(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월13일
(11) 등록번호 10-2065493
(24) 등록일자 2020년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 6/46* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8227 (2013.01)
A01H 6/46 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0107663
(22) 출원일자 2019년08월30일
심사청구일자 2019년08월30일
(56) 선행기술조사문헌
Nuno Duque Pires. University of East Anglia 박사학위논문. Evolution of bHLH transcription factors that control cell differentiation in plants (2010.09.)
Xiaoxing Li 등. Plant Physiology. Vol. 141, 페이지 1167-1184 (2006.08.08.)

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정기홍
경기도 수원시 영통구 영통로200번길 112, 103동 504호(망포동, 영통 SK VIEW)
문선옥
경기도 용인시 기흥구 흥덕2로118번길 25, 803동 403호(영덕동, 흥덕마을8단지 한국 아델리움)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

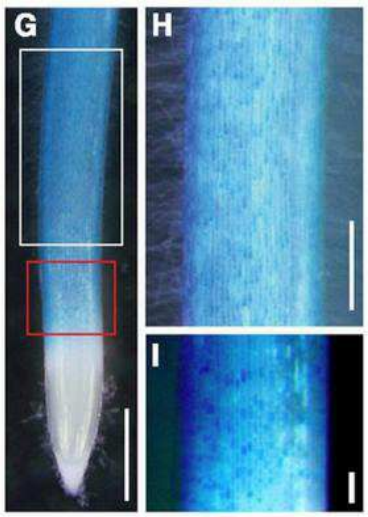
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **벼 Os03g42100 유전자 유래의 뿌리털 특이적 프로모터 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 벼 식물의 뿌리털 특이적 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 프로모터는 뿌리털 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 조절하여 벼를 포함하는 주요 단자엽 식물체 내지 곡물의 뿌리털에 의한 양분의 흡수능 증진 등의 뿌리털 형질 개선에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



pOs03g42100::GUS

(52) CPC특허분류
C12N 15/8205 (2013.01)
C12N 15/8261 (2013.01)
(72) 발명자
김유진
경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 30, 104동 1704호(서천동, 영통로 효성해링턴플레이스)

유요한
인천광역시 연수구 원인재로 180, 217동 1606호(연수동, 연수우성2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ013259
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 게놈 정보 기반의 영양분 이용 효율 증진을 위한 벼 유용 유전자 발굴 및 기능 규명
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ013664
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 인델 빅데이터를 기반으로한 자연변이 벼 품종 활용기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2018.02.01 ~ 2020.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 식물 뿌리털 특이적 발현 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터를 포함하는 식물의 뿌리털 특이적 발현 벡터.

청구항 3

제 2항의 발현 벡터를 이용하여 형질전환된 아그로박테리움.

청구항 4

제 2항의 식물의 뿌리털 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환된 식물체.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 단자엽 식물은 벼인 것을 특징으로 하는 형질전환된 식물체.

청구항 7

제 4항의 형질전환 식물체의 종자.

청구항 8

제 1항의 뿌리털 특이적 발현 프로모터에 뿌리털 형질 개선 외래 유전자를 재조합하여 벡터를 제조하는 단계; 및,

상기 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 포함하는 뿌리털 형질 개선 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 뿌리털 특이적으로 발현시키는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8항의 방법에 의해 제조된 뿌리털 형질 개선 외래 유전자가 뿌리털 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 벼 0s03g42100 유전자 유래의 뿌리털 특이적 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 벼 0s03g42100 유전자 유래의 프로모터는 뿌리털에서 특이적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 분자생물학의 발달은 외래 유용유전자의 분리 및 편집을 가능케 했으며, 이러한 결과는 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻을 수 있게 되었다. 현재까지 형질전환체를 만들 수 있는 형질전환 방법으로, 80년대 원형질체

에 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol, PEG)과 전기충격법(electroporation)으로 많은 형질전환체를 획득하였으며, 90년대 후반 유전자총 이용법이 보편화되었고, 최근에는 쌍자엽 식물에서 널리 이용되어 왔던 아그로박테리움(Agrobacterium) 이용법도 많이 이용되고 있다. 그밖에 화분법(pollen pathway), 미세주사(microinjection) 방법 등이 있다.

