(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년03월17일
(11) 등록번호 10-0813118
(24) 등록일자 2008년03월06일

(51) Int. Cl.
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0023419
(22) 출원일자 2007년03월09일
심사청구일자 2007년03월09일
(30) 우선권주장
1020070016149 2007년02월15일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
US20040055039 A1
US5646333 A
US6127179 A
WO2005035766 A1
전체 청구항 수 : 총 4 항

(73) 특허권자
서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교
(72) 발명자
김성룡
경기도 고양시 일산동구 마두동 백마마을 212-1003
김성현
서울시 영등포구 대림3동 코오롱 아파트 105-1305
(74) 대리인
양부현

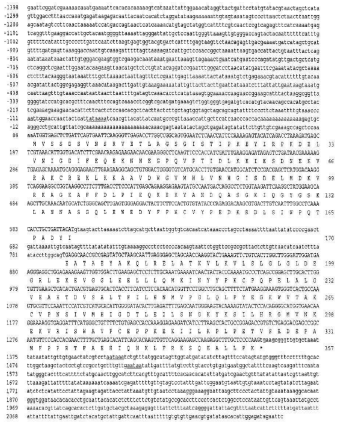
심사관 : 김기연

(54) 과일의 표피 조직 특이적 발현 특성을 갖는 프로모터

(57) 요 약

본 발명은 식물체의 과일의 표피 조직 특이적 발현 특성을 갖는 프로모터에 관한 것이다. 본 발명의 과일 표피 조직 특이적 발현 특성을 갖는 프로모터는 과일의 표피 조직의 색깔, 조직 등의 특성을 조절하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1b



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 과일 표피 조직 특이적 발현 특성의 프로모터.

청구항 2

(a) 상기 제 1 항의 프로모터 및 (b) 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래유전자를 포함하는 벡터.

청구항 3

상기 제 2 항의 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 식물체.

청구항 4

상기 제 2 항의 벡터로 식물을 형질전환시켜 상기 외래유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 형질을 전환시키는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<6> 본 발명은 식물체의 과일의 표피조직 특이적 발현 특성을 갖는 프로모터에 관한 것이다.

<7> 꽃과 과일에서 색깔의 발달은 식물의 적응도(fitness)에서 중요한 특성이다. 색깔화(coloration)는 클로로필(chlorophyll), 카로테노이드(carotenoid), 및 플라보노이드(flavonoid)가 혼합되는 것으로부터 발생된다. 안토시아닌(anthocyanins)은 플라보노이드의 서브클래스에 속하는 2차 대사물(secondary products)이다. 이들은 수분(pollination)을 위해서 곤충을 유혹하거나 또는 종자의 확산을 돕기 위해서 꽃과 과일에서 색소로서 기능한다 (Holton and Cornish, 1995; Springob et al,, 2003).

<8> 안토시아닌과 다른 플라보노이드들은 UV 광과 병원균에 대해서 보호제로서 작용하거나 박테리아와 식물사이의 상호작용에서 신호분자로 작용하기도 한다 (Harbone and Grayer, 1994; Holton and Cornish, 1995; Dixon and Steele, 1999; Springob et al., 2003; Kim et al., 2006). 안토시아닌이외에 플라보놀(flavonols)과 카로테노이드와 같은 다른 색소, 금속착물, 액포(vacuole)의 pH, 및 세포의 모양이 최종적으로 나타나는 색소형성의 표현형에 영향을 미칠 수 있다 (Forkmann, 1994; Holton and Cornish, 1999).

<9> 안토시아닌 생합성 경로는 2차 대사물에 대해서 공지되어 있다 (Dixon and Steele, 1999).

<10> 이는 페투니아(*Petunia hybrida*) 및 금어초(*Antirrhinum majus*)의 꽃과 옥수수(*Zea mays*) 낟알 등에서 광범위하게 연구되었다(Holton and Cornish, 1995). 이 생합성 경로에서 연구된 유전자 및 효소 중에서, 안토시아니딘 씬타아제(anthocyanidin synthase; ANS)는 류코안토시아니딘(leucoanthocyanidins)을, 안토시아닌 합성경로 중에서 최초의 색소 화합물인 안토시아니딘으로 변환하기 때문에 매우 중요하다(Springob et al., 2003).

<11> 개나리속(*Forsythia*)에서 ANS 전사물이 꽃받침조각(sepals)에서 발견되었지만 꽃밥(anthers) 또는 꽃잎(petal)에서는 발견되지 않았다(Rosati et al., 1999). 아라비돕시스(*Arabidopsis*)의 백화된(etiolated) 식물에서 *ANS* 유전자는 플라보놀 합성유전자(flavonol synthase gene; FLS) 보다 후에 백색광에 의해서 최고 수준까지 유도되었는데, 이는 *ANS* 유전자가 생합성 경로에서 후기 유전자(late gene)라는 것을 암시한다 (Pelletier et al., 1997). 적색 포르마(forma)의 적색 잎에서 검출되는 들깨(*Perilla*) *ANS* 유전자의 발현은 고강도 백색광에 의해 포르마에서 대등하게 유도되었다(Gong et al., 1997).

<12> 이와 유사하게, 사과 ANS 유전자의 전사물은 푸른색이 아닌 붉은색 과일의 표피조직에서 선택적으로 검출되었고, 이는 광에 의해서 조절적으로 유도된다(Kim et al., 2003).

<13> 안토시아닌 생합성 경로중에서의 조절 유전자도 확인되었다(Springob et al., 2003). 이들 유전자들 중에서 그 특성이 잘 연구된 유전자는 발현의 강도 및 패턴에 영향을 주는 MYB 및 bHLH(basic helix-loop-helix)를 코딩하는 유전자이다(Holton and Cornish, 1995; Springob et al., 2003). 예를 들어, 개나리속 *ANS* 유전자는 안토시아닌 유전자의 활성화 및 광반응에 관여하는 몇 개의 시스-엘리먼트(cis-element)를 포함한다(Rosati et al., 1999). 옥수수에서, 근접한 제2의 추정 위치를 갖는 C1-결합 부위는 *ANS* 유전자의 활성화에서 기능한다(Lesnick and Chandler, 1998).

