

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0043531 (43) 공개일자 2014년04월10일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01) C12N 9/22 (2006.01)		(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(21) 출원번호 10-2012-0105571		(72) 발명자 이상열 경상남도 진주시 진주대로 829 21, 삼환나우빌 101동 1801호
(22) 출원일자 2012년09월24일 심사청구일자 2012년09월24일		김선영 경남 진주시 가호로 26, 213동 1205호 (가좌동, 가좌주공2아파트) (뒷면에 계속)
		(74) 대리인 김동완

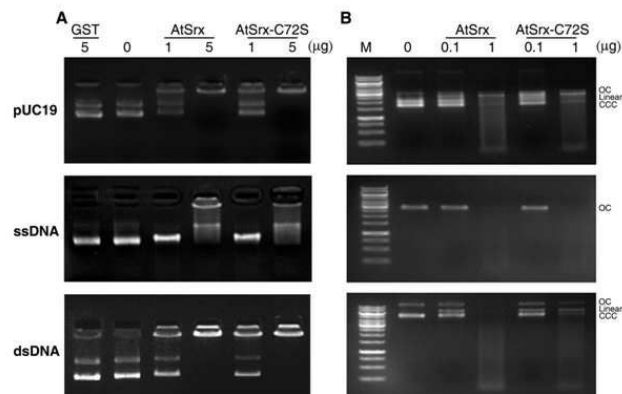
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **아라비돕시스 셀피레독신을 과발현하는 활성산소종으로부터 보호되는 형질전환 식물체**

(57) 요약

본 발명은 산화 환원 의존적 셀피닉산 환원효소인 아라비돕시스 셀피레독신(AtSrx)(서열번호: 1)에 있어서, 상기 아라비돕시스 셀피레독신은 산화 환원 비의존적으로 핵산 결합 및 분해 활성을 지니는 뉴클레아제로 작용하고, 서열번호: 1의 94번 아미노산 잔기인 시스테인이 셀피닉산 환원효소 효소활성의 활성 부위임을 특징으로 하는 아라비돕시스 셀피레독신에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 아라비돕시스 셀피레독신을 과발현하여 활성산소종(ROS)에 의해 손상된 유전정보를 지닌 핵산들을 제거시킴으로써 활성산소종 스트레스 저항성을 지닌 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

정인정

경남 사천시 사천읍 구암두문로 254-9, 104동 1102호 (원광이안애아파트)

신미림

경북 포항시 남구 오천읍 남원로 85, 123동 703호 (부영사랑으로)

황광용

경남 진주시 내동면 내동로247번길 19,

박진호

경남 진주시 호탄길34번길 5-1, 202호 (호탄동, 임대주택)

이은선

전남 순천시 도장길 40, 1201동 702호 (연향동, 부영12차아파트)

김강산

경상남도 사천시 사천읍 수석6리 1784-28

박정훈

대구 동구 신암로16길 33, 104동 809호 (신천동, 가람타운)

김민지

경남 진주시 진주대로500번길 32, 201호 (가좌동, 동헌빌)

지용훈

경남 진주시 진양호로125번길 17, (평거동)

정영준

경남 진주시 향교로115번길 10, 511호 (옥봉동, 대림아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0451

부처명 농촌진흥청

연구사업명 시스템합성농생명공학사업

연구과제명 차세대바이오그린21사업-시스템합성농생명공학사업단

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

산화 환원 의존적 설파닉산 환원효소인 아라비돕시스 설파레독신(AtSrx)(서열번호: 1)에 있어서, 상기 아라비돕시스 설파레독신은 산화 환원 비의존적으로 핵산 결합 및 분해 활성을 지니는 뉴클레아제로 작용하고, 서열번호: 1의 94번 아미노산 잔기인 시스테인이 설파닉산 환원효소 효소활성의 활성 부위임을 특징으로 하는 아라비돕시스 설파레독신

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 아라비돕시스 설파레독신의 뉴클레아제 활성은 Ca, Mg, Mn, Co 2가금속 양이온의 농도가 증가함에 따라 기질 DNA와의 친화성이 증가되고 높은 KCl(0.2M)의 농도에도 기질 DNA와의 친화성이 유지됨을 특징으로 하는 아라비돕시스 설파레독신

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 아라비돕시스 설파레독신의 기질 DNA는 단일-가닥 DNA, 이중-가닥 DNA를 모두 포함함을 특징으로 하는 아라비돕시스 설파레독신

청구항 4

제 1항의 아라비돕시스 설파레독신을 과발현하여 활성산소종(ROS)에 의해 손상된 유전정보를 지닌 핵산들을 제거시킴으로써 활성산소종 스트레스 저항성을 지닌 형질전환 식물체

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 아라비돕시스 설파레독신(AtSrx) 단백질(NCBI 접근번호 : At1g31170)(서열번호: 1)의 이미 알려진 설파닉산 환원효소의 기능 이외에 뉴클레아제 효소활성 기능을 확인하고, 상기 AtSrx 단백질을 과발현시켜 활성산소종(ROS)에 의해 손상된 유전정보를 지닌 핵산들을 제거함으로써 활성산소종으로부터 보호되는 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

활성산소종(ROS)는 환경 스트레스뿐만 아니라 다양한 대사과정으로부터 발생되며 매우 높은 활성을 지니고 핵산 지질 단백질 등을 포함하는 다수의 생물학적 거대분자에 산화 손실을 야기시킨다. 세포간 ROS 레벨의 변화에 응답하여 세포내 민감한 분자들이 가역적 또는 비가역적으로 변형될 수 있으며 이는 그 기능과 활성의 변화를 초래한다. 이러한 과정 중에서 단백질 내의 설파이드릴(sulphydryl) 그룹은 산화 변형에 특히 민감하다. 따라서 특정 단백질 내의 티올 그룹의 형태는 세포의 산화 환원 변화를 반영하는 것이다.

[0003]

항산화 효소 2-Cys Prx(페록시다제)는 티오레독신, 티오레독신 환원효소와 전자 전달 시스템을 형성하는 산화환원 효소이다. 지금까지 포유류에서 다섯 종류의 2-Cys Prx가 밝혀졌고, H₂O₂ 농도를 조절하는 것으로 알려져 있는 페록시다제(Prx)는 활성 산소에 의해 시스테인 잔기가 과산화되면 시스테인 설파닉산(Cis-SOOH) 형태의 비가역적인 불활성 물질로 변형되고 2-Cys Prx는 최근에 알려진 단백질 설파레독신에 의하여 환원되어 그 기능이 회복된다.

