



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0081744
(43) 공개일자 2019년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8261 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0184491
(22) 출원일자 2017년12월29일
심사청구일자 2017년12월29일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
고재홍
경기도 수원시 영통구 영통로154번길 51-16 306동 702호 (망포동, 센트럴하이츠아파트)
김민하
경기도 성남시 중원구 박석로97번길 24-1 302호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 13 항

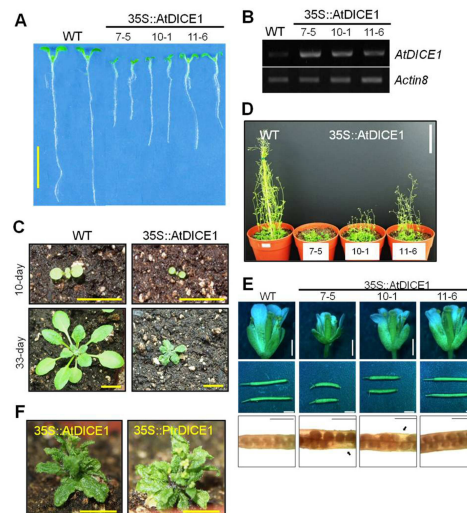
(54) 발명의 명칭 식물세포의 길이생장에 관련된 유전자 및 이를 이용한 난쟁이 식물 제조방법

(57) 요약

본 발명은 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 식물 생장이 억제된 형질전환 식물 및 이의 제조방법; 및 At2g41610 유전자를 포함하는, 식물 생장 억제용 발현 벡터 및 이를 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는 식물 생장을 억제하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 식물의 생장을 억제하여 크기가 작은 식물의 제조를 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 화훼 및 원예 분야에서 다양한 크기 및 모양을 갖는 기능성 작물 개발 용도로 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014071G10-1722-AA04
 부처명 산림청
 연구관리전문기관 임업진흥원
 연구사업명 산림자원 유전체 해독 사업
 연구과제명 진화-발달학적 유전체 연구를 통한 임목 유용유전자원 개발연구
 기 여 율 1/2
 주관기관 경희대학교
 연구기간 2017.05.26 ~ 2018.03.25

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01060807
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초연구지원사업 기본연구
 연구과제명 목본식물-특이적 생장/발달관련 새로운 포플러 R2R3-MYB 전사조절인자 규명
 기 여 율 1/2
 주관기관 경희대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 식물 생장이 억제된 형질전환 식물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물 성장 억제는 길이 성장 억제인 것인, 형질전환 식물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 At2g41610 단백질은 서열번호 1로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 At2g41610 유전자는 서열번호 2로 구성되는 것인, 형질전환 식물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 발현 증가는 At2g41610 유전자가 도입되어 증가된 것인, 형질전환 식물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 도입되는 At2g41610 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 형질전환 식물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 프로모터는 35S 프로모터인 것인, 형질전환 식물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 식물은 애기장대 또는 포플러인 것인, 형질전환 식물.

청구항 9

At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물 생장이 억제된 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 형질전환 식물은 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 11

At2g41610 유전자를 포함하는, 식물 생장 억제용 발현 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 At2g41610 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 것인, 발현 벡터.

청구항 13

제11항 또는 제12항의 발현벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는, 식물 생장을 억제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 식물 생장이 억제된 형질전환 식물 및 이의 제조방법; 및 At2g41610 유전자를 포함하는, 식물 생장 억제용 발현 벡터 및 이를 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는 식물 생장을 억제하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 2008년 조사에 의하면 전세계 화훼산업 분야의 시장 규모는 연간 약 26조원 정도이며, 경제 발전에 따라 꾸준히 성장해 왔다. 화훼산업을 선도하는 네덜란드의 화훼 생산 규모는 연간 약 5조원에 달하여 전세계 화훼산업의 상당 부분을 차지하고 있다. 네덜란드의 수도 암스테르담 부근의 알스미어 화훼 경매장은 세계 최대 규모로서 하루에 세계 꽃 거래량의 80%인 2000만 송이의 꽃과 200만 개의 화분이 거래된다. 또한, 네덜란드는 전 세계에서 수입한 꽃들을 개량하여 신품종을 개발하고 높은 로열티를 벌어들이는 것으로도 유명하다.

[0004] 국내 화훼 시장 규모는 1988년 서울 올림픽을 계기로 1990년대 중반까지 연간 약 19~58%씩 급성장하였고, 1997년 IMF로 인하여 잠시 주춤하였으나 그 후에도 꾸준히 성장하여 2008년에는 약 1조 105억원에 이르렀다. 화훼농가의 수도 1980년 불과 2733호로 집계되었던 것이 2012년 기준 9450호로 집계되어 32년만에 약 5배로 증가하였다. 1991년에는 양재동에 2만 1000평 규모의 한국농수산물유통공사 aT 화훼공판장이 문을 열었고, 그 외에 서울고속버스터미널 꽃 도매상가, 구파발 화훼 단지, 종묘 상가 등 곳곳에 화훼 단지가 조성되어 있다. 이와 같이 국내 화훼 산업이 외형상 크게 성장하였으나, 기후 변화로 인한 피해, 유가 상승으로 인한 생산 비용 증가, 및 해외에 지불하는 품종에 대한 로열티 증가 등으로 인하여 수익성이 떨어지는 실정이다.

[0005] 따라서 생산성이 높은 신품종의 개발이 시급한 상황인데, 이러한 상황에 대한 해법이 될 수 있는 것이 바로 난쟁이 식물의 개발이다. 난쟁이 식물은 정상 크기의 식물에 비해서 바람과 강우 피해 및 병해충에 대한 피해에도 더 강한 경향이 있다. 또한 물을 덜 소비할 뿐 아니라 줄기나 잎을 만드는 대신 종자나 과일을 만드는 데 더 많은 비율의 에너지를 투자하여 생산성이 높은 것으로 알려져있다. 그리고 실내 외 유희 공간을 꾸밀 수 있는 관상식물로서도 가치가 높다.

[0006] 현재까지는 난쟁이 식물을 만들기 위해 주로 적심을 통해 줄기생장을 억제하거나 왜화제를 이용하는 방법이 이용되어 왔다. 이 중 왜화제를 이용하는 방법이 가장 용이하여 여러 작물에 적용되고 있다. 한국등록특허 제10-0126545호에서는 불소치환 아브시스산 유도체를 포함하는 왜화제를 개발하였으나, 이는 화학물질로 환경오염이 야기될 수 있다는 단점이 있다. 따라서 환경오염이나 생리장해의 위험이 없는 식물의 왜화 방법의 개발이 필요하다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 애기장대 식물에서 길이 생장을 조절하는 막관통단백질을 코딩하는 유전자인 AtDICE1를 발견하였고, 상기 유전자 및 이의 상동 유전자를 과발현시킴으로서 식물체의 길이생장을 억제하여 난쟁이 식물을 제조할 수 있다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 식물 생장이 억제된 형질전환 식물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물 생장이 억제된 형질전환 식물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 At2g41610 유전자를 포함하는, 식물 생장 억제용 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 식물 생장 억제용 발현벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는, 식물 생장을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된, 식물 생장이 억제된 형질전환 식물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 용어 "At2g41610"란, 애기장대의 도관세포에서 주로 발현되는, 2번째 염색체에 존재하는 막관통단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 의미한다.
- [0018] 본 발명에서는 상기 유전자의 발현을 증가시킨 형질전환 식물의 경우, 야생형 식물과 비교하여 식물 생장이 저해되는 특성을 발견하였는 바, 상기 유전자를 AtDICE1(Defect in cell elongation1)로 명명하였다. 따라서, 본 발명에서 At2g41610는 AtDICE1와 혼용된다.
- [0019] 본 발명에서 At2g41610의 구체적인 단백질의 아미노산 서열 또는 염기서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다. 구체적으로 At2g41610 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 At2g41610 단백질은 상기 서열번호 1과 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 폴리펩티드를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 또한, 이러한 상동성을 가지며 상기 단백질에 상응하는 효능을 나타내는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 보조 단백질도 본 발명의 자일라나제로 사용될 수 있음은 자명하다.
- [0020] 또한, 코돈 축퇴성 (codon degeneracy)에 의해 상기 서열번호 1로 구성된 아미노산 서열을 가지는 단백질 또는 이와 상동성을 가지는 단백질로 번역될 수 있는 폴리뉴클레오티드 역시 포함될 수 있음은 자명하다. 또는 공지의 유전자 서열로부터 조제될 수 있는 프로브, 예를 들면, 상기 염기 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화하여, 서열번호 1로 구성된 아미노산 서열을 포함하는 단백질과 동일/유사한 활성을 가지는 단백질을 코딩하는 서열이라면 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0021] 상기 "상동성"은 두 개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드 모이어티(moiety) 사이의 동일성의 퍼센트를 말한다. 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 일치하는 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 본 명세서에서, 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 동일하거나 유사한 활성을 가지는 그의 상동성 서열이 "% 상동성"으로 표시된다. 하나의 모이어티로부터 다른 하나의 모이어티까지의 서열 간 상동성은 알려진 당해 기술에 의해 결정될 수 있다. 예를 들면, 점수(score), 동일성(identity) 및 유사도(similarity) 등의 매개 변수(parameter)들을 계산하는 표준 소프트웨어, 구체적으로 BLAST 2.0을 이용하거나, 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 해당 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual,

2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley& Sons, Inc., New York)으로 결정될 수 있다.

