(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0021409
(43) 공개일자 2009년03월04일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/05* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0085874
(22) 출원일자 2007년08월27일
심사청구일자 2007년08월27일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
임채오
경남 진주시 하대동 현대아파트 103동 1203호
임찬주
대구 수성구 수성동1가 463-1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

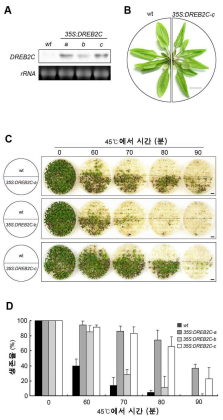
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C의 발현 조절을 통한내열성이 향상된 형질전환 식물체

(57) 요 약

본 발명은 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C (DREB2C)의 발현 조절을 통해 타겟 유전자의 프로모터와의 결합 및 발현을 증진시킨 내열성 형질전환 식물체에 관한 것으로, 상기 형질전환 식물체는 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C (DREB2C)가 고온 스트레스-저항 관련 타겟 유전자의 프로모터 상의 탈수 반응 요소/C-반복서열 (DRE/CRT) 모티프 (A/GCCGAC)와 함께 복합체를 형성함으로서 고온 스트레스-저항 관련 타겟 유전자의 발현을 상향 증진시킴을 특징으로 한다.

대 표 도



(72) 발명자

정우식

경남 진주시 가좌동 주공그린빌아파트 109동 1702호

이균오

경남 진주시 가좌동 주공그린빌아파트 102동 804호

이상열

경남 진주시 망경동 한보아파트 106동 1806호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C (DREB2C)의 발현 조절을 통해 타겟 유전자의 프로모터와의 결합 및 발현을 증진시킨 내열성 형질전환 식물체

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C (DREB2C)가 고온 스트레스-저항 관련 타겟 유전자의 프로모터 상의 탈수 반응 요소/C-반복서열 (DRE/CRT) 모티프 (A/GCCGAC)와 함께 복합체를 형성함으로서 고온 스트레스-저항 관련 타겟 유전자의 발현을 상향 증진시킴을 특징으로 하는 내열성 형질전환 식물체

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 고온 스트레스-저항 유전자는 애기장대 게놈 개시 번호 At5g57560(GenBank 등록 번호 AV544278), At1g17020(GenBank 등록 번호 AV560286), At2g42010(GenBank 등록 번호 AV555459), At5g12080(GenBank 등록 번호 AV547543), At5g23590(GenBank 등록 번호 AV555517), At5g59720(GenBank 등록 번호 AV441076), At5g54170(GenBank 등록 번호 AV440321), At3g60520(GenBank 등록 번호 AV521773), At2g04900(GenBank 등록 번호 AV536394), At4g10040(GenBank 등록 번호 AV521939)에서 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 내열성 형질전환 식물체

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C (DREB2C)의 발현 조절을 통해 타겟 유전자의 프로모터와의 결합 및 발현을 증진시켜 내열성이 증가된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다. 더욱 상세하게는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C의 발현을 증진시켜 열내성과 관련된 타겟 유전자의 프로모터와의 결합 및 이들 유전자들의 발현의 증가를 유도하여 식물체의 내열성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 과도하게 증가된 온도는 식물체 내의 생장 및 발달에 여러 손상을 유발시키는 부적당한 환경 스트레스이다. 식물 세포가 매우 짧은 시간 동안 과도한 온도에 노출되는 경우 프로그램화된 세포 사멸 (PCD)이 유발될 수 있고 PCD의 전형적인 특징은 시간-의존적 게놈 DNA의 파괴 및 원형질체의 세포벽으로부터의 분리 및 응축을 포함한다.

<3> 이와 대조적으로 비치사적 고온의 전처리 (고온 순응)는 고온 스트레스에 대한 식물체의 고온 내성을 유발하고 후속 노출의 치사 온도로부터 식물을 보호한다. 후천적 내열성으로 표기되는 이러한 현상은 열 순응 기간 동안 열 충격 단백질 (HSP)의 축적과 관련된다. HSP의 축적 및 이에 따른 기본 수준 이상의 내열성 증가는 식물체 열 순응의 결과이다. 이외에도 세포소기관에서 적은 양의 HSP가 세포막 결합시, 세포소기관 및 세포골격을 포함한 세포 구조의 변화뿐만 아니라 세포막 지방산 조성의 변화, 탄화수소 및 단백질 대사의 변화, 광합성율의 변화, 프롤린과 같은 용해성 유기 화합물의 축적을 포함한 고온 스트레스 내성의 여러 중요한 특징이 확인되었다. 또한 여러 보고서는 앱시스산 (ABA), 칼슘, 살리실산, 초과산화물 및/또는 과산화수소와 같은 고온 스트레스와 일반적으로 관련된 신호전달 분자가 고온 스트레스에 반응하여 작동되는 경로를 조절하고 이들이 HSP 생성 및 내열성을 증가시킴을 밝히고 있다.

<4> 대한민국 특허등록 제703115호 '스트레스 유도성 프로모터 및 그의 이용방법'에서는 단자엽 식물에서 효과적으로 작용할 수 있는 스트레스 유도성 프로모터, 이 프로모터를 사용한 환경 스트레스 내성 식물을 개시하고 있다. 또한 이때 스트레스 내성을 향상시키는 조절 유전자의 적합한 예로서 애기장대 유래 전사인자 DREB, 벼 유래 전사인자 OsDREB 등을 예시하고 있다. 그러나 상기 특허 문헌에 개시된 사항은 상기와 같은 조절 유전자

를 작동할 수 있게 하는 벼 유래 프로모터에 관한 것이며 애기장대 유래 전사인자 DREB의 발현 조절을 통해 내열성을 증진시킨 형질전환 식물에 관해서는 제시하고 있지 않다.

<5> 한편 대한민국 특허등록 제571131호 '식물의 전사인자를 코딩하는 유전자'에서는 스트레스 내성 유전자에 특이적인 전사인자를 코딩하는 벼와 같은 단자엽식물 유래의 유전자를 확인하고 그 유전자를 사용하여 새로운 환경 스트레스 내성 식물을 개시하고 있다. 즉 벼 게놈으로부터 DREB 상동 유전자를 분리하고 이를 이용한 형질전환 식물을 제시하고 있는 것이다. 그러나 상기 특허 문헌에는 애기장대에서 분리된 DREB2C 단백질의 발현을 증진시킨 내열성 형질전환 식물체에 관해서는 전혀 개시하고 있지 않다.

