

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2006-0043798

(43) 공개일자

2006년05월15일

(21) 출원번호 10-2005-0019847

(22) 출원일자 2005년03월09일

(30) 우선권주장 1020040015804 2004년03월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인 서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교(72) 발명자 김성룡
경기 고양시 일산구 마두동 백마마을 105-902
김수진
서울 용산구 이촌2동 대림아파트 102-408

(74) 대리인 특허법인세신

심사청구 : 있음

(54) 비생물성 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 스트레스-유도성 OsAsr1 유전자 및 단백질

요약

본 발명은 식물체에서 과발현되는 경우 식물체에 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 유전자 및 단백질에 관한 것으로서, 본 발명의 OsAsr1 유전자 및 단백질은 식물체에 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성을 증진하는 데 매우 유효하다.

대표도

도 4c

색인어

식물, 벼, 저온, 건조, 염, 스트레스, OsAsr1, 형질전환

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 CLUSTALW 프로그램으로 실시한 OsAsr1 단백질과 다른 공지의 Asr 단백질의 아미노산 비교를 보여주는 도면이다. 추정 Zn²⁺ DNA 결합 위치 및 핵내 위치지정 시그널 (NLS)은 밑줄 부분이다. 검은 상자 내의 백색체는 16 서열 모두에서 완전히 일치하는 서열을 나타낸다.

도 2는 벼 유사체에서 다양한 Asr 단백질의 유전계통학적 분석을 보여주는 덴드로그램이다. 인디카 벼 WGS 콘티그(contig)에 대한 TBLASTN 검색으로부터 벼 유사체들에 대한 정보를 얻었다. 덴드로그램은 ClustalX 및 Mega2 프로그램을 이용하여 구축하였다. 각각의 접근번호는 식물명 옆에 기재되어 있다. 수평선의 길이는 진화거리를 나타낸다.

도 3은 *OsAsr1*의 서던 블롯 분석 결과이다. 3가지 자포니카 재배종, 남양 21 (1), 오대 (2) 및 동진 (3)을 *EcoRI* (E), *HindIII* (H) 및 *BamHI* (B)으로 절단하고 방사능표지 *OsAsr1* 프로브로 혼성화 하였다. *HindIII*로 절단된 *OsAsr1* DNA의 위치 및 kb 크기가 표시되어 있다.

도 4a-4e는 다양한 비생물성 스트레스 및 ABA 처리 하에서 *OsAsr1* 발현 분석 결과이다: 도 4a-4c는 *OsAsr1*의 노던 블롯 분석 결과이다. 총 RNA 30 μ g (A) 또는 10 μ g (B 및 C)을 분리하고, 블롯팅한 다음, 방사능표지 *OsAsr1* 프로브로 혼성화 하였다. 도 4a는 다양한 기관 또는 조직에서 *OsAsr1* 발현을 나타낸다. 레인: 1, 캘러스; 2, 유식물체의 신초; 3, 유식물체의 뿌리; 4, 성숙 잎; 5, 플렉 잎의 잎집; 6, 프리헤드 단계에서의 노트 I 및 II 사이의 인터노드; 7, 1-2 cm 원추 화서; 8, 3-8 cm 원추 화서; 9, 개화기 전의 성숙 원추 화서; 10, 수분 (DAP) 3일째의 발달중 종자 (DAP); 11, 6 DAP의 발달중 종자. 도 4b는 *OsAsr1*의 저온 유도성 발현을 보여준다. 성숙된 식물체를 12°C에서 4일 동안 처리하였다. L, 잎; CL, 저온처리 잎; F, 플로릿; CF, 저온 처리 플로릿. 도 4c는 상이한 온도 및 ABA에 의한 *OsAsr1*의 발현을 보여준다. 30°C에서 성장한 유식물체를 4°C, 12°C 또는 3시간, 6시간 및 20시간 동안 10 μ M ABA로 처리. 도 4d는 *OsAsr1*의 준-정량적 RT-PCR 분석으로 SalT를 건조-, 저온-, 염- 및 ABA-반응 대조군으로 사용하였다. 벼 액틴 유전자의 전사체는 PCR 분석에서 내재적 대조군을 나타낸다. 도 4e는 실-시간 PCR을 이용한 *OsAsr1* 발현 수준의 분석으로 오차 막대는 표준편차를 나타낸다. 8-일 유식물체를 4°C (c), 250 mM NaCl (s), 건조 (d) 또는 100 μ M ABA (A)로 처리하고 주기적으로 수확하였다. 벼 액틴 유전자의 전사체는 PCR 분석에서 내재적 대조군을 나타낸다.