- [0022] 또한, At2g41610 유전자는 서열번호 1의 염기서열 또는 서열번호 1과 적어도 50%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 가지는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 또한, 본 발명의 식물 생장이 억제된 형질전환 식물은 At2g41610 단백질의 상동단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현이 증가된 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 용어 “상동단백질”이란 같은 단백질에서 파생된 여러 단백질들을 의미하는 것으로서, 아미노산 배열의 유사성과 3차원 구조의 유사성을 통해 상동 단백질인지 알 수 있다. 본 발명의 상기 단백질들은 아미노산 배열이 유사하고, 3차원 구조가 유사하며, 식물 생장을 억제하는 기능을 갖는 외부 N-말단 모티프의 서열이 유사한 바, 이들은 상동 단백질임이 확인되었다.
- [0025] 상기 상동 단백질은 오리자 사티바(*Oryza sativa*), 제아 메이즈(*Zea mays*), 포플러스 트리코카르파(*Populus trichocarpa*), 브라시카 라파(*Brassica rapa*), 테오브로마 카카오(*Theobroma cacao*), 살릭스 퍼퓨레아(*Salix purpurea*), 글리신 맥스(*Glycine max*), 브라치포디움 디스타치온(*Brachypodium distachyon*), 및 파니쿰 비르가툼(*Panicum virgatum*)로 구성된 군에서 선택된 어느 하나로부터 유래한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 상동 단백질은 SapurV1A.0321s0320.1, Potri.014G108300.1, Thecc1EG005005t1, Glyma.20G001800.1, Brara.J00090.1, Pavir.Ib01060.1, GRMZM2G377647, LOC_Os03g14880.1 및 Bradi3g23030.3로 구성된 군에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 상기 SapurV1A.0321s0320.1는 살릭스 퍼퓨레아에서 유래한 것이고, 상기 Potri.014G108300.1는 포플러스 트리코카르파에서 유래한 것이고, 상기 Thecc1EG005005t1는 테오브로마 카카오에서 유래한 것이고, 상기 Glyma.20G001800.1는 글리신 맥스에서 유래한 것이고, 상기 Brara.J00090.1는 브라시카 라파에서 유래한 것이고, 상기 Pavir.Ib01060.1는 파니쿰 비르가툼에서 유래한 것이고, 상기 GRMZM2G377647는 제아 메이즈에서 유래한 것이고, 상기 LOC_Os03g14880.1는 오리자 사티바에서 유래한 것이며, 상기 Bradi3g23030.3는 브라치포디움 디스타치온에서 유래한 것이다.
- [0027] 본 발명에서는 구체적으로 At2g41610의 상동 단백질로서, 포플로에서 유래한 Potri.014G108300.1를 과발현시킨 형질전환 식물에서도, 길이 생장이 억제된 동일한 표현형이 확인되었다(실험예 2, 도 3의 F).
- [0028] 본 발명의 용어 "발현 증가"란, At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자가 도입되어 발현되거나, 식물체가 가진 내재적 발현 또는 변형 전 발현에 비하여 발현이 증가된 것을 의미한다. 상기 단백질의 "도입"은, 식물체가 본래 가지고 있지 않았던 특정 단백질의 활성이 자연적 혹은 인위적으로 나타나게 되는 것을 의미한다. 예를 들어, 상기 발현 증가는 외래의 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 도입하여 발현을 증가시키는 것; 또는 내재적 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 것을 모두 포함할 수 있다. 구체적으로, 본원에서 발현 증가 방법으로는,
- [0029] 1) 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가,
- [0030] 2) 상기 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형,
- [0031] 3) 상기 단백질의 발현이 증가되도록 염색체 상의 폴리뉴클레오티드 서열의 변형, 또는
- [0032] 4) 이의 조합에 의해 발현이 증가되도록 변형하는 방법 등에 의하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 상기 1) 폴리뉴클레오티드의 카피수 증가는, 특별히 이에 제한되지 않으나, 벡터에 작동 가능하게 연결된 형태로 수행되거나, 대상 식물체의 염색체 내로 삽입됨으로써 수행될 수 있다. 또한 카피수 증가의 한 양태로, 단백질의 활성을 나타낼 수 있는 폴리뉴클레오티드를 대상 식물체 내로 도입하여 수행될 수 있다. 상기 도입은 공지된 형질전환 방법을 당업자가 적절히 선택하여 수행될 수 있으며, 대상 식물체 내에서 상기 도입된 폴리뉴클레오티드가 발현됨으로써 단백질의 발현이 증가될 수 있다.
- [0034] 다음으로, 2) 폴리뉴클레오티드의 발현이 증가하도록 하는 발현조절 서열의 변형시킬 수 있다. 상기 발현조절 서열은, 특별히 이에 제한되지 않으나 프로모터, 오퍼레이터 서열, 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열 등을 포함할 수 있다.
- [0035] 구체적으로, 폴리뉴클레오티드 발현 단위의 상부에는 본래의 프로모터 대신 강력한 이중 프로모터가 연결될 수

있다. 본 발명에서는 상기 프로모터로서 35S 프로모터를 사용할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0036] 아울러, 3) 염색체 상의 폴리뉴클레오타이드 서열의 변형은, 특별히 이에 제한되지 않으나, 발현조절 서열상의 변이를 유도하여 수행하거나, 더욱 강한 활성을 갖도록 개량된 폴리뉴클레오타이드 서열로 교체함에 의하여 수행될 수 있다.
- [0037] 마지막으로, 4) 상기 1) 내지 3)의 조합에 의해 발현이 증가되도록 변형하는 방법은, 상기 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 카피수 증가, 이의 발현이 증가하도록 발현조절 서열의 변형, 염색체 상의 상기 폴리뉴클레오타이드 서열의 변형 중 하나 이상의 방법을 함께 적용하여 수행될 수 있다.
- [0038] 상기 폴리뉴클레오타이드는 기능을 할 수 있는 폴리뉴클레오타이드 집합체인 경우 유전자로 기재될 수 있다. 본원에서 폴리뉴클레오타이드와 유전자는 혼용될 수 있으며, 폴리뉴클레오타이드 서열과 뉴클레오타이드 서열은 혼용될 수 있다.
- [0039] 본 발명은 At2g41610 유전자를 도입하여 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 식물 생장이 억제된 형질전환 식물을 제조하였다. 또한, 상기 At2g41610 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태로 도입될 수 있지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 "프로모터"란, 전사조절인자들이 결합 할 수 있는 DNA 염기서열을 의미하는데, 상기 프로모터는 전사조절 인자를 매개로 하여 RNA 중합효소와 결합함으로써, 그의 하류에 위치한 개방해독틀(ORF)의 전사를 유도할 수 있다. 구체적으로 35S 프로모터를 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 또한, 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어 프로모터와 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 용어, "식물 생장 억제"는 야생형(표준형)에 비해 식물의 생장 또는 생장이 억제된 것을 의미한다. 따라서, 식물 생장이 억제된 식물은 식물체의 높이, 줄기의 길이, 잎의 크기 또는 꽃의 크기 등이 감소된 표현형을 나타낼 수 있고, 구체적으로 본 발명에서는 길이 생장이 억제된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 또한, 본 발명에서 야생형(표준형)에 비해 식물 생장이 억제된 식물은 "난쟁이(dwarf) 표현형"을 갖는 식물 또는 "난쟁이형" 식물이라고 불릴 수 있으며, "식물 생장 억제", "난쟁이 식물", "난쟁이 표현형" 또는 "난쟁이형"은 혼용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 용어 "형질전환"이란, DNA를 숙주에 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서는 상기에서 서술한 AtDICE1 유전자를 숙주에 도입하는 것을 의미 할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 용어 "형질전환 식물"이란, 숙주로서 식물을 사용하여 상기 형질전환으로 인해 생성된 식물을 의미한다.
- [0046] 본 발명에서 숙주세포로의 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떠한 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 식물에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이러한 방법에는 전기충격 핵산분자 전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 침전, 염화칼슘 침전, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반, 아그로박테리아로 매개된 형질전환, PEG, 텍스트란 설페이트 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않으며, 아그로박테리아로 매개된 형질전환법이 바람직하다.
- [0047] 본 발명의 목적상, 상기 형질전환 식물은 길이 생장이 억제될 수 있어, AtDICE1 유전자의 과발현에 의하여 난쟁이 표현형을 가질 수 있는 한, 초본 및 목본 식물 모두가 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0048] 일 예로서, 초본 식물로는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 오리자 사티바(*Oryza sativa*; 벼), 제아 메이즈(*Zea mays*; 옥수수), 미스칸투스(*Miscanthus*)종 또는 페니세툼 풀푸레움(*Pennisetum purpureum*) 등을 포함할 수 있고, 목본 식물로는 유칼립투스(*Eucalyptus*) 종 (예를 들면 *E. alba*, *E. albens*, *E. amygdalina*, *E. aromaphloia*, *E. baileyana*, *E. balladoniensis*, *E. bicostata*, *E. botryoides*, *E. brachyandra*, *E.*