<6> 최근 DNA 마이크로어레이 분석과 같은 광범위한 게놈 수준의 유전자 분석방법이 애기장대 내 열 순응-관련 유전자를 규명하는데 이용되고 있다. 이러한 연구는 고온에서 발현하는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2 (*DREB2*) 유전자 그룹뿐만 아니라 다양한 전사 조절인자 및 고온 발현 유전자들을 대량으로 분리 및 확인하였다. 이들 유전자 중 저온 스트레스시 유발되는 *DREB1/CBF* 유전자와 달리 *DREB2* 유전자 그룹은 NaCl, 가뭄 또는 고온 스트레스에 의해 우선적으로 유발된다고 보고된 바 있다. 더욱이 이들 유전자 중 *DREB2A*의 구조적 활성 형태의 과발현은 고온 및 가뭄 내성을 증가시킨다. 따라서 *DREB2* 유전자는 수분 결핍 및 고온 스트레스에 대한 반응과 관련된다고 여겨지고 있다. 그러나 애기장대 내 확인된 8개의 *DREB2* 유전자 중 *DREB2A*만이 집중적인 연구가 수행된 유전자이다. 따라서 다른 *DREB2* 유전자에 대한 기능을 규명할 필요성이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C (DREB2C)의 DNA-결합, 트랜스-활성화 능력 및 마이크로어레이 분석을 통해 다운스트림 타겟 유전자를 확인함으로서 애기장대 식물 내의 *DREB2C* 과발현에 의한 내열성 효과를 분석코자 하였으며, 이를 통해 *DREB2C* 유전자로 형질전환시킨 고온내성 식물체를 개발코자 한 것이다.

과제 해결수단

<8> 본 발명의 목적은 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C (DREB2C)의 발현 조절을 통해 타겟 유전자의 프로모터와의 결합 및 발현을 증진시킨 내열성 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

<9> 또한 본 발명은 상기 형질전환 식물체는 서열번호: 1로 표시되는 아미노산 서열을 지니는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C (DREB2C)가 고온 스트레스-저항 관련 타겟 유전자의 프로모터 상의 탈수 반응 요소/C-반복서열 (DRE/CRT) 모티프 (A/GCCGAC)와 함께 복합체를 형성함으로서 고온 스트레스-저항 관련 타겟 유전자의 발현을 상향 증진시킨 내열성 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

<10> 또한 상기 고온 스트레스-저항 유전자는 애기장대 게놈 개시 번호 At5g57560(GenBank 등록 번호 AV544278), At1g17020(GenBank 등록 번호 AV560286), At2g42010(GenBank 등록 번호 AV555459), At5g12080(GenBank 등록 번호 AV547543), At5g23590(GenBank 등록 번호 AV555517), At5g59720(GenBank 등록 번호 AV441076), At5g54170(GenBank 등록 번호 AV440321), At3g60520(GenBank 등록 번호 AV521773), At2g04900(GenBank 등록 번호 AV536394), At4g10040(GenBank 등록 번호 AV521939)에서 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.

효 과

<11> 본 발명의 효과는 탈수 반응 요소 결합 단백질 2C (DREB2C)의 DNA-결합 및 트랜스-활성화 능력을 측정함으로서 애기장대 식물 내의 전사 조절인자로서의 DREB2C의 기능을 입증한 것이다. 또한 DREB2C를 과발현시킨 형질전환 식물체를 대상으로 마이크로어레이 분석을 수행하여 DREB2C에 의해 조절 받는 유전자를 확인하고 DREB2C를 과발현시킨 고온 내성 형질전환 식물체를 개발한 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<12> 탈수 반응 요소 결합 단백질 2 (DREB2) 그룹은 식물-특이적 전사 조절인자인 APETALA2/에틸렌-반응 요소 결합 인자 (AP2/ERF) 패밀리에 속한다. 본 발명자들은 비치사적 고온 (37℃) 스트레스에 의해 유도되는 애기장대 DREB2C를 암호화하는 cDNA를 분리하였다. 전기영동 이동 변화 분석 (EMSA) 및 효모 원-하이브리드 (yeast one-hybride) 분석은 DREB2C가 탈수 반응 요소/C-반복서열 (DRE/CRT; A/GCCGAC) 모티프와 함께 복합체를 형성

할 수 있음을 규명하였다.

<13> 효모 내 트랜스-활성화 분석 (*trans*-activation ability test)은 DREB2C가 타겟 유전자의 전사 발현을 효과적으로 증가시킬 수 있다는 사실을 입증하였다. 콜리플라워 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus; CaMV) 35S 프로모터의 조절 하에 DREB2C의 과다 발현은 애기장대 형질전환체의 내열성을 증가시켰다. 형질전환 식물체의 마이크로어레이 및 역전사 증폭 분석은 DREB2C가 그의 프로모터 내에 DRE/CRT 요소를 포함한 여러 고온 스트레스-유도성 유전자의 발현을 조절함을 나타내었다. 이들 데이터로부터 본 발명은 DREB2C가 애기장대의 고온 스트레스 내성의 조절자임을 규명한 것이다.

<14> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<15> 열 반응성 DREB2 유전자

<16> 초기 연구에서 본 발명자들은 애기장대의 내열성-관련 분자 반응에 대한 추가적인 규명을 위해 마이크로어레이 분석을 수행하였다. 이들 분석은 *DREB2* 서브패밀리 유전자들이 각각의 조사 시점에 고온 스트레스에 의해 상향-조절됨을 나타내었다. 여기서 본 발명은 고온 스트레스 유도 후 애기장대 *DREB2A*, *B* 및 *C*의 발현 패턴을 비교하기 위해 RT-PCR을 이용하였다. 본 발명은 *DREB2A*가 고온 스트레스 처리 1시간 이내에 일시적으로 유도됨을 관찰하였다 (도 1a). *DREB2B*는 *DREB2A*와 같이 유사한 신속한 유도를 나타내었으나 열 처리 12시간 후 발현이 지속된 반면 *DREB2C*는 다른 유전자보다 느린 속도의 유도를 나타내었다 (도 1a). 따라서 3가지 *DREB2* 상동체 모두는 열 처리의 다른 방어 단계에 관련된다. 이들 유전자 중 *DREB2C*가 본 발명에서 추가적 조사를 위해 선택되었다.

