



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월15일
(11) 등록번호 10-0794395
(24) 등록일자 2008년01월07일

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0005870

(22) 출원일자 2007년01월19일

심사청구일자 2007년01월19일

(56) 선행기술조사문헌

Plant Cell. Vol.12(9):1541-1550. (2000.09.)

Science. Vol.296(5565):141-145. (2002.04.05.)

Genbank Accession ID AAN15544 (2002)

(73) 특허권자

명지대학교 산학협력단

경기 용인시 처인구 남동 산 38-2 명지대학교

(72) 발명자

최상봉

경기 성남시 분당구 수내동 77번지 푸른마을 쌍용아파트 605동403호

김호방

서울 관악구 봉천11동 180-294번지 401호

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

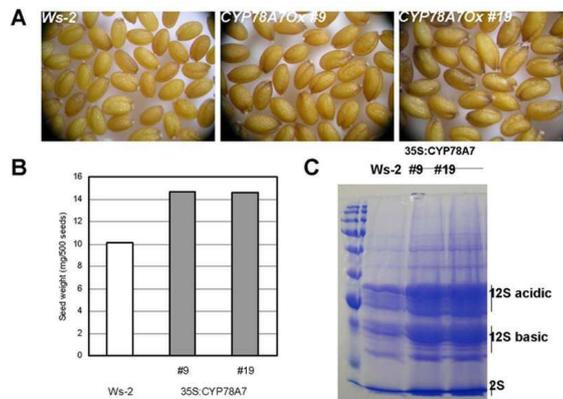
심사관 : 신원혜

(54) 식물의 종자 크기를 증가시키는 시토크롬 P 4 5 0 유전자

(57) 요약

본 발명은 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는데 이용되는, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 시토크롬 P450 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터, 상기 벡터를 이용하여 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량이 증가된 식물 및 상기 식물의 형질전환(transgenic) 종자에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는데 이용되는, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 애기장대(Arabidopsis thaliana) 유래의 시토크롬 P450 단백질을 코딩하는 유전자에 있어서, 서열번호 3의 시토크롬 P450 코딩 유전자의 프로모터 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 시토크롬 P450 코딩 유전자.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는데 이용되는, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 애기장대(Arabidopsis thaliana) 유래의 시토크롬 P450 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물 세포를 형질전환하여 상기 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식물은 벼, 유채, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제8항의 방법에 의해 제조된 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량이 증가된 식물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 식물은 벼, 유채, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물인 것을 특징으로 하는 식물.

청구항 12

제10항에 따른 식물의 형질전환(transgenic) 종자.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <8> 본 발명은 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는데 이용되는, 애기장대(Arabidopsis thaliana) 유래의 시토크롬 P450 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터, 상기 벡터를 이용하여 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는 방법, 상기 방법에 의해 제조된 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량이 증가된 식물 및 상기 식물의 형질전환(transgenic) 종자에 관한 것이다.
- <9> 시토크롬 P450은 화학적으로 다른 다양한 종류의 기질에 대하여 효소학적 반응들, 즉, 내인성 및 이종성(xenobiotic) 기질에 대한 산화, 과산화 및 환원 대사를 촉매한다. 식물 P450은 식물 생산물, 예컨대 페닐프로파노이드, 알카로이드, 테르페노이드, 지질, 시아노제닉 글리코시드(cyanogenic glycosides) 및 글루코시놀레이트의 합성을 포함하는, 생화학적 경로에 참여한다(Chappel, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 198,49 : 311-343).
- <10> 시토크롬 P450은 또한 P450 헤미-티올레이트 단백질로 알려져 있으며, P450-함유 모노옥시게나제 시스템이라 일컫는 다중 전자 전자 전이 연쇄(multicomponent electron transfer chains)에서 최종 산화효소로 작용한다. 특히 촉매 반응으로는, 탈메틸화, 수산화, 에폭시화(epoxidation), N-산화, 설포옥시테이션, N-, S- 및 O-탈알킬화, 탈황산화, 탈아민화 및 아조(azo), 니트로 및 N-옥사이드 기의 환원이 있다.
- <11> 니코티아나 식물의 P450 효소의 다양한 역할은 페닐프로파노이드, 알카로이드, 테르페노이드, 지질, 시아노제닉 글리코시드, 글루코시놀레이트 및 그의 다른 화학적 본체에 대한 호스트와 같은 식물 대사산물의 다양성과 관련되어 있다. 최근 몇 년 동안, 일부 P450 효소가 식물 내 식물 대사 산물들의 구성에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.
- <12> 상기와 같은 종래 기술을 바탕으로, 시토크롬 P450의 기능을 연구하던 중, 본 발명자들은 애기장대(Arabidopsis thaliana) 유래의 시토크롬 P450이 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <13> 본 발명의 목적은 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는 애기장대(Arabidopsis thaliana) 유래의 시토크롬 P450 단백질을 제공한다.
- <14> 또한, 본 발명의 목적은 상기 시토크롬 P450 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.
- <15> 또한, 본 발명의 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.
- <16> 또한, 본 발명의 목적은 상기 벡터를 이용하여 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.
- <17> 또한, 본 발명의 목적은 상기 방법에 의해 제조된 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량이 증가된 식물 및 상기 식물의 형질전환(transgenic) 종자를 제공한다.