도 5a 및 5b는 *OsAsr1* mRNA의 인/시투 국부위치화를 보여주는 사진이다. heading 전 4일째의 벼 꽃 및 4일 동안 12°C에 노출된 잎의 절단면을 디콕시게닌-표지 안티센스 (A, C, E, 및 G) 또는 센스 (B, D, F 및 H) *OsAsr1* 프로브로 혼성화시켰다. 절단면의 높은 배율이 나타나 있다 (C, D, G 및 H). an, 꽃밥; lm, 외영; pa, 내영; l.e.p, 내영의 하부 표피; LVB, 큰 유관속; mc, 모터 세포; xy, 목부; ph, 사부; me, 엽육. 막대 = 0.3 mm

도 6a-6c는 센스 및 안티센스 방향으로 *OsAsr1*을 발현하는 형질전환 식물체의 분석 결과를 보여준다. 도 6a는 벼 형질전환을 위한 *OsAsr1* 센스 (pSK167) 및 안티센스 (pSK168) 발현 벡터의 구조이다. P_{UBI}, 옥수수 유비퀴틴 프로모터; P_{35S}, CaMV 35S 프로모터; T_{NOS}, 노팔린 신타아제 종결자 서열; T7, 전사체 7의 종결자 서열; *hph*, 형질전환 캘러스를 선택하기 위한 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자; RB 및 LB, 아그로박테리움 튜메페이스스 (*Agrobacterium tumefaciens*)의 Ti 플라스미드의, 각각 우측 및 좌측 보더 서열. 도 6b는 형질전환 유전자의 서던 블롯 분석 결과이다. 형질전환 식물체로부터 얻은 지놈 DNA를 *HindIII*로 절단한 10 μ g을 이용하여 서던 블롯을 실시하였다. 형질전환 벡터에서 유비퀴틴 프로모터 단편을 프로브로 이용하였다. *HindIII*로 절단된 *OsAsr1* DNA의 위치 및 kb 크기가 표시되어 있다. 도 6c는 센스 형질전환 벼 (*Ubiquitin::OsAsr1*)에서 *OsAsr1*의 발현을 보여주는 사진이다. 정상 성장 조건 하의 야생형 분리자 (WS) 및 센스 형질전환 식물체로부터 얻은 잎의 총 RNA를 분리하고, 블롯팅한 다음, 방사능표지 *OsAsr1* 프로브로 혼성화시켰다. 숫자는 각각의 형질전환주를 나타낸다. EtBr-염색 rRNA 밴드는 동일한 양이 로딩되었음을 보여준다.

도 7은 클로로필 형광 측정에 의해 판정된 *Ubiquitin::OsAsr1* 식물체의 스트레스 내성을 나타내는 그래프. 저온 스트레스 하의 연장된 잎의 클로로필 형광의 변화를 측정하였다. Fv/Fm 값의 평균 및 표준편차를 측정함으로써 광합성의 기능적 손상을 평가하였다.

도 8은 CBF1 형질전환 벼에서 *OsAsr1*의 발현을 보여주는 사진이다. 대조군 (30°C) 또는 저온처리 (4°C)에서 두가지 강한 *CBF1*-발현자 (18-2 및 18-3) 및 야생형 비형질전환주 (NT)의 성숙된 잎으로부터 얻은 총 RNA를 방사능표지 *OsAsr1* 프로브와 혼성화시켰다. EtBr-염색 rRNA 밴드는 동일한 양이 로딩되었음을 보여준다.

도 9는 센스 (9a) 또는 (9b) 안티센스 방향에서 *OsAsr1*를 발현하는 형질전환 벼의 염 내성을 보여준다: 12일령된 유식물체를 200 mM NaCl에서 1 일 (센스 식물체) 또는 12 시간 (안티센스 식물체)로 처리하고 정상 조건 하에서 2 일 동안 회복시켰다.

도 10은 벼 품종 및 형질전환 *OsAsr1* 벼 식물체의 위조 비율을 보여준다: 12일령 유식물체를 200 mM NaCl에서 1 일 (센스 식물체) 또는 12 시간 (안티센스 식물체)로 처리하고 정상 조건하에서 2 일 동안 회복시켰다.

도 11은 센스 (11a) 또는 (11b) 안티센스 방향에서 *OsAsr1*를 발현하는 형질전환 벼의 건조 내성을 보여준다: 14일령 유식물체에 4일 동안 물을 공급하지 않고, 다시 정상 조건하에서 7 일 동안 회복시켰다.

도 12는 벼 품종 및 형질전환 *OsAsr1* 벼 식물체의 위조 비율을 보여준다: 14일령 유식물체에 4일 동안 물을 공급하지 않고, 다시 정상 조건하에서 7 일 동안 회복시켰다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 저온, 건조 또는 염 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 비생물성 스트레스-유도성 *OsAsr1* 유전자 및 단백질에 관한 것이다.

고착성 유기체로서의 식물은 환경 스트레스, 예컨대, 저온, 건조 및 염해 등 비생물성 스트레스에 대응을 하여야 한다. 이러한 노출 이후에, 유전자 발현의 패턴에서 일련의 변화가 일어난다 (Guy, 1999). 이러한 반응은 성장속도, 생산성 및 종분포에 영향을 미친다. 열대 또는 아열대 원산지를 갖는 곡물류로서의 벼는 종종 저온 손상을 받으며, 이러한 손상을 받은 식물체는 퇴락, 괴사 또는 상장 지연과 같은 다양한 증상을 나타낸다 (De Datta, 1981). 온대 지역에서, 벼는 종종 개화시기 동안에 저온-여름 손상뿐만 아니라 유식물체 단계에서 저온에 직면하게 된다.

