



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0143696  
(43) 공개일자 2023년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/415 (2006.01) A01H 5/10 (2018.01)  
C12N 15/82 (2006.01) C12N 5/04 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 14/415 (2013.01)  
A01H 5/10 (2022.05)  
(21) 출원번호 10-2022-0042632  
(22) 출원일자 2022년04월06일  
심사청구일자 2022년04월06일

(71) 출원인  
서강대학교산학협력단  
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)  
(72) 발명자  
서미정  
서울특별시 강남구 영동대로 210, 5동 705호(대치동, 쌍용아파트)  
김세미  
경기도 안산시 단원구 당곡2로 29, 810동 1201호 (고잔동, 중앙주공아파트)  
(74) 대리인  
최규환

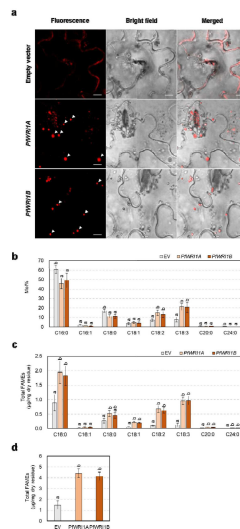
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 식물체의 TAG 함량을 증가시키는 들깨 유래 WRI1 유전자 및 이의 용도

### (57) 요약

본 발명은 식물체의 TAG (triacylglycerol) 함량을 증가시키는 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨 유래 WRI1 (WRINKLED1) 단백질 및 이의 코딩 유전자에 관한 것으로, 본 발명의 들깨 유래 WRI1은 유지식물에서 화석 연료를 대체할 수 있는 지속 가능하고 재사용 가능한 식물성 기름의 생산 증진에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

**C12N 15/8247** (2013.01)

**C12N 5/04** (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                          |
|-------------|------------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1395071909                               |
| 과제번호        | PJ015709012022                           |
| 부처명         | 농촌진흥청                                    |
| 과제관리(전문)기관명 | 농촌진흥청                                    |
| 연구사업명       | 바이오그린연계농생명혁신기술개발                         |
| 연구과제명       | 대사 네트워크 조절을 통한 작물의 종자오일 함량 증진 기술 개발(1주관) |
| 기 여 율       | 1/1                                      |
| 과제수행기관명     | 서강대학교                                    |
| 연구기간        | 2022.01.01 ~ 2022.12.31                  |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진, 들깨(*Perilla frutescens*) 유래 WRI1 (WRINKLED1) 단백질.

#### 청구항 2

제1항의 들깨 유래 WRI1 단백질을 코딩하는 유전자.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

#### 청구항 4

제2항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

#### 청구항 5

제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 숙주세포는 식물 세포인 것을 특징으로 하는 숙주세포.

#### 청구항 7

서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨(*Perilla frutescens*) 유래 WRI1 (WRINKLED1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하여 WRI1 단백질 코딩 유전자를 과발현시키는 단계; 및

상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는 비형질전환 식물체에 비해 TAG (triacylglycerol) 함량이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법.

#### 청구항 8

제7항의 방법에 의해 제조된, 비형질전환 식물체에 비해 TAG 함량이 증가된 형질전환 식물체.

#### 청구항 9

제8항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

#### 청구항 10

서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨(*Perilla frutescens*) 유래 WRI1 (WRINKLED1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 비형질전환 식물체에 비해 식물체의 TAG (triacylglycerol) 함량을 증가시키는 방법.

#### 청구항 11

서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨(*Perilla frutescens*) 유래 WRI1 (WRINKLED1) 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 TAG (triacylglycerol) 함량 증가용 조성물.

### 발명의 설명

## 기술분야

[0001] 본 발명은 식물체의 TAG 함량을 증가시키는 들깨 유래 *WRI1* (WRINKLED1) 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

## 배경기술

[0002] 최근 몇 년간 급속한 인구 증가와 대규모 화석연료 사용으로 인한 이산화탄소 배출로, 지구 온난화의 심각성은 세계적으로 해결해야 할 심각한 문제로 떠올랐다. 이에 따라 식물성 기름의 지속가능성과 대체성을 높이기 위해 많은 연구가 수행되고 있다. 식물은 종자 또는 과일 발달 중에 탄소 및 에너지 저장 성분으로 triacylglycerol (TAG)을 축적한다. TAG의 단위 질량 당 에너지는 탄수화물이나 단백질보다 약 두 배 높다. 저장유(storage oil)는 야자수(*Elaeis guines*), 콩(*Glycine max*), 옥수수(*Zea mays*) 및 유채(*Brassica napus*) 등에서 생산되며, 식용유뿐만 아니라 페인트, 세제, 윤활제 및 화장품을 생산하는 산업용 원료로 사용된다. 또한 지구 온난화와 화석 연료 고갈 문제를 해결하기 위한 대안으로 식물성 기름을 재생가능한 바이오디젤 생산에 사용하기도 한다. 최근에는 식물성 기름에 대한 수요를 증가시키기 위해 유전공학적 기법을 이용하여 종자유를 증가시킨 유지식물의 개발이 연구되고 있다.

[0003] 모델식물인 애기장대의 씨앗에서는 지방산 생합성이 색소체(plastid)에서 이루어진다. 해당과정을 통해 포도당으로부터 피루브산이 생성되면, 상기 피루브산은 피루브산 탈카르복실화라 불리는 과정에 의해 세 가지 종류의 피루브산 탈수소효소 복합체(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)에 의해 아세틸-CoA로 전환된다. PDC는  $\alpha$ -PDH (pyruvate dehydrogenase alpha subunit) 및  $\beta$ -PDH (pyruvate dehydrogenase beta subunit), DHLAT (dihydrolipoamide acetyltransferase) 및 DPD (dihydrolipoamide dehydrogenase)의 3가지 효소 복합체이다. 아세틸-CoA는 ACCase (Acetyl-CoA carboxylase)에 의해 malonyl-CoA로 전환되고, malonyl-CoA는 MCMT (malonyl-23 CoA:ACP malonyltransferase)에 의해 malonyl-ACP로 전환된다. ACCase는 malonyl-ACP와 아세틸-CoA간 축합반응을 일으켜 3-ketoacyl-ACP를 형성한다. 이형화합의(heteromeric) ACCase는  $\alpha$ -CT 및  $\beta$ -CT (carboxyltransferase alpha and beta subunit), 비오틴 카르복실화효소(biotin carboxylase) 및 비오틴 카르복실 캐리어 단백질(biotin carboxyl carrier protein)을 포함한다. 그 후 지방산합성효소복합체에 의해 16~18 개의 지방산-ACP와 탄소의 일련의 축합반응이 진행된다. FATA/FATB [acyl-acyl carrier protein (ACP) thioesterases]는 티오에스테르 결합을 가수분해하여 지방산기 확장을 종료한다. 수크로스를 사용하여 색소체에서 합성된 지방 아실-CoA는 TAG 생합성을 위해 색소체를 빠져나가 케네디 경로를 통해 글리세롤 골격으로 응축된다. TAG 생합성에서 DHAP (dihydroxyacetonephosphate)의 연속적인 아실화 및 환원 반응에 의해 glycerol-3-phosphate (G3P)가 생성된다. GPAT (G3P acyltransferase)는 G3P의 *sn*-1에서 첫 번째 아실화를 유도하여 LPA (lysophosphatidic acid)를 생성하고, LPAAT (2-lysophosphatidic acid acyltransferase)가 아실-CoA를 LSP의 *sn*-2에 결합시켜 PA (phosphatidic acid)를 형성함으로써 두 번째 아실화가 이루어지며, PA의 탈인산화가 PP (phosphatidate phosphatase)에 의해 일어나 DAG (diacylglycerol)를 생성한다. DAG는 지질 저장과 합성에 있어 중요한 위치에 있다. DAG의 TAG로의 최종 아실화를 일으키는 DGAT (DAG acyltransferase)는 종자유 TAG 생합성에 가장 중요한 역할을 한다. DGAT는 지방 아실-CoA를 이용하여 DAG의 *sn*-3을 아실화함으로써 TAG를 생성한다. 또한 DAG는 아실 공여체로서 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline)을 이용하여 PDAT (phospholipid:diacylglycerol acyltransferase)에 의해 아실화된다.

[0004] 식물에서 오일 생합성을 증가시키기 위한 대사공학적 접근법에는 "Push-Pull-Protect"라고 불리는 세 가지 단계가 있다. 색소체에서 생성된 지방산은 엽록체로 방출되어(Push) 소포체로 들어가(Pull) TAG를 축적한다. TAG는 오일 방울(oil droplet) 또는 유체(oil body)가 올레오신을 둘러싸면서 축적된다(Protect). 더 많은 TAG를 얻기 위해 많은 연구팀이 상기 메커니즘을 사용하여 식물의 오일 함량을 증가시켰다. 예를 들어 담배(*N. benthamiana*) 잎에서 *WRI1*(Push)과 *DHAT*(Pull)의 일시적인 공동발현이 TAG 생합성 및 축적의 증가에 시너지 효과가 있다는 보고가 있었다. 오일 생합성에 중요한 것으로 알려진 *WRI1* (WRINKLED1)는 AP2/EREBP (APETALA2/ethylene responsive element binding) 계열의 전사인자에 속하며 식물에 특이적으로 존재하는 것으로 알려졌다.

