

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 4월 23일 (23.04.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/056908 A1

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/009167
- (22) 국제출원일: 2014년 9월 30일 (30.09.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0124112 2013년 10월 17일 (17.10.2013) KR
- (71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 배정명 (BAE, Jung Myung); 139-782 서울시 노원구 한글비석로 5길 62, 803동 907호, Seoul (KR). 노철아 (NOH, Seol Ah); 136-051 서울시 성북구 동소문로 20가길 62, 302호, Seoul (KR). 신정철 (SHIN, Jeong Sheop); 136-734 서울시 성북구 길음로 9길 50, 910동 2501호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

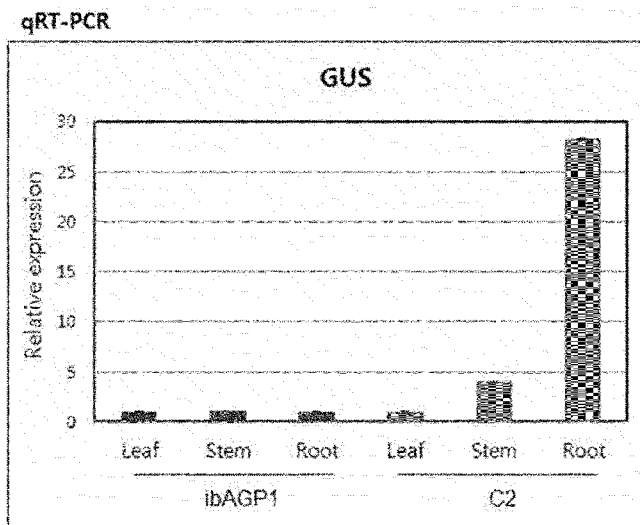
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PLANT CONSTITUTIVE AND HIGH EXPRESSION RECOMBINANT PROMOTER

(54) 발명의 명칭: 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터



(57) Abstract: The present invention relates to a plant constitutive and high expression recombinant promoter having a nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 to the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 4, and including ibAGP1 promoter and SRD1 promoter linked to each other; to a plant constitutive and high expression vector comprising the promoter; and to a method for expressing an exotic gene in all tissues in a plant using the vector. The plant constitutive and high expression promoter of the present invention induces high expression of an exotic gene in all tissues of the Dicotyledoneae. Therefore, the present invention is useful in selecting transformants using an antibiotic or herbicide resistant gene when the transformant is manufactured, and developing transgenic plants producing useful materials for medical and industrial purposes.

(57) 요약서: 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 ~ 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 군에서 선택되는 염기서열을 갖는, ibAGP1 프로모터와 SRD1 프로모터가 연결된 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 식물체 전신 고 발현 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 식물체의 전 조직에서 발현시키는 방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의한 식물체 전신 고 발현 프로모터는 쌍자엽 식물의 전 조직에서 외래유전자의 고 발현을 유도한다. 따라서 형질전환체 제작 시 항생제 혹은 제초제 저항성 유전자를 이용한 형질전환체 선발 및 의료, 산업용 유용 물질 생산 형질전환 식물체 등의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터

기술분야

- [1] 본 특허출원은 2013년 10월 17일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2013-0124112호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 쌍자엽 식물체의 뿌리를 포함한 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도하는 재조합 프로모터 염기서열, 상기 염기서열을 포함하는 쌍자엽 식물체 전신 고 발현 플라스미드 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 쌍자엽 식물체의 전 조직에서 발현시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [3] 작물분자유종은 모든 종(種)의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 게놈 단위로만 가능하던 육종기술을 유전자 단위로 끌어내려 무한대의 육종 효과를 미세하게 조절할 수 있다는 측면에서 차세대 농업을 이끌어 갈 핵심적인 기술이다.
- [4] 이러한 작물분자유종 기술을 이용한 유전자변형 작물의 재배면적과 재배량이 전 세계적으로 지속적으로 증가하고 있으며, 2009년 현재 유전자 변형 작물의 재배 국가는 미국, 브라질, 아르헨티나, 인도, 중국 등을 비롯하여 총 25개국이 되었으며, 유전자 변형 작물의 재배면적 및 재배량이 지속적으로 증가하고 있는 실정이며, 실제로 2008년에 비해서 2009년에는 약 7%인 9백만 헥타아르의 재배 면적이 증가한 것으로 나타났다.
- [5] 상업화된 유전자변형 신종자의 세계 시장 규모는 2002년 40억 달러에서 2010년 100억 달러(종자와 기술료 포함)로 전체 세계 종자 시장규모 300억 달러 대비 15% 수준이며 종류로는 대두, 옥수수, 면화, 유채가 주시장을 형성하고 있다. 유전자변형 작물의 향후 시장 규모에 대한 전망은 장기적으로 유전자변형 작물 시장이 바이오산업에서 가장 큰 영역을 차지할 것이라고 예측하면서 2020년 시장규모를 Astra- Zeneca 등 생명과학 기업들은 750억 달러, 일본의 미쓰비시 연구소는 1,375억 달러에 달할 것으로 전망하였다. 이와 함께 유전자 변형 가공식품도 2010년 1,360억 달러, 2020년에는 1,590억 달러의 거대 시장을 형성하여 21세기 최대의 바이오산업으로 부상할 것으로 예측하였다.
- [6] 유전자변형 작물의 효과를 극대화하기 위해서는 외부에서 삽입된 유전자의 발현을 가장 효과적으로 조절할 수 있어야하며 이를 위해 다양한 프로모터의 개발이 이루어져야 한다. 이에 1980년대 초반부터 식물 유전자의 발현을 조절하는 프로모터에 대한 연구가 진행되어 왔다. 꽃양배추 모자이크 바이러스(Cauliflower mosaic virus)의 프로모터가 식물 전 조직에서 강한 발현을

유도할 것이라고는 가능성이 제시되고(Hohn et al., 1982, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96: 193-236), 상기 프로모터의 염기서열이 밝혀지고(Odell et al., 1985, *Nature* 313:810-812), 식물체내에서 강한 발현이 증명되었다(Sanders et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 1543-58). 그 후 CaMV 35S(특허번호: JP1993192172-A1) 프로모터는 식물에서 가장 많이 쓰이는 항상성 (universal) 프로모터가 되었다.

- [7] 이 후 아그로박테리움 유래 opine synthase 프로모터가 개발되었다 (Bevan et al., 1983, *Nature* 304: 184-187). 근래에는 형질전환 식물체 제작 시 식물 유래의 프로모터 사용에 대한 사회적인 요구가 지속적으로 있어왔으며, 이에 식물 유래 쌍자엽 식물용 항상성 프로모터 개발이 이루어져 왔다. 애기장대 ubiquitin 프로모터 (Callis et al., 1990, *Journal of Biological Chemistry*, 265: 12486-12493), 담배 식물의 NeIF-4A 프로모터 (Mandel et al., 1995, *Plant Molecular Biology*, 29: 995-1004), 애기장대 actin 프로모터 (An et al., 1996, *Plant Journal*, 10: 107-121), 담배식물 tCUP 프로모터 (Foster et al., 1999, *Plant Molecular Biology*, 41: 45-55; Wu et al., 2001, *Molecular Genetics and Genomics* 265: 763-770; Malik et al., 2002, *Theor Appl Genet*, 105: 505-514) 등이 개발되어왔다.

- [8] 하지만 식물 유래의 쌍자엽용 항상성 프로모터는 여전히 부족한 상황으로 쌍자엽용 항상성 프로모터의 개발에 대한 요구가 지속적으로 있어왔다. 본 발명자들에서 개발한 고구마 유래 ibAGP1 프로모터는 쌍자엽 식물의 지상부 조직에서 강한 활성을 보이는 항상성 프로모터(대한민국 등록특허 제10-0604191호(2006.07.25)이며, ibAGP1 유전자의 전분체 타겟팅 염기서열과 함께 사용할 경우 식물의 지상부 각 조직에서 CaMV35S 프로모터를 능가하는 활성을 보인다 (Kwak et al., 2007, *Plant Cell Reports*, 26: 1253-1262; 대한민국 등록특허 제10-0542053호 (2006.01.12)). 하지만 뿌리 조직에서는 그 활성이 매우 약하여 CaMV35S 프로모터에 훨씬 못 미치는 활성을 보이는 문제점이 있었다.

