



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0053827

(43) 공개일자 2007년05월28일

(21) 출원번호 10-2005-0111514

(22) 출원일자 2005년11월22일

심사청구일자 2007년04월12일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 김경현
경기 성남시 분당구 정자동 121 상록마을 우성아파트 310-1305
이호정
서울 강동구 명일동 고덕현대아파트 13-306호
이윤숙
인천광역시 부평구 부평1동 대림아파트 11동 214호
고은지
전북 군산시 중앙로1가 6-11번지
이희진
경기 안산시 상록구 사동 1345-1 요진아파트 203동 101호
박진섭
인천광역시 연수구 동춘동 925-7 삼환아파트 113동 705호
박천석
경기 성남시 분당구 수내동 양지마을한양아파트 521동 503호
이성준
서울 강남구 청담동 삼성청담공원아파트 104동 402호

(74) 대리인 현중철

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 애기장대 유래 익스팬신 유전자

(57) 요약

본 발명은 셀룰로스를 확장시키는 활성이 있는 애기장대 유래 익스팬신 단백질 유전자, 이를 포함하는 재조합 벡터 및 이를 이용한 대장균에서의 익스팬신 단백질의 발현 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 미생물에서 과발현된 식물유래 재조합 익스팬신을 손쉽게 대량생산하는 방법을 개발함으로써 익스팬신 단백질을 세포벽의 주성분인 셀룰로스의 확장 활성을 조사하고 여러 가지 섬유소에 대한 셀룰라제의 효소작용을 향상시키는 단백질로서의 이용할 수 있다.

대표도

도 4a

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1 내지 5중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 익스펜신 유전자.

청구항 2.

제 1항의 익스펜신 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 도 2의 개열지도를 갖는 pET-14b 벡터의 NdeI-BamHI (510-526) 부위에 제 1항에 따른 익스펜신 유전자가 삽입된 도 4a 내지 4e중 어느 하나의 개열지도를 갖는 재조합 벡터.

청구항 4.

제 2항 또는 제 3항의 재조합 벡터가 도입된 형질전환체.

청구항 5.

제 2항 또는 제 3항에 따른 재조합 벡터를 대장균에 도입하는 단계, 상기 도입된 대장균을 배양하는 단계, 및 상기 익스펜신 유전자를 발현시키는 단계, 및 상기 발현된 익스펜신을 정제하는 단계를 포함하는 익스펜신의 제조방법.

청구항 6.

제 1항에 따른 익스펜신 유전자 또는 그로부터 발현된 익스펜신 단백질을 유효성분으로 포함하는 셀룰로스 확장 활성 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 셀룰로스를 확장시키는 활성이 있는 애기장대 유래 익스펜신 단백질 유전자, 이를 포함하는 재조합 벡터 및 이를 이용한 대장균에서의 익스펜신 단백질의 발현 방법에 관한 것이다.

식물은 세포벽이라는 매우 단단한 골격을 가지고 있는데 이는 셀룰로오스 섬유와 당 (carbohydrates), 펙틴, 단백질 혼합체의 겔 매트릭스로 이루어져 있다(Cosgrove, D. J., 1999, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 391-417; Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M., 1993, Plant J. 3:1-30). 세포벽의 단단한 구성성분에도 불구하고 실제로 식물세포는 자동차 타이어의 공기압보다 5 배정도 더 큰 내부압력을 견딜 수 있다고 알려져 있는데 이러한 팽창은 식물세포벽에 존재하는 식물세포벽확장 단백질인 익스팬신(expansin)의 기능에서 기인한다(Cosgrove, D. J., 1999, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.; Carpita, N. C. and Gibeaut, D. M., 1993, Plant J. 3: 1-30; Macqueen-Mason, S. and Cosgrove, D. J., 1995, Plant Physiol. 107: 87-100; Marga, F. et al., 2005, Plant J. 43:181-190).

익스팬신은 세포벽에 있는 겔 매트릭스와 셀룰로오스 섬유 간의 수소결합을 약화시키는 기능을 한다. 즉, 익스팬신이 세포벽에 다량 존재할 경우 셀룰로오스 섬유의 직접적 가수분해 없이도 식물세포가 팽창될 수 있는 기작을 제공하게 됨을 의미한다. 익스팬신은 염기서열 유사성과 효소 활성에 따라 크게 α -와 β -형태의 두개의 family로 나뉘어진다(Cosgrove, D. J., 1999, Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 50:391-417). McQueen-Mason과 Cosgrove는 익스팬신을 오이 줄기에 처리할 경우 줄기의 길이가 단 6 시간 내에 2 배로 늘어나는 것을 확인하였는데 이것이 최초로 익스팬신의 기능을 단적으로 보여준 실험결과라 하겠다. 익스팬신의 기능은 그 후로도 계속 연구가 되어왔는데 최근에는 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)라는 모델식물을 비롯한 여러 다른 식물을 이용하여 많은 연구가 이루어지고 있다 (Vreeburg R. A. et al., 2005, Plant J. 43:597-610; Marga, F., 2005, Plant J. 43:181-190; Jones L. and McQueen-Mason S., 2004, FEBS Lett. 559:61-65; Zenoni, S. et al., 2004, Plant Cell 16:295-308).

