

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 애기장대의 스트레스 유도성 *AtCYS2* 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터를 포함하는 발현벡터.

청구항 3

제2항의 발현벡터를 도입한 형질전환 세포.

청구항 4

제2항의 발현벡터를 숙주식물에 형질도입한 형질전환 식물체.

청구항 5

제2항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 포함하는 프로모터, 외래의 유용물질 코딩서열 및 전사종결자(terminator) 서열을 포함하는 스트레스 내성 또는 유용물질 대량 생산용 발현벡터.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 스트레스에 의해 유도되는 애기장대 파이토시스타틴(*AtCYS2*) 프로모터에 관한 것이다. 보다 상세하게는 저온(cold), 고온(heat), 가뭄(drought) 및 상해(wound)와 같은 비생물학적·기계적 스트레스에 의해 유도되는 애기장대 파이토시스타틴(*AtCYS2*) 프로모터 및 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 시스타틴(Cystatin)은 시스테인 프로테아제를 저해하는 단백질 그룹으로서, 진핵생물체 내에 존재한다. 식물체의 시스타틴은 파이토시스타틴(Phytocystatins, PhyCYSs)이라 불리며, 시스타틴 상과(superfamily)에서 독립적인 아과(subfamily)를 형성하고 있다. 여러 종류의 파이토시스타틴은 세포사멸(Belenghi et al. 1003), 과실의 발생(Ryan et al. 1998; Neuteboom et al. 2009) 및 씨의 발생 및 발아(Abe et al. 1987; Bolter 1993; Misaka et al. 1996; Gaddour et al. 2001; Hong et al. 2007; Hwang et al. 2009) 등과 같은 다양한 프로세스에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 상기 파이토시스타틴에 대한 결과에 이은 후속연구들은 식물체가 병원체나 곤충의 공격에 대해 스스로를 방어하는 기전에 있어서 파이토시스타틴의 기능에 대해 집중되어져 왔으며, 최근에는 이 단백질이 비생물학적 스트레스(abiotic stress)에 대한 반응에도 연관되어 있는 것으로 밝혀지고 있다(Gaddour et al. 2001; Atkinson et al. 2004; Diop et al., 2004; Zhang et al. 2008).

[0004] 식물체에 가해질 수 있는 스트레스는 여러가지 종류가 있으며, 주로 병원체나 생명체에 의한 생물학적, 화학적 스트레스 이외에도 비생물학적 스트레스, 기계적 스트레스가 있다. 비생물학적 스트레스란 가뭄이나 저온, 고염분, 고온, 저온과 같은 열악한 환경조건을 말하며 식물의 성장과 생산성을 저하시키는 주요 요인으로서, 환경 스트레스로도 일컬어지고 있다. 또한 기계적 스트레스는 물리적으로 식물체가 상해를 입는 경우의 스트레스를 의미한다.

- [0005] 식물은 동물과 달리 비생물학적·기계적 스트레스에 노출되면 유전자 발현변화, 세포 내 대사작용의 변화 및 비정상적인 생육 등 많은 생리적 장애요인이 유발되어 생산량에 막대한 영향을 초래한다. 따라서, 오래전부터 작물의 생산성을 높이기 위해 다양한 환경 스트레스에 내성이 강하고 잘 적응하는 새로운 작물을 육성하고자 하는 육성기법 및 분자생물학적 기법을 이용한 노력이 이어져 오고 있다.
- [0006] 콩의 경우에는 식물체가 상해를 입었을 때 파이토시스타틴의 발현이 변화하는 것으로 조사된 바 있다(Botella et al. 1996). 밤나무(chest nut)의 파이토시스타틴은 저온과 염분(salt) 스트레스에 반응하여 뿌리와 잎에서 강하게 발현되었으며, 고온 스트레스에 대해서는 뿌리에서 강하게 발현되는 것으로 나타났다(Pernas et al. 2000). 옥수수의 파이토시스타틴 유전자는 가뭄과 저온 스트레스에 대응하여 즉각 발현되는 것으로 나타났다(Massonneau et al. 2005).
- [0007] 애기장대(*Arabidopsis*)에서는 7개의 파이토시스타틴 유전자(*AtCYS1* 내지 *AtCYS7*)가 동정되었으며(Martinez et al. 2005), *AtCYS3* 및 *AtCYS6*은 산화적 스트레스나 저온에 대해서뿐만 아니라, 가뭄과 염분 스트레스에 대한 식물체의 저항성도 증가시키는 것으로 나타났다(Zhang et al. 2008).
- [0008] 이와 같은 생물성 또는 비생물학적기계적 스트레스에 대한 식물체의 반응에 있어서 파이토시스타틴이 수행하고 있는 중요한 기능에도 불구하고, 파이토시스타틴의 조직특이적인 발현양상에 대한 분석 및 발생단계와 환경인자에 따른 조절 기전, 그리고 이에 관여하는 DNA 또는 단백질 인자에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. 이러한 조절기전에 관여하는 파이토시스타틴의 *cis*- 작용 인자(게놈상에서 유전자의 발현을 조절하는 DNA 염기서열)를 규명하게 되면, 향후 농업, 원예 관련분야에서 식물체에 가해질 수 있는 상기의 다양한 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 높이고 생산성 및 유용물질의 대량생산을 기대할 수 있는 유전공학적 기술로써 응용될 수 있어 이에 대한 연구가 매우 중요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이와 같은 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 스트레스에 대해 보다 높은 저항성을 갖는 프로모터를 개발하기 위하여 노력한 결과 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0010] 결국, 본 발명의 목적은 애기장대 파이토시스타틴(*AtCYS2*) 유전자의 프로모터를 이용하여 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 높이고 유용물질을 생산하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0012] 본 발명의 일 측면에 따르면, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 애기장대의 스트레스 유도성 *AtCYS2* 프로모터가 제공될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프로모터를 포함하는 발현벡터가 제공될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 발현벡터를 도입한 형질전환 세포가 제공될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 발현벡터를 숙주식물에 형질도입한 형질전환 식물체가 제공될 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 따르면, 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 포함하는 프로모터, 외래의 유용물질 코딩서열 및 전사 종결자(terminator) 서열을 포함하는 스트레스 내성 또는 유용물질 대량 생산용 발현벡터가 제공될 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 파이토시스타틴 프로모터 서열은 스트레스에 내성을 갖는 식물체의 개발과 기타 유용 물질을 대량으로 생산할 수 있는 형질전환 식물체의 제조에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 *AtCYS2::GUS* 형질전환 식물체에 대한 조직화학적 염색결과이다. 스케일 바는 500 μ m 크기이다.
- 도 2는 *AtCYS2* 프로모터의 gs 1.04 단계의 *AtCYS2::GUS* 형질전환 식물체의 잎과 뿌리에서의 GUS 활성을 나타내는 사진이다. 스케일 바는 10 μ m(i), 50 μ m(j)이다.