brassiana, *E. brevistylis*, *E. brockwayi*, *E. camaldulensis*, *E. ceracea*, *E. cloeziana*, *E. coccifera*, *E. cordata*, *E. cornuta*, *E. corticosa*, *E. crebra*, *E. croajingoleisis*, *E. curtisii*, *E. dalrympleana*, *E. deglupta*, *E. delegatensis*, *E. delicata*, *E. diversicolor*, *E. diversifolia*, *E. dives*, *E. dolichocarpa*, *E. dundasii*, *E. dunni*, *E. elata*, *E. erythrocois*, *E. erythrophloia*, *E. eudesmoides*, *E. falcata*, *E. gamophylla*, *E. glaucina*, *E. globulus*, *E. globulus* subsp. *bicostata*, *E. globulus* subsp. *globulus*, *E. gongylocarpa*, *E. grandis*, *E. grandis*×*urophylla*, *E. guilfoylei*, *E. gunnii*, *E. hallii*, *E. houseana*, *E. jacksonii*, *E. lansdowneana*, *E. latisinensis*, *E. leucophloia*, *E. leucoxylon*, *E. lockyeri*, *E. lucasii*, *E. maidenii*, *E. marginata*, *E. megacarpa*, *E. melliodora*, *E. michaeliana*, *E. microcorys*, *E. microtheca*, *E. muelleriana*, *E. nitens*, *E. nitida*, *E. obliqua*, *E. obtusiflora*, *E. occidentalis*, *E. optima*, *E. ovata*, *E. pachyphylla*, *E. pauciflora*, *E. pellita*, *E. perriniana*, *E. petiolaris*, *E. pilularis*, *E. piperita*, *E. platyphylla*, *E. polyanthemos*, *E. populnea*, *E. preissiana*, *E. pseudoglobulus*, *E. pulchella*, *E. radiata*, *E. radiata* subsp. *radiata*, *E. regnans*, *E. risdoni*, *E. robertsonii*, *E. rodwayi*, *E. rubida*, *E. rubiginosa*, *E. saligna*, *E. salmonophloia*, *E. scoparia*, *E. sieberi*, *E. spathulata*, *E. staeri*, *E. stoatei*, *E. tenuipes*, *E. tenuiramis*, *E. tereticornis*, *E. tetragona*, *E. tetradonta*, *E. tindaliae*, *E. torquata*, *E. umbra*, *E. urophylla*, *E. vernicosa*, *E. viminalis*, *E. wandoo*, *E. wetarensis*, *E. willisii*, *E. willisii* subsp. *falciformis*, *E. willisii* subsp. *willisii*, *E. woodwardii*), 포플러스(*Populus*) 종(예를 들면, *P. alba*, *P. alba*×*P. grandidentata*, *P. alba*×*P. tremula*, *P. alba*×*P. tremulavar. glandulosa*, *P. alba*×*P. tremuloides*, *P. balsamifera*, *P. balsamifera* subsp. *trichocarpa*, *P. balsamifera* subsp. *trichocarpa*×*P. deltoides*, *P. ciliata*, *P. deltoides*, *P. euphratica*, *P. euramericana*, *P. kitakamiensis*, *P. lasiocarpa*, *P. laurifolia*, *P. maximowiczii*, *P. maximowiczii*×*P. balsamifera* subsp. *trichocarpa*, *P. nigra*, *P. sieboldii*×*P. grandidentata*, *P. suaveolens*, *P. szechuanica*, *P. tomentosa*, *P. tremula*, *P. tremula*×*P. tremuloides*, *P. tremuloides*, *P. wilsonii*, *P. canadensis*, *P. yunnanensis*), 침엽수(예를 들면, loblolly pine(*Pinus taeda*), slash pine(*Pinus elliotii*), ponderosa pine(*Pinus ponderosa*), lodgepole pine(*Pinus contorta*), Monterey pine(*Pinus radiata*); Douglas-fir(*Pseudotsuga menziesii*); Western hemlock(*Tsuga canadensis*); Sitka spruce(*Picea glauca*); redwood(*Sequoia sempervirens*); silver fir(*Abies amabilis*); balsam fir(*Abies balsamea*)) 및 삼나무(예를 들면 Western redcedar(*Thuja plicata*), Alaska yellow-cedar(*Chamecyparis nootkatensis*)) 등을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0049] 다른 예로서, 상기 초본 식물로는 애기장대가 될 수 있고, 목본 식물로는 포플러가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0050] 본 발명의 용어 "애기장대(*Arabidopsis thaliana*)"란, 개화식물로서 십자화과(Brassicaceae)에 속하며 농업적인 중요성은 가지고 있지 않으나 현대 식물학에 있어 모델 식물로 널리 사용되고 있는 유전학과 분자생물학적 연구에 매우 중요한 식물이다. 본 발명에서 상기 애기장대는 초본 식물의 대표 식물로서 사용될 수 있으며, 구체적으로 *Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia(Col-0) 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명의 용어 "포플러(poplar)"란, 쌍떡잎식물 버드나무목 버드나무과 사시나무속에 속하는 식물의 총칭이다. 본 발명에서 상기 포플러는 목본 식물의 대표식물로서 사용될 수 있으며, *Populus alba*×*P. tremula* var. *glandulosa* 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0053] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시키는 단계를 포함하는, 식물 생장이 억제된 형질전환 식물의 제조방법을 제공한다. 상기 제조방법에 사용되는 프로모터, At2g41610 유전자, 식물생장 억제, 형질전환 식물 등은 전술한 바와 같고, 상기 방법에 의해 본 발명의 형질전환 식물을 제조할 수 있다.

[0054] 또한, 상기 제조방법에 의하여 제조된 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 형질전환식물의 재배는 널리 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있고, 재배 온도, 재배 시간 및 배지의 pH 등의 조건은 적절하게 조절될 수 있다.

[0055] 사용되는 배지는 특정한 형질전환식물의 요구 조건을 적절하게 충족시켜야 한다. 배지의 형태로는 고체배지(solid medium), 액체배지(liquid medium), 이중배지(double layer medium)가 있으며, 이에 대한 성분으로는 물, 고결재료로서, 한천, 아가로스(agarose), 젤라이트(gelite) 등이 사용될 수 있다.

- [0056] 무기 영양소로는 15개의 원소, 즉 C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, B, 및 Mo 등이 형태에 구애 받지 않고 첨가되며, 유기 영양소로는 탄수화물, 식물생장 조절물질, 비타민 등이 첨가되고, 아미노산류로는 미오-이노시톨, 글라이신, L-글루타민 등이 첨가될 수 있다.
- [0057] 탄소원으로는 글루코스, 프럭토스, 만노스, 리보오스, 자일로스, 수크로스, 멜리비오스, 셀로비오스, 락토오스, 아밀로스, 탄수화물, 라피노스, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤 등이 첨가될 수 있다.
- [0058] 예를 들어, 본 발명예에서는 애기장대를 23 ± 2 의 생장실(16시간 빛/8시간 어둠)에서 토양에 재배하거나 또는 2% 수크로스를 포함한 half-strength MS 배지에서 재배하였다.
- [0060] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 At2g41610 유전자를 포함하는, 식물 생장 억제용 발현 벡터를 제공한다. 상기 At2g41610, 식물 생장 억제 등은 전술한 바와 같다.
- [0061] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현 벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 본 발명에서는 35S 프로모터와 작동가능하게 연결된 서열번호 2의 At2g41610 유전자를 pB2GW7 벡터에 도입하여 제작된 발현벡터를 이용하여 식물 생장이 억제되는 형질전환 식물을 제작하였다. 또한 본 발명에서 상기 At2g41610 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결된 상태로 벡터에 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 식물 생장 억제용 발현 벡터를 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는, 식물 생장을 억제하는 방법을 제공한다.
- [0064] 구체적으로, 본 발명의 식물체의 생장을 억제하는 방법은 상기 발현벡터를 식물 생장이 억제될 수 있는 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함한다. 이때, 상기 방법에 사용되는 프로모터, At2g41610 유전자, 식물 생장 억제 등은 상술한 바와 동일하고, 상기 방법에 의해 생장을 억제할 수 있는 임의의 식물체에서 식물의 생장을 억제시킬 수 있다.

발명의 효과

- [0066] 본 발명은 At2g41610 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시킴으로써 식물의 생장을 억제하여 크기가 작은 식물의 제조를 가능하게 한다. 따라서, 본 발명은 화훼 및 원예 분야에서 다양한 크기 및 모양을 갖는 기능성 작물 개발 용도로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0068] 도 1의 A 및 B는 애기장대에서 AtDICE1의 발현 정도를 보여주는 도면이다. 상기 붉은색은 AtDICE1가 높게 발현되었음을 의미한다. C 및 D는 줄기, 뿌리 및 꽃 조직의 관다발에서의 AtDICE1 프로모터 활성을 나타내는 도면이다. C는 유묘일 때, D는 성체식물일 때이다. 상기 스케일바는 100 μ m를 나타낸다.
- 도 2의 A는 AtDICE1 및 다양한 식물 종으로부터 유래한 이의 상동 단백질의 아미노산 서열을 나타낸다. 붉은색 막대는 막관통 도메인을 나타내고, 파란색 박스는 막 외부에 존재할 것으로 예상되는 N-말단 및 내부의 보존된 도메인을 의미한다. B는 AtDICE1와 가장 가까운 상동 유전자인 Potri.014G108300.1 유전자의 조직 특이적 발현을 나타내는 도면이다. C는 막관통 도메인 및 개입된 고리를 예측하는 도면을 나타낸다. D는 막단백질의 2차 구조를 예측하는 도면을 나타낸다. E는 비-뿌리 계통 발생 분석을 나타낸다.
- 도 3의 A는 7일간 자란 애기장대 야생형 및 35S::AtDICE1 식물을 비교한 도면이고, B는 35S::AtDICE1 중 3개의 라인(7-5, 10-1, 11-6)에서 AtDICE1 발현량을 비교한 도면이고, C는 애기장대 야생형 및 35S::AtDICE1의 날짜

별 성장 정도를 비교한 도면이고, D는 60일간 자란 애기장대 야생형 및 35S::AtDICE1 식물을 비교한 도면이고, E는 56일간 자란 애기장대 야생형 및 35S::AtDICE1 식물의 꽃, 장각과 및 팽창된 장각과를 비교한 도면이다. 상기 화살표는 비-발달된 종자를 나타내고, 스케일 바는 0.5mm를 나타낸다. F는 35S::AtDICE1 식물 및 35S::PtrDICE1의 표현형을 비교한 도면이다.

도 4의 A는 7일간 자란 애기장대 야생형 및 35S::AtDICE1 식물의 표피 세포 팽창 정도를 자엽(위), 배측(중간) 및 배측의 절단면(아래)에서 관찰한 도면이고, B는 7일간 자란 애기장대 야생형 및 35S::AtDICE1 식물의 하배측을 전자 주사 현미경을 통해 관찰한 도면이고, C는 30일간 자란 애기장대 야생형 및 35S::AtDICE1 식물의 로제트 잎의 잎자루를 관찰한 도면이다. 붉은 화살표는 팽창된 세포를 나타낸다. 스케일 바는 0.5cm를 나타낸다.

도 5의 A는 10일간 자란 T3 동형접합 AtDICE1/pMDC7 식물(8-4 라인)에 17-β-에스트라디올 처리에 의해 유도된 AtDICE1의 유전자 발현을 확인하기 위한 반-정량적 RT-PCR 분석을 나타낸 도면이고, B는 17-β-에스트라디올 처리/미처리에 따른 AtDICE1/pMDC7 식물(8-4 라인)을 나타낸 도면이다. 붉은 화살표는 팽창된 세포를 나타낸다.

도 6의 A는 셀룰로오스 생합성 억제제인 아이속사벤을 처리한 경우의 애기장대 야생형 및 35S::AtDICE1 식물을 나타낸 도면이고, B는 애기장대 줄기의 다당류 함량을 분석한 도면이고, C는 세포벽층의 미세소관의 배열을 나타낸 도면이다.

