(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0090349
(43) 공개일자 2011년08월10일

(51) Int. Cl.
A01H 1/00 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0010070
(22) 출원일자 2010년02월03일
심사청구일자 2010년02월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이호정
서울특별시 강남구 대치동 900-33번지 401호
권예림
서울특별시 동대문구 제기동 벽산아파트 103동 1502호
(74) 대리인
구현서

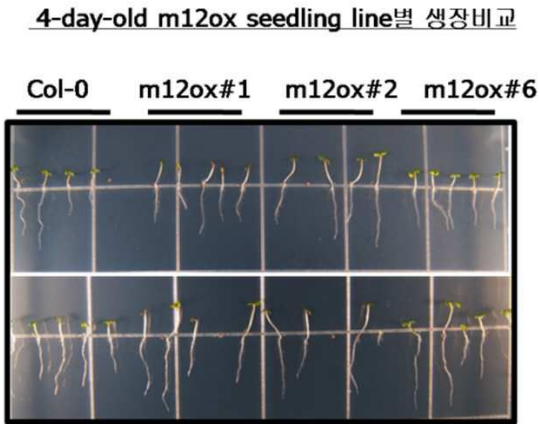
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 식물성장 촉진용 유전자 및 그 유전자를 포함하는 형질전환 식물

(57) 요 약

본 발명은 At5g47390 유전자, 그 유전자를 포함하는 벡터, 그 벡터를 포함하는 형질전환 식물체 및 그 유전자를 과발현시켜서 식물 성장을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20090065693
부처명 한국학술진흥재단
연구관리전문기관
연구사업명 (이공)일반연구자지원-여성과학자
연구과제명 Myb 등 전사조절자의 과발현체를 이용한 능동적 식물이차대사 조절 기전 연구
기여율
주관기관 한국연구재단
연구기간 2009년 05월 01일 ~ 2010년 04월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

At5g47390 유전자를 과발현시켜서 식물 성장을 증가시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 At5g47390 유전자는 서열번호 1에 기재된 핵산 서열을 가지는 식물 성장을 증가시키는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 식물은 암 조건 하에 있는 것을 특징으로 하는 식물 성장을 증가시키는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 유전자는 아라비돕시스 탈리아나로부터 기원하는 식물 성장을 증가시키는 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 식물은 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물인 식물 성장을 증가시키는 방법.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 유전자는 배축(hypocotyl) 조직 특이적 발현성을 가지고 있는 것을 특징으로 하는 식물 성장을 증가시키는 방법.

청구항 7

식물 성장 관련 유전자의 발현을 촉진시킬 수 있는 하나 이상의 조절 유전자에 작동적으로 연결된 At5g47390 유전자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 식물성장 촉진용 발현벡터.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 At5g47390 유전자는 서열번호 1에 기재된 핵산 서열을 가지는 식물 성장 촉진용 발현벡터.

청구항 9

제 7항 또는 제 8항에 있어서, 상기 발현벡터는 도 7의 개열지도를 가지는 것을 특징으로 하는 식물 성장 촉진용 발현벡터.

청구항 10

(a) 식물 또는 식물 세포 내로 제 7항 또는 제 8항에 따른 발현벡터를 도입시키는 단계; 및

(b) 상기 발현벡터를 포함하는 식물 또는 식물 세포를 식물 성장을 촉진하는 조건하에 배양하는 단계를 포함하는 식물 성장 촉진용 형질전환(transgenic) 식물을 제조하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 식물 또는 식물 세포는 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물인 식물로부터 기원하는 식물 성장 촉진용 형질전환(transgenic) 식물을 제조하는 방법.

청구항 12

제 7항 또는 제 8항의 발현벡터를 포함하고, 상응하는 야생형 식물과 비교하여 식물 성장이 증가되어 있는 형질전환 식물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 식물 또는 식물 세포는 단자엽식물 또는 쌍자엽 식물인 식물로부터 기원하는 형질전환 식물.

청구항 14

제 12항 또는 제 13항에 있어서, 상기 식물은 전체 식물, 식물 기관, 종자, 식물 세포 또는 이의 자손인 형질전환 식물.

청구항 15

제 14항에 있어서, 식물 기관은 줄기 또는 뿌리인 형질전환 식물.

청구항 16

제 14항에 있어서, 상기 식물 세포는 조직 배양 세포인 형질전환 식물.

청구항 17

서열번호 4의 At5g47390 유전자의 프로모터를 암처리하여 활성화시키는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 At5g47390 유전자, 그 유전자를 포함하는 벡터, 그 벡터를 포함하는 형질전환 식물체 및 그 유전자를 과발현시켜서 식물 성장을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세계 인구의 증가에 따른 식량문제는 우리가 풀어나가야 할 중요한 과제이다. 인류의 식량난을 해결하기 위해 신품종 육종법 등을 통한 다각적인 노력을 하였으나 그 대책을 찾지 못하다가, 최근 생명공학기술을 이용한 유전자변형작물의 개발이 식량난이 해결을 위한 핵심기술로써 기대되고 있다.

[0003] 유전자변형 기술을 이용하여 제초제 저항성, 병해충 저항성, 높은 당도, 과즙영양분 다량 함유, 성장 속도 조절, 유해물질 내성, 환경저항성, 유용미생물 등의 유전자를 주입하여 초다수성 농작물, 저온 건조 염해 등의 불량환경이나 병충해에 강한 농작물 개발 등을 통한 생산력의 비약적 향상에 기여할 수 있으며, 영양성분이나 기능성 성분(항암 효과 등)이 많은 농작물, 알러지 원인 물질을 제거한 농작물을 생산함으로써 식량증산에 결정적으로 기여할 수 있는 가능성도 보여 주었다.

[0004] 새로운 식물 종의 개발에 의해 작물 수율을 개선시키기 위한 노력은 2가지 시도로 나누어질 수 있다. 하나는 가뭄, 냉해 또는 염과 같은 비생물적 스트레스 조건, 또는 해충 또는 질병-유발 병원체로부터 초래되는 생물적 스트레스 조건에 대한 내성이 증가된 작물 변종을 육종시키거나 또는 가공함으로써 작물 수율 손실을 감소시키는 것이다. 그러나 이러한 시도가 가치가 있다고 해도, 이는 스트레스 조건의 부재하에서 근본적으로 향상된 작물 수율을 제공하지 않는다.

[0005] 다른 두 번째 시도는 기본 수율 능력이 증가된 새로운 작물 변종을 육종시키거나 또는 가공하는 것이다. 전통적인 육종 프로그램은 초기에 변종 작물에서 향상된 수율에 있어서의 실질적인 획득을 달성하였다. 일반적으로 경험된 패턴은 초기에 수율에 있어서의 실질적인 획득에 이어 증가된 추가의 향상을 수반하는데, 이러한 향상은 보다 적어지거나 또는 획득하기가 더욱 어려워진다.

[0006] 분자 생물학 기술을 바탕으로 하는 보다 최근에 개발된 시도는 기본적으로 식물 성장 및/또는 발달에 있어서 중요한 역할을 하는 식물 유전자의 발현의 시기, 위치 또는 수준을 변경시킴으로써 작물 수율의 실질적인 향상을 달성하기 위한 잠재능을 제공한다. 식물 성장 및/또는 발달에 있어 역할을 담당하는 식물 유전자를 확인하는데 있어 실질적인 진전이 과거 20년에 걸쳐 이루어졌다. 식물 성장 조절이 궁극적으로 수율 특성과 어떻게 관련되어 있는가에 대한 복잡성 때문에, 이들 유전자 중 어떠한 것이 작물 수율을 향상시키기 위한 명백한 후보물이

될 수 있는지에 대해서는 여전히 명백하지 않다.

[0007] 성장 및/또는 발달 기능을 가진 식물 유전자를 확인하기 위해 수행된 많은 작업은 모델 식물 시스템인 아라비돕시스 탈리아나(Arabidopsis thaliana)에서 수행되었다. 레볼루타(REVOLUTA)(REV)라고 불리는 이러한 유전자 중 하나는 근본적으로 rev1으로 불리는 아라비돕시스에서 기능-상실 돌연변이인 것으로 최초로 확인되었다(참조: Talbert et al., Development 121 :2723-2735, 1995). 당해 돌연변이는 식물 성장 및 형태학에 있어서 다면발현성 효과를 지녔다. 관심대상인 rev1 돌연변이 중 하나의 표현형은 현저히 보다 큰 종자였다. 이러한 표현형은 농업적으로 매우 강력하게 요망되었으나, 불행하게도, 꽃 및 종자의 수의 감소, 수정불능, 및 변형된 잎 형태와 같은 바람직하지 않은 특성을 동반하였다. rev1 돌연변이체는 보다 큰 종자 외에, 보다 큰 잎, 줄기 및 꽃을 나타낸다.

[0008] REV 유전자는 맵(map)을 근거로 한 클로닝 시도(WO 01/33944호에 기술)에 의해 확인되어 전사 인자의 홈 도메인-루이신 지퍼(home domain-leucine zipper: HD-ZIP) 계열에 속하는 전사 인자인 것으로 입증되었다. 식물에서, HD-Zip 유전자는 관 조직 발달, 모상체 및 뿌리털 발달 및 빛-조절된 반응을 포함하는 많은 발달 경로에 관여한다. rev1은 기능 상실 돌연변이인 것으로 여겨지므로, 역전된 반복 REV(REV-IR) 작제물을 발현시킴에 의해 또는 REV 유전자의 강력한 과발현에 의해 야기되는 공-억제를 통해 유전자전이(transgenic) 아라비돕시스에서 REV 기능을 녹 아웃(knock-out)하기 위한 노력이 이루어졌다(참조: WO 01/33944).

[0009] 식물 전체에 걸친 REV 전이유전자의 강력한 구성적 발현은 rev1 돌연변이체의 거대 종자 표현형을 나타내지만, 이는 또한 rev1 돌연변이체를 사용하여 관측되는 바람직하지 않은 표현형을 복제한다. REV 전이유전자의 구성적 과발현의 기술적으로 직접적인 시도에 의해 보다 큰 종자 크기 표현형을 수득하기 위한 능력이 촉망된다고 해도, 바람직하지 않은 표현형은, 이러한 시도가 농업의 상업적 적용을 위해 실용적이지 않을 수 있음을 의미한다.

[0010] 다수의 식물 유전자가 과발현 또는 제어 분석에 의해 성장 및/또는 발달에서 역할을 담당하는 것으로 밝혀졌다.