- [0004] 설피닉 또는 설포닉 산 단백질의 과산화된 형태가 비가역적인 단백질 변형으로서 나타나지만 최근에는 페록시레독신(Prx) 타입의 설피닉 형태가 티오레독신(Trx) 또는 글루타레독신(Grx) 시스템의 도움과 함께 설피레독신(Srx)에 의해 가역적으로 환원된다. 그러나 현재까지 Prx의 설포닉 형태는 비가역적으로 과산화된 형태로 남겨져 있다.
- [0005] 설피레독신(Srx)은 작은 산화환원 단백질로서 효모로부터 처음 확인되었으며 2-Cys 페록시레독신(2-Cys Prx)의 설피닉 형태의 환원제로서 작용한다. 이 반응에 의해서 매우 높게 보존된 Srx 내의 Cys 잔기는 활성부위로 중요하게 작용하며 이때 반응을 위해서는 ATP 존재와 Mg^{2+} 와 티올-환원제(reductant)가 요구된다.
- [0006] Srx의 항산화 기능을 통해 Srx는 다양한 세포 조절 기능, 예를 들면 산화환원-매개 신호화 캐스케이드(cascades), Pap1 경로 내의 flux 신호화, 세포 증식, 종양 성장, 산화 및/또는 니트로화 스트레스에 대항하는 후-번역 변형의 조절 등을 들 수 있다. Srx의 전사 수준은 과산화수소에 의해 크게 유도되고 효모세포 내의 이의 고갈은 산화 스트레스에 감소된 순응(tolerance)을 유도한다.
- [0007] 아라비돕시스 정보 원천 데이터베이스(TAIR ID: Atlg31170)의 검색을 통해 Srx의 아미노산 서열이 프로카리오프(prokaryote) ParB 단백질의 일부와 높은 서열 상동성을 공유함을 확인하였다. 헬릭스-턴-헬릭스(HTH) 모티프를 그 아미노산 서열 내에 지니고 있는 ParB는 cis-활성 부위(*parS*)와 ATPase(*parA*)와 같은 두가지 다른 성분의 도움에 의해 박테리아 염색체 파티션의 기능과 플라스미드 유전 기능을 수행한다.
- [0008] 이 반응에서 ParB 단백질은 DNA 결합에 중요한 역할을 하며 Ca^{2+} 의존적 뉴클레아제 활성을 나타낸다. 현재까지 분자 메커니즘이 명확하진 않지만 ParB가 *parS* 부위와 결합하고 뉴클레오프로테인 복합체의 형성 DNA를 따라 측면으로 퍼져나간다는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 ParA, Walker-박스 ATPase는 세포의 반대편 극방향으로 ParB-*parS* 복합체를 분리시킨다. 염색체 분리의 과정은 구조 유지 염색체(SMC)의 ParB-*parS*에 의한 전사 오리진으로의 채택을 통해 증진될 수 있다.
- [0009] Srx와 ParB의 전체적인 서열 상동성에도 불구하고 Srx는 ParB의 DNA 결합을 위한 중요한 도메인으로써 알려진 HTH 모티프를 지니지 않는다. 또한 매우 높게 보존되는 아미노산인 ParB의 글루타민 산은 Srx 내의 Cys 잔기로 치환된다. ParB와 Srx의 두 개의 단백질은 매우 높은 서열 및 구조적 상동성을 지니는 것으로 나타나고 있으나 Srx의 뉴클레아제 기능에 관해서는 전혀 개시된 바 없다.
- [0010] 본 발명자들은 AtSrx로 지칭되는 아라비돕시스 Srx의 박테리아 발현 재조합 단백질을 사용하여 과연 AtSrx가 뉴클레아제 기능을 하는지 여부를 측정하였으며, AtSrx는 산화환원-의존 설피닉산 환원제로서의 기능 뿐 아니라 산화환원-비의존적 뉴클레아제 기능을 수행하는 두 가지 기능을 지님을 명백히 확인함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.
- [0011] 또한 본 발명자들은 상기 아라비돕시스 설피레독신(AtSrx) 단백질을(서열번호: 1)의 뉴클레아제 효소활성 기능을 확인하고, AtSrx 단백질을 과발현하는 형질전환 식물체를 제조함으로써 활성산소종(ROS)에 의해 손상된 유전정보를 지닌 핵산들을 제거시켜 활성산소종으로부터 보호되는 형질전환 식물체를 개발한 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 AtSrx가 산화환원-의존 설피닉산 환원제로서의 기능 뿐 아니라 산화환원-비의존적 뉴클레아제 기능을 수행하는 두 가지 기능을 지님을 확인코자 한 것이다. 또한 상기 AtSrx 단백질을 과발현하는 형질전환 식물체를 제조함으로써 활성산소종(ROS)에 의해 손상된 유전정보를 지닌 핵산들을 제거시켜 활성산소종으로부터 보호되는 형질전환 식물체를 개발코자 한 것이다.
- [0013] 본 발명은 산화 환원 의존적 설피닉산 환원효소인 아라비돕시스 설피레독신(AtSrx)(서열번호: 1)에 있어서, 상기 아라비돕시스 설피레독신은 산화 환원 비의존적으로 핵산 결합 및 분해 활성을 지니는 뉴클레아제로 작용하고, 서열번호: 1의 94번 아미노산 잔기인 시스테인이 설피닉산 환원효소 효소활성의 활성 부위임을 특징으로 하는 아라비돕시스 설피레독신을 제공하는 것이다.
- [0014] 이때 상기 아라비돕시스 설피레독신의 뉴클레아제 활성은 Ca, Mg, Mn, Co 2가금속 양이온의 농도가 증가함에 따라 기질 DNA와의 친화성이 증가되고 높은 KCl(0.2M)의 농도에도 기질 DNA와의 친화성이 유지됨을 특징으로 한다.
- [0015] 또한 상기 아라비돕시스 설피레독신의 기질 DNA는 단일-가닥 DNA, 이중-가닥 DNA를 모두 포함함을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명의 또다른 목적은 상기 아라비돕시스 설피레독신을 과발현하여 활성산소종(ROS)에 의해 손상된 유전정보를 지닌 핵산들을 제거시킴으로써 활성산소종 스트레스 저항성을 지닌 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 효과는 AtSrx가 산화환원-의존 설피닉산 환원제로서의 기능 뿐 아니라 산화환원-비의존적 뉴클레아제 기능을 수행하는 두 가지 기능을 지님을 확인코자 한 것이다. 또한 상기 AtSrx 단백질을 과발현하는 형질전환 식물체를 제조함으로써 활성산소종(ROS)에 의해 손상된 유전정보를 지닌 핵산들을 제거시켜 활성산소종으로부터 보호되는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0018] 또한 본 발명의 또 다른 효과는 Srx는 그 생물체 내에서 DNA 복구 과정을 통해 손상되거나 잘못 매치된 DNA를 결합하고 가수분해할 수 있는 기능을 지니는 것을 확인함으로써 본 발명의 설피닉산 환원제로서 작용하는 Srx가 ROS를 제거하기 위해 엽록체 및 미토콘드리아 내에서 ROS-매개 과산화된 2-Cys Prx 또는 Prx IIF를 환원시켜 2-Cys Prx와 Srx의 상호협조적인 시스템을 통하여 외부 산화스트레스로부터 효율적으로 방어가 가능한 형질전환 식물체를 제공할 수 있게 된 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 AtSrx 및 AtSrx-C72S 단백질의 정제 및 아라비돕시스 2-Cys Prx를 기질로 사용하여 설피닉산 환원제 기능을 비교한 것이다.
- (A) AtSrx 및 AtSrx-C72S의 박테리아 발현 재조합 단백질을 Ni-NTA 아가로스 친화성 겔 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 단백질의 정제도는 Coomassie blue 염색을 통해 13.5% SDS-PAGE 겔에서 분석되었다. AtSrx (레인 1), AtSrx-C72S(레인 2), IPTG 처리에 의해 단백질을 유도하기 전에 형질전환 대장균에 의해 추출된 것(레인 3), IPTG 처리에 의해 단백질을 유도한 후에 형질전환 대장균에 의해 추출된 것(레인 4)을 포함하는 용해성 단백질(40 μ g)을 사용한다. 1 μ g의 AtSrx(레인 5) 및 AtSrx-C72S(레인 6)를 His-태그 후에 로딩시키고 트롬빈 처리를 통해 제거시킨다. M : 분자량 표준.

