



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0024666
(43) 공개일자 2025년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 6/46 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8231 (2013.01)
A01H 6/4636 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2023-0105593
(22) 출원일자 2023년08월11일
심사청구일자 2023년08월11일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
(72) 발명자
김유진
경상남도 밀양시 삼랑진읍 삼랑진로 1268-50
정기홍
경기도 수원시 영통구 영통로154번길 56(망포동, 한양수자인에듀파크)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

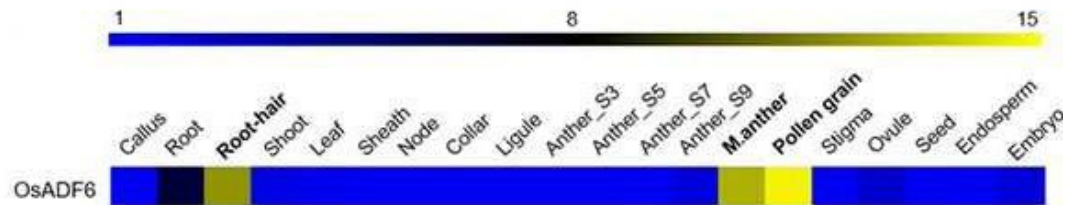
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 벼 LOC_Os04g46910 유전자 유래 조직 특이적 발현 프로모터 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 조직 특이적으로 발현하는 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 조직 특이적 프로모터는 화분과 뿌리털의 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 특이적으로 조절하여 벼를 포함하는 주요 곡물의 화분 발달, 꽃가루 발달, 뿌리 발달 등을 개선함으로써, 생산성이 증대된 작물을 육성하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 15/8261 (2013.01)

C12N 2830/008 (2013.01)

(72) 발명자

김의정

경기도 용인시 수지구 풍덕천로 76, 909동 804호(
풍덕천동, 용인수지 신정마을9단지)

홍우중

경기도 수원시 장안구 대평로51번길 56, 253동 80
1호(정자동, 화서역파크뷰)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395072806

과제번호 PJ016610022022

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 신육종기반기술개발

연구과제명 유전자교정 기술을 이용한 벼 변이집단 개발 및 분석거점 구축(2공동)

기 여 율 7/10

과제수행기관명 경희대학교산학협력단

연구기간 2022.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711185170

과제번호 2019R1C1C1002636

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 신진연구자지원사업

연구과제명 작물 생산량 증가를 위한 벼 화분관 발달 조절 연구

기 여 율 3/10

과제수행기관명 부산대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 조직 특이적 발현 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조직은 화분, 제10단계 내지 제13단계 꽃밥 및 뿌리털로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 프로모터.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 4

제3항에 따른 벡터에 의해 형질 전환된 형질전환세포.

청구항 5

제3항에 따른 벡터 또는 제4항에 따른 형질전환세포로 형질전환된 형질전환 식물체.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 형질전환 식물체는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 단자엽 식물은 벼, 갈대, 옥수수, 잔디, 보리, 밀, 조, 수수, 귀리, 호밀, 사탕수수, 피, 대나무, 강아지풀, 난, 갈대, 부들, 억새풀, 마늘, 튼립, 군자란, 붓꽃, 백합, 기장, 울무, 바랭이, 달개비, 범부채, 용설란, 홍죽, 관음죽, 산마늘, 꽃제비, 비짜루 및 박새로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 8

제3항에 따른 벡터 또는 제4항에 따른 형질전환세포로 식물체를 형질전환시켜 외래 유전자를 상기 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 식물체의 형질전환 방법.

청구항 9

하기의 단계들을 포함하는 조직 특이적으로 발현되는 벼 형질전환체의 제조방법:

- (1) 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;
- (2) 벼에 상기 벡터를 도입하는 단계; 및
- (3) 상기 벡터가 도입되어 상기 벼의 조직 특이적으로 상기 외래 유전자가 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 조직은 화분, 제10단계 내지 제13단계 꽃밥 및 뿌리털로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 벼 LOC_Os04g46910(또한, "OsADF6"로 명명됨) 유전자 유래의 조직 특이적으로 발현하는 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 벼(*Oryza sativa*)는 세계에서 가장 중요한 식량 작물의 하나로 과거 20여년 동안 꾸준히 수량 증대에 힘써왔으나, 현재의 인구 증가 추세로 볼 때 2020년이면 현재의 70% 이상에 달하는 수량을 더 생산해야만 할 형편에 놓여 있다. 그러나, 벼가 재배되는 농지는 세계 각국의 공업화 현상으로 갈수록 줄어들고, 육종의 소재가 되는 새로운 유전 자원은 고갈되어 외래 유용 유전자의 도입이 요구되고 있다.

