(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월05일
(11) 등록번호 10-1723309
(24) 등록일자 2017년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01) *C12P 17/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8257 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0161304
(22) 출원일자 2015년11월17일
심사청구일자 2015년11월17일
(56) 선행기술조사문헌
Plant Physiology. Vol. 149, no. 2, 페이지 981-993, (2008.12.17.)*
KR101459584 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
고재흥
경기도 수원시 영통구 영통로154번길 51-16 306동 702호 (망포동, 센트럴하이츠아파트)
조진성
경기도 수원시 권선구 하탑로34번길 25, 301호 (탑동,부림빌라)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

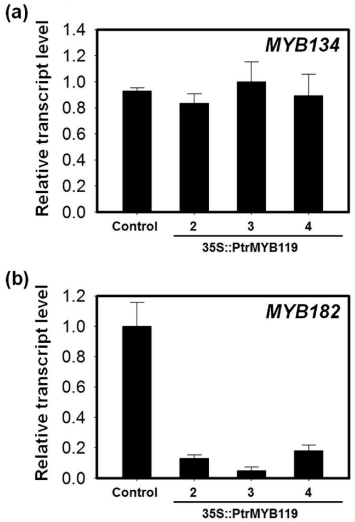
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물**

(57) 요 약

본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자가 도입되어 안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물, 상기 형질전환 식물의 제조방법, 상기 형질전환 식물로부터 안토시아닌을 생산하는 방법, 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자를 포함하는 안토시아닌 생합성 촉진용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 안토시아닌 생합성 촉진용 키트 및 상기 조성물을 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는 식물체에서 안토시아닌의 생합성을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공하는 안토시아닌 생합성 촉진용 조성물을 이용하면 숙주인 식물세포의 성장에 전혀 영향을 주지않으면서도, 안토시아닌을 대량생산할 수 있으므로, 보다 효과적인 안토시아닌의 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12P 17/06 (2013.01)
(72) 발명자
최영임
경기도 수원시 영통구 청명로 132 324동 601호 (영통동,청명마을3단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 S111214L080110
부처명 산림청
연구관리전문기관 산림청
연구사업명 임업기술연구개발사업
연구과제명 포플러 슈퍼클론 개발
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교
연구기간 2015.04.15 ~ 2016.04.14
공지예외적용 : 있음

원반팝
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교 국제캠퍼스 생명과학대학

명 세 서

청구범위

청구항 1

프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 PtrMYB119 유전자가 도입되어 상기 PtrMYB119 유전자가 과발현된, 안토시아닌 및 프로안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프로모터는 35S 프로모터인 것인 형질전환 식물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 안토시아닌은 시아니딘(cyanidin), 펠라르고니딘(pelargonidin), 델피딘(delphidine) 및 페오니딘(peonidin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물인 것인 형질전환 식물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 형질전환 식물은 애기장대 또는 포플러인 것인 형질전환 식물.

청구항 6

프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 PtrMYB119 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, 안토시아닌 및 프로안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물의 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항, 제2항, 제4항 및 제5항 중 어느 한 항의 형질전환 식물로부터 안토시아닌 및 프로안토시아닌을 추출하는 단계를 포함하는, 안토시아닌 및 프로안토시아닌의 생산방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 형질전환 식물은 포플러인 것인 방법.

청구항 10

프로모터에 작동가능하게 연결된 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 PtrMYB119 유전자를 포함하는, 안토시아닌 및 프로안토시아닌 생합성 촉진용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 조성물은 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자를 포함하는 발현벡터인 것인 조성물.

청구항 12

제10항 또는 제11항의 조성물을 포함하는, 안토시아닌 및 프로안토시아닌 생합성 촉진용 키트.

청구항 13

제10항 또는 제11항의 조성물을 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는, 식물체에서 안토시아닌 및 프로안토시아닌의 생합성을 증가시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자가 도입되어 안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물, 상기 형질전환 식물의 제조방법, 상기 형질전환 식물로부터 안토시아닌을 생산하는 방법, 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자를 포함하는 안토시아닌 생합성 촉진용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 안토시아닌 생합성 촉진용 키트 및 상기 조성물을 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는 식물체에서 안토시아닌의 생합성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물은 우리가 일상생활에서 필요로 하는 영양소를 섭취할 수 있는 중요한 자원이다. 이러한 영양소 및 기타 풍부한 미네랄은 식물에 존재하는 이차대사산물의 다양한 합성 경로를 통하여 만들어지는데, 이와 관련된 합성 효소들 역시 천연 자원 식물에서 많이 발견되는 항생제 및 다른 의약소재의 합성에 긴밀하게 관련되어 있는 것으로 알려져 있다. 최근에는 기존의 유용 식물을 이용하여 그의 대사과정 경로를 조절하여 이차대사산물의 합성을 증가시키거나, 혹은 새로운 물질을 합성해내는 방향으로 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0003] 지구상에는 대략 400,000 종의 식물이 서식하고 있는 것으로 알려져 있으나 그 중 약 10% 만이 연구의 대상이 되고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 매우 중용한 약리성분의 대부분은 식물에서 추출되어 이용되어 왔으며 어떤 것은 200년 전부터 연구되어 온 것도 있다. 현재 시중의 일반인에 의해 소비되는 약들 중 약 25%가 식물유래인 것으로 알려져 있으며, 약 처방전에 따른 식물유래 이차대사산물의 가치는 미화로 3백억 달러에 이르는 것으로 추정된다. 식물의 이차대사산물은 주 대사산물 합성 경로에서 파생되어 생긴 합성 경로를 이용하므로 실제 식물의 생존에 절대적으로 필요한 과정은 아니기에 이차대사산물이라 일컬어지며, 대부분의 경우 식물체 내

함량이 매우 낮은 것으로 확인된다(식물 건조 중량의 1% 미만). 그러나 이들 이차대사산물은 식물이 끊임없이 변화하는 혹독한 환경에서 움직이지 않고도 생존의 기회를 높이는 데 중요한 역할을 하며 각종의 다양한 물질들이 이에 속한다.

[0004] 안토시아닌은 식물체에 존재하는 수용성 색소 배당체(glucoside) 화합물로서, 세포액의 산성농도, 색소화합물의 화학적 구조, 여러 금속이온들과의 결합상태에 의해 자색, 적색, 청색 등의 색상을 나타내는 식물성 천연 색소이다. 식물에서의 안토시아닌 생합성은 식물 자체가 가지고 있는 유전적 요인과 이것이 잘 발현되도록 하는 환경요인의 상호작용에 의해 조절된다 (The Plant Cell, 7: 1071-1083). 즉 안토시아닌 생합성 관련 유전자들은 광도, 광질, 일장, 온도, 수분, 화학물질, 기타 요인들에 의해 자극을 받아 발현되는데(Plant Physiol. 92: 1191-1195; Planta, 194:541-549), 일단 조절 유전자가 발현이 되면 생합성 과정에 관련된 여러 가지 효소가 생성되어 이들의 작용에 의해 안토시아닌이 만들어진다.

[0005] 최근 안토시아닌의 다양한 생리활성작용이 보고되고 있다. 예컨대, 노화억제작용, 항균작용, 돌연변이 억제작용, 콜레스테롤 저하작용, 시력개선효과, 혈관보호기능, 항 궤양기능, 항산화 기능 등이 규명되었다. 특히 항산화 활성 면에서 천연 항산화제인 토코페롤보다 5-7배의 강한 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려졌다. 안토시아닌은 독성이 낮다. 따라서, 현재 안토시아닌은 청량음료, 잼, 시력보호용 음료수, 사탕 등의 가공식품 생산과 향장공업, 염료공업, 의약품 개발 등에 활용되고 있다. 최근에는 발암성 및 간 독성이 우려되는 합성 착색료를 대신할 수 있는 안전한 천연 착색료로 주목을 받아 식품 영양학적인 면과 더불어 시각적 신선감 및 즐거움을 줄수 있는 유용성분으로 평가되고 있다. 이러한 안토시아닌은 다양한 식물 종에 폭넓게 존재하며, 흔히 식물체의 꽃, 과실, 줄기, 잎, 뿌리 등에 함유되어 있다. 포도, 딸기, 올리브, 적양배추, 가지, 장미 등의 식물체로부터 안토시아닌을 추출하여 여러 가지 원료로 이용되기 때문에, 이같은 안토시아닌의 생성양을 증가시키기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0006] 예를 들어, 한국공개특허 제2010-0022553호에는 에틸렌 수용체 유전자 돌연변이 애기장대 또는 에틸렌 신호 전달 관련 유전자 돌연변이 애기장대에 수크로스가 존재하는 배지에서 빛을 조사하여 키우는 단계를 포함하는 애기장대 안토시아닌 생합성 조절 방법이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2010-0103189호에는 수크로스를 200 mM 내지 300 mM 함유하는 것을 특징으로 하는 식물의 플라보노이드 합성을 증대시키기 위한 배지 조성물 및 이를 이용한 플라보노이드의 생산 방법이 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2014-0126528호에는 진홍무로부터 분리한 신규한 RsMYB1 및 이를 형질전환한 식물체의 안토시아닌 색소 축적량 증가 효과가 개시되어 있다.

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 안토시아닌의 생합성을 증가시킬 수 있는 기술을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, R2R3 MYB 유전자의 일종인 PtrMYB119 유전자가 과발현된 식물체내에서 안토시아닌의 생합성 수준이 증가됨을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자가 도입되어 안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 형질전환 식물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 식물로부터 안토시아닌을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자를 포함하는 안토시아닌 생합성 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 안토시아닌 생합성 촉진용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함하는 식물체에서 안토시아닌의 생합성을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 안토시아닌의 생합성을 증가시키고자 다양한 연구를 수행하던 중, 안토시아닌 생합성을 조절한다고 알려진 R2R3 MYB 유전자에 주목하게 되었다. 특히, 포플러에서 유래된 R2R3 MYB 유전자 중에서 PtrMYB119 유전자는 17번 염색체에 존재하는데, 이들의 염기서열을 분석한 결과, 애기장대에서 안토시아닌의 생합성에 관여

한다고 알려진 PAP1(PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1)와 높은 상동성을 나타내고, 계통학적으로 페츄니아, 토마토, 고구마, 포도 등에서 안토시아닌 생합성에 관여한다고 알려진 유전자와 유사한 위치에 있음을 확인하였다.

[0015] 이에, 상기 PtrMYB119 유전자가 과발현된 형질전환 포플러에서 상기 유전자의 과발현이 안토시아닌 생합성에 미치는 효과를 분석한 결과, 중과피(pith), 껍질(cortex), 체관부(phloem), 방사조직 세포(ray cell) 및 형성층(cambium layer)에서 안토시아닌이 대량으로 축적된 세포가 관찰되었고, 특히, 피하세포의 외측층에 안토시아닌이 대량으로 축적된 세포가 밀집됨을 확인하였다. 그러나, 안토시아닌과 유사한 화학적 구조를 갖는 플라보노이드의 수준은 변화되지 않음을 확인하였다. 아울러, 상기 PtrMYB119 유전자가 과발현된 형질전환 포플러에서는 안토시아닌 생합성에 관여하는 유전자의 발현수준이 증가됨을 확인하였고, 이처럼 안토시아닌이 대량으로 축적되더라도 형질전환된 식물의 성장에는 아무런 영향을 주지 않음을 확인하였다.

[0016] 이처럼, PtrMYB119 유전자의 과발현을 통해, 식물에서 안토시아닌을 대량으로 생산할 수 있으면서도, 식물의 성장에 영향을 주지않는 기술은 지금까지 보고되지 않았고, 본 발명자에 의하여 최초로 개발되었다.

