



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월05일
(11) 등록번호 10-1844781
(24) 등록일자 2018년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8222 (2013.01)

C12N 15/8261 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0030380

(22) 출원일자 2017년03월10일

심사청구일자 2017년03월10일

(56) 선행기술조사문헌

Plant Physiology. Vol.170, No.4, 페이지
2494-2510 (2016.02.22.)*

GenBank Accession Number CP002684
(2016.07.27.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

이상열

경상남도 진주시 진주대로 829번길 21 삼환나우빌
101동 1801호

지용훈

경상남도 진주시 진양호로125번길 17

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동완

전체 청구항 수 : 총 1 항

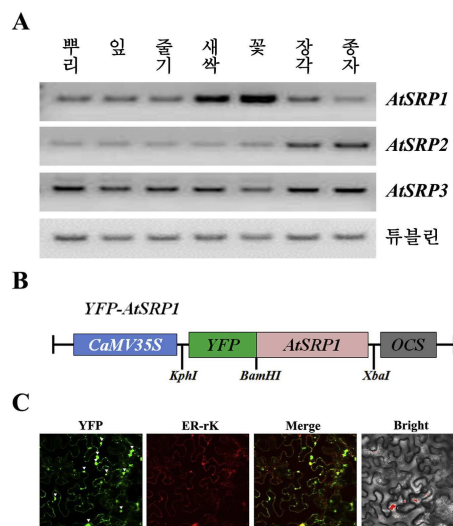
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 AtSRP1 단백질을 발현하는 아라비도시스 식물체

(57) 요약

본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 AtSRP1 단백질을 발현하는 아라비도시스 식물체에 있어서, 상기 AtSRP1 단백질은 식물체 내의 새싹, 꽃, 장각의 생식기관에서 발현되어 세포질 내의 소포체(ER) 및 지방소립(Lipid droplet) 내에 편재되어 있으며 AtSRP1 단백질 발현은 화분 성장과 종자 발달에 기여함을 특징으로 하는 아라비도시스 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

박정훈

대구광역시 동구 신암로16길 33 신천가람타운 104
동 809호

강창호

경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015-0838

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인지초연구지원사업(기본연구)

연구과제명 수도권에서 구리독성에 대한 업록체 산화환원 단백질인 OsTrxm의 방어기작 메카니즘에 대한 연구

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016-0154

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 시스템합성농생명공학사업단

연구사업명 차세대바이오그린사업

연구과제명 시스템합성생물학기법이용 바이오소재 생산 시스템 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호: 2의 DNA 염기 서열로 구성된 AtSRP1 유전자로부터 서열번호: 1의 아미노산 서열로 구성된 AtSRP1 단백질을 발현하는 아라비도시스 식물체에 있어서,

- i) 상기 서열번호: 2의 AtSRP1 유전자는 서열번호: 3의 5'-UTR 영역 및 서열번호: 4의 3'-UTR 영역을 포함하고 서열번호: 5의 첫 번째 엑손과 서열번호: 6의 두 번째 엑손 및 서열번호: 7의 첫 번째 인트론과 서열번호: 8의 두 번째 인트론을 포함하는 유전자임;
- ii) 상기 AtSRP1 단백질은 식물체 내의 새싹, 꽃, 장각의 생식기관에서 발현되어 세포질 내의 소포체(ER) 및 지방소립(Lipid droplet) 내에 편재됨;
- iii) 상기 AtSRP1 단백질 발현은 식물체 내에서 성숙한 화분 낱알을 생성하여 화분 성장과 종자 발달에 기여함; 및
- iv) 상기 AtSRP1 단백질의 발현은 총 mRNA로부터 서열번호: 9의 정방 프라이머 및 서열번호: 10의 역방 프라이머로 RT-PCR시켜 수득된 전사체의 함량으로 측정함; 을 특징으로 하는 아라비도시스 식물체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 AtSRP1 단백질을 발현하는 아라비도시스 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 AtSRP1(At Small Rubber Particle Protein 1) 단백질이 식물체 내의 새싹, 꽃, 장각의 생식기관에서 발현되어 화분 성장과 종자 발달에 기여하는 아라비도시스 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 2000여종의 다양한 식물체를 통해 천연고무(시스-1,4-폴리이소프렌)가 생산되지만 오직 브라질 고무 나무(Hevea brasiliensis) 만이 천연 고무의 상용화 원료로 사용된다. 천연고무는 이소펜테닐 디포스페이트(IPP)로부터 메발로네이트 경로를 통해 생성된다. H. brasiliensis 내의 고무 전이효소는 시스-프레닐 전이효소(CPT)이고 고무 입자에 결합하며 수천 개의 이소프레닐 유니트로 구성된 고무 중합체의 생합성 촉매로 작용한다.
- [0003] 고무나무 내에서 고무 생장 인자(HbREP)와 이와 밀접하게 관련된 동족체인 소형고무입자 단백질(HbSRPP)은 각각 크고 작은 고무 입자에 결합하여 고무 입자 내에 풍부하게 함유되어 있다. HbREP와 HbSRPP의 소수성 및 수불용성과 산성화 특성은 천연고무 생합성에 중요한 역할을 한다.
- [0004] 또한 HbREF 및 HbSRPP는 매우 높은 아미노산 서열 상동성 및 보존된 모티프를 공유하고 있다. 다만 SRPP 단백질의 C-말단 영역은 HbREF에 존재하지 않지만 이들 두 단백질은 공통의 조상으로부터 유래된 것으로 여겨지고 있다. HbREF와 HbSRPP는 상대적으로 작은 단백질이고 분자량은 14 내지 28 kDa 정도이다.

