

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0127020 (43) 공개일자 2013년11월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)		(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(21) 출원번호	10-2012-0048022	(72) 발명자 윤대진 경상남도 사천시 용현면 선진리 517번지 박형철 경상남도 진주시 초전동 757-1번지
(22) 출원일자	2012년05월07일	(74) 대리인 김동완
심사청구일자	2012년05월07일	

전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **톨루지엘라 살수기니아 유래 HK T1 동족체로 형질전환된 칼륨-특이성을 지닌 형질전환 식물체**

(57) 요약

본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 톨루지엘라 살수기니아 유래하는 TsHKT1;2 단백질에 있어서, 상기 단백질은 식물체 내에서 칼륨 이온(K⁺)을 선택적으로 흡수시켜 나트륨 이온과 칼륨 이온의 항상성을 유지시킴을 특징으로 하는 TsHKT1;2 단백질과 상기 TsHKT1;2 단백질을 코드화한 유전자를 도입하여 형질전환시킨 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 TsHKT1;2 단백질을 과발현하는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

대표도 - 도1a

ScTRK1	665	SPTWWGEFTAMSAFNDLGLTLTPNSMMSFNKAVYPLIVMIWFIIIGNTGFPILLRCIIWILHKIT	729
		SP + +TA+S +D G T +M+ F K L ++I + +G+T FP L IW + KI+	
TsHKT1;2	192	SPLTFSVFTAVSTLSDCGFVPTNENMIFRKNSGLLWLLIPQVFMGDTLFPFCFLVLAIWGLHKIT	256
TpHKT1;2	190	SPLTFSIFTTVSTLSDCGFVPTNENMIVFRKNSGLLWLLIPQVFMGDTLFPFCFLISLIWGLDKIT	254
TpHKT1;1	198	SPLTFSIFTTVSTFGNCGFVPTNENMAIFRKNSGLLWLLIPQVFMGNTLFPFCFLLIWGLDKIT	262
AtHKT1	191	SPLTFSVFTTVSTFANCGFVPTNENMIFRKNSGLIWLIPQVIMGNTLFPFCFLALLIWGLYKIT	255
AtHKT1	196	SPLTFSVFTTVSTFANCGFVPTNENMIFRKNSGLIWLIPQVIMGNTLFPFCFLVLLIWGLYKIT	260
TsHKT1;1	198	SPLTFSVFTAVSTFGNCGFVPTNENMIFRKNSGLLWLLIPQALMGNTLFPFCFLFLVSGLDKIT	262
*****:***:***:~:***** *****:*****~:***:*****: ** **			
		P _B	M2 _B

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	03-2011-0342
부처명	농림수산부
연구사업명	차세대 바이오그린21사업
연구과제명	할로필리즘(halophilism) 및 환경스트레스 관련 유용유전자 확보와 기능해석
기 여 율	1/2
주관기관	농촌진흥청
연구기간	2011.05.01 ~ 2011.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0725
부처명	교육과학기술부
연구사업명	세계수준의 연구중심대학 육성 사업
연구과제명	4차(국고)기후변화대응사업단
기 여 율	1/2
주관기관	한국연구재단
연구기간	2011.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 툴룬지엘라 살수기니아 유래하는 TsHKT1;2 단백질에 있어서, 상기 단백질은 식물체 내에서 칼륨 이온(K^+)을 선택적으로 흡수시켜 나트륨 이온과 칼륨 이온의 항상성을 유지시킴을 특징으로 하는 TsHKT1;2 단백질

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단백질의 칼륨 이온 선택성 및 이온 항상성은 서열번호: 1의 500개 아미노산 잔기 중 207번째 및 238번째 잔기가 HKT(High-affinity potassium transporter) 단백질 패밀리의 아스파라긴(N) 잔기에서 아스파르트산 잔기(D)로 치환 변형됨으로써 칼륨 이온 선택성 및 나트륨/칼륨 이온의 항상성이 증진됨을 특징으로 하는 TsHKT1;2 단백질

청구항 3

TsHKT1;2 단백질을 코드화한 유전자를 도입하여 형질전환시킨 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 TsHKT1;2 단백질을 과발현하는 형질전환 식물체

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 염분 스트레스 조건하에서 칼륨이온(K^+)을 선택적으로 흡수 유지시켜 나트륨 이온과 칼륨 이온의 항상성을 유지시켜 염분 스트레스 내성이 증진됨을 특징으로 하는 칼륨-특이성을 지닌 형질전환 식물체

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 툴룬지엘라 살수기니아 유래 HKT1 동족체(TsHKT1;2)를 과발현하는 칼륨-특이성을 지닌 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 염분 스트레스 조건하에서 칼륨이온(K^+)을 선택적으로 흡수 유지시켜 나트륨 이온과 칼륨 이온의 항상성을 유지시킬 수 있는 칼륨-특이성을 지닌 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 1가 이온 수송체의 HKT 패밀리의 단백질은 SOS(Salt Overly Sensitive) 경로다음으로 증가된 염분에 대한 식물의 방어에 있어서 관련 요소로 알려져 왔다. 그럼에도 불구하고 HKT 패밀리에서 식물 이온 수송체의 정확한 기능은 알려지지 않은 상태로 남아있다.

[0003] HKT1은 먼저 밀에서 분리되었고 Na^+/K^+ 보조-수송체 구성요소를 지닌 높은 친화력의 K^+ 흡수 수송체로서 알려져 있다. 그러나 아라비도시스에서는 HKT1이 선택적 Na^+ 수송체로서 작용한다. 이 차이점은 배지 또는 토양에서 정상적인 Na^+/K^+ 비율을 변화시키는 환경 조건하에서 중요하게 된다.

- [0004] 식물의 이온 흡수 머내저리(menagerie)의 일반적인 형태(picture)로 HKT 단백질을 배치하기 위한 방법에 관한 복잡한 기작은 최근에 Kronzucker 및 Britto에 의해 분석되었다. 요컨대 밀 K^+ -수송체인 TaHKT1의 첫 설명 후에, 다양한 생물에서 연구되었으며, 가장 상세하게 연구된 생물은 쌀과 아라비도시스로 양립하기 힘든 HKT 단백질에 대한 특징을 입증하였다. HKTs는 일부 종에서 작은 유전자 패밀리로 대표되며, 반면에 아라비도시스 게놈은 오직 하나의 HKT1 유전자를 포함한다. 일부 종에서 많은 유전자는 나트륨 이온 보다 칼륨 수송에 우선적 기능을 수행하도록 발전되어 왔다.
- [0005] 다른 경로에서는 외부 배지의 1가 양이온의 농도에 따라 수송하지만, 반면에 일부는 칼슘 이온을 수송하는 것으로 보인다. 일부 종에서 다수의 유전자가 환경에 반응하여 어떻게 발현되는지에 따라 다양한 HKTs의 생화학적 활성은 외견상으로(seemingly) 조절되었다. 그러나 충분한 또는 최종 특성을 제공하는 단백질의 조직, 세포 및 서브-세포 분배에 대한 정보는 아직 충분하지 않다. 특히 상이한 HKT1 형태의 단백질 서열 및 단백질 구조에 대한 규명은 특별한 종의 '생활 특성'이 어떻게 수송체의 특징을 형성하는 아미노산 서열의 변화를 조성하는지에 대한 정보를 제공할 것이다.
- [0006] 식물 염 스트레스 '저항성'-저항한다고 할 수 있는 나트륨 이온의 양에 대한 정량적 척도(yardstick)-은 상이한 세포 구획에 위치하고 있는 여러 경로의 종합적 작용을 나타내는 것이다. 이는 삼투물질 및 그 외 보호 대사산물 또는 단백질의 합성 및 Na^+ 항상성의 조절을 포함하며, 또한 여러 구성 요소를 지닌다.
- [0007] 독립 개체(entity) 흡수, 유출 용량, 세포 및 서브-세포 격리 및 식물체간의 조직된 분배이다. 저항성에 대해서 나트륨 이온을 관리하기 위해서는 칼슘 이온의 흡수 및 분배의 보호 배경에 대해서 체계화되어야 한다. 더욱이 일반적 이온 균형 및 영양 항상성의 재-확립은 성공적인 염 스트레스 방어를 위해 필요로 된다.
- [0008] Na^+ 흡수 및 분배는 다양한 막 단백질, 역수송체, 비-특이적 양이온 채널, CNGCs, 음이온 수송체, ABC-타입 수송체, 아미노산 투과효소, Na^+ 및 K^+ 수송체, 형질막 및 액포 ATPases 및 아쿠아포린에 의해 수행되고 영향을 받는다. Na^+ 유출은 세포의 Ca^{2+} 의 염 스트레스-유도된 농도의 감지로부터 개시되는 반응 사슬에서 SOS 경로에 의해 실시된다.
- [0009] 이 결과는 칼슘-결합 단백질, SOS3 (CBL4) 및 단백질 키나아제, SOS2간의 복합체의 형성을 초래한다. SOS3/SOS2 복합체는 인산화 될 수 있으며 따라서 Na^+/H^+ -역수송체 SOS1을 활성화할 수 있으며, 이것은 세포로부터 Na^+ 유출을 증진시킨다. 나트륨 이온의 유출은 뿌리의 표면에서는 제한되지 않고 식물체 전체에서 재-분배되는 것이다.
- [0010] 식물이 새로운 세포 및 새로운 액포를 생성하는 동안 주요한 싱크(sink)일 수 있는 액포로의 나트륨 이온의 격리(sequestration)는 세포질 Na^+ 의 독성 농도를 완화시키기 위하여 AtNHX 패밀리의 멤버에 의해 용이하게 된다. 상이한 단백질 패밀리에서 K^+ 수송체의 높은 친화력은 보상 K^+ 획득에 관여하게 된다. 막-내재 Na^+ 및 K^+ 수송체, 채널 및 보조-수송체는 H^+ -ATPases에 의해 매개되는 전위를 기반으로 하여 세포내 K^+/Na^+ 비율을 확립하고 유지한다.
- [0011] 모든 농작물이 근본적으로 포함되는 그룹인 염분 저해(glycophytic) 그룹과는 대조적으로, 염분 생장이라고 하는 염분 스트레스 저항성을 지닌 종은 유출 메커니즘과 통합된 Na^+ 유입, 다양한 조직으로의 분배를 조정하는 능력 및 액포로의 Na^+ 의 효율적인 격리를 통해 특수 제어(exceptional control)를 한다. 염분 생장 식물은 액포에

Na^+ 를 축적하며, 이는 물이 유입되게 하며 성장을 촉진하는 삼투 전위를 제공한다. 최적의 성장에 필요한 NaCl 의 양에 대한 염분 생장 종간의 차이는 특이적인 일련의 메커니즘보다 본질적인 힘과 더 관련 있는 즉 종간의 근본적인 차이보다는 질적인 차이로 말할 수 있다.

[0012] 툴룬지엘라 살수기니아(이전의 T. 할로필라)는 염분 저해 모델의 모든 장점과 해수에서 NaCl 농도를 증가시키는 특수한 능력을 지닌 아라비돕시스와 밀접하기 때문에 식물의 염분 생장 천성(nature)을 연구할 수 있는 모델을 제공한다. 더욱이 T. 살수기니아에 대한 게놈 서열 및 관련된 T. 파볼라가 알려져 있다.

[0013] 두 개의 툴룬지엘라 종은 식물의 극한 생활 방식 및 염분 저항성의 유전적 및 게놈적 근거의 전형적인 예가 된다. 툴룬지엘라에 관한 몇몇의 연구를 기반으로 하는 저항성은 아라비돕시스와 비교시 순 Na^+ 흡수량 및 효율적이고 선택적인 K^+ 흡수량의 타이트한 조절에 부분적으로 기인하는 것으로 보인다.

[0014] 본 명세서에서 본 발명자들은 종의 염분 생장 행동에 기여하는 T. 살수기니아 HKT1-유사 단백질(TsHKT1;2)의 매개를 개시한다. 이 TsHKT1;2는 염 스트레스에 의해 유도되며, 아라비돕시스 HKT1 (AtHKT1)의 발현 패턴과는 상이하다. T. 살수기니아 HKT-RNAi 라인은 NaCl 에 대한 민감성을 보이며, K^+ 결핍성을 나타내며, 이는 T. 살수기니아에서 염 저항성 및 K^+ 수송에 대한 이 단백질의 역할을 강조한다. TsHKT1;2가 아라비돕시스 야생형 및 hkt1 변이체 라인 및 Na^+ 또는 K^+ 수송체가 결핍된 효모 변이체에서 발현될 때, TsHKT1;2의 상이한 기능은 특히 명확해진다. 이 결과는 종들의 차이점으로 정의되는 염분 스트레스 저항성으로서 TsHKT1;2에 대한 차별적 Na^+ 및 K^+ 선택성을 시사한다.

[0015] 따라서 본 발명자들은 T. 살수기니아 HKT1-유사 단백질(TsHKT1;2)을 포함하는 유전자 컨스트럭트를 아라비돕시스 식물체 형질전환시킴으로써 NaCl 존재시 칼륨 특이성을 지닌 염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체를 제조함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 T. 살수기니아 HKT1-유사 단백질(TsHKT1;2)을 포함하는 유전자 컨스트럭트를 아라비돕시스 식물체 형질전환시킴으로써 NaCl 존재시 칼륨 특이성을 지닌 염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체를 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 툴룬지엘라 살수기니아 유래하는 TsHKT1;2 단백질에 있어서, 상기 단백질은 식물체 내에서 칼륨 이온(K^+)을 선택적으로 흡수시켜 나트륨 이온과 칼륨 이온의 항상성을 유지시킴을 특징으로 하는 TsHKT1;2 단백질을 제공하는 것이다.

