



- (51) 국제특허분류:
A01N 63/00 (2006.01) A01P 21/00 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/012140
- (22) 국제출원일: 2014년 12월 10일 (10.12.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0156634 2013년 12월 16일 (16.12.2013) KR
- (71) 출원인: 세종대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIA COOPERATION GROUP OF SEJONG UNIVERSITY) [KR/KR]; 143-747 서울시 광진구 능동로 209, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 소문수 (SOH, Moon Soo); 143-762 서울시 광진구 군자로 12길 46 일성아파트 102-710, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

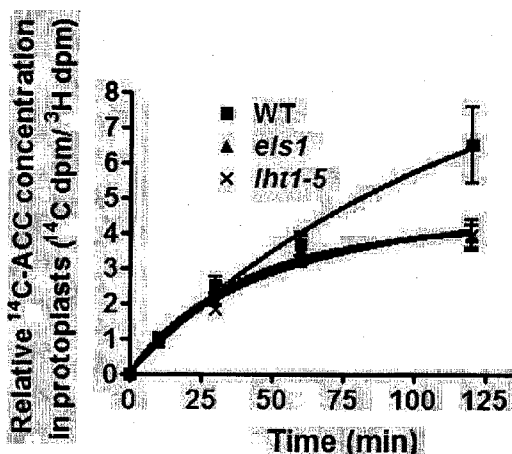
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: NOVEL USE OF LHT1 GENE AS ACC CARRIER

(54) 발명의 명칭: LHT1 유전자의 ACC 수송체로서의 신규한 용도

도 7



(57) Abstract: The present invention relates to: a composition for accelerating the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) absorption of a plant and a method for accelerating the absorption; and a composition for inhibiting the ACC absorption of a plant and a method for inhibiting the absorption. The present invention can effectively regulate the transport or absorption of the ethylene precursor, ACC, which is a main plant hormone involved in the environmental stress resistance and growth development process of higher plant life, so as to effectively control the synthesis of ethylene and various biochemical mechanisms in a plant in which ACC is involved, thereby obtaining a plant with a desired phenotype.

(57) 요약서: 본 발명은 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 촉진용 조성물 및 흡수 촉진 방법과, 식물체의 ACC 흡수 억제용 조성물 및 흡수 억제 방법에 관한 것이다. 본 발명은 고등식물의 환경 스트레스 내성 및 성장·발달 과정에 관여하는 주요 식물 호르몬인 에틸렌의 전구체 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)의 수송 또는 흡수를 효율적으로 조절함으로써, 에틸렌의 합성 뿐 아니라 ACC가 관여하는 식물체 내 다양한 생화학적 기작을 효율적으로 제어하여 원하는 표현형의 식물체를 수득할 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

LHT1 유전자의 ACC 수송체로서의 신규한 용도

5

【기술 분야】

본 발명은 LHT1 유전자의 발현을 조절함으로써 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)의 식물체 내 수송 또는 흡수를 조절하는 방법에 관한 것이다.

10

【배경 기술】

에틸렌은 식물이 끊임없이 변화하는 주변 환경의 변화에 대한 식물의 적응에 있어 중추적인 역할을 한다. 이 식물 호르몬은 생물학적/비생물학적 스트레스에 대한 내성을 조절할 뿐 아니라 고등식물의 성장 및 발달에 있어서 다양한 부분에 관여한다(Bleecker and Kende, 2000; Guo and Ecker, 2004). 예를 들어, 에틸렌은 ABA에 길항적으로 작용함으로써 종자의 발아를 촉진한다(Beaudoin et al., 2000). 발아단계에서, 에틸렌은 세가지 반응을 일으키는데, 이는 배축을 두껍게 하며, 뿌리의 신장을 억제하고, 암조건에서 자란 종자의 정단 후크(apical hook)를 과대화시키는 것이다(Guzman and Ecker, 1990). 에틸렌은 또한 잎이 나이에 따라 잎의 성장을 억제하고 노화를 촉진하며(Kieber et al., 1993; Kim et al., 2009), 개화시기의 조절에 관여하여 애기장대의 추대(bolting)를 지연시킨다(Achard et al., 2007; Zhu et al., 2013). 생식기간에 에틸렌은 꽃 기관의 이탈/성숙을 촉진한다(Patterson and Bleecker, 2004; Chen et al., 2011).

분자 유전학적 접근을 통해 식물이 에틸렌에 반응하는 기작을 점차 이해하게 되었다.

상기 세가지 반응이 결실된 유전적 변이가 발견되어 이는 ER-위치 수용체에서 시작되어 1차 전사조절자 EIN3/EIL의 활성화에 이르는 고등식물에서의 표준적 에틸렌-신호경로를 밝히는 수단이 되고 있다(Roman

et al., 1995; Chen et al., 2005). 이러한 뚜렷한 전사 결과물에는 NACs, ERFs 및 EDFs 등의 전사인자 패밀리가 포함되며, 이들은 발생 네트워크로의 통합 뿐 아니라 다양한 에틸렌-의존성 반응을 뒷받침하고 있다(Schaller, 2012; Merchante et al., 2013). 다른 식물 호르몬 및 환경자극을 포함하는 몇몇 발생학적 신호는 에틸렌 생합성에 영향을 미친다. 일반적으로, 에틸렌에 의해 조절되는 대부분의 식물 반응은 에틸렌 생합성 증가를 수반한다(Yang and Hoffman, 1984; Zarembinski and Theologis, 1994). S-아데노실 메치오닌(S-adenosyl methionine)이 에틸렌 전구체인 ACC(1-aminocyclo propane-1-carboxylic acid)로 전환되는 것은 ACC 합성효소에 의해 촉매되는 속도결정단계(rate-limiting step)이다. 이후, ACC는 ACC 산화효소(ACC oxidases, ACOs)에 의해 에틸렌으로 변환된다. 분자 유전학 및 생화학적 분석 결과 ACS 및 ACO 유전자 패밀리에 대한 다층적인 정교한 전사 및 전사 후 조절이 존재함이 밝혀졌다(Tsuchisaka and Theologis, 2004; Argueso et al., 2007).

에틸렌의 생합성 뿐 아니라, 그 전구체의 수송도 특정 환경 또는 발달 상황 하에서 차별적인 에틸렌 생합성/반응에 기여할 것으로 생각된다(Kiss and Koning, 1989; Finlayson et al., 1991; Jackson, 2002). 예를 들어, ACC는 담수 또는 염분에 노출된 식물의 목질부 수액에서 검출된다(Bradford and Yang, 1980; Else et al., 1995). *Zinnia elegans*에서, 관상요소(tracheary elements)로 분화하는 세포 배양액의 세포외 배양물에서의 ACC의 축적은 측분비(paracrine) 모드의 표지자가 된다(Pesquet and Tuominen, 2011). 이전의 생리학적 분석 결과는 아미노산 수송체의 특성을 가지는 ACC 수송 시스템의 존재를 시사하였으나(Lürssen, 1981; Saftner, 1994), 이러한 ACC 수송체의 분자적 특성은 밝혀지지 않았다.

이에, 본 발명자들은 다양한 ACC-저항성 표현형을 보이는 *Arabidopsis thaliana*의 유전적 변이인 *els1*(early leaf senescence 1)를 동정하였다. 호르몬 민감성 실험을 통해 *els1*이 ACC에 대한 저항성을 유발하나 에틸렌이나 다른 식물 호르몬에 대한 저항성을 유발하지 않는다는 것을 확인하였다.

돌연변이 유전자 분리 및 유전적 상보성 실험 결과, 아미노산

트랜스포터를 인코딩하는 *LHT1*이 상기 돌연변이의 원인임이 밝혀졌다. 유전적 분석결과와 함께 생리학적 및 생화학적 분석결과는 *LHT1*이 애기장대에서 ACC의 섭취에 관여함을 보여준다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명자들은 고등식물의 다양한 생물학적/비생물학적 스트레스에 대한 내성을 조절하고 성장 및 발달 과정에 관여하는 식물 호르몬인 에틸렌의 전구체인 ACC(1-aminocyclo propane-1-carboxylic acid)의 생성 또는 흡수를 효율적으로 조절하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 아미노산 트랜스포터를 인코딩하는 *LHT1* 유전자가 식물체 내에서 ACC의 섭취에 관여하여 결과적으로 에틸렌의 생성을 비롯한 다양한 생화학적 기작을 조절할 수 있다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 촉진용 조성물 및 흡수 촉진 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 억제용 조성물 및 흡수 억제 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 기술되어 있다.

【기술적 해결방법】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 촉진용 조성물을 제공한다.

- 5 본 발명자들은 고등식물의 다양한 생물학적/비생물학적 스트레스에 대한 내성을 조절하고 성장 및 발달 과정에 관여하는 식물 호르몬인 에틸렌의 전구체인 ACC(1-aminocyclo propane-1-carboxylic acid)의 수송 또는 흡수를 효율적으로 조절하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 아미노산 트랜스포터를 인코딩하는 *LHT1* 유전자가
- 10 식물체 내에서 ACC의 섭취에 관여하여 결과적으로 에틸렌의 생성을 비롯한 다양한 생화학적 기작을 조절할 수 있다는 사실을 발견하였다.

- 본 발명에 따르면, 서열목록 제2서열의 아미노산은 서열은 *LHT1* 단백질의 아미노산 서열이며, 상기 아미노산 서열을 코딩하는
- 15 뉴클레오타이드 서열을 식물체에서 과발현시킴으로써 ACC의 흡수를 촉진할 수 있다. 증가된 ACC는 ACC 산화효소(ACO)에 의해 에틸렌으로 변환됨으로써 에틸렌이 관여된 환경 스트레스 반응성 등을 조절할 뿐 아니라 에틸렌과 무관하게 ACC가 직접적으로 관여하는 다양한 발아 및 성장 단계에서의 생화학적 신호 기작을 조절할 수 있다.

- 20 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 서열목록 제2서열의 아미노산은 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열이며, 서열목록 제1서열은 *LHT1* 유전자의 뉴클레오타이드 서열이다.

- 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에
- 25 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.

- 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈 (예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에
- 30 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.

상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 사용되는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을

5 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다.

10 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443 (1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31 (1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44 (1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90 (1988);

15 Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65 (1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31 (1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and

20 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

본 명세서에서, 용어 “식물(체)”는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한

25 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.

본 발명에서 형질전환의 대상이 되는 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 쌀, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및

30 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무,

대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명의 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid) 흡수 촉진용 조성물을 제공한다.

본 명세서에서 용어 “작동적으로 결합”은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.

본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있다.

본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, PM 프로모터, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 컬리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 센타아제 (nos) 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러스 프로모터, 리블로오스-1,5-비스-포스페이트 카르복실라아제 스몰 서브유닛 (ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리오스포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라비도시스 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터 및 옥토판인 신타아제

프로모터를 포함한다.

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열은 아그로박테리움 투메파시엔스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것 (NOS 3' end) (Bevan et al. *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385 (1983)), 아그로박테리움 튜머페이션스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분, CaMV 35S 터미네이터 및 OCS 터미네이터 (octopine synthase terminator) 서열을 포함한다.

- 10 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반할 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제 (예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자 (예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*npt II*), 하이그로마이신
- 15 포스포트랜스퍼라아제 (*hpt*), 등)를 포함할 수 있다.

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 식물발현용 재조합벡터로서 아그로박테리움 (*Agrobacterium*) 바이너리 벡터를 이용할 수 있다.

- 본 명세서에서 용어 “바이너리 벡터”는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는데 필요한 유전자를 가진 플라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말한다. 본 발명의 형질전환용 아그로박테리움은 본 발명의 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 것이면 어느 것이라도 좋고, 예를 들어 본 발명에서
- 25 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404을 사용할 수 있다.

- 본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation),
- 30 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method) 및 열충격법(heat shock) 등이 있다. 구체적으로는

전기천공법(electroporation)을 사용한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 촉진방법을 제공한다.

본 발명에서 이용되는 아미노산 서열, 뉴클레오타이드 서열 및 이들을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

특정 뉴클레오타이드 또는 이를 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 식물세포에 도입하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시될 수 있다.

형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (nptII) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다 (참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 *LHT1* 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 억제용 조성물을 제공한다.

본 발명에 따르면, *LHT1* 유전자의 기능이 소실된 *els1*(early leaf senescence 1) 돌연변이가 식물체 내에서 에틸렌의 전구체인 ACC-특이적인 반응(ACC-induced triple response)이 결여되며, 이는 상기 돌연변이에서 ACC 흡수가 정상적으로 일어나지 못하기 때문임을 실험적으로 확인하였다. 따라서, *LHT1* 유전자의 발현을 억제할 경우 ACC가 관여된 식물체 내 다양한

생화학적인 기작이 효율적으로 억제되어 원하는 표현형의 식물체를 수득할 수 있다.

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 억제하고자 하는 *LHT1* 유전자는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.

5 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 발현 억제 핵산 분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 보다 구체적으로는, 상기 핵산 분자는 T-DNA이다.

10 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자

15 siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 쌍을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면

20 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟

25 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도

30 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

본 명세서에서 용어 “shRNA”는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, *in vivo* 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.

본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 유전자 발현을 조절하며, 전장 20-50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-45개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 20-40개 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 20-30개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21-23개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥 RNA분자를 의미한다. miRNA는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.

본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.

본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장

흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라

5 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.

본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여

10 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 올리고뉴클레오타이드 본 발명의 안티센스 뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.

15 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 10 내 40 염기이다.

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995).

20 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된

25 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

30 본 명세서에서 용어 “T-DNA”는 *Agrobacterium* 종의 Ti(tumor-inducing) 플라스미드의 전달(transfer) DNA로서 숙주 식물세포의 핵으로

전달되는 DNA 절편을 말한다. T-DNA의 양 끝 가장자리에는 25 bp의 반복서열이 존재하며, 전달은 왼쪽 경계(border)에서 전달이 시작되어 오른쪽 경계에서 종료된다. 박테리아 T-DNA는 약 20,000 bp 길이로서 이들의 삽입에 의하여 타겟 유전자를 붕괴시킴으로서 삽입
 5 돌연변이(insertional mutagenesis)를 일으키는 데에 사용되며, 삽입된 T-DNA 서열은 돌연변이를 일으킬 뿐 아니라 타겟 유전자를 표지하기도 한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명의 핵산분자; (b) 상기 핵산분자에 작동적으로 결합(operatively
 10 linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 억제용 조성물을 제공한다.

15 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 억제방법을 제공한다.

본 발명에서 이용되는 핵산분자, 식물발현용 재조합 벡터 및 이를 식물체에 도입하는 방법은 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기
 20 위하여 그 기재를 생략한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 식물체의 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 촉진용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:

25 (a) *LHT1* 유전자를 포함하는 식물세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 *LHT1* 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계, 상기 *LHT1* 유전자의 발현량 또는 활성이 증가되는 경우에는 상기 시료는 식물체의 ACC 흡수 촉진용 조성물로 판정된다.

30 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 증가”란 식물 세포 내에서 *LHT1* 유전자의 발현, 이로 인하여 생산된 단백질 수준 또는 그 활성이 본

발명의 분석하고자 하는 시료를 접촉시키지 않은 대조군 식물세포에 비하여
유의하게 증가된 경우를 의미하며, 보다 구체적으로는 발현량 또는 활성이
140% 이상으로 증가된 경우를 의미하고, 보다 더 구체적으로는 170% 이상
증가한 경우를 의미하며, 가장 구체적으로는 200% 이상 증가된 경우를
5 의미한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를
포함하는 식물체의 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수
억제용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:

10 (a) *LHT1* 유전자를 포함하는 식물세포에 분석하고자 하는 시료를
접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 *LHT1* 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계, 상기
LHT1 유전자의 발현량 또는 활성이 감소되는 경우에는 상기 시료는
식물체의 ACC 흡수 억제용 조성물로 판정된다.