- [0005] 2개의 유형의 민들레 형질전환체를 통한 SRPP 동족체의 RNAi 매개 침묵화(silencing)는 SRPP가 고무 입자 안정성에 매우 중요한 역할을 함을 나타낸다. SRPP 단백질의 발현을 억제시킨 RNAi 형질전환 식물체는 불안정한 고무입자를 나타내고 고무 생산의 40~50% 감소를 나타낸다. 몇 개의 SRPP가 라텍스 응집에 관여하고 있으며 이는 HbSRPP와 Hevea 라텍스 렉틴(HLL) 사이의 상호작용에 의해 증진되는 것으로 알려져 있다. 또한 추위 순화에 의한 guayule SRPP 동족체 PaGHS의 도입은 고무 생합성을 증진시킨다.
- [0006] SRPP 동족체는 몇몇의 비-고무생산 식물종 내에서 동정되었다. 비-고무생산 식물체 내의 몇 개의 SRPP 동족체는 다양한 스트레스 형태에 의해 유도되고 스트레스에 응답하는 역할이 보고되고 있다. 예를 들면 Phaseolus vulgaris PvSR2는 Zn²⁺ 및 중금속 이온 스트레스로부터 유도된다. 반면 고추(Capsicum annuum) CaSRP1와 고구마(Ipomoea batatas) IbMuSI는 비생물학적 스트레스에 의해 유도된다.
- [0007] 또한 CaSRP1 및 IbMuSI를 과발현하는 형질전환 식물체는 아라비도시스 탈리아나 및 담배 식물체 내에서 각각 향상된 스트레스 저항성을 나타내었다. 또한 CaSRP1을 과발현하는 형질전환 아라비도시스 식물체는 향상된 세포주기 진전을 나타내고 야생형(WT) 식물체에 비해 빠른 볼팅과 함께 더 길어진 뿌리, 더 길어진 잎과 같은 빠른 성장을 나타내었다. 이러한 발견은 SRPP 동족체가 비-고무생산 식물체 내에서는 고무 생합성과는 관련없는 다양한 역할을 하는 것으로 여겨진다.
- [0008] 비록 아라비도시스는 전형적인 비-고무생산 식물체이나 3개의 SRPP 동족체(At1g67360, At2g47780, 및 At3g05500)를 지니고 있으며, 본 명세서 내에서 AtSRP1 내지 AtSRP3로 언급한다. 지질 드롭렛(LDs) 내의 생성에 관한 이들의 역할과 스트레스 저항성 만이 종래에 보고되어 있었다.
- [0009] 따라서 본 발명에서는 본 발명자들이 atsrp1 녹아웃 식물체(FLAG_543A05)를 조립하고 녹아웃 식물체를 통해 AtSRP1 단백질의 신규한 생리학적 역할을 조사하였다. 그 결과는 AtSRP1 단백질이 비-고무생산 식물체인 아라비도시스 내에서 화분 성장 및 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 규명되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 atsrp1 녹아웃 식물체(FLAG_543A05)를 조립하고 녹아웃 식물체를 통해 AtSRP1 단백질의 신규한 생리학적 역할을 측정코자 한 것이다. AtSRP1 단백질이 비-고무생산 식물체인 아라비도시스 내에서 화분 성장 및 발달에 중요한 역할을 하는 것을 규명코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 목적은 서열번호: 2의 DNA 염기 서열을 지니는 AtSRP1 유전자로부터 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 AtSRP1 단백질을 발현하는 아라비도시스 식물체에 있어서, 상기 서열번호: 2의 AtSRP1 유전자는 서열번호: 3의 5'-UTR 영역 및 서열번호: 4의 3'-UTR 영역을 포함하고 서열번호: 5의 첫 번째 엑손과 서열번호: 6의 두 번째 엑손 및 서열번호: 7의 첫 번째 인트론과 서열번호: 8의 두 번째 인트론을 포함하는 유전자이며, 상기 AtSRP1 단백질은 식물체 내의 새싹, 꽃, 각각의 생식기관에서 발현되어 세포질 내의 소포체(ER) 및 지방소립(Lipid droplet) 내에 편재되고 상기 AtSRP1 단백질 발현은 화분 성장과 종자 발달에 기여함을 특징으로 하는 아라비도시스 식물체를 제공하는 것이다.
- [0012] 이때 상기 AtSRP1 단백질의 발현은 총 mRNA로부터 서열번호: 9의 정방 프라이머 및 서열번호: 10의 정방 프라이

머로 RT-PCR시켜 수득된 전사체의 함량으로 측정함을 특징으로 한다.

- [0013] 또한 상기 AtSRP1 단백질의 발현은 식물체 내에서 성숙한 화분 낱알을 생성하는 반면 AtSRP1 단백질의 발현이 억제된 형질전환 식물체의 경우 감소된 종자의 수, 불임 종자의 생성, 작은 장각, 감소된 장각 내 종자 세트 및 비정상 종자 형상을 나타내어 생식기관 발달이 저해됨을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 효과는 atsrp1 녹아웃 식물체(FLAG_543A05)를 조립하고 녹아웃 식물체를 통해 AtSRP1 단백질의 신규한 생리학적 역할을 규명한 것이다. 비-고무생산 식물체인 아라비도시스 내에서 화분 성장 및 발달에 중요한 역할을 하는 AtSRP1 단백질을 제공코자 한 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 아라비도시스의 서로 다른 조직 내 AtSRP의 발현 패턴 및 담배 표피 세포에서 YFP-융합 AtSRP1 (YFP-AtSRP1)의 세포 내부 편재를 나타낸다.

(A) 4주령 아라비도시스의 다양한 조직(종자, 뿌리, 잎, 줄기, 꽃봉오리, 꽃 및 장각 조직)에서 총 RNA를 추출하였다. 적하 대조군으로 튜블린을 사용하였다. (B) YFP-AtSRP1 컨스트럭트의 개략적 구조를 나타낸다. (C) *Nicotiana benthamiana* 잎 상피세포의 일시적 발현 시스템에서의 mCherry-라벨화 ER 마커(ER-rk CD3-959)와 YFP-AtSRP1의 공동 편재화를 나타낸다. 시그널은 레이저 주사 공초점 현미경으로 3일 후에 관찰하였다. 좌에서 우로: YFP 및 mCherry(ER-rk)의 형광. YFP와 mCherry 형광을 함께 나타내는 통합된 이미지. 밝은 영역 이미지. 흰색 화살표 머리는 LD의 스폿 및 도트- 유사 구조를 나타낸다.

도 2는 아라비도시스의 T-DNA 삽입 atsrp1 변이주의 구조와 체노타입 PCR과 RT-PCR에 의해 분석한 유전자 발현 패턴을 나타낸다.

(A) AtSRP1 (FLAG_543A05)의 유전자 구조와 T-DNA 삽입을 나타낸다. 검은색과 흰색 박스는 각각 엑손과 AtSRP1의 UTR을 나타낸다. 굵은 실선은 인트론을 나타낸다. F는 정방 프라이머를 나타내며 R 및 R1은 역방 프라이머를 나타내고 LB4는 T-DNA 좌측 경계에 특이적인 프라이머를 나타낸다. 체노타입 PCR에 F 및 LB4 프라이머를 사용하였다. RT-PCR 분석에 F 및 R 프라이머를 사용하였다. (B) AtSRP1의 T-DNA 삽입 녹아웃 변이주 (FLAG_543A05)의 체노타입 PCR을 나타낸다. PCR에 사용된 프라이머는 패턴 A에 나타난 것과 같다. (C) 야생형(WT)과 FLAG_543A05 변이주로부터의 AtSRP1 전사체에 대한 RT-PCR 분석을 나타낸다. PCR에 사용된 프라이머는 A에 나타난 것과 같다. 튜블린을 내부 대조군으로 사용하였다.