도 7의 A는 AtDICE1의 구조 및 N-말단의 보존된 도메인이 결실된 AtDICE1(ΔNT-AtDICE1)의 구조를 나타내는 도면이고, B는 35S:: ΔNT-AtDICE1 식물에서의 ΔNT-AtDICE1의 발현을 반-정량적 RT-PCR 분석을 통해 확인한 도면이고, C는 7일된 애기장대 야생형 및 35S:: ΔNT-AtDICE1 식물을 비교한 도면이며, D는 33일된 애기장대 야생형, 35S::AtDICE1 식물 및 35S:: ΔNT-AtDICE1 식물을 비교한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0071] 실시예 1: 식물 재료 및 성장 조건

[0072] 본 발명에서는 야생형 또는 형질전환체로서 애기장대(Arabidopsis thaliana, ecotype Columbia(Col-0))를 사용하였다. 상기 애기장대는 층화 후, 23±2의 생장실(16 시간 빛/8시간 어둠)에서 토양 또는 MS-한천 플레이트(0.5x MS, 2% 수크로스, 0.8% (w/v) 한천)상에서 재배되었다. 또한, 어린 유묘의 성장을 측정하기 위해, MS-한천 플레이트를 수직 방향으로 배치하였다. 아이속사벤(36138, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 처리를 위해, 아이속사벤을 메탄올에 용해시키고 애기장대 유묘의 배양액에 아이속사벤의 최종농도가 각각 1nM, 5nM 및 10nM 이 되도록 첨가하였다. 2%(w/v) 수크로오스, 0.8%(w/v) 한천 및 다양한 농도의 아이속사벤을 함유하는 0.5x MS 배지에서 유묘를 재배하고 7일 후에 관찰하였다.

[0074] 실시예 2: 조직학적 분석

[0075] 로제트 바로 위에 위치한 줄기 영역(기저 수준)의 횡단면을 만들고, 2% 플로로글루시놀/염산(phloroglucinol/HCl) 또는 0.05% 톨루이딘 블루 O(toluidine blue O)로 1분 동안 염색하였다. 파라핀 삽입 후 마이크로톰(Leica RM2025, Leica, <http://www.leica.com>) 절단을 통해 배측과 줄기의 상세한 구조를 관찰했다.

[0076] 또한, 공초점 레이저 주사 현미경(Confocal laser scanning microscopy)을 사용하기 위해, 488nm 여기 거울, 560nm 방출 필터 및 505-530nm 방출 필터를 갖는 Zeiss PASCAL 공초점 레이저 주사 현미경(Jena, Germany)을 사용하여 이미지를 저장했다. 이미지 분석은 레이저 주사 현미경 PASCAL LSM version 3.0 SP3 소프트웨어를 사용하여 수행했다.

[0077] 주사 전자 현미경(SEM)의 경우, 야생형 및 35S::AtDICE1(7-5) 식물의 7일 된 유묘에서 배측을 시각화하기 위해 기본 조건에서 테이블탑 SEM (Hitachi TM3000, Tokyo, Japan)을 사용했다.

[0079] 실시예 3: 유전자변형 애기장대 식물 제작을 위한 플라스미드 벡터의 제작

- [0080] 35S::AtDICE1 컨스트럭트를 제작하기 위해, Gateway 클로닝 시스템을 이용하여 *AtDICE1* (At2g41610)의 전장 cDNA를 PCR을 이용하여 증폭하고 pB2GW7 또는 pB7BWIWG2(II) 벡터(*Trends in Plant Science* 7, 193-195)의 35S 프로모터의 다운스트림에 삽입하였다.
- [0081] 35S::ΔNT-AtDICE1 컨스트럭트를 제작하기 위해, 상기의 35S::AtDICE1 컨스트럭트를 주형으로 사용하여 *AtDICE1*의 N-말단이 결실된 단편(ΔNT-AtDICE1)을 PCR을 이용하여 증폭하였고, 상기 PCR 산물을 pB2GW7의 35S 프로모터의 다운스트림에 삽입하였다.
- [0082] *AtDICE1* 프로모터::GUS 컨스트럭트를 제작하기 위해, 애기장대 잎 조직으로부터 추출한 게놈 DNA를 주형으로 사용하여 *AtDICE1* 코딩 서열의 5' 말단에 인접한 1.0kb XbaI/BamHI 게놈 단편을 PCR을 이용하여 증폭시키고, pCB308 벡터에 서브클로닝 하였다(*Plant Molecular Biology* 40, 711-717).
- [0083] 35S::PtrDICE1 컨스트럭트를 제작하기 위해, Gateway 클로닝 시스템을 이용하여 *PtrDICE1* (Potri.014G108300.1)의 전장 cDNA를 PCR을 이용하여 증폭하고 pB2GW7 또는 pB7BWIWG2(II) 벡터(*Trends in Plant Science* 7, 193-195)의 35S 프로모터의 다운스트림에 삽입하였다.
- [0084] 상기 컨스트럭트의 제작을 위해 수행한 PCR에서 사용한 프라이머는 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

유전자	프라이머	서열(5' → 3')	서열번호
AtDICE1	Forward	AAAAAGCAGGCTATGAATTCAGAATGGGAAATGG	3
	Reverse	AGAAAGCTGGGTTCATGTGTCTGATGTCTTCTTACTCTG	4
ΔNT-AtDICE1	Forward	AAAAAGCAGGCTATGCCTCAAATCACCGACGTTCTA	5
	reverse	AGAAAGCTGGGTTCATGTGTCTGATGTCTTCTTACTCTG	6
AtDICE1 프로모터	Forward	GCGTCTAGATCTCAATCTACGAGCACAAA	7
	reverse	TTTGGATCCGAATCCATTTCCATTCTGAA	8
PtrDICE1	Forward	AAAAAGCAGGCTATGCTGTACCGACGGGACCTGG	9
	reverse	AGAAAGCTGGGTCTACCTGTCTAACTTTACATGTGC	10

- [0088] 제작된 모든 벡터 컨스트럭트는 DNA 시퀀싱을 통해 확인하였다. 이후 상기 벡터를 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 C58에 도입하였고, 상기 균주를 이용하여 floral-dip 방법(*The plant journal for cell and molecular biology* 16, 735-743)에 따라 각각 애기장대(Col-0)를 형질전환시켰다.

[0090] 실시예 4: 알코올-불용성 세포벽 잔류물의 추출

- [0091] 알코올-불용성인 세포벽 잔류물을 추출하기 위해, 60일 된 야생형 및 35S::AtDICE1 식물의 줄기 조직(로제트 수준로부터 5cm)을 미세분말로 분쇄했다. 지반 물질(~1g)을 70% 에탄올 15ml로 세척하고, 70℃에서 15분간 가열하여 내인성 효소를 비활성화시켜 세포 내용물을 제거했다. 이후, 상기 샘플을 4000g에서 10분 동안 원심분리하고, 펠렛을 100% 에탄올로 2회 및 100% 아세톤으로 1회 세척하였다. 세척 후 남은 펠렛을 70℃에서 건조하여 알코올-불용성 세포벽 잔류물(alcohol-insoluble residue: AIR)을 수득하였다.

[0093] 실시예 5: 세포벽의 단당류 조성물의 분석

- [0094] 공지된 문헌(*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37, 360-367)에서 개시하고 있는 방법에 따라, 세포벽의 당(알디톨 아세테이트)을 분석하였다.

- [0095] 구체적으로, 상기 실시예 4를 통해 수득한 AIRs(3mg)를 실온에서 70% 황산과 함께 30분 동안 인큐베이션시킨 후, 내부 표준으로서 이노시톨을 첨가하고 최종농도가 6% 황산이 되도록 물로 희석하였다. 상기 용액을 105℃에서 120분 동안 가열한 후, 25% 암모늄 용액을 처리하였다. 디메틸 술폭사이드(dimethyl sulfoxide)에서 수소화 붕소나트륨(sodium borohydride)으로 환원시킨 후, 상기 용액을 40℃에서 90분간 가열하고, 이 후 빙초산

(glacial acetic acid), 아세트산 무수물(acetic anhydride), 1-메틸이미다졸(1-methylimidazole), 디클로로메테인(dichloromethane) 및 물을 순차적으로 처리하였다. 가수분해된 세포벽 당의 알디톨 아세테이트를 함유하는 유기층을 물로 3회 세척하고, 상기 당을 30m × 0.25 mm(i.d.) 실리카 모세관 칼럼 DB 225 (Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA)이 장착된 기체-액체 크로마토 그래피(model 6890; Hewlett-Packard, <http://www.hp.com>)상에서 분석하였다.

[0097] 실시예 6: 조직화학적 GUS 염색

[0098] 공지된 문헌(*Plant Physiology Biochemistry* 104, 226-33)에서 개시하고 있는 방법을 이용하여, 유전자변형 식물체를 조직화학적 GUS 염색하였다. 간단하게, 샘플을 GUS 반응 버퍼에서 37℃에서 18-24 시간 동안 배양하고, 70% 에탄올로 행구어 클로로필을 제거한 후 시각화하였다.

[0100] 실시예 7: RNA 추출 및 반-정량적(semi-quantitative) RT-PCR 분석

[0101] 제조사의 지시에 따라, 트리졸(Trizol) 시약(Gibco-BRL, <http://www.invitrogen.com>)을 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. 전체 RNA는 Superscript II 역전사 효소(Invitrogen)를 사용하여 20 μl 부피의 반응을 통해 역전사되었다. 주형으로서 상기 반응 산물 1 μl을 사용하여 반-정량적 RT-PCR을 수행하였다. 증폭된 DNA 단편을 1% 아가로스 겔에서 분리하고, 브로민화 에티듬으로 염색하였다. RT-PCR 분석에서 사용된 프라이머는 하기 표 2에 기재되었다.

표 2

유전자	프라이머	서열(5' → 3')	서열번호
AtDICE1	AtDICE_pF	GCAAGGACTGACATTGCTTG	11
	UTR3'	ACCGAGGATGGTCTAGTACA	12
ΔNT-AtDICE1	Forward	ATGCCTCAAATCACCGACGTTCTA	13
	Reverse	TCATGTGCTGATGTCTTCTACTCTG	14
Actin8	Forward	ATGAAGATTAAGGTCGTGGCA	15
	everse	TCCGAGTTTGAAGAGGCTAC	16

[0105] 실험예 1: AtDICE1 및 이의 상동 단백질의 발견 및 3차원적 구조 예측

[0106] 본 발명에서는 주로 관다발 조직에서 발현되는(도 1의 A 및 B), 기능이 전혀 알려지지 않은 유전자좌인 At2g41610 유전자를 발견하였다. 또한 상기 At2g41610 유전자를 '*AtDICE1*(*Arabidopsis thaliana* DEFECT IN CELL ELONGATION1)'라고 명명하였다.