발명의 구성 및 작용

- <18> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는데 이용되는, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 애기장대(Arabidopsis thaliana) 유래의 시토크롬 P450 단백질을 제공한다.
- <19> 본 발명은 애기장대(Arabidopsis thaliana) 유래의 시토크롬 P450 단백질의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 상기 단백질은 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는데 이용될 수 있다. 상기 종자 저장 단백질은 12S 산성 종자 저장 단백질, 12S 염기성 종자 저장 단백질, 2S 종자 저장 단백질 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- <20> 본 발명의 일 구현예에 따른 시토크롬 P450 단백질에서, 상기 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 변이체는 아미노산 서열은

변화되지만, 서열번호 1의 아미노산 서열과 유사한 기능적 및 면역학적 특성을 갖는 아미노산 서열이다. 구체적으로, 시토크롬 P450 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다.

- <21> 본 발명은 또한, 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는데 이용되는, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 시토크롬 P450 단백질을 코딩하는 유전자 (*AtCYP78A7*)를 제공한다. 바람직하게는 상기 유전자는 서열번호 2의 염기 서열을 가질 수 있다. 또한, 상기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 변이체는 염기 서열은 변화되지만, 서열번호 2의 염기 서열과 유사한 기능적 및 면역학적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, 시토크롬 P450 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 2의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다.
- <22> 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 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. 상기 %는 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열 모두에 존재하는 위치의 수를 확인하여 정합 위치의 수를 산출하고, 그 정합 위치의 수를 비교 영역 내의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 상동성 %를 산출함으로써 계산된다. 비교를 위한 서열의 최적 배열은 공지된 연산방식의 컴퓨터에 의한 임플러멘테이션에 의해(예를 들면, GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFAST in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, WI, or BlastN and BlastX available from the National Center for Biotechnology Information), 또는 검사에 의해 이루어질 수 있다.
- <23> "실질적인 동일성" 또는 "실질적인 유사성"이란 용어는 폴리펩티드가 엄격한 조건하에서 표적 폴리펩티드와 혼성화될 수 있는 서열을 포함하는 것을 의미한다. 엄격한 조건은 2×SSC의 용액 및 65℃의 온도를 의미한다.
- <24> "실질적으로 유사한" 폴리펩티드는 동일하지 않은 잔기 위치가 보존적 아미노산 변화에 의해 상이할 수 있는 것을 제외하고는 상기 서열을 공유한다. 보존적 아미노산 치환은 유사한 측쇄를 갖는 잔기의 상호교환성을 의미한다. 예를 들면, 지방족 측쇄를 갖는 아미노산 군은 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신이며, 지방족 히드록실 측쇄를 갖는 아미노산 군은 세린 및 트레오닌이며, 아미드 함유 측쇄를 갖는 아미노산 군은 아스파라긴 및 글루타민이며, 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 군은 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판이며, 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 군은 라이신, 아르기닌 및 히스티딘이며, 황 함유 측쇄를 갖는 아미노산 군은 시스테인 및 메티오닌이다.
- <25> 폴리뉴클레오티드 서열의 실질적인 동일성은 폴리뉴클레오티드가 70% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것을 의미한다. 또 다른 의미는 두 분자가 엄격한 조건하에서 서로에게 특이적으로 혼성화하는 경우 뉴클레오티드 서열이 실질적으로 동일하다는 것이다. 엄격한 조건은 서열 의존성이며 다른 상황에서는 상이할 것이다. 일반적으로, 엄격한 조건은 정해진 이온 강도 및 pH에서 특정 서열에 대한 열 용점(Tm) 보다 약 10 °C 더 낮도록 선택된다. Tm은 표적 서열의 50%가 완전히 정합된 프로브에 혼성화되는 온도(정해진 이온 강도 및 pH 하에서)이다. 프로브의 길이 및 염기 조성 양자의 함수인, 혼성체의 Tm은 문헌(Sambrook, T. et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (second edition), Volume 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring) 내의 정보를 이용하여 계산될 수 있다. 전형적으로, 서던 블롯 절차에 대한 엄격한 조건은 0.2XSSC로 65℃에서의 세척을 포함한다. 바람직한 올리고뉴클레오티드 프로브의 경우에, 세척 조건은 전형적으로 6XSSC에서 약 42℃이다.
- <26> 본 발명의 일 구현예에 따른 유전자에서, 시토크롬 P450 코딩 유전자는 서열번호 3의 시토크롬 P450 코딩 유전자의 프로모터 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 프로모터 서열에 GUS 유전자를 융합시켜 식물체 내에서 발현한 결과, 상기 유전자는 암발아/명발아 유식물의 자엽과 정단 분열조직, 꽃봉오리, 꽃, 측아 또는 발달 중인 배에서 강하게 발현되는 것을 알 수 있었다.
- <27> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.
- <28> 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태

에서는 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.