[0003] 프로모터는 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성할 수 있으며, 그 기능에 따라서 몇 가지 프로모터로 분류할 수 있다.

[0004] 첫째, 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍자엽 식물용 프로모터로 사용되고 있다. 벼 등의 단자엽 식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquithin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C 유전자(Os0c1)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(대한민국 등록번호 제10-0429335호). 이들은 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체 내 기능을 밝히고자 시도할 때 특이적으로 고려되는 프로모터들이다.

[0005] 둘째, 뿌리 특이 발현 프로모터이다. 애기장대 퍼옥시다제(peroxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 특이적 발현을 확인하였고, 최근 고구마 유래의 매즈 유전자(ibMADS)와 당 유도성 에이디피 글루코즈 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에서 특이 발현을 유도하며 당근, 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함을 확인하여 특허 등록(대한민국 등록번호 제10-0604186호, 제10-0604191호)된 바 있다.

[0006] 위와 같이, 큰 부류로 특이적 발현을 위한 프로모터들이 알려져 있지만, 보다 더 세밀하게 기관 특이적 발현을 목적으로 하는 프로모터들이 개발될 필요성이 있다. 그 중에서 뿌리털은 뿌리의 표피 세포로부터 만들어지는 원통형의 돌출부위로, 뿌리의 표면적을 효과적으로 넓히며, 수분 및 영양분의 흡수, 식물체와 미생물간 상호작용에 중요한 역할을 한다. 주요 영양소, 중금속 그리고 확산 제한적 이온들의 흡수에 대한 능력은 농업 및 환경 분야에서 큰 기여를 할 것으로 예측된다. 이러한 사실들은 뿌리털을 포함한 기관 특이성이 증대된 프로모터들의 지속적인 개발이 필요함을 나타낸다.

[0007] 따라서, 본 발명자들은 벼 Os03g42100 유전자 유래의 뿌리털 특이적 프로모터를 pGA3519 벡터에 삽입하여 벼에 도입한 결과, 형질전환 벼의 뿌리털에서 뿌리털 형질 개선에 필요한 외래 유전자가 특이적으로 발현하여 뿌리털의 형질이 변환됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-0604186 B

(특허문헌 0002) KR 10-0604191 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 벼의 뿌리털에서 형질 개선에 필요한 외래 유전자가 특이적으로 발현할 수 있도록 벼 Os03g42100 유전자 유래의 뿌리털 특이적 프로모터를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 따라서 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 벼 Os03g42100 유전자를 포함하는 벼의 뿌리털 특이적 발현 특성 프로모터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 뿌리털 특이적 발현 벡터를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 벡터에 뿌리털 형질 개선에 필요한 외래 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합된 뿌리털 특이적 발현 벡터를 식물체에 형질전환 시키는 단계를 포함하는 뿌리털 형질 개선 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 뿌리털 특이적으로 발현시키는 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 뿌리털 개선 외래 유전자가 뿌리털 특이적으로 발현되는 형질전환 식물체를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 프로모터는 뿌리털에 특이적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터로써, 뿌리털 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 조절하여 특히 주요 작물인 벼에서 뿌리털 신장조절 및 영양분의 흡수 능력 증진 등과 같은 뿌리털 형질 개선에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 LOC_Os03g42100 유전자의 기관 별 발현 정도를 수치화한 그래프를 나타낸 것이다.

도 2는 LOC_Os03g42100 프로모터와 유전자의 일부를 포함하는 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 나타낸 것이다.

도 3은 형질전환 식물체에서 LOC_Os03g42100 프로모터가 뿌리털에서 특이적으로 발현을 보이는 GUS 염색 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 벼 Os03g42100 유전자 유래의 뿌리털 특이적 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 벼 Os03g42100 유전자 유래의 프로모터는 뿌리털에서 특이적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터로써, 뿌리털 형질 개선에 필요한 유전자발현을 조절할 수 있는 특징을 가진다. 뿌리털의 형질 개선에 따라, 활성산소량 감소, 생장 촉진 등, 식물체에서 다양한 효과를 가질 수 있다.