비생물성 스트레스-반응 기전을 이해하기 위하여, 연구자들은 몇 종의 식물체에서 비생물성-유도성 단백질을 코딩하는 다수의 유전자를 분리하였다 (Guy, 1999; Thomashow, 1999). 칼시뉴린 B-유사 1 (CBL 1) 유전자는 건조, 염 및 저온 스트레스에 의하여 상당히 유도된다. 또한, CBL1-과발현 식물체는 증진된 염 및 건조 내성을 보여주었다 (Cheong, Y.H., Kim, K.N., Pandey, G.K., Gupta, R., Grant, J.J., and Luan, S. 2003. CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. Plant Cell 15:1833-1845). 저온 하에서 유도되는 유전자들은 다양한 유전산물을 생성시킴으로써 세포를 보호하는 기능을 하는 것으로 예측된다. 예를 들어, 아라비도시스 (*Arabidopsis*) MAP 키나아제 (ATMPK4 및 ATMPK6) and C-반복/DRE 결합 인자 (CBF/DREB) 전사 인자는 저온 스트레스 신호전달에 관여하며 (Mizoguchi et al., 1993; Stockinger et al., 1997), 지질 탈포화효소는 냉각 동안에 막 변형에 관여한다 (Gibson et al., 1994). 저온-유도성 발병-관련 단백질, 예컨대, 키티나아제-유사 및 타우마틴-유사 단백질은 항동결 단백질로서의 작용을 한다 (Hiilovaara-Teijo et al., 1999). 또한, 샤페론, 후기 배발생 풍부 (LEA) 단백질, 칼모듈린-관련 단백질 및 동결 내성을 증진시키는 것으로 예측된다 (Thomashow, 1999). 최종적으로, 당, 프롤린과 베타인과 같은 다양한 삼투보호제의 생합성에 필요한 효소는, 또한 저온 노출 후의 식물 삼투압 조절에 매우 중요하다 (Kishor et al., 1995; Igarashi et al., 1997; Scott et al., 1999).

ABA (abscisic acid), 삼투압 스트레스 (osmotic stress) 및 성숙 (ripening)에 반응성을 나타내는 *Asr* 유전자들은 토마토, 감자, 살구, 테다소나무, 나리, 옥수수, 팜메로, 포도와 벼와 같은 다양한 종에서 동정되었다 (Iusem et al., 1993; Canel et al., 1995; Silhavy et al., 1995; Wang et al., 1998; Chang et al., 1996; Mbeguie-A-Mbeguie et al., 1997; Vaidyanathan et al., 1999; Hong et al., 2002; Jeanneau et al., 2002; Cakir et al., 2003). 토마토 *Asr1* mRNA의 높은 수준이 성숙된 과일 및 수 스트레스를 받은 잎에서 검출되었다 (Hagit et al., 1995). 나리 ASR 단백질의 양은 화분 성숙 동안에 건조에 의해 증가한다 (Wang et al., 1998). 그러나, ASR 단백질의 생리학적 역할은 지금도 불명이다. 토마토 ASR1 단백질이 핵에 국부적으로 위치한다는 사실은 토마토 ASR1 단백질이 비히스톤 염색체 단백질로 작용한다는 것을 제안케 한다 (Rossi and Iusem, 1994). 또한, 몇 종의 ASR 단백질이 후기 배발달 풍부 (LEA) 단백질 또는 디히드린 단백질과 구조적 및 기능적으로 유사하다는 사실로부터, ASR이 종자 발달에 관여할 것이라는 추론을 할 수 있다 (Maskin et al., 2001; Silhavy et al., 1995). 다수의 공지 ASR 단백질은 N-말단 부위에 추정된 Zn-결합 위치 및 C-말단에 약 70 아미노산의 추정된 핵내 위치지정 서열 (NLS)에 해당하는 두 개의 보전 부위를 갖는다 (Cakir et al., 2003; Silhavy et al., 1995). 이러한 사실들 그리고 단당류 운반 유전자의 프로모터 서열에 포도 ASR (VvMSA)이 결합한다는 사실들로부터, VvMSA가 당 및 ABA 시그널링에 관여하는 전사-조절 복합체의 성분일 것이라는 추론을 할 수 있다 (Cakir et al., 2003).

