



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0129631
(43) 공개일자 2010년12월09일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)

C12P 21/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0048292

(22) 출원일자 2009년06월01일

심사청구일자 2009년06월01일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이호정

서울특별시 강동구 상일동 고덕주공5단지아파트
511동 503호

오지은

서울특별시 서초구 서초1동 1603-53 우성빌리지
5호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

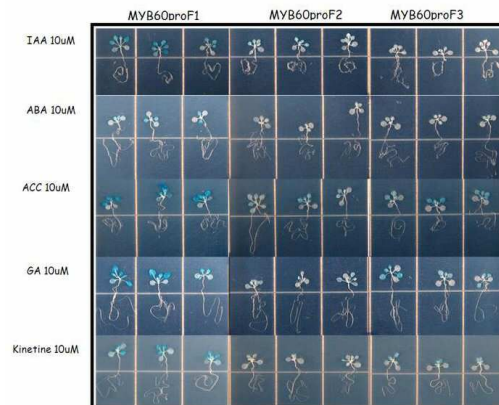
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 애기장대 MYB 6 0 프로모터를 이용한 형질전환 식물체에서 목적 단백질 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 애기장대의 공변세포에 특이적인 AtMYB60 프로모터를 사용하여 형질 전환된 식물체에서 목적 단백질을 생산하는 방법 및 상기 방법에 의해 생산된 목적 단백질에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 목적 단백질을 효율적으로 생산하기 위해 식물 호르몬을 처리한 배지 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

홍석환

광주광역시 북구 용봉동 전남대학교 농업생명과학
대학

이성준

서울특별시 강남구 청담동 삼성청담공원아파트 10
4동 402호

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) AtMYB60 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질 전환하는 단계; 및
- 2) 상기 형질전환 된 식물체에 식물 호르몬을 처리하여 상기 식물체 내에서 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물 호르몬은 에틸렌(ACC), 인돌 아세트산(IAA), 지베렐린(GA), 및 카이네티(kinetin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 목적 단백질 생산 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프로모터의 길이는 1.0 내지 1.2Kb인 것을 특징으로 하는 목적 단백질 생산 방법.

청구항 4

제1항의 생산 방법에 의해 생산된 목적 단백질.

청구항 5

AtMYB60 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질 전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 공변세포에 특이적으로 발현시키는 형질전환식물체의 제조방법.

청구항 6

에틸렌(ACC), 인돌아세트산(IAA, 옥신), 지베렐린(GA), 및 카이네티(kinetin)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 식물호르몬을 포함하는, 애기장대 AtMYB60 프로모터를 사용하여 제1항의 목적 단백질을 생산하기 위한 배지 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 애기장대의 공변세포에 특이적인 AtMYB60 프로모터를 사용하여 형질 전환된 식물체에서 목적 단백질을 생산하는 방법 및 상기 방법에 의해 생산된 목적 단백질에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 목적 단백질을 효율적으로 생산하기 위해 식물 호르몬을 처리한 배지 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002]

식물체는 많은 이차대사산물들을 생합성하며 이들의 조절은 특이적인 전사인자들에 의하여 조절된다. 특히 식물에서 많은 종류의 MYB 단백질들은 염기 특이적인 DNA 결합(binding)을 통해서 특정 유전자들의 발현을 조절하여 대사과정 및 발육 과정의 전사 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 애기장대에는 약 125종이 알려져 있다. 또한, 생명 공학 기술의 발전으로, 원하는 유전자를 식물에 직접 삽입하는 시스템이 도입되었으며, 이와 같은

기술로 인하여 육종에 있어서의 종래 기술의 문제점을 해결할 수 있게 되었다. 상기와 같은 기술로서, 식물의 조직 특이적인 프로모터를 외래 유전자와 결합시키고, 외래 유전자가 상기 프로모터의 조절 하에 발현하도록 하는 기술이 필요하게 되었다.

[0003] 프로모터는 전사조절인자들이 결합하는 모든 DNA 염기서열부위를 말하여, 일반적으로 전사를 조절할 대상이 되는 유전자의 유전정보를 지니고 있는 DNA 염기서열 앞부분에 위치한다. 진핵생물에서는 전사조절인자(transcription factor)라고 하는 단백질들이 프로모터 부분에 결합함으로써 RNA 중합효소를 이곳으로 이끌고 오는 일에 관여한다. 프로모터는 이러한 전사조절인자들이 결합하는 모든 DNA 염기서열부위를 지칭한다고도 할 수 있다. 그에 비해 원핵생물에서의 프로모터는 대개 RNA 중합효소가 결합하는 전사시작지점(Transcription Start Site) 바로 근처의 결합부위로 정의된다. 전사를 조절하는 DNA 염기서열은 프로모터 외에도 인핸서(enhancer)가 존재하나 프로모터가 전사시작지점으로부터 바로 앞쪽으로 수백 염기쌍(base pair) 이내에 위치하는데 비해 인핸서는 프로모터로부터 수천 염기쌍 이상 떨어져 있다는 점에서 구별될 수 있다.