도 3은 아라비도시스 atsrp1 변이주의 표현형 분석을 나타낸다.

(A) 장기간 성장 조건하에서 7주령의 야생형 및 atsrp1 변이주 식물로부터의 장각 발달 형태분석을 나타낸다. 야생형(WT)과 atsrp1 변이 식물체의 장각의 크기(B, C) 및 종자 수(D)를 나타낸다. 모든 수치는 20개의 반복된 실험으로부터의 평균±표준편차를 나타낸다. 데이터는 일방 ANOVA 및 Tukey 테스트로 분석하였으며 장각 내 종자 수 및 장각 길이의 차이를 비교하기 위해 사용하였다. (E) 야생형(WT) 및 atsrp1 변이 식물체로부터 채취된 각각 3개의 장각에서 배출된 종자 수와 모양을 나타낸다. (F) 야생형(WT)과 atsrp1 아라비도시스의 종자 모양 비교를 나타낸다. 스케일 바는 각각 2cm(A), 0.5cm(B) 및 1mm(E 및 F)를 나타낸다.

도 4는 야생형(WT) 및 atsrp1 변이 식물체의 꽃밥 및 화분 낱알 구조를 나타낸다.

(A) 알렉산더 염색법으로 야생형 및 atsrp1 식물체의 꽃밥을 염색하였다. 적색 또는 녹색으로 염색된 화분은 각각 생존 가능하거나 생존 가능하지 않은 화분을 나타낸다. (B) 알렉산더 용액으로 염색된 야생형 및 atsrp1 변이 식물체의 화분 낱알 비교를 나타낸다. (C) 소포자 발달 단계에서 DAPI (40,6-디아미디노-2-페닐인돌)로 염색한 화분 입자를 야생형 및 atsrp1 식물체로부터 수득하였다. 화살표는

수축한 화분을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 서열번호: 2의 DNA 염기 서열을 지니는 AtSRP1 유전자로부터 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 AtSRP1 단백질을 발현하는 아라비돕시스 식물체에 있어서, 상기 서열번호: 2의 AtSRP1 유전자는 서열번호: 3의 5'-UTR 영역 및 서열번호: 4의 3'-UTR 영역을 포함하고 서열번호: 5의 첫 번째 엑손과 서열번호: 6의 두 번째 엑손 및 서열번호: 7의 첫 번째 인트론과 서열번호: 8의 두 번째 인트론을 포함하는 유전자이며, 상기 AtSRP1 단백질은 식물체 내의 새싹, 꽃, 장각의 생식기관에서 발현되어 세포질 내의 소포체(ER) 및 지방소립(Lipid droplet) 내에 편재되고 상기 AtSRP1 단백질 발현은 화분 성장과 종자 발달에 기여함을 특징으로 하는 아라비돕시스 식물체에 관한 것이다.
- [0017] 또한 상기 AtSRP1 단백질의 발현은 식물체 내에서 성숙한 화분 낱알을 생성하는 반면 AtSRP1 단백질의 발현이 억제된 형질전환 식물체의 경우 감소된 종자의 수, 불임 종자의 생성, 작은 장각, 감소된 장각 내 종자 세트 및 비정상 종자 형상을 나타내어 생식기관 발달이 저해됨을 특징으로 한다.
- [0018] 이하 본 발명을 첨부된 도면에 의거 더욱 상세히 설명한다.
- [0019] 1. 유전자 발현 패턴과 AtSRP1의 세포 내부 편재
- [0020] 3개의 SRPP의 동족체인 AtSRP1 내지 AtSRP3를 전형적인 비-고무생성 식물체 중의 하나인 아라비돕시스로부터 분리하였다. AtSRPs의 생리적 역할을 조사하기 위해 본 발명자들은 AtSRPs의 조직 특이적 발현 패턴을 RT-PCR을 통해 파악하였다. AtSRPs의 mRNA 전사체는 뿌리, 잎, 줄기, 새싹, 꽃, 장각(silique), 종자를 포함한 모든 조직에서 발현되었다. 특히 본 발명자들은 AtSRP1은 주로 AtSRP2 및 AtSRP3와 달리, 새싹, 꽃, 장각(silique) 등의 생식 기관에서 발현하는 것을 발견했다(도 1a). 이 결과 AtSRP1이 비-고무생성 식물체인 아라비돕시스 내의 생식기관 및 종자 발달에 중요한 역할을 한다는 것을 암시한다. 따라서 본 발명자들은 AtSRP1을 선별하였고 추가 연구를 위해 AtSRP1-T-DNA 삽입 억아웃 변이체를 스크리닝하였다. 이를 통해 아라비돕시스 내의 생식 기능과 관련된 생리학적 특성을 조사하였다.
- [0021] 또한 본 발명자들은 AtSRP1의 세포 내부 편재화에 대해 조사하였다. 이를 위해 황색 형광 단백질(YFP)을 35S 구조 프로모터의 조절 하에 이 단백질의 N-말단에 융합시켜 YFP-AtSRP1을 수득하였다(도 1b). YFP-AtSRP1 컨스트럭트를 아그로박테리움 매개-침투법을 통해 *N. benthamiana* 잎 상피 세포에 형질전환시켰다. 본 발명자들은 공초점 레이저 주사 현미경을 사용하여 YFP-AtSRP1의 형광성을 측정하였다(도 1c). YFP-AtSRP1의 형광 시그널이 스폿- 및 도트- 유사 형상으로 담배 잎 상피 세포 내에서 발견되었다. 이는 AtSRP1이 식물 세포 내에서 지질 드롭렛(LDs)으로부터 타겟화되었음을 나타낸다. 실제로 AtSRP1은 이전에 나타난 바와 같이 LD에 편재화되어 있었다. 또한, 담배 잎 상피 세포에서 YFP-AtSRP1의 형광 신호는 이 단백질이 소포체(ER)에 편재화된 것을 나타내는 mCherry-라벨 소포체 마커(도 1c)와 일치하며 본 발명에서는 mCherry-라벨 소포체 마커 ER-rk, 아라비돕시스 스톡 센터(ARC, <http://www.arabidopsis.org>)에서 구매한 CD3-959를 표준 지시제로 사용하였다. 이러한 결과는 AtSRP1 단백질이 식물 생식 및 종자 개발에 관련된 LD 및 소포체 내에서 특정 역할을 할 수 있음을 시사한다.
- [0022] 2. 아라비돕시스 AtSRP1 억아웃 변이체(FLAG_543A05)의 제조 및 표현형 분석
- [0023] 본 발명자들은 ARC(FLAG_543A05)로부터 AtSRP1 동형접합형 T-DNA 삽입 억아웃 변이체를 수득하였다(도 2a). 상기 FLAG_543A05 억아웃 변이체(atrsrp1) 내에는 T-DNA가 AtSRP1의 첫 번째 인트론에 삽입되어 있다. 동형접합 atrsrp1 변이체를 AtSRP1 유전자-특이 및 T-DNA 보더 프라이머를 사용하여 제노타입 PCR으로 검증하였다(도 2b). RT-PCR을 통해 atrsrp1 변이 식물체 내에서 아무런 AtSRP1 전사체도 발현되지 않았음을 확인하였다. 또한 atrsrp1 변이체는 AtSRP1의 동형접합으로 T-DNA를 삽입한 변이체였다(도 2c). atrsrp1 라인을 사용하여 본 발명자들은 아