Vaidyanathan et al. (1999)은 포칼리 (Pokkali) 벼로부터 *ASR* cDNA, *OsAsr1*를 동정하였고, 이 유전자는 ABA- 및 삼투압 (NaCl) 스트레스-유도성임을 규명하였다. 하지만, 친수성 알파 나선 구조를 갖는 *OsAsr1*의 기능은 대부분 알려져 있지 않다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용은 괄호 내에 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준과 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 비생물성 스트레스에 대하여 내성을 증진시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 노력한 결과, 벼 (*Oryza sativa*)로부터 스트레스에 의해 유도되는 *OsAsr1* (*Oryza sativa* responsive to ABA, osmotic stress, and ripening gene 1) 유전자를 발굴하고 상기 유전자에 의해 형질전환된 식물체가 저온, 염 또는 건조에 대하여 증진된 내성을 나타낸다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 비생물성 스트레스-유도성 *OsAsr1* 단백질을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 비생물성 스트레스-유도성 *OsAsr1* 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자를 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 비생물성 스트레스-유도성 *OsAsr1* 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자를 포함하는 벡터를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 저온, 염 또는 건조 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 저온, 염 또는 건조 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

발명의 구성 및 작용

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하며 식물체에서 과발현되는 경우 상기 식물체에 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 비생물성 스트레스-유도성 *OsAsr1* 단백질 또는 상기 단백질과 80% 이상의 아미노산 서열 상동성을 나타내는 단백질을 제공한다.

본 발명자들은 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대하여 내성을 증진시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 노력한 결과, 벼 (*Oryza sativa*)로부터 스트레스에 의해 유도되는 *OsAsr1* (*Oryza sativa* responsive to ABA, osmotic stress, and ripening gene 1) 유전자를 발굴하고 상기 유전자에 의해 형질전환된 식물체가 저온, 염 또는 건조에 대하여 증진된 내성을 나타낸다는 것을 확인하였다.

본 명세서에서 용어 "비생물성 스트레스"는 저온, 염 및 건조와 같은 비생물학적 요인에 의해 유도되는 스트레스를 의미한다.

본 명세서에서 용어 "저온 스트레스"는 저온, 바람직하게는 15℃ 이하, 보다 바람직하게는 12℃ 이하, 가장 바람직하게는 10℃ 이하의 저온에 의한 스트레스를 의미한다.

본 발명의 비생물성 스트레스-유도성 *OsAsr1* 단백질은 상기한 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내며, 동시에 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성 증진을 할 수 있는 범위 내에서의 아미노산 서열을 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 프로그램 (예: ClustalX 및 PROSIS)을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.

한편, 본 발명의 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질은 다음과 같이 특정될 수 있다: (a) 벼 (*Oryza sativa* L.)로부터 분리; (b) N-말단 부위에 하나의 Zn-결합 모티프가 있음; 및 (c) C-말단 부위에 하나의 핵내 위치지정 (nuclear localization) 도메인이 있음.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자를 제공한다.

본 명세서에서 용어 "핵산 분자"는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다 (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

가장 바람직하게는, 본 발명의 핵산 분자는 서열목록 제 1 서열의 뉴클레오타이드 서열 중 서열번호 67-480의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질을 코딩하는 본 발명의 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 프로그램 (예: ClustalX 및 DNASIS)을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 벡터는 (a) 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 (b) 상기 뉴클레오타이드에 작동적으로 결합된 (operably linked) 프로모터를 포함하는 벡터를 제공한다.

본 명세서에서 용어 "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 트랜스레이션을 조절하게 된다.

본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있으며, 이 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

본 발명의 벡터는 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 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, p_L^{λ} 프로모터, *trp* 프로모터, *lac* 프로모터, T7 프로모터, *tac* 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 *E. coli*가 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위 (Yanofsky, C., *J. Bacteriol.*, 158:1018-1024(1984)) 그리고 파아지 λ 의 좌향 프로모터 (p_L^{λ} 프로모터, Herskowitz, I. and Hagen, D., *Ann. Rev. Genet.*, 14:399-445(1980))가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

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: λ gt4- λ B, λ -Charon, λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예: SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.

한편, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 *tk* 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

본 발명의 벡터는 그로부터 발현되는 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질 (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His (hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다. 상기 정제를 위한 추가적인 서열 때문에, 숙주에서 발현된 단백질은 친화성 크로마토그래피를 통하여 신속하고, 용이하게 정제된다.

본 발명의 벡터는 선택표지로서, 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함할 수 있으며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

본 발명의 유전자는 식물에서 분리되었고, 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 식물체의 내성을 증진하는 작용을 할 수 있으므로, 식물에 대하여 가장 바람직한 유용성을 갖는다. 따라서, 본 발명의 벡터는 (i) 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 식물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (iii) 식물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위를 포함하는 식물발현용 벡터를 제공한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 프로모터는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 콜리플라우어 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 신타아제 (nos) 프로모터, 피그위트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러리스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카르복실라아제 식물 서브유닛 (ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리오포스페이트 이소머라아제 (TPI) 프로모터, 아라비도시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터 및 옥토파인 신타아제 프로모터를 포함한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 적합한 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위는 아그로박테리움 튜메피이션스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것 (nos 3' end) (Bevan et al., *Nucleic Acids Research*, 11(2):369-385(1983)), 아그로박테리움 튜메피이션스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분 및 CaMV 35S 터미네이터를 포함한다.

선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자 (예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제 (예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자 (예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*hpt*), 등)를 포함한다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주 세포는 당업계에 공지되어 어떠한 숙주 세포도 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, 바실러스 쉼린젠시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

또한, 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주 세포로서, 이스트 (*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충 세포, 사람 세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 한편, 본 발명의 *OsIti 32* 유전자는 식물에서 유용성이 크기 때문에, 상기 형질전환체는 세포뿐만 아니라, 식물 세포 또는 조직으로부터 유래된 캘러스를 포함한다.