15 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 감소”란 식물 세포 내에서
LHT1 유전자의 발현, 이로 인하여 생산된 단백질 수준 또는 그 활성이 본
발명의 분석하고자 하는 시료를 접촉시키지 않은 대조군 식물세포에 비하여
유의하게 감소된 경우를 의미하며, 보다 구체적으로는 발현량 또는 활성이
20 대조군의 60% 이하로 감소된 경우를 의미하고, 보다 더 구체적으로는 30%
이하로 감소된 경우를 의미하며, 가장 구체적으로는 *LHT1* 유전자의 발현
또는 활성이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을
의미한다.

25 【유리한 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)
흡수 촉진용 조성물 및 흡수 촉진 방법과, 식물체의 ACC 흡수 억제용
30 조성물 및 흡수 억제 방법을 제공한다.

(b) 본 발명은 고등식물의 환경 스트레스 내성 및 성장·발달 과정에

관여하는 주요 식물 호르몬인 에틸렌의 전구체 ACC(1-aminocyclo propane-1-carboxylic acid)의 수송 또는 흡수를 효율적으로 조절함으로써, 에틸렌의 합성 뿐 아니라 ACC가 관여하는 식물체 내 다양한 생화학적인 기작을 효율적으로 제어하여 원하는 표현형의 식물체를 수득할 수 있다.

5

【도면의 간단한 설명】

도 1은 동정된 ACC-저항성 돌연변이 *e/s1*의 표현형을 나타낸 그림이다. 도 1a는 1 μ M ACC를 함유하는 MS-suc(1%)에서 지속적 백광 하에서 자란 7일령 종자의 대표적 형태를 나타낸 그림이다. 스케일: 5 mm. 도 1b는 뿌리길이를 최소 10개 종자 측정값에 대한 평균으로 나타낸 그림이다. 에러 바는 표준편차를 나타낸다.

도 2는 다양한 식물 호르몬에 대한 용량-반응 분석결과를 나타낸 그림이다. 도 2a-2e는 다양한 농도의 ACC(도 2a); BA(6-benzylamino purine)(도 2b); MeJA(methyl jasmonate)(도 2c); 2,4-D(2,4-dichloro phenoxy acetic acid)(도 2d); 또는 BL(epi-brassinolide)(도 2e) 하에서의 뿌리 성장을 관찰한 결과를 보여준다. 에러바는 표준편차를 나타낸다. 도 2f는 야생형, *e/s1* 및 *ein2-1*의 ABA에 의한 발아율 변화를 나타낸다. 도 2f는 야생형, *e/s1* 및 *ein2-1*의 ABA에 의한 발아율 변화를 나타낸다. 에러바는 3개의 독립적인 실험에 대한 표준편차를 나타낸다.

도 3은 ACC-유도된 성장 반응의 양상을 보여주는 그림이다. 도 3a는 0, 0.5, 1, 10 또는 20 μ M ACC를 함유하는 절반농도 MS-suc(1%)에서 암조건 하에서 4일간 자란 야생형(WT) 및 *e/s1* 돌연변이의 대표적인 표현형을 나타낸다. 스케일: 5mm. 도 3b는 도 3a의 종자의 정단 후크 부위를 확대한 그림이다. 도 3c는 도 3a의 종자의 배축 길이를 나타낸 그래프이다. 길이 값은 최소 15개 종자의 평균값으로 나타내었으며, 유사한 결과가 독립된 반복실험에서도 나타났다. 에러바는 표준편차를 나타낸다. 도 3d는 외부에서 ACC를 가해준 경우 *e/s1* 돌연변이의 잔뿌리 형성이 감소됨을 나타낸 그림이다. 유사한 결과가 독립된 반복실험에서도 나타났다. 스케일: 1mm. 도 3e는 10, 1, 10 또는 50 μ M ACC를 함유하는

절반농도 MS-suc(1%)에서 16일간 지속광 하에서 자란 종자 잎의 ACC-반응성 성장을 나타낸 그림이다. 도 3f는 0, 1 또는 10 μ M ACC를 함유하는 절반농도 MS-suc(1%)에서 4일간 지속광 하에서 자란 종자에서의 *ERF1* 발현을 실시간 RT-PCR로 분석한 결과를 나타낸 그림이다. 야생형 및 *els1* 돌연변이에서 *ERF1*의 상대적 발현량을 *PP2A*에서 표준화하였다. 데이터는 3개의 독립적인 실험에서의 평균값으로 표시하였으며, 에러바는 표준편차를 나타낸다.

도 4는 맵-기반 ELS1/LHT1 클로닝 결과를 보여준다. 도 4a는 유전자 매핑의 모식도를 나타낸 그림이다. ELS1 좌위는 최초로 5번 염색체의 MKM21 및 K5J14 사이로 매핑되었다. 이후 세부 매핑으로 각각 At5g40220 및 At5g41010에 해당하는 MSN9 및 MEE6 마커 사이에 위치하는 것으로 보다 좁아졌다. 도 4b는 후보 유전자인 *els1*의 RT-PCR 분석결과를 나타낸 그림이다. *UBQ10*이 로딩 컨트롤로 사용되었다. 도 4c는 *els1* 돌연변이의 *LHT1* 유전자 구조를 나타낸 그림이다. 검은 사각형은 엑손을, 삼각형은 T-DNA 삽입부위를 나타낸다. 도 4d는 1 μ M ACC를 함유한 절반농도 MS-suc(1%)에서 자란 5일령 종자의 대표적 표현형을 나타낸 그림이다. 스케일: 5mm. 도 4e는 도 4d의 종자의 뿌리길이를 나타낸 그래프이다. 에러 바는 표준편차(n=10)를 나타낸다. 도 4f는 *LHT1* 유전자의 형질전환에 의한 *els1* 돌연변이의 형질전환 상보성을 보여주는 사진이다. *els1* 돌연변이 백그라운드를 가지는 두 개의 독립된 형질전환 식물인 *LHT1ox33* 및 *LHT1ox36*를 야생형 및 *els1* 돌연변이와 함께 4시간 동안 암조건에서 1 μ M ACC 하에서 배양하였다. 스케일: 5mm.

도 5는 기체 에틸렌 및 외부에서 가해진 ACC에 대한 *els1* 돌연변이의 반응을 나타낸 그림이다. 도 5a는 다양한 농도의 에테폰(ethephon)을 함유하는 챔버에서 4일간 배양한 미성숙 종자(etiolated seedling)의 대표적 형태를 나타낸 그림이다. 스케일: 5 mm. 도 5b는 도 5a의 종자의 배축 길이(상단) 및 뿌리 길이(하단) 측정결과를 나타낸 그래프이다. 에러바는 표준편차를 나타낸다(n>15). 도 5c는 암조건에서 절반농도 MS-suc(1%)에서 배양한 *els1eto1-1* 및 *els1eto3-1* 이중 돌연변이의 4일령

종자의 대표적 형태를 나타낸 그림이다. 스케일:5mm. 도 5d는 도 5c 종자의 뿌리길이를 측정한 결과를 나타낸 그림이다. 에러바는 표준편차를 나타낸다(n>15).

5 도 6은 ACC-유도 삼중 반응에 기반한 아미노산 경쟁 분석결과를 나타낸 그림이다. 도 6a는 1 μ M ACC 및 L-아미노산(100 μ M)을 포함하는 절반농도 MS-suc(1%)에서 4일간 암조건에서 배양한 야생형 종자의 뿌리길이를 나타낸다. 측정 값은 최소 15개 종자의 평균값으로 표시하였다. 에러바는 표준편차를 나타낸다. 도 6b는 다양한 농도의 ACC 하에서
10 메치오닌(MET) 100 μ M의 존재 또는 부재시 종자의 대표적 형태를 나타내며, 외부에서 가해진 MET가 ACC에 의해 유도된 야생형 종자의 정단 후크과대화를 억제함을 보여준다. 스케일: 5 mm. 도 6c는 도 6b 종자의 뿌리길이를 측정한 결과이다. 에러바는 표준편차를 나타낸다(n >15).

15 도 7은 야생형, *lht1-5* 및 *els1* 돌연변이의 원형질체에서 시간에 따른 14 C-ACC 흡수 분석결과를 나타낸 그림이다. 14 C-ACC 측정값은 원형질체의 $^3\text{H}_2\text{O}$ 값에 대해 표준화함으로써 취득하였으며, 4개의 독립된 반복실험으로부터의 평균 $\pm$ 표준편차 값으로 나타내었다.

20 도 8은 *els1* 돌연변이의 조기 노화 표현형을 나타낸 그림이다. 도 8a는 3번째 잎의 16-28 DAE(days after emergence) 시점에서 장광조건에서 자란 야생형 및 *els1* 돌연변이 식물체의 전체 형태를 나타낸 그림이다. 도 8b는 상기 시점의 DAE에서 세 번째 잎의 대표적 형태를 나타낸 그림이다.

25 도 9는 D-알라닌에 대한 저항성을 가지는 *els1* 돌연변이의 성장을 나타낸 그림으로, 3mM D-알라닌을 함유한 MS-suc(1%) 배지에서 지속광 조건 하에서 11일 간 배양한 야생형과 *els1* 및 *lht1-5* 돌연변이의 대표적 표현형을 보여준다. 스케일: 5 mm.

30 도 10은 외부로부터의 ACC 처리에 의하여 *LHT1* 전사체가 증가함을 반정량적 RT-PCR 분석을 통해 확인한 결과를 나타낸 그림이다. 독립적인

생물학적 복제물을 이용한 2번의 실험에서도 유사한 결과를 얻었다. *UBQ10*를 로딩 컨트롤로 사용하였다.

도 11은 야생형 및 *els1* 돌연변이의 에틸렌 생성을 분석한 결과를 나타내는 그림이다. 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균값으로 나타내었으며, 에러 바는 표준편차를 나타낸다.

【발명의 실시를 위한 형태】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험 방법

식물 시료 및 배양 환경

본 발명에서 사용된 모든 *Arabidopsis thaliana* 식물시료는 Col-0' 생태형 백그라운드를 가진다. *eto1-1*, *eto3-1*, *ein2-1* 및 *lht1-5* (SALK_115555C)의 돌연변이 종자는 ABRC에서 획득하였다. *lht1-5*에의 T-DNA 삽입에 있어 동형성(homozygous)인 돌연변이의 동정을 위해, 본 발명자들은 하기의 표 1에 표시된 프라이머들을 이용하여 지노타이핑 PCR을 수행하였다. 다른 언급이 없는 한, 식물은 1%(w/v) 수크로오스 및 0.8%(w/v) 파이토아가(Duchefa)를 함유하는 절반농도의 MS(Murashige-Skoog) 배지에서 배양하였다. 7일 후, 이들 식물을 21-23℃의 장광(long day, 16h 명조건/8h 암조건) 하에서 자라게 하기 위해 토양(Sunshine Professional Growing Mix #5)에 옮겼다. 종자의 발달을 관찰하기 위하여, 씨앗을 3일간 4℃에 보관하여 종자들의 발아가 동시에 일어나도록 하였다. 이후, 이들 종자를 MS 배지에 뿌려 실험광에 노출시키기 전에 12시간 동안 백광(white light)을 조사하였다. 식물을 수직으로 배양하기 위하여, 종자를 먼저 1%(w/v) 파이토아가가 보충된 MS-suc 배지에 심었다.

【표 1】

실험에 사용된 프라이머의 목록

lht1-5 (Salk_115555C) 지노타이핑을 위한 프라이머		
프라이머 명칭	서열(5' -3')	
lht1-5 F	TAGCTACTCAACAATCGCATGG	
lht1-5 R	CACACACGAAAATACAAACCCTA	
SALK LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
RT-PCR 또는 qRT-PCR 분석을 위한 프라이머		
유전자	서열(5' -3')	AGI, TAIR10
LHT1	ATCCAAGCAACTATCCCTTCAA AGGACCATCAAGAAAAGACCAA	At5g40780
ERF1	TTAATTCACTCCCCATTCTC CCAAGTCCCACTATTTTCAG	At3g23240
PP2A	TATCGGATGACGATTCTTCGTGCAGGCTGGTCGAC TATCGGAATGAGAG	At1g69960
UBQ10	GATCTTTGCCGAAAACAATTGGAGGATGGT CGACTTGTCATTAGAAAGAAAGAGATAACAGG	At4g05320
els1 돌연변이 매핑을 위한 프라이머		
마커 명칭	서열(5' -3')	서술
S0191	CTCCACCAATCATGCAAATG TGATGTTGATGGAGATGGTCA	SSLP
MKM21	ACAGCCAGAAACAACGGAAC AGGGGATGCTCTGTTTTTGA	SSLP
MSN9	ATGGTCTCAAGTCTGTGCTCA AGGTGCCATAACATTCAGCTTT	CAPS (Hind III)
MPO12-1	ATGCGGATAAGAGTGAAAGCAT AATTTGGGAGTCCATAGGGTTT	SSLP
MNF13	TGGTCCAATGGTTCTAGATGCT	CAPS (Rsa I)

	GAGCTAAACCCACAGTACCACA	
MHK7	ATTGGCTTTTCTTCTCGTCAAA ATTCTGTTGGGGAAATACAACG	CAPS (Hind III)
MEE6	CACCATTTTGAATGCGTCTC CAGTGCCAAAAAGTCTCAACC	CAPS (BamH I)
K1013	GCACGTGGCGTATACTG CTTGCTCATAGAGACTCG	CAPS (Hind III)
K5J14	AAATAAGCAAAGGACAAGA TGATAGTCAAAATATTC	SSLP
K9L2	TGTCCTTCTCTGCGTATG AACCATTGGATATAATTAAG	SSLP
CIW10	CCACATTTTCTTCTTTTATA CAACATTTAGCAAAATCAACTT	SSLP
<i>els1</i> 돌연변이의 <i>LHT1</i> 유전자 구조의 TAIL-PCR 분석을 위한 프라이머		
프라이머 명칭	서열(5' -3')	
<i>els1</i> tail TR1	GGGTGGATTTTGAAGATCTAG	
<i>els1</i> tail TR2	GTTGAGATCTACAACTACGTGC	
<i>els1</i> tail TR3	AGTCAACTTATACGAGTGTTC	
<i>els1</i> 돌연변이의 지노타이핑을 위한 프라이머		
프라이머 명칭	서열(5' -3')	서술
LHT1 F1	TCAGAAGTGTGAGGCCTTGTTA	5' UTR
LHT1 R1	TGATTTTTGGGGATGTACAGTT	3' UTR
<i>els1</i> insertion F1	GCGAGATCATCCGTGTTTCAA	pBI-GR 벡터
pBI-GR RB	GCCAAGCTCTTCAGCAATA	pBI-GR 벡터
전체길이 <i>LHT1</i> cDNA를 위한 프라이머		
프라이머 명칭	서열(5' -3')	서술
LHT1-F	GGATCCAGATGGTAGCTCAAGCTCCTCA	BamH I sited added
LHT1-R	CACACACGAAAATACAAACCCTA	

호르몬 반응 분석

호르몬 민감성을 시험하기 위하여, 종자를 ACC(Sigma), 2,4-D(Sigma), BA(Duchefa), epi-BL(Sigma), MeJA(Sigma) 또는 D-알라닌(Sigma)을 함유하는 MS 배지의 플레이트에 뿌렸다. 이들 종자를
 5 지속광(continuous light) 또는 암상태에서 추가적으로 배양하였다. 기체에틸렌을 가해주기 위해, 종래에 보고된 방법에 따라 플레이트를 Na_2HPO_3 완충액(5 mM) 내 에테폰(ethephon, Sigma)을 함유하는 gas-tight 챔버에 보관하였다(Zhang and Wen, 2010; Shin et al., 2013). ImageJ 소프트웨어 (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)를 이용하여 최소 15개 종자로부터
 10 배축 및 뿌리를 측정하여 뿌리 길이를 대조군에 대해 표준화하였다. 이후 디지털 카메라(Nikon Coolpix P5000)로 종자의 이미지를 캡처하였다. ABA(Sigma)에 대한 발아 민감성을 분석하기 위하여, 종자를 (+/-)-cis,trans-앱시스산을 함유하는 MS 플레이트에 심었다. 백광 하에서 5일간 배양한 뒤, 발아율을 어린뿌리 출현(radicle emergence)에 근거하여
 15 계산하였다. 실험 세트로 최소 70개 종자가 사용되었으며, 3번의 독립적인 실험으로부터 평균값을 구했다.