<14>

<15> 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.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<16> 본 발명자들은 과일의 표피조직에서 유전자를 선택적으로 발현하도록 조절하는 기능을 갖는 프로모터를 찾기 위해 노력한 결과, 사과의 안토시아니딘 씬타아제(anthocyanidin synthase, *ANS*) 유전자인 *MdANS1*를 클로닝하였고, 이 유전자의 프로모터 부위와 *GUS* 유전자의 융합유전자인 *MdANS1*::*GUS* 로 형질전환된 담배 식물체의 생식기관에서 *GUS* 활성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

<17> 따라서, 본 발명의 목적은 식물체의 과일의 표피조직에서 특이적으로 발현하는 특성을 갖는 프로모터를 제공하는 데 있다.

<18> 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 프로모터 및 원하는 외래유전자를 포함하는 벡터를 제공하는 데 있다.

<19> 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 벡터에 의해 형질이 전환된 형질전환 식물체를 제공하는 데 있다.

<20> 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 벡터에 의해 식물의 형질을 전환시키는 방법을 제공하는 데 있다.

<21> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구의 범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 구성 및 작용

<22> 본 발명의 일 양태에 따르면, 유전자를 식물의 과일 표피조직에서 특이적으로 발현시키는 특성을 갖는 서열번호 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로모터를 제공한다.

<23> 본 발명자들은 유전자를 식물체의 과일의 표피조직에서 특이적으로 발현하도록 조절하는 기능을 갖는 프로모터를 찾기 위해 노력한 결과, 사과의 안토시아니딘 씬타아제(*ANS*) 유전자인 *MdANS1*를 클로닝하였고, 이 유전자의 프로모터와 *GUS* 유전자의 융합유전자인 *MdANS1*::*GUS*로 형질전환된 담배 식물체의 생식기관에서 *GUS* 활성을 확인하였다.

<24> 본 명세서에서의 용어 "특이적으로" 라는 용어는 프로모터의 발현 활성이 동일한 식물체내의 적어도 하나 이상의 다른 조직보다 특정한 조직 내에서 더 높다는 것을 의미한다. 프로모터의 발현 활성의 수준은 일반적으로 사용되는 방법을 이용하여 미리 측정된 조직 내에서의 프로모터의 발현수준을 다른 조직내에서의 것과 비교함으로써 평가된다. 일반적으로 프로모터의 발현수준은 프로모터의 조절 하에서 발현된 유전자 생성물, 예를 들어 단백질 및 RNA 등의 생성량에 의해 측정된다.

<25> 본 명세서에서의 용어 "프로모터" 는 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 프로모터 부위는 당업자라면 용이하게 인식할 수 있다. 즉, ATG 모티프를 포함하는 추정의 개시코돈이 확인되어 있고, 이 개시코돈으로부터 업스트림이 추정 프로모터 부위이다. 프로모터는 인접 및 원거리의 업스트림 엘리먼트(element)들로 구성되어 있다. 인접 엘리먼트로서는 통상적으로 RNA 중합효소 II가 적합한 전사 개시 위치에서 RNA의 합성을 개시할 수 있게 하는 TATA 박스를 포함한다. 원 거리 엘리먼트은 인헨서(enhancer)라고도 불리우는 조절 서열을 포함하는데, 이는 TATA 박스의 업스트림 부위에 조직 특이적 또는 시간 특이적 발현에 관여하는 추가 조절 엘리먼트이다. 인헨서는 프로모터의 활성을 촉진할 수 있는 DNA 서열이고, 프로모터의 고유의 엘리먼트이거나, 프로모터의 조직-특이성이나 발현 수준을 향상시키기 위해서 삽입되는 이종기원(heterologous)의 엘리먼트일 수 있다. 프로모터는 본래의 유전자로부터 그 전체가 유래한 것일 수 있고, 또는 자연계에서 발견된 상이한 프로모터들로부터 유래한 상이한 엘리먼트들로 구성될 수도 있고, 심지어 합성 DNA를 포함할 수도 있다. 당업자라면 각각 상이한 프로모터는 각각 상이한 조직 또는 세포 타입에서, 또는 발

달단계의 상이한 단계에서, 또는 상이한 환경조건에 대응하여서 유전자의 발현을 지시할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 유전자를 대부분의 세포타입에서 대부분의 시간동안 발현시키는 프로모터를 "구성성(constitutive) 프로모터"라고 한다. 식물체 세포내에서 유용한 다양한 타입의 새로운 프로모터들이 계속적으로 발견되고 있다; 다수의 프로모터 예들이 Okamuro and Goldberg에 의한 편집물에 개시되어 있다(1989, Biochemistry of Plants 15:1-82). 대부분의 경우에서 조절 서열의 정확한 경계부분이 완벽하게 정해지지 않기 때문에 일정한 변이의 DNA 단편들이 동일한 프로모터 활성을 갖는다고 인식되어 있다.

<26> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 상기 서열번호 1에 기재된 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

<27> 본 명세서에서의 용어 "작동가능하게 연결된" 은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사 조절인자 결합위치의 배열)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.

<28> 본 명세서에서의 용어 "원하는 외래 유전자" 는 특정의 유전자로 한정되지 않고, 원하는 적용 또는 달성하고자 하는 표현형에 따라 선택할 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게는 과일의 표면조직의 특성, 예를 들어 과일의 색깔 또는 표면 조직을 개선하는 데 유용한 유전자를 선택할 수 있다.

<29> 본 발명에서의 벡터는 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 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

<30> 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다.

<31> 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pLλ프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., J. Bacteriol., 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터 (pLλ프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., Ann. Rev. Genet., 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

<32> 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예: λgt4·λB, λ-Charon, λΔz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

<33> 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

<34> 본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

<35> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 콜리플라우어 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 씬타아제 (nos) 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리 폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러러스 프로모터, 리불로오스-1,5-비스-포스페이트 카르복실라아제 스몰 서브유티트 (ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리오스 포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라비돕시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(APRT) 프로모터 및 옥토파인 신타아제 프로모터를 포함한다.

<36> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위는 아그로박테리움 튜머페이션스의 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, 또는 CaMV 35S 터미네이터를

포함한다.

<37> 선택적으로, 본 발명의 벡터는 리포터 분자 (예: 루시퍼라아제 및 β-글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제 (예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자 (예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (nptⅡ), 또는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 (hpt), 등)를 포함한다.

<38>

<39> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.

<40> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 상기 벡터로 식물을 형질전환시켜 상기 외래유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 형질을 전환시키는 방법을 제공한다.

