(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0001606
(43) 공개일자 2014년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0069626
(22) 출원일자 2012년06월28일
심사청구일자 2012년06월28일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박연일
대전광역시 유성구 은구비남로 55 열매마을7단지 705동 401호
신동호
대전광역시 서구 관저북로 80 원앙마을2단지아파트 205동 1203호
(74) 대리인
최규환

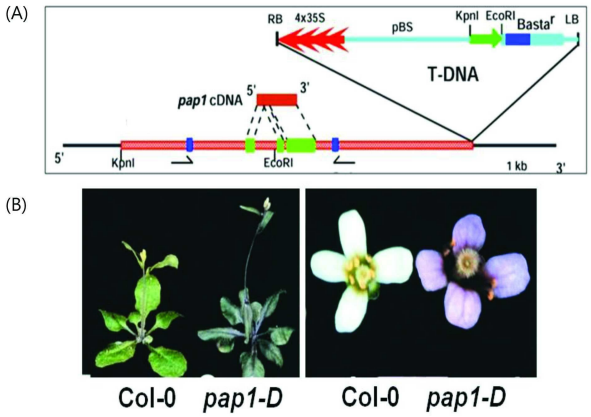
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **ＰＳＲ１ 유전자의 안토시안 생합성 조절자로서의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법, 상기 PSR1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 PSR1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008205
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21 사업
연구과제명	남세균 유전체 기반 작물형질 개량용 유용유전자원 발굴
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교
연구기간	2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 안토시안 생합성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현을 증진시켜 식물체의 안토시안 생합성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 발현의 조절은 PSR1 단백질 코딩 유전자의 식물로의 도입 및 발현에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 6

제5항의 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 8

제6항에 따른 식물체의 종자.

청구항 9

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 애기장대 막 단백질 유래의 PSR1 유전자의 안토시안 생합성 조절자로서의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법, 상기 PSR1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 PSR1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 안토시안은 식물의 꽃, 열매, 줄기 또는 잎 등의 색깔을 결정할 뿐 아니라 성장 및 발달에 있어서도 아주 중요한 기능을 한다. 안토시안은 꽃잎에서 곤충 등 꽃가루 매개자를 유혹하고, 열매 및 씨앗에서 종자의 분산을 돕는다. 또한, 안토시안을 포함한 플라보노이드 화합물은 곤충 및 외부 스트레스에 대한 식물의 손상을 보호하는 기능을 하고, 특히 활성산소 등에 의한 손상을 막기 위해 항산화제로서의 기능을 한다(Gould et al., 2004 J. Biomed. Biotechnol. 5, 314-320).

[0003] 식물에서 안토시안 생합성 경로는 잘 알려져 있다. 식물체 내 안토시안 축적은 플라보노이드 생합성 경로에 포함된 주요 효소들을 암호화하는 구조 유전자군의 조절과 이들 구조 유전자들의 발현을 조절하는 조절 유전자들에 의해 이루어진다. 금어초, 페튜니아 및 애기장대에서 CHS(chalcone synthase), CHI(chalcone isomerase), F3H(flavanone 3-hydroxylase) 등은 플라보노이드계 화합물의 초기 합성에 관여하는 EBGs(early biosynthetic genes)로서 다양한 플라보노이드 화합물 생합성 기작에 모두 공통으로 관련되어 있으며, 초기에 발현이 이루어진다. 한편 DFR(dihydroflavonol 4-reductase), LDOX(leucoanthocyanidin oxygenase), ANR(anthocyanidin reductase), UF3GT(UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase) 등은 LBGs(late biosynthetic genes)로서 EBG들의 발현이 이루어진 후 나중에 발현되며, 안토시안 생합성 경로의 후반부를 담당하고 있다.

[0004] 식물체에서 안토시안의 축적은 다양한 환경자극에 반응하여 조절되는 것으로 알려져 있다. 특히 빛, 온도, 당, 식물호르몬 및 무기염류 등은 식물체의 안토시안 생합성에 있어 아주 중요한 인자들이며, 이들의 상호작용에 의해 다양한 조직 및 세포에서 색소 축적이 조절된다. 따라서 안토시안 생합성에 있어 이들 인자의 상호작용을 밝히는 것은 식물체의 안토시안 색소 축적 및 식물 2차 대사 기작을 이해하는 데 있어 매우 중요하다. 이전의 연구에서 다양한 빛 조건 하에서 안토시안의 생합성 변화를 연구하여 빛이 아주 중요한 인자 중 하나임이 밝혀졌으며, 특히 인산의 결핍, 저온 스트레스 및 당의 증가는 빛에 의해 야기되는 안토시안 축적에 있어 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려졌다(Lea et al., 2007 Planta. 225, 1245-1253). 또한, 식물의 성장 및 발달에 있어 식물 호르몬 및 당은 매우 복잡한 네트워크를 형성하여 상호작용하고 있는 것으로 드러났다. 안토시안 생합성에 있어 수크로즈, 호르몬 에틸렌, 시토키닌, 지베렐린 및 앱시스산의 상관관계에서 당에 의한 안토시안 생합성이 에틸렌 및 지베렐린에 의해서 억제되는 것으로 알려져 있다.

[0005] 내적 및 외적 요인에 의한 안토시안 생합성은 구조 유전자에서 조절된다. 현재까지 당에 의한 안토시안 생합성 촉진은 R2R3 MYB 전사인자인 PAP1(production of anthocyanin pigment 1) 및 PAP2, WD-40 단백질인 TTG1, 그리고 bHLH(basic helix-loop-helix) 전사인자인 TT8, GL3 및 EGL3로 구성된 MBW(MYB-bHLH-WD40) 전사복합체에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다(Quattrocchio et al., 2006 Plant Cell 18, 1274-1291). 반면에 R3 MYB 전사인자인 MYBL2는 TT8과 상호작용하여 LBW(MYBL2-bHLH-TTG1) 복합체를 형성하여 안토시안 생합성에 있어 억제적 조절자(negative effector)로 작용한다. 다시 말해서 안토시안 생합성은 MBW 및 LBW 복합체 간의 경쟁적 관계에 의해서 조절된다. 상기 복합체 이외에 MYB11, 12, 111, 113 및 114는 복합체를 형성하지 않고 독립적으로 안토시안 생합성 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려졌다. 당에 의한 안토시안 생합성 증가는 PAP1 발현이 촉진되는 반면 MYBL2 발현이 억제됨으로서 유도된다. 반면 에틸렌 및 당에 의한 안토시안 생합성 억제는 PAP1 발현을 억제함으로써 일어난다. 시토키닌에 의한 당 유도 경로의 촉진은 PAP1 발현의 촉진을 통해서 나타나는 것으로 알려졌다. 이와 같이 전사수준에서 PAP1 전사인자의 발현 조절은 안토시안 생합성 경로에서 매우 중요함을 알 수 있다. 그럼에도 불구하고 당 및 호르몬의 신호에 의해서 PAP1의 전사를 조절하는 경로에 대해서는 밝혀진 바는 없다.