[9]

- [10] 본 발명의 배경이 되는 기술로, 본 발명자들은 대한민국 등록특허 제10-1259682호 (2013.05.02)에 미세조류 유래 베타카로틴 케톨레이제(ketolase) 유전자 및 이를 이용한 케토행 카로티노이드 생산과 동시에 베타카로틴 증산하는 형질전환 식물체 제조 방법에 대해 개시한 바가 있고, 대한민국 등록특허 제10-1260565호 (2013.05.06)에 고구마 유래 SRD1 유전자의 cDNA, 상기 cDNA를 포함하는 식물 형질전환용 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 생산한 뿌리작물 등의 형질전환 식물체에 대해 개시한 바 있다. 그러나, ibAGP1 프로모터를 포함하여 뿌리를 포함한 쌍자엽 식물의 전 조직에서 강한 발현을 유도하는 것에 대해 알려진 바는 없다.

- [11] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 인용문헌 및 특허 문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

- [12] [선행기술문헌]
- [13] [특허문헌]
- [14] 대한민국 등록특허 제10-0604191호 (2006.07.25)
- [15] 대한민국 등록특허 제10-0542053호 (2006.01.12)
- [16] 대한민국 등록특허 제10-1259682호 (2013.05.02)
- [17] 대한민국 등록특허 제10-1260565호 (2013.05.06)

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [18] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 기 개발된 **ibAGP1** 프로모터의 뿌리 조직에서 활성을 증가시켜 쌍자엽 식물체의 뿌리를 포함한 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도하는 재조합 프로모터의 염기서열을 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 의한 재조합 프로모터를 포함하는 식물체 형질전환용 벡터 및 이에 의해 형질전환된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 다른 목적은 전신 고발현-형질전환체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제 해결 수단

- [22] 본 발명은 기 개발된 **ibAGP1** 프로모터의 뿌리 조직에서 활성을 증가시켜 쌍자엽 식물체의 뿌리를 포함한 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도하는 재조합 프로모터의 염기서열을 제공한다.
- [23] 본 발명은 본 발명에 의한 재조합 프로모터를 포함하는 식물체 형질전환용 벡터 및 이에 의해 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [24] 본 발명은 전신 고발현-형질전환체를 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [25] 상술한 바와 같이 본 발명은 재조합 프로모터에 관한 것으로서 이는 쌍자엽 식물의 뿌리 조직을 포함한 전 조직에서 강한 발현을 유도한다. 그러므로 본 발명은 쌍자엽 식물의 전 조직에서 강한 발현을 유도할 때 효과적으로 이용될 수 있다. 특히, 형질전환 식물체 제작 시 제초제 혹은 항생제 합성 유전자 등의 선발 유전자의 강한 발현을 유도하거나, 의료 산업용 유용 물질 생산 형질전환체 제작에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [26] 도 1은 본 발명의 재조합 프로모터의 구조를 나타내는 도면.
- [27] 도 2는 본 발명을 위한 일시적 발현 분석용 프로모터 클로닝에 이용한 **pBI101** 벡터 모식도.
- [28] 도 3a는 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 일시적 발현 분석 결과를 **GUS**

염색으로 나타내는 도면.

[29] 도 3b는 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 일시적 발현 분석 결과를 뿌리 조직에서 GUS 단백질 정량 분석으로 나타내는 도면.

[30] 도 3c는 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 일시적 발현 분석 결과를 잎 조직에서 GUS 단백질 정량 분석으로 나타내는 도면.

[31] 도 4는 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 활성을 세포 단위별로 확인하기 위해 Agrobacterium infiltration 방법을 이용하여 일시적으로 형질전환시키고 GUS 염색이 완료된 배추 식물체 뿌리 조직의 단면을 관찰한 결과를 보여주는 도면.

[32] 도 5는 본 발명을 위한 재조합 프로모터 애기장대 형질전환체 제작용 벡터 (pBGWFS7.0) 모식도.

[33] 도 6은 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 애기장대 형질전환체에서 활성을 GUS 염색으로 나타낸 도면. 붉은 색 점선으로 된 원 내부는 뿌리 조직을 나타냄.

[34] 도 7은 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 콩 형질전환체에서 활성을 GUS 염색으로 나타낸 도면.

[35] 도 8은 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 활성을 정량화하기 위해 콩 형질전환체에서 GUS 유전자에 대한 발현 정도를 qRT-PCR 분석으로 나타낸 도면.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[36] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 ~ 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 군에서 선택되는 하나의 염기서열을 갖는, ibAGP1 프로모터와 SRD1 프로모터가 연결된 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터를 제공한다.

[37] 바람직하게, 상기 재조합 프로모터는 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는다.

[38] 바람직하게, 상기 식물체는 쌍자엽 식물체인 것을 특징으로 한다.

[39] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 재조합 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터를 제공한다.

[40] 바람직하게, 상기 발현벡터는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 재조합 프로모터가 pBGWFS7.0에 도입된 형질전환용 발현벡터이다.

[41] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.

[42] 본 발명의 또 양태에 의하면, 본 발명은 전신 고발현-형질전환체를 제조하는 방법을 제공한다.

[43]

[44] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

[45] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 고구마 유래 ibAGP1 프로모터의 5' 말단 부위에 SRD1 프로모터를 융합시켜 재조합 프로모터를 제작하였으며

배추식물에 일시적 발현 및 애기장대 형질전환체에서 동일 프로모터의 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[46] 따라서 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 ~ 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 군에서 선택되는 하나의 염기서열을 갖는, **ibAGP1** 프로모터와 **SRD1** 프로모터가 연결된 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터를 제공한다.

[47] 본 발명에 있어, '프로모터(promoter)'란, 일반적으로 전사를 개시하는 지점을 포함하는 암호화 부위의 상류 쪽에 위치하는 유전자 부위로, 흔히 유전자 발현을 조절하는 TATA 박스, CAAT 박스 부위, 외부 자극에 반응하여 유전자 발현에 영향을 주는 부위 및 위치와 방향에 상관없이 거의 모든 유전자의 발현을 촉진하는 인핸서 등으로 이루어져 있다. 또한, 이러한 프로모터 중에는 모든 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터 및 시간 또는 위치 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터가 있으며, 바람직하게 본 발명에 따른 프로모터는 전 조직에서 발현하는 재조합 프로모터이다. 따라서, 본 발명에 의한 상기 프로모터는 식물체 전 조직에서 목적 유전자의 발현을 유도시킬 수 있다.

[48] 본 발명에 의한 재조합 프로모터는 상기 두 개의 프로모터의 4가지 조합을 이용할 수 있다 (도 1). **ibAGP1** 프로모터는 그 활성이 높으며 당 처리에 의해 프로모터 활성이 가장 높게 유도되는 전체 크기(1976 bp)의 프로모터와 전분체 타겟팅 염기서열 (TP)가 연결되어 있는 **ibAGP1** 프로모터를 이용한다. 한편, **SRD1** 프로모터는 3-kb 전체에 뿌리 특이 발현 조절 인자가 산재해 있을 것으로 추정되는 결손 프로모터 결과 (Noh et al., 2012, Transgenic Research, 21: 265-278)를 바탕으로 **SRD1**의 활성이 높게 나타나는 전체 크기(-2801~+209; 2801 bp **SRD1** 프로모터 + 209 bp 5' 비번역 부위)와 최소 크기(-321~+209; 321 bp **SRD1** 프로모터 + 209 bp 5' 비번역 부위), 그리고 ROOT MOTIF가 다량 산재되어 있는 부위(-2088 ~ -1543)를 선정하여 **ibAGP1**의 프로모터에 연결함으로써 새로운 재조합 프로모터 합성을 완성할 수 있다.