<41> 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

<42> 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트 (Saccharomyce cerevisiae), 곤충 세포, 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 한편, 본 발명의 벡터는 식물에서 유용성이 크기 때문에, 상기 형질전환체는 세포 뿐만 아니라, 식물 세포 또는 조직으로부터 유래된 캘러스를 포함한다.

<43> 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acac. Sci. USA, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., J. Mol. Biol., 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., Nucleic.Acids Res., 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법(Capecchi, M.R., Cell, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., Virology, 52:456(1973)), 전기 천공법(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 리포좀-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)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

<44> 본 발명의 방법에 있어서, 식물세포의 형질전환은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있으며, 이는 전기천공(Neumann, E. et al., EMBO J., 1:841(1982)), 입자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572 (1990)) 및 아그로박테리움-중재 형질전환(미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호)을 포함한다. 이 중에서, 아그로박테리움-중재 형질전환이 가장 바람직하다.

<45> 쌍떡잎 식물을 아그로박테리움 튜머페이션스를 이용하여 형질전환시키고 형질전환된 식물체를 얻는 방법은 공지되어 있고, 이 외에 다른 다양한 식물에 대해서 형질전환 식물체를 얻는 방법이 공지되어 있는 데, 목화(cotton)에 대해서는 미합중국 특허 제 5,004,863 및 5,159135호; 콩에 대해서는 미합중국 특허 제 5,569,834 및 5,416011호; 브라시카(*Brassica*) 에 대해서는 미합중국 특허 제 5,463,174호; 땅콩(peanut)에 대해서는 Cheng et al. (1996) *Plant Cell Rep.* 15:653-657, McKently et al. (1995) *Plant Cell Rep.* 14:699-703)에; 파파야(papaya)에 대해서는 Ling, K. et al. (1991) Bio/technology 9:752-758); and pea (Grant et al. (1995) Plant *Cell Rep.* 15:254-258에 개시되어 있다.

<46> 형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예컨데, 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물 세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (nptII) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<47> 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜트로부터 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 (미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

<48> 본 발명에 있어서, 바람직한 형질전환 방법은 아그로박테리움 시스템을 이용하여 실시되며, 보다 바람직하게는 아그로박테리움 튜머페이션스 (Agrobacterium tumefaciens)-바이너리 벡터 시스템을 이용하여 실시된다.

<49> 식물 세포의 형질전환은 Ti 플라스미드를 포함하는 아그로박테리움 튜머페이션스를 가지고 실시된다 (Depicker, A. etal., Plant cell transformation by Agrobacterium plasmids. In Genetic Engineering of Plants, Plenum Press, New York (1983)). 보다 바람직하게는, pBin19, pRD400, pRD320, pGA1611 및 pGA1991과 같은 바이너리 벡터 시스템이 이용된다 (An, G. et al., Binary vectors" In Plant Gene Res. Manual, Martinus Nijhoff Publisher, New York(1986); An et al., 1988; 및 Lee et al., 1999).

<50> 본 발명에 적합한 바이너리 벡터는 (i) 식물에서 작동하는 프로모터; (ii) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 구조 유전자; 및 (iii) 폴리아데닐화 시그널 서열을 포함한다. 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자 (예:루시퍼라아제 및 글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 바이너리 벡터에 이용되는 프로모터의 예는 CaMV 35S 프로모터, 1 프로모터, 2 프로모터 및 노팔린 씬타아제 (nos) 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

<51> 아그로박테리움 튜머페이션스에 의한 익스플랜트의 감염은 당업계에 공지된 방법을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 감염 과정은 아그로박테리움 튜머페이션스의 배양물에 익스플랜트를 함침시켜 공동배양하는 과정을 포함한다. 이에 의해 아그로박테리움 튜머페이션스는 식물내로 감염된다.

<52> 아그로박테리움 튜머페이션스에 의해 형질전환된 익스플랜트는 재분화 배지에서 재분화되며, 이는 최종적으로 형질전환 식물체를 형성한다.

<53> 본 발명에 따라 형질전환된 식물은 당업계에 공지된 방법에 의해 형질전환 여부가 확인된다. 예를 들어, 형질전환된 식물의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 형질전환 식물의 지놈에 삽입된 외래 유전자가 규명될 수 있다. 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯팅을 실시하여 형질전환 여부를 확인할 수 있다 (Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989).)

<54> 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

<55> (ⅰ) 본 발명은 유전자를 과일의 표피조직에서 특이적으로 발현하게 하는 프로모터를 제공한다.

<56> (ii) 본 발명의 프로모터는 과일의 표피조직에서 색깔 등의 특성을 조절하는데 유용하게 이용될 수 있다.

<57> 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.

<58> **실시예**

<59> ***실험방법***

<60> **박테리아 균주**

<61> 대장균 균주 MC1000 및 XL-1 Blue MRF'을 분자 클로닝에 대한 숙주 균주로 사용하였다. f1 헬퍼 파아지 R408을, λUNI-Zap XR 벡터(Stratagene, USA)로부터 pBluescript 파아지미드를 절단(excision)해내는데 사용하였다. 대장균 균주 XL1-Blue MRA (P2)는 지놈 라이브러리를 스크리닝한 후에 λ파아지 제조에 대한 숙주로서 사용하였다.

<62>

<63> **지놈 라이브러리의 스크리닝**

<64> 사과 지놈 라이브러리는 한국의 연세대학교 김우택 박사로부터 얻었다. 라이브러리는 제조자의 지시에 따라, *Bam*HI-절단된 λDASHII 벡터(Stratagene)을 사용하여 어린 사과잎으로부터 제조하였다. 라이브러리의 파아지는 [α-^{32}p]dCTP로 표지된 *MdANS1* 프로브 (Accession Number AF117269)로 플라크 하이브리다이제이션(plaque hybridization)에 의해 스크리닝하였다. 3차 스크리닝한 후에, 양성 플라크를 분리하였고, 재조합체 클론의 제한효소 단편을 pBluescript SK(-) 벡터(Stratagene)으로 서브 클로닝하였다.

<65> **DNA 서열 분석**

<66> DNA 시퀀싱은 Thermo Sequenase Cyle Sequencing Kit (Amersham, UK)와 오토시퀀서(Autosequence; ABI, USA)를 사용하여 다이디옥시뉴클레오타이드 체인 터미네이션(dideoxynucleotide chain termination) 방법에 따라 수행하였다. 서열을 BLAST 프로그램(Altschul et al., 1990) 및 DNASIS 및 PROSIS 소프트웨어(Hitachi, Japan)를 사용하여 데이터베이스의 것과 비교하였다. 프로모터 서열에서 추정의 DNA-단백질 결합 부위를 Mat-Inspector 프로그램 및 스탠다드 세팅(Standard settings, Core similarity, 0.80; matrix similarity, 0.85)을 사용하여 조사하였다.

