



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월26일
(11) 등록번호 10-1669484
(24) 등록일자 2016년10월20일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/8271 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0127368</p> <p>(22) 출원일자 2016년10월04일
심사청구일자 2016년10월04일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
박연일 등. 남세균 유전체 기반 작물형질 개량용
유용유전자원 발굴 연구보고서. (2015.02.)</p> | <p>(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
박연일
대전광역시 유성구 은구비남로 34, 808동 601호(노은동, 열매마을아파트 8단지 새미래)</p> <p>(74) 대리인
최규환</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 12 항

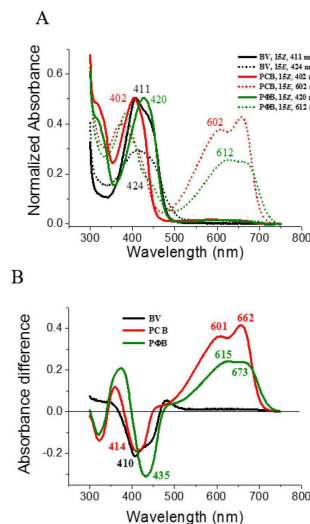
심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 남세균 유래 자색/오렌지색 광호변성 피토크롬 TpR0787 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 톨리포스릭스(Tolypothrix) PCC 7910 유래의 자색/오렌지색 광호변성 피토크롬 TpR0787 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 TpR0787 단백질의 258번째 아미노산이 시스테인에서 세린으로 돌연변이된 녹색/적색 광호변성 피토크롬 TpR0787 C258S 변이체 단백질에 관한 것으로, 본 발명의 TpR0787 단백질은 오렌지색과 녹색을 생장 및 분화의 정보원으로 이용하지 못하는 조류와 고등식물 등의 광합성 식물에 도입하면 광형태형성과 열형태형성을 제어할 수 있고, 식물체에 음지 내성을 부여할 수 있으며, 아파트형 식물공장과 온난화 환경에서 맞춤형 작물의 재배와 생산성 제고에 기여할 수 있는 있는 방법을 제공할 수 있을 뿐만 아니라 광의학, 생체이미징, 세포학, 바이오에너지 등 여러 생명공학 분야에 다양하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ012324

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21_농생물게놈활용연구사업

연구과제명 기후온난화 적응용 식물개발을 위한 식물의 열형태형성 제어기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2016.05.09 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 톨리포스릭스(Tolypothrix) PCC 7910 유래의 자색/오렌지색 광호변성 피토크롬 TpR0787 단백질.

청구항 2

제1항의 TpR0787 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 4

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 TpR0787 단백질의 258번째 아미노산이 시스테인에서 세린으로 돌연변이된 TpR0787 C258S 변이체 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 TpR0787 C258S 단백질은 녹색/적색 광호변성 피토크롬인 것을 특징으로 하는 변이체 단백질.

청구항 6

제4항의 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 7

제2항 또는 제6항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 8

제7항의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 TpR0787 단백질을 코딩하는 유전자 또는 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 식물의 음지 내성을 증가시키는 방법.

청구항 9

제7항의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 음지에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 10

제9항의 방법에 의해 제조된 야생형에 비해 음지에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체.

청구항 11

제10항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 12

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 톨리포스릭스(Tolypothrix) PCC 7910 유래의 자색/오렌지색 광호변성 광수용체 TpR0787 단백질 또는 상기 TpR0787 단백질의 258번째 아미노산이 시스테인에서 세린으로 돌연변이된 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 음지에 대한 내성 증가용

조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 남세균 유래 자색/오렌지색 광호변성 피토크롬 TpR0787 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 남세균 톨리포스릭스(*Tolypothrix*) PCC 7910 유래의 자색/오렌지색 광호변성 피토크롬 TpR0787 단백질을 과 상기 단백질의 점돌연변이체인 녹색/적색 광호변성 TpR0787 C258S 변이체 단백질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 빛은 광합성을 통해 식물체에 에너지를 제공할 뿐만 아니라 외부 자극원으로서 식물의 환경 적응 및 생존에 직접적인 영향을 준다. 산소 발생형 광합성 생물은 변화하는 빛 환경 조건에서 최적의 광합성을 수행한다. 예를 들어 미세조류에서는 낮은 광 조건에서는 빛을 향해서 이동하는 양성 주광성을, 높은 광 조건에서는 빛으로부터 멀어지는 음성 주광성을 보인다. 엽록체를 갖는 육상식물에서는 빛의 세기에 따라 세포내 엽록체가 재배열 됨으로써 광합성을 최적화함과 동시에 과다한 광으로부터 피해를 최소화한다.

[0003] 식물에서 볼 수 있는 광수용체(photoreceptor)로는 적/원적외선을 감지하는 피토크롬(phytochrome), 청색을 감지하는 크립토크롬(cryptochrome)과 포토트로핀(phototropin), 자외선B를 감지하는 자외선 수용체(UVR8)가 알려져 있다. 식물과 조류의 세포질에 존재하는 피토크롬은 빛의 질적인 면을 인지하여 분자적인 반응을 야기한다. 피토크롬은 약 120 kDa의 단백질로, 아미노-말단에 빛을 인지하는 부분으로서 발색단(chromophore)이 결합하는 부위를 포함하여 PAS-GAF-PHY 도메인을 가지고 있고, 카복시-말단 부위에는 핵으로의 이동에 관여하는 시그널 도메인(nuclear localization signal)과 히스티딘 키나아제 도메인(histidine kinase domain)을 가지고 있다. 고등식물 피토크롬의 발색단은 선상 테트라피롤(open-chain tetrapyrrole)인 피토크로모빌린(phytochromobilin)이다. 피토크롬은 적색광과 원적색광을 흡수하여 발아, 하배축 길이 신장, 광합성 기구 발달 및 개화와 같은 광주기와 관련된 기작들을 조절한다. 피토크롬 신호전달 경로는 피토크롬 상호작용인자(phytochrome interacting factors, PIFs)를 매개로 이루어지며, 다수의 PIFs 중에서 PIF4로 알려진 전사인자는 고온 조건에서 하배축과 잎자루의 길이 생장을 촉진하며 잎의 하편생장을 유도함으로써 식물이 고온 조건에서도 적응할 수 있는 냉각효과(cooling effect)를 유도하기도 한다.