애기장대의 경우 특히, *AtEXP10*와 같은 세포벽확장 단백질은 애기장대 식물에 이 유전자를 과발현시키거나 그 발현을 억제시켰을 경우, 식물세포벽 확장에 큰 문제를 초래하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 애기장대라는 식물 역시 그의 세포벽 확장에 이 단백질을 이용하고 있음을 보여주는 결과이다. 흥미롭게도, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 게놈에는 30 여종 이상의 익스팬신 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있으며(Kende, H. et al., 2004, Plant Mol Biol. 55:311-314) bryophyte를 비롯한 다른 여러 식물에도 존재하는 것으로 알려져 있다(Hutchison, K. W. et al., 1999, Plant Physiol. 120:827-832; Cosgrove, D. J., 2000, Curr. Opin. Plant Biol. 3:73-78; Chanliaud, E., 2004, Plant J. 38:27-37). 그러나 유사유전자의 경우는 그 구체적인 세포벽확장에 있어서의 기능 및 그 활용에 대한 연구가 아직 미비한 실정이다. 한편, 곰팡이에서도 익스팬신과 유사한 스왈레닌(swollenin)이라는 단백질이 셀룰로스의 수소결합을 끊어서 셀룰로스의 구조를 느슨하게 하여 셀룰라제가 작용을 잘 하도록 도울 가능성이 있다는 보고도 있다(Saloheimo, M. et al., 2002, Eur. J. Biochem. 269: 4202-4211).

이에, 본 발명자들은 익스팬신 단백질을 여러 가지 섬유소에 대한 셀룰라제의 효소작용을 향상시키는 단백질로서의 이용하고자 예의 연구노력한 결과, 애기장대에 존재하는 익스팬신 유전자들 중 5 종을 선별하여 단백질발현 벡터에 클로닝하고 최종적으로 순수 단백질로 분리한 다음 각각의 세포벽확장 활성을 조사함으로써 미생물에서 과발현된 식물유래 재조합 익스팬신을 손쉽게 대량생산하는 방법을 개발하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서, 본 발명의 주된 목적은 애기장대 유래 익스팬신 유전자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 형질전환체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환체를 이용하여 익스팬신을 대량으로 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 익스팬신 유전자 및 단백질의 셀룰로스 확장 활성의 새로운 용도를 제공하는 데 있다.

발명의 구성

본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1 내지 5중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 익스팬신 유전자를 제공한다.

본 발명에서, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 expansin family 단백질 중 총 5 종의 유전자를 pGEM vector에 클로닝하고 그 염기서열을 결정하였다. 서열번호 1은 Exp3의 cDNA 염기서열이고, 서열번호 2는 Exp10의 cDNA 염기서열이고, 서열번호 3은 Exp11의 cDNA 염기서열이고, 서열번호 4는 ExpB1의 cDNA 염기서열이고, 서열번호 5는 ExpB4의 cDNA 염기서열이다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 본 발명의 재조합 벡터는 상기 익스팬신 유전자를 발현시킬 수 있는 종래 알려진 어떠한 발현 벡터, 예컨대 pGEM vector 또는 pET-14b vector도 가능하다.

본 발명에서, 바람직하게는 도 2의 개열지도를 갖는 pET-14b 벡터의 NdeI-BamHI (510-526) 부위에 본 발명의 익스팬신 유전자가 삽입된 도 4a 내지 4e 중 어느 하나의 개열지도를 갖는 재조합 벡터를 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 본 발명의 재조합 벡터가 도입된 형질전환체를 제공한다. 본 발명의 형질전환체는 익스팬신의 발현을 원하는 어떤 숙주세포도 가능하나, 바람직하게는 이를 대량으로 발현할 수 있는 대장균인 것을 특징으로 한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 본 발명의 재조합 벡터를 대장균에 도입하는 단계, 상기 도입된 대장균을 배양하는 단계, 및 상기 익스팬신 유전자를 발현시키는 단계, 및 상기 발현된 익스팬신을 정제하는 단계를 포함하는 익스팬신의 제조 방법을 제공한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 본 발명의 익스팬신 유전자 또는 그로부터 발현된 익스팬신 단백질을 유효성분으로 포함하는 셀룰로스 확장 활성 조성물을 제공한다. 상기 익스팬신 유전자는 발현을 위한 적절한 벡터에 삽입된 채로 존재할 수 있다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

실시예 1: 애기장대로부터 RNA의 추출

각각의 익스팬신 cDNA를 얻기 위하여 total RNA를 추출하였다. 우선, 애기장대 식물을 3 주 동안 2%의 sucrose와 MS (Murashige-Skoog)가 포함된 고체배지(0.6% phyto-agar)에서 키운 다음 조직 전체를 액체질소에서 파쇄하였다. 약 100 mg의 식물 조직에 1 mL의 Trizol 용액을 첨가하여 10 분 동안 상온에 둔 다음 10,000g에서 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액에 100% 에탄올을 첨가한 뒤 원심분리로 얻은 침전물을 70% 에탄올로 세척한 뒤 건조시켰다.

실시예 2: 익스팬신 cDNA 합성

이 침전된 total RNA를 증류수로 녹인 뒤 Reverse transcriptase와 oligo-dT를 이용하여 first strand cDNA를 합성하였다. 각각의 익스팬신 cDNA를 합성하기 위하여 EXP3, EXP10, EXP11, EXPB1, EXPB4 유전자에 대한 primer를 Arabidopsis database(TAIR)에서 조사하여 제작하였다.