[0005] 유지작물로서 들깨(*Perilla frutescens* (L.) var. *frutescens*)는 꿀풀과에 속하며 종자에 35~45%의 오일이 함유되어 있고 이 중, 오메가 3 지방산( $\alpha$ -리놀렌산, ALA)이 54~64%, 오메가 6 지방산(리놀렌산, LA)은 14%를 차지한다. 들깨의 종자에는 리놀레산(18:2) 및 리놀렌산(18:3)을 포함하는 불포화지방산(PUFA)이 약 80%를 차지한다. 들깨 종자의 전사체 분석 결과, ER에 위치하는  $\Delta 12$  올레산염 불포화효소(fatty acid desaturase 2, FAD2)와 리놀레산염  $\Delta 15$  불포화효소(FAD3)가 높은 수준으로 발현되고 있으며, LA 및 ALA의 합성에 FAD2 및 FAD3가

각각 연관되어 있음이 밝혀졌다. 또한 TAG 생합성에 중요한 DHAT1은 종자 발달 중에 높은 발현을 보여 TAG 생합성에 중요한 역할을 할 것으로 추측되었다.

[0006] 한편, 한국공개특허 제2021-0029065호에는 전사조절인자 HAT2를 이용한 '불포화지방산 비율이 조절된 종자를 제조하기 위한 조성물 및 이로부터 제조된 종자'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1424154호에는 '신규한 CvFatB1 유전자 및 팔미트산 생합성에서의 이의 용도'가 개시되어 있고, 미국공개특허 제2017-0218386호에는 애기장대, 유채, 옥수수, 십자화과 또는 가지과 유래의 *WRI1* 용도에 관한 'Genetically engineered plants with increased vegetative oil content'가 개시되어 있다, 본 발명의 '식물체의 TAG 함량을 증가시키는 들깨 유래 *WRI1* 유전자 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 새로운 식물체 유래의 *WRI1* 유전자를 찾기 위해서, 발달 중인 들깨의 종자로부터 *WRI1* 오솔로그(ortholog)를 분리하였고(*WRI1A* 및 *WRI1B*), 이의 아미노산 서열을 분석한 결과 들깨 유래의 *WRI1A* 및 *WRI1B*가 공지된 다른 식물종 유래의 *WRI1* 단백질과 서열 상동성이 최대 50%를 넘지 않음을 확인하였다. 또한, *WRI1A* 및 *WRI1B*의 CDS 서열을 각각 클로닝한 재조합 벡터로 형질전환된 아그로박테리움으로 담배 잎에 인필트레이션한 결과, 들깨 유래 *WRI1A* 및 *WRI1B*가 일시적으로 과발현된 조직에서 TAG (triacylglycerol)의 함량이 대조구 대비 현저히 증가된 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진, 들깨(*Perilla frutescens*) 유래 *WRI1* (*WRINKLED1*) 단백질을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 들깨 유래 *WRI1* 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨 유래 *WRI1* 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하여 *WRI1* 단백질 코딩 유전자를 과발현시키는 단계; 및 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는 비형질전환 식물체에 비해 TAG (triacylglycerol) 함량이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된, 비형질전환 식물체에 비해 TAG 함량이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨 유래 *WRI1* 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 비형질전환 식물체에 비해 식물체의 TAG 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨 유래 *WRI1* 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 TAG 함량 증가용 조성물을 제공한다.

## 발명의 효과

[0016] 본 발명은 TAG (triacylglycerol) 함량을 증진시킬 수 있는 신규한 들깨 유래 유전자를 제공함으로써, 유지식물에서 화석 연료를 대체할 수 있는 지속 가능하고 재사용 가능한 식물성 기름의 생산 증진에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 들깨 유래 *WRI1*의 아미노산 및 염기서열 정보이다. (a): Pf*WRI1A*, (b): Pf*WRI1B*.

도 2는 들깨 유래 *WRI1*와 공지된 다른 식물체 유래 *WRI1*의 계통발생학적 유연관계를 분석한 계통수이다. At*WRI1*, *Arabidopsis thaliana* (824599); Pf*WRI1s*, *Perilla frutescens* var. *frutescens*; As*WRI1*, *Avena*

*sativa* (SRX1079426); BnWRI1, *Brassica napus* (ABD16282.1); CsWRI1A, *Camelina sativa*; EgWRI1, *Elaeis guineensis*; GhWRI1, *Gossypium hirsutum* (TC200263); OsWRI1, *Oryza sativa* (CAE00853.1); PtWRI1, *Populus trichocarpa* (SRX1079428); Pp3c10, *Physcomitrella patens* (24550V3.2); Pp3c23\_13360V3.1; *Micromonas* sp. RCC299 (RCC57733), *Micromonas pusilla* CCMP1545 (CCM52220); O134044, *Ostreococcus lucimarinus* (34044); Dusal.0066s00042.1, *Dunaliella salina*; RcWRI1, *Ricinus communis* (AB774159.1, AB774160.1); Sm85823, *Selaginella moellendorffii* (85823); StWRI1, *Solanum tuberosum* (SRX1079426); Vocar.0023s0210.1, *Volvox carteri*; ZmWRI1, *Zea mays* (ACF83189.1, ACF80269.1).

도 3은 다양한 식물체 유래 WRI1 오쏘로그간 아미노산 서열 유사도 분석 결과이다.

도 4는 들깨 조직별 PfWRI1의 발현 수준 분석 결과이다. RL, rosette leaves of 4-week-old; ST, stem of 4-week-old; R, roots of 4-week-old; OF, open flowers; DS, developing seeds 10 to 20 days after flowering.  $p < 0.05$ .

도 5는 PfWRI1의 세포 내 위치 확인을 위한 PfWRI1s:eYFP 컨스트럭트의 모식도(A) 및 상기 컨스트럭트를 포함하는 아그로박테리움으로 인필트레이션된 담배 잎의 공초점 레이저 주사현미경 분석 이미지이다. EV: empty vector (pPZP212), scale bar = 20  $\mu$ m.

도 6은 PfWRI1A의 기능 분석에 관한 것으로, (a)는 PfWRI1A:eYFP 컨스트럭트의 모식도(A) 및 상기 컨스트럭트를 포함하는 아그로박테리움으로 인필트레이션된 담배 잎의 공초점 레이저 주사현미경 분석 이미지로 하얀색 화살표 머리는 Nile red로 염색하여 확인된 유체(oil bodies)를 가리키며, (b) 및 (c)는 크로마토그래피 분석 결과로 TAG (triacylglycerol)에 존재하는 지방산 성분을 분석한 결과이고, (d)는 총 FAMES이다.  $p < 0.05$ .

도 7은 저장유 생합성 경로(a) 및 PfWRI1A 또는 PfWRI1B를 발현하는 담배 잎의 WRI1 표적 유전자 발현 수준을 분석한 결과(b, c)이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진, 들깨 (*Perilla frutescens*) 유래 WRI1 (WRINKLED1) 단백질을 제공한다.
- [0019] 본 발명에 따른 들깨 유래 WRI1 단백질의 범위는 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2 또는 서열번호 4로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체의 TAG (triacylglycerol) 함량 증진 활성을 의미한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 들깨 유래 WRI1 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 상기 WRI1 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 3의 염기서열과 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 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 들깨 유래 WRI1 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0022] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 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 벡

터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다.

[0024] 본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, pL $\lambda$  프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*Escherichia coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지  $\lambda$ 의 좌향 프로모터 (pL $\lambda$  프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0025] 한편, 본 발명에 이용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예: pSC101, ColE1, pBR322, pUC8/9, pHC79, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예:  $\lambda$ gt4 ·  $\lambda$ B,  $\lambda$ -Charon,  $\lambda$   $\Delta$ z1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

[0026] 한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 75K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0027] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 식물 발현 벡터이다.

[0028] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)와 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 유전자를 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 형질전환 하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0029] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함한다. 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 포스포노트리신(포스포노트리신)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이크로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 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.

[0031] 본 발명에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린합성효소(nopaline synthase, NOS), 베타-아밀라아제 RAm1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스의 옥토파인 신타아제(Octopine synthase) 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.

[0032] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0033] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 미세조류, 미생물 등을 포함한 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 예컨대, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli*

RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 쉐린겐시스(*B. thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아 마르세센스(*Serratia marcescens*) 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모 (예컨대, *Saccharomyces cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주(*Chinese hamster ovary*), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 식물 세포이다.

[0035] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우,  $\text{CaCl}_2$  방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포솜-매개 형질감염법, DEAE-텍스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한, 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨(*Perilla frutescens*) 유래 WRI1 (WRINKLED1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하여 WRI1 단백질 코딩 유전자를 과발현시키는 단계; 및 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계;를 포함하는 비형질전환 식물체에 비해 TAG (triacylglycerol) 함량이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0037] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직배양 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 et al., 1982, *Nature* 296: 72-74; Negrutiu et al., 1987, *Plant Mol. Biol.* 8: 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito et al., 1985, *Bio/Technol.* 3: 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway et al., 1986, *Mol. Gen. Genet.* 202: 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법(Klein et al., 1987, *Nature* 327: 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜머 파시엔스 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EPA 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 바이너리 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[0038] 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.

[0039] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 열매, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 짝 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 구현 예에 따른 형질전환 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 형질전환된 식물 세포에서 들깨 유래 WRI1 단백질 코딩 유전자의 발현을 증가시키면 비형질전환 식물체에 비해 TAG (triacylglycerol) 함량이 증가된 형질전환 식물체를 제조할 수 있다.

[0041] 용어 "TAG"는 글리세린에 포함된 3개의 히드록시기(-OH)에 지방산 3분자가 에스테르(ester) 결합한 것으로, 식용 유지의 대부분(보통 99% 이상)이 TAG로 구성되어 있다.

[0042] 본 발명은 또한, 상기 제조방법에 의해 제조된, 비형질전환 식물체에 비해 TAG 함량이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다. 전술한 것과 같이, 본 발명의 형질전환 식물체는 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨 유래 WRI1 단백질 코딩 유전자의 발현이 증가된 경우에는 식물체의 TAG 함량이 증가되는 것을 특징으로 한다.

