
TpHKT1;2	Thellungiella parvula	Tp6g07110
TsHKT1;1	Thellungiella salsuginea	Ts6g08650
TsHKT1;2	Thellungiella salsuginea	Ts6g08730
TsHKT1;3	Thellungiella salsuginea	Ts6g08740
TaHKT1;5-B1	Triticum aestivum	ABG33947
TaHKT1;5-B2	Triticum aestivum	ABG33948
TaHKT1;5-D	Triticum aestivum	ABG33945
TaHKT2;1	Triticum aestivum	AAA52749
TmHKT1;4-A2	Triticum monococcum	ABK41857
TmHKT1;5-A	Triticum monococcum	ABG33946
ZmHKT1;5	Zea mays	GRMZM2G047616
ZmHKT2;1	Zea mays	GRMZM2G135674

도면

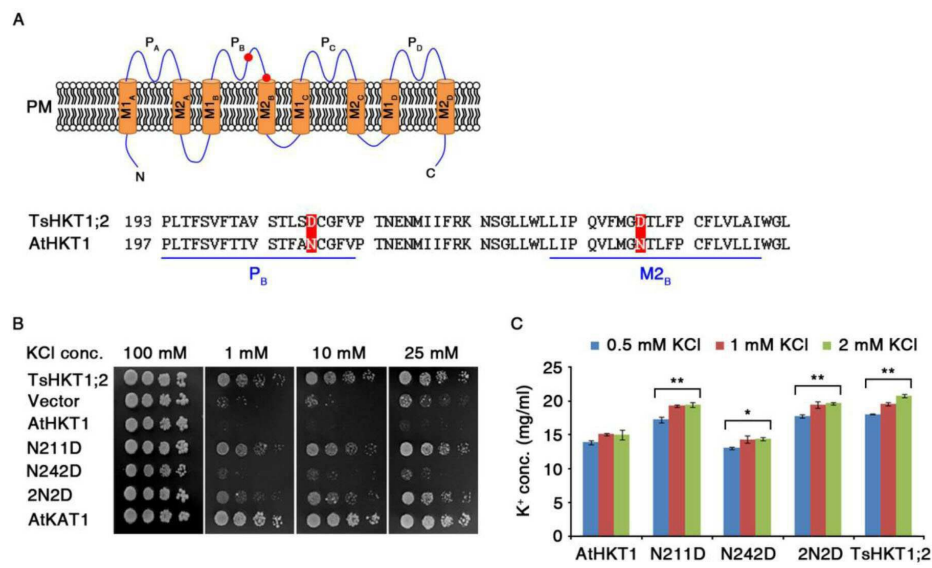
도면1



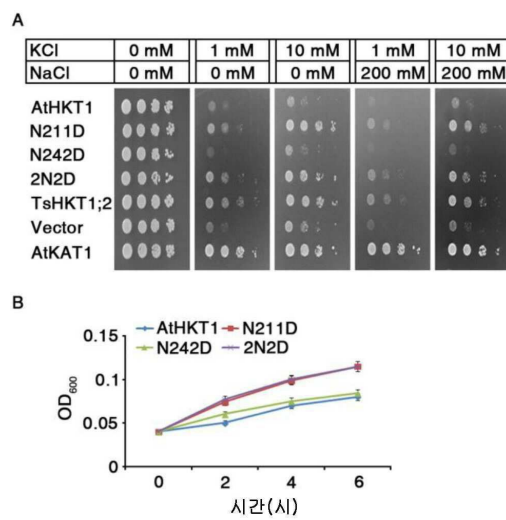
도면2