아래 표 1은 이들 유전자의 클로닝에 필요한 primer의 염기서열을 나타낸다. 이들 primer는 차후 pET14b vector로의 클로닝을 용이하게 하기 위하여 Forward primer에는 제한효소 NdeI site를 reverse primer에는 제한효소 BamHI site를 삽입하였다. 또한, forward primer에는 각 유전자의 start codon인 ATG를 Reverse primer에는 stop codon까지를 포함시켜 제작하였다. 기 제작된 cDNA first strand에서 각 primer로 얻은 PCR product를 전기영동으로 분리하여 얻은 결과를 그림 2에 나타내었다. 그림 2에서 얻어진 PCR product를 우선 클로닝이 쉬운 pGEM vector(Promega, USA)에 삽입하였다. 도 1은 익스팬신 유전자 클로닝을 위한 PCR 반응 산물의 전기영동 결과이다.

[표 1] 익스팬신 유전자 클로닝을 위한 primer 염기서열

Genes	Forward Primer	Reverse Primer
Exp3	AGCCATATGACGGCGACTGCGTT	GGGATCCTCAGACTCGAAAGTT
Exp10	AGCCATATGGGTTCATCTTGGGTT	GGGATCCTTAACGGAAGTGTCC
Exp11	AGCCATATGTCAAAGTCTCTAGC	GGGATCCTTAAAGTGAACGTT
ExpB1	AGCCATATGCAGCTCTTCCGGT	GGGATCCTTAGAGAACAGGGGA
ExpB4	AGCCATATGGCATCATCACAAG	GGGATCCTTAAAGTTAACAAT

실시예 3: PCR product의 염기서열 결정

보통의 PCR 반응에서 생길 수 있는 돌연변이를 없애기 위해 5 종의 플라스미드 염기서열을 모두 확인하였다. 이때에는 T7 promoter의 염기서열을 이용하여 염기서열을 결정하였고 그 결과의 익스팬신 유전자의 염기서열 (EXP3, EXP10, EXP11, EXPB1, EXPB4)을 각각 서열번호 1 내지 5로 나타내었다.

실시예 4: 익스팬신 유전자의 pET-14b 및 pGEX vector로의 삽입

pGEM vector에 클로닝된 위 5 종의 익스팬신 유전자로부터 단백질을 발현시키기 위해 각각의 insert를 pET14b vector에 옮겨 클로닝하였다. 이 pGEM vector에는 도 2에 제시된 pET14b vector로 클로닝할 수 있는 restriction enzyme site의 결여로 인하여 애초에 본 연구진은 이들 유전자의 클로닝에 사용한 primer에 미리 NdeI 과 BamHI site를 포함시켜 제작하였다. pGEM vector에 들어있는 각각의 익스팬신 cDNA를 NdeI 과 BamHI restriction으로 분해한 뒤 pET14b vector(Novagen, Germany)의 동일 위치인 Multiple cloning site의 NdeI-BamHI (510-526)에 이를 클로닝하였다. 클로닝 후에 pET14b vector에서 in-frame으로 발현이 되어야 우리가 목적하는 단백질을 발현시킬 수 있으므로(in-frame으로 클로닝되지 않으면 전혀 다른 단백질로 발현이 됨) 그의 염기서열을 다시 한번 결정하여 이를 확인하였다(이때에는 pET14b vector에 내재된 T7 promoter primer를 이용하여 염기서열을 결정하였다).

결론적으로, pET14b vector에 클로닝된 EXP3, EXP10, EXP11, EXPB1, EXPB4 유전자는 in-frame으로 제대로 클로닝되었음을 확인할 수 있었다. 아래 도 3에서 보는 바와 마찬가지로 pET14b vector는 히스티딘 아미노산을 표지인자로 달고 있는 vector 시스템으로 차후의 단일 익스팬신의 순수 분리에 용이하게 사용되어질 수 있을 것으로 생각된다. 단백질 발현을 위해 자주 이용되는 또 하나의 vector인 pGEX vector의 효율성을 또한 검증하기 위해 현재 EXP3 유전자의 경우는 pGEX vector의 GST 유전자 뒤에 in-frame으로 클로닝을 하였고, 또한 pET14b vector에도 in-frame으로 클로닝을 완료하였다.

도 2는 익스팬신 유전자의 발현벡터인 pET14b 벡터의 개열지도이고, 도 3은 익스팬신 유전자의 발현벡터 일부인 Multiple cloning sites의 염기서열이다. pET-14b vector는 Expansin 단백질에 His(6) Tagging되어 Ni²⁺ column으로 익스팬신만 순수 분리 정제할 수 있다. 도 4a 내지 4e는 5 종류의 익스팬신 유전자를 클로닝한 재조합 익스팬신 유전자 발현벡터의 모식도로서, 제한효소 위치와 익스팬신 유전자의 위치를 표시하였다. 이 벡터에 있는 항생제 Ampicillin에 대한 저항성을 이용하여 클로닝을 하였다.

실시예 5: 익스팬신 유전자(alpha/beta형)의 대장균 시스템에서의 발현

익스팬신 유전자 클로닝이 완료되었으므로 그 다음단계로서 이들 단백질을 과 발현시키는 단계의 실험을 수행하였다. 우선, 상기와 같이 클로닝된 익스팬신 유전자가 들어있는 플라스미드를 대장균 균주 BL21에 삽입한 후 16 시간 동안 37도에서 배양하였다. 배양 후 IPTG의 농도를 달리하고 그 유도시간을 달리하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