- <29> 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 목적인 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.
- <30> 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 계놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- <31> 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 진핵세포 배양에 대해 디히드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 내성을 포함한다. 가장 널리 이용되는 식물 형질전환 마커는 Tn5로부터 분리된 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 II(nptII) 유전자이며, 또 다른 마커 유전자는 항생제 하이그로마이신에 내성을 부여하는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자이다.
- <32> 본 발명의 일 구현예에 따른 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.
- <33> 터미네이터는 노팔린 신타아제(NOS) 또는 베타-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.
- <34> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 식물 발현 벡터로 식물 세포를 형질전환하여 시토크롬 P450 유전자를 과발현하는 단계를 포함하는 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시키는 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 식물은 벼, 유채, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- <35> "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protooplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- <36> "식물 세포"는 인 플란타 식물 세포를 포함하며, 배양 상태의 식물 세포 및 원형질체를 포함한다.
- <37> 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 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. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 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-코딩된)

입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 바이너리 벡터 기술을 이용하는 것이다.

<38> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 의해 제조된 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량이 증가된 식물을 제공한다. 본 발명의 방법에 의해 식물 세포를 형질전환시켜, 시토크롬 P450 유전자를 과발현시키면 상기 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량은 증가되는 것이다. 바람직하게는 상기 식물은 벼, 유채, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

<39> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 식물의 형질전환(transgenic) 종자를 제공한다. 바람직하게는 상기 식물은 벼, 유채, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

<40> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<41> **실시예**

<42> **재료 및 방법**

<43> **식물 재료 및 성장 조건**

<44> 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 생태형 Ws-2를 형질전환용 야생형으로서 이용하였다. 종자를 표면 살균하고, 2일 동안 4℃에서 차게한 후, 16시간-명(22-24℃)/8시간-암(18-20℃) 광주기하에 1% 수크로스(KOH를 이용하여 pH 5.8)로 보충된 1x Murashige and Skoog 염(Murashige T, Skoog F (1962) *Physiol Plant* **15**: 473-497)을 포함하는 0.8% 한천-고형화된 배지 상에서 발아 및 성장시켰다. 토양에서 자란 식물을 또한 동일한 광주기하에 키웠다.

<45> **아라비돕시스에서 AtCYP78A7의 구성적 발현**

<46> AtCYP78A7의 코딩 영역을 포함하는 게놈 단편을 주형으로서 아라비돕시스 게놈 DNA를 이용하여 프라이머 쌍으로 Pwo 중합효소(Roche, Mannheim, Germany)에 의해 증폭하였다. PCR 산물의 용이한 클로닝을 위해, *KpnI* 및 *XbaI*에 대한 제한효소 자리를 프라이머 내로 도입하였다: 78A7KpF, 5'-GGGGTACCCATCAACCCAAAATAATGGAGTTGATG-3'(서열번호 4); 78A7XbR, 5'-GCTCTAGACATTCTGCAATTCATACCTCTCGACAA-3'(서열번호 5). PCR 산물을 pUC19 벡터의 *SmaI* 자리 내로 클로닝하였다. PCR 산물의 완전한 뉴클레오티드 서열을 결정하여 PCR 에러를 검사하였다. PCR 산물의 *KpnI/XbaI* 단편을 CaMV 35S 프로모터 및 pART7의 ocs3' 사이에 서브클로닝하였다(Gleave AP (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 1203-1207). pART7 유래의 과발현 카세트를 포함하는 *NotI* 단편을 바이너리 벡터인 pART27 내로 서브클로닝하였다(Gleave AP (1992) *Plant Mol Biol* **20**: 1203-1207). pART27 내의 과발현 카세트를 전기천공에 의해 아그로박테리움 GV3101 내로 형질전환하고, 플로랄 딥(floral dip) 방법을 이용하여 생태형 Ws-2 식물 내로 도입하였다(Clough SJ, Bent AF (1998) *Plant J* **16**: 735-743). 형질전환 식물을 카나마이신(40 µg/mL)을 포함하는 MS 플레이트에서 선발하였다.

<47> **프로모터 구축물의 생성 및 GUS 염색 절차**

<48> AtCYP78A7의 프로모터 영역을 포함하는 게놈 단편(길이가 약 2.5 kb)을 *SalI/BamHI*으로 절단된 BAC 클론(MYH9)으로부터 수득하였다. 상기 프로모터 단편은 *GUS* 유전자와 번역 융합을 하기 위해 상기 유전자의 부분적인 ORF를 포함하였다. *SalI/BamHI* 단편을 pBI101 바이너리 벡터 내로 서브클로닝하였다. 상기 프로모터 구축물을 전기천공에 의해 *Agrobacterium* GV3101 내로 형질전환하고, 플로랄 딥(floral dip) 방법을 이용하여 생태형 Ws-2 식물 내로 도입하였다(Clough SJ, Bent AF (1998) *Plant J* **16**: 735-743). 형질전환 식물을 카나마이신(40 µg/mL)을 포함하는 MS 플레이트에서 선발하였다. 프로모터 구축물을 포함하는 동형접합 형질전환 라인을 T3 세대로부터 선발하였다. 식물 및 식물 조직을 Stomp의 방법에 따라 GUS 염색을 하였다(Stomp A-M (1992) In S.R. Gallagher ed, *GUS protocols: Using the GUS gene as a reporter of gene expression*, Academic Press, San Diego, CA, pp. 103-113). GUS 염색된 조직을 에탄올 시리즈를 통해 탈수하였다.