[0018] 이때 상기 단백질의 칼륨 이온 선택성 및 이온 항상성은 서열번호: 1의 500개 아미노산 잔기 중 207번째 및 238번째 잔기가 HKT(High-affinity potassium transporter) 단백질 패밀리의 아스파라긴(N) 잔기에서 아스파르트산 잔기(D)로 치환 변형됨으로써 칼륨 이온 선택성 및 나트륨/칼륨 이온의 항상성이 증진됨을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명의 또다른 목적은 TsHKT1;2 단백질을 코드화한 유전자를 도입하여 형질전환시킨 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 TsHKT1;2 단백질을 과발현하는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0020] 이때 상기 형질전환 식물체는 염분 스트레스 조건하에서 칼륨이온(K^+)을 선택적으로 흡수 유지시켜 나트륨 이온과 칼륨 이온의 항상성을 유지시켜 염분 스트레스 내성이 증진됨을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 효과는 T. 살수기니아 HKT1-유사 단백질(TsHKT1;2)을 포함하는 유전자 컨스트럭트를 아라비돕시스 식물체 형질전환시킴으로써 NaCl 존재시 칼륨 특이성을 지닌 염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 툴룬지엘라 살수기니아에서 HKT 동족체의 서열 비교 및 계통 분석을 나타낸 것이다.

도 1a는 아라비돕시스 및 툴룬지엘라 종으로부터 HKT 동족체의 비교를 나타낸 것이다. 두 번째 포어 루프 영역(P_B) 및 인접한 막관통영역($M2_B$)의 아미노산 서열은 clustalw(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)로 정렬하였다. 효모 TRK1 (ScTRK1) 서열은 비교를 위해 포함되었다. P_B 영역에서 보존된 글리신 잔기는 화살표로 표시하였다. TsHKT1;2 및 TpHKT1;2에 특이적인 아스파르트산 잔기는 박스로 강조하였다.

도 1b는 10,000 부트스트랩 사본을 지닌 HKT 동족체의 단백질 서열의 루트가 결정되지 않은(unrooted) 최소-진화 계통수를 나타낸 것이다. 모든 서열에 대한 기탁번호 및 종을 표 1에 기재하였다. 효모 TRK 단백질(ScTRK1 및 ScTRK2)은 외집단으로서 포함되었다. 서브패밀리는 Platten et al.(2006)에 정의된 바와 같다. 스케일바는 0.2 치환/site를 나타낸다. 계통수는 MEGA5 (<http://www.megasoftware.net/>)를 이용하여 제작하였다.

도 2는 HKT 동족체의 발현 및 T. 살수기니아 TsHKT-RNAi 형질전환 식물의 구축을 나타낸 것이다.

도 2a 및 도 2b는 HKT 발현 패턴을 T. 살수기니아(도 2a) 및 A. 탈리아나(도 2b)에서 준 정량적인(semi-quantitative) RT-PCR로 분석한 것을 나타낸 것이다. 2주일 된 T. 살수기니아 및 10일 된 A. 탈리아나 묘목은 각각 150 mM 및 100 mM NaCl로 지시한 시간 동안 처리되었다. 비교한 것은 엠티 RNAi 벡터(Ts WT) 및 A. 탈리아나 Col-g11 (At WT)로 형질전환된 T. 살수기니아 Shandong 라인과 절충된(compromised) SOS1 발현을 지닌 각각의 변이체 라인(tssos1-4 및 atsos1-1)이다. 액틴(ACT2)은 참고 전사물질로서 사용된다. 도 2c는 TsHKT-RNAi 구조의 대표도를 나타낸 것이다. 도 2d는 TsHKTs 발현이 TsHKT-RNAi 구축으로 형질전환된 T. 살수기니아 라인에서 저해됨을 나타낸 것이다. 나타낸 것은 벡터 대조군(Ts WT)과 비교해 볼 때 두 개의 대표 TsHKT-RNAi 형질전환 라인(77-1 및 81-2)이다.

도 3은 T. 살수기니아 TsHKT-RNAi 라인의 염-민감한 표현형(phenotype)을 나타낸 것이다.

도 3a~도 3d는 벡터 대조군(Ts WT) 또는 TsHKT-RNAi 컨스트럭트(라인 77-1 및 81-2)를 지니는 T. 살수기니아 식물이 불활성 인공 토양에서 성장되었으며, 실시예에 기술된 바와 같이 염 처리를 하지 않거나(도 3a) 또는 300 mM NaCl(도 3b) 처리되었음을 나타낸 것이다. 도 3c는 염 처리 후에 생중량을 비교한 것을 나타낸 것이며, 에러바는 별개의 3회 반복으로부터의 표준편차를 나타내는 것이다(각 반복에서 n=30). 도 3d는 Ts WT 및 TsHKT-RNAi 라인의 대표 잎 크기를 비교한 것을 나타낸 것이다. 도 3e 및 3f는 염 스트레스 하에서 Ts WT 및 TsHKT-RNAi 묘목의 뿌리 성장을 나타낸 것이다. $\frac{1}{2}$ MS 상에서 성장된 10일 된 묘목은 100 mM NaCl로 보충된 K^+ 결핍 배지(실시예)로 이동되었다. 도 3e는 수직 성장에 대해 추가로 10일 후에 찍은 사진을 나타낸 것이다. 도 3f는 뿌리털 부분의 확대를 나타낸 것이다. 스케일 바는 패널 a, b, d 및 e에서 10 mm를 나타낸다.

도 4는 TsHKT1;2 및 AtHKT1을 전위(ectopically) 발현시키는 A. 탈리아나 및 효모 스트레인의 염 스트레스 반응의 비교를 나타낸 것이다.

도 4a ~4c는 야생형(Col-g11) 또는 AtHKT1 녹아웃 변이체(athkt1-3) 백그라운드에서 TsHKT1;2 (TsHKT1;2-OX)

또는 35S-CaMV 프로모터를 지닌 AtHKT1(AtHKT1-OX)을 과발현시키는 4일 된 아라비돕시스 묘목은 염 배지로 이동되었다(추가 표 S4). 도 4a는 7일 동안 수직 성장 후에 찍은 사진을 나타낸 것이며, 도 4b는 뿌리 성장을 3회 반복하여 측정된 것을 나타낸 것이다(각 반복에서 n=30). 도 4c는 순(shoot) 표현형을 나타내기 위해서 확대된 사진을 나타낸 것이다. 스케일 바는 패널 a 및 c에서 10 mm를 나타낸다. 도 4d는 TsHKT1;1, TsHKT1;2 및 AtHKT1이 사카로마이세스 세레비지에 스트레인 AXT3K($\Delta ena1-4-\Delta nha1 \Delta nhx1$)에서 이소 발현되며, 이는 Na^+ -유출 시스템을 결핍시킨다는 것을 나타낸 것이다. 벡터 대조군 및 AtKAT1로 형질전환된 세포가 각각 음성 대조군 및 양성 대조군으로 포함된다. 1:10으로 희석한(decimal dilution) 효모 세포는 1 mM K^+ (대조군) 및 각각 1 mM 및 10 mM KCl을 지니는 150 mM NaCl을 포함하는 AP 배지 상으로 플레이트 되었다.

도 5는 K^+ -제한요인 하에서 T. 살수기니아 TsHKT-RNAi 라인의 절충적(compromised) 성장을 나타낸 것이다. 벡터 대조군(Ts WT) 또는 TsHKT-RNAi 컨스트럭트(라인 77-1 및 81-2)를 지니는 T. 살수기니아 묘목은 10일 동안 1/2 MS상에서 성장되었으며, 1/2 MS 대조군 배지(도 5a) 또는 K^+ -결핍 배지(도 5b) 또는 10 mM KCl로 보충된 동일 배지(도 5c)로 이동되었다. K^+ -결핍 배지는 MS 배지로부터 변형되었으며, KNO_3 을 포함하지 않고 $(NH_4)_2HPO_4$ 로 교체되었으며 KH_2PO_4 를 포함한다(실시예 및 표 2). 15일 동안 수직 자세(vertical position)로 배양 후에 사진을 찍었다. 도 5d는 도 5c의 뿌리 성장을 정량화한 것이다. 도 5e는 K^+ -제한 요인 하에서 A. 탈리아나 WT 및 athkt1 녹아웃 변이체를 나타낸 것이다. 아라비돕시스 Col-g11 (WT) 및 athkt1 녹아웃 변이체의 상이한 대립형질을 지니는 아라비돕시스 식물(athkt1-1, 3 및 4)은 4일 동안 1/2 MS 상에서 성장되었으며, 10 mM KCl로 보충된 K^+ -결핍 배지로 이동되었다. 이동된 묘목이 15일 동안 수직자세로 배양된 후 사진을 찍었다. 도 5f는 도 5e의 뿌리 성장을 정량화한 것이다. 도 5d 및 도 5f의 에러바는 3회 반복의 표준편차를 나타낸다(n=30). 스케일 바는 패널 a, b, d 및 e에서 10 mm를 나타낸다.

도 6은 A. 탈리아나 및 TsHKT1;2 및 AtHKT1을 이소 발현시키는 효모 스트레인의 K^+ -제한 요인에 대한 반응의 차이를 나타낸 것이다.

도 6a 및 b는 야생형(Col-g11) 또는 AtHKT1 녹아웃 변이체(athkt1-3) 백그라운드 상에서 TsHKT1;2(TsHKT1;2-OX) 또는 AtHKT1(AtHKT1-OX)을 과발현시키는 4일 된 아라비돕시스 묘목이 20 mM NaCl로 보충된 K^+ -결핍 배지(표 2)로 이동되었음을 나타낸 것이다. 도 6a는 수직 자세로 7일 배양 후에 찍은 사진을 나타낸 것이고, 도 6b는 뿌리 성장을 정량화한 것을 나타낸 것이다. 준 정량적인(semi-quantitative) RT-PCR은 이소성 HKT 발현과 비슷한 수준인 형질전환 라인을 선별하기 위해서 사용된다(도 6a, 위쪽 부분). 도 6c 및 도 6d는 동일한 형질전환 라인의 뿌리 성장을 1 mM Na^+ 및 0, 1 또는 5 mM K^+ 이온으로 보충된 K^+ -결핍 배지(표 2)에서 WT과 비교한 것을 나타낸 것이다. 도 6c는 도 6a와 같이 수직 자세로 7일 배양 후에 찍은 사진이며, 도 6d는 도 6b와 같이 뿌리 성장을 정량화한 것을 나타낸 것이다. 스케일 바는 도 6a 및 도 6c에서 10 mm를 나타낸 것이다. 도 6b 및 도 6d의 에러바는 3회 반복의 표준편차를 나타낸다(n=30). 도 6e는 벡터 대조군(pYES2), TsHKT1;1, TsHKT1;2, AtHKT1 및 AtKAT1을 지니는 효모 스트레인 CY162(Mat a, ura3-52, his3D200, his44-15, trkD1, trkD2::pcK64) 세포의 성장을 나타낸 것이다. 세포는 100 mM KCl (Control) 또는 지시한 KCl 및 NaCl의 양을 포함하는 AP 배지 상에서 1:10 희석하여 플레이트 되었다. 벡터 대조군 및 AtKAT1로 형질전환된 세포가 각각 음성 및 양성 대조군으로 포함되었다.

도 7은 TsHKT1;2 단백질의 위치 207 및 238 내의 점 돌연변이(point mutations)의 효과를 나타낸 것이다. TsHKT1;2를 지니는 효모 스트레인 CY162(Mat a, ura3-52, his3D200, his44-15, trkD1, trkD2::pcK64) 세포는 점 변이체 TsHKT1;2-1 (D207N), TsHKT1;2-2 (D238N) 및 TsHKT1;2-1/2 (D207N 및 D238N)를 발현시키는 세포와 비교되었다. 세포는 100 mM KCl (대조군) 또는 지시한 KCl 및 NaCl의 양을 포함하는 AP 배지 상에서 1:10 희석하여 스팟(spot)되었다. 벡터 대조군, AtHKT1 및 AtKAT1로 형질전환된 세포는 대조군으로서 포함되었다.

도 8은 TsHKT1;1 및 TsHKT1;2의 발현 패턴을 나타낸 것이다. RNA 샘플은 150 mM NaCl로 처리된 2주된 T. 살수기니아 식물로부터 제조되었다. 정량적인 RT-PCR은 TsHKT1;1 및 TsHKT1;2 서열에 특이적인 프라이머를 사용하여 수행되었다(표 3). 2개의 프라이머 쌍의 증폭 효율은 표준 곡선을 이용하여 보정하였다.

도 9는 벡터 대조군(WT)과 TsHKT-RNAi 라인(라인 77-1 및 81-2)에서 K^+ 및 Na^+ 함량을 비교한 것이다. 4주 된

수경법으로 성장한 식물은 24시간 동안 250 mM NaCl로 세척되었다. Na^+ 및 K^+ 함량은 유도결합플라즈마 발광광도법(ICP-OES)으로 측정되었다. 도 9a는 순(shoot)의 Na^+ 및 K^+ 함량을 나타낸 것이고, 도 9b는 순(shoot) 조직의 K^+/Na^+ 비율을 나타낸 것이다. 도 9c는 뿌리의 Na^+ 및 K^+ 함량을 나타낸 것이다. 도 9d는 뿌리의 K^+/Na^+ 비율을 나타낸 것이다. 예러 바는 3회 반복의 표준 편차를 나타낸다.