라비둡시스 내에서 AtSRP1의 생리적 기능을 조사하였다.

[0024] 본 발명자들이 *atsrp1* 변이 식물체와 WT 아라비도시스의 성장 및 발달을 분석하였을 때 본 발명자들은 생장기 (vegetative stage) 내에서 식물체 간의 차이를 감지하지 못하였다. 그러나 성숙기(mature stage)인 7주령에서 본 발명자들은 이들 식물체간의 커다란 표현형의 차이를 관찰하였다. *atsrp1* 변이체는 매우 짧은 장각과 감소된 수의 성숙된 종자와 같은 생식 기관 내에서 심각한 불임 표현형을 나타내었다. *atsrp1* 변이 식물체의 장각의 길이는 야생형(WT) 아라비도시스의 거의 절반에 불과하였다(도 3a~도 3c). 특히 성숙된 *atsrp1* 장각 내의 종자의 수는 야생형(WT) 식물체의 수보다 매우 낮은 것이었다(10% 이하, 도 3d).

[0025] 또한 변이 종자는 비-동형접합성, 크고 작은 다양한 크기 범위의 비정상 형상 및 약간 어두운 색소 침착을 지닌 종자로 나타난다(도 3e, 도 3f). 이러한 결과는 비-고무생산 식물체인 아라비도시스 내에서 AtSRP1의 역할은 종자의 성장 및 발달에 밀접하게 관련되어 있음을 암시하는 것이다.

[0026] 3. *atsrp1* 변이 식물체 내의 꽃밥 및 화분의 형태학적 분석

[0027] 포스포리파아제 A2(PLA2s)의 RNAi 결실 변이체와 AtMMS21의 표현형은 *atsrp1* 식물체의 표현형과는 화분 성장 및 배우체(gametophyte) 발달 면에서 매우 유사하게 작용한다. 이는 감소된 종자의 수, 불임 종자의 생성, 작은 장각, 감소된 장각 내 종자 세트 및 비정상 종자 형상 등을 포함한다. *atsrp1* 및 PLA2 변이체는 생식기관 발달에 관련된 매우 유사한 표현형을 공유하기 때문에 본 발명자들은 *atsrp1* 변이체 내에서 화분 형상과 배우체 발달을 분석하였다. 본 발명자들은 알렉산더 및 DAPI 염색법을 통해 화분 발달을 염색하고 이를 통해 화분의 생존을 매우 민감한 기법으로 측정하였으며 살아있는 화분 발달과 살아있지 않은 화분 발달 사이의 구별을 명확히 하였다(도 4).

[0028] 알렉산더 염색법으로 살아있는 화분은 붉은색으로 염색하였으며 반면 살아있지 않은 화분은 녹색으로 염색하였다. 본 발명자들은 일정한 발달 크기를 지닌 붉은 염색 화분을 포함하는 야생형(WT) 식물체의 성숙한 화분 발달을 발견하였다(도 4a). 이와는 대조적으로 *atsrp1* 변이체 내의 화분 발달의 대부분은 녹색으로 염색되었다. 이는 화분 발달의 대부분이 살아있지 않고 매우 높게 변화할 수 있는 이형성의 크기와 형상을 지닌 것이었다(도 4a 및 도 4b). 또한 야생형 및 *atsrp1* 식물체로부터 화분 핵의 마이크로스포어 DAPI 염색은 큰 차이를 나타내었다(도 4c). 야생형 화분 내에서 DAPI-염색된 핵은 명확한 일정한 크기였으나 *atsrp1* 식물체 내의 화분 핵은 불명확한 경계와 혼돈된 염색 패턴을 나타내었다. 또한 염색된 영역의 크기는 *atsrp1* 화분 발달 사이에 매우 큰 변동을 나타내었다. 이러한 결과는 고무-생산 식물체 내의 SRPP의 역할과 대비되는 AtSRP1이 비-고무생산 식물체 아라비도시스 내에서 화분 성장 및 발달에 필수적 역할을 함을 나타내는 것이다.

[0029] *H. brasiliensis*의 고무 입자 내의 두 개의 중요한 단백질 성분인 REF 및 SRPP는 고무 생합성에 매우 중요한 역할을 한다. HbSRPP 오르소로그인 *guayule*의 PaGHS와 민들레 TbSRPP 및 TkSRPP는 고무 생합성에 또한 매우 결정적인 역할을 한다. 고무 생합성 경로 내에서 SRPP의 중요성에도 불구하고 다수의 SRPP 동족체의 비-고무생산 식물체 내에서 생리학적 기능은 아직까지 규명되지 않고 있다. 최근 SRPP 동족체가 비-고무생산 식물체 내에서 스트레스 저항성에 역할을 함을 보고하고 있다. 특히 고추(*Capsicum annuum*) 및 고구마(*Ipomoea batatas*)로부터의 CaSRP1 및 IbMusI는 비생물학적 스트레스에 의해 유도되고 이들 유전자를 과발현하는 형질전환 식물체는 가뭄 및 카드뮴 스트레스에 대해 매우 큰 저항성을 지닌다.