<49> 역전사-중합효소 연쇄반응

<50> 식물 조직으로부터 전체 RNA를 TRIzol 시약 (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 정제하였다. 전체 RNA (5 µg)를 MMLV-역전사효소(Invitrogen)를 이용하여 제1 가닥 cDNA 합성에 이용하였다. PCR 증폭 조건은 하기와 같다: 96°C, 5분 초기변성에 이은 94°C/15초, 55°C/30초, 및 72°C/1분의 27 사이클 후, 72°C에서 5분 동안 최종 연장. 튜블린-2를 코딩하는 전사체를 양성 대조군으로서 증폭하였다. RT-PCR에 대한 프라이머 서열은 하기 표 1에 요약하였다.

표 1

<51> RT-PCR에 이용된 프라이머 서열

Atg 코드	유전자 산물	PCR 프라이머 (5'→3')	
		정방향	역방향
At5g09970	AtCYP78A7	GGTACGACGGTTCGAGTGGGGTCAGGA (서열번호 6)	CATTACTCCATTTAGATTTTAGACCC ACAA(서열번호 7)
At3g02480	저온 유도된 단백질 kin1	ATAAAATTCAAAGTGTAAGCAAAAC (서열번호 8)	ATTAATTAGAAAAGAAGTCCAAGGT (서열번호 9)
At5g62490	ABA-반응성 단백질 (HVA22b)	ATCACGAAGACTAATAAAACAAAGT (서열번호 10)	AACAAATTAACACTTAGGAAAATTG (서열번호 11)
At2g42530	저온-반응성 단백질/저온 조절된 단백질 (cor15b)	AAACAAAAGACTACATTGTTGAGA (서열번호 12)	TACGTATTTAAAATGTGCTAGTGAG (서열번호 13)
At3g50970	dehydrin xero2 (XERO2)	AAAAGGTATAGCAGAAAAGATTA (서열번호 14)	CATCATATTATTACACCACACAAAT (서열번호 15)
At5g61380	ABI3-상호작용 단백질 1 (AIP1)	AAGAAGATTAGGTATGTGAATAGGA (서열번호 16)	AACATCTTCTGTTGTTTGATAAGAT (서열번호 17)
At5g25610	탈수 유도된 단백질 RD22	AAAAGTTAGTGGAGAGGAGAAGTAT (서열번호 18)	AGATCTATCTAGTAGCTGAACCACA (서열번호 19)
At5g52310	탈수 유도된 단백질 RD29A	ATTCTGTTGAAGAGGCTCCAAAATC (서열번호 20)	AATACATCAAAGACGTCAAACAAAAC A(서열번호 21)
At1g52400	AtBG1 (β-글루코시다제 1)	TTATATCCAAAGGCATCTCTTGAGT (서열번호 22)	AAACGATCCATAGAACACACAAACT (서열번호 23)
	튜블린-2	GAGCCTTACAACGCTACTCTGTCTGTC (서열번호 24)	ACACCAGACATAGTAGCAGAAATCAA G(서열번호 25)

<52> 단백질 추출 및 SDS-PAGE

<53> 500개의 성숙한 건조 종자를 막자 및 사발을 이용하여 400 ul의 추출 버퍼 [125 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1% SDS, 10% 글리세롤, 50 mM 소듐 설파이트]를 이용하여 균질화하였다. 원심분리 후에, 5 ul의 각각의 추출액을 SDS-PAGE에 이용하였다 (Laemmli UK (1970) Nature **227**: 680-685). 단백질 함량을 표준으로서 BSA를 이용하여 Bio-Rad 단백질 분석 키트를 이용하여 측정하였다.

<54> 탈수 처리

<55> 5주된 야생형 및 형질전환 아라비도시스 식물을 건조 스트레스 처리에 이용하였다. 토양에서 키운 식물을 물에 12시간 동안 침지시키고, 과량의 물을 제거한 후, 18일 동안 관개(irrigation)를 보류함으로써 탈수 스트레스를 가하였다. 상기 식물이 탈수 스트레스로부터 회복될 수 있는지를 검사하기 위해, 식물을 18일 동안 탈수 스트레스 후에 다시 물을 주었다.

<56> RNA 추출 및 마이크로어레이 혼성화

<57> 전체 RNA를 TRIzol 시약 (Invitrogen)을 이용하여 12일된 모종으로부터 분리하였다. 분리된 전체 RNA를 RNeasy 식물 미니 키트 (Qiagen, Germany)를 이용하여 추가로 정제하였다. cDNA를 Superscript II 역전사효소 (Invitrogen)를 이용하여 시료당 15µg의 전체 RNA로부터 제조하고, Cy3 및 Cy5로 표지된 마이크로어레이 프로브를 제조자의 지시(Genisphere, Montvale, NJ)에 따라 Genisphere 3DNA Array 900 DNA 표지 키트를 이용하여 cDNA로부터 제조하였다. 상기 cDNA 프로브는 Qiagen-Operon Arabidopsis Genome Array Ready Oligo Set