<67> ***ANS* 지놈 클론의 분석 및 *ANS::GUS*의 제조**

<68> *MdANS1* cDNA에 대응하는 지놈 클론을 분리하고, *MdANS1* 5'-측 부위를 포함하는 1.5kb *Eco*RI 단편을 pBluescript SK(-)에 서브클로닝하여, pANS1.5를 제조하였다. pANS1.5의 *Sal*I/*Xba*I 단편을 pBI101.2 (Accession number U12668; Jefferson et al.,)에 트랜스레이션 결합 (translationally fused) 시켜 pSK126을 제조하였다. 이어서, 이 벡터를 냉동-해동 방법(freeze-thaw method)에 의해 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 균주 LBA4404안으로 도입시켰다.

<69> **담배 형질전환 및 GUS 분석**

<70> *Nicotiana tabacum* var. SR1을 아그로박테리움 튜머페이션스(*A. tumefaciens*)와 함께 잎 디스크 형질전환방법에 의해 형질전환시켰다. 온실에서 재배한 형질전환된 담배 식물체의 꽃, 꽃봉오리 및 잎을 Jefferson et al.(1987)에 의해 기술된 방법에 따라 *GUS* 분석에 사용하였다. 조직을 0.1% (w/v)의 5-브로모-4-클로로-3-인돌일-β-D-글루쿠로나이드(X-Glu), 10 mM의 EDTA, 0.5 % (v/v)의 Triton X-100, 5 mM의 포타슘 페로시아나이드, 및 20% 메탄올을 포함하는 100 mM 소디엄 포스페이트 버퍼 (pH 7.0)에서, 10-13 시간 동안 37℃에서 암실에서 배양하였다. 조직을 염색한 후에, 50℃에서 5 시간 동안 에탄올로 세정하고, 암실 조건에서 현미경으로 관찰하였다.

<71> ***실험결과***

<72> **사과 *ANS* 지놈 클론의 분리**

<73> 붉은 사과 품종인 '후지(Fuji)' 의 표피 조직에서 선택적으로 발현되는 *ANS* 유전자(*MdANS1*)에 대해서는 이미 연구가 진행되었다(Kim et al., 2003). 이러한 조직 특이적 발현에 대한 조절적 메카니즘을 더 잘 이해하기 위해, 지놈 클론을 분리하였다. 지놈 라이브러리의 약 3 × 10^5 플라크를, *MdANS1* cDNA를 프로브로서 사용하여 플라크 하이브리다이제이션에 의해 스크리닝하였다. 3차 스크리닝 후에, 9개의 재조합 플라크를 얻었고, 이들의 제한효소 맵에 기초하여 4가지의 그룹으로 나누었다(데이타 제시하지 않음). 대략 12kbp 길이의 지놈 클론인 λANS1이 *MdANS1* cDNA에 대응한다는 것을 발견하였다. λANS1의 1.5-kbp *Eco*RI 서브클론(pANS1.5)이 코딩 부위의 일부분과 함께 5' 측 서열 부위를 포함하였다(도 1a).

<74> 근접하는 2.0-kbp *Eco*RI 서브클론인 pANS2.0 은 194bp 인트론 및 3'측 부위와 함께 나머지 부위를 포함하였다. 인트론을 포함하는 이러한 지놈 구조는 아라비돕시스, 개나리속 및 페투니아에서 발견되는 것과 유사하지만, 옥수수에서 확인되는 구조와는 다르다(Furtek et al., 1998; Menssen et al., 1990; Pelletier et al., 1997; Rosati et al., 1999) 본 발명에서의 인트론은 5' 및 3' 말단에서 각각 콘센서스 GT 및 AG 서열을 포함하였다.

<75>

<76> ***ANS* 프로모터의 *인 실리코(In Silico)* 분석**

<77> 추정 CAAT 박스 서열 CAAT, 및 TATA 박스 서열 TATAAAA는 *MdANS1* cDNA 5' 말단으로부터 -112/-109 및 -91/-85에서 *MdANS1* 의 5' 측 서열내에서 각각 발견되었다. Myb-클래스 P 활성자 결합 부위, CCAACC (-847/-842 위치) 및 두개의 이와 유사한 서열 뿐만 아니라, 광반응 또는 플라보노이드 생합성-특이적 발현에 중요한 여러 가지 시스-엘리먼트가 위치하였다(표 1). 옥수수 과피에서, P 단백질은 3-디옥시플라보노이드(3-deoxyflavonoid) 생합성에 필요한 A1 유전자의 전사를 활성화시킨다(Pelletier and Shirley, 1996). 본 발명자들이 발견한 유전자도 세 개의 위치에서 C1 및 MYB.Ph3 결합에 필요한 시스-엘리먼트(Martin et al., 1991; Grotewold et al., 1994)를 포함하였다(표 1). C1, P 및 MYB.Ph3 결합을 위한 시스-엘리먼트들은 개나리속 *ANS* 프로모터에서도 발견되었다(Rosati et al., 1999). 또한, 본 발명의 *MdANS1* 프로모터에서(표 1), 주로 광(light)에 의해 조절되는 프로모터들에서 발견되는 G박스(CACGTG) 및 GT-1 박스(GGTTAA)(Solano et al., 1995; Terzaghi and Cashmore, 1995)와 같은 다른 엘리먼트들도 발견하였다. 보통 GT-1 부위들은 앞뒤로 나란히 위치하는 형태로 발견되고 이들 부위들 사이의 공간이 매우 중요하다(Terzaghi and Cashmore, 1995). *MdANS1* 프

로모터에서, -1042 위치에서의 GT-1 부위는, GT-1 결합 부위에 밀접하게 관련된 서열인 SBF-1 결합 부위로부터 22-b 만큼 떨어져 있다. 프로모터 부위는 ABA-반응성 엘리먼트(ABRE)와 겹쳐지는 세 개의 G 박스 코어 서열을 포함한다. *MdANS1*이 광-유도성이라는 것이 확인되었다(Kim et al. 2003). 추정의 시스-엘리먼트에 결합하는 전사인자는 *MdANS1* 유전자의 전사를 활성화하거나 억제하는 것을 매개할 수 있다.