[49] 재조합 프로모터 제작 시에 **ibAGP1** 프로모터를 3' 방향에 그리고 **SRD1** 결손 프로모터들을 5' 방향에 위치하게 제작한다. 즉 4 가지의 종류가 다른 합성 프로모터 C1, C2, C3, C4를 제작할 수 있는데, C1은 **SRD1** (-2801 ~ +209) + **ibAGP1** (-1909 ~ +67) (서열번호 1), C2는 **SRD1** (-321 ~ +209) + **ibAGP1**(-1909 ~ +67)(서열번호 2), C3는 **SRD1**(-2088 ~ -1543) + **ibAGP1**(-1909 ~ +67)(서열번호 3), C4는 **SRD1**(-2801 ~ +209) + **ibAGP1**[(-1909 ~ +67) + TP1](서열번호 4)의 프로모터들로 구성되어 있다 (도 1).

[50] 본 발명에 의한 상기 프로모터는 기존의 **ibAGP1** 프로모터의 뿌리 조직에서 약한 활성을 보완하여 쌍자엽 식물에서 뿌리를 포함한 모든 조직에서 목적 유전자의 강한 발현을 유도시킬 수 있다.

[51]

[52] 바람직하게, 상기 재조합 프로모터는 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖으며, 더욱 바람직하게 서열번호 2의 염기서열을 갖는 재조합

프로모터(C2)이다. 상기 C2 프로모터는 기존의 ibAGP1 프로모터의 5' 말단 부위에 SRD1 프로모터의 일부분 (-321 ~ +209)을 연결시킨 것으로 발현유도 효율이 가장 우수하다.

- [53] 본 발명의 식물체 전 조직 고 발현 재조합 프로모터는 상기 서열번호 1 ~ 서열번호 4의 염기서열뿐만 아니라 상기 염기서열의 일부 염기가 치환, 결실 또는 부가된 변형서열로서 전 조직 특이적 프로모터 활성을 나타내는 염기서열을 포함한다.
- [54]
- [55] 본 발명에서 상기 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물체이고, 상기 쌍자엽 식물은 이에 제한되지는 않으나, 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 셀러리 및 유채일 수 있고, 상기 단자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양과일 수 있다.
- [56]
- [57] 또한, 본 발명은 상기 재조합 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현 벡터를 제공한다. 바람직하게 본 발명은 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물체의 전 조직 고 발현 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [58] 본 발명에 있어, '발현 벡터'란 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 식물체의 전 조직 고 발현 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다.
- [59] 본 발명에 있어, '작동 가능하게 연결(operably linked)' 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합할 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란, 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.
- [60] 상기 본 발명에 따른 발현 벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 재조합 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입함으로써

제조할 수 있다. 따라서 본 발명에 사용될 수 있는 벡터로 다양한 클로닝 부위를 가지고 있는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 Ti 플라스미드 등의 플라스미드가 있고, 식물 바이러스 벡터가 있으며, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라면 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 pBI101 벡터 및 pBGWFS7.0를 이용하여 C2::GUS 발현벡터를 제조하였다.

[61]

[62] 본 발명에 있어서, '목적 단백질'이란 본 발명의 프로모터에 의해 식물체의 전 조직에서 고 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 단백질을 말하며, 바람직하게는 외인성 단백질이거나 또는 내인성 단백질 및 리포터 단백질일 수 있다. 상기 외인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연으로 존재하지 않는 단백질을 말하며, 상기 내인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연으로 존재하는 유전자에 의해 발현된 단백질을 말한다. 또한, 상기 리포터 단백질은 리포터 유전자에 의해 발현된 단백질로서 그 존재에 의해서 세포 내에서의 그의 활성을 알려주는 표지 단백질을 말한다. 본 발명의 일 실시예에서는 청색 발색 유전자인 GUS가 연결된 형태의 리포터 시스템이 내재되어 있는 pBI101 또는 pBGWFS7.0에 본 발명의 애기장대 재조합 프로모터를 GUS 유전자의 상류부분에 작동가능하게 연결한 재조합 발현 벡터 C2::GUS를 제조하였다. 상기 외래 유전자는 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.

[63]

나아가 본 발명의 식물체 전 조직 고 발현 프로모터의 전사활성에 의하여 발현되는 목적 단백질 유전자의 예로는, 형질전환 대상 식물체가 유채, 들깨 및 참깨 등의 유지작물인 경우 지방산 생합성 및 조절 관련 유전자 등을 들 수 있고, 단백질의 생성 및 축적량이 다른 식물에 비해 상대적으로 높은 콩 및 알팔파 등의 두과식물인 경우 경제적으로 부가가치가 높은 항체 유전자 등을 들 수 있고, 사료작물로 대표적인 옥수수의 경우 돼지 설사병, 구제역 바이러스 등의 경구 백신(edible vaccine) 유전자 등을 들 수 있고, 뿌리로 장기간 보관, 유통되는 대부분의 작물의 경우 수확 후 저장성을 높이도록 각종 병 저항성에 관련된 유전자 등을 들 수 있으며, 그 외에도 토코페롤, 베타카로틴 등과 같이 특정 영양 성분을 작물의 뿌리에서 강화하려는 경우에는 관련 물질대사경로의 생합성 유전자 등을 들 수 있으나, 여기에 한정되지 않고, 본 발명의 전 조직 고 발현 프로모터를 사용하여 조절될 수 있는 각종 목적 단백질을 코딩하는 유전자들이 포함될 수 있다.

[64]

그러므로 본 발명의 프로모터를 이용한다면 식물체의 전 조직을 섭취하는 작물의 경우, 유용한 목적 단백질을 식물체의 전 조직에서 발현시킴으로써

식물체와 함께 목적 단백질을 함께 섭취할 수 있는 작물을 개발할 수 있다. 또는, 식물체 내에서 생산된 목적 단백질을 당업계에 알려진 적절한 방법에 따라 추출하여 사용할 수도 있다.

[65]

[66] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 식물세포 및 식물체를 제공한다. 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현 벡터는 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 식물 세포내로 도입할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터를 식물 세포내로 도입하는 방법으로는, 제한 없이 당해 공지된 방법이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 염화칼슘(CaCl_2) 및 열 쇼크(heat shock) 방법, 입자 총 충격법(particlegunbombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공(electroporation) 및 PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법 등과 같은 방법들이 있다.

[67]

[68] 또한, 본 발명은 본 발명의 재조합 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 식물체 전 조직에서 고발현시키는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[69]

[70] 본 발명은 또한, 1) 서열번호 1 ~ 4의 염기서열 중 하나의 염기서열을 갖는 재조합 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 2) 상기 형질전환된 식물체의 전 조직 내에서 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법을 제공한다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[72]

[73] 실시예 1. 본 발명에 의한 ibAGP1+SRD1 재조합 프로모터 제작

[74] ibAGP1 프로모터와 SRD1 프로모터를 재조합하여 뿌리를 포함한 전 조직에서 강하게 발현하는 프로모터를 개발하기 위하여 두 개의 프로모터의 4가지 조합을 이용하였다 (도 1).

[75] ibAGP1 프로모터는 그 활성이 높으며 당 처리에 의해 프로모터 활성이 가장 높게 유도되는 전체 크기(1981 bp)의 프로모터와 전분체 타겟팅 염기서열 (TP)가 연결되어 있는 ibAGP1 프로모터를 이용하였다.

