

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0052854 (43) 공개일자 2016년05월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)	(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)	
(21) 출원번호 10-2014-0147904	(72) 발명자 이궁주 세종특별자치시 조치원읍 섭골길 59, 112동 1103호 (세종e편한세상아파트)	
(22) 출원일자 2014년10월29일 심사청구일자 2015년10월06일	정성진 대전 유성구 대학로 34, 1706호 (봉명동, 노블레스타워)	
	(74) 대리인 최규환	

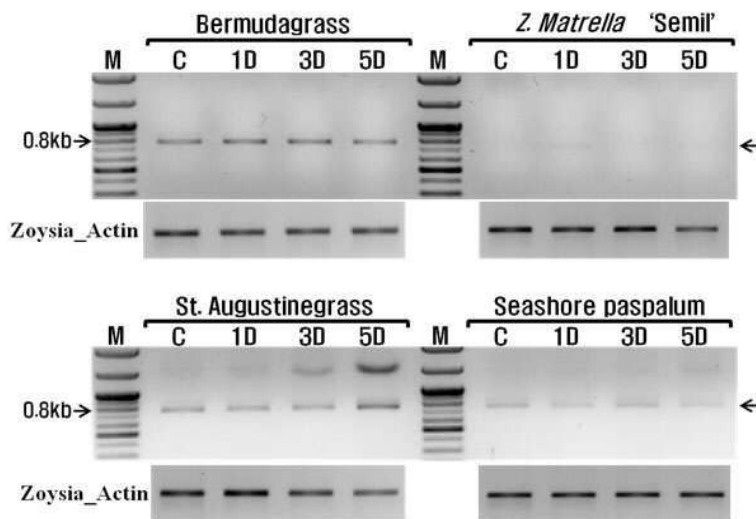
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **억새 유래의 WRKY4 단백질**

(57) 요약

본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 억새 유래의 WRKY4 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008131
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	식물분자육종사업단
연구사업명	차세대바이오그린21 사업
연구과제명	역새 EST 기반 바이오매스 증가 품종 육성을 위한 분자마커 개발 및 활용
기 여 율	1/2
주관기관	충남대학교
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PJ009081
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	식물분자육종사업단
연구사업명	차세대바이오그린21 사업
연구과제명	식물기반 유전자가위의 변이유도 시스템 구축
기 여 율	1/2
주관기관	충남대학교
연구기간	2012.05.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 억제 유래의 WRKY4 단백질.

청구항 2

제1항의 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 4

제3항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 억제 유래의 WRKY4 단백질에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 억제 유래의 WRKY4 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터 및 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전사요소(transcription factor; TF)는 특이한 염기서열을 가지고 있는 DNA 결합 단백질로 특정 유전자가 mRNA로 전사되는 과정에서 유전자의 프로모터 부위에서 작용을 촉진 또는 방해함으로써 식물체의 발달 또는 여러 환경 요인에 대한 반응을 조절하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 진핵생물의 경우 전사요소들은 전체 게놈의 약 7%를 차지하는 것으로 알려져 있으며 하나의 전사요소들은 유사 또는 특이한 기능을 가진 여러 개의 유전자군(gene family)으로 존재하고 있으며, 진화과정에서 여러 생물종 특히 식물 종에서 잘 보존되어 있는 것으로 보고되고 있다(Wang et al., 2010 BMC Plant Biol.10:192).

[0003] 이제까지 알려진 여러 전사요소들은 각각 특이성 있는 기능을 보이고 있는 것으로 알려졌다. 전사요소 bZip는 생물학적 및 비생물학적 신호작용 또는 발달 단계에 관여하는데 특히 ABA (abscisic acid)에 반응하는 유전자들의 전사작용을 촉진하는 것으로 보고 되었다(Jakoby et al., 2002 Trends Plant Sci. 7:106-111). 또 다른 커다란 식물 전사요소 유전자군에 속하는 Myb은 UV 광, 상처, 혐기성 스트레스, 생물 및 비생물적 스트레스에 반응하는 것으로 보고되고 있다(Cai et al., 2011 Gene 485:146-152). WRKY 전사요소군 역시 식물체 전사조절에서 매우 독특한 기능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Chen et al., 2012 Biochim. Biophys. Acta 1819:120-128). 특히 전사조절 유전자들 중에는 식물이 생육 적온보다 낮은 온도에서의 냉해 또는 빙점에 가까운 온도에서 동해피해를 대비하여 식물의 생리적 및 대사적 조절작용에 관여하는 것들이 다수 알려져 있다. 이들은 공통적으로 생육 적온 범위를 벗어나 냉해 또는 동해를 유발할 수 있는 환경조건에서 그 발현량이 증가되어 하부 조절작용에 관여하는 여러 유전자들과 결합하여 그 기능을 향상 또는 억제시킴으로써 식물체의 적응력을 높이는 작용을 한다(Qin et al., 2004 Trends Plant Sci. 15:247-258).

