



등록특허 10-2129116



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월01일

(11) 등록번호 10-2129116

(24) 등록일자 2020년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/8257 (2013.01)
C12N 9/1085 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0138314

(22) 출원일자 2019년11월01일

심사청구일자 2019년11월01일

(56) 선행기술조사문헌

KR101459594 B1

KR101545261 B1

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

하선화

경기도 수원시 영통구 광고호수공원로 277, 101동 1703호 (원천동, 광고중흥에스클래스)

유민경

경기도 용인시 기흥구 사은로126번길 33, 205동 1903호 (보라동, 민속마을신창미선힐아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

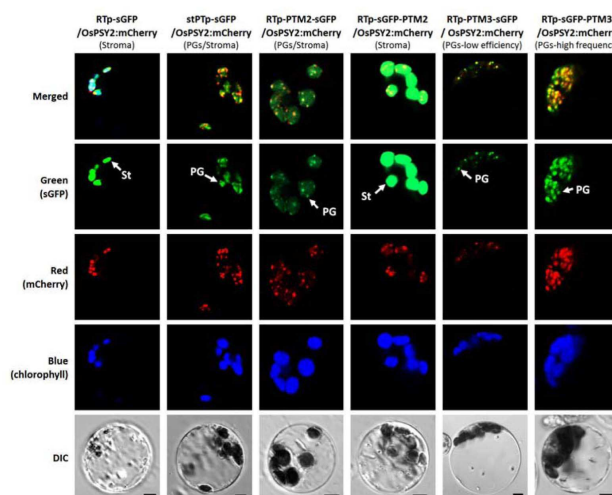
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 엽록체 내 플라스토글로불리를 표적하는 트랜지트 펩티드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 엽록체 내 플라스토글로불리(plastoglobuli)를 표적하는 트랜지트 펩티드 및 상기 트랜지트 펩티드를 이용하여 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량으로 생산하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 트랜지트 펩티드를 이용할 경우 식물체 엽록체로부터 목적 단백질을 효율적으로 대량 생산할 수 있어 산업적으로 값비싼 단백질을 대량생산하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 9/88 (2013.01)

C12Y 205/01032 (2013.01)

C12Y 401/01039 (2013.01)

(72) 발명자

유지수

전라북도 군산시 문화로 208-8, 104동 408호 (미장동, 과인빌아파트)

이여진

경기도 성남시 수정구 회망로 472, 1동 1304호 (단대동, 미도아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01334601

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 시스템합성농생명공학사업단

연구사업명 차세대바이오그린21

연구과제명 터펜 기질 증진 벼의 기능성 2차대사산물 de novo 생산 기작 규명 및 활용

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

엽록체 타겟팅 트랜지트 펩티드 코딩 서열; 목적 단백질을 코딩하는 유전자; 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 PTM3을 코딩하는 서열;이 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는, 목적 단백질을 식물세포 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하기 위한 재조합 벡터.

청구항 2

삭제

청구항 3

엽록체 타겟팅 트랜지트 펩티드 코딩 서열; 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 PTM2를 코딩하는 서열; 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자;가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는, 목적 단백질을 식물세포 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하기 위한 재조합 벡터.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제3항의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 이동 및 축적시켜 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량으로 생산하는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제3항의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 이동 및 축적시켜 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량 생산하는 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 7

제6항의 제조방법에 의해 제조된 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)에서 대량 생산하는 형질전환 식물체.