[0011] 성장 및/또는 발달에 관여된 것으로 알려져 있는 일부의 예를 기재하면 하기와 같다. 아라비돕시스 CAP 유전자는 Ras-cAMP 시그날전달 및 액틴 세포골격의 조절에 관여하는 사이클라제-관련 단백질을 암호화한다. 글루코코르티코이드-유도성 프로모터 하에서 CAP의 과발현은 내피 및 엽육 세포의 감소된 연장으로 인하여 잎 크기의 감소 및 액틴 필라멘트의 손실을 유발한다(참조: Barrero et al., Annals of Botany 91:599-603, 2003). 면화에서 슈크로즈 신타제 유전자 발현의 제어는 감소된 세포 섬유 길이 및 보다 작고 적은 섬유 세포를 초래한다(참조: Yong-Ling Ruan et al., Plant Cell 15:952-964, 2003). 유전자전이 벼에서 ABA-유도성 프로모터를 사용한 벼 히스톤 데아세틸라제 1 유전자의 과발현은, 야생형과 비교하여 성장 속도, 비정상적인 싹 및 뿌리 조직 발달이 증가된 식물을 생성한다(참조: In-Cheol Jang et al., Plant J. 33:531-541, 2003). 아라비돕시스에서 RNAi에 의한 E2Fc의 제어는 잎, 분열조직 및 주변조직(pericycle) 세포에서 증식 활성을 증가시킨다. 기관 내 세포는 야생형보다 더 작지만 보다 다수이고 잎에서 배수성 수준이 감소되었다(참조: del Pozo et al., Plant Cell 18:2224-2235,2006). RNAi에 의한 BKI 유전자의 제어는 배축 길이가 증가된 묘목을 초래하며 BKI의 과발현은 난장이 식물을 가져온다(참조: Xuelu and Chory, Science 313:1118-1122, 2006). 부분적으로 구성적인 스테로이드 수용체 BRI1을 발현하는 유전자전이 식물은 보다 긴 배축을 지닌다(참조: Wang et al., Dev. Cell 8:855-865, 2005).

[0012] 아라비돕시스에서 아르고스-유사(ARL)의 제어는 보다 작은 떡잎, 잎 및 다른 측 기관을 가져오는 반면, 과발현은 반대 효과를 제공한다. 기관 크기에 있어서의 변화는 세포 수보다는 세포 크기에 기여할 수 있다(참조: Hu et al., Plant J. 47:1-9, 2006). 변경된 성장 및/또는 발달 표현형을 초래하는 돌연변이를 갖는 식물의 분석으로 식물 성장 및 발달에서 역할을 담당하는 다수의 유전자가 확인되었다. 브라시노스테로이드 호르몬 인식에 영향을 미치는 돌연변이, bril-5는 난장이 식물을 생성한다(참조: Wang et al., Dev. Cell 8:855-865, 2005). 아실-아실 캐리어 단백질 티오에스테라제를 암호화하는 아라비돕시스 FATB 유전자에서 T-DNA 삽입(녹-아웃)은 감소된 성장 속도, 감소된 신선 중량 및 낮은 종자 생존성을 초래한다(참조: Bonaventure et al., Plant Cell 15:1020-1033, 2003). 추정의 항-포스파타제에서 기능-상실 돌연변이인 페피노는 싹 끝의 분열조직에서 종양-유사 세포 증식을 나타내고 잉여의 비정상적인 잎을 생산한다(참조: Haberer et al., Dev. Genes Evol. 212:542-550, 2002). 아라비돕시스 RGS 유전자(G-단백질-시그날전달의 조절인자)는 G-단백질-커플링된 수용체(GPCR)의 구조를 가지며 RGS 박스를 함유한다. RGS 단백질은 Gα 소단위의 탈활성화를 가속화시킴으로써 GPCR 시그날전달을 감소시킨다. 널(null) rgs 돌연변이는 암실에서 성장한 배축에서 증가된 세포 연장 및 광실에서 성장한 뿌리에서 증가된 세포 생산을 갖는다(참조: Chen et al , Science 301 :1728- 1731 , 2003). 아라비돕시스 TIP1 유

전자는 뿌리털 발달 및 또한 세포 성장에 있어서 역할을 담당한다. tip1-2 돌연변이체는 보다 작은 장미꽃, 감소된 높이 및 보다 짧은 마디 사이(internode)를 갖는다(참조: Ryan et al., New Phytol. 138:49-58, 1998 and Hemsley et al., Plant Cell 17:2554-2563, 2005). 빅 브러더 mRNA를 거의 제공하지 않거나 또는 전혀 제공하지 않는 빅 브러더(BB) 유전자의 돌연변이체(염색체 재배열 또는 T-DNA 삽입)는 보다 큰 꽃 기관, 보다 많은 꽃 생물량 및 보다 두꺼운 줄기로 발달한다. 역으로, 빅 브러더의 과발현은 보다 작은 꽃 기관, 거의 없는 꽃 생물량, 보다 얇은 줄기를 초래하고 잎 크기를 감소시킨다. BB는 세포 수를 변경시킬 수 있다(참조: Disch et al., Curr. Biol. 16:272-279,2006). RHD2 유전자는 근모에서 반응성-산소 종의 축적 및 칼슘 채널의 후속적인 활성화에 중요한 NADPH 옥시다제를 암호화한다. rhd2 돌연변이는 뿌리의 끝 성장 세포의 세포 확장이 결여되어 있다(참조: Foreman et al., Nature 422:442-446, 2003). 옥수수에서 소형 돌연변이는 INCW2 유전자로부터 발현된 세포 벽 인버타제에 있어서의 손실을 유발한다. mn1 돌연변이체의 세포는 야생형보다 훨씬 작고 nm1 종자 돌연변이체는 단지 20%의 내배유 중량의 야생형 종자를 갖는다. 확장은 mn1 내배유의 말초 층의 세포내에서 절충될 수 있으며 이들 세포의 유사분열 활성을 감소시킬 수 있다(참조: Vilhar et al., Plant Physiol. 129: 23-30, 2002). WAK2의 T-DNA 삽입 돌연변이, wak2-1는 뿌리에서 감소된 세포 연장을 갖는다. WAK2는 공포(vacuolar) 인버타제 활성의 조절을 통해 세포 확장을 조절할 수 있다. 식물에서 WAK2 또는 WAK4의 유도성 안티센스의 발현은 세포 연장을 방지하고 난장이 식물을 생산한다(참조: Wagner and Kohorn, Plant Cell 13:303-318, 2001, Lally et al., Plant Cell 13:1317-1331, 2001, 및 Kohorn et al., Plant J. 46:307-316, 2006). 아라비돕시스 유전자 AP2는 꽃 기관 동일성 및 꽃 분열조직 동일성의 확립에 있어 역할을 담당한다. AP2에서 기능-상실 돌연변이는 야생형과 비교하여 종자 질량을 증가시킨다(참조: Masa- Ohto et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 102:3123-3128, 2005). teb 돌연변이체는 짧은 뿌리, 톱니모양의 잎 및 결속을 갖는다. 이들은 G2/M 세포 주기 진행에 있어서의 결함으로 유발될 수 있는 세포 분열에 있어서 결함을 나타낸다(참조: Inagaki et al., Plant Cell 18:879-892, 2006).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고, 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 식물 성장 및/또는 발달에 관여하는 유전자를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 이용한 식물 성장 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 형질전환식물 생산 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 식물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 At5g47390 유전자를 과발현시켜서 식물 성장을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0018] 본 명세서에 사용된 "식물 성장 유전자"는 조직 일체성 및 형태학을 결정하는 식물 발달프로그램에서 역할을 담당하거나, 또는 식물의 성장 속도, 전체 크기, 조직 크기 또는 조직 수를 결정하는데 있어서 역할을 담당하는 유전자이다. 이러한 성장 및 발달 관련 유전자는, 돌연변이, 과발현 또는 발현의 억제에 의해 자체 기능의 변형이 변형된 식물 성장 속도, 전체 식물 크기, 조직 크기 또는 수 또는, 변형된 발달을 초래하는 경우 확인된다. 식물 및 성장 관련 유전자는 다수의 메카니즘을 통해 자체 효과를 발휘할 수 있으며, 이러한 메카니즘의 일부는 세포 주기의 조절, 식물 호르몬 합성/파괴 경로, 식물 호르몬에 대한 민감성, 세포벽 생합성, 세포 동일성 측정 등을 포함한다.

[0019] 본 발명에서 사용된 용어 "성장 유전자" 또는 "성장 형질전환유전자"는 본원에서 뉴클레오타이드의 발현 및/또는 생산을 암호화하거나 또는 촉진시키는 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 따라서, 용어 "성장 유전자" 또는 "성장 형질전환 유전자"는 뉴클레오타이드 및/또는 단백질 암호화 서열을 플랭킹하는 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 서열은 단백질 암호화 서열(엑손), 중재 서열(인트론), 유전자의 정상 발현에 요구되는 서열(예를 들면, 각각 프로모터 및 폴리A 추가 영역, 및 어떠한 인핸서 서열)을 함유하는 플랭킹된 5' 및 3' DNA 영역인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 구체예에서, 사용된 At5g47390 유전자 서열은 아리비돕

[0021] 시스 탈리아나로부터의 것이지만, 관심대상의 다른 종으로부터의 At5g47390 유전자또는 유사 유전자도 또한 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 At5g47390 유전자는 서열번호 1에 기재된 핵산 서열과 실질적 동일성을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0023] 본 발명에서 폴리뉴클레오타이드 서열의 "실질적인 동일성"이란 용어는 폴리뉴클레오타이드가 표준 매개변수를 사용하여 하기 기술한 프로그램을 사용하여 참조 서열과 비교할 때 60% 이상의 서열 동일성, 통상적으로 70% 이상, 보다 통상 적으로 80% 이상 및 가장 바람직하게는 90% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함함을 의미한다. 당해 분야의 숙련가는, 이들 값이 코돈 축퇴성, 아미노산 유사성, 판독 프레임 위치화 등을 고려하여 2개의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 단백질의 상응하는 동일성을 측정하도록 적절히 조절할 수 있음을 인지할 것이다.

[0024] 서열 동일성 퍼센트 및 서열 유사성을 측정하는데 적합한 알고리즘의 예는 문헌(참조: Altschul et al.,J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)에 기술된 BLAST 알고리즘이다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생물학 정보 센터(National Center for Biotechnology Information)의 웹 사이트를 통해 이용가능하다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 유전자 발현은 프로모터 조절 하에 있는 것이 바람직하다.

[0026] 본 발명의 기술된 방법을 사용하여 식물 성장 관련 유전자에 작동적으로 연결시켜 발현시키기에 적합한 프로모터는 형질전환될 식물의 동일한 종으로부터 또는 이종으로부터의 것을 사용할 수 있다. 또한, 프로모터는 사용될 본 발명의 유전자에 대해 동일한 종으로부터 기원할 수 있거나, 또는 이종으로부터 기원할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 프로모터는 또한 하나 이상의 하기에서 기술한 것과 공통되는 발현 프로파일을 갖는 프로모터의 조합을 포함할 수 있는 키메라 프로모터를 포함할 수 있다.