[0004] 남세균 중 시네코시스티스 PCC6803 (*Synechocystis* sp. PCC6803) 종에서 알려진 빌린 광수용체는 Cph1(cyanobacteria phytochrome 1; slr0473 위치) 및 Cph2(cyanobacteria phytochrome 2; slr10821 위치)이다. Cph1은 식물체의 피토크롬과 유사한 구조를 갖는 반면 Cph2는 PAS 도메인 없이 GAF-PHY 도메인으로 구성되어 있다.

[0005] 최근에 남세균 노스톡 펄티포르메(*Nostoc punctiforme* ATCC 29133)에서 적색/원적외선 피토크롬과는 다른 새로운 유형의 피토크롬이 보고되었다. TP1(trichromatic phytochrome 1; NpF1833 유전자 위치) 이라고 불리는 이 피토크롬은 전형적인 Cph1나 Cph2와는 달리 피코시아노빌린(phycoerythrin) 발색단이 결합하는 Cys-His 모티프(motif) 대신에 Cys-Cys 잔기를 가지고 있는 이중 시스테인 피토크롬(dual-Cys phytochrome)으로, 자색/적색 광호변성 특성을 보인다. 또한 TP1은 자색 흡수형에서 적색 흡수형으로의 전환 과정에서 녹색 흡수형의 중간형이 생성된다는 점에서 기존의 알려진 피토크롬과 차별성을 보인다. 피토크롬 이외에도 PAS나 PHY 도메인이 결핍되어도 GAF 도메인이 독립적으로 광수용체 역할을 하는 자외선, 청색, 녹색, 오렌지, 및 적색을 흡수하는 광수용체 사이아노박테리오크롬(cyanobacteriochrome, CBCR)이 다수 보고되었다.

[0006] 이와 같이 적색/원적외선(예, Cph1과 Cph2) 및 자색/녹색/적색(예, TP1) 광호변성(phototropism) 피토크롬이 발견되었으나 그 외의 빛에 의해 광호변되는 피토크롬에 대해서는 밝혀지지 않았다. 특히, 본 발명에서와 같이 TP1과 같이 이중 시스테인을 가지면서 자색/오렌지색 광호변성을 갖는 피토크롬과 두 번째 시스테인이 세린으로 치환될 경우 녹색/적색 광호변성 특성을 보인다는 피토크롬에 대해서는 아직까지 밝혀진 바가 전혀 없다.

[0007] 한편, 한국등록특허 제0715129호에는 Pr 흡수 스펙트럼이 더 긴 파장으로 이동된 조절된 파이토크롬 A(modified phytochrome A, PHYA) 핵산 분자를 이용한 '음지인식 가능 장파장 흡광 파이토크롬 광수용체 및 이를 이용한 음지내성 작물 개발'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1256475호에는 Cph2 또는 PixJ1 단백질을 함유하는 자외선-특이적 광수용체에 관한 '남세균 피토크롬 단백질을 함유하는 자외선-특이적 광수용체'가 개시되어 있으나, 본 발명의 남세균 유래 자색/오렌지색 광호변성 피토크롬 TpR0787 단백질 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없

다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 남세균 톨리포스릭스(*Tolypothrix*) PCC 7910으로부터 TpR0787 피토크롬 단백질을 분리 및 동정하였고, 상기 TpR0787 단백질의 광센서 모듈 도메인과 빌린계 발색단과의 결합 유무를 시험하여 분광학적 특성을 분석한 결과, 본 발명의 TpR0787 피토크롬 단백질은 자색/오렌지색 광가역적 특성을 가지는 피토크롬인 것을 확인하였다. 또한, 광센서 모듈 내 GAF 도메인의 두 번째 시스테인 잔기를 세린으로 치환한 TpR0787 C258S 변이체 단백질은 녹색/적색 광호변성인 것을 알 수 있었다. 본 발명자들은 TpR0787 단백질이 발색단과 결합하는 부위에 이중 시스테인 잔기를 가지면서 자색/오렌지색 광호변성을 가지는 신규한 피토크롬인 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 톨리포스릭스(*Tolypothrix*) PCC 7910 유래의 자색/오렌지색 광호변성 피토크롬 TpR0787 단백질을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 TpR0787 단백질의 258번째 아미노산이 시스테인에서 세린으로 돌연변이된 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 TpR0787 단백질을 코딩하는 유전자 또는 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 식물의 음지 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 음지에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 톨리포스릭스 PCC 7910 유래의 자색/오렌지색 광호변성 광수용체 TpR0787 단백질 또는 상기 TpR0787 단백질의 258번째 아미노산이 시스테인에서 세린으로 돌연변이된 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 음지 내성 증가용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 자색, 오렌지색, 녹색 및 적색을 흡수할 수 있는 새로운 피토크롬 광수용체를 발굴한 것으로서, 본 발명의 광수용체 TpR0787 단백질은 오렌지색과 녹색을 식물의 생장 및 분화의 정보원으로 이용하지 못하는 조류와 고등식물 등의 광합성 식물에 도입하면 광형태형성과 열형태형성을 제어할 수 있고, 식물에 음지 또는 고온 내성을 부여할 수 있으며, 아파트형 식물공장과 온난화 환경에서 맞춤형 작물의 재배와 생산성 제고에 기여할 수 있는 있는 방법을 제공할 수 있을 뿐만 아니라 광의학, 생체이미징, 세포학, 바이오에너지 등 여러 생명공학 분야에 다양하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 톨리포스릭스 유래 TpR0787 단백질의 도메인 구조(A)와 TpR0787 단백질의 아미노 말단 및 GAF 도메인의 아미노산 서열 비교 결과(B) 및 계통도 분석 결과(C)이다. NpF1183, 노스톡 펄티포르메(*Nostoc punctiforme* WP_012407929) 피토크롬; CphP, 톨리포스릭스(*Tolypothrix* sp. PCC 7601 AAL76161.1) 피토크롬; Cph1, 시네코 시스티스(*Synechocystis* sp. PCC6803 BAK51092.1) 피토크롬; Agp1, 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens* F2 WP_010971984.1) 피토크롬; DrBphP, 데이노코쿠스 라디오듀란스(*Deinococcus radiodurans* WP_010888498.1) 피토크롬; AtPhyA, 애기장대(*Arabidopsis thaliana* AAC33219.1) 피토크롬.

도 2는 TpR0787 단백질의 광센서 도메인의 구조(A)와 빌리버딘(biliverdin, BV), 피코시아노빌린(phycocyanobilin, PCB) 또는 피토크로모빌린(phytochromobilin, PΦB)의 발색단을 생산하는 재조합 대장균에서 분리된 TpR0787 단백질의 PAS-GAF-PHY 도메인을 포함하는 광센서 모듈(photosensory module)의 쿠마시 브릴리언트 블루 염색(CBB)과 Zn^{2+} 블랏팅 결과를 보여주는 그림(B)이다.