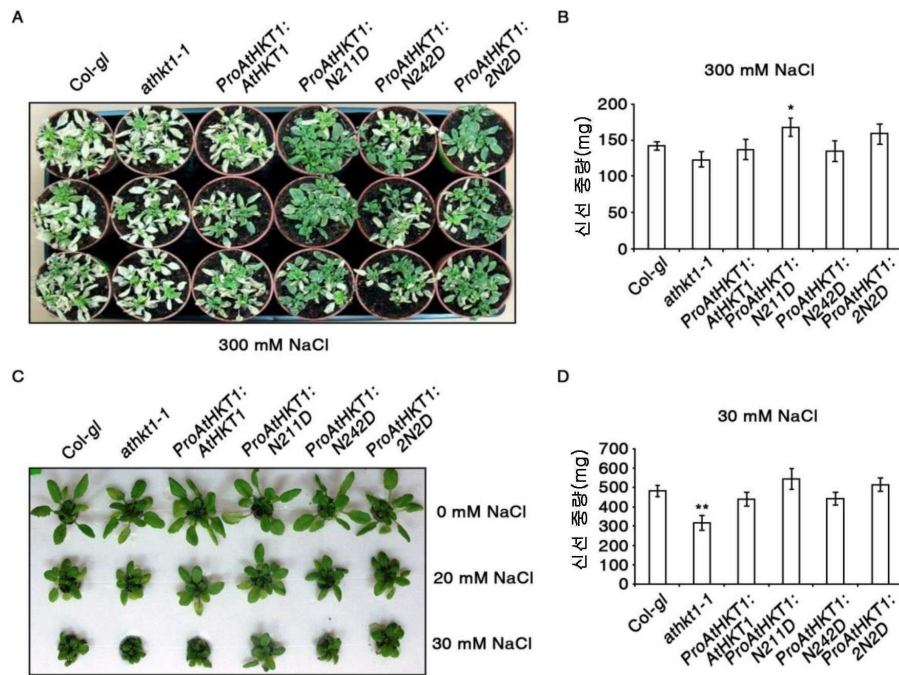
도면3



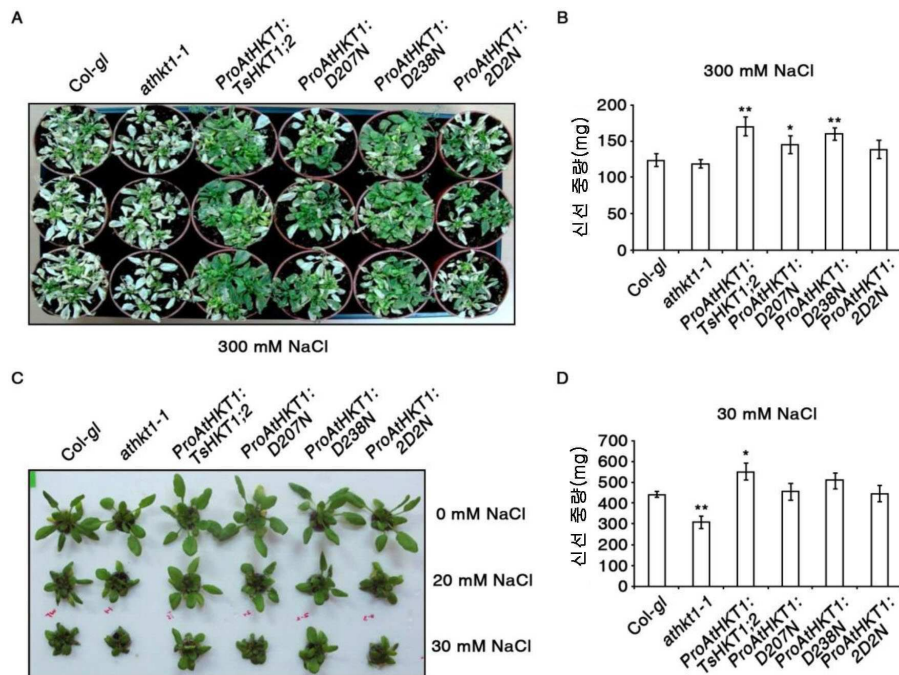
도면4



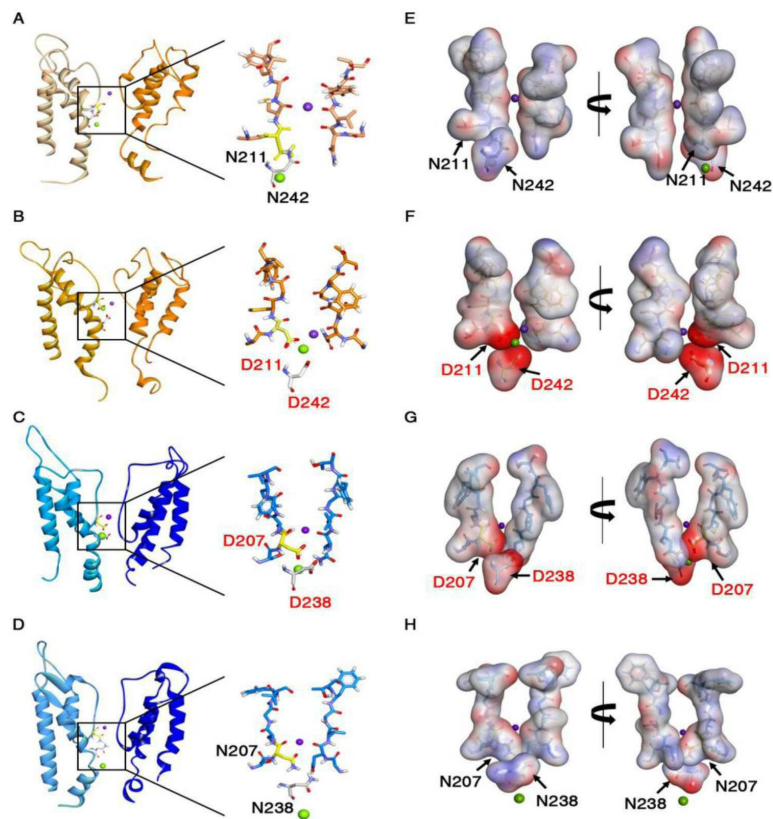
도면5



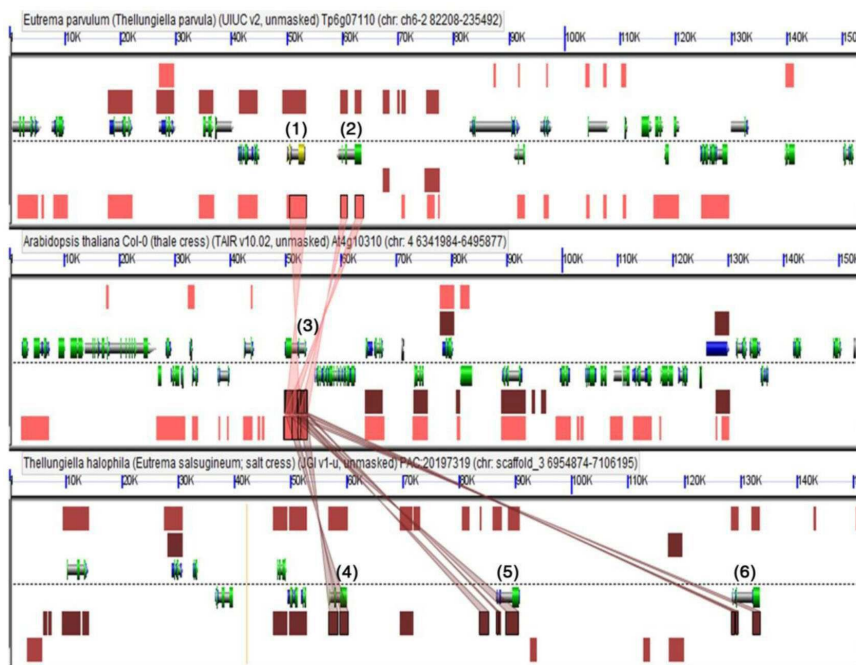
도면6



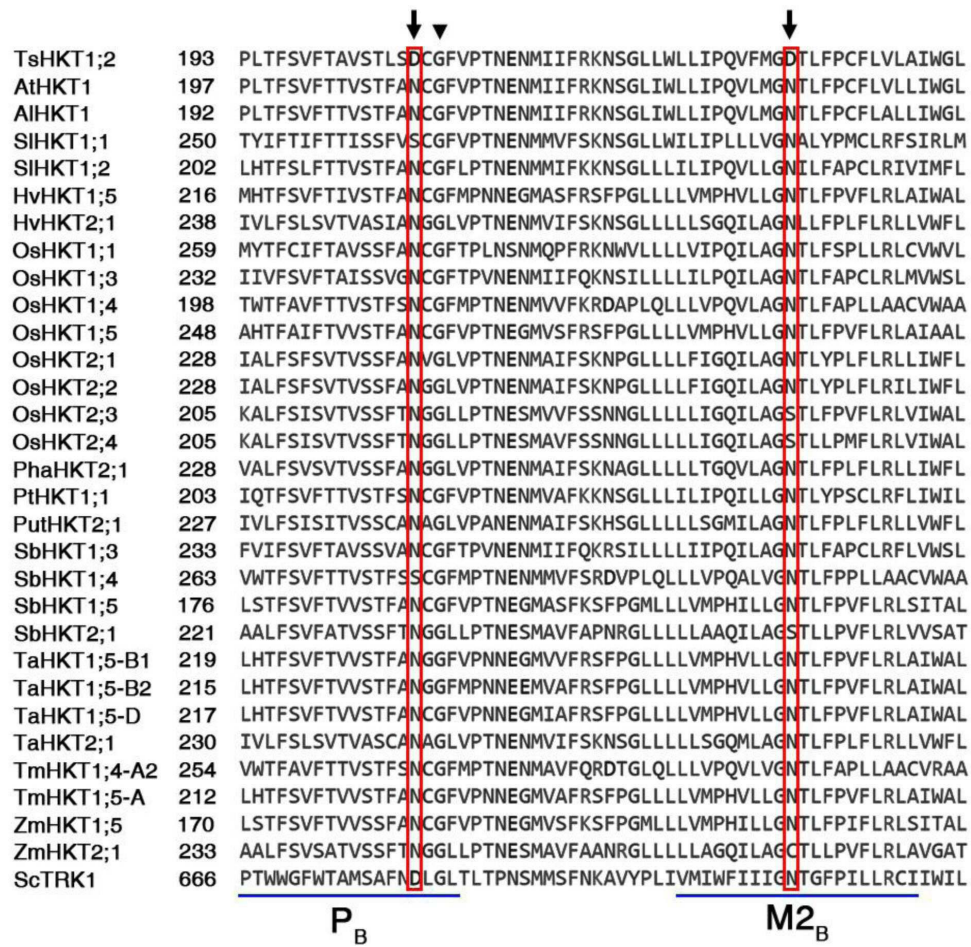
도면7



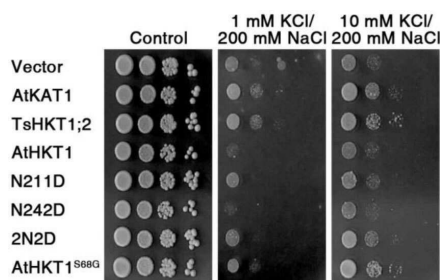
도면8



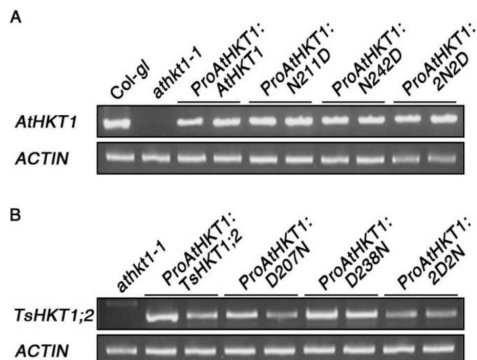
도면9



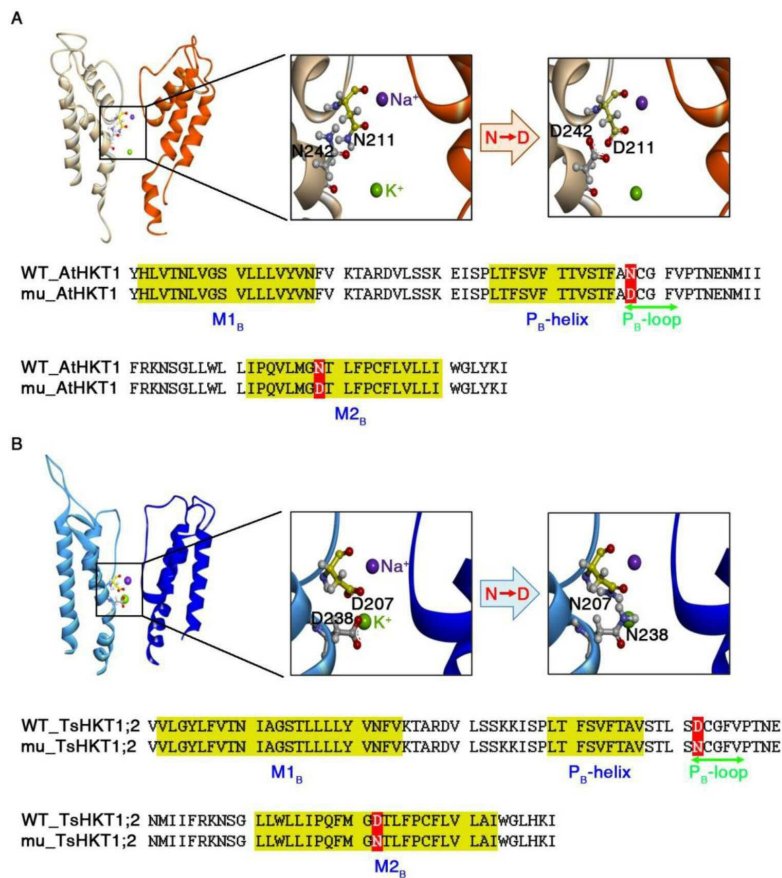
도면10



도면11



도면12



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Transgenic plant resistant to high saline stress

<130> KP-982

<160> 39

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 500