[0027] 식물 게놈 DNA에서 프로모터 영역을 확인하고 특성화하는 방법은 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있으며, 예를 들면, 문헌[참조: Jordano et al , Plant Cell 1 :855-866, 1989; Bustos et al., Plant Cell 1 :839-854, 1989; Green et al., EMBO J. 7:4035- 4044, 1988; Meier et al., Plant Cell 3:309-316, 1991; 및 Zhang et al., Plant Physiol. 110:1069-1079, 1996]에 기술되어 있다.

[0028] 이러한 프로모터 서열의 예는 아미노산 퍼미아제 유전자에 대한 프로모터(AAP1)(예: 아라비돕시스 탈리아나로부터의 AAP1 프로모터)(참조: Hirner et al., Plant J. 14:535-544,1998), 올레이트 12-하이드록실라제:데사투라제 유전자에 대한 프로모터(예: 레스쿠에렐라 펜들레리로부터LFAH12로 지명된 프로모터)(참조: Broun et al., Plant J. 13:201-210, 1998), 2S2 알부민 유전자에 대한 프로모터(예: 아라비돕시스 탈리아나로부터의 2S2 프로모터)(참조: Guerche et al., Plant cell 2:469-478, 1990),지방산 엘롱가제 유전자 프로모터(FAE1)(예: 아라비돕시스 탈리아나로부터의 FAE1 프로모터)(참조: Rossak et al., Plant Mol. Biol. 46:717-715, 2001), 및 리피 코틸레돈 유전자 프로모터(LEC2)(예: 아라비돕시스 탈리아나로부터의 LEC2 프로모터)(참조: Kroj et al Development 130:6065-6073, 2003)를 포함한다. 또한, 본 발명의 일 실시예에서 사용된 CaMv(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터도 포함될 수 있다.

[0029] 또한 본 발명은 식물 성장 관련 유전자의 발현을 촉진시킬 수 있는 하나 이상의 조절 유전자에 작동적으로 연결된 At5g47390 유전자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 식물성장 촉진용 발현벡터을 제공한다.

[0030] 본 발명에서 "벡터" 또는 "발현벡터"는 외부 DNA에 이를 삽입시킬 수 있는 통상적으로 이본쇄인 DNA 가닥을 말한다. 벡터 또는 레플리콘은 예를 들면, 플라스미드 또는 바이러스 기원일 수 있다. 벡터는 숙주 세포내에서 벡터의 자가 복제를 촉진시키는 "레플리콘" 폴리뉴클레오타이드 서열을 함유한다. 당해 기술과 관련하여 용어 "레플리콘"은 또한 숙주 염색체내로 벡터 서열의 재조합을 표적화하거나 또는 그밖의 촉진시키는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0031] 또한, 비록 외부 DNA가 초기에 예를 들면, DNA 바이러스 벡터 내로 삽입될 수 있다고 해도, 바이러스 벡터 DNA의 숙주 세포 내로의 형질전환은 바이러스 DNA의 바이러스 RNA 벡터 분자 내로의 전환을 초래할 수 있다. 외부 DNA는 이종 DNA로 정의되며, 이는 예를 들면, 벡터 분자를 복제하고 선별가능하거나 또는 선별가능한 마커 또는 형질전환 유전자를 암호화하는, 숙주 세포 내에서 천연적으로 발견되지 않는 DNA인 이종 DNA로 정의된다. 벡터는 외부 또는 이종 DNA를 적합한 숙주 세포내로 전달하는데 사용된다. 숙주 세포 내에서, 벡터는 숙주 염색체 DNA와는 독립적으로 또는 일치하지 않게 복제할 수 있으며, 몇 개의 벡터 카피 및 이의 삽입된 DNA를 생성시킬 수 있다.

[0032] 또한, 벡터는 외부 또는 이종 DNA의 숙주 염색체 내로 삽입을 표적화할 수 있다. 또한, 벡터는 또한 삽입된 DNA의 mRNA 분자로의 전사를 허용하거나 또는 달리는 삽입된 DNA의 다수 카피의 RNA로의 복제를 유발하는 필수 성분을 함유할 수 있다. 일부 발현 벡터는 추가로 단백질 분자 내로 mRNA의 해독을 허용하는 삽입된 DNA에 근접한 서열 성분을 함유한다. 따라서, 많은 mRNA 분자 및 삽입된 DNA에 의해 암호화된 폴리펩타이드는 신속하게 합성될 수 있다.

[0033] 본 발명의 용어 "형질전환유전자 벡터"는 DNA의 삽입된 분절, 즉, 숙주 세포 내에서 mRNA내로 삽입되거나 또는 RNA로서 복제되는 "형질전환유전자"를 말한다.

[0034] 본 발명에서 "형질전환유전자"이라는 용어는 RNA로 전환되는 삽입된 DNA의 부위만을 말하는 것이 아니라,RNA의 전사 또는 복제에 필요한 벡터의 부위를 말한다. 또한, 형질전환유전자는 단백질을 생산할 수 있는 개방 판독 프레임을 함유하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 필수적으로 포함할 필요가 없다.

[0035] 본 발명에서 "형질전환된 숙주 세포", "형질전환된" 및 "형질전환"이란 용어는 DNA의 세포내로의 도입을 말한다. 세포는 "숙주 세포"로 명명되며, 이는 원핵 또는 진핵 세포일 수 있다. 대표적인 원핵 숙주 세포는 이. 콜라이(E. coli)의 각종 균주를 포함한다. 대표적인 진핵 숙주 세포는 식물 세포(예: 캐놀라, 면화, 카멜리나, 알팔파, 대두, 벼,귀리, 밀, 보리 또는 옥수수 세포 등), 효모 세포, 곤충 세포 또는 동물 세포이다. 도입된 DNA는 일반적으로 DNA이 삽입된 조각을 함유하는 벡터의 형태이다. 도입된 DNA 서열은 숙주 세포와 동일한 종, 또는 숙주 세포와는 상이한 종으로부터 기원할 수 있거나, 또는 이는 숙주 종으로부터 기원한 일부 DNA 및 일부 외부 DNA를 함유하는 하이브리드 DNA 서열일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 "식물"이라는 용어는 전체 식물, 식물 기관(예: 잎, 줄기, 꽃, 뿌리 등), 종자 및 식물 세포(조직 배양 세포 포함) 및 이의 자손을 포함한다. 본 발명의 방법에 사용될 수 있는 식물의 부류는 일반적으로 단자엽 식물 및 쌍자엽 식

[0037] 물 둘다를 포함하는 형질전환 기술에 적용가능한 고등 식물의 부류, 및 조류와 같은 특정의 하등 식물과 같이 광범위하다. 이는 배수체, 이배체 및 반수체를 포함하는 각종의 배수성 수준의 식물을 포함한다.

[0038] 본 발명의 At5g47390를 과발현시키는 형질전환 식물은 예를 들면, 식물 내로 At5g47390 유전자에 작동적으로 연결된 프로모터를 암호화하는 유전자전이 벡터(예: 플라스미드, 바이러스 등)를 형질감염시킴에 의해 수득될 수 있다.

[0039] 통상적으로, 벡터가 플라스미드인 경우, 당해 벡터는 또한 선별성 마커 유전자, 예를 들면, 카나마이신에 대한 내성을 암호화하는 카나마이신 유전자를 포함한다. 식물 형질전환의 가장 일반적인 방법은 표적 형질전환유전자를 식물 형질전환 벡터 내로 클로닝시킨 후 문헌[참조: Hoeckeme et al.,(Nature 303:179-181, 1983)]에 기술된 바와 같이 헬퍼 Ti-플라스미드를 함유하는 아그로박테리움 투미파시엔스(Agrobacterium tumifaciens)내로 형질전환시킨다. 추가의 방법은 예를 들면, 문헌(참조: Maloney et al.,Plant Cell Reports 8:238, 1989)에 기술되어 있다. 형질전환유전자 벡터를 함유하는 아그로박테리움 세포는 문헌(참조: An et al., Plant Physiol. 81:301-305, 1986; Hooykaas, Plant Mol. Biol. 13:327-336, 1989)에 기술된 바와 같이 형질전환될 식물의 잎 조각과 함께 배양할 수 있다. 배양된 식물 숙주 세포의 형질전환은 통상적으로 위에서 기술한 바와 같이, 아그로박테리움 투미파시엔스를 통해 달성할 수 있다. 단단한 세포 막 장벽을 갖지 않는 숙주 세포의 배양물은 일반적으로 문헌(참조: Graham et al., Virology 52:546, 1978)에 원래 기술되고 문헌(참조: Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual (2nd Ed., 1989 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY))에 기술된 바와 같이 변형된 인산칼슘 방법을 사용하여 형질전환시킨다. 그러나, 폴리브렌(참조: Kawai et al., Mol. Cell. Biol. 4:1172, 1984), 원형질체 융합(참조:Schaffner, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2163, 1980), 전기천공(참조: Neumann et al., EMBO J. 1 :841,1982), 및 핵내로의 직접적인 미세주사(참조: Capecchi, Cell 22:479, 1980)와 같이 DNA를 세포내로 도입하기 위한 다른 방법을 또한 사용할 수 있다. 형질전환된 식물 세포는 세포를 예를 들면, 카나마이신과, 적절한 양의, 캘러스(callus) 및 경엽부(shoot) 유도를 위한 나프탈렌 아세트산 및 벤질아데닌과 같은 광호르몬을 함유하는 배지상에서 성장시켜 선별가능한 마커를 통해 선별할 수 있다. 이후에, 식물 세포를 재생시키며 수득되는 식물은 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지된 기술을 사용하여 토양으로 이전시킬 수 있다.

[0040] 위에서 기술한 방법 외에, 클로닝된 DNA를 곁씨식물, 포자 식물, 단자엽 및 쌍자엽 식물을 포함하는 광범위한 식물 종내로 이전시키기 위한 다수의 방법이 당해 분야에 널리 공지되어 있다[참조: Glick and Thompson, eds.,Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993;

Vasil,Plant Mol. Biol, 25:925-937, 1994; and Komai et al., Current Opinions Plant Biol. 1 :161-165, 1998 (일반적 검토); Loopstra et al., Plant Mol. Biol. 15:1-9, 1990; 및 Brasileiro et al., Plant Mol. Biol.17:441-452, 1990 (나무의 형질전환); Eimert et al., Plant Mol. Biol. 19:485-490, 1992 (브라시카의 형질전환); Hiei et al., Plant J. 6:271-282, 1994; Hiei et al., Plant Mol Biol. 35:205-218, 1997; Chan et al., Plant Mol. Biol. 22:491-506, 1993; 미국 특허 제5,516,668호 및 제5,824,857호(벼 형질전환); 및 미국 특허 제5,955,362호(밀 형질전환); 제5,969,213호(단자엽식물 형질전환); 제5,780,798호(옥수수 형질전환); 제5,959,179호 및 제5,914,451호(대두 형질전환)].