[0003] 다행히 분자생물학의 발달로 외래 유용 유전자의 분리 및 조작이 가능하게 되어 유용 유전자를 벼를 비롯한 많은 식물 세포에 형질전환하여 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻음으로서 여러 가지 생명 현상을 규명하는 유전자 발현 연구는 물론 육종의 좋은 소재가 되고 있다. 이러한 형질전환기술을 이용한 신품종의 생산은 앞으로 다가오는 21세기에는 고부가가치 산업으로 대두함은 물론이며, 인류의 가장 큰 문제점으로 부각되는 식량 문제를 어느 정도는 해결할 수 있으리라 기대된다.

[0004] 현재까지 알려진 형질전환 방법은 80년대에는 원형질체에 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol(PEG))과 전기충격법(electroporation)으로 많은 형질전환체를 획득하였으며, 90년대 후반에는 유전자총 이용법이 보편화되었으며, 최근에는 쌍자엽식물에서 널리 이용되어 왔던 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 이용법도 많이 이용되고 있다. 그밖에 화분법(pollen pathway), 미세주사(microinjection) 방법 등이 있다.

[0005] 프로모터는 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성할 수 있으며, 그 기능에 따라서 다음과 같이 분류할 수 있다.

[0006] 첫째로, 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있다. 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C 유전자(OsOc1)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(참조: 등록번호 10-0429335). 이들은 식물형질전환 기본 운반체 내에 선발마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체 내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다. 이러한 프로모터들은 조직-선택성 또는 기관-선택성이 결여되어 있기 때문에 형질전환시킨 선

별마커 등이 전체 식물에서 발현됨으로써, 식물체 생장을 지연시키는 결과를 초래한다. 또한, 프로모터의 특성상 도입한 유전자의 발현을 목적하는 기관에 국한되어 충분히 발현시키지 못하므로 형질전환체의 경제성이 떨어지게 된다.

[0007] 둘째로, 종자 특이적 프로모터를 들 수 있다. 대표적인 예로서 벼 주요 저장 단백질 유전자의 프로모터들로서 황금쌀(golden rice) 개발에 사용된 벼 글루테린(glutelin) 프로모터가 현재까지 외떡잎식물의 종자 특이적 발현을 유도하는 경우에 많이 사용되고 있고, 쌍떡잎식물의 종자 특이적 발현을 유도하는데 주로 사용되는 프로모터로는 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 및 애기장대의 종자에서 감마 토코페롤 메틸기 전이효소(γ -tocopherol methyl transferase: γ -TMT) 유전자 발현을 유도함으로써 비타민 E 생성을 증진시킨 연구에 사용된 당근 유래 DC-3 프로모터, 들깨 유래 올레오신(oleosin) 프로모터의 종자 특이발현유도 특허출원(참조: 특허출원번호 10-2006-0000783) 사례가 있다. 상기 종자 특이적 프로모터들은 주로 종자 자체가 식량이나 식품 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용되고 있다.

[0008] 셋째로, 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.

[0009] 넷째로, 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스(rbcS: ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 RoID 프로모터, 감자 유래 피경 특이 발현 유도 파타틴(patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과일 성숙 특이 발현 유도 피디에스(PDS: phytoene synthase) 프로모터 등이 있다.

[0010] 한편, 단자엽 및 작물의 모델 생물체인 벼에서 뿌리털의 양분 흡수 효율 증진 및 화분관의 발달과 같은 극성 생장 조직에 관한 연구는 이를 활용한 다양한 작물의 형질의 개량 및 육종산업의 발전에 활용할 수 있는 중요한 유전자원을 발굴할 수 있다는 점에서 반드시 필요한 연구이다. 하지만, 다른 조직 특이적 프로모터와 대비하여 화분이나 뿌리털에 특이적으로 작용할 수 있는 프로모터에 관한 연구는 매우 부족한 실정이다. 그러므로, 개발자의 의도에 따라 화분이나 뿌리털에서의 발현을 조절할 수 있는 새로운 프로모터에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) KR 10-2097525 B
(특허문헌 0002) KR 10-2022-0161020 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신이 아닌 화분이나 뿌리털에 국한하여 발현시킬 수 있는 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 조직 특이적 발현 프로모터를 제공한다.