- [76] 한편, SRD1 프로모터는 3-kb 전체에 뿌리 특이 발현 조절 인자가 산재해 있을 것으로 추정되는 결손 프로모터 결과 (Noh et al., 2012, Transgenic Research, 21: 265-278)를 바탕으로 SRD1의 활성이 높게 나타나는 전체 크기(-2801~+209; 2801 bp SRD1 프로모터 + 209 bp 5' 비번역 부위)와 최소 크기(-321~+209; 321 bp SRD1 프로모터 + 209 bp 5' 비번역 부위), 그리고 ROOT MOTIF가 다량 산재되어 있는 부위(-2088~-1543)를 선정하여 ibAGP1의 프로모터에 연결함으로써 새로운 재조합 프로모터 합성을 완성하였다.
- [77] 재조합 프로모터 제작 시에 ibAGP1 프로모터를 3' 방향에 그리고 SRD1 결손 프로모터들을 5' 방향에 위치하게 제작하였다. 즉 4 가지의 종류가 다른 합성 프로모터 C1, C2, C3, C4를 제작하였는데, C1은 SRD1(-2801 ~ +209) + ibAGP1(-1909 ~ +67)(서열번호 1), C2는 SRD1(-321 ~ +209) + ibAGP1(-1909 ~ +67)(서열번호 2), C3는 SRD1(-2088 ~ -1543) + ibAGP1(-1909 ~ +67)(서열번호 3), C4는 SRD1(-2801 ~ +209) + ibAGP1[(-1909 ~ +67) + TP1](서열번호 4)의 프로모터들로 구성되어 있었다 (도 1).
- [78] 이상의 재조합 프로모터들의 벡터를 제작하기 위하여 두 개의 과정으로 클로닝을 실시하였다 (도 2). 먼저, ibAGP1 프로모터의 5'쪽 프라이머는 (서열번호 5) *Xba* I 제한효소 인식부위를 첨가시키고, 3'쪽 프라이머에 (ibAGP1은 서열번호 6, ibAGP1+TP1은 서열번호 7) *Bam* HI 제한효소 인식부위를 첨가시켜 PCR로 증폭시켰다. 이때 PCR은 94°C에서 5분간 처리 후, 94°C-1분, 55°C-1분, 72°C-1분 30초를 30회 수행한 후 72°C에서 10분간 처리하였다. 이 PCR 산물을 pBI101 벡터에 삽입 시키고, *Xba* I 과 *Bam* HI을 처리하여 확인하였다.

[79] 표 1

[Table 1]

5' 프라이머	5-GACTCTAGACTGATACTTTGGTGACT-3'	서열번호 5
3' 프라이머	5-TGCGGATCCTTTTAAGCCGCGCTACCA-3'	서열번호 6
3' 프라이머	5-TGCGGATCCCTGCGAATTCTGCGAATC-3'	서열번호 7

[80]

- [81] 먼저 제작된 ibAGP1이 삽입된 pBI101 벡터에 각각의 SRD1 프로모터를 클로닝하기 위하여, SRD1 프로모터의 5'쪽 프라이머는 *Sal* I 제한효소 인식부위를 첨가시키고, 3'쪽 프라이머에 *Xba* I 제한효소 인식부위를 첨가시켜 PCR로 증폭시켰다 (표 2). C1과 C4용 PCR은 94°C에서 5분간 처리 후, 94°C-1분, 58°C-1분, 72°C-2분 30초를 30회 수행한 후 72°C에서 10분간 처리하였으며, C2와 C3용 PCR은 94°C에서 5분간 처리 후, 94°C-1분, 58°C-1분, 72°C-1분을 30회 수행한 후 72°C에서 10분간 처리하였다. 이 PCR 산물을 각각 ibAGP1이 삽입된 pBI101 벡터에 삽입 시키고, *Sal* I 과 *Xba* I 을 처리하여 확인하였다. 삽입이 확인된 colony 들을 대상으로 플라스미드 DNA를 추출한 후 염기서열 분석을

통해 최종적으로 재조합 프로모터 제작을 완료하였다.

[82] 표 2

[Table 2]

C1	5' 프라이머	5'-CATGTCGACGGCTGGTTTCTAAGACAT-3'	서열번호 8
	3' 프라이머	5'-GACTCTAGACCTTCTCCTCCCTGAAGAAATC-3'	서열번호 9
C2	5' 프라이머	5'-CATGTCGACGCTAATTAATCAAATACTCAT-3'	서열번호 10
	3' 프라이머	5'-GACTCTAGACCTTCTCCTCCCTGAAGAAATC-3'	서열번호 9
C3	5' 프라이머	5'-GACGTCGACATTATTTTCATTGGCACG-3'	서열번호 11
	3' 프라이머	5'-GACTCTAGAGGTGCATTATTTTAAAGTTTAATG TGCT-3'	서열번호 12
C4	5' 프라이머	5'-CATGTCGACGGCTGGTTTCTAAGACAT-3'	서열번호 8
	3' 프라이머	5'-GACTCTAGACCTTCTCCTCCCTGAAGAAATC-3'	서열번호 9

[83]

[84] 실시예 2: 배추 식물에서 재조합 프로모터 일시적 발현 분석

[85] 제작된 4종의 재조합 프로모터(C1, C2, C3, C4) (도 1)를 대조구와 함께 agroinfiltration 실험을 실시하였다. Agroinfiltration 분석을 위하여 10일 동안 온실에서 키운 배추가 사용되었다. 각각의 프로모터가 삽입된 바이너리 벡터는 LBA4404에 각각 형질전환하고 잎과 뿌리 조직에 infiltration을 실시하였다. Agrobacterium 하나의 콜로니는 50 mg/L kanamycin과 25mg/L rifampicin이 포함된 3 mL YEP 액체배지에서 하루 동안 28°C에서 키웠다. 하루 동안 키운 배양액의 500 µL를 50 mL YEP 액체배지에서 OD₆₀₀ 값이 1.0이 되도록 키운 후 5000g, room temperature에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 버렸다. 여기에 50 mL infiltration buffer [10 mM MgCl₂, 10 mM MES-KOH (pH5.7), 200 µM Acetosyringone]를 넣어 현탁 시킨 후 다시 원심분리하고 상층액을 버리고 다시 infiltration buffer를 OD₆₀₀ 값이 1.0이 되게 넣어 주었다. OD₆₀₀ 값이 1.0으로 맞춰진 배양액은 상온에서 2-4시간 동안 뒀다가 vacuum을 이용한 infiltration을 실시하였다. Agroinfiltration 실시 이틀 후 유식물을 각각 X-gluc이 첨가된 용액에 하룻밤 동안 반응시켜 발현된 GUS의 양상을 비교하고, 정량적 분석을 위해서는

자엽과 뿌리 조직을 각각 채취하여 GUS 추출용액에 담근 후 드릴과 플라스틱 막대를 이용하여 곱게 파쇄하였다. 이렇게 파쇄된 샘플에 MUG를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, MUG로부터 GUS에 의해 변환된 MU값을 정량적으로 환산하여 분석하였다.

- [86] 분석 결과 *ibAGP1* 프로모터의 활성은 지상부에서는 35S 프로모터의 활성과 비슷한 수준이었다(도 3a 및 도 3c). 뿌리에서는 *ibAGP1* 프로모터의 활성은 35S 프로모터보다 낮았다.(도 3a, 3b 및 3c) 그러나 재조합 프로모터의 활성은 뿌리에서는 35S 프로모터보다 높고 *ibAGP1* 프로모터보다 높아졌으며, 잎에서는 그 활성이 크게 감소되지 않았다 (도 3a ~ 도 3c). 그중에서도 특히, 재조합 프로모터 C2과 C3에 의해 뿌리에서 높아진 활성을 나타내었다. 이 결과는 뿌리에서 약한 *ibAGP1* 프로모터의 활성을 뿌리 특이적 활성을 나타내는 SRD1 프로모터가 보완함으로써 쌍자엽 형질전환체 개발에 유용한 전신 고발현 프로모터를 제공할 수 있다.

[87]

[88] 실시예 3: 뿌리 조직에서 재조합 프로모터 활성 부위 확인

- [89] 재조합 프로모터의 활성을 세포 단위별로 확인하기 위해 Agrobacterium infiltration 방법을 이용하여 일시적으로 형질전환시키고 GUS 염색이 완료된 배추 식물체 뿌리 조직의 단면을 hand-section 하여 관찰하였다.

- [90] 그 결과 도 4에서 보는 바와 같이 *ibAGP1* 프로모터는 뿌리 조직의 cortex 층에서만 GUS 염색이 관찰된 반면 재조합 프로모터 C2와 C3에 의해 형질전환된 뿌리들에서는 중심부 내부의 도관 조직 세포에서 강한 GUS 염색을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 기존의 *ibAGP1* 프로모터에서는 부족하던 뿌리 조직에서의 활성이 C2와 C3 재조합 프로모터에서는 첨가된 SRD1 프로모터 단편에 의해 뿌리의 도관 조직 내에서 강한 프로모터 활성을 보이고 있음을 시사한다. 따라서 C2와 C3 재조합 프로모터는 쌍자엽 식물의 형질전환체 개발에 유용한 전신 고발현 프로모터임을 보여주며, 이 중 뿌리와 잎 두 조직에서 모두 높은 활성을 보여주는 (도 3a 및 도 3b) C2 프로모터가 가장 적합한 재조합 프로모터임을 나타낸다.