[0041] 대표적인 예는 원형질체에 의한 전기천공-촉진된 DNA 흡수(참조: Rhodes et al., Science 240:204-207, 1988;Bates, Meth. MoL Biol. 111 :359-366, 1999; DHalluin et al., Meth. MoL Biol. 111 :367-373, 1999; 미국특허 제5,914,451호); 폴리에틸렌 글리콜을 사용한 원형질체의 처리(참조: Lyznik et al., Plant Mol. Biol.13:151-161, 1989; Datta et al., Meth. Mol. Biol., 111 :335-334, 1999); 및 DNA가 들어있는 미세발사를 사용한 세포의 충격(bambardment)(참조: Klein et al., Plant Physiol. 91 :440-444, 1989; Boynton et al.,Science 240:1534-1538, 1988; Register et al., Plant MoL Biol. 25:951-961, 1994; Barcelo et al., Plant J. 5:583-592, 1994; Vasil et al., Meth. Mol. Biol. 111 :349-358, 1999; Christou, Plant MoL Biol.35:197-203, 1997; Finer et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240:59-80, 1999)을 포함한다. 추가로,식물 형질전환 단계 및 기술은 문헌(참조: Birch, Ann. Rev. Plant Phys. Plant MoL Biol. 48:297, 1997;Forester et al., Exp. Agric. 33:15-33, 1997)에 찾을 수 있다. 약간의 변이는, 당해 기술이 광범위한 식물 종에 적용가능하도록 한다.

[0042] 단자엽 식물 형질전환의 경우에, 입자 충격은 통상적으로 선별 방법이다. 그러나, 옥수수와 같은 단자엽 식물은 또한 미국 특허 제5,591,616호에 기술된 바와 같은 아그로박테리움 형질전환 방법을 사용하여 형질전환시킬 수 있다.

[0043] 단자엽식물, 예를 들면, 옥수수 형질전환을 수행하기 위한 다른 방법은 배아형성 현탁액 배양물로부터의 세포를 섬유 현탁액[5% w/v, 실라 SC-9 휘스커(Silar SC-9 whiskers)] 및 플라스미드 DNA(1㎍/㎕)를 혼합한 후 이를 볼텍스 게니에 II 볼텍스 혼합기(Vortex GENIE II vortex mixer)[미국 뉴욕 보헤미아 소재의 사이언티픽 인더스트리스, 인코포레이티드(Scientific Industries, Inc.) 제조원] 상의 다수 샘플 헤드내에 직접 두거나 또는 MIXOMAT 치아 아말감 혼합기[dental amalgam mixer; 카나다 온타리오 부를링톤 소재의 데구사 카나다 리미티드(Degussa Canada Ltd.) 제조원]의 홀더속에서 수평으로 두는 것이다. 이후에, 형질전환은 약 60초(예를 들면, 볼텍스 GENIE II를 사용하여)의 최고 속도로 혼합하거나, 또는 1초(MIXOMAT) 동안 고정 속도로 진탕시켜 수행할 수 있다. 당해 과정으로 안정한 형질전환체가 선별될 수 있는 세포 집단이 생산된다. 식물은 안정하게 형질전환된 캘러스로부터 재생되며, 이들 식물 및 이들의 후손은 서던 하이브리드화 분석에 의해 형질전환된 것으로 밝혀질 수 있다.

[0044] 식물 세포, 특히 옥수수의 형질전환을 위한 수염의 사용은 예를 들면, 미국특허 제5,464,765호에 기술되어 있다. 미국 특허 제5,968,830호는 대두를 형질전환시키고 재생시키는 방법을 기술하고 있다. 미국 특허 제5,969,215 호는 사탕무우와 같은 형질전환된 베타 불가리스(Beta vulgaris) 식물을 생산하기 위한 형질전환 기술을 기술하고 있다.

[0045] 각각의 상기 형질전환 기술은 장 단점을 가진다. 각각의 기술에서, 플라스미드로부터의 DNA를 유전자 조작함으로써 이것이 목적 유전자 뿐만 아니라 선별가능하고 스크리닝가능한 마커 유전자도 함유하도록 한다. 선별가능한 마커 유전자를 사용하여 플라스미드의 통합된 카피(당해 작제물은, 목적 유전자 및 선별가능하고 선별가능한 유전자가 단위로서 형질전환되도록 한다)를 갖는 세포만을 선별하는데 사용된다. 선별가능한 유전자는 목적 유전자를 지닌 세포만을 성공적으로 배양하기 위한 다른 점검을 제공한다.

[0046] 항생제 내성의 선별가능한 마커를 사용한 전통적인 아그로박테리움 형질전환은, 이러한 식물이 동물 및 사람에 대해 항생제 내성을 확산시킬 과도한 위험성을 내포하기 때문에 문제가 될 수 있다. 이러한 항생제 마커는 식물을 미국 특허 제제5,731,179호에 기술된 것과 유사한 아그로박테리움 기술을 사용한 형질전환 식물에 의해 식물로부터 제거시킬 수 있다. 항생제 내성 문제는 미국 특허 제5,712,135호에 기술된 바와 같은 바(bar) 또는 패트(pat) 암호화 서열을 사용하여 효과적으로 피할 수 있다. 이러한 바람직한 마커 DNA는 글루타민 신테타제억제제 제초제 포스피노트리신(글루포시네이트) 및 글루포시네이트 암모늄 염(Basta, Ignite)의 작용을 억제시키거나 중화시키는 제2 단백질 또는 폴리펩타이드를 암호화한다.

[0047] 하나 이상의 이러한 유전자를 함유하는 플라스미드는 앞서 언급된 기술 중 어느 하나에 의해 식물 원형질체 또

는 캘러스내로 도입시킨다. 마커 유전자가 선별가능한 유전자인 경우, DNA 패키지가 혼입된 세포만이 적절한 식물독소제를 사용한 선별하에 생존한다. 적절한 세포가 확인되고 증식되면, 식물이 재생된다. 형질전환된 식물로부터의 후손을 시험함으로써 DNA 패키지가 식물 게놈 내로 성공적으로 통합되었음을 확인하여야 한다.

[0048] 형질전환의 성공에 영향을 미치는 다수의 인자들이 존재한다. 외인성 유전자 작제물의 설계 및 작제, 및 이의 조절 성분은 외인성 서열의 식물 핵의 염색체 DNA내로의 통합 및 세포에 의해 발현될 형질전환유전자의 능력에 영향을 미친다. 외인성 유전자 작제물을 식물 세포 핵내로 비-치명적인 방법으로 도입시키기에 적합한 방법은 필수적이다. 중요한 점은, 전체 식물이 회수되는 경우에 작제물이 도입되어지는 세포의 유형이 재생에 대해 보정가능한 유형이어서 적절한 재생 프로토콜을 제공하여야 한다는 점이다.

[0049] 원핵세포는 또한 본 발명의 초기 클로닝 단계를 위한 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 방법, 벡터, 플라스미드 및 숙주 세포 시스템은 이러한 초기 클로닝 및 확장 단계에 사용될 수 있는 당해 분야의 숙련가에게 잘 알려져 있고 본원에서는 기술되지 않을 것이다.

[0050] 본 발명의 다른 구체예에서, 프로모터는 당해 분야의 숙련가에게 널리 공지된 방법을 사용하여 형질전환될 식물에서 At5g47390와 같은 식물 성장 관련 유전자를 암호화하는 유전자에 작동적으로 연결시킬 수 있다. 프로모터의 삽입은 유전자형질전환 식물의 발달하는 종자에서, 유전자 발현을 허용할 것이다.

[0051] 본 발명의 방법에서 형질전환 식물은 단자엽 및 쌍자엽 식물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이들 과중에서 관심대상의 식물은 캐놀라, 옥수수, 면화, 밀, 벼, 대두, 보리 및 기타 종자 생산 식물,및 알팔파 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는 기타 식물을 포함하고 농업적, 공업적, 기타 산업적으로 관심대상인 것 모두를 포함한다.

[0052] 본 명세서에 사용된 "이종 서열"은 상이한 종으로부터 기원하거나, 또는 동일한 종으로부터 기원한 경우, 원래의 형태로부터 실질적으로 변형된 올리고뉴클레오타이드 서열이다. 예를 들어, 구조 유전자에 작동적으로 연결된 이종 프로모터는구조 유전자가 기원하는 것과는 상이한 종으로부터 기원하거나, 또는 동일한 종인 경우, 원래의 형태로부터 실질적으로 변형된 것으로부터 기원한다.

[0053] 본 명세서에서 사용된 "프로브"는 통상의 검출가능한 표지 또는 리포터 분자, 예를 들어, 방사성 동위원소, 리간드, 화학발광제 또는 효소가 부착된 분리된 핵산이다.

[0054] 본 명세서에 사용된 "프라이머"는 핵산 혼성화에 의하여 상보적 표적 DNA 가닥에 어닐링(annealing)되어 프라이머와 표적 DNA 가닥간에 혼성체(hybrid)를 형성하고, 다음으로 중합효소, 예를 들어 DNA 중합효소에 의하여 표적 DAN 가닥을 따라연장되는 분리된 핵산이다. 본 발명의 프라이머 쌍은, 예를 들어 중합체 연쇄 반응(PCR) 또는 다른 종래의 핵산증폭 방법에 의한 표적 핵산 서열의 증폭을 위한 이들의 사용을 나타낸다.

[0055] 프로브와 프라이머는 일반적으로 11개 이상의 뉴클레오티드, 바람직하게는 18개 이상의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 24개 이상의 뉴클레오티드, 및 가장 바람직하게는 30개 이상의 뉴클레오티드 길이이다. 이러한 프로브와 프라이머는 매우 엄격한 혼성화 조건하에서 표적 서열과 특이적으로 혼성화된다.

[0056] 프로브와 프라이머를 제조하고 사용하는 방법들은, 예를 들어 Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (이하, "Sambrook et al., 1989"); Current Protocols in Molecular Biology, ed. Ausubel et al., Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, 1992 (주기적으로 개정됨) (이하, "Ausubel et al., 1992");및 Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, 1990에 설명되어 있다. PCR-프라이머 쌍들은, 예를 들어 이러한 목적을 위하여 개발된 Primer(Version 0.5, ⓒ 1991,Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA)와 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여, 공지된 서열로부터 도출될 수 있다.

[0057] 핵산 증폭은 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 포함하는 당업계에서 공지된 다양한 핵산 증폭 방법의 어떠한 것이라도 사용될 수 있다. 다양한 증폭 방법이 당업자에 공지되어 있으며, 특히, 미국특허번호 제4,683,195호와 제4,683,202호 및 PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, ed. Innis et al., Academic Press,San Diego, 1990에 설명되어 있다. PCR 증폭 방법은 최대 22kb의 게놈 DNA 및 최대 42kb의 박테리오파아지 DNA를 증폭하는 정도로 발전되어 있다(Cheng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5695-5699, 1994).