[0018] 본 발명은 식물의 조직 또는 기관 특이적인 유전자 발현을 조절할 수 있는 프로모터에 대하여 개시된다. 구체적으로 식물의 특정 조직 또는 기관에 국한시켜 목적 유전자를 특이적으로 발현 또는 저해할 수 있는 시스템을 제공할 수 있도록 한다. 이 과정에서 벼의 LOC_Os03g42100의 프로모터가 뿌리털에서 특이적으로 발현을 유도할 수 있다. 따라서 상기 프로모터를 이용한 형질 전환체에서 뿌리털 특이적으로 유전자가 발현될 수 있다.

[0019] 보다 상세하게, 본 발명자들은 벼의 대표적인 기관인 지상부(shoot), 뿌리(root), 잎(leaf), 다발부(heath), 이삭부(panicle), 꽃(flower), 종자(seed), 뿌리털(root hair) 8개 기관에 대한 샘플을 사용하여 quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR)을 수행하였고, LOC_Os03g42100 유전자가 다른 기관에서는 발현이 거의 일어나지 않는 반면, 뿌리털에서만 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 프로모터는 아래와 같은 과정에 따라 분리하였다.

[0021] 염기서열 해독 정보를 참고로 하여 LOC_Os03g42100의 -1,846부터 +914까지의 프로모터 영역과 두 번째 exon까지 포함하는 영역을 게놈 DNA PCR를 통해서 분리하고 pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다.

[0022] 이렇게 분리된 프로모터를 pGA3519 벡터에 삽입하여 형질전환 벡터를 제조하고, 이를 이용하여 형질전환된 식물체를 제작하였다. 상기 형질전환된 식물체에서 β-Glucuronidase(GUS) 반응을 형광 표시를 통해 검증함으로써, 해당 프로모터를 이용하여 형질전환된 식물체의 뿌리털에서 유전자 발현이 특이적으로 유도된 것을 확인하였다.

[0023] 상기 분리된 프로모터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함한다.

[0024] 프로모터는 유전자의 환경적, 시기적 및 조직적 발현을 조절하는 필수적인 요소로서, 본 발명에 따른 뿌리털 특이적 발현 프로모터를 사용하여 식물체 내에서 외래 유용 유전자의 발현 부위를 뿌리털에 특이적으로 유도할 수 있다. 본 발명은 벼의 LOC_Os03g42100로부터 유래된 프로모터로서, 외래 유전자의 발현이 뿌리털에 특이적으로 이루어지도록 유도하는 뿌리털 특이적 발현 프로모터(이하 ' 프로모터' 라 함)를 제공한다.

[0025] 본 발명에 있어서 "특이적" 이란, 본 발명에 따른 프로모터에 의한 고발현성, 특이성 등을 모두 포함하여 식물체 일부 기관에서 특이적 발현 증가를 의미한다. 예컨대 본 발명에 따른 프로모터가 결여된 식물체와 대비하여 50% 이상, 100% 이상, 200% 이상, 5배 이상 또는 그 이상의 발현 증가를 의미한다.

[0026] LOC_Os03g42100은 약 310개의 아미노산으로 구성된 basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding domain containing protein을 암호하며, 다섯 개의 exon으로 구성되어 있다. LOC_Os03g42100유전자는 basic helix-

loop-helix region bHLH domain contaning protein의 기능을 하는 유전자로서, 진핵생물의 전사인자로 기능한다. LOC_Os03g42100유전자는 식물에서 뿌리털의 분화 및 뿌리털 신장에 영향을 주는 유전자로 알려져 있다.

[0027] 또한 본 발명은 상기 프로모터 및 이와 작동 가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0028] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서, 발현 벡터는 재조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입 시, 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 게놈 내에 통합되는 것들을 포함한다.

[0029] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 프로모터를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 pCAMBIA계열, pGA계열, pGWB계열, 예컨대, pGA3519, pCAMBIA3301, pCAMBIA3300, pGA3426, pGA3780, pGWB12, pGWB14와 같은 Ti-plasmid 및 이에 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0030] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편을 포함한다.