[0006] 본 발명의 PSR1(PAP1 SuppRessor 1)은 애기장대에 존재하는 총 16종의 막 단백질인 SPX(SYG1/Pho81/XPR1) 중의 하나로서, 세포 내 위치 및 생리 생화학적인 기능이 알려져 있지 않았으나, 본 발명에서 애기장대 SPX 단백질 일종인 PSR1이 안토시안 생합성 경로 조절 전사인자 일종인 PAP1의 전사체 수준을 조절함을 확인하였다.

[0007] 한국등록특허 제0809736호에는 '안토시아닌 생합성 억제 활성을 가진 MYB60 유전자와 상기 유전자가 도입된 형질전환 상추 및 그 제조방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2009-0111404호에는 '안토시아닌 생합성 촉진 기능을 가지는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 PSR1 유전자의 안토시안 생합성 조절자로서의 용도에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 PAP1 유전자가 과발현된 *pap1-D* 돌연변이체를 모본으로 하여 T-DNA로 형질전환하여 무작위로 T-DNA가 삽입된 이중 돌연변이체 집단을 구축하여 안토시안색소 축적이 억제되거나 또는 더욱 많이 증가하는 돌연변이체를 선발한 후, T-DNA가 삽입된 위치를 동정하여 PAP1(production of anthocyanin pigment 1)의 전사 또는 전사체 조절에 관여하는 유전자를 발굴한 결과, 막단백질의 일종인 PSR1(PAP1 suppressor 1)이 PAP1 발현 수준을 조절하여 안토시안 함량이 조절되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 PSR1 유전자를 이용한 애기장대 안토시안 생합성 조절 방법을 통하여 식물체의 안토시안 축적 및 함량을 조절할 수 있어 산업적으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 pap1 유전자 3' 말단 UTR 부근에 T-DNA가 삽입된 부위(A) 및 *pap1-D* 돌연변이체의 표현형 분석(B)을 나타낸다. Basta는 바스타 저항성(barstar resistance)을 나타내고, Kan은 카나마이신 저항성(Kanamycin resistance), LB는 왼쪽 보더(left border), RB는 오른쪽 보더(right border), 4X 35S는 35S의 4 카피를 나타낸다. Col-0는 애기장대 야생형인 Columbia-0를 나타내고, *pap1-D*는 PAP1 유전자가 과발현된 돌연변이체를 나타낸다.

도 2는 약한 빛 세기(60 $\mu molm^{-2}s^{-1}$)에서 생장한 야생형, *pap1-D* 및 R194 2차 돌연변이체 계통에서 안토시안 함량을 나타낸다. Col-0는 애기장대 야생형인 Columbia-0, *pap1-D*는 PAP1 유전자가 과발현된 돌연변이체, r194는 *pap1-D* 식물체에 T-DNA 삽입을 통해 안토시안 함량이 야생형 수준으로 감소되어 선별된 식물체를 의미한다.

도 3은 중간 빛 세기(140 $\mu molm^{-2}s^{-1}$)에서 생장한 야생형, *pap1-D* 및 R194 2차 돌연변이체 계통에서 안토시안 함량을 나타낸다.

도 4는 중간 빛 세기(140 $\mu molm^{-2}s^{-1}$)에서 설탕 농도에 따른 야생형, *pap1-D* 및 R194 2차 돌연변이체 계통에서 안토시안 함량을 나타낸다.

도 5는 R194의 T-DNA 삽입 위치 및 TAIR T-DNA 돌연변이체 집단 중 R194에 T-DNA 태깅(tagging)된 계통(R194-1 : Salk_001261, R194-2 : Salk_009309)을 나타낸다.

도 6은 야생형, *pap1-D* 및 R194 돌연변이에서 PSR1 전사체 함량을 나타낸다.

도 7은 R194 2차 돌연변이체 계통에서 T-DNA가 pap1 유전자의 3' 말단 UTR 부근에 삽입됨을 나타낸다.

도 8은 야생형, *pap1-D* 및 r194 식물체에서 구조 및 조절 유전자 전사체 함량을 나타낸다.

도 9는 야생형 Col-0, *R194-1* 및 *R194-2* 돌연변이체에서 R194 전사체 함량을 나타낸다.

도 10은 야생형 Col-0, *R194-1* 및 *R194-2* 돌연변이체에서 안토시안 함량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명에서는 PAP1 유전자가 과발현된 *pap1-D* 돌연변이체를 모본으로 하여 T-DNA로 형질전환하여 무작위로 T-DNA가 삽입된 이중 돌연변이체 집단을 구축하여 안토시안 색소 축적이 억제되거나 또는 더욱 많이 증가하는 돌연변이체를 선발한 후, T-DNA가 삽입된 위치를 동정하여 PAP1(production of anthocyanin pigment 1)의 전사 또는 전사체 조절에 관여하는 유전자를 발굴한 결과, 애기장대 막 단백질의 일종인 At4G11810이 T-DNA의 삽입에 의해 돌연변이가 유도될 경우 안토시안 생합성을 조절하는 전사인자인 PAP1의 전사체 수준을 조절함으로서 결국에는 안토시안 생합성을 조절하는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에서는 At4G11810을 PAP1 SuppRessor1인 PSR1으로 명명하였다.

[0018] 본 발명의 PSR1 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법에서, 상기 PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 안토시안 생합성을 감소시키거나, PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현을 증진시켜 식물체의 안토시안 생합성을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법에서, 상기 PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현의 조절은 PSR1 단백질 코딩 유전자의 식물로의 도입 및 발현에 의해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 PSR1 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0022] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0023] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0024] 재조합 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 게놈 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 적

당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0025] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 재조합 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.

[0027] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투머파시엔스(Agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0028] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0029] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefiaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0030] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0031] 본 발명의 일 구현 예에 따른 형질전환 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수 수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.

[0033] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 PSR1(*PAP1 SuppRessor 1*) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 안토시안 생합성을 조절할 수 있는 것이다.