[0017] 상술한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하나의 양태로서 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자가 도입되어 상기 PtrMYB119 유전자가 과발현된 안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 용어 "프로모터"란, 전사조절인자들이 결합할수 있는 DNA 염기서열을 의미하는데, 상기 프로모터는 전사조절인자를 매개로 하여 RNA 중합효소와 결합함으로써, 그의 하류에 위치한 개방해독틀(ORF)의 전사를 유도할 수 있다. 본 발명에서는 일 예로서, 35S 프로모터를 사용하였다.

[0019] 본 발명의 용어 "작동가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0020] 본 발명의 용어 "PtrMYB119 유전자"란, 대체로 포플러 식물의 17번째 염색체에 존재하는 안토시아닌 생합성을 조절하는 유전자로서 R2R3 MYB 타입 유전자의 일종을 의미한다. 상기 유전자의 구체적인 염기서열 또는 단백질의 아미노산 서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: NM_125275.1, NP_568891.1 등). 본 발명에서는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 PtrMYB119 유전자를 이용하여 안토시아닌 생합성이 증진된 형질전환 식물을 제작하였다.

[0021] 본 발명의 용어 "안토시아닌(anthocyanin)"이란, 식물체에 존재하는 수용성 색소 배당체(glucoside) 화합물로서, 세포액의 산성농도, 색소화합물의 화학적 구조, 여러 금속이온들과의 결합상태에 의해 자색, 적색, 청색 등의 색상을 나타내는 식물성 천연 색소를 의미한다. 식물로부터 검출되는 주요 안토시아닌으로는 사과, 블랙베리, 복숭아 등으로부터 검출되는 시아니딘(cyanidin); 딸기, 석류 등으로부터 검출되는 펠라르고니딘(pelargonidin); 가지 등으로부터 검출되는 델피딘(delphidine); 망고 등으로부터 검출되는 페오니딘(peonidin) 등이 알려져 있다. 본 발명에서는 상기 안토시아닌의 수준을 확인하기 위하여 시아니딘 및 펠라르고니딘의 수준을 측정하였다.

[0022] 한편, 상기 안토시아닌은 식물체에서 발현되는 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 다양한 효소의 일련작용에 의하여 생합성되는데, 상기 각 효소를 코딩하는 유전자로는 찰콘 생합성 효소 유전자(PtrCHS1 및 PtrCHS2), 찰콘 아이소머라제 유전자(PtrCHI1), 플라보노이드 3'-히드록실라제 유전자(PtrF3H1), 디히드로플라보놀 리덕타제 유전자(PtrDFR1), 안토시아닌 생합성효소 유전자(PtrANS1 및 PtrANS2) 등이 알려져 있으며, 이러한 각 유전자의 전사는 R2R3 MYB 타입 유전자와 bHLH 타입 유전자에 의하여 조절되는 것으로 알려져 있다.

[0023] 상기 PtrMYB119 유전자는 목적하는 식물에 도입되어 과발현될 경우, 다양한 안토시아닌 생합성 유전자의 전사를 촉진시켜서, 안토시아닌의 생합성을 촉진시킬 수 있으므로, 상기 PtrMYB119 유전자가 발현될 수 있도록 프로모터에 작동가능하게 연결된 형태를 포함하는 조성물은 식물체에서 안토시아닌 생합성을 촉진시킬 수 있는 조성물로 사용될 수 있다. 일 예로서, 상기 조성물은 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자를 포함하는 발현벡터가 될 수 있다.

[0024] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현

벡터는 개시코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시 코돈 및 종결 코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되며, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 본 발명에서는 35S 프로모터와 작동가능하게 연결된 서열번호 1의 PtrMYB119 유전자를 pK2GW7 벡터에 도입하여 제작된 발현벡터를 이용하여 안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물을 제작하였다.

[0025] 또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 단백질의 분리를 촉진하기 위하여 융합 폴리펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시 시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시 코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널들 및 개시 코돈들은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.

[0026] 본 발명의 용어 "형질전환"이란, DNA를 숙주에 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다. 구체적으로 본 발명에서는 상기에서 서술한 PtrMYB119 유전자를 숙주에 도입하는 것을 의미할 수 있다.

[0027] 본 발명의 용어 "형질전환 식물"이란, 숙주로서 식물을 사용하여 상기 형질전환으로 인해 생성된 식물을 의미한다.

[0028] 본 발명에서 숙주세포로의 형질전환은 핵산을 유기체, 세포, 조직 또는 기관에 도입하는 어떠한 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 식물에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이러한 방법에는 전기충격 핵산분자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산칼슘 침전, 염화칼슘 침전, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반, 아그로박테리아로 매개된 형질전환, PEG, 덱스트란 설페이트 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 포함되나, 이로 제한되지 않으며, 아그로박테리아로 매개된 형질전환법이 바람직하다.

[0029] 본 발명의 목적상, 상기 형질전환 식물은 안토시아닌을 생합성할 수 있어, PtrMYB119 유전자의 과발현에 의하여 안토시아닌 생합성이 증진될 수 있는 한, 초본 및 목본 식물 모두가 제한 없이 포함할 수 있다.

[0030] 일 예로서, 초본 식물로는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 오리자 사티바(*Oryza sativa*; 벼), 제아 메이즈(*Zea mays*; 옥수수), 미스칸투스(*Miscanthus*) 종 또는 페니세툼 풀푸레움(*Pennisetum purpureum*) 등을 포함할 수 있고, 목본 식물로는 유칼립투스(*Eucalyptus*) 종(예를 들면 *E. alba, E. albens, E. amygdalina, E. aromaphloia, E. baileyana, E. balladoniensis, E. bicostata, E. botryoides, E. brachyandra, E. brassiana, E. brevistylis, E. brockwayi E. camaldulensis, E. ceracea, E. cloeziana, E. coccifera, E. cordata, E. cornuta, E. corticosa, E. crebra, E. croajingoleisis, E. curtisii, E. dalrympleana, E. deglupta, E. delegatensis, E. delicata, E. diversicolor, E. diversifolia, E. dives, E. dolichocarpa, E. dundasii, E. dunnii, E. elata, E. erythrocoiys, E. erythrophloia, E. eudesmoides, E. falcata, E. gamophylla, E. glaucina, E. globulus, E. globulus subsp. bicostata, E. globulus subsp. globulus, E. gongylocarpa, E. grandis, E. grandis×urophylla, E. guilfoylei, E. gunnii, E. hallii, E. houseana, E. jacksonii, E. lansdowneana, E. latisinensis, E. leucophloia, E. leucoxylon, E. lockyeri, E. lucasii, E. maidenii, E. marginata, E. megacarpa, E. melliodora, E. michaeliana, E. microcorys, E. microtheca, E. muelleriana, E. nitens, E. nitida, E. obliqua, E. obtusiflora, E. occidentalis, E. optima, E. ovata, E. pachyphylla, E. pauciflora, E. pellita, E. perriniana, E. petiolaris, E. pilularis, E. piperita, E. platyphylla, E. polyanthemos, E. populnea, E. preissiana, E. pseudoglobulus, E. pulchella, E. radiata, E. radiata subsp. radiata, E. regnans, E. risdoni, E. robertsonii E. rodwayi, E. rubida, E. rubiginosa, E. saligna, E. salmonophloia, E. scoparia, E. sieberi, E. spathulata, E. staeri E. stoatei, E. tenuipes, E. tenuiramis, E. tereticornis, E. tetragona, E. tetrodonta, E. tindaliae, E. torquata, E. umbra, E. urophylla, E. vernicosa, E. viminalis, E. wandoo, E. wetarensis, E. willisii, E. willisii subsp. falciformis, E. willisii subsp. willisii, E. woodwardii*), 포플러스(*Populus*) 종(예를 들면, *P. alba, P. alba×P. grandidentata, P. alba×P. tremula, P. alba×P. tremula var. glandulosa, P. alba×P. tremuloides, P. balsamifera, P. balsamifera subsp. trichocarpa, P. balsamifera subsp. trichocarpa×P. deltoides, P. ciliata, P. deltoides, P. euphratica, P. euramericana, P. kitakamiensis, P. lasiocarpa, P. laurifolia, P. maximowiczii, P. maximowiczii×P.*

balsamfera subsp. trichocarpa, *P. nigra*, *P. sieboldii×P. grandideiztata*, *P. suaveolens*, *P. szechuanica*, *P. tomentosa*, *P. tremula*, *P. tremula×P. tremuloides*, *P. tremuloides*, *P. wilsonii*, *P. canadensis*, *P. yunnanensis*), 침엽수(예를 들면, loblolly pine(*Pinus taeda*), slash pine(*Pinus elliotii*), ponderosa pine(*Pinus ponderosa*), lodgepole pine(*Pinus contorta*), Monterey pine(*Pinus radiata*); Douglas-fir(*Pseudotsuga menziesii*); Western hemlock(*Tsuga canadensis*); Sitka spruce(*Picea glauca*); redwood(*Sequoia sempervirens*); silver fir(*Abies amabilis*); balsam fir(*Abies balsamea*)) 및 삼나무(예를 들면 Western red cedar(*Thuja plicata*), Alaska yellow-cedar(*Chamecyparis nootkatensis*)) 등을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0031] 다른 예로서, 상기 초본 식물로는 애기장대가 될 수 있고, 목본 식물로는 포플러가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 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. 본 발명에서 상기 애기장대는 초본 식물의 대표 식물로서 사용될 수 있으며, 구체적으로 *Arabidopsis thaliana*, *ecotype Columbia*(Col-0) 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 용어 "포플러(poplar)"란, 쌍떡잎식물 버드나무목 버드나무과 사시나무속에 속하는 식물의 총칭이다. 본 발명에서 상기 포플러는 목본 식물의 대표 식물로서 사용될 수 있으며, *Populus alba x P. tremula var. glandulosa* 등이 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 포플러에서 유래된 R2R3 MYB 유전자 중에서 PtrMYB119 유전자를 애기장대에 도입한 결과, 특정 부분이 아닌 식물체 전체적으로 적색소의 수준이 증가하였고 이는 PtrMYB119 유전자의 과발현에 의한 안토시아닌의 생성량 증가로 인하여 야기된 것으로 예상되었으며(도 1), 상기 PtrMYB119 유전자의 서열을 이용한 계통분석을 수행한 결과 쌍자엽식물 안토시아닌 생산용 MYBs의 계통에 속함을 확인하였고, 그의 보존적 서열을 분석한 결과, PtrMYB119 유전자가 안토시아닌 생합성에 관여할 것으로 분석되었다(도 2).

[0035] 이러한 PtrMYB119 유전자의 기능을 확인하기 위하여, 상기 유전자가 도입된 형질전환 포플러를 제작한 결과, 상기 형질전환 포플러는 외관이 적색을 나타내었고(도 3a 내지 3c), PtrMYB119 유전자의 발현수준이 400배 이상 증가하였으며(도 3d 및 3e), 안토시아닌의 일종인 시아니딘과 펠라르고니딘의 수준이 각각 15 내지 20배 증가하였으나(도 4a), UV 흡수성을 나타내는 플라보노이드의 수준은 증가하지 않아(도 4b), 상기 PtrMYB119 유전자는 안토시아닌의 생합성만을 특이적으로 촉진시키는 효과를 나타내는 것으로 분석되었다.