본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, CaCl_2 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973)), 하나한 방법 (Cohen, S.N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 9:2110-2114(1973); 및 Hanahan, D., *J. Mol. Biol.*, 166:557-580(1983)) 및 전기 천공 방법 (Dower, W.J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 16:6127-6145(1988)) 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주 세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법 (Capecchi, M.R., *Cell*, 22:479(1980)), 칼슘 포스페이트 침전법 (Graham, F.L. et al., *Virology*, 52:456(1973)), 전기 천공법 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 리포솜-매개 형질감염법 (Wong, T.K. et al., *Gene*, 10:87(1980)), DEAE-덱스트란 처리법 (Gopal, *Mol. Cell Biol.*, 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572(1990)) 등에 의해 벡터를 숙주 세포 내로 주입할 수 있다.

숙주 세포 내로 주입된 벡터는 숙주 세포 내에서 발현되며, 이러한 경우에는 다량의 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질 발현을 얻게 된다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 식물 세포 또는 식물 조직을 상기 본 발명의 벡터로 형질전환하는 단계; (b) 형질전환된 식물세포 또는 식물조직을 선별하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 식물세포 또는 식물조직으로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계를 포함하는 저온, 염 또는 건조 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 저온, 염 또는 건조 스트레스 내성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.

본 발명에서 이용되는 익스플랜트로는 식물 세포 또는 식물 조직이며, 식물 조직을 이용하는 경우에는 캘러스를 이용하는 것이 바람직하다.

본 발명의 방법에 있어서, 식물세포의 형질전환은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있으며, 이는 전기천공 (Neumann, E. et al., *EMBO J.*, 1:841(1982)), 입자 밤바드먼트 (Yang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:9568-9572 (1990)) 및 아그로박테리움-중재 형질전환 (미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호)을 포함한다. 이 중에서, 아그로박테리움-중재 형질전환이 가장 바람직하다.

형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제 (예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물 세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (nptII) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

식물 원형질 또는 다양한 익스플랜트로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는 재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다 (미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

본 발명의 방법은 다양한 식물체에 적용되지만, 바람직하게는 벼, 보리, 밀 및 옥수수과 같은 곡류의 식물체 적용되며, 보다 바람직하게는 벼에 적용되며, 가장 바람직하게는 자포니카 재배종에 적용된다.

본 발명에 있어서, 바람직한 형질전환 방법은 아그로박테리움 시스템을 이용하여 실시되며, 보다 바람직하게는 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)-마이너리 벡터 시스템을 이용하여 실시된다.

아그로박테리움 시스템을 이용하는 방법에 있어서, 구체적인 일 실시예는 다음의 단계를 포함한다: (a') 식물 세포의 지놈 DNA에 삽입될 수 있고 다음의 서열을 갖는 벡터가 내재되어 있는 아그로박테리움 튜머페이션스 (*Agrobacterium tumefaciens*)로 식물체의 익스플랜트를 감염시키는 단계: (i) 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 식물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; (iii) 식물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위; (b') 상기 감염된 익스플랜트를 재분화 배지에서 재분화하여 형질전환 식물체를 얻는 단계.

식물 세포의 형질전환은 Ti 플라스미드를 포함하는 아그로박테리움 튜머페이션스를 가지고 실시된다 (Depicker, A. et al., *Plant cell transformation by Agrobacterium plasmids*. In *Genetic Engineering of Plants*, Plenum Press, New York (1983)).

보다 바람직하게는, pBin19, pRD400, pRD320, pGA1611 및 pGA1991과 같은 마이너리 벡터 시스템이 이용된다 (An, G. et al., *Binary vectors* In *Plant Gene Res. Manual*, Martinus Nijhoff Publisher, New York(1986); An et al., 1988; 및 Lee et al., 1999). 본 발명에 적합한 마이너리 벡터는 (i) 식물에서 작동하는 프로모터; (ii) 상기 프로모터에 작동적으로 연결된 구조 유전자; 및 (iii) 폴리아데닐화 시그널 서열을 포함한다. 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자 (예: 루시페라아제 및 글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반한다. 마이너리 벡터에 이용되는 프로모터의 예는 CaMV 35S 프로모터, 1 프로모터, 2 프로모터 및 노팔린 쉐타아제 (nos) 프로모터를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

아그로박테리움 튜머페이션스에 의한 익스플랜트의 감염은 당업계에 공지된 방법을 포함한다. 가장 바람직하게는, 상기 감염 과정은 아그로박테리움 튜머페이션스의 배양물에 익스플랜트를 함침시켜 공동배양하는 과정을 포함한다. 이에 의해 아그로박테리움 튜머페이션스는 식물내로 감염된다.

아그로박테리움 튜머페이션스에 의해 형질전환된 익스플랜트는 재분화 배지에서 재분화되며, 이는 최종적으로 형질전환 식물체를 형성한다.