[0030] 이와 유사하게 3개의 AtSRP가 소포체를 포함하는 스트레스 반응에 관련되어 있고 이는 염분 및 산화 스트레스에 반응하는 것이다. 특히 소포체 스트레스 유발자인 튜니카마이신과 DTT에 의해 유도된 AtSRP1의 발현은 두배 이상 증가하였다. 또한 AtSRP2와 AtSRP3는 염분과 과산화수소 처리 하에 각각 6배 및 12배의 발현이 유도되었다.

- [0031] AtSRP3는 아보카도로부터의 LDAP(지질 드롭렛-관련 단백질)와 매우 높은 상동성을 지닌다. LDAP는 특히 비-종자 식물 세포(담배 BY-2 세포) 내의 LD에 특이하게 편재되어 있으며 이는 식물 세포질 내에서 지질이 풍부한 입자의 결합과 안정화에 관련되어 있는 것이다. 본 발명에서 본 발명자들은 AtSRP1의 기능이 비-고무생산 식물체인 아라비도시스 내에서 화분 성장 및 발달에 관련되어 있음을 최초로 개시한 것이다.
- [0032] *atsrp1* 녹아웃 변이체는 화분 및 종자 발달에 심각한 결함을 지닌다. 이는 심각한 불임 표현형으로 짧은 장각, 장각 내 감소된 종자 세트 및 비정상 종자 형상 등이다. AtSRP1 전사체는 특히 새싹, 꽃 및 장각과 같은 생식 기관 내에서 주로 발현되는 것이다. 따라서 AtSRP1은 종자 성숙에 관련되어 있고 화분 생식의 화분 생식의 역할을 함과 일치하는 것이다. 또한 AtSRP1은 식물체 세포 내의 LD 및 소포체 내에 편재되어 있다. LD는 꽃밥 및 화분 발달 기간 내에 화분 낱알을 탈수 및 환경 스트레스로부터 보호하기 위해 화분 코트 내의 소수성 막의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 소포체는 화분 발달, 화분 발아 및 화분 관 성장에 관련된 대사 산물을 축적하는데 관련되어 있다.
- [0033] 현재 스트레스-저항 단백질이 식물체의 발달에 역할을 함을 나타내는 몇 가지 보고가 있다. 이때 스트레스 저항 단백질은 미토겐-활성화 단백질 키나아제(MAPK) 및 이노시톨 폴리포스페이트 키나아제(AtIPK2 α 및 AtIPK2 β 이다. 형질전환 담배 식물체는 보존적으로 AtIPK2를 과발현시키고 이를 통해 삼투압, 가뭄, 추위 및 산화 스트레스 처리에 대한 저항성을 증진시킨다. 이러한 단백질은 화분 발달, 화분 관 가이드 및 배아 형성에 대해 중요한 역할을 함이 녹아웃 변이체 분석을 통해 밝혀졌다.
- [0034] 또한 BiP 단백질이 단백질 국소화, 단백질 폴딩 및 소포체 내에서 품질 보증을 조절함이 알려져 있고 이들 단백질이 자성 배아체 발달에 큰 역할을 함이 알려져 있다. 지질 효소 포스포리파아제 A2(PLA2)는 노화, 상처, 스트레스 응답, 병원체 대응 및 세포간 막 트래피킹 기능을 지닌이 알려져 있으며 PLA2의 RNAi 변이체는 심각한 불임, 매우 감소된 종자의 수, 감소된 장각 길이 및 화분 낙태와 같은 비정상 화분 발달을 나타낸다. 이는 AtSRP1과 같은 스트레스 관련 단백질이 식물 성장 및 발달에 관련된 역할을 한다는 개념을 확인하는데 도움을 줄 것이다.
- [0035] 본 발명에서 본 발명자들은 화분 성장 및 발달에 관련된 비-고무생산 식물체인 아라비도시스 내에서 AtSRP1의 새로운 기능을 동정하였다. 고무 생합성 및 스트레스 반응 내의 중요한 엘레먼트임과 더불어 이러한 시험 결과는 SRP가 비-고무생산 식물체 내에서 식물 발달에 큰 역할을 함을 확인한 것이다.
- [0036] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0037] (실시예 1) 식물 재료 및 성장 조건
- [0038] 본 발명에서는 4 Wassilewskija(WS4)을 기본 표현형(WT)으로 사용 하였다. AtSRP1의 T-DNA 삽입 라인(FLAG_543A05)는 베르사유 유전학과 식물 육종 연구소(INRA, 파리, 프랑스) 내의 아라비도시스 탈리아나 자원 센터(ARC)에서 획득하였다. 야생형 (WS4) 및 *atsrp1* 변이 식물체는 16시간 광 / 8시간 암 주기 및 70 % 습도하에서 22°C에서 토양 내에서 성장시켰다.
- [0039] (실시예 2) 유전자 발현 분석