도 5에서 pGEX vector에 클로닝된 EXP3의 경우로서 IPTG로 유도된 단백질의 크기가 46kd에 달하는 것을 알 수 있었다. 즉, 약 26 kd의 EXP3과 약 20 kd의 GST (glutathione-S-transferase)가 융합된 단백질이 합성될 것이므로 약 46 kd에 달하는 단백질을 얻을 수 있게 되는 것이다. IPTG를 2 mM로 4시간 처리하였을 때가 EXP3이 가장 많이 발현되는 것으로 나타났다. pET14b vector에 클로닝된 EXP3의 경우는 위와 똑 같은 실험을 수행한 결과 도 6과 같은 결과를 얻었다. 그러나, 이 vector는 GST로 tagging된 vector가 아니기 때문에 발현된 단백질의 크기가 원래 예측할 수 있는 익스팬신의 크기로 발현됨을 확인하였다. EXP3의 경우는 16 시간 배양 후 1 mM IPTG로 3 시간 유도하였을 때가 가장 발현이 많이 되는 것으로 나타났다. EXP10, EXP11, EXPB1, EXPB4의 경우도 이와 유사한 결과를 보이는 것으로 나타났다 (data not shown). 도 5는 pGEX vector를 이용한 익스팬신 (EXP3) 발현 조건을 나타낸 사진이다. 도 6은 pET14b vector를 이용한 익스팬신 (EXP3) 발현 조건을 나타낸 사진이다. 도 5와 도 6을 비교하여 보면 pET14b vector의 사용이 훨씬 더 많은 단백질을 발현시키는 것으로 나타났다.

실시예 6: 대장균 내 발현 재조합 익스팬신 셀룰로스 확장활성 조사

일반적으로 익스팬신은 순수 셀룰로스로 만들어진 여과지(filter paper)에 반응시켰을 경우 여과지를 늘이는 활성을 보이면 이러한 활성은 식물체내 세포벽을 확장시키는 것과 동일한 작용에 의한 것으로 추측된다(McQueen-Mason et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 6574-6578). 따라서 본 실험에서는 대장균 내 발현된 애기장대 유래 재조합 익스

팬신이 셀룰로스 확장활성(extension activity)이 있는지를 알아보기 위하여 여러 식물체로부터 분리된 익스팬신의 여과지(Whatman filter paper)를 이용하여 확장활성도와 비교측정하였다. 이를 위하여 우선 이들 식물체를 액체질소에서 급게 파쇄하였다. 그 후, 1g의 마쇄된 조직에 3 mL ice-cold buffer A (50mM Hepes[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], pH 7.0, 5mM DT, 3 mM sodium metabisulfite, 2mM EDTA, 0.1% [w/v] polyvinylpyrrolidone [분자량 40,000], and 0.1% [v/v] Triton X-100)를 넣은 뒤 10,000g에서 30 분간 원심분리를 하였다. 침전물을 ice-cold distilled water로 씻은 뒤 buffer B(500 mL, 50mM hepes, pH 7.0)를 첨가한 뒤 1도에서 12 시간 동안 교반하였다.

위와 동일하게 원심분리한 뒤에 상등액을 회수하고, 나머지 침전물은 다시 100 mL의 buffer B로 재차 추출한 후(1도에서 2 시간) 원심분리시킨 후 얻은 상등액을 앞의 상등액과 합하였다. 이 용액에 ammonium sulfate(0.4g/mL)를 첨가하여 1도에서 16 시간동안 stirring을 하였다. 이 요액을 원심분리한 후(10,000g, 30분) 상등액은 버리고 남은 침전물을 가능한 최소부피의 buffer C(sodium chloride를 제외한 buffer B 조성)에 녹였다. 회수된 단백질의 양을 BSA standard assay로 이용하여 정량한 다음 신장계(extensometer)를 이용하여 세포벽확장활성을 조사하였다.

Constant-load extensometer를 이용하였고 사용한 샘플의 대략적 양은 다음과 같다. 사용한 식물체의 종류는 벼, 오이, 콩 이며 사용한 단백질의 양은 약 10²g/?L이다. 각각의 추출된 단백질을 50 mM sodium acetate(pH 4.5)와 1:1의 비율로 혼합한 다음 와트만 여과지(3MM Whatman filter paper)를 사용하여 확장능을 조사하였다(Macqueen-Mason, S. and Cosgrove, D. J., 1995, Plant Physiol. 107: 87-100). constant-load extensometer는 25 N의 load cell로 구성된 모델이었다. 이 load cell은 세포벽 확장능을 조사하기에는 약간 무거운 것으로 나타났으나 본 실험에서도 기존의 다른 연구진에 의해 알려진 바와 같은 대략적 결과를 얻을 수 있었다 (도 7). 도 7은 여과지를 이용한 익스팬신의 셀룰로스확장 활성을 비교한 그래프이다. (예기장대: 예기장대유래 대장균 내 발현된 재조합 세포벽확장 단백질, EXP3) 즉, 식물 종류에 따라 약간의 차이는 있으나 3MM whatman paper를 확장시키는 정도가 오이가 벼에 비해 약 2.2 배 정도 더 증가함이 밝혀졌다 (1.6 시간째).