[0043] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 식물체는 바람직하게는 유지식물(oil plant)일 수 있고, 상기 유지식물은 카멜리나, 참깨, 들깨, 유채, 해바라기, 아주까리(피마자), 땅콩, 콩, 코코야자, 기름야자 또는 호호바 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0044] 본 발명은 또한, 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨(*Perilla frutescens*) 유래 WRI1 (WRINKLED1) 단백질 코딩 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 비형질전환 식물체에 비해 식물체의 TAG (triacylglycerol) 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0045] 발명의 일 구현 예에 따른 식물체의 TAG 함량 증가 방법에 있어서, 상기 들깨 유래 WRI1 단백질 코딩 유전자의 발현이 증가된 경우에는 초장 및 종자 크기가 증가되고 출수가 지연될 수 있다.
- [0046] 본 발명은 또한, 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨(*Perilla frutescens*) 유래 WRI1 (WRINKLED1) 단백질 코딩 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 TAG (triacylglycerol) 함량 증가용 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 유효성분으로 서열번호 2 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 들깨 유래 WRI1 단백질 코딩 유전자를 함유하며, 상기 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환 시킴으로써, 식물체의 TAG 함량을 조절할 수 있다.
- [0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] **재료 및 방법**
- [0052] **1. 식물 재료 및 성장 조건**
- [0053] 담배(*Nicotiana benthamiana*)와 들깨(*Perilla frutescens* var. *frutescens*)가 본 발명에서 이용되었다. 각 식물체를 토양(soil: perlite: water = 3:1:1)에 심어 재배하였으며, 본 발명에 사용된 모든 식물체의 성장 조건은 22±1℃의 온도, 50~60%의 습도 및 장일 조건(16시간 명/8시간 암)으로 유지되었다.
- [0055] **2. *PfWRI1s*:eYFP 벡터 구축**
- [0056] 담배 잎에서 들깨 유래 *WRI1* (이하, *PfWRI1*)를 발현시키기 위해서, SacI-*PfWRI1*\_F1 (서열번호 5) 및 XmaI-*PfWRI1*\_R1 (서열번호 6)의 프라이머 세트를 이용하여 약 1,300 bp 크기의 *PfWRI1* cDNA를 증폭하였다. 상기 증폭된 산물에 SacI과 XmaI을 처리하여 자르고, 바이너리 벡터인 pPZP212에 클로닝하였다. 그 후, 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 균주에 freeze-thaw method을 이용하여 형질전환하였다.
- [0058] **3. *CsWRI1A*, *AtWRI1* 및 *PfWRI1s*의 아미노산 서열 다중정렬 및 계통수 분석**
- [0059] 카멜리나 *WRI1* (*CsWRI1A*), 애기장대 *WRI1* (*AtWRI1*) 및 *PfWRI1s*의 서열 유사성을 CLUSTALW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>) 및 GeneDoc (<https://genedoc.software.informer.com/>) 프로그램을 이용한 다중 서열 정렬을 통해 분석하였다. *PfWRI1*의 염색체 서열 정보는 농촌진흥청 이경렬 박사로부터 제공받았다.
- [0060] 종간 계통수 분석은 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 및 Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)을 사용하여 수행하였다. 들깨 유래 *WRI1* 및 다양한 종의 *WRI1*의 아미노산 서열은 MEGA10 프로그램을 이용하여 준비하였으며, 1,000 반복의 bootstrap 방법으로 진행하였다.
- [0062] **4. 총 RNA 분리 및 RT-PCR 분석**
- [0063] 개화 후 2~3주째의 발달 중인 종자로부터 Luis Onate-Sanchez and Jesus Vicente-Carbajosa (BMC Res Notes. 2008 Oct 20;1:93)의 방법을 일부 변형하여 총 RNA를 추출하였다. 액체질소 하에서 곱게 간 종자 시료를 추출 버퍼(8 M LiCl, 1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 M EDTA, 10 % sodium dodecyl sulfate) 및 클로로포름과 섞은 후 10초간 볼텍싱하고, 13,000 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮긴 후 페놀:클로로포름:이소아밀알코올 (Ambion, AM9720)을 넣고 10초간 볼텍싱하고 13,000 rpm으로 3분간 원심분리하였다. 새로운 튜브로 옮긴 상층액에 8 M 염화리튬을 넣고 인버팅한 후 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 30분간 원심분리하였다.

수득된 펠렛을 0.1% DEPC-water에 용해시킨 후 RNase-free DNase I (Qiagen)으로 4℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 상기 0.1% DEPC에 페놀:클로로포름:이소아밀알코올을 첨가한 후 13,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상층액을 새로운 튜브로 옮기고, 상층액의 1/10에 3 M 아세트산나트륨 및 2배 볼륨의 70% 에탄올을 첨가한 후 -20℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 침전 반응이 완료되면, 13,000 rpm에서 20분동안 원심분리하고, 상층액을 제거한 뒤, 70% 에탄올을 넣어 탭핑 후 원심분리하고, 최종적으로 획득한 펠렛을 0.1% DEPC-water에 용해시켰다. 추출한 총 RNA를 dT 프라이머와 함께 70℃에서 5분간 반응시켰으며, 반응 종료 후 GoScript™ 5X 반응 버퍼, 25 mM 염화마그네슘, 0.5 mM dNTP 및 GoScript™ 역전사효소를 추가하고 25℃에서 5분, 42℃에서 60분, 그리고 70℃에서 15분 반응시켜 역전사 반응을 수행하였다. 합성된 cDNA는 RT-PCR 분석에 사용하였다.

[0064] 들개의 조직별 *PfWRI1* 유전자 발현을 분석하기 위해, 3~4주령 들개의 잎, 줄기, 뿌리와 개화된 꽃에서 Total RNA kit (Qiagen)를 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 이용하여 전술한 방법으로 cDNA를 합성하였으며, 합성된 cDNA는 유전자 특이적 프라이머 세트를 이용하여 RT-PCR 반응에 사용되었다.

## 표 1

본 발명에 사용된 프라이머 정보

| Contents                                               | Primer name      | Sequence information (from 5' to 3')           | 서열번호 |
|--------------------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------|------|
| PfWRI1:eYFP                                            | SacI-PfWRI1_F1   | GGC GAG CTC ATG AAG AGA AAG TCT CCC TCA CCA GC | 5    |
|                                                        | XmaI-PfWRI1_R1   | GCC CCG GGC ATG TTG CTG CAA GCT GAT ATG GTC    | 6    |
| RT-PCR                                                 | PfWRI1_F1        | CAC CTG AGC CAG AAT CGA AAG                    | 7    |
|                                                        | PfWRI1_R1        | GTC GAT GAT AAT GGC GAC GAC                    | 8    |
| Perilla internal control                               | PfACT_F1         | TAC AGA GGC ACC TCT CAA CCC                    | 9    |
|                                                        | PfACT_R1         | CAC GAA CAA TTT CCG GCT CGG                    | 10   |
| Transiently expression in <i>N. benthamiana</i> leaves | qRT-NbACT2_F1    | TGT TCT CAG TGG TGG CTC CA                     | 11   |
|                                                        | qRT-NbACT2_R1    | TGG AAT GTG CTG AGG GAT GC                     | 12   |
|                                                        | qRT-NbBCCP2_F1   | GGT TGG TGA CAA AGT GCA GAA                    | 13   |
|                                                        | qRT-NbBCCP2_R1   | CAA CAC TGA CAG GCT TGC CA                     | 14   |
|                                                        | qRT-NbKAS1_F1    | CCG AGC CTT CCG TTG AGT T                      | 15   |
|                                                        | qRT-NbKAS1_R1    | GAC AAC GGA GTT GTG ACC ACC                    | 16   |
|                                                        | qRT-NbPI-PKβ1_F1 | GGG TGC AGA GGA GAC CTT CA                     | 17   |
|                                                        | qRT-NbPI-PKβ1_R1 | GTG AGT AGA TTG GAG CCG CC                     | 18   |

[0065]

[0066] RT-PCR 반응은 94℃ 5분을 1회; 94℃ 30초, 61℃ 30초 및 72℃ 30초의 과정을 총 28회; 72℃ 7분을 1회 진행하도록 설정하였으며, Prime Taq Premix (GENET BIO, Cat No G-2000)를 사용하였다. 유전자 발현의 정량적 평가는 액틴 유전자의 발현 수준으로 산출하였다.

## [0068] 5. 세포 내 위치 분석

[0069] 35S 프로모터 하에서 발현 조절되는 PfWRI1A:eYFP 또는 PfWRI1B:eYFP 컨스트럭트를 아그로박테리움 튜머파시엔스 GV3101에 형질전환하였다. 그 후 상기 아그로박테리움을 담배 잎에 인필트레이션하였다. 인필트레이션 후 48시간 췌에 각 담배 잎을 공초점 레이저 주사현미경(TCS SPE, Leica Microsystems, Germany)으로 관찰하였다. YFP 형광 신호는 488 nm/ 532 nm(excitation/emission) 파장에서 관찰하였다.

[0070] 세포 내에서 PfWRI1A 또는 PfWRI1B 단백질이 어떤 세포소기관에 위치하는지 확인하기 위해, WOLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 및 TargetP (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TargetP-2.0>)를 사용하였다. *PfWRI1s*:eYFP로 인필트레이션한 잎을 5 µg/ml(in PBS)의 DAPI 용액(Sigma D9542)으로 5분간 염색하고 증류수로 1~2회 세척한 후 DAPI(em 359nm/ex 461nm) 및 YFP(em 488 nm/ex 532 nm)의 형광을 관찰하였다.