[91]

[92] 실시예 4: 애기장대 형질전환용 벡터 제작

- [93] 일시적 발현 분석에서 가장 적합한 전신 고발현 프로모터로 선정된 C2 프로모터의 활성을 형질전환 식물체에서 확인하기 위해, 애기장대 형질전환체를 제작하였다. 재조합 프로모터 C2와 *ibAGP1* 프로모터를 PCR로 증폭시킨 후 게이트웨이 벡터 pBGWFS7.0의 GFP-GUS 유전자의 5' 부위에 삽입시켰다 (도 5). PCR 조건은 상기 실시예 1에서 사용하였던 조건과 동일하였으며 프라이머 염기서열도 실시예 1에서 사용하였던 염기서열에서 제한효소 인식부위만 제외한 동일한 부위의 염기서열을 사용하였다. 제작된 벡터를 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)에

냉-해동(Freeze-thaw) 방법(An, G. 1987, Methods in Enzymology)으로 도입하였다. 형질전환된 아그로박테리아 (Agrobacteria)는 2일 동안 28°C에서 진탕 배양한 후, 플로랄딥(floral dip) 방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal)에 근거하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana* cv. columbia)의 개화 직전 암술머리에 접종하여 애기장대 식물체를 형질전환시켰다.

[94]

[95] 실시예 5: 형질전환된 애기장대의 조직 화학적 염색 분석

[96] 실시예 3에서 제조된 애기장대 형질전환체로부터 종자를 수확한 다음, PPT(phosphinothricin, 10 mg/L)을 함유하는 MS 배지에 도말하여 저항능을 가진 형질전환 식물체를 선별하였다. 선별된 형질전환 식물체의 각 조직으로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하며 조사하였다. 유식물체의 전체 조직을 1 mM X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl--glucuronidase), 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담가 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 70% 에탄올을 첨가하여 2시간동안 클로로포름을 제거하는 과정을 3회 반복한 후, 100% 에탄올에 보관하면서 관찰하였다.

[97] 그 결과, 도 6과 같이 ibAGP1 프로모터는 유식물의 지상부 전 조직에서 강한 활성을 보이는 반면, 뿌리에서는 활성이 없어서 GUS 염색을 관찰할 수 없었던 반면 C2 프로모터는 뿌리를 포함한 지상부 전 조직에서 강한 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 실시예 2의 일시적 발현 분석에서도 뿌리 조직에서 C2 프로모터의 활성이 ibAGP1 프로모터의 활성에 비해 상승하였으나 형질전환체에서는 재조합 프로모터의 효과가 더 극명함을 보여준다. 이러한 결과는 형질전환체 제작 시에 C2 프로모터가 매우 효과적으로 사용할 수 있는 전신 고발현 프로모터임을 나타낸다.

[98]

[99] 실시예 6: 형질전환 콩 제작 및 활성 분석

[100] 실시예 4에서 제조된 C2 프로모터와 ibAGP1 프로모터 형질전환용 벡터를 Kim 등 (2012, PLoS One 7, e48287)의 방법으로 광안콩에 형질전환시켜 형질전환 콩을 확보하였다. T1 형질전환 종자를 유리 데시케이터에서 시판용 clorox (100 mL)와 conc. HCl (3.3 mL) 을 섞어서 발생시킨 가스를 이용해 48시간 동안 소독한 후 PPT(phosphinothricin, 20 mg/L)와 carbenicillin(100 mg/L)이 함유된 1/2 MS 배지에서 발아시켰다. 발아 후 본엽이 3-4장 정도 나왔을 때 잎과 뿌리를 채취해 실시예 5에서와 동일한 조직 화학적 방법으로 GUS 활성을 조사하였다. 그 결과 도 7과 같이 잎 조직에서는 C2와 ibAGP1 프로모터 모두 비슷한 수준의 강한 활성을 보여준 반면, 뿌리 조직에서 C2 프로모터의 활성이 ibAGP1 프로모터의 활성에 비해 상승하였음을 확인할 수 있었다.

[101] 상기의 결과를 정량적으로 확인하기 위해 콩 형질전환체를 대상으로 GUS

유전자에 대한 real-time PCR을 수행하였다. 이를 위해 조직화학적 분석에 사용하였던 동일한 기내 배양 콩 형질전환체에서 잎, 줄기, 뿌리 조직을 분리하여 채취한 후 RNeasy Mini kit (Qiagen)를 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. 각 샘플당 전체 RNA 1 ug을 iScript cDNA synthesis kit (BIO RAD)로 cDNA를 합성 후 LightCycler 480 Instrument II (Roche)와 SYBR Premix Ex Taq(TaKaRa)을 사용하여 qRT-PCR 분석을 실시하였다. GUS 유전자 프라이머 (5'-CCTCGCATTACCCTTACGCTG-3', 5'-CGTTGACTGCCTCTTCGCTG-3')를 사용하였으며 콩의 actin11 유전자(5'-ATCTTGACTGAGCGTGGTTATTCC-3', 5'-GCTGGTCCTGGCTGTCTCC-3')를 내적 대조구로 사용하였다. 도 8의 그래프와 같이 ibAGP1 프로모터의 활성화에 C2 프로모터의 활성을 비교한 결과 잎 조직에서는 두 개 프로모터가 비슷한 정도의 활성을 보인 반면 줄기 조직에서는 C2 프로모터의 활성이 ibAGP1 프로모터에 비해 4배 정도 증가하였다. 특히 뿌리 조직에서는 C2 프로모터의 활성이 매우 강하여 ibAGP1 프로모터의 활성화에 비교한 결과 약 28배 정도 상승하였다. 이러한 결과는 콩 등의 형질전환체 제작 시에 C2 프로모터가 매우 효과적으로 사용할 수 있는 전신 고발현 프로모터임을 나타내며, 특히 뿌리 조직에서 그 활성이 매우 강함을 시사한다.

[102]

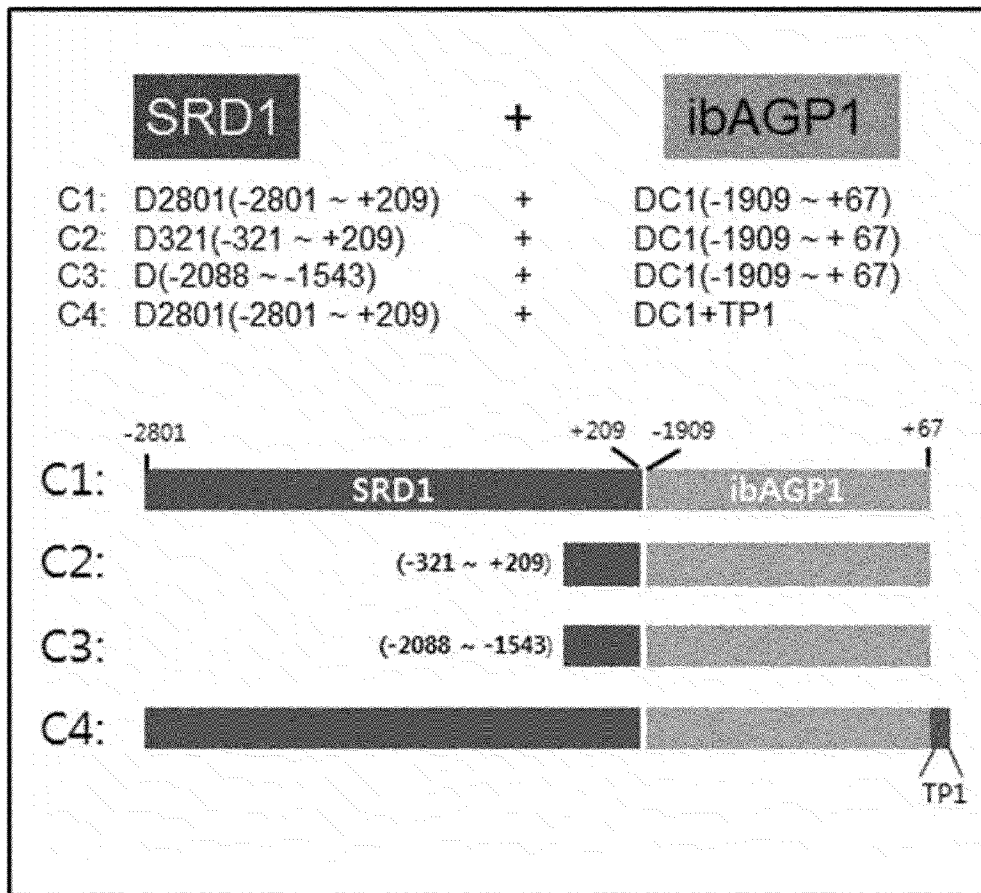
[103] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[104]