[0107] 상기 *AtDICE1* 유전자가 식물체의 어느 부위에서 발현되는지 확인하기 위해 프로모터-GUS 리포터 분석을 수행하였다. 그 결과, *AtDICE1* 유전자의 프로모터 활성은 자엽(떡잎)과 배축의 관 조직에서 주로 검출되었고, 2일된 어린 유묘의 뿌리에서 상기 활성이 나타났다(도 1의 C). 또한, 줄기와 뿌리의 횡단면의 경우, *AtDICE1* 프로모터의 활성은 주로 관다발에서, 특히 형성층 및/또는 목질부 유세포에서 발견되었다(도 1의 D).

[0108] 추가적으로, *AtDICE1* 단백질의 서열분석을 통해, 다른 식물 종에 존재하는 상동 단백질을 확인하였고, 상기 단백질의 3차원 구조를 예측하였다.

[0109] 구체적으로, 오리자 사티바(*Oryza sativa*), 제아 메이즈(*Zea mays*), 포플러스 트리코카르파(*Populus trichocarpa*), 브라시카 라파(*Brassica rapa*), 테오브로마 카카오(*Theobroma cacao*), 살릭스 퍼푸레아(*Salix purpurea*), 글리신 맥스(*Glycine max*), 브라치포디움 디스타치온(*Brachypodium distachyon*), 및 파니쿰 비르가툼(*Panicum virgatum*)에서 유래한 상동 단백질을 확인하였다(도 2의 A). 상기 상동 단백질들은 전체 아미노산 서열이 유사할 뿐만 아니라, 외부 N-말단 모티프의 서열이 매우 유사하여, 여러 식물 종에서 고도로 보존되었음을 확인하였다.

[0110] 상기 상동 단백질 중 포플러에서 유래한 Potri.014G108300 단백질 또한 AtDICE1 단백질과 동일하게 목질 형성 조직에서 우선적으로 발현됨을 확인하였고(도 2의 B), 이를 PtrDICE1로 명명하였다.

[0111] 또한, AtDICE1의 3차원 구조를 예측하기 위해 TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 및 SOSUI(<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>)를 이용하여 분석한 결과, 외부 N-말단 및 내부 C-말단 및 7개의 막관통도메인(transmembrane domain)을 포함하는 막관통단백질임을 예측했다(도 2의 C 및 D).

[0113] 실험예 2: AtDICE1 유전자의 과발현에 의한 난쟁이 표현형 유도 확인

[0114] AtDICE1 유전자의 과발현에 의해 식물의 난쟁이 표현형을 유도할 수 있는지 확인하기 위해, 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0115] 구체적으로, CaMV 35S 프로모터(즉, 35S::AtDICE1 식물)의 조절 하에 AtDICE1 유전자가 과발현되는, 기능-획득 유전자변형(transgenic) 애기장대(*Arabidopsis*) 식물을 제작하였다. 상기의 26개의 T1 형질전환 식물을 조사한 결과, 야생형 애기장대 식물과 비교하여 상기 형질전환 식물에서 난쟁이 표현형이 나타났다.

[0116] 추가적인 상세한 분석을 위해, 난쟁이 표현형의 정도에 기초하여 3개의 T3 동형접합체 형질전환 식물(35S::AtDICE1의 7-5, 10-1 및 11-6 라인)을 선택했다. 35S::AtDICE1 식물의 난쟁이 표현형은 어린 유묘 뿐만 아니라 성체식물에서도 분명히 나타났다(도 3의 A, D, 표 3).

표 3

Age	Measurements	WT	35S::AtDICE		
			7-5	10-1	11-6
7-day-old	Hypocotyl (mm)	1.9 ± 0.06	1.4 ± 0.14	1.7 ± 0.21	1.8 ± 0.21
	Roots (cm)	2.9 ± 0.17	1.5 ± 0.15	2.1 ± 0.15	2.6 ± 0.23
56-day-old	Height (cm)	29.3 ± 2.31	4.7 ± 1.01	15.6 ± 2.39	21.8 ± 2.25
	Rosette diameter (cm)	5.5 ± 0.23	1.1 ± 0.12	3.2 ± 0.32	4.1 ± 0.16
	Flowering (day)	36 ± 4	42 ± 5	38 ± 5	36 ± 5

Plants were grown in a 16 hr light/8 hr dark. Data represent mean ± S.D. (n=20)

[0118]

[0120] 또한, 난쟁이 표현형의 강도는 AtDICE1 유전자의 발현 수준과 비례하였다(도 3의 B). 성체식물에서, AtDICE1 유전자의 발현이 매우 강한 7-5 식물은 매우 작은 로제트 잎, 매우 짧은 꽃차례 줄기, 작은 꽃 및 감소된 정단 우성을 보였다(도. 3의 C, D 및 F). 그러나 AtDICE1 유전자의 발현량이 7-5 식물보다 작은 11-6 식물의 경우는 정상보다 60% 정도 작은 표현형을 보였다 (도. 3의 D). 따라서, AtDICE1 유전자 과발현을 통해 난쟁이 표현형을 갖는 식물을 유도할 수 있음을 확인하였다.

[0121] 또한, AtDICE1의 상동 유전자인 PtrDICE1 유전자를 과발현(35S::PtrDICE1)시킨 애기장대의 경우에도, 35S::AtDICE1에서 관찰된 것과 거의 동일한 표현형을 보여줬다(도 3의 F). 상기 결과를 통해, PtrDICE1이 AtDICE1와 이종유사성을 가짐을 확인하였다.

[0123] 실험예 3: 35S::AtDICE1 식물의 길이방향 세포 신장에서의 결함 확인

[0124] AtDICE1 유전자가 과발현된 식물의 경우 이방성(길이방향) 세포신장에 결함이 생기는지 확인하였다.

[0125] 그 결과, 35S::AtDICE1 식물의 유묘에서는 표피 세포의 방향성 없는 등방성 팽창이 배측 및 자엽 모두에서 분명

하게 나타났다. 그러나, 야생형 유묘에서는 상기와 같은 팽창이 발견되지 않았다(도 4).

[0126] 구체적으로, 7일된 유묘의 하배측의 단면 분석을 통해, 35S::AtDICE1 식물의 표피 세포뿐만 아니라 내부의 거의 모든 세포에서도 불규칙한 세포팽창이 확인되었다(도 4의 A). 또한, SEM(Scanning Electron Microscope: 주사 전자현미경) 관찰 결과, 35S::AtDICE1 식물의 표피 세포가 팽창되었음이 명확하게 확인되었고(도 4의 B), 상기 등방성 세포의 팽창은 성체식물에서 지속적으로 발견되었는 바(도 4의 C), 이로 인해 35S::AtDICE1 식물의 현저한 난쟁이 표현형을 일으킨 것으로 예측할 수 있었다.

[0127] 또한, 상기 표현형을 검증하기 위해, *AtDICE1* 발현을 유도할 수 있는 형질전환 애기장대를 추가로 제작했다. 구체적으로, 상기 유도성 유전자 발현을 위해, Gateway Destination vector pMDC7 벡터(*Plant Physiology*. 133, 462-469)를 사용했다. 상기 벡터는 17-β-에스트라디올에 의한 유도성 발현을 위한 XVE 유도성 프로모터를 포함한다. 상기의 유도성 벡터를 도입한 형질전환 애기장대에 10μM의 17-β-에스트라디올을 처리한 경우 *AtDICE1* 발현이 성공적으로 유도됨을 확인하였고(도 5의 A), 2일된 유묘에서 표피 세포가 등방성으로 팽창되었음을 확인하였다(도 5의 B).

[0129] 실험예 4: 35S::AtDICE1 식물에서의 셀룰로오스 생합성 결손 확인

[0130] 셀룰로오스 생합성의 변화 또는 피층 미세소관 배열의 변화는 세포의 비정상적인 등방성 팽창을 유도하는 것으로 알려져 있다(*The Plant Cell* 12, 2409-2424). 따라서, 본 발명의 *AtDICE1* 유전자가 과발현된 애기장대의 경우의 셀룰로오스 생합성의 억제되거나 또는 피층 미세소관 배열이 변화되는 지 확인하기 위해, 셀룰로오스 생합성 억제제로 알려진 아이속사벤(isoxaben)을 야생형 및 35S::AtDICE1 식물에 처리하였다.

[0131] 구체적으로, 5nM 아이속사벤을 야생형 애기장대에 처리한 경우, 35S::AtDICE1 식물의 표피 세포가 팽창되는 표현형이 성공적으로 재현되었다(도 6의 A). 아이속사벤 처리에 의해 세포막으로의 셀룰로오스 신타제 복합체(Cellulose synthase complex: CSC)의 삽입을 방지하는 것으로 알려져 있기 때문에(*Science* 312, 1491-1495), 35S::AtDICE1 식물의 표피 세포 팽창은 세포벽에서의 셀룰로오스 생합성의 억제에 의한 것으로 보인다.

[0132] 추가적으로 35S::AtDICE1 식물에서 셀룰로오스 생합성이 영향을 받는지를 확인하기 위해, 야생형 및 35S::AtDICE1 식물의 줄기 조직의 세포벽 물질의 단당류 조성을 분석하였다.

[0133] 그 결과, 글루코스 함량은 35S::AtDICE1 식물에서 현저하게 감소되었다(도 6의 B). 세포벽의 알코올 불용성 잔류물(alcohol insoluble residues: AIR)이 상기 분석에 사용되었기 때문에, 대부분의 글루코스 함량은 셀룰로오스의 분해로부터 유래되었는 바, 상기 35S::AtDICE1 식물의 글루코스 함량이 감소된 것은 세포벽의 셀룰로오스 함량이 감소되었음을 의미한다.

[0134] 또한, 35S::AtDICE1 식물의 피층 미세소관 배열에 변화가 있는지 알아보기 위해, GFP-TuA6 식물에서 *AtDICE1* 유전자를 과발현시켰다. 상기의 GFP-TuA6 식물은 GFP-융합 튜블린 A6을 구성적으로 발현하기 때문에, 피층의 미세소관을 공초점 현미경으로 시각화 할 수 있다(*Protoplasma* 213, 28-38).