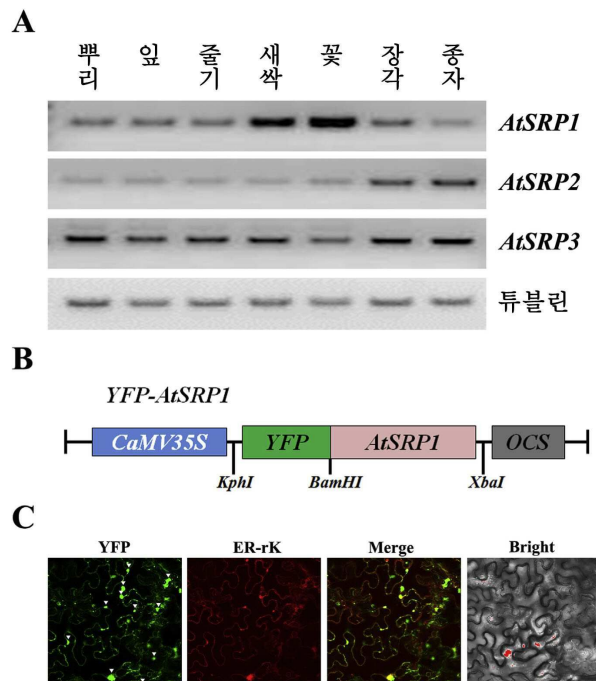
- [0040] 3주령 야생형 식물체로부터 뿌리, 줄기 및 잎과 5주령 식물체로부터 꽃봉오리(새싹, 눈) 및 꽃, 8주령 야생형 식물체로부터 건조된 씨앗을 채집하고 총 RNA의 분리 및 cDNA 합성을 위해 액체 질소에 냉동시켰다. 총 RNA는 MACHEREY-NAGEL RNA 키트(Duren, 독일)를 사용하여 샘플로부터 추출하고 사용자 지침에 따라 RevertAid 역전사 효소(Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit, Lithuania)를 사용하여 역전사시켰다. 새로 합성된 cDNA를 ddH₂O 50 ng/ μ l로 희석하고, 특정 프라이머를 사용하여 중합 효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭시켰다.
- [0041] AtSRP1, AtSRP2 및 AtSRP3의 프라이머는 다음과 같다. AtSRP1 정방: 5-GAACTCACAAAAAACTAAGATGGAGACA-3(서열번호: 9) AtSRP1 역방: 5-CAACAAATCACAAAATGTCTCAATCCTACT-3(서열번호: 10) AtSRP2 정방: 5-AACGGCACCAAGTCTTTGACAATGG-3(서열번호: 11) AtSRP2 역방: 5-AAGGAATCTTTGGCTTCAGAAGAGTAAATAGTCA-3(서열번호: 12) AtSRP3 정방: 5-ATAATCTCTTTGCATCGATTCATCATG-3(서열번호: 13) AtSRP3 역방: 5-TCACACTAACAAAACCCATATCAATC-3(서열번호: 14). AtSRP1, AtSRP2 및 AtSRP3의 발현 수준은 내부 대조 유전자인 튜블린(AT5G62690)과 비교하였다.
- [0042] 튜블린을 위한 특정 PCR 프라이머는 다음과 같다. 정방: 5-CCAACAACGTGAAATCGACA-3(서열번호: 15), 역방: 5-TCTTGGTATTGCTGGTACTC-3(서열번호: 16). PCR 사이클은 95℃에서 2분간의 최초 변성 단계를 시작으로 95℃에서 20초, 55℃에서 40초 및 72℃의 1분을 30회 사이클로 실행하며 72℃에서 5분의 마지막 사이클 단계로 실행하였다. PCR 생성물은 TAE 완충액(400 mM Tris, 200 mM 아세트산나트륨 및 20 mM EDTA, pH 8.3) 내의 1% 아가로스 겔(Life Technologies, USA)을 사용하여 전기주입하고 에티듐 브로마이드로 염색하였다.
- [0043] (실시예 3) AtSRP1의 세포 내부 편재
- [0044] 이전에 언급한 바와 같이 AtSRP1는 아라비도시스 cDNA 라이브러리에서 PCR을 사용하여 클로닝 하였다. 전체 코딩 영역 서열의 확인 후에, N-말단 영역에서 YFP를 암호화시킨 바이너리 벡터인 pCAMBIA1300의 절단 부위인 BamHI/XbaI 사이트에 전체 길이 cDNA를 라이게이션 시킨다. 담배식물(Nicotiana benthamiana) 잎에 pCAMBIA1300::YFP-AtSRP1 컨스트럭트를 삽입하기 위해 아그로박테리움 균주(Agrobacterium tumefaciens GV3101)를 감염 침투시킨다. 즉 Agrobacterium tumefaciens GV3101 균주를 50 mg/ml 카나마이신, 50 mg/ml 리팜피신, 0.2mM 아세토시링곤 및 10mM MES로 구성된 LB 배지 상에서 정지 상태가 될 때까지 30 ℃에서 배양시킨다. 아그로박테리움 균주는 실온에서 15분 동안 3000 rpm으로 원심 분리시켜 수득한 후 침투 완충액(10 mM MgCl₂, 10 mM MES (pH 5.6), 및 100 mM 아세토시링곤)으로 흡광도 OD600이 약 0.8이 될 때까지 재현탁시켰다. 3시간 인큐베이션시킨 후 pCAMBIA1300::YFP-AtSRP1 컨스트럭트 및 p19 플라스미드를 포함하는 아그로박테리움 균주 혼합액을 3주령 N. benthamiana 잎의 배측(abaxial) 공기 층에 바늘없는 시린지를 통해 침투시킨다. 시험은 적어도 3회 이상 반복한다.
- [0045] (실시예 4) T-DNA 삽입 atsrp1 변이체의 분리
- [0046] 유전자-특이 프라이머(AtSRP1-F, 5-AACATCCACACACGACGACC-3(서열번호: 17), 및 AtSRP1-R1, 5-ACGACGGTGGTGACGGCTC-3(서열번호: 18)와 T-DNA-특이 프라이머 (RB4, 5-CGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGT-3(서열번호: 19))를 사용하여 게놈 DNA의 PCR 분석에 의해 T-DNA 삽입 호모자이 고트체를 확인하였다. MACHEREY-NAGEL RNA키트(Duren, Germany)와 Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis 키트(Lithuania)를 사용하여 사용자 지침에 의해 야생형 및 atsrp1 변이 식물체로부터 총 RNA를 분리하였다. 신규로 합성된 cDNA는 50 ng/ μ l 의 ddH₂O로 희석하고 특이 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭시킨다. AtSRP1에 대한 PCR 프라이머는 다음과 같다: AtSRP1-정방, 5-GAACTCACAAAAAACTAAGATGGAGACA-3(서열번호: 9), 및 AtSRP1-역방, 5-CAACAAATCACAAAATGTCTCAATCCTACT-3(서열번호: 10). RNA 양을 일반화하기 위한 내부 대조군으로서 튜블린 유전자를 사용하였다.

[0047] (실시예 5) 조직학적 분석

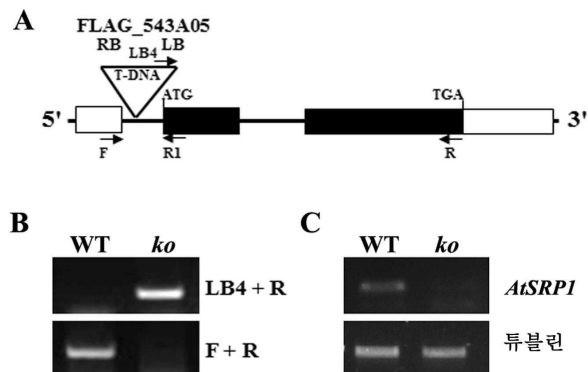
[0048] 화분 생존능을 위해 야생형(WT) 및 *atsrp1* 변이 식물체로부터 꽃밥을 채취하고 현미경 슬라이드 상에서 알렉산더 염색 용액으로 염색시켰다. 염색된 꽃밥은 올림푸스 FLUOVIEW FV1000 현미경으로 관찰하였다. 또 다른 화분 전개의 관찰을 위한 방법은 DAPI 염색 용액으로 꽃가루 현상을 관찰하는 데 사용되는 또 다른 방법은 DAPI 염색 용액 0.1M 인산나트륨, pH 7.0, 1mM EDTA, 0.1% Triton X-100 및 0.5 μ g/ml DAPI으로 염색시켜 관찰하였다. 20 분간 암소에서 인큐베이션시킨 후 화분 핵을 올림푸스 현미경으로 관찰하였다.