[0014] 상기 조직은 화분, 제10단계 내지 제13단계 꽃밥 및 뿌리털로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이

바람직하다.

- [0015] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 벡터에 의해 형질 전환된 형질전환세포를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 벡터 또는 상기 본 발명에 따른 형질전환세포로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0018] 상기 형질전환 식물체는 단자엽 식물인 것이 바람직하다.
- [0019] 상기 단자엽 식물은 벼, 갈대, 옥수수, 잔디, 보리, 밀, 조, 수수, 귀리, 호밀, 사탕수수, 피, 대나무, 강아지풀, 난, 갈대, 부들, 억새풀, 마늘, 튼립, 군자란, 붓꽃, 백합, 기장, 울무, 바랭이, 달개비, 범부채, 용설란, 홍죽, 관음죽, 산마늘, 꽃제비, 비짜루 및 박새로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.
- [0020] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 벡터 또는 본 발명에 따른 형질전환세포로 식물체를 형질전환시켜 외래 유전자를 상기 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 식물체의 형질전환 방법을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 (1) 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; (2) 벼에 상기 벡터를 도입하는 단계; 및 (3) 상기 벡터가 도입되어 상기 벼의 조직 특이적으로 상기 외래 유전자가 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 조직 특이적으로 발현되는 벼 형질전환체의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 상기 조직은 화분, 제10단계 내지 제13단계 꽃밥 및 뿌리털로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 조직 특이적 프로모터는 화분과 뿌리털의 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 특이적으로 조절하여 벼를 포함하는 주요 곡물의 화분 발달, 꽃가루 발달, 뿌리 발달 등을 개선함으로써, 생산성이 증대된 작물을 육성하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 RNA-seq 발현 데이터를 통한 LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 발현 Heatmap 그림을 나타낸 것이다. 파란색은 낮은 발현값을, 노란색은 높은 발현값을 나타낸다. LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자는 뿌리털과 성숙한 꽃밥 및 성숙한 화분 조직에서 발현이 강하다.
- 도 2는 LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자에 대한 qRT-PCR 결과를 그래프로 나타낸 것이다. LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자는 10단계의 꽃밥 조직에서 약하게 발현하며 13단계의 꽃밥 조직에서 제일 강하게 발현한다. 뿌리털 조직에서도 높은 발현을 한다.
- 도 3은 LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 프로모터를 사용한 GUS histochemical assay 결과를 나타낸 것이다. LOC_Os04g46910(OsADF6)의 프로모터는 뿌리에 있는 뿌리털 세포(trichoblast cell)와 뿌리털에서 GUS 단백질을 강하게 발현시킨다. 또한, 10단계 및 13단계의 꽃밥 조직에서도 GUS 단백질이 발현된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0026] 본 발명의 발명자들은 식물의 조직 또는 기관 특이적인 유전자 발현을 조절할 수 있는 프로모터들을 발굴함으로써, 식물의 특정 조직 또는 기관에 국한시켜 목적 유전자를 특이적으로 발현 또는 저해할 수 있는 시스템을 확립하고자 하였다. 이 과정에서 벼 LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 프로모터가 식물의 다른 조직보다 화분 및 뿌리털에서 특이적으로 발현이 이루어짐을 확인하였고, 이에 따라 상기 프로모터를 확보하여 이를 포함하는 발현벡터를 제조한 후 이를 식물에 도입하여 형질전환시킨 형질전환체에서 조직 특이적으로 리포터 유전자가 발현됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0027] 보다 상세하게는, 본 발명의 발명자들은 공개된 벼 에피메트릭스(affymetrix) 자료 983종을 수집하였고, 이들을 17개 기관별로 재분류를 하였다. 에피메트릭스 어레이(affymetrix array)는 한 번의 실험으로 57000 종의 프로

브에 의해서 대변되는 유전자 발현을 분석 가능케 하며, 대규모로 수집된 에피메트릭스 어레이(affymetrix array) 자료의 재구성을 통해서 만들어진 기관별 발현 양상은 상당히 높은 재현성을 보여 주었다. 이 자료의 발현 패턴별 분석을 통해서 다양한 기관 및 조직 특이적 유전자들이 분리되었다. 그 중에서 본 발명자들은 화분과 뿌리털에서 중요한 형질 발현에 필요한 프로모터 발굴에 관심을 가졌다.