<17> DREB2C의 DRE/CRT-결합 및 전사 활성화 능력의 분석

<18> 전체 길이의 DREB2C 단백질은 발현될 수 없기 때문에 본 발명은 DREB2C 유래 128개 아미노산 단편을 포함한 GST 융합 단백질을 생성한 후 재조합 단백질 ($DREB2C^{145-528}$)이 대장균 내에서 발현되고 정제되었다. DREB2C의 DNA-결합 활성을 조사하기 위해 본 발명은 $DREB2C^{145-528}$ 및 *rd29A* 프로모터에서 유래된 DRE/CRT 모티프를 포함한 ^{32}P-표지된 프로브를 이용하여 이동변화 전기영동 분석법(electrophoretic mobility shift assay; EMSA)을 수행하였다. DREB1A 및 DREB2A에 대한 관찰과 유사하게 도 2A는 $DREB2C^{145-528}$이 DRE/CRT-포함 프로브에 결합됨을 나타낸다.

<19> 또한 본 발명은 효모 원-하이브리드 분석을 이용하여 DREB2C의 DRE-결합 특이성을 시험하였다. pGAD424-DREB2C 및 DRE-His3을 지닌 효모 세포는 His가 결핍되고 20 mM 3-AT를 함유한 SD 배지 상에서 생장될 수 있는 반면 pGAD424-DREB2C 및 mDRE-His3을 지닌 세포는 동일한 배지에서 생장될 수 없었다 (도 2B). 더욱이 이러한 SD 배지 상에서 생장될 수 있는 효모 세포는 β-갈락토시다제 활성도 나타내었다. 이들 결과는 DREB2C가 DRE 요소에 특이적으로 결합하고 mDRE 요소에는 그렇지 않음을 입증하였다.

<20> 더욱이 본 발명은 효모 내 DREB2C의 트랜스-활성화 능력을 조사하였다. DREB2C 암호화 영역은 GAL4 DNA-결합 도메인 발현 벡터에 융합되었고 본 발명은 효모 세포 내 전사 활성제로서 이러한 컨스트럭트의 작용을 조사하였다. GAL4 활성화 도메인의 부재시 야생형 DREB2C와 GAL4 DNA-결합 도메인 사이의 융합은 *His3* 및 *LacZ* 리포터 유전자의 전사를 효과적으로 활성화시켰다 (도 2C). 따라서 DREB2C가 효모 내 전사 활성제로서 기능할 수 있음을 확인하였다.

<21> *DREB2C* 과발현 형질전환 식물의 증가된 내열성

<22> 종전 DREB2A 활성이 애기장대 내의 내열성을 증가시킨다고 보고되었다. 본 발명은 애기장대 내 *DREB2C*의 구성적 과발현이 내열성을 유도할 수 있는지 여부를 평가하였다. 3개의 동형접합성 T_3 형질전환 식물 계통이 선택되었고 도입된 유전자 발현 수치는 RNA-블럿 분석 (RNA gel blot analysis)에 의해 측정되었다. *DREB2C*가 독립적 계통 내에서 다른 발현 수치를 나타내었으나 이는 용이하게 검출 가능하였다 (도 3A). 여러 생장 지연을 나타내는 다른 DREB 서브패밀리 멤버의 과발현시킨 형질전환 식물의 결과와 달리 본 발명의 *35S:DREB2C* 식물은 정상 생장 조건 하에서 지연 없이 생장됨을 발견하였다. 생장 처음 3주 동안은 야생형과 형질전환 사이의 명백한 차이가 존재하지 않았으나 잎 가장자리의 특이적인 하향 말림현상 (curling)이 4주령 형질전환 식물에서 발견되었다 (도 3B). 말림현상 정도는 *DREB2C* 축적 수치에 의존적이었다 (도 1b).

<23> 또한 본 발명은 3종의 T_3 계통 (*35S:DREB2C-a*, *-b*, *-c*)과 야생형 사이의 내열성 정도를 비교하기 위해 10일령 식물을 이용하였다. 식물은 0, 60, 70, 80 및 90분간 45℃에 위치된 후 회복을 위해 22℃로 복귀되었다. 며

칠 후 생존 식물은 새롭게 출현한 잎의 존재에 의해 명백하게 확인될 수 있는 반면 비-생존 식물은 완전한 표백, 팽압의 소실 및 잎 형성 중지 현상을 나타내었다 (도 3C). 내열성 정도는 *35S:DREB2C-a* 및 *-c* 식물이 *35S:DREB2C-b* 식물보다 더 높은 수치를 보였으며 이는 *DREB2C* 발현 정도와 일치된 결과를 보였다 (도 3A, C 및 D). 따라서 이들 결과는 DREB2C가 내열성에 중요한 역할을 함을 나타낸다.

<24> *DREB2C*-발현 식물의 마이크로어레이 분석

<25> 어떠한 타겟 유전자가 *DREB2C* 과발현에 의해 조절되는지 여부를 측정하기 위해 본 발명은 8000개 내외의 애기장대 cDNA를 포함한 cDNA 마이크로어레이를 이용하여 비-스트레스 조건 하에서 야생형 및 열 내성 *DREB2C* 형질전환 계통 내에서 유전자 발현을 비교하였다. 본 발명은 *35S:DREB2C* 형질전환 식물 내 증가된 발현 (> 1.5-배)을 지닌 14개 후보 유전자를 확인하였다. 이후 본 발명은 이들 결과를 확인하기 위해 RT-PCR 분석을 수행하였고 *35S:DREB2C-a* 및 *-c* 식물 내에서 본 발명은 상기 확인된 14개 유전자 중 10개의 상향-조절을 발견하였다. 더욱이 컴퓨터 예측 (*in silico*) 모티프 분석은 이들 10개 유전자의 프로모터 내 하나 이상의 DRE/CRT 서열의 존재를 나타내었다 (표 1).