청구항 8

제7항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 9

제1항 또는 제3항의 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 목적단백질을 식물세포 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하기 위한 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 엽록체 내 플라스토글로불리를 표적하는 트랜지트 펩티드 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 식물세포 내의 엽록체와 같은 색소체(Plastid) 내부에 단일막구조로 이루어져 있는 플라스토글로불리(plastoglobuli, 복수형 plastoglobules, PG)는 식물의 지질 및 테페노이드(terpenoid) 대사에 대한 주요 합성 및 저장 장소이기 때문에, 유용 물질 생산을 위한 대사공학을 위하여 플라스토글로불 적중 단백질을 활용한 적중배열 동정연구가 경쟁적으로 이루어져 왔으나 *OsPSY2*(*Oryza sativa* Phytoene synthase 2) 유전자로부터 동정된 PTP(*OsPSY2*의 N-말단 80개 아미노산 부분) 및 stPTP(synthetic PTP) 적중배열이 전부이다. 하지만, PTP는 코딩 서열의 높은 GC 함량(%) 때문에 발현 등의 문제점이 높고, PG 특이 적중이기 보다는 스트로마(stroma)와 함께 적중되기 때문에 PG 적중률은 그렇게 높지 않다는 단점이 있다. 또한, PTP 코딩 서열의 GC 함량을 낮추고 단백질 발현 효율을 높이기 위한 코돈 최적화를 통해 stPTP가 합성·제작 되었지만, 발현 효율의 상승 외에 PG 적중률은 높아지지 않는 것으로 확인되었다. 이러한 이유로 PTP/stPTP 보다 PG 적중률이 높은 적중배열의 개발은 매우 필요하다고 할 수 있다.
- [0003] 한편, 한국공개특허 제2014-0095748호에는 '엽록체 적중 펩타이드 및 이의 이용'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2000-0014264호에는 '엽록체를 타겟팅하는 신규한 유전자 발현방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 엽록체 내 플라스토글로불리를 표적하는 트랜지트 펩티드 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 종래 엽록체 적중 펩티드로 알려진 PTP(transit peptide of OsPSY2)의 엽록체 내 소기관인 플라스토글로불리의 적중 효율을 보다 높이기 위해 OsPSY2 단백질의 구조를 분석하여 3개의 막관통영역(transmembrane domain)을 확인하였다. 상기 막관통영역을 포함하는 펩티드를 코딩하는 서열과, RTP(transit peptide of RuBisCO small subunit) 코딩 서열 및 형광 단백질 유전자를 작동가능하게 연결시켜 재조합 벡터를 제작한 후, 베타 원형질체에 형질전환하여 형광 단백질의 세포 내 위치를 확인한 결과, OsPSY2 단백질 유래 두 번째 막관통영역(TM2)을 포함하는 적중배열(PTM2) 및 세 번째 막관통영역(TM3)으로 이루어진 적중배열(PTM3)의 코딩 서열이 RTP 코딩 서열 및 형광 단백질 코딩 유전자와 특정 순서로 조합될 때 형광 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에 특이적으로 적중시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0005] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 RTP(transit peptide of rice RuBisCO small subunit) 코딩 서열; 목적 단백질을 코딩하는 유전자; 및 PTM3(Transmembrane domain 3 of OsPSY2) 코딩 서열;이 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는, 목적 단백질을 식물세포 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하기 위한 재조합 벡터를 제공한다.
- [0006] 또한, 본 발명은 RTP 코딩 서열; TM2(Transmembrane domain 2 of OsPSY2)를 포함하는 트랜지트 펩티드 코딩 서열; 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자;가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는, 목적 단백질을 식물세포 엽록체의 플라스토글로불리로 타겟팅하기 위한 재조합 벡터를 제공한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리로 이동 및 축적시켜 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량으로 생산하는 방법을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리로 이동 및 축적시켜 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량 생산하는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량 생산하는 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 목적단백질을 식물세포 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하기 위한 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에서는 엽록체 내 주요 기능성 2차 대사산물의 생산 및 저장 장소인 플라스토글로불(Plastoglobules)에 대한 적응 효율이 높은 신규한 트랜지트 펩티드(transit peptide)를 제공함으로써, 식물체에서 상기 펩티드를 이용하여 식물체 엽록체로부터 목적 단백질을 효율적으로 대량 생산할 수 있으므로, 산업적으로 값비싼 단백질을 대량생산하는데 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 엽록체 적응 펩티드들의 세포 내 적응 장소(subcellular localization)를 탐색하기 위한 다양한 조합의 재조합 벡터의 모식도이다.

도 2A는 *OsPSY2*(*Oryza sativa* Phytoene synthase 2) 유전자에서 동정된 엽록체 내 플라스토글로불(Plastoglobules, PG) 적응배열인 PTP가 제거된 *OsPSY2*(Δ PTP)를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 벼 원형질체의 공초점 현미경 관찰 결과로, Red는 mCherry의 형광이고, Blue는 엽록체 내 엽록소(chlorophyll) 자연형광을 나타낸다. PG: 플라스토글로불, Cy: 세포질. 스케일 바 = 5 μ m. 도 2B는 각각의 재조합 벡터로 형질전환된 벼 원형질체로부터 단백질을 추출하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과이며, 도 2C는 *OsPSY2* 단백질에서 PTP의 위치 및 막관통영역(transmembrane domain, TM)의 위치를 보여준다.