이중 돌연변이의 구축

els1eto1-1 및 *els1eto3-1*의 이중 돌연변이를 구축하기 위하여, *els1*
 20 돌연변이와 *eto1-1* 또는 *eto3-1* 돌연변이를 교배하였다. 수득된 F_1 자손은 자가수분되어 F_2 종자를 생산하였다. 구조적인 에틸렌 반응성(예를 들어 MS 배지에서 짧은 뿌리의 표현형)을 보이는 종자를 먼저 F_2 개체 사이에서 선별한 뒤, PCR-기반 분자마커로 *els1* 돌연변이를 지노타이핑하였다(표 S1). 이중 돌연변이(double mutant)로 추정되어 선별된 종자를 F_3 세대에서
 25 동형성을 시험한 후 표현형 분석에 사용하였다.

발현분석

광조건에서 자란 5일령 야생형 및 돌연변이 종자로부터 총 RNA를 추출하여 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)을 실시하였다. DNaseI을 처리한 뒤,
 30 SuperscriptII 역전사 효소 및 oligo(dT)₁₈ 프라이머(Invitrogen)를 이용하여 1총 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. 10배 희석한 cDNA를

반정량적 RT-PCR 분석 또는 실시간 qRT-PCR 분석에 사용하였다. 실시간 qRT-PCR은 Eco™ 실시간 PCR 시스템(Illumina)에서 QuantiMixSYBR 키트(PhileKorea)을 이용하여 10부피에서 수행하였다. 사용된 프라이머 서열은 표 S1에 표시하였다. 반응은 실험 복제물을 이용하여 각각 세 번
 5 수행하였다. $\Delta\Delta Ct$ 방법(Comparative Threshold methods)를 이용하여 시료 내 각각의 증폭산물의 상대적인 양을 측정하였다(Livak and Schmittgen, 2001). 상대적 발현량은 Lee et al.(2013)의 방법대로 *PP2A*의 Ct값에 따라 표준화하였다.

10 *els1* 돌연변이의 염색체 매핑 및 유전적 구조 분석

종래에 보고된 방법에 따라 분자 마커를 이용한 재조합-기반 유전자 매핑을 통해 염색체 상에서 *els1* 돌연변이의 위치를 결정하였다(Lukowitz et al., 2000; Soh, 2006; Lee et al., 2013; Shin et al., 2013). *els1*과 Ler 야생형을 교배하여 수득한 F₂ 종자의 뿌리 표현형을 1 μ M ACC
 15 하에서 조사하였다. 긴 뿌리를 가져 *els1* 돌연변이로 추정되는 종자를 지놈 DNA 추출을 위해 선정하였다. 추가적인 마커를 Col/Ler 다형성(TAIR)에 근거하여 dCAPS Finder(Neff et al., 1998)를 이용하여 설계하였다. 매핑을 위한 프라이머 서열은 표 S1에 나열하였다.

els1 돌연변이에서 *LHT1* 유전자 구조를 결정하기 위하여, 다양한
 20 프라이머 세트와 지놈 PCR 분석을 수행하였다. TAIL-PCR 분석 결과, T-DNA는 *LHT1*의 두 번째 인트론에 삽입된 것으로 밝혀졌다. 이후 pBI-GR 벡터(Liu and Whittier, 1995)의 오른쪽 경계 부위에 특이적으로 설계된 프라이머를 이용한 TAIL-PCR을 통해 *els1*에 삽입된 T-DNA 절편의 플랜킹 서열을 조사하였다. 증폭된 PCR 산물의 시퀀싱 결과 이들 pBI-GR T-DNA가
 25 *LHT1* 지놈 DNA의 두 번째 인트론 중 전사 개시 부위로부터 744bp 다운스트림에 삽입되었음을 확인하였다.

형질전환 상보성 (Transgenic complementation) 검사

els1 돌연변이의 형질전환 상보성(transgenic complementation)을
 30 조사하기 위하여, 표 S1에 기재된 프라이머를 이용하여 RT-PCR로 *LHT1* 전체길이 cDNA를 증폭하였다. 서열이 확인된 *LHT1* cDNA를

pENTR1A(Invitrogen)에 서브클로닝하였다. 수득한 클론을 게이트웨이-호환성 식물발현 벡터인 pMDC32(Curtis and Grossniklaus, 2003)에 제조사(Invitrogen)의 설명서에 따라 LR 클로네이즈를 이용하여 재조합하였다. 상기 pMDC32/*LHT1* 클론을 floral-dip 방법(Clough and Bent, 1998)으로 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 도입하여 *els1* 돌연변이 식물에 형질전환하였다. 형질전환체는 하이그로마이신 저항성에 근거하여 선별하였다. 표현형 분석을 위하여, T₂ 및 T₃ 세대로부터 T-DNA가 단일 삽입된 동형접합체를 선별하였다.

10 에틸렌 생성의 측정

아가(0.8%)-고형화된 절반농도 MS-suc(1%) 배양액을 포함하는 20-mL 기체 크로마토그래피 용기에 종자(용기 당 약 30개체)를 23°C 지속광 조건에서 4일간 배양하였다. 에틸렌의 축적을 PLOT 융합 실리카 컬럼 및 열탈착기(Unity, Markes, UK)가 탑재된 기체 크로마토그래피-불꽃이온화 검출기(GC-FID) 시스템(Varian 450-GC; Varian Inc., USA)으로 모니터링하였다. 헤드스페이스의 5 mL 시료를 컬럼에 주입하였다. 에틸렌 피크를 Galaxie 크로마토그래피 데이터 시스템으로 1 mL⁻¹ 및 0.2mL⁻¹의 표준 에틸렌과의 비교를 통해 정량화하였다. 에틸렌 생성은 각각의 용기 내 종자의 수에 대해 표준화하였으며, 모든 관찰은 최소 3번의 반복을 통해 이루어졌다.

¹⁴C-ACC 흡수 분석

ACC 흡수를 측정하기 위하여 단광(short days, 8h 광조건/16h 암조건) 하에서 자란 7주령의 야생형, *els1* 및 *lht1-5* 식물들의 잎으로부터 엽육 원형질체를 정제하였다. Martinoia et al.(1993)의 방법에 따라 33% 퍼콜 구배용액을 사용하였다. 원형질체를 로딩 완충액[0.1mL 당 0.5 M 소르비톨, 1 mM CaCl₂, 10mM Mes-KOH, 5mM KHCO₃, 0.1% BSA, 및 1.85kBq ³H₂O(Amersham Biosciences); pH 5.6]에 재부유하여 mL 당 1x10⁷ 원형질체의 농도를 수득하였다. 상온(25°C)에서 30분 간 시료를 부드럽게 흔들었다.

¹⁴C-ACC 흡수 분석을 위하여, 원형질체 부유액 2 mL에 37k Bq¹⁴C-ACC(Amersham Biosciences)를 첨가하고 상온에서 부드럽게 흔들었다.

배양 후, ^{14}C 및 ^3H 함량을 Kang et al.(2010)의 방법대로 액상섬광계수기를 이용하여 측정하였다.

실험결과

5 ACC-저항성 돌연변이의 동정

*PRE1*의 스테로이드-유도성 발현을 위한 pBI-GR-기반 벡터(Lloyd et al., 1994; Lee et al., 2006)를 이용하여 형질전환 식물을 제작하면서 조기 노화 돌연변이를 발견하였다(도 8). 이 돌연변이체의 생리학적 분석과정에서, 본 발명자들은 이 돌연변이가 외부에서 가해진 ACC에 대해 10 유의한 저항성을 나타냄을 발견하였다(도 1). 야생형(WT)과 달리 돌연변이는 연장된 뿌리 성장 및 확장된 자엽을 포함하는 ACC 저항성 표현형을 보였다. 이러한 강력한 저항성으로 인해 본 발명자들은 모든 에틸렌-의존성 반응과 관련된 돌연변이의 특성 규명에 초점을 맞추어 후속 연구를 진행하였다. 본 발명자들은 조기 노화에 근거하여 이를 *els1*(early 15 *leaf senescence 1*) 돌연변이로 명명하였다. 야생형과의 최소 4번의 역교배(back-crossing) 후에, *els1*에 대한 추가적인 분자적 및 생리학적 분석을 수행하였다.

유전적 분석 결과, F_1 이형접합체(*els1/els1*)가 뿌리가 조금 긴 표현형을 가진다는 사실에 근거하여 ACC-저항성이 부분 우성(partially 20 dominant)인 것으로 판단되었다(도 1). 이어서 $1\ \mu\text{M}$ ACC를 이용한 F_2 분석 결과 이러한 저항성은 전형적인 멘델 분리 비율을 따름으로써 *els1* 돌연변이가 단일인자 유전을 함을 암시하였다.

els1 돌연변이는 다양한 ACC-유도 반응이 손상된다

25 *els1* 돌연변이의 호르몬 민감성을 구체적으로 조사하기 위하여 용량반응 분석(dose-response analysis)을 수행하였다. *els1* 돌연변이가 용량 의존적으로 외부에서 가해진 ACC에 대해 유의한 저항성을 보이는 반면 (도 2), MeJA(methyljasmonat), 2,4-D(asyntheticauxin), BA(asynthetic-cytokinin, 6-benzylaminopurine), BL(epi-brassinolide) 및 ABA 30 (abscisicacid)에는 민감성을 가졌다. 이는 이러한 반응성 손상이 ACC-특이적임을 보여준다. 이에서, 본 발명자들은 *els1*에서의 다양한 에틸렌-

유도 반응의 특성을 조사하였다. ACC 존재 하에서, 암조건에서 자란 애기장대 종자는 삼중 반응, 예를 들어 배축/뿌리의 성장억제 및 정단 후크의 과대화(Guzman and Ecker, 1990)를 포함하는 극적인 형태 변화를 보였다.

- 5 삼중 반응을 측정하기 위하여, 본 발명자들은 야생형 및 돌연변이 종자를 암조건 하에서 다양한 농도의 ACC를 함유하는 MS 배지에서 배양하였다. 야생형을 1 μ M ACC에 노출시키자 전형적인 삼중 반응이 관찰되었다(도 3a-3c). 반면, *els1-1*의 뿌리/배축은 이 농도에서 성장이 유의하게 억제되었다. 뿐만 아니라, 정단 후크 과대화는 돌연변이에서
10 거의 관찰되지 않았다(도 3b). 그러나, 10 에서 야생형 및 *els1* 모두 전형적인 삼중반응을 나타냈다. 이러한 결과는 본 발명의 돌연변이가 용량 의존적으로 ACC-유도 삼중 반응을 저해함을 보여준다.

- 에틸렌은 가는 뿌리(hairy root)의 생성을 촉진하는 것으로 알려졌다(Tanimoto et al., 1995). ACC-유도 뿌리털 발달이 *els1*
15 돌연변이에서 변화하는지를 조사하기 위하여, 다양한 농도의 ACC를 함유하는 MS-suc 배지에서 종자를 수직 성장시켰다. 돌연변이에서 1 μ M ACC 하에서 더 적은 뿌리털이 생성되었으나, 10 μ M ACC에서는 *els1*과 야생형 모두 뿌리털이 활발하게 발달하였다(도 3d).

- ACC의 존재 하에서, 야생형 로제트 잎의 세포크기의 감소로 인하여
20 ACC에 노출되지 않은 경우보다 훨씬 작았다(Kieber et al., 1993). ACC의 농도 증가에 따라 야생형에서 잎의 성장도 감소하였다(도 3e). 반면, 돌연변이는 ACC에 대한 민감성 저하를 보이며 잎 성장의 억제가 감소하였다. 아울러, EIN3의 1차 타겟인 *ERF1*(Chao et al., 1997)의 발현이 *els1*에서 ACC 처리에 덜 민감하다는 사실을 확인하였다(도 3f).

- 25 이러한 결과를 종합하면, *els1* 돌연변이는 ACC-유도 다중 에틸렌 반응이 손상되며, 이에 에틸렌 반응성 성장 및 발단의 조절에 중요한 역할을 함을 알 수 있다.

*LHT1*의 기능소실 대립인자로서의 *els1*의 분자적 특성

- 30 *els1* 돌연변이의 분자적 손상을 결정하기 위하여, 돌연변이의 ACC-저항성 표현형에 기초한 맵-기반 클로닝을 수행하였다. 크로모솜 매핑

결과 *els1* 좌위는 5번 염색체 아래 팔의 AT5G40220 및 AT5G41010 사이인 것으로 나타났다(도 4a). 이어서 매핑된 부위의 시퀀싱 및 RT-PCR 분석결과 후보 유전자로서 *LHT1* (AT5G40780)이 동정되었다. 돌연변이 내에서 전사체가 없는 것으로 보아 *els1*은 *LHT1*의 영 대립인자(null allele)인 것으로 보인다(도 4b). 돌연변이에서의 *LHT1*의 유전자 구조에 대한 추가적인 서열분석을 통해 1번 인트론에 T-DNA가 삽입되었음을 확인하였다(도 4c). *LHT1*의 녹-아웃 돌연변이인 *lht1-5*를 이용하여 대립성 검사(allelism test)를 수행하였다(Svennerstam et al., 2007; Liu et al., 2010). 상기 돌연변이는 *els1* 돌연변이와 동일한 ACC-저항성 표현형을 보였다(도 4d). 뿐만 아니라, *els1*과 *lht1-5*를 교배하여 수득한 이중 이형접합체(double heterozygote)가 단일 돌연변이와 마찬가지로 동일한 ACC-저항성을 나타낸다는 사실을 확인하였다(도 4e). 이들 결과는 *els12* 돌연변이가 *lht1-5*와 대립 유전자임을 나타낸다.

lht1 돌연변이가 D-아미노산에 저항성을 가진다는 이전의 보고(Svennerstam et al., 2007; Liu et al., 2010)와 마찬가지로, 본 발명자들은 *els1* 돌연변이가 야생형과 비교하여 외부에서 가해진 D-알라닌에 저항성을 가진다는 사실을 확인하였다(도 9).