- [0028] 상기 방법을 통해서, 다른 유전자들에 비하여 화분과 뿌리털에서 높은 발현 양상을 보여 주는 유전자를 확보하였다. 이러한 유전자에 의해서 조절되는 유전자 발현양상은 이들 프로모터 3' 방향에서 GUS reporter 유전자를 발현시켜 그 활성을 식물체 내에서 측정함으로써 정밀하게 분석되었다.
- [0029] 염기서열 해독 정보를 참고로 하여 LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 ATG 앞 프로모터를 게놈 DNA PCR를 통해 분리하고 pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다.
- [0030] 이렇게 분리된 프로모터를 pGA3519 벡터에 넣어, 형질전환된 식물체를 제작하였다. 형질전환 된 식물체에서 GUS 반응을 검증함으로써, 해당 프로모터를 이용하여 식물의 조직 특이적 유전자 발현을 유도할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0031] 따라서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 조직 특이적 발현 프로모터를 제공한다.
- [0032] 프로모터는 유전자의 환경적, 시기적 및 조직적 발현을 조절하는 필수적인 요소로서, 본 발명에 따른 화분 및 뿌리털 특이적 프로모터를 사용하여 식물체 내에서 외래 유용 유전자의 발현 부위를 화분과 뿌리털 특이적으로 유도할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 벼의 LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 프로모터로서, 외래 유전자의 발현이 화분과 뿌리털, 그리고 제10단계 내지 제13단계 꽃밥에서 특이적으로 이루어지도록 유도하는 조직 특이적 프로모터(이하 '본 발명의 프로모터'라 함)를 제공한다.
- [0034] LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 갖는다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0036] 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 복제 가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 게놈 내에 통합되는 것들을 포함한다.
- [0037] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 프로모터를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 pCambia계열, pGA계열, pGWB계열, 예컨대, pGA3383, pCambia3301, pCambia3300, pGA3426, pGA3519, pGA3780, pGWB12, pGWB14와 같은 Ti-plasmid 및 이에 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0038] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편을 포함한다.
- [0039] "본 발명의 프로모터"와 "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 프로모터는 공개된 벼 게놈 서열 상, LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 앞쪽에 위치하는 서열로서, 서열번호 1로 표시되는 염기 서열 중 일부가 추가 또는 삭제되더라도 공개된 벼 게놈 서열 상 LOC_Os04g46910(OsADF6)의 앞에 위치한 서열과 상동성이 유지되어 실질적으로 동등한 효과를 나타낸다면 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 발현 벡터는 3' 방향에 목적 단백질에 대한 유전자가 발현되도록 한다.
- [0041] 바람직하게는 상기 발현 벡터는 화분 및 뿌리털, 그리고 제10단계 내지 제13단계 꽃밥에서 특이적으로 발현시키

고자 하는 유용한 외래 유전자를 포함할 수 있다.

- [0042] 상기 외래 유전자는 화분 및 뿌리털, 그리고 제10단계 내지 제13단계 꽃밥에서 발현을 원하는 어떠한 유전자라면 무엇이든 무방하다.
- [0043] 상기 발현 벡터는 통상의 벡터에 본 발명의 프로모터를 도입한 것일 수 있으며, 이처럼 본 발명의 프로모터를 도입하여 발현 벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 벡터에 의해 형질 전환된 형질전환세포를 제공한다.
- [0045] 상기한 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포(예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포) 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0046] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 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.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 벡터 또는 상기 본 발명에 따른 형질전환세포로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0048] "본 발명의 형질전환 식물체"와 "기능적으로 동등한 형질전환 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 식물체로서, 화분 및 뿌리털, 그리고 제10단계 내지 제13단계 꽃밥에서의 특이적 프로모터 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 식물체이다.
- [0049] 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, FA et al, 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I et al, June 1987, Plant Mol Biol 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito RD et al, 1985 Bio/Technol 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A et al, 1986, Mol GenGenet 202, 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법(Klein TM et al, 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 형질전환되는 식물체는 본 실시예에서 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)를 포함한 단자엽식물 뿐만 아니라 쌍자엽 식물도 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0051] 바람직하게는, 벼, 갈대, 옥수수, 잔디, 보리, 밀, 조, 수수, 귀리, 호밀, 사탕수수, 피, 대나무, 강아지풀, 난, 갈대, 부들, 억새풀, 마늘, 튼립, 군자란, 붓꽃, 백합, 기장, 울무, 바랭이, 달개비, 범부채, 용설란, 홍죽, 관음죽, 산마늘, 꽃제비, 비짜루 및 박새로 이루어진 군으로부터 선택되는 단자엽 식물, 더욱 바람직하게는 벼(*Oryza sativa* L.)가 사용된다.
- [0052] 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 벡터 또는 본 발명에 따른 형질전환세포로 식물체를 형질전환시켜 외래 유전자를 상기 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 식물체의 형질전환 방법을 제공한다.
- [0054] 바람직하게는, 본 발명은 (1) 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; (2) 벼에 상기 벡터를 도입하는 단계; 및 (3) 상기 벡터가 도입되어 상기 벼의 조직 특이적으로 상기 외래 유전자가 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 조직 특이적으로 발현되는 벼 형질전환체의 제조방법을 제공한다.
- [0055] 상기 조직은 화분, 제10단계 내지 제13단계 꽃밥 및 뿌리털로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이