<78> [표 1]

<79> 본 발명의 *MdANS1* 프로모터에서 관찰되는 추정의 시스-엘리먼트들

P (CC(T/A)ACC)[b]	C1 (AAACGT)	MYB.Ph3 (aaaAaaC(C/G)GTTA or aaaAGTTAGTTA)	I-box (CATAA)	SBF-1(GGTTAA(A/T)(A/T)(A/T)) or GT-1 (GGTTAA)[c]	G-box (CACGTG) or ABRE (ACGT)[d]
CCAACC (-847 to -842)				GGTTAAAAT (-1072 to -1064)	
CCCACC (-250 to -245)[e]	AAACGT (-528 to -523)	ATGAGCTAGTTA (-1312 to -1301)[e]	CATAA (-1278 to -1274)	GGTTAAACT (-1042 to -1034)	TACGTA (-1316 to -1311)
GCTACC (-154 to -149)[e]		CTAAGGCGGTTA (-319 to -308)		AGTTAAAAG (-865 to -857)	TACGTG (-961 to -956)
				AGTTAACAT (-679 to -671)	AACGTA (-527 to -522)
				GCTTAAAAC (-582 to -574)	
				AGTTAAAAT (-554 to -546)	
				GGTTAAACA (-489 to -481)	
				AGTTAATTA (-388 to -380)[e]	

<80>

<81> - *MdANS1* cDNA의 5' 말단으로부터 1398bp 업스트림 부위에서 관찰되는 추정의 시스-엘리먼트들.

<82> - [b]뉴클레오타이드 서열은 다른 식물종으로부터의 프로모터에서 보고된 코어 콘센서스 서열을 나타낸다.

<83> - [c]GT-1 박스들 및 [d]ABRE 코어 서열들을 밑줄을 그어 나타내었다.

<84> - [e]서열은 MdANS1 오픈리딩프레임의 방향과 비교하여 역방향에서 발견되는 서열이다.

<85> **형질전환된 담배 식물체에서 사과*ANS::GUS*의 발현**

<86> 조직-특이적 발현에서의 *MdANS1* 프로모터의 역할을 조사하기 위해 형질전환된 식물체를 제조하였다. 사과는 형질전환이 어렵기 때문에, 담배 식물체 시스템을 사용하였다. *ANS* 프로모터 부위를 바이너리 벡터 pBI101.2의 *GUS* 유전자에 트랜스레이션 결합(translationally fused) 시켰다(도 1c). *ANS::GUS* 구조의 PCR 검사법에 기초하여, 10 개의 재생된 식물들중에서 6개가 형질전환체인 것으로 확인하였다(데이터 제시하지 않음). 이들 융합된 유전자의 발현은 조직화학적 *GUS* 분석법에 의해 분석하였다. 형질전환된 담배 식물체의 영양생장단계(vegetative growth phase)에서는 *GUS* 활성이 거의 나타나지 않았는데, 이는 *MdANS1*의 노던 분석으로부터의 결과와 일치하는 것이다. 이와는 대조적으로, 생식 단계에서, GUS 활성은 생식 기관: 꽃눈(floral bud)의 꽃받침조각(sepal), 성숙한 꽃의 꽃잎(petal), 꽃턱(receptacle) 및 발달단계의 종자(seed)로부터의 여러 조직에서 검출되었다(도 2). 꽃받침조각에서, *GUS* 활성은 돌기꼴구조(trichome)에서 주로 발견되었고, 상피조직에서는 약하게 발견되었다. 유사하게, 성숙한 꽃잎에서는 활성이 상피 조직에서보다 돌기꼴구조에서 더욱 크게 나타났다. 꽃잎에서는 도관(vascular) 조직에서도 강한 활성을 나타내었다. 발달단계의 과일에서는 미성숙 씨앗의 무딘 톱니 모양의 상피세포내에서 활성이 현저하였으나, 태좌(placenta)에서는 약하게 나타났다. 강한 활성은 꽃턱의 중앙에서 관찰되었다. 이와 같이 형질전환된 담배의 생식기관에서의 높은 활성과 영양기관에서의 낮은 활성은 앞서 연구되었던 *MdANS1*의 생식기관 선택적 발현(Kim et al. 2003)과 일치하는 결과이다.

<87> *GUS* 활성은 본원의 형질전환 담배의 미성숙 씨앗에서 매우 높게 나타났는데(도 2), 이는 발달단계에 있는 종피(seed coat)에서 안토시아닌 생성과 관련될 수 있다. *Phaseolus vulgaris*에서, CHS15 프로모터-유도된 *GUS* 유전자는 형질전환된 담배 식물체로부터의 발달단계에 있는 종자의 상피세포에서 *GUS* 발현을 나타낸다(Lawton et al., 1991).

<88> 한편, 본 발명에서 형질전환된 담배의 과일 표피에서 약한 활성만을 검출할 수 있었는데, 이것은 아마도 담배와 사과는 과일의 발달과정이 상이하기 때문으로 생각된다. 즉, 담배 과실은 씨방으로부터 발달하는 열개성 삭과(dehiscent capsule)인 반면에, 사과 과실은 과실 유조직으로 발달한 꽃턱통(hypanthium)인 폐과성 과육(indehiscent flesh)이다(Fahn, 1990).

발명의 효과

<89> 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 유전자를 과일의 표피조직에서 특이적으로 발현하게 하는 특성을 갖는 프로모터를 제공한다. 본 발명의 프로모터는 과일의 표피조직의 색깔, 조직 등의 특성을 조절하는데 유용하게 이용될 수 있다.

<90> 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.