도 10은 AtHKT1, TsHKT1;1 및 TsHKT1;2를 이소 발현시키는 효모 세포 AXT3K 내의 K^+ 및 Na^+ 함량을 나타낸 것이다. AtHKT1, TsHKT1;1 또는 TsHKT1;2를 발현시키는 AXT3K 효모 세포(OD_{600} 0.7, 1.0×10^8 세포)의 Na^+ 함량(도 10a) 및 K^+ 함량(도 10b)은 2시간 동안 지시한 KCl 및 NaCl의 농도로 보충된 완충용액에서 배양된 후에 측정되었다. 예러 바는 3회 반복의 표준 편차를 나타낸다.

도 11은 T. 살수기니아, T. 파볼라 A. 탈리아나 및 A. 리라타의 HKT1 단백질 서열의 정렬을 나타낸 것이다(표 1을 참고). 정렬은 clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)에 의해 수행되었다.

4개의 포어 루프 영역($P_A \sim P_D$) 및 막관통영역($M1_A/M2_A \sim M1_D/M2_D$)에 밑줄을 그었다. 포어 루프 영역 내의 보존된 글리신 잔기 및 M2D 영역 내의 양전하를 띤 잔기는 화살표로 나타내었다. TsHKT2 및 TpHKT2에서 발견된 아스파르트산 잔기는 빨간색 박스로 표시하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 세포의 Na^+/K^+ 비율은 식물의 염분 스트레스 저항성을 측정하는 중요한 지표이다. 본 발명자들은 염분 생장(halophytic) 아라비돕시스-연관 툴룬지엘라 살수기니아(*Theellungiella salsuginea*)로부터 유래된 고-친화성 칼륨 수송체(HKT; high-affinity potassium transporter) 패밀리에서 형질막 Na^+/K^+ 보조-수송체의 기능을 테스트하였다.

[0024] T. 살수기니아는 적어도 두 개의 HKT 유전자를 포함한다. TsHKT1;1은 아주 낮은 수준으로 발현되었으나, 반면에 많은 양의 TsHKT1;2는 염 스트레스에 의해 전사적으로 강하게 상향-조절되었다. T. 살수기니아에서 TsHKT-기반 RNAi 간섭은 Na^+ -민감성 및 K^+ -결핍을 초래하였다.

[0025] TsHKT1;2를 과발현시킨 athkt1 변이 라인은 AtHKT1를 과발현시킨 라인보다 Na^+ 에 대해 덜 민감하였고, K^+ 결핍이 덜하였다. Na^+ 또는 K^+ 수송체를 결핍시키는 효모 변이체에서 전위성(ectopical)-발현된 TsHKT1;2는 강한 K^+ -수송체 활성 및 Na^+ 보다 K^+ 에 대한 강한 선택성을 나타냈다.

[0026] AtHKT1 서열을 모방하는 TsHKT1;2에서 두 개의 아미노산 잔기의 변형은 증진된 나트륨 흡수(uptake)와 TsHKT1;2 고유 K^+ 수송체 활성의 손실을 초래하였다. 본 발명자들은 T. 살수기니아의 염분 생장 생활 방식을 지지하는 중요한 요소인 염 스트레스 하에서 TsHKT1;2를 통한 K^+ -흡수의 유지를 통한 항상성을 확인하였다.

[0027] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0028] 식물 HKT 슈퍼패밀리(superfamily) 관계

[0029] T. 살수기니아 게놈은 적어도 두 개의 상이한 HKT-유사 전사물을 포함한다. 비슷하게 T. 파볼라의 게놈 서열은 두 개의 동시에 복제된 HKT 유전자를 포함한다. 본 발명자들은 아라비돕시스 HKT1 및 TsHKT1;1의 서열로부터 이들의 서열을 분리한 아미노산 서열과는 차이를 보이는 T. 살수기니아 HKT1;2 유전자의 전사물에 중점을 둔다(도

1a).

[0030] TsHKT1;1 및 TsHKT1;2 단백질은 AtHKT1과 각각 79.41% 및 79.20% 아미노산 서열 동일성을 보인다. 계통수에서 아라비도시스 및 툼지엘라 HKTs는 서브패밀리 1에서 매우 가까이 그룹화되어 있다. 아라비도시스 종으로부터의 단일 카피(single copy) HKT1 서열로 구성되는 가지 내에서, TsHKT1;1은 포함되나, TsHKT1;2는 떨어져 있다(도 1b, 표 1). T. 파볼라에서 두 개의 HKT 유전자는 이들의 배치에 있어서 별다른 차이가 없다.

【표 1】

계통분석에 사용된 HKT-유사 단백질 서열

명칭	종	서열 소스 (source)
AtHKT1	<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002872505
AtHKT1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAF68393
EcHKT1;1	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	AAF97728
EcHKT1;2	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	AAD53890
HvHKT1;5	<i>Hordeum vulgare</i>	ABK58096
HvHKT2;1	<i>Hordeum vulgare</i>	CAJ01326
McHKT1;1	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	AAK52962
McHKT1;2	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	AAO73474
OsHKT1;1	<i>Oryza sativa</i>	CAD37183
OsHKT1;3	<i>Oryza sativa</i>	CAD37185
OsHKT1;4	<i>Oryza sativa</i>	CAD37197
OsHKT1;5	<i>Oryza sativa</i>	BAB93392
OsHKT2;1	<i>Oryza sativa</i>	BAB61789
OsHKT2;2	<i>Oryza sativa</i>	BAB61791
OsHKT2;3	<i>Oryza sativa</i>	CAD37187
OsHKT2;4	<i>Oryza sativa</i>	CAD37199
PaHKT2;1	<i>Phragmites australis</i>	BAE44385
PpHKT3;1	<i>Physcomitrella patens</i>	XP_001763760
PtHKT1;1	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002325229
ScTRK1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AAA34728
ScTRK2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AAA35172
SmHKT1;1	<i>Selaginella moellendorffii</i>	AA820529
TaHKT1;5B1	<i>Triticum aestivum</i>	ABG33947
TaHKT1;5B2	<i>Triticum aestivum</i>	ABG33948
TaHKT1;5D	<i>Triticum aestivum</i>	ABG33945
TaHKT2;1	<i>Triticum aestivum</i>	AAA52749
TmHKT1;4A1	<i>Triticum monococcum</i>	ABK41858
TmHKT1;4A2	<i>Triticum monococcum</i>	ABK41857
TmHKT1;5	<i>Triticum monococcum</i>	ABG33946
TpHKT1;2	<i>Thehungiella parvula</i>	Dassanayake et al., 2011
TpHKT1;1	<i>Thehungiella parvula</i>	Dassanayake et al., 2011
TsHKT1;2	<i>Thehungiella salsugenia</i>	BAJ34563
TsHKT1;1	<i>Thehungiella salsuginea</i>	JQ063120
VvHKT1;1	<i>Vitis vinifera</i>	CAO64083
VvHKT1;2	<i>Vitis vinifera</i>	CAO64075
VvHKT1;3	<i>Vitis vinifera</i>	CAO64081
VvHKT1;6	<i>Vitis vinifera</i>	CAO64069
VvHKT1;7	<i>Vitis vinifera</i>	CAO64070
VvHKT1;8	<i>Vitis vinifera</i>	CAO64071

[0031]

[0032] TsHKT1;2 전사물은 염 스트레스에 의해 유도된다.

[0033] 대조군 및 염 스트레스 조건 하에서 HKT 유전자의 발현 패턴은 A. 탈리아나 및 T. 살수기니아 식물에서 측정되었다. 코스 실험때 HKT 발현은 T. 살수기니아에서 NaCl에 의해 유도되는(도 2a) 반면에, HKT1 전사물의 양은 같은 시간 동안 아라비도시스에서는 감소하였다(도 2b). 동일한 패턴이 염-민감성 T. 살수기니아 tssos1-4 및 atsos1-1 변이체에서 관찰되었으며, 이는 SOS1 활성의 독립적 조절 경로를 시사한다(도 2a 및 도 2b). T. 살수기니아에서 두 개의 공지된 HKT1 카피 중에서, TsHKT1;2는 염 스트레스에 의해 급격하게 유도되는 반면에 TsHKT1;1 발현은 매우 낮은 수준으로 남아 있다(도 8). 발현 패턴 때문에 후보자로 더 가능성 있는 HKT1;2를 지닌 HKT 단백질이 살수기니아에서 염분 생장 특성에 기여하는지 여부를 측정하기 위해서, TsHKT-RNAi 컨스트럭트

를 지닌 형질전환된 라인(도 2c)이 발달되었다. 몇개의 독립적 TsHKT-RNAi 형질전환 T. 살수기니아 라인은 벡터 대조군과 비교시 감소된 TsHKTs 발현이 확인되었다(도 2d).

[0034] TsHKT-RNAi는 T. 살수기니아에서 성장 및 K^+ -항상성을 저해한다.

[0035] 나트륨 특이적 반응은 T. 살수기니아 및 아라비돕시스에 있어서 적어도 HKT 발현 수준에 대해서 상이하다(도 2a, 도 2b). 활성 수준에 대한 차이를 분석하기 위해서, 실시예에 기재된 바와 같이 TsHKT-RNAi 라인은 한달 동안 비활성 인공 토양에서 성장되었으며, 2주 동안 300 mM NaCl로 처리되었다. TsHKT-RNAi 라인은 비-스트레스 하에서 성장시 차이점을 나타내지 않았으나(-NaCl, 도 3a) 벡터 대조군과 비교시 염(+NaCl, 도 3b)에 대한 민감성을 나타냈다. TsHKT-RNAi 라인은 훨씬 적은 생중량(fresh weight)을 축적하였으며(도 3c), 야생형과 비교시 염 스트레스 하에서 더 작은 잎을 생성하였다(도 3d). 100 mM NaCl로 보충된 칼슘-무 배지에서 TsHKT-RNAi 라인 묘목은 주근 성장의 억제를 나타냈으며(도 3e), 야생형과 비교시 뿌리털은 더 높은 밀도로 발달되었다(도 3f). TsHKT 야생형 및 TsHKT-RNAi 라인에 의한 K^+ 축적에 대한 역할을 확인하기 위하여, 수정법으로 성장된 식물은 24시간 동안 250 mM NaCl로 처리되었다. ICP-OES(유도결합플라즈마 광학 발광 분광법Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy)에 의한 이온 함량분석은 야생형과 비교시 K^+ 및 TsHKT-RNAi 라인의 감소를 보였다(도 9a, c). K^+/Na^+ 비율은 순(shoot) 조직에서 상당히 낮았으며, 반면에 TsHKT-RNAi 라인의 뿌리 조직에서 아주 조금 증가하였다(도 9b, d). 성장 및 이온 함량의 차이는 Na^+ 저항성에 있어서 TsHKTs의 기능 및 K^+ 항상성의 유지를 제안하였다.

[0036] TsHKT1;2는 Na^+ 과민 반응에 있어서 AtHKT1와는 상이하다.

[0037] T. 살수기니아 및 아라비돕시스 HKT1 단백질의 차별적 나트륨-특이적 반응을 분석하기 위해서, 야생형 또는 AtHKT1 변이체(athkt1-3) 백그라운드에서 AtHKT1 또는 TsHKT1;2를 발현시키는 아라비돕시스 라인의 묘목은 75 mM NaCl를 포함하는 배지로 이동되었다. 모든 HKT-발현 라인은 그들 각각의 대조군과 비교시 뿌리 성장 지연을 증명하였다. AtHKT1을 발현시키는 라인은 TsHKT1;2를 발현시키는 라인과 비교시 주근 성장의 더 심한 저해를 나타냈다(도 4a, b). 순 민감성 반응은 AtHKT1을 발현시키는 라인에서만 관찰되었다(도 4a, c).

[0038] AtHKT1 및 TsHKTs의 Na^+ 및 K^+ 이온에 대한 친화력은 이종계(heterologous system)와 비교되었다. TsHKTs 및 AtHKT1은 효모 스트레인 AXT3K(ena1::HIS3::ena4, nha1::LEU2, nhx1::KanMX4)에서 발현되었으며, 이는 Na^+ 수송 활성을 결핍시켰으며, 염-민감성이다. 형질막 K^+ 채널 AtKAT1의 발현은 대조군의 역할을 하였다. 염 스트레스(150 mM NaCl)는 AtHKT1을 발현시키는 세포의 성장을 저해하였으며, TsHKT1;1의 발현은 벡터 대조군과의 유의미한 차이를 초래하지는 않았다. 대조적으로 TsHKT1;2를 발현시키는 세포는 AtKAT1를 발현시키는 세포와 비슷한 아르기닌/인산염(AP) 배지 상에서 성장을 나타냈다. 추가로 10mM K^+ 의 첨가는 TsHKT1;2 또는 AtKAT1을 발현시키는 세포의 성장을 증가시켰다(도 4d). TsHKT1;2를 발현시키는 세포는 Na^+ 를 훨씬 낮은 수준으로 축적하였으나, 반면에 AtHKT1를 발현시키는 세포는 벡터 대조군보다 더 높은 Na^+ 흡수율을 나타냈다(도 10a). 그와는 반대로 TsHKT1;2 발현 세포는 특히 250 mM Na^+ 존재시 벡터 대조군보다 더욱 K^+ 를 축적하였다. AtHKT1 발현 세포는 벡터 대조군보다 더 낮은 K^+ 수준을 나타냈으며, 이는 AtHKT1과 TsHKT1;2 단백질간의 정반대 활성을 시사한다(도 10b).

[0039] TsHKT-RNAi는 T. 살수기니아에서 K^+ -제한 조건 하에서 성장 저해를 유도하였다.