(B) 아라비돕시스 2-Cys Prx의 과산화 형태를 기질로 사용하여 AtSrx의 설파닉산 환원제 기능 분석. 5mM H₂O₂에 처리한 2-cys Prx(6μg)를 50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 1mM ATP와 10 mM GSH를 포함하는 100μl의 반응 혼합물 내에서 2μg의 AtSrx 또는 AtSrx-C72S와 함께 30℃에서 120분간 인큐베이션 시켰다. 120분간의 인큐베이션 전의 혼합물(좌측 패널) 또는 이후의 혼합물(우측 패널)을 13.5% SDS-PAGE 겔에 적하시키고 2-Cys Prx의 과산화 형태 또는 2-Cys Prx 전체단백질을 각각 특이적으로 인식할 수 있는 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅시켰다.

도 2는 AtSrx의 DNA 결합 활성을 나타내는 것이다.

0.2μg의 pUC19(상부 패널), ssDNA(중간 패널) 또는 dsDNA(하부 패널)를 포함하는 다양한 DNA 기질과 함께 재조합 AtSrx를 인큐베이션 시킨 후 얼음욕에 30분간 넣어둔다. 반응 후에 반응 생성물을 1% 아가로스 겔에 적하시키고 겔 이동을 EtBr 염색으로 시각화하였다. (A) 다양한 농도의 AtSrx(0, 1, 2 및 5μg)의 첨가 후 반응을 시작한다. AtSrx 대신에 GST 5μg을 대조군으로 사용하였다. (B) AtSrx의 DNA 결합 활성 상에 KCl의 효과를 KCl의 농도를 0.2M 농도까지 증가시키면서 조사하였다. 이 반응에서 AtSrx(2μg) 또는 15μl DNA 결합 완충액 내의 KCl의 존재 또는 부재시 0.2μg의 DNA를 인큐베이션 시켰다.

도 3은 AtSrx의 뉴클레아제 활성을 나타내는 것이다.

AtSrx의 농도 의존적 DNA 가수분해 효과를 0.2μg의 pUC19(A), ssDNA(B) 또는 dsDNA(C)를 기질로 사용하여 또는 5 mM Ca²⁺ (D)의 존재하에 37℃에서 20분간 조사하였다. 또한 AtSrx의 시간 의존적 DNA 가수분해 효과를 0.2μg의 pUC19를 사용하여 조사하였다. 반응은 2 mM EDTA를 첨가하여 중지되었으며 반응 생성물을 1% 아가로스 겔 상에서 분석하였다. 수퍼 코일형(CCC), 개방 환형(OC) 및 선형 DNA가 검출되었다. M은 분자량 표준(1kb DNA 래더)을 나타낸다.

도 4는 AtSrx의 뉴클레아제 활성 상의 2가 양이온의 효과를 나타낸 것이다.

다양한 농도의 AtSrx(0, 0.1 및 0.2μg)를 5 mM 2가 양이온(Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, Co²⁺) 또는 2 mM EDTA 존재하에서 37℃ 20분간 pUC19(0.2μg)를 기질로 사용하여 인큐베이션 시켰다. 반응 생성물을 0.8% 아가로스 겔 상에서 분석하였다. CCC: 수퍼 코일형, OC: 개방 환형, Linear: DNA의 선형. M은 분자량 표준(1kb DNA 래더)을 나타낸다.

도 5는 AtSrx의 DNA 결합 및 뉴클레아제 활성 상에 설파네이트 환원제로서 활성 부위 Cys 잔기(Cys72)의 효과를 나타내는 것이다.

재조합 AtSrx 및 AtSrx-C72S 단백질을 제조한 후에 이들을 0.2μg의 pUC19 (상부 패널), ssDNA(중간 패널) 또는 dsDNA(하부 패널)를 기질로 사용하여 인큐베이션 시키고 이들의 DNA 결합(A) 및 가수분해(B) 활성을 1% 아가로스 겔 상에서 분석하였다. GST 5μg을 대조군으로 사용하였다. CCC: 수퍼 코일형, OC: 개방 환형, Linear: DNA의 선형. M은 분자량 표준(1kb DNA 래더)을 나타낸다.

도 6은 Clustal W 프로그램을 사용한 AtSrx와 프로카리오프 ParB 단백질 간의 아미노산 서열을 비교한 것이다.

ParB 단백질의 AtSrx와 매우 높은 서열 상동성을 지닌 특이 도메인을 정렬시켰다. 단백질 내에서 동일하거나 유사한 아미노산은 흑색 또는 회색 박스로 표시한다. 특히 별표는 보존된 AtSrx의 촉매 시스테인 잔기를 나타낸다. PSIPRED 프로그램에 의해 분석된 TtParB와 AtSrx의 단백질 2차 구조는 TtParB와 AtSrx 서열의 상단부에 플롯팅하였다. 각각의 단백질의 GenBank 접근번호는 다음과 같다. TtParB (Thermus thermophilus, YP_005573), MIParB (Mycobacterium leprae, NP_302727), NpParB (Nostoc punctiforme PCC 73102, YP_001869951) and AtSrx (Arabidopsis thaliana, Atlg31170).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020]

본 발명의 아라비돕시스 설파레독신(AtSrx) 단백질은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지닌 단백질로서 125개의 아미노산 잔기를 포함하고 있다. 이때 서열번호: 1의 아미노산 잔기 1번부터 22번까지는 엽록체로 가는 시그널 펩타이드로서 엽록체로 이동한 AtSrx 단백질은 펩티다제에 의해 절단되어 서열번호: 1의 23번부터 125번까지의 아미노산 잔기가 실질적인 효소 활성을 나타내는 Mature 형태로 엽록체에서 발현된다. 따라서 본 발명에서 기재하고 있는 Cys-72번 위치는 서열번호: 1의 아미노산 서열 중 94번 아미노산 잔기인 시스테인에 해당하는 것이다.