[0036] 이에, 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 유전자의 발현수준을 비교한 결과, 플라보노이드 경로의 시작단계에 관여하는 유전자, 안토시아닌의 생합성에 관련된 유전자 및 프로안토시아닌(PA) 생합성 경로에 특이적인 유전자의 발현수준이 모두 증가됨을 확인하였고(도 5), 프로안토시아닌 역시 형질전환 포플러에서 생성량이 증가함을 확인하였으며(도 6), 프로안토시아닌의 생합성의 양성적 조절인자로서 알려진 MYB134 유전자의 발현수준은 대조군과 유사한 수준을 나타내었으나, 프로안토시아닌/안토시아닌의 생합성 억제자로 알려진 MYB182 유전자의 발현수준은 현저하게 감소됨을 확인하였다(도 7).

[0037] 끝으로, 상기 PtrMYB119 유전자의 표적을 분석한 결과, PtrMYB119의 직접적인 하류 표적이 PtrCHS1 유전자 및 PtrANS2 유전자임을 확인하였고(도 8a 및 8b), 안토시아닌의 합성수준이 증가하더라도 포플러의 생장수준과 광합성수준은 변화되지 않음을 확인하였다(도 9).

[0038] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 안토시아닌의 생합성이 증진된 형질전환 식물의 제조방법을 제공한다.

[0039] 상기 제조방법에 사용되는 프로모터, PtrMYB119 유전자, 식물체, 안토시아닌 등은 상술한 바와 동일하고, 상기 방법에 의해 본 발명의 형질전환 식물을 제조할 수 있다.

[0040] 또한, 상기 제조방법에 의하여 제조된 형질전환 식물을 토양 또는 배지에서 재배하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 형질전환식물의 재배는 널리 공지된 방법에 따라서 수행될 수 있고, 재배 온도, 재배 시간 및 배지의 pH 등의 조건은 적절하게 조절될 수 있다.

[0041] 사용되는 배지는 특정한 형질전환식물의 요구 조건을 적절하게 충족시켜야 한다. 배지의 형태로는 고체배지(solid medium), 액체배지(liquid medium), 이중배지(double layer medium)가 있으며, 이에 대한 성분으로는 물, 교질재료로서, 한천, 아가로스(agarose), 겔라이트(gelite) 등이 사용될 수 있다.

[0042] 무기 영양소로는 15개의 원소, 즉 C, H, O, N, P, K, S, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, B, 및 Mo 등이 형태에 구애받지 않고 첨가되며, 유기 영양소로는 탄수화물, 식물생장 조절물질, 비타민 등이 첨가되고, 아미노산류로는 미오-이노시톨, 글라이신, L-글루타민 등이 첨가될 수 있다.

[0043] 탄소원으로는 글루코스, 프럭토스, 만노스, 리보오스, 자일로스, 수크로스, 멜리비오스, 셀로비오스, 락토오스, 아밀로스, 탄수화물, 라피노스, 소르비톨, 만니톨, 글리세롤1 등이 첨가될 수 있다.

[0044] 예를 들어, 본 발명예에서는 애기장대를 25℃의 생장실(14시간 빛/10시간 어둠)에서 토양에 재배하거나 또는 스크리닝을 위한 적당한 항생제 및 2% 수크로스를 포함한 half-strength MS 배지(Murashige and Skoog, Sigma)에서 재배하였다. 또한 본 발명에서 사용된 포플러(Populus alba x P. tremula var. glandulosa)도 상기 애기장대와 동일한 조건으로 재배하였다.

[0045] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 PtrMYB119 유전자가 도입된 형질전환 식물로부터 안토시아닌을 추출하는 단계를 포함하는, 안토시아닌의 생산방법을 제공한다.

[0046] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 제공하는 PtrMYB119 유전자가 도입된 형질전환 식물은 안토시아닌의 생합성 수준이 현저히 증가되었으므로, 상기 형질전환 식물은 안토시아닌의 산업적 생산을 위한 원료로서 사용될 수 있다. 특히, 형질전환 포플러의 경우에는 PtrMYB119 유전자의 도입에 의하여 포플러의 생장이 영향받지 않으면서도, 잎의 수가 많고, 잎의 부피가 비교적 클 뿐만 아니라 잎의 발아속도 및 생육속도가 빠르기 때문에, 상기 형질전환 포플러의 잎은 보다 경제적인 안토시아닌 생산을 위한 원료로서 사용될 수 있다.

[0047] 상기 형질전환 식물은 상술한 바와 동일하고, 특히 형질전환 포플러의 잎을 안토시아닌 생산원료로 사용할 수 있다.

[0048] 상기 형질전환 식물로부터 안토시아닌을 추출하는 단계는 안토시아닌을 추출할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 수용성 배당체인 안토시아닌의 특성상, 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 등을 단독으로 또는 조합하여 사용한 용매추출법에 의해 수행될 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 의하면, PtrMYB119 유전자가 도입된 형질전환 포플러는 안토시아닌을 높은 수준으로 생성한다고 알려진 종래의 식물인 토마토, 적양배추, 블루베리 및 체리 보다는 높은 수준으로 안토시아닌의 일종인 시아니딘과 펠라르고니딘을 생성함을 확인하였으므로(도 10), 본 발명에서 제공하는 PtrMYB119 유전자가 과발현된 형질전환 포플러는 안토시아닌의 공급원료로서 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0050] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자를 포함하는 안토시아닌 생합성 촉진용 조성물을 제공한다.

[0051] 상기 조성물에 사용되는 프로모터, PtrMYB119 유전자, 안토시아닌 등은 상술한 바와 동일하고, 상기 조성물을 이용하여, 안토시아닌을 생합성할 수 있는 임이의 식물체에서 안토시아닌 생합성을 촉진시킬 수 있다.

[0052] 즉, 상기 조성물에 포함된 PtrMYB119 유전자가 안토시아닌을 생합성할 수 있는 식물체에 도입되면, 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 다양한 효소의 발현을 증가시켜서, 결과적으로 안토시아닌의 생합성을 촉진시킬 수 있다.

[0053] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 안토시아닌 생합성 촉진용 조성물을 포함하는 안토시아닌 생합성 촉진용 키트를 제공한다.

[0054] 본 발명의 키트는 식물체에서 안토시아닌의 생합성을 촉진시킬 수 있다. 본 발명의 안토시아닌 생합성 촉진용 키트에는 프로모터에 작동가능하게 연결된 PtrMYB119 유전자 뿐만 아니라 상기 PtrMYB119 유전자의 도입 또는 발현에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0055] 구체적인 일 예로서, 본 발명의 키트는 PtrMYB119 유전자의 형질도입을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 예를 들어, 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 완충액 농도는 다양), 식물체 배양용기, 식물배양용 배지, 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 내부대조군로 사용될 수 있는 PtrMYB119 유전자가 아닌 다른 유전자를 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 식물체에서 안토시아닌의 생합성을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0057] 구체적으로, 본 발명의 안토시아닌의 생합성을 증가시키는 방법은 상기 조성물을 안토시아닌을 생합성 할 수 있

는 식물체에 도입하여 발현시키는 단계를 포함한다. 이때. 상기 방법에 사용되는 프로모터, PtrMYB119 유전자, 식물체, 안토시아닌 등은 상술한 바와 동일하고, 상기 방법에 의해 안토시아닌을 생합성 할 수 있는 임의의 식물체에서 안토시아닌의 생합성을 증가시킬 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명에서 제공하는 안토시아닌 생합성 촉진용 조성물을 이용하면 숙주인 식물세포의 성장에 전혀 영향을 주지않으면서도, 안토시아닌을 대량생산할 수 있으므로, 보다 효과적인 안토시아닌의 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 포플러 유래의 PtrMYB119 유전자를 애기장대에 도입하여 제작된 형질전환 애기장대에서 색소 표현형의 변화를 나타내는 사진으로서, a는 PtrMYB119 유전자가 도입된 후 10일동안 재배된 형질전환 애기장대의 잎에 축적된 적색소의 수준을 대조군인 정상 애기장대의 잎과 비교한 결과를 나타내는 사진이고, b는 PtrMYB119 유전자가 도입된 후 10일동안 재배된 형질전환 애기장대의 각 부분(잎, 배축, 잎자루 및 뿌리)을 확대한 사진이다.

도 2의 (a)는 PtrMYB119 또는 PtrMYB120 유전자의 염기서열을 이용한 계통분석을 수행한 결과를 나타내는 도표로서, "AN"항목은 안토시아닌 생합성의 전사 활성화인자 계통을 나타내고, "PA"항목은 프로안토시아닌 생합성의 전사활성화 인자 계통을 나타낸다.

도 2의 (b)는 PtrMYB119 또는 PtrMYB120 유전자의 보존적 모티프를 분석한 결과를 나타내는 도표이다.

도 3a는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)의 사진이다.

도 3b는 상기 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 채집된 잎의 색을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3c는 적색소가 강하게 나타나는 형질전환 포플러의 절단면을 나타내는 현미경사진으로서, EP는 표피(epidermis)를 나타내고, Co는 껍질(cortex)를 나타내며, Ca는 형성층(cambium layer)을 나타내고, Pf는 체관부 섬유(phloem fiber)를 나타내며, Xy는 물관부(xylem)를 나타내고, Pi는 중과피(pith)를 나타낸다.

도 3d는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)를 대상으로, 정량적 실시간 PCR을 수행하여, 도입된 PtrMYB119 유전자의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

도 3e는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 발현된 PtrMYB119 유전자의 발현수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4a는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 생성된 안토시아닌을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4b는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 생성된 UV 흡수성분을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 5는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 유전자의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 프로안토시아니딘(PA)의 생성부위를 나타내는 연미경사진으로서, (a)는 줄기를 나타내고, (b)는 잎꼭지부위를 나타낸다.

도 7은 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러

(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서, 프로안토시아닌의 합성에 관여하는 유전자의 발현수준을 측정한 결과를 나타내는 그래프로서, (a)는 프로안토시아닌의 생합성의 양성적 조절인자로서 알려진 MYB134 유전자의 발현수준을 나타내고, (b)는 프로안토시아닌/안토시아닌의 생합성 억제자로 알려진 MYB182 유전자의 발현수준을 나타낸다.

도 8a는 TAA 분석법에 사용될 효과기 벡터와 리포터 벡터의 구조를 나타내는 개략도이다.

도 8b는 PtrMYB119와 PtrCHS1, PtrANS1 및 PtrANS2를 이용한 TAA 분석결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)를 대상으로안토시아닌의 대량생성이 식물의 성장에 영향을 미치는지 확인한 결과를 나타내는 그래프로서, (a)는 줄기의 높이를 나타내고, (b)는 직경을 나타내며, (c)는 절간의 수를 나타내고, (d)는 잎의 면적을 나타내며, (e)는 잎의 클로로필 형광을 나타내는 사진이고, (f)는 상기 잎의 클로로필 형광의 수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10은 본 발명에서 제공하는 PtrMYB119 유전자가 과발현된 형질전환 포플러에서 생성된 시아니딘과 펠라르고니딘의 수준을 안토시아닌을 높은 수준으로 생성한다고 알려진 토마토, 적양배추, 블루베리, 체리 및 자색고구마에서 생성된 시아니딘과 펠라르고니딘의 수준과 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] **실시예 1: 안토시아닌 생합성을 양성적으로 조절하는 포플러 MYB 전사인자의 규명**

[0062] **실시예 1-1: PtrMYB119 유전자가 도입된 형질전환 애기장대의 색소 표현형 변화 분석**

[0063] 본 발명자들은 포플러에서 유래된 R2R3 MYB 유전자 중에서 PtrMYB119 유전자를 애기장대에 도입하여, 형질전환 애기장대를 제작하고, 상기 형질전환 애기장대에서 상기 도입된 유전자에 의한 색소 표현형의 변화를 분석하였다(도 1).