실시에 7: 고탄성 익스팬신 유전자(alpha/beta형)의 탐색

식물은 여러 종류의 다양한 익스팬신 유전자를 가지고 있다. 예기장대의 경우 만 해도 그 종류가 수 십 가지에 달하는 것으로 알려져 있다. 본 연구팀은 이러한 사실에 착안하여 이미 클로닝된 유전자의 단백질 기능 검정과 더불어 새로운 유전자를 확보하는 방법의 일환으로 RT-PCR 반응을 수행하였다. 즉, 이미 알려진 여러 종류의 익스팬신 유전자(예기장대 유래)의 염기서열로부터 primer를 제작하였다. 그 다음, 잘 자란 예기장대 식물을 고염스트레스를 처리한 뒤 total RNA를 추출하고 이로부터 cDNA를 만든 다음 위 primer로 RT-PCR 반응을 수행하였다. 아래 도 8은 고염 스트레스를 처리한 식물조직으로 실시한 RT-PCR 반응의 결과를 나타낸다. 특이할 만한 사항은 이들의 발현이 고염 스트레스에 대해 각각 다른 양상을 보인다는 것이었다. 즉, EXPB1은 정상 조건에서는 잘 발현이 되다가도 고염스트레스에서는 발현이 감소하는 것으로 나타났다. 식물은 정상적인 성장 조건에 문제가 있다고 파악될 경우 성장을 멈추고 환경스트레스에 대비하기 위한 조절 단계로 넘어간다. 즉, 이 익스팬신 유전자의 경우는 세포성장에 크게 기여하고 있을 것이라고 가정해볼 수 있다. 아래의 결과로 미루어 볼 때 이러한 다양한 익스팬신 유전자들 중에서도 EXPB1의 경우 그 발현이 고염스트레스에서 현저히 증가하는 것으로 세포 팽창의 주된 활성에 관여하고 있을 것이라 추측할 수 있다. 본 실험에 사용된 primer는 예기장대 뿐만 아니라 우수한 식물세포벽 확장능을 가지고 있는 것으로 고려되는 오이를 포함한 여러 다른 식물체에서 새로운 익스팬신을 탐색하는데 중요한 재료로 사용될 것이다. 도 8은 익스팬신 유전자의 고염 스트레스 처리 시 발현 양을 나타낸 사진이다. (1: 정상조건에서 키운 식물, 2: 200mM NaCl 배지에서 3시간 배양한 식물, 3:200mM NaCl 배지에서 6시간 배양한 식물, 4: 200mM NaCl 배지에서 12시간 배양한 식물, 5: 300mM NaCl 배지에서 3시간 배양한 식물, 6: 300mM NaCl 배지에서 6시간 배양한 식물, 7: 300mM NaCl 배지에서 12시간 배양한 식물)

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 미생물에서 과발현된 식물유래 재조합 익스팬신을 손쉽게 대량생산하는 방법을 개발함으로써 익스팬신 단백질을 세포벽의 주성분인 셀룰로스의 확장 활성을 조사하고 여러 가지 섬유소에 대한 셀룰라제의 효소작용을 향상시키는 단백질로서의 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 익스팬신 유전자 클로닝을 위한 PCR 반응 산물의 전기영동 결과이다.

도 2는 익스팬신 유전자의 발현벡터인 pET14b 벡터의 개열지도이다.

도 3은 익스팬신 유전자의 발현벡터 일부인 Multiple cloning sites의 염기서열이다.

도 4a 내지 4e는 5 종류의 익스팬신 유전자를 클로닝한 재조합 익스팬신 유전자 발현벡터의 모식도

도 5는 pGEX vector를 이용한 익스팬신 (EXP3) 발현 조건을 나타낸 사진이다.

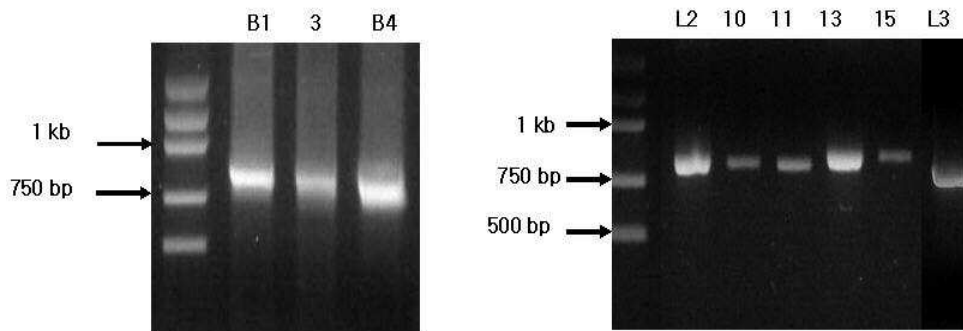
도 6은 pET14b vector를 이용한 익스팬신 (EXP3) 발현 조건을 나타낸 사진이다.

도 7은 여과지를 이용한 익스팬신의 셀룰로스 확장 활성을 비교한 그래프이다.

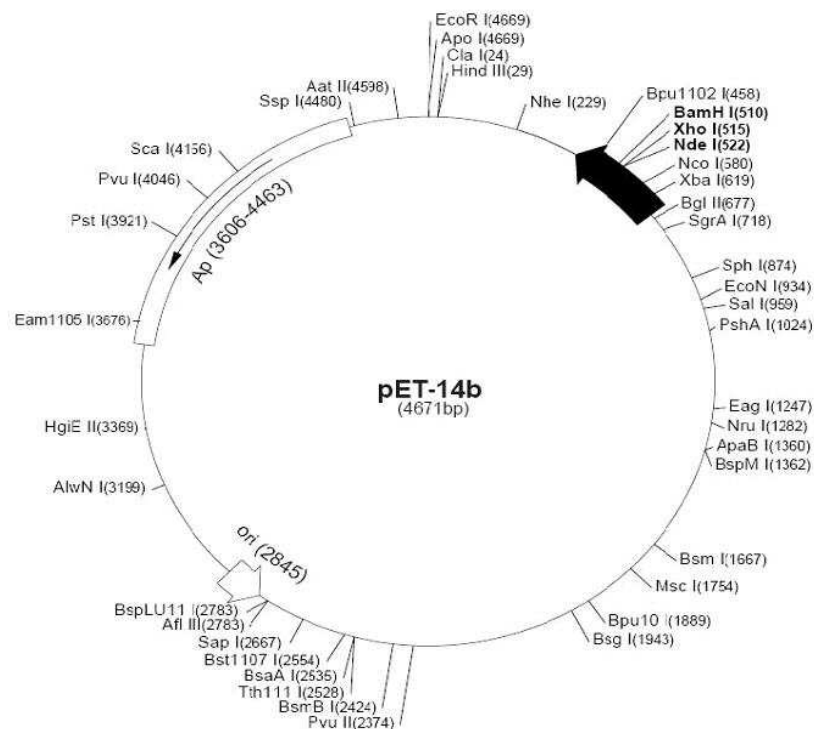
도 8은 익스팬신 유전자의 고염 스트레스 처리 시 발현 양을 나타낸 사진이다.