[0135] 그 결과, *AtDICE1* 유전자를 과발현시키지 않은 GFP-TuA6 식물의 경우 신장 방향과 수직인 미세소관의 배열을 보여준 반면, 35S::AtDICE1/GFP-TuA6 식물의 경우에는, 팽창된 세포의 피층 미세소관이 비정상적인 배열을 갖는 것을 확인하였다(도 6의 C).

[0137] 실험예 5: AtDICE1의 보존된 N-말단 도메인의 기능 확인

[0138] *AtDICE1*은 조사된 식물 중에서 매우 보존된 것으로 추정되는 외부 N-말단 모티프를 가지고 있기 때문에(도 2의 A), 모티프의 기능적 중요성을 확인하기 위해, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0139] 구체적으로, N-말단이 결실된 *AtDICE1* 유전자(35S::ΔNT-*AtDICE1*)를 과발현하는 유전자변형 애기장대를 제작하고(도 7의 A 및 B), 상기 유전자변형 애기장대의 표현형을 확인하였다.

[0140] 19개의 독립적인 T3 동형접합 유전자변형 식물의 어린 유묘 또는 성체 식물을 조사한 결과, *AtDICE1* 유전자가 과발현되었을 때 나타나는 표현형은 관찰되지 않았다(도 7의 C 및 D).

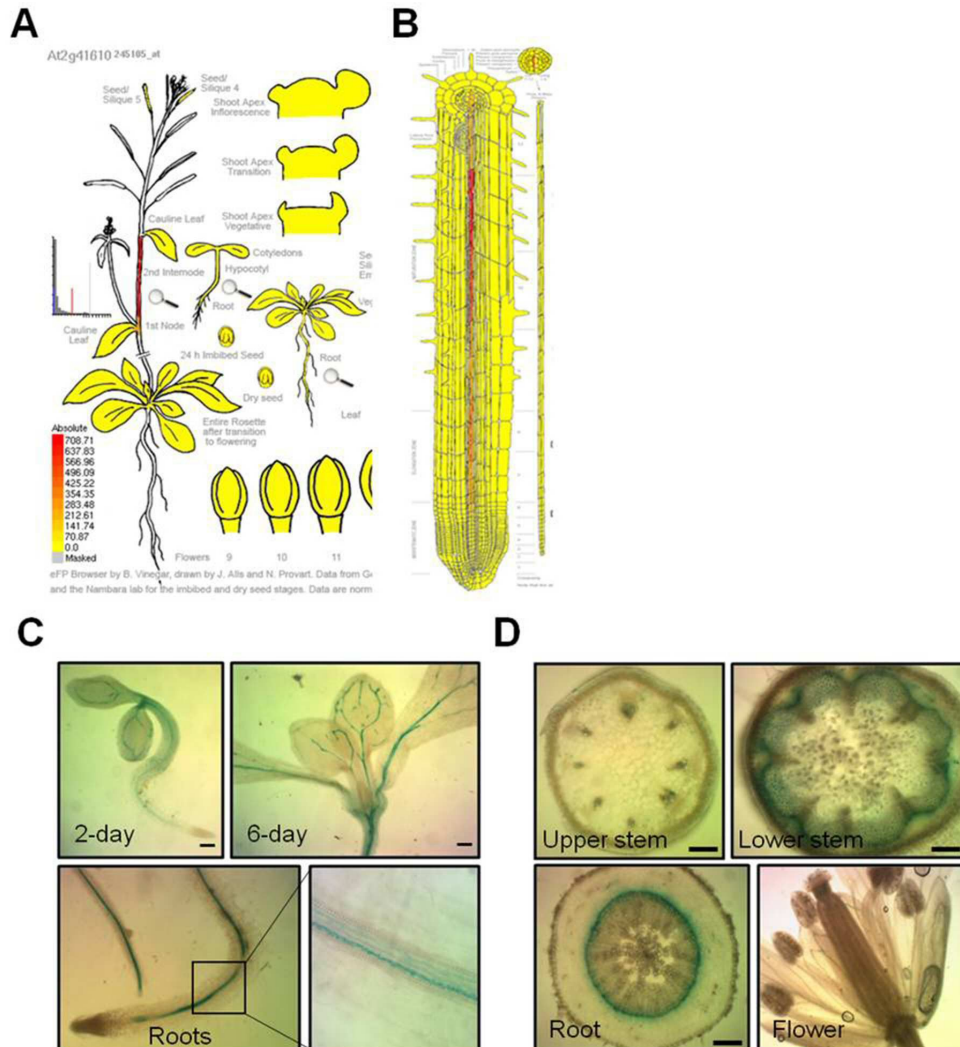
[0141] 따라서, 이를 통해 *AtDICE1*의 고도로 보존된 N-말단 외부 도메인이 *AtDICE1* 기능에서 중요한 역할을 할 수 있음을 알 수 있다.

[0143]

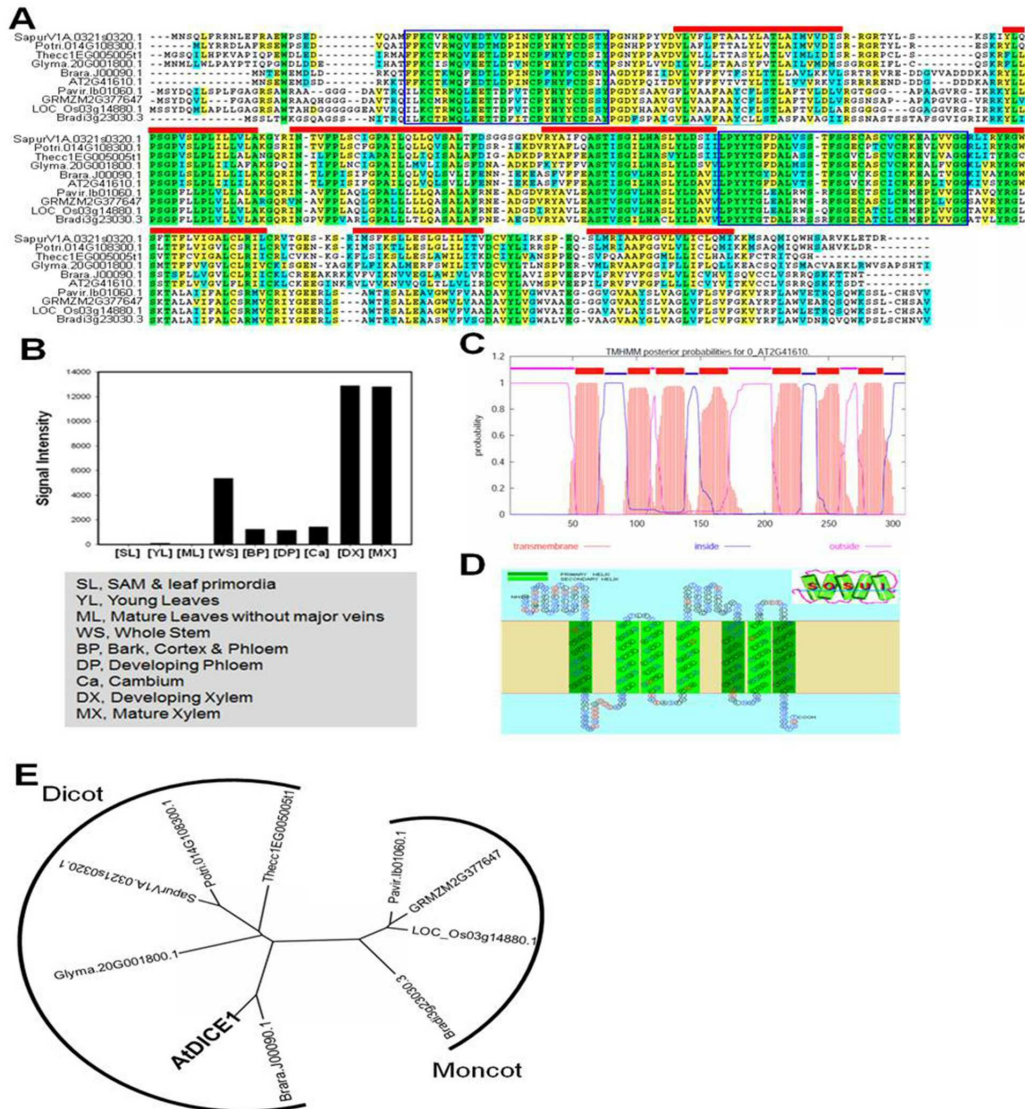
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