<91> **참조 문헌**

<92> Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Bio* 215: 403-411

<93> An G, Ebert PR, Mitra A., Ha SB (1988) Binary vectors; In Gelvin SB and Schilperoort RA, eds, Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.A3/1-A3/19

<94> Dixon RA, Steele CL (1999) Flavonoids and isoflavonoids : A gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* 4: 394-400

<95> Fahn A (1990) *Plant Anatomy*, pp. 503-512, Pergamon Press, Oxford

<96> Forkmann G. (1994) Genetics of flavonoids; The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, In JB Harborne (ed.), pp 537-564, Chapman & Hall, London

<97> Furtek D, Schiefelbein JW, Johnston F, Nelson OE (1988) Sequence comparisons of three wild-type Bronze-1 alleles from Zea mays. *Plant Mol Biol* 11:473-481

<98> Gilmartin PM, Sarokin L, Memelink J, Chua NH (1990) Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell* 2: 369-378

<99> Gong Z, Yamazaki M, Sugiyama M, Tanaka Y, Saito K (1997) Cloning and molecular analysis of structural genes involved in anthocyanin biosynthesis and expressed in a forma-specific manner in Perilla frutescens. *Plant Mol Biol* 35: 915-927

<100> Grotewold E, Brummond BJ, Bowen B, Perterson T (1994) The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activation a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* 76: 543-553

<101> Harborne JB, Grayer RJ (1994) Flavonoids and insects; The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, In Harborne JB (ed.), pp 589-618, Chapman & Hall, London

<102> Holton TA, Cornish EC (1995) Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. *Plant Cell* 7: 1071-1083

<103> Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907

<104> Kim J-S, Lee B-H, Kim S-H, Oh K-H, Cho KY (2006) Responses to environmental and chemical signals for anthocyanin biosynthesis in non-chlorophyllous corn (Zea mays L.) leaf. *J Plant Biol* 49: 16-25

<105> Kim SH, Lee JR, Hong ST, Yoo YG, An G, Kim SR (2003) Molecular cloning and analysis of anthocyanin biosynthesis genespreferentially expressed in apple skin. *Plant* Sci165: 403-413

<106> Lawton MA, Dean SM, Dron M, Kooter JM, Kragh KM (1991) Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor, SBF-1, closely related to GT-1. *Plant Mol Biol* 16: 235-249

<107> Lesnick ML, Chandler VL (1998) Activation of the maize anthocyanin gene a2is mediated by an element conserved in many anthocyanin promoters. *Plant Physiol* 117: 437-445

<108> Martin C, Prescott A, Mackay S, Bartlett J, Vrijlandt E (1991) Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of Antirrhinum majus. *Plant J* 1:37-49

<109> Menssen A, Hohmann S, Martin W, Schnable PS, Peterson PA, Saedler H, Gierl A (1990) The En/Spm transposable element of Zea mays contains splice sites at the termini generating a novel intron from a dSpm element in the A2 gene. *EMBO J* 9: 3051-3057

<110> Pelletier MK, Murrell JR, Shirley BW (1997) Characterization of flavonol synthase and leucoanthocyanidin dioxygenase genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* 113: 1437-1445

<111> Pelletier MK, Shirley BW (1996) Analysis of flavanone 3-hydroxylase in Arabidopsis seedlings, Coordinate regulation with chalcone synthase and chalcone isomerase. *Plant Physiol* 111: 339-345

<112> Rosati C, Cadic A, Duron M, Ingouff M, Simoneau P (1999) Molecular characterization of the anthocyanidin synthase gene in Forsythia intermedia reveals organ-specific expression during flower development. *Plant Sci* 149: 73-79

<113> Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467

<114> Solano R, Nieto C, Avila J, Canas L, Diaz I, Paz-Ares J (1995) Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor (MYB.Ph3) from Petunia hybrida. *EMBO J* 14: 1773-1784

<115> Springob K, Nakajima J, Yamazaki M, Saito K (2003) Recent advances in the biosynthesis and accumulation of anthocyanins. *Nat Prod Rep* 20: 288-303

<116> Terzaghi WB, Cashmore AR (1995) Light-regulated transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol* 46: 445-474

도면의 간단한 설명

<1> 도 1a - 도 1c는 *MdANS1* 유전자의 뉴클레오티드 서열 및 *MdANS1::GUS* 의 구조를 보여주는 그림이다.

<2> 도 1a는 *MdANS1* 지놈 클론의 제한효소 맵을 나타낸다. pANS1.5로 나타낸 1.5kb *Eco*RI 단편은 업스트림 부분과 함께 ATG 개시 코돈을 포함하고, pANS2.0은 나머지 다운스트림 부분을 포함한다. *MdANS1* 코딩부분은 두꺼운 흑색 박스로 표시된 부분이고 인트론은 백색 박스로 표시되어 있다. E, *Eco*RI; B, *BamH*I; S, *Sac*I. 두개의 *BamH*I 부위[a] 는 서로 가까운 곳에 위치하여 있다. 다른*Sac*I 부위[b] 는 *Eco*RI의 근처에 업스트림쪽에 위치한다.

<3> 도 1b는 *MdANS1* 유전자의 뉴클레오티드 서열 및 유추된 아미노산 서열을 나타낸다. 비-코딩 영역은 소문자로 표시되어 있고, 코딩 영역은 대문자로 표시되어 있다. *MdANS1* 유전자의 추정된 아미노산 서열은 뉴클레오티드 서열의 아래에 표시하였다. 왼쪽 및 오른쪽의 숫자는 각각 뉴클레오티드와 아미노산의 위치를 나타낸다. *MdANS1* cDNA의 첫 번째 뉴클레오티드는 굵게 표시하였고, +1 으로 지정하였다. 프로모터 부위의 추정의 CAAT 및 TATA 박스, 및 폴리아데닐레이션 (polyadenylation) 시그널은 밑줄로 나타내었다.

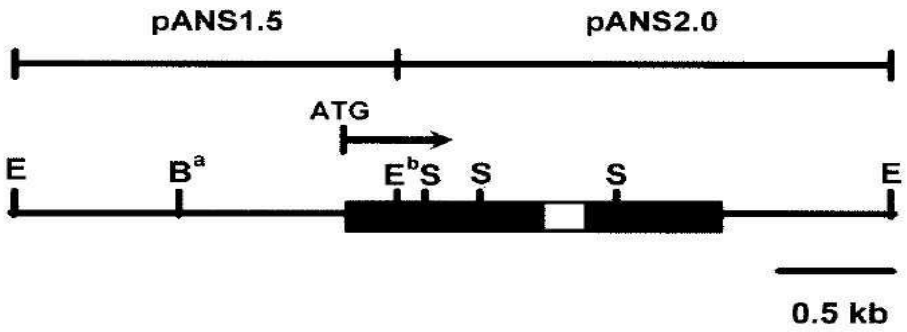
<4> 도 1c는 형질전환 담배에서 *MdANS1* 하에서 GUS를 발현시키도록 디자인된 카이메릭 유전자 구성을 나타낸다. 이러한 유전자 카세트를 바이너리 벡터 pBI101.2 안으로 삽입시키고 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-중개 형질전환에 의해 담배잎 디스크안으로 도입시켰다. RB는 T-DNA의 오른쪽 경계; P_{NOS}는 노팔린(nopaline) 씬타아제 프로모터; *npt II*는 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자; T_{NOS}는 노팔린 씬타아제 종결자; LB는 T-DNA의 왼쪽 경계.