[0031] 본 발명의 프로모터와 "기능적으로 동등한 절편"은 본 발명의 프로모터와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다. 또한, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 프로모터와 일부 유전자 영역은 공개된 벼 게놈 서열 상, LOC_Os03g42100의 프로모터 영역과 유전자의 일부 (두번 째 엑손까지)를 포함하는 서열로, 서열번호 1로 표시되는 염기 서열 중 일부가 치환, 삽입 또는 삭제되더라도 공개된 벼 게놈 서열 상 LOC_Os03g42100의 프로모터와 일부 유전자 영역에 위치한 서열과 상동성이 유지되어 실질적으로 동등한 효과를 나타낸다면 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명의 발현 벡터는 3' 방향에 목적 단백질에 대한 외래 유전자가 삽입 될 수 있으며, 상기 외래유전자는 뿌리털에 특이적으로 발현시키고자 하는 유용한 외래 유전자일 수 있다.

[0033] 식물이 생장하기 위해서는 양분과 물의 흡수가 중요하며 그 역할을 뿌리털이 주요하게 담당한다. 또한, 식물체를 고정시키고, 이차대사산물을 합성하는 역할을 수행한다. 따라서, 상기 외래 유전자는 뿌리털의 앞서 언급된 기능 및 뿌리털의 특성과 관련된 것이면 무엇이든 도입될 수 있다. 예컨대 뿌리털 발달과 관련된 유전자로서 벼의 *ROOT HAIRLESS1, EXPA17* 등이 도입될 수 있다. 또한, 뿌리털의 발달에 관여하는 *CSLD1*이나 양분 흡수에 관여하는 *OsPT1* 유전자들이 도입될 수 있으며, 이러한 외래 유전자에 관한 예시로 도입가능한 유전자의 종류가 한정되는 것은 아니다.

[0034] 상기 발현 벡터는 통상의 벡터에 본 발명의 프로모터를 도입한 것일 수 있으며, 이처럼 본 발명의 프로모터를 도입하여 발현벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.

[0035] 상기한 발현 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 삽입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피무리움 또는 아그로박테리움 투메파시엔스; 또는 식물 세포, 예를 들면, 옥수수, 보리, 밀, 벼, 귀리, 호밀 또는 사탕수수 등의 단자엽 식물 또는, 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 상추, 배추, 양배추, 수박, 참외 등의 쌍자엽 식물의 세포일 수 있다.

[0036] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용 가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast),

싹 및 캘러스 조직을 포함한다.

[0037] 또한 본 발명은 상기 발현 벡터 또는 상기 형질전환 세포를 포함하는 뿌리털 특이적 발현 유도용 조성물을 제공한다. 뿌리털 특이적 발현 유도용 조성물은 단자엽 식물체에 외래 유전자를 도입하여 단자엽 식물체의 뿌리털에서 외래 유전자의 발현을 특이적으로 유도할 수 있다. 본 발명에 있어서, 단자엽 식물체는 본 발명의 일 실시양태에 따른 벼(Oryza sativa)를 포함하여 단자엽 식물로 구분되는 식물체 모두를 제한 없이 포함한다. 본 발명에 있어서, 뿌리털 특이적 발현 유도는 단자엽 식물체의 뿌리털에 특이적 발현을 의미한다. 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 식물체는 옥수수, 보리, 밀, 벼, 귀리, 호밀 또는 사탕수수 등의 단자엽 식물 및 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 상추, 배추, 양배추, 수박, 참외 등의 쌍자엽 식물이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이하, 본 발명의 구체적인 설명은 단자엽 식물인 벼에서의 적용에 대하여 개시된다.

[0038] 또한 본 발명은 상기 발현 벡터, 상기 형질전환 세포 또는 이를 포함하는 뿌리털 특이적 발현 유도용 조성물로 형질전환된 단자엽 식물체를 제공하며, 바람직하게 상기 식물체는 단자엽 식물체이고, 보다 바람직하게는 벼이다. 이러한 본 발명의 형질 전환 단자엽 식물체는 도입된 외래 유전자가 단자엽 식물체 뿌리털에 특이적으로 발현되는 특성을 나타낸다.

[0039] 본 발명의 "형질전환 단자엽 식물체"와 "기능적으로 동등한 형질전환 단자엽 식물체"는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 변이체와 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 이용하여 제조된 형질 전환 단자엽 식물체로써, 단자엽 식물체 전신에서 프로모터 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 단자엽 식물체이다.