[0064] 도 1은 포플러 유래의 PtrMYB119 유전자를 애기장대에 도입하여 제작된 형질전환 애기장대에서 색소 표현형의 변화를 나타내는 사진으로서, a는 PtrMYB119 유전자가 도입된 후 10일동안 재배된 형질전환 애기장대의 잎에 축적된 적색소의 수준을 대조군인 정상 애기장대의 잎과 비교한 결과를 나타내는 사진이고, b는 PtrMYB119 유전자가 도입된 후 10일동안 재배된 형질전환 애기장대의 각 부분(잎, 배축, 잎자루 및 뿌리)을 확대한 사진이다.

[0065] 상기 도 1에서 보듯이, 포플러에서 유래된 PtrMYB119 유전자가 도입되어 과발현된 애기장대에서는 특정 부분이 아닌 식물체 전체적으로 적색소의 수준이 증가하였으며, 이는 PtrMYB119 유전자의 과발현에 의한 안토시아닌의 생성량 증가로 인하여 야기된 것으로 예상되었다.

[0066] **실시예 1-2: PtrMYB119 유전자의 염기서열을 이용한 계통분석**

[0067] 상기 실시예 1-1의 결과를 나타내는 포플러 유래 PtrMYB119 유전자의 염기서열 및 이를 이용한 계통분석을 수행하였다(도 2의 (a)). 이때, 사용된 프로그램으로는 ClustalW와 minimum evolution method (1,000 bootstrap replicates) 및 p-distance model을 사용한 MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013)을 사용하였다.

[0068] 도 2의 (a)는 PtrMYB119 유전자의 염기서열을 이용한 계통분석을 수행한 결과를 나타내는 도표로서, "AN"항목은 안토시아닌 생합성의 전사 활성화인자 계통을 나타내고, "PA"항목은 프로안토시아닌 생합성의 전사활성화 인자 계통을 나타낸다.

[0069] 도 2의 (a)에서 보듯이, PtrMYB119 유전자는 PtrMYB116, PtrMYB117 및 PtrMYB118 유전자를 갖는 17번 염색체에 존재하며, 안토시아닌 생합성의 전사 활성화인자로 알려진 PhAN2(Petunia hybrida Anthocyanin2), LeANT1(tomato Anthocyanin1), IbMYB1(sweet potato MYB1), 포도의 VvMYBA1 및 애기장대의 AtPAP1(PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT1)을 포함하는 쌍자엽식물 안토시아닌 생산용 MYBs의 계통에 속함을 확인하였다.

[0070] **실시예 1-3: PtrMYB119 유전자의 보존적 서열분석**

[0071] 상기 PtrMYB119 유전자의 염기서열을 분석하여 보존적 모티프를 분석하였다(도 2의 (b)).

[0072] 도 2의 (b)는 PtrMYB119 유전자의 보존적 모티프를 분석한 결과를 나타내는 도표이다. 도 2의 (b)에서 보듯이,

PtrMYB119 또는 PtrMYB120 유전자는 3개의 잘 알려진 보존된 모티프를 갖는데, 첫 번째 모티프는 [D/E]Lx2[R/K]x3Lx6Lx3R 모티프로서, bHLH 단백질과의 반응에 관여하고, PtrMYB 유전자의 R3 도메인에 위치하며; 두 번째 모티프인 ANDV 역시 PtrMYB 유전자의 R3 도메인에 위치하고; 세 번째 모티프는 [R/K]Px[P/A/R]xx[F/Y] 모티프로서, 안토시아닌 조절 MYB 유전자의 C-말단 영역에 존재함을 확인하였다.

[0073] 따라서, 상기 실시예 1-1 내지 1-3의 결과를 종합하면, PtrMYB119 유전자가 안토시아닌 생합성에 관여할 것으로 분석되었다.

[0074] **실시예 2: 35S::PtrMYB119 형질전환 포플러의 제작 및 특성분석**

[0075] **실시예 2-1: 35S::PtrMYB119 형질전환 포플러의 제작**

[0076] 상기 실시예 1의 결과에서, PtrMYB119 유전자가 안토시아닌 생합성에 관여할 것으로 분석되었으므로, 이러한 분석결과가 맞는지 확인하기 위하여, 교배 포플러에 상기 PtrMYB119 유전자를 도입하고, 이들을 과발현시킴으로써, 안토시아닌의 생합성에 의해 나타나는 적색소의 수준을 확인하여, 상기 PtrMYB119 유전자가 안토시아닌의 생합성에 관여하는지 여부를 검증하고자 하였다.

[0077] 구체적으로, PtrMYB119를 과발현시키는 형질전환 교배 포플러(35S:: PtrMYB119)를 제작하였다. 교배 포플러(Populus alba × P. tremula var. glandulosa, clone BH)는 대조군과 형질전환 식물로 사용하였다. 상기 식물은 토양에서 순응시키고, 조절된 환경(16 h 광조사; 광도 150 μmol/㎡/sec; 24 ℃)에서 재배하였다.

[0078] 이어, PtrMYB119의 cDNA를 PCR 방법으로 증폭시키고, pK2GW7 벡터의 35S 프로모터 뒷 부분에 삽입하여, 발현벡터(35S::PtrMYB119)를 제작하였다. 상기 발현벡터를 Agrobacterium tumefaciens strain C58에 도입하고, 상기 도입된 균주를 floral-dip method에 적용하여 애기장대에 도입하거나 또는 transformation-regeneration method에 적용하여 포플러에 도입하였다.

[0079] 형질전환 포플러에서 얻어진 세포를 Murashige & Skoog (MS) 배지(1.0 mg/L 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 0.1 mg/L benzylaminopurine, 0.01 mg/L 1-naphthylacetic acid (NAA), 500 mg/L cefotaxime, 및 50 mg/L kanamycin)에서 선별하였다. 상기 세포를 WPM(woody plant medium) 배지(1.0 mg/L zeatin, 0.1 mg/L benzyladenine, and 0.01 mg/L NAA)로 옮겨서, 상기 세포로부터 새싹을 발아시켰다. 전체적으로, 배양은 25 ± 2 ℃의 배양실에서 냉백형광(cool white fluorescent light)(30/㎡/sec, 16 h photoperiod)을 조사하면서, 수행하였다.

[0080] 상기 발아된 새싹을 2개월 동안 재배하여 다수의 형질전환 교배 포플러를 제작한 결과, PtrMYB119 유전자가 도입된 형질전환 교배 포플러에서는 적색소가 증가된 포플러가 확인하였다.

[0081] **실시예 2-2: 35S::PtrMYB119 형질전환 포플러의 적색소 분석**

[0082] 상기 적색소가 증가된 포플러가 확인된 PtrMYB119 유전자가 도입된 형질전환 교배 포플러 중에서, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 식물(#2 및 4)과 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 식물(#3)을 선별하고, 이의 색소특성을 분석하였다(도 3a 내지 3c).

[0083] 도 3a는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)의 사진이고, 도 3b는 상기 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 채집된 잎의 색을 비교한 결과를 나타내는 사진이다.

[0084] 도 3c는 적색소가 강하게 나타나는 형질전환 포플러의 절단면을 나타내는 현미경사진으로서, EP는 표피(epidermis)를 나타내고, Co는 껍질(cortex)를 나타내며, Ca는 형성층(cambium layer)을 나타내고, Pf는 체관부 섬유(phloem fiber)를 나타내며, Xy는 물관부(xylem)를 나타내고, Pi는 중과피(pith)를 나타낸다. 도 3c에서 보듯이, 형질전환되지 않은 대조군 포플러에 비하여, 형질전환 식물의 중과피(pith), 껍질(cortex), 체관부(phloem), 방사조직 세포(ray cell) 및 형성층(cambium layer)에서 많은 적색소로 염색된 세포가 발견되었다. 특히, 표피의 외측에 농축된 적색소가 확인되었는데, 이로 인하여 형질전환 포플러의 외관이 적색을 나타냄을 알 수 있었다.

[0085] **실시예 2-3: 35S::PtrMYB119 형질전환 포플러의 PtrMYB119 유전자 발현수준 분석**

[0086] 상기 선별된 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 발현되는 PtrMYB119 유전자의 발

현수준을 분석하였다(도 3d 및 3e).

[0087] 도 3d는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)를 대상으로, 정량적 실시간 PCR을 수행하여, 도입된 PtrMYB119 유전자의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 사진이고, 도 3e는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 발현된 PtrMYB119 유전자의 발현수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3d 및 3e에서 보듯이, 대조군에 비하여 형질전환 포플러에서는 PtrMYB119 유전자의 발현수준이 400배 이상 증가함을 확인하였다.

[0088] **실시예 2-4: 35S::PtrMYB119 형질전환 포플러의 안토시아닌의 함량분석**

[0089] 상기 선별된 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 또는 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)를 LN2를 사용하여 미세분말로 각각 마쇄하였다. 상기 마쇄된 각 미세분말 10 mg에 추출용매(메탄올, 0.1% HCl) 300 ㎕를 가하고, 4℃에서 하룻밤동안 추출하였으며, 수득한 추출물에 물 200 ㎕와 클로로포름 200 ㎕를 가하고, 상기 혼합물을 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 상기 수득한 각 상층액을 대상으로, 안토시아닌의 함량은 A530에서 시아니딘의 수준을 측정하고, A515에서 펠라르고니딘의 수준을 측정하였다(도 4a).

[0090] 도 4a는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 생성된 안토시아닌을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4a에서 보듯이, 시아니딘과 펠라르고니딘은 대조군에 비하여 형질전환 식물에서 각각 15 내지 20배 증가함을 확인하였다.

[0091] **실시예 2-5: 35S::PtrMYB119 형질전환 포플러의 UV 흡수성분의 함량분석**

[0092] 본 발명에서 제공하는 형질전환 식물에서 생합성 수준이 증가되는 안토시아닌은 화학구조의 측면에서 볼 때, 플라보노이드 화합물의 일종으로 볼 수 있는데, 색소를 나타내지 않는 플라보노이드와는 구별되므로, 상기 PtrMYB119 유전자가 안토시아닌의 생합성만을 특이적으로 촉진시키는지 아니면 전체적인 플라보노이드의 생합성을 촉진시키는지의 여부를 확인하고자 하였다.

[0093] 이를 위하여, 상기 실시예 2-4에서 수득한 상층액을 대상으로 안토시아닌이 아닌 플라보노이드의 수준을 측정하고자 하였으며, 상기 안토시아닌이 아닌 플라보노이드는 대체로 UV를 흡수하는 성질을 나타내므로, A330에서 이들의 수준을 측정하였다(도 4b).

[0094] 도 4b는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 생성된 UV 흡수성분을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 4b에서 보듯이, UV 흡수성분은 대조군과 형질전환 포플러 사이에 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

[0095] 따라서, PtrMYB119 유전자는 안토시아닌의 생합성만을 특이적으로 촉진시키는 효과를 나타내는 것으로 분석되었다.