<5> 도 2는 형질전환된 담배 식물체에서 *MdANS1* 프로모터-유도된 *GUS* 발현을 보여주는 사진이다. 파란색 침전은 *GUS* 활성의 위치를 나타낸다. 도 2의 패널 A는 어린 꽃눈(floral bud) 이다. 확대사진은 꽃받침조각(sepal)의 돌기꼴구조(trichome)에서 활성이 있다는 것을 나타낸다. 막대(bar) = 1 mm. 도 2의 패널 B는 개화하기전의 꽃을 나타낸다. 확대사진은 꽃잎(petal)의 돌기꼴구조 뿐만 아니라 도관 조직(vascular tissues)에서 활성이 나타남을 보여준다. 막대 = 2 mm. 도 2의 패널 C는 발달단계에 있는 과일의 단면을 나타낸다. 확대사진은 종피(seed coat)에서 활성이 존재한다는 것을 보여준다. 막대 = 1 mm. 도 2의 패널 D는 발달단계에 있는 과일의 하부부분이다. GUS-발현된 부분의 사진을 위해 오래된 꽃받침 조각은 과일로부터 떼어냈다. 막대 =

1 ㎜. P는 꽃잎; R은 꽃턱; S는 꽃받침조각; Se는 발달단계에 있는 종자.