[0034] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0035] **재료 및 방법**

[0036] **식물 재료 및 생장 조건**

[0037] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 야생형인 Col-0(Columbia-0), Ws(Wassilewskija), 돌연변이체 또는 과량발현 형질전환 식물(도 1)을 사용하였다. 애기장대를 4.44g/L MS(Murashige 및 Skoog) 염과 0.7% 한천 분말, 60mM

설탕 또는 5.5mM 포도당을 함유한 pH 5.7의 배지에서 생장시켰다. 모든 종자는 4℃의 암소에서 5일 동안 저온 처리를 거친 뒤, 18시간의 광 조건 및 6시간의 암 조건이 반복되는 광주기를 거친 후에 22℃의 배양실로 옮겨 12일간 생장시켰다. 필요에 따라 0, 70, 140 및 240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$ 광도의 빛을 조사시켰다. 필요 시 애기장대를 4.44g/L MS 염과 0.7% 한천 분말을 포함한 배지에 엿당, 포도당, 과당, 만니톨 및 팔라티노스를 각각 60mM씩 첨가하거나, 포도당 및 과당을 각각 30mM씩 혼합하여 첨가한 후 pH 5.7로 조절하여 생장시켰다. 또한 에틸렌 생합성을 억제하거나 수용체 기능을 억제하기 위해서 60mM 설탕이 첨가된 MS 배지에 10μM ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)와 100μM $AgNO_3$를 각각 첨가하였다.

[0038] **형질전환 및 RSE-PCR(Restriction Site Extension-PCR)**

[0039] *pap1-D* 형질전환 돌연변이체로부터 T-DNA가 삽입된 부분을 동정하기 위해 RSE-PCR(restriction site extension-polymerase chain reaction)을 실시하였다. RSE-PCR이란 DNA에 삽입된 알려지지 않은 게놈 DNA 단편의 효과적인 분리를 위해 구축한 방법으로, 1차 RSE-PCR의 첫 번째 사이클에서 제한효소로 절단된 DNA 단편이 확장되고, 그 후의 2차 네스티드(nested)-PCR 과정 동안 타겟 단편이 특이적으로 증폭된다. RSE-PCR은 큰 게놈 식물체에서 알려지지 않은 부위에 알려지지 않은 DNA로부터 태깅된 서열(T-DNA 또는 트랜스포존)을 밝힐 수 있는 고 효율의 방법이다. 식물체 100mg을 액체질소를 이용하여 막자사발에서 분쇄한 후, DNA 추출 용액(50mM Tris-HCl pH 7.4, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS)을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 페놀/클로로포름 용액 추출 및 에탄올 침전을 통하여 게놈 DNA를 정제한 후, 약 500ng의 게놈 DNA를 제한효소로 절단하였다. T-DNA 특이적인 보더(border) 프라이머 및 임의적인 arbitary 프라이머(표 1)를 이용하여 1차 RSE-PCR을 실시하여 T-DNA 단편을 증폭하였다. 상기 증폭된 T-DNA 단편을 주형으로 이용하여 2차 네스티드-PCR을 실시한 후, 아가로스 겔에 전기영동하여 증폭된 단편을 분리하였다. 상기 분리된 단편을 겔 정제 키트를 이용하여 정제한 후, 시퀀싱하여 T-DNA 삽입부위를 확인하였다.

표 1

[0040] RSE-PCR 분석에서 사용한 프라이머 목록

프라이머	서열 (5' → 3')
L1	TCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTTCCCAGATAAGGG (서열번호 3)
L2	TGTGAGTAGTTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCCTA (서열번호 4)
L3	TGTTTACACCACAATATATCCTGC (서열번호 5)
L4	GGTTTCGCTCATGTGTTG (서열번호 6)
ADkpn	GTAATACGACTCACTATAGGGCGTACC (서열번호 7)
ADPst	GTAATACGACTCACTATAGGGCTGCAG (서열번호 8)
ADSac	GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCTC (서열번호 9)
AP	GTAATACGACTCACTATAGGGC (서열번호 10)

[0041] **RNA 추출, RT-PCR 및 실시간 정량 PCR 분석**

[0042] 0.1g의 식물체를 액체 질소로 얼려 막자 사발에서 분쇄한 후, RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 추출하였다. cDNA를 합성하기 위하여 추출한 총 RNA 1μg을 15개의 티민(thymine)이 연결된 올리고 dT 프라이머 및 dNTP와 함께 65℃ 항온수조에서 5분간 반응시켜 단일가닥을 생성한 뒤, 역전사효소인 SuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하여 42℃ 항온수조에서 1시간 동안 역전사 시켰다. 총 20㎕의 반응액을 끓는 물에 5분간 반응시켜 역전사효소의 활성을 제거한 후, 핵산분해 효소가 없는 물(nuclease-free water) 80㎕를 첨가하여 1/5로 희석하였다. mRNA 발현 정도를 비교하기 위한 RT-PCR은, 합성된 cDNA 2㎕를 주형으로 하고, 각 유전자와 상보적인 10pmole의 프라이머 1㎕를 Taq-중합효소 혼합물(Taq-polymerase Mixture, Bioneer, Korea)에 첨가하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하였다. PCR은 DNA Engene(BioRAD, USA)을 이용하여 각 PCR 산물이 포화되지 않는 조건으로 반복횟수를 결정하였다. 합성된 PCR 산물을 10 $\mu gm\ell^{-1}$ EtBr(ethidium bromide)이 포함된 1% 아가로스 겔에서 전기영동 하였고, GELDOC2000 농도계(densitometer) 및 영상 분석 시스템(BioRad, USA)으로 확인하였다. 실시간 정량 PCR(Quantitative Real-Time PCR)을 수행하기 위해, RT-PCR 방법과 같이 주형 cDNA 및 프라이머를 섞어준 후, 10㎕의 iQ™SYBR Green

Supermix(BioRad, USA)를 섞어 Exicycler 96(Bioneer, Korea)을 이용하여 순환 역치(cycle threshold, C_T)를 얻었다. 각 유전자의 C_T를 유비퀴틴의 C_T로 나눈 후, 그 역수를 취하여 mRNA 발현 정도를 비교하였다.