*LHT1*가 *els1* 돌연변이의 원인 유전자라는 사실을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 CaMV35S 프로모터에 의해 발현이 유도되는 전체길이 *LHT1* cDNA를 *els1* 돌연변이에 삽입하였다. 단일카피 T-DNA가 삽입된 형질전환 식물주로 ACC-민감성을 조사하였다. 15개의 시험 식물주 중 13개에서 *els1* 돌연변이에 의해 손상된 삼중 반응이 회복되었다(도 4f). RT-PCR 결과 *LHT1* 유전자가 이들 형질전환 식물주에서 과발현됨을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 *LHT1*의 기능 소실이 ACC 민감성의 감소를 야기한다는 것을 알 수 있었다.

LHT1 발현이 ACC 처리를 통해 조절되는지를 시험하고자, 반정량적 RT-PCR 분석을 수행하였다. ACC를 처리하자 2시간 내에 *LHT1* 전사 수준이 상승하였고, 이것이 12시간 동안 유지되어(도 10), 이러한 발현이 ACC에 의해 유도되었음을 알 수 있었다.

*els1*의 에틸렌 및 내인성 ACC에 대한 정상 민감성 반응

*els1/LHT1*의 분자적 특성에 근거하여, 본 발명자들은 *els1* 돌연변이의 감소된 ACC-민감도가 에틸렌의 인식/신호전달 결핍보다는 ACC 수송의 변화에 기인한 것이라 가정하였다. *els1* 돌연변이에서의 에틸렌 민감성을 측정하기 위해, 기체 에틸렌을 이용하여 삼중 반응을 시험하였다.

5 돌연변이 및 야생형은 뿌리/줄기 성장 및 정단 후크 형성에 있어서 본질적으로 동일한 용량-반응을 보였다(도 5a 및 5b). 이는 *els1* 돌연변이가 본질적으로 에틸렌의 인식/신호전달에 영향을 미치지 않음을 의미한다.

eto1-1 및 *eto3-1*과 같은 몇몇 유전적 돌연변이들이 내인성 ACC를 과다 생산하여 외부로부터의 ACC가 없이도 삼중 반응을 보이는 것으로 알려졌다(Chae et al., 2003; Wang et al., 2004). *els1* 및 *eto1-1* 또는 *eto3-1* 간의 유전적 상위 관계를 조사하기 위하여, *els1eto1-1* 및 *els1eto3-1*의 이중 돌연변이주를 구축하고, 이들의 표현형이 각각 *eto1-1* 또는 *eto3-1* 단일 돌연변이의 그것과 유사함을 발견하였다(도 5c 및 5d).

15 이들 결과는 *els1* 돌연변이가 에틸렌의 생합성이나 *eto1-1* 또는 *eto3-1* 돌연변이에서 내인성 ACC-과다생산으로 인한 에틸렌-의존성 기작에 영향을 미치지 않음을 보여준다. 또한, *els1* 돌연변이 종자는 기체 에틸렌을 야생형에 해당하는 수준만큼 생산한다(도 11).

20 ACC 반응성에 대한 아미노산들의 경쟁 억제 반응

*LHT1*이 에틸렌-유도 반응이 아닌 ACC-유도 반응에 필수적이라는 사실이 확인되었으므로, 본 발명자들은 *LHT1*이 외인성 ACC의 흡수에 관여할 것이라고 가정하였다. *LHT1*가 식물에서 몇몇 아미노산의 흡수를 매개한다는 기존의 보고에 근거하여(Hirner et al., 2006; Svennerstam et al., 2007, 2011), 본 발명자들은 과량의 외인성 아미노산이 ACC-유도 삼중반응을 억제할 것이라 가정하였다. ACC-유도 삼중반응과 관련하여, 20개 아미노산을 이용한 경쟁분석(competition assays)을 수행하였다. 몇몇 아미노산은 1 μ M ACC 하에서 상이한 영향을 끼치며 야생형의 삼중반응을 억제하였음에 반해, 티로신, 아르기닌, 라이신 및

25 아르파르테이트는 최소한의 영향만을 나타냈다. 이들 중 메치오닌(MET)은

30 뿌리 성장에 대해 가장 강력한 억제효과를 나타냈다(도 6a). MET(100

mM)를 첨가하자 1 μ M ACC의 투여에 의해 유도되었던 정단 후크의 과대화 및 배측 연장의 억제가 완화되었다. 그러나, ACC 농도가 증가(10 μ M)하자 MET 하에서도 야생형에서의 삼중 반응이 회복되었다(도 6b). 따라서, MET에 의한 억제효과는 ACC 농도에 따라 다른 것으로 나타났다. 실제로, 5 시험된 아미노산만으로는 ACC 부재 하에서 유묘 성장에 영향을 주지 않았다(도 6b). 나아가, 이들 아미노산은 에틸렌-유도 또는 *eto1*-유도 삼중반응에 영향을 미치지 않았다. 이에, 실험된 MET의 농도는 *els1* 돌연변이에 의한 ACC-유도 삼중 반응에 대해 유의한 영향을 미치지 못했다(도 6b 및 6c).

10

lht1 돌연변이의 방사능-표지된 ACC의 흡수 감소

*LHT1*이 ACC 흡수에 영향을 미치는지 여부를 직접 조사하기 위하여, 방사능 동위원소로 표지된 14 C-ACC 및 잎 엽육세포의 원형질체를 이용하였다. 비록 모든 식물주에서 장시간 14 C-ACC 흡수가 점차 증가하였으나, 두 개의 15 *lht1* 돌연변이 식물주인 *els1* 및 *lht1-5*에서 야생형 원형질체의 측정량의 60% 수준이었다(도 7). 이들 결과는 *lht1* 돌연변이에서 ACC 흡수가 완전히 사라지지 않는으나 다소간 감소하였음을 나타낸다.

20

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드
서열을 포함하는 식물체의 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)
5 흡수 촉진용 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제1서열의
뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

(a) 제 1 항 또는 제 2 항의 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기
뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고
식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서
15 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널
서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 ACC(1-
aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 촉진용 조성물.

【청구항 4】

제 1 항 또는 제 2 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를
포함하는 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수
20 촉진방법.

【청구항 5】

LHT1 유전자의 발현을 억제하는 핵산 분자를 포함하는 식물체의
ACC(1-aminocyclopropane-1- carboxylic acid) 흡수 억제용 조성물.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 LHT1 유전자는 서열목록 제1서열의
30 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제 5 항 또는 제 6 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 T-DNA, siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

5

【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 핵산 분자는 T-DNA인 것을 특징으로 하는 조성물.

10 【청구항 9】

(a) 제 5 항 또는 제 6 항의 핵산분자; (b) 상기 핵산분자에 작동적으로 결합(operatively linked)되어있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 억제용 조성물.

15

【청구항 10】

제 5 항 또는 제 6 항의 조성물을 식물 세포에 도입시키는 단계를 포함하는 식물체의 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 억제방법.

20

【청구항 11】

다음의 단계를 포함하는 식물체의 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 촉진용 조성물의 스크리닝 방법:

25

(a) *LHT1* 유전자를 포함하는 식물세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 *LHT1* 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계, 상기 *LHT1* 유전자의 발현량 또는 활성이 증가되는 경우에는 상기 시료는 식물체의 ACC 흡수 촉진용 조성물로 판정된다.

30

【청구항 12】

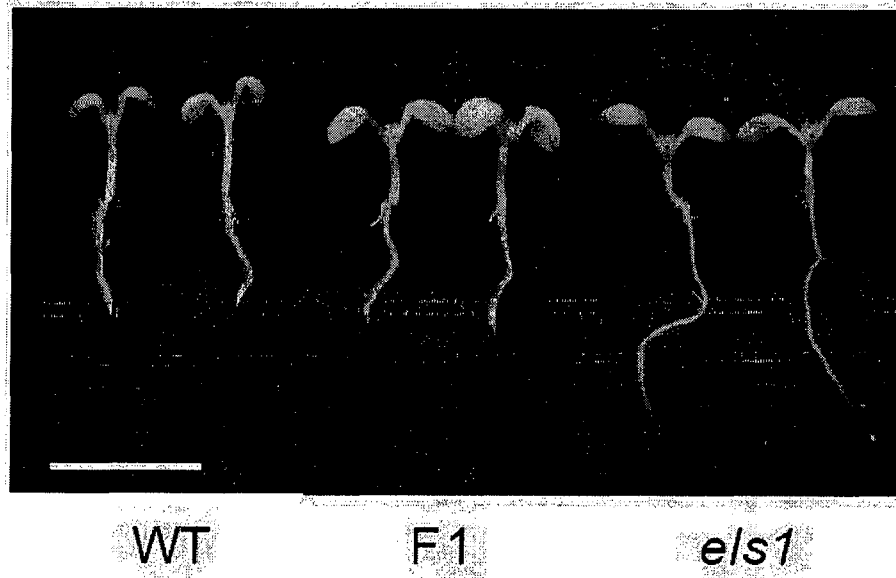
다음의 단계를 포함하는 식물체의 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 흡수 억제용 조성물의 스크리닝 방법:

(a) *LHT1* 유전자를 포함하는 식물세포에 분석하고자 하는 시료를
5 접촉시키는 단계; 및

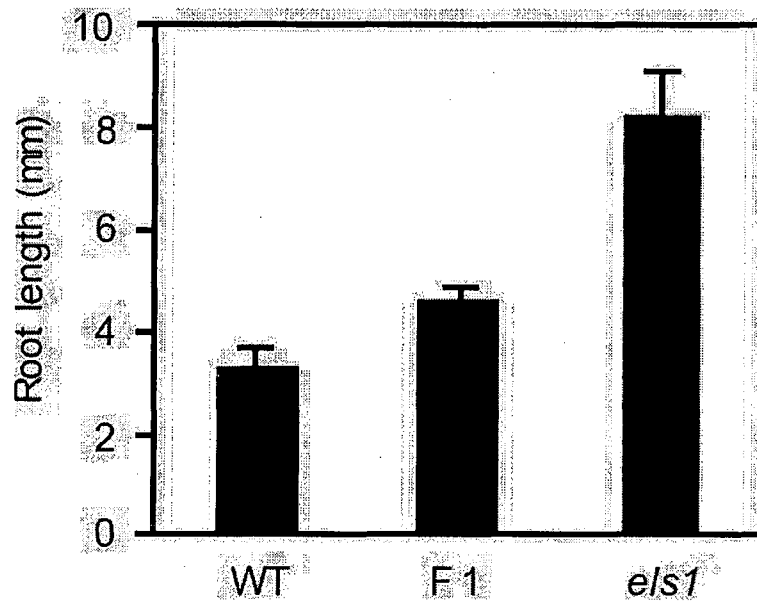
(b) 상기 *LHT1* 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계, 상기 *LHT1* 유전자의 발현량 또는 활성이 감소되는 경우에는 상기 시료는 식물체의 ACC 흡수 억제용 조성물로 판정된다.