[0004] 난지형 잔디는 27-35℃의 온도 범위에서 원활한 생육을 보이는 것으로 알려졌지만 중 또는 품종간에도 온도에 대한 적응력 차이를 보이고 있고, 특히 St. Augustinegrass는 저온내성이 아주 낮고, seashore paspalum과 bermudagrass가 중간 정도, 그리고 상대적으로 한국 들잔디가 높은 것으로 알려졌다(Duncan and Carrow, 2000 Seashore paspalum: The environmental turfgrass. John Wiley & Sons, Inc, NJ, USA). 하지만 이들 난지형 잔디에서 저온 반응성과 관련한 유전 정보는 다른 식량작물들에 비하여 미약한 편이고 최근의 차세대 염기서열 정보를 활용한다면 실제 유전체 정보가 상대적으로 미흡한 잔디에서 유용한 유전정보를 활용할 수 있을 것으로 기대된다(Duncan and Carrow, 1999 Adv. Agron. 67:233-305). 실제로 최근의 비교 유전체 연구를 통해서 유전

체 구조가 복잡하거나 유전자 기능이 잘 알려져 있지 않은 잔디에서 기존 모델식물에서 밝혀진 저온내성 유전자 종류, 전사조절 기작 및 유전자 기능들을 활용하는 사례는 많이 보고되고 있다(Takuhara et al, 2011 J. Plant Physiol. 168:967-975).

[0005] 난지형 잔디와 같이 저온 휴면형 식물체는 가을철 온도하강과 함께 잎의 노화가 일어나고 녹기연장형(stay-green type)은 노화의 시작, 노화속도의 지연, 그리고 엽록소 분해정도에 따라서 4가지 유형으로 분류되고 있다(Kusaba et al., 2013 Photosynth. Res. DOI 10.1007/s11120-013-9862-x (e-online published ahead of print)). 식물체가 저온에 노출되었을 때 이러한 노화 또는 엽록소의 변화는 많은 유전자의 발현차이와 이들 유전자 조절 전사요소들이 관여하는 것으로 나타났다. 식물 발달단계에 따라 발현하는 전사요소 중에는 식물체의 노화시기를 결정하는데 관여하고 있어 이들 전사조절 유전자의 기능이 상실됨에 따라 식물체 잎의 녹색연장이 가능하다는 것을 실험적으로 증명하기도 하였다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1300509호에서는 '억새 유래의 COMT 유전자 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0795367호에서는 '병원균에 대한 저항성을 조절하는 고추의 전사조절 유전자 CaWRKY1'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 억새 유래의 WRKY4 단백질에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 억새 전사체 분석을 통하여 얻어진 전사조절 유전자 중에서 저온에 관여하는 새로운 유전자를 분리하였고, 다른 작물에서의 기능을 근거로 저온에서 발현이 증가하는 유전자를 중심으로 난지형 잔디에서의 저온 반응성을 분석하였다. 이를 위해서 먼저 타겟 전사조절 유전자의 유전정보를 확보하고 다른 작물과의 상동성을 비교하여 특성을 검증한 것이다. 또한 식물 종간에 비교적 잘 보존된 DNA 영역에서 프라이머 디자인을 한 뒤 저온 반응성이 다른 난지형 잔디를 저온에 노출시켜 시간에 따라 저온 반응 유전자의 변화를 조사하여 저온 적응성, 내한성 그리고 녹기지연 특성간의 관련성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 억새 유래의 WRKY4 단백질을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 억새에서 저온에 반응하는 새로운 전사요소인 WRKY4 단백질을 코딩하는 유전자를 분리한 것으로, 이를 이용함으로써 효과적으로 식물체에 저온 또는 동결 내성을 부여할 수 있다. 따라서, 화본과 작물인 억새뿐만 아니라 잔디를 포함하는 경제 작물 등의 생산성 향상과 수확량 증대 등에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 다른 식물 종으로부터 다른 WRKY 단백질과 관련 있는 억새 저온 반응 WRKY 이소티그(isotig)의 5개의 계통 그룹(그룹 I ~ V)을 나타낸다. 각각의 억새 이소티그는 점으로 나타내었고, 이소티그 말단에 WRKY 수는 애기장대 유전자 수를 나타낸다. 원의 그룹 I 및 IV의 WRKY 패밀리는 저온 처리 반응에서 유도되고, 사각형의 그룹 II, III 및 V는 억제된다고 보고되었다.