표 2

[0043] RT-PCR 분석에서 사용한 프라이머 목록

Gene	서열 (5' → 3')		Use
	Forward (F)	Reverse (R)	
R194-1	1F;TGCTGATTGTGAGGACTGATG (서열번호 11)	1R;TTGGCATCTTCCAGTGTTTTC (서열번호 12)	Mutants screening
R194-2	2F;GGTTTGTGGTGTTGTTATCGG (서열번호 13)	2R;GACGCTAACAGAATTTGCCTG (서열번호 14)	
R194	4F;GGTGATGGAAGCGAGGA (서열번호 15)	4R;CAATCGTGCCAGCTTCC (서열번호 16)	RT-PCR
PAP1	F;AGACATTACGCCCATTCCTACAAC (서열번호 17)	R;GTCGCTTCAGGAACCAAAATATCT (서열번호 18)	
ACT2	F;ATTCAGATGCCCAGAAGTCTTGT (서열번호 19)	R;GAAACATTTTCTGTGAACGATTCCT (서열번호 20)	
18S rRNA	F;CCTGCGGCTTAATTTGACTC (서열번호 21)	R;CCGGATCATTCAATCGGTA (서열번호 22)	
ACTIN2	F;GCTGAGAGATTCAGATGCCCA (서열번호 23)	R;GTGGATTCCAGCAGCTTCCAT (서열번호 24)	Q-PCR
CHS	F;GGCAAAGAAGCGGCAGTGAAG (서열번호 25)	R;CGGAAGGACGGAGACCAAGAAG (서열번호 26)	
DFR	F;CTTTGTTCGTGCCACCGTTCG (서열번호 27)	R;TCCTTCCTCAGATAAATCAGCCTTCC (서열번호 28)	
LDOX	F;GTTTGCAGCTTTTCTACGAGG (서열번호 29)	R;TGAGCAAAAGTCCGTGGAGG (서열번호 30)	
UF3GT	F;TGTCAGATCGTTTTGGTTCC (서열번호 31)	R;GATTCTTCCTCACTTTCTCAC (서열번호 32)	
PAP1	F;CAAGAGGTAGATATTTTGGTTCC (서열번호 33)	R;CTATACACAAACGCAAACAAATG (서열번호 34)	
PAP2	F;ATGGAGAAGGCAAATGGCATCAAG (서열번호 35)	R;CCAGCAATCAAGGACCACCTATTTC (서열번호 36)	
TTG1	F;CTCCGCTCATCCTCCGGTCACAG (서열번호 37)	R;CAACGGCGCACAAAACTCGCTCG (서열번호 38)	
TT8	F;GGCGGTTCAATCTGTGGAC (서열번호 39)	R;CTGTTGGCTCCTCTCTAACG (서열번호 40)	
EGL3	F;GGATTCAACGGTTAGGTCAG (서열번호 41)	R;ATCATCTTCTGCGATTTCTCTC (서열번호 42)	
GL3	F;GAGCAACAGAGAAATGTGAAGAC (서열번호 43)	R;GTTCCTGATGATGATGACGA (서열번호 44)	
MYBL2	F;GCCCATTCCAAGTACCAA (서열번호 45)	R;AGCGTTTCTTGACCTGTTGA (서열번호 46)	

[0044] **안토시안 추출 및 정량**

[0045] 각 조건에서 12일간 생장한 식물을 처리구 당 20개의 유식물을 취하여 600㎕의 추출 용액(1% HCl이 포함된 메탄올)에 담궈 4℃ 암소에서 6시간 동안 보관하였다. 이후 증류수 200㎕ 및 클로로포름 200㎕를 순서대로 첨가하고 12,000rpm으로 5분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 UV-VIS 분광기(Shimadzu, Japan)를 이용하여 530nm 및 657 nm에서 흡광도를 측정하였다. A_{530}-0.33A_{657}의 수식에 대입하여 얻어진 안토시안의 양을 추출에 이용된 식물 개체의 수로 나누어 주었다.

[0046] **실시예 1. PAP1 과발현체의 2차 돌연변이 유도를 통한 안토시안 색소 생합성에 관련된 새로운 돌연변이주의 선발**

[0047] PAP1(production of anthocyanin pigment 1) 유전자가 과발현된 *pap1-D* 돌연변이체를 모본으로 하여 T-DNA로 형질전환한 후, 무작위 T-DNA 삽입 이중 돌연변이체 집단을 구축하였다. 형질전환을 통해서 총 832계통의 T2 돌연변이주를 선발할 수 있었으며, 이들 중 444 계통은 T-DNA가 1 카피 삽입된 돌연변이주로 항생물질 선발에서 나타났으며, 134 계통은 2 카피, 82 계통은 3 카피 이상 T-DNA가 삽입된 것으로 나타났다. 덧붙여, 172 계통은 멘델의 분리비를 따르지 않는 것으로 나타났다. 또한, 1 카피 T-DNA가 삽입된 444 계통 중 219 계통은 *pap-1D* 타입의 표현형을 보여 안토시안 색소의 과축적을 보여 주었으며, 165 계통은 *pap-1D* 표현형이 억제되어 야생형과 비슷하게 색소축적이 거의 유도되지 않았다. 반면에 60종은 야생형과 *pap-1D* 돌연변이의 중간 정도의 안토시안 색소가 축적되었다.

[0048] 상기 T-DNA가 삽입된 돌연변이주 중에서 1 카피 T-DNA가 삽입된 444 계통의 표현형을 관찰하여 안토시안 색소 축적이 억제되거나 또는 더욱 더 많이 증가하는 돌연변이체를 선발하였다. 그 후 T-DNA가 삽입된 위치를 동정하여 PAP1의 전사 또는 전사체의 안정성 조절에 관여하는 유전자를 발굴하였다. 도 1A에 나타낸 바와 같이, 모본으로 사용한 *pap1-D* 돌연변이주는 PAP1 유전자의 3'UTR 부근에 CaMV의 35S 증폭자(enhancer)가 삽입되어 PAP1 유전자의 발현이 촉진되어 식물체 전반에 걸쳐 과도한 안토시안 색소의 축적이 이루어지는 변이체이다. 또한, 대조군으로 사용한 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 야생형인 Columbia-0(Col-0) 및 *pap1-D* 돌연변이체의 표현형을 도 1B에 나타내었다.