도 3은 재조합 톨리포스릭스 TpR0787 단백질의 광센서 모듈의 분광학적 특성을 보여주는 그림이다. BV, PCB 또는 PΦB를 생산하는 재조합 대장균으로부터 분리된 재조합 His₆-PAS-GAF-PHY의 흡수(A)와 이의 흡수 차이(B)를 보여주는 스펙트럼이다.

도 4는 재조합 톨리포스릭스 TpR0787 단백질의 258번 아미노산 시스테인이 각각 히스티딘과 세린으로 치환된 변이체 단백질 TpR0787 C258H(A)와 C258S(B)의 흡수 스펙트럼을 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 톨리포스릭스(Tolypothrix) PCC 7910 유래의 자색/오렌지색 광호변성 피토크롬 TpR0787 단백질을 제공한다.
- [0021] 용어 '피토크롬(phytochrome)'은 식물의 적색광 광수용체로, 빛을 흡수하여 흡수 스펙트럼의 형태가 가역적으로 변하는 식물체 내의 색소 단백질로서 균류 이외의 모든 식물에 들어 있는 단백질이다. 피토크롬은 간혹 근적외선에 활성을 띠기도 하나 대부분의 경우 적색광에 의해 활성을 띠고 식물 유전자 발현 조절, 종자 발아 유도, 음지회피 반응 등을 매개하는 것으로 알려져 있다. 피토크롬은 2개의 뚜렷한 스펙트럼의 형태인 Pr 형태를 흡수하는 적색광(R, $\lambda_{max} = 660nm$) 및 Pfr 형태를 흡수하는 원-적색광(FR, $\lambda_{max} = 730nm$)의 형태가 있다. 식물 피토크롬의 적색광/원적색광 가역적 광변환에 비해, 남세균 피토크롬은 UV 근처로부터 적색광 부분까지 매우 다양한 흡광 특성을 나타낸다.
- [0022] 용어 '광호변성'은 조명(照明)되고 있는 동안에 한 물질의 빛깔이 가역적인 변화를 보이는 현상을 말한다.
- [0023] 본 발명에 따른 TpR0787 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 자색/오렌지색 광호변성 특성을 의미한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 TpR0787 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0025] 본 발명에 따른 상기 TpR0787 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 TpR0787 단백질의 258번째 아미노산이 시스테인에서 세린으로 돌연변이된 TpR0787 C258S 변이체 단백질 및 상기 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 상기 TpR0787 C258S 변이체 단백질은 TpR0787 단백질의 광센서 모듈(도 2) 내 GAF(GTPase-activating protein) 도메인에 있는 두 개의 시스테인 잔기 중 두 번째 시스테인이 세린으로 치환된 점돌연변이체로, TpR0787 단백질과 달리 녹색/적색 광호변성의 분광학적 특성을 보여주었다.
- [0028] 본 발명은 또한, 상기 TpR0787 단백질 또는 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0029] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한

재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

- [0030] 본 발명에서, 상기 TpR0787 단백질 또는 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.
- [0031] TpR0787 단백질 또는 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자 서열 및 적당한 전사/번역 조절 신호를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 TpR0787 단백질을 코딩하는 유전자 또는 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는 식물의 음지 내성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스 (예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 재조합 발현 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터 또는 Clp 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 상부의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시성 (constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이며, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.
- [0035] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0036] 재조합 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), G418, 블레오마이신(bleomycin)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl₂ 방법, 하나한 방법(Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 유전자총-매개 형질전환 방법(bombardment), 아그로박테리움-매개 형질전환법, 미세주입법, 갈슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법 및 DEAE-텍스트란 처리법 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 태양광에 대한 경쟁은 식물 발달을 조절하는데 있어서 가장 중요한 관점 중 하나로, 높은 밀도(즉, 음지 조건) 하에서 성장한 식물은 적색광(R) 대 원-적색광(FR) 비율의 감소를 알아차리고, 이러한 변화는 식물체에 음지회

피성 증후군 또는 음지회피성 반응을 일으킨다. 음지회피 반응(shade avoidance)이란 식물이 앞의 식물들에 의해 빛을 받지 못할 때 위로 자라고, 빛을 잘 받을 때에는 더 많은 빛을 받기 위해 옆으로 자라는 반응을 말하는 것으로서, 발아가 지연되고, 연장 성장 및 개화가 가속화되며, 잎 발달 및 엽록체 발달이 지연되고, 감소된 종자 세트 및 미성숙 열매가 많이 생성된다. 이러한 음지회피성 반응은 주로 피토크롬에 의해 조절되는데, Pr 흡수 스펙트럼이 더 긴 파장으로 이동한(즉, 장파장 또는 적색-이동한) 피토크롬은 음지 조건에서 빛을 흡수하고 이용하여 식물체에 음지 내성을 부여한다.

[0039] 일부 식물에서 대기 온도상승에 대응하기 위해서 기화열 방출을 통한 냉각기능 강화와 태양에너지에 노출을 최소화시키기 위해 식물의 하배측, 줄기 및 잎자루의 생장이 촉진되는 warm growth가 일어난다. 이러한 열형태형성(thermomorphogenesis)은 피토크롬의 신호전달 경로 하위인자 중 하나인 피토크롬 작용인자 4(phytochrome interacting factor 4, PIF4)에 의해서 옥신과 브라시노스테로이드(brassinosteroid) 호르몬의 생합성 조절을 통해서 일어난다.

[0040] 본 발명의 TpR0787 단백질은 장파장의 오렌지색 빛을, TpR0787 C258S 변이체 단백질은 장파장의 적색 빛을 흡수할 수 있는 형태로 전환되는 광호변성을 가지고 있으므로, 본 발명의 TpR0787 단백질 또는 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 식물체 내에서 과발현시키면 식물체에 음지 내성을 증가시킬 수 있는 것이다.

[0041] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

[0042] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 야생형에 비해 음지에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0043] 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같다.

[0044] 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다.

[0045] 전술한 바와 같이, 본 발명의 TpR0787 단백질 또는 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물체는 오렌지색 또는 적색의 장파장 빛을 흡수(사용)할 수 있으므로, 야생형에 비해 음지 내성이 증가된다.