도 2는 저온(10℃) 처리 1, 3 및 5일 후에 반응하는 4종의 난지형 잔디 MSIR7180-WRKY4 전사인자의 RT-PCR 분석을 나타낸다. 잔디 액틴 유전자는 로딩 대조구조로 사용되었다. 화살표는 WRKY4 유전자의 예상 크기를 가리킨다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 역새 유래의 WRKY4 단백질을 제공한다.
- [0015] 본 발명에 따른 WRKY4 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.
- [0016] 본 발명은 또한 상기 단백질의 단편, 유도체 및 유사체 (analogues)를 포함한다. 본원에 사용된, 용어 "단편", "유도체" 및 "유사체"는 본 발명의 단백질과 실질적으로 같은 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 본 발명의 단편, 유도체 및 유사체는 (i) 하나 이상의 보존적(conservative) 또는 비보존적 아미노산 잔기(바람직하게는 보존적 아미노산 잔기)가 치환된 폴리펩티드(상기 치환된 아미노산 잔기는 유전암호에 의해 암호화될 수도, 되지 않을 수도 있다) 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산 잔기에서 치환기(들)를 가지는 폴리펩티드, 또는 (iii) 또 다른 화합물(폴리펩티드의 반감기를 연장할 수 있는 화합물, 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜)과 결합된 성숙 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드, 또는 (iv) 부가적인 아미노산 서열(예를 들면, 선도 서열, 분비 서열, 상기 폴리펩티드를 정제하는데 사용된 서열, 프로테이노젠(proteinogen) 서열 또는 융합 단백질)과 결합된 상기 폴리펩티드로부터 유래된 폴리펩티드일 수 있다. 본원에 정의된 상기 단편, 유도체 및 유사체는 당업자에 잘 알려져 있다.
- [0017] 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 오직 성숙 폴리펩티드만을 암호화하는 코딩 서열; 성숙 폴리펩티드 및 다양한 부가적인 코딩 서열을 암호화하는 서열; 성숙 폴리펩티드(및 임의의 부가적인 코딩 서열) 및 넌코딩 서열을 암호화하는 서열을 포함한다.
- [0018] 용어 "폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드"는 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 부가적인 코딩 및/또는 넌코딩 서열을 더 포함하는 폴리뉴클레오티드를 말한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 것과 동일한 아미노산 서열, 또는 이의 단편, 유사체, 및 유도체를 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오티드의 변이체에 관한 것이다. 폴리뉴클레오티드 변이체는 자연적으로 발생하는 대립유전자 변이체 또는 비자연적으로 발생하는 변이체일 수 있다. 상기 뉴클레오티드 변이체는 치환 변이체, 결실 변이체, 및 삽입 변이체를 포함한다. 당업계에 공지된 바와 같이, 대립유전자 변이체는 폴리뉴클레오티드의 대안(alternative)이며, 이는 하나 이상의 치환, 결실 또는 삽입된 뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 변이체에 의해 암호화된 폴리펩티드에서 실질적인 기능 변화를 초래하지는 않는다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 WRKY4 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 WRKY4 단백질을 코딩하는 DNA 또는 RNA 일 수 있다. DNA는 cDNA, 게놈 DNA 또는 인위적인 합성 DNA를 포함한다. DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. DNA는 코딩 (coding) 가닥 또는 넌코딩 (non-coding) 가닥일 수 있다.
- [0021] 바람직하게는, 본 발명의 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 기재된 서열번호 1의 염기서열과 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 70%, 더욱 바람직하게는 적어도 80%의 동일성을 가지는 서열과 혼성화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명은 특히, 스트린젠트 조건하에 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명에서, "스트린젠트 조건"은 (1) $0.2 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, 60°C와 같은 더 낮은 이온강도 및 더 높은 온도하에서의 혼성화 및 세척; 또는 (2) 50%(v/v) 포름아미드, 0.1% 소혈청/0.1% Ficoll 및 42°C 등과 같은 변성제의 존재하에 혼성화; 또는 (3) 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 더욱 바람직하게는 95% 이상의 동일성을 가지는 단지 2개의 서열 사이에서 발생하는 혼성화를 말한다. 게다가, 혼성화가 가능한 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화된 폴리펩티드의 생물학적 기능 및 활성은 서열번호 2로 표시되는 성숙 폴리펩티드의 생물학적 기능 및 활성과 동일하다.
- [0023] 본 발명은 또한, 상기 WRKY4 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

- [0024] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호된 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.
- [0025] 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 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0026] 본 발명은 또한, 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포(예컨대, CHO 세포주(Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.
- [0028] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.
- [0029] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] **재료 및 방법**
- [0031] **식물체 재료 및 저온처리**
- [0032] 본 발명에 이용된 식물체는 충남대학교에서 수집 또는 분양받아 보관중인 난지형 잔디 4종 [한국 금잔디 교배종 '세밀' (단국대 분양품종, *Zoysia matrella*), bermudagrass (국내 수집종, *Cynodon dactylon*), St. Augustinegrass (미국 조지아대학교 분양, *Stenotaphrum secundatum*), seashore paspalum (미국 조지아대학교 분양, *Paspalum vaginatum*)]을 이용하여 실시하였다. 종자를 이용하여 번식시킨 Seashore paspalum을 제외하고는 영양체를 이용하여 증식하였고, 유리온실 조건에서 15 cm 직경의 화분에서 4개월 이상 생육시켜 충분히 자란 식물체를 이용하였다.
- [0033] 온실의 화분에서 생육중에 있던 상기 4종의 잔디로부터 RNA 추출을 위하여 잎을 샘플링한 뒤 10℃로 맞추어진 생육상(16 및 8시간 명기와 암기)에 옮긴 후 1, 3 그리고 5 일차에 같은 방법으로 잎 조직으로부터 유전자 발현을 위한 RNA를 추출하였다. 모든 잎 샘플은 액체 질소에 곧바로 동결한 뒤 막자사발을 이용하여 신속하게 분쇄한 뒤 RNA 분석에 이용하였고 남은 조직은 모두 초저온 냉동고(-80℃)에 보관하였다.
- [0034] **역세 전사요소의 탐색과 출현빈도**
- [0035] 본 발명에 이용된 전사요소는 잔디와 같이 화분과 작물의 하나인 역세 EST (Expressed Sequence Tag)에서 유래하였다. 참역세 (*Miscanthus sinensis*)와 물역세(*M. sacchariflorus*) 2종의 잎과 지하경(rhizome)으로부터 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Seoul, Korea)을 이용하여 총 RNA를 추출한 뒤 SuperScript II (Life Technologies, Carlsbad, CA)로 cDNA를 합성하였고, Roche GS-FLX 454 염기서열분석기(Roche, Brandford, CT)를 이용하여 염기서열 정보를 확보하였다. 총 4개의 역세 EST 집단(2개 역세로부터 각각 잎과 지하경 조직)에서 확보된 DNA 단편 조각들은 GS 드 노보 어셈블리 (버전 2.6)를 이용하여 유전자의 기능분석을 위한 길다란 콘티그들로 재조합하였다.
- [0036] GS-FLX 염기서열 분석장치를 활용한 NGS 분석을 통해 확보한 역세 잎과 지하경의 EST 데이터는 데이터베이스 검색 (<http://www.phytozome.net/>)을 통해 애기장대와 벼에서 밝혀진 유전자를 기초로 역세 EST 염기서열에 대한 애노테이션 (annotation)을 수행하였다. 역세 전사조절 요소 분석은 Jin et al. (2013, Nucl. Acids Res.)이