[0040] K^+ 항상성에 있어서 TsHKT1;2의 가능한 기능을 조사하기 위해서, 10일 동안 1/2 MS 상에서 성장된 T3 동형접합성 TsHKT-RNAi는 K^+ 결핍 배지로 이동되었다. K^+ -결핍 배지는 1/2 MS에서 KNO_3 및 KH_2PO_4 를 NH_4NO_3 및 $(NH_4)_2HPO_4$ 로 대체함으로써 만들어졌으며, K^+ 수송체를 저해한다(표 2). 정상 배지에서 성장시 TsHKT-RNAi 라인은 아주 조금 작아졌으나(도 5a), 야생형과 비교시 K^+ 결핍에는 더욱 민감하였다(도 5b). 반응이 야생형 표적으로 보여진 것과는 다르게 10 mM K^+ 의 첨가는 TsHKT-RNAi 라인의 성장을 증진시킬 수는 없었다(도 5c, d). 이것은 athkt 녹아웃(knockout) 변이체는 10 mM K^+ 로 보충된 K^+ -결핍 배지 상에서 뿌리 성장에 대한 차이를 보이지 않았던 아라비도시스와는 대조적이다(도 5e, f).

【표 2】

K^+ -결핍 배지 제조 방법*

변형된 MS 원액	
1) 100x N 원액	: NH_4NO_3 165 g/L
2) 100x Mg 원액	: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 37 g/L
3) 100x Ca 원액	: $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 44 g/L
4) 100x Fe-EDTA 원액	: Na_2 -EDTA 3730 mg/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2780 mg/L
5) 100x 미량영양소 용액	:
붕산 (H_3BO_3)	620 mg/L
염화코발트 ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	2.5 mg/L
황산구리 ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	2.5 mg/L
황산망간 ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	2230 mg/L
요오드화칼륨 (KI)	83mg 0.83 mg/L =5 μ M → 요오드화나트륨으로 대체
몰리브덴산나트륨 ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	25 mg/L
황산아연 ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	860 mg/L
Na_2 EDTA $\cdot$ 2H ₂ O	25 mg/L
K^+ -결핍 배지 제조 방법	
1) N 원액	1/20x
2) Mg 스톱	1/20x
3) Ca 원액	1/20x
4) Fe-EDTA 원액	1x
5) 미량영양소 용액	1x
6) 1X 인산칼륨 (KH_2PO_4)	170 mg/L 및 질산칼륨 1900 mg/L은 각각 전체 NH_4 농도를 3.28 mM으로 조절하기 위해서 인산암모늄 $(NH_4)_2HPO_4$ 165mg/L (1.25 mM) 및 NH_4NO_3 1000 mg/L (12.5 mM)으로 대체되었다.
7) MES: 0.5g/L 수크로즈: 30 g/L Bacto Agar (BD, Franklin lake, NJ): 12 g/L	
8) NaOH로 pH를 조절	

*다음으로부터 변형됨 :

Rus A, Lee BH, Munoz-Mayor A, Sharkhuu A, Miura K, Zhu JK, Bressan RA, Hasegawa PM (2004) AtHKT1 facilitates Na^+ homeostasis and K^+ nutrition in planta. Plant Physiol 136: 2500-2511

[0041]

[0042] TsHKT1;2는 AtHKT1에 비해 Na^+ 보다 K^+ 에 대해 더 높은 민감성을 나타낸다.

- [0043] TsHKT1;2의 추정 K^+ -관련된 역할을 분석하기 위해서, CaMV 35S 프로모터 하에서 TsHKT1;2 또는 AtHKT1를 과발현시키는 형질전환 아라비도시스 라인이 같은 수준의 HKT 발현을 위해 선별되었다(도 6a, 위쪽). 동형 접합성 T3 라인으로부터의 종자는 $\frac{1}{2}$ MS 배지 상에서 4일 동안 발아 및 성장되었으며, 20 mM NaCl로 보충된 K^+ -결핍 배지로 이동되었다. 성장 억제 징후는 AtHKT1 발현 식물과 비교시 TsHKT1;2 형질전환 식물에서 덜 심각했다(도 6a, b). HKT 수송체의 이온 선택성에 관한 테스트를 위해서, 도 6a에서 사용된 동일한 형질전환 라인이 1 mM Na^+ 및 0, 1 또는 5 mM K^+ 로 보충된 K^+ -결핍 배지 상에서 성장되었다(도 6c, d). K^+ 결핍시 1 mM Na^+ 존재는 뿌리 성장을 감소시켰으며, 높은 수준의 억제가 AtHKT1-과발현 식물에서 관찰되었다.
- [0044] 그러나 TsHKT1;2-과발현 식물은 배지에서 K^+ 농도를 점진적으로 증가시킴에 따라 야생형 보다 낮거나 비슷한 뿌리 성장을 보였다. 대조적으로 AtHKT1-과발현 식물의 뿌리 성장은 배지에서 K^+ 의 첨가에 의해 보충 되지 않았다(도 6c, d).
- [0045] TsHKT1;2에 의한 K^+ 수송체 활성 및 Na^+ 보다 K^+ 선호성은 K^+ 수송체 결핍 효모 스트레인 CY162 (Mat a, ura3[?]52, his3D200, his44[?]15, trkD1, trkD2::pcK64)에서 TsHKT1;2의 이소성 발현에 의해 확인되었다. 1 mM K^+ 를 포함하는 AP 배지상에서, TsHKT1;2를 발현시키는 세포는 AtKAT1을 발현시키는 세포와 비슷한 성장을 나타냈으나, 반면에 AtHKT1 또는 벡터 플라스미드의 발현은 세포의 성장을 복구하는데 실패하였다(도 6e). 비슷하게 AtKAT1 및 TsHKT1;2 발현 세포는 300 mM NaCl이 존재시 10 mM K^+ 에서 강하게 성장하였다. 또한 K^+ 의 이 농도에서, TsHKT1;1 발현 세포는 AtHKT1를 발현시키는 세포에서는 보이지 않는 약간의 증가된 성장을 나타냈으며(도 6e), K^+ 선택성에 대한 경향은 TsHKT1;2에서는 보다 덜 확실하더라도 TsHKT1;1에 도 존재한다는 것을 나타낸다.
- [0046] TsHKT1;2에 의한 K^+ -특이성은 서툼(subtle) 서열 차이에 기반을 두고 있다.
- [0047] 일차 아미노산 서열(도 11)의 차이 중에서 2개의 아미노산은 식물 HKT 단백질 서열 간의 비교시 막관통영역 및 막공 도메인 내의 위치 때문에 두드러지는 것 같았다(도 1a). 두 지역에서 교체는 TsHKT1;2 (및TpHKT1;2)에서 아스파르트산(D) 잔기이나, 반면에 아스파라긴(N)은 아라비도시스와 모든 그 밖의 공지된 식물 서열에서 발견되었다(자료에는 나타내지 않음).
- [0048] 개별적으로 또는 함께 2개의 D 잔기는 AtHKT1에 존재하는 N 잔기에 의해 교체되었다(D207N, D238N)(도 1a). 각각의 단일 변화(각각 라인 TsHKT1;2-1 및 TsHKT1;2-2)는 Na^+ 의 존재시 감소된 성장을 초래하였으며, 이는 특히 1 mM KCl을 지니는 AP 배지 및 1 mM KCl + 300 mM NaCl에서 분명하였다(도 7). 그러나 NaCl을 첨가하거나 첨가하지 않고 10 mM KCl의 존재시, 단일 변이체 및 이중 변이체를 지니는 세포(라인 TsHKT1;2-1/2)는 야생형 TsHKT1;2 발현 세포보다는 그리 좋지 않았으나 AtHKT1보다는 약간 미리 형성하였다(도 7).
- [0049] 본 발명은 T. 살수기니아의 염분 생장 특징이 연구된 AtHKT1 및 OsHKT1 단백질의 HKT1 아이소형에 의한 것인지에 대한 기여를 분석하는 것을 목표로 하고 있다. 염분 저해 식물과 구별하면, 염분 생장 식물의 특징은 질적인 것보다 양적인 것으로 기술되어왔으며, 이전의 연구는 이러한 개념을 지지해왔다. 만약 그렇다면 염-저항성 또는 염-그라데이션을 필요로 하는 것이 존재한다고 예상하면, 타입과 상이하지 않은 유전자 및 단백질의 수에 의해 셋업할 수 있지만, 유전자가 얼마나 민감하게 반응하는지 단백질이 얼마나 민감한지는 이 스트레스 조건 하에서 결정된다.

- [0050] 아라비도시스와 가까운 친척인 두 개의 염분 생장 식물의 게놈 서열인 툴룬지엘라 파블라 및 T. 살수기니아는 이를 위해 참고되었다. 이들 게놈의 구조(organization)는 아라비도시스의 게놈과 비교시 매우 보존되어 있으나, 반면에 유의미한 차이는 스트레스-관련 유전자 및 이들의 발현에 대한 아이소형의 수에서 비롯된다.
- [0051] 그럼에도 불구하고 본 발명자들은 염분 생장(halophytism)을 정의하는 유전자를 아직 정확하게 지목할 수는 없지만, 몇몇의 경로 및 유전자는 알려져 있고 현재 덜 이해되거나 덜 알려져 있는 다른 경로 및 유전자도 매우 분명하게 관련되어 있다. 상이한 구획에서 다수의 1가 양이온 수송체 및 불분명한 다른 수송체 단백질의 가능한 기여가 예이다. 아라비도시스 게놈에서 인코딩된 이 카테고리 내에 197개의 유전자가 있으며(TAIR 9 방출), 반면에 동일한 카테고리 내의 단백질에 대한 299개의 유전자는 T. 파블라의 게놈 서열에서 확인되었다.
- [0052] 식물 내로의 나트륨 이온의 유입, 유출 및 분배가 조절되는 방법에 대해서는 어느 정도 연구되었다. SOS 경로는 가장 중요한 의의와 중요성을 지닌다. 상기 경로에서 3개의 유전자의 순차적 작용은 식물체에서 내내 -식물체의 발달동안 변화하는 것 같은 정도로- Na^+/H^+ -역수송체 단백질인 SOS1과 함께 나트륨의 배출 및 분배를 가능하게 하며, 이것은 중요한 역할을 한다. 스트레스 없는 조건 및 염 스트레스 에피소드 동안 상이한 조직 및 성장 단계에서 SOS 경로의 활성화된 요소의 동적 분배는 아직 알려지지 않은 반면, SOS 경로 특히 SOS1에서 유전자의 제거 또는 감소(RNAi)는 염분 피해 및 염분 생장에서 똑같이 NaCl에 대한 강한 민감성을 유도한다.
- [0053] 또 다른 수송 과정보도 주목받고 있다. 밀 TaHKT1는 전도도가 Na^+ 농도에 의존하는 Na^+/K^+ 수송체이다. 마이크로몰 농도에서 이는 Na^+/K^+ 공동 수송체로서 작용하지만, Na^+ 의 밀리몰 범위에서는 HKT1는 Na^+ 유니포터로서 작용한다. 대조적으로 AtHKT1는 *Xenopus oocytes* 및 효모와 같은 이중계에서 높은 선택적 친화력 Na^+ 수송체로서 작용한다. 벼는 AtHKT1와 비슷한 Na^+ 수송체로서 행동하는 그룹 OsHKT1내의 유전자와 다수의 HKT 유전자를 포함하며, 반면에 OsHKT2 유전자는 TaHKT1처럼 공동 수송체 또는 유니포터로서 작용한다. 대부분의 벼 HKT-유사 수송체가 연구되지 않은 것을 고려하면, 벼에 속한 이 패밀리는 1가 양이온 항상성에 있어 중요한 역할을 하는 것이 가능한 것 같다. K^+ 결핍은 OsHKT 유전자들의 두 타입의 발현에 대해 양성 조절자로서 작용한다, 반면에 Na^+ 는 음성 조절을 유도한다. 이 행동은 HKTs와 구조적으로 관련된 진균 TRK K^+ 수송체 단백질을 연상시킨다. 진균 TRK는 이온 환경 및 세포의 K^+ 상태에 따른 Na^+/K^+ 의 선택성의 조건적 조절을 수행한다.
- [0054] 일찍이 염분 조건 하에서 높은 K^+/Na^+ 비율을 유지하는 T. 살수기니아의 탁월한 능력이 인정받아왔다. 염분 스트레스 저항성을 매개하는 HKT-유사 단백질의 중요성에 대한 엄청난 강하고 지지되는 모델에서 유전적 및 분자 연구에 의해 제공되었다. 몇몇 경우에서, 개선된 염분 저항성은 HKT-타입 수송체를 포함하는 게놈 지역과 관련되어 있다. 본 명세서에서 본 발명자들은 T. 살수기니아의 유사한 특징을 기초로 한 증거를 제공한다. 이는 진성(true) 염분 생장 식물에 존재하는 HKT 패밀리 수송체중 하나라는 것에 근거를 두고 있다. TsHKT1;2는 이 종에서 염분 저항성을 형성하는 시스템의 일부이다.
- [0055] 본 발명자들의 결과는 AtHKT1 및 서열 시그니처 및 발현 특징에 의해 TsHKT1;1 단백질과 상이한 기능을 하는 TsHKT1;2를 확인한다. Na^+ 이온의 존재시 K^+ 항상성에 관한 기능을 갖는 중복 유전자(duplicated gene)의 신기능화의 설명(example)은 두 번째 설명과 툴룬지엘라 종을 특징화하는 염분 생장 생활 방식에 대한 유전자 발현의 강도를 제공한다.
- [0056] 이온 특이성이라는 용어의 기능적 포괄성(diversity)은 두 개의 서브-패밀리의 차이에 의해 의미하던 것보다 더 복잡해질 수 있기 때문에, 진화적 관계의 관점은 HKT 명명법을 재-고려하는 것에 대해 논쟁을 불러일으킬 것으로 보인다. 관다발 식물에서 HKT 단백질은 추정상 분명한 이온 선택성을 지니는 2개의 서브 패밀리로 나누어질

수 있다. 서브패밀리 2의 멤버는 단백질의 첫 번째 포어 루프(pore loop)에서 보존된 글리신 잔기를 포함하며, 반면 서브패밀리 1의 멤버는 이 위치에서 세린 잔기를 나타낸다는 것을 제안해왔다. 첫 번째 P-루프에서 이 글리신에서 세린으로의 치환이 K^+ 또는 Na^+ -선택성을 담당할 수도 있다는 것이 앞서서 추측되어 왔으며, TsHKT1;2가 이 법칙을 따르지 않는다는 사실은 또 다른 사이트 또는 사이트들이 Na^+ 보다 K^+ -선호에 관여한다는 나타내는 것 같다.