[0046] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0047] 상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물 또는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쪽감, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 툴리포스릭스 PCC 7910 유래의 자색/오렌지색 광호변성 광수용체 TpR0787 단백질 또는 상기 TpR0787 단백질의 258번째 아미노산이 시스테인에서 세린으로 돌연변이된 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 음지 내성 증가용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 툴리포스릭스 PCC 7910 유래의 자색/오렌지색 광호변성 광수용체 TpR0787 단백질 또는 TpR0787 단백질의 258번째 아미노산이 시스테인에서 세린으로 돌연변이된 TpR0787 C258S 변이체 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물에 형질전환함으로써 식물체의 음지 내성을 조절할 수 있는 것이다.

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 재료 및 방법

[0051] 계놈 DNA 분리 및 광센서모듈 클로닝

[0052] 계놈 DNA 분리

[0053] 지수 생장기의 툴리포스릭스(Tolypothrix) PCC 7910 세포를 원심분리(3,500rpm, 15분, 4℃)하여 수확한 후, 200μl TEN 완충액(10mM Tris-Cl, 150mM NaCl 및 100mM EDTA)에 현탁시켰다. 여기에 10μl 리소자임(lysozyme, 20mg/ml)을 첨가하여 37℃에서 15분 반응시켜 세포를 파괴한 뒤, 10% SDS 5μl를 첨가하고 흔들어 주었다. 상기

반응물에 20 μ g/ml 농도의 프로테아제 K 5 μ l를 첨가하여 60℃에서 1시간 반응시킨 후, 페놀 400 μ l를 첨가하고 원심분리(3,500 rpm, 3분, 상온)하여 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 상등액과 동량의 페놀:클로로포름:아이소아밀알코올을 첨가하여 상온에서 3-5분 흔들어 주었다. 다시 원심분리(3,500rpm, 3분, 상온)한 후, 얻어진 상등액은 20 μ l 3M 아세트산나트륨(pH 5.2) 및 400 μ l 에탄올과 혼합한 뒤, 원심분리(3,500rpm, 3분, 상온)를 통해 DNA만 획득하였다.

[0054] 광센서 모듈 클로닝

[0055] 아미노-말단에 PAS, GAF 및 PHY 도메인의 단백질 서열이 보존된 야생종의 GAF를 증폭할 수 있는 프라이머와 GAF 도메인의 258번째 시스테인이 세린으로 치환될 수 있도록 프라이머(표 1)를 제작하였으며 이때 양 말단에 어댑터로서 제한효소 인식부위를 삽입하였다. 사용된 제한효소는 클로닝하고자 하는 염기서열 내에 존재하지 않는 것으로 선택하였으며, 본 발명에는 *Xho*I과 *Pst*I이 사용되었다. 제작된 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 통하여 다량의 염기서열 절편을 얻었다. 단백질 발현용 대장균에 형질전환하기에 앞서 DH5 α 대장균에 서브클로닝을 수행하여 벡터 pBAD/mycHisC(Invitrogen, 미국)와 중합효소연쇄반응을 통해 얻어진 GAF 도메인의 염기서열 절편을 라이게이션하고 형질전환하여 재조합 플라스미드를 얻었다. 재조합 플라스미드를 추출하고 염기서열분석법을 통해 플라스미드 내에 염기서열이 정확하게 삽입되었는지 확인하였다. 단백질 서열이 보존되었는지 최종 확인한 후, 빌리버딘(biliverdin, 이하 BV), 피코시아노빌린(phycocyanobilin, 이하 PCB) 혹은 피토크로모빌린(phytochromobilin, 이하 P Φ B) 발색단(chromophore)을 생산하는 단백질 발현용 대장균(LMG-pPL-BV, LMG-pPL-PCB, 및 LMG-pPL-P Φ B)에 재조합 플라스미드를 형질전환하였다.

표 1

[0056] 본 발명에 사용된 프라이머 정보

프라이머명	방향	서열정보(5'→3')
Tpr0787 야생형	정방향	CCGCTCGAGAATGAGCCAGTCAGAAGAG (서열번호 3)
	역방향	ATCTGCAGTTTGGCTAACTCATCGGC (서열번호 4)
Tpr0787 C258S	정방향	GTGGATGCTTGCTCTATAGAA (서열번호 5)
	역방향	TTCTATAGAGCAAGCATCCAC (서열번호 6)

[0057] BV, PCB 또는 P Φ B를 생산하는 대장균에서 Tpr0787 단백질의 발현 및 순수분리

[0058] 형질전환된 단백질 발현용 대장균은 RM 액체배지(2% casamino acids, 1X M9 salts, 1mM MgCl₂, 0.2% Glucose, 및 0.1mM Thiamine) 100ml에 항생제 앰피실린(200 μ g/ℓ)와 카나마이신(50 μ g/ℓ)을 첨가하고 OD₆₀₀=0.1이 되도록 접종하여 OD₆₀₀=0.4~0.6이 될 때까지 37℃에서 배양하였다. LB배지 500ml에 RM배지 100ml에 키운 단백질 발현용 대장균을 섞어주고 FAC 25 μ M, ALA 25 μ M, IPTG 0.1mM, 앰피실린 200 μ g/ℓ, 카나마이신 50 μ g/ℓ를 첨가하여 28℃에서 1시간 배양하였다. 0.2% 아라비노스(arabinose)를 처리하여 28℃에서 5시간 배양한 뒤, 7,000rpm, 4℃에서 원심분리하여 단백질 발현용 대장균을 수확하고 -70℃에 세포를 냉동보관하였다. 단백질을 추출하는 모든 과정은 4℃, 암조건에서 수행하였다. 세포용해버퍼(50mM Tris (pH 7.85), 100mM NaCl, 10% Glycerol, 0.1% NP40) 20ml에 completeTM, EDTA-free 프로테아제 저해제 각테일 타블렛(Roche, 스위스) 0.5 타블렛, 0.1mM DTT를 첨가하여 1시간 30분가량 초음파 세포파쇄기로 단백질 발현용 대장균을 깨트린 후 15,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 상등액을 새 튜브에 옮겼다. 상등액에 Ni-NTA 아가로스 비드(QuiaGen, 독일) 500 μ l를 넣고 4℃ 암조건에서 1시간 30분간 섞어주어 단백질과 결합시켰다. 그 후 3,500rpm, 4℃에서 2분간 원심분리하여 단백질이 결합된 비드를 가라앉히고 상등액을 제거하였다. 단백질이 결합한 비드를 Poly-Prep 크로마토그래피 컬럼(Bio-Rad, 미국)에 옮겨 세척버퍼(50mM Tris (pH 7.85), 300mM NaCl, 10% Glycerol, 20mM imidazole, 0.1% NP40) 10ml를 5번 통과시켜 결합한 단백질외의 불순물을 제거하였다. 용출버퍼(50mM Tris (pH 8.0), 300mM NaCl, 250mM imidazole) 1.5ml를 통과시켜 단백질을 용출하고 Amicon Ultra centrifugal filter units 10K membrane(Millipore, 미국)을 이용해 원심분리 함으로써 단백질을 농축하였다. 분리된 순수한 단백질은 흡수 및 형광 스펙트럼을 측정하는데 사용하였다.