개발한 Plant Transcription Factor Database v3.0 (<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>)에 있는 데이터 베이스를 기초로 수행하였다.

[0037] **난지형 잔디의 WRKY 전사요소의 분석**

[0038] 역새 전사요소를 분석한 결과 WRKY 패밀리가 참억새와 물억새 잎과 줄기에서 발현되는 모든 종류 중 가장 높은 빈도로 출현(9.59%)하였고, 저온 스트레스에서 식물의 방어기작에 관여한다는 사실을 근거로 본 발명에서는 여러 난지형 잔디의 저온 반응의 차이를 알아보기 위하여 WRKY 전사요소를 대상으로 분석하게 되었다.

[0039] 잔디 WRKY 유전자의 염기서열은 역새 트랜스크립톰(transcriptome) 분석을 통해 얻어진 EST 데이터로부터 plant TF DB(<http://planttfdb.cbi.pku.edu.cn/>)에 있는 데이터를 기초로 약 230여 개의 WRKY 패밀리와 상동성을 보이는 이소티그(isotig)로부터 확보하였다. 그 중 약 80여 개의 이소티그가 저온에 반응하는 WRKY 패밀리와 높은 상동성을 보이는 것으로 확인되었다. 80여 개의 역새 이소티그에서 얻어진 염기서열 정보들은 BLASTN을 이용하여 NCBI 데이터베이스에서 검색된 자료들과 비교 분석하였고 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>)를 이용하여 여러 식물체에서 공통적으로 나타나는 염기서열을 기초로 프라이머를 디자인하였다(표 3).

[0040] NCBI 데이터베이스에서 확보한 여러 식물체의 WRKY 패밀리를 유사도 분석과 계통수(phylogenetic tree)는 BioEdit 소프트웨어(V.7.0.9.0, <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit>)와 Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 소프트웨어(v.5.2, <http://www.megasoftware.net>) (Tamura et al., 2007 Mol. Biol. Evol. 28:2731-2739)를 이용하여 neighbor-joining methods로 작성하였다(Saitou and Nei, 1987 Mol. Biol. Evol. 4:406-425).

[0041] **WRKY 전사요소의 잔디 저온 반응성 분석**

[0042] 저온(10℃)에서 잔디 WRKY 전사요소의 발현양상을 알아보기 위하여 4종의 잔디 잎(100mg)으로부터 Hybrid R (Geneall, Seoul, Korea)를 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 흡광도계를 이용하여 정량하여 냉동고(-80℃)에 보관하여 사용하였다. RT (reverse transcription) PCR은 Takara RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (Takara, Shiga, Japan)를 이용하여 제조사 사용방법을 따라 실시하였고, NCBI에 공개되어 있는 한국잔디 (*Zoysia japonica*) 베타-액틴 (GU290545, 1134bp)을 기준으로 참억새와 물억새 잎 또는 지하부 조직으로부터 탐색된 저온반응 WRKY 전사요소(MSAL314_WRKY33, MSAL1702_WRKY33, MSIR7180_WRKY4)의 상대적인 발현차이를 조사하였다(표 3). 발현량을 조사하기 위한 들잔디 액틴 유전자의 프라이머는 액틴_F: 5'-ATG GCT GAC GGT GAG GAT ATC-3' (서열번호 3), 액틴_R: 5'-TTA GAA GCA TTT CCG GTG AAC-3' (서열번호 4)으로 디자인하였다. 잔디 액틴 유전자의 증폭은 우선 94℃에서 5분간 DNA 가닥의 변성, 이어 25회에 걸쳐 변성(94℃에서 30초)-결합(53℃에서 30초)-신장(72℃에서 1분 10초)을 반복한 뒤 마지막으로 72℃에서 7분간 안정화 과정을 거쳐 중합반응을 완료했다. 잔디의 저온반응성을 알아보기 위하여 사용된 MSIR7180_WRKY4 전사요소의 연쇄중합반응은 94℃에서 5분간 DNA 가닥의 변성, 이어 25회에 걸쳐 변성(94℃에서 30초)-결합(55℃에서 30초)-신장(72℃에서 1분)을 반복한 뒤 마지막으로 72℃에서 7분간 안정화시켜 완료했다.