## [0072] 6. *WRI1*의 표적 유전자 발현 수준 분석

[0073] *WRI1*의 표적 유전자 발현 수준을 분석하기 위해, phytozome v13 (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>)으로부터 *PI-PKβ1*, *PDH-E1a*, *BCCP2*, *KAS1* 및 *FATA*의 서열을 얻었다. 담배 유전자를 조사하기 위해 애기장대 유전자를 주형으로 하여 Sol Genomic Network ([https://solgenomics.net/organism/Nicotiana\\_benthamiana/genome](https://solgenomics.net/organism/Nicotiana_benthamiana/genome))에서

Blast를 수행하였다. 담배는 사배체(tetraploid)이기 때문에 4n으로 추정되는 두 유전자를 구별할 수 있었다. 각 유전자에 특이적인 프라이머 세트(표 1)를 이용하여 발현 수준을 분석하였다.

## 7. 나일 레드(Nile red) 염색

PfWRI1A:eYFP, PfWRI1B:eYFP 또는 공벡터(pPZP212)를 포함하는 아그로박테리움을 OD<sub>600</sub>=0.8까지 배양한 뒤 인필트레이션 용액[10 mM MES (pH 5.7), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM Acetosyringone]을 사용하여 P19 세포와 혼합하여 OD<sub>600</sub>=0.125으로 맞춘 후 4~5주령의 담배 식물체의 잎에 주입하였다. 그 후 아그로박테리움이 주입된 잎을 나일 레드 용액[10 μg/ml in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), Sigma-N3013]을 이용하여 상온의 암조건에서 30분간 염색하였다. Tris-HCl 버퍼로 2회 세척하고 유체(oil body) 형성을 공초점 레이저 주사현미경을 이용하여 560 nm/ 615 nm (excitation/emission)에서 관찰하였다.

## 8. TLC (Thin layer chromatography) 분석

형질전환된 아그로박테리움을 인필트레이션한 6일 후 담배 잎 조직을 액체질소 하에서 미세하게 분쇄하여 동결 건조하였으며, 건조된 분말 5 mg을 분석샘플로 사용하였다. 시료를 함유한 유리관에 내부표준(Glycerol triheptadecanoate in chloroform) 15 μg/ml, 클로로포름:메탄올(2:1) 1.5 ml, 철 비즈 3개를 첨가하여 10분간 볼텍싱하였다. 상기 혼합물을 0.1 M 염화칼륨 500 μl에 넣고 5분간 볼텍싱한 후, 600 rpm에서 원심분리하고, 하부 지질상을 새로운 유리 튜브로 옮겼다. 질소를 이용하여 지질 추출물을 증발시킨 후, 농축된 지질을 클로로포름 100 μl로 용해하였다. 추출된 지질은 120℃에서 2시간 동안 데워진 TLC 플레이트(Kieselgel 60, MERC)에 모세관 부착하였다. 부착된 TLC 플레이트는 헥산:디에틸 에테르(diethyl ether):아세트산(70:30:1, v/v) 버퍼에서 각각 20분, 60분 동안 두 번 분리되었다. 분리 후 TLC 플레이트에 0.01%의 primuline (Sigma-206865)을 함유한 80% 아세톤을 분사하고 건조시킨 후 TAG는 자외선으로 표시되었다(Vanhercke et al., FEBS Lett. 2013 Feb 14;587(4):364-9). 표시된 TAG를 벗겨내어 톨루엔 및 5% 황산(in methanol)과 혼합한 후 90℃에서 90분간 에스테르화하였다. 에스테르화된 TAG는 가스 크로마토그래피를 이용하여 위와 같은 방법으로 지방산을 분석하였다.

## 9. 가스 크로마토그래피를 이용한 지방산 분석

분석 시료로는 PfWRI1 과발현 2세대의 건조된 종자 7개를 사용하였다. 분석 시료를 유리관에 넣고 5% 황산(in methanol) 1 ml과 톨루엔 1 ml을 첨가하여 90~95℃에서 90분간 트랜스메틸화하였다. 이때 glyceryl triheptadecanoate (C17:0) 50 μg을 내부표준으로 사용했다. 트랜스메틸화 및 냉각 후 각 반응 시료의 FAME (fatty acid methyl esters) 튜브에 0.9%(w/v) 염화나트륨 수용성 1.5 ml과 헥산(hexane) 2 ml을 첨가하였다. 볼텍싱 후 원심분리기를 사용하여 600 rpm에서 5분간 분리하여 FAME를 함유한 상등액을 추출하였다. 헥산 2 ml을 이용하여 총지방산 추출을 3회 반복하였다. FAME를 농축하기 위해 추출한 용액을 질소 가스로 완전히 증발시켰다. 농축된 FAMEs를 헥산 100 μl에 녹여 DB-23 column (30 mm×0.25 mm, 막두께 0.25 μm, J&W Scientific, USA)을 장착한 GC-2010(Shimadzu, Japan)에서 반응시켰다. 반응 조건은 160℃에서 220℃로 분당 2.5℃의 속도로 증가하도록 설정되었다. 각 FAME에 대해 내부 표준의 유지 시간과 피크 영역을 비교 및 분석하였다.

## 실시예 1. 들깨의 WRI1의 서열 분석

들깨에서 WRI1 오쏘로그(ortholog)를 분리하기 위해 농촌진흥청 이경렬 박사 연구팀으로부터 PfWRI1의 RNA-seq 데이터를 얻어 PfWRI1 유전자 특이 프라이머를 제작하였다. 시퀀스 분석 결과, PfWRI1의 긴 형태(1,200 bp)는 PfWRI1의 짧은 형태(1,197 bp)와 거의 동일한 것으로 나타났다(도 1). PfWRI1의 긴 cDNA와 짧은 cDNA를 각각 PfWRI1A와 PfWRI1B로 명명하였다. PfWRI1A 및 PfWRI1B의 아미노산 서열을 정렬하기 위해 각 뉴클레오타이드 서열을 아미노산 서열로 변환하였다. PfWRI1A, PfWRI1B 및 AtWRI1의 아미노산 서열을 정렬하였으며, PfWRI1은 AP2/EREBP 전사인자군에 속함을 알 수 있었다. PfWRI1A 및 PfWRI1B는 AtWRI1의 기능성 모티프인 'VYL' 대신 'IYL'을 가지며, PfWRI1의 아이소폼인 PfWRI1A와 PfWRI1B의 뉴클레오타이드 서열 유사성은 약 98%로 매우 유사하여 두 아이소폼이 매우 잘 보존되었음을 알 수 있었다.

애기장대 이후 다양한 작물에서 WRI1의 오쏘로그가 확인되었으며, 옥수수(ZmWRI1a 및 ZmWRI1b)와 카멜리나

(CsWRI1A, B 및 C)를 제외하고, 대부분의 WRI1 오쏘로그는 한 가지 형태로 존재하는 것으로 보고되었다. 계통발생학적 분석에 따르면, PfWRI1s는 현재 식물에서 확인된 다양한 WRI1s 중 애기장대와 유채(*B. napus*)에 가까운 군집으로 분류되었다(도 2).

[0088] 실시예 2. 들깨 *WRI1*의 발현 경향

[0089] 들깨에서 종자 및 다양한 조직 발달 시 PfWRI1의 발현 수준을 분석하였다. PfWRI1A와 PfWRI1B는 두 유전자의 상동성이 높아 분리하기가 어려웠기 때문에 총 PfWRI1의 발현을 2개의 아이소폼을 포함하여 분석하였다. 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 로제트 잎, 줄기, 뿌리, 꽃, 발달 중인 종자 샘플에서 RT-PCR과 RT-qPCR을 통해 발현 수준을 확인하였다. 그 결과 도 4에 개시된 바와 같이 총 PfWRI1의 유전자 발현은 다른 조직보다 발달 중인 씨앗에서 높게 발현되는 것이 확인되어 이전의 다른 연구들과 유사한 경향을 나타내었다.

[0091] 실시예 3. 들깨 *WRI1*의 세포 내 위치

[0092] PfWRI1A:eYFP 및 PfWRI1B:eYFP로 형질전환된 아그로박테리움(GV3103주)으로 인필트레이션 된 담배 잎에서, 아그로박테리움 주입 48시간 후 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰한 결과, PfWRI1A와 PfWRI1B는 모두 세포내 핵에 위치하는 것을 알 수 있었다(도 5).

[0094] 실시예 4. 들깨 *WRI1*의 유체(oil body)의 축적에 미치는 영향 분석

[0095] PfWRI1A와 PfWRI1B가 유체 형성에 기여하는지 여부를 분석하기 위해 담배 잎에 PfWRI1A와 PfWRI1B를 각각 일시적으로 발현시켰다. PfWRI1A를 포함한 아그로박테리움 침윤 6일 후의 잎을 나일 레드 용액으로 염색하여 공초점 레이저 주사현미경으로 관찰한 결과, 대조구(EV) 대비 PfWRI1A와 PfWRI1B 모두 담배 잎에서 유체 형성을 증진시키는 것으로 확인되었다(도 6a). 이는 PfWRI1s가 식물체에서 TAG를 축적할 수 있음을 시사하였다.

[0096] PfWRI1A와 PfWRI1B가 TAG를 축적할 수 있는지 조사하기 위해 PfWRI1A와 PfWRI1B를 각각 포함하는 아그로박테리움으로 담배 잎을 인필트레이션한 6일 후, 침윤된 담배 잎을 TLC 및 GC 분석에 사용하였다. 분석 결과, PfWRI1A와 PfWRI1B를 발현하는 담배 잎의 총 FAMES는 대조구 대비 각각 약 2.9배 및 2.7배 증가하였고(도 6d). 팔미트산(C16:0), 스테아릭산(C18:0), 올레익산(C18:1), 리놀레익산(C18:2), 리놀레닉산(C18:3)의 지방산 함량 또한 PfWRI1A와 PfWRI1B를 과발현하는 담배 잎에서 대조구 대비 각각 증가된 것이 관찰되었다(도 6b, 6c).