[0040] 본 발명의 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D.et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen.Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0301316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0041] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 단자엽 식물체를 형질 전환시켜 외래 유전자를 단자엽 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는, 뿌리털 특이적으로 발현하는 형질 전환 단자엽 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0042] 바람직하게, 상기 발현 벡터 또는 상기 형질 전환 세포를 포함하는 단자엽 식물체 뿌리털 특이적 발현 유도용 조성물을 제조하는 단계; 단자엽 식물체에 상기 조성물을 도입하는 단계; 및 상기 조성물이 도입되어 단자엽 식물체 뿌리털에 외래유전자가 특이적 발현되는 형질전환 단자엽 식물체를 선별하는 단계를 포함하는 형질 전환 단자엽 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0044] **<실시예 1> 벼의 8개 기관에 대한 RNA 추출 및 상보적 DNA 합성**

[0045] 벼 뿌리털에 특이적으로 발현하는 유전자를 선발하기 위하여, 벼의 뿌리털을 포함한 8개의 기관, 구체적으로 지상부, 뿌리, 잎, 다발부, 이삭부, 꽃, 종자 및 뿌리털에서 RNA 추출 실험을 수행하였다. 각 기관 샘플을 갈아서 가루 형태로 만든 후, TRI reagent(RNAiso)를 sample 0.1g 당 1ml을 첨가하여 잘 섞어 주었다. BCP(1-bromo-3-chloropropane) 100ul를 첨가 후, 4℃에서 12,000rpm으로 15분 동안 원심분리 하였다. 상층액 500ul을 새 tube로 옮기고 Isopropanol 500ul을 넣은 후 잘 섞어 주었다. 4℃에서 12,000rpm 조건으로 10분 간 원심분리하고, 상층액을 제거한 뒤에 75% EtOH 700ul을 넣고, RNA pellet이 떨어질 정도로만 섞어 주었다. EtOH를 제거하고 DEPC-treted DDW을 50ul 넣은 후, 55~60℃에서 10~15분 간 보관하였다. 이렇게 추출한 RNA를 역전사효소와 DNA 중합효소에 의하여 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA)로 재합성하였다.

[0047] **<실시예 2> qRT-PCR을 통한 LOC_Os03g42100 유전자의 기관별 발현 분석**

[0048] 합성된 cDNA를 주형으로 하여 qRT-PCR을 수행하였다. qRT-PCR 조건은 95℃에서 20초 후; 95℃에서 5초, 58℃에

서 10초, 72℃에서 20초를 40회 반복하였다. LOC_Os03g42100의 발현을 분석하기 위해 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0049]

Primer name	Sequencing (5'-3')
Os03g42100 RT F (서열번호 2)	GTCGAATGGCAAGGCTCAAT
Os03g42100 RT R (서열번호 3)	CTTCACGTAATGCATTGCCTC

[0050] 이를 통해 LOC_Os03g42100 유전자의 조직별 발현 양상을 분석하였으며 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에서, LOC_Os03g42100 유전자의 발현이 다른 기관에 비해 뿌리털에서 매우 강한 것을 확인하였다. 이는 LOC_Os03g42100 프로모터에 의한 유전자의 조직별 발현이 뿌리털 특이적으로 일어남을 보여준다.

[0052] **<실시예 3> 뿌리털 특이적 발현을 위한 프로모터의 클로닝**

[0053] LOC_Os03g42100의 프로모터를 클로닝하기 위하여 작성된 프라이머들과 동진 벼 (Oryza sativa L. japonica cultivar-group) 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다.

[0054] 프로모터 클로닝을 위해 사용된 프라이머의 염기 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0055]

Primer name	Sequencing (5'-3')
LOC_Os03g42100-proF_KpnI (서열번호 4)	GGTACCCAGGCTTGCAATTCATTTGG
LOC_Os03g42100-proR_XbaI (서열번호 5)	GTCTAGACCCTGCATCCAATAAACGAAGA

[0056] 주형 DNA는 100 ng로 사용하였고, 각 프라이머는 5 pmol로 사용하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 56℃에서 30초, 68℃에서 300초를 4회 반복한 후; 95℃에서 30초, 62℃에서 30초, 68℃에서 300초를 35회 반복하고 마지막으로 68℃, 10분으로 하였다. PCR 산물은 전기영동하여 크기를 확인하고, pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다. 클로닝한 DNA를 KpnI과 Xba1으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pGA3519 벡터(promoter-GUS cloning용 벡터)와 라이게이션을 14℃에서 12시간 진행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 200㎕과 혼합하여 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에 1분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 3시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프렙(mini-plasmid preparation)하였다. 미니 프랩으로 얻은 DNA를 제한 효소 KpnI과 XbaI을 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로즈 젤을 분리하고 밴드를 확인하였다. 이렇게 해서 얻어진 클로닝 DNA를 다시 염기 서열 분석하여 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다.