[0043] **실시예 1. 역새 유래의 WRKY4 유전자의 동정 및 저온 처리시 발현 양상 분석**

[0044] 본 발명에서는 역새의 잎과 지하경 조직으로부터 확보한 4개의 역새 EST 라이브러리로부터 유전자 전사요소 전체를 탐색하여 그 중 생육 적온보다 낮은 저온에 반응하는 전사조절 요소를 조사하고 난지형 잔디에서 반응차이를 알아보는 것을 목적으로 하였다.

[0045] 분석결과, 탐색된 전사조절 요소의 종류는 총 50 종류로 나타났고, 그 중 WRKY 패밀리의 전사요소와 관련 있는 이소티그가 226개로 가장 많이 발견되었고(9.6%), 다음으로 ERF 전사요소와 관련 있는 이소티그가 212개(9.0%), bZIP 전사요소와 관련 있는 이소티그가 179개(7.6%), Myb-관련의 전사요소와 관련 있는 이소티그가 161개(6.8%), 그리고 NAC 전사요소와 관련 있는 이소티그가 156개(6.6%) 순으로 상위 5종류에 포함되었다(표 1).

표 1

[0046] 두 종의 엑세로부터 동정된 전사요소 리스트

전사요소 패밀리	이소타그 갯수 ^a				총 갯수	%
	MSA leaf	MSA rhizome	MSI leaf	MSI rhizome		
WRKY	55	48	83	40	226	9.6
ERF	43	66	54	49	212	9.0
bZIP	30	25	93	31	179	7.6
MYB_related	58	51	32	20	161	6.8
NAC	40	32	56	28	156	6.6
MYB	25	39	40	34	138	5.9
bHLH	36	30	43	11	120	5.1
C2H2	38	21	27	26	112	4.8
ARF	18	31	23	21	93	3.9
TALE	9	20	22	25	76	3.2
GRAS	16	17	25	17	75	3.2
HSF	8	17	18	27	70	3.0
HD-ZIP	9	22	11	17	59	2.5
GATA	11	13	11	16	51	2.2
C3H	22	8	9	10	49	2.1
CO-like	14	5	18	7	44	1.9
CAMTA	4	10	20	9	43	1.8
Dof	6	15	10	7	38	1.6
MYC	9	8	11	10	38	1.6
DBB	14	6	9	4	33	1.4
Trihelix	6	11	8	8	33	1.4
G2-like	7	9	10	6	32	1.4
SBP	4	7	5	10	26	1.1
ARR	7	6	6	6	25	1.1
B3	3	5	9	6	23	1.0
LBD	-	7	6	9	22	0.9
NF-YA	3	5	4	6	18	0.8
HB-other	2	3	6	6	17	0.7
EIL	5	2	7	2	16	0.7
NF-YC	4	3	5	3	15	0.6
Nin-like	4	3	7	1	15	0.6
RAV	7	-	5	2	14	0.6
HB-PHD	3	3	5	2	13	0.6
BES1	2	3	3	3	11	0.5
GRF	1	1	4	5	11	0.5
FAR1	2	1	4	3	10	0.4
NF-YB	1	2	3	4	10	0.4
TCP	3	4	2	-	9	0.4
AP2	4	1	2	1	8	0.3
BBR/BPC	-	3	1	3	7	0.3
GeBP	1	2	3	1	7	0.3
NF-X1	4	-	2	-	6	0.3
S1Fa-like	1	1	1	1	4	0.2
SRS	1	-	1	2	4	0.2
Whirly	-	1	2	1	4	0.2
CPP	-	2	-	1	3	0.1
ZF-HD	1	1	1	-	3	0.1
VOZ	-	1	-	1	2	0.1
E2F/DP	-	-	-	1	1	0.04
YABBY	-	-	1	-	1	0.04

[0047] ^a MSA: 물억새(*M. sacchariflorus*), MSI: 참억새(*M. sinensis*)

[0048] 억새 종류 및 조직별 전사요소의 분포를 보면 물억새는 잎에서 MYB-관련 유전자가 가장 많았고(10.6%), WRKY(10.1%)와 ERF(7.9%) 유전자가 그 다음 순으로 EST 이소티그와 관련되었고, 지하경의 경우 ERF(11.5%), MYB-관련(8.9%), 그리고 WRKY(8.3%) 순으로 분포하였다. 참억새 잎의 경우는 bZIP(12.7%) 유전자가 가장 많았고, WRKY(11.4%), NAC(7.7%) 순으로 분포하였으며, 지하경에서는 ERF(9.7%), WRKY(7.9%) 그리고 MYB(6.7%) 순으로 높게 나타났다. 억새의 조직별로는 CPP와 VOZ 유전자는 지하경에서만 관찰되었으며, NF-X1은 반대로 잎에서만 관찰되었다. 억새의 종류에 따라 E2F/DP는 참억새의 지하경에서, YABBY는 참억새의 잎에서만 관찰되는 것을 알 수 있었고, 물억새 잎과 지하경에서만 관찰되는 유전자는 없는 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어 볼 때 전사요소는 식물 종 또는 조직 특이적으로 유전자 발현 조절기능이 다르다는 것을 알 수 있었다.