[0058] 또한 본 발명은 서열번호 4의 At5g47390 유전자의 프로모터를 암처리하여 활성화시키는 방법을 제공한다. 즉, 이러한 방법은 암 조건에서만 발현이 되고 빛을 쪼이면 사라진다는 특성이며, 만약 어떤 유전자를 암 조건에서

만 발현시키고 빛 조건에서는 발현되지 않는 유전자를 식물에 조작하여 넣을 때 아주 유용할 수 있다.

[0059] 이하 본 발명을 설명한다.

[0060] 본 발명은 애기장대의 전사 인자, At5g47390 유전자를 과발현시켰을 때 형질전환된 식물에서 나타나는 특징적인 표현형의 생리학적인 기작을 알아보고자 한다. 그 특징은 식물체의 hypocotyl이 WT에 비하여 크게 길어지는 것인데 이는 At5g47390 유전자가 light signaling pathway의 negative regulator로 작용하고 있다고 볼 수 있다. Light와 관련된 기작의 negative regulator는 식물체가 성장 발달함에 있어 아주 중요한 역할을 함으로 이 유전자에 대한 연구는 이러한 기작을 조절할 수 있는 방법을 제공할 것이다.

발명의 효과

[0061] 상기의 해결수단 및 하기 실시예 및 도면에서 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 At5g47390 유전자를 과발현시키는 경우에 야생형에 비하여 그 성장이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 정상배지에서 At5g47390(m12ox)를 과발현 시킨 형질전환체의 표현형적 특징을 나타낸 도이다. M12ox T3line으로 homozygous한 개체를 Knamycin배지에서 screening하여 얻은 T4 line으로 실험을 진행하였다. 정상적인 MS배지에서 심은후 4일(도 1a)과 8일(도 1b) 되었을 때 m12ox의 표현형을 야생형인 Col-0와 생장비교 하였다. 3개의 라인중 #1, #2가 야생형과 비교하였을대 확실하게 hypocotyl의 길이가 긴 것을 확인할 수 있었다.

도 2는 정상적인 MS배지에 씨를 심은 후 7일째 되는 seedling을 압착법으로 시료를 만들어 관찰한 것이다. 야생형인 col-0 와 m12ox#1의 세포 크기를 현미경으로 조사한 것이다. 도2-(b)에서 보는 바와같이 세포의 길이가 야생형에 비해 긴 것을 볼 수있다.

도 3은 식물호르몬을 처리한 배지에서 각각 야생형과 형질전환체를 심어 발아부터 7일 후에 비교하여 보았다. 0.1μM, 1 μM 그리고 10 μM의 IAA(3a),NPA(Naphtylphthalamic acid)(3b), 및 GA(Giberellic acid)(3c)를 처리한 배지에서 자란 야생형과 형질전환체는 NPA에서 차이를 보였다. 각각의 10 μM 농도에서 표현형을 확인하여 보면 m12ox가 야생형에 비하여 훨씬 더 hypocotyl의 생장이 저해되고 있음을 확인할 수 있다. 따라서 이러한 결과로부터 형질전환체가 야생형에 비하여 식물호르몬에 민감하게 반응하지 않는다는 것을 알 수 있다.

도 4는 m12promoter와 GUS repoter 유전자를 가지고 있는 plasmid가 형질전환된 식물체로 광조건에 차이를 두어 실험하였다. 정상적인 MS배지에서 4일 동안 키운 m12pro-GUS를 광 조건과 암 조건에서 각각 3일간 더 키운 후 GUS staining을 실시하였다. 위의 도에서 보는바와 같이 M12 promoter는 암처리에 의하여 확연하게 activation 됨을 볼 수 있었다. 특히 hypocotyl에서 염색이 가장 짙게 되었고 hypocotyl과 root의 junction에서 그리고 뿌리에서 약간의 발현을 확인할 수 있다.

도 5 (a)는 광조건에서 정상적인 MS배지에 7일간 키운 M12pro-GUS seedling을 (b)는 암조건에서 발아부터 시켜서 7일간 키운 seedling을 각각 광조건에서 키운 것은 암조건으로 (1, 3, 5, 12, 그리고 24시간), 광조건에서 키운 것은 암조건 같은 시간 별로 처리하였다. 그런 후 15시간 동안 GUS solution에 담가 37℃에서 incubation 하여 현미경으로 관찰한 결과이다. 상기 결과는 빛에 의해서 m12 promoter 자체의 활성을 GUS라는 repoter 유전자를 통해 확인할 수 있었다. 암처리에서 많이 활성이 커졌던 프로모터가 빛에 노출되었을때 시간이 지남에 따라 m12 pormoter의 활성이 점점 떨어지는것을 순차적으로 확인 할 수 있었다. 광처리에서 암처리를 또 순차적으로 했을 때 예상대로 그 반대의 결과를 보였다.

도 6은 Auxin responsive gene인 DR5의 promoter와 GUS reporter gene을 가지고 있는 식물체와 그 형질전환체와 M12ox를 크로스하여 얻은 개체를 정상적인 MS배지에 키웠다. 각각을 7일간 키운 후, control상태에서와 auxin을 처리한 상태에서 GUS 유전자의 발현을 관찰하였다. 그 결과 M12ox에서 auxin responsive한 유전자의 promoter가 더 활성화되어 있음을 확인 할 수 있었다(a). 또한 auxin에 의한 활성도 GUS staining에 의하여 관찰하였다(b). 도 6은 auxin이라는 식물 호르몬은 식물 생장에 관련된 중요한 호르몬으로 m12ox자체에서 DR5라는 auxin에 responsive한 유전자의 프로모터 활성이 크다는 것은 의미있는 발견이다. 그 의미는 m12유전자가 과발현됨에 따라 생장호르몬인 auxin의 합성 또는 signaling에 영향을 주고 있다는 것으로 곧 형질전환체의 hypocotyl length가 야생형보다 훨씬 긴 이유가 auxin 과 연관되어 있을 것이라고 생각된다.

도 7은 pBI121 벡터의 개열지도를 나타낸다.

도 8은 pMDC162 벡터의 개열지도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하 비한정적인 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되어지지 아니한다.

[0064] 실시예 1: 식물 재료 및 성장/스트레스 처리 조건

[0065] 야생형으로 Arabidopsis thaliana, colombia를 사용하였으며, 일반적으로 0.7% phytoagar, 2% sucrose, 4% MS(Murashige and Skoog,Duchefa Biochemie.)를 포함한 배지에서 식물을 키웠다. Bleach로 소독 후, sterilized water로 헹구어 4℃에서 3일 동안 vernalization 처리를 하여 70% 습도에서 16시간 광 처리, 8 시간 암처리 하에서 23±1℃ 조건에서 씨앗을 발아시킨 후 키워서 생장을 비교하고 여러가지 phytohormone도 처리하였다. 호르몬으로는 ABA(Abscisic acid), ACC(1-Aminocyclopropane carboxylic acid),IAA(Indole 3-acetic acid),Kinetin 그리고 NPA(Naphtylphthalamic acid) 각각 1,10μM의 농도로 사용되었다.

[0066] 실시예 2: 애기장대의 유전자 과발현 및 형질전환

[0067] myb-like transcription factor, Riken Bioresource center에서 구입한 At5g47390 cDNA(Resource number:pda06999)를 애기장대에 과발현시켜 T4 line에서 homozygous한 line 3개를 selection하였다. 과발현시 At5g47390 cDNA를 포함하고 있는 RAFL clone을 DH5a에 먼저 transformation하여 clone의 copy수를 늘리고 그로부터 plasmid를 추출한 후 XhoI과 BamHI으로 enzyme digestion하였다. 그 다음 TOPO vector(Invitrogen K4500-01)에 ligase를 이용하여 overnight으로 ligation하고, 다시 XbaI과 SacI으로 digestion하여 binary vector인 pBI121(Clontech)에 클로닝하였다(도 7).

[0068] 그리고 먼저는 E.coli cell인 DH5a에 transformation하고 다음으로 Agrobacterium에 최종적으로 transformation하였다. transformaiton된 Agrobacterium을 5ml정도 seed culture하고 다음으로 500ml에 cell culture하여 5000rpm 으로 15분 동안 원심분리하고 down된 cell을 1/2X MS(0.5g MS,12.5g sucrose in 250ml water)에 resuspension하여 silwet을 첨가하여 Col-0에 dipping하여 transformaiotn시켰다. 이 binary vector의 CaMv(cauliflower mosaic virus) 35S promoter에 의해 At5g47390은 형질전환된 식물체에서 과발현하게 된다. 또한 At5g47390 promoter는 Col-0의 gDNA로부터 Forward primer(5'-GGT ACC TTC AGACTTCGA TCA GAT CC-3';서열번호 2)와 Reverse primer(5'-CTC GAG TAA AGC GTG TAT CAC GC-3';서열번호 3) 로 PCR 증폭한 후 gateway 시스템(Invitrogen.Cat no. 11791-020)을 이용하기 위하여 먼저 entry vector인 TOPO(Invitrogen. pCR 8/GW/TOPO TA cloning kit. Par no. 45-0642)에 cloning하고 그 plasmid를 GUS reporter gene이 있는 pMDC162(TAIR, Carnegie Institution for Science Department of Plant Biology)에 클로닝(도 8)한 후 위와 같은 방법으로 식물체에 과발현시켰다.

[0069] 실시예 3: GUS staining

[0070] m12promoter 와 GUS reporter gene이 포함된 플라스미드가 형질전환된 식물체를 4일 키운후 3일간의 암 처리를 하여 정상적인 광 처리에서의 식물체와 함께 GUS staining을 실시하였다.

[0071] 이러한 실험은 먼저 7일동안 정상적인 환경(16h light / 8h dark,23'C로 세팅된 growth chamber)에서 자란 식물체와 7일간의 암처리하에서 자란 식물체들을 각각 정상적인 환경(광처리)하에서 자란 식물은 시간(1,3,6,12h, or 24h)별로 암 처리를 하고, 암처리 하에서 자란 식물은 같은 시간별로 광처리를 하여 샘플을 준비한다. 또는 7일 동안 정상적인 배지와 환경 조건에서 키운 식물을 5시간동안 식물호르몬인 IAA(10uM)를 처리하여 샘플을 준비한다. 그리고 난 후, 1M NaPO4 buffer에 10mM Ferricyanide와 같은 농도의 Ferrocyanide, 0.5M EDTA(pH8.0), 그리고 1mM X-Glu(Gold biotechnology Inc.) 와 0.1% Triton X-100을 혼합하여 GUS solution을 만들고 각각의 광조건 및 호르몬이 처리된 식물체를 이 soultion에 담근다. 37℃ incubator에 15시간 동안 incubation 한 후 MS배지 위에 staining된 식물체를 잘 펴서 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0072] 그 결과, 암 처리 상태에서 10일간 키운 후 시간별로 광처리를 한 식물체의 염색 정도를 확인하면, 빛에 의해서 At4g47390의 promoter가 활성화되는 것을 확인할 수 있었다. 그와 같은 결과로 또 광처리 상태에서 10일간 키운 후 암 처리로 옮긴 식물체의 염색 정도 또한 암 처리 시간이 늘어날수록 At5g47390의 promoter 활성이 감소됨을 관찰할 수 있었다.