1/22

도 1a

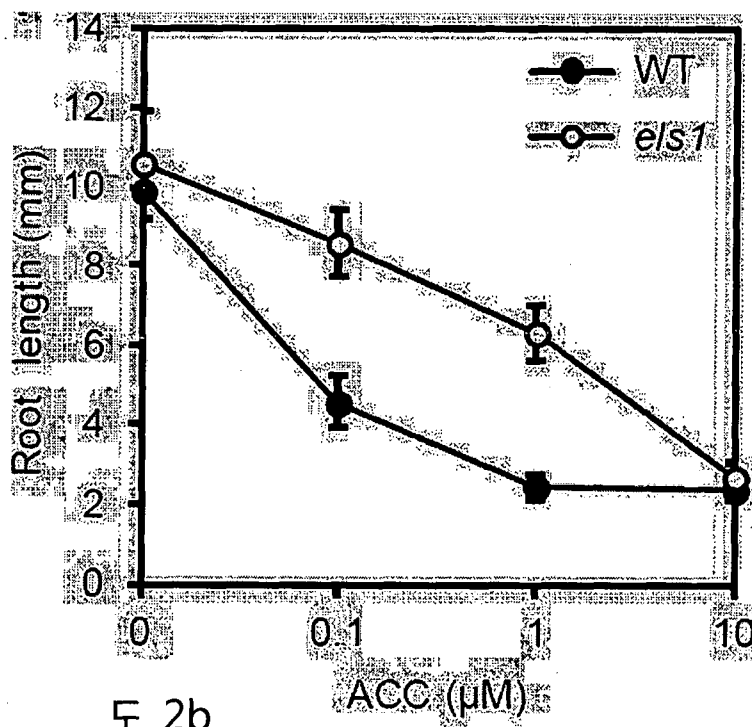


도 1b

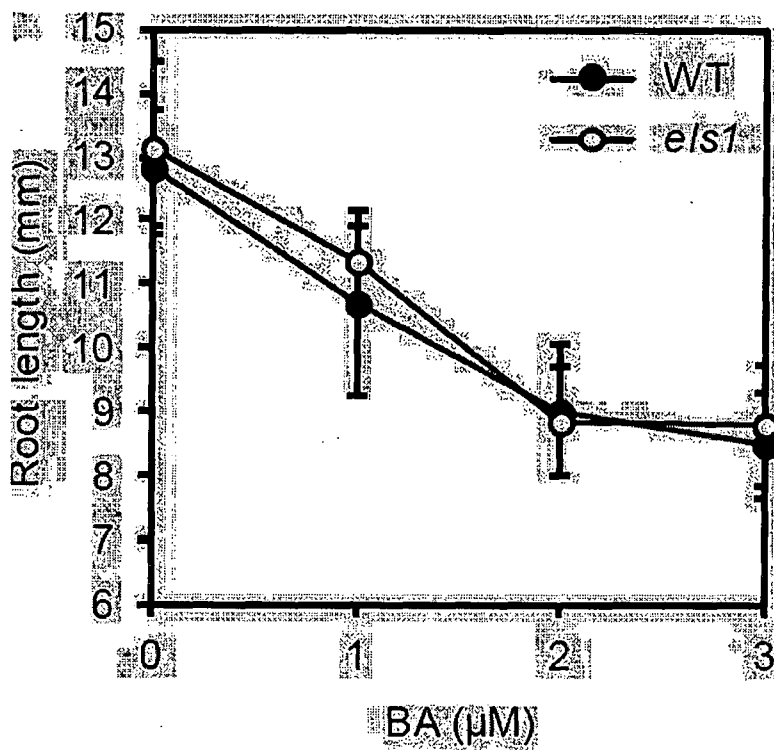


2/22

도 2a

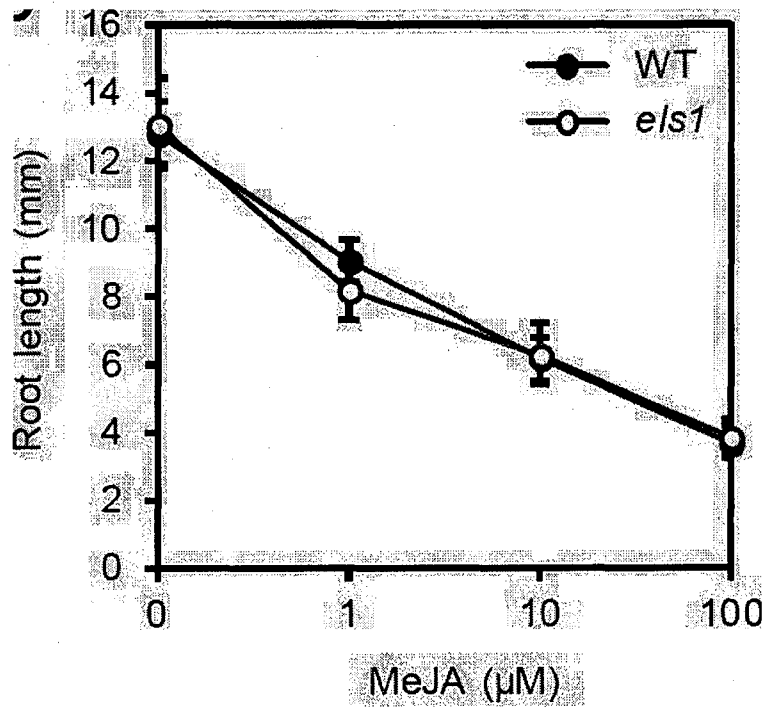


도 2b

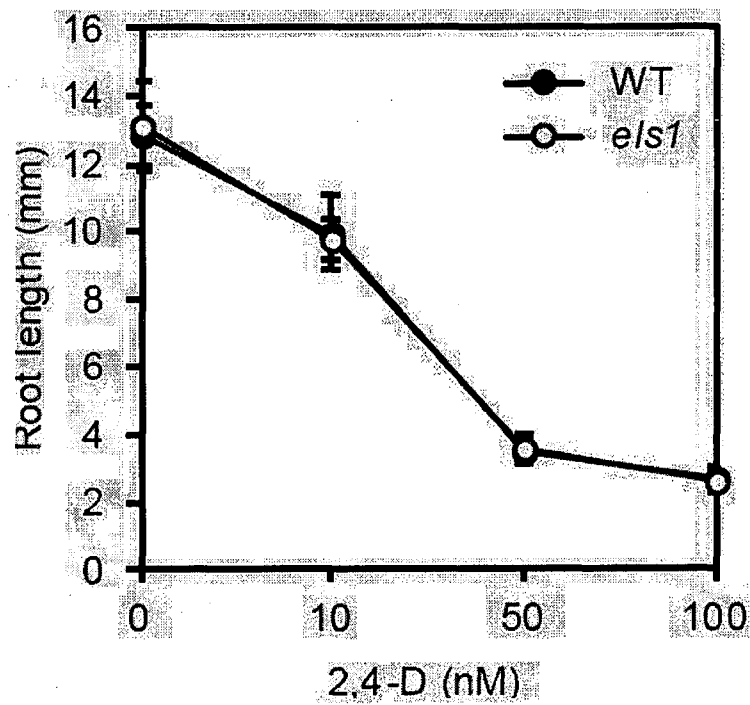


3/22

도 2c

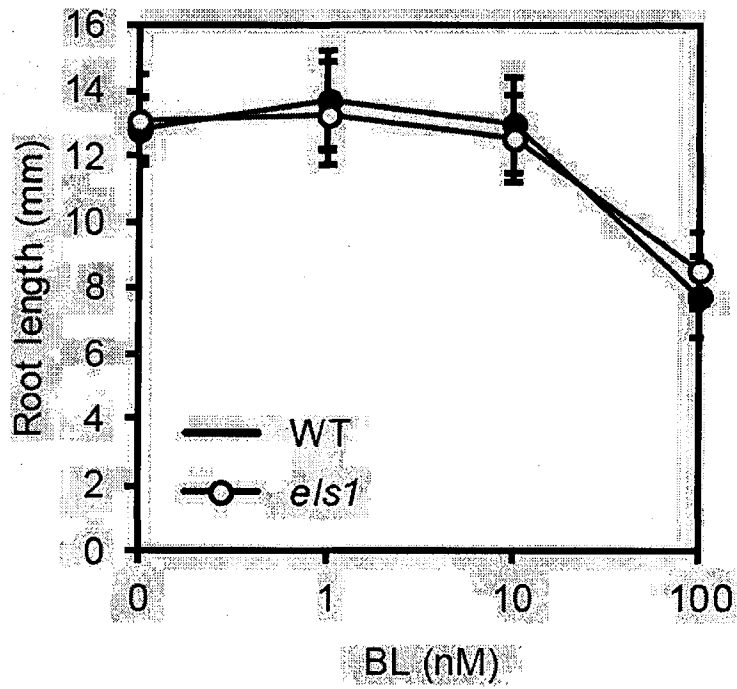


도 2d

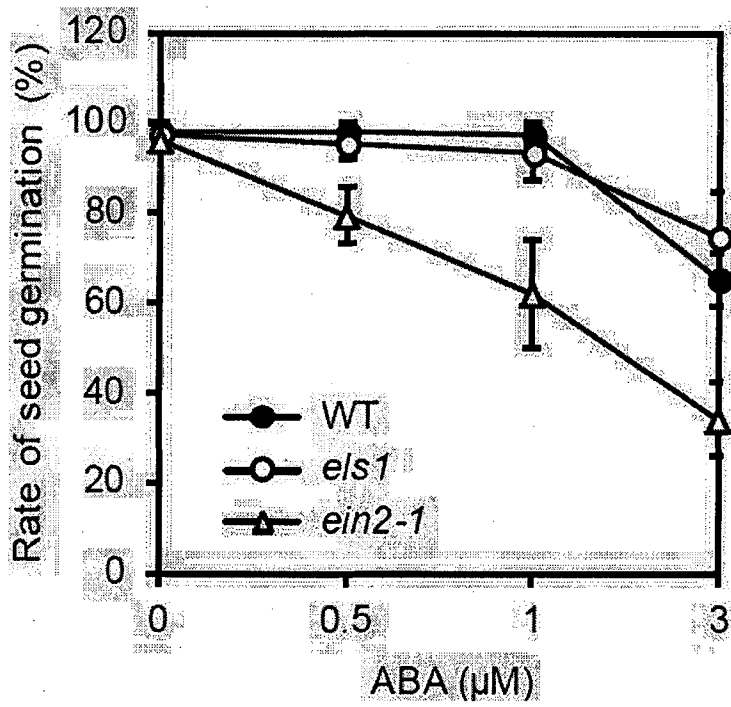


4/22

도 2e

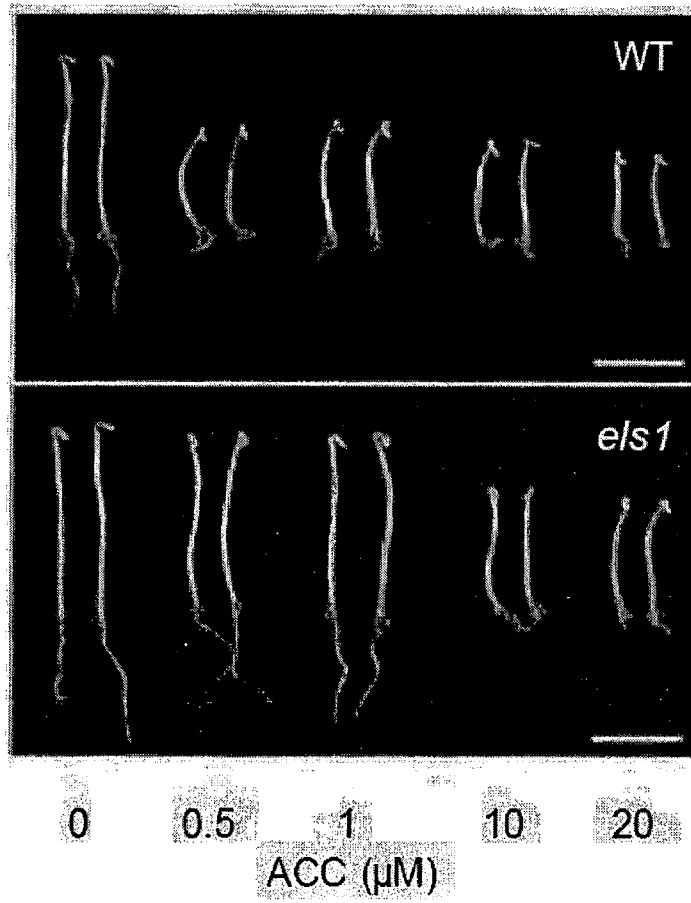


도 2f



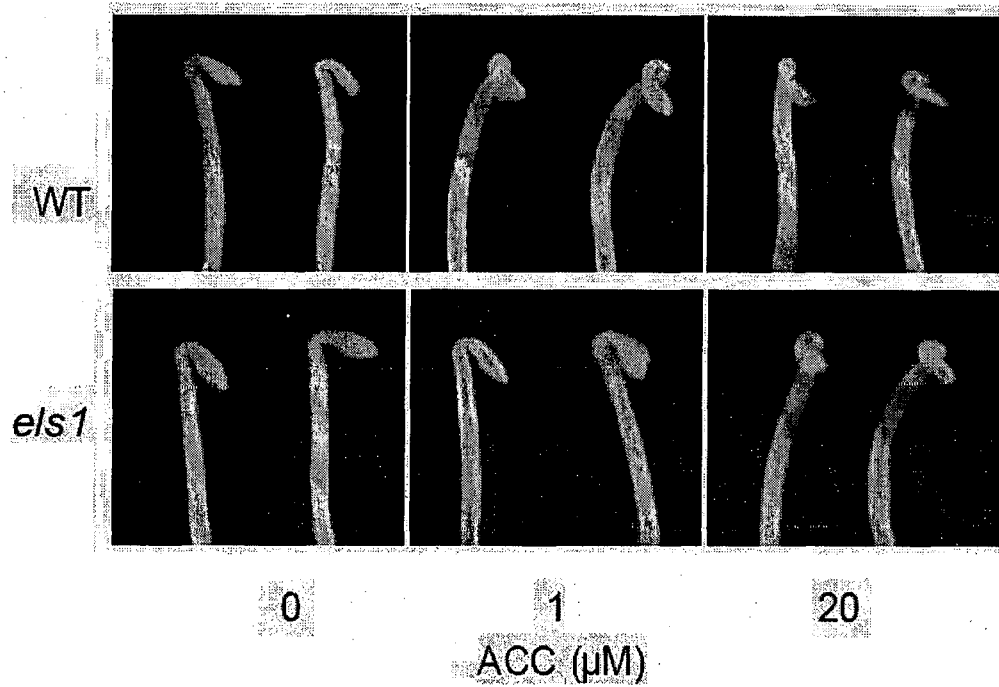
5/22

도 3a

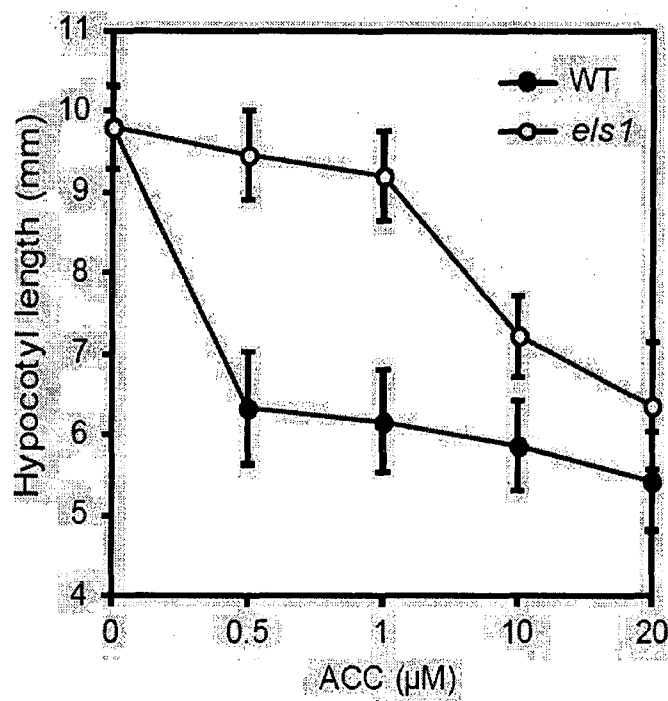


6/22

도 3b

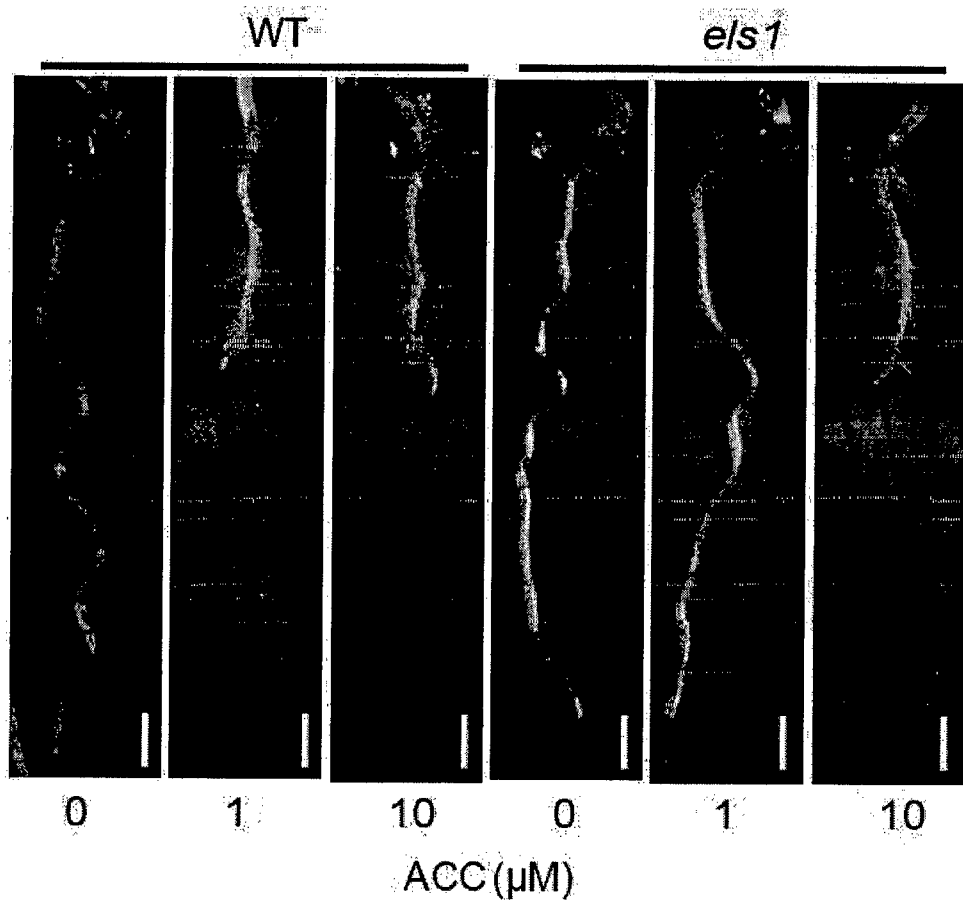


도 3c



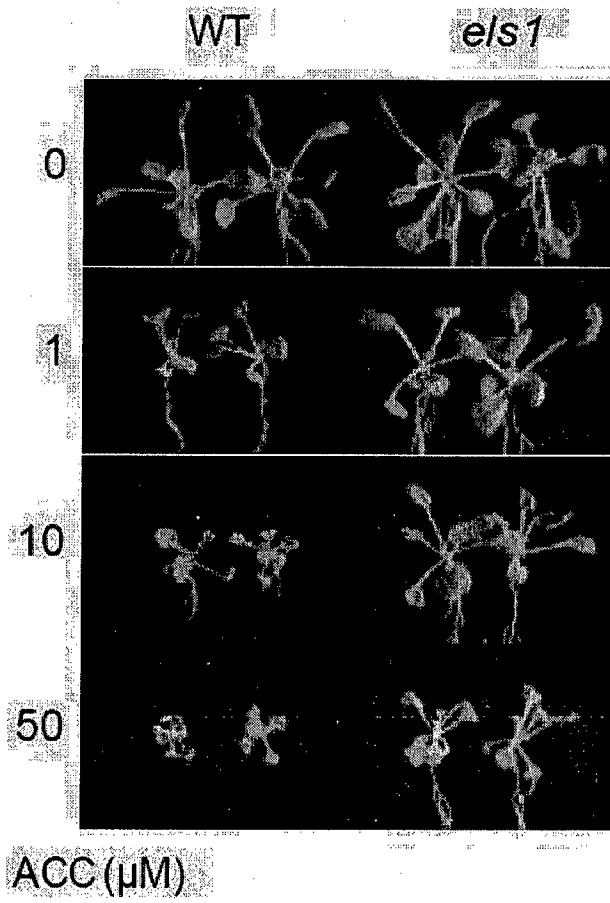
7/22

도 3d



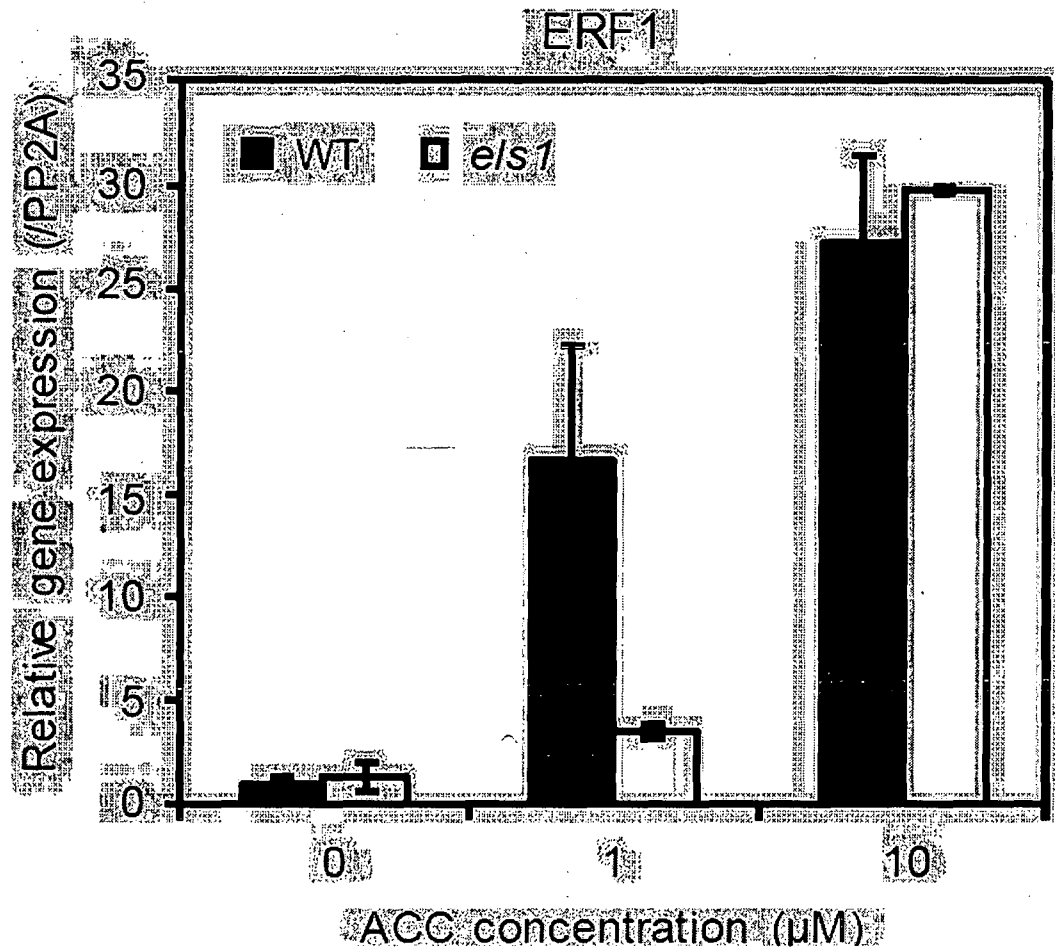
8/22

도 3e



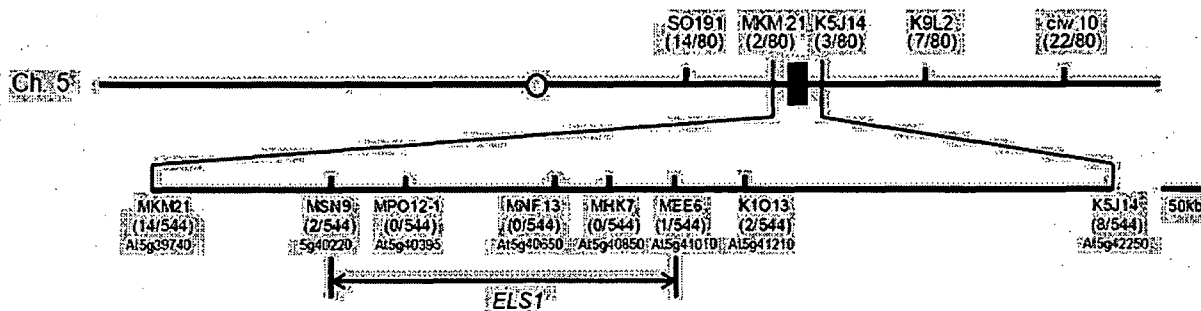
9/22

도 3f

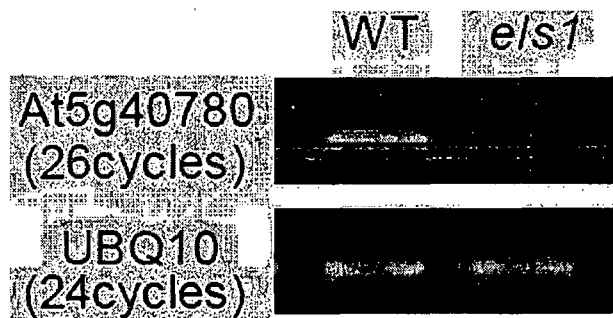


10/22

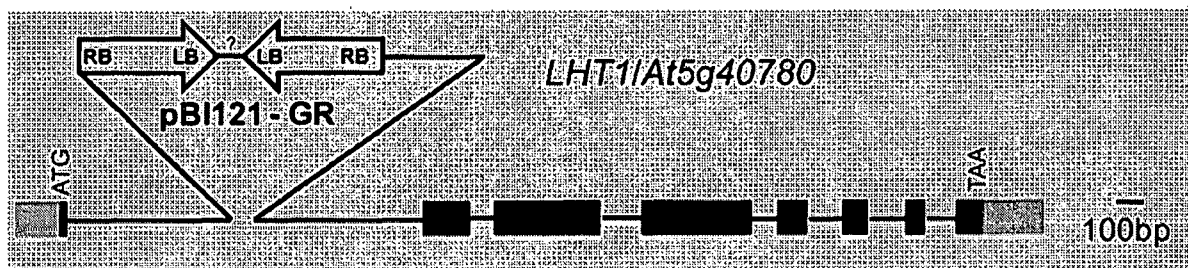
도 4a



도 4b

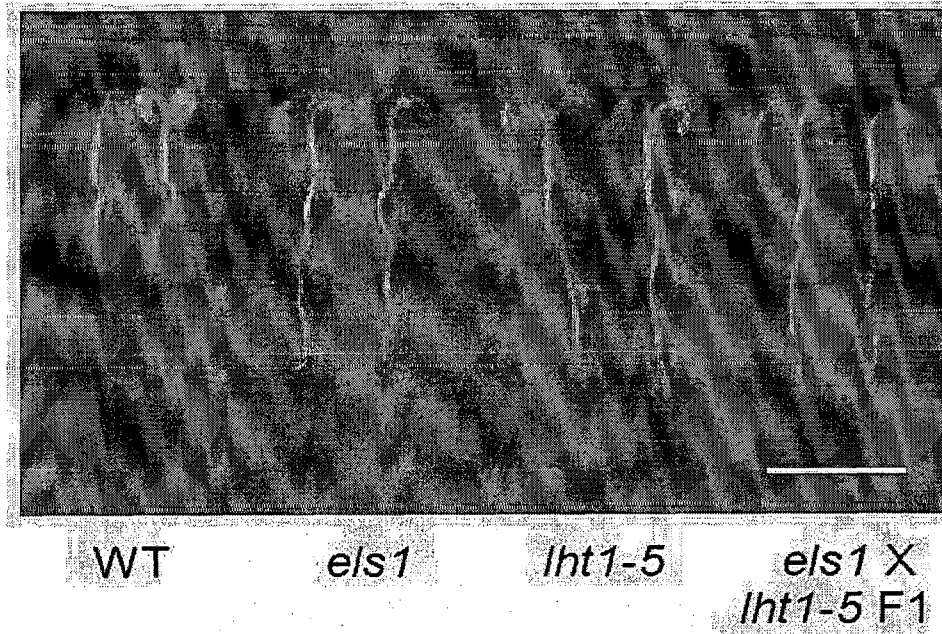


도 4c

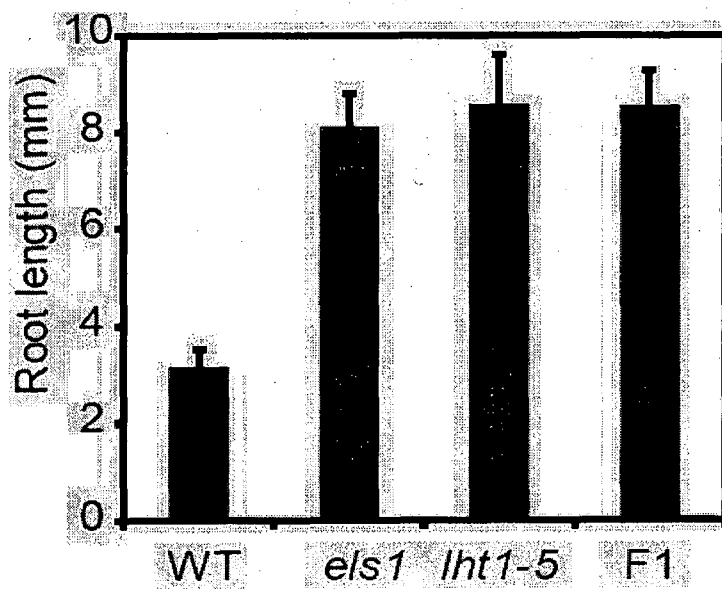


11/22

도 4d

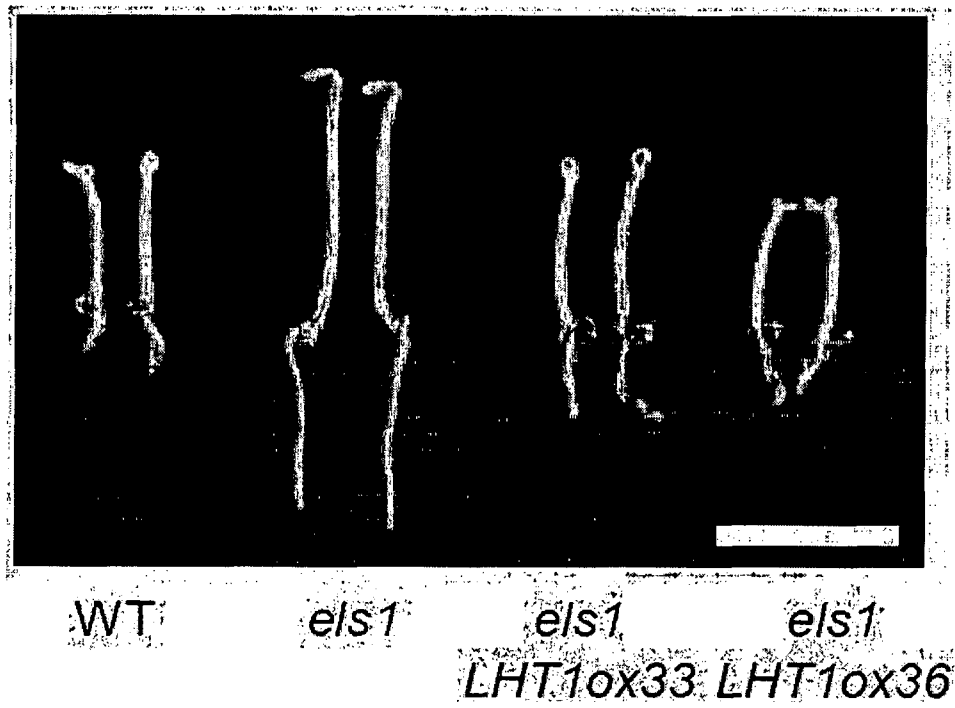


도 4e



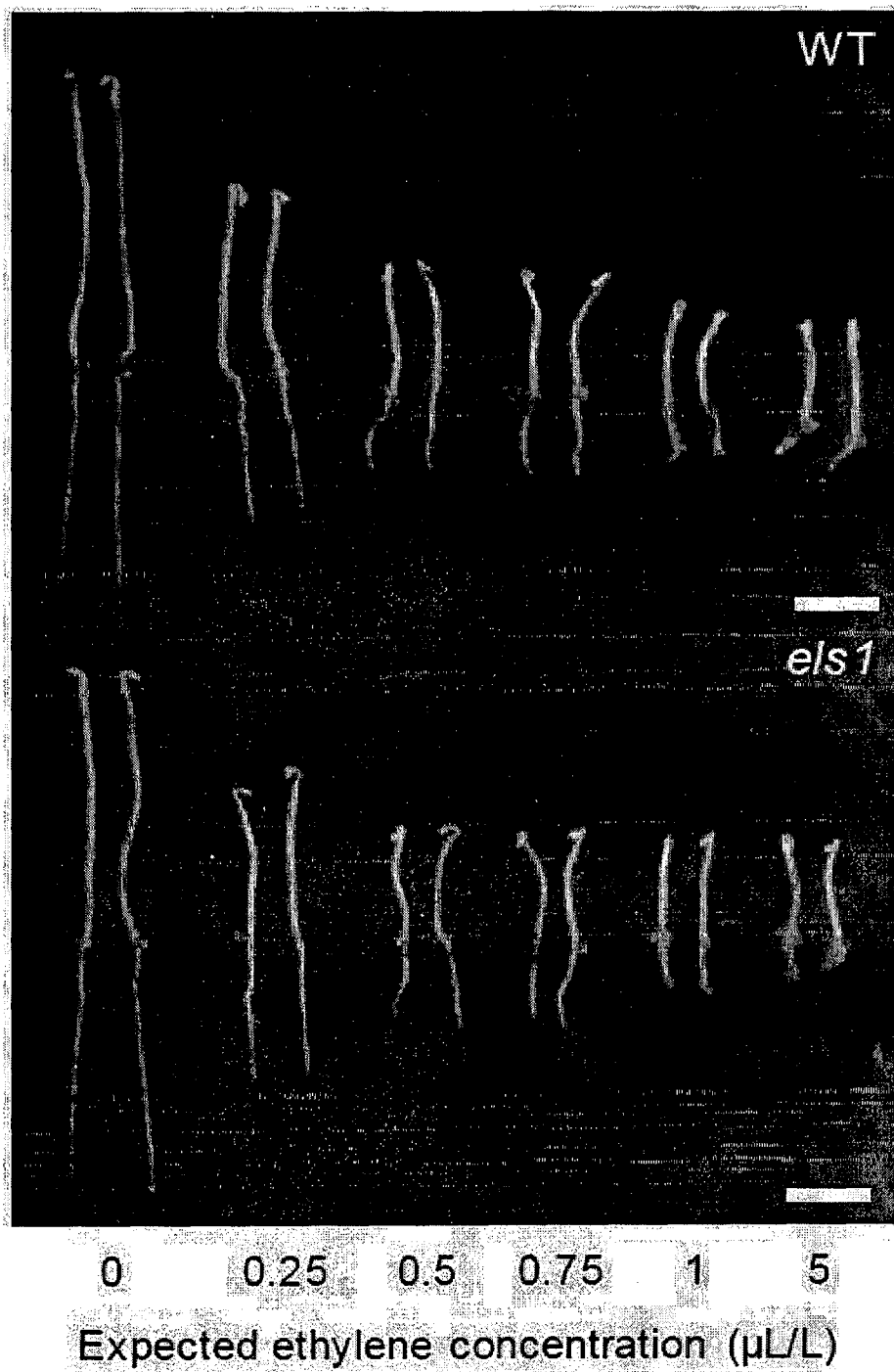
12/22

도 4f



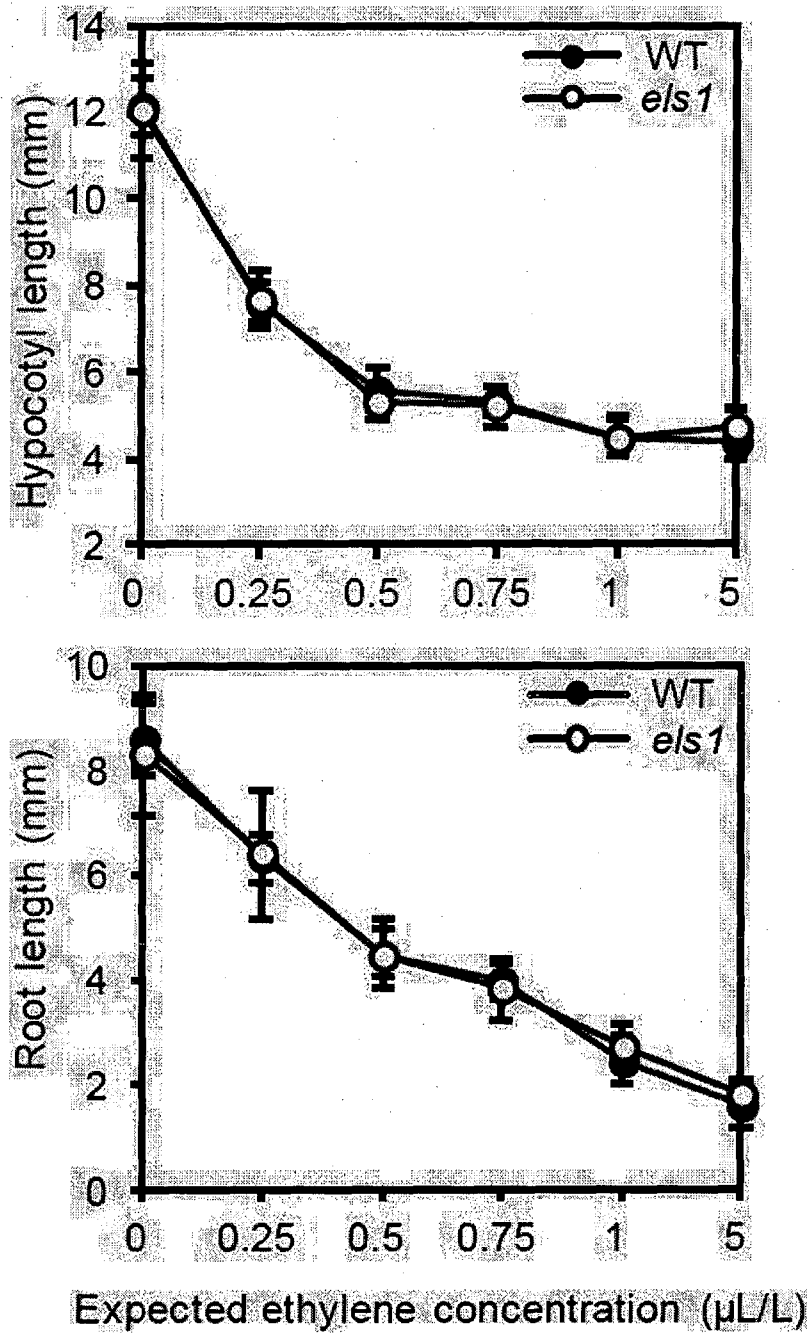
13/22

도 5a



14/22

도 5b

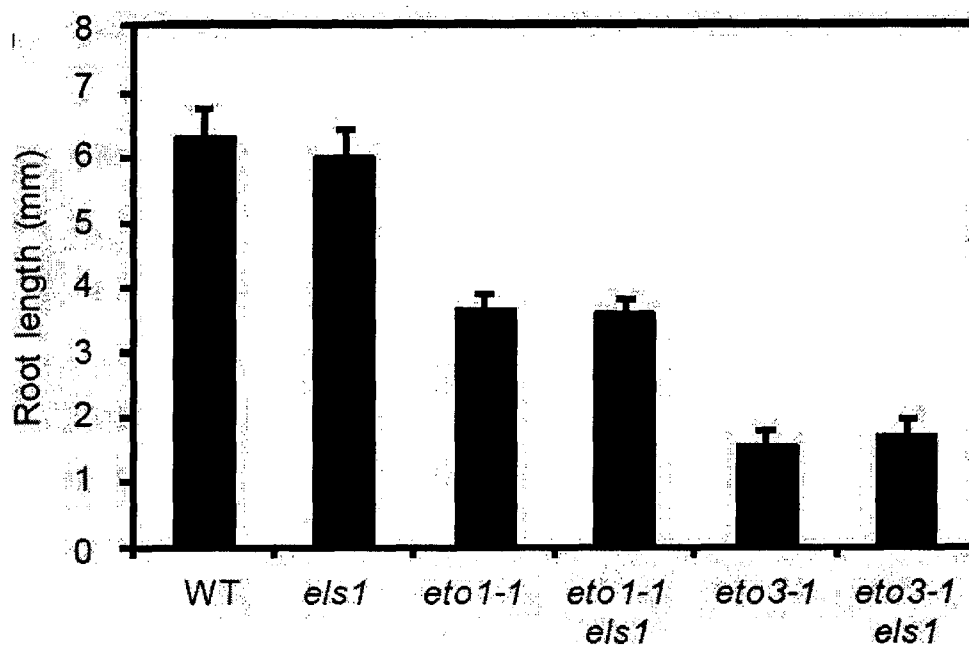


15/22

도 5c

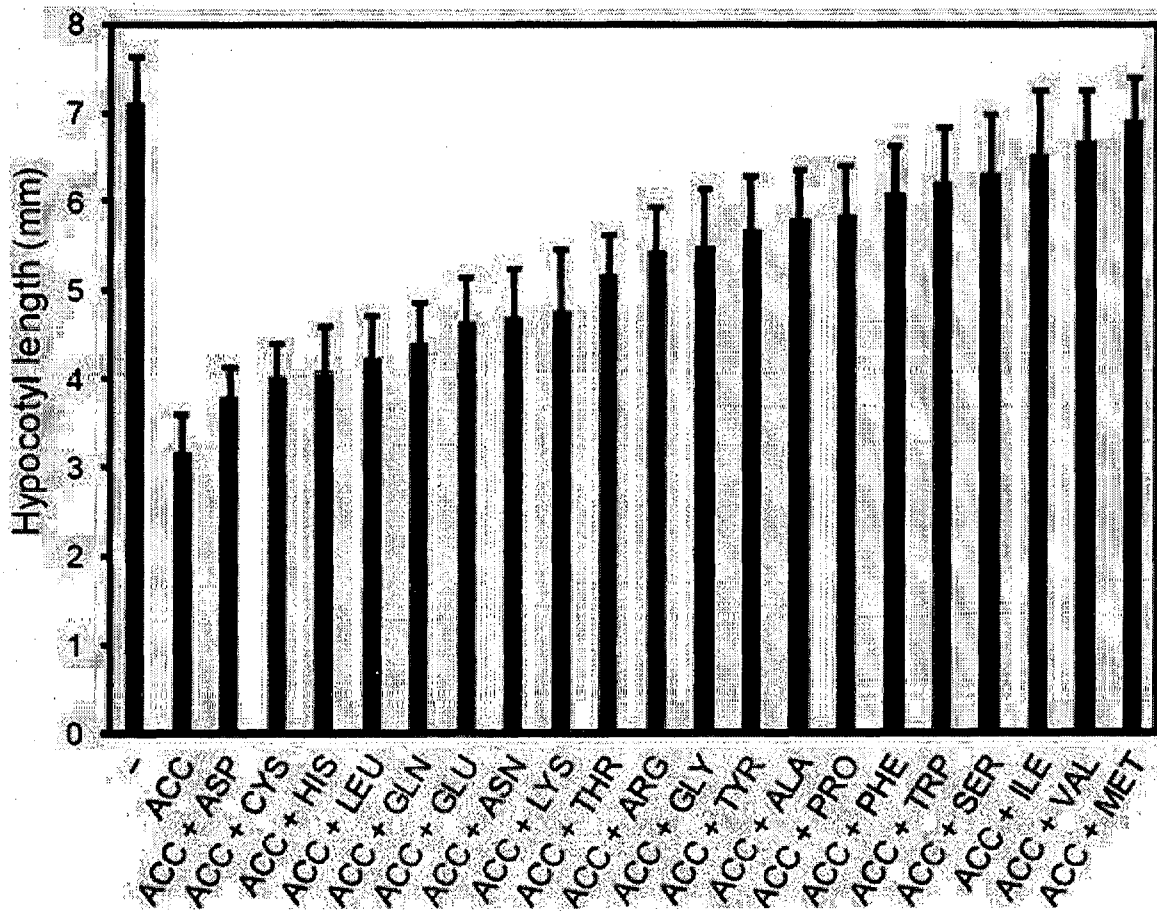


도 5d



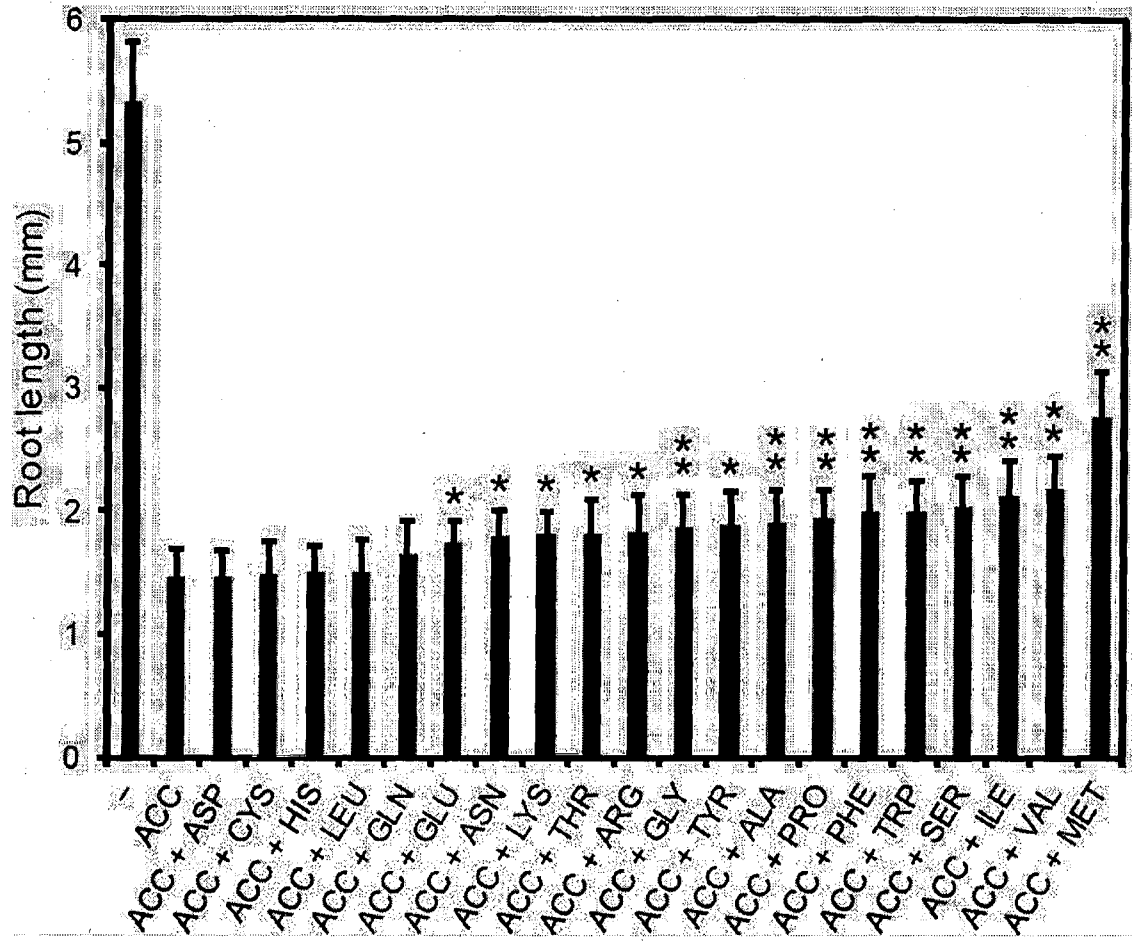
16/22

도 6a



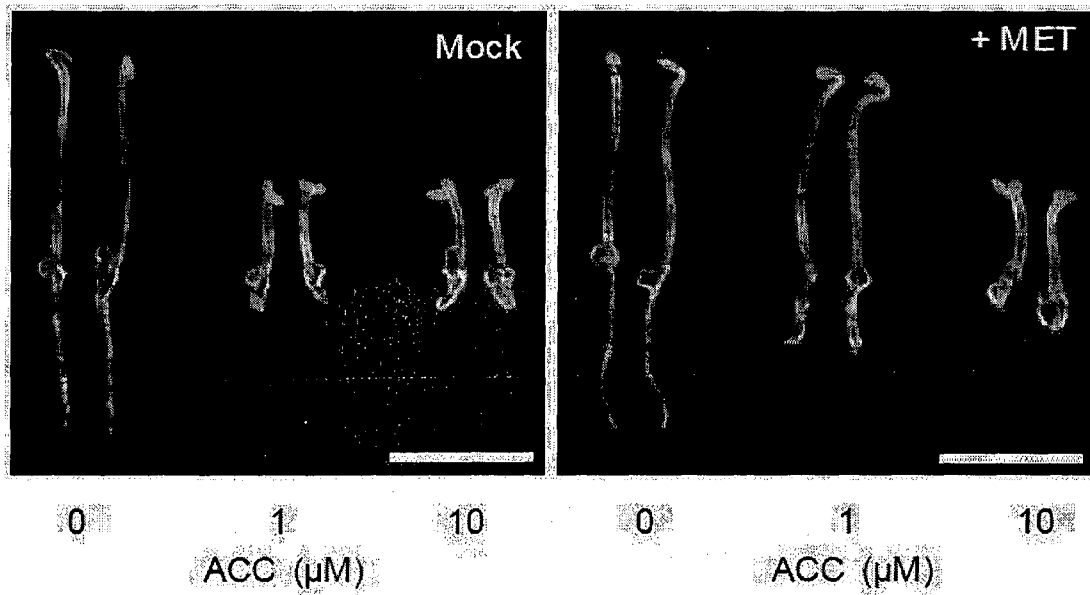
17/22

도 6b

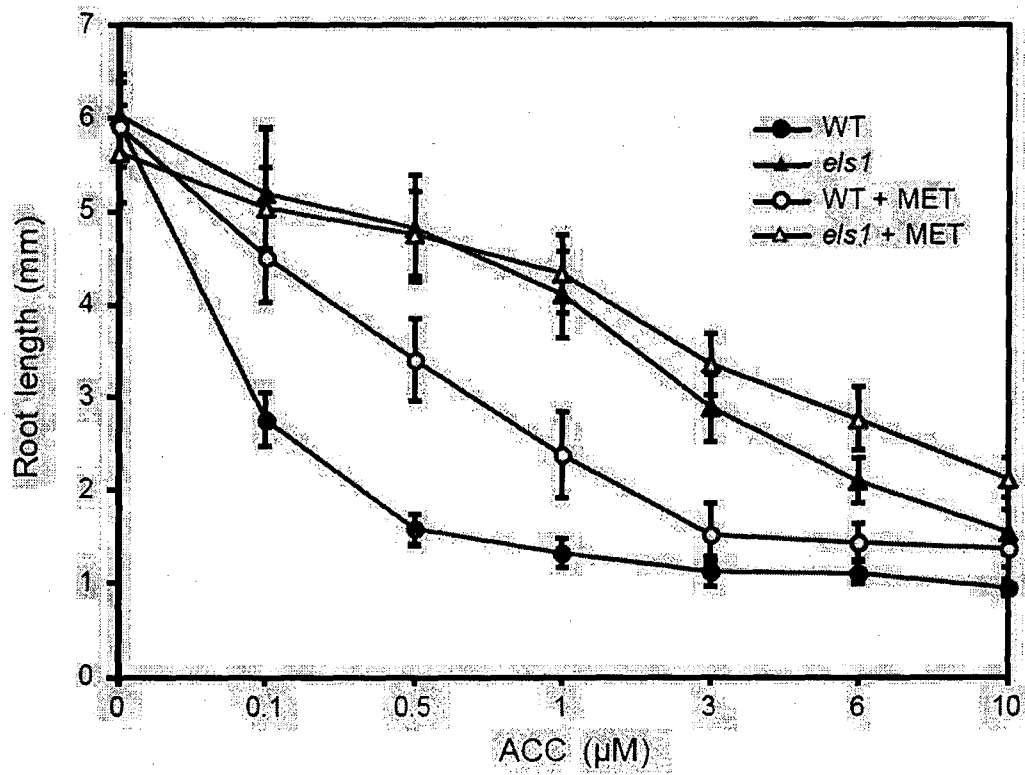


18/22

도 6c

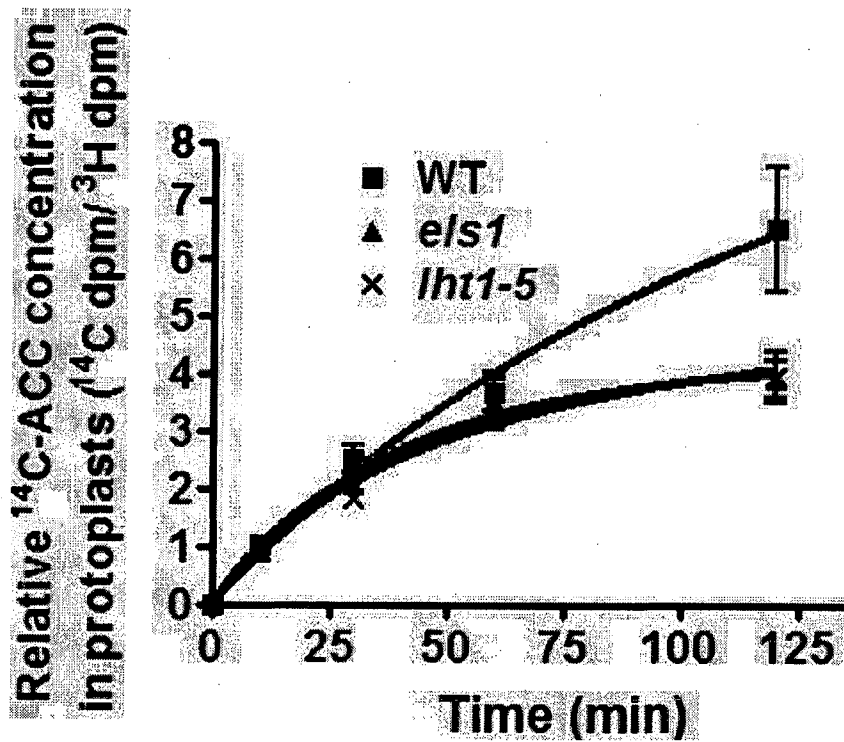


도 6d



19/22

E 7



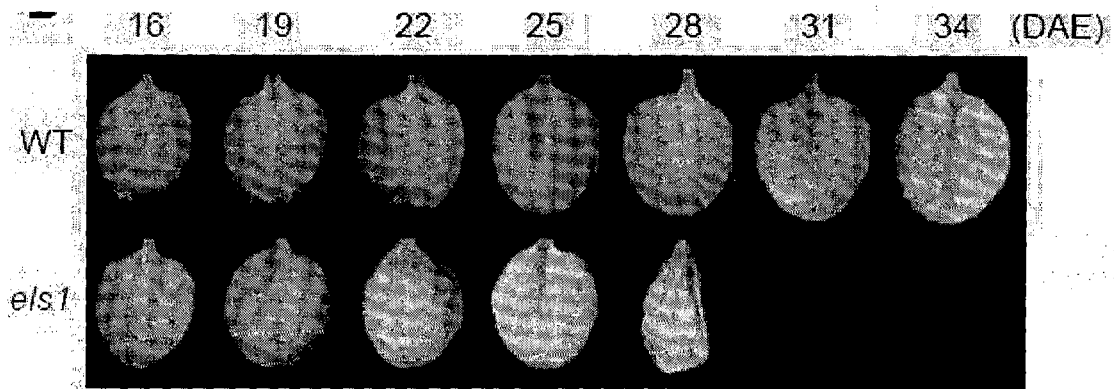