<212> PRT

<213> Thellungiella salsuginea

<400> 1

Met Glu Arg Val Val Asp Lys Leu Ala Lys Ile Phe Ser Gln His Ala

1 5 10 15

Lys Ser Leu Pro Leu Phe Phe Leu Tyr Phe Phe Tyr Phe Leu Phe Phe

20 25 30

Ser Phe Leu Gly Phe Leu Ala Leu Lys Ile Ser Lys Pro Arg Thr Thr

35 40 45
 Ser Arg Pro His Asp Leu Asp Leu Phe Phe Thr Ser Val Ser Ala Ile
 50 55 60
 Thr Val Ser Ser Met Ser Thr Ile Asp Met Glu Val Phe Ser Asn Thr
 65 70 75 80
 Gln Leu Ile Ile Ile Thr Ile Leu Met Phe Leu Gly Gly Glu Ile Phe
 85 90 95
 Thr Ser Phe Val Asn Leu Tyr Phe Ser His Phe Ile Asn Phe Lys Ile

 100 105 110
 Lys His Leu Val Gly Ser Phe Asn Phe Asp Arg Pro Ile Asn Asp Pro
 115 120 125
 Gly Ser Asp Leu Glu Asn Val Thr Asn His Val Lys Leu Ser Ser Gln
 130 135 140
 Ile Asn Glu Arg Ala Ser Lys Cys Leu Tyr Ser Val Val Leu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Leu Phe Val Thr Asn Ile Ala Gly Ser Thr Leu Leu Leu Leu Tyr Val
 165 170 175

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

 245 250 255
 Asn Arg Glu Glu Leu Gly Tyr Ile Leu Lys Asn His Lys Lys Met Gly
 260 265 270
 Tyr Ser His Leu Leu Ser Val Arg Leu Cys Val Leu Leu Ala Leu Thr
 275 280 285
 Val Leu Gly Leu Val Met Ile Gln Phe Leu Leu Phe Cys Thr Phe Glu

290 295 300
 Trp Asn Ser Glu Ser Leu Glu Gly Met Asn Ser Tyr Glu Lys Leu Val
 305 310 315 320

 Gly Ser Leu Phe Gln Val Val Asn Ser Arg His Thr Gly Glu Thr Val
 325 330 335
 Val Asp Leu Ser Thr Leu Ser Pro Ala Ile Leu Val Leu Phe Ile Leu
 340 345 350
 Met Met Tyr Leu Pro Pro Tyr Thr Leu Phe Met Pro Leu Thr Val Glu
 355 360 365
 Lys Asn Lys Lys Glu Gly Glu His Asp Ser Gly Asp Glu Ile Lys Gly
 370 375 380
 Lys Lys Asn Gly Phe Tyr Val Ser Gln Leu Thr Phe Leu Ala Ile Cys