도 3은 *AtCYS2*::GUS 형질전환 식물체의 개화단계에서의 *AtCYS2* 프로모터의 발현을 나타낸다. 스케일 바는 좌측 4개 사진에서는 500 μm , 우측 2개에서는 200 μm 를 나타낸다.

도 4a는 *AtCYS2*::GUS 형질전환 식물체(gs 1.04)가 암실조건에서 저온, 가뭄, 고온 또는 상해에 의한 스트레스에 노출되도록 한 다음 수행한 Semi-quantitative RT-PCR 결과를 나타낸다.

도 4b는 *AtCYS2*::GUS 형질전환 식물체의 *AtCYS2*의 전사물(transcript)이 고온에 의해 발현되는 변화하는 양상을 시간대별로 나타낸 것이다.

도 5는 모티프 검색을 실시하여 *AtCYS2* 프로모터부위에 존재하는 가용한 전사조절인자를 도식한 것이다.

도 6은 고온 스트레스에 의한 *AtCYS2*의 시간적, 공간적인 발현양상을 관찰하기 위하여 *AtCYS2*::GUS 형질전환 식물체(gs 1.04)를 관찰한 결과를 나타낸다. 스케일 바는 1mm(a), 15 μm (b), 12.5 μm (c), 50 μm (d)를 나타낸다.

도 7은 *AtCYS2*::GUS 형질전환 식물체에 대해 상해 후 48시간째의 GUS염색 패턴을 나타낸다. 스케일 바는 1mm(a), 50 μm (b)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 포함하는 비생물학적·기계적 스트레스에 반응하여 발현되는 애기장대 파이토시스타틴(*AtCYS2*) 유전자의 프로모터 서열을 제공한다.

[0021] 본 발명의 프로모터에 의한 발현 양상은, 정상적인 발생단계에서는 묘목단계에서 강하게 발현되나 성체단계에서는 거의 발현되지 않는 것으로 나타났으며, 그 발현 부위는 잎과 뿌리, 특히 잎에서는 단일세포인 연모(trichomes) 및 기공세포(guard cells)에서, 뿌리에서는 뿌리골무(root cap)에서 강하게 발현되는 것으로 나타났다. 개화시기의 발생단계에서는 미성숙한 꽃밥(anther) 및 수술대(filament)를 연결하는 부위, 암술대(style)와 암술머리(stigma)를 연결하는 부위에서 관찰되었다.

[0022] 비생물학적·기계적 스트레스인 저온, 가뭄, 고온 또는 상해에 의한 스트레스에 대해서 본 발명의 *AtCYS2* 프로모터는 가뭄, 고온 및 상해에 의한 스트레스에 의해 유발되었으며, 저온에 의한 발현은 유발되지 않았다. 또한, *AtCYS2* 발현은 고온이 가해진지 3시간 이후부터 증가하였으며 12~48시간 동안 점차 증가하였다.

[0023] 고온 스트레스에 의한 발현 패턴은 고온 스트레스에서는 신장(elongation)부위 및 성숙부위(maturation zone)에서 관찰되었으며, 상해에 의한 스트레스가 발생한 경우에는 상해가 일어난 부위 주변에서 *AtCYS2* 프로모터의 활성이 증가하는 발현양상이 관찰되었다.

[0024] 본 발명의 *AtCYS2* 프로모터에서는 전사개시를 위한 TATAbox(-25 ~ -31)가 발견되었으며, ABA-response 인자(ABRE), CCAAT-boxes, heat shock elements (HSE), stress response elements(STRE) 및 W-boxes가 발견되었다. *AtCYS2* 유전자의 상위 (-428 ~ -420 및 -356 ~ -348)에는 HSEs(Amin et al. 1988; Xiao and Lis 1988)가 포함되어 있었으며, 5개의 CCAAT-box 염기서열이 *AtCYS2* 프로모터부위(-1293 ~ -1289, -997 ~ -993, -524 ~ -520, -272 ~ -268, 및 -143 ~ -139)에서 발견되었다.

[0025] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프로모터를 포함하는 발현벡터가 제공될 수 있다. 본 발명의 *AtCYS2* 프로모터는 스트레스가 가해지지 않은 정상 발생단계에서 잎의 연모와 기공, 뿌리골무에서 발현되는 것으로 나타났다. 이는 외래의 유용 물질을 코딩하는 유전자를 *AtCYS2* 프로모터에 접합하여 벡터로 제조하고 식물체에 도입하게 될 경우, 해당 유전자를 상기의 조직에서 발현시킬 수 있음을 의미한다. 이 때 사용될 수 있는 외래 유용물질의 종류에는 제한 사항이 없으며, 벡터의 종류도 식물체 내에서 전사를 유발할 수 있는 종류이면 어느 것이나 상관없고, 특히 항시적인 과발현을 위해 CaMV 35S, UBQ3 및 UBQ10 프로모터 등을 본 발명의 *AtCYS2* 프로모터에 전사적인 활성을 해치지 않는 범위에서 접합하여 사용할 수도 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 발현벡터를 도입한 형질전환 세포가 제공될 수 있다. 본 발명의 *AtCYS2* 프로모터는 비생물학적 및 기계적 스트레스, 특히 고온과 상해에 의해 발현이 유발되는 특성을 가지고 있으므로, 특정 유용 유전자를 고온처리를 조건으로 발현시킬 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 발현벡터를 숙주식물에 형질도입한 형질전환 식물체가 제공될 수 있다. *AtCYS2* 프로모터로 형질전환된 식물체는 상기 언급된 바와 같이 고온과 상해와 같은 스트레스에 반응하여 활발