(AROS) Version 3.0 (<http://www.ag.arizona.edu/microarray/>)를 이용하여 아리조나 대학교에서 프린팅된 29,000-element 아라비도시스 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이에 혼성화하였다. 간단하게, 혼성화를 하기 2 단계 절차에 따라 수행하였다: 1) 슬라이드 상에 스팟팅된 올리고머에 대한 cDNA 혼성화, 2) 제1 가닥 합성 동안 cDNA에 혼입된 포획 서열을 통한 cDNA에 대한 3-DNA 형광 텐드리머의 혼성화. 모든 cDNA 및 형광 염료 혼성화를 제조자가 공급한 SDS-기재 혼성화 버퍼를 이용하여 35 ul의 부피에서 수행하였다. cDNA 혼성화를 60°C에서 18시간 동안 MAUI Hybridization System 및 MAUI Mixer A0 Hybridization Chamber Lids (BioMicro Systems, Salt Lake City)에서 수행하였다. 이어서 슬라이드를 절차에 따라 세정하고, 10분 동안 원심분리에 의해 풍건하였다. 0.5 mM DTT를 첫번째 두번의 세정 용액에 첨가하여 플루오로크롬이 산화되는 것을 방지한 것을 제외하고는, 3-DNA 혼성화를 전술한 바와 같이 4시간 동안 55°C에서 수행하였다. 1일 교환 슬라이드를 포함하는 4개의 사본 슬라이드를 각 실험에 대해 생성하여 염료 형광 편차를 제거하였다. 형질전환 아라비도시스 라인 #19 및 #38에 대해 각각 3개 및 2개 슬라이드를 이용하였다.

<58> **스캐닝 및 데이터 분석**

<59> 혼성화 후에, 상기 슬라이드를 GenePix 4000B (Axon Instruments, Union City, CA)를 이용하여 스캐닝하고, 스팟을 GenePix Pro 4.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA)을 이용하여 정량화하였다. 상기 스캐닝된 마이크로어레이 결과를 Acuity 분석 소프트웨어 3.0 (Axon Instruments, Union City, CA) 내로 도입하고, global LOWESS normalization (Yang YH, 등 (2002) Nucleic Acids Res **30**:e15)을 이용하여 표준화하였다. 데이터 파일을 이어서 하기 필터를 만족하는 각 실험에 대해 생성하였다[(Sum of Medians>=100) AND (Flags>=0) AND (F635%Sat<3) AND (F532%Sat<3) AND (RgnR2(635/532)>0.6) AND (SNR635>3) AND (SNR532>3)]. 상기 필터는 GenePix에 의해 불량한 것으로 플래깅되거나(flagged) 100 미만의 중간 합을 갖거나 (매우 약함) 백그라운드 의 것보다 적은 픽셀을 갖는 (진정한 스팟일 가능성이 낮음) 데이터 포인트를 제거한다. 이용한 슬라이드 중에서 75% 이상에 대해 상기 기준을 통과한 스팟을 분석하였다. 야생형 및 형질전환 라인의 비교를 위해, 각 데이터 세트에서 상기 기준에 부합하는 스팟에 대한 비율의 중간 평균을 계산하였다. 생성된 2개의 데이터세트를 이어서 Acuity 소프트웨어에서 K-means 클러스터링 알고리즘을 이용하여 클러스터링하였다. 마이크로어레이 상의 클론에 대한 주석 및 유전자 존재(ontology) 기능을 웹사이트 The Arabidopsis Information Resource (TAIR, <ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/home/tair/>)로부터 수집하고, Gene Ontology Consortium (www.geneontology.org)에 의해 제공된 카테고리에 따라 분류하였다.

<60> **실시예 1: RT-PCR 분석을 통한 조직별 발현 양상 분석**

<61> RT-PCR 분석을 통해 조직별 발현 양상을 살펴본 결과, *AtCYP78A7* 유전자는 거의 모든 식물 조직에서 발현되거나 꽃봉오리, 꽃, 열매 (silique) 및 유식물에서 강하게 발현되는 것을 확인하였다 (도 1).

<62> **실시예 2: 프로모터::GUS를 이용한 발현 분석**

<63> *GUS* 리포터 유전자를 이용한 조직별 발현 양상을 분석한 결과, *AtCYP78A7* 유전자는 암발아/명발아 유식물의 자엽과 정단 분열조직에서 강하게 발현되었고, 꽃봉오리, 꽃, 측아, 발달 중인 배 등에서도 강하게 발현되었다 (도 2).

<64> **실시예 3: *AtCYP78A7* 유전자를 과발현하는 애기장대 형질전환체**

<65> 1) 형질전환체 형태적 표현형

<66> 과발현 형질전환체(35S:CYP78A7)의 경우, 야생형(Ws-2)에 비해 2차 꽃대와 측지의 생장이 억제되는 강한 정단 우성 현상을 보였다 (도 3).

<67> 또한, 과발현 형질전환체(35S:AtCYP78A7)의 라인 #9, #19 및 #38)의 경우, 야생형(Ws-2)에 비해 식물체의 키가 야생형에 약 25% 증가하였다 (도 4).