[0049] 발견된 전사조절 유전자 중에서 제일 많이 발견된 것은 WRKY 전사요소였고, 따라서 본 발명에서는 억새 WRKY 패밀리를 애기장대, 벼 그리고 수수에서 기능이 밝혀진 WRKY 유전자들과 비교 검색한 결과 약 80개의 억새 이소티그가 저온에 반응하여 발현이 유도 또는 억제되는 것으로 나타났고, 이들은 또한 저온 또는 다른 비생물적 스트레스 환경에서 자란 타 작물의 WRKY 유전자들과 매우 높은 상동성을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 탐색된 80개의 억새 이소티그 중 염기서열 길이가 가장 길고 상동성이 가장 높은 것(e-value 기준)으로 확인된 7개의 억새 이소티그를 얻을 수 있었고 애기장대와 벼에서 저온에 대한 반응성을 기초로 상동성이 높은 유전자를 찾을 수 있었다(표 2).

표 2

[0050] 저온 반응의 억새 WRKY 전사요소 및 이와 상동성이 높은 애기장대, 벼 및 수수 유래의 유전자들

억새 이소티그 갯수 ^a	애기장대 ID	벼 ID	수수 ID	유전자 애노테이션 ^b	
				애기장대	벼
MSAL_isotig00314	AT2G38470.1	Os05g27730.1	Sb09g015900.1	<i>AtWRKY33</i>	<i>OsWRKY53</i>
MSAL_isotig01702	AT2G38470.1	Os01g61080.1	Sb03g038510.1	<i>AtWRKY33</i>	<i>OsWRKY24</i>
MSAL_isotig01948	AT4G23810.1	Os09g16510.1	Sb02g022290.1	<i>AtWRKY53</i>	<i>OsWRKY74</i>
MSAL_isotig04544	AT4G26640.2	Os07g39480.1	Sb02g037660.1	<i>AtWRKY20</i>	<i>OsWRKY78</i>
MSAL_isotig05174	AT2G46400.1	Os09g16510.1	Sb02g022280.1	<i>AtWRKY46</i>	<i>OsWRKY74</i>
MSAR_isotig05845	AT4G39410.1	Os01g08710.1	Sb03g003640.1	<i>AtWRKY13</i>	<i>OsWRKY79</i>
MSIR_isotig07180	AT1G13960.1	Os08g17400.1	Sb07g016330.1	<i>AtWRKY4</i>	<i>OsWRKY</i>

[0051] ^a MSAL: 물억새 잎(Leaf of *M. sacchariflorus*), MSAR: 물억새 지하경(rhizome of *M. sacchariflorus*), MSIR: 참억새 지하경(rhizome of *M. sinensis*)

[0052] ^b 볼드체는 애기장대 또는 벼에서 저온 반응으로 유도된 유전자

[0053] 계속해서 이들 7개 이소티그들의 염기서열 정보들을 BLASTN을 이용하여 NCBI 데이터베이스에 등록된 다른 유전자들의 염기서열과 비교하였고 여기서 확보한 염기서열들은 ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>)를 이용하여 여러 식물체 (*Zea mays*, *Setaria italic*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*)의 염기서열 정보와 유사도 분석을 위한 정렬을 수행한 결과 5개의 그룹으로 분류할 수 있었다(도 1). 그림에서 표시된 것처럼 원형 안의 그룹 I과 IV에 속하는 *WRKY* 패밀리들은 저온에 처했을 때 발현이 증가되고, 그룹 II, III, 그리고 V에 있는 *WRKY* 패밀리들은 저온에서 억제되는 것으로 알려졌다(Rushton et al., 2010 Trends Plant Sci. 15:247-258). 즉 저온에서 발현이 증가되는 *WRKY* 전사요소들은 세포의 핵으로부터 세포질로 이동하여 하부의 저온 내성에 관여하는 유전자들 (예, *AtABF4*, *AtDREB1A* 등)의 발현을 유도하여 식물로 하여금 추위에서 견딜 수 있도록 한다(Chen et al., 2012 Biochim. Biophys. Acta 1819:120-128).

[0054] 난지형 잔디의 저온 반응성을 비교하기 위하여 무가온 온실에서 자란 4가지 난지형 잔디의 MSIR7180_WRKY4 유전

자(도 1의 그룹 IV)의 발현을 저온(10℃)에서 노출시킨 뒤 조사하였다. *MSIR7180_WRKY4* 유전자는 애기장대와 벼에서 저온 처리 후 발현이 증가되는 것으로 알려졌고 역세 이소티그가 이들 유전자와 상동성이 높아 동일한 것으로 간주되어 *WRKY4*의 이름을 붙였다(표 3 및 도 1). *MSIR7180_WRKY4* (본 발명의 서열번호 1로 이루어진 염기서열을 가지는 *WRKY4*)의 유전자는 참억새의 지하경과 잎에서만 확인되었고, 지하경에서 확인된 염기서열 정보가 잎에서 확인된 염기서열보다 길고 애기장대 및 벼와 상동성이 높아서 지하경의 염기서열을 이용하여 블라스트 검색을 실시하여 프라이머 제작을 시도하였다(표 3).