한 전사를 일으키게 되며, 특히 기공세포에서 그 발현이 활발히 유도되는 것으로 나타났다. 기공의 숫자를 조절하여 식물체의 식량증산을 도모한 연구(Ikuko Hara-Nishimura, Nature, 2009)등에서 볼 수 있듯이, 기공을 조절하는 유전자를 도입하게 되면 식물체의 이산화탄소 생성을 저감시키고 식물체로 하여금 전분 등의 합성을 조절할 수 있다. 즉, 식물체의 기공에 특이적으로 발현되는 *AtCYS2* 프로모터의 특성은 식물체의 내성증진 및 생산량 조절에 있어서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0028] 이 때 사용될 수 있는 숙주식물의 종류에는 제한이 없으며, 본 발명의 *AtCYS2* 프로모터가 정상적으로 작동할 수 있는 식물체이면 무엇이든 가능하다. 식물체 간에는 기초전사인자(Basal transcription factor)가 다른 경우가 일반적이므로, 본 발명의 *AtCYS2* 프로모터가 작동되지 않을 경우에는 본 발명의 도 5에 도시된 TATA box를 제거한 염기서열을 숙주식물의 프로모터에 전사적인 활성을 해치지 않도록(transcriptionally active) 접합하여 형질전환 식물체를 제조함으로써 해당 식물체의 기공에서 스트레스에 반응하여 특정유전자가 발현되도록 할 수도 있다.

[0029] 이에 따르면, 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 포함하는 프로모터, 외래의 유용물질 코딩서열 및 전사종결자(terminator) 서열을 포함하는 스트레스 내성 또는 유용물질 대량 생산용 발현벡터가 제공될 수 있다.

[0030] 상기의 내용을 도면의 내용을 첨부하여 보다 상세하게 설명하면 하기와 같다.

[0031] 발생단계에서의 *AtCYS2*의 발현양상

[0032] 도 1에는 *AtCYS2::GUS* 형질전환 식물체에 대한 조직화학적 염색결과가 나타나 있다. 식물체 발생과정에서의 *AtCYS2* 프로모터의 활성을 조사하는 것은 향후 이 프로모터를 이용하여 형질전환 식물체에 도입된 유전자가 정상적인 상황에서 미칠 수 있는 영향을 예측하는데 필요하다.

[0033] 배측 묘목 단계(hypogeal seedling stage, growth stage [gs] 0.1; 상기 gs 숫자는 Boyes et al. [2001]의 기재를 따름)에서, *AtCYS2* 은 전체 부위에서 강하게 발현되는 것으로 나타났다. 상배측 묘목단계(epigeal seedlings, gs 0.7~1.0)에서는, *AtCYS2*는 자엽(cotyledon), 배측(hypocotyl) 및 뿌리(gs 0.7)와 같은 비-관다발성 조직(non vascular tissue)에서 발현되는 것으로 나타났다. 자엽에서의 *AtCYS2* 발현은 묘목이 점차 성장하면서 급격히 감소하였다. 완전히 자란 식물체에서는 *AtCYS2*가 거의 발현되지 않는 것으로 나타났다(gs 1.04). *AtCYS2*는 신장되지 않은 어린 잎 및 약간의 뿌리 끝에서만 발현되었다.

[0034] 형질전환 식물체가 생식주기(reproductive stage)에 있을 때에도(gs 5.10), *AtCYS2::GUS*식물체에서는 GUS활성이 거의 나타나지 않았다. 이러한 GUS의 활성 분석결과는 *AtCYS2*가 묘목단계에서 강하게 발현되나 성체단계에서는 거의 발현되지 않는 것으로 정리될 수 있다.

[0035] 잎과 뿌리에서의 *AtCYS2*의 발현

[0036] 도 2에는 *AtCYS2* 프로모터의 gs 1.04 단계의 형질전환 식물체의 잎과 뿌리에서의 GUS 활성이 나타나있다. 어린 로세트잎(rosette leaf, 짧은 줄기의 끝에서부터 땅에 붙어서 사방으로 나는 잎)에서는 *AtCYS2*는 단일세포인 잎연모(trichomes) 및 기공세포(guard cells)에서 강하게 발현되는 것으로 나타났다 (도 2d-f). 뿌리에서의 *AtCYS2* 발현은 주근(primary root)의 뿌리끝부(root cap)에 제한적으로 발현되는 것으로 나타났다(도 2i-j). 이러한 결과는 *AtCYS2* 프로모터의 발생단계 특이성뿐만 아니라, 잎과 뿌리에서의 조직특이적 발현 양상을 나타내고 있다.

[0037] 개화(Flowering)단계에서의 *AtCYS2*의 발현

[0038] 도 3에는 개화단계에서의 *AtCYS2* 프로모터의 발현이 나타나 있다. *AtCYS2::GUS* 활성은 미성숙한 꽃밥(anther) 및 수술대(filament)를 연결하는 부위, 암술대(style)와 암술머리(stigma)를 연결하는 부위에서 개화시기의 발생단계(fds) 9~12에서 관찰되었다. fds 12이후에는 *AtCYS2* 발현이 감소하였으며 fds 15에서는 거의 관찰되지 않았다.