<68> 또한, 과발현 형질전환체의 경우, 야생형(Ws-2)에 비해 종자의 크기가 증가하였으며 (도 5의 A), 종자 무게는 야생형(Ws-2)에 비해 약 50% 정도 증가하였으며 (도 5의 B), 12S 글로불린 및 2S 알부민과 같은 종자 저장 단백질의 함량은 야생형(Ws-2)에 비해 또한 증가하였다 (도 5의 C). 종자 무게는 동일한 수의 야생형(Ws-2) 및 형질전환 종자(#9 및 #19)를 이용하여 측정하였다. 총 저장 단백질은 동일한 수의 야생형(Ws-2) 및 형질전환 종자(#9 및 #19)로부터 추출하였다.

<69> 2) 형질전환체에 대한 마이크로어레이

<70> 애기장대 전체 게놈 올리고 칩을 이용하여 마이크로어레이를 수행하였다. 12일간 키운 유식물체에서 전체 RNA를 분리하여 5회의 독립된 마이크로어레이를 수행한 결과, 12S와 2S 종자 저장 단백질, 식물 호르몬인 ABA에 반응하거나 저온/건조 스트레스에 반응하는 유전자들의 발현이 형질전환체에서 증가하였다 (표 2).

표 2

<71> 종자 저장 단백질, ABA에 반응하거나 저온/건조 스트레스 관련 단백질을 코딩하는 유전자가 *AtCYP78A7*을 과발현하는 형질전환 아라비도시스에서 상향 조절되는 것을 보여주는 마이크로어레이 분석.

유전자 카테고리	유전자 코드	유전자 산물
저장 단백질 유전자	At4g28520	12S 종자 저장 단백질
	At4g27150	2S 종자 저장 단백질 2
	At5g44120	12S 종자 저장 단백질 (CRA1)
	At4g27140	2S 종자 저장 단백질 1
	At4g27160	2S 종자 저장 단백질 3
ABA에 반응하거나 저온/건조 스트레스 관련 유전자	At3g02480	저온 유도된 단백질 kin1
	At5g62490	ABA-반응성 단백질 (HVA22b)
	At2g42530	저온 조절된 유전자 cor15b
	At4g19120	탈수 스트레스에 대한 초기 반응성 단백질 (ERD3)
	At2g26980	CBL-상호작용 단백질 키나아제 3 (CIPK3)
	At3g50970	dehydrin xero2 (XERO2)/저온 유도 단백질 LTI30 (LTI30)
	At1g56280	건조 반응성 패밀리 단백질
	At1g52400	글리코실 히드롤라제 패밀리 1 단백질/베타-글루코시다제 (AtBG1)
	At5g61380	ABI3-상호작용 단백질 1 (AIP1)

<72> 이들 유전자들이 형질전환체에서 발현이 증가했는지의 여부를 파악하기 위하여, 야생형(Ws-2)과 형질전환체 (35S:*AtCYP78A7*의 라인 #9, #19 및 #38)로부터 RNA를 분리하여 RT-PCR을 수행한 결과, 형질전환체에서 모두 발현이 증가함을 확인하였다 (도 6).

<73> 3) 형질전환체의 수분 스트레스 저항성

<74> 마이크로어레이 결과를 바탕으로 형질전환체의 수분 스트레스 저항성 여부를 조사하였다. 야생형의 경우 수분 스트레스 처리 12 일째 시들기 시작한 후 18일째 완전히 죽는 것을 볼 수 있었다. 반면, 형질전환체 (35S:*AtCYP78A7*의 라인 #9, #19 및 #38)의 경우, 수분 스트레스 처리 18일 후에야 시들기 시작함을 볼 수 있었고, 다시 수분을 공급하면 수분 스트레스로부터 완전히 회복되는 것을 볼 수 있었으나, 야생형의 경우 복구되지 않았다 (도 7).

발명의 효과

<75> 본 발명에 따르면, 식물의 종자 크기 또는 종자 저장 단백질의 함량을 증가시킬 수 있다.

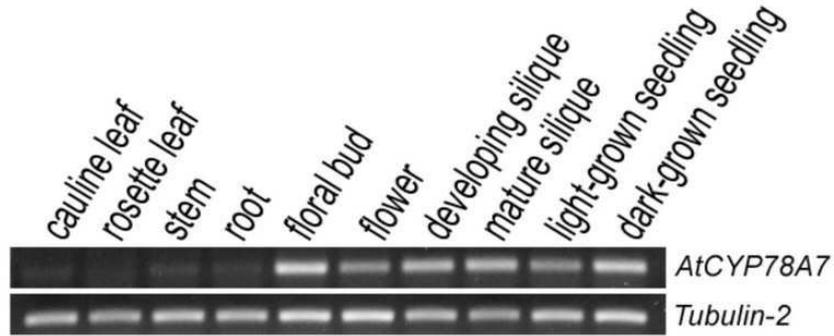
도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 애기장대의 상이한 조직에서 *AtCYP78A7* 발현의 RT-PCR 분석 결과를 보여준다.
- <2> 도 2는 *AtCYP78A7* 발현의 GUS 조직화학적 분석 결과를 보여준다.
- <3> 도 3은 발아 후 40일에 형질전환 아라비도시스 식물의 표현형을 보여준다.
- <4> 도 4는 발아 후 50일에 야생형 및 형질전환 식물 키의 비교를 보여준다.
- <5> 도 5는 아라비도시스에서 *AtCYP78A7* 과발현은 종자 크기(A), 종자 무게(B) 및 12S 글로불린 및 2S 알부민과 같은 종자 저장 단백질의 함량(C)을 증가시킨다는 것을 보여준다.
- <6> 도 6은 ABA에 반응하거나 저온/건조 스트레스 관련 유전자의 반정량적인 RT-PCR 결과를 보여준다.