[0096] **실시예 2-6: 35S::PtrMYB119 형질전환 포플러에서 안토시아닌 생합성 경로에 포함된 유전자의 발현수준 분석**

[0097] 안토시아닌 축적은 안토시아닌 생합성 유전자의 발현에 의한 것으로 알려져 있는데, 상기 형질전환 포플러에서 안토시아닌이 높은 수준으로 생성된다고 확인되었기 때문에, 상기 3종의 형질전환 포플러에서 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 유전자의 발현수준을 대조군과 비교하였다(도 5). 이때, 상기 유전자는 3가지 그룹으로 분류할 수 있는데, 제1 그룹은 범용적인 플라보노이드의 생합성 경로의 시작단계에 관여하는 유전자인 PtrPAL1(phenylalanine ammonia-lyase 1)(a) 및 Ptr4CL1(4-coumaroyl CoA: ligase1)(b)이고; 제2 그룹은 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 유전자인 PtrCHS1(chalcone synthase1)(c), PtrCHS2(chalcone synthase2)(d), PtrCHI1(chalcone isomerase1)(e), PtrF3H1(flavanone 3-hydroxylase1)(f), PtrDFR1(dihydroflavonol reductase1)(g), PtrANS1(anthocyanidin synthase1)(h), PtrANS2(anthocyanidin synthase2)(i) 및 PtrUFGT1(UDP glucose: flavonoid-3-O-glucosyltransferase1)(j)이며; 제3 그룹은 프로안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 유전자인 PtrLAR1(leucoanthocyanidin reductase1)(k) 및 PtrANR1(anthocyanidin reductase1)(l)이다.

[0098] 도 5는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러

(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 유전자의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 5의 (a) 내지 (l)에서 보듯이, 플라보노이드 경로의 시작단계에 관여하는 유전자, 안토시아닌의 생합성에 관련된 유전자 및 프로안토시아닌(PA) 생합성 경로에 특이적인 유전자의 발현수준이 모두 증가됨을 확인하였다.

[0099] 상기 결과로부터, PtrMYB119 유전자는 안토시아닌 및 프로안토시아닌의 생합성에 관여하는 유전자 뿐만 아니라 범용적인 플라보노이드 생합성에 관여하는 유전자 까지도 모두 발현수준을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0100] 아울러, 상기 형질전환 포플러에서 안토시아닌 생합성 경로의 유전자 뿐만 아니라 프로안토시아닌(PA) 생합성 경로의 유전자도 발현수준이 증가되었으므로, 상기 PA가 형질전환 포플러에서 생성되는지의 여부를 확인하였다(도 6). 이때, PA를 확인하기 위하여 DMACA(dimethylaminocinnamaldehyde) 염색을 수행하였다.

[0101] 도 6은 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 프로안토시아닌(PA)의 생성부위를 나타내는 현미경사진으로서, (a)는 줄기를 나타내고, (b)는 잎꼭지부위를 나타낸다. 도 6에서 보듯이, 형질전환 포플러에서는 표피세포층 뿐만 아니라 껍질과 중과피에도 강한 청색으로 표시되는 PA가 생성됨을 확인하였다.

[0102] 또한, MYB 유전자 중에서 프로안토시아닌의 합성에 관여하는 유전자의 발현수준이 PtrMYB119 유전자의 과발현에 의해 영향을 받는지 확인하고자 하였다. 즉, 프로안토시아닌의 생합성의 양성적 조절인자로서 알려진 MYB134 유전자와 프로안토시아닌/안토시아닌의 생합성 억제자로 알려진 MYB182 유전자의 발현수준을 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서 측정하고 비교하였다(도 7).

[0103] 도 7은 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)에서, 프로안토시아닌의 합성에 관여하는 유전자의 발현수준을 측정한 결과를 나타내는 그래프로서, (a)는 프로안토시아닌의 생합성의 양성적 조절인자로서 알려진 MYB134 유전자의 발현수준을 나타내고, (b)는 프로안토시아닌/안토시아닌의 생합성 억제자로 알려진 MYB182 유전자의 발현수준을 나타낸다. 도 7에서 보듯이, 각 형질전환 포플러에서 프로안토시아닌의 생합성의 양성적 조절인자로서 알려진 MYB134 유전자의 발현수준은 대조군과 유사한 수준을 나타내었으나, 프로안토시아닌/안토시아닌의 생합성 억제자로 알려진 MYB182 유전자의 발현수준은 현저하게 감소됨을 확인하였다.

[0104] 즉, PtrMYB119 유전자의 과발현은 안토시아닌과 프로안토시아닌의 합성을 억제하는 유전자의 발현을 저해하여, 안토시아닌과 프로안토시아닌의 합성을 증가시킬 뿐만 아니라 합성된 안토시아닌과 프로안토시아닌의 안정화를 촉진할 수 있음을 알 수 있었다.

[0105] 상술한 바를 종합하면, PtrMYB119 유전자가 안토시아닌 뿐만 아니라 프로안토시아닌의 생합성과 안정화를 촉진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0106] **실시예 3: 프로토플라스트를 이용한 PtrMYB119의 표적확인**

[0107] 상기 실시예 2-6의 결과로부터, 형질전환 포플러에서 발현수준이 크게 증가한 것으로 확인된 PtrCHS1, PtrANS1 및 PtrANS2가 PtrMYB119에 의하여 직접적으로 영향을 받는지 확인하고자, TAA 분석법(transient transcriptional activation assay)을 수행하였다.

[0108] 구체적으로, 효과기 벡터를 제작하기 위하여, PtrMYB119 유전자의 전장 cDNA를 CaMV 35S 프로모터에 작동가능하게 연결시키고, pTrGUS 벡터에 도입하였으며; 리포터 벡터는 pTrGUS 벡터에서 35S 프로모터를 제거한 후, GUS 리포터 유전자 앞쪽에 다양한 프로모터(PtrANS1, PtrANS2, PtrCHS1 또는 PtrCesA4)를 도입하여 제작하였다(도 8a).

[0109] 도 8a는 TAA 분석법에 사용될 효과기 벡터와 리포터 벡터의 구조를 나타내는 개략도이다.

[0110] 상기 제작된 효과기 벡터 및 리포터 벡터를 애기장대 잎의 프로토플라스트에 도입하고, 16시간 동안 배양한 후, 파쇄하고, 수용성 추출물을 사용하여 GUS 분석을 수행하였다(도 8b). 이때, 리포터 벡터만이 도입된 프로토플라스트를 대조군으로 사용하였고, 내부대조군으로는 PtrCesA4 유전자를 사용하였다.

[0111] 도 8b는 PtrMYB119와 PtrCHS1, PtrANS1 및 PtrANS2를 이용한 TAA 분석결과를 나타내는 그래프이다. 도 8b에서 보듯이, PtrMYB119는 내부대조군인 PtrCesA4 프로모터를 제외한 모든 프로모터의 발현을 강하게 활성화시켰고, PtrCHS1 프로모터 및 PtrANS2 프로모터를 각각 30배 및 20배 이상으로 활성화시켰으나, PtrANS1 프로모터는 단지 5배 증가시킴을 확인하였다.

[0112] 따라서, PtrCHS1 유전자 및 PtrANS2 유전자는 PtrMYB119의 직접적인 하류 표적인 것으로 분석되었다.

[0113] **실시예 4: 안토시아닌의 대량생성이 식물의 생장에 미치는 효과분석**

[0114] 식물의 성장이 중지되는 가을에 안토시아닌의 생성량이 증가되는 것으로 알려져 있으므로, 상기 안토시아닌의 대량생성이 식물의 성장에 영향을 미치는지 확인하였다.

[0115] 구체적으로, PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)를 대상으로 줄기의 높이(바닥에서 끝까지의 높이), 직경(토양으로부터 10cm 상단 부위의 줄기 두께), 절간의 수(바닥에서 끝까지) 및 잎의 면적(상위 10 내지 12개 잎의 평균면적)을 각각 측정하였다(도 9의 (a) 내지 (d)).

[0116] 도 9는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)를 대상으로 안토시아닌의 대량생성이 식물의 성장에 영향을 미치는지 확인한 결과를 나타내는 그래프로서, (a)는 줄기의 높이를 나타내고, (b)는 직경을 나타내며, (c)는 절간의 수를 나타내고, (d)는 잎의 면적을 나타낸다. 도 9의 (a) 내지 (d)에서 보듯이, 형질전환 포플러는 높이, 직경, 절간의 수 및 잎의 면적의 측면에서 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않음을 확인하였다.

[0117] 한편, 상기 안토시아닌의 대량생성이 광합성 수준에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 클로로필 형광수준을 분석하였다(도 9의 (e) 및 (f)). 이때, 클로로필 형광수준은 온실에서 재배된 3월령의 각각의 포플러 잎 5 내지 7개를 15분 동안 암소에 방치한 다음, 강한 플래시 빔에 노출시킨 후, Pocket PEA chlorophyll fluorometer(Hansatech, Germany)를 이용하여 클로로필 형광(Fv/Fm)을 측정하였다.

[0118] 도 9의 (e)는 PtrMYB119 유전자가 도입되지 않은 대조군 포플러, 적색소가 강하게 나타나는 두개의 형질전환 포플러(#2 및 4) 및 적색소가 약하게 나타나는 하나의 형질전환 포플러(#3)를 대상으로 잎의 클로로필 형광을 나타내는 사진이고, 도 9의 (f)는 상기 잎의 클로로필 형광의 수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 9의 (e) 및 (f)에서 보듯이, 형질전환 포플러는 광합성 수준에서도 대조군과 별다른 차이를 나타내지 않음을 확인하였다.

[0119] 따라서, 본 발명에서 제공하는 PtrMYB119 유전자가 과발현된 형질전환 포플러는 상기 유전자의 과발현으로 인하여 안토시아닌이 대량으로 생산된다 하여도 성장에 영향을 받지 않음을 알 수 있었다.

[0120] **실시예 5: 안토시아닌의 생산수준의 비교**

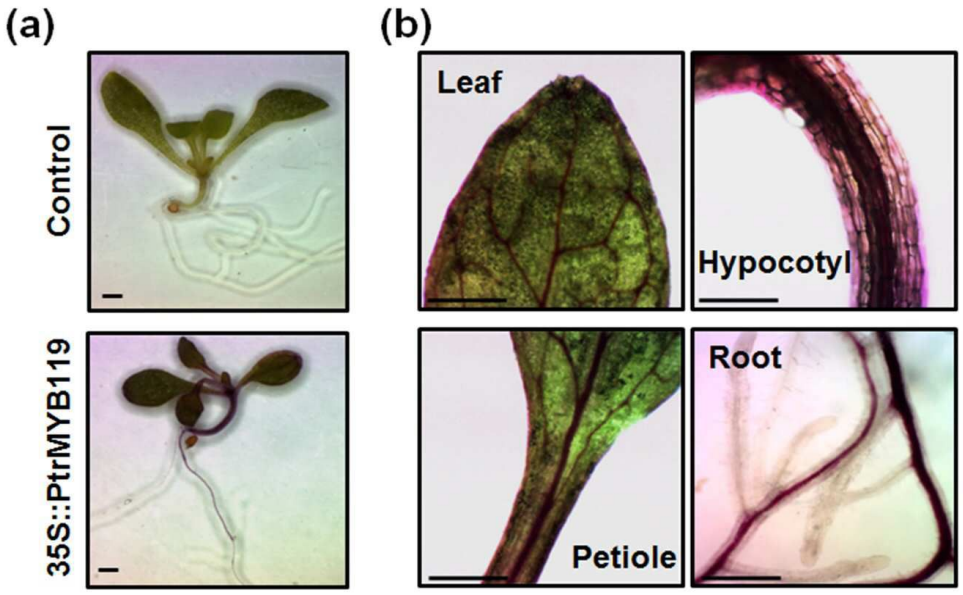
[0121] 상술한 바와 같이, PtrMYB119 유전자가 과발현된 형질전환 포플러는 상기 유전자의 과발현으로 인하여 안토시아닌이 대량으로 생산됨을 확인하였는 바, 상기 형질전환 포플러에서 생성된 안토시아닌의 수준을, 안토시아닌을 높은 수준으로 생성한다고 알려진 종래의 다른 식물에서 측정된 안토시아닌의 수준과 비교하였다(도 10). 이때, 안토시아닌을 높은 수준으로 생성한다고 알려진 종래의 다른 식물로는 토마토, 적양배추, 블루베리, 체리 및 자색고구마를 사용하였고, 측정대상인 안토시아닌으로는 시아니딘과 펠라르고니딘을 사용하였다.