본 발명에 따라 형질전환된 식물은 당업계에 공지된 방법에 의해 형질전환 여부가 확인된다. 예를 들어, 형질전환된 식물의 조직으로부터 얻은 DNA 시료를 이용하여, PCR을 실시하면 형질전환 식물의 지놈에 삽입된 외래 유전자가 규명될 수 있다. 택일적으로, 노던 또는 서던 블롯팅을 실시하여 형질전환 여부를 확인할 수 있다 (Maniatis et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1989).)

본 발명의 *OsAsr1* 유전자 및 단백질은 식물체에 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성을 증진하는 데 매우 유효하다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

식물체 시료 및 박테리아 균주

자포니카 벼 (*Oryza sativa*)의 재배종인 동진 (Dongjin)을 종자-코트 cDNA 라이브러리를 구축하고 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 사용하였다. 저온 내성 시험에 사용된 다른 재배종 또는 야생종은 표 1에 기재되어 있다. 종자를 표면-멸균처리하고, 물 또는 MS 아가 배지 (Murashige and Skoog, 1962)에서 발아시켰다. 또는, Yoshida 용액에서 발아시켰으며 (Yoshida et al., 1976), 이들을 29°C 낮/21°C 밤 온도, 16-시간-명/8-시간-암 주기 및 83% 상대습도 조건을 포함하는 수경재배법으로 조절된 조건하에서 배양하였다. 유식물체를 토양으로 옮기고 30°C 연속광 (세기 60 to 70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 하에서 성장 챔버에 두었다. 저온 처리를 위하여, 암조건에서 4°C 또는 12°C에 노출된 14일령 유식물체를 수확하였다. ABA 처리 연구를 위하여, 10 μM ABA-함유 MS 액체배지로 옮겨진 5일령 유식물체를 수확하였다. 염 또는 ABA 처리를 위하여, 유식물체를 250 mM NaCl 또는 100 μM ABA 을 포함하는 요시다 용액에 옮긴 다음, 주기적으로 수확하였다. 건조 처리를 위하여, 유식물체를 공기 중에서 건조시킨 후 주기적으로 수확하였다. 생식 단계에서의 저온 스트레스 영향을 연구하기 위하여, heading 전 4일째 재배지에서 성장하는 벼 식물체를 온실 (30°C, 14 hr 광/10 hr 암)로 옮기고 2일동안 적응시켰다. 그런 다음, 식물체를 14 hr 광주기 (ca. 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$)로 12°C에서 4일 동안 처리하였다. 모든 조직 시료를 액체질소로 즉시 동결시키고 -70°C에서 보관하였다. *E. coli* 균주, XL-1 Blue MRF' { $\Delta(\text{mcrA})183\Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173 \text{ endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB, lacIqZ}\Delta\text{M15 Tn10 (Tetr))}$ } (Stratagene, USA)를 클로닝을 위한 숙주로 이용하였다.

cDNA 라이브러리 구축 및 EST 분석

4일 또는 8일령 종자의 코트를 현미경 하에서 손으로 분해하였다. 이어, 종자 코트로부터 얻은 poly-A RNA를 이용하여 cDNA 라이브러리를 구축하였다. 라이브러리로부터 cDNA 클론을 무작위로 선택하고, 이들의 5'-말단을 시퀀싱하였다. DNA 준비, 시퀀싱 및 컴퓨터 분석은 Hong et al. (1998)이 개시한 방법에 따라 실시하였다. 우선, 주형 DNAs를 알칼린 분해방법에 의해 준비하고, 삽입서열을 ABI PRISM™ BigDye™ 터미네이터 사이클 시퀀싱 키트 (Amersham)를 이용하여 시퀀싱하였다. DNAsis, Prosis (Hitachi), ClustalX, ClustalW 및 GeneDoc (Thompson et al., 1994; Nicholas and Nicholas, 1997)과 같은 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 서열분석을 하였다. Genbank, EMBL 및 Swiss-Prot 데이터베이스는 BLASTX 알고리즘을 이용한 아미노산 서열 상동성 조사시 검색되었다 (Altschul et al., 1997).

DNA 및 RNA 젤-블롯 분석

3가지 자포니카 재배종, 남양 (Namyang) 21, 동진 및 오대 (Odae)에 대하여 DNA 젤-블롯 분석을 실시하였다. 남양 21은 저온-민감성 (저온 내성도, CTI = 7), 오대는 저온-내성 (CTI = 3), 그리고 동진은 중간 (CTI = 5)이다 (Lim, 1998). 0 내지 9 사이의 CTI 값에서, 0은 가장 내성이 큰 것이고, 9는 가장 민감한 것이다. 세틸트리메틸암모늄 브라마이드 방법 (Roger and Bendich, 1988)에 따라 지놈 DNA를 유식물체로부터 분리하였다. 제한효소로 37°C에서 6시간 동안 절단한 DNA 10 µg을 0.8% 아가로스 젤에서 분리하고, 진공 전이 시스템 (Hefer)을 이용하여 Hybond-N 막 (Amersham)으로 옮겼다. RNA 젤-블롯 분석을 위하여, 총 RNA 10 µg을 1.3% 포름알데히드 아가로스 젤에서 분리하고 나일론막으로 블롯팅 하였다. DNA 및 RNA 블롯 분석을 방사능표지 *OsAsr1* 프로브를 이용하여 실시하였다. 상기 프로브를 제조하기 위하여, 무작위 프라이밍 방법에 따라, *OsAsr1* cDNA 단편을 [α - ^{32} P] dCTP (3000 ci mmol $^{-1}$)로 방사능 표지 하였다. G-50 Sephadex 컬럼 크로마토그래피를 통하여, 삽입되지 않은 뉴클레오타이드를 제거하였다. 혼성화 이후, 막을 2 x SSC, 0.1% SDS에서 실온에서 15분; 1 x SSC, 0.1% SDS에서 실온에서 15분; 및 0.1 x SSC, 0.1% SDS에서 실온에서 15분의 조건으로 세척하였다. 혼성화 시그널은 상 분석기 (BAS-1500, Fuji)로 검출하고, HyperfilmTM MP 필름 (Amersham)에 노출시켰다.