- [0021] 본 발명은 뉴클레아제 효소로서 아라비도시스 설피레독신(AtSrx) 단백질의 새로운 기능을 확인한 것으로, AtSrx 단백질 내의 Cys-72 위치(서열번호: 1의 94번 아미노산 잔기 시스테인)는 AtSrx 단백질의 설피네이트 산화환원 작용에는 필요하나 DNA를 절단하는 뉴클레아제 효소에서는 활성 부위로 작용하지 않는다.
- [0022] 한편 AtSrx 단백질의 DNA 결합에 있어서 금속염의 효과는 Ca, Mg, Mn, Co 2가금속 양이온이 증가함에 따라 기질 DNA와의 친화성이 증가된다. 또한 높은 KCl의 농도에서도 기질 DNA와의 친화성이 유지된다.
- [0023] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0024] (1) AtSrx의 뉴클레아제 효소로서 작용하는 신규한 기능의 확인
- [0025] AtSrx의 추정 아미노산 서열이 프로카리요트 ParB 단백질의 서열과 매우 유사함을 근거로 하여 뉴클레아제 효소로서의 기능이 알려져 있지만, 본 발명자들은 다양한 기질을 사용하여 AtSrx의 핵산 가수분해 활성을 조사하였다.
- [0026] 본 발명에서 AtSrx의 cDNA 클론(312 bp)를 아라비도시스 cDNA 라이브러리로부터 분리하였으며 pET28a 발현 벡터에 서브클로닝시켜 대장균 내에서 단백질을 발현 시켰다. 형질전환된 대장균에 1 mM IPTG를 처리하여 AtSrx의 발현 수준을 현격히 유도하였다(도 1A). His-태그 재조합 AtSrx를 Ni-NTA 아가로스 친화성 컬럼 크로마토 그래피를 사용하여 균질하게 정제한 후, His-태그를 트롬빈 처리를 통해 제거하였다. 이에 따라 AtSrx의 단일 단백질 밴드를 SDS-PAGE 겔 상에 수득할 수 있었다(도 1A).
- [0027] AtSrx 내의 활성 Cys 잔기의 역할을 조사하기 위해 본 발명자들은 AtSrx- C72S의 Cys 변이 형태를 제조하였다. 이 변이 형태는 72 위치의 활성 Cys 잔기가 세린으로 치환된 것이다. 이러한 단백질을 사용하여 본 발명자들은 웨스턴 블롯팅에 의해 AtSrx의 환원제 기능을 확인하였다. 이는 아라비도시스 2-Cys Prx의 설피닉 형태가 효율적으로 감소하는 것이다(도 1B). 이러한 실험 내에서 본 발명자들은 2-Cys Prx의 과산화 그룹 또는 2-Cys Prx의 전체 단백질에 의해 각각 특이적으로 인지되는 두 개의 항체를 사용하였다. 예측한 바와 같이 AtSrx 내의 Cys72가 아라비도시스 2-Cys Prx의 설피닉산 형태를 환원시키는데 필수적인 역할을 함을 입증하였다.
- [0028] 또한 본 발명자들은 pUC19, 단일가닥 M13mp8 파지 DNA 및 이중가닥 DNA 분자를 포함하는 다양한 DNA 기질을 사용하여 AtSrx의 DNA 결합 활성을 시험하였다. 본 발명자들은 AtSrx가 시험에 사용한 DNA 분자 모두에 결합함을 확인하였으며 이는 AtSrx가 기질특이성을 나타내지 않고 DNA와 상호작용함을 의미하는 것이다. 따라서 반응 혼합물 내의 1 μ g 이상의 AtSrx 존재시 AtSrx는 겔 상에서 그의 전자-모빌리티의 매우 큰 이동을 야기하는 것이다(도 2A).
- [0029] 이와는 반대로 대조군으로 사용한 GST의 초과량(5 μ g)을 사용하여 DNA 기질과 인큐베이션 시켜도 아무런 상호작용이 나타나지 않았다. AtSrx의 DNA 결합에 필요한 염의 효과를 측정하기 위해 본 발명자들은 KCl의 농도를 증가시키면서 DNA 기질과의 결합 친화성을 조사하고 아가로스 겔 상에서 분석하였다. 200mM 농도까지 KCl을 증가시켜도 AtSrx는 다양한 목표 DNA와 결합한다(도 2B). 흥미롭게도 이는 설피닉산 환원제로서 이미 확인된 AtSrx 역시 다양한 형태의 DNA 분자와 결합하는 활성을 지님을 나타내는 결과로부터 확인할 수 있었다.
- [0030] AtSrx의 DNA 결합활성(도 2)과 더불어 AtSrx의 단백질 구조와 서열이 뉴클레아제 활성을 지닌 ParB 단백질과 매

우 높게 상동적임을 근거로 하여 본 발명자들은 즉시 DNA 가수분해 활성을 분석하였다(도 3).

[0031] 도 2의 시험에서 사용된 DNA 기질과 AtSrx를 인큐베이션시킴을 통해 본 발명자들은 AtSrx의 첨가에 따라 점진적으로 모든 DNA가 절단됨을 발견하였다(도 3). 슈퍼 코일형(CCC) DNA의 우세한 형태와 개방 환형(OC) DNA의 일부를 포함하는 pUC19 DNA가 AtSrx의 농도 증가에 따라 절단되었다. 따라서 pUC19의 개방 환형 및 선형 형상의 함량이 모두 AtSrx의 농도 증가에 따라 점증적으로 증가하였다. 반면 DNA의 CCC 형태의 양은 감소하였다. 더욱이 반응 혼합물 내에 1 μ g 이상의 AtSrx를 첨가시 pUC19 DNA는 완전히 퇴화되었다. 반면 AtSrx 대신에 인큐베이션 시킨 GST(5 μ g)는 전혀 DNA를 가수분해 할 수 없었다. AtSrx의 동일한 결과가 다른 DNA(단일가닥 DNA 및 이중가닥 DNA)를 기질로 사용한 경우에 획득되었다.

[0032] 이 실험에서 1 μ g의 AtSrx는 기질을 완전히 가수분해 하기에 충분한 양이다(도 3B 및 3C). AtSrx의 DNA 가수분해 활성은 pUC19 DNA와 함께 AtSrx의 인큐베이션 시간의 증가에 따라 비례하여 증가하였다(도 3D). 상기한 결과로부터 AtSrx는 또다른 신규한 뉴클레아제 효소 활성을 소유함을 강력하게 제시하는 것이다. 또한 이는 설피닉산 환원제의 이미 확인된 기능과도 일치한다.