[0057] 상기에서 분석된 염기서열을 서열번호 1에 나타내었으며, LOC_Os03g42100의 -1,846부터 +914까지의 프로모터 영역과 두 번째 exon까지 포함하는 영역을 프로모터 서열로 사용되었다. LOC_Os03g42100 프로모터와 유전자의 일부를 포함하는 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 도 2에 나타냈다.

[0059] **<실시예 4> 형질전환 세포의 제작**

[0060] 상기 실시예 3에서 제작한 식물 발현용 벡터를 추출하였다.

[0061] 아그로박테리움 컴피턴트 셀(Agrobacterium tumefaciens LB4404) 50㎕와 2㎍의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 액체질소에 75초 넣은 후, 37℃ 오븐에 5분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간을 기다려 생성되는 아그로박테리움 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프렙한 후, KpnI과 Xba1을 사용하여 효소 절단 후 사이즈를 확인하여, 형질전환된 아그로박테리움 균주를 제조하였다.

[0062] 상기의 형질전환된 아그로박테리움을 이용하여 벼의 형질전환에 사용하였다.

[0064] **<실시예 5> 형질전환 식물체의 제작**

[0065] N6D 고체 배지에서 동진벼 종자를 7일 정도 28℃ 생장실에서 키워서 벼의 캘러스를 제작하였다. 생성된 캘러스를 상기 실시예 3의 형질전환된 아그로박테리움과 혼합하여 N6D-아세토시링곤(Acetosyringone)을 포함한 배지에서 22℃ 암조건의 생장실에서 배양하였다.

[0066] 아그로박테리움과 함께 배양된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 헹구어 낸 다음 N6D 고체 배지에서 hygromycin 선발을 1차(hygromycin 30 mg/L), 2차 (hygromycin 40 mg/L)에 걸쳐서 계대 배양을 통해 진행하였다. 선발은 28℃ 생장실에서 각각 2주 씩 합해서 4 주 동안 이루어졌다. 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L) 고체배지에 옮겨 4주 28℃ 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0068] <실시예 6> 형질전환 식물체를 이용한 뿌리털 우세한 발현 검증

[0069] 재분화된 식물체의 기관 특이적 GUS 발현을 확인하기 위하여, 수확한 종자를 10개씩 28℃에서 7일간 배양한 후 모든 개체를 GUS 염색 처리하였다.

[0070] GUS 용액은 0.5M sodium phosphate buffer 200ml, 12.5mM potassium ferricyanide 100ml, 12.5mM potassium ferrocyanide 100ml, 0.5M EDTA 20ml, 10% Triton X-100 50ml, 10ml 의 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-gluc 1g과 Methanol 200ml을 넣고 증류수로 1L의 부피를 맞추어 제조되었다. 각 계통의 식물체를 모두 15ml의 GUS 염색액에 24시간 처리한 후 70% 에탄올과 100% 에탄올을 순차적으로 이용하여 상온에서 탈색하였다.