도 3은 *OsPSY2*의 두 번째 막관통영역 TM2(20개 아미노산)를 포함하도록 제작된 적응배열 PTM2 및 세 번째 막관통영역 TM3 서열로 이루어진 PTM3(19개 아미노산) 적응배열 코딩 서열을 포함하는 재조합 벡터와 *OsPSY2*:mCherry로 공동-형질전환된 벼 원형질체의 공초점 현미경 관찰 결과이다. St: 스트로마, PG: 플라스토글로불. 스케일 바 = 5 μ m.

도 4는 *OsPSY2*의 막관통영역(TM1, TM2, TM3)을 포함하는 적응배열(PTM1, PTM2, PTM3) 코딩서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 벼 원형질체의 웨스턴 블랏 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 RTp(transit peptide of rice RuBisCO small subunit) 코딩 서열; 목적 단백질을 코딩하는 유전자; 및 PTM3(Transmembrane domain 3 of *OsPSY2*) 코딩 서열;이 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는, 목적 단백질을 식물세포 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하기 위한 재조합 벡터를 제공한다.

- [0014] 본 발명은 또한, RTp 코딩 서열; TM2(Transmembrane domain 2 of *OsPSY2*)를 포함하는 트랜지트 펩티드 코딩 서열; 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자;가 순차적으로 연결된 것을 특징으로 하는, 목적 단백질을 식물세포 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하기 위한 재조합 벡터를 제공한다.

- [0015] 본 발명에 따른 재조합 벡터에 있어서, 상기 RTp, PTM2 및 PTM3는 트랜지트 펩티드(transit peptide)로, RTp는 목적 단백질을 엽록체로 타겟팅하는 트랜지트 펩티드이며, PTM2 및 PTM3는 목적 단백질을 엽록체 내 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하는 트랜지트 펩티드이다.

- [0016] 본 발명의 RTp, PTM2 또는 PTM3는 각각 벼 RuBisCO small subunit의 N-말단, *OsPSY2*(*Oryza sativa* Phytoene synthase 2) 단백질의 두 번째 막관통영역(transmembrane domain)을 포함하는 서열 및 세 번째 막관통영역의 서열이며, 바람직하게는 각각 서열번호 2, 서열번호 4 및 서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. PTM2의 경우 서열번호 4의 아미노산 서열에서 1 내지 20번째 아미노산이 막관통영역이다. 또한, 본 발명의 PTM3는 TopPred 1.0 (<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred>), TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 및 HMMTOP (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>) 툴을 이용하여 예측된 *OsPSY2*의 세 번째 막관통영역 서열에서 중복되는 서열만을 사용한 것이다.

- [0017] 또한, 상기 RTp, PTM2 또는 PTM3를 코딩하는 서열은 각각 서열번호 1, 서열번호 3 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 RTp, PTM2 또는 PTM3를 코딩하는 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상동체는 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1, 서열번호 3 또는 서열번호 5의 염기서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열이다. 구체적으로, 상기 염기서열은 서열번호 1, 서열번호 3 또는 서열번호 5의 염기서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서

열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다.

- [0018] 용어 "트랜지트 펩티드(transit peptide)"는 전구체 단백질을 엽록체로 이동할 수 있도록 지시하는 타겟팅 서열을 의미한다. 식물체에 존재하는 단백질들 중에서 엽록체로 이동될 단백질들은 트랜지트 펩티드라고 부르는 전구체 시퀀스가 단백질의 아미노 말단에 존재하고 있어 이를 단백질 이동 표지로 이용함으로써 단백질이 엽록체로 이동할 수 있도록 시스템화 되어져 있다. 그러나 이러한 트랜지트 펩티드들은 여러 종류의 엽록체 단백질들 간에 특별히 보존된 시퀀스가 없다.
- [0019] 엽록체는 식물세포 한 개 당 적게는 10개에서 많게는 100개 정도로 세포내에 독립적 공간으로 존재하기 때문에 특정 물질을 대량 생산하기에 매우 좋은 장소이다. 따라서 엽록체 내의 세분화된 기관(예, 스트로마, 틸라코이드 또는 플라스토글로불리 등)으로 운반되는 엽록체 타겟팅 트랜지트 펩티드가 있다면, 이 트랜지트 펩티드에 생산하고자 하는 목적 단백질을 연결하여 세포 내에서 목적 단백질의 발현을 유도한 후 엽록체로 이동 및 축적시켜 엽록체 내에서 목적 단백질을 대량으로 생산할 수 있을 것이다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 벡터에서, 상기 재조합 벡터는 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하는 것을 특징으로 한다. "플라스토글로불리(plastoglobuli)"는 호고장성인 엽록체의 기질에서 발견되는 지질이 주성분으로 된 작은 구형 구조물로서, 엽록체가 나이를 먹어서 커져서 카로티노이드가 축만하거나 유색체로 변하기도 한다.
- [0021] 본 발명의 용어 "목적 단백질"은 당업자가 대량으로 생산하고자 하는 단백질로서, 재조합 벡터에 상기 목적 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 삽입하여 형질전환체에서 발현이 가능한 모든 단백질을 의미한다.
- [0022] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0023] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0024] 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 계놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- [0025] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(Hygromycin), 클로람페니콜(Chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있