[0033] (2) AtSrx의 뉴클레아제 활성 상에 2가 금속 양이온의 효과

[0034] AtSrx의 뉴클레아제 활성 상에 2가 양이온의 효과를 측정하기 위해 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 또는 Zn^{2+} 등의 다양한 2가 양이온을 pUC19 DNA와 다양한 함량의 AtSrx를 포함하는 반응 혼합물에 첨가하였다. 그리고 본 발명자들은 반응 생성물을 20분간 인큐베이션 시킨후 아가로즈 겔을 이용하여 분석하였다(도 4). AtSrx는 금속 양이온의 부재 시에도 pUC19 DNA를 서서히 가수분해시킬 수 있었으나 반응 혼합물에 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} 과 같은 금속 이온을 첨가시 뉴클레아제 활성이 현저하게 증가되었으나 Zn^{2+} 는 이와 반대로 뉴클레아제 활성을 저해시켰다. 더욱이 예 측한 대로 EDTA(에틸렌디아민테트라아세트 산)과 같은 금속 킬레이트제를 첨가시 AtSrx의 뉴클레아제 활성은 현저히 저해되었다. 이는 AtSrx가 금속 이온-의존적으로 뉴클레아제 활성을 나타냄을 제시하는 것이다.

[0035] (3) AtSrx의 산화환원-비의존적 DNA 결합 및 뉴클레아제 활성

[0036] c-말단에 위치한 활성 부위인 시스테인 잔기(Cys72)가 AtSrx의 촉매활성의 활성부위이며 이는 또한 산화환원-의존적 설피닉산 환원제 기능에 중요함을 나타내었다(도 1B). 본 발명에 있어서 또한 AtSrx의 신규한 기능인 뉴클레아제 효소로서의 활성 역시 확인하였기 때문에 AtSrx-C72S 변이 단백질을 사용하여 뉴클레아제 활성에 Cys72의 기능을 조사하였다. 천연 및 변이 AtSrx 모두를 사용하여 아가로즈 겔 상에서 DNA 결합 및 가수분해 활성을 분석 비교하였다(도 5). AtSrx의 설피네이트 환원제 기능에 관한 데이터에 반하여 설피네이트 환원제 기능에 활성 부위인 Cys72는 DNA 결합 및 가수분해 활성에 아무런 영향을 미치지 못하였다. 더욱이 예를 들면 pUC19 DNA, 단일가닥-DNA 또는 이중가닥-DNA과 같은 서로 다른 기질에 있어서도 어떠한 활성의 차이를 측정할 수 없었다(도 5).

[0037] 이 결과는 AtSrx의 Cys 활성부위(Cys72)가 설피네이트 환원제의 기능으로서는 중요한 역할을 하나 뉴클레아제 효소로서는 DNA 촉매에 아무런 관련이 없음을 제시하는 것이다. 결과적으로 본 발명자들은 AtSrx는 산화환원-비의존적으로 뉴클레아제 활성을 나타낼 뿐 아니라 산화환원-의존적으로 2-Cys Prx의 설피닉산 환원제로 작용하는 두 가지 기능을 지님을 확인할 수 있었다.

- [0038] 상기와 같은 실험 결과를 통해 본 발명에서 다음과 같은 제안을 수립하였다.
- [0039] 다양한 아이소 형을 포함하는 2-Cys Prx의 첫 번째 기능은 다양한 세포 대사과정으로부터 발생하는 활성산소종(ROS)을 제거하는 것이다. 과산화수소를 제거시키면서 2-Cys Prx는 활성 시스테인을 시스테인 설피닉 산(Cys-SO₂H)으로 변형함에 따라 과산화되고 불활성화 된다. 불활성화된 2-Cys Prx는 Srx의 설피닉산 환원 작용에 의해 다시 활성화될 수 있다.
- [0040] 이는 Srx는 2-Cys Prx의 시스테인 설피닉산을 산화환원-의존적 방법으로 시스테인으로 환원시킨다. 따라서 Srx는 2-Cys Prx의 과산화된 항산화 단백질을 환원시킴에 의해 효모, 포유류 및 식물 세포 내에서 외부 스트레스에 대항하는 세포 방어 시스템의 중요한 역할을 한다. 인간 세포 내의 Srx의 증가된 수준은 세포 증식을 증진시키고 세포-주기 프로파일의 변화를 유도한다.
- [0041] 또한 산화 스트레스에 응답하여 포유류 Srx의 시토솔(cytosolic) 형태는 설피닉 2-Cys Prx(I 및 II)의 시토솔 형태뿐만 아니라 설피닉 2-Cys Prx III의 미토콘드리아 형 모두를 환원시키기 위해 미토콘드리아로 편재될 수 있다. 미토콘드리아 내에서 Srx는 미토콘드리아 막 포텐셜의 붕괴 속도를 감소시키며 세포 사멸에 저항하는 증강된 세포 저항성을 부여시킨다. 한편 아라비도시스 엽록체에 편재된 AtSrx는 항-광산화 및 항-산화 스트레스에 관련되어있다. 그러나 최근 완두콩 내의 Srx는 미토콘드리아와 엽록체 모두에 편재되어있음을 나타낸다. 따라서 식물체 내에서 엽록체 Srx에 의해 2-Cys Prx의 설피닉 형태를 환원시키는 것이 가능할 수 있다. 그러나 Srx의 미토콘드리아 형태는 식물 미토콘드리아 내에 편재된 atypical 2-Cys Prx, Prx IIF의 설피닉 형태를 환원시킬 수 있다. 긴 광주기 하에서 Srx-결핍 녹아웃 변이 식물체는 야생형 식물에 비해 작은 잎을 지닌 왜소형(dwarf) 형질형을 야기시킨다. 또한 Srx의 감소된 수준은 야생형보다 paraquat 및 과산화수소의 처리에 더욱 민감한 것이다.
- [0042] 본 발명이 나타내는 가장 중요한 결과는 AtSrx는 박테리아 염색체 파티셔닝에 참여하는 ParB 단백질과 기능적으로 관련되어있지 않지만 그 아미노산 서열 및 구조적 유사성을 매우 높게 지니는 것이다. ParB의 엑소- 및 엔도-뉴클레아제 활성에 기인하여 AT-풍부 영역과 같은 잠재적 단일-가닥 특성을 지닌 부위에서 수퍼코일화된 플라스미드 DNA를 절단하는 기능으로서 개방 환형 DNA를 생성하고 마지막으로는 선형 DNA를 생성하게 되는 것이다. 또한 다른 세포 내 파트너와 상호작용하는 ParB는 박테리아 세포 내에서 다면발현성을 나타낸다.
- [0043] 이와 같은 다면발현성은 세포 분열시 DNA 세그리게이션, 딸세포가 새로 합성된 DNA의 모든 성분을 수령하는 것을 확인하는 기능, 콜로니 형성, 프라젤라 생합성, 세포 이동성 및 세포-세포 신호화 등의 기능을 나타낸다. 따라서 par 유전자의 변이 또는 삭제는 매우 심각한 문제를 야기시키며 이는 딸세포의 뉴클레오타이드의 형성, 염색체 세그리게이션의 결함 및 세포 사멸 등을 야기할 수 있다.
- [0044] 다양한 세포 작용의 중요성에 기인하여 이는 새로운 항미생물 약제를 설계하는 중요한 타겟이 될 수 있다. 본 발명자들은 설피닉산 환원제로서의 알려진 기능 이외에 AtSrx가 DNA-결합 및 과수분해 활성을 나타냄을 확인하였다. 이것은 pCXC100 ParB의 경우에 명백한 사실이다. pCXC100은 어느 DNA결합 모티프와도 상당한 서열 상동성을 나타내지 않지만 이 단백질은 DNA에 결합하고 ParB와 같이 플라스미드 안정성을 유지하는 기능을 지닌다.
- [0045] Srx와 ParB 단백질의 서열비교 및 파일로제네틱 분석에 근거하여 Srx는 ParB의 C-말단 반쪽의 트런케이션(truncation)을 통해 진화한 것으로 보고되었다. 진화 시나리오를 통해 ParB의 C-말단 도메인의 HTH 모티프가 제거되고 ParB의 글루타민 산이 Srx 내에서 시스테인으로 치환된 것이다. 이는 Srx의 촉매 부위에 해당한다.
- [0046] 따라서 AtSrx가 비록 단일 단백질 분자일지라도 산화환원에 민감한 설피닉산 환원제 효소로서 진화 절차를 통해