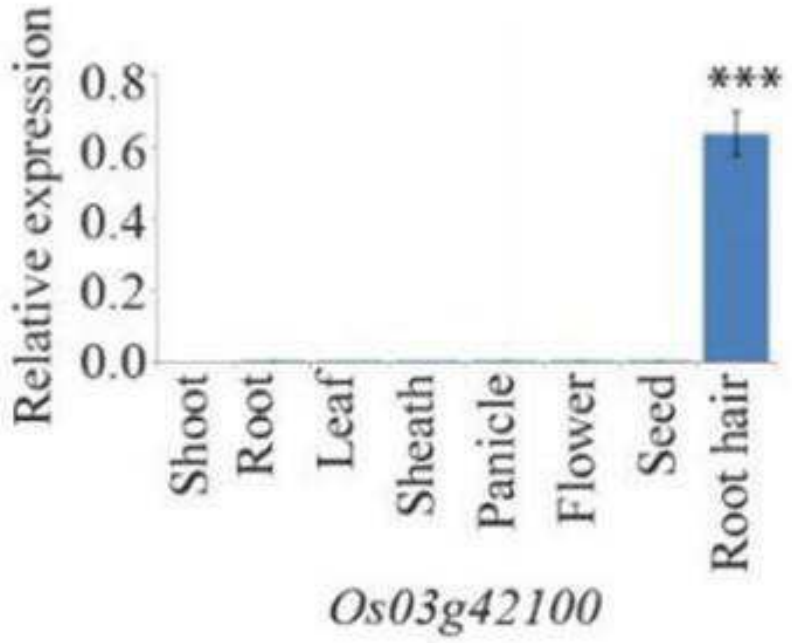
[0071] 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3의 (G)는 발아 후 5일째의 식물체 뿌리를 나타내며, (H), (I)는 뿌리털을 자세히 관찰한 사진이다.

[0072] 도 3에 나타낸 바와 같이, 형질전환 식물체들은 다른 부위에서 GUS 발현이 약한 것과는 달리 뿌리털에서 우세한 GUS발현은 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다. 도 3의 결과를 토대로 LOC_Os03g42100 프로모터는 뿌리털 특이적으로 발현을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0073] 즉, 상기 분석 결과를 통해 LOC_Os03g42100 유전자의 -1,846부터 +914까지의 프로모터 영역이 특이적 발현 프로모터로 작용할 수 있음을 확인하였다.

도면

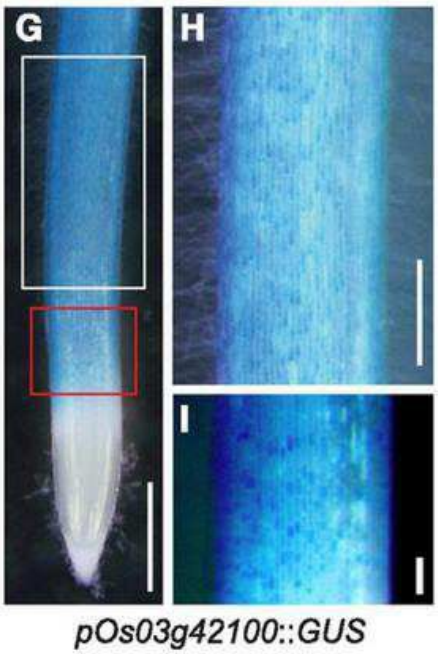
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> A root hair-specific promoter from Oryza sativa Os03g42100 gene and uses thereof