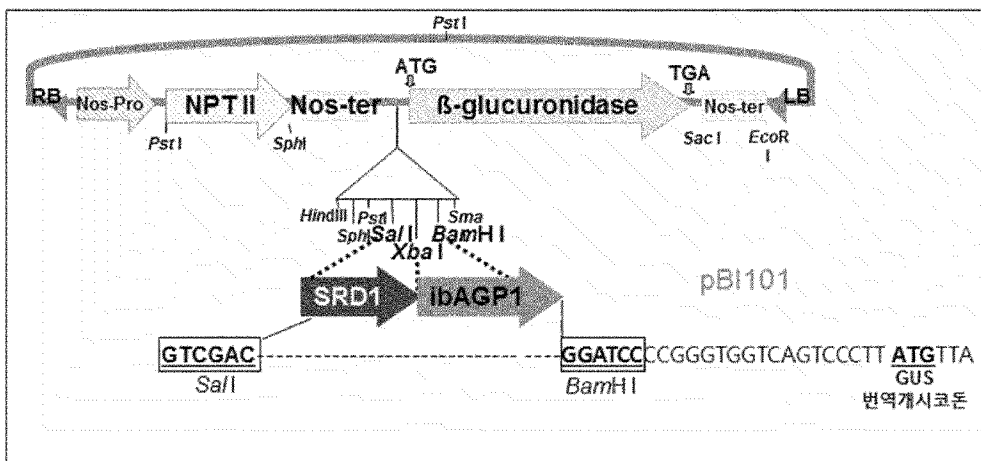
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 염기서열 ~ 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 군에서 선택되는 하나의 염기서열을 갖는, *ibAGP1* 프로모터와 *SRD1* 프로모터가 연결된 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 재조합 프로모터는 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 재조합 프로모터.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물체인 것을 특징으로 하는 재조합 프로모터.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항 기재의 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 발현벡터는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 재조합 프로모터가 pBGWFS7.0에 도입된 형질전환용 발현벡터.
- [청구항 6] 제4항 기재의 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체.
- [청구항 7] 다음 단계를 포함하는 전신 고발현-형질전환체를 제조하는 방법:
 (a) 제1항 또는 제2항의 프로모터; 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된(*operatively linked*) 외래유전자를 포함하는 발현벡터를 제조하는 단계; 및
 (b) 상기 발현벡터로 식물을 형질전환시켜 상기 외래유전자를 식물체에서 고발현시키는 단계.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 (b)의 식물체는 쌍자엽 식물체인 것을 특징으로 하는 방법.

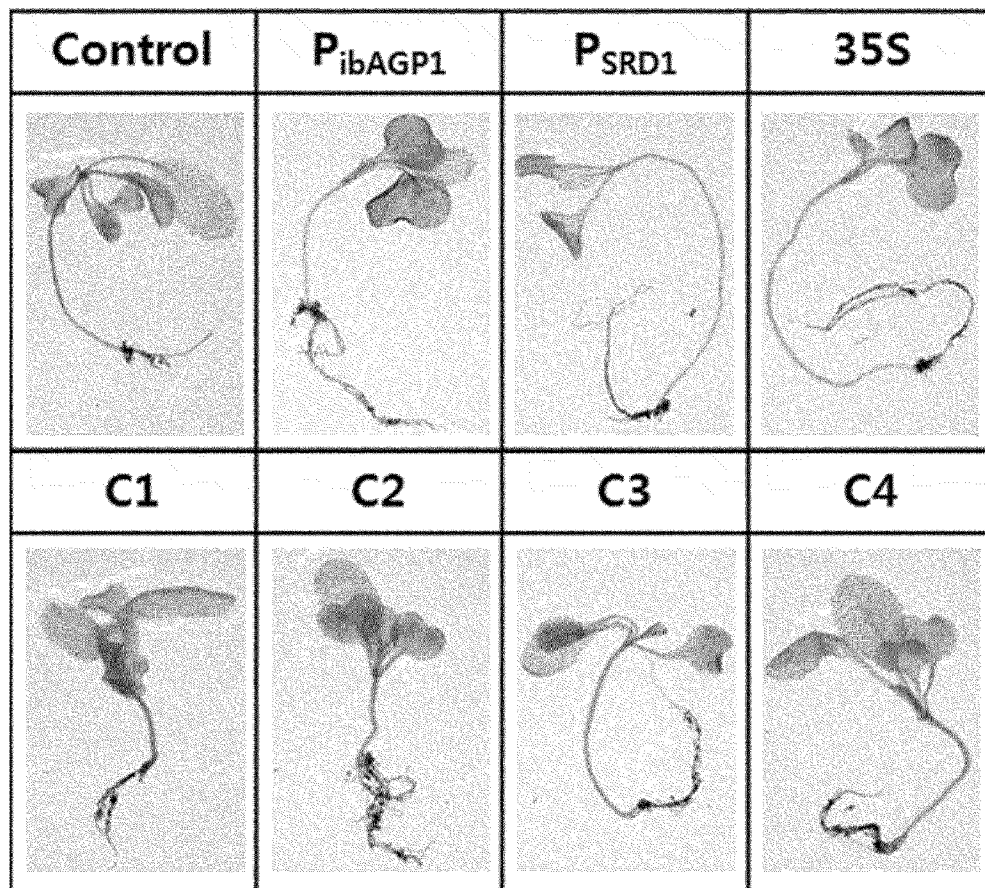
[Fig. 1]



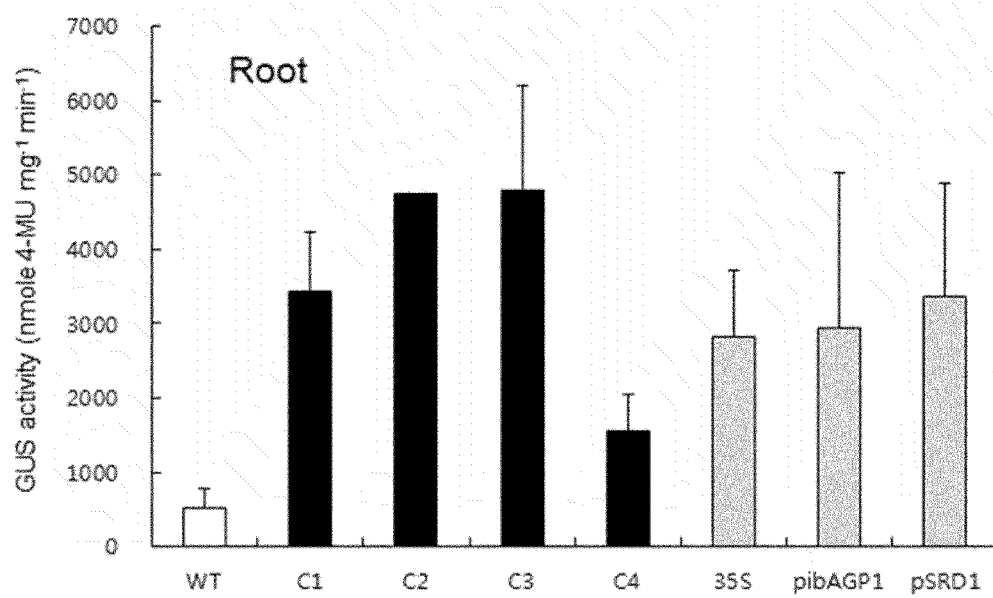
[Fig. 2]