도면

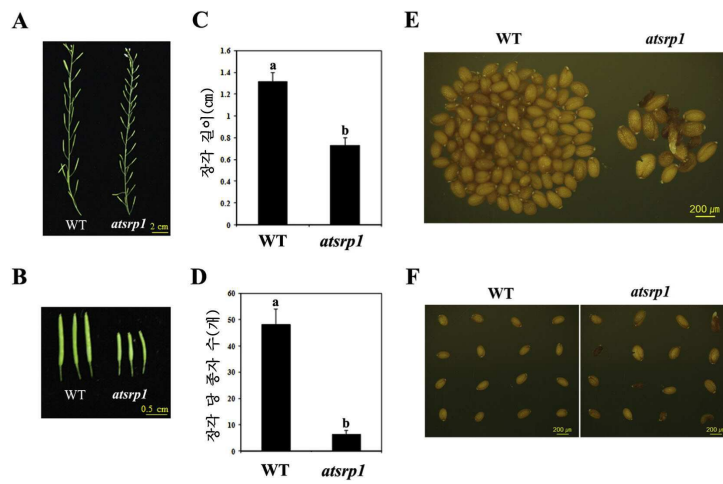
도면1



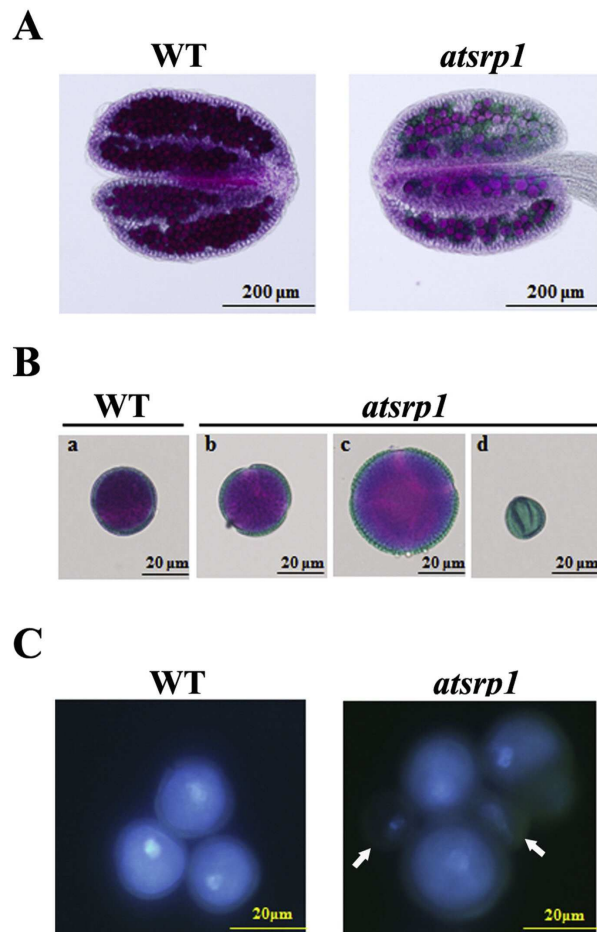
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Arabidopsis plant expressing AtSRP1 protein
- <130> KP-999
- <160> 19