[0039] 비생물적·기계적 스트레스로 유발되는 *AtCYS2* 전사에 대한 Semi-quantitative RT-PCR 분석

- [0040] 도 4a에는 애기장대 (gs 1.04)가 암실조건에서 저온, 가뭄, 고온 또는 상해에 의한 스트레스에 노출되도록 한 다음 수행한 Semi-quantitative RT-PCR 결과를 나타내었다. 처리 후 48시간 경과 후, *AtCYS2*는 가뭄, 고온 및 상해에 의한 스트레스에 의해 유발되었으며, 저온에 의한 발현은 유발되지 않았다(도 4a).
- [0041] 도 4b에는 *AtCYS2*의 전사물(transcript)이 고온에 의해 발현되는 변화하는 양상을 시간대별로 나타내었다. *AtCYS2* 발현은 고온이 가해진지 3시간 이후부터 증가하였으며 12~48시간 동안 점차 증가하였다.
- [0042] 도 4c에서는 상해에 의한 유전자 발현을 관찰하기 위해서 로세트잎(gs 1.04)에 펀치를 이용하여 구멍을 낸 다음 암실에서 22℃로 배양하여 전체 식물체로부터 RNA를 시간대별로 추출하고 Semi-quantitative RT-PCR을 수행한 결과를 나타내었다. 도 4c에 나타난 바와 같이, *AtCYS2*는 고온처리과 마찬가지로 상해에 의한 스트레스에서도 발현되는 것을 나타나고 있다.
- [0043] ***AtCYS2* 프로모터 염기서열의 데이터베이스 분석**
- [0044] 일반적으로 스트레스에 반응하는 *cis*-작용 인자(게놈상에서 유전자의 발현을 조절하는 DNA 염기서열)들은 스트레스에 의해 발현되는 유전자의 프로모터 부위에서 발견된다. 도 4에서와 같이 *AtCYS2*가 비생물학적·기계적 스트레스에 의해 발현되는 것을 관찰하였으므로, PLACE (Higo et al. 1999; <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 및 PlantCARE (Lescot et al. 2002; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)를 이용하여 모티프 검색을 실시하여 *AtCYS2* 프로모터부위에 존재하는 가용한 전사조절인자를 검색하였다.
- [0045] 도 5에 나타나있는 바와 같이, 전사개시를 위한 TATAbox가 (-25 ~ -31) 발견되었으며, ABA-response 인자 (ABRE), CCAAT-boxes, heat shock elements (HSE), stress response elements(STRE) and W-boxes가 발견되었다. *AtCYS2* 유전자의 상위 (-428 ~ -420 및 -356 ~ -348)에는 HSEs (Amin et al. 1988; Xiao and Lis 1988)가 포함되어 있었으며, 5개의 CCAAT-box 염기서열이 *AtCYS2* 프로모터부위(-1293 ~ -1289, -997 ~ -993, -524 ~ -520, -272 ~ -268, 및 -143 ~ -139)에서 발견되었다.
- [0046] 이들 CCAAT 인핸서(enhancer, 전사수준을 향진시키는 전사조절 인자) 염기서열은 CCAAT 인핸서 결합 단백질 (C/EBP)의 결합부위를 나타내며, HSEs 와 같이 작용하여 고온처리에 따른 프로모터의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Williams and Morimoto 1990; Rieping and Schaffl 1992). STRE 인자는 다양한 스트레스 조건, 특히 고온처리에 의한 스트레스에 대한 전사활성에 있어서 중요한 인자인 것으로 알려져 있다(Siderius and Mager 1997). 두 개의 STREs(염기서열 AGGGG)이 *AtCYS2* 프로모터(-910 ~ -906 및 -903 ~ -899)에서 발견되었다. 상기 W-box (염기서열 TTGAC)에는 WRKY 인자가 결합하며, 고온처리와 상해에 의한 스트레스에 반응하는 것으로 알려져 있다(Ulker and Somssich 2004; Miller et al. 2008; Levee et al. 2009; Li et al. 2009). 수 개의 이들 모티프가 *AtCYS2* 프로모터(-1341 ~ 1338, -1303 ~ -1229, -697 ~ -693, -550 ~ 546, 및 -315 ~ 311)에서 발견되었다.
- [0047] 따라서, 상기와 같은 *cis*-작용 인자 및 이에 결합하여 작용하는 전사인자(Transcription factors)들 간의 상호작용을 통해 식물체가 고온 및 상해에 의한 스트레스에 작용할 가능성이 매우 높은 것으로 나타났다.
- [0048] **고온 스트레스에 대한 *AtCYS2*의 반응**
- [0049] 도 6에는 고온 스트레스에 의한 *AtCYS2*의 시간적, 공간적인 발현양상을 관찰하기 위하여 *AtCYS2::GUS* 형질전환 식물체(gs 1.04)를 이용하여 관찰한 결과가 나타나있다. 도 6a에 나타난 바와 같이, 37℃의 고온 스트레스는 몇몇 조직에서 강하게 *AtCYS2*의 발현을 유발시켰다. *AtCYS2*는 기공을 포함하여 신장(elongation)부위 및 성숙부위(maturation zone)에서 관찰되었다(도 6b).
- [0050] 스트레스가 없는 상태에서의 *AtCYS2*의 발현은 주근의 뿌리끝부에서만 관찰된 바 있다(도 2 참조). 측근에서는 *AtCYS2*의 발현은 주근에서와 마찬가지로 신장(elongation)부위 및 성숙부위(maturation zone)에서 증가되는 것으로 나타났다. 그러나 *AtCYS2*는 고온 스트레스 하에서도 측근의 뿌리끝부에서는 발현되지 않았다(도 6b). 이러한 결과는 *AtCYS2* 프로모터가 고온 스트레스 상황에서 식물체의 신장 및 성장부위에서 작용함을 나타낸다.
- [0051] 도 6c는 *AtCYS2::GUS*의 어린 잎 엽신(leaf blade)에서 고온 스트레스에 의한 발현이 유도되는 것을 나타내고 있다. 또한, 도 6d에는 동일한 잎을 횡단면으로 절단하여 보다 더 상세하게 발현양상을 관찰하였다. 도 6d에 나

타나있는 바와 같이, *AtCYS2*의 발현양상은 횡단면상으로 관찰하더라도 도 6c와 마찬가지로 기공세포에서 관찰되었다.