[0057]

이온 선택성에 있어서 관찰된 차이점과는 관계없이, TsHKT1;2 및 AtHKT1은 서브패밀리 1에 포함되며, 다른 십자화과 HKT 단백질과 함께 그룹화된(도 1b). 세 구조에서, TsHKT1;1, TsHKT1;2 및 AtHKT1은 첫 번째 포어 루프에서 보존된 세린 잔기를 포함한다(P_A , 도 11). K^+ 수송 활성화에 대한 필수적 결정요인으로 제안되는 $M2_D$ 막관통 영역에서 양전하를 띤 아미노산도 십자화과 중 중에서 보존되어 있다($M2_D$ 에서 화살표, 도 11). AtHKT1 및 TsHKT1;1(또한 TpHKT1;1)를 구별하는 아미노산 서열 변이는 두 번째 포어 루프 지역(P_B) 및 인접한 막관통영역($M2_B$)에서 보였다. 아라비도시스 HKT1가 보존된 아스파라긴 잔기를 포함하는 위치에서, TsHKT1;2 및 TpHKT1;2는 보존된 음성 전하를 띤 아스파르트산 잔기를 포함하였다(도 1a). P_B 지역에서 이 아스파르트산 잔기는 TsHKT1;2 및 TpHKT1;2의 특징이지만, 오늘날까지 알려진 다른 식물 HKTs에 의해 공유되지는 않는다(자료에는 나타나지 않음). 그러나 효모 칼슘 수송체 ScTrk1은 포어 루프 지역의 동일한 지역에서 아스파르트산을 포함하며, 이는 칼슘 특이적 수송체에 대해 결정요인으로서 이 아미노산이 가능하다는 것을 제안한다(도 1a). TsHKT1;2는 서브패밀리 2에 포함되는 HKT2 단백질과는 상이한 서열(subtle) 아미노산 서열 변이를 통해 이온 선택적으로 수행되는 것으로 보인다. 두 개의 서브패밀리에서의 차이는 쌍떡잎식물 중에서 제거되는 HKT 아이소형의 리텐션(retention)-게놈 복제(duplication) 및 그 후의 증폭 후에-을 의미하는 단자엽식물강(monocot)-특이적 표지 HKT2를 이용하여 진화적 거리를 반영한 것보다 기능적 특성의 차이가 거의 없는 것 같다. 우선적으로 K^+ -수송 단백질로 HKT2 가지를 이퀄라이징하는 것은 논의와 개정을 필요로 한다. 본 발명자들의 결과를 근거로 하여, 서열 다양성 및 기능적 특징은 이 두 개의 HKT 서브패밀리로 나눌 수 있는 방법과 관련되지 않은 것으로 보인다.

[0058]

정렬(alignment) 내의 TsHKT1;2 단백질 서열의 포함은 이 단백질들이 어떻게 작용하는지 이해하는데 유용하기만 한 것이 아닌 통찰력을 제공한다. 더욱이 본 발명자들의 결과는 전반적인 K^+ 항상성에 있어서 TsHKT1;2가 관련되어 있음을 증명한다. 염의 존재시 낮은 세포질 Na^+/K^+ 비율을 유지하는 툴룬지엘라 종의 능력은 이전에 밝혀졌다. 더욱 상세한 내용을 첨부하면, TsHKT1;2는 이 종에서 염분 저항성을 나타내는 계의 일부로서 부각되었다. Na^+/K^+ -공동 수송체로 작용하는 단백질의 설명(version)에 있어 K^+ 항상성을 책임지는 일부 HKTs는 염 또는 K^+ 결핍에 의해 유도되며, 반면에 다른 종의 발현은 염 스트레스 하에서 중단된다. TsHKT1;2의 아이소형인 TsHKT1;1의 발현은 염분에 의해 오직 근소하게만 변화되는 반면 염 스트레스는 TsHKT1;2를 양성적으로 조절하며(도 8), 반면에 AtHKT는 염에 의해 하향 조절되었다(도 2b). RNAi 라인 및 과발현에 의해 입증된 이 염-특이적 유도에 관한 본 발명자들의 분석은 염의 존재시 K^+ 의 획득에 있어서 TsHKT1;2의 주요한 역할을 제안한다. 세포에서 높은 Na^+ -함량은 K^+ -결핍을 초래하며, Na^+/K^+ 비율을 바꾸고, 이는 K^+ -수송체를 포함한다. SOS1 또는 이의 발현 수준에 대한 변이는 A. 탈리아나 및 염분 생장과 관련 있는 T.살수기니아에서 염 저항성을 감소시킨다.

[0059]

T.살수기니아 tssos1-4,(염에 민감한 TsSOS1의 RNAi 라인)는 TsHKT1;2의 강한 염-의존적 상향-조절을 보였으나(도 2a; 도 8), 반면에 AtHKT1 발현의 강한 억압은 염 스트레스 하에서 atsos1-1 식물에서 나타났다(도 2b). 이 반응은 두 개의 TsHKT 단백질간의 발현 및 활성화의 근본적인 차이를 강조한다. AtHKT1은 K^+ 에 대한 친화력이 없는 Na^+ -유니포터이다. 유사하게 HKT1-방해 아라비도시스 라인(athkt1-1, athkt1-3 및 athkt1-4)은 K^+ 결핍에 대한 민감성을 나타내지 않았다(도 5e). 역으로 RNAi에 의한 TsHKT 하향-조절은 K^+ 결핍 배지 상에서 염 스트레스 시 감소된 생중량, 작은 잎의 형성, 뿐만 아니라 뿌리 성장의 지연을 나타냈다(도 3). 본 발명의 결과는 K^+ 항상성 및 염 저항성에 있어서 TsHKT1;2의 필수적인 역할을 강조한다. A. 탈리아나 및 T. 살수기니아의 병치

(juxtapositioning)는 성장 및 번식 성공률을 결정하는 염 스트레스에 대한 행동의 주요한 결정요인으로서 높은 K^+/Na^+ 비율을 유지하는 활성에 있어 생화학적 차이뿐만 아니라 복제 수 변이-유전자 수 및 발현-을 시사하는 것 같다.

[0060] 염분 생장은 염 스트레스 존재시 K^+ 흡수가 유지될 수 있으면 낮은 세포질 $[Na^+]$ 를 유지함으로써 수분흡수 및 성장을 지지하는 세포의 삼투 퍼텐셜을 유지하지 위해 Na^+ 의 초과량을 이용한다. Na^+ 에 대한 TsHKT1;2의 낮은 친화력은 이 생리학적 메커니즘을 지지한다. 동일한 이유는 외부의 나트륨 이온이 증가할 때 AtHKT1- K^+ 에 대한 특이성을 결핍시키는-이 하향-조절되는 것을 필요로 한다(도 2b). 또한 AtHKT1은 TsHKT1;2와 대조적으로 CY162 (K^+ 수송 시스템에서 효모 스트레인 결핍) 세포를 보완하지 못했다(도 6e). 본 발명자들의 결과는 T. 살수기니아의 염분 생장적 행동에 대해 TsHKT1;2가 중요하게 관련되어 있음을 증명하며, 염분 스트레스 저항성에 대해 HKT의 중요성에 대하여 다른 종의 결과를 강하게 지지한다. TsSOS1의 염 스트레스 후에 강한 유도 및 활성을 나타내는 이전의 결과는 이 두 개의 이온 수송 시스템의 공동-진화가 염분 생장, 극한 생활방식을 나타내는 중요한 요소를 제공함을 암시한다.

[0061]

[0062] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0063] (실시예 1) 식물 재료

[0064] Colgl1 백그라운드에서 Col-gl1 (WT), athkt1-1, athkt1-3, athkt1-4 및 sos3-1의 아라비돕시스 묘목은 P.M. 하세가와 교수(퍼듀 대학교)에 의해 제공되었다. 툴룬지엘라 살수기니아 v162, 춘화처리 요구가 없는 라인은 형질전환 식물의 발달을 위해 사용되었다.

[0065] (실시예 2) TsHKT-RNAi 툴룬지엘라 및 아라비돕시스 식물의 생성

[0066] TsHKT-RNAi 컨스트럭트는 pGSA1285 벡터에서 PCR 증폭된 생성물의 제한/결찰을 통해 GUS(인트론으로서 사용됨)의 양쪽 말단에 앞뒤로 561 bps (131-692 bp) cDNA TsHKT 단편을 삽입시킴으로써 만들어졌다. 561 bp의 정방 및 역방 단편 증폭에 이용된 프라이머는 표 3에 나타났다. 이 컨스트럭트는 T. 살수기니아에서 모든 HKT 복사본을 침묵시켰다(silence). T. salsuginea line v162 식물은 TsHKT-RNAi 컨스트럭트를 지니는 아그로박테리움 서스펜션 세포를 이용하여 플로랄 딥(floral dip)에 의해 형질전환되었다. 형질전환된 식물은 BASTA에 의해 선별되었으며, 표 3에 기재된 프라이머를 이용하여 PCR에 의해 재-확인되었다. 4개의 별개의 동형접합 T3 라인이 실험에 사용되었다.

【표 3】

프라이머 목록

프라이머	서열	목적
RTPCR TsHKT(670F)	CCCACGAATGAGAACATGATCATCTTT	RT-PCR (도 2a, b 및 d)
RTPCR TsHKT(1015R)	CAACGATCCAACCAACTTCTCGTA	
RT-PCR-AthHKT1-F	ATGGAGAGAGTTGGGGCA	
RT-PCR-AthHKT1-R	TTATGAGGGAGGAC	
RTPCR ACT2(1349F)	AGAGAGGTTACATGTTTACCACAA	
RTPCR ACT2(1807R)	AAGCAAGATGGAACCAACCGAT	RNAi 형질전환체의 스크리닝
CaMVP1-1302	CCAACCACGCTCTCAAAGCAAGTG	
HKTRNAiCONR	AAGAGATCGCTGATGTTATCGGTG	RT-PCR (도 6a)
TsHKT1.2SEQ2	TATTCATGCCGTTGACCGTA	
TsHKT1.2-R	CTACGAAGATGAAGGATAAAG	
AthHKT1-R	GGAAGACGAGGGGTAAAG	
actin2F	CCTTGCTGGACGTGACCTTA	
actin2R	AACCAACGATCCAGACACTG	효모 컨스트럭트를 위한 클로닝
1300TsHKT1.2HAF	GATCGGATCCATGGAGAGAGTTGTGGAC	
TsHKT1.2-pYES2R	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGGAAGATGAAGGA TAAAG	
AthHKT1-pYESF	GATCGGATCCATGGACAGAGTGGTGGCA	
AthHKT1-pYES2R	ATAAGAATGCGGCCGCTCAGGAAGACGAGGGG TAAAG	
AthHKT1-pYESF	GATCGGATCCATGTCGATCTCTTGGACTCG	HKT 형질전환체 아라비도시스의 확인
AthHKT1-pYES2R	ATAAGAATGCGGCCGCTCAATTTGATGAAAA TAC	
CaMVP1-1302	CCAACCACGCTCTCAAAGCAAGTG	
TsHKT1.2R	CGAAGATGAAGGATAAAG	
AthHKT1R	CAGGAAGACGAGGGGTAAAG	
ThHKT(Ascl)	ATCGGCGCGCCAAGAACCACGTACGTC	RNAi 컨스트럭션
TsHKT(Swal)	ACTATTAAATAAGGAGCCAGAGAAGACCCGA	
TsHKT(BamHI)	ACTGGATCCATAAGGAGCCAGAGAAGACC	
TsHKT(SpeI)	GATACTAGTGCCAAGAACCACGTACGTC	
1300TsHKT1.2F 5	GATCGGATCCATGGAGAGAGTTGTGGAC	
TsHKT1.2-1300R	TCTAGACTACGAAGATGAAGGATAAAG	HKT 유전자의 클로닝
1300-AthHKT1F 5	GATCGGATCCATGGACAGAGTGGTGGCA	
AthHKT1-1300R	TCTAGACTAGGCCGCTCAGGAAGACGAGGGGT AAAG	
ACT2(1730F) Q-RT	CAAGCAGCATGAAGATTAAAGTCTGTT	
ACT2(1842R) Q-RT	CTTGGAGATCCACATCTGCTGGAAT	
TsHKT1.1(320F)QRT	CTTCTCCCATTTACCAAATTTGTCCTC	정량적 RT-PCR (도 8)
TsHKT1.1(450R)QRT	CTCATTGATCTGGCTTGGATCCACAG	
TsHKT1.2(314F)QRT	CTCTACTTCTCTCATTTTCACTTCAA	
TsHKT1.2(430R)QRT	GATCTGACTAGAAAGCTTGACATGATT	
TsHKT1.2-1F	TCTACGTTATCAAACGTGTGGATTGTCT	
TsHKT1.2-1R	GACAAATCCACAGTTTGATAACGTAGA	점 돌연변이체를 위한 클로닝 (도 7)
TsHKT1.2-2F	GTATTCATGGGAAACACTTTGTTTCCT	
TsHKT1.2-2R	AGGAAACAAAGTGTTCCTCATGAATAC	

[0067]

[0068]

TsHKT1.2 및 AthHKT1의 cDNA는 표 3에 기재된 프라이머로 RT-PCR에 의해 증폭되었다. 복제된 HKT cDNAs는 1300PT(Multi) 바이너리 벡터에 35S-CaMV 프로모터의 BamHI 및 XbaI 사이트 다운스트림 사이에 삽입되었으며, 야생형 Col-g11 및 athkt1-3는 플로랄 덩에 의해 형질전환되었다. 형질전환 식물은 히그로마이신 내성을 기초로 하여 선별되었으며, 표 3에 기재된 프라이머로 확인되었다. 히그로마이신에 대한 내성을 갖는 3:1 분리비를 나타내는 라인이 선별되었으며, 비슷한 수준의 TsHKT1.2 또는 AthHKT1 발현을 나타내는 동형접합성 T3 식물은 비교 실험으로 선별되었다.