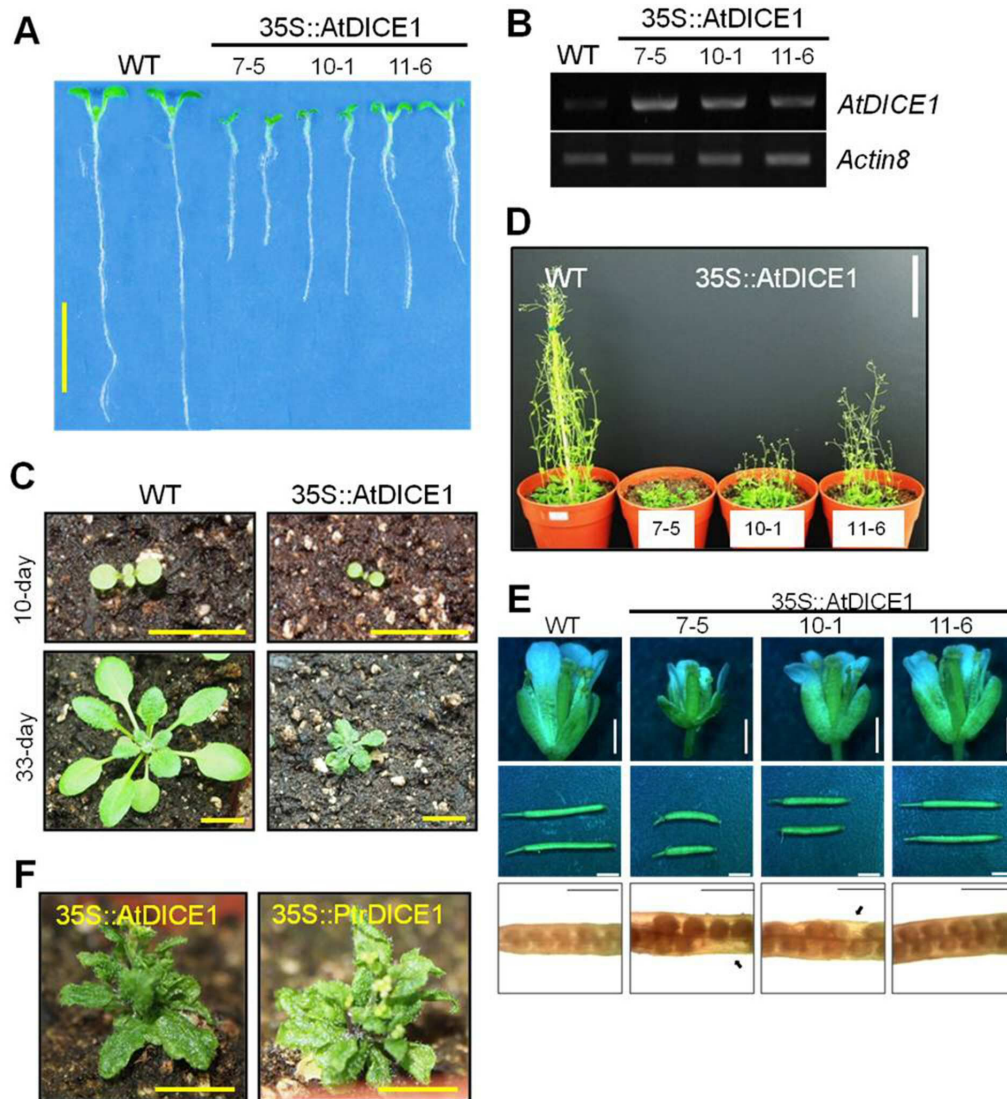
도면1



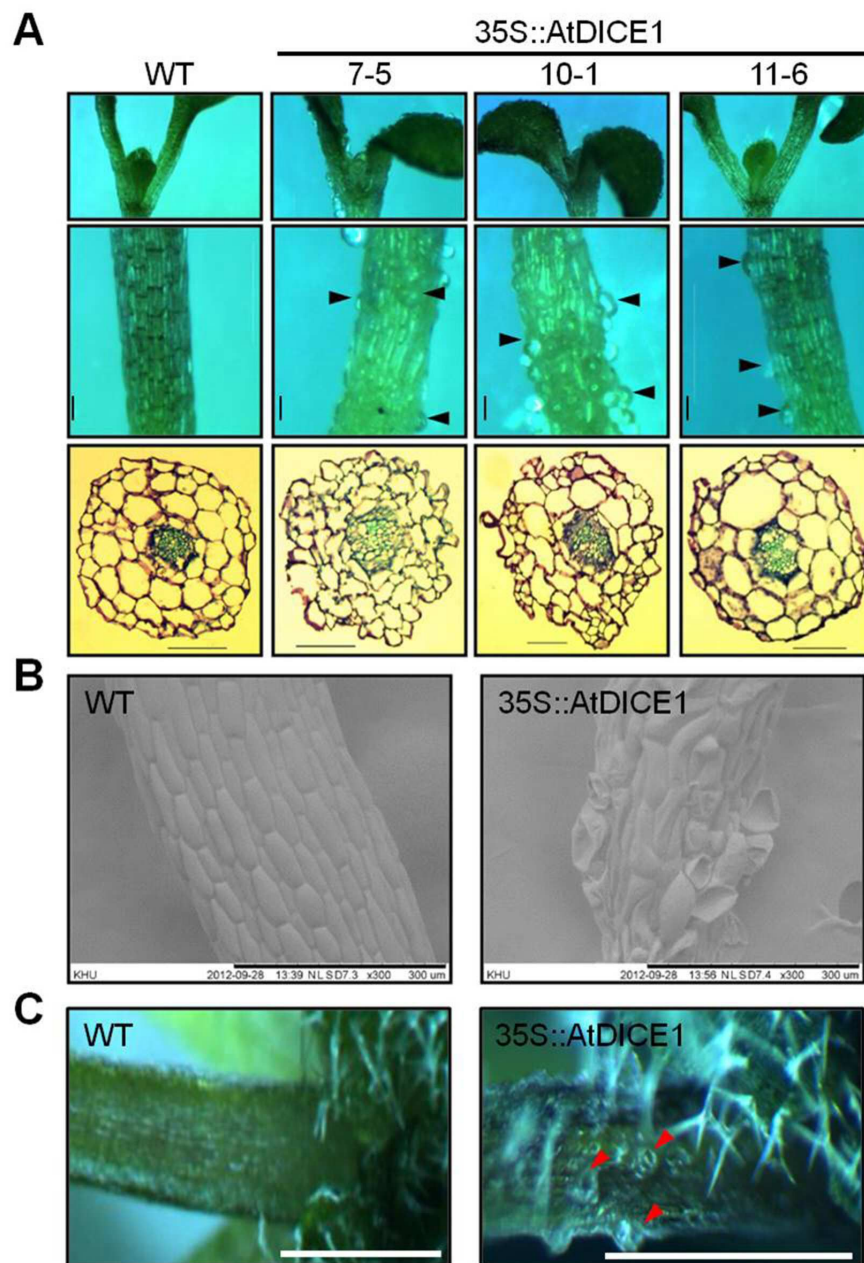
도면2



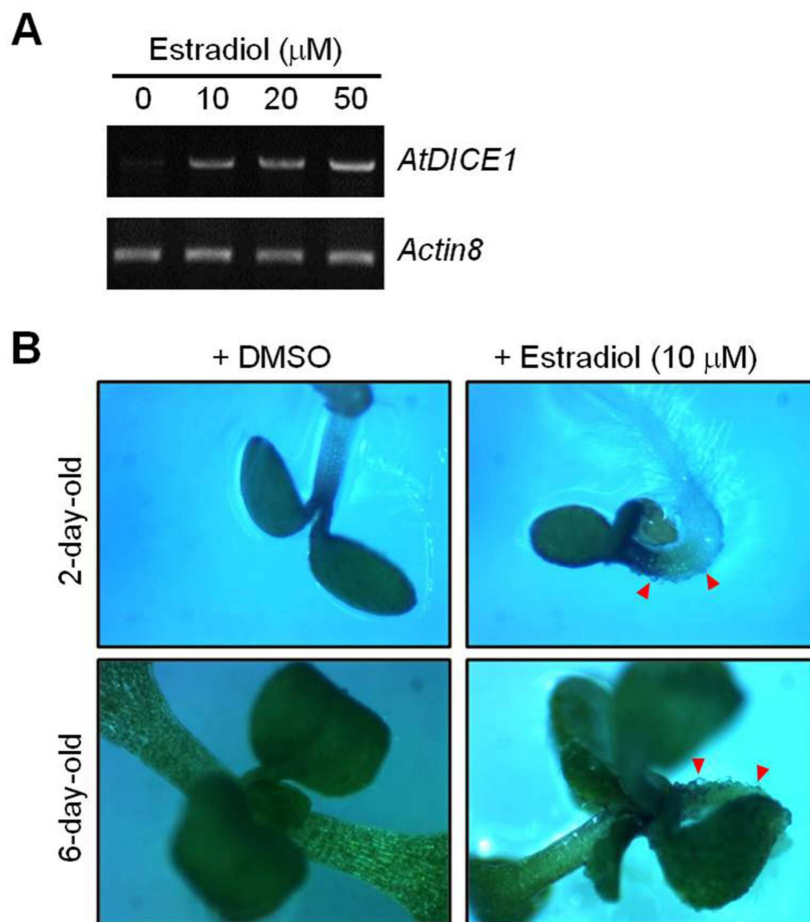
도면3



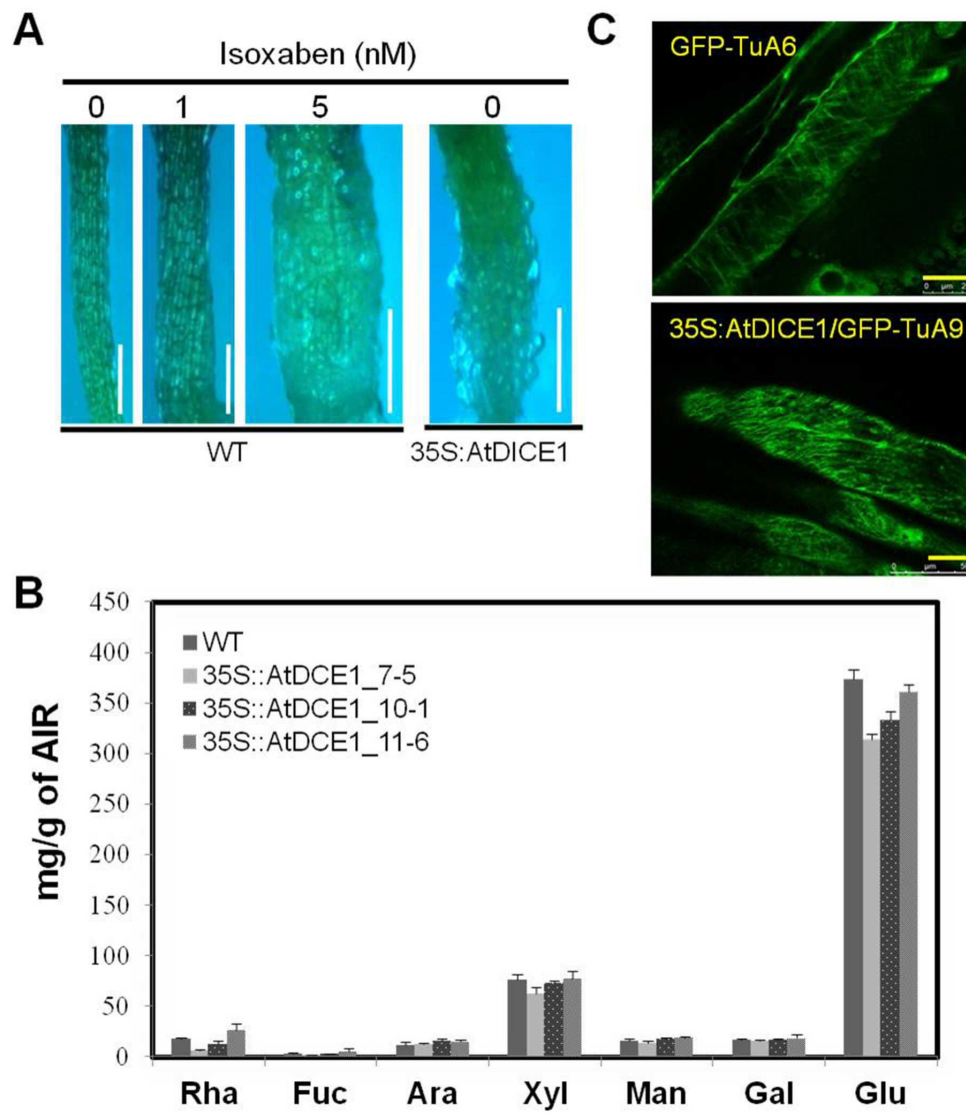
도면4



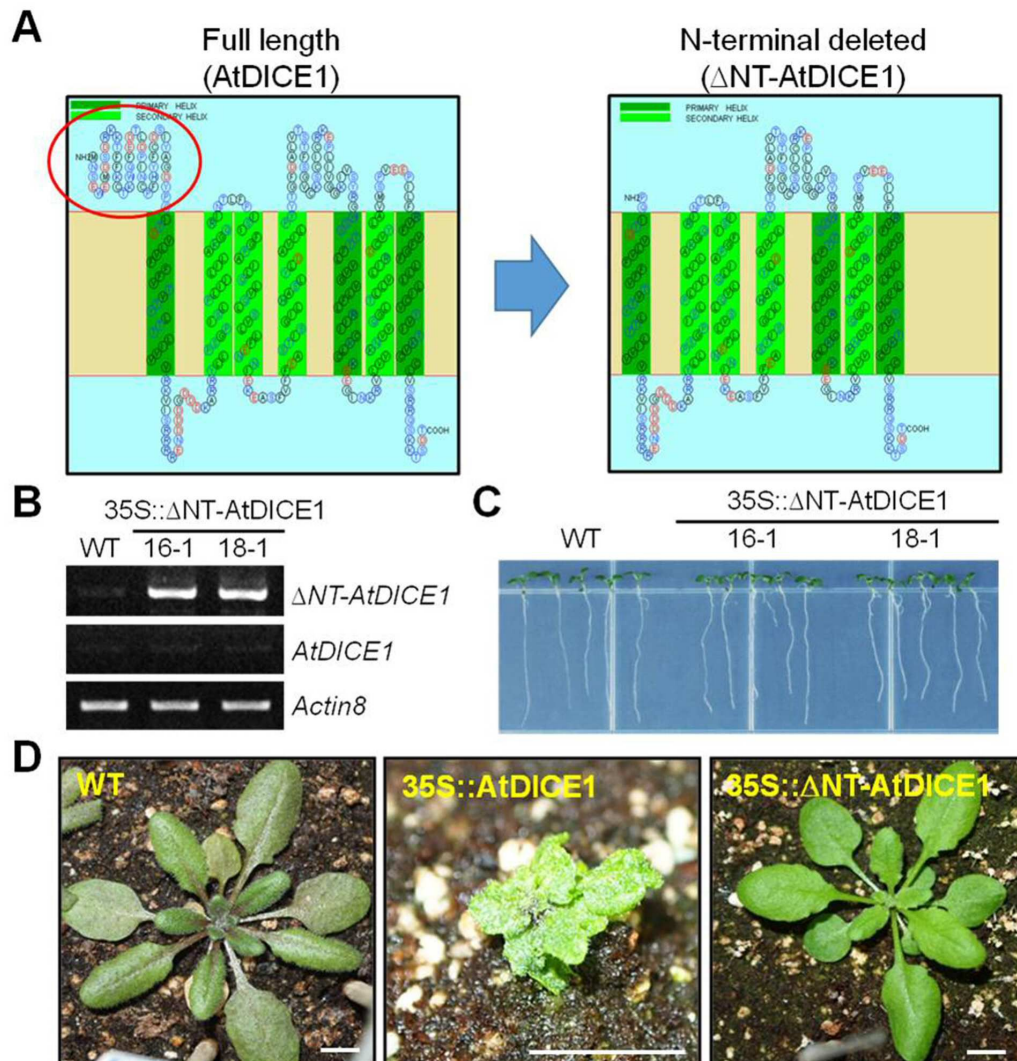
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A gene involved in plant cell elongation and production of dwarf plants
- <130> KPA171165-KR
- <160> 16
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 310
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis thaliana
- <400> 1

Met Asn Ser Glu Trp Glu Met Asp Ser Asp Arg Lys Lys Thr Phe Phe

1 5 10 15
 Lys Cys Thr Lys Trp Gln Phe Glu Asp Thr Leu Asp Pro Ile Asn Cys

 20 25 30
 Pro Phe His Tyr Phe Cys Asp Ser Ile Tyr Ala Gly Asp Tyr Pro Gln
 35 40 45
 Ile Thr Asp Val Leu Val Phe Phe Phe Val Thr Val Thr Tyr Leu Thr
 50 55 60
 Thr Leu Ile Val Val Val Arg Lys Val Ile Ser Arg Arg Arg Arg Glu
 65 70 75 80
 Asn Asp Asp Asp Gly Asp Asp Asp Lys Ala Arg Arg Tyr Leu Leu Pro
 85 90 95

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

 165 170 175
 Gly Phe Asp Ala Leu Val Thr Ser Thr Phe Ser Gly Val Cys Lys Ser
 180 185 190
 Cys Ile Cys Arg Lys Glu Pro Leu Ile Val Gly Gly Lys Ile Val Ser
 195 200 205
 Tyr Arg Gly Trp Ser Ser Thr Thr Phe Leu Val Val Gly Val Leu Phe
 210 215 220
 Leu Arg Ile Ile Cys Lys Leu Cys Lys Glu Glu Gly Ile Asn Lys Arg
 225 230 235 240

 Val Leu Val Val Lys Asn Val Val Gln Gly Leu Thr Leu Leu Val Leu
 245 250 255

Ile Arg Asp Cys Val Tyr Leu Ala Val Met Ser Pro Val Glu Glu Pro
 260 265 270
 Ile Leu Phe Arg Val Phe Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Ile Cys
 275 280 285
 Val Tyr Val Ile Thr Lys Val Cys Cys Leu Val Ser Arg Arg Gln Ser
 290 295 300
 Lys Lys Thr Ser Asp Thr

305 310

<210> 2

<211> 1083

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

caaaacaaaa aaaacaaaca aattatgaat tcagaatggg aaatggattc tgatagaaag	60
aaaacatttt tcaaatgcac aaagtggcaa ttcgaggaca cacttgatcc tattaactgt	120
cctttccact atttctgcga cagcatctat gccggcgact accctcaaat caccgacgtt	180
ctagttttct tcttcgttac ggttacttat ttgacgacgc taattgttgt cgtaaggaag	240
glaatatcaa gaagaagaag agaaaatgat gatgatgggtg atgatgacaa agcaagaagg	300
tacttacttc cttctgggcc aatctctctt cctttgatca tcttgattct tgcaaaagg	360
caaaggatca ataccctttt cccaatttcc atctttggac ctgcgatact acagcttggt	420
cagctctcag tgcttttatt tgagaacaat atcgaaaaag aagcgagttt tgtctcttc	480
gaagcctcta ctatctctgg tattctccac gctagtcttt acttagacgc tgtgattctc	540