[0052] 기계적 스트레스에 의한 *AtCYS2* 발현

[0053] 도 4a 및 4c에 나타난 바와 같이, *AtCYS2*의 전사는 기계적 스트레스에 의해서도 증가하는 것으로 나타났다. *AtCYS2::GUS* 형질전환 식물체의 잎(gs 1.04)을 티켓 펀칭기로 기계적인 상해를 가하였다.

[0054] 도 7에는 상해 후 48시간째의 GUS염색 패턴을 나타내었다. 증가된 GUS 활성이 *AtCYS2::GUS* 형질전환 식물체의 상해부위 주변에서 관찰되었다(도 7a). 보다 세밀한 관찰을 위해 동일한 잎을 횡단면으로 절단하여 관찰하였다(도 7b). *AtCYS2*의 발현은 상해부위 주변의 엽신과 기공에서 증가한 것으로 나타났다.

[0055] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다 할 것이다.

[0056] 실시예 1: 식물체의 배양

[0057] 애기장대(*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.)의 생태형(ecotype)인 콜롬비아(Columbia, Col-0) 식물체가 토양 또는 3% 슈크로스 및 0.25% 파이타겔(phyta-gel (pH 5.8))을 포함하는 MS 배지 (Murashige and Skoog 1962)에서 장일조건(16 시간 동안 $100 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ 조건으로 빛을 쬔 후 8시간 암실처리)으로 22°C에서 배양하였다.

[0058] 동시 발아를 유도하기 위하여, 씨앗들은 암실에서 4°C로 3일간 배양하였으며, 이후 배양 챔버로 옮겼다.

[0059] 실시예 2: 애기장대 형질전환체의 제조

[0060] 실시예 1과 같이 배양된 애기장대로부터 genomic DNA를 추출(Quiagen, Midiprep)한 다음, 파이토시스타틴 유전자의 5'부위 유전자(NCBI 액세스 번호 At2g31980; ATG 시작코돈으로부터 -1392 에서 +30 부위)를 *AtCYS2* promoter forward(서열번호 2: 5'GAA TTC GAG ACT CTT ACG CTT AGG G-3') 및 *AtCYS2* promoter reverse(서열번호 3: 5'GGA TCC TAC AAG AGA GAC CTT CAA CAT GG-3') 프라이머를 이용하여 애기장대의 genomic DNA로부터 *AtCYS2* 프로모터 부위를 약 1.4kb가량 증폭하였다. 상기 증폭된 상물은 pMD18-T(Takara, Tokyo, Japan) 벡터에 TA-오버행(overhang)을 이용하여 클로닝하였다. 클로닝된 DNA는 *EcoRI* and *BamHI*로 제한한 다음 pCambia1381-GUS 플라스미드에 삽입하였다. 유전자 재조합된 플라스미드는 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 도입한 다음, 애기장대 식물체에 플로랄 딥(floral dip) 기법(Clough and Bent 1998)을 통해 형질전환하였다. 단일 T-DNA 삽입을 갖는 T3 동형접합체(Homozygous)를 분석에 사용하였으며, 형질전환체는 상기과 같이 장일조건에서 유지하였다.

[0061] 실시예 3: GUS 리포터 분석

[0062] 실시예 2와 같이 유지된 형질전환 식물체의 GUS 활성에 대한 조직화학적 분석은 Jefferson et al. (1987)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 즉, 애기장대 묘목, 기관(organ) 및 조직을 50 mM 소듐 포스페이트 용액(pH 7.0), 2 mM 포타슘 페로시아나이드(potassium ferrocyanide) (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2 mM 포타슘 페리시아나이드(potassium ferricyanide)(Sigma), 및 1 mM X-GlcA (Duchefa, Haarlem, The Netherlands)를 함유하는 0.2% Triton X-100 (Sigma)에 침윤시켰다. 침윤된 샘플은 암실에서 37°C로 12시간 동안 배양하였으며, 이후 엽록소를 제거하기 위하여 70% 에탄올로 옮겼다. 디지털 이미지는 Olympus SZX12 입체현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하였다.

[0063] 실시예 4: RT-PCR 분석을 위한 스트레스 처리

[0064] 실시예 2와 같이 유지된 형질전환 식물체를 22°C에서 10일 동안 배양한 다음 다양한 비생물학적·기계적 스트레

스를 가하였다. 필터 페이퍼 상(22℃)에서 급속하게 건조시켜 가뭄조건을 형성시키거나, 4℃ 혹은 37℃의 암실 챔버(EYELA, Tokyo, Japan)에서 온도에 의한 스트레스를 유발하였다. 기계적인 상해는 로세트잎에 펀칭을 통해 구멍을 뚫으로써 수행하였으며, 이후 식물체들은 22℃의 암실에서 배양하였다.

[0065] 스트레스가 가해진 시료들은 처리 후 0, 1, 3, 6, 12, 24 또는 48시간째에 수집하였다. 수집된 식물체들은 즉시 액체질소에 동결시킨 다음, RNA 추출을 위해 -80℃로 보관하였다.

[0066] 전체(total) RNA는 100 mg의 식물 전체 조직으로부터 TRIzol 용액 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 추출하였다. 상보적인 DNA(cDNA)는 Revert AidTM M-MuLV 역전사효소(Fermentas, Glen Burnie, MD, USA)를 이용하여 2 µl의 전체 RNA로부터 합성하였다.