 385 390 395 400
 Ile Phe Leu Ile Ser Thr Thr Glu Ser Gln Lys Leu Arg Arg Asp Pro
 405 410 415
 Leu Asn Phe Asn Ile Leu Asn Ile Thr Phe Glu Val Ile Ser Ala Tyr
 420 425 430
 Gly Asn Val Gly Phe Thr Thr Gly Tyr Ser Cys Glu Arg Arg Leu Asp
 435 440 445
 Ile Ser Asp Gly Ser Cys Lys Asp Ala Ser Tyr Gly Phe Ala Gly Arg
 450 455 460

 Trp Ser Pro Val Gly Lys Phe Ile Leu Ile Ile Val Met Phe Tyr Gly
 465 470 475 480
 Lys Phe Lys Gln Phe Ser Ala Lys Ser Gly Arg Ala Trp Ile Leu Tyr
 485 490 495
 Pro Ser Ser Ser
 500

 <210> 2
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis
 <400> 2

Met Asp Arg Val Val Ala Lys Ile Ala Lys Ile Arg Ser Gln Leu Thr
1 5 10 15
Lys Leu Arg Ser Leu Phe Phe Leu Tyr Phe Ile Tyr Phe Leu Phe Phe
20 25 30
Ser Phe Leu Gly Phe Leu Ala Leu Lys Ile Thr Lys Pro Arg Thr Thr
35 40 45
Ser Arg Pro His Asp Phe Asp Leu Phe Phe Thr Ser Val Ser Ala Ile
50 55 60
Thr Val Ser Ser Met Ser Thr Val Asp Met Glu Val Phe Ser Asn Thr
65 70 75 80
Gln Leu Ile Phe Leu Thr Ile Leu Met Phe Leu Gly Gly Glu Ile Phe
85 90 95
Thr Ser Phe Leu Asn Leu Tyr Val Ser Tyr Phe Thr Lys Phe Val Phe
100 105 110
Pro His Asn Lys Ile Arg His Ile Leu Gly Ser Tyr Asn Ser Asp Ser
115 120 125
Ser Ile Glu Asp Arg Cys Asp Val Glu Thr Val Thr Asp Tyr Arg Glu
130 135 140
Gly Leu Ile Lys Ile Asp Glu Arg Ala Ser Lys Cys Leu Tyr Ser Val
145 150 155 160
Val Leu Ser Tyr His Leu Val Thr Asn Leu Val Gly Ser Val Leu Leu
165 170 175
Leu Val Tyr Val Asn Phe Val Lys Thr Ala Arg Asp Val Leu Ser Ser
180 185 190
Lys Glu Ile Ser Pro Leu Thr Phe Ser Val Phe Thr Thr Val Ser Thr
195 200 205
Phe Ala Asn Cys Gly Phe Val Pro Thr Asn Glu Asn Met Ile Ile Phe
210 215 220
Arg Lys Asn Ser Gly Leu Ile Trp Leu Leu Ile Pro Gln Val Leu Met
225 230 235 240
Gly Asn Thr Leu Phe Pro Cys Phe Leu Val Leu Leu Ile Trp Gly Leu

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

 305 310 315 320
 Glu Lys Leu Val Gly Ser Leu Phe Gln Val Val Asn Ser Arg His Thr
 325 330 335
 Gly Glu Thr Ile Val Asp Leu Ser Thr Leu Ser Pro Ala Ile Leu Val
 340 345 350
 Leu Phe Ile Leu Met Met Tyr Leu Pro Pro Tyr Thr Leu Phe Met Pro
 355 360 365
 Leu Thr Glu Gln Lys Thr Ile Glu Lys Glu Gly Gly Asp Asp Asp Ser
 370 375 380