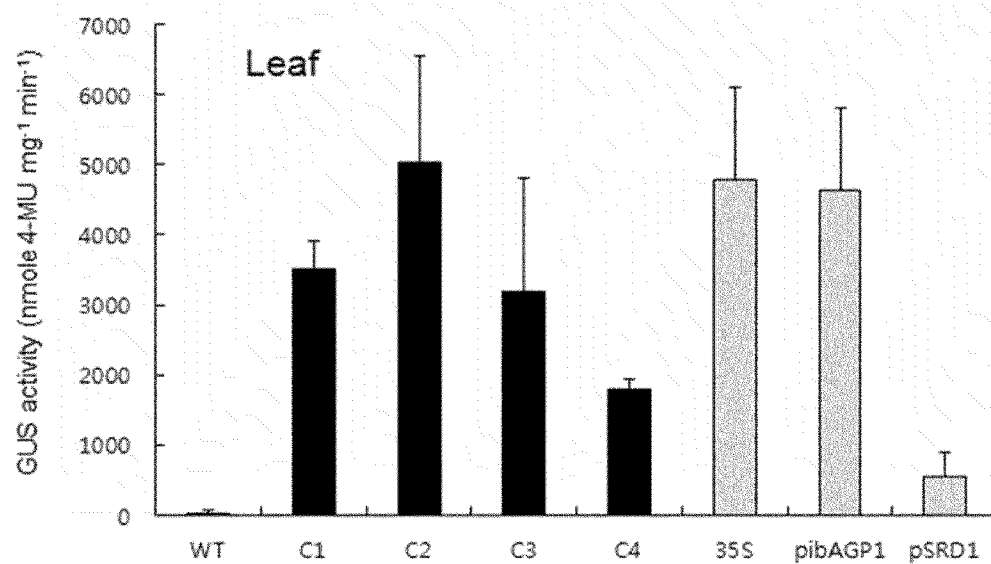
[Fig. 3a]



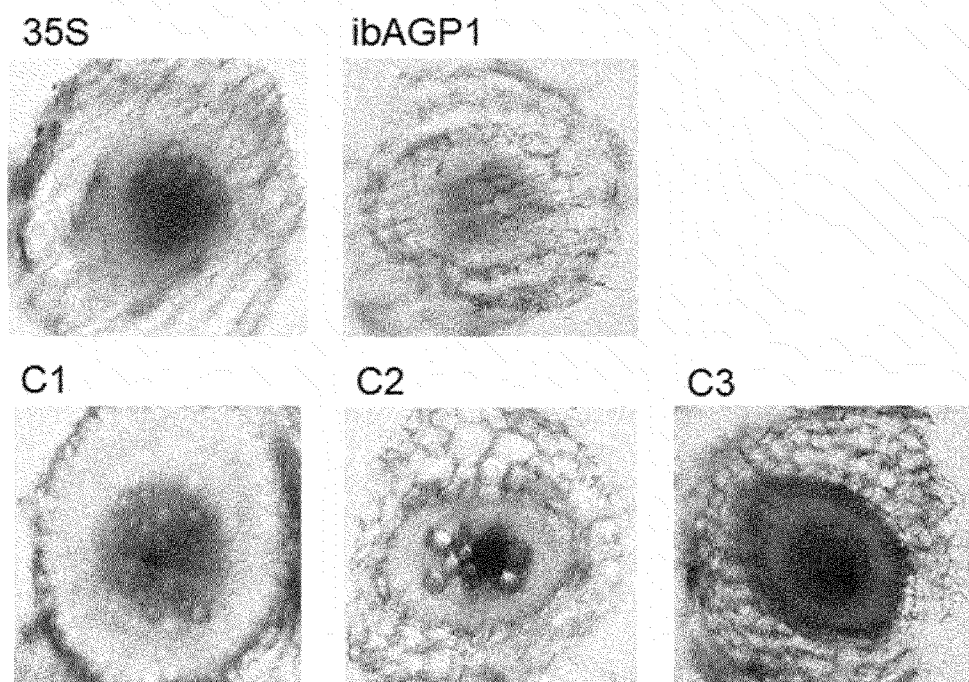
[Fig. 3b]



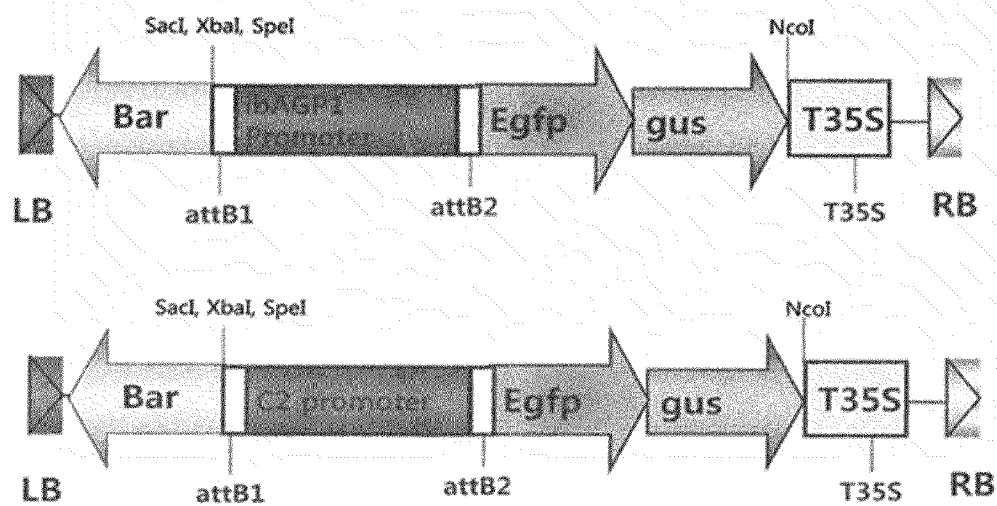
[Fig. 3c]



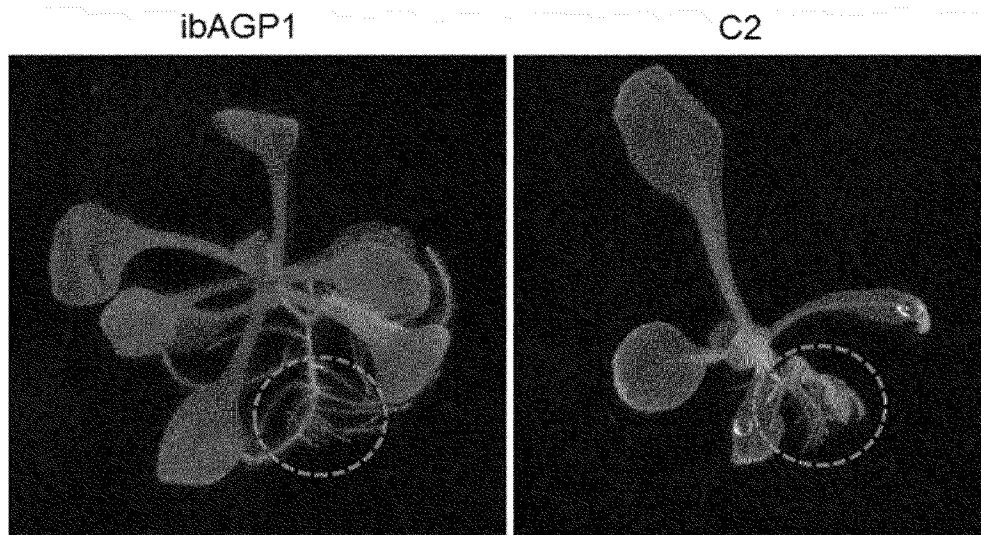
[Fig. 4]