표 3

난지형 잔디 *WRKY* 유전자의 발현 분석에 이용된 프라이머(잔디 액틴은 대조구로 사용됨)

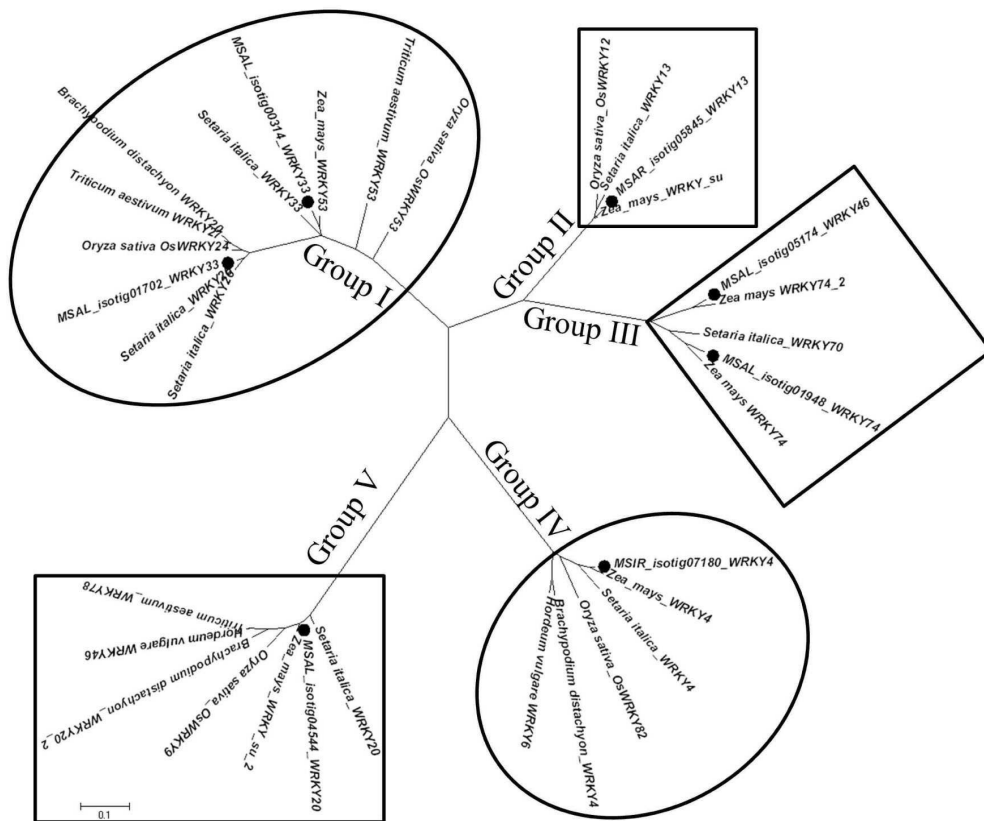
프라이머 이름 ^a	5' to 3' 서열	타겟 크기 (bp)
<i>MSIR7180_WRKY4_F</i>	CATCAAGCAGCTTTGGCRAG (서열번호 5)	800
<i>MSIR7180_WRKY4_R</i>	CGCCATCTRTAYCCATCACTC (서열번호 6)	
<i>Zoysia_ACTIN_F</i>	ATGGCTGACGGTGAGGATATC (서열번호 7)	1,134
<i>Zoysia_ACTIN_R</i>	TTAGAAGCATTTCCGGTGAAC (서열번호 8)	

^a MSIR: 참억새 지하경(rhizome of *M.sinensis*)