ccctattata caggattcga tgctctgggtc acatctactt tctctggagt ctgcaagtct	600
tgtatatgca ggaaagagcc attaatagtg ggagggaaga ttgtctctta ccgaggatgg	660
tctagtacaa cgttcttggg gggttggtgtt ttgtttttga ggattatatg caagttatgc	720
aaagaagaag gaataaataa aagagttttg gtggttaaaa atgttgtgca aggactgaca	780
ttgcttggtc ttataagaga ttgtgtgtac ttggccgtta tgtctcctgt tgaagagcct	840
atcttgttta gggtttttgt gtttggtttt cttcttctgt tgatatgtgt ttatgtaatc	900
acaaaagtat gttgttttgt tagtcggaga cagagtaaga agacatcaga cacatgaaat	960
ttgaaacaaa aaggaaaaat caggaggcaag atgaagtaaa tgtaaatgat tgcttaatga	1020
tgagtttata ttggatgtga tgatgaaatg gtaaaactta aacattactt ctatatctat	1080
tta	1083

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtDICE1 construct_F

<400> 3

aaaaagcagg ctatgaattc agaatgggaa atgg 34

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtDICE1 construct_R

<400> 4

agaaagctgg gttcatgtgt ctgatgtctt cttactctg 39

<210> 5

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-termianl deletion AtDICE1 construct_F

<400> 5

aaaaagcagg ctatgcctca aatcaccgac gttcta 36

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-termianl deletion AtDICE1 construct_R

<400> 6

agaaagctgg gttcatgtgt ctgatgtctt cttactctg 39

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtDICE1 promoter construct_F

<400>	7	
gcgtctagat ctcaatctac gagcacaaa		29
<210>	8	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>		
>	AtDICE1 promoter construct_R	
<400>	8	
tttggatccg aatccatttc ccattctgaa		30
<210>	9	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PtrDICE1 promoter construct_F	
<400>	9	
aaaaagcagg ctatgctgta ccgacgggac ctgg		34
<210>	10	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PtrDICE1 promoter construct_R	
<400>	10	
agaaagctgg gtctacctgt ctaactttac atgtgc		36
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	AtDICE1_AtDICE_pF	
<400>	11	
gcaaggactg acattgcttg		20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtDICE1_UTR3'

<400> 12

accgaggatg gtctagtaca 20

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-termianl deletion AtDICE1_F

<400> 13

atgcctcaaa tcaccgacgt tcta 24

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-termianl deletion AtDICE1_R

<400> 14

tcatgtgtct gatgtcttct tactctg 27

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin8_F

<400> 15

atgaagatta aggtcgtggc a 21

<210> 16

<

211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Actin8_R

<400> 16

tccgagtttg aagaggctac 20