<130> PN1906-317

<160> 5

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2760

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> LOC_Os03g42100 promoter

<400> 1

caggcttgca attcatttgg tcaactgaaa gtgatgtcat tttcaaaaac tgaaaatgac 60

acaatgaaaa agatttcagg gaagttttcc acacaaaaga ataactgaat ccaacttgca 120

aacttaagta gcttggttag ttttcttaat aagatagcag tgagccagcg aggttgtttt 180

tccatatatg atacattatt ggtagtccta cttgatttat gcactaagga gaactgtata 240

ttttgcccct tcagatatac tttatggtct tcaaagggaa taatctcaat gtaatcaggg 300

ttcctcatta tgcaactgga cattatagaa gtcatgattc aagagacata tgccaagcgc 360

ttttcgcata tttgtgtatg atctatgatt ctaaattttt ttttagataa tatgtgattc 420

tacatttatt tctatgttta ttagaaatat aagatcggta ttaggtattc cgttattcat 480

gctatgcaat ttggctgcat atcagcatgg cattggaagt ttccgagttc atacttcata 540

cagctaaaaa tcagaggtac aagtaatcca caccttttggt cccttgaatt catttttctt 600

tgctggcatc tgagcttcat tttttattcc cctcattgat cctctgtgtg gaacaaagag 660

gcaagaggaa taaaaactct tttgaaggcg aaggggcatt gcagaaatac agctcatccc 720

ttctgctact tgtaggatct gagtcatgtg cagctcctat tgttgaggag atcagaaccg 780

gatcatcgga taattcagat tttgtcgggt tactgcaagg cagagtcctt ttgatttcac 840

atgctcagtg attttcaaga tatacaacta ccataatctg aatattattt ttctctcctg 900

caggtctctg gtaatgtttg cctggaacta ttacttggat aaccatcaga cagatgtcat 960

attgtctgac aattacatct agcaacagac tagcccagtc tttgctgtgt ccagatctat 1020

ccagcaaaca gtttaattta ctcccaaagt tatttcttct ttaaacttag ttcagaaaaa 1080

ggtatatgga tcactggaat gcctgtattt tcagtgggct atcttaccat gagacaatga 1140

tgaaaactgt gtgcatgtga agacaaagct cgagatctgc ggaggcagtg tccaatcctt 1200

tttgagctct gaagaatgat tagattcccc tccatgttcg tgcaagcctc tcctggtagc 1260

tccttgagtt tgtttattgg acgacttcat tgcagcaaca ttctctacaa tacaatctca 1320

taacatctga tcctgcatta attgctaaga taagcccatg tttgttcctg ttttgaacat 1380

aatgcagtat atacttgttt tttcattgtc ctttgatgca tctaaactgg ggatgatttt 1440

ctctccaatc attgaaacat gtccttgtga cacttgcctc ttgagctctg attggcttga 1500

cctcttaact gtgtctgatc ttggggcaag tcactatcct gtctaccaac ttgtaacagc 1560

tagcagttga aatttttttc taatcctcat aatgtgcaca ggggttgcta tcacccccag 1620

ttcatctcca gccgtgggca tctatttatt ttaagcatga tttaccattt cttaatcctg 1680

caagttgctg tgcttccatt caacctttg tcttttcatc aggtataaat gatcctgcca 1740

taacctgcat ctcttcttca ccgagcacaa gtgtatcaaa ctatcaaaca cagcacggtc 1800

ctcacaccac ctctaacatc tctcacatcc aaaacttgta tcagaaatgg agtccggagg 1860

ggtgatcgcg gaggcggggt ggagctcgct cgacatgtcg tcgcaggccg aggagtcgga 1920

gatgatggcg cagctgcttg gaacctgctt cccctccaat ggcgaggatg atcatcacca 1980

agagcttcct tggtcggttg acacccccag tgcctactac ctccattgca atggaggtag 2040

ctcaagtgca tacagctcta ccactagcag caacagtgct agtggtagct tcactctcat 2100

tgcaccaaga tctgagtatg aggggtacta tgtgagtgac tctaatgagg cggccctcgg 2160

gatcagcatc caggagcaag gtgcagctca gttcatggat gccattctca accggaacgg 2220

cgatccgggc ttcgatgatc tcgctgactc gagcgttaat ctgctggatt ccatcggcgc 2280

ttctaacaag agaaagattc aggagcaagg caggctagat gaccaaacga aagtgagtta 2340

acctgatgat tttttatcat ttttgcgata acagtgtatt aaggctgctg tttaaattgc 2400

tggtgtgcag aatttgcatg ctgattttga ttgaaatgga tataatgcag agtaggaaat 2460

ctgcgaagaa ggctggctcg aagcggggaa agaaggcggc gcaatgtgaa ggtgaagatg 2520

gcagcattgc tgtcaccaac aggcaaagct tgagctgctg cacctctgaa aatgattcga 2580

ttggttctca agaatctcct gttgctgcta agtcgaatgg caaggctcaa tctggccatc 2640

ggtcagcaac cgatccccag agcctctatg caagggtact agagatgatc ttctgaattc 2700

actgtctaaa aacgttacag attggcaatc tcgctaatgc tcttcgttta ttggatgcag 2760

2760

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> LOC_Os03g42100 promoter RT F

<400> 2

gtcgaatggc aaggctcaat 20

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> LOC_Os03g42100 promoter RT R

<400> 3

cttcacgtaa tgcattgcct c 21

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> LOC_Os03g42100 promoter Kpn1 F

<400> 4

ggtacccagg cttgcaattc atttgg 26

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> LOC_Os03g42100 promoter Xbal1 R

<400> 5

gtctagaccc tgcatccaat aaacgaaga 29