[0098] 실시예 5. 들깨 *WRI1*의 표적 유전자 발현 증진

[0099] PfWRI1s가 *WRI1* 표적 유전자 발현을 조절하는지 여부를 조사하기 위해 PfWRI1A와 PfWRI1B를 일시적으로 과발현시킨 담배 잎 시료에서 총 RNA를 추출하였다. 추출한 총 RNA로 cDNA를 합성한 후 담배 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 RT-qPCR을 수행한 결과, 대조구(EV)에 비해 *WRI1*의 표적 유전자인 *NbPI-PKβ1*, *NbKAS1* 및 *NbFATA*의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었고(도 7b, 7c), 이의 결과를 통해 PfWRI1A와 PfWRI1B가 *WRI1*의 표적 유전자를 상향 조절하고 PfWRI1s가 식물체의 오일 축적을 증가시킬 수 있을 것으로 기대되었다.

도면

도면1a

a

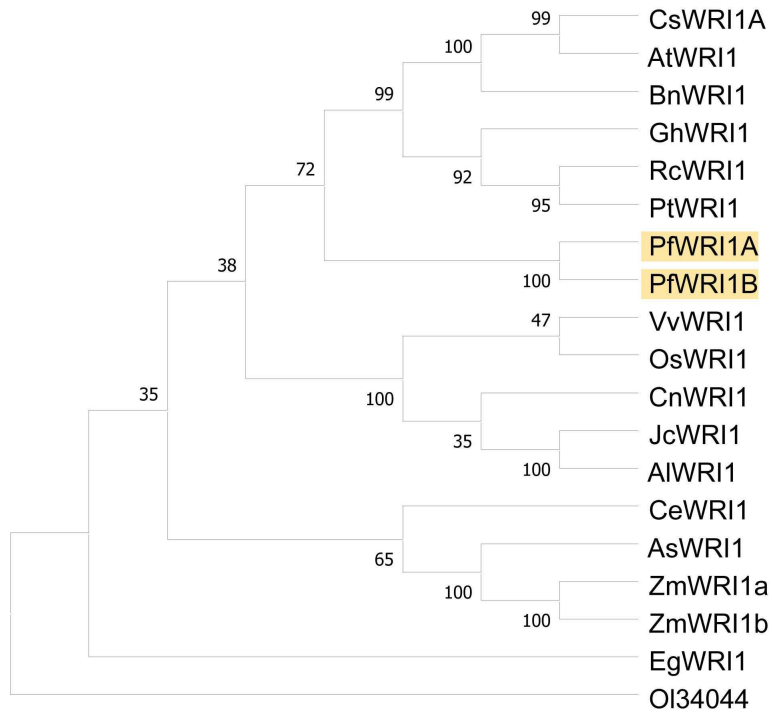
|                                                              |      |
|--------------------------------------------------------------|------|
| ATGAAGAGAAAGTCTCCCTCACCAGCTTGCTCCTCCTCCTCCTCCTGCTGCATCGAA    | 60   |
| M K R K S P S P A C S S S S S S C C I E                      | 20   |
| TCGCCAACCACGCAGAAAAATGCGCCGAATCAAAGCCCGACGCGTCAAACCCAAGCCC   | 120  |
| S P T T Q K N A P Q S K P D A V K P K P                      | 40   |
| AAACGCGTTTCGAGCGAAGAAAAACCAGAGCCACAGCAATTCGCCACCTCCCCTAAATCG | 180  |
| K R V R A K K N Q S H S N S A T S P K S                      | 60   |
| CGAAGCTCCATCTACAGAGGCGTCACTAGGCATAGATGGACGGGAGGTAAGAAGCTCAC  | 240  |
| R S S I Y R G V T R H R W T G R Y E A H                      | 80   |
| CTCTGGGATAAGACGACATGGAACAGCATTGAGAACAAGCGAGGAAGACAAATCTATTTA | 300  |
| L W D K T T W N S I Q N K R G R Q I Y L                      | 100  |
| GGAGCTTATGATAATGAGGAAGATGCGGCTCGGACCTACGATCTAGCTGCCCTTAAATAT | 360  |
| G A Y D N E E D A A R T Y D L A A L K Y                      | 120  |
| TGGGGCCCTGCTACTATCCTCAACTTTCCTGTAGAGGCCACACCAAAATCTTGAGGAG   | 420  |
| W G P A T I L N F P V E A Y T K D L E E                      | 140  |
| ATGCAAAAATTGACTAAGGAGGATTTAGCCTCGCTTAGGCGGCGGAGTAGCGGCTTT    | 480  |
| M Q K L T K E E Y L A S L R R R S S G F                      | 160  |
| TCGCGGGAGTTTCTAAGTATCGCGGTGTAGCAAGGCACCATCACAATGGCCGGTGGGAG  | 540  |
| S R G V S K Y R G V A R H H H N G R W E                      | 180  |
| GCTCGAATTGGGCGTGTGTGCGGAAACAAGTATCTCTACCTAGGAACCTACAGCACCCAA | 600  |
| A R I G R V C G N K Y L Y L G T Y S T Q                      | 200  |
| GAGGAAGCAGCAGCAGCATATGATATGGCAGCAATAGAATTCAGAGGTCCAAACGCTGTA | 660  |
| E E A A A A Y D M A A I E F R G P N A V                      | 220  |
| ACAAATTCGACGTAAGTAATTATGCAGATAAGTTAAAGAAATTCCTACCGAGGTGCAT   | 720  |
| T N F D V S N Y A D K L K K F L P E V H                      | 240  |
| GTCAGACAGGAAGAGGTTCATGTGAAGCAGGAAACCAATTCTGTATCCCTGATGAAGAA  | 780  |
| V R Q E E V H V K Q E T N S V I P D E E                      | 260  |
| GTACAAGCAGTTCAAGCACAAGATAATCAAGAATATCCAAACCAGTTTGCTCAAACAAGT | 840  |
| V Q A V E A Q D N Q E Y P N Q F A Q T S                      | 280  |
| ACACCTGAGCCAGAATCGAAAGATTCCATTGAGTCGGAAGACATACTCGTCATGGACCTG | 900  |
| T P E P E S K D S I E S E D I L V M D L                      | 300  |
| TCCGAGGAGCAGCAGAACCCCTGGGATCTCTGTCTAGACACTGTATTCAATATCCTCCCA | 960  |
| S E E H E N P W D L C L D T V F N I L P                      | 320  |
| ATCCCTGACCTTCCTCTGGGTAAAGCCTCCGAGGTATTCGATTACCATGGTTTGGAGAC  | 1020 |
| I P D L P L G K A S E V F D Y H G F E D                      | 340  |
| GATATTGAATGCATCTTCGACGAGCCATTAGATGATAATGAGAACTCCAGAATGCAATG  | 1080 |
| D I E C I F D E P L D D N E N F Q N A M                      | 360  |
| CTTGGATGCCAGGTTGATGCAGATGCTTTGGTATCTCAAACTGAAAGGGACGAATTCT   | 1140 |
| L G C Q V D A D A L V S Q N L K G T N S                      | 380  |
| CCTTCTTCTCCTTCCTCGTCGCCATTATCATCGACCATATCAGCTTGACGCAACATGTAA | 1200 |
| P S S P S S S P L S S T I S A C S N M *                      | 400  |