산화환원-비의존적 뉴클레아제 기능을 추가적으로 지니게 되었음을 제안한다. 이와 같은 기능의 변화의 조건-의존적 일탈은 유전자 공유(gene sharing)의 표제 하에 추측된다. 또한 단일 단백질을 코드화한 유전자는 그의 첫 번째 기능을 상실할 필요 없이 두 번째 기능을 취득할 수 있는 것이다. 유전자 공유는 2-Cys Prx, α-크리스탈린 뿐만 아니라 ClpA, ClpX, FtsH, AAA 프로테아제 복합체 및 Lon과 같은 몇 개의 단백질 분해효소에서 발견되었다.

[0047] 환경적 변화가 산화환원 변화에 의한 세포간 시그널을 민감하게 변환시킬 수 있기 때문에 AtSrx의 산화환원-의존적 기능 변환은 외부 자극에 대항하는 중요한 후-번역 조절 메카니즘으로 나타날 수 있다.

[0048] 미토콘드리아, 엽록체 및 플라즈마 멤브레인 내에서 전자 수송 경로를 통해 발생하는 활성산소종(ROS)은 단백질, 지질, 핵-, 미토콘드리아-, 엽록체-핵산에 산화 손실을 야기할 수 있다. 특히 ROS-매개 DNA 손상의 여러 종류는 뉴클레오타이드 변경, 뉴클레오타이드 인벌전, 염기 삽입/결실 및 DNA 스트랜드 브레이크를 포함할 수 있다. 미토콘드리아와 엽록체는 ROS 생성에 주요부위이고 히스톤의 결핍을 야기할 수 있기 때문에 DNA 보호 단백질, 미토콘드리아 및 엽록체 DNA는 핵 DNA보다 ROS에 의한 산화적 손상에 더욱 민감하다.

[0049] 그러나 세포는 손상되거나 잘못 매치된 DNA의 제거를 위한 세포내 뉴클레아제 효소에 의해 손상된 DNA를 치료할 수 있다. 식물 Srx가 미토콘드리아와 엽록체 모두에 뉴클레아제로서 생체 내 기능을 조사하는 목표가 될 수 있다는 사실을 고려하여 Srx는 그 생물체 내에서 DNA 복구 과정을 통해 손상되거나 잘못 매치된 DNA를 결합하고 가수분해할 수 있는 기능을 지니는 것으로 간주된다. 또한 설피닉산 환원체로서 작용하는 Srx는 ROS를 제거하기 위해 엽록체 및 미토콘드리아 내에서 ROS-매개 과산화된 2-Cys Prx 또는 Prx IIF를 환원시킬 수 있다. 2-Cys Prx와 Srx의 상호 협조적인 시스템을 통하여 식물체는 외부 스트레스로부터 효율적으로 관리될 수 있는 것이다.

[0050] AtSrx의 기능 복합성의 확인은 식물세포 내의 세포현상의 이해를 더욱 증진시킨 것이며 본 실험 결과에 근거하여 가까운 장래에 식물체 내에 두가지 활성을 지닌 AtSrx의 생리 활성적 기능과 중요성이 다시 조사되어야 할 것이다.

[0051] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다.

[0052] (실시예 1) 재료

[0053] M13mp8(단일-가닥 DNA)와 M13mp8RFI(이중-가닥 DNA)를 뉴잉글랜드 바이오랩(NEB)로부터 구매하였다. CaCl₂, MgCl₂, CoCl₂, ZnCl₂ 및 EDTA를 시그마로부터 구입하였으며 pUC19 DNA는 다카라로부터 구입하였다.

[0054] (실시예 2) 재조합 AtSrx 및 AtSrx-C72S 단백질의 제조 및 정제

[0055] AtSrx를 코드화시킨 cDNA(312 bp)를 아라비도시스 cDNA 라이브러리로부터 클로닝하고 다음 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 정방 프라이머는 5' -TATAGGATCCATGAACGGTTCCGCCCGGT-3' (서열번호: 2)이며 역방 프라이머는 5' -CTCGAGTCAGCGAAGATGATGCCTTAATGTTT-3' (서열번호: 3)이었다. PCR 생성물은 pGEM-Teasy 벡터(프로메가)로 라이게이트 시켰다. pGEM-Teasy 벡터 내의 AtSrx DNA를 주형으로 사용하여 Cys72가 세린에 의해 치환된 AtSrx-C72S를 코드화한 DNA를 다음의 특이 프라이머인 정방 프라이머 5' -ATGGGTTCTCGGGATCCCAC-3' (서열번호: 4)과 역방 프라이머 5' -ATCTGTGGGATCCGAGAAC-3' (서열번호: 5)를 이용하여 PCR-매개 뮤타제네시스 기법에 의해 제조하였다. *E. coli* BL21 (DE3) 내에 AtSrx 및 AtSrx-C72S 유전자를 형질전환시키고 0.2 mM IPTG로 유도하고 히스티딘(His)-태그 재조합 AtSrx 및 AtSrx-C72S 단백질을 발현시킨 후 Ni-NTA 친화 아가로스 겔 크로마토그

라피에 의해 정제시켰다. His-태그는 트롬빈 처리에 의해 분리되었고 AtSrx 및 AtSrx-C72S 단백질의 천연형에 의한 생화학적 분석에 사용되는 20 mM Hepes-KOH (pH 8.0)를 통해 투석시켜 수득하였다.

[0056] (실시예 3) 아라비도시스 2-Cys Prx 단백질의 제조 및 그의 환원 분석

[0057] 아라비도시스 2-Cys Prx를 대장균 내에서 AtSrx 단백질의 제조를 위해 사용한 동일한 방법에 의해 수득하였다. 단백질은 상기한 바와 같은 H_2O_2 (5 mM) 처리에 의해 과산화시켰다. AtSrx에 의한 2-Cys Prx의 설피닉 형태로의 환원을 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM $MgCl_2$, 1mM ATP, 10mM GSH, 6 μ g의 2-Cys Prx의 설피닉산 형태, 2 μ g의 AtSrx 또는 AtSrx-C72S를 포함하는 30 $^\circ$ C, 120분 동안 반응시킨 100 μ l 반응 혼합물 내에서 측정하였다. 2-Cys Prx의 산화된 상태는 과산화된 2-Cys Prx(LabFrontier 사로부터 구매) 또는 2-Cys Prx의 전체 단백질(본 연구실에서 제조함)과 함께 반응시킨 특이 항체 사용을 통해 웨스턴 블롯 분석에 의해 조사하였다.