표 1

마이크로어레이 분석시 *35S:DREB2C-a* 및 *-c* 식물의 상향-조절 유전자 목록

AGI[a]	등록 번호[b]	유전자 명칭	유전자 설명[c]	*35S:DREB2C*[d]			*35S:DREB2A*[e]	No. of DREs[f]
				-a	*-c*	평균	평균	
At5g57560	AV544278	TCH4	자일로글루칸 엔도트랜스글리코실라제	1.89	3.59	2.74	-	1
At1g17020	AV560286	SRG1	산화환원효소	2.23	2.13	2.18	3.7	1
At2g42010	AV555459	PLDBETA1	포스포리파제 D 베타 1	2.03	2.22	2.12	-	1
At5g12080	AV547543	-	기계감각적 이온 채널 도메인-포함 단백질	1.81	1.88	1.84	4.5	1
At5g23590	AV555517	-	DNAJ 열 충격 N-말단 도메인 포함 단백질	2.09	1.48	1.78	-	1
At5g59720	AV441076	HSP18.2	열 충격 단백질	2.17	1.2	1.68	8.3	1
At5g54170	AV440321	-	발현 단백질	1.6	1.69	1.64	4.0	1
At3g60520	AV521773	-	발현 단백질	1.64	1.61	1.62	3.1	1
At2g04900	AV536394	-	발현 단백질	1.63	1.6	1.61	2.3	3
At4g10040	AV521939	-	사이토크롬 c, 추정	1.56	1.6	1.58	4.7	1

[a] 애기장대 게놈 개시 번호

[b] NCBI 데이터베이스에서 이용 가능한 서열

[c] BLASTN 상동성 검색으로 주석이 달린 유전자 설명

[d] 반복 실험의 평균 비율

[e] Sakuma et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:18822-18827, 2006

[f] 유전자 전사 시작 사이트의 업스트림 서열(<1500 bp) 내 DRE/CRT (A/GCCGAC)

<26> 핵심 서열 수

<27> *35S:DREB2C* 식물이 내열성을 나타내었기 때문에 본 발명에서는 DREB2C가 다른 열 유도성 유전자를 조절하는지 확인하는 것이 중요하다. 이를 위해 본 발명은 이들 10개 유전자가 37℃에서 열 유도성 발현을 나타내는지 여부를 측정하여기 위해 RT-PCR을 이용하였다. 도 4에 나타난 바와 같이 10개 유전자 모두의 발현이 열에 의해 유도되었고 이는 DREB2C가 열 반응성 유전자를 조절함을 나타낸다. 그러나 이들 열 반응성 유전자가 DREB2C에 의해 조절되는 경우 *DREB2C* 발현이 3시간 후에만 관찰되었기 때문에 유도 관찰을 예측하는 최초 시점은 37℃ 처리 3시간 후가 될 것이다 (도 1a). 실제로는 이들 여러 잠재적 타겟 유전자는 3시간 전에 유도되었고 (도 4)

따라서 이들 표면적인 모순된 결과를 해결하기 위해 본 발명은 고온 스트레스 하의 유전자 발현 패턴 및 DREB2A 및 DREB2C 모두의 타겟 유전자를 비교하였다 (도 1a, 표 1). 그 결과 *DREB2A*의 일시적 유도가 처리 1시간 후에 관찰되었을 뿐만 아니라 DREB2A 및 DREB2C는 다운스트림 타겟 유전자를 공유한다(표 1). 이들 결과는 DREB2A 및 DREB2C가 각각 37℃ 고온 스트레스 조건 하에서 일반 타겟 유전자의 발현을 유도하는 초기 및 후기 조절자로서 기능함을 나타낸다.

<28> 현재 전사 조절인자의 DREB 서브패밀리는 DRE/CRT 요소에 결합하고 한랭, 가뭄 및 고염도에 대한 내성에 관련된 유전자 전사를 조절한다고 보고되었다. J. Diaz-Martin *et al.*, Plant Physiol. 139:1483-1494, 2005은 해바라기 HaDREB2가 *Hahsp17.6G1* 프로모터 내 DRE/CRT 요소에 결합하여 HaHSFA9와의 상승적 상호작용을 통해 *Hahsp17.6G1* 발현을 증진시킨다고 보고하였다. 더욱이 게놈-광범위 인 실리코 분석은 DRE/CRT-포함 유전자가 열 충격에 의해 유의적으로 유도됨을 나타내었다. 형질전환 애기장대 식물에서 애기장대 *DREB2A* 또는 옥수수 *ZmDREB2A*의 구성적으로-활성인 형태의 과발현은 HSP 및 HsfA3과 같은 많은 고온 스트레스 유도성 유전자의 발현을 활성화시키고 이들 유전자의 발현이 증가된 내열성을 유발함이 판명되었다.

<29> 본 발명은 *DREB2C* cDNA의 과발현이 형질전환 애기장대 내의 내열성을 증가시키는 타겟 유전자들의 프로모터 영역 내 DRE/CRT 모티프에 결합하여 고온 스트레스-관련 유전자를 상향-조절함을 나타내었다. 따라서 이들 데이터는 DREB2 서브그룹이 DRE/CRT 요소에 의해 제어되는 내열성 기전에 중요한 역할을 함을 나타내고 DREB2C가 고온 스트레스 내성 반응의 구성요소임을 나타낸다.

<30> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<31> (실시예 1) 식물 생장 조건 및 내열성 분석

<32> 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh. 생태형 Columbia [Col-0]) 식물은 22℃에서 토양 (60% 상대 습도) 또는 시험관 내 100 $\mu E\ s^{-1}\ m^{-2}$ 광조건 16시간 및 8시간 암조건으로 3% 자당 및 0.25% 파이타-겔 (phytagel)(pH 5.8)을 함유한 MS 배지 상에서 생장되었다. 동조 발아를 유도하기 위해 종자는 암조건으로 3일간 4℃에서 춘화현상 유발된 후 생장조절실로 옮겨졌다. 내열성 분석을 위해 실험접시에서 생장된 10일령 식물이 암조건으로 0, 60, 70, 80 또는 90분간 45℃로 온도 조절된 생장조절고 (EYELA, 일본 도쿄) 내에 위치된 후 정상 생장 조건으로 복귀되었다. 복귀 7일 후 식물은 촬영되고 생존율이 측정되었다.