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 240

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

Met Glu Thr Glu Lys Lys Asn Ser Lys Glu Val Ala Leu Lys His Leu

1 5 10 15

Ala Phe Val Arg Ile Ala Thr Ile His Ile Leu Ala Ser Val Ser Asn

20 25 30

Leu Tyr Glu Tyr Ala Lys Gln Asn Ser Gly Pro Leu Lys Ser Ala Val

35 40 45

Glu Lys Val Glu Gly Ala Val Thr Thr Val Val Thr Pro Val Tyr Gln

50 55 60

Lys Phe Lys Asp Val Pro Asp Ser Leu Leu Val Phe Leu Asp His Lys

65 70 75 80

Val Gly Glu Val Ser Tyr Lys Phe Asp Glu His Ala Pro Pro Met Ala

85 90 95

Lys Lys Val Val Asn Gln Ala His Val Leu Ile Tyr Lys Ala Thr Glu

100 105 110

Lys Ala Gln Ser Phe Val Lys Glu Ala Arg Thr Gly Gly Pro Lys Ala

115 120 125

Ala Phe Asn Tyr Ala Ala Thr Glu Tyr Lys Phe Phe Val Val Thr Asn

130 135 140

Ser Val Lys Val Trp Ala Lys Leu Asn Gln Tyr Lys Pro Ile His Ala

145 150 155 160

Met Gly Asp Lys Ala Leu Pro Val Ala Ala His Phe Ser Ser Arg Tyr

165 170 175

Asn Asp Leu Val Thr Asp Met Thr Asn Met Gly Tyr Ser Leu Val Gly

180 185 190

Tyr Leu Pro Leu Val Pro Val Asp Asp Ile Val Lys Ala Tyr Glu Lys

195 200 205

Glu Asp Ala Arg Arg Lys Lys Gly Gly Asp Thr Ala Gly Lys Lys Gly

210 215 220

Glu Thr Thr Asp Ala Ala Asp Gly Asp Lys Ser Ser Ser Asp Ser Glu

225 230 235 240

<210> 2

<211> 1613

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

tttctagaaa cgattctttt ttttaataccc cacacaccct cagatctatt atcaaccgtt 60

ggattacgtg gacaagtcca atgccactcg tatttttaac cattcctcac actcctcaac 120

gtgatgtgaa gatactttgc tgtttcataa cgtcataaag aacagtgaca ggcgaaattt 180

ctcaagaaag caaatcgga gaactcacia aaaaaactaa ggtaagagat tattatcatc 240

acttttggtc ttctttcact caaaactacg atcaaaatcg tgatttcac gtctttggtg 300

tagatggaga cagagaagaa aaatagcaag gaggtagcgc taaaacacct agcgttcgtg 360

agaattgcaa cgatccatat tctggttcc gtctcaaate tctacgaata cgctaaacaa 420

aactccggtc ctctcaaate cgccgtggaa aaggctgaag gagccgtcac caccgtcgtc 480

acccctgtct atcagaaatt caaagatgtt cctgattctc tcttggcttt tctagatcac 540

aaggtagagc ccaattttga attttcata gatattgtct ttgttggatc tgatgaccta 600

atttagaaac cagatcgtgt ttagtttttc aaacatttcc tttctttatt tacttttgct 660

aggtgggtga agtttcgtac aagtttgatg agcatgctcc tccaatggct aagaaagtgg 720

tgaatcaagc acatgtattg atctacaagg cgacagagaa agctcaaagc tttgtgaaag 780

aggctcgtac cgggtgtccc aaagctgcgt ttaactatgc tgcaactgag tacaagtttt 840

tcgttggtac caactcgggt aaagcttggg ctaaacttaa ccagtataaa ccaatccatg 900

caatgggtga caaagctttg cctgtggctg cacacttttc cagtcggtac aacgatttgg 960

tgactgatat gactaatatg ggttactctt tggttggtta tcttccgttg gttcctgttg 1020

atgacattgt taaggcttat gaaaaggaag atgcaaggag aaagaaagga ggggatacgg 1080

ctggaaagaa aggagagact actgatgcgg ctgatgtga taaatcatcg tctgattcgg 1140

agtaggattg agacattttg tgatttgttg ctgctttgga aagtttggtt tgttgggttt 1200

tggttatgtg tgtaaatgat cttaggacct ctcttttttt cttctatcac agaactttga 1260

actagtgttt tatctcttgg tgctgtgaaa atgtactacg tgtgtttcga tctttttaaa 1320

caaggatggg tagtgtagc tacataactt cgaagaacat gaaaaaatta tcacattttg 1380
 agaaattgta tcagtatcaa aaatggagga gatggagaat caaaacaact ttactaagaa 1440
 ccaatgagca ttatttcttt ctctgtcgta aacaagtttg aagttattat ttgagttttg 1500
 taccaagctc ccagacacct taagaacaaa tagaaacaga agcggacaaa ctccgagaaa 1560
 aatagcttga aaacaaacat gcatccatcc agacagcata acacatcttc ttt 1613

<210> 3
 <211> 221
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 3

tttctagaaa cgattctttt ttttaataccc cacacacct cagatctatt atcaaccgtt 60
 ggattacgtg gacaagtcca atgccactcg tatttttaac cattcctcac actcctcaac 120
 gtgatgtgaa gatactttgc tgtttcataa cgtcataaag aacagtgaca ggcgaaattt 180
 ctcaagaaag caaatcggaa gaactcacia aaaaaactaa g 221

<210> 4
 <211> 468
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 4

gattgagaca ttttgtgatt tgttgctgct ttggaaagtt tggtttgttg ggttttggtt 60

 atgtgtgtaa atgatcttag gacctctctt ttttcttct atcacagaac ttgaactag 120
 tgttttatct cttggtgctg tgaaaatgta ctacgtgtgt ttcgatcttt ttaaacaagg 180
 atgggtagtg ttagctacat aacttcgaag aacatgaaaa aattatcaca ttttgagaaa 240
 ttgtatcagt atcaaaaatg gaggagatgg agaatacaaa caactttact aagaaccaat 300
 gagcattatt tctttctcgt tcgtaaacaa gtttgaagtt attatttgag ttttgtacca 360
 agctcccaga cacttaaga acaaatagaa acagaagcgg acaaaactcg agaaaaatag 420
 cttgaaaaca aacatgcatc catccagaca gcataacaca tcttcttt 468

<210> 5
 <211> 240
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 5

atggagacag agaagaaaaa tagcaaggag gtagcgctaa aacacctagc gttcgtgaga 60
attgcaacga tccatattct ggcttccgct tcaaatctct acgaatacgc taaacaaaac 120
tccggctctc tcaaatccgc cgtggaaaag gtcgaaggag ccgtcaccac cgtcgtcacc 180
cctgtctatc agaaattcaa agatgttcct gattctctcc tggcttttct agatcacaag 240
240

<210> 6

<211> 483

<212>

> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

gtgggtgaag tttcgtacaa gtttgatgag catgctctc caatggctaa gaaagtgggtg 60
aatcaagcac atgtattgat ctacaaggcg acagagaaag ctcaaagctt tgtgaaagag 120
gctcgtaccg gtgggcccaa agctgcgttt aactatgctg caactgagta caagtttttc 180
gttgtgacca actcgggttaa agtctgggct aaacttaacc agtataaacc aatccatgca 240
atgggtgaca aagctttgcc tgtggctgca cacttttcca gtcggtacaa cgatttgggtg 300
actgatatga ctaatatggg ttactctttg gttggttatc ttccgttggg tctgtttgat 360

gacattgtta aggccttatga aaaggaagat gcaaggagaa agaaaggagg ggatacggct 420
ggaaagaaag gagagactac tgatgcggct gatggtgata aatcatcgtc tgattcggag 480
tag 483

<210> 7

<211> 82

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 7

gtaagagatt attatcatca cttttgttct tccttcactc aaaactacga tcaaatcgt 60
gatttcatcg tctttgggtg ag 82

<210> 8

<211> 119

<212>

> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 8

gtagagccca attttgaatt tctcatagat ttagtctttg ttggatctga tgacctaat 60

tagaaaccag atcgtgttta gtttttcaaa catttccttt ctttatttac ttttgctag	119
<210> 9	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 9	
gaactcacia aaaaaactaa gatggagaca	30
<210> 10	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 10	
caacaaatca caaatgtct caatcctact	30
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 11	
aacggcacca agtctttgac aatgg	25
<210> 12	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer	
<400> 12	
aaggaatctt tggcttcaga agagtaaata gtca	34
<210> 13	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Primer
 <400> 13
 ataatctctt tgcacgatt tcatcatg 28
 <210> 14
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 14
 tcacactaac aaaacaccca tatcaatc 28
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 15
 ccaacaacgt gaaatcgaca 20
 <210> 16
 <211>
 > 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 16
 tcttggtatt gctggtactc 20
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer
 <400> 17
 aacatccaca cagcacgc c 21
 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 18

acgacggtgg tgacggctc

19

<210> 19

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 19

cgtgtgccag gtgcccacgg aatagt

26