[0058] (실시예 4) 핵산 결합 분석 및 가수분해 활성

[0059] AtSrx의 핵산 결합 활성을 상기한 기질로써 다양한 DNA를 사용하여 겔 퇴화 기법에 의해 분석하였다. 200 ng의 pUC19, M13mp8 또는 M13mp8RFI를 다양한 농도(0, 1, 2, 5 μ g)의 정제 AtSrx 단백질과 15 μ l의 결합 완충액(2 mM EDTA, 4 mM KCl, 5% 글리세롤 및 50 μ g/ml 우혈청 알부민을 포함하는 20 mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 인큐베이션시켰다. 반응 혼합물을 얼음 위에서 30분간 유지시키고 DNA 결합활성을 에티디움 브로마이드 염색(EtBr)로 시각화시킨 아가로스 겔 상의 겔 이동을 통해 측정하였다. 뉴클레아제 활성을 약간 변형하여 상기 방법으로 분석하였다. 다양한 농도(0.1, 0.5, 1 및 5 μ g)의 AtSrx를 3 mM β -머캅토에탄올, 5 mM $CaCl_2$ 를 포함하는 30 μ l의 반응 완충액(20 mM Tris-HCl, pH 7.5)으로 37 $^\circ$ C에서 20분간 처리하면서 기질로서 pUC19, 단일-가닥 또는 이중-가닥 DNA 200 ng과 함께 인큐베이션 시켰다. 2 μ l의 500 mM EDTA를 첨가하여 반응을 중지시킨 후, 혼합물을 0.8% 아가로스 겔 내에서 전기영동 시켰다. 뉴클레아제 활성을 EtBr 염색에 의해 시각화시켰다. AtSrx 대신에 S-트랜스퍼라제(GST : 5 μ g)을 대조군으로 사용하였다.

[0060] (실시예 5) AtPrx 유전자를 도입한 형질전환 식물체의 산화스트레스 저항성

[0061] AtPrx 유전자를 도입하기 위한 식물체 전이용 벡터를 제조하기 위하여, 먼저 아라비도시스로부터 전체 RNA를 분리하여 역전사효소를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그리고, 합성된 cDNA와 식물 AtPrx에 특이적 프라이머를 넣고 연쇄증합반응을 하여 식물의 AtPrx를 클로닝하였다. 이때 특이적 프라이머에는 pBI121 벡터에 삽입을 이용하기 위해 XbaI과 SacI의 효소부위를 첨가하였다. 그리고, 클로닝 한 2-시스페록시레독신을 콜리 플라워 모자이크 바이러스(CaM virus)의 35S 프로모터(promoter)와 2'/7' 전사 종결자의 조절 하에서 발현될 수 있게 pBI121 벡터에 삽입하여 재조합 식물체 전이용 벡터인 pBI121::Prx를 제조하였다.

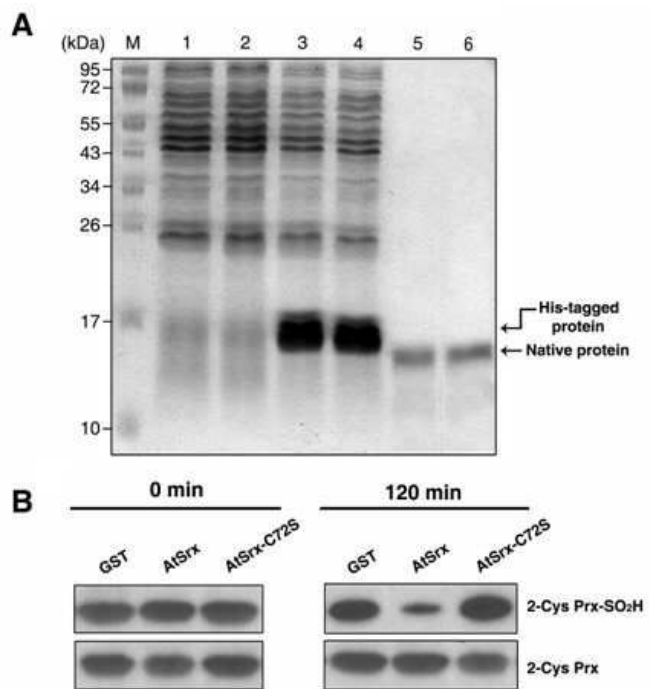
[0062] 상기 재조합 벡터를 아그로박테리움 투머파시엔스(agrobacterium tumerfaciens) GV3101 박테리아 세포에 전기충격법으로 형질 전환하여 형질전환체를 선발하였다. 형질전환체의 선발방법은 먼저 전기충격을 가한 세포를 카나마이신, 리팜피신, 젠타마이신이 든 배지에 깔고 30 $^\circ$ C에서 배양하였다. 그리고, YEP배지에서 자란 콜로니를 따서 아그로박테리아의 DNA분리하고 연쇄증합반응(PCR)을 통해서 형질전환을 확인하였다.

[0063] 그 후 아라비도시스를 3주 정도 성장시킨 후 첫 번째 꽃대를 잘라 다른 꽃대가 올라온 상태로 만들고, 아라비도시스를 형질전환 세포가 든 용액에다가 담그는 디핑 형질전환법을 사용하여 형질전환된 아라비도시스를 만들고 그 씨를 받아 성장시킨다. AtPrx가 발현됨을 확인하였고, 형질전환된 아라비도시스 식물체를 산화스트레스 저항성을 위한 실험에 이용하고 야생형에 비해 본 발명의 형질전환 식물이 H_2O_2 등의 산화스트레스에 강력한 저항성

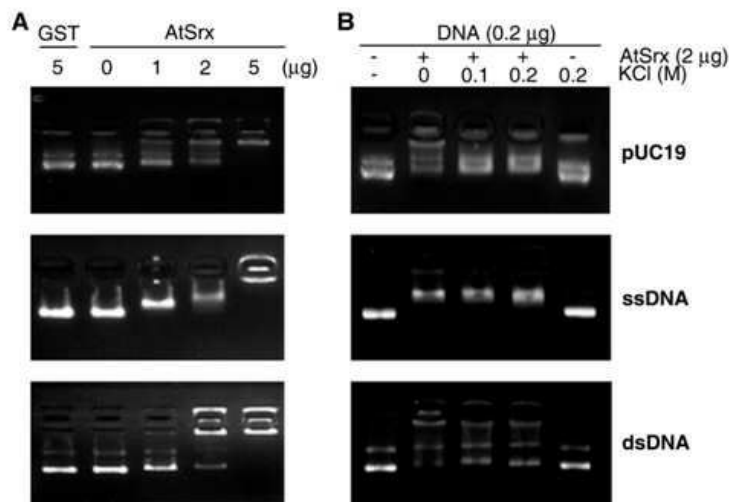
을 지니고 있음을 확인하였다.