[0049] **실시예 2. 빛 세기에 따른 안토시안 함량**

[0050] R194 돌연변이는 *pap-1D* 표현형이 야생형 수준으로 억제된 165 계통 중의 하나이다. 안토시안 함량은 빛의 세기 및 파장에 의존한다. 애기장대의 경우 암소에서는 안토시안 축적이 일어나지 않으며 빛 세기가 증가함에 따라서 함량 축적이 증가하는데, 240 $\mu molm^{-2}s^{-1}$까지 증가한다(Jeong et al., 2010 Plant Physiol. 154(3), 1514-1531). 따라서 PSR1이 빛의 세기와 무관하게 PAP1을 억제하는지 조사하고자 낮은 빛 세기와 중간 빛 세기 조건에서 안토시안 함량 변화를 측정하였다. 도 2 및 도 3에 나타낸 바와 같이 약한 빛 세기와 중간 빛 세기 조건의 토양에서 생장된 R194 계통은 야생형과 비슷한 안토시안 함량을 보임으로써 *pap1-D*의 표현형을 거의 100% 억제(suppression)함을 알 수 있었다.

[0051] **실시예 3. 설탕(sucrose) 농도에 따른 안토시안 함량**

[0052] 당(sugar)은 애기장대를 포함함 식물의 안토시안 생합성을 촉진한다. 애기장대의 경우 포도당이나 과당에 비해 설탕(sucrose) 또는 엿당(maltose)이 안토시안 생합성을 촉진한다. 반면에 다른 이당류인 팔라티노스(palatinose) 및 삼투조절자 만니톨(mannitol)은 안토시안 생합성에 영향을 미치지 못한다. 애기장대의 안토시안 생합성을 촉진하는 설탕 농도에 따른 안토시안 함량을 조사하였다. 도 4에서 나타낸 바와 같이 설탕 농도 증가에 따라서 안토시안 함량이 현저하게 증가하였다. 예를 들어 90mM의 설탕 농도에서는 야생형 및 *pap1-D*가 대조구에 비해 각각 6배 및 10배 증가하였다. 그러나 r194 돌연변이체에서는 *pap1-D* 표현형을 현저하게 억제하였으며, 심지어 야생형과 비교해 적은 축적을 보였다.

[0053] **실시예 4. R194 계통의 유전형 특성 분석**

[0054] R194 계통에서 T-DNA가 삽입된 부분을 T-DNA를 포함하는 DNA 절편을 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 이용하여 RSE-PCR(restriction site extension-PCR) 기법으로 조사하였다.

[0055] T-DNA가 삽입된 위치를 확인한 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 T-DNA가 At4G11810(PSR1) 유전자의 첫 번째 엑손 부위, 단백질 개시코돈에서 20bp 떨어진 위치에 삽입되어 있었다. T-DNA 삽입에 의해서 At4G11810 전사체 수준이 감소하였음을 확인할 수 있었다. 3' 말단 특이 프라이머 세트(4F 및 4R)를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 도 6에서와 같이 야생형 및 *pap1-D* 과발현체에 비해서 r194 돌연변이체에서 mRNA 양이 현저하게 감소하였다. 이는 T-DNA 삽입에 의해 PAP1 mRNA의 전사체 수준이 현저하게 감소함을 의미한다.

[0056] 또한, *pap1-D*에서와 같이 r194 돌연변이체에서 항생제 *PAP1* 유전자에 삽입된 바스타(barstar)를 검출할 수 있는

프라이머 세트를 이용하여 DNA를 증폭한 결과 r194 돌연변이체에서도 바스타가 증폭된 PCR 밴드를 얻을 수 있었다(도 7). 상기 결과는 R194 돌연변이 계통의 PAP1이 3' UTR 부근에 T-DNA가 삽입되어 유지되고 있음을 나타낸다.

[0057] **실시예 5. 안토시안 생합성 유전자 전사체 함량**

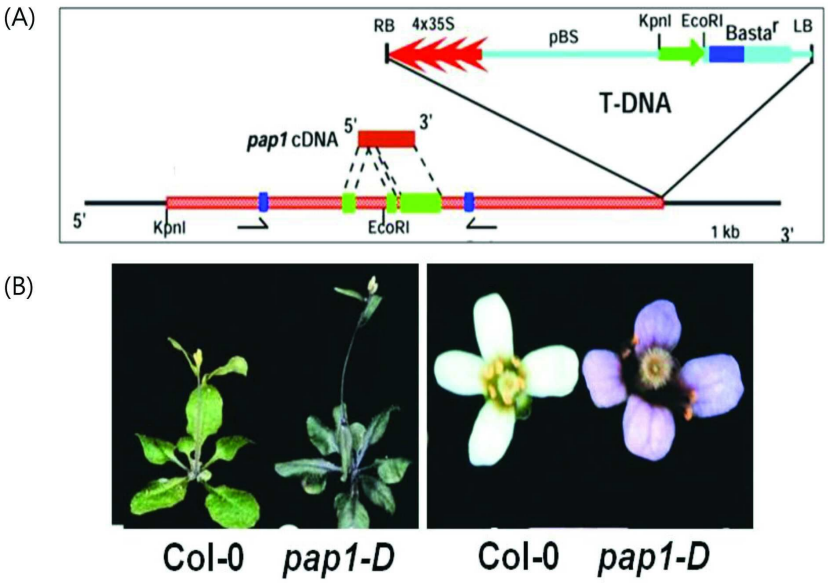
[0058] PAP1은 안토시안 생합성 경로의 뒷 단계에 관여하는 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다. 알려진 바와 같이 *pap1-D* 과발현 돌연변이체에서 안토시안 생합성 경로의 앞 단계에 관여하는 CHS(chalcone synthase)의 전사체 함량은 야생형과 큰 차이가 없었으나, 안토시안 생합성 경로의 뒷 단계에 관여하는 유전자인 DFR(dihydroflavonol 4-reductase), LDOX(leucoanthocyanidin oxygenase) 및 UF3GT(UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase)의 전사체 함량은 야생형에 비해 10 ~ 90 배 이상 높았다(도 8). 반면에 r194 돌연변이체에서는 PAP1 전사체가 *pap1-D*에 비해 수백 배 감소하였을 뿐만 아니라 야생형에 비해 30% 낮게 유지되었다. 상기 결과는 R194가 PAP1 전사체 수준을 조절함을 나타낸다.