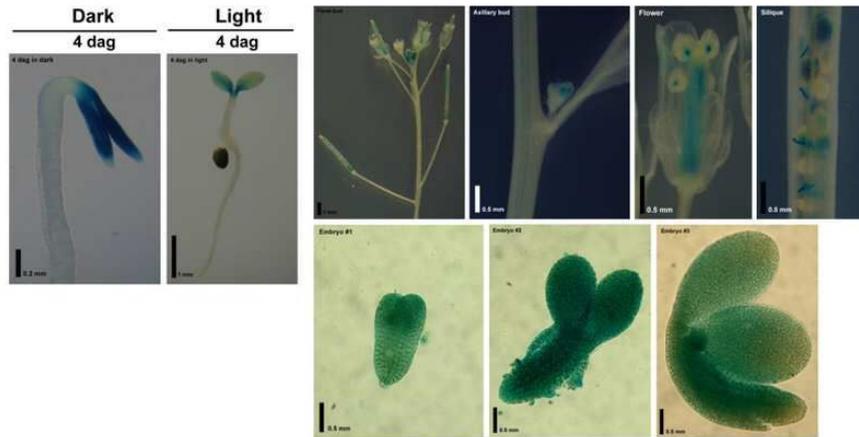
<7> 도 7은 야생형 및 형질전환 아라비도시스 사이의 건조 스트레스 반응의 비교를 보여준다. 숫자는 *AtCYP78A7*를 과발현하는 독립적인 형질전환 라인을 나타낸다. daws, 수분 스트레스 후 일수; darw, 재수분 후 일수.