[0067] 각각의 cDNA 샘플은 10배로 희석된 다음, 1 µl의 상기 희석된 cDNA에 대하여 유전자에 특이적인 프라이머 세트 (*AtCYS2* forward, 5' TCT AGA ATG GCT ACC ATG TTG AAG GTC-3' *AtCYS2* reverse, 5' GGT ACC TTA GTA GAC AGG ACT GAC AAC AGG-3')를 이용하여 PCR로 증폭하였다. 상기 PCR산물은 시퀀싱으로 염기서열을 분석하고, 전기영동으로도 분석하였다.

[0068] 실시예 5: 형질전환체에 대한 고온 및 상해에 의한 스트레스 처리

[0069] 실시예 2와 같이 유지된 3가지 라인의 독립적인 형질전환 식물체를 10일 동안 플레이트 상에서 배양하여 고온 및 상해에 의한 스트레스 처리를 수행하였다. 고온 처리를 위해서, 식물체들은 온도가 조절되는 챔버에서 37℃로 48시간 동안 암실처리하였다.

[0070] 상해 실험은 티켓 펀치를 이용하여 로세트잎에 구멍을 내는 것으로 수행하였다. 이후 식물체들은 22℃에 암실상태의 성장 챔버로 옮겼다. 처리 후 48시간이 경과했을 때 식물체를 수집하였다.

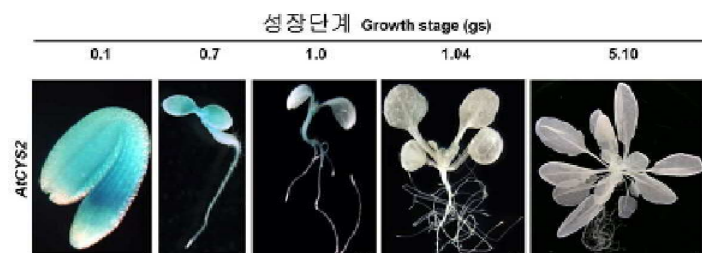
[0071] 로세트잎 조직의 횡단면 조직을 얻기 위해, GUS-염색 샘플은 점증적으로 희석된 에탄올 시리즈로 탈수하였으며, 0.1% Eosin Y(Sigma)로 염색한 다음 *tert*-butanol 시리즈에 처리하고 파라핀에 임베딩하였다. 임베딩한 조직(12 µm 두께)은 폴리-라이신으로 처리된 슬라이드 글라스(Polysciences, PA, USA) 사에 고정시킨 후 42℃로 철야배양하였다.

[0072] 슬라이드는 세척액(Amresco, OH, USA; Yang et al. 2006)으로 처리하여 파라핀을 제거한 다음, Olympus AX-70현미경을 이용하여 디지털 이미지를 수집하였다.

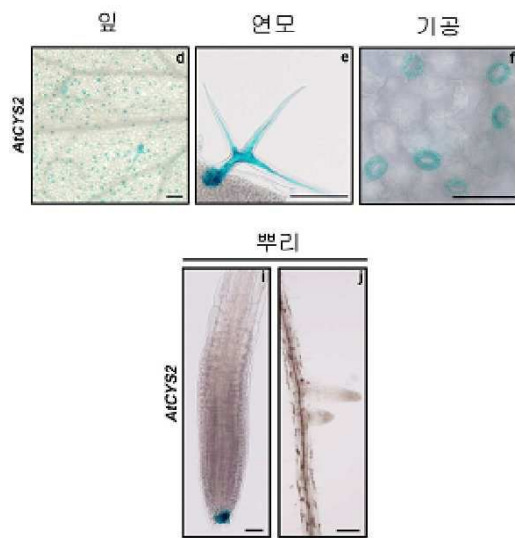
[0073] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