[0059] 전기영동 및 Zn²⁺ 블랏팅

[0060] 12% SDS-PAGE 겔을 제작하여 분리 정제된 단백질 3 μ l와 4X 샘플 버퍼 1 μ l를 섞어 100℃에서 5분간 가열하였다.

겔의 각 레인당 시료 $4\mu\text{l}$ 를 분주하고 120mV로 2시간 전기영동을 수행하였다. Zn^{2+} 블랏팅은 20mM Tris (pH 7.35), 20mM 아세트산아연 용액에 5분간 암조건에서 반응시킨 뒤 UV하에서 단백질 밴드를 확인하였다. 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie Brilliant Blue, CBB) 용액으로 1시간 염색한 뒤 탈색 용액으로 12시간 이상 반응시켰다.

[0061] 흡수 스펙트럼 측정

[0062] UV-vis spectrophotometer S-3100(Scinco, 한국) 기계를 이용하고 LabPro 소프트웨어를 이용하여 190~1100nm 영역에서 흡수되는 스펙트럼을 측정하였다. 초기값은 Tris(pH 8.0) 용액으로 설정하였다. 750nm의 값으로 영점 보정한 뒤 Origin 8.0 프로그램으로 300~800nm 내의 흡수 스펙트럼을 그렸다.

[0063] 실시예 1. 광수용체 TpR0787의 구조 분석

[0064] 톨리포스트릭스 남세균 피토크롬(cyanobacterial phytochrome) 중의 하나인 TpR0787 단백질은 아미노-말단에 PAS, GAF, 그리고 PHY 도메인을, 카복시-말단에 히스티딘 키나제(HKA)와 ATPase 도메인을 가지고 있음을 확인하였다(도 1A).

[0065] TpR0787 단백질의 아미노산 서열 정렬 결과, TpR0787 단백질은 발색단이 결합하는 GAF 도메인에 두 개의 시스테인 잔기를 갖는 이중 시스테인 피토크롬(dual-Cys phytochrome)임을 알 수 있었다. 일반적으로 피토크롬 GAF 도메인은 한 개의 시스테인 잔기를 갖고 있는데, 첫 번째 시스테인 잔기는 인접한 히스티딘과 함께 Cys-His(CH) 모티프를 갖는 것으로 알려졌다(Rockwell, N.C., and Lagarias, J.C. (2010) *ChemPhysChem* 11:1172-1180). TpR0787 단백질의 GAF는 노스톡 유래 TP1과 같이 CH 모티프 대신에 두 개의 시스테인 CC 모티프를 갖는다(도 1B). 전장 아미노산을 이용하여 현재까지 알려진 대표적인 피토크롬 6종을 대상으로 계통관계를 분석한 결과 노스톡 평티포르메의 TP1(trichromatic phytochrome 1)인 NpF1183과 자매그룹을 형성함을 보임으로써 TpR0787이 TP1과 유연관계가 매우 가까움을 알 수 있었다(도 1C).

[0066] 광센서 모듈 PAS-GAF-PHY 도메인(도 2A)의 빌린계 발색단과의 결합 유무를 시험하기 위하여, 본 발명자는 BV, PCB 혹은 PΦB를 생산하는 대장균 세포에서 상기 광센서 모듈을 발현시키고, 각 재조합 대장균주에서 분리된 단백질을 12% SDS-PAGE 겔에 전기영동하여 쿠마시 브릴리언트 블루 염색(CBB) 염색과 Zn^{2+} 블랏팅을 수행한 결과, PCB와 PΦB가 TpR0787 단백질의 광센서 모듈에 발색단으로 결합할 수 있음을 확인하였다(도 2B).

[0067] 실시예 2. TpR0787의 분광학적 특성 분석

[0068] 분리된 TpR0787 단백질을 고농도로 농축하여 광수용체로서 어떠한 파장의 빛을 흡수하는지 확인하고자 UV 분광광도계(spectrophotometer)를 이용하여 흡수 스펙트럼을 측정하였다. PCB를 발색단으로 갖는 바닥상태의 PAS-GAF-PHY-PCB(native 15Z)는 자색(402nm 피크)을 흡수하는 자색흡수형 피토크롬(Pv, violet absorbing phytochrome)이었다. Pv에 380nm의 자외선A(near UV-A)를 조사하면 오렌지색(602nm)을 흡수하는 오렌지색흡수형 피토크롬(native 15E, Po, orange absorbing phytochrome)으로 전환되었다(도 3). PΦB를 발색단으로 갖는 광센서 모듈 또한 청색/오렌지색 광호변성을 보였으나 PCB를 발색단으로 갖는 광센서모듈보다 15Z와 15E 상태에서 흡수 피크가 약 10nm 적색 편이(red-shift)되었다. 이러한 적색 편이는 D 피롤(pyrrole)의 C18의 작용기(functional group)의 차이에서 기인하는 것으로, PΦB는 C18의 작용기로 비닐(vinyl)기를 갖는 반면 PCB는 C18의 작용기로 에틸(ethyl)기를 가지고 있어서 공액사슬의 길이가 길기 때문에 장파장의 빛을 흡수할 수 있게 된 것이다. 비록 BV 발색단은 광센서 모듈과 공유결합을 하지는 못하지만 비공유결합 형태로 청색광(411-424nm)을 흡수하였다. 그러나 PCB 발색단이나 PΦB 발색단과 같은 광호변적 특성은 보이지 않았다(도 3). 노스톡 TP1은 자색(Pv)과 적색(Pr)을 흡수하는 형이며, Pv에서 Pr형으로의 전환에 빛 이외에 열에너지가 추가로 필요하다(점(Rockwell et al., (2011) *Proc Natl Acad Sci USA*, 108:11854-9)에서 본 발명의 TpR0787 단백질과는 차이점이 있었다.