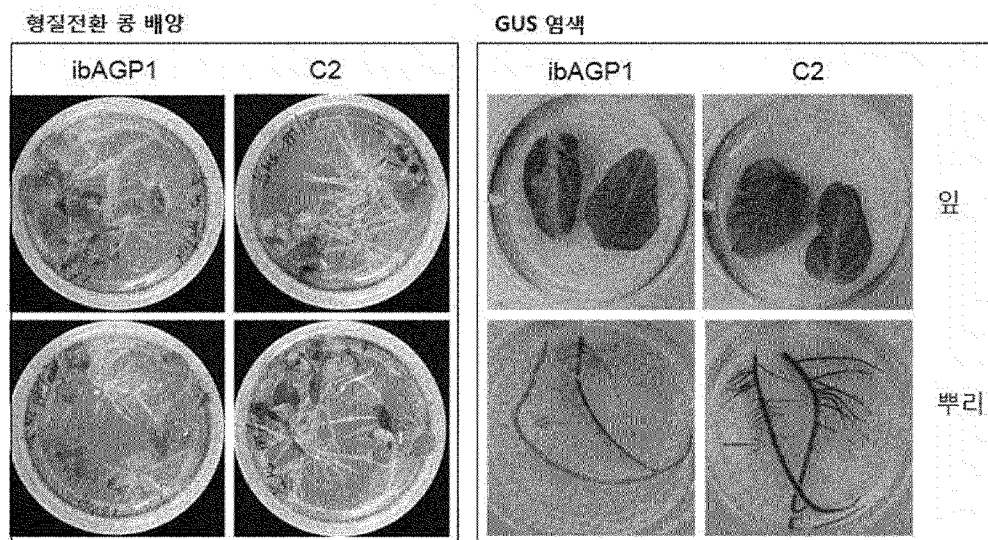
[Fig. 5]



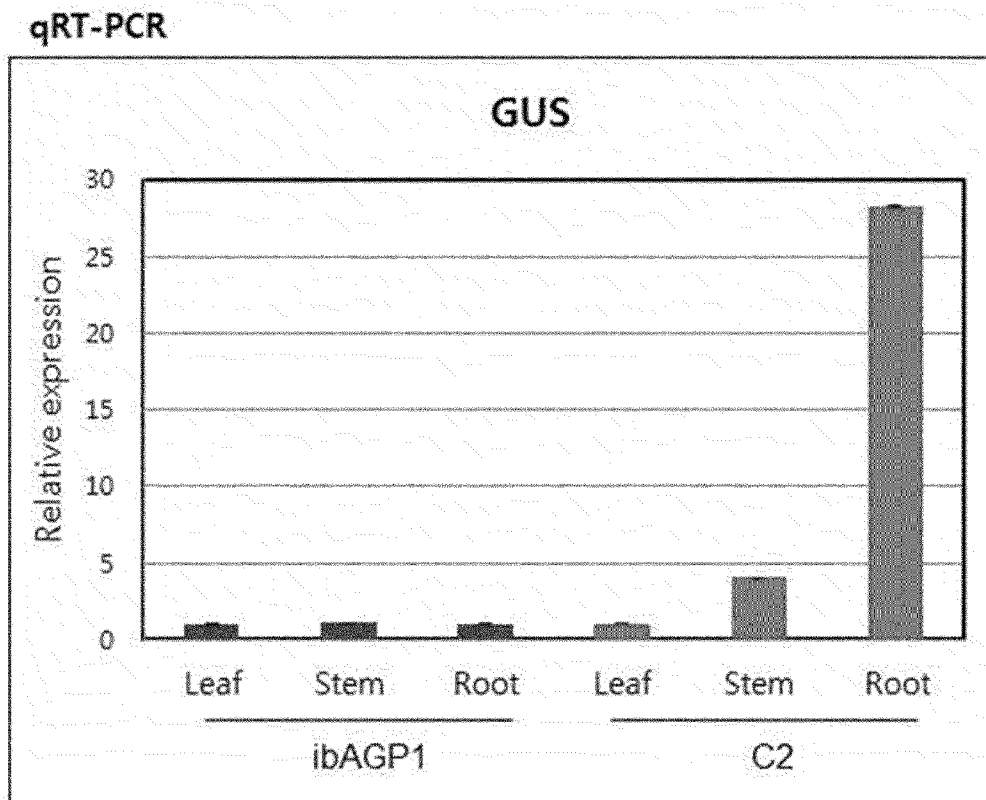
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/009167**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/82(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, A01H 5/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/82; C12N 15/63; C12N 15/29; A01H 5/00; C12N 15/52; C12N 15/62; C12N 9/22; C12N 15/11

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: ibAGPI promoter, SRD1 promoter, plant, expression, dicotyledonous**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2012-0045631 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 09 May 2012 See the entire document	1-8
A	KR 10-2006-0022054 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 09 March 2006 See the entire document	1-8
A	US 2012-0309092 A1 (SPANGENBERG, German et al.) 06 December 2012 See the entire document	1-8
A	Seol Ah Noh et al., Transgenic Res. 2012, Vol. 21, No. 2, pp. 265-278. A sweetpotato SRD1 promoter confers strong root-, taproot-, and tuber-specific expression in Arabidopsis, carrot, and potato See the entire document	1-8
A	GenBank Accession Number AY694185, Ipomoea batatas small subunit ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPI) gene, promoter region, 22 February 2006 See the entire document	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 DECEMBER 2014 (05.12.2014)

Date of mailing of the international search report

05 DECEMBER 2014 (05.12.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

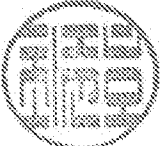
Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/009167

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0045631 A	09/05/2012	NONE	
KR 10-2006-0022054 A	09/03/2006	CN 1914321 A	14/02/2007
		CN 1914321 B	20/07/2011
		CN 1914321 C0	14/02/2007
		JP 2007-521830 A	09/08/2007
		US 2006-0288452 A1	21/12/2006
		US 7538210 B2	26/05/2009
		WO 2006-028332 A1	16/03/2006
US 2012-0309092 A1	06/12/2012	AR 079065 A1	21/12/2011
		AU 2010-321676 A1	07/06/2012
		CA 2780989 A1	26/05/2011
		CN 102753011 A	24/10/2012
		EP 2501219 A1	26/09/2012
		EP 2501219 A4	24/07/2013
		NZ 600007 A	29/08/2014
		WO 2011-060490 A1	26/05/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 15/82(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, A01H 5/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 15/82; C12N 15/63; C12N 15/29; A01H 5/00; C12N 15/52; C12N 15/62; C12N 9/22; C12N 15/11 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: ibAGP1 프로모터, SRD1 프로모터, 식물, 발현, 쌍자엽		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2012-0045631 A (고려대학교 산학협력단) 2012.05.09 전체 문헌 참조	1-8
A	KR 10-2006-0022054 A (고려대학교 산학협력단) 2006.03.09 전체 문헌 참조	1-8
A	US 2012-0309092 A1 (GERMAN SPANGENBERG 등) 2012.12.06 전체 문헌 참조	1-8
A	Seol Ah Noh 등. Transgenic Res. 2012, Vol. 21, No. 2, 페이지 265-278. A sweetpotato SRD1 promoter confers strong root-, taproot-, and tuber-specific expression in Arabidopsis, carrot, and potato 전체 문헌 참조	1-8
A	GenBank Accession Number AY694185, Ipomoea batatas small subunit ADP-glucose pyrophosphorylase (AGP1) gene, promoter region, 2006.02.22. 전체 문헌 참조	1-8
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2014년 12월 05일 (05.12.2014)		국제조사보고서 발송일 2014년 12월 05일 (05.12.2014)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 최준호 전화번호 +82-42-481-5569 

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0045631 A	2012/05/09	없음	
KR 10-2006-0022054 A	2006/03/09	CN 1914321 A	2007/02/14
		CN 1914321 B	2011/07/20
		CN 1914321 C0	2007/02/14
		JP 2007-521830 A	2007/08/09
		US 2006-0288452 A1	2006/12/21
		US 7538210 B2	2009/05/26
		WO 2006-028332 A1	2006/03/16
US 2012-0309092 A1	2012/12/06	AR 079065 A1	2011/12/21
		AU 2010-321676 A1	2012/06/07
		CA 2780989 A1	2011/05/26
		CN 102753011 A	2012/10/24
		EP 2501219 A1	2012/09/26
		EP 2501219 A4	2013/07/24
		NZ 600007 A	2014/08/29
		WO 2011-060490 A1	2011/05/26