[0073] 다음으로는 옥신에 responsive한 유전자인 DR5의 promoter와 GUS reporter gene이 함께있는 plasmid를 위에 언

급한 방법으로 과발현 시킨 식물체와 At5g47390을 과발현 시킨 식물체(M12ox)를 cross하여 얻은 F2세대를 이용하여 At5g47390과 옥신과의 관계를 살펴보고자 하였다. 각각 DR5-GUS와 DR5-GUS * M12ox(At5g47390 과발현체) 식물체에 auxin(IAA,10uM)을 5시간동안 처리한 후 위와 같은 방법으로 GUS staining을 실시하였다. 도 6에서 보는 바와 같이 IAA를 처리하지 않은 상태(도 6a)의 식물체에서 DR5 promoter의 활성은 DR5-GUS * M12ox에서 더 강하게 나타났다. 반면 IAA를 처리한 상태에서는 DR5-GUS와 DR5-GUS*M12ox에서 거의 비슷한 정도의 DR5 promoter활성을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 M12ox에서 auxin에 responsive한 유전자의 promoter이 활성화됨을 알 수 있고, 그 이유는 At5g47390이 과발현되었기 때문이라고 추정할 수 있다. 이로써, 식물 성장에 관여하는 호르몬인 auxin의 합성이나 signaling이 M12ox에서 야생형과는 다르게 변화되었음을 알 수 있다.

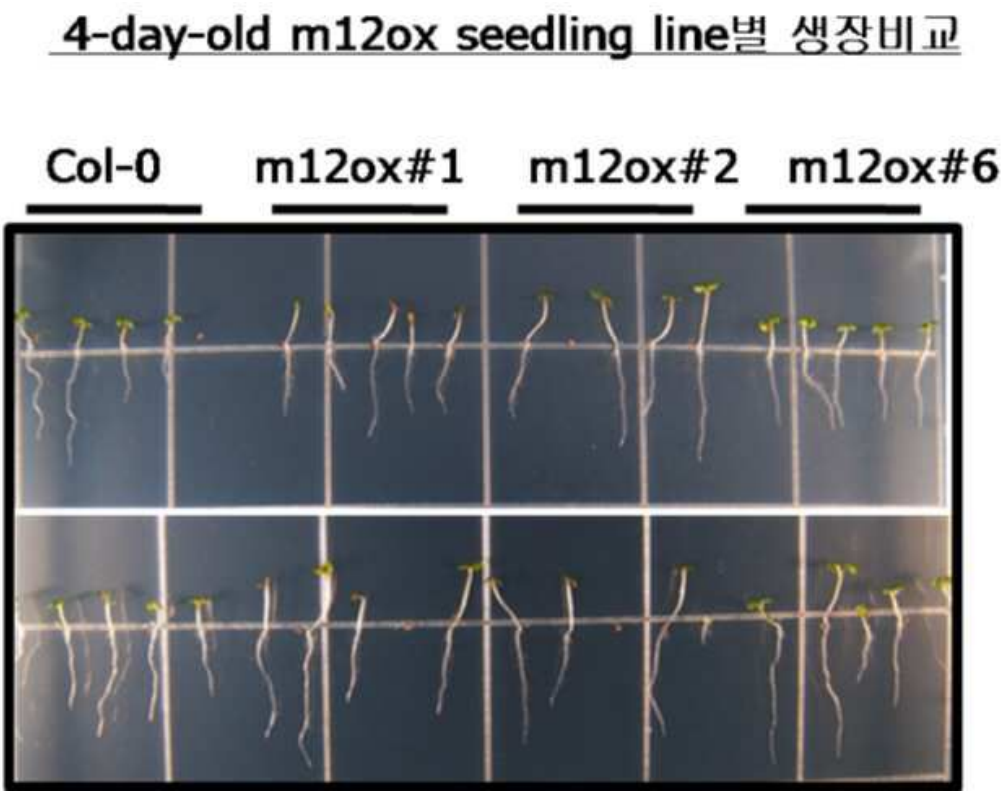
[0074] 상기의 실시예의 결과를 정리하면 다음과 같다.

[0075] At5g47390 과발현된 형질전환 식물은 길이가 늘어난 hypocotyl를 가진다.

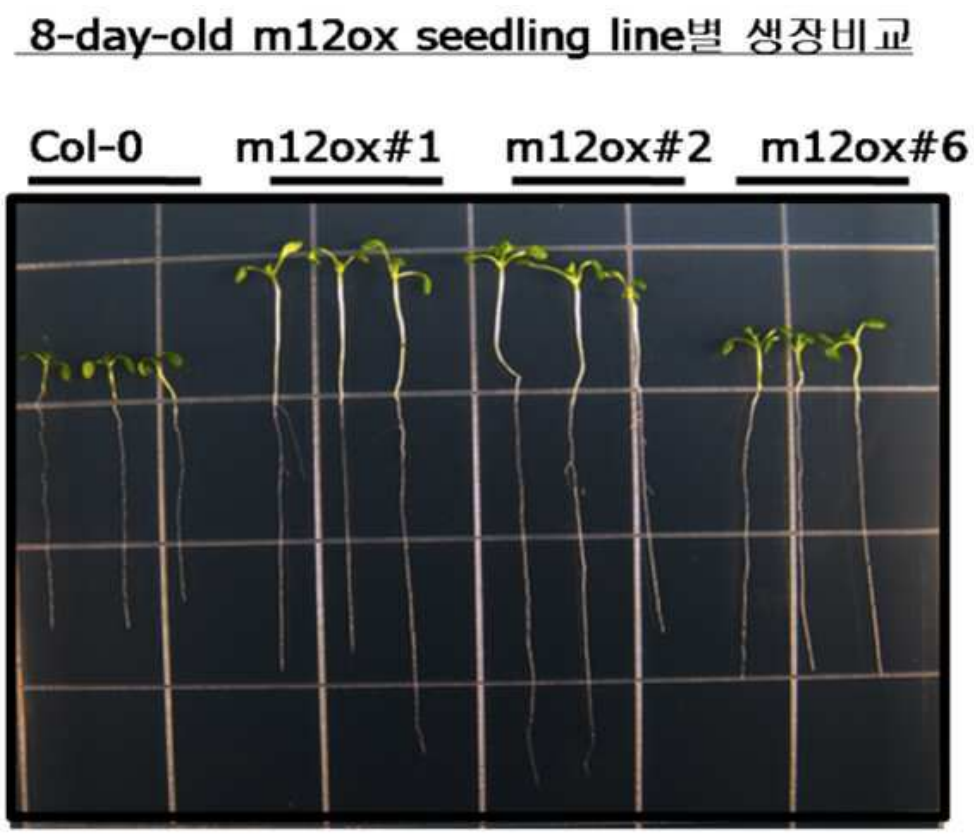
[0076] 또한 암 처리에서, At5g47390 유전자의 프로모터는 야생형에서 활성화될 수 있다.