[0069] 실시예 3. GAF 도메인의 두 번째 시스테인 잔기가 세린으로 치환된 TpR0787 C258S의 광호변성 분석

[0070] TpR0787 단백질의 GAF 도메인에는 PCB나 PΦB와 결합할 수 있는 시스테인 잔기가 257번째 및 258번째에 존재하였다. 첫 번째 시스테인은 남세균이나 고등식물 피토크롬에서 PCB나 PΦB와 결합이 이루어지는 CH 모티프에 매우 잘 보존되어진 시스테인 잔기인 반면 두 번째 시스테인 Cys258은 노스톡 TP1에서 발견되는 258 시스테인과 상응하는 잔기로서 PCB와의 결합을 통해서 자색빛 흡수를 가능하게 하였다. TP1과 같이 TpR0787에서 두 번째 시스테인 잔기 역시 PCB와 공유결합을 통해서 자색을 흡수함을 상기 실시예 2를 통해 알 수 있었다.

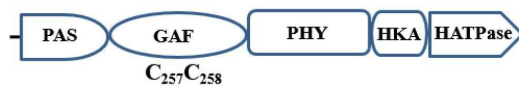
[0071] 발색단과 결합 환경을 결정하는 GAF 도메인에서 상기 두 번째 시스테인을 히스티딘 잔기로 치환한 Tpr0787 C258H 변이체는 자색을 흡수하는 대신에 적색을 흡수하는 형으로 확인되었다(도 4A). 흥미롭게도 본 발명에서는 두 번째 시스테인 잔기를 세린으로 치환시켰을 때 자색 대신 녹색(549 nm)을 흡수하는 15Z 바닥상태(Pg, green absorbing phytochrome)가 형성됨을 확인하였고, Tpr0787 C258S Pg형은 녹색광 조사에 의해서 적색을 흡수하는 Pr 형태(661 nm)로 전환됨을 알 수 있었다(도 4B).

[0072] 이상의 결과를 정리하여 보면, Tpr0787은 GAF 도메인의 257번과 258번 시스테인 잔기를 통해서 이중으로 PCB 발색단과 결합하며, 258번 시스테인이 청색 전이(blue-shifted)에 관여하는 것으로 판단되었다. 주목할 점은 258번 시스테인이 세린으로 치환될 경우 녹색/적색 광가역성을 유지함을 확인하였다.

도면

도면1

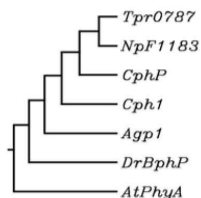
A. Tpr0787의 도메인 구조



B. N-말단 및 GAF 도메인 부위 아미노산 서열 비교

		N terminal Cys		CH motif			
Tpr0787	..MSQSEETN	AQKASLTNHD	RRAIHLPGSI	QPLDLSLSVL	RSVDA	CCIEF	HQNMGVGALL
NpF1183	..MSQPENTT	TQATALTNHD	RKPIHIPGSI	QHLDLSYCLL	RSFDW	CCAEY	HQNMGVKALL
CphP	ENSPENAATA	PFEVDLTNCD	REPIHIPGSI	QPTDLSHSVL	RSVSF	CHLEY	LHNMGVKASM
Cph1	...MATTVQ	LSDQSLRQLE	TLAIHTAHLI	RAVDLTESIL	RSAYH	CHLEY	LKNMGVGASL
Agp1	QERLEKVMSS	SHTPKLDS	AEPIHIPGAI	AVLDMSFSQL	RSVSF	CHLEY	MRNMGTAASM
DrBphP	LPFFPPLYLG	GPEITENC	REPIHIPGSI	APTPLGGAVL	RATSE	CHMQY	LRNMGVGSSL
AtPhyA	VTGPFVVENQF	PRSDRVTT	LHHIQKGKLI	FDLTLCGSTL	RAPH	CHLQY	MANMDSIASL