<33> (실시예 2) 형질전환 애기장대의 생성

<34> 전체 길이 *DREB2C* cDNA을 증폭시키기 위해 야생형 애기장대 (Col-0) 모종으로부터 수득된 전체 RNA 상에서 RT-PCR이 수행되었다. 반응은 PCR 프라이머 5'-TCTAGAATGCCGTCGGAGATTGAC-3'(서열번호: 2) 및 5'-GGATCCTTATGTAGATCCATGAAC-3'(서열번호: 3)을 사용하였다. RT-PCR 생성물은 TA-돌출부를 이용하여 pGEM-T Easy (Promega, Madison WI) 벡터 내로 삽입되었고 DNA 염기 서열분석에 의해 검증되었다. 이후 *DREB2C* cDNA는 *Xba*I 및 *Bam*HI로 분리한 후 1.026 kb DREB2C 단편은 pBI121 (Clontech, Palo Alto, CA) 벡터 내 CaMV 35S 프로모터와 노팔린 신타제 터미네이터(nopaline synthase terminator; NOS-Ter) 사이에 삽입되었다. 재조합 플라스미드는 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 내로 도입되고 화아 침적 방법을 통해 애기장대를 형질전환시키는데 이용되었다. 단일 T-DNA 삽입을 포함한 동형접합성 T_3 계통이 분석에 이용되었고 형질전환 식물은 상기 기술된 바와 같이 유지되었다.

<35> (실시예 3) 재조합 DREB2C의 발현 및 EMSA

<36> DREB2C DRE/CRT-결합 활성을 분석하기 위해 본 발명은 전체 AP2-도메인을 포함한 DREB2C cDNA 384 bp (145~528) 단편을 PCR-증폭시켰다. 증폭용 프라이머는 5'-TCTAGAATGCCGTCGGAGATTGAC-3'(서열번호: 4) 및 5'-GGATCCTTATGTAGATCCATGAAC-3'(서열번호: 5)이었다. 증폭된 단편은 제한효소*Bam*HI-*Xho*I로 절단한 후 pGEX-4T-1 (Pharmacia, Piscataway, NJ) 벡터 내 동등한 사이트 내에 인-프레임으로 접합되었다. 재조합 글루타치온-S-전이효소 (GST)-DREB2C 융합 단백질은 대장균 BL21(DE3) pLysE 균주 내에서 발현되고 친화성 크로마토그래피를 이용하여 융합 단백질이 정제되었다. EMSA는 M.S. Choi et al., J. Biol. Chem. 280:40820-40831, 2005에 기술된 바와 같이 *rd29A* 프로모터의 DRE/CRT 요소를 포함한 ^{32}P-dATP-표지된 71 bp 단편을 이용하여 수행되었다.

<37> (실시예 4) 효모 원-하이브리드 분석

<38> 전체 DREB2C 암호화 영역이 pGAD424 활성화 도메인 (Clontech)의 *Eco*RI-*Bam*HI 사이트 내로 융합되었다. 이후 pGAD424-DREB2C는 야생형(wDRE, T**ACCGAC**AT) 또는 돌연변이화된 DER/CRT 일렬 반복 서열(mDRE, T**ATTTTC**AT)의 조절 하에서 리포터 유전자 *His*3 및 *LacZ*를 운반하는 효모 균주 YM4271 내로 형질전환되었다. 효모의 형질전환은 표준 실험방법 (Clontech)에 따라 수행하였으며, DREB2C의 DRE 요소에 대한 특이적 결합 여부는 20 mM 3-아미노트리졸(3-AT; *His*3 유전자 생성물의 경쟁적 저해제)을 함유한 SD 배지 상에서의 생장 및 β-갈락토시다제 활성 분석에 의해 확인되었다.

<39> (실시예 5) 효모 내 DREB2C의 트랜스-활성화 능력

<40> 전체 DREB2C 암호화 영역을 효모 GAL4 DNA-결합 도메인 발현 벡터인 pGBT9 (Clontech)의 *Eco*RI-*Bam*HI 위치 내로 융합하였다. 이후 재조합 플라스미드는 제조사 (Clontech)에 의해 기술된 바와 같이 효모 균주 PJ69-4A 내로 형질전환되었고 형질전환체는 3일간 30℃에서 Trp^- 합성 배지 상에서 선택되었다. 제조사 실험방법 (Clontech)에 따라 β-갈락토시다제 필터-리프트 (filter-lift) 분석이 수행되었다.

<41> (실시예 6) 애기장대 cDNA 마이크로어레이 분석

<42> 10일령 전체 RNA 분리, 형광 프로브 제조, 마이크로어레이 혼성화, 스캐닝 및 데이터 분석은 K.A. Yang *et al.*, Plant Sci. 168:959-966, 2005 및 J.M. Chirgwin *et al.*, Biochemistry 18:5294-5299, 1979에 기술된 바와 같이 수행되었다. 마이크로어레이의 실험적 오류를 최소화하기 위해 각각의 비교는 염료-반전 혼성화 및 독립적으로 분리된 RNA 표본을 이용하여 적어도 2회 이상 수행되었다. 표지된 프로브는 GSNU-애기장대-EST-12 K 어레이 (EMBL 어레이 등록 번호: A-MEXP-187)에 혼성화되었다. 모든 실험의 상세한 설명은 등록 번호 E-MEXP-986 하에서 ArrayExpress(http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/)에서 온라인으로 이용 가능하다.

<43> (실시예 7) RNA 겔 블럿 분석 및 RT-PCR

<44> RNA 겔 블럿 분석은 J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, third ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001에 기술된 바와 같이 수행되었다. RT-PCR 분석을 위해 cDNA는 전체 RNA 2 ㎍으로부터 합성되었다. 각 cDNA 표본은 1:10으로 희석되었고 희석된 cDNA 1 ㎕가 유전자-특이적 프라이머 세트로 PCR 증폭 (1분간 94℃, 1분간 58℃, 1분간 72℃; 50 ㎕ 부피 내)에 사용되었다 (표 2).