RNA 인 situ 혼성화

벼 꽃 및 잎을 50 mM PIPES 완충액 (pH 7.2) 내의 2% (w/v) 파라포름알데히드와 2.5% (v/v) 글루타르알데히드로 하룻밤 동안 4°C에서 고정화하였다. 에탄올의 등급 농도로 고정된 조직을 탈수하고, 파라플라스트 미디움 (Oxford labware, USA)에서 임베딩하였다. 임베딩된 조직을 회전 마이크로톰 (Leica, Germany)으로 7 µm 절편으로 절단하고, 절편을 실린화 유리 슬라이드 (Matsunami, Japan)에 부착시켰다. 에탄올의 등급 농도를 이용하여 파라핀을 제거한 다음, 시료를 1시간 동안 건조시켰다. T3 or T7 RNA 중합효소 (Roche, USA)를 이용하여, *OsAsr1* cDNA가 있는 선형화된 pBluscript로부터 디옥시게닌-표지 센스 또는 안티센스 RNA 프로브를 제조하였다. 상기 절편을 혼성화 용액내에서 상기 제조된 프로브로 48°C에서 16 hr 동안 처리하여 혼성화 하고, 2x SSC, 1x SSC 및 0.1x SSC를 포함하는 용액에서 15분 동안 50°C에서 세척하였다. 혼성화된 프로브는 항-DIG 접합 알칼린 포스파타아제 (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 발색으로 검출하였다. 사진은 bright-field 현미경 (Nikon Eclipse 600, Japan)을 이용하여 얻었다.

형질전환 식물체의 제조 및 분석

전장 *OsAsr1* cDNA를 바이너리 벡터 pGA1611 (포항공대 안진홍 교수) (An *et al.* 1988; Kim *et al.*, 2003)의 옥수수 유비퀴틴 프로모터 (Christensen, Sharrock & Quail 1992)의 다운스트림쪽에 센스 및 안티센스 방향으로 삽입시켰다. 벼 형질전환은 Jeon *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999에 개시된 방법에 따라, 아그로박테리움-중재 공동배양 방법을 통하여 실시하였다. 외영과 내영을 제거한 벼종자를 2 mg L $^{-1}$ 2,4-D가 포함된 2N6배지에 치상해 한 달간 캘러스를 유도하고, 30 mg L $^{-1}$ 하이그로마이신 B와 3 mg L $^{-1}$ 테트라사이클린이 첨가된 AB배지에서 3일간 성장시킨 아그로박테리움과 3일간 20°C에서 암상태에서 2N6-ASB배지에서 3일간 공동배양 후에, 40 mg L $^{-1}$ 하이그로마이신 B와 250 mg L $^{-1}$ 세포탁심이 첨가된 2N6-CH40 배지에 3주간 둔 후 잘 자라는 캘러스를 골라 2-3주간 0.1 mgL $^{-1}$ NAA, 2 mg L $^{-1}$ 키네티ن, 2% 소비톨, 1.6% 피트아가, 50 mg L $^{-1}$ 하이드로마이신 B와 250 mg L $^{-1}$ 세포탁심이 혼합된 MS 배지에서 연속광 상태로 재분화 시키며, 재분화된 개체는 흙에 옮겨 온실에서 성장시켰다. 모든 형질전환 벼 식물체들은 40-mg L $^{-1}$ 하이그로마이신 B-함유 배지에서 제조되었고, 재생 후 온실로 옮겼다. 형질전환 식물체를 규명하기 위한 PCR 분석을 전방향 프라이머 (5-CAC CCT GTT GTT TGG TG-3) 및 역방향 프라이머 (5-GCG GGA CTC TAA TCA TAA AAA CC-3)를 이용하여 실시하였다. PCR 조건은 94°C 1분, 54°C 1분 및 72°C 1분의 사이클로 30 사이클로 하였다.