도면

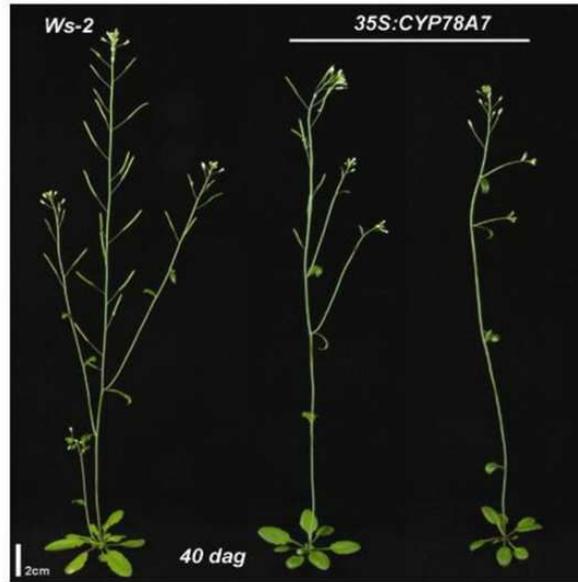
도면1



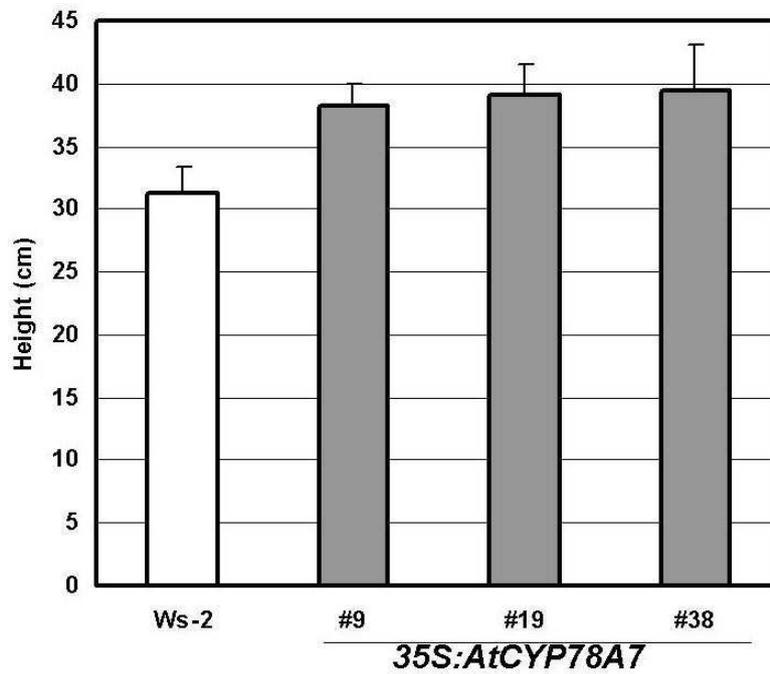
도면2



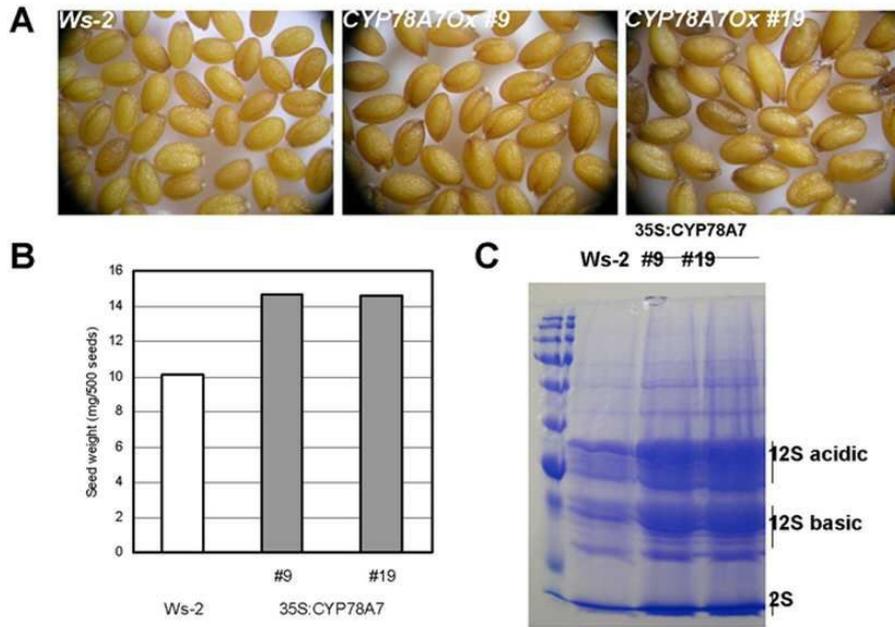
도면3



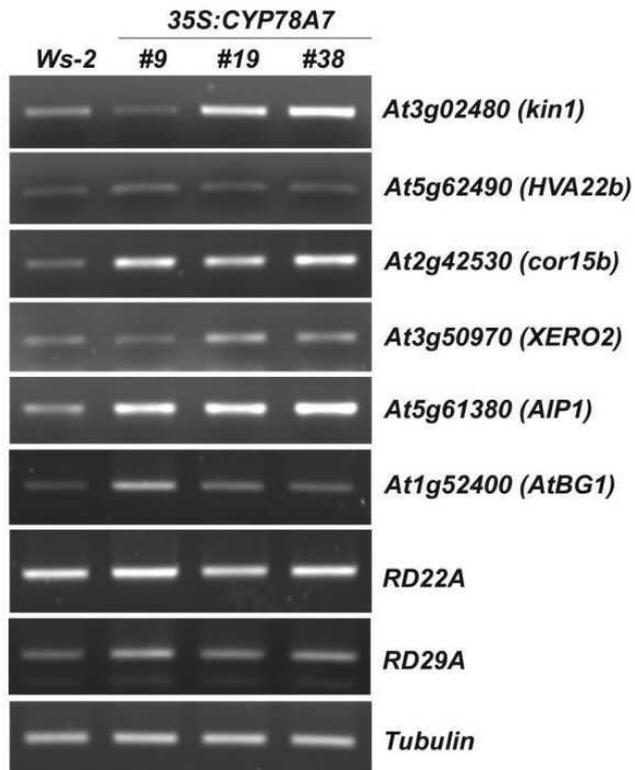
도면4



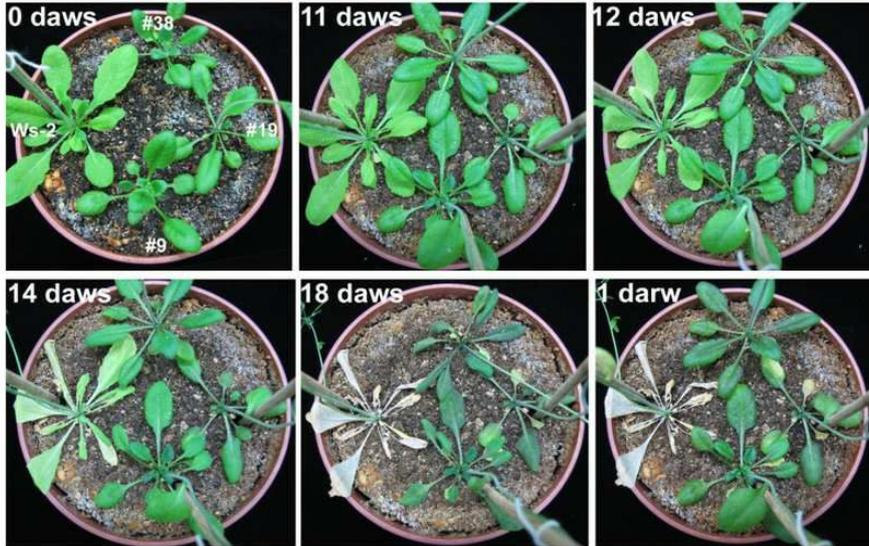
도면5



도면6



도면7



서열목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)