[0122] 도 10은 본 발명에서 제공하는 PtrMYB119 유전자가 과발현된 형질전환 포플러에서 생성된 시아니딘과 펠라르고니딘의 수준을, 안토시아닌을 높은 수준으로 생성한다고 알려진 토마토, 적양배추, 블루베리, 체리 및 자색고구마에서 생성된 시아니딘과 펠라르고니딘의 수준과 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 10에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 PtrMYB119 유전자가 과발현된 형질전환 포플러는 안토시아닌을 높은 수준으로 생성한다고 알려진 식물 중에서 자색고구마를 제외한 나머지 식물보다도 높은 수준으로 시아니딘과 펠라르고니딘을 생성함을 확인하였다.

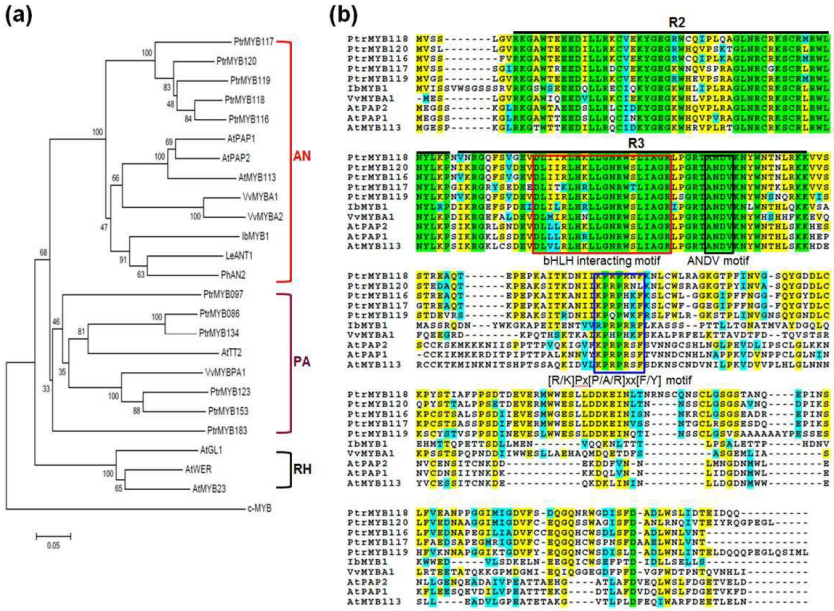
[0123] 따라서, 본 발명에서 제공하는 PtrMYB119 유전자가 과발현된 형질전환 포플러는 안토시아닌의 공급원료로서 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

도면

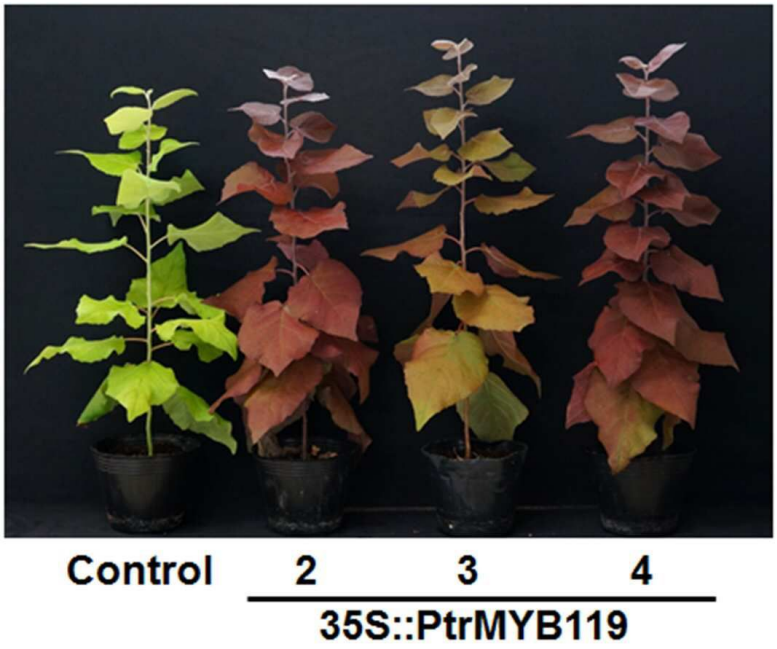
도면1


(a)
(b)
Control
35S::PtrMYB119
Leaf
Hypocotyl
Petiole
Root

도면2


(a)
(b)
PtrMYB117
PtrMYB120
PtrMYB119
PtrMYB118
PtrMYB116
AtPAP1
AtPAP2
AtMYB113
VvMYBA1
VvMYBA2
IbMYB1
LeANT1
PhAN2
PtrMYB097
PtrMYB086
PtrMYB134
AtTT2
VvMYBPA1
PtrMYB123
PtrMYB153
PtrMYB183
AtGL1
AtWER
AtMYB23
c-MYB
AN
PA
RH
R2
R3
bHLH interacting motif
ANDV motif
[R/K]Px[P/A/R]xx[F/Y] motif