20/22

도 8a



21/22

도 8b

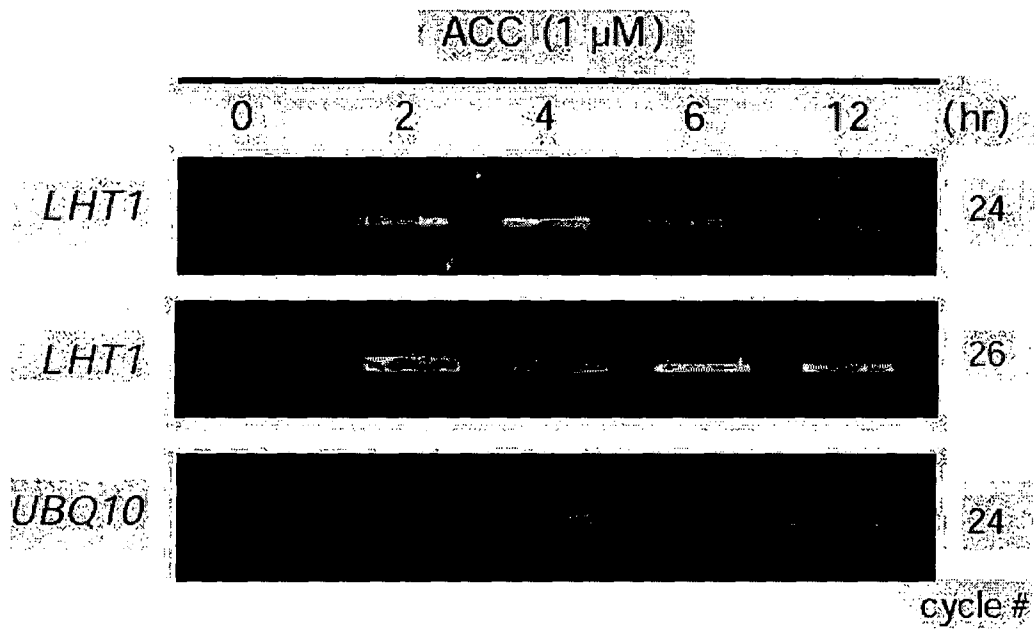


도 9

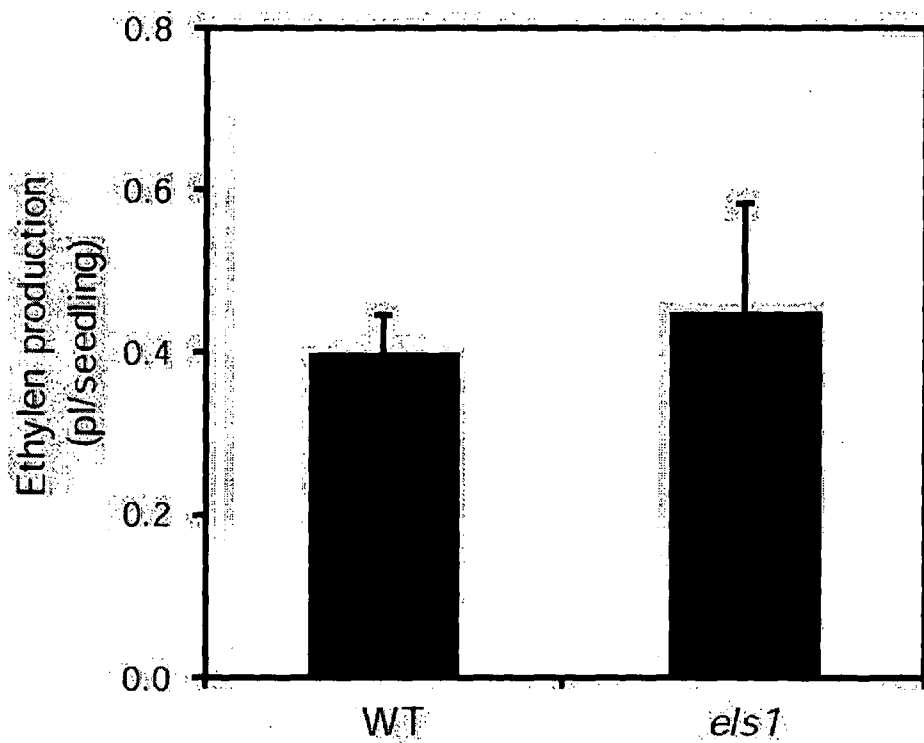


22/22

도 10



도 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/012140**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A01N 63/00(2006.01)i, C12N 15/29(2006.01)i, A01P 21/00(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01N 63/00; C12N 15/63; C12N 15/29; C12N 15/52; C12N 9/00; A01P 21/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: LHT1, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC, ethylene

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AXEL HIRNER et al., "Arabidopsis LHT1 Is a High-Affinity Transporter for Cellular Amino Acid Uptake in Both Root Epidermis and Leaf Mesophyll", The Plant Cell, Vol. 18, pp. 1931-1946, August 2006 See abstract and page 1944, Accession Numbers.	1-12
Y	LIU, G. et al., "Amino Acid Homeostasis Modulates Salicylic Acid-Associated Redox Status and Defense Responses in Arabidopsis", The Plant Cell, Vol. 22, pp. 3845-3863, November 2010 See page 3847, right column, line 9 - page 3848, right column, line 6.	1-12
Y	ADAMS, D. O. et al., "Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76(1), pp. 170-174, January 1979 See abstract.	1-12
A	KR 10-2006-0035579 A (UNIVERSITY OF HAWAII) 26 April 2006 See claim 13.	1-12
A	KR 10-0741255 B1 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 19 July 2007 See claim 2.	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