[0004] 유전자 전이(transformation)를 통한 형질전환 식물체를 개발함에 있어 상시적이면서 강한 발현을 하는 프로모터들, 예를 들어 꽃양배추 모자이크 바이러스 35S(CaMV35S) 프로모터(Odell et al., Nature 313: 810-812, 1985)가 널리 사용되고 있다. 그러나 이러한 프로모터에 연결된 특정 유전자의 상시적이고 과다한 발현(over-expression)은 생체대사에 불필요한 대량의 단백질이 주는 유독효과로 인하여 형질전환 식물체가 발아가 되지 않거나 왜소하게 되는 등의 부작용이 나타나는 경우가 많다. 대표적인 예로서, CaMV35S 프로모터를 사용하여 환경스트레스 전사인자 유전자 DREB1A를 과발현시킨 애기장대가 저온 및 저수분 조건에 대하여 저항성을 증진되는 것은 관찰되었으나, 성장이 저해되어 왜소증(dwarfed phenotype)을 보이면서 아미노산 프롤린 및 수용성 당류의 생산이 함께 증가하는 것이 확인되었다(Lie et al., Plant Cell 10: 1391-1406, 1998; Gilmour et al., Plant Physiol. 124: 1854-1865, 2000). 이러한 부작용은 CaMV35S 프로모터 대신 환경스트레스 관련 유전자인 rd29A의 유도성 프로모터를 사용함으로써 최소화할 수 있다(Kasuga et al., Nat. Biotechnol. 17: 287-291, 1999).

[0005]

[0006] 그러므로, 식물체 조직에서 모든 시간대에 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터 대신 특정 조건 또는 특정 시기에 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 유도성 프로모터를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 학술적으로는, 미생물이나 동물에서 분리된 프로모터를 식물에 도입하고 화학물질을 유도체로 사용하여 목적 단백질의 생합성을 촉발하는 유도성 프로모터 시스템이 많이 개발되었다. 지금까지 화학물질에 의한 발현 유도 시스템으로서 식물에 적용된 예로서, 스테로이드 텍사메타손(dexamethasone), 항생제 테트라사이클린(tetracycline), 구리이온, IPTG 등 화학물질을 유도물질로 처리해 주는 방법이 소개된 바 있다(Gatz et al., Plant J. 2: 397-404, 1992; Weimann et al., Plant J. 5: 559-569, 1994; Aoyama T. and Chua N-H, Plant J. 11: 605-612, 1997). 그러나 이들 시스템에 사용하는 유도물질 화합물들의 가격이 극히 고가이고 그 화합물질 자체가 주는 유독한 효과를 발생하기도 하며 모든 식물에 적용되지 못하는 등의 문제점이 있다.

[0007] 한편, 산업(농업)에 응용하기 위하여, 목적유전자를 식물유래 프로모터에 연결하고 식물 호르몬을 유도체로 사용하는 시스템에 대한 연구가 진행되었다. 살리신산 메칠에스터(MeSA)를 유도체로 사용하는 PR-1a 프로모터(Gorlach et al., Plant Cell 8: 629-643, 1996)와 제초제의 유독 효과로부터 식물의 저항성을 증진시키는 사페너(Safener)로 알려진 농약 벤젠설폰마이드(benzensulfonamide)를 유도체로 사용하는 In2-2 프로모터가 대표적인 예이다(De Veylder et al., Plant Cell Physiol. 38: 568-577, 1997). 또 다른 경우는 상처에 의해 유도되는 단백질 분해효소 저해물질(protease inhibitor) 유전자 Pin2의 프로모터를 이용한 형질전환 담배를 예로 들 수 있다. 잎을 수확하고 이를 종이 절단기로 잘게 자른 후 2 내지 6시간 방치하면, 상처를 입은 담배잎에서 목적하는 유전자의 발현이 유도되어 목적인 재조합 단백질이 생합성 되는데, 이로부터 단백질을 추출, 정제한 사례가 보고되고 있다.

[0008] 또한, 식물이 저수분(가뭄), 고염(염해), 저온(냉해), 등의 환경스트레스에 대하여 자체적 저항성을 보이게 되는 메카니즘은 식물분자생물학의 큰 분야로서 매우 많은 연구가 진행되어 왔다(Xiong et al., Plant Cell S165-S183, 2002). 이 저항성 반응은 잎에 분포하는 두 개의 반달형 공변세포(guard cells)가 이루는 기공(stomata)들의 역할이 결정적인 것으로 알려져 있다. 기공이 닫히면 식물체 내의 수분이 증발하는 증산작용

(transpiration)을 억제하여 환경스트레스를 받을 때 체내 수분을 유지할 수 있도록 한다(Roelfsema and Hedrich, New Phytologist 167: 665-691, 2005).

[0009] 공변세포가 환경스트레스의 신호를 받아들이고 앱시스 산(abscisic acid, ABA)을 신호전달 호르몬(signal transducer)으로 사용하여 기공이 열림과 닫힘(opening-closing)의 유동을 하도록 하는 메카니즘과, 이에 관여하는 많은 유전자들이 다수 밝혀져 있다(Fan et al., Curr. Opin. Plant Biol. 7: 537-546, 2004). 뿐만 아니라, 상기와 같이 학술적 연구를 통하여 밝혀진 세포 신호전달 과정 및 유전자 발현 조절 메카니즘을 애기장대 프로모터의 발현을 이용하여 인위적으로 조절하여 가뭄 등 환경스트레스에 대하여 저항성을 갖는 식물체 및 목적 단백질을 생산하는 방법을 개발하고자 하는 연구가 오래 전부터 진행되어 왔다(Valliyodan and Nguyen, Curr. Opin. Plant Biol. 9: 189-195, 2006). 그러나, 상기 프로모터의 활성을 증가시키기 위한 배양 조건으로 식물 호르몬의 처리에 관한 연구는 미비한 실정이다.

[0010] 이에 본 발명자는 애기장대의 공변세포에 AtMYB60의 발현이 활발하다는 사실에 착안하여 상기 프로모터의 활성으로 인한 목적 단백질의 생산 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 상기 AtMYB60 프로모터의 발현을 유도할 수 있는 식물 호르몬을 이용한 배양조건을 확립함으로써 목적 단백질을 효율적으로 생산할 수 있는 방법을 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0011] 본 발명의 하나의 목적은, AtMYB60 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질 전환하는 단계, 및 상기 형질전환된 식물체에 식물 호르몬을 처리하여 상기 식물체 내에서 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은, 상기 생산 방법에 의해 생산된 목적 단백질을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은, AtMYB60 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질 전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 공변세포에 특이적으로 발현시키는 형질전환식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은, AtMYB60 프로모터를 사용하여 본 발명의 목적 단백질을 생산하기 위한 배지 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0015] 하나의 양태로서 본 발명은, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 프로모터인 AtMYB60 프로모터를 이용한 목적 단백질을 생산하는 방법에 관한 것으로서, 바람직하게 AtMYB60 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질 전환하는 단계, 및 상기 형질전환된 식물체에 식물 호르몬을 처리하여 상기 식물체 내에서 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법에 관한 것이다.

[0016] 본 발명에서의 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. 애기장대의 중요한 특징으로는 다음과 같다.

[0017] 우선, 게놈 크기가 작으며(120-130MB), 다섯개 염색체 모두의 유전학적, 물리적 지도에 대한 많은 정보가 있다(MapViewer). 또한, 생활사가 짧아 파종에서부터 약 6주면 종자를 얻을 수 있으며, 제한된 공간에서 많은 식물을 비교적 쉽게 키울 수 있다. 뿐만 아니라, 아그로박테리움을 이용한 효율적인 형질전환이 가능하며 (Stock Centers), 전 세계적인 연구 네트워크가 형성되어 있기 때문에 애기장대는 개화식물의 세포, 분자생물학적 연구를

위한 모델식물로 널리 이용되고 있다.

[0018] 본 발명에서의 용어, '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 애기장대의 공변세포에서 특이적으로 발현하는 AtMYB60 프로모터이다.

[0019] AtMYB60 프로모터는 애기장대의 전사인자 AtMYB60 에 대한 프로모터로서, AtMYB60는 앱시스산 또는 저수분 스트레스에서 급격히 하향조절(downregulation) 되는 것으로 알려져 있다. AtMYB60 는 뿌리를 제외한 대부분의 식물 기관에서 발현하는 것으로 알려져 있었는데, 본원 발명자들은 AtMYB60이 공변세포에 특이적으로 발현하고, 잎과 줄기에서도 많이 발현하며, 뿌리에서도 일부 발현하는 것으로 관찰하였다 (도 4 및 도 5). 또한, 식물호르몬의 처리에 따라 AtMYB60 프로모터의 발현효율을 조절할 수 있다는 것은 본원 발명자들에 의해 처음으로 규명된 것이다 (도 3).

[0020] 프로모터는 길이에 따라 그 효율이 달라질 수 있는바, AtMYB60 프로모터의 길이는 1.0 내지 1.2 Kb 인 것이 바람직하다. 바람직한 본 발명의 일 양태로서, 상기 애기장대 AtMYB60 프로모터는 세 종류로서, 각각의 길이가 462bp (60proF3, 서열번호 1), 859bp (60proF2, 서열번호 2), 및 1,198bp (60proF1, 서열번호 3)인 것을 사용하였다. 보다 바람직하게는 길이가 1,198bp (60proF1)인 것이다. 또한, AtMYB60 프로모터의 서열, 보다 바람직하게는 상기 서열번호 1, 2 및 3 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 변이체는 염기 서열은 변화되지만, AtMYB60 프로모터의 서열의 염기 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, AtMYB44 프로모터는 AtMYB60 프로모터의 서열의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 각각의 길이가 다른 세 종류의 애기장대 AtMYB60 프로모터를 사용하여 각각의 발현 여부를 살펴 본 결과, 가장 길이가 긴 60proF1이 가장 높은 발현을 나타냄을 확인하였다(도 1 및 2).

[0022] 본 발명에서의 용어, '목적 단백질'이란 본 발명의 프로모터에 의해 식물체에 특이적으로 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 천연적으로 존재하지 않는 단백질을 말하며, 상기 내인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연적으로 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.

[0023] 본 발명에서의 용어, '발현 벡터'란 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 암호화하는 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 식물체의 지상부 발현 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 암호화하는 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. 상기 용어, "작동 가능하게 연결(operably linked)"된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 또한, "발현 조절 서열(expression control sequence)"이란, 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 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.

[0024] 상기 본 발명에 따른 발현 벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 AtMYB60 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream)쪽으로 목적 단백질을 암호화하는 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 바이너리벡터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라

면 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 암호화하는 염기서열을 숙주 세포내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다.

[0025] 그러므로 본 발명의 프로모터를 이용한다면 식물체의 지상부 부위, 예를 들면 잎 또는 줄기 등을 섭취하는 작물의 경우, 유용한 목적 단백질을 식물체의 지상부에서 발현시킴으로써 잎 또는 줄기와 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. 바람직하게 본 발명의 일 실시예에서는 청색발색 유전자인 Gus가 연결된 형태의 리포터 시스템이 내재되어 있는 pBI121 벡터에 본 발명의 애기장대 AtMAB60 프로모터를 Gus 유전자의 상류부분에 작동가능하게 연결한 재조합 발현 벡터를 제조하였다(실시예 2 참조).

[0026] 또한, 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 암호화하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현 벡터는 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 숙주 세포내로 도입할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터를 숙주 세포내로 도입하는 방법으로는, 제한 없이 당해 공지된 방법이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 염화칼슘(CaCl_2) 및 열 쇼크(heat shock) 방법, 입자 총 충격법(particle gunbombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethylenglycol)에 의한 침전법 등과 같은 방법들이 있다.

[0027] 본 발명의 바람직한 일 양태로서, 상기와 같은 방법으로 발현 벡터가 도입된 식물체 내에 목적 단백질을 생산하기 위한 조건으로 식물 호르몬이 AtMYB60 프로모터에 미치는 영향을 확인하기 위해 각각의 식물 호르몬을 처리하여 프로모터의 발현 양상을 확인하였다.

[0028] 본 발명에서의 용어, '식물 호르몬'이란, 식물의 특정부위에서 만들어지고 식물체 내의 다른 부분으로 이동하여 적은 양으로 생리적 작용을 일으키는 유기화합물을 말한다. 상기 식물 호르몬의 예로는 생장조절 호르몬(IAA, 인돌아세트산, 옥신), 지베렐린(Gibberellin, GA), 에틸렌(ethylene, ACC), 및 카이네틴(kinetin) 등이 포함될 수 있다.

[0029] 본 발명에서, '에틸렌(ethylene, ACC)'이란, 기체로 된 식물 호르몬으로 식물의 성숙을 촉진하는 호르몬이다. 에틸렌은 가스나 석유가 연소할 때 생기는 에틸렌 가스와 같은 물질로 외부에서 에틸렌을 뿌려줘도 식물의 성숙을 촉진하기 때문에 오래전부터 상업적으로 이용되어 왔다. 본 발명에서, '인돌아세트 산(indole acetic acid, IAA)'이란, 식물에 널리 포함되어 있는 천연 옥신으로, 특히 뿌리나 눈의 끝 부분에 작용하여 세포를 크게 하거나 세포 분열을 왕성하게 하여 식물의 성장을 촉진시키는 식물 생장 호르몬의 일종을 말하고, '카이네틴(kinetin)'은, 식물의 세포분열을 촉진하고 눈의 형성 유도, 잎의 생장촉진과 노화지연, 광발아종자의 암흑 속에서의 발아촉진 등에 효과가 있는 식물 호르몬의 일종을 말한다. 끝으로 '지베렐린 산(gibberellic acid, GA)'은 줄기신장 촉진, 세포분열과 신장휴면 중에 있는 종자의 휴면타파를 통한 발아 유도 등에 효과가 있는 식물 호르몬의 일종을 말한다.

[0030] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 식물 호르몬, 다시 말해 생장조절 호르몬(IAA, 인돌아세트산, 옥신), 앱시스 산(abscisic acid, ABA), 지베렐린(Gibberellin, GA), 에틸렌(ethylene, ACC), 및 카이네틴(kinetin)을 각각 1.2%-Agar 배지에 파종하여 4일후, 10M 씩 배지에 옮겨 3일 동안 더 키운 후 GUS 염색을 진행하였다. 그 결과, 전체적으로 ABA 를 제외한 식물호르몬에서 GUS 가 강하게 발현하였으며, MYB60proF1 개체들이 F3개체들보다 AtMYB60 프로모터의 활성을 촉진하였고, 반면 ABA 에서는 MYB60proF1에서도 매우 흐리게 염색된 것으로 보아 AtMYB60 프로모터의 활성 저해를 확인하였다(도 3).

[0031] 또 하나의 양태로서, 본 발명의 상기 생산 방법에 의해 생산된 목적 단백질에 관한 것이다.

[0032] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 AtMYB60 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질 전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 공변세포에 특이적으로 발현시키는 형질 전환식물체의 제조방법에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에서 상기 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물일 수 있으며, 상기 쌍자엽 식물로는 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 양파일 수 있다.

[0034] 또 하나의 양태로서, 애기장대 AtMYB60 프로모터를 사용하여 목적 단백질을 생산하기 위한 배지 조성물에 관한 것으로서, 바람직하게 본 발명의 배지 조성물에는 상기 기재한 바와 같이 생장조절 호르몬(IAA, 인돌아세트산, 옥신), 지베렐린(Gibberellin, GA), 에틸렌(ethylene, ACC), 및 카이네틴(kinetin) 등이 포함될 수 있다.

[0035] 바람직한 본 발명의 실시예에 따르면, 본 발명의 배지 조성물에 처리될 식물 호르몬은 하나 또는 그 이상이 처리될 수 있다. 또한, 상기 배지 조성물에 식물호르몬을 각각 10M씩 처리한 결과, 전체적으로 MYB60proF1 개체들이 다른 프로모터보다 진하게 염색되었고, 특히, IAA에서는 MYB60proF2 개체들이 F3개체들보다 진하게 염색된 반면, ABA 에서는 MYB60proF1에서도 매우 흐리게 염색된 것을 확인하였다. 따라서, ABA를 제외한, 다른 식물 호르몬의 처리시 MYB60proF1에 의한 발현이 다른 프로모터보다 더 높은 것을 확인하였다(도 3).

효 과

[0036] 본 발명은 애기장대 AtMYB60 프로모터가 포함된 발현 벡터를 식물체에 삽입하여 효율적으로 목적 단백질을 생산하는 방법으로서 식물 호르몬을 처리하는 조건을 확립하여 효율적인 배양 조건을 확립하였으며, 상기 방법에 의한 경우 목적 단백질을 효율적으로 대량생산할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0038] 실시예 1. *Arabidopsis* 식물의 생육 및 스트레스 처리 조건

[0039] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 생태형 중에서 col-0를 사용하여 실험을 진행하였다. 살균된 종자는 3일간 4 °C에 처리하여 균일한 종자 발아를 유도하였고 2% 수크로스(sucrose)가 첨가된 MS (Murashige and Skoog salt base) - 아가 배지에 파종하여 23 ± 1°C, 16 시간 광주기와 70%의 습도조건에서 생육하였다. 또는 같은 조건에서 흙에 심어 4주간 키운 후 실험을 진행하였다.

[0040] 실시예 2. AtMYB60 프로모터의 분자적 클로닝

[0041] TAIR (The Aarabidopsis Information Resources)의 데이터베이스를 이용하여 AtMYB60의 프로모터 부분을 과발현시키기 위한 구조물(construct)을 디자인하였다. 3종류의 구조물(construct)은 각각 462bp (60proF3), 859bp (60proF2), 및 1,198bp (60proF1)의 길이로 제작하여 pBI121 벡터에 삽입하였다. 클로닝을 위하여 사용된 프라이머 세트는 다음과 같다. 60proF3의 F: 5-CCCAAGCTTGGGGTCTCTTACGTTCCCTTC-3(서열번호 4), 60proF2의 F: 5-CCCAAGCTTGGGCACATCCTTCACGTAGATGAC-3(서열번호 5), 60proF1의 F: 5-CCCAAGCTTGGGGCTTGTGACTCTTCTCCA-3(서열번호 6), 그리고 각 세트의 R: 5- CGGGATCCCCTCTCTGAGTCTTATGCTCTC-3(서열번호 7). 클로닝 된 개체들은 50 µg/ml 카나마이신(kanamycin)이 첨가된 배지에서 선별하여 T2 개체로 실험을 진행하였다.

[0042] 실시예 3. AtMYB60 프로모터 길이에 따른 목적 단백질의 발현 양상

[0043] 실시예 2 에서 제조한 3종류의 길이가 다른 프로모터를 포함하는 각 벡터의 프로모터 뒤에 GUS 유전자를 삽입하여, 흙에서 4주간 키운 애기장대 col-0 에 형질전환 하였다. 형질전환된 식물을 GUS 용액 (0.1M NaPO₄ pH7, 10mM EDTA pH7, 0.5mM potassium ferricyanide, 0.5mM potassium ferrocyanide, 1mM X-glucuronide, 0.1% Triton X-100)에 담그고 37°C에서 하룻 밤동안 배양하였다. 식물을 용액에서 꺼내어 70% EtOH, 70°C에서 세척하여 클로로필(chlorophyll)을 제거하였다. 식물의 초록색이 모두 빠져나갈 때까지 반복하여 GUS 염색만 남은 식물을 2%-아가 배지에 퍼서 관찰하였다. 그 결과, 가장 긴 F1 프로모터를 GUS유전자에 융합시킨 개체에서

가장 진한 염색이 되었고, 중간 길이의 F2 프로모터를 도입한 개체에서 가장 흐리게 염색이 되었음을 확인할 수 있었다(도 1).

[0044] 다음으로, 어린 묘목(seedling) 상태에서 AtMYB60 프로모터를 사용하여 GUS 염색 정도를 관찰하였다. 상기와 같이 3종류의 길이가 다른 프로모터 및 GUS 유전자를 포함하는 각 벡터를 1.2% 아가 배지에 파종하여 4일간 생육한 애기장대 col-0 에 형질전환하여 3일간 더 키운 후 GUS 염색을 하여 관찰하였다. 그 결과, 도 1과 유사하게, 가장 긴 F1 프로모터를 GUS 유전자에 융합시킨 개체에서 가장 진한 염색이 되었고, 중간 길이의 F2 프로모터를 도입한 개체에서 가장 흐리게 염색이 되었음을 확인할 수 있었다(도 2).

[0045] 실시예 4. 식물호르몬 처리에 따른 목적 단백질 발현양상

[0046] 실시예 2에서 제조한 3종류의 길이가 다른 프로모터를 포함하는 각 벡터의 프로모터 뒤에 GUS 유전자를 삽입하였고, 이를 1.2%-아가배지에 파종하여 4일간 생육한 애기장대 col-0 에 형질전환하였다. 형질전환된 식물을 10M IAA, 10M ABA, 10M ACC, 10M GA, 또는 10M 카이네틴(Kinetine) 배지에 옮겨서 3일 동안 더 키운 다음 GUS 염색을 진행하였다. 그 결과, 전체적으로 ABA 를 제외하고는 GUS 가 진하게 염색되어 비슷한 양상을 보였지만, IAA 에서는 MYB60proF2 개체들이 F3개체들보다 진하게 염색되었으며 ABA 에서는 MYB60proF1에서도 매우 흐리게 염색된 것을 관찰할 수 있었다.

[0047] 실시예 5. 현미경 관찰

[0048] 애기장대를 GUS 염색한 후 슬라이드 글라스 위에 표본을 만들어 Carl-Zeiss사의 역상 현미경(Inverted Microscope) (모델명: Axio Observer D1)을 사용하여 200x 혹은 400x로 관찰하였다. 그 결과, YB60proF1, F2, F3 모두 같은 부분에서 관찰되었으며 MYB60proF1개체에서 가장 진하게 염색되었음을 확인할 수 있었다. 뿐만 아니라, MYB60pro::GUS는 특히 기공에서 가장 뚜렷하게 염색되어 있었고 잎과 줄기에서 가장 많이 관찰되었다. 그러나, 잎의 정맥 부분이나 뿌리에서는 흐릿하게 염색된 것을 관찰할 수 있었다(도 4 및 5).

산업이용 가능성

[0049] 본 발명에 따른 애기장대 AtMYB60 프로모터의 활성화에 도움을 주는 식물 호르몬을 처리한 배지 조성물 및 상기 조건을 이용한 목적 단백질을 생산하는 방법을 통하여 목적 단백질을 보다 효과적으로 용이하게 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 각 길이가 다른 세 종류의 프로모터인 MYB60prF1, F2, 그리고 F3 에 대한 식물의 GUS 염색을 나타낸 것이다. 각 길이가 다른 3종류의 프로모터 부분을 GUS 유전자 앞에 삽입하여 애기장대 col-0 에 형질 전환을 하였다. 흙에서 4주간 키운 T2 개체들을 GUS염색을 하고 2%-Agar 배지에 펼쳐 염색된 정도를 관찰하였다. 가장 긴 F1 프로모터를 GUS유전자에 융합시킨 개체에서 가장 진한 염색이 되었고, 중간 길이의 프로모터를 도입한 개체에서 가장 흐리게 염색이 되었음을 관찰할 수 있었다.

[0051] 도 2는 어린 묘목(seedling) 상태에서의 GUS 염색을 나타낸 것이다. 도 1과 같이 3종류의 형질전환체를 MS 플레이트에서 파종하여 발아한지 7일째 되는 날 GUS염색을 하여 관찰하였다. MYB60proF2가 가장 흐리게 염색되었다.

[0052] 도 3은 호르몬 처리한 개체들의 GUS 염색을 나타낸 것이다. 1.2%-Agar 배지에 파종하여 4일후 10M IAA, 10M ABA, 10M ACC, 10M GA, 그리고 10M 카이네틴(Kinetine) 배지에 옮겨서 3일 동안 더 키운 후 GUS 염색을 진행하였다.

[0053] 도 4는 MYB60pro개체들의 GUS 염색 후 현미경 관찰한 사진을 나타낸 것이다. MYB60proF1, F2, F3 모두 같은 부분에서 관찰하였으며 위의 사진은 가장 진하게 염색된 MYB60proF1개체를 현미경으로 관찰한 사진이다. MYB60pro::GUS는 특히 기공에서 가장 뚜렷하게 염색되어 있었고 따라서 잎과 줄기에서 가장 많이 관찰되었다.

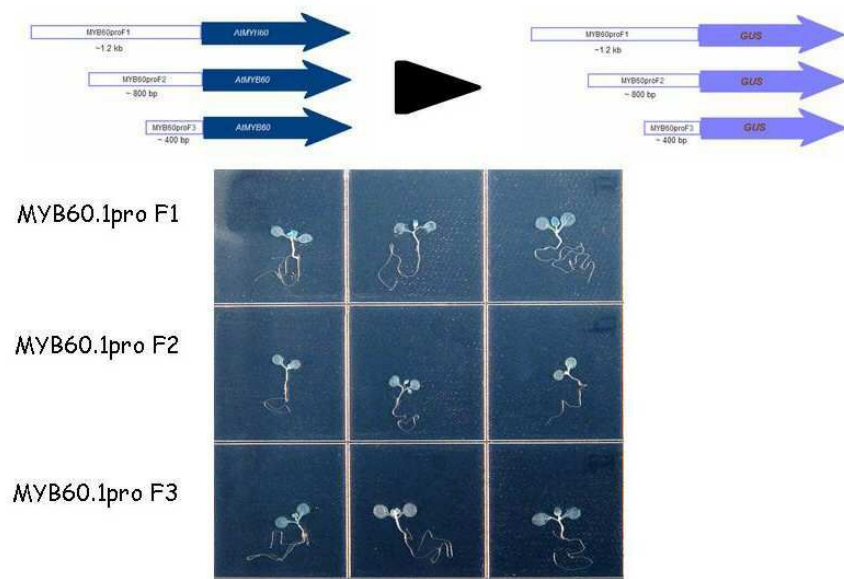
[0054] 도 5는 MYB60pro개체들의 GUS 염색 후 현미경 관찰한 사진을 나타낸 것이다. 잎의 정맥 부분이나 뿌리에서는 흐릿하게 염색된 것을 관찰할 수 있었다.

도면

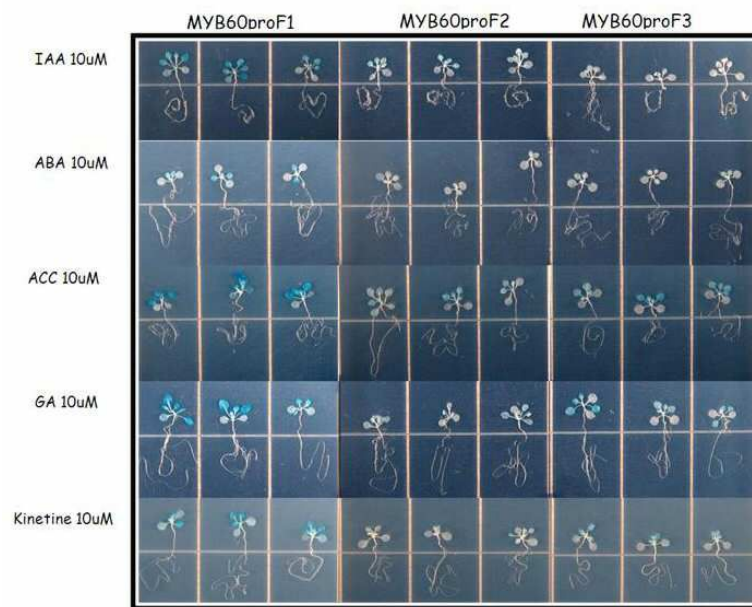
도면1



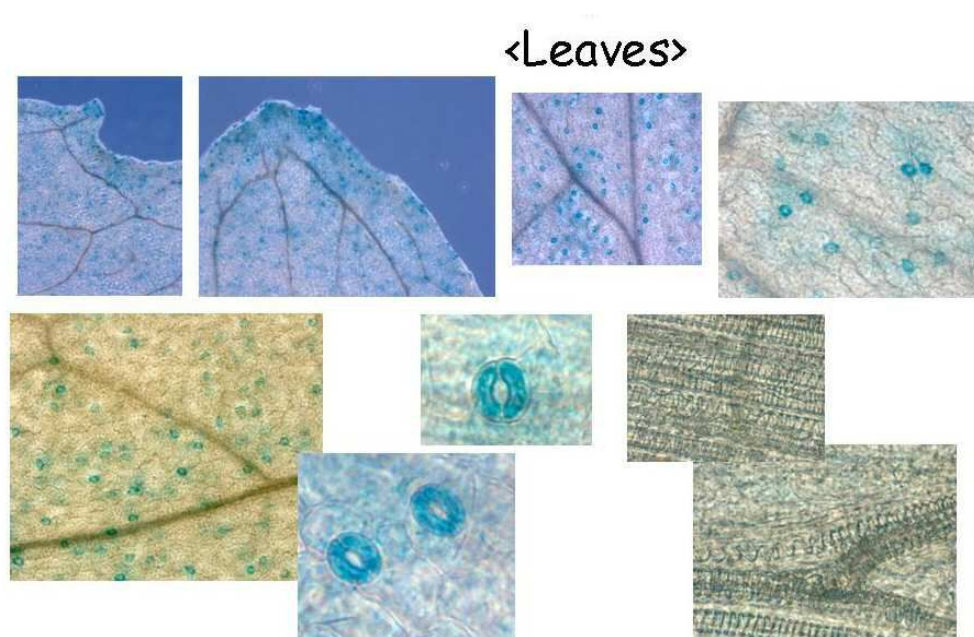
도면2



도면3

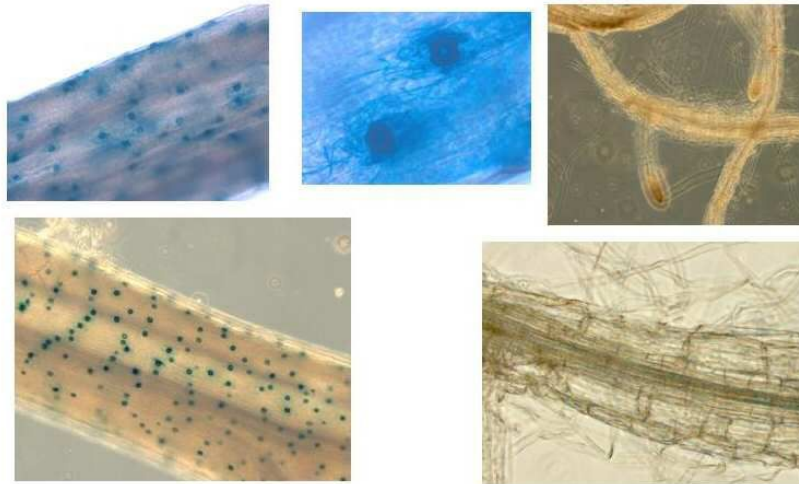


도면4



도면5

<Stems & Roots>



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
<120> METHOD FOR PRODUCING TARGETING PROTEIN FROM TRANSFORMATION PLANT
USING ARABIDOPSIS THALIANA MYB60 PROMOTER

<130> PA090110KR

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 462

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> promoter

<222> (1)..(462)

<223> ARABIDOPSIS THALIANA MYB60 PROMOTER F3

<400> 1

gcttgtagct cttcttccat ttatgagttg attatcacta tattataag taattaccaa

60

cgaatgttcc aaattaagca aaatatgtga atcgatacac tatgtattca tctacaatat	120
gtaacgagc tccttttatg gaaatatctc gattgaaaa acatttgatg gatcgttcac	180
taaataaata atccagtaac gttttcttaa gggagatata catattcgtg tggagatcaa	240
catactctcg ttaattgact acgcaaaata gttaatggaa aaggcagagt gactcgtgag	300
cttggcagat ccaaagagg ttgtcaagaa aaagcagatt taaaagttct tcctcttct	360
ttaagtcacc cattaatttc acatatatgt acatacatgt tgcatttaac tcatatacat	420
acatatcttc acatctataa agagagcata agactcagag ag	462
<210> 2	
<211> 859	
<212> DNA	
<213> Arabidopsis thaliana	
<220>	
<221> promoter	
<222> (1)..(859)	
<223> ARABIDOPSIS THALIANA MYB60 PROMOTER F2	
<400> 2	
cacatccttc acgtagatga caaaataaag aaaaacatga atgaaagttg taacttgtaa	60
gcatcaacat ggaaatcata tcacaaagaa cacaatcta actaatgggt cttttcacat	120
attggtataa ttataagttg taagaatatt agttaaacag aggcaacgag agatgcgtga	180
tatatgaaaa gttgaaaaca aaagacatgg atctaaagag tcaagcaaaa tgtaatatct	240
ttttttcttc taaacttgag gatgtccaag ttgcagtga tgattccctt taatcatgga	300
gaaattcaat gaaataattg tgtttcttcc cacactttat ctttatttat tttcttacca	360
caattacaac tattatcaca aaaatgtaag taacatagct tgtgactctt cttccattta	420

tgagttgatt atcactatat ttataagtaa ttaccaacga atgttcctaaa ttaagcaaaa	480
tatttgaatc gatacactat gtattcatct acaatatgtt aacgagctcc ttttatggaa	540
atatttcgat tgaaaaaaca ttgatggat cgttccactaa ataaataatc cagtaacgtt	600
ttcttaaggg agatatacat attcgtgtgg agatcaacat atcttcgtta attgactacg	660
caaaatagtt aatggaaaag gcagagtgc tcgtgagctt ggcagatcca aaagaggttg	720
tcaagaaaa gcagatttaa aagttcttcc ctcttcttta agtcacccat taatttcaca	780
tatatgtaca tacatgttgc atttaactca tatacataca tattctcaca tctataaaga	840
gagcataaga ctgagagag	859

<210> 3
 <211> 1198
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> promoter
 <222> (1)..(1198)
 <223> ARABIDOPSIS THALIANA MYB60 PROMOTER F1

<400> 3 gtctcttctt acgttccctt cttttttttt tcgttttctt ttgtcgtata gaccaggcag	60
gggctagggc ctagtgatgg gtattggccc aatactattg gggtatttgc ctggtttatt	120
atttcgattt taggttaatt caattttaag aatacgtaga ttgttttggt ttagtttggt	180
ttggttgcac taagttcggg ttacataaa tagaatctaa cactactaat tgttatcgt	240
aaaatacaac aacaataaca gatttttcgt ttcaattttc gttaagagg gtagacattt	300
tggtttgggt tggttcattt tttttttccc ttcaaatc acatccttca cgtagatgac	360

aaaataaaga aaaacatgaa tgaaagttgt aacttgtaag catcaacatg gaaatcatat 420
 cacaaagaac acaaatctaa ctaatgggtc ttttcacata ttgtataat tataagttgt 480
 aagaatatta gttaaacaga ggcaacgaga gatgcgtgat atatgaaaag ttgaaaacaa 540
 aagacatgga tciaaagagt caagcaaaat gtaatatctt ttttcttct aaacttgagg 600
 atgtccaagt tgcagtgaat gattcccttt aatcatggag aaattcaatg aaataattgt 660
 gtttcttccc acactttatc tttatttatt ttcttaccac aattacaact attatcacia 720
 aaatgtaagt aacatagctt gtgactcttc ttccatttat gatttgatta tcactatatt 780
 tataagtaat taccaacgaa tgttccaaat taagcaaaat attgtaatcg atacactatg 840
 tattcatcta caatatgtta acgagctcct tttatggaaa tatttcgatt gaaaaaacat 900
 ttgatggatc gttcactaaa taaataatcc agtaacgttt tcttaaggga gatatacata 960
 ttctgttgga gatcaacata tcttcgttaa ttgactacgc aaaatagtta atggaaaagg 1020
 cagagtgact cgtgagcttg gcagatccaa aagaggttgt caagaaaaag cagatttaaa 1080
 agttcttccc tcttctttaa gtcacccatt aatttcacat atatgtacat acatgttgca 1140
 tttaactcat atacatacat atttcacat ctataaagag agcataagac tcagagag 1198

<210> 4
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer for MYB60proF3

<400> 4
 cccaagcttg gggctctctc ttacgttccc ttc 33

<210> 5
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer for MYB60proF2

<400> 5
 cccaagcttg ggcacatcct tcacgtatg gac 33

<210> 6
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> forward primer for MYB60proF1

<400> 6
 cccaagcttg gggcttgtga ctcttcttcc a 31

<210> 7
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> reverse primer for MYB60proF1, MYB60proF2 or MYB60proF3

<400> 7
 cgggatcccg ctctctgagt cttatgctct c 31