도면

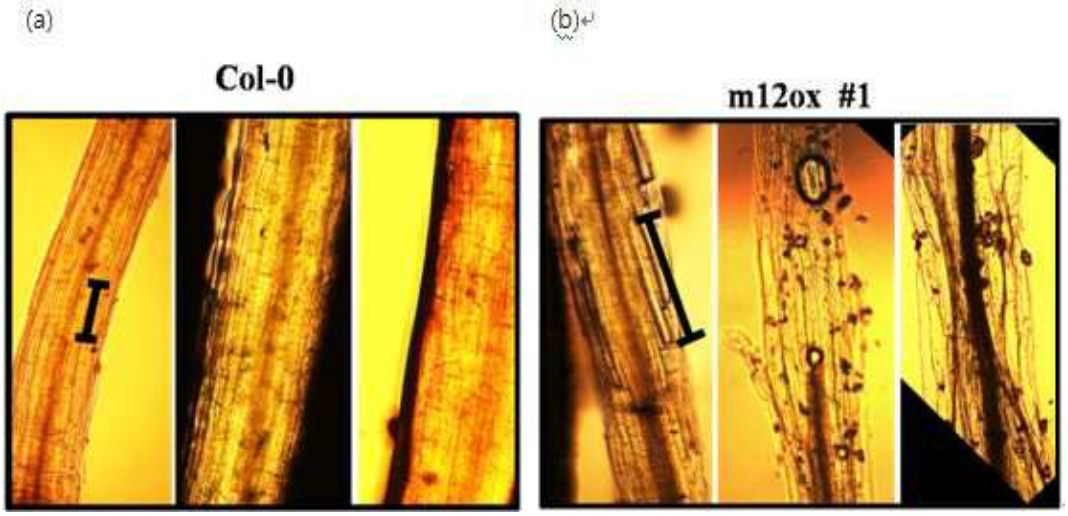
도면1a



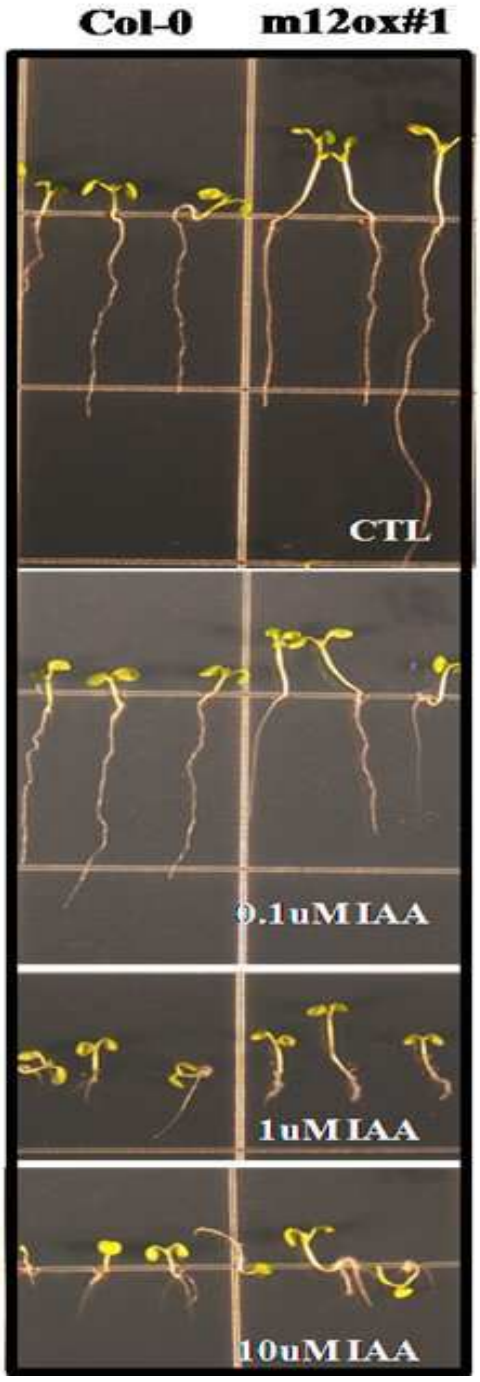
도면1b


8-day-old m12ox seedling line별 생장비교
Col-0
m12ox#1
m12ox#2
m12ox#6

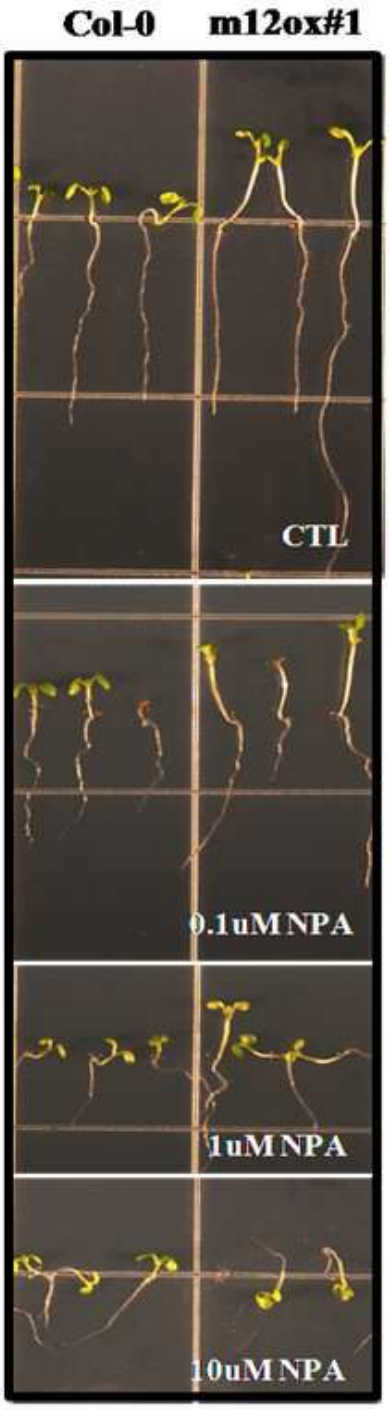
도면2


(a)
(b)
Col-0
m12ox #1

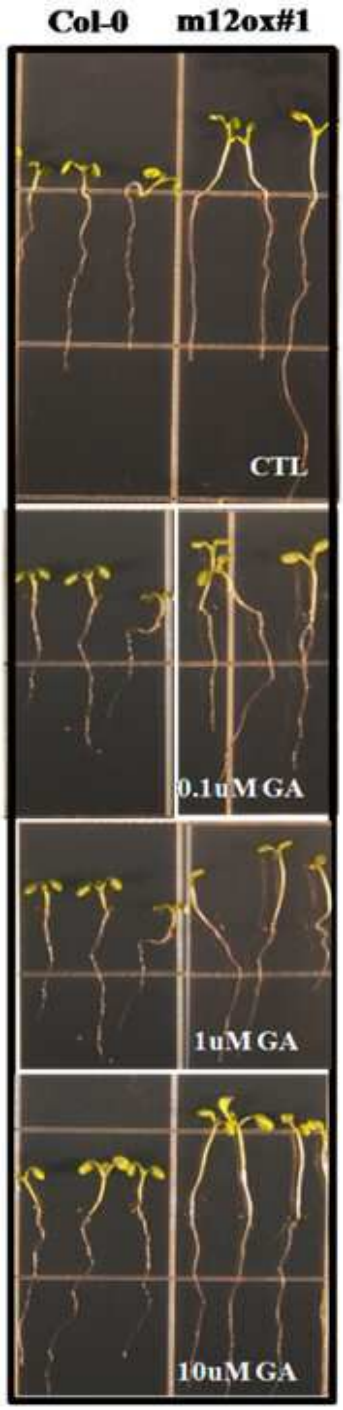
도면3a



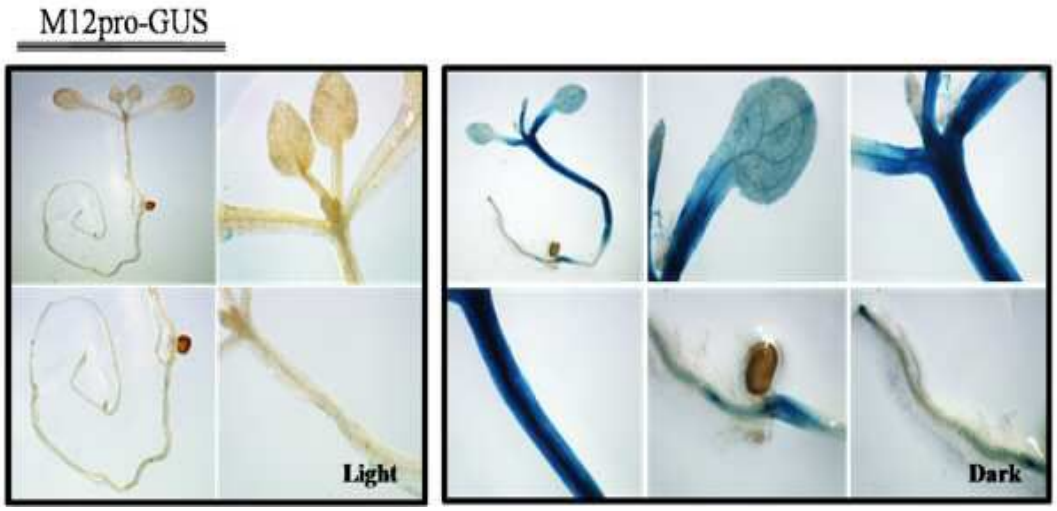
도면3b



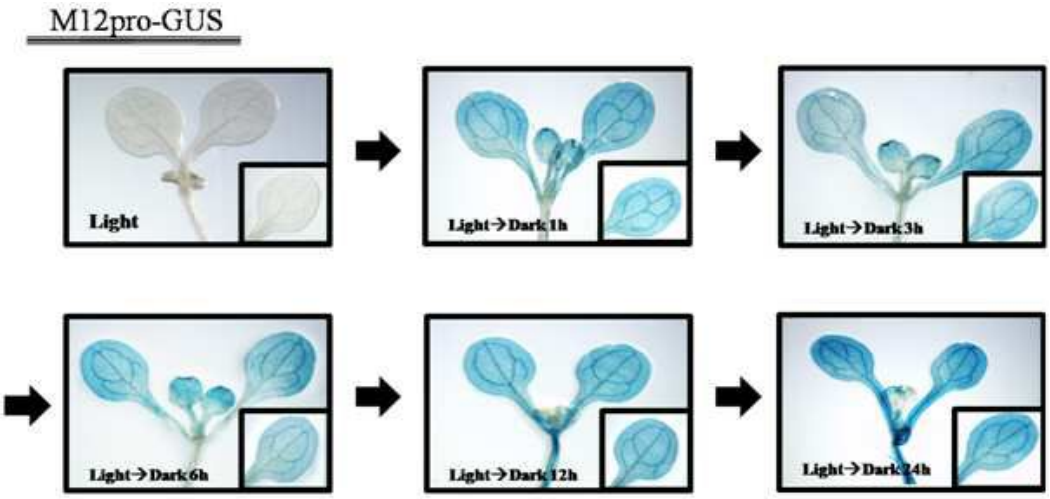
도면3c



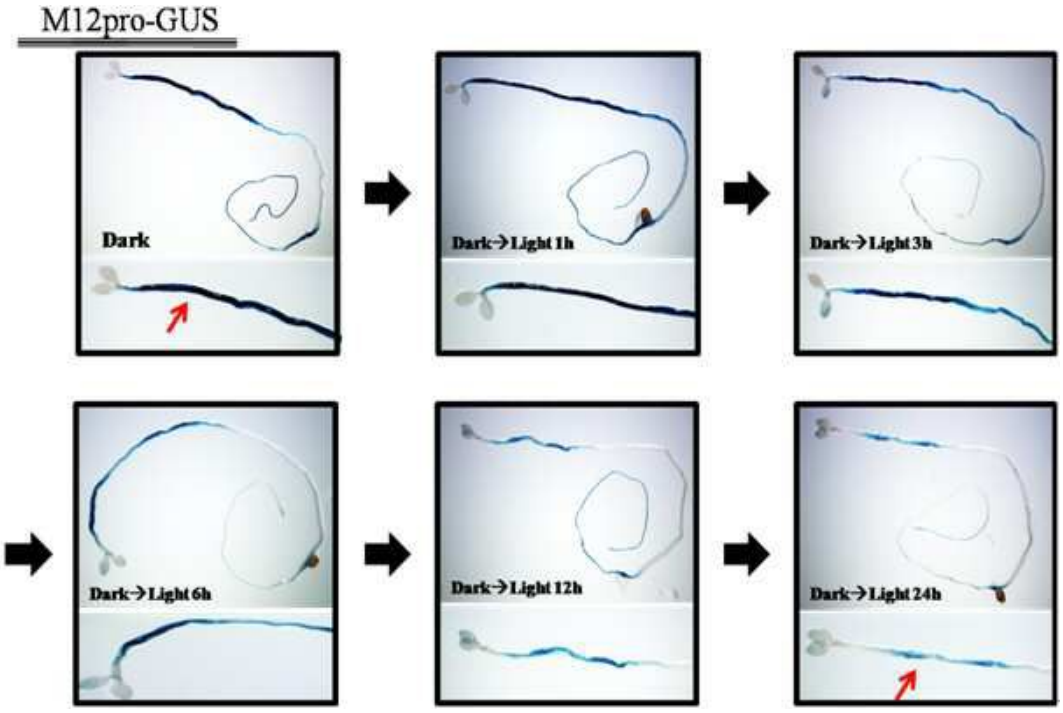
도면4


M12pro-GUS
Light
Dark

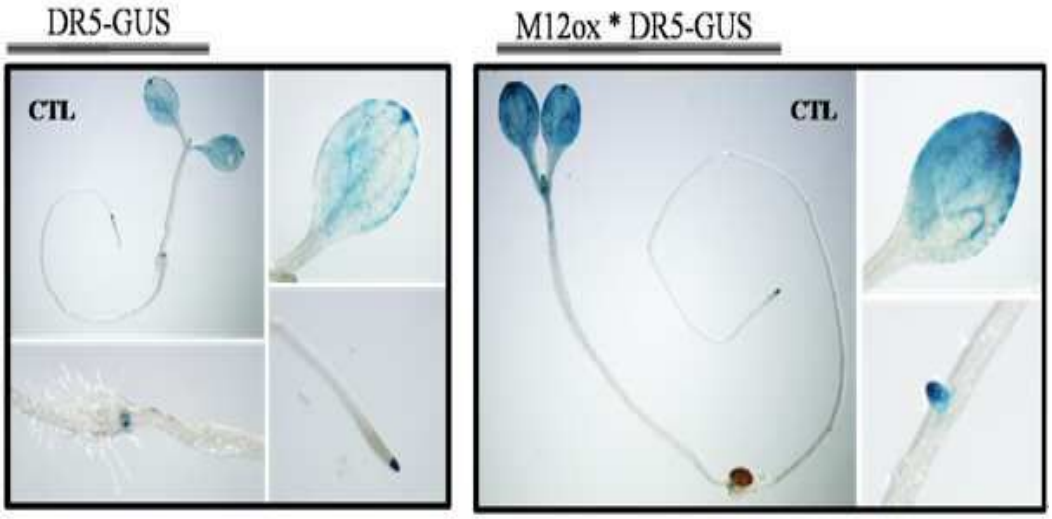
도면5a


M12pro-GUS
Light
Light→Dark 1h
Light→Dark 3h
Light→Dark 6h
Light→Dark 12h
Light→Dark 24h