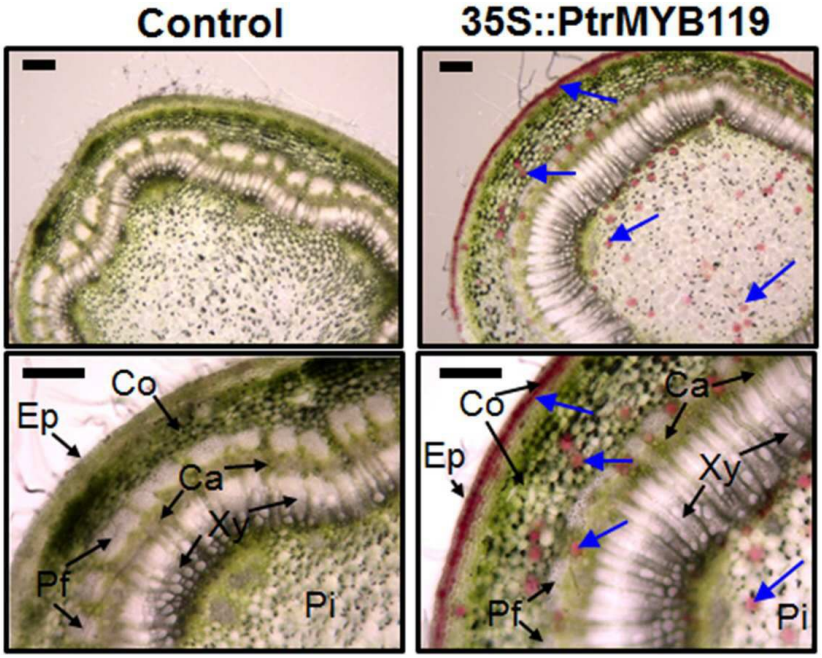
도면3a


Control
2
3
4
35S::PtrMYB119

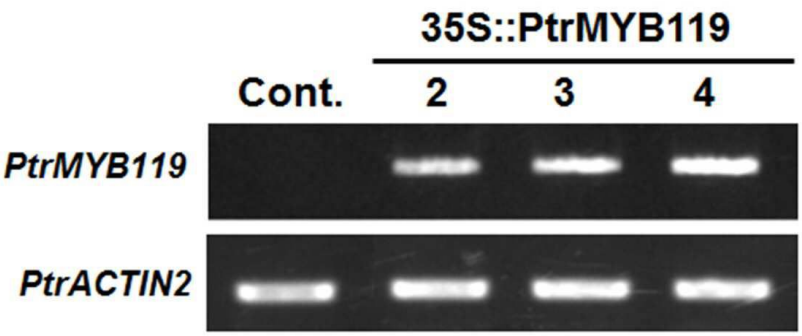
도면3b


Cont.
4
3
2
35S::PtrMYB119
Front
Back

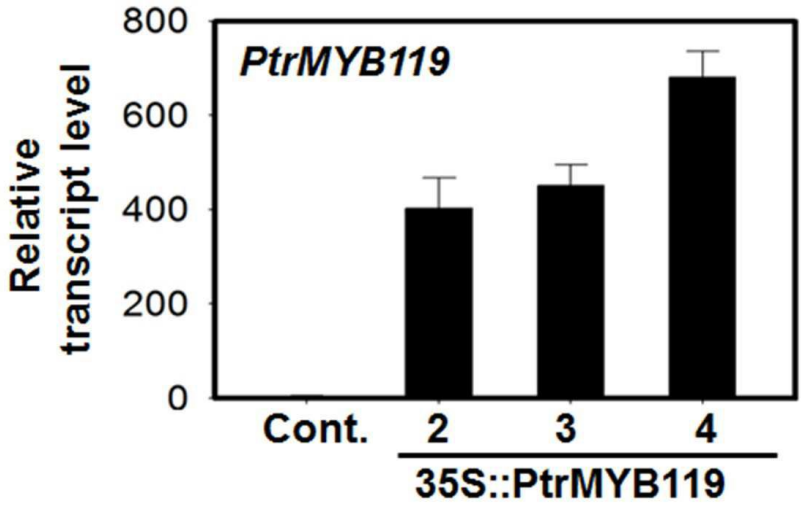
도면3c



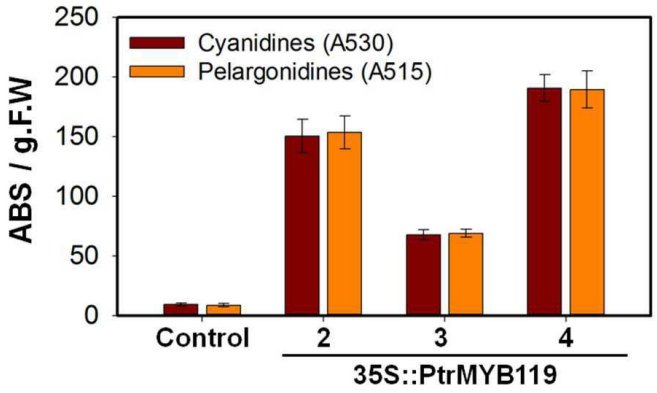
도면3d



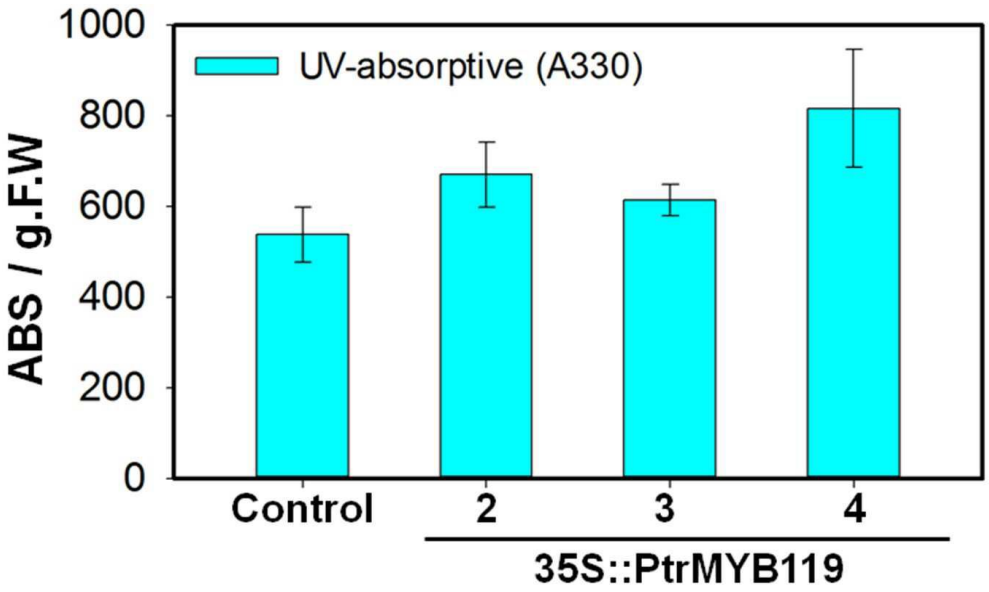
도면3e



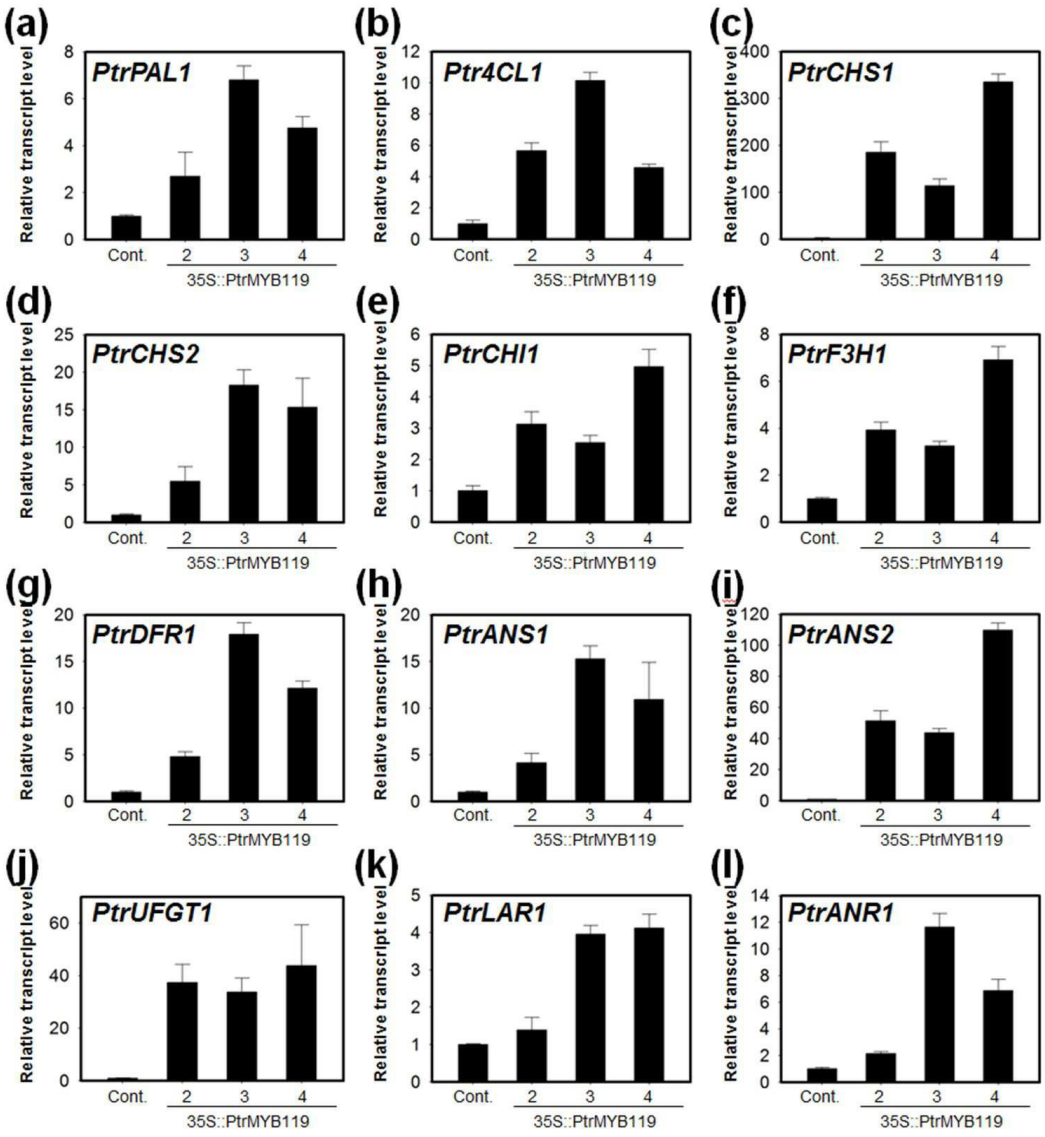
도면4a


250
200
150
100
50
0
ABS / g.F.W
Cyanidines (A530)
Pelargonidines (A515)
Control
2
3
4
35S::PtrMYB119

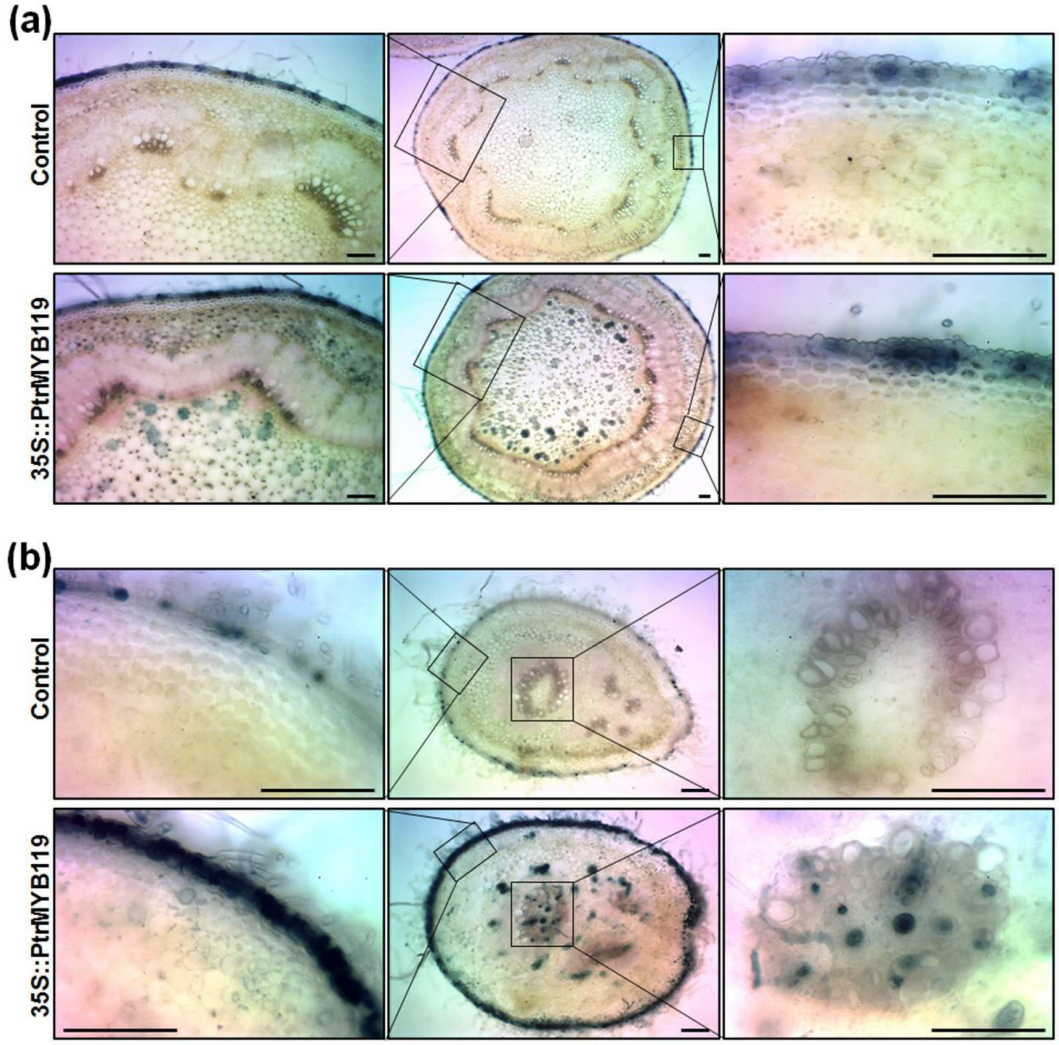
도면4b


1000
800
600
400
200
0
ABS / g.F.W
UV-absorptive (A330)
Control
2
3
4
35S::PtrMYB119

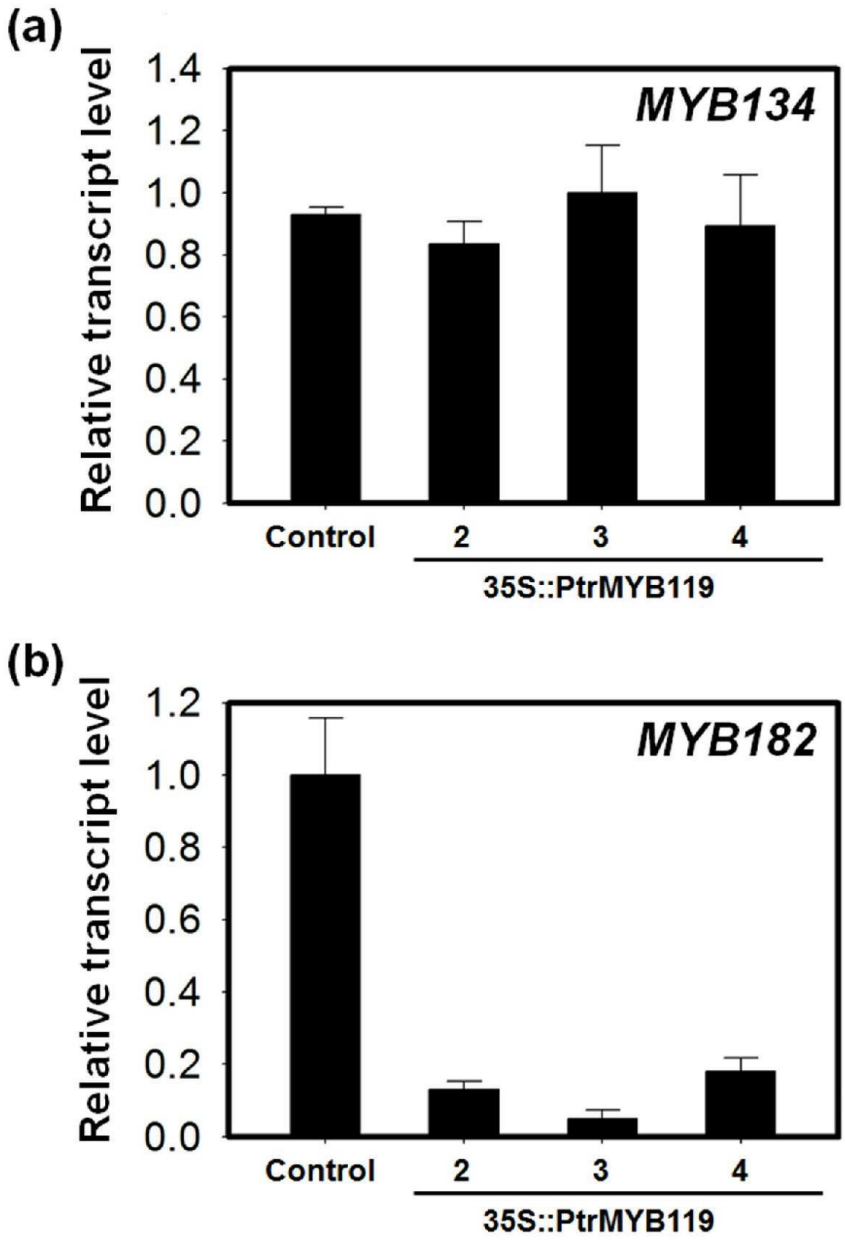
도면5


(a)
PtrPAL1
(b)
Ptr4CL1
(c)
PtrCHS1
(d)
PtrCHS2
(e)
PtrCHI1
(f)
PtrF3H1
(g)
PtrDFR1
(h)
PtrANS1
(i)
PtrANS2
(j)
PtrUFGT1
(k)
PtrLAR1
(l)
PtrANR1
Relative transcript level
Cont.
2
3
4
35S::PtrMYB119