기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0027] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(nopaline syntase, NOS), 베타-아밀라아제 RAm1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투머파시엔스(*A. tumefaciens*)의 옥토파인 신타아제(octopine synthase) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0028] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 이동 및 축적시켜 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량으로 생산하는 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 재조합 벡터를 식물 숙주세포 내로 운반하는 방법은 미세주입법(Capecci, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘포스페이트 침전법(Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법(Wong, T.K. et al., Gene, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)) 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990)) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명의 일 구현 예에 따른 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량으로 생산하는 방법은, 본 발명에 따른 트랜지트 펩티드의 엽록체 내 플라스토글로불리로의 운반 기능 분석을 위해, 시간적으로 효율적이고 기술 적용이 가능한 식물종 범위가 넓은 뿐 아니라 식물체로의 재분화가 용이한 원형질체(protoplast)를 이용한 형질전환 방법을 선택하였다. 구체적으로는, 수행 장소에 제한이 많은 전기천공법 보다는 보편적으로 쉽게 수행될 수 있는 화학적 삼투압 방법 즉, PEG(polyethylene glycol)에 의한 삼투압 방법을 선택하여 목적 단백질의 '일시적 발현(transient expression)'을 유도하였다.

[0031] 식물의 엽록체는 광합성을 담당하는 기관으로서 식물 세포의 총 단백질 중 40% 이상이 엽록체 단백질일 정도로 단백질 저장 능력이 뛰어나기 때문에 외래 단백질의 저장소로 좋은 타겟이 되고 있다. 또한 엽록체는 자체적으로 계놈을 가지고 있어서 스스로 유전정보를 전자 번역하여 단백질을 생산할 능력이 있다. 그러나, 상기와 같은 장점에도 불구하고 엽록체 형질전환은 이중막 구조의 세포막이 물리적 장벽으로 작용하는 관계로 외래 단백질을 벡터에 결합시켜 도입하는데 어려움이 있다. 이러한 어려움을 극복하기 위해, 현재는 금속의 미립자에 유용한 유전자를 결합시켜, 그 미립자를 고압가스의 힘으로 농작물의 잎 절편 등에 밀어 넣어 유전자가 들어가도록 하는 방법인 '입자 총' 및 '유전자 총' 기술(biolistic method)(Maliga P, 2003 Trends Biotechnol. 21, 20-28)을 이용하고 있으나, 상기 입자 총 방법 등은 고가의 장비가 필요하며 효율이 낮고 고도의 숙련기술이 필요하는 등 문제점이 있다. 그러나, 본 발명에 따른 트랜지트 펩티드(transit peptide)를 코딩하는 염기서열을 포함하는 목적 단백질 발현용 재조합 벡터를 이용할 경우, 저비용 고효율로 목적 단백질 대량생산이 가능하므로, 매우 유용하다.

[0032] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 이동 및 축적시켜 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량 생산하는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0033] 본 발명의 제조방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, PEG(polyethylene glycol)에 의한 삼투압 방법 또는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*A. tumefaciens*)에 의해 매개될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 또한, 본 발명의 제조방법은 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0035] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물세포"는 어떤 식물세포도 된다. 식물세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 열매, 줄기,

있, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체, 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한, 상기 제조방법으로 제조된 목적 단백질을 엽록체의 플라스토글로불리에서 대량 생산하는 형질 전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다. 상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양과 등의 단자엽 식물 또는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 무, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있고, 바람직하게는 벼(*Oryza sativa*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0037] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터를 유효성분으로 포함하는, 목적단백질을 식물세포 엽록체의 플라스토글로불리(plastoglobuli)로 타겟팅하기 위한 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 RTp(transit peptide of rice RuBisCO small subunit) 코딩 서열; 목적 단백질을 코딩하는 유전자; 및 PTM3(Transmembrane domain 3 of OsPSY2) 코딩 서열;이 순차적으로 연결된 재조합 벡터, 또는 RTp 코딩 서열; TM2(Transmembrane domain 2 of OsPSY2)를 포함하는 트랜지트 펩티드 코딩 서열; 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자;가 순차적으로 연결된 재조합 벡터를 포함하여, 이를 식물체에 형질전환시킴으로써 목적 단백질을 식물세포의 엽록체 내 플라스토글로불리로 타겟팅할 수 있는 것이다.