<45>

표 2

RT-PCR에 사용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머

AGI [a]	타겟 유전자	프라이머 서열	예측 크기 (bp)
At1g17020	*SRG1*	5'-CACAGTGGAGCTCTATCC-3'(서열번호: 6) 5'-TTAGATTCTCAAAGCATC-3'(서열번호: 7)	1058
At2g04900	-	5'-GCCTTAATCGCTTTCAACACTCG-3'(서열번호: 8) 5'-CTAGGAGAAGGCACGCCAGTTTTTC-3'(서열번호: 9)	365
At2g42010	*PLDBETA1*	5'-CTCGTTATCCATACCCTTACGG-3'(서열번호: 10) 5'-CGAGCTGTTAGGGTAACCATAC-3'(서열번호: 11)	675
At2g40340	*DREB2C*	5'-GGAGACTTTGGATGCTTG-3'(서열번호: 12) 5'-TTATGTAGATCCATGAACATCTTTG-3'(서열번호: 13)	376
At3g18780	*Actin2*	5'-ATGGCTGAGGCTGATGATATTCAA-3'(서열번호: 14) 5'-TTAGAAACATTTTCTGTGAACGATT-3'(서열번호: 15)	1220
At3g60520	-	5'-GCCTTAATCGCTTTCAACACTCG-3'(서열번호: 16) 5'-CTAGGAGAAGGCACGCCAGTTTTTC-3'(서열번호: 17)	265
At4g10040	-	5'-ATGGCGTCGTTCGACGAAG-3'(서열번호: 18) 5'-TAAGCGATGAGATCGGCACGATC-3'(서열번호: 19)	317
At5g05410	*DREB2A*	5'-ATGGCAGTTTATGATCAGAGTGGAGATAGA-3'(서열번호: 20) 5'-TTAGTTCTCCAGATCCAAGTAACTCAAGTC-3'(서열번호: 21)	1008
At5g12080	-	5'-TCCTGAAACATCACACCTTCTGGGG-3'(서열번호: 22) 5'-ACATGGTAAGCAGCAGCCAAAGCC-3'(서열번호: 23)	745
At5g23590	-	5'-GCTCTGAAGCTTACCGAGAAG-3'(서열번호: 24) 5'-TGCTTTCTGAAGAGGTACAACC-3'(서열번호: 25)	690
At5g54170	-	5'-TAGGGCTAATCACAGGATGG-3'(서열번호: 26) 5'-TACCCCATCGTCTCTTCTTGATTCC-3'(서열번호: 27)	857
At5g57560	*TCH4*	5'-AAAGAGACGTTGAGATCACTTGGG-3'(서열번호: 28) 5'-GCACCCATCTCATCCTTTGTTGAGC-3'(서열번호: 29)	702
At5g59720	*HSP18.2*	5'-TCTCCCGAAAAGCAACGAAC-3'(서열번호: 30) 5'-CATAAACTTCCCACTAGCTC-3'(서열번호: 31)	366

<46> [a] 애기장대 게놈 개시 번호

<47> 수득된 PCR 생성물(각각 3 ㎕)은 전기영동 및 에티듐 브로마이드 (EtBr) 염색에 의해 분석되었다.

도면의 간단한 설명

<48> 도 1a는 고온 스트레스에 반응한 *DREB2* 유전자의 전사 수준을 나타낸 것이다. RT-PCR 분석은 표시된 시간동안 고온 스트레스 (37℃)로의 노출 후 10일령 식물 내 전사량을 측정하는데 이용되었다. 도 1b는 *DREB2C* 과발현 식물 내 생장 특성을 나타낸 것이다. wt, 비형질전환 야생형 식물, 상단, 중간 및 하단 사진은 각각 4일령, 3주령 및 4주령 식물을 나타낸다. 축척 막대는 4일령 식물 사진 내 1 mm, 3주령 및 4주령 식물 사진 내 1 cm이다.

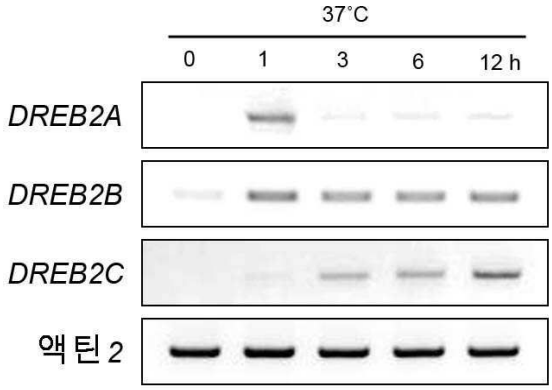
<49> 도 2는 DREB2C의 전사 활성화 능력의 분석뿐만 아니라 시험관 내 DREB2C 및 DRE/CRT 요소 사이의 상호작용을 나타낸다. 도 2(A)는 박테리아로-생성된 GST-DREB2C 융합 단백질 및 *rd29A* 프로모터 유래 DRE/CRT 요소를 포함한 ^{32}P-표지된 71 bp 단편을 이용하여 수행된 EMSA를 나타낸다. 레인 1, 무-프로브. 레인 2, 10 ㎍ GST. 레인 3, 10 ㎍ GST-DREB2C. 경쟁적 EMSA을 위해 ^{32}P-표지된 프로브의 첨가 전 10 ㎍ GST-DREB2C가 10-배 (레인 4), 50-배 (레인 5), 100-배 (레인 6) 또는 500-배 (레인 7) 몰 과량의 비표지 프로브와 함께 전처리되었다. 무-프로브 (FP) 및 단백질-복합된 프로브 (CP)는 7% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분리되었고 방사능사진에 의해 시각화되었다. 도 2(B)는 DREB2C의 DNA-결합 특이성 분석을 위한 효모 원-하이브리드 분석을 나타낸다. 효모 균주 YM4271은 표시된 재조합 유전자 (상단 좌측)로 형질전환되고 0 mM (상단 우측 실험접시) 또는 20 mM (하단 좌측 실험접시) 3-AT의 존재하에 생장되었다. β-갈락토시다제의 발현은 필터-리프트 분석을 이용하여 측정되었다 (하단 좌측 실험접시). 도 2(C)는 GAL4 DB 발현 벡터 (pGBT9)에 인 프레임으로 융합된 후 효모 스트레인 PJ-694A 내로 형질전환된 *DREB2C* 유전자를 나타낸다. 형질전환체는 3일간 30℃로 Trp^- 합성 배지 상에서의 생장에 의해 선택되었다. 전사 활성화 능력의 존재는 β-갈락토시다제 분석 및 His^- 배지 상에서의 활성 시험에 의해 확인되었다.