도면 1b

**b**

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| ATGAAGAGAAGTCTCCCTCACCAGCTTGCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTGCTGC         | 60   |
| M K R K S P S P A C S S S S S S S S C C                       | 20   |
| ATCGAATCGCAACCGCGCAGAAAAATGCGCCGAATCAAAGGCCGACGCGGTCAAACCC    | 120  |
| I E S P T A Q K N A P Q S K A D A V K P                       | 40   |
| AAGCCCCAACCGCGTTCGAGCGAAGAAAAACCGAGGCCACGCAATTCCGCCACCTCCCCT  | 180  |
| K P K R V R A K K N Q S H S N S A T S P                       | 60   |
| AAATCGCGCAGCTCCATCTACAGAGGCGTCACTAGGCATAGATGGACTGGGAGGTACGAA  | 240  |
| K S R S S I Y R G V T R H R W T G R Y E                       | 80   |
| GCTCACCTCTGGGATAAGACGACATGGAACAGCATTGAGAACAAGCGAGGAAGACAAATC  | 300  |
| A H L W D K T T W N S I Q N K R G R Q I                       | 100  |
| TATTTAGAGCTTATGATAATGAGGAAGATGCGGCTCGGACCTACGATCTAGCTGCCCTT   | 360  |
| Y L G A Y D N E E D A A R T Y D L A A L                       | 120  |
| AAATATTGGGGCCCTGCTACTATCCTCAACTTTCTGTAGAGGCCTACACCAAAGATCTT   | 420  |
| K Y W G P A T I L N F P V E A Y T K D L                       | 140  |
| GAGGAGATGCAAAAATTGACTAAGGAGGAGTATTTAGCCTCGCTTAGCGCGCGGAGTAGC  | 480  |
| E E M Q K L T K E E Y L A S L R R R S S                       | 160  |
| GGCTTTTCGCGGGGAGTTTCTAAGTATCGCGGTGTAGCAAGGCACCATCACAATGGCCGG  | 540  |
| G F S R G V S K Y R G V A R H H H N G R                       | 180  |
| TGGGAGGCTCGAATTGGGCGCGTTTTCGCGAAACAAGTATCTCTACCTAGGAACCTACAGC | 600  |
| W E A R I G R V C G N K Y L Y L G T Y S                       | 200  |
| ACCCAAGAGGAAGCAGCAGCAGCATATGATATGGCAGCAATAGAATTCAGAGGTCCAAAC  | 660  |
| T Q E E A A A A Y D M A A I E F R G P N                       | 220  |
| GCTGTAAACAATTTCCGATGTAAGTAATTATGCAGATAAGTTAAAGAAATTCCTACCGGAG | 720  |
| A V T N F D V S N Y A D K L K K F L P E                       | 240  |
| GTGCAATCTCAGACGGAAGAGGTTCATGTGAAGCAGAAACCAATCTGTGTAATCCTTGAT  | 780  |
| V Q V R Q E E V H V K Q E A T N S V T L D                     | 260  |
| GAAGAAGTACAAGCAGTTAAGCACAAGATAATCAAGAATATCCAACCAGTTTGCTCAA    | 840  |
| E E V Q A V K A Q D N Q E Y P N Q F A Q                       | 280  |
| ACAAGTACACTGAGCCAGAATCGAAAGATTCCATTGAGTCGGAAGACATACTCGTCATG   | 900  |
| T S T P E P E S K D S I E S E D I L V M                       | 300  |
| GACCTGTCCGAGGAGCACGAGTACCCTTGGGATCTCTGTCTAGACACTGTATTCAATATC  | 960  |
| D L S E E H E H P W D L C L D T V F N I                       | 320  |
| CTCCCAATCCCTGACCTTCCTCTGGGTAAAGCCTCCGAGGTATTCGATTACCATTGGTTTT | 1020 |
| L P I P D L P L G K A S E V F D Y H G F                       | 340  |
| GAGGACGATATTGAATGCATCTTCGACGAGCCATTAGATGATAATGAGAACTTCAGAAT   | 1080 |
| E D D I E C I F D E P L D D N E N F Q N                       | 360  |
| GCAATGCTTGATGCCAGGTTGATGCAGATGCTTTGGTATCTCAAACCTTGAAAGGGACG   | 1140 |
| A M L G C Q V D A D A L V S Q N L K G T                       | 380  |
| AATTCTCCTTCCTCGTCGCCATTATCATCGACCATATCAGCTTGCGAGCAACATGTAA    | 1197 |
| N S P S S S P L S S T I S A C S N M *                         | 398  |

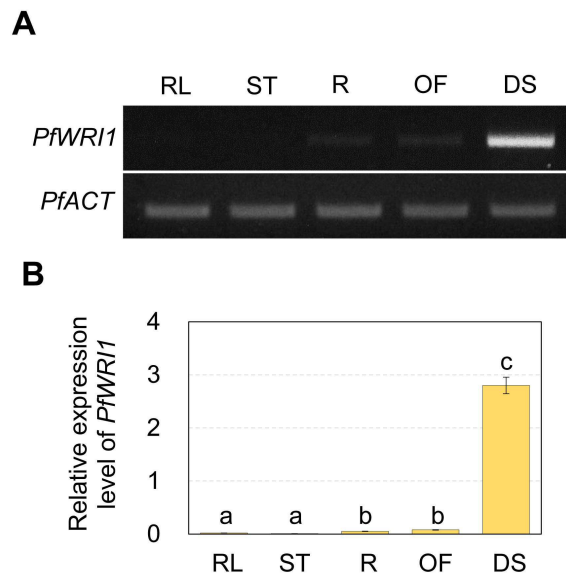
도면2



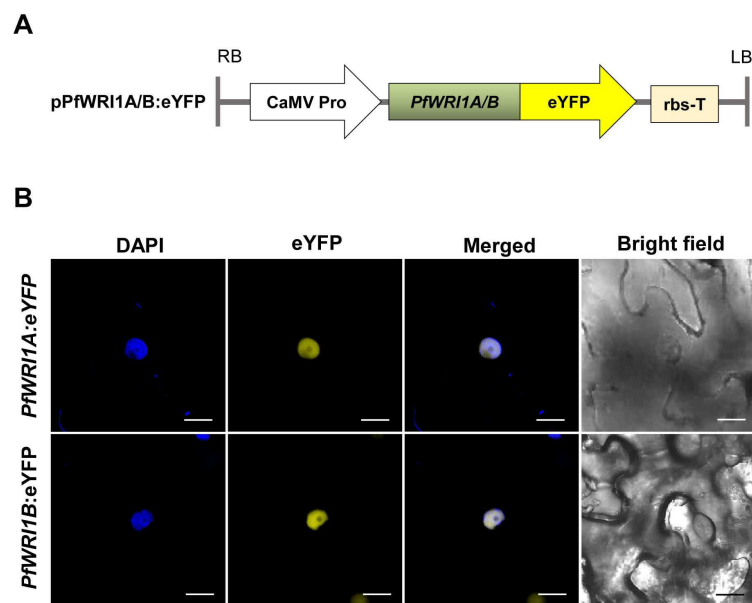
Amino acid sequence analysis of WR11 orthologs in various plants.

| Query<br>sequence | Query coverage(%) |        |       |        |        |        |       |        |        |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |        |    |
|-------------------|-------------------|--------|-------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|----|
|                   | PtWR1A            | PtWR1B | AtWR1 | CsWR1A | CsWR1B | CsWR1C | BaWR1 | ZmWR1a | ZmWR1b | GhWR1 | EgWR1 | RcWR1 | PtWR1 | AsWR1 | CsWR1 | JcWR1 | VvWR1 | AtWR1 | OsWR1 | CnWR1 | OS4044 |    |
| PtWR1A            |                   | 96     | 46    | 47     | 47     | 47     | 49    | 41     | 41     | 45    | 43    | 45    | 49    | 42    | 45    | 25    | 21    | 18    | 30    | 22    | 48     |    |
| PtWR1B            |                   |        | 46    | 46     | 48     | 46     | 49    | 42     | 41     | 46    | 43    | 45    | 50    | 43    | 45    | 25    | 22    | 18    | 31    | 22    | 48     |    |
| CsWR1A            |                   | 46     |       | 84     | 83     | 83     | 75    | 42     | 41     | 51    | 42    | 50    | 54    | 40    | 46    | 24    | 24    | 32    | 34    | 23    | 47     |    |
| CsWR1B            |                   | 47     | 46    | 84     |        | 95     | 94    | 79     | 43     | 42    | 50    | 41    | 49    | 54    | 40    | 19    | 24    | 23    | 32    | 23    | 47     |    |
| CsWR1C            |                   | 47     | 48    | 83     | 95     |        | 95    | 79     | 43     | 42    | 50    | 43    | 47    | 57    | 40    | 46    | 29    | 22    | 25    | 32    | 47     |    |
| BaWR1             |                   | 47     | 46    | 83     | 94     | 95     |       | 78     | 42     | 42    | 50    | 43    | 47    | 57    | 41    | 45    | 24    | 22    | 27    | 32    | 47     |    |
| ZmWR1a            |                   | 49     | 49    | 75     | 79     | 79     | 78    | 43     | 42     | 52    | 42    | 49    | 57    | 41    | 46    | 24    | 20    | 25    | 31    | 20    | 48     |    |
| ZmWR1b            |                   | 41     | 42    | 42     | 43     | 43     |       | 43     | 42     | 42    | 43    | 42    | 41    | 44    | 59    | 46    | 20    | 23    | 21    | 32    | 19     | 48 |
| GhWR1             |                   | 41     | 41    | 41     | 42     | 42     | 42    | 42     | 42     | 42    | 41    | 40    | 43    | 57    | 44    | 23    | 23    | 25    | 22    | 17    | 47     |    |
| EgWR1             |                   | 45     | 46    | 51     | 50     | 50     | 50    | 52     | 43     | 42    |       | 43    | 48    | 58    | 41    | 47    | 19    | 23    | 25    | 34    | 24     | 47 |
| RcWR1             |                   | 43     | 43    | 42     | 41     | 43     | 43    | 42     | 42     | 41    | 43    | 39    | 40    | 41    | 40    | 23    | 19    | 23    | 19    | 27    | 44     |    |
| AtWR1             |                   | 45     | 45    | 50     | 49     | 47     | 49    | 41     | 40     | 48    | 39    |       | 59    | 38    | 41    | 26    | 18    | 24    | 31    | 22    | 46     |    |
| PtWR1             |                   | 49     | 50    | 54     | 54     | 57     | 57    | 44     | 43     | 58    | 40    | 59    |       | 47    | 47    | 29    | 18    | 24    | 31    | 23    | 48     |    |
| AsWR1             |                   | 42     | 43    | 40     | 40     | 40     | 41    | 41     | 59     | 57    | 41    | 38    | 47    |       | 45    | 26    | 24    | 23    | 37    | 20    | 48     |    |
| CsWR1             |                   | 45     | 45    | 46     | 46     | 46     | 45    | 46     | 46     | 44    | 47    | 41    | 47    | 45    |       | 25    | 21    | 25    | 32    | 21    | 46     |    |
| JcWR1             |                   | 25     | 25    | 24     | 19     | 29     | 24    | 24     | 20     | 23    | 19    | 23    | 26    | 29    | 26    | 25    |       | 45    | 52    | 59    | 39     | 19 |
| VvWR1             |                   | 21     | 22    | 24     | 24     | 22     | 22    | 20     | 23     | 23    | 19    | 18    | 18    | 24    | 21    | 45    |       | 41    | 49    | 36    | 18     |    |
| AtWR1             |                   | 18     | 18    | 32     | 23     | 25     | 27    | 25     | 21     | 25    | 23    | 24    | 24    | 23    | 25    | 52    | 41    |       | 52    | 35    | 19     |    |
| OsWR1             |                   | 30     | 31    | 34     | 32     | 32     | 32    | 31     | 32     | 22    | 34    | 19    | 31    | 37    | 32    | 59    | 49    | 52    |       | 43    | 15     |    |
| CnWR1             |                   | 22     | 22    | 23     | 23     | 22     | 24    | 20     | 19     | 17    | 24    | 27    | 22    | 23    | 20    | 39    | 36    | 35    |       |       |        |    |
| OS4044            |                   | 48     | 48    | 47     | 47     | 47     | 47    | 48     | 48     | 47    | 44    | 46    | 48    | 48    | 46    | 19    | 18    | 19    | 15    | 14    | 14     |    |