[0038] 본 명세서에서 용어 '타겟', '적중' 및 '표적'은 혼용되어 사용될 수 있고, 목적 단백질을 최종적으로 엽록체의 플라스토글로불리로 이동 및 축적시키는 것을 의미한다. 또한, 용어 '적중배열'은 '트랜지트 펩티드'와 동일한 의미로 사용하였다.

[0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 재료 및 방법

[0041] *OsPSY2* 유전자(*Os12g43130*)로부터 막관통영역(Transmembrane domain)을 동정하여 35S 프로모터가 있는 식물발현벡터 pB2GW7에 게이트웨이 시스템을 사용하여 클로닝 하였으며(도 1), 벼 종자 파종 후 10일 된 식물체 잎 조직을 셀룰라아제와 마세로자임(macerozyme) 등의 분해효소 용액에서 반응시킴으로써 세포벽이 제거된 벼 원형질체(protoplast)를 준비하여 PEG(Polyethylene glycol)를 이용한 삼투압작용으로 목적 운반체를 형질전환하였다. 이후, 공초점 현미경(Confocal microscopy; LSM 800, Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 GFP 및 mCherry 단백질의 세포내 형광신호를 관찰하여 적중 장소를 동정하였다. 또한, 형질전환된 원형질체로부터 총 단백질을 추출하여 anti-GFP, anti-mCherry 또는 anti-actin 항체를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 상기 클로닝, 원형질체 준비, 형질전환, 공초점 현미경 관찰 및 웨스턴 블랏은 이전의 연구 논문(You et al., *Int. J. Mol. Sci.* (2017) 18, 18)의 방법에 따라 수행되었다.

[0042] 실시예 1. *OsPSY2*로 부터 신규 플라스토글로불(plastoglobule, PG) 적중배열 존재 확인

[0043] *OsPSY2*(*Oryza sativa* Phytoene synthase 2) 유전자에서 동정된 PG 적중배열(트랜지트 펩티드, transit peptide)인 PTP가 제거된 *OsPSY2*(Δ PTP)에 mCherry 형광단백질을 융합하여 벼 원형질체에 발현시켜 형광단백질의 세포 내 적중장소를 확인해 본 결과, 형광 신호가 모두 세포질에서만 관찰되어 엽록체 안으로 전혀 적중되지 않는다는 것이 확인되었다. 이에 반해 엽록체 적중배열인 RTp(transit peptide of RuBisCO small subunit)와 융합하여 적중장소를 확인해 본 결과, PTP가 제거되었음에도 불구하고 RTp 적중배열 외 *OsPSY2*(Δ PTP):mCherry 단백질이 PG에서 발견되는 것이 확인되었다(도 2A). 상기 결과를 통해 PTP 이외에도 *OsPSY2*에 다른 PG 적중기능을 하는 신호배열이 존재한다는 것이 입증되었다.

[0044] 본 발명자는 PTP/stPTP 이외에 PG 적중 기능을 하는 신호배열로서 PG가 단일막구조로서 엽록체 내 틸라코이드 막에서 유래한다는 점을 고려하여 *OsPSY2* 단백질의 막관통영역(transmembrane domain, TM)이 중요한 기능을 할 수도 있을 것이라 추정하고 *OsPSY2*의 아미노산 서열을 분석해본 결과, *OsPSY2*에는 3개의 TM(이하, TM1, TM2 및 TM3)이 존재하는 것으로 분석되었다(도 2C). 그 중 TM1 및 TM2는 PTP 내에 포함되어 있기 때문에 3번째 TM인 TM3가 *OsPSY2*(Δ PTP):mCherry 단백질의 PG 적중에 중요한 역할을 했을 것으로 추정하여 TM3를 포함하는 적중배열 PTM3의 PG 적중 기능을 확인하기 위하여 sGFP(Superfolder Green fluorescent protein) 형광단백질에 융합하여 벼 원형질체에 발현시켜 형광단백질의 세포내 적중 장소를 확인해 보았다.