바람직하다.

[0056] 이하에서는, 구체적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 일 구체예를 기재한 것이며, 하기 실시예에 기재된 사항에 의하여 본 발명의 권리범위가 한정되어 해석되는 것은 아니다.

[0057] 또한, 본 발명의 발명자에 의하여 출원 또는 등록된 바 있는 대한민국 공개특허 제10-2022-0161020호 및 대한민국 등록특허 제10-2097525호에 기재된 사항은 참조로서 본원에 통합된다.

[0058] **[실시예]**

[0059] **실시예 1: 화분 및 뿌리털에 특이적으로 발현되는 벼 유전자의 확보**

[0060] 11개의 벼 ADF 유전자 수그룹 중에서 뿌리털 및 성숙한 화분 조직에서 동시에 강하게 발현되는 LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자를 조직별 RNA-seq 데이터를 통해 확보하였다.

[0061] 도 1에 나타낸 바와 같이, LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자는 뿌리털과 성숙한 꽃밥 및 성숙한 화분 조직에서 발현이 강함을 확인하였다.

[0062] **실시예 2: RT-PCR을 통한 조직 특이적 발현 확인**

[0063] 상기 실시예 1로부터 확보된 화분 및 뿌리털에 특이적으로 발현되는 벼 유전자를 대상으로 이들의 발현을 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)으로 검정하였다.

[0064] 도 2에 나타낸 바와 같이, LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자는 10단계의 꽃밥 조직에서 약하게 발현하며, 13단계의 성숙 꽃밥 조직에서 제일 강하게 발현하였다. 또한, 뿌리털 조직에서도 높은 발현량을 나타냄을 확인하였다.

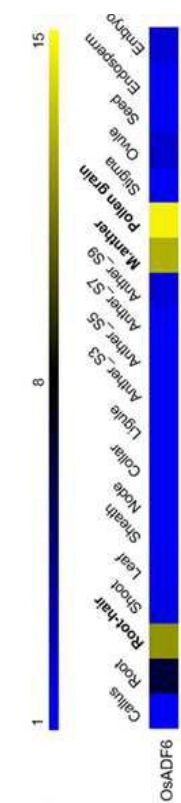
[0065] **실시예 3: 형질전환 식물체의 제작**

[0066] 상기 실시예 1 및 실시예 2를 통하여 확보된 LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 프로모터를 활용하여 GUS를 발현시킬 수 있는 pGA3519 벡터에 도입하여 형질전환된 식물체를 제작하였다.

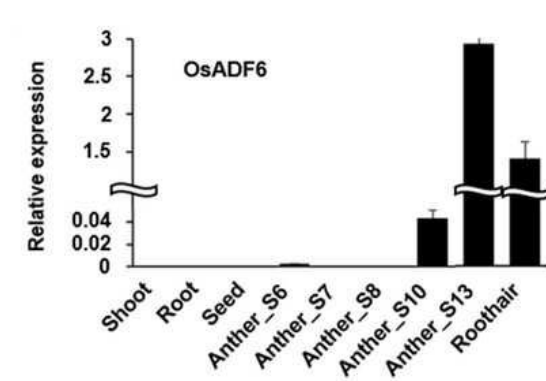
[0067] 도 3에 나타낸 바와 같이, LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 프로모터를 사용한 GUS histochemical assay 결과, LOC_Os04g46910(OsADF6) 유전자의 프로모터는 뿌리에 있는 뿌리털 세포(trichoblast cell)와 뿌리털에서 GUS 단백질을 강하게 발현시킴을 확인하였다. 또한, 10단계 및 13단계의 성숙 꽃밥 조직에서도 GUS 단백질의 발현이 강함을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



도면3



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.