[0069]

(실시예 3) 상이한 이온 조성물에 대한 성장 반응

[0070]

성숙한 식물의 NaCl에 대한 성장 반응을 테스트하기 위해서, 10일된 T. 살수기니아 형질전환 식물은 불활성 토양 ISOLITE "CG-1" (ISOLITE Insulating Products Co., 오사카, 일본)로 이동되었으며, 1/8 강도 Murashige and Skoog (MS) 배지 용액에 하루걸러 세척하며 한달 동안 성장시켰으며, 2주 동안 300 mM NaCl로 처리하였다. 다른 모든 시험관 내에서의 실험에 대해, A. 탈리아나 및 T. 살수기니아 식물이 발아되었으며, 1/2 MS 염 30 g/L Suc 및 12 g/L 한천 플레이트 상에서 각각 4일 및 10일 동안 배양되었으며, 이에 준하여 Na^+ 를 포함하거나 K^+ 이 결핍된 배지로 이동되었다. 자세한 배지 성분은 표 2 및 표 4에 나타내었다. HKT 발현 분석을 위해, A. 탈리아나 및 T. 살수기니아 식물이 성장되었으며, 염으로 처리되었으며, Oh et al. (2009) 기술된 바와 같이 수확되었다.

【표 4】

염 스트레스 처리에 대한 최소 배지*

1.	KH ₂ PO ₄	0.5 mM
2.	KNO ₃	1.25 mM
3.	MgSO ₄	0.5 mM
4.	FeNa-EDTA	20 μM
5.	H ₃ BO ₃	7 μM
6.	MnSO ₄	1.4 μM
7.	ZnSO ₄	1 μM
8.	KI	4.5 μM
9.	CuSO ₄	0.1 μM
10.	NaMoO ₄	0.2 μM
11.	CoCl ₂	10 nM
12.	NaCl	75 mM
13.	CaNO ₃	10 mM
Agar, 1.2%, NaOH로 pH 5.7		

* 다음으로부터 변형됨 :

Maser P, Eckelman B, Vaidyanathan R, Horie T, Fairbairn DJ, Kubo M, Yamagami M, Yamaguchi K, Nishimura M, Uozumi N (2002) Altered shoot/root Na⁺ distribution and bifurcating salt sensitivity in Arabidopsis by genetic disruption of the Na⁺ transporter AtHKT1. FEBS Lett 531: 157-161

[0071]

[0072]

(실시예 4) RNA 추출물 및 정량적 RT-PCR

[0073]

톨루지엘라 및 아라비도시스로부터의 RNA는 Qiagen RNeasy, 식물 미니 키트 (Qiagen, Maryland, U.S.A.)로 추출되었다. RT-PCR(역전사효소 폴리머라제 연쇄반응, polymerase chain reaction)이 표 3에 기재된 프라이머로 ThermoScript™ RT-PCR 시스템을 이용하여 전체 RNA 3 μg로 수행되었다. 정량적 RT-PCR(도 8)은 Gong et al에 기술된 바와 같이 기본적으로 작용한다.

[0074]

(실시예 5) 효모 발현 및 성장

[0075]

효모 스트레인 AXT3K (ena1::HIS3::ena4, _nha1::LEU2, _nhx1::KanMX4) 및 CY162 (Mat a, ura3-52,his3D200, his44-15, trkD1,trkD2::pcK64)가 사용되었다. 표 3에 기재된 바와 같이 프라이머로 증폭된 cDNAs는 pYES2 벡터(Invitrogen, 칼스바드, 미국)의 BamHI 및 NotI 사이트로 클로닝되었다. 효모 세포는 LiAc 방법으로 형질전환되었으며, -Ura S.D. 배지상에서 선별되었고, 지시한 대로 추가된 K⁺ 및 Na⁺가 있는 아르기닌 인산염 배지 상에서 성장되었다.

[0076]

(실시예 6) 이온 함량의 분석

[0077]

식물의 이온 함량 분석은 식물이라는 점만 제외하고는 Rus et al., 2001에 기술된 바와 같이 실시되었으며, 4주 동안 수경법으로 성장되었다. 샘플은 2일 동안 65℃에서 건조되었으며, 뿔은 조직 100 mg은 30분 동안 0.1 N HNO₃ 10 ml로 추출되었다. 샘플은 여과되었고 K⁺ 이온 함량 분석은 ICP-OES (Inductively coupled plasma optical emission spectroscopy, 유도결합플라즈마 발광광도법) OPTIMA 4300DV/5300DV (Perkin Elmer, Waltham, MA)로 수행되었다. 효모에서 이온 흡수 분석은 마이너 모디피케이션(minor modification)으로 Takahashi et al. (2007)에 의한 프로토콜을 따랐다. 간단하게 pYES2 (벡터 대조군), AtHKT1, TsHKT1;1, TsHKT1;2으로 형질전환된 효모(S. 세레비지에 스트레인 AXT3K)는 SD 배지(우라실이 없는 드롭아웃 배지)에서

0.7 (1.0×10^8 세포) OD₆₀₀까지 성장되었다. 세포는 2.0% 글루코즈, 10 mM MES을 지닌 10 ml AP 배지에서 현탁되었으며, 트리스 베이스(Tris base)로 pH 6.0으로 조절되며, KCl 및 NaCl의 지시된 농도로 보충되었다. 세포는 2시간 동안 배양되었으며, 5분 동안 1,250 rpm에서 수집되었고, 0.1 M HCl 10ml에서 하룻밤 동안 산-추출되었다. 샘플은 조직파편(debris)을 제거하기 위해서 5분 동안 5000 g에서 원심분리되었으며, 상청액의 이온 함량은 ICP-OES OPTIMA 4300DV/5300DV (Perkin Elmer)으로 측정되었다.

[0078] (실시예 7) TsHKT1;2의 자리지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)

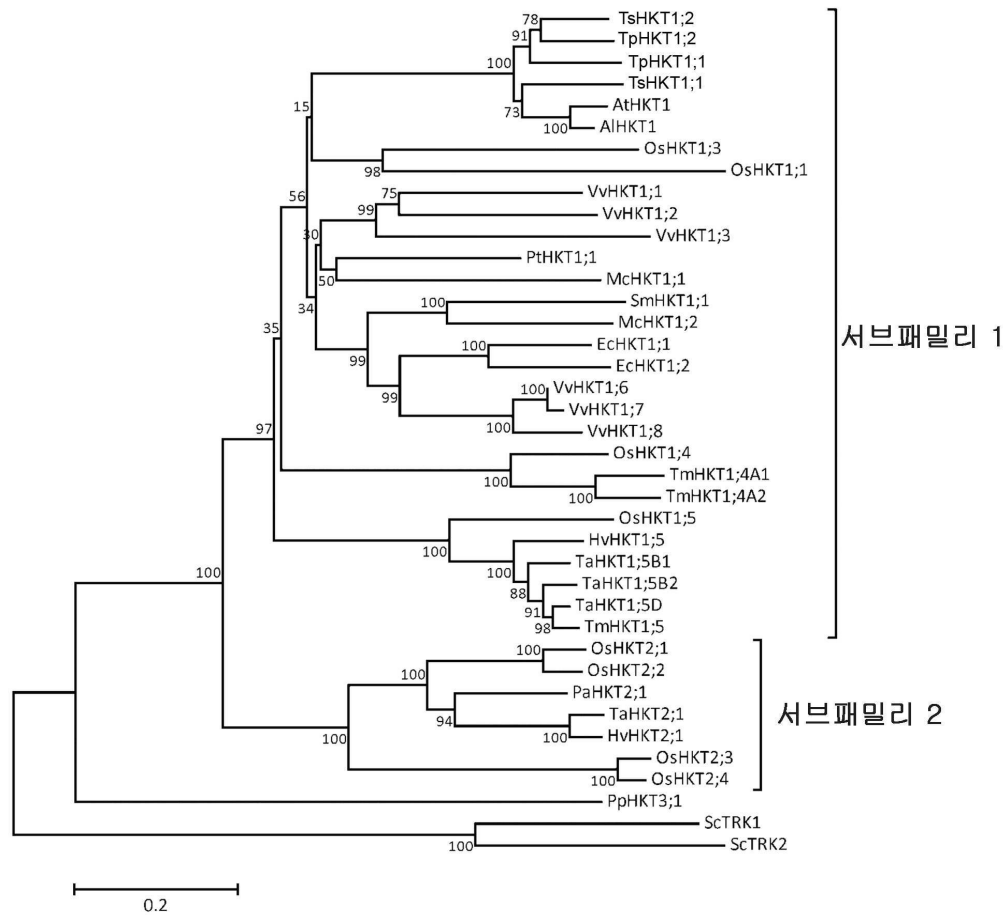
[0079] T. 살수기니아 HKT1;2에서 두 번째 포어 루프 영역(도 1a; PB)내의 두 개의 보존된 아미노산(아스파르트산, D) 및 인접한 막관통영역은 QuikChange® Site-Directed Mutagenesis 키트(Stratagene, La Jolla, CA)를 사용하여 변이되었다. 변화는 이 영역내의 A. 탈리아나 HKT1에서 발견된 아미노산 아스파라긴(N)을 도입하였다(도 1a; 도 11). 각각의 아미노산 변이(D207N, TsHKT1;2-1 및 D238N, TsHKT1;2-2)는 표 3에 기재된 이들 각각의 프라이머로 pYES2-TsHKT1;2 cDNA의 주형을 제조하였다. 모든 변이(D207N, D238N 이중 변이체 TsHKT1;2-1/2)를 제조하기 위해서 변이된 pYES2-TsHKT1;2-1가 TsHKT1;2-2를 위해 고안된 프라이머를 지닌 주형으로서 사용되었다.

도면

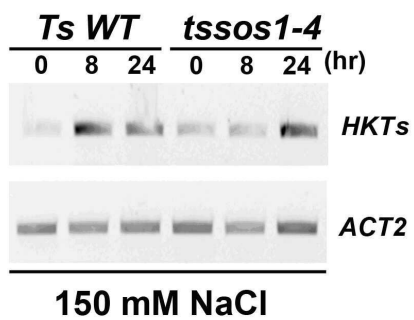
도면1a

ScTRK1	665	SPTWWGFWTAMSAFNDLGLTLTPNSMMSFNKAVYPLIVMIWFIIIGNTGFPILLRCIIWILHKIT	729
		SP + +TA+S +D G T +M+ F K L ++I + +G+T FP L IW + KI+	
TsHKT1;2	192	SPLTFSVFTAVSTLS [□] CGFVPTNENMIFRKNSGLLWLLIPQVFMG [□] TLFPCFLVLAIWGLHKIT	256
TpHKT1;2	190	SPLTFSIFTTVSTLS [□] CGFVPTNENMVIFRKNSGLLWLLIPQVFMG [□] TLFPCFLISLIWGLDKIT	254
TpHKT1;1	198	SPLTFSIFTTVSTFGNCGFVPTNENMAIFRKNSGLLWLLIPQVFMGNTLFPCLFLLIWGLDKIT	262
AIHKT1	191	SPLTFSVFTTVSTFANCGFVPTNENMIFRKNSGLIWLIPQVLMGNTLFPCLALLIWGLYKIT	255
AtHKT1	196	SPLTFSVFTTVSTFANCGFVPTNENMIFRKNSGLIWLIPQVLMGNTLFPCLVLLIWGLYKIT	260
TsHKT1;1	198	SPLTFSVFTAVSTFGNCGFVPTNENMIFRKNSGLLWLLIPQALMGNTLFPCLFLVLSGLDKIT	262
		*****:***:***:***** *****:*****:***:*****: ** **	
		P _B M2 _B	