02 APRIL 2015 (02.04.2015)

Date of mailing of the international search report

02 APRIL 2015 (02.04.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/012140

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2006-0035579 A	26/04/2006	AU 1997-40629 B2	05/07/2001
		CA 2260765 A1	19/02/1998
		CA 2260765 C	15/01/2008
		CN 1227606 A0	01/09/1999
		EP 0918869 A1	24/03/2004
		JP 2000-500663 A	25/01/2000
		JP 2003-070368 A	11/03/2003
		JP 2005-323613 A	24/11/2005
		KR 10-2000-0029923 A	25/05/2000
		US 05767376 A	16/06/1998
		US 05874269 A	23/02/1999
		US 2003-0084487 A1	01/05/2003
		US 6448474 B1	10/09/2002
		US 6727406 B2	27/04/2004
		WO 98-06852 A1	19/02/1998
KR 10-0741255 B1	19/07/2007	JP 04189011 B2	03/12/2008
		JP 2008-017833 A	31/01/2008
		US 2008-0120735 A1	22/05/2008
		US 7781644 B2	24/08/2010
		WO 2008-007854 A1	17/01/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01N 63/00(2006.01)i, C12N 15/29(2006.01)i, A01P 21/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01N 63/00; C12N 15/63; C12N 15/29; C12N 15/52; C12N 9/00; A01P 21/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: LHT1, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC, 에틸렌

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	AXEL HIRNER et al., `Arabidopsis LHT1 Is a High-Affinity Transporter for Cellular Amino Acid Uptake in Both Root Epidermis and Leaf Mesophyll`, The Plant Cell, Vol. 18, pp. 1931-1946, August 2006 초록 및 1944쪽, Accession Numbers 참조.	1-12