클로로필 형광의 측정

성숙 식물체로부터 얻은 연장된 잎의 약 5-cm-길이의 단편을 백형광 (260 mol m $^{-2}$ sec $^{-1}$) 하에서 4°C에서 MS 액체 배지에 0, 6, 12 또는 24시간 동안 부유시켰다. 30분 동안의 암-적응 후, 클로로필 시그널을 Plant Efficiency Analyzer (Hansatech, UK)를 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 4회 반복 실시하였다.

저온 스트레스 결정

위조 (wilting) (Saijo *et al.*, 2000)의 정도 또는 재성장양 (Lee *et al.*, 1993)을 평가하여 저온 스트레스에 노출된 식물체의 생존율을 계산하였다. 성장 챔버 (16-h 광/8-h 암; 광세기 60 µmol m $^{-2}$ sec $^{-1}$; 30°C)에서 성장시킨 10일령 유식물체

(3엽 단계)를 연속광 ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$) 하에서 3, 4, 5, 6, 7, 10 또는 12일 동안 4℃에 노출시켰다. 이어, 식물체를 표준 성장-챔버 조건으로 10일 동안 회귀시켜 회복되도록 하였다. 위조비율은 명백한 퇴록 정도 및 잎의 퇴록 데이터에 기초하였다. 재성장을 분석하기 위하여, 4일 동안 4℃에 노출시킨 유식물체를 성장 챔버에 되돌려 13일 동안 회복시켰다. 재성장은 유식물체상의 신규 4엽의 생성으로 정의내렸다.

건조 및 염 스트레스 결정

식물체를 성장 챔버 (30℃, 16/8 시간의 명/암 주기)에서 약 2 주간 배양하고 스트레스 처리 후 생존율을 측정하였다. 건조-생존 시험을 위하여, 4일 동안 물을 공급하지 않았다. 정상 성장 조건에서 다시 7일 간 배양하고 위조 식물체 (wilted) 및 건강한 식물체의 수를 측정하였다 (Lee, S.C., Huh, K.W., An, K., An, G., and Kim, S. R. 2004b Ectopic expression of a cold-inducible transcription factor, CBF1/DREB1b, in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) Mol. Cells 18: 107-114). 염 스트레스 처리를 위하여, 10일령 유식물체를 0.1% (w/v) Hyponex (Hyponex) 영양배지에서 2일간 배양하고 200mM NaCl 포함하는 신선한 영양배지로 옮긴 후, 1일 (센스 식물체에 대하여) 또는 12 시간 (안티센스 식물체에 대하여) 동안 30℃에서 16 시간 광주기 ($50-60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ light)로 배양하였다. 염 스트레스 처리 후에, 유식물체의 뿌리를 물로 세척하고 정상 조건하에서 NaCl없이 신선한 배지에서 배양하였다. 완전하게 위조된 식물체의 3 내지 4개의 잎이 명백한 퇴록을 나타낼 때, 스트레스 후 위조가 결정하였다.

실험 결과

벼 종자-코트 라이브러리로부터 *OsAsr1* cDNA의 동정

본 발명에 의해 개발된 종자 코트로부터 분리한 cDNA 클론은 Vaidyanathan et al. (1999)에 의해 발견된 *OsAsr1*과 상동성이 크다. 본 발명의 클론은 838 bp 길이로서, 66-bp, 5'-비해독 부위 (UTR), 417-bp 오픈 리딩 프레임, 325-bp 3'-UTR, 및 poly (A)-테일을 포함한다. 공지의 클론과 비교하여 5'-말단이 4 bp 정도 짧고, 3'-UTR에서 T가 C (정지 코돈의 다운스트림으로부터 304 bp 떨어져 있음)로 변화된 것을 제외하고는 *OsAsr1*과 완전히 일치한다. 공지된 cDNA는 포칼리 (Pokkali), 인디카벼로부터 분리된 것이고 본 발명에 의해 분리된 것은 자포니카 타입인 동진으로부터 분리된 것이기 때문에, 3'-UTR에서의 단일-뉴클레오타이드 변이는 재배종에서의 차이에 기인한 것으로 판단된다.

OsAsr1 지놈 서열을 인디카벼 WGS 지놈 데이터베이스 (Yu et al., 2002)로부터 회수하였다. 클론의 *인-실리코* 분석은 ABA 반응 엘리먼트 (ABRE)의 중심서열, ACGT가 -261 위치, 즉 최초 ATG 코돈에서부터 610 및 616 bp 떨어진 위치에 있음을 예측케 하였다. 중요한 저온-반응성 *cis* 엘리먼트, C-반복/건조 반응성 엘리먼트 (CRT/DRE) 서열, GCCGAC은 위치 714에서 발견되었고, 추정 Myb (143, -149, 및 698), Myc (71, 512, 및 694) 그리고 bZIP (202 및 711) 결합 위치도 발견되었다. 추정 Zn-결합 His-잔기 및 추정 NLS 도메인은, *OsAsr1* 단백질의 각각 N-말단 및 C-말단에 위치한다 (도 1). cDNA 및 지놈 서열 비교로부터, 119-bp-길이의 인트론이 *OsAsr1* 유전자에 있음을 알 수 있다. 질문어를 *OsAsr1* protein sequence (accession no. AAB96681)로 한 TBLASTN 검색 (Altschