



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0050164
(43) 공개일자 2018년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/8273 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0146998
(22) 출원일자 2016년11월04일
심사청구일자 2016년11월04일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
김성룡
경기도 고양시 일산동구 일산로 205 (마두동, 백
마마을2단지아파트) 212-1003
마누 쿠마르
서울특별시 마포구 신수동 121-742 서강대학교 생
명과학과(리씨홀) 식물분자생물학연구실(1106)
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

전체 청구항 수 : 총 10 항

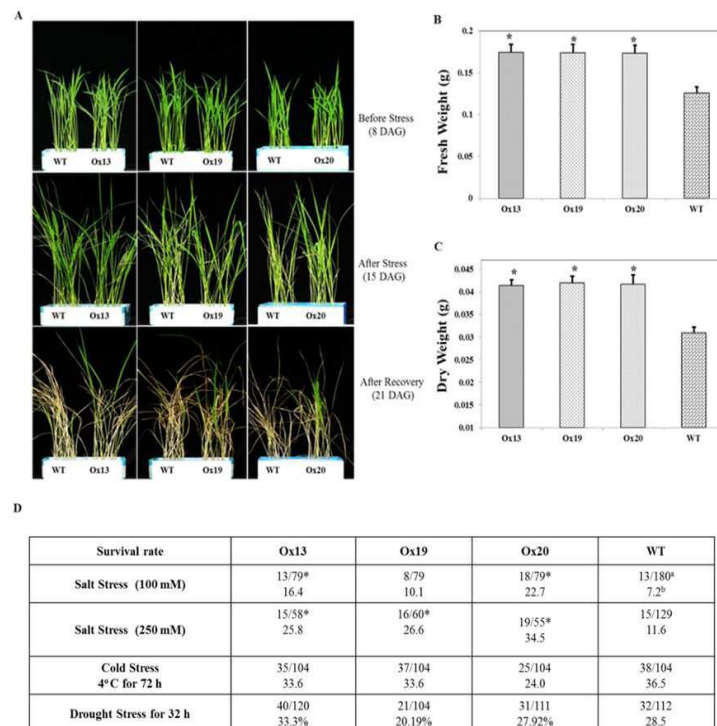
(54) 발명의 명칭 염 스트레스 내성을 증진시키는 비생물 스트레스-유도성 *OsSta2* 유전자, 단백질 및 *OsSta2* 발현이 증진된 내성 형질전환체

(57) 요약

본 발명은 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하며 식물체에서 과발현되는 경우 상기 식물체에 염 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 염 스트레스-유도성 *OsSta2* 단백질 및 상기 *OsSta2* 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체,

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



염 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 염 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체를 제공한다. 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 비생물적 스트레스(예컨대, 염 스트레스)에 대한 식물체의 저항성 증대 및 종자 생산에 관여하며, 이를 이용하여 식물체를 형질전환하면 상술한 스트레스에 대한 식물체의 저항성 및 곡물 수득율을 동시에 증가시킬 수 있으므로 식물체 재배 지역의 한계 극복할 수 있으며, 벼에 적용될 경우 비생물 스트레스에 강하고 고수율의 벼의 생산이 가능하여 생산력을 극대화시킬 수 있다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ011927
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대 바이오그린21-농생명 게놈활용 연구사업단
연구과제명	유전체/전사체/표현체학을 이용한 벼 내재성 유전자 연구
기 여 율	1/1
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2016.04.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하며 식물체에서 과발현되는 경우 상기 식물체에 염 스트레스(salt stress)에 대한 내성을 증진시키는 염 스트레스-유도성 OsSta2 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 염 스트레스-유도성 OsSta2 단백질은 곡실 수득율(grain yield)을 증가시키는 것을 특징으로 하는 염 스트레스-유도성 OsSta2 단백질.

청구항 3

상기 제 1 항 또는 제 2 항의 염 스트레스-유도성 OsSta2 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 1 서열인 것을 특징으로 하는 핵산분자.

청구항 5

상기 제 4 항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 6

상기 제 5 항의 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 형질전환체는 개선된 곡실수득율(grain yield)을 나타내는 것을 특징으로 하는 형질전환체.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 염 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법:

- (a) 식물 세포 또는 식물 조직을 상기 제 5 항의 벡터로 형질전환하는 단계;
- (b) 형질전환된 식물세포 또는 식물조직을 선별하는 단계; 및
- (c) 상기 형질전환된 식물세포 또는 식물조직으로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 9

제 8 항에서 있어서, 상기 식물체는 벼, 보리, 밀 또는 옥수수인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

상기 제 8 항 또는 제 9 항의 제조방법에 의해 제조된 염 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 염 스트레스 내성을 증진시키는 비생물 스트레스-유도성 *O s S t a 2* 유전자, 단백질 및 *O s S t a 2* 발현이 증진된 내성 형질전환체에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 전 세계 인구의 절반 이상은 쌀을 주요 식용작물로 이용하고 있으며, 쌀의 세계적 수요는 인구의 증가에 따라 계속 증가할 것이다. 다양한 환경적 스트레스는 스트레스 내성을 갖는 식물로 이끄는 조절기작 또는 신호전달에 중요한 역할을 하는 유전자 및 스트레스 내성을 주는 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 변화시킴으로써 분자 수준에서 반응하게 한다. 건조 및 염 스트레스는 쌀 생산성을 제한하는 환경인자이다. 염분 영향을 받는 지역의 쌀 생산성은 매년 30-50%씩 효율이 유의적으로 감소하고 있다. 최근 수십년간 쌀을 포함한 많은 식물 중에서 염 스트레스 내성을 이해하고 달성하기 위한 의미있는 진보가 있었다. 염 스트레스 하에서 스트레스로부터 세포를 보호하고 정상 생장을 유지하기 위해, 세포질의 칼슘 방출, 액포 내 이온 불균형, 스트레스 신호전달 및 유전자의 조절과 같은 많은 세포 반응이 일어난다.

[0004] AP2/ERF, bZIP, MYB, NAC, 징크-핑거(zinc-finger), MYC 및 WRKY와 같은 전사인자는 많은 스트레스 반응성 유전자의 발현을 조절할 수 있으므로, 식물의 스트레스 반응 및 스트레스 내성에 중요한 것으로 알려져 있다. 비생물적 스트레스에 대한 내성이 증진된 식물체를 제조하기 위해 전사인자를 형질전환하는 방법이 중요한 접근법임이 입증되었다. 전사인자 중 AP2/ERFs는 식물의 배 발육과 같은 발육 과정, 꽃 발생, 열매 숙성, 잎의 표피세포 식별 및 잎꼭지 발생과 같은 다양한 역할을 한다. 또한 AP2/ERF 단백질은 생물적 스트레스에 대한 식물의 반응과 관련이 있다. 예를 들어, ERF 단백질은 GCC 박스(AGCCGCC)에 결합하여 발병 관련 유전자의 발현을 조절한다. *Medicago truncatula* 유래의 ERN1, 2, 3 및 EFD와 같은 AP2/ERF 단백질은 질소-고정 박테리아와 공생하여 콩과 식물의 뿌리 혹의 발생을 조절시킨다.

[0005] AP2/ERF 단백질은 생물적 스트레스에 대한 반응의 역할 외에 건조, 염 및 저온과 같은 비생물적 스트레스에 대한 반응에 대해서도 중요한 역할을 한다. AP2/ERF 단백질은 보존적 AP2/ERF 도메인을 포함한다. 가장 많이 연구된 AP2/ERF 단백질은 많은 스트레스-관련 단백질의 발현을 활성화시키고 건조, 염 및 저온에 대한 내성을 개선시키는 CBF/DREB이다.

[0006] 벼(*Oryza sativa* ssp. *Japonica*)는 적어도 139 종류의 AP2/ERF 패밀리 유전자를 갖는다. 다양한 환경적 스트레스는 스트레스 내성과 관련된 벼 AP2/ERF 유전자의 발현을 유도한다. 예를 들어, AP2/ERF 단백질인 SNORKEL1 및 SNORKEL2(SK1 및 SK2)는 침수 고전에서 회피 전략으로 지베렐린산의 축적 및 줄기 신장을 빠르게 촉진한다(Hattori et al., 2009). 반면, AP2/ERF 단백질인 SUB1A-1은 싹의 신장을 억제하고 침수-내성에 대한 생존을 증가시키는 휴지전략을 갖는다(Xu et al., 2006). 또한, DREB1A, HARDY(*arabidopsis*), HvCBF4(barley) 및 TERF1(tomato)와 같은 AP2/ERF 유전자의 계속적인 발현은 비생물적 스트레스 내성을 증가시킨다(Oh et al., 2005, 2007; Karaba et al., 2007; Gao et al., 2008). 벼 AP2/ERF 유전자인 AP37의 과발현은 높은 곡물 수득율을 갖는 생장 단계에서 건조 내성을 부여한다(Oh et al., 2009). AP2/ERF 단백질인 TSRF1의 과발현은 벼의 삼투 및 건조 내성을 개선시킨다(Quan et al., 2010). 최근에, 벼의 OsEREB1의 과발현이 생물적 및 비생물적 스트레스에 대한 내성을 증가시키는 것이 보고되었다(Jisha et al., 2015).

[0007] 벼의 역유전 방법(reverse genetic method) 및 정유전 방법(forward genetic method)를 포함하는 기능적 개념은 식물 스트레스 반응 및 내성과 관련된 새로운 유전자를 규명하기 위한 중요한 연구 분야이다. 이러한 유전

자는 벼 및 다른 작물의 내성을 개선시키는 유전공학의 새로운 타겟이 될 수 있을 것이다.

- [0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Hattori, Y. et al. (2009) The ethylene response factors SNORKEL1 and SNORKEL2 allow rice to adapt to deep water. *Nature*. 460, 1026-1030.
- (비특허문헌 0002) Xu, K. et al. (2006) Sub1A is an ethylene-response-factor-like gene that confers submergence tolerance to rice. *Nature*. 442, 705-708.
- (비특허문헌 0003) Oh, S. J. et al. (2005) Arabidopsis CBF3 DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.* 138, 341-351.
- (비특허문헌 0004) Oh, S. J. et al. (2007) Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J.* 5, 646-656.
- (비특허문헌 0005) Karaba, A. et al. (2007) Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. *Proc. Natl Acad. Sci.* 104, 15270-15275.
- (비특허문헌 0006) Gao, S. et al. (2008) Expression of TERF1 in rice regulates expression of stress-responsive genes and enhances tolerance to drought and high-salinity. *Plant Cell Rep.* 27, 1787-1795.
- (비특허문헌 0007) Oh, S. J. et al. (2009) Overexpression of the transcription factor AP37 in rice improves grain yield under drought conditions. *Plant Physiol.* 150, 1368-1379.
- (비특허문헌 0008) Quan, R. et al. (2010) Overexpression of an ERF transcription factor TSRF1 improves rice drought tolerance. *Plant Biotechnol. J.* 8: 476-488.
- (비특허문헌 0009) Jisha, V. et al. (2015) Overexpression of an AP2/ERF type transcription factor OsEREBP1 confers biotic and abiotic stress tolerance in rice. *PLoS one*. 10, 6-e0127831.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명자들은 비생물(abiotic) 스트레스에 대하여 내성을 증진시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 노력한 결과, 벼(*Oryza sativa*)로부터 염 스트레스에 의해 유도되는 *OsSta2* 유전자를 발굴하고 상기 유전자에 의해 형질전환된 식물체가 염 스트레스에 대하여 증진된 내성을 나타낸다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 따라서, 본 발명의 목적은 염 스트레스-유도성 *OsSta2* 단백질을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 염 스트레스-유도성 *OsSta2* 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자를 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 염 스트레스-유도성 *OsSta2* 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공하는 데 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 염 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은 염 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체를 제공하는 데 있다.

[0020] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0022] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하며 식물체에서 과발현되는 경우 상기 식물체에 염 스트레스(salt stress)에 대한 내성을 증진시키는 비생물 스트레스-유도성 OsSta2 단백질을 제공한다.

[0023] 본 발명자들은 비생물(abiotic) 스트레스에 대하여 내성을 증진시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 노력한 결과, 벼(*Oryza sativa*)로부터 염 스트레스에 의해 유도되는 OsSta2 유전자를 발굴하고 상기 유전자에 의해 형질전환된 식물체가 염 스트레스에 대하여 증진된 내성을 나타낸다는 것을 확인하였다.

[0025] 본 발명의 비생물 스트레스-유도성 OsSta2 단백질은 상기한 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내며, 동시에 염 스트레스에 대한 내성 증진을 할 수 있는 범위 내에서의 아미노산 서열을 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 프로그램(예: ClustalX 및 PROSIS)을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.

[0026] 본 명세서에서 용어 “비생물 스트레스”는 특정 환경에서 생물에 대한 미생물 요소의 부정적 영향으로 정의되며, 염(salt) 스트레스, 건조(drought) 스트레스, 저온(cold) 스트레스 및 삼투(osmotic) 스트레스를 포함한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 비생물 스트레스는 염 스트레스이다.

[0028] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 비생물 스트레스-유도성 OsSta2 단백질은 야생형과 비교하여 염 스트레스에 대하여 1.5-5.0, 1.5-4.5 또는 1.5-4.0배의 내성을 나타낸다.

[0029] 본 발명의 또다른 구현예에 따르면, 상기 염 스트레스-유도성 OsSta2 단백질은 야생형과 비교하여 곡실 수득율(grain yield)에 대하여 2-15%, 3-15% 또는 4-13% 증가된 수득율을 나타낸다.

[0031] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 비생물 스트레스-유도성 OsSta2 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자를 제공한다.

[0032] 본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다 (Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, NewYork(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).

[0033] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 1 서열인 것을 특징으로 하는 핵산분자이다. 비생물 스트레스-유도성 OsSta2 단백질을 코딩하는 본 발명의 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 프로그램(예: ClustalX 및 DNASIS)을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.

[0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 비생물 스트레스-유도성 OsSta2 단백질을 코딩하는 뉴클레

오타이드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

- [0036] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 (a) 염분-유도성 OsSta2 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 (b) 상기 뉴클레오타이드에 작동적으로 결합된 (operably linked) 프로모터를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합된”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절 인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.
- [0038] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [0039] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.
- [0040] 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pL λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (pL λ 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.
- [0041] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드[예: pGA 시리즈(Kim et al., 2009), ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등], 파지 (예: λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0042] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0043] 본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 염 스트레스-유도성 OsSta2 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 말토스 결합 단백질(NEB, USA), 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His (hexahistidine; QuiaGen, USA) 등이 있다. 상기 정제를 위한 추가적인 서열 때문에, 숙주에서 발현된 단백질은 친화성 크로마토그래피를 통하여 신속하고, 용이하게 정제된다.
- [0044] 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0045] 본 발명의 유전자는 식물에서 분리되었고, 비생물 스트레스에 대한 식물체의 내성을 증진하는 작용을 할 수 있으므로, 식물에 대하여 가장 바람직한 유용성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 벡터는 (i) 염-유도성 OsSta2 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 식물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 식물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 식물발현용 벡터를 제공한다.
- [0046] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 쉐타아제 (nos) 프로모터, 피그위트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카복실라아제 스몰 서브유닛 (ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토솔 트리오스 포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라비도시스의 아데닌 포스포리보실트 랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터 및 옥토파인 신타아제 프로모터를 포함한다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위는 아그로박테

리움 튜머페이션스의 팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것 (nos 3' end) (Bevan et al., Nucleic Acids Research, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 튜머페이션스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분 및 CaMV 35S 터미네이터를 포함한다.

[0048] 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자[예: GFP(Green Fluorescence Protein)]를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제 (예: 네오마이신, 카메니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자 (예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(npt II), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 (hpt), 등)를 포함한다.

[0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0051] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0052] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 이스트(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic. Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법 (Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

[0054] 숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현되며, 이러한 경우에는 다량의 염 스트레스-유도성 OsSta2 단백질을 얻게 된다.

[0055] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 형질전환체는 개선된 곡실수득율을 나타낸다.

[0057] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 식물 세포 또는 식물조직을 상기 본 발명의 벡터로 형질전환 하는 단계; (b) 형질전환된 식물세포 또는 식물조직을 선별하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 식물세포 또는 식물조직으로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계를 포함하는 염 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0059] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 염 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.

[0060] 본 발명에서 이용되는 익스플랜트는 식물 세포 또는 식물 조직이며, 식물 조직을 이용하는 경우에는 캘러스를 이용하는 것이 바람직하다.

[0061] 본 발명의 방법에 있어서, 식물세포의 형질전환은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있으며, 이는 전기천공(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 입자 밤바드먼트 (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 및 아그로박테리움-중재 형질전환 (미합중국 특허 제5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호)을 포함한다. 이 중에서, 아그로박테리움-중재 형질전환이 가장 바람직하다.

[0062] 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제 (예: 대사억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물 세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페

이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(npt II) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다 (미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

[0064] 본 발명의 방법은 다양한 식물체에 적용되지만, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 벼, 보리, 밀 및 옥수수과 같은 곡류의 식물체 적용되며, 보다 바람직하게는 벼에 적용된다.

발명의 효과

[0066] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0067] (a) 본 발명은 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하며 식물체에서 과발현되는 경우 상기 식물체에 염 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 염 스트레스-유도성 OsSta2 단백질 및 상기 OsSta2 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자, 상기 핵산분자를 포함하는 벡터, 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체, 염 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 염 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0068] (b) 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 비생물적 스트레스(예컨대, 염 스트레스)에 대한 식물체의 저항성 증대 및 종자 생산에 관여하며, 이를 이용하여 식물체를 형질전환 하면 상술한 스트레스에 대한 식물체의 저항성 및 곡물 수득율을 동시에 증가시킬 수 있으므로 식물체 재배 지역의 한계 극복할 수 있으며, 벼에 적용될 경우 비생물 스트레스에 강하고 고수율의 벼의 생산이 가능하여 생산력을 극대화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1a 내지 1c는 OsSta2 태깅 돌연변이주의 염 스트레스 내성을 확인한 결과를 나타낸다. 도 1a는 발아 9일째 묘에 100 mM NaCl 조건으로 7일 동안 염 처리 또는 250 mM NaCl 조건으로 48시간 동안 염 처리 후 6일 회복기를 거친 묘의 염 내성 반응의 표현형을 나타낸다. 도 1b는 *OsSta2* 및 *LOC_Os02g43830*의 사이에 삽입된 T-DNA의 모식도 및 RT-PCR 결과를 나타낸다. 도 1c는 태깅 돌연변이주 및 야생형의 *OsSta2* 발현에 대한 qRT-PCR 결과를 나타낸다.

도 2a 및 2e는 스트레스 조건에서의 발생 조직 내 *OsSta2*의 발현 패턴을 나타낸다. 도 2a는 발생 단계에 걸친 *OsSta2* 발현의 qRT-PCR 결과를 나타낸다. Ca=캘러스(callus), Ss= 발아 7일째 싹(7-DAG shoot), Sr=7일된 뿌리(7 days old root), Lf=성숙잎(mature leaf), Ls=지엽의 잎집(flag leaf sheaths), Ih=수분 3일째의 성숙종자(mature seeds at 3 days after pollination), *R4c1*은 기준 유전자로 사용하였다. 도 2b 내지 2e는 각각 염, 건조, ABA 및 저온 스트레스가 0, 1, 3, 6 및 24시간 처리된 묘의 *OsSta2* 발현의 qRT-PCR 결과를 나타낸다.

도 3a 내지 3d는 *OsSta2* 과발현(Ox) 형질전환주의 컨스트럭트를 나타낸다. 도 3a는 형질전환에 이용된 *pUbi::OsSta2* 컨스트럭트를 도식화하여 나타낸다. *Pubi*, 메이즈 유비퀴틴 프로모터; *P35S*, CaMV 35S 프로모터; *Tnos* 노팔린 합성효소 유전자의 종결서열; T7, 전사체7의 종결서열; *hph*, 히그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자; RB(right border) 및 LB(left border)는 각각 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 유래 Ti 플라스미드의 오른쪽 경계 및 왼쪽 경계 서열이다. 도 3b는 *OsSta2-Ox* 형질전환주의 qRT-PCR 분석 결과를 나타낸다. 액틴(actin)은 로딩 컨트롤이다. 도 3c는 *OsSta2-Ox* 형질전환주의 발아 8일째의 표현형을 나타낸다. 도 3d는 1/2MS 내 발아 14일째 묘의 표현형을 나타낸다.

도 4a 내지 4d는 *OsSta2-Ox* 형질전환주의 생장 단계에서의 개선된 염 스트레스 내성을 나타낸다. 도 4a는 발아 8일째 묘에 100 mM NaCl을 7일 동안 처리하고 6일의 회복기를 가진 형질전환주 및 야생형의 표현형을 나타낸다. 도 4b는 회복 후 생중량을 나타낸다. 도 4c는 2일동안 건조후의 건조중량을 나타낸다. 도 4d는 *OsSta2-Ox* 형질전환주의 생존비로 판단한 스트레스-내성을 나타낸다. 발아 8일째 묘에 건조(32시간 동안 단수), 염(100 mM NaCl 7일 처리 및 250 mM NaCl 72시간 처리), 저온(4℃ 72시간) 스트레스 처리하고 회복 후 생존비를 측정한 결과이다. a는 '생존 묘의 수/총 묘의 수' b는 총 묘 중 생존 묘의 백분율, *은 형질전환주

및 야생형의 유의한 차이(t -test 및 χ^2 test $P < 0.05$)를 나타낸다.

도 5a 내지 5d는 스트레스 조건 하에서 *OsSta2-0x* 형질전환주의 광합성율을 나타낸다. 도 5a는 동형접합체 T4 *OsSta2-0x* 형질전환주(0x13, 0x19 및 0x20), 야생형 및 T-DNA 돌연변이주를 염(100, 200 및 250mM NaCl) 스트레스 처리한 잎 디스크 분석을 나타낸다. 도 5b 및 5c는 동형접합체 T4 *OsSta2-0x* 형질전환주의 클로로필 평가(mg per g 생중량)를 나타낸다. 도 5d는 고염(500 mM NaCl 48시간), 건조(페트리디시 내 무수(無水) 3시간), 저온(4℃ 48시간) 스트레스 조건에서 동형접합체 T4 *OsSta2-0x* 형질전환주의 클로로필 형광 값(F_v/F_m)의 변화를 나타낸다. *OsSta2-0x* 형질전환체의 동형접합체 T4 3주 및 야생형을 12일 동안 흙에서 배양하였다. 잎 디스크에 다양한 스트레스 처리 후, 펄스 조절 형광계(mini-PAM; Walz)를 이용하여 F_v/F_m 값을 측정하였다.

모든 식물체는 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 지속적인 광원 하에서 스트레스 처리하였다. * 표시값은 *OsSta2-0x* 형질전환주 및 야생형 간의 유의한 차이를 나타낸다(t -test, $P < 0.05$).

도 6a 내지 6k는 정상 조건에서 *OsSta2-0x* 형질전환체의 농업적 특성을 나타낸다. 도 6a는 tiller per hill, 도 6b는 줄기의 길이, 도 6c는 hill 당 filled grain의 수, 도 6d는 원추 꽃차례 당 작은 수상화의 수, 도 6e는 hill 당 작은 수상화의 수, 도 6f는 원추꽃차례의 길이, 도 6g는 1000 낱알무게, 도 6h는 성숙 벼 원추 꽃차례의 형태, 도 6i는 성숙논의 벼 형태, 도 6j는 마이크로소프트 엑셀 소프트웨어를 이용하여 그린 정상 조건에서 *OsSta2-0x* 형질전환주 및 야생형의 농업적 특성의 스카이라인 그래프를 나타낸다. 각 측정점은 도 7a 내지 7h에 리스트된 중간값($n=8$)의 백분율을 나타낸다. 야생형의 중간값을 100%의 기준값으로 세팅하였다. CL은 줄기 길이(Culm length), NFG는 filled grain의 수(number of filled grains), NSH는 hill 당 spikelets의 수(number of spikelets per hill), NSP는 원추꽃차례 당 작은수상화의 수(number of spikelets per panicle), NP는 hill 당 원추꽃차례의 수(number of panicles per hill), NT는 hill 당 싹의 수(number of tillers per hill), 1,000GW는 1000 낱알무게(1,000 grain weight)를 나타낸다. 오차막대는 8회 실험의 표준 에러값을 나타낸다. * 표시값은 *OsSta2-0x* 형질전환주 및 야생형의 유의한 차이를 의미한다(t -test, $P < 0.05$).

도 7a 및 7b는 *OsSta2-0x* 형질전환주의 ABA 민감성에 대한 분석을 나타낸다. *OsSta2-0x* 형질전환체는 초기 묘 성장시 ABA-민감성 표현형을 나타낸다. 발아 5일째의 2종의 *OsSta2-0x*(0x19 및 0x20)를 다른 농도의 ABA가 첨가된 half-strength MS 배지로 옮겼다. 도 7a는 ABA 처리에 의한 *OsSta2-0x*의 성장 억제체를 나타낸다. 이식 7일후 묘의 진이다. 스케일 바는 5 cm를 나타낸다. 도 7b는 *OsSta2-0x* 및 야생형의 상대적 싹의 길이를 나타낸다. 결과는 중간값 $\pm$ 실험당 묘의 수)를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0073] 실시예

[0074] 실험방법

[0075] 식물 재료 및 비생물적 스트레스 조건

[0076] T-DNA 삽입 돌연변이주 및 과발현주 벼(*Oryza sativa* ssp. japonica cv. 동진)의 종자 풀(pool)을 표면-살균하고 젖은 종이수건에서 2일 동안 발아시켰다. 22-30℃ 범위의 온도주기 및 12시간 광주기 조건의 워크-인 생장 챔버 내 화분에서 식물을 배양하였다. 발현 분석을 위한 비생물적 스트레스 처리를 위해, 건조(물 제거), 염(300 mM NaCl), 저온(4℃) 및 ABA(Absciscic acid, 100 μM)의 Yoshida 용액을 0, 1, 3, 6, 12 및 24 시간동안 발아 8일째 묘에 처리하여 수경법으로 배양하였다. T4 종자를 대상으로 비생물적 스트레스 내성에 대한 묘의 생존율을 분석하였다. 발아 8일째의 살균제 처리된 겉껍질이 벗겨진 발아 종자를 100 g 흙이 담긴 박스에서 배양하였다. 30-40시간동안 잎이 시들때까지 살수하지 않는 방법으로 건조 스트레스를 유도하였다. 묘을 100 mM NaCl 및 250 mM NaCl 용액으로 옮기고 각각 7일 및 72시간동안 항온배양 하여 염 스트레스를 유도하였다. 잎이 시들때까지 염 용액을 2회 교체하여 농도를 유지하였다. 묘에 차가운 물 2리터를 붓고, 4℃에서 48-72시간동안 항온배양하여 저온 스트레스를 유도하였다. 스트레스 처리 후 6일 동안 회복기를 거친 뒤 식물체의 생존율을 계산하였다. 식물체의 스트레스 내성을 대표하는 형태 사진을 찍고, 생중량을 측정하였

다. 식물체의 건조중량은 80℃에서 2일 동안 건조 후 측정하였다.

[0077] *OsSta2-Ox* 형질전환체의 T5 세대에 대하여 ABA 민감성 시험을 실시하였다. 표면-살균되고 겉껍질이 벗겨진 종자를 히그로마이신(hygromycin, 50 mg/L)을 포함하는 half-strength MS 배지 상에서 발아시키고 발아 후 부모 형질전환주를 결정하였다. 발아 5일 후, 유사한 형질전환 묘를 0, 5, 10 μM ABA이 첨가된 half-strength MS 배지를 포함하는 6.125 sq. 인치 및 3" 크기의 재배면적의 마젠타 GA-7 식물배양 박스로 옮겼다. 묘는 수직으로 성장하였다. 묘의 성장은 이식 후 7일에 측정하였다.

[0079] 염 스트레스 내성에 대한 활성 태깅주의 스크리닝

[0080] T-DNA 삽입 형질전환주의 염 내성을 스크리닝하기 위해, 발아 8일된 묘에 100 mM NaCl을 7일 동안 또는 250 mM NaCl을 48시간 동안 처리하였다. 처리 후, 묘를 6일 동안 회복시키고, 생존율을 결정하였다. 염 내성주를 분리하고 RT-PCR 및 qRT-PCR을 이용하여 T-DNA 택 인근 유전자의 발현을 확인하였다.

[0082] RT-PCR 및 qRT-PCR을 이용한 유전자 발현 분석

[0083] 총 RNA를 분리하기 위해 RNeasy 미니 플랜트 키트(QIAGEN, 독일)을 사용하였고, RT 컴플리트 키트(BIOFACT, 대한민국)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 cDNA를 합성하였다. Gene Runner 소프트웨어(<http://www.generunner.net/>) 및 NCBI 프라이머 블라스트(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)를 이용하여 PCR 산물의 증폭을 위한 프라이머를 디자인하였다. 프라이머 서열은 표 1과 같다. 프라이머의 최종 농도는 RT-PCR은 10 pM, qRT-PCR은 5 pM이고, 주형으로 cDNA 3 μl(총 RNA 6 ng와 동일)를 이용하였다.

표 1

[0084]

-	서열	분석법	서열목록
<i>OsSta2-F</i>	AGATGCAATTGCGCGAAC	RT-PCR	제5서열
<i>OsSta2-R</i>	CACCGTTGAGGTGTGCGTTG	RT-PCR	제6서열
<i>Pubi-F</i>	TTGATATACTGGATGATGGCATA	gD-PCR	제7서열
<i>Tnos-R</i>	GCGGGACTCTAATCATAAAAACC	gD-PCR	제8서열
<i>RAc1-F</i>	CGCAGTCCAAGAGGGGTATC	RT-PCR	제9서열
<i>RAc1-R</i>	TCCCTCACAATTCCCGCTC	RT-PCR	제10서열
<i>RAc1-qF</i>	GACTCTGGTGATGGTGTGACCCACAC	qRT-PCR	제11서열
<i>RAc1-qR</i>	CGCACTCATGATGGAGTTGTAT	qRT-PCR	제12서열

[0086] PCR은 95℃ 5분 실시 후, 95℃ 30초, 58℃ 30-60초, 72℃ 30-60초로 25-35주기 실시하였다. 증폭된 산물을 0.8% 아가로즈겔에 리졸브(resolve)하였다. 1회 이상 실험을 반복하여 독립적으로 준비된 총 RNA로 RT-PCR 결과를 발리데이션하였다. qRT-PCR 분석을 위해, KAPA SYBER FAST 유니버살 qPCR-kit 및 LightCycler 96(ROCHE LIFE SCIENCE, 독일)을 이용하였다. PCR 주기는 전보온 95℃ 3분 후, 95℃ 3초, 60℃ 20초 및 72℃ 20초로 40 주기로 증폭하고, 72℃ 20초 반응시켰다. 95℃ 5초, 65℃ 1분 및 97℃ 1분의 조건으로 멜팅 커브를 구하였다. 40℃에서 10분 동안 쿨링하였다. 상대발현정도는 내부유전자 *RAc1*으로 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 법을 이용하여 계산하였다.

[0088] *OsSta2* 프로모터의 인 실리코 분석

[0089] ATG 개시 코돈의 2 kb 길이 업스트림의 프로모터서열을 Oryzabase(Kurata and Yamazaki, 2006)으로 분석하고, 프로모터 내 cis-elements를 PLACE 데이터베이스(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)로 검색하였다.

- [0091] *OsSta2* 과발현 주의 제조
- [0092] *OsSta2*-과발현 벡터의 컨스트럭트를 위해, KOME(<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>)로부터 *OsSta2* cDNA를 구매하였다. cDNA를 pGA3426 바이너리 벡터의 *SacI* 및 *BamHI* 부위 및 노팔린(nopaline) 합성효소 터미네이터를 갖는 *메이즈(maize)* 유비퀴틴 1 프로모터 조절 하에 두었다. 일본형 벼품종인 ‘동진’의 캘리 유래 배반을 아르고박테리움(*Agrobacterium*)-매개 공동배양법으로 형질전환하였다. 형질전환체를 추가 생장을 위한 지정된 논으로 옮겼다.
- [0094] 형질전환주의 분리 분석
- [0095] T2-T5 세대 내 *OsSta2* 유전자의 유전을 분석하였다. 히그로마이신에 대한 내성으로 자손을 평가하였다. 일본 벼품종의 독립적 형질전환체의 50개 이상의 T2-T3 종자를 히그로마이신-포함 배지(50 mg/L)로 선별하였다. 30℃에서 5일 동안 배양한 후 생존한 묘의 수를 세고, 생존한 모든 묘를 동형접합체로 판단하였다.
- [0097] 클로로필 형광 측정을 통한 비생물적 스트레스-내성 분석
- [0098] *OsSta2-0x* 형질전환체 및 야생형 대조군 벼의 종자를 발아시키고 워크-인 성장 챔버(12 h 광주기[$150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$] 12 h 암주기 28℃)내 흙 박스에서 12일 동안 생장시켰다. *인비트로* 스트레스 처리하기 전에, 10개 묘의 5번째 초록잎을 가위로 잘랐다. 이를 500 mM NaCl에서 $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 지속적인 광원 하에 48시간동안 28℃로 항온반응시켜 고염 스트레스를 유도하였다. $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 지속적인 광원 하에 28℃에서 3시간동안 공기 건조시켜 건조 스트레스를 유도하였다. 묘 잎을 $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 지속적인 광원 하에 4℃ 탈이온수에 48시간동안 담궈 저온 스트레스를 유도하였다. MINI-PAM-II Photosynthesis Yield Analyzer(WALZ, 독일)을 이용하여 *Fv/Fm* 값을 측정하였다.
- [0100] 잎 디스크의 염 내성 분석
- [0101] 잎 디스크 분석을 위해, 형질전환체(성숙), 야생형의 건강하고 완전하게 펼쳐진 잎을 탈이온수로 세척하고 1 cm 직경 잎 디스크로 자른 후, 30 ml NaCl 용액(100, 200 및 250 mM, 24h)에 띄웠다. 표현형 변화를 관찰하고 클로로필 함량을 측정하여 잎 디스크에 대한 염 스트레스 처리의 영향을 정량화하였다.
- [0103] 농업적 특성 조사
- [0104] 동진벼(*Oriza sativa* ssp. japonica cv. Dongjin), 야생형(*OsSta2-0x* 주의 비형질전환체) 및 독립적 동형접합체인 *OsSta2-0x* 주의 종자를 표면-살균하고 30℃ 암조건에서 발아시켰다. 발아 2일 후, 성장 챔버(28℃, 60% RH, 12-h 광주기/12-h 암주기, 광원 $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 내 흙 박스에서 묘를 생장시켰다. 1주일된 묘를 온실로 옮겼다. 4주 후에 이 식물체를 벼 LMO 필드에 식이하였고, 2012, 2013, 2014 및 2015년의 매년 10월 말에 수확하였다. 시험 묘장은 대한민국 군위군 경북국립대 및 수원 경희대학교이다. *OsSta2-0x* T4 및 T5 동형접합체, 및 야생형 벼의 농업적 특성을 분석하기 위해, 3종 독립주의 8 개체에 대하여 식물 당 결논의 수, 식물당 원추 꽃차례의 수, spikelets panicle의 수, 원추 꽃차례 당 filled grain의 수, 원추꽃차례의 길이, 줄기의 길이, 1000 곡물중량을 분석하였다. 아가(agar) 배지에서 배양하기 위해, 묘를 30℃에서 5일 동안 암조건으로 배양하고, 지속적인 광조건으로 옮겼다.
- [0106] 통계적 분석
- [0107] 3회 반복실험의 결과로부터 중간값±표준편차를 계산하였다. 처리 간의 차이는 스튜던트 t-테스트 및 x2 테스트($P<0.05$)로 결정하였다.

[0109] 실험결과

[0110] 염 스트레스 내성 활성 태깅 돌연변이주의 분리

[0111] PFG T-DNA 태깅 돌연변이주의 T2 세대의 혼합물을 스크리닝하여, 100 mM 및 250 mM NaCl에서 모두 염 스트레스 내성을 갖는 PFG_3A-05272.R을 얻었다(도 1a 및 표 2). *LOC_Os02g43820* 및 *LOC_Os02g43830* 사이에 태깅된 T-DNA를 밝히기 위해 인벌스(inverse) PCR을 이용하여 PFG_3A-05272.R의 분자 분석하였다. 상기 두 유전자 중, RT-PCR 또는 qRT-PCR로 확인한 결과 *LOC_Os02g43820*만이 야생형과 비교하여 8배 고발현이 유도되었다(도 1c). 상기 유전자를 *Oryza sativa* Salt tolerance activation 2-Dominant(*OsSta2*, *LOC_Os02g43820*)로 명명하였다.

표 2

[0112]

염 스트레스	야생형	<i>OsSta2-D</i>
100 mM NaCl	9/48 ^a (18.8) ^b	16/43 [*] (37.2)
250 mM NaCl	0/48 (0.0)	5/48 [*] (10.4)

[0114] 상기 표 2는 생존비로 판단한 야생형 및 *OsSta2* 태깅 돌연변이주의 염-내성을 나타낸다. 발아 8일째 묘에 염 스트레스(100 mM NaCl 7일 처리 및 250 mM NaCl 48시간 처리) 처리하였고, 6일의 회복기 후에 생존비를 측정하였다. a는 '생존 묘 수/총 묘 수'를 의미하고, b는 총 묘 중 생존한 묘의 백분율을 나타낸다. * 표시값은 야생형과 유의적 차이(χ^2 test, $P < 0.05$)를 나타냄을 의미한다.

[0116] *OsSta2*의 분리 및 구조 분석

[0117] *OsSta2* 유전자의 1035 bp ORF(Open Reading Frame)으로 구성된 추정 아미노산은 분자량 및 pI가 각각 36.3 kDa 및 5.63으로 예상되는 344 아미노산의 단백질이다(서열목록 제3서열 및 제4서열). *OsSta2* 단백질의 추정 2차 구조는 하나의 시트(sheet), 두 개의 β -헤어핀(β -hairpin), 하나의 가닥(strand), 하나의 나선(helix) 및 하나의 나선-나선 상호작용이 존재한다. 추정 *OsSta2* 단백질은 58 아미노산의 보존적 DNA-결합 도메인(AP2/ERF 도메인) 및 Ala, Pro 및 Ser이 풍부한 3개의 아미노산 부위(A24HAAAGEAEAVYRAAAEPVMIRFGGEVSPVSDPRRPPLTISLPPTSHAWAAAEAVHPAALLQAQTAAAAAD, P172PPPPPPP 및 S205SKSVKTETTYTSPASSSLA-STTTSTVTSSSTSPSPSS)를 갖는다고 추정된다. *OsSta2*의 열라인 및 계통수 분석은 *Zea mays* ZmEREBP(KJ727501, 62%), *Setaria italic* SiERF5(XP_004953326, 58%), *Brachypodium distachyon* BdERF6(XP_003572768, 53%), *Sorghum bicolor* Sb06g024360(XP_00446882, 43%), *Arabidopsis thaliana* AtERF5(At5g47230, 42%)와 아미노산 수준에서 유의한 상동성을 가짐을 나타낸다.

[0118] *OsSta2-Ox* 형질전환주를 제조하기 위해 사용된 *OsSta2* cDNA는 트렁케이티드형태로 775 bp 및 56 아미노산으로 구성된다(서열목록 제1서열 및 제2서열).

[0120] *OsSta2*의 발현 분석

[0121] 다른 조직 내 *OsSta2*의 발현을 RT-PCR로 분석하고 qRT-PCR로 발리데이션하였다. 모든 조직에서 발현되었고, 3-8 cm 길이의 원추 꽃차례, 성숙 원추 꽃차례, 캘러스, 발아 후 7일째의 뿌리, 지엽의 잎집에서는 풍부하였고, 전출수(pre-heading) 단계의 최상(最上) 절간, 발아 7일째의 싹, 수분 3일째의 성숙 종자에서 적게 발현되었다(도 2a). *OsSta2*의 발현은 12시간의 염 스트레스가 유도된 후에 3시간 동안 감소하였다(도 2b). 24시간 건조 스트레스 후에 발현이 유도되었다(도 2c). ABA 처리 동안, *OsSta2* 발현은 3시간동안 감소하고 그후에 증가하였다(도 2d). 저온 스트레스 하에서 *OsSta2*는 유도되지 않았다(도 2e).

[0123] *OsSta2-Ox* 형질전환주의 제조

[0124] *OsSta2* 과발현 형질전환주를 제조하기 위해, KOME(<http://cdna01.dna.affrc.go.jp/cDNA/>)로부터 구한 cDNA 서열(J065129D08)을 pGA3426 벡터 내 *메이즈* 유비퀴틴 프로모터 하에 삽입하였다(도 3a). 카세트를 *O. sativa* L. cv. 동진벼에 형질전환 하였다. 총 21개의 독립적 형질전환주를 제조하였다. 지노믹 DNA PCR 분석으로 *OsSta2*의 삽입을 확인하였다. 최초 형질전환주 중, 정상 종자를 생산을 나타내는 5종을 T1 세대 생산을 위해 선별하였다. 종자를 수확하고 히그로마이신-포함 배지(50 mg/L)로 선별하였다. T2 동형접합체 종자를 이용한 염 스트레스 시험으로, 추후 분석을 위해 선별된 3종의 T2 세대 *OsSta2* 과발현 주의 강한 염 스트레스 내성을 확인하였다. 상기 주의 *OsSta2* 과발현을 RT-PCR로 확인하고 qRT-PCR로 발리데이션하였다(도 3b). 3종의 독립적인 주는 야생형보다 *OsSta2* 발현이 증가하였고, 형태적 차이는 나타나지 않았다(도 3c 및 3d).

[0126] *OsSta2-Ox* 형질전환주의 염 스트레스 내성

[0127] *OsSta2*의 과발현이 염 스트레스 내성을 부여하는지 조사하기 위해, 워크-인 생장 챔버에서 벼 묘에 염 스트레스를 주었다. 100 mM NaCl을 7일 동안 처리한 결과, *OsSta2-Ox* 형질전환주는 10.1-22.7% 생존하였고, 야생형은 7.2% 생존하였다. 250 mM NaCl을 72h 처리한 조건에서도 유사한 결과가 나왔다. 형질전환주는 25.8-34.5% 생존하였으나, 야생형은 11.6%만 생존하였다(도 4). *OsSta2-Ox* 형질전환주의 생중량 및 건조중량은 스트레스 회복 후에 야생형 보다 증가하였다(도 4b 및 4c).

[0128] *OsSta2-Ox* 형질전환주는 염 스트레스 내성을 추가 확인하기 위해, 다양한 농도의 NaCl를 처리하고 잎 디스크 분석을 실시하였다. 야생형 및 T4 *OsSta2-Ox* 형질전환주의 잎 디스크를 100, 200 및 250 mM NaCl 용액에 4시간 동안 띄웠다. 염분에 의한 클로로필의 손실은 야생형과 비교하여 *OsSta2-Ox* 형질전환주에서 더 적었다(도 5a). 24시간 후에 스트레스에 의한 손상을 나타내는 잎 조직의 블리칭 정도를 관찰하였다. 스트레스 처리된 잎 디스크의 클로로필 함량의 측정은 *OsSta2-Ox* 형질전환주와 염 스트레스와 정관계에 있음을 나타낸다(도 5c).

[0129] 스트레스-내성 표현형을 추가로 확인하기 위해, 생장 단계의 *OsSta2-Ox* 형질전환주 및 야생형의 *Fv/Fm* 값을 측정하였다(도 5d). *Fv*는 가변 형광을 나타내고, *Fm*는 최대 형광을 나타내며, *Fv/Fm* 값은 암적응 상태에서 PSII의 최대 광화학 효율성을 의미한다. *Fv/Fm* 값은 고염 조건에서 야생형보다 *OsSta2-Ox* 형질전환주에서 약 6% 높았다. 대조적으로, 건조 및 저온 조건에서는 *Fv/Fm* 값이 야생형과 *OsSta2-Ox* 형질전환주가 거의 유사하였다. 그러므로, 이러한 결과는 형질전환주에서 *OsSta2*의 과발현이 생장 단계에서 고염에 대한 내성을 증가시킴을 의미한다.

[0131] *OsSta2-Ox* 형질전환주의 ABA 민감성

[0132] *OsSta2-Ox* 형질전환주는 초기 묘 성장에서 ABA-민감 표현형을 나타내었다(도 7). 발아 5일째의 *OsSta2-Ox* 형질전환주(Ox) 2주를 ABA 농도가 다르게 첨가된 half-strength 배지로 옮겼다. *OsSta2-Ox* 형질전환주의 싹 성장은 ABA 처리에 의해 억제되었다. 5 μ M 및 10 μ M ABA 조건에서 싹은 야생형보다 유의하게 63% 및 74% 억제되었다. 이러한 결과는 *OsSta2-Ox* 형질전환주가 ABA 민감하고 *OsSta2* 유전자는 ABA 신호전달 경로에 관련되어 있음을 의미한다.

[0134] *OsSta2*의 과발현에 의한 곡실 수득율의 증가

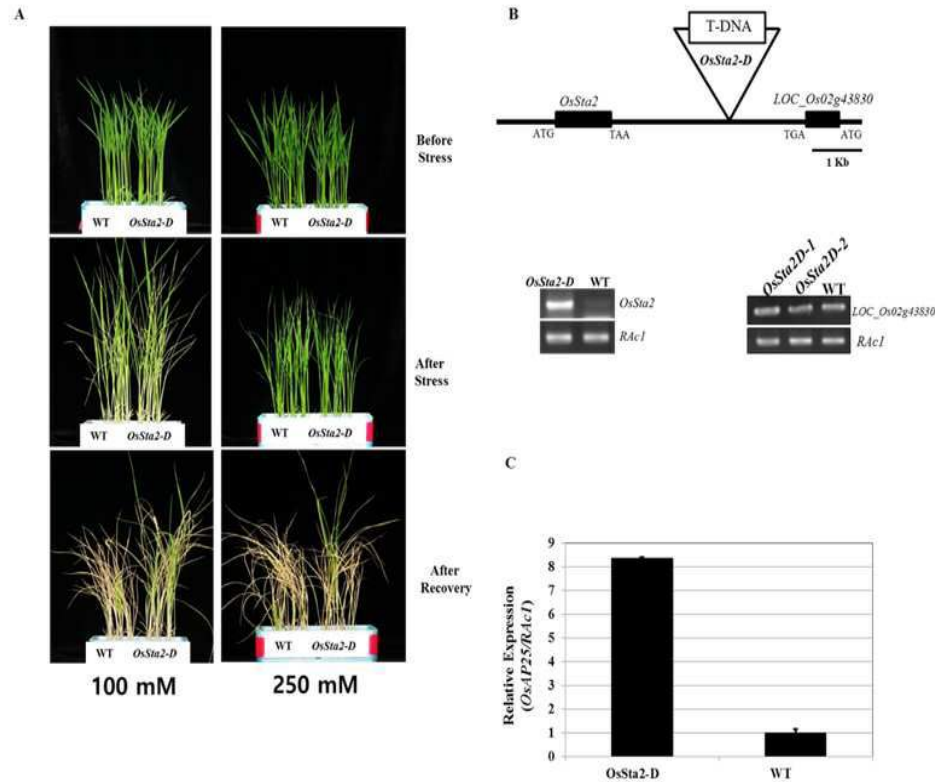
[0135] 포장 조건 하에 곡식 수득률에 대한 *OsSta2*의 역할을 조사하기 위해, 3 주 *OsSta2-Ox* 형질전환주의 T4 및 T5 동형접합주를 야생형과 함께 논에서 재배하고, 8가지 농업적 특성을 분석하였다. 성숙한 *OsSta2-Ox* 형질전환주는 4잎 단계까지는 차이를 나타내지 않았지만 반-왜소증을 나타내었다. 전반적으로, 성숙한 *OsSta2-Ox* 형질전환주의 줄기는 7-9% 정도 야생형보다 짧았다(도 6). *OsSta2-Ox* 형질전환주는 또한 야생형보다 많은 수의 새싹을 나타내었다. 정상 논 조건 하의 수확 파라미터의 조사는 *OsSta2-Ox* 형질전환주의 곡실 수득율이 야생형보다 증가함을 보여주었다. 수확 파라미터의 통계적 분석은 *OsSta2-Ox* 형질전환주의 곡실 수득율이 야생형보다 유의하게 증가됨을 나타낸다. 특히, Ox13 및 Ox19에서 채움률(filling rate)은 야생형보다 각각 17% 및 23% 높았고, 총 곡물중량도 각각 5% 및 8% 높았다. 다른 과발현주보다 낮은 *OsSta2*의 발현을 나타내는 Ox20은 야생형과 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았다. Ox20은 작은수상화 당 원추꽃차례의수가 8% 증가하였고 총

곡물중량의 10% 증가를 나타내었다.

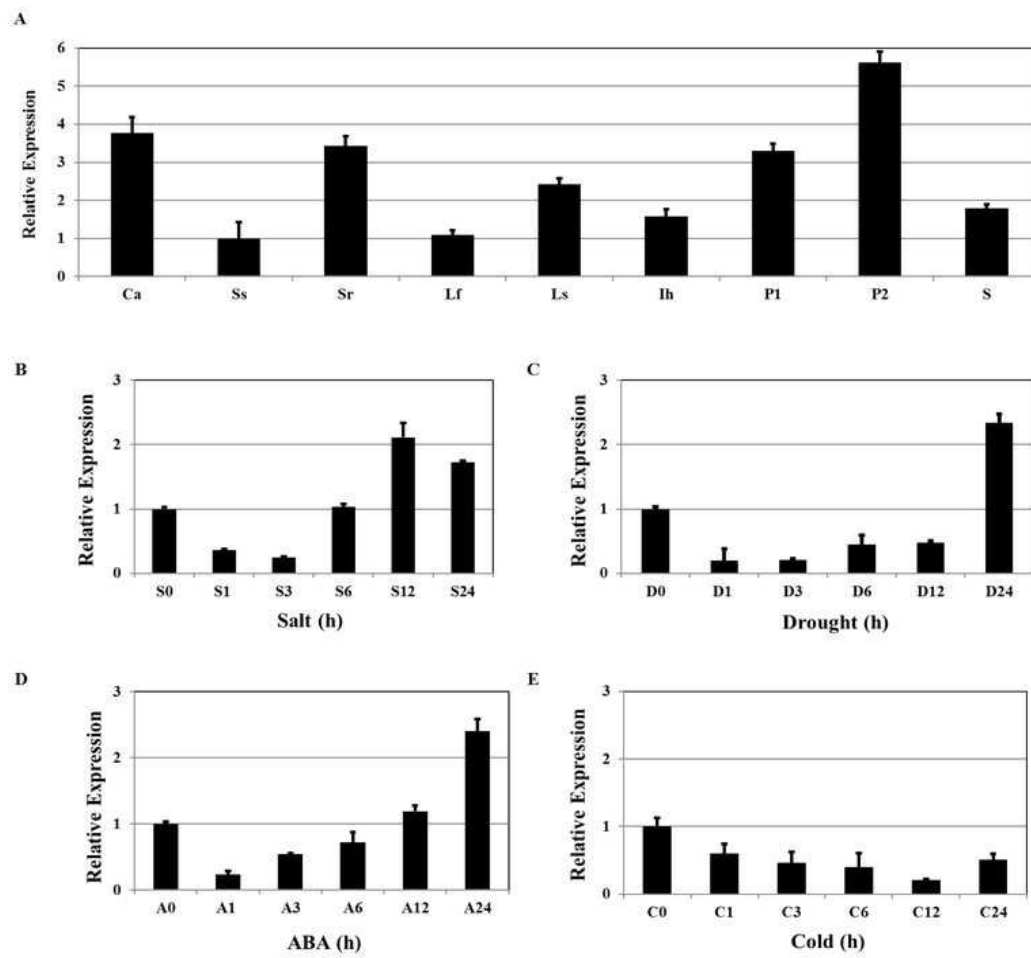
[0137] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

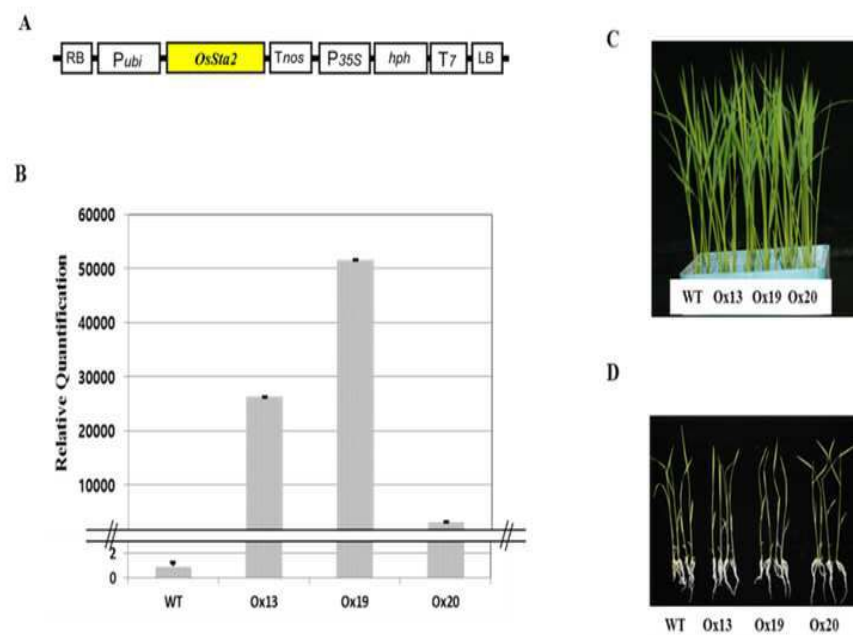
도면1



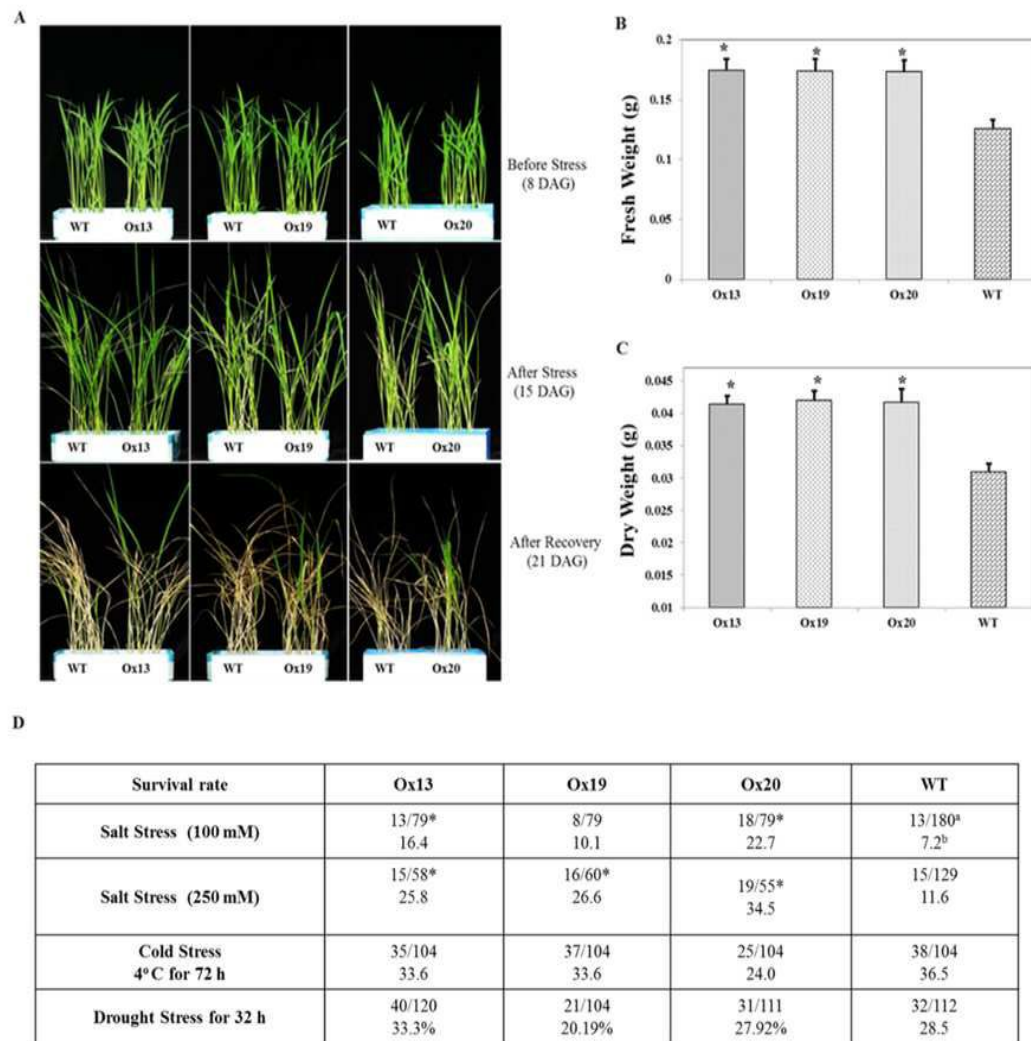
도면2



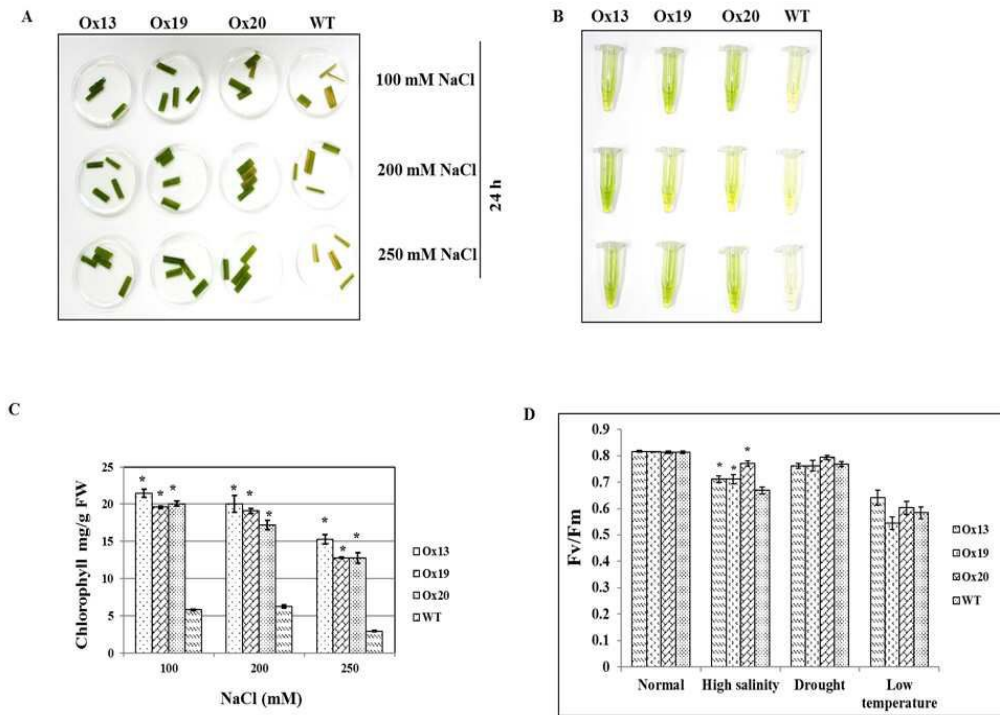
도면3



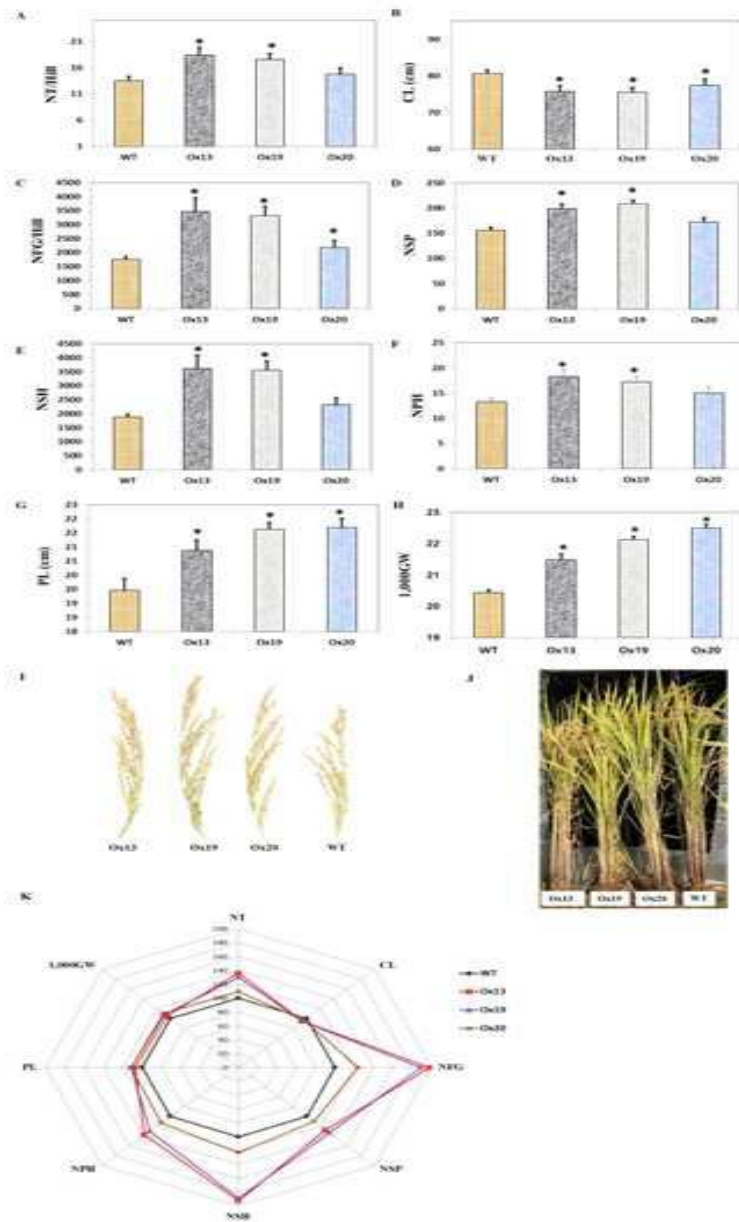
도면4



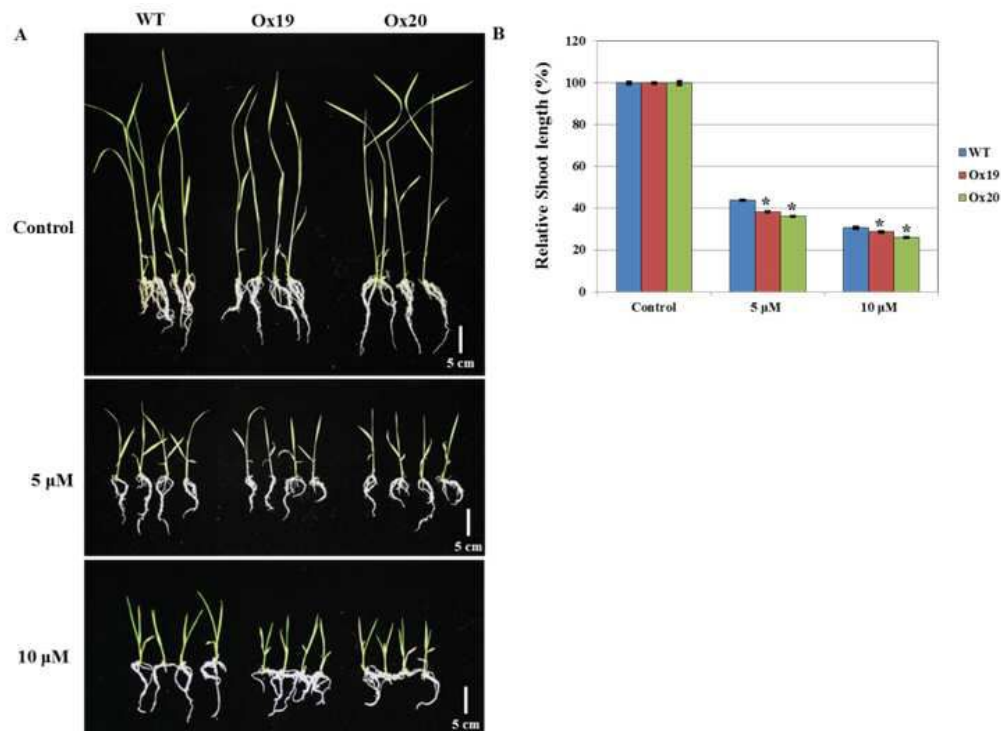
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
- <120> Abiotic Stress-Inducible OsSta2 Gene, Protein and Transformant
Enhancing Tolerance to Salt Stress
- <130> PN160387
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 775
- <212> DNA
- <213> Oryza sativa
- <400> 1

```

ggcagatgca attgcgcgaa cacctccaaa ctcccgagtc cctctcctc tctcgtcttc      60
ctctccacga cgacctctcc gtttcaattc tgcgccgcc cgcgcccgga cgacgtcgac      120
ccacggcaaa cggaagcggc acgagacggc ggcgggccgac ccggacgtcg aggtgatcgg      180

agaatcatcc aaatccgtca agaccgagac gtacacatcg ccggcgctcg cgtcgtctggc      240
ctcaacgaca acctcaacgg tgacatcatc atccacgtcg ctttccccct cgtcgggagc      300
agctgcctgc ggcgggcgcg gcggcgagct gttcgtccca ccgatgccgt cgagctggtc      360
  
```

gtgggatcag ttggaggggt tcttcggcat cctctcgccg ctctcgccgc acccgcaaat 420
 gggattcccc gaggtcgccg taaactaatt aagcgcgcta atgatctctc taagcatgat 480
 taattaggcg caataatcgg caattaatta gtggcttcta gttctcgacg gccttcgctt 540
 tggacacatc tcaggagatt tggcttggag cagtgtacta tactgtacag aggagagaag 600

atagtatatt agcgcgatgca tgtgacgggt actgaatgtg tgcacgcaca taggtgttgg 660
 agatacactc tagatatctt gaaaataata agaggaaata atagtatagg atgggtgata 720
 ataacattgt aaattaatta attaaatgaa gagtaaatgt gtactagttt gtttt 775

<210> 2

<211> 56

<212> PRT

<213> oryza sativa

<400> 2

Met Gln Leu Arg Glu His Leu Gln Thr Pro Glu Ser Pro Leu Leu Ser

1 5 10 15

Arg Leu Pro Leu His Asp Asp Leu Ser Ala Ser Ile Leu Arg Arg Pro

20 25 30

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Pro Thr Ala Asn Gly Ser Gly Thr Arg Arg

35 40 45

Arg Arg Pro Thr Arg Thr Ser Arg

50 55

<210> 3

<211> 1035

<212> DNA

<213> oryza sativa

<400> 3

atggacttca gcggcgacat cgatgacctg atctccctcc agctcctcca cgatcagctg 60
 ctcggggtcg aggccgacgc gtgcctcccg gtggcagttc atcacgatgg cgtcgccgcg 120
 ttcgcgagc atcagcaggg ttccatccc gcggcgcttc tgccgcagca gccgatgacg 180
 atgacaccgg ctgggtacgt ggacatggcg aatgatcagt atttgggtgc gcatgccgcc 240

gctggcgagg cggaggcgggt ctaccgggcg gcggcggcgg agccggtgat gatacggttc 300
 ggccggcgagg tgtccccggt gtcggacccc cggaggccgc ccctgacgat ctgcctgcct 360
 ccgacgtcgc acgcgtgggc ggccggcgag gcggtgcacc cggccgctct gctgcaggcg 420

cagaccgcgg ccgcggccgc cgacccgaac gacttccgga agtaccgcgg cgtgcggcag 480
 cggccgtggg gcaagttcgc ggcggagatc cgcgacccca agaagcgggg ctgcgcgtg 540
 tggctcgga cgtacgacac ggccatcgag gcggcgcgcg cgtacgaccg cgccgccttc 600
 cgcatgcgcg gcgccaaggc catcctcaac ttccccaacg aggtcggctc ccgcggcgcc 660

gacttctgg caccgccgc gccgccccg ccgccgacga cgtcgacca cggcaaacgg 720
 aagcggcacg agacggcggc ggccgaccg gacgtcgagg tgatcggaga atcatccaaa 780
 tccgtcaaga ccgagacgta cacatcgccg gcgtcgtcgt cgtggcctc aacgacaacc 840
 tcaacggtga catcatcacc cagtcgcct tccccctcgt cggaggcagc tgctgcggc 900
 ggccggcgcg gcgagctgtt cgtccaccg atcccgctga gctggtcgtg ggatcagttg 960
 gaggggttct tcggcatcct ctgcgcgtc tcgccgacc cgcaaatggg attcccgag 1020
 gtcgccgtaa actaa 1035

<210> 4
 <211> 345
 <212> PRT
 <213> oryza sativa
 <400> 4

Met Asp Phe Ser Gly Asp Ile Asp Asp Leu Ile Ser Leu Gln Leu Leu
 1 5 10 15

His Asp Gln Leu Leu Gly Val Glu Ala Asp Ala Cys Leu Pro Val Ala
 20 25 30

Val His His Asp Gly Val Ala Ala Phe Ala Glu His Gln Gln Gly Phe
 35 40 45

His Pro Ala Ala Phe Leu Pro Gln Gln Pro Met Thr Met Thr Pro Ala

50 55 60
 Gly Tyr Val Asp Met Ala Asn Asp Gln Tyr Leu Gly Ala His Ala Ala

65 70 75 80
 Ala Gly Glu Ala Glu Ala Val Tyr Arg Ala Ala Ala Glu Pro Val

85 90 95
 Met Ile Arg Phe Gly Gly Glu Val Ser Pro Val Ser Asp Pro Arg Arg

100 105 110
 Pro Pro Leu Thr Ile Ser Leu Pro Pro Thr Ser His Ala Trp Ala Ala

115 120 125
 Ala Glu Ala Val His Pro Ala Ala Leu Leu Gln Ala Gln Thr Ala Ala
 130 135 140
 Ala Ala Ala Asp Pro Asn Asp Phe Arg Lys Tyr Arg Gly Val Arg Gln
 145 150 155 160
 Arg Pro Trp Gly Lys Phe Ala Ala Glu Ile Arg Asp Pro Lys Lys Arg
 165 170 175
 Gly Ser Arg Val Trp Leu Gly Thr Tyr Asp Thr Ala Ile Glu Ala Ala
 180 185 190
 Arg Ala Tyr Asp Arg Ala Ala Phe Arg Met Arg Gly Ala Lys Ala Ile
 195 200 205
 Leu Asn Phe Pro Asn Glu Val Gly Ser Arg Gly Ala Asp Phe Leu Ala
 210 215 220
 Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Thr Thr Ser Thr His Gly Lys Arg
 225 230 235 240
 Lys Arg His Glu Thr Ala Ala Ala Asp Pro Asp Val Glu Val Ile Gly
 245 250 255
 Glu Ser Ser Lys Ser Val Lys Thr Glu Thr Tyr Thr Ser Pro Ala Ser
 260 265 270
 Ser Ser Leu Ala Ser Thr Thr Thr Ser Thr Val Thr Ser Ser Ser Thr
 275 280 285
 Ser Pro Ser Pro Ser Ser Glu Ala Ala Ala Cys Gly Gly Gly Gly Gly
 290 295 300
 Glu Leu Phe Val Pro Pro Met Pro Ser Ser Trp Ser Trp Asp Gln Leu
 305 310 315 320
 Glu Gly Phe Phe Gly Ile Leu Ser Pro Leu Ser Pro His Pro Gln Met
 325 330 335
 Gly Phe Pro Glu Val Ala Val Asn ***

340 345
 <210> 5
 <211> 18

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OsSta2-F	
<400>	5	
	agatgcaatt gcgcgaac	18
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OsSta2-R	
<400>	6	
	caccgttgag gttgtcgttg	20
<210>	7	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Pubi-F	
<400>	7	
	ttgatatact tggatgatgg cata	24
<210>	8	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Tnos-R	
<400>	8	
	gcgggactct aatcataaaa acc	23
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RAc1-F	
<400>	9	
	cgcagtccaa gaggggtatc	20
<210>	10	

<211> 20
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> RAc1-R
 <400> 10
 tccctcaca tttcccgctc 20
 <210> 11
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RAc1-qF
 <400> 11
 gactctggtg atggtgtcag ccacac 26
 <210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> RAc1-qR
 <400> 12
 cgcacttcat gatggagttg tat 23