 Glu Asn Gly Lys Lys Val Lys Lys Ser Gly Leu Ile Val Ser Gln Leu
 385 390 395 400
 Ser Phe Leu Thr Ile Cys Ile Phe Leu Ile Ser Ile Thr Glu Arg Gln
 405 410 415
 Asn Leu Gln Arg Asp Pro Ile Asn Phe Asn Val Leu Asn Ile Thr Leu
 420 425 430
 Glu Val Ile Ser Ala Tyr Gly Asn Val Gly Phe Thr Thr Gly Tyr Ser
 435 440 445
 Cys Glu Arg Arg Leu Asp Ile Ser Asp Gly Gly Cys Lys Asp Ala Ser

 450 455 460
 Tyr Gly Phe Ala Gly Arg Trp Ser Pro Met Gly Lys Phe Val Leu Ile
 465 470 475 480
 Ile Val Met Phe Tyr Gly Arg Phe Lys Gln Phe Thr Val Lys Ser Gly
 485 490 495
 Arg Ala Trp Ile Leu Tyr Pro Ser Ser Ser

	500	505	
<210>	3		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer		
<400>	3		
tcttcttgga	gtgacgggtgc	20	
<210>	4		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer		
<400>	4		
acgttgaaat	ttatcggatc	20	
<210>	5		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer		
<400>	5		
tattcatgcc	gttgaccgta	20	
<210>	6		
<211>	21		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	primer		
<400>	6		
ctacgaagat	gaaggataaa g	21	
<210>	7		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		

<220><223> primer
 <400> 7
 ccttgctgga cgtgacctta 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 aaccaccgat ccagacactg 20
 <210> 9
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 gatcgatcc atggacagag tggtagga 28
 <210> 10
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 10
 ataagaatgc ggccgctcag gaagacgagg ggtaaag 37
 <210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 gatcgatcc atggagagag ttgtggac 28
 <210> 12
 <211> 37
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

ataagaatgc ggccgctcac gaagatgaag gataaag

37

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gatcgaattc atggagagag ttggggca

28

<210> 14

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

agaatgcggc cgctcagaaa gaggagggat aaagaatc

38

<210> 15

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

gatcgatcc atggagagaa ttgatgcaaa attcgctaaa ctcggttccc

50

<210> 16

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

ataagaatgc ggccgctcac gaagaggagg gataaagtat cca

43

<210> 17

<211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 gatcggatcc atggagagag ttgtagcaaa attagctag 39
 <210> 18
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 ataagaatgc ggccgcttag taagaagagg atggataaag tatccac 47

 <210> 19
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 gatcggatcc atggagagag ttgtggcaaa attagctaaa cttcg 45
 <210> 20
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 ataagaatgc ggccgcttat ggataaagta tccatgctcg gccaga 46
 <210> 21
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21

gatcggatcc atgtcgatct cttggactcg

30

<210> 22

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

ataagaatgc ggccgctcaa tttgatgaaa aatac

35

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 23

ccatggaaat ggagagagtt gtgg

24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 24

actagtcgaa gatgaaggat aaag

24

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 25

ggactagtgg aagacgaggg gtaaag

26

<210> 26

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 26

aaaactgcag agctcgaatc tacattacaa tt 32

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 27

cgcggatcct ttagttctcg agtcggttta ag 32

<210> 28

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 28

atggacagag tgggtggcaaa aatagca 27

<210> 29

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 29

agaagtgaag aaaaggtcaa ag 22

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 30

tccacgtttg cagactgcgg atttgtc 27

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 31

gacaaatccg cagtctgcaa acgtgga 27

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 32

agtactgatg ggagacactt tgttcctt 28

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 33

agggaacaaa gtgtctccca tcagtact 28

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 34

catcacgctc tctggcatgt ctaccgtc 28

<210> 35

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial Sequence

<400> 35

gacggtagac atgccagaga cggtgatg 28

<210> 36
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 36
 tctacgttat caaactgtgg atttgtc 27
 <210> 37
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 37

 gacaaatcca cagtttgata acgtaga 27
 <210> 38
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 38
 gtattcatgg gaaacacttt gtttcct 27
 <210> 39
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Artificial Sequence
 <400> 39
 aggaaacaaa gtgtttccca tgaatac 27