C. 계통도 분석



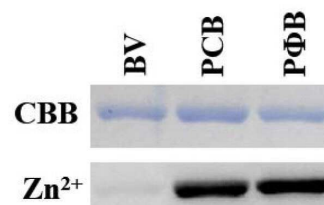
도면2

A

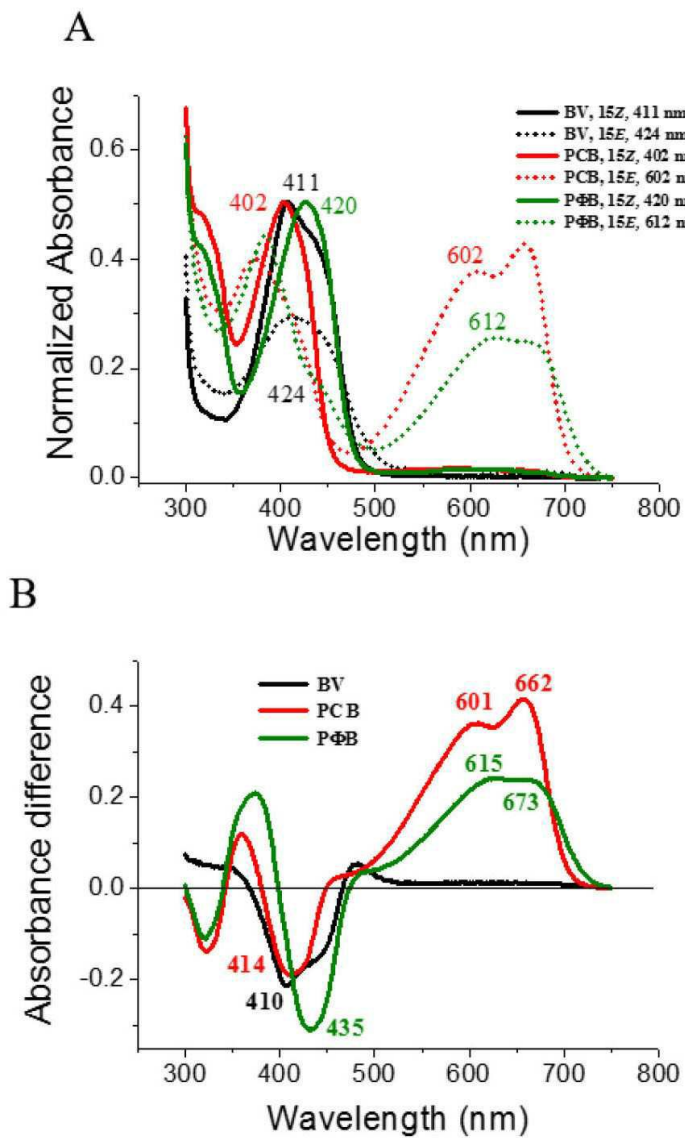
Tpr0787 photosensory domain



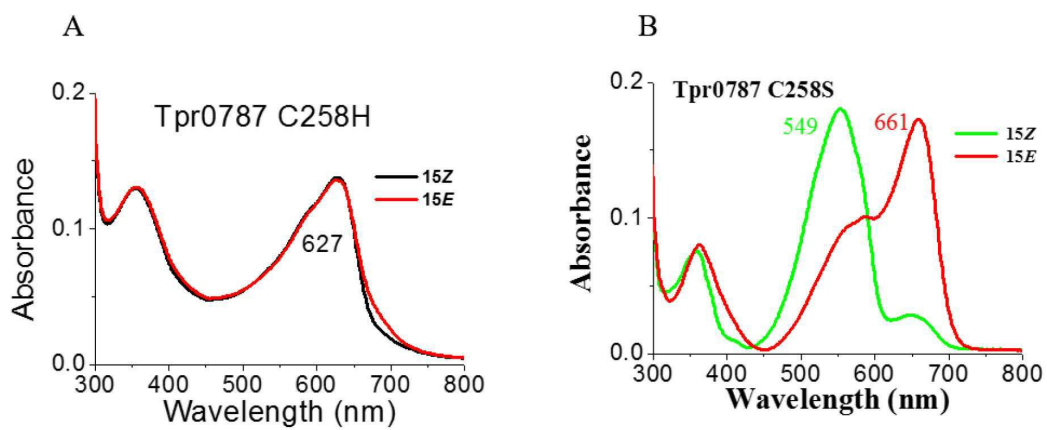
B



도면3



도면4



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
 <120> Violet/orange photointerconvertible phytochrome TpR0787 protein
 from cyanobacterium and uses thereof
 <130> PN16270
 <160> 6
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 2247
 <212> DNA
 <213> Tolypothrix PCC 7910
 <400> 1

```

atgagccagt cagaagagac caatgcccaa aaagcttctt tgactaacca cgatcgaga      60
gcgattcatc tacctggctc aatccaacct catggcgttt tactagcact gagttcccag      120

ttagagattc tgcaagttag taacaataca cagcaatact ttggcaaagc tacccaagat      180
ttgcttggtc aatctttaga cagcttattt gatgctcgac aaactgcaac tatcaagcag      240
tgctgggaaa aaaaatttgg tagtgtagt agttataaag tagcaatcat cactaatcat      300
caagaacaat tttttgattg cattgtccat cgcacagcag atgttttgat tgtggagtgt      360
gaggcgatag catctagttc agaaatcagt ttcttgagtt ttcattgcttt ggtgagtgt      420
gcgatcgccc aaatgcaacg catttctaata ccccagaat tcttgaattt ggtggctaca      480
gaagtccgca aaatcacagg gtttgaccga gtaatggtct atcaatttga tctgcaaggc      540

gctggtgctg tagttgcgga agccaaacga gaggatttat caccatattt gggactgcat      600
tatcccgcta cagatattcc tgcccaaagt agagatttat ataccgggtg tcaactccga      660
tttattccag atatcaatac tcaagcagtt aacttagtac caatagatca ccccatcagc      720
catcaacctc tggatttaag cttatctgta ctccaggagtg tggatgcttg ctgtatagaa      780
tttcatcaaa atatgggtgt gggggcgcta ttggtaatct cactgatgca ggaagggaag      840
ctttggggct taatatcttg tcatcatcac acaccaagt atcttcctta tgaagtacga      900
aaaatctgcg aatttctcgg acaaattgtc tcctcagagt tagcccacaa ggtgagtcac      960

tcggaatggg actatgaagt aaagctaaaa gcctccaat ctgacttttt agcctccatt      1020
tcccaagctg acaattttat cgatgctttg attaaaccag aaatccgctt gctggatatt      1080
gccagtgtt ctggtgcagc agtttgtttg gataatgaaa ttaccttggt ggggtgcaaca      1140
cccaatcttg agcaagtttg tgccttaatt gaatgggcag agactcaagt aggggaaaaat      1200
ttattttata ccgattcttt agccaagctt taccccgatg gggttgctct taaagatact      1260
    
```

gctagcggct tgttattgct gcggatttcg caagtgcggc gctattacat tctctggttt 1320
cgcccagaag tgatacaaac ggtaaatgg gcaggaaacc ccaatgcac tattgcctt 1380

gatgctgatg gtactgttac ctggggccg cgaaaatcct ttgccaaatg gcaggagacg 1440
gtgcaattaa cticcctacc ctggaacaa tcggaacttg atagtgcgat cgcactcaga 1500
aatgcgatcg tgggtattgt actttctaaa gccgatgagt tagccaaaat taacctagag 1560
ttagaacgca gtaaccgca acttagttct ttgcctacg ctgcatctca cgatttgaag 1620
gaacctttgc ggggtatcta taattactca actgtgctga tagaagacta cgcccatgta 1680
cttgatgctg aagcaattga gtatctagaa acagtagtca ccttatcagt gcggatggag 1740
gctttaatta atgctttgtt acgactggcg cagttaggaa aagcacaact acgtgccaaa 1800

gccattgata ttaacgaatt aatcacccaa gtaattgata tatttcatgc cagccgccaa 1860
tactctcagg ttttggatat tcgcatcct caacctttac caacaatttc atgtgacgct 1920
gttttggtaa acgaagtttt tagtaacttg attggcaatg cgttgaaata caacgataaa 1980
ccagaacaat ggggtggagat tggctatggc aaaggcgaaa attctgcact tatattttac 2040
gtgcgagata acggagtgg cattcccgaa catcatcgag aaactatctt ccgcttattt 2100
aagcgactcc actctcaaga aaaatttggc ggcggagtgt gtgccggatt agcaattgtt 2160
aagaaaattg tcgagatgca caacggccaa atttgggttg agtctactgt tggcgttggc 2220

tcaacgtttt attttacgct ggaatag 2247

<210> 2
<211> 748
<212> PRT
<213> Tolypothrix PCC 7910
<400> 2

Met Ser Gln Ser Glu Glu Thr Asn Ala Gln Lys Ala Ser Leu Thr Asn
1 5 10 15
His Asp Arg Arg Ala Ile His Leu Pro Gly Ser Ile Gln Pro His Gly
20 25 30
Val Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gln Leu Glu Ile Leu Gln Val Ser Asn
35 40 45
Asn Thr Gln Gln Tyr Phe Gly Lys Ala Thr Gln Asp Leu Leu Gly Gln
50 55 60
Ser Leu Asp Ser Leu Phe Asp Ala Arg Gln Thr Ala Thr Ile Lys Gln