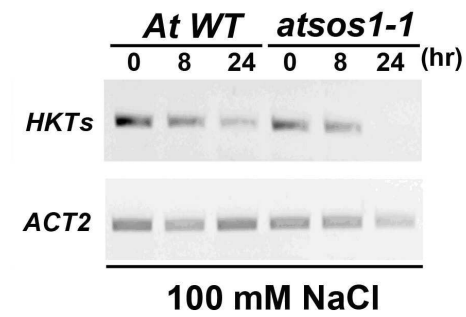
도면1b



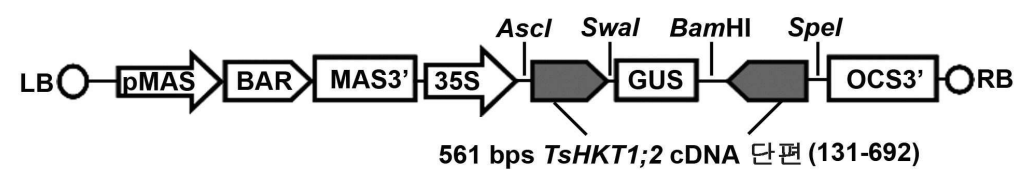
도면2a



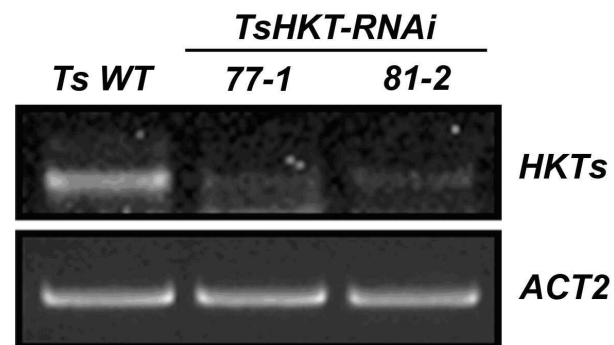
도면2b



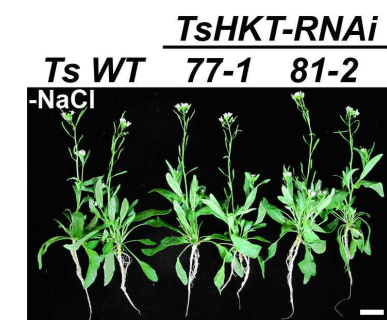
도면2c



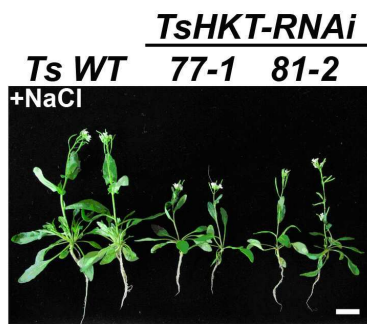
도면2d



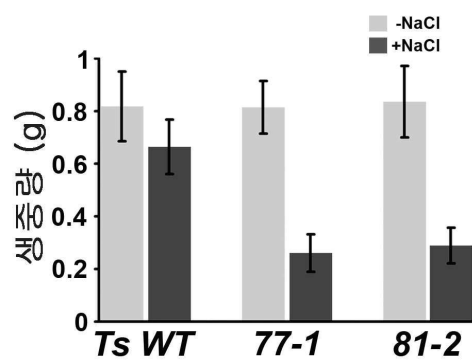
도면3a



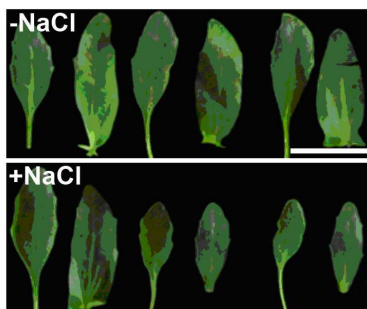
도면3b



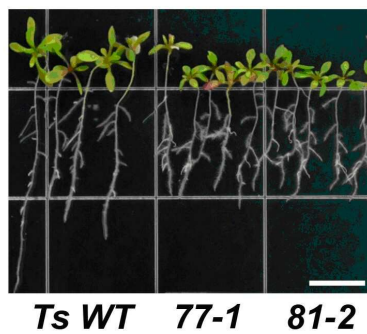
도면3c



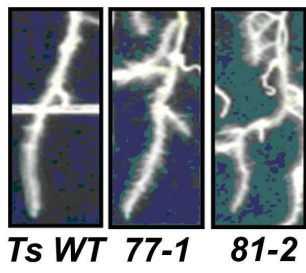
도면3d



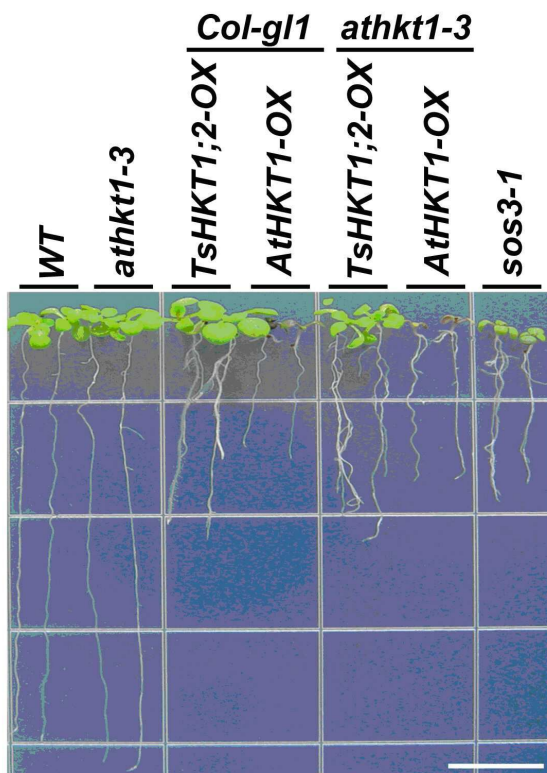
도면3e



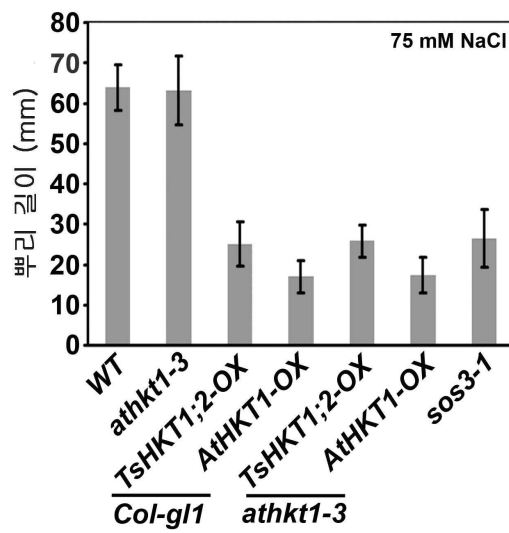
도면3f



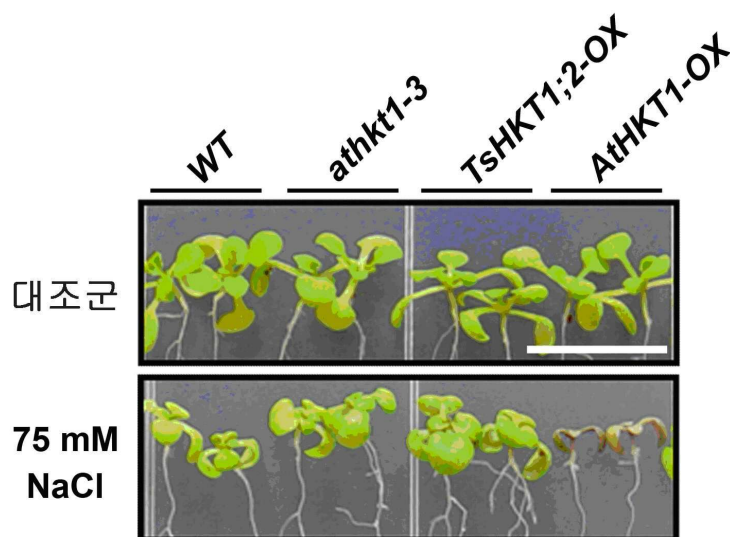
도면4a



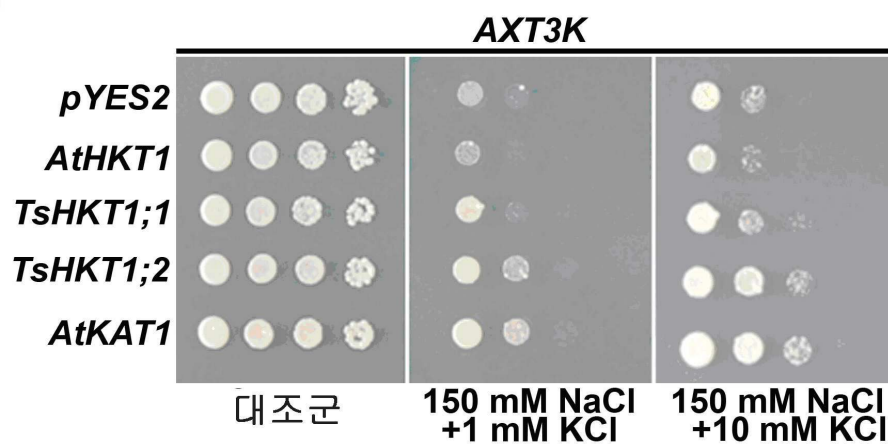
도면4b



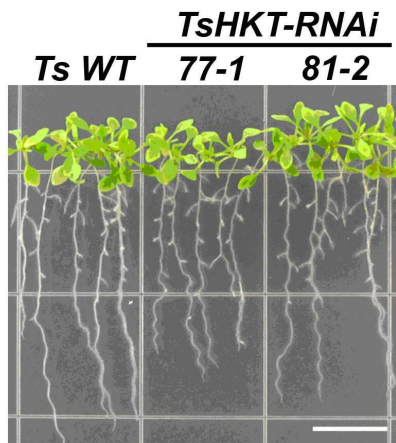
도면4c



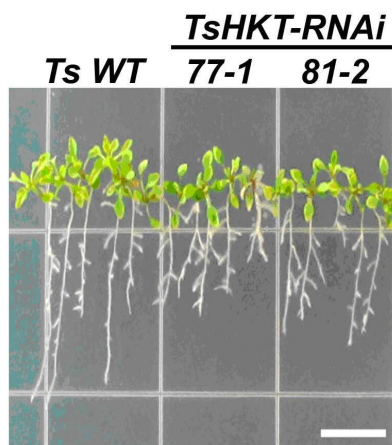
도면4d



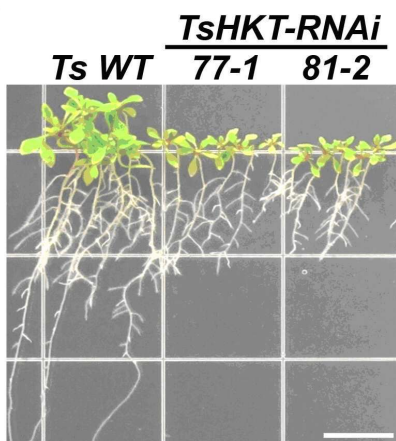
도면5a



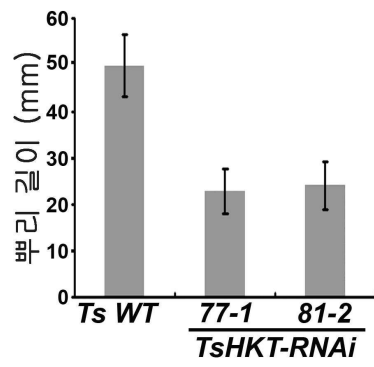
도면5b



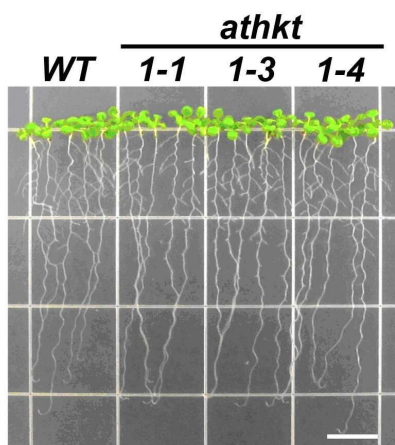
도면5c



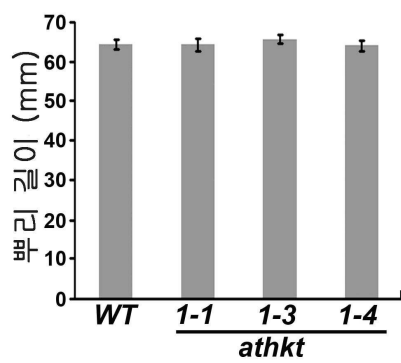
도면5d



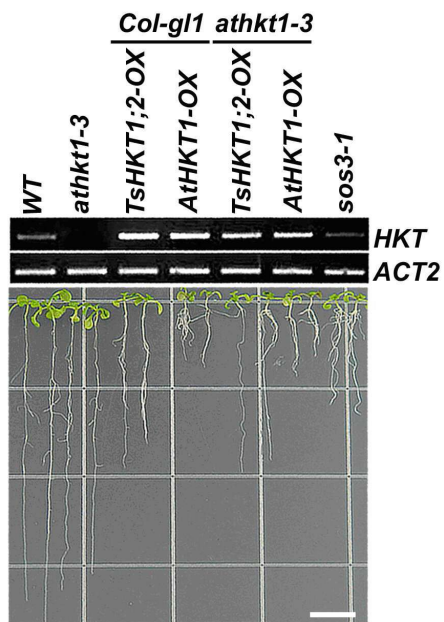
도면5e



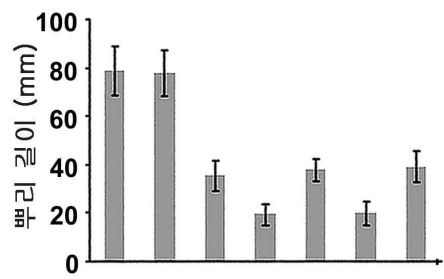
도면5f



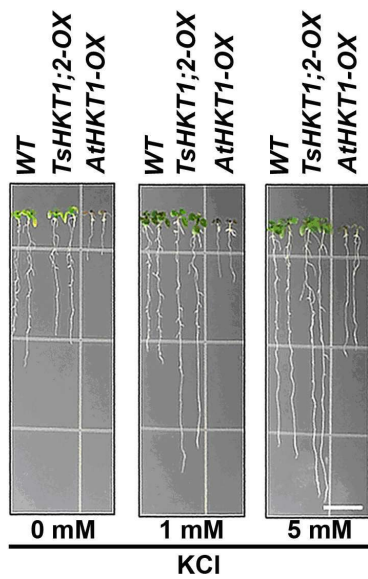
도면6a



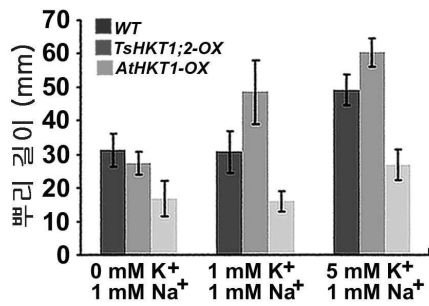
도면6b



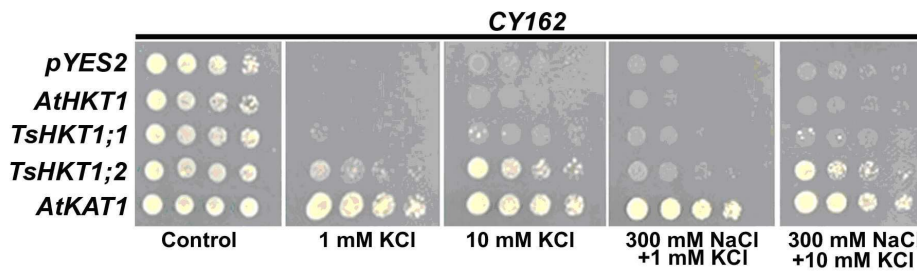
도면6c



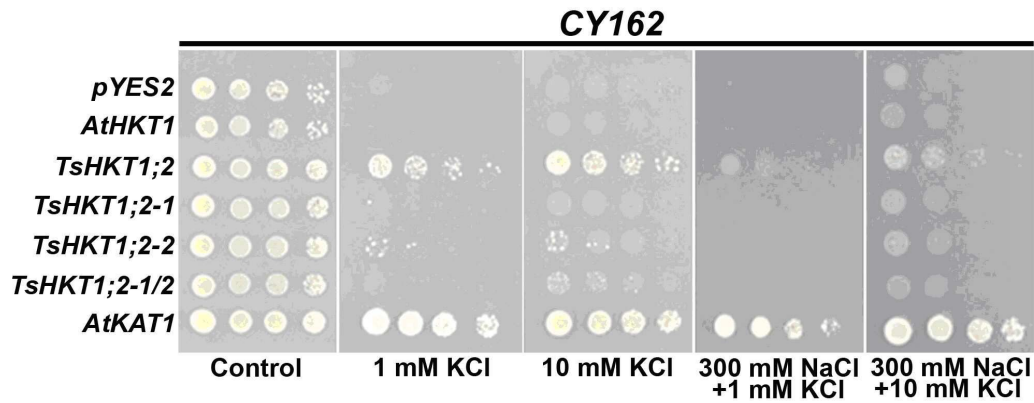
도면6d



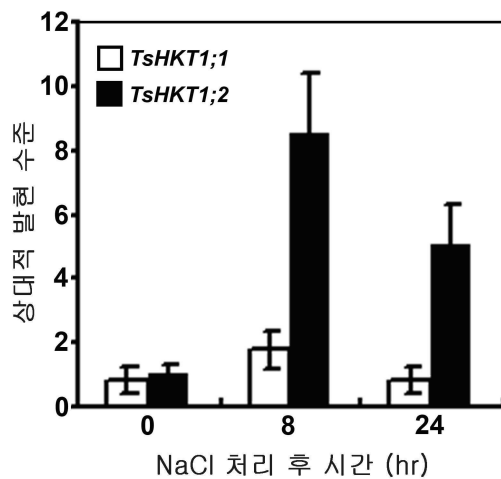
도면6e



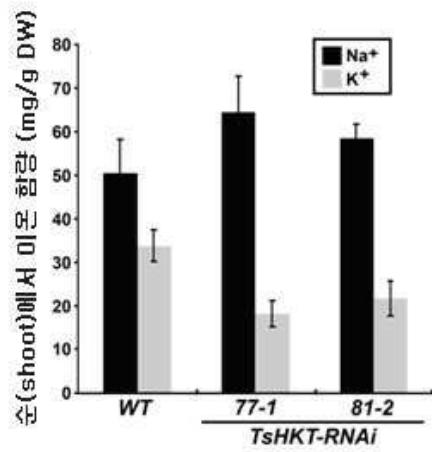
도면7



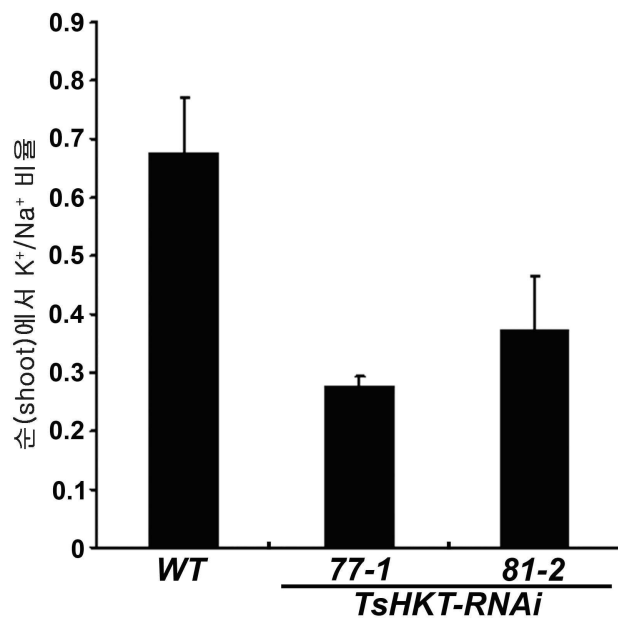
도면8



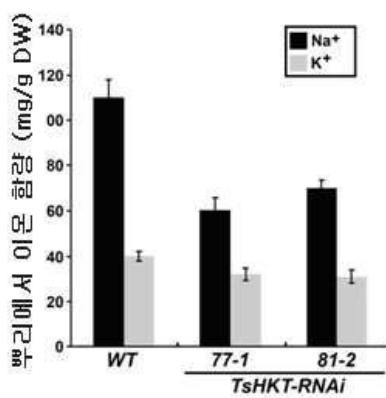
도면9a



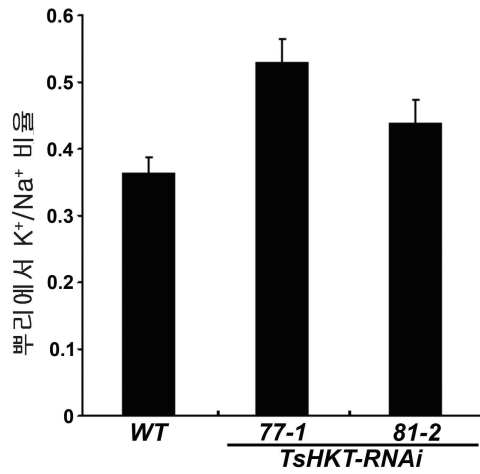
도면9b



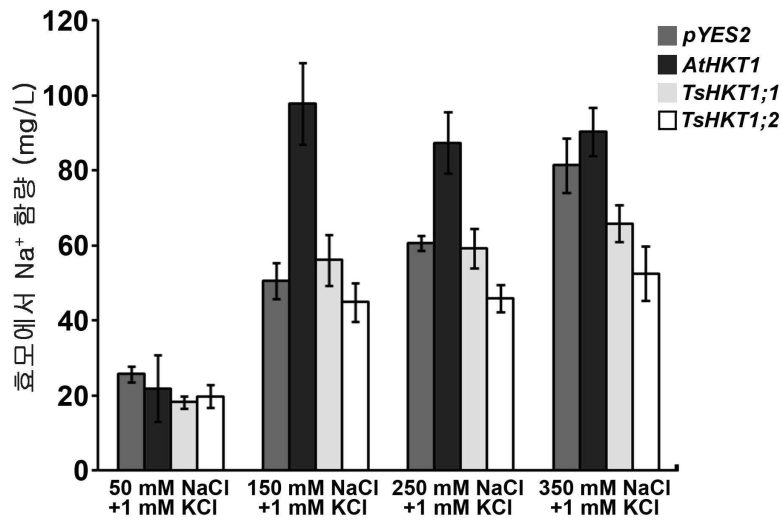
도면9c



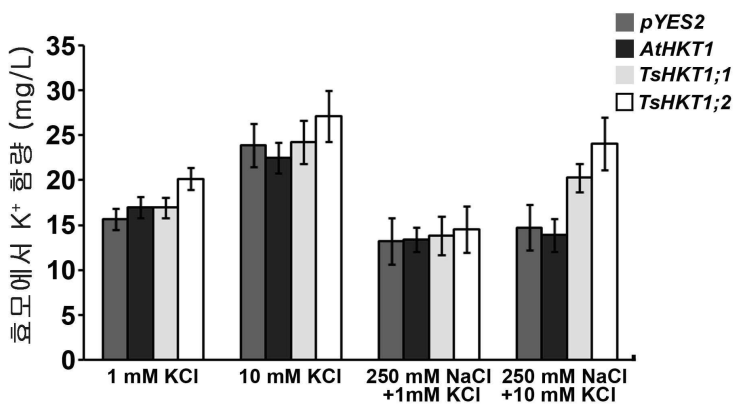
도면9d



도면10a



도면10b



<212> PRT

<213> Thellungiella Salsuginea

<400> 1

Met Glu Arg Val Val Asp Lys Leu Ala Lys Ile Phe Ser Gln His Ala

1 5 10 15

Lys Ser Leu Pro Leu Phe Phe Leu Tyr Phe Phe Tyr Phe Leu Phe Phe

20 25 30

Ser Phe Leu Gly Phe Leu Ala Leu Lys Ile Ser Lys Pro Arg Thr Thr

35 40 45

Ser Arg Pro His Asp Leu Asp Leu Phe Phe Thr Ser Val Ser Ala Ile

50 55 60

Thr Val Ser Ser Met Ser Thr Ile Asp Met Glu Val Phe Ser Asn Thr

65 70 75 80