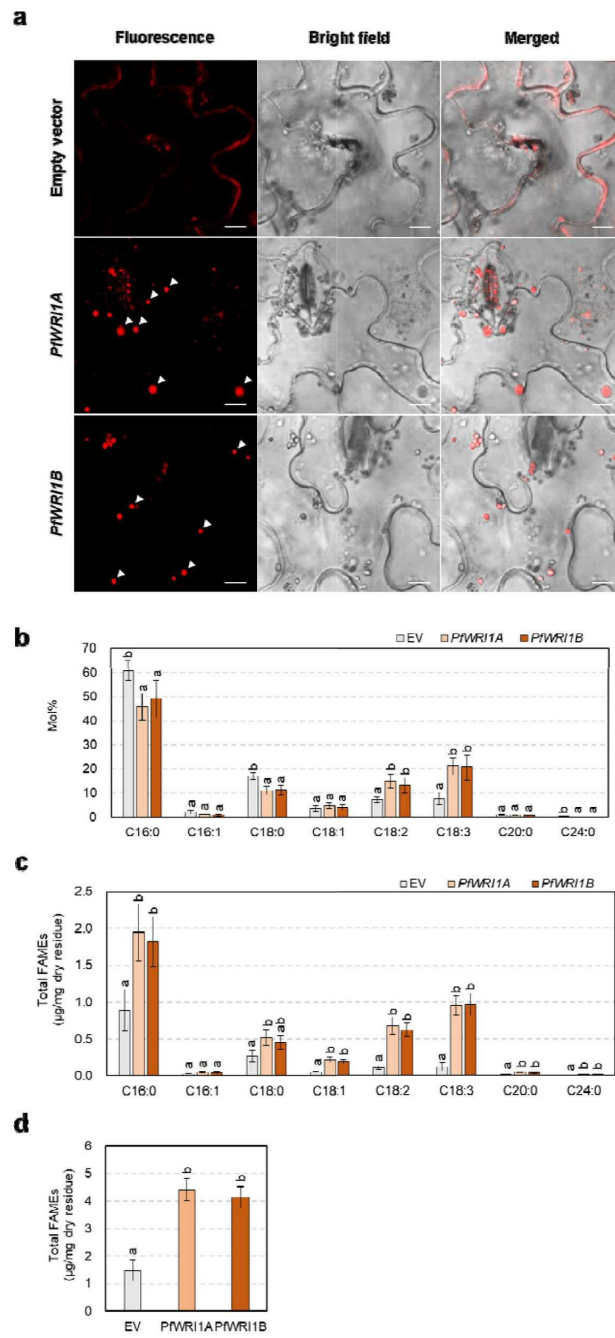
도면4



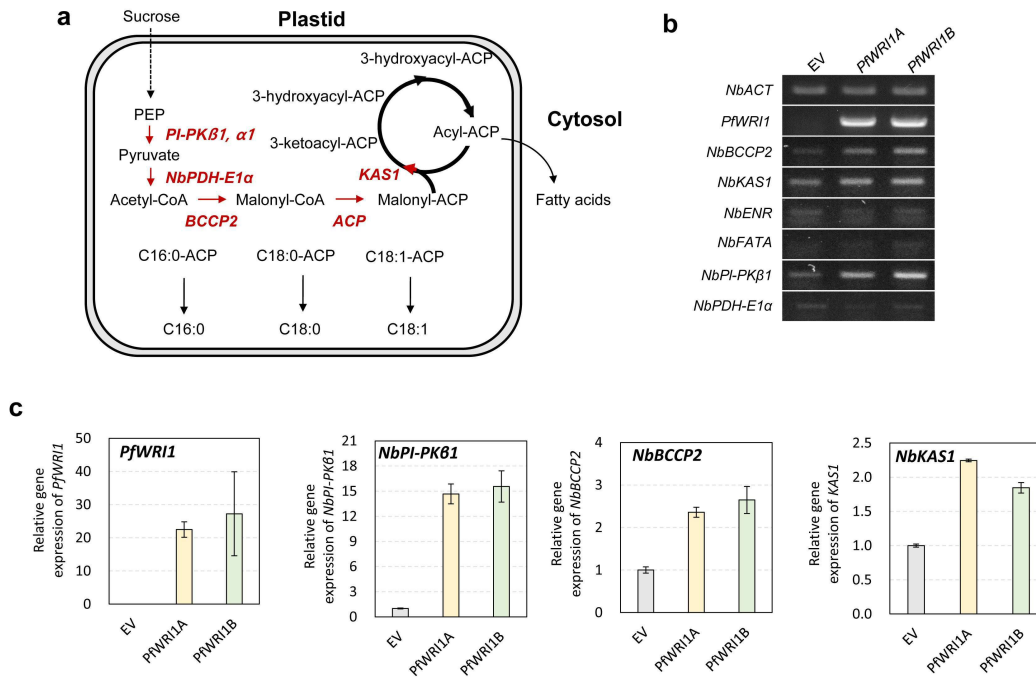
도면5



도면6



## 도면7



## 서열 목록

- <110> SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION
- <120> WRI1 gene derived from Perilla frutescens increasing TAG content of plant and uses thereof
- <130> PN22104
- <160> 18
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1200
- <212> DNA
- <213> Perilla frutescens
- <400> 1

```

atgaagagaa agtctccctc accagcttgc tctctctect cctctctctg ctgcctcga 60
tcgccaacca cgcagaaaaa tgcgcgcgcaa tcaaagcccg acgccgtcaa acccaagccc 120
aaacgcgttc gagcgaagaa aaaccagagc cacagcaatt ccgccacctc ccctaaatcg 180

cgaagctcca tctacagagg cgtcactagg catagatgga ccgggaggta tgaagctcac 240
ctctgggata agacgacatg gaacagcatt cagaacaagc gaggaagaca aatctattta 300
ggagcttatg ataatgagga agatgcggct cggacctacg atctagctgc ccttaaatat 360
tggggccctg ctactatctt caactttctt gtagaggcct acaccaaaaga tcttgaggag 420

```

atgcaaaaat tgactaagga ggagtattta gcctcgctta ggcggcggag tagcggcttt 480  
tcgcggggag tttctaagta tcgcggtgta gcaaggcacc atcacaatgg ccggtgggag 540  
gctcgaattg ggcgtgtttg cggaacaag tatctctacc taggaaccta cagcacccaa 600

gaggaagcag cagcagcata tgatatggca gcaatagaat tcagaggtcc aaacgctgta 660  
acaaatttcg acgtaagtaa ttatgcagat aagttaaaga aattcctacc ggaggtgcat 720  
gtcagacagg aagaggttca tgtgaagcag gaaaccaatt ctgttatccc tgatgaagaa 780  
glacaagcag ttgaagcaca agataatcaa gaatatccaa accagtttgc tcaaacaagt 840  
acacctgagc cagaatcgaa agattccatt gagtcggaag acatactcgt catggacctg 900  
tccgaggagc acgagaaccc ttgggatctc tgtctagaca ctgtattcaa taccctccca 960  
atccctgacc ttctctggg taaagcctcc gaggtattcg attacatgg ttttgaggac 1020

gatattgaat gcattctcga cgagccatta gatgataatg agaacttcca gaatgcaatg 1080  
cttgatgcc aggttgatgc agatgctttg gtatctcaaa acttgaaagg gacgaattct 1140  
ccttctctc cttctctgc gccattatca tcgaccatat cagcttcgag caacatgtaa 1200  
1200

<210> 2  
<211> 399  
<212> PRT  
<213> Perilla frutescens  
<400> 2

Met Lys Arg Lys Ser Pro Ser Pro Ala Cys Ser Ser Ser Ser Ser Ser  
1 5 10 15

Cys Cys Ile Glu Ser Pro Thr Thr Gln Lys Asn Ala Pro Gln Ser Lys  
20 25 30

Pro Asp Ala Val Lys Pro Lys Pro Lys Arg Val Arg Ala Lys Lys Asn  
35 40 45

Gln Ser His Ser Asn Ser Ala Thr Ser Pro Lys Ser Arg Ser Ser Ile  
50 55 60

Tyr Arg Gly Val Thr Arg His Arg Trp Thr Gly Arg Tyr Glu Ala His  
65 70 75 80

Leu Trp Asp Lys Thr Thr Trp Asn Ser Ile Gln Asn Lys Arg Gly Arg

85 90 95

Gln Ile Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Asn Glu Glu Asp Ala Ala Arg Thr  
100 105 110

Tyr Asp Leu Ala Ala Leu Lys Tyr Trp Gly Pro Ala Thr Ile Leu Asn  
115 120 125

Phe Pro Val Glu Ala Tyr Thr Lys Asp Leu Glu Glu Met Gln Lys Leu  
130 135 140

Thr Lys Glu Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Arg Arg Arg Ser Ser Gly Phe  
145 150 155 160