[0045] **실시예 2. OsPSY2의 막관통영역으로부터 신규 플라스토글로불 적중배열 동정**

[0046] 실시예 1에서 OsPSY2의 세 번째 막관통영역을 포함하는 적중배열 PTM3에 융합된 sGFP 단백질의 형광신호가 엽록체 내 PG에서 관찰됨으로서(도 3), PTM3이 PG 적중신호로서의 기능을 가지고 있다는 것이 확인되었다. 또한, PTM3의 위치가 OsPSY2의 뒷부분에 위치하고 있다는 점을 고려하여 PTM3을 sGFP 형광단백질 앞과 뒤에 융합하여 각각 엽록체 내 PG로의 적중기능을 분석한 결과, PTM3의 융합 위치가 엽록체 내 적중 위치에 매우 중요하다는 사실이 확인되었다. 도 3에 개시된 것과 같이, PTM3이 sGFP의 앞에 융합되었을 때에는 관찰되는 형광신호가 거의 없을 뿐 아니라 관찰이 되더라도 형광신호가 매우 약해보이는 양상이 확인되어, PTM3은 목적 단백질 뒤에 위치할 경우에만 PG 적중배열로서의 효율이 매우 높은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통하여 OsPSY2의 PTM3을 엽록체 내 PG로 목적 단백질을 적중시킬 수 있는 신규 PG 적중배열로서 동정하였다.

[0047] **실시예 3. 기존 플라스토글로불 적중배열 PTP 내 막관통영역 분석을 통한 추가적인 신규 플라스토글로불 적중배열 동정**

[0048] OsPSY2로부터 처음으로 PG 적중배열로서 동정되었던 PTP에는 2개의 막관통영역이 존재하는 것이 확인되었고(도 2C), 웨스턴블랏(western blot) 결과(도 2B) OsPSY2:mCherry(72 kDa)이 PG 적중 후 70 kDa 보다 작지만 OsPSY2(Δ PTP):mCherry(63.41 kDa) 보다 큰 것으로 확인되어 PTP 배열 기능이 엽록체와 PGs 적중기능으로 이원화되어 있을 가능성이 확인되면서, OsPSY2가 엽록체로 적중 될때 PTP 내의 엽록체 적중기능 배열이 먼저 제거되고 PTP의 남아 있는 배열이 엽록체 내 PGs로 적중 기능에 중요한 역할을 하는 것으로 추정되었고, PTP의 두 번째 막관통영역인 TM2가 그 역할을 할 것이라 생각하여, 상기 TM2를 포함하여 제작된 적중배열 PTM2와 sGFP 형광단백질에 융합하여 세포 내 적중 장소를 확인해 보았다. 또한, PTM2만으로는 엽록체 내로 적중될 수 없다고 예상되어 엽록체 적중 배열인 RTP (Transit peptide of RuBisCO small subunit)도 함께 융합되도록 하였다.

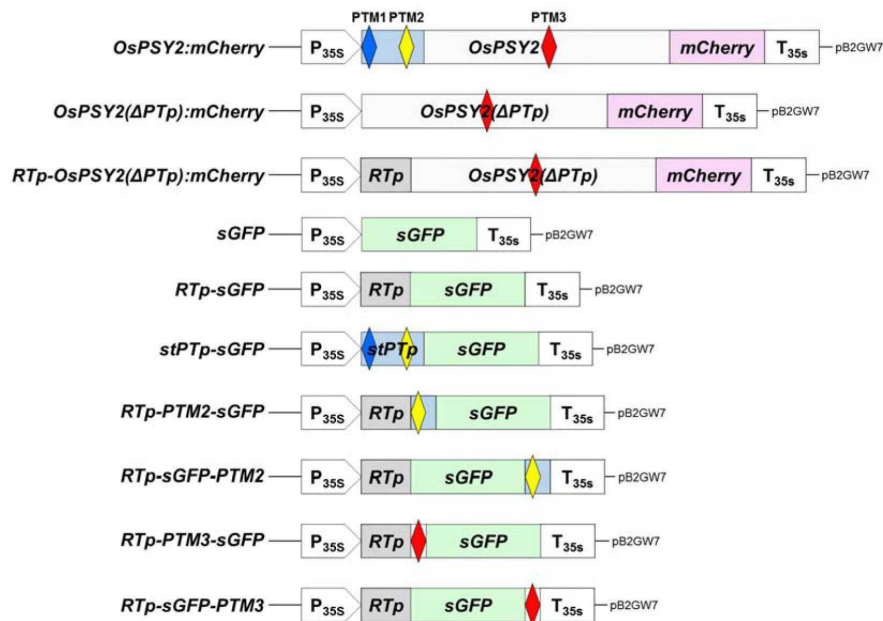
[0049] PTM2에 의한 sGFP의 세포 내 적중장소를 분석한 결과, 도 3에 개시된 것과 같이 RTP와 융합된 PTM2의 형광신호는 기존에 보고된 PTP/stPTP의 적중유도 양상과 유사하게 세포의 엽록체 내 플라스토글로불과 스트로마에 적중되는 것으로 확인되었다. 또한, 도 2에서 확인된 PTM3의 경우와 같이 PTM2도 목적 단백질의 앞·뒤에서 위치할 때에 각각의 세포 내 적중효율이 다를 수 있을 것이라 예상하고 RTP와 sGFP 형광단백질 앞 또는 뒤에 PTM2가 위치하도록 재조합 벡터를 제작하여(도 1) 세포 내 적중장소를 확인하였다. 그 결과, PTM2가 목적 단백질 뒤에 있을 때에는 PGs 적중양상이 전혀 발견되지 않고 온전히 엽록체 내 스트로마에 적중되었고(도 3), 이것으로 PTM3와는 다르게 PTM2는 목적 단백질의 앞에 위치할 경우에만 PGs 적중배열로서 역할을 할 수 있다는 것이 확인되었다. 이러한 결과를 통하여 PTM2는 PTP/stPTP 적중배열의 엽록체 내 플라스토글로불로의 적중 유도 기능의 주요한 영역이라는 사실을 확인되었고, 최종적으로 PTM2 배열을 PTM3 외 추가적인 신규 PG 적중배열로 동정하였다.