도면

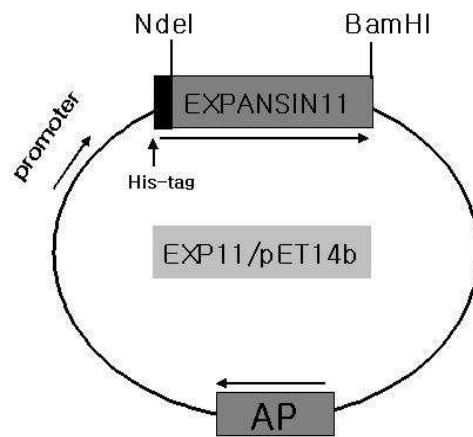
도면1



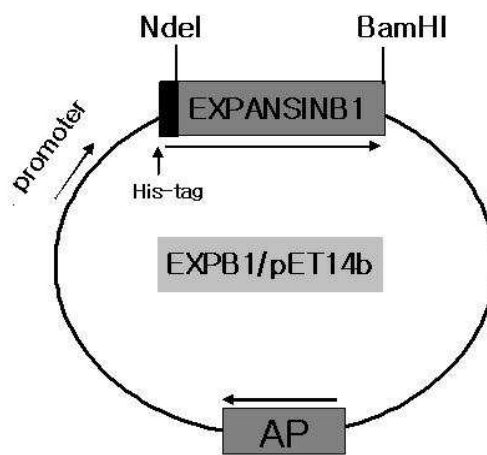
도면2



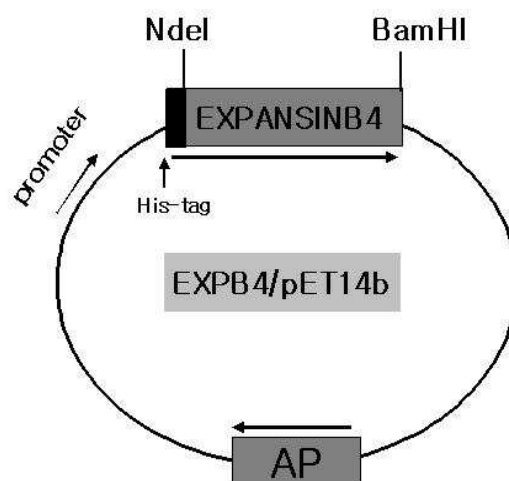
도면4c



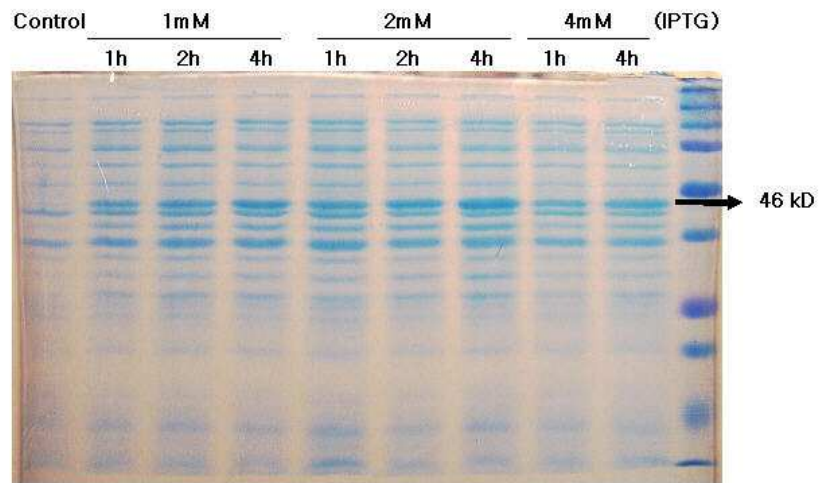
도면4d



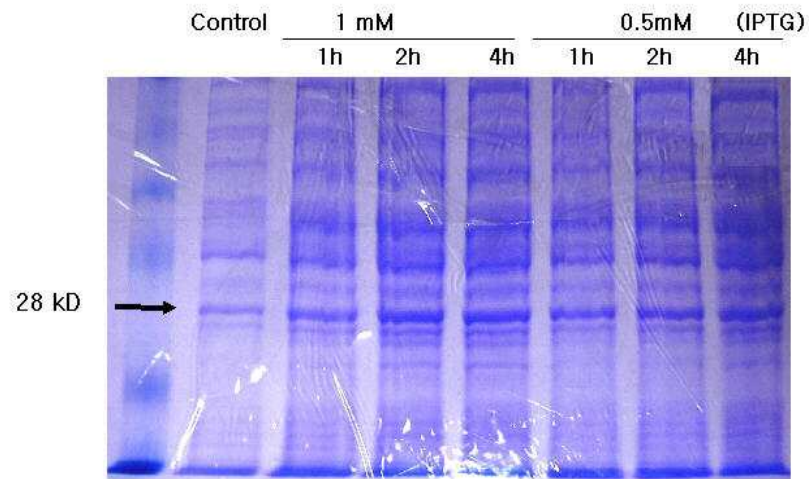
도면4e



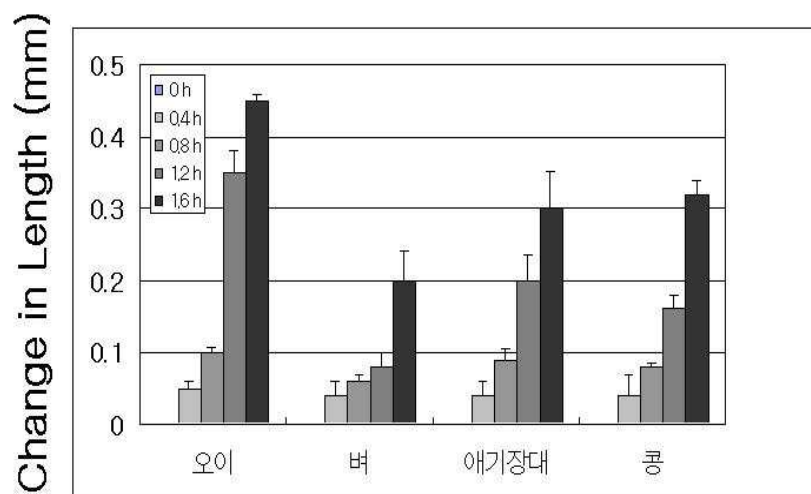
도면5



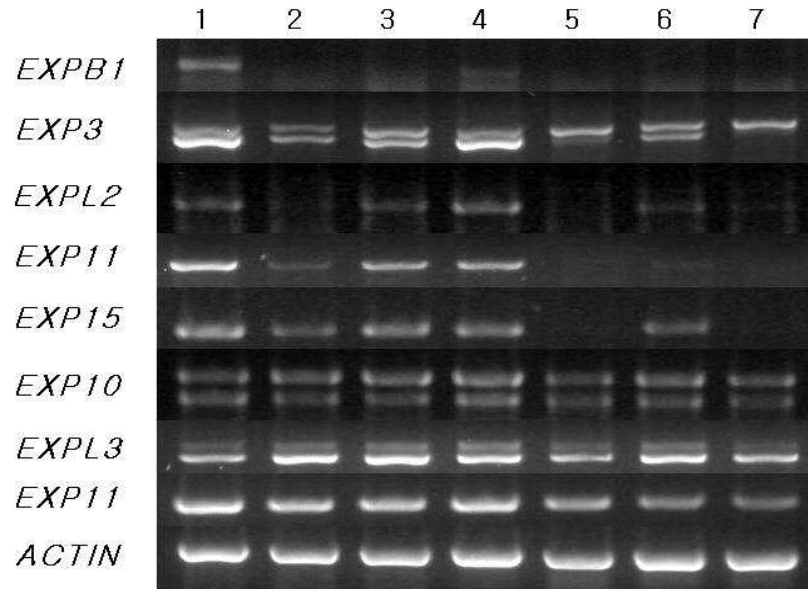
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> Expansin genes derived from Arabidopsis thaliana

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 789

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

```

atgacggcga ctgcgttttag ggtcggcttg tggttggccg ttacggcttc ctttctctta      60
accgcaacaa acgccaaaat ccccggcgtt tacagtggcg gaccgtggca gaatgcacac      120
gccactttct acggtggcag tgacgcctcc ggcacaatgg gcggcgcgctg tgggtacggg      180
aacttgtaaa gccaaggata cgggtgtgaac acggcggcgt tgagcactgc tttgttcaac      240
aacggattca gctgtggtgc ttgttttgag attaagtgtg ctgatgatcc gagatggtgt      300
gttccgggaa atccatctat tcttgtgacg ggcacgaact tttgtccgcc gaattttgct      360
cagccgagtg acgacggagg gtggtgcaat ccgccgcgcg agcattttga tctcgccatg      420
cctatgttcc tcaagatcgg tctataaccg gcaggcattg tccccgtctc ctatcgcagg      480

```

gtaccttgtc ggaagatagg agggataaga ttcacagtaa acggattcag atacttcaat 540
 cttgttcttg taactaacgt tgccggcgcc ggagatatta acggagttag cgtaaaggga 600
 tcaaagacag attgggtgag gatgagtcgg aactggggac agaactggca atccaacgcc 660
 gttctcatcg gccaatcact ctctttccga gtcaccgcct ctgaccgacg ttcttctacc 720
 tcatggaacg ttgctcctgc cacgtggcag tttggtcaga ctttctccgg caaaaacttt 780
 cgagtctga 789