도면

도면1a



도면1b

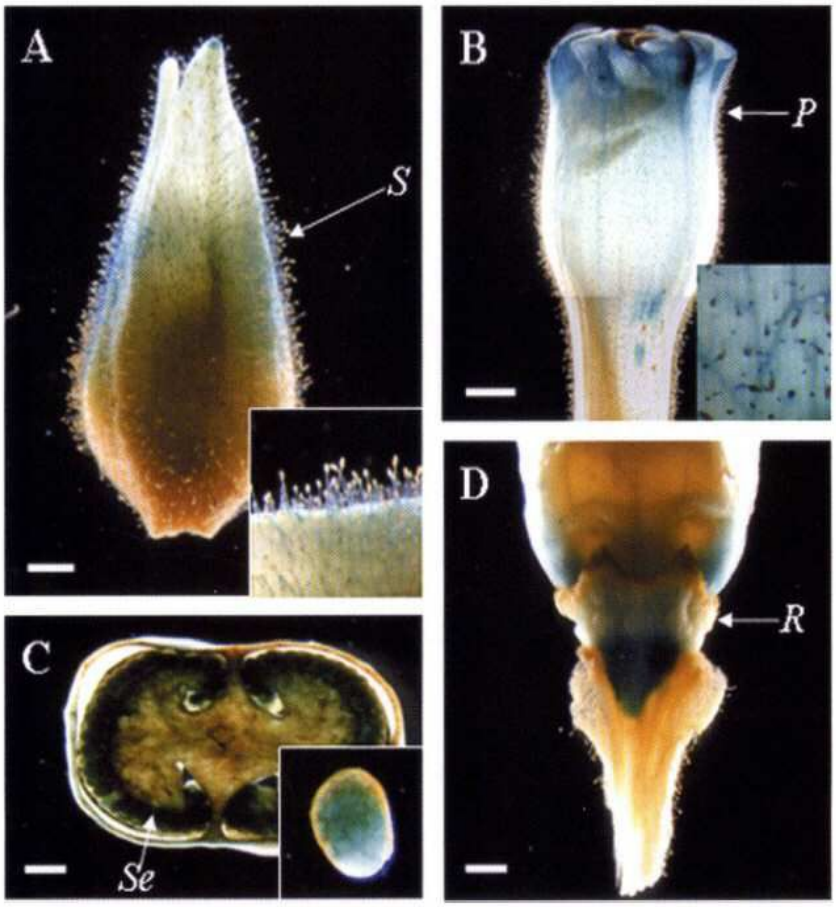
```
-1398  gaattcggatcgaaaaacaaatgaaaattcacacacaaaaagtcataaattattggaaacataggttactgattcctatgtatacgtaactagctcata
-1299  gttggacctttaaccaaatgagataagagacaattacaatcacatctaggatataagaaaaaattgtagtaaatagtccctaactctaacttaattgg
-1200  agcaatagtccttcaactaaaaatccatgaccagtaactcatcaaaacatgtagctatggtcattttcgtcaactccgtcagagtttcatcaaaatgag
-1101  tcaggtttgaaggaccattgctacaatgggggttaaaattagggattattgctccaattgggttaaagttgtgggaccagtactacaatttttttcatttg
-1002  gtttttcatatttgccccttgattcaatcttaagtgagtggtacgtgactcattttgagtaagttctaacagagttgacgaaaatgatcatagctgcat
 -903  gttttgatgagttaaaggaccaattgtcaaagatttttagttaaaagatcattgctccaaccggctaaaattaagtgaccattactgttaatttactcag
 -804  aatataaaataaactattgtgggacgaagtggtcgaagacaaataaatgaattaaagttagaaactgaatcatgaatcccagatatgttgactgctcatg
 -705  ctcaggctcgaatttggaatacaagaagttaacatgctctctgtatacaggatccgaatttgggatcctaacatatgaatttcgaaatatacgctaaaa
 -606  ctctttacaagggtaataaattttgcttaaaactaattagtttctcgaattgagttaaaattactataaatgtctgagaaacgtacatttttttgtacaa
 -507  acgatattactggcgagaggttaaacataagacttgattgtaaagaaaaatattgttacttacttgaattataaatctttattattgaataagtaaatg
 -408  caattaagtttgtaaaccaataattaacttaattttgatagtcaaacacctcatataaagtggaaaaccaagaaccggaagcatttactaaggcggtta
 -309  ggggtatccatgcacgctttcaactttccagtcaaacctcggtcgcatgatgaaagtctggtgggtgagatgtcacatgtacaacagccacatgcctac
 -210  tcgaaaagaaagaacacattcttcactctccaacacgctcacttactcttgctagtggtagctagcagcagtatttttcccttctaaatttgtaaaccc
 -111  aattggaaccaactactcattataaaatcaacgttacattatcaatgcccgttaaaccattgcttcatcaacccaccacaaaaaaaaaaaaaagagtgc
  -12  agggcctgcattgttatcgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaacaaacgagtaatatactagctgagatagtatattcttgttgtcgaaagccagctccaa
   88  aaATGGTGAGCTCTGATTCAGTGAATTCAAGGGTTGAGACCTTGGCCGGCAGTGGAATCTCAACCATCCCAAAAGAGTACATCAGACCTAAAGATGAGC
         M  V  S  S  D  S  V  N  S  R  V  E  T  L  A  G  S  G  I  S  T  I  P  K  E  Y  I  R  P  K  D  E  L   33
  187  TCGTAAACATTGGTGACATCTTCGAACAAGAGAAGAACAACGAAGGGCCTCAAGTTCCCACCATCGATTTGAAGGAGATAGAGTCTGATAACGAAAAAG
         V  N  I  G  D  I  F  E  Q  E  K  N  N  E  G  P  Q  V  P  T  I  D  L  K  E  I  E  S  D  N  E  K  V   66
  286  TGAGAGCAAAATGCAGGGAGAAGTTGAAGAAGGCAGCTGTGGACTGGGGTGTCATGCACCTTGTGAACCATGGCATCTCCGACGAGCTCATGGACAAGG
         R  A  K  C  R  E  K  L  K  K  A  A  V  D  W  G  V  M  H  L  V  N  H  G  I  S  D  E  L  M  D  K  V   99
  385  TCAGGAAGGCCGGTAAGGCCTTCTTTGACCTTCCCATTGAGCAGAAGGAGAAGTATGCCAATGACCAGGCCTCTGGTAAGATTCAAGGCTATGGAAGCA
         R  K  A  G  K  A  F  F  D  L  P  I  E  Q  K  E  K  Y  A  N  D  Q  A  S  G  K  I  Q  G  Y  G  S  K  132
  484  AGCTTGCAAACAATGCATCTGGGCAGCTTGAGTGGGAGGACTACTTCTTCCACTGTGTATACCCAGAGGACAAGCGTGACTTGTCAATTTGGCCTCAAA
         L  A  N  N  A  S  G  Q  L  E  W  E  D  Y  F  F  H  C  V  Y  P  E  D  K  R  D  L  S  I  W  P  Q  T  165

  583  CACCTGCTGATTACATgtaagtacttaaaaatcttagcatgcttaattggtgtcacaatcataaaccctagcctaaaattttaattatatccccgaact
         P  A  D  Y  I                                                                                      170
  682  gattaaaattgtcaatagttttatatatatttgtaaaaggccctcctccccacaagtaattctggttccgccgcttactcttgttaacatcaatctttta
  781  atacctggcagTGAGGCAACCGCCGAGTATGCTAAGCAATTGAGGGAGCTAGCAACCAAGGTACTGAAAGTTCTGTCACTTGGCTTGGGATTGGATGA
                    E  A  T  A  E  Y  A  K  Q  L  R  E  L  A  T  K  V  L  K  V  L  S  L  G  L  G  L  D  E  199
  880  AGGGAGGCTGGAGAAAGAAGTTGGTGGACTTGAAGAGCTCCTCTTGCAAATGAAAATCAACTACTACCCAAAATGCCCTCAGCCGGAGCTTGCACTTGG
         G  R  L  E  K  E  V  G  G  L  E  E  L  L  L  Q  M  K  I  N  Y  Y  P  K  C  P  Q  P  E  L  A  L  G   232
  979  TGTTGAAGCTCACACTGACGTGAGTGCACTCACCTTCATCCTCCACAACATGGTTCCTGGCCTGCAGCTTTTCTATGAAGGAAAGTGGGTCACTGCCAA
         V  E  A  H  T  D  V  S  A  L  T  F  I  L  H  N  M  V  P  G  L  Q  L  F  Y  E  G  K  W  V  T  A  K  265
 1078  GTGCGTTCCAAATTCCATCGTCATGCACATTGGGGATACACTTGAGATTTGAGCAATGGGAAGTACAAAAGTATACTCCACAGGGGCATGGTGAACAA
         C  V  P  N  S  I  V  M  H  I  G  D  T  L  E  I  L  S  N  G  K  Y  K  S  I  L  H  R  G  M  V  N  K  298
 1177  GGAAAAGGTGAGGATTTCATGGGCTGTTTTCTGTGAGCCACCAAAGGAGAAGATCATCCTTAAGCCACTGCCGGAGACCGTGTCTGAGGACGAGCCGGC
         E  K  V  R  I  S  W  A  V  F  C  E  P  P  K  E  K  I  I  L  K  P  L  P  E  T  V  S  E  D  E  P  A  331
 1276  AATGTTCCCACCACGAACTTTTGCTGAGCACATTCAGCACAAGTTGTTCAGGAAGAGCCAAGAGGCTTTGCTCCCCAAGtgaagcgggttgtgctaaat
         M  F  P  P  R  T  F  A  E  H  I  Q  H  K  L  F  R  K  S  Q  E  A  L  L  P  K  *                  357
 1375  tataatattgttgtgaactatcgtcctaataaatctgtttatggcatagttggtatgatatatcttagtttccatagtatgtgggtttccttttgcac
 1474  ttggctaagctactcctgtccgcctgctttgttgaataattattgattttatgtccttgtacctgtgatgaatggctattttcaagtcaagatttcaata
 1573  tatgggtactttcattttctatgcaacttggcatcttcacgtttgcattttcacaacacatattatgatcgaactgtttatatattaatcgttaattgt
 1672  ttaaagattatttttatataaaaaatcaaaatcgagatttttgttgtagtcctatttgattcggaatgtaattgtgtaaatcctagtatatcttagaat
 1771  atctctcatattcctattagaagtagattacctattaaatgttgtaatcctaaagggaaaggaattaagcttccctactattgtaaataaaggcacaat
 1870  gggtggataacacacacctgcaattacacatctctttcttctgtctatgccgcaccttccctcactctggcctccataattgttcagtaaattatgcct
 1969  aaaacacgttatcagcacactcttgatgctacgctaaagagagtttattctttaatcaggggattattacgttttaatcattcttttttatgattaattt
 2068  attattttattgaattgatctacatgctattgattcaatttaatttttgtgtgttgaacgtgatataacacattggagatagaattc
```

도면1c



도면2



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부