[0050] **실시예 4. 본 발명에서 개발된 신규 엽록체 내 스트로마 및 플라스토글로불 적중배열들의 발현양상 비교 분석**

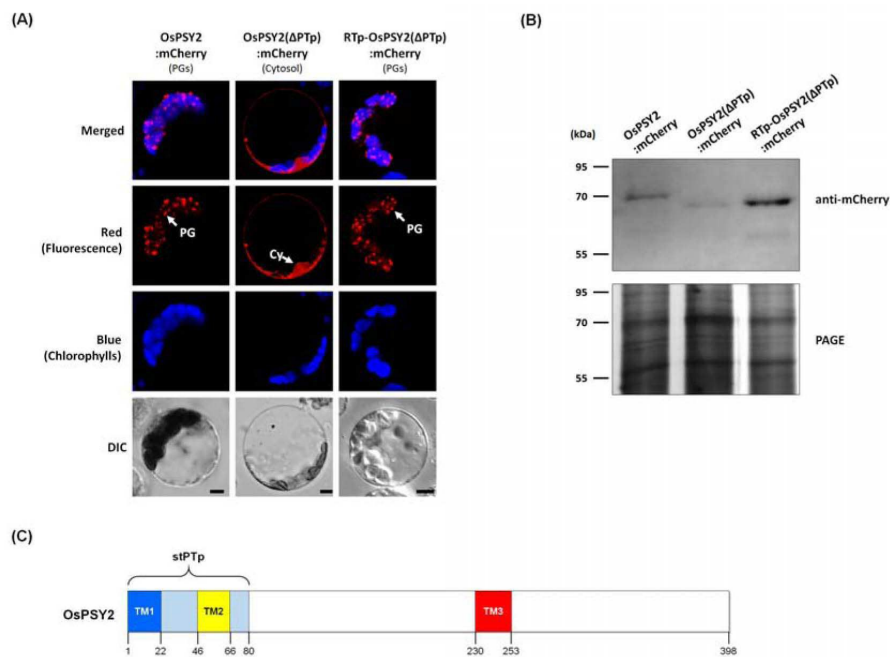
[0051] OsPSY2의 막관통영역 TM1, TM2 및 TM3을 포함하는 적중배열 PTM1, PTM2 및 PTM3의 세포내 적중 기능 및 목적 단백질 융합 위치 분석 후 최종 선별된 RTP-PTM2:목적 단백질(sGFP) 및 RTP-목적 단백질(sGFP):PTM3 적중배열 조합과 stPTP 적중배열의 단백질 발현 양상의 비교해본 결과(도 4), PTM2와 PTM3 모두 목적 단백질 크기에 영향을 주지 않으면서 성공적으로 PG로 적중시킬 수 있는 기능을 할 수 있을 뿐 아니라 대조군으로 사용된 sGFP와 RTP-sGFP의 발현율과 비슷하게 목적 단백질(sGFP)을 효율적으로 발현시키고 있다는 것이 확인되었다.