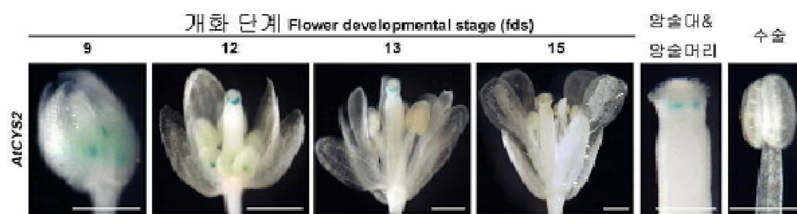
도면1



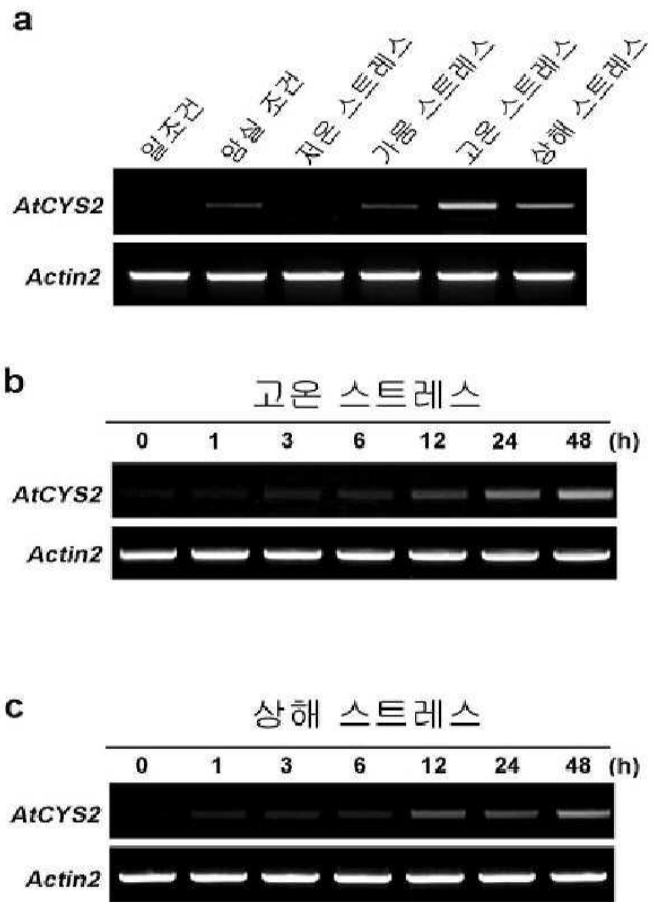
도면2



도면3



도면4



도면5

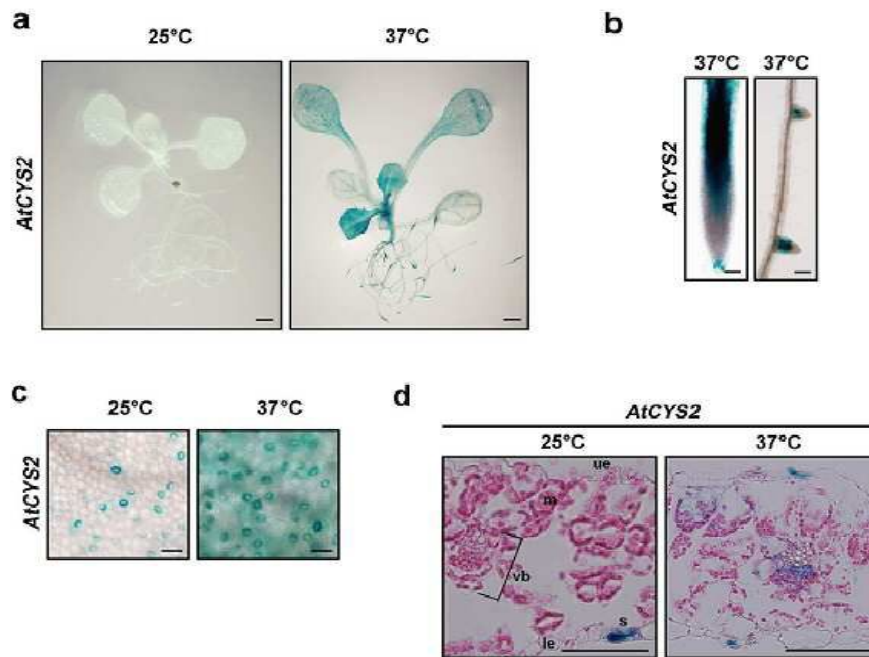
```

-1392 GAGACTCTTA CGCTTAGGGA GAGAAACAGA CGAAGAGAGA AGACATAGAA TGTTCATTGAA
-1332 TCATCTCTCG ATAGCTTTCA TTAATGTTTG TCAATAAGGA TTGGTTAAAG CATTAGTATA
-1272 TTTAGTCTCT TATCTTCGGC CCAAAGCAGC GTAAAGCTTT GAATGGCTTT GTTGAAGAC
-1212 GTAAAGCAGT AGTAGCTTGA AGCAAAGTGT GGTGTGGTCT ATGGGGTTCT TAATTTTAAC
-1152 GGTTCCTTCT AAAGGTGATT ACCAAATTTT GGTGATATC AAATTTTATA ACTCTCAGTT
-1092 CTTATATGTA TATCTCTCGC TCTTCTAATG AATATATCTA TTCATATTTT GGCAAAACAT
-1032 ATAATTATAT TTTATTTTCA AATTGTGTAT ACCTACCAAT CTACCATCAT GGTTAACCAA
-972 AAATTGTAT CATAACTAAT TAACTATTTT TGTTTTGTTC TCCGTGGAAC TAGGAGGCCA
-912 GGAGGGGAGA GGGGTTTATA AAGTTATATG AAAGTATTGT TGTGTCGAAA AGAAAAGTTT
-852 ATTTCTGTTAA AGAGCTTGAT TGTAAACAAA TACATAAAGA CATTATACAT TTCTCTTGT
-792 CCGTAACGGA TTGAGTTGTT AATTATTGAA TAGTTCGGCA TACGTATAAG AGAAGGTGCT
-732 ACGTAGCAG CATGCGAAGA GAAATAGGG CAGATGTCAA ATTCAATTGA TACGTGTGCG
-672 TCTCCTAAAC AAAAATCTCT TCTTGCATGA TAACAAAATC AGCAAAACGA CAACAATATT
-612 TCAACACCAA ATCGAGGCGA TAAGGAAAAG GCTAAAGCGA CCCATGATCC CTCGCTCCTT
-552 TCGTCAAATT AGAATTTAAA ACTGTTTCAT TGGTGCAATT AAATGATCCT CTAAAAAGTG
-492 TTGGAACATA ATTATTTTTC CATATACATC CATAATTGTA TAACTTTTG TGAGAAGAAA
-432 CCTACGAAAT TTCTGTCTTT TTAACATATT AATATCAACT AATAGATGGT GATCTAAAGT
-372 TTAAAAATCA GGTATCAAAT AATTTCGAAT TCAITTTGAA TTATAAGTAT GGACTAGTTG
-312 ACAATCATAA ATAAAAACCT TAAATTACCA AAAAAATAAT CCAATTGCTT AGATTAGGAT
-252 ATATAATTAG TGTGTTGAAA TCCGATTAC AATAAAAAACA AAATTACAGA TCGGAGCAAT
-192 TCACATATAT ACGTTAAAAA GGTGGGGGCT CACTTCACGT GGAGACTTAA TTGGATCAGA
-132 AAAGTAACTT AAAAGATGCG GAACCCCGAA GGTGCCGATG GCATGGGGAC CCATTACAGT
-72 ACACCCAAAC ACAAAACACCA ACATTGCCTA AACTCTTTCT CTATATAAAC ACTTCTCTTT
-12 CTTTTTCTTT CTCTCACACA AAAATACAAC AACTTAGATC AGTCTCAAAG GGGGAAAAAA
+48 AACTTAAAAG AAACATTAAG AGGCAACACA AATCACACAA AAGATCAAAT TGAAGCCTAA
+108 GAAGAAGGCA AAAAGTGAGA AGCAATGGCT ACCATGTTGA AGGTCTCTCT TGTA
      M A T M L K V S L S
  