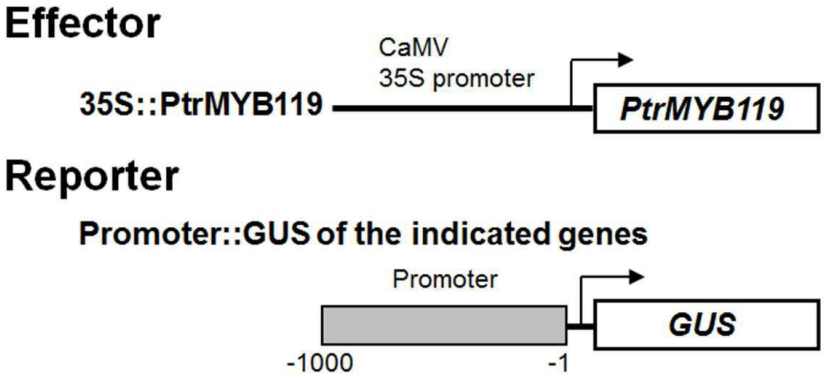
도면6



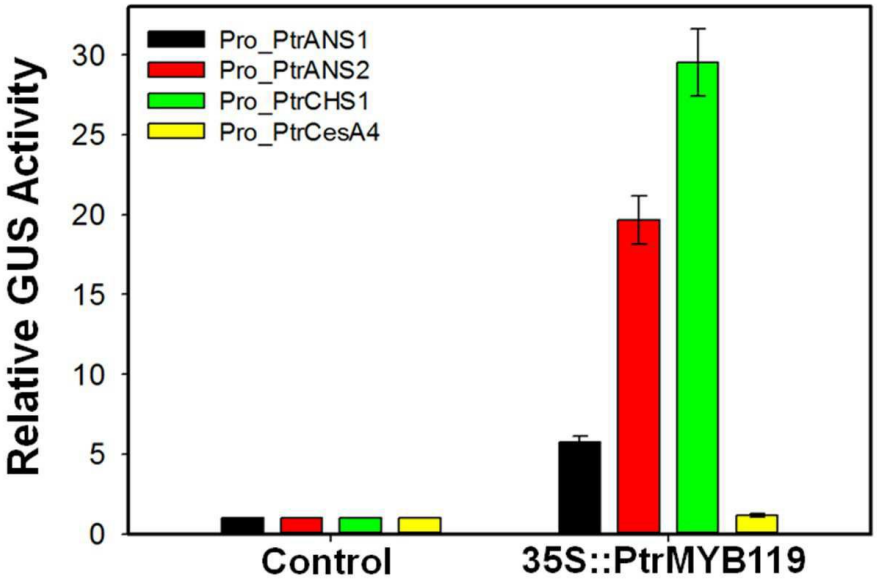
도면7


(a)
Relative transcript level
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MYB134
Control
2
3
4
35S::PtrMYB119
(b)
Relative transcript level
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
MYB182
Control
2
3
4
35S::PtrMYB119

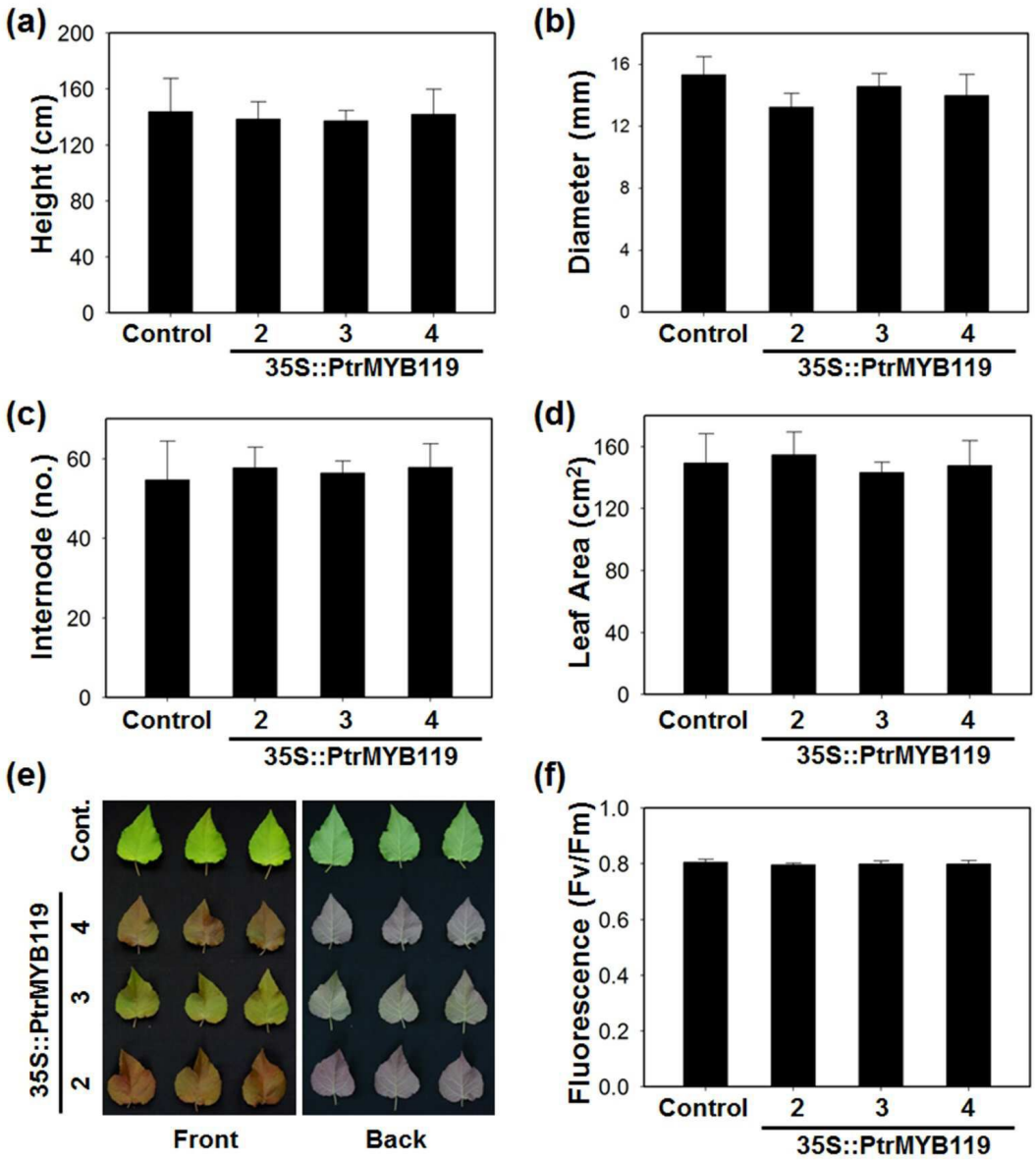
도면8a


Effector
CaMV
35S promoter
35S::PtrMYB119
PtrMYB119
Reporter
Promoter::GUS of the indicated genes
Promoter
GUS
-1000
-1

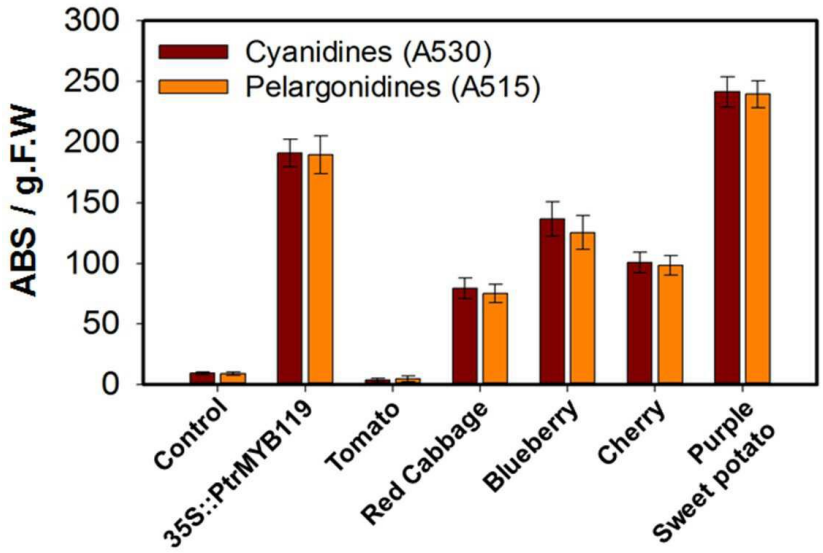
도면8b


Pro_PtrANS1
Pro_PtrANS2
Pro_PtrCHS1
Pro_PtrCesA4
Relative GUS Activity
0
5
10
15
20
25
30
Control
35S::PtrMYB119

도면9


(a)
Height (cm)
200
160
120
80
40
0
Control
2
3
4
35S::PtrMYB119
(b)
Diameter (mm)
16
12
8
4
0
Control
2
3
4
35S::PtrMYB119
(c)
Internode (no.)
60
40
20
0
Control
2
3
4
35S::PtrMYB119
(d)
Leaf Area (cm2)
160
120
80
40
0
Control
2
3
4
35S::PtrMYB119
(e)
Cont.
35S::PtrMYB119
4
3
2
Front
Back
(f)
Fluorescence (Fv/Fm)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Control
2
3
4
35S::PtrMYB119

도면10



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Transgenic plants for enhanceing anthocyanin biosynthesis

<130> KPA150849-KR

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 834

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant PtrMYB119 gene

<400> 1

atggtaggct cattaggagt aaggaaaggt gcatggacgg aggaggaaga tatacttcta 60

aggaagtgcg tcgagaaata tggtgaagga agatggcatg aagttccttc cagagcaggc 120

ttgaatcgat gcaggaaaag ctgcagaatg aggtggttga attatcttaa gccaaatgtc 180

aagagaggac agttttcggt ggacgaagtg gacttgatta tcagactaca caagttgctt 240

ggcaataggt ggtcattgat agctggtaga ctttcaggaa gaacagcgaa tgatgtcaag 300

aattattgga actcaaacca gcgtaagaag gtgatttcta gcactgatga agttcgatca 360

aaaccagaag caaaatcaat cacaagagac aacataataa agcctcaacc ttggaagttc 420

agaagtttat tctggttaag aggaaaaagt actccactta ttaatgttgg taattctcaa 480

tatgggaacg atctttgtaa gtcatgttat tcaacagtat cgccaccttc cgacattaat 540

gaagttgaaa gtttatggtg ggaaagctcg ttagatgaca aagaaattaa tcaaacgatc 600

aacagcagtt gtctgggttc tgtttcagca gcagcagcag cagcttaccc agagtccagc 660

gaaagtcatt ttgtaaagaa caacgcacca ggagggataa aaactgggga cgtgttctat 720

gaacaaggac aaaattgttg gagtgacatt tctttggatg cagacctttg gaatctaatc 780

aatacagaac tagatcaaca acaacctgaa ggacttcagt ctataatgtt gtaa 834