Ser Arg Gly Val Ser Lys Tyr Arg Gly Val Ala Arg His His His Asn  
165 170 175

Gly Arg Trp Glu Ala Arg Ile Gly Arg Val Cys Gly Asn Lys Tyr Leu  
180 185 190

Tyr Leu Gly Thr Tyr Ser Thr Gln Glu Glu Ala Ala Ala Tyr Asp  
195 200 205

Met Ala Ala Ile Glu Phe Arg Gly Pro Asn Ala Val Thr Asn Phe Asp  
210 215 220

Val Ser Asn Tyr Ala Asp Lys Leu Lys Lys Phe Leu Pro Glu Val His  
225 230 235 240

Val Arg Gln Glu Glu Val His Val Lys Gln Glu Thr Asn Ser Val Ile  
245 250 255

Pro Asp Glu Glu Val Gln Ala Val Glu Ala Gln Asp Asn Gln Glu Tyr  
260 265 270

Pro Asn Gln Phe Ala Gln Thr Ser Thr Pro Glu Pro Glu Ser Lys Asp  
275 280 285

Ser Ile Glu Ser Glu Asp Ile Leu Val Met Asp Leu Ser Glu Glu His  
290 295 300

Glu Asn Pro Trp Asp Leu Cys Leu Asp Thr Val Phe Asn Ile Leu Pro  
305 310 315 320

Ile Pro Asp Leu Pro Leu Gly Lys Ala Ser Glu Val Phe Asp Tyr His  
325 330 335

Gly Phe Glu Asp Asp Ile Glu Cys Ile Phe Asp Glu Pro Leu Asp Asp  
340 345 350

Asn Glu Asn Phe Gln Asn Ala Met Leu Gly Cys Gln Val Asp Ala Asp

355

360

365

Ala Leu Val Ser Gln Asn Leu Lys Gly Thr Asn Ser Pro Ser Ser Pro

370

375

380

Ser Ser Ser Pro Leu Ser Ser Thr Ile Ser Ala Cys Ser Asn Met

385

390

395

<210> 3

<211> 1197

<212> DNA

<213> Perilla frutescens

<400> 3

atgaagagaa agtctccctc accagcttgc tctctctcct cctcctcctc ctctctgtgc 60

atcgaatcgc caaccgcgca gaaaaatgcg ccgcaatcaa aggccgacgc cgtcaaacc 120

aagcccaaac gcgttcgagc gaagaaaaac cagagccaca gcaattccgc cacctccct 180

aaatcgcgca gctccatcta cagaggcgtc actaggcata gatggactgg gaggtacgaa 240

gctcacctct gggataagac gacatggaac agcattcaga acaagcgagg aagacaaatc 300

tatttaggag cttatgataa tgaggaagat gcggctcgga cctacgatct agctgccctt 360

aaatatggg gccctgctac taccctcaac tttcctgtag aggctacac caaagatctt 420

gaggagatgc aaaaattgac taaggaggag tatttagcct cgcttaggcg gcggagtagc 480

ggcttttcgc ggggagtttc taagtatcgc ggtgtagcaa ggaccatca caatggccgg 540

tgggaggctc gaattggcg cggttcgga aacaagtatc tctacctagg aacctacgc 600

acccaagagg aagcagcagc agcatatgat atggcagcaa tagaattcag aggtccaaac 660

gctgtaacaa atttcgatgt aagtaattat gcagataagt taaagaaatt cctaccggag 720

gtgcaagtca gacaggaaga ggtccatgtg aagcaggaaa ccaattctgt tacccttgat 780

gaagaagtac aagcagttaa agcacaagat aatcaagaat atccaaacca gtttgcctaa 840

acaagtacac ctgagccaga atcgaaagat tccattgagt cggaagacat actcgtcatg 900

gacctgtccg aggagcacga gcaccttgg gatctctgtc tagacactgt attcaatac 960

ctcccaatcc ctgaccttcc tctgggtaaa gcctccgagg tattcgatta ccatggtttt 1020

gaggacgata ttgaatgcat cttcgacgag ccattagatg ataatgagaa cttccagaat 1080

gcaatgcttg gatgccaggt tgatgcagat gctttggtat ctcaaaactt gaaagggacg 1140

aattctcctt cgtcgtcgcc attatcatcg accatatcag cttgcagcaa catgtaa 1197

<210> 4

<211> 398

<212> PRT

<213> *Perilla frutescens*

<400> 4

Met Lys Arg Lys Ser Pro Ser Pro Ala Cys Ser Ser Ser Ser Ser Ser

1 5 10 15

Ser Ser Cys Cys Ile Glu Ser Pro Thr Ala Gln Lys Asn Ala Pro Gln

20 25 30

Ser Lys Ala Asp Ala Val Lys Pro Lys Pro Lys Arg Val Arg Ala Lys

35 40 45

Lys Asn Gln Ser His Ser Asn Ser Ala Thr Ser Pro Lys Ser Arg Ser

50 55 60

Ser Ile Tyr Arg Gly Val Thr Arg His Arg Trp Thr Gly Arg Tyr Glu

65 70 75 80

Ala His Leu Trp Asp Lys Thr Thr Trp Asn Ser Ile Gln Asn Lys Arg

85 90 95

Gly Arg Gln Ile Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Asn Glu Glu Asp Ala Ala

100 105 110

Arg Thr Tyr Asp Leu Ala Ala Leu Lys Tyr Trp Gly Pro Ala Thr Ile

115 120 125

Leu Asn Phe Pro Val Glu Ala Tyr Thr Lys Asp Leu Glu Glu Met Gln

130 135 140

Lys Leu Thr Lys Glu Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Arg Arg Arg Ser Ser

145 150 155 160

Gly Phe Ser Arg Gly Val Ser Lys Tyr Arg Gly Val Ala Arg His His

165 170 175

His Asn Gly Arg Trp Glu Ala Arg Ile Gly Arg Val Cys Gly Asn Lys

180 185 190

Tyr Leu Tyr Leu Gly Thr Tyr Ser Thr Gln Glu Glu Ala Ala Ala Ala

195 200 205

Tyr Asp Met Ala Ala Ile Glu Phe Arg Gly Pro Asn Ala Val Thr Asn

210                      215                      220  
 Phe Asp Val Ser Asn Tyr Ala Asp Lys Leu Lys Lys Phe Leu Pro Glu  
 225                      230                      235                      240  
 Val Gln Val Arg Gln Glu Glu Val His Val Lys Gln Glu Thr Asn Ser  
                          245                      250                      255  
  
 Val Thr Leu Asp Glu Glu Val Gln Ala Val Lys Ala Gln Asp Asn Gln  
                          260                      265                      270  
 Glu Tyr Pro Asn Gln Phe Ala Gln Thr Ser Thr Pro Glu Pro Glu Ser  
                          275                      280                      285  
 Lys Asp Ser Ile Glu Ser Glu Asp Ile Leu Val Met Asp Leu Ser Glu  
                          290                      295                      300  
 Glu His Glu His Pro Trp Asp Leu Cys Leu Asp Thr Val Phe Asn Ile  
 305                      310                      315                      320  
 Leu Pro Ile Pro Asp Leu Pro Leu Gly Lys Ala Ser Glu Val Phe Asp  
  
                          325                      330                      335  
 Tyr His Gly Phe Glu Asp Asp Ile Glu Cys Ile Phe Asp Glu Pro Leu  
                          340                      345                      350  
 Asp Asp Asn Glu Asn Phe Gln Asn Ala Met Leu Gly Cys Gln Val Asp  
                          355                      360                      365  
 Ala Asp Ala Leu Val Ser Gln Asn Leu Lys Gly Thr Asn Ser Pro Ser  
                          370                      375                      380  
 Ser Ser Pro Leu Ser Ser Thr Ile Ser Ala Cys Ser Asn Met  
 385                      390                      395

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ggcgagctca tgaagagaaa gtctccctca ccagc

35

<210> 6

<211> 33

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 6  
 gccccgggca tgttgctgca agctgatatg gtc 33  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 7  
 cacctgagcc agaatcgaaa g 21  
  
 <210> 8  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 8  
 gtcgatgata atggcgacga c 21  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 9  
 tacagaggca cctctcaacc c 21  
 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer  
 <400> 10  
 cacgaacaat ttccgctcg g 21

|            |                        |    |
|------------|------------------------|----|
| <210>      | 11                     |    |
| <211>      | 20                     |    |
| <212>      | DNA                    |    |
| <213>      | Artificial Sequence    |    |
| <220><223> | primer                 |    |
| <400>      | 11                     |    |
|            | tgtttctcagt ggtggctcca | 20 |
| <210>      | 12                     |    |
| <211>      | 20                     |    |
| <212>      | DNA                    |    |
| <213>      | Artificial Sequence    |    |
| <220><223> | primer                 |    |
| <400>      | 12                     |    |
|            | tggaatgtgc tgagggatgc  | 20 |
| <210>      | 13                     |    |
| <211>      | 21                     |    |
| <212>      | DNA                    |    |
| <213>      | Artificial Sequence    |    |
| <220><223> | primer                 |    |
| <400>      | 13                     |    |
|            | ggttggtgac aaagtcaga a | 21 |
| <210>      | 14                     |    |
| <211>      | 20                     |    |
| <212>      | DNA                    |    |
| <213>      | Artificial Sequence    |    |
| <220><223> | primer                 |    |
| <400>      | 14                     |    |
|            | caacactgac aggcttgcca  | 20 |
| <210>      | 15                     |    |
| <211>      | 19                     |    |
| <212>      | DNA                    |    |
| <213>      | Artificial Sequence    |    |
| <220><223> | primer                 |    |
| <400>      | 15                     |    |

ccgagccttc cgttgagtt 19

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

gacaacggag ttgtgaccac c 21

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

gggtgcagag gagaccttca 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gtgagtagat tggagccgcc 20