```

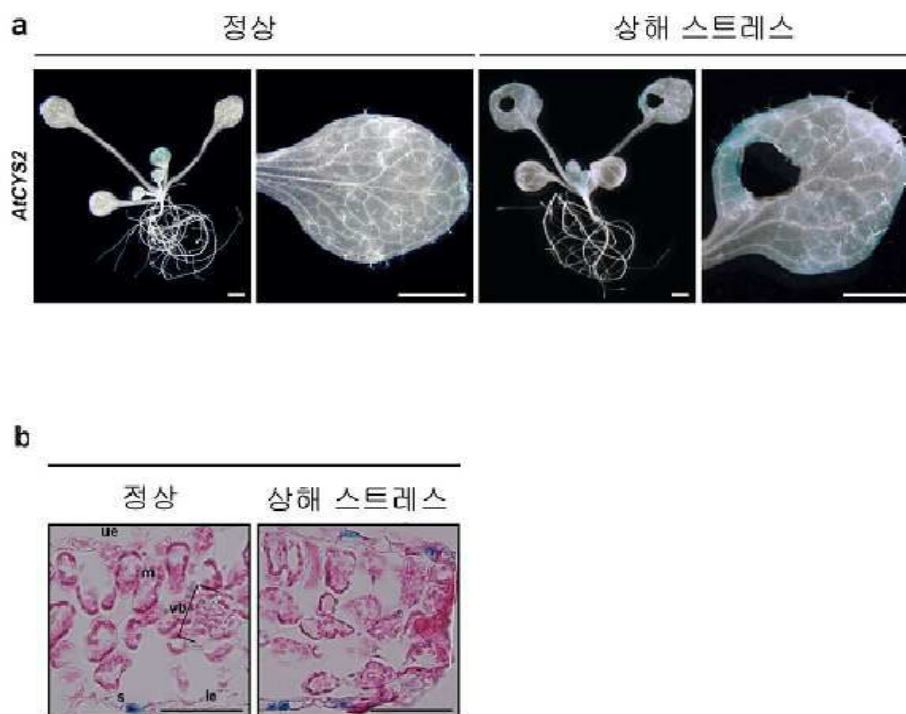


-  ABRE, ABA-responsive element
-  CCAAT-box, enhancer-binding protein element
-  HSE, heat shock responsive element
-  STRE, stress responsive element
-  W-box, wounding and pathogen responsive element

도면6



도면7



서열 목록

- <110> LIM, Chae Oh
- <120> Stress-inducible phytoecystatin *AtCYS2* promoter from *Arabidopsis*
- <160> 3

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 1605

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

gagactctta cgcttaggga gagaacaga cgaagagaga agacatagaa tgtcattgaa	60
tcattctctcg atagctttca ttaatgtttg tcaataagga ttggttaaag cattagtata	120
tttagtctct tatcttcggc ccaaagcagc gtaaagcttt gaatggcttt gttaggaagac	180
gtaaagcagt agtagcttga agcaaagtgt ggtgtggtct atgggggttct taattttaac	240
ggttctttct aaagtgatt accaaatttt ggttgatata aaattttata actctcagtt	300
cttatatgta tatctctcgc tcttctaata aatatactta ttcataattt ggcaaacat	360
ataattatat tttattttca aattgtgtat acctaccaat ctaccatcat ggttaaccaa	420
aaatttgat cataactaat taactatttt tgttttgttt tccgttgaac taggaggcca	480
ggaggggaga ggggtttata aagtatatg aaagtattgt tgtgtcgaaa agaaaagttt	540
atttcgttaa agagcttgat gttaacaaa tacataaaga cattatacat ttcctcttgt	600
ccgtaacgga ttgagttgtt aattattgaa tagttcggca tacgtataag agaaggtgct	660
acgtgagcag catgcgaaga gaagataggg cagatgtcaa attcagttga tacgtgtcgc	720
tctcctaaac aaaaactctc tcttgcatga taacaaaatc agcaaacga caacaatatt	780
tcaacaccaa atcgaggcga taaggaaaag gctaaagcga cccatgatcc ctgcctcctt	840
tcgtcaaatt agaatttaaa actgtttcat tggtgcaatt aatgatcct ctaaaaagt	900
tttgaacata attatttttc catatacatc cataattgta taaacttttg tgagaagaaa	960
cctacgaaat ttctgtcttt ttaacataat aatatcaact aatagatggt gatctaaagt	1020
ttaaaaatca ggtatcaaat aatttcaatt tcattttgaa ttataagtat ggactagttg	1080
acaatcataa ataaaaacct taaattacca aaaaaataat ccaattgctt agattaggat	1140
atataattag tgtgttcgaa tccgatttac aataaaaaca aaattacaga tcggagcaat	1200
tcacatatat acgttaaaaa ggtgggggct cacttcacgt ggagacttaa ttggatcaga	1260
aaagtaactt aaaagatgcg gaaccccgaa ggtgccgatg gcatggggac ccattcacgt	1320
acacccaac acaaacacca acattgccta aactctttct ctatataaac acttctcttt	1380
ctttttcttt ctctcacaca aaaatacaac aacttagatc agtctcaaag ggggaaaaaa	1440
aacttaaaag aaacattaag aggcaacaca aatcacacaa aagatcaaat tgaagcctaa	1500

gaagaaggca aaaagtgaga agcaatggct accatgttga aggtctctct tgtattgtca	1560
ttgttaggtt ttctggatgat cgctgtcgtg actccatcgg cggcg	1605
<210> 2	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AtCYS2 promoter forward	
<400> 2	
gaattcgaga ctcttacgct taggg	25
<210> 3	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> AtCYS2 promoter reverse	
<400> 3	
ggatcctaca agagagacct tcaacatgg	29