도면

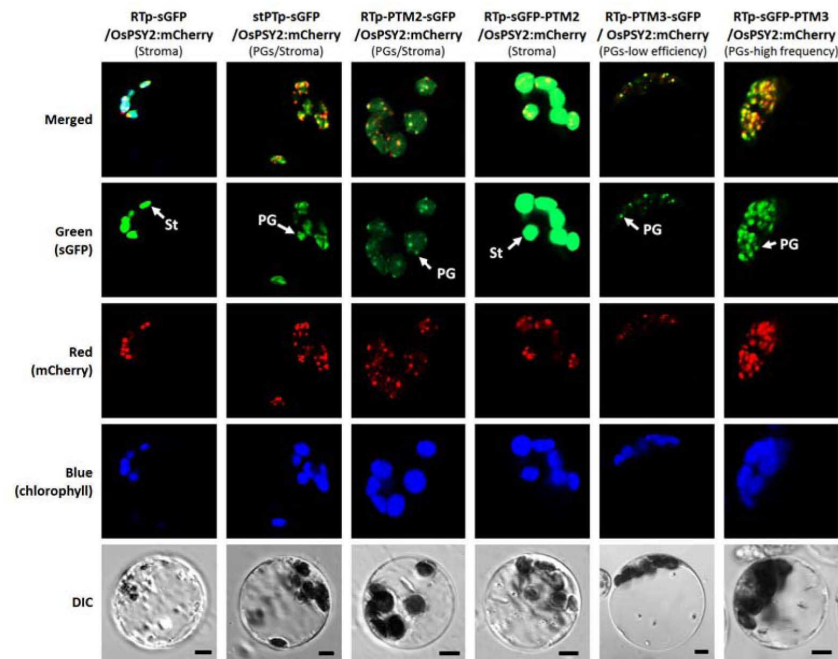
도면1



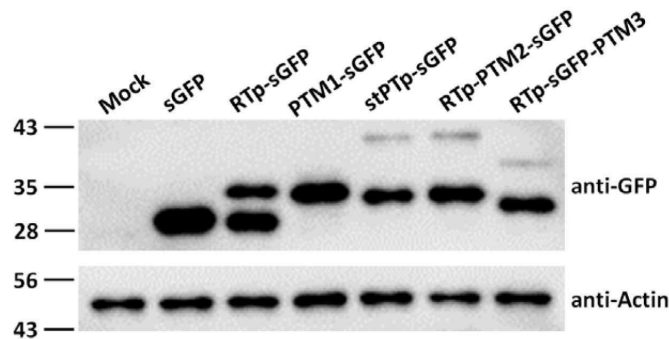
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Transit peptide for targeting to plastoglobuli in chloroplast and uses thereof
- <130> PN19402
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 153
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RTp

<400> 1

atggcgcgcc cctccgtgat ggcgtcgtcg gccaccaccg tcgtccctt ccaggggctc	60
aagtccaccg ccggcatgcc cgtcgcccg cgctccggca actccagctt cggcaacgtc	120
agcaatggcg gcaggatcag gtgcatgcag gcc	153

<210> 2

<211> 51

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Ala Ala Pro Ser Val Met Ala Ser Ser Ala Thr Thr Val Ala Pro	
1 5 10 15	
Phe Gln Gly Leu Lys Ser Thr Ala Gly Met Pro Val Ala Arg Arg Ser	
20 25 30	
Gly Asn Ser Ser Phe Gly Asn Val Ser Asn Gly Gly Arg Ile Arg Cys	
35 40 45	
Met Gln Ala	
50	

<210> 3

<211> 105

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PTM2

<400> 3

gtgaggccgc tgcaggccgc gagcctggcg gtggccacgg cgccggttgc tgttgcacg	60
agaagaacag ctgctgagga ggctgtttac gaagtcgttc ttaga	105

<210> 4

<211> 35

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 4

Val Arg Pro Leu Gln Ala Ala Ser Leu Ala Val Ala Thr Ala Pro Val

1 5 10 15
 Ala Val Ala Ser Arg Arg Thr Ala Ala Glu Glu Ala Val Tyr Glu Val
 20 25 30

 Val Leu Arg
 35
 <210> 5
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PTM3
 <400> 5
 gagctctacc tctactgcta ctacgttgct ggcacggttg gtctcatgac agtaccg 57
 <210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa
 <400> 6
 Glu Leu Tyr Leu Tyr Cys Tyr Tyr Val Ala Gly Thr Val Gly Leu Met
 1 5 10 15
 Thr Val Pro