[0059] **실시예 6. PSR1 돌연변이체에서 안토시안 및 PAP1 전사체 함량**

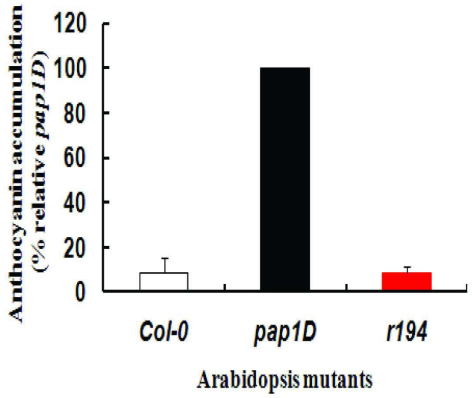
[0060] 애기장대에서 총 16종 단백질이 SPX(SYG1/Pho81/XPR1)를 가지고 있는 막 단백질이다. 이중 PSR1(At4G11810)은 SPX 도메인을 가지고 있는 주요 촉진자 수퍼패밀리(major facilitator superfamily) 유전자 11 종(At4g11810, At4g22990.1, At4g22990.2, At1g63010.1, At1g63010.2, At1g63010.3, At1g63010.4, At1g63010.5, At4G40340, At4g30340, At2g38646) 중 하나로서, 세포 내 위치 및 생리 생화학적인 기능이 알려져 있지 않다. 상기 R194 돌연변이 라인은 T-DNA가 본 발명에서 PSR1로 정의된 At4G11810 유전자의 첫 번째 엑손 부위, 단백질 개시코돈에서 20bp 떨어진 위치에 삽입된 결과로 나타났다(도 5). 상기 결과는 PSR1이 발현되지 않을 경우 *pap1-D* 표현형이 사라짐을 의미한다. 이는 PSR1이 PAP1 발현을 조절하며 그 결과 안토시안 생합성 경로를 조절함을 의미한다. 따라서 PSR1이 PAP1 전사체 조절에 관여할 가능성을 조사하고자 T-DNA 삽입 돌연변이 집단(http://www.arabidopsis.org) 중에서 R194의 프로모터 부위에 T-DNA가 삽입된 라인인 *R194-1* 및 6번 엑손에 T-DNA가 삽입된 라인인 *R194-2*(도 5)를 확보한 후 순계라인을 구축하였다. 구축된 순계라인의 R194 유전자 발현은 *R194-1*에서는 야생형과 동일하였으나 *R194-2*에서는 R194의 발현 수준이 매우 낮았다(도 9). 또한 안토시안 함량도 *R194-2*에서만 야생형에 비해서 30% 수준을 유지하였다(도 10).

도면

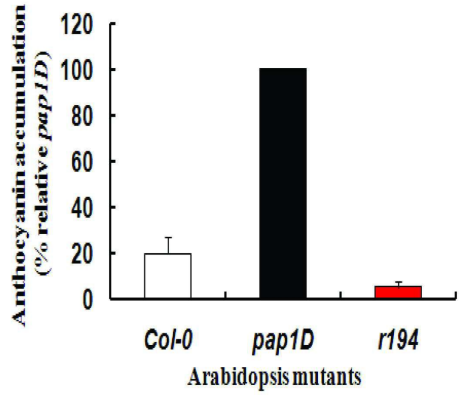
도면1



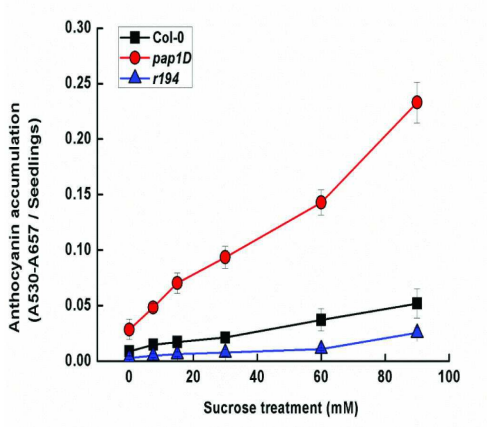
도면2



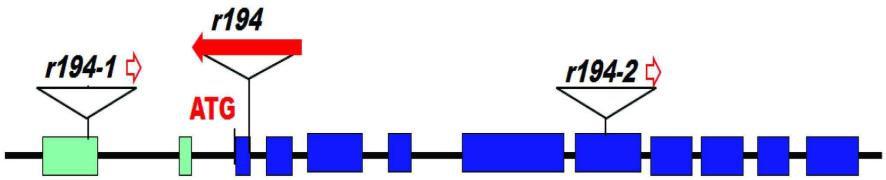
도면3



도면4



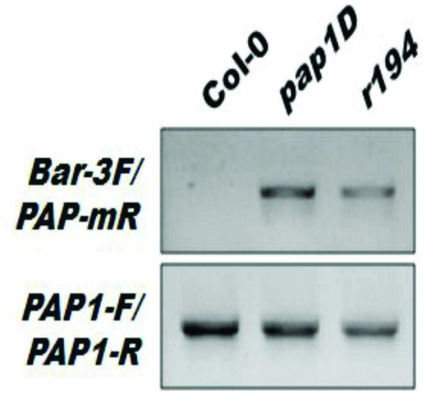
도면5



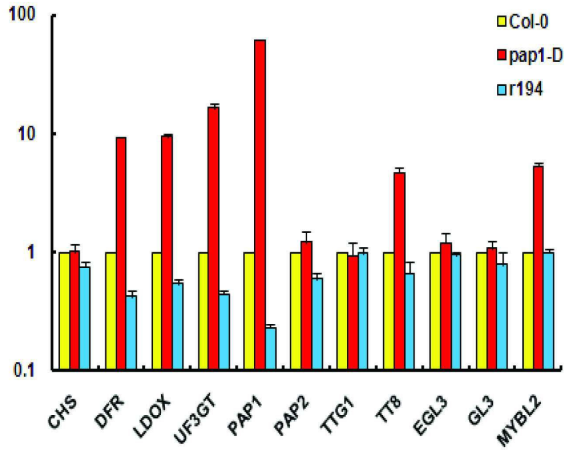
도면6


Col-0
pap1D
r194
R194 4F/
R194 4R
18S rRNA

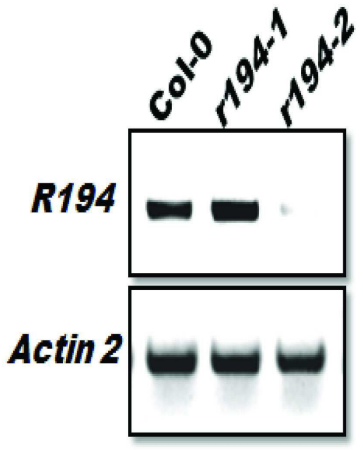
도면7


Col-0
pap1D
r194
Bar-3F/
PAP-mR
PAP1-F/
PAP1-R

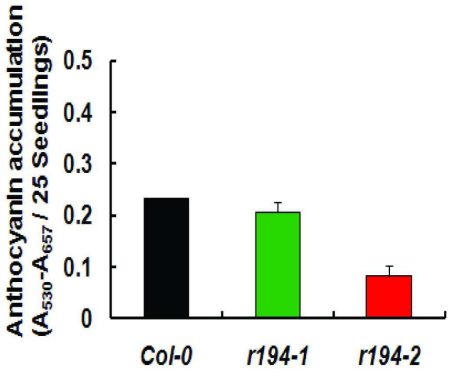
도면8


100
10
1
0.1
Col-0
pap1-D
r194
CHS
DFR
LDOX
UF3GT
PAP1
PAP2
TTG1
TT8
EGL3
GL3
MYBL2

도면9



도면10



서 열 목 록

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

<120> Use of PSR1 gene as anthocyan biosynthesis regulator

<130> PN12142

<160> 46

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2124

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atggtcgcct ttggaaaaaa gctcaaggaa cgtagcattg aagaatggca agaatattac 60