<50> 도 3은 *DREB2C* 과발현 식물의 표현형 분석을 나타낸 것이다. 도 3(A)는 야생형 및 형질전환 식물 내 *DREB2C*의 RNA 겔 블럿 분석을 나타낸다. 각 레인은 2주령 형질전환 및 야생형 애기장대 식물에서 제조된 총 RNA 20 ㎍으로 적가되었다. 에티듐 브로마이드 염색된 rRNA는 적가 대조군으로 나타났다. 도 3(B)는 *35S:DREB2C* 식물상의 잎 가장자리의 하향 말림현상을 나타낸다. 사진은 정상 조건 하에서 생장된 4주령 야생형 및 *35S:DREB2C-c* 식물 유래의 잎의 반대면을 나타낸다. 도 3(C)는 *35S:DREB2C* 식물의 증가된 내열성을 나타낸다. 22℃에서 생장된 10일령 야생형 및 *35S:DREB2C-a, -b* 및 *-c* 식물은 표시된 시간 동안 45℃에 노출되었다. 비스트레스 조건(22℃) 하에서 회복 7일 후 식물은 사진 촬영되었다. 축척 막대 = 1 cm. 도 3(D)는 식물 생존율로 측정된 내열성을 나타낸다. 실험결과는 적어도 5회 이상의 독립 실험으로부터의 평균 ㅁ S.E.이다.

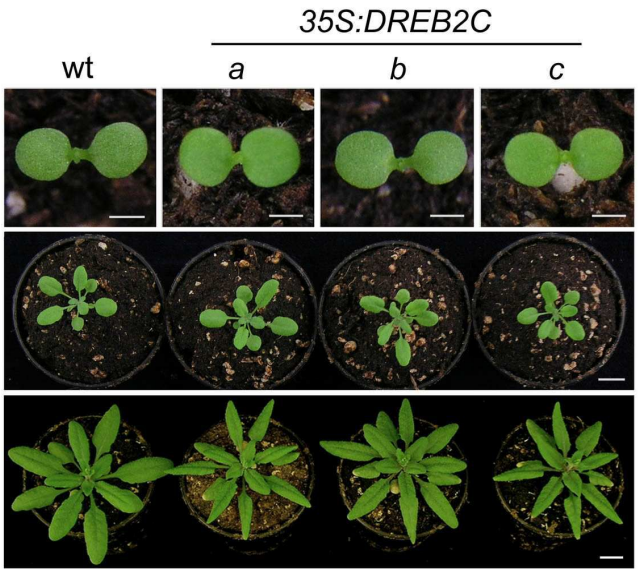
<51> 도 4는 37℃ 고온 스트레스 후 *DREB2C* 과발현에 의해 상향-조절되고 증가된 발현을 나타내는 유전자를 나타낸다. RT-PCR은 10일령 식물 내 전사량을 측정하는데 이용되었다.