Y	LIU, G. et al., `Amino Acid Homeostasis Modulates Salicylic Acid-Associated Redox Status and Defense Responses in Arabidopsis`, The Plant Cell, Vol. 22, pp. 3845-3863, November 2010 3847페이지, 좌측 컬럼, 9행 - 3848페이지, 좌측컬럼, 6행 참조.	1-12
Y	ADAMS, D. O. et al., `Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene`, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 76(1), pp. 170-174, January 1979 초록 참조.	1-12
A	KR 10-2006-0035579 A (유니버시티 오브 하와이) 2006.04.26 청구항 제13항 참조.	1-12
A	KR 10-0741255 B1 (고려대학교 산학협력단) 2007.07.19 청구항 제2항 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 04월 02일 (02.04.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 04월 02일 (02.04.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 7140

심사관

김종호

전화번호 +042 481 8657



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2006-0035579 A	2006/04/26	AU 1997-40629 B2 CA 2260765 A1 CA 2260765 C CN 1227606 A0 EP 0918869 A1 JP 2000-500663 A JP 2003-070368 A JP 2005-323613 A KR 10-2000-0029923 A US 05767376 A US 05874269 A US 2003-0084487 A1 US 6448474 B1 US 6727406 B2 WO 98-06852 A1	2001/07/05 1998/02/19 2008/01/15 1999/09/01 2004/03/24 2000/01/25 2003/03/11 2005/11/24 2000/05/25 1998/06/16 1999/02/23 2003/05/01 2002/09/10 2004/04/27 1998/02/19
KR 10-0741255 B1	2007/07/19	JP 04189011 B2 JP 2008-017833 A US 2008-0120735 A1 US 7781644 B2 WO 2008-007854 A1	2008/12/03 2008/01/31 2008/05/22 2010/08/24 2008/01/17