65	70								75								80							
Cys	Trp	Glu	Lys	Asn	Ile	Gly	Ser	Val	Ser	Ser	Tyr	Lys	Val	Ala	Ile									
				85				90				95												
Ile	Thr	Asn	His	Gln	Glu	Gln	Phe	Phe	Asp	Cys	Ile	Val	His	Arg	Thr									
				100				105				110												
Ala	Asp	Val	Leu	Ile	Val	Glu	Leu	Glu	Ala	Ile	Ala	Ser	Ser	Ser	Glu									
				115				120				125												
Ile	Ser	Phe	Leu	Ser	Phe	His	Ala	Leu	Val	Ser	Asp	Ala	Ile	Ala	Gln									
				130				135				140												
Met	Gln	Arg	Ile	Ser	Asn	Leu	Pro	Glu	Phe	Leu	Asn	Leu	Val	Ala	Thr									
				145				150				155				160								
Glu	Val	Arg	Lys	Ile	Thr	Gly	Phe	Asp	Arg	Val	Met	Val	Tyr	Gln	Phe									
				165				170				175												
Asp	Leu	Gln	Gly	Ala	Gly	Ala	Val	Val	Ala	Glu	Ala	Lys	Arg	Glu	Asp									
				180				185				190												
Leu	Ser	Pro	Tyr	Leu	Gly	Leu	His	Tyr	Pro	Ala	Thr	Asp	Ile	Pro	Ala									
				195				200				205												
Gln	Ser	Arg	Asp	Leu	Tyr	Thr	Arg	Cys	Gln	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Asp									
				210				215				220												
Ile	Asn	Thr	Gln	Ala	Val	Asn	Leu	Val	Pro	Ile	Asp	His	Pro	Ile	Ser									
				225				230				235				240								
His	Gln	Pro	Leu	Asp	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Asp	Ala									
				245				250				255												
Cys	Cys	Ile	Glu	Phe	His	Gln	Asn	Met	Gly	Val	Gly	Ala	Leu	Leu	Val									
				260				265				270												
Ile	Ser	Leu	Met	Gln	Glu	Gly	Lys	Leu	Trp	Gly	Leu	Ile	Ser	Cys	His									
				275				280				285												
His	His	Thr	Pro	Lys	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Glu	Val	Arg	Lys	Ile	Cys	Glu									
				290				295				300												
Phe	Leu	Gly	Gln	Ile	Val	Ser	Ser	Glu	Leu	Ala	His	Lys	Val	Ser	His									
				305				310				315				320								
Ser	Glu	Trp	Asp	Tyr	Glu	Val	Lys	Leu	Lys	Ala	Leu	Gln	Ser	Asp	Phe									

325	330	335	
Leu Ala Ser Ile Ser Gln Ala Asp Asn Phe Ile Asp Ala Leu Ile Lys			
340	345	350	
Pro Glu Ile Arg Leu Leu Asp Ile Ala Ser Ala Ser Gly Ala Ala Val			
355	360	365	
Cys Leu Asp Asn Glu Ile Thr Leu Val Gly Ala Thr Pro Asn Leu Glu			
370	375	380	
Gln Val Cys Ala Leu Ile Glu Trp Ala Glu Thr Gln Val Gly Glu Asn			
385	390	395	400
Leu Phe Tyr Thr Asp Ser Leu Ala Lys Leu Tyr Pro Asp Gly Val Val			
405	410	415	
Phe Lys Asp Thr Ala Ser Gly Leu Leu Leu Leu Arg Ile Ser Gln Val			
420	425	430	
Arg Arg Tyr Tyr Ile Leu Trp Phe Arg Pro Glu Val Ile Gln Thr Val			
435	440	445	
Asn Trp Ala Gly Asn Pro Asn Ala Ser Ile Arg Leu Asp Ala Asp Gly			
450	455	460	
Thr Val Thr Leu Gly Pro Arg Lys Ser Phe Ala Lys Trp Gln Glu Thr			
465	470	475	480
Val Gln Leu Thr Ser Leu Pro Trp Lys Gln Ser Glu Leu Asp Ser Ala			
485	490	495	
Ile Ala Leu Arg Asn Ala Ile Val Gly Ile Val Leu Ser Lys Ala Asp			
500	505	510	
Glu Leu Ala Lys Ile Asn Leu Glu Leu Glu Arg Ser Asn Arg Glu Leu			
515	520	525	
Ser Ser Phe Ala Tyr Ala Ala Ser His Asp Leu Lys Glu Pro Leu Arg			
530	535	540	
Gly Ile Tyr Asn Tyr Ser Thr Val Leu Ile Glu Asp Tyr Ala His Val			
545	550	555	560
Leu Asp Ala Glu Ala Ile Glu Tyr Leu Glu Thr Val Val Thr Leu Ser			
565	570	575	

Val Arg Met Glu Ala Leu Ile Asn Ala Leu Leu Arg Leu Ala Gln Leu
580 585 590
Gly Lys Ala Gln Leu Arg Ala Lys Ala Ile Asp Ile Asn Glu Leu Ile
595 600 605
Thr Gln Val Ile Asp Ile Phe His Ala Ser Arg Gln Tyr Ser Gln Val
610 615 620

Leu Asp Ile Arg Ile Pro Gln Pro Leu Pro Thr Ile Ser Cys Asp Ala
625 630 635 640
Val Leu Val Asn Glu Val Phe Ser Asn Leu Ile Gly Asn Ala Leu Lys
645 650 655
Tyr Asn Asp Lys Pro Glu Gln Trp Val Glu Ile Gly Tyr Gly Lys Gly
660 665 670
Glu Asn Ser Ala Leu Ile Phe Tyr Val Arg Asp Asn Gly Val Gly Ile
675 680 685
Pro Glu His His Arg Glu Thr Ile Phe Arg Leu Phe Lys Arg Leu His

690 695 700
Ser Gln Glu Lys Phe Gly Gly Gly Val Gly Ala Gly Leu Ala Ile Val
705 710 715 720
Lys Lys Ile Val Glu Met His Asn Gly Gln Ile Trp Val Glu Ser Thr
725 730 735
Val Gly Val Gly Ser Thr Phe Tyr Phe Thr Leu Glu
740 745

<210> 3
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer
<400> 3

ccgctcgaga atgagccagt cagaagag

28

<210> 4
<211> 27
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

atctgcagtt ttggctaact catcggc

27

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gtggatgctt gctctataga a

21

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ttctatagag caagcatcca c

21