도면

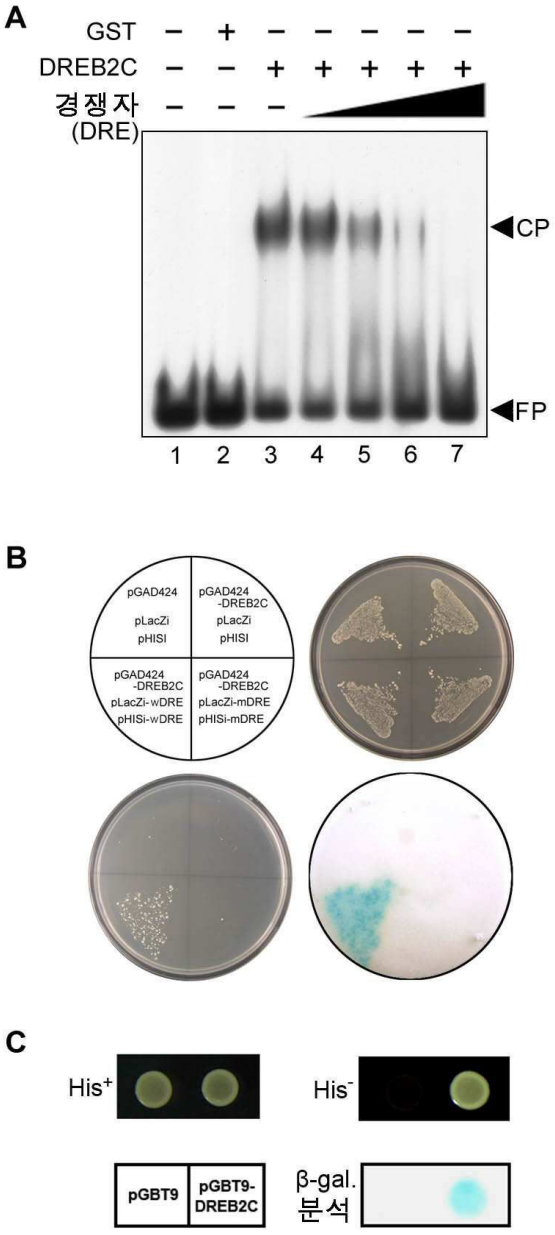
도면1a



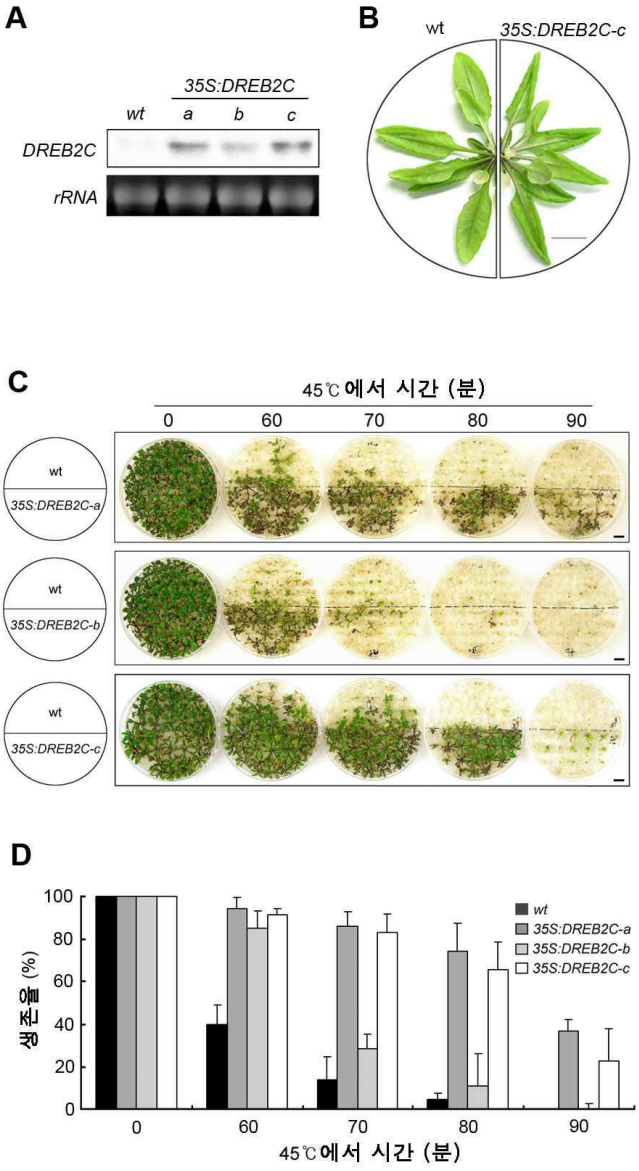
도면1b



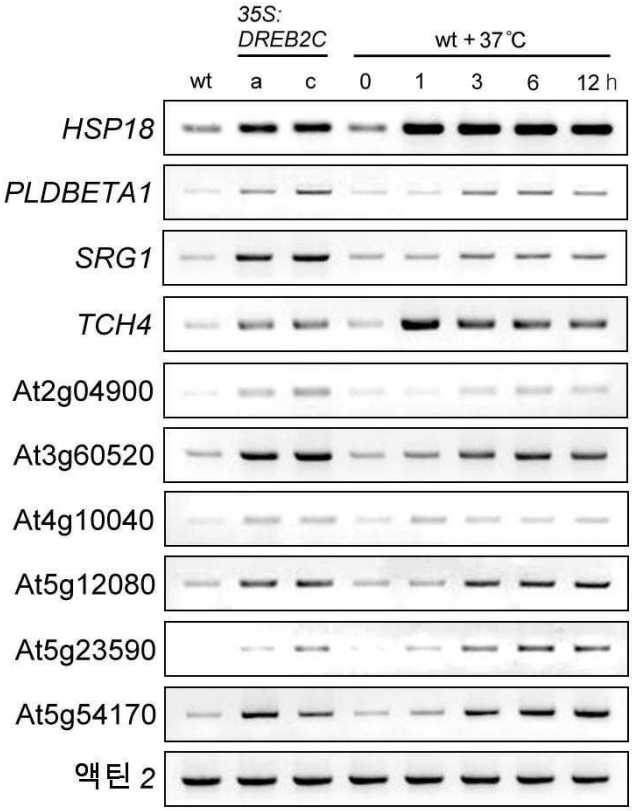
도면2


A
GST
DREB2C
경쟁자
(DRE)
CP
FP
1 2 3 4 5 6 7
B
pGAD424
pLacZi
pHISi
pGAD424 -DREB2C
pLacZi
pHISi
pGAD424 -DREB2C
pLacZi-wDRE
pHISi-wDRE
pGAD424 -DREB2C
pLacZi-mDRE
pHISi-mDRE
C
His+
His-
pGBT9
pGBT9-DREB2C
β-gal. 분석

도면3


A
35S:DREB2C
wt
a
b
c
DREB2C
rRNA
B
wt
35S:DREB2C-c
C
45℃에서 시간 (분)
0
60
70
80
90
wt
35S:DREB2C-a
wt
35S:DREB2C-b
wt
35S:DREB2C-c
D
생존율 (%)
100
80
60
40
20
0
wt
35S:DREB2C-a
35S:DREB2C-b
35S:DREB2C-c
0
60
70
80
90
45℃에서 시간 (분)

도면4



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
<120> Transgenic plant having enhanced thermo-tolerance by modulating the expression of dehydration responsive element binding protein 2C

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 341
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1
Met Pro Ser Glu Ile Val Asp Arg Lys Arg Lys Ser Arg Gly Thr Arg
1 5 10 15

Asp Val Ala Glu Ile Leu Arg Gln Trp Arg Glu Tyr Asn Glu Gln Ile
20 25 30

```
Glu Ala Glu Ser Cys Ile Asp Gly Gly Gly Pro Lys Ser Ile Arg Lys
         35                  40                  45

Pro Pro Pro Lys Gly Ser Arg Lys Gly Cys Met Lys Gly Lys Gly Gly
     50                  55                  60

Pro Glu Asn Gly Ile Cys Asp Tyr Arg Gly Val Arg Gln Arg Arg Trp
 65                  70                  75                  80

Gly Lys Trp Val Ala Glu Ile Arg Glu Pro Asp Gly Gly Ala Arg Leu
                 85                  90                  95

Trp Leu Gly Thr Phe Ser Ser Ser Tyr Glu Ala Ala Leu Ala Tyr Asp
            100                 105                 110

Glu Ala Ala Lys Ala Ile Tyr Gly Gln Ser Ala Arg Leu Asn Leu Pro
        115                 120                 125

Glu Ile Thr Asn Arg Ser Ser Ser Thr Ala Ala Thr Ala Thr Val Ser
    130                 135                 140

Gly Ser Val Thr Ala Phe Ser Asp Glu Ser Glu Val Cys Ala Arg Glu
145                 150                 155                 160

Asp Thr Asn Ala Ser Ser Gly Phe Gly Gln Val Lys Leu Glu Asp Cys
                165                 170                 175

Ser Asp Glu Tyr Val Leu Leu Asp Ser Ser Gln Cys Ile Lys Glu Glu
            180                 185                 190

Leu Lys Gly Lys Glu Glu Val Arg Glu Glu His Asn Leu Ala Val Gly
        195                 200                 205

Phe Gly Ile Gly Gln Asp Ser Lys Arg Glu Thr Leu Asp Ala Trp Leu
    210                 215                 220

Met Gly Asn Gly Asn Glu Gln Glu Pro Leu Glu Phe Gly Val Asp Glu
225                 230                 235                 240

Thr Phe Asp Ile Asn Glu Leu Leu Gly Ile Leu Asn Asp Asn Asn Val
                245                 250                 255

Ser Gly Gln Glu Thr Met Gln Tyr Gln Val Asp Arg His Pro Asn Phe
```

260 265 270

Ser Tyr Gln Thr Gln Phe Pro Asn Ser Asn Leu Leu Gly Ser Leu Asn
275 280 285

Pro Met Glu Ile Ala Gln Pro Gly Val Asp Tyr Gly Cys Pro Tyr Val
290 295 300

Gln Pro Ser Asp Met Glu Asn Tyr Gly Ile Asp Leu Asp His Arg Arg
305 310 315 320

Phe Asn Asp Leu Asp Ile Gln Asp Leu Asp Phe Gly Gly Asp Lys Asp
325 330 335

Val His Gly Ser Thr
340