Gln Leu Ile Ile Ile Thr Ile Leu Met Phe Leu Gly Gly Glu Ile Phe

85 90 95

Thr Ser Phe Val Asn Leu Tyr Phe Ser His Phe Ile Asn Phe Lys Ile

100 105 110

Lys His Leu Val Gly Ser Phe Asn Phe Asp Arg Pro Ile Asn Asp Pro

115 120 125

Gly Ser Asp Leu Glu Asn Val Thr Asn His Val Lys Leu Ser Ser Gln

130 135 140

Ile Asn Glu Arg Ala Ser Lys Cys Leu Tyr Ser Val Val Leu Gly Tyr

145 150 155 160

Leu Phe Val Thr Asn Ile Ala Gly Ser Thr Leu Leu Leu Leu Tyr Val

165 170 175

Asn Phe Val Lys Thr Ala Arg Asp Val Leu Ser Ser Lys Lys Ile Ser

180 185 190

Pro Leu Thr Phe Ser Val Phe Thr Ala Val Ser Thr Leu Ser Asp Cys

195 200 205

Gly Phe Val Pro Thr Asn Glu Asn Met Ile Ile Phe Arg Lys Asn Ser

210 215 220

Gly Leu Leu Trp Leu Leu Ile Pro Gln Val Phe Met Gly Asp Thr Leu

225 230 235 240
 Phe Pro Cys Phe Leu Val Leu Ala Ile Trp Gly Leu His Lys Ile Thr
 245 250 255
 Asn Arg Glu Glu Leu Gly Tyr Ile Leu Lys Asn His Lys Lys Met Gly
 260 265 270
 Tyr Ser His Leu Leu Ser Val Arg Leu Cys Val Leu Leu Ala Leu Thr
 275 280 285
 Val Leu Gly Leu Val Met Ile Gln Phe Leu Leu Phe Cys Thr Phe Glu
 290 295 300
 Trp Asn Ser Glu Ser Leu Glu Gly Met Asn Ser Tyr Glu Lys Leu Val

 305 310 315 320
 Gly Ser Leu Phe Gln Val Val Asn Ser Arg His Thr Gly Glu Thr Val
 325 330 335
 Val Asp Leu Ser Thr Leu Ser Pro Ala Ile Leu Val Leu Phe Ile Leu
 340 345 350
 Met Met Tyr Leu Pro Pro Tyr Thr Leu Phe Met Pro Leu Thr Val Glu
 355 360 365
 Lys Asn Lys Lys Glu Gly Glu His Asp Ser Gly Asp Glu Ile Lys Gly
 370 375 380

 Lys Lys Asn Gly Phe Tyr Val Ser Gln Leu Thr Phe Leu Ala Ile Cys
 385 390 395 400
 Ile Phe Leu Ile Ser Thr Thr Glu Ser Gln Lys Leu Arg Arg Asp Pro
 405 410 415
 Leu Asn Phe Asn Ile Leu Asn Ile Thr Phe Glu Val Ile Ser Ala Tyr
 420 425 430
 Gly Asn Val Gly Phe Thr Thr Gly Tyr Ser Cys Glu Arg Arg Leu Asp
 435 440 445
 Ile Ser Asp Gly Ser Cys Lys Asp Ala Ser Tyr Gly Phe Ala Gly Arg

 450 455 460
 Trp Ser Pro Val Gly Lys Phe Ile Leu Ile Ile Val Met Phe Tyr Gly
 465 470 475 480

Lys Phe Lys Gln Phe Ser Ala Lys Ser Gly Arg Ala Trp Ile Leu Tyr
 485 490 495
 Pro Ser Ser Ser
 500