atcaattaca aattgatgaa gaagaaagtg aagcaatatg gtccacaaat cgaagtagga 120

agtttagatc gccgccatgt tcttaaagat ttctcaagga tgttggatca tcagatcgag 180

aaaatcgctc ttttcatgtt ggagcaacaa ggtttgcttt caagtaggtt acaaaagcta 240

agggaatggc atgatacact tcaagatgag cctgacttat ctcagatagc taagctaaga 300

gaggcttata gagccgtggg acaagatctt ctcaagcttc tgtttttcat cgatatgaat 360

gctattggta tccgcaagat actgaagaaa ttcgataaga gattcggtta tcgattcaca 420

aactattatg tcaagactcg cgctgatcat ccttactctc aacttcagca agtgtttaga 480

catgtgggcc ttggagctgt tgttggagcc atatctcgca accttcatga gcttcaaaac 540

aatgaaggaa gctacttatc catttatgac cagcctgttc ttcctcttca ggatcctgta 600

gtggattcga ttaagaatgc agtggacagg ctaacacatt caacaaactt tcttaatttc 660

atggctcaac atgctttaat catgcaagac gatgaagacc tactaatgct tcctccagac 720

gagcaagcgg aaaaagaaga aggaagatat cacttcatgt cactattgtt aaacttggcc 780

aacacgtttc tttatatggt caatacatat atcattgttc caacagctga tgattactct 840

atgagccttg gagcagccgc aacggtttgt ggtgttgtta tcggtgctat ggccgttgct 900

cagctcttct cttccgttta cttcagtgct tggtccaata aatcttactt caagccgctt 960

atatttagta gcatcgttct tttctttggg aacttgttat atgctttggc ttatgacttt 1020

aattcattag cacttctctt gattggtcgg ctttttttgtg gatttggttc agcgagagca 1080

gtgaaccgga gatatataag cgattgtgtg ccgctgaaaa tccgaatgca ggcttcagcg 1140

ggttttgtta gtgcaagtgc tctaggaatg gcttgtggtc ctgctcttgc tggcttgttg 1200

caaactgatt tcaagatcaa aaatgttaca tttaaccaag atacgttacc tggttgggtt 1260

atggctgttg cttggctatt gtacttagtc tggttagcta tttcgtttcg ggaacctgca 1320

cgtgagccag aagagattca tacttcacaa gagtctacct ctgagcaaat cttttgtggt 1380

gaagctgatc aagatggaaa tatagagaaa ggtcttaaaa aaccgctgtt gcttgcatcg 1440

gaagaaacag aacatgatga agaagatgac ggtgatggaa gcgaggaatc ttctgatgat 1500

tcccgtaaac ccgctaactc ctttgtagct gcttacaagc tactcactcc ttcagtaaag 1560

gttcaattgt tgatatactt catgcttaag tatgcaatgg agattctact atcagaatca 1620

agtgttgtaa ccacatatta ctttggttgg tccatgagtt ctgtttccat cttcttgttc 1680

tgtctgggtc taaccgtttt accggttaac ctcgttgttg gaagctatat cagcaacatg 1740

ttcgaagatc ggcaaattct gttagcgtca gagattatgg tctgtatcgg aatagttctc 1800

agcttccatg tagtaatccc ttacactgtc ccacaatacg ttatctcagg atttatcatg 1860

tttgtttctg ctgaagttct tgaaggtgtg aacttatcgt tactatcgag agtgatgtca 1920

tcgaggctgt cccgcgggac ttataacgga gggttactgt cgacggaagc tggcacgatt 1980

gcacgtgtga tagcggatgc gacgatcact ttggctggtt tcttgggaca gagtatgctt 2040

ttgaatgtta ctctgcttcc ttctttgatc atctgtgttt tgtctatcct agctacttgt 2100

tatacttata actccttgta ttag 2124

<210> 2

<211> 707

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Val Ala Phe Gly Lys Lys Leu Lys Glu Arg Ser Ile Glu Glu Trp