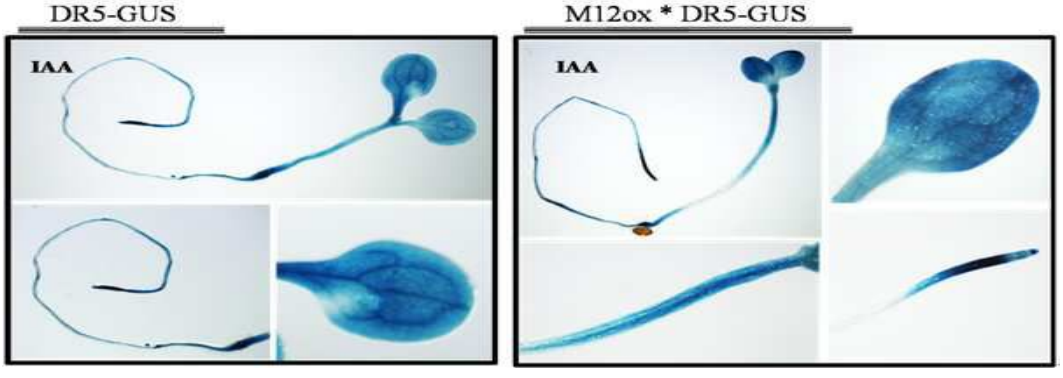
도면5b



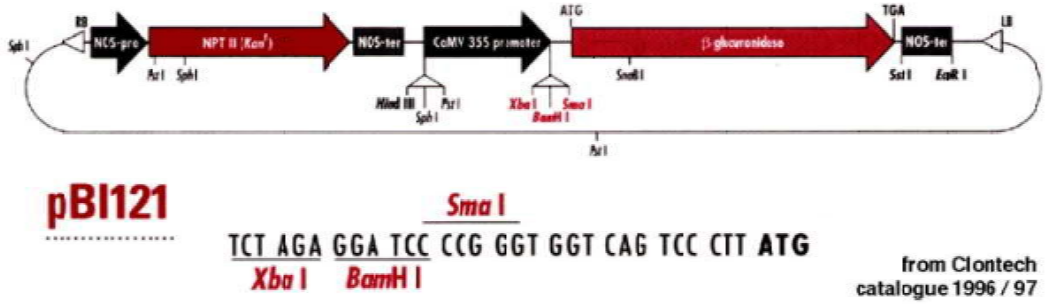
도면6a



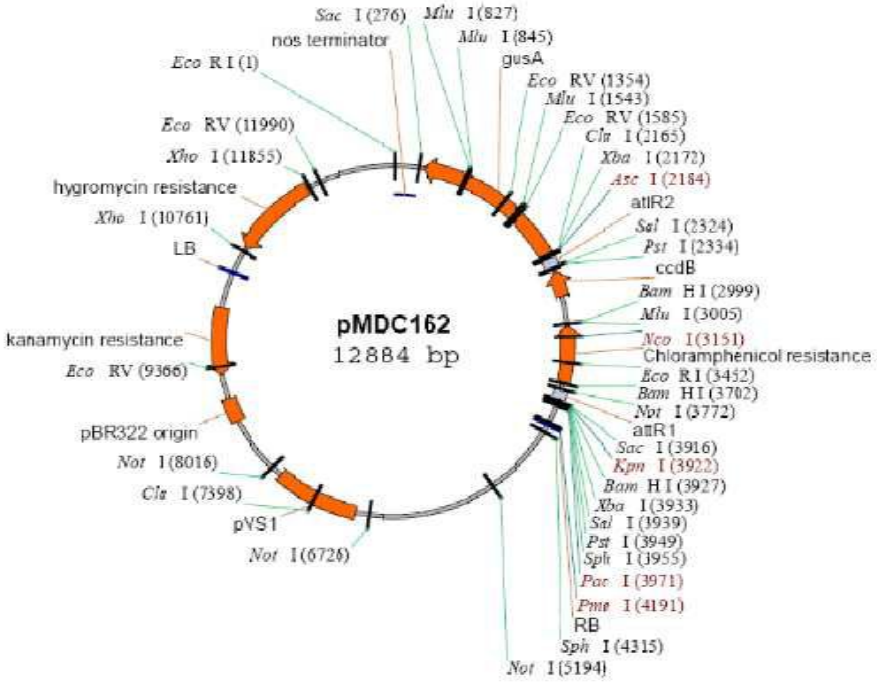
도면6b



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> A GENE FOR PROMOTING PLANT GROWTH AND A TRANSGENIC PLANT COMPRISING THE SAME

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1621

<212> DNA

<213> At5g47390

<400> 1

aaataaaaaa aaaaatccgg ccagataaat cgaatttatg taataaatcc gaccagataa 60

actgatatta ttgtctttct tccgctcctt tgtctctcta tctctttctc acaattagat 120

tctgtgcttc ttctgcgatc aactaagatc cgatccgcga gcgtttcaga cttcgatcag 180

atccgattaa gagaagcaaa tcgggtcggg tatgactcgt cgatgttctc actgcaatca 240

caatggccac aactctcgga cttgtcccaa tcgcggcgtg aagctctttg gtgttcggct 300

caccgaaggt tcgatccgga aaagtgcaag tatgggtaat cttagccatt acacgggttc 360

tggatcgggt gggcatggaa ccgggtccaa cactccgggt tctccgggtg atgtccctga 420

ccatgtcgct ggtgatggtt acgcttctga ggatttcgtt gctggctctt cctctagccg 480

cgagagaaag aaaggaactc catggacaga ggaagaacac aggatgttct tattaggttt 540

acagaagctg ggtaaaggtg attggagagg tatctcaaga aactatgtga ccactaggac 600

acctacacaa gttgctagcc atgctcagaa gtatttcatc agacaatcca atgtctctcg 660

tcgcaaaaga cgttctagtc tctttgatat ggttcctgat gaggttggag atattcccat 720

ggatttgcaa gaaccagagg aagataatat tcctgtggaa actgaaatgc aaggtgctga 780

ctctattcat cagacacttg ctcctagctc acttcacgca ccgtcaatct tggaaatcga 840

agaatgtgaa tcaatggact ccacaaactc taccaccggg gaaccaaccg caactgccgc 900

tgctgcttct tcttcttcca gactagaaga aaccacacaa ctgcaatcac aactgcaacc 960

gcagccgcaa ctacctggct cattccccat actatatccg acctactttt caccatatta 1020

cccgtttcca ttcccaatat ggcctgctgg ttatgttcct gaaccaccca agaaagagga 1080

aactcatgaa attctcagac caactgctgt gcactcgaaa gctcctatca atgttgacga 1140

gcttcttggt atgtctaagc tcagccttgc agagtccaac aaacatggag aatccgatca 1200

gtctctttca ttgaagctag gtggcgggtc atcttcaaga caatcagcat ttcacccgaa 1260

tcctagctct gatagttcag acatcaaaag cgtgatacac gctttataaa agacctgagg 1320

aagtgatggt ctaaaatggg atctggtttg gggtttacag gttagttgtt ggtcacagta 1380

acttaaataa gtttttcttt gttaggttgt ttaacttggg taggatgttt tagttcagct 1440

ttgatcatta gggaaaagaa aaaagaaaaa aaaaagggag aaaaacaaat tattattttt 1500

tgcttacatt tctttatatt tgtatgcttt tattttgact ctaggatgcg ttaattttcg 1560

tttaatctgt actaaaaatt agaatttatt agttttgaat aaataaaatc acagtttgtt 1620

t 1621

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggtaccttca gacttcgatc agatcc 26

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

ctcgagtaaa gcgtgtatca cgc 23

<210> 4

<211> 1000

<212> DNA

<213> M12 promoter

<400> 4

tggcatttgt ttaccatttt tcttatgata acttattaaa cagatgtcat attttactta 60

tttgtgttta taactgttaa aatctagtca agctttctgt atggaacgcg tgaagggcta 120

ttaagatatt ttaaaatgtt gaatagtgta attaatcttg tggctaataa tattcatgcc 180

aattgttaat ttctggtgga gggttaacac ttgtacataa atacttaatt tttctttttg 240

cagtttttgt atagatatcc atccttatat aaatagaaaa atataaggaa attgtaatga 300

tttagcataa gacaattgga taatcacaaa tgcattaaac ctattaacta gtctatatag 360

aaagagttat tagttacagc tatactattt gtggtggcat taatatatag taacttattt 420

aagatatatg tcataatgtt aaaaagaaat cacagagaaa gctgttattt tttttaatcc 480

taaatttaaa actttggata ttgagattag cctgtaatac atctttttcc aaaaaattta 540

tacaaaaatg gccattaata attaatagta atagctagtt ggacttctta gttcaaagta 600

attcaacatt ttttctaaaa taaatcttct aataatagaa cacgttggat tgactaatta 660

agtcaaatat gaaatatgga aaaggaaaaa aatccaccaa cgatacacca aataatttcc 720

gatttttata tatataaata aacatactaa gagcaaaaga aaaacaaact gaaaataaaa 780

aaaataaata aataaaaaaa aaaatccggc cagataaatc gaatttatgt aataaatccg 840

accagataaa ctgatattat tgtctttctt ccgctccttt gtctctctat ctctttctca 900

caattagatt ctgtgcttct tctgcgatca actaagatcc gatccgcgag cgtttcagac 960

ttcgatcaga tccgattaag agaagcaaat cgggtcgggt 1000