<210> 2
 <211> 750
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 2
 atgggtcatc ttgggttctt agttatgatt atggtaggag tcatggcttc ttctgtgagc 60
 ggctacggtg gcggttgat caacgctcac gccacttttt acggtggttg tgatgcttcc 120
 ggcacaatgg gtggtgcttg tggatatggt aatctatata gccaaaggcta cgggacgagc 180
 acggcggtc taagcacagc tctcttcaac aatggactta gctgtggttc ttgctttgag 240
 ataagatgtg aaaacgatgg taaatggtgt ttacctggct caatcgttgt aaccgctaca 300
 aacttctgcc cgccaaataa cgcgtagcg aacaataatg gcggttggtg taatcctcct 360
 cttgaacact ttgacctgc tcagcctggt tttcaacgca ttgctcagta cagagctgga 420
 atcgtccctg tttcctacag aagggttctt tgcaggagaa gaggaggaat aagattcacg 480
 ataaacggcc actcatactt caaccttggt ctgatcaca acgtcggttg tgccggagac 540
 gttcactcgg cggcgatcaa gggttcaaga acagtgtggc aagctatgtc aaggaactgg 600
 gggcaaaatt ggcaaagcaa ctcttacctc aacgggtcaag cactttcctt taaggtcacc 660
 accagcgacg gccgcacagt tgtctccttc aacgccgctc ctgccggctg gtcttatggc 720
 cagacttttg ccggtggaca gttccgttaa 750

<210> 3
 <211> 758
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

atgtcaaaagt ctctagctgg attggcggtt ttggccgctc tttttattgc ggttgatgcg 60
 tttaggcctt ctggttaact aatggtcacg ctacattcta tggaggaagt gacgcttctg 120
 gaacaatggg tggagcttgt ggttacggag atctttactc ggcggggtac gggacaatga 180
 cggcggcggt aagcacggct ctgttcaacg acggagcttc ttgcggagaa tgctatagga 240
 taacgtgtga tcacgcggcg gactcacggg ggtgcttgaa aggagcttct gtggttatta 300
 cagccactaa cttttgcca ccaaactttg ctttgcctaa caacaacggg ggttggtgca 360
 atccgccgct taaacatttc gacatggcac aaccgcttg ggaaaagatc ggaatttaca 420
 gaggaggaat cgttcccgtc gttttccaaa gagtaagctg ttacaagaaa ggaggagtta 480
 gattcagaat aaacggaaga gactacttgc agctagtga tttcaaaaat gtaggaggag 540
 caggttctat taaatctgta tccatcaaag gatcaaagac tggttgggta gccatgtctc 600
 gtaactgggg agctaattgg caatcgaatg cttatctaga tggtaagct ctctctttct 660
 ccattaccac tactgatggg gctactagag tctttctcaa tgttgttctt tcttcttggt 720
 cttttggaca gattttattct tccaacgttc agttttaa 758

<210> 4
 <211> 820
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4
 atgcagctct ttccggtcat cctaccgaca ctatgcgtct tcctccacct tctaataagt 60
 ggctctggct ctactccacc gttgactcac tccaatcaac aagtggcagc cactcgttgg 120
 cttcccgcca ccgcaacctg gtacggaagt gccgaggag acggcagcag cggaggagct 180
 tgtggttacg gatcgttggg ggacgtgaag ccgtttaagg ctagagtcgg agcggtgagt 240
 ccgattctgt tcaaagggtg tgaaggctgc ggtgcatgct acaaggtcag gtgtctcgac 300
 aagaccattt gctctaagag agcagtcacc attattgcca ccgaccagtc accgtcagga 360
 ccatctgcta aagcaaaaaca cactcatttc gacctcagtg gcgccgcctt tggacatatg 420
 gctattcccg gccataacgg tgatcatccg aaccgtggcc tattaacat cctctaccgc 480
 cgaacggcat gcaaatacag agggaagaac atagcgtttc atgtgaacgc aggatcaact 540
 gattattggg tatcgcttct cattgagtat gaagacgggtg aaggagacat tggctctatg 600

cacattcgtc aagcgggatac taaggagtgg atatcgatga agcacatatg gggagcgaac 660
 tgggtgcatcg tcgaaggacc actcaaggga ccattctccg tgaagctcac aactttgtcc 720
 aacaataaga cactctccgc caccgacgtc atccccagta actgggttcc caaagctact 780
 tacacctctc gcctcaactt ctcccctggt ctctaaaaaa 820

<210> 5
 <211> 780
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5
 atggcatcat caciaagata ttctgctctc ctagctcctt tcgcagtctc actaaaattt 60
 tggtattgcc aaaatgagac tatagatgta gctggatcgg gaaccgccgg agttacttgg 120
 tacggtgaac cattcggcgc cggtagcacc ggaggagctt gtgggtacgg ttccgcggtg 180
 gctaataccac cactatacgc gatgggtttca gccggaggtc cttcgctggt caacaatgga 240
 aaaggatgtg gaacatgtta tcaggttgta tgcacggac atccagcgtg ctcggggtca 300
 ccaataacgg tgacgataac cgacgagtgc cctgggtggc cttgctcctc tgaaccagtc 360
 cacattgatc ttagcggcaa agccatgggt gccttagcca aacctggcca agccgatcaa 420
 cttcgatccg ctggtgttat acgtgtcaac taaaaacgtg cggcatgttt atatcgagga 480
 actaacatag tttttcgtat ggacgctgga gcaaatacgt actacatttc atttgttggt 540
 gagtatgaaa acggcgatgg agatttgtcc aatgttgaaa ttcaaccagc cggcggaagt 600
 ttcatctcca tgcaagaaat gagatccgcc gtatggaagg tcaactcagg cagtgccta 660
 agaggaccat tcaacattag acttacttct ggtgaatctc ataaagtaat cgtcgcttat 720
 aatgttattc cggcgaattg gaaacctgac gaatcttacc gttcaattgt taacttttag 780
 780