1 5 10 15

Gln Glu Tyr Tyr Ile Asn Tyr Lys Leu Met Lys Lys Lys Val Lys Gln

20 25 30

Tyr Gly Pro Gln Ile Glu Val Gly Ser Leu Asp Arg Arg His Val Leu

35 40 45

Lys Asp Phe Ser Arg Met Leu Asp His Gln Ile Glu Lys Ile Ala Leu

50 55 60

Phe Met Leu Glu Gln Gln Gly Leu Leu Ser Ser Arg Leu Gln Lys Leu

65 70 75 80

Arg Glu Trp His Asp Thr Leu Gln Asp Glu Pro Asp Leu Ser Gln Ile

85 90 95

Ala Lys Leu Arg Glu Ala Tyr Arg Ala Val Gly Gln Asp Leu Leu Lys

100 105 110

Leu Leu Phe Phe Ile Asp Met Asn Ala Ile Gly Ile Arg Lys Ile Leu

115 120 125

Lys Lys Phe Asp Lys Arg Phe Gly Tyr Arg Phe Thr Asn Tyr Tyr Val

130 135 140

Lys Thr Arg Ala Asp His Pro Tyr Ser Gln Leu Gln Gln Val Phe Arg

145 150 155 160

His Val Gly Leu Gly Ala Val Val Gly Ala Ile Ser Arg Asn Leu His

165 170 175

Glu Leu Gln Asn Asn Glu Gly Ser Tyr Leu Ser Ile Tyr Asp Gln Pro

180 185 190

Val Leu Pro Leu Gln Asp Pro Val Val Asp Ser Ile Lys Asn Ala Val

195 200 205

Asp Arg Leu Thr His Ser Thr Asn Phe Leu Asn Phe Met Ala Gln His

210 215 220

Ala Leu Ile Met Gln Asp Asp Glu Asp Leu Leu Met Leu Pro Pro Asp

225 230 235 240

Glu Gln Ala Glu Lys Glu Glu Gly Arg Tyr His Phe Met Ser Leu Leu

245 250 255

Leu Asn Leu Ala Asn Thr Phe Leu Tyr Met Val Asn Thr Tyr Ile Ile

260 265 270

Val Pro Thr Ala Asp Asp Tyr Ser Met Ser Leu Gly Ala Ala Ala Thr

275 280 285

Val Cys Gly Val Val Ile Gly Ala Met Ala Val Ala Gln Leu Phe Ser

290 295 300

Ser Val Tyr Phe Ser Ala Trp Ser Asn Lys Ser Tyr Phe Lys Pro Leu

305 310 315 320

Ile Phe Ser Ser Ile Val Leu Phe Phe Gly Asn Leu Leu Tyr Ala Leu

325 330 335

Ala Tyr Asp Phe Asn Ser Leu Ala Leu Leu Leu Ile Gly Arg Leu Phe

340 345 350

Cys Gly Phe Gly Ser Ala Arg Ala Val Asn Arg Arg Tyr Ile Ser Asp

355 360 365

Cys Val Pro Leu Lys Ile Arg Met Gln Ala Ser Ala Gly Phe Val Ser

370 375 380

Ala Ser Ala Leu Gly Met Ala Cys Gly Pro Ala Leu Ala Gly Leu Leu

385 390 395 400

Gln Thr Asp Phe Lys Ile Lys Asn Val Thr Phe Asn Gln Asp Thr Leu

405 410 415

Pro Gly Trp Val Met Ala Val Ala Trp Leu Leu Tyr Leu Val Trp Leu

420 425 430

Ala Ile Ser Phe Arg Glu Pro Ala Arg Glu Pro Glu Glu Ile His Thr

435 440 445

Ser Gln Glu Ser Thr Ser Glu Gln Ile Phe Cys Gly Glu Ala Asp Gln
450 455 460
Asp Gly Asn Ile Glu Lys Gly Leu Lys Lys Pro Leu Leu Leu Ala Ser
465 470 475 480
Glu Glu Thr Glu His Asp Glu Glu Asp Asp Gly Asp Gly Ser Glu Glu
485 490 495
Ser Ser Asp Asp Ser Arg Lys Pro Ala Asn Ser Phe Val Ala Ala Tyr
500 505 510

Lys Leu Leu Thr Pro Ser Val Lys Val Gln Leu Leu Ile Tyr Phe Met
515 520 525
Leu Lys Tyr Ala Met Glu Ile Leu Leu Ser Glu Ser Ser Val Val Thr
530 535 540
Thr Tyr Tyr Phe Gly Trp Ser Met Ser Ser Val Ser Ile Phe Leu Phe
545 550 555 560
Cys Leu Gly Leu Thr Val Leu Pro Val Asn Leu Val Val Gly Ser Tyr
565 570 575
Ile Ser Asn Met Phe Glu Asp Arg Gln Ile Leu Leu Ala Ser Glu Ile

580 585 590
Met Val Cys Ile Gly Ile Val Leu Ser Phe His Val Val Ile Pro Tyr
595 600 605
Thr Val Pro Gln Tyr Val Ile Ser Gly Phe Ile Met Phe Val Ser Ala
610 615 620
Glu Val Leu Glu Gly Val Asn Leu Ser Leu Leu Ser Arg Val Met Ser
625 630 635 640
Ser Arg Leu Ser Arg Gly Thr Tyr Asn Gly Gly Leu Leu Ser Thr Glu
645 650 655

Ala Gly Thr Ile Ala Arg Val Ile Ala Asp Ala Thr Ile Thr Leu Ala
660 665 670
Gly Phe Leu Gly Gln Ser Met Leu Leu Asn Val Thr Leu Leu Pro Ser
675 680 685
Leu Ile Ile Cys Val Leu Ser Ile Leu Ala Thr Cys Tyr Thr Tyr Asn
690 695 700

Ser Leu Tyr

705

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

tctccataat aatgtgtgag tagttcccag ataaggg 37

<210> 4

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

tgtgagtagt tcccagataa gggaattagg gttccta 37

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tgtttacacc acaatatatc ctgc 24

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ggtttcgctc atgtgttg 18

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gtaatacgac tcactatagg gcgtacc 27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gtaatacgac tcactatagg gctgcag 27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gtaatacgac tcactatagg gcagctc 27

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

gtaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

tgctgattgt gaggactgat g 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

ttggcatctt ccagtgtttt c 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

ggtttgtggt gttgttatcg g 21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

gacgctaaca gaatttgcct g 21

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

ggtgatggaa gcgagga 17

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

caatcgtgcc agcttcc 17

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

agacattacg cccattccta caac 24

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gtcgcttcag gaaccaaaat atct 24

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 19

attcagatgc ccagaagtct tgt 23

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 20

gaaacatttt ctgtgaacga ttcct 25

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 21

cctgcggctt aatttgactc 20

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 22

ccggatcatt caatcggta 19

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 23

gctgagagat tcagatgccc a 21

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 24

gtggattcca gcagcttcca t 21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 25

ggcaaagaag cggcagtgaa g 21

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 26

cggaaggacg gagaccaaga ag 22

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 27

ctttgttcgt gccaccgttc g 21

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 28

tccttcctca gataaatcag ccttcc 26

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 29

gtttgcagct tttctacgag g 21

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 30

tgagcaaaag tccgtggagg 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 31

tgtcagatcg ttttggttcc 20

<210> 32

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 32

gattcttcct cactttctca c 21

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 33

caagaggtag atattttggt tcc 23

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 34

ctatacacaa acgcaaacaa atg 23

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 35

atggagaagg caaatggcat caag 24

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 36

ccagcaatca aggaccacct atttc 25

<210> 37

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 37

ctccgctcat cctccggtca cag 23

<210> 38

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 38

caacggcgca caaaactcgc tcg 23

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 39

ggcggttcaa tctgtggac 19

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 40

ctgttggctc ctctctaacg 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 41

ggattcaacg gttaggtcag 20

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 42

atcatcttct gcgatttctc tc 22

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 43

gagcaacaga gaaatgtgaa gac 23

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 44

gttcctgatg atgatgacga 20

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 45

gcccattcca agtaccaa 18

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 46

agcgtttctt gacctgttga 20