도면

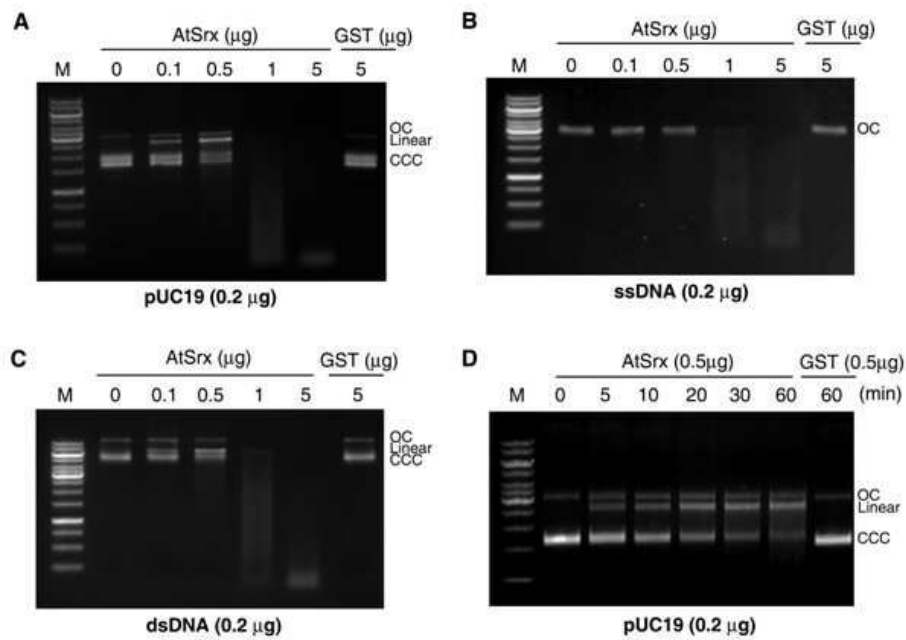
도면1



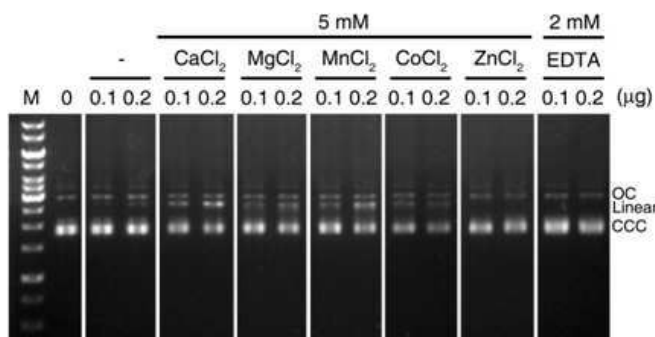
도면2



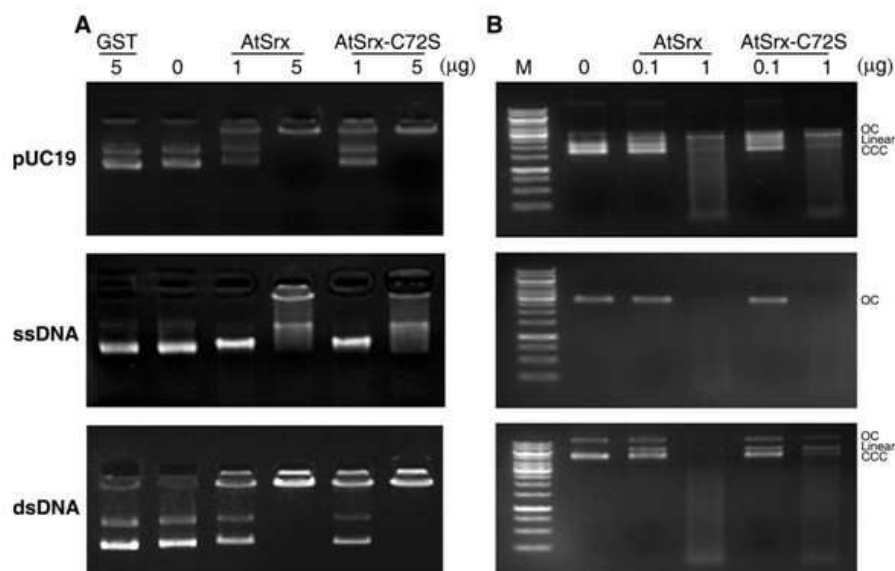
도면3



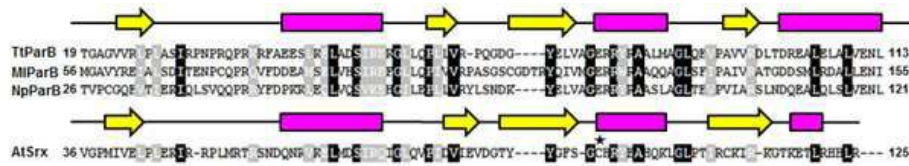
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Transgenic plant protected from ROS overexpressing Arabidopsis
sulfiredoxin
- <130> KP-923
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 125
- <212> PRT
- <213> Arabidopsis
- <400> 1

Met Ala Asn Leu Met Met Arg Leu Pro Ile Ser Leu Arg Ser Phe Ser

1 5 10 15

Val Ser Ala Ser Ser Ser Asn Gly Ser Pro Pro Val Ile Gly Gly Ser

20 25 30

Ser Gly Gly Val Gly Pro Met Ile Val Glu Leu Pro Leu Glu Lys Ile

35 40 45

Arg Arg Pro Leu Met Arg Thr Arg Ser Asn Asp Gln Asn Lys Val Lys

50 55 60

Glu Leu Met Asp Ser Ile Arg Gln Ile Gly Leu Gln Val Pro Ile Asp

65 70 75 80

Val Ile Glu Val Asp Gly Thr Tyr Tyr Gly Phe Ser Gly Cys His Arg

85 90 95

Tyr Glu Ala His Gln Lys Leu Gly Leu Pro Thr Ile Arg Cys Lys Ile

100 105 110

Arg Lys Gly Thr Lys Glu Thr Leu Arg His His Leu Arg

	115	120	125
<210>	2		
<211>	30		
<212>	DNA		
<213>	Arabidopsis		
<400>	2		
	tataggatcc atgaacgggtt cgccgccggt		30
<210>	3		
<211>	32		
<212>	DNA		
<213>	Arabidopsis		
<400>	3		
	ctcgagtcag cgaagatgat gccttaatgt tt		32
<210>	4		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Arabidopsis		
<400>	4		
	atgggttctc gggatccac		20
<210>	5		
<211>	20		
<212>	DNA		
<213>	Arabidopsis		
<400>	5		
	atctgtggga tcccgagaac		20