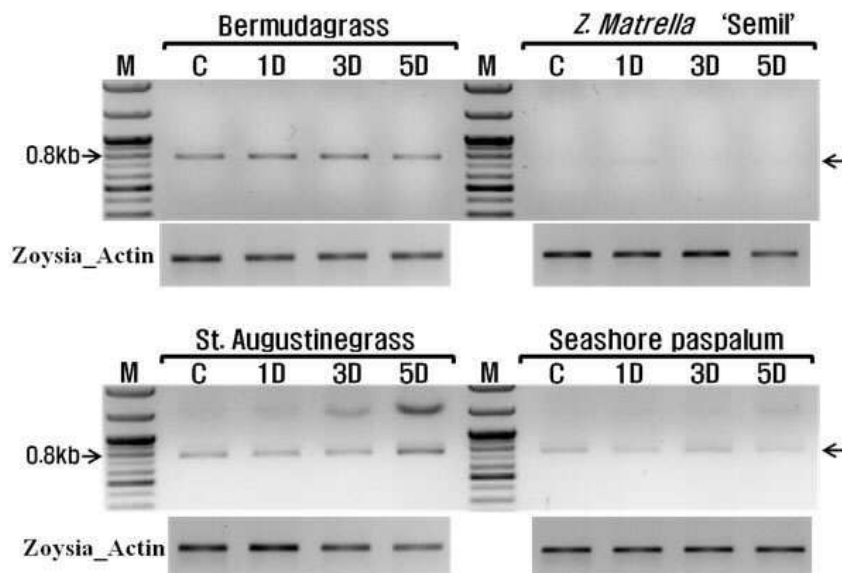
MSIR7180_WRKY4 유전자의 발현 양상은 4가지 난지형 잔디에서 특징적으로 달리 나타났다. 버뮤다그래스는 처리 기간 동안 유전자의 발현에 큰 차이는 보이지 않았으나 비교구(무가온 온실)에서도 높은 발현을 보이고 있었고, 금잔디(*Z. matrella*)간의 교배를 통해 얻어진 세밀 품종은 처리기간 내내 발현이 미약하였다(도 2). 한편 St. Augustinegrass는 3일 동안은 비교구와 큰 차이가 없다가 5일째부터 발현이 증가하였고, 반면에 Seashore paspalum은 처리 초기의 발현이 5일째에는 약해지는 경향을 나타냈다. 이러한 결과로 유추해 볼 때 버뮤다그래스와 St. Augustinegrass는 저온에 노출되었을 때 급속히 관련 유전자들이 작동하여 휴면 또는 저온 적응성을 보이지만, 상대적으로 금잔디와 Seashore paspalum 잔디는 저온 반응 유전자의 작동이 상대적으로 늦은 것으로 해석될 수 있었다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> WRKY4 protein from Miscanthus species

<130> PN14317
 <160> 8
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 749
 <212> DNA
 <213> Miscanthus species
 <400> 1

catcaagcag ctttggcgag tgttacagca caggcacaaa tgcacttgca gtcaccaact 60
 tcatctgcat gttcggaagt gccatcaagt ccattttata tgacaccaag atctctagt 120
 ccactgcagc aatcaccatc agtaactgaa ggaaatatat gtaaaccaat tgctgacaag 180

tcattttcat ctgattcaaa atcacacat gttgttgtaa atatggtagc tgatggcttc 240
 aactggagga aatatggta gaagcaggtg aaaagtagtg ataattccag gagctactat 300
 agatgcacaa acttaggttg tctggctaaa aagaaggtcg agcatttccc tgatggccgt 360
 gttgtggaaa tcatttatag aggagctcat aatcatgaac caccacaaaa gaccagattt 420
 gcaaaagaaa gagtactcc tatcagtgtt ccctctggag gcgaaatctt gagacttggtg 480
 aacacagaaa tttagaatc cagtacgcct acttgtaaat tggaacagag tgccatctca 540
 gaaacttctg agcagcatct cttttgctca agtgactgcg aaggggatgc tggtacaaaa 600

tctgaagatg aacatcctag tgcagaaccc ctgccaagc gaagagcact cgagaccaca 660
 gcgcctaacc taacgccagt tctcagaact gttagagagc aaaagattat tgtgcaggct 720
 ggaaagatga gtgatggata cagatggcg 749

<210> 2
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> Miscanthus species
 <400> 2

Val Val Val Asn Met Val Ala Asp Gly Phe Asn Trp Arg Lys Tyr Gly
 1 5 10 15
 Gln Lys Gln Val Lys Ser Ser Asp Asn Ser Arg Ser Tyr Tyr Arg Cys
 20 25 30
 Thr Asn Leu Gly Cys Leu Ala Lys Lys Lys Val Glu His Phe Pro Asp
 35 40 45

Gly Arg Val Val Glu Ile Ile Tyr Arg Gly Ala His Asn His Glu Pro
50 55 60
Pro Gln Lys Thr Arg Phe Ala Lys Glu Arg Val Thr Pro Ile Ser Val
65 70 75 80
Pro Ser Gly Gly Glu Ile Leu Arg Leu Val Asn Thr Glu Ile Val Glu
85 90 95
Ser Ser Thr Pro Thr Cys Lys Leu Glu Gln Ser Ala Ile Ser Glu Thr
100 105 110
Ser Glu Gln His Leu Phe Cys Ser Ser Asp Cys Glu Gly Asp Ala Gly
115 120 125
Asn Lys Ser Glu Asp Glu His Pro Ser Ala Glu Pro Leu Pro Lys Arg
130 135 140
Arg Ala Leu Glu Thr Thr Ala Pro Asn Leu Thr Pro Val Leu Arg Thr
145 150 155 160
Val Arg Glu Gln Lys Ile Ile Val Gln Ala Gly Lys Met Ser Asp Gly
165 170 175
Tyr Arg Trp

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 3
atggctgacg gtaggatat c 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 4
ttagaagcat ttccggtgaa c 21

<210> 5

<211> 20
 <212> DNA
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 catcaagcag ctttggcrag 20
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 cgccatctrt ayccatcact c 21
 <210> 7
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 atggctgacg gtgaggatat c 21
 <210> 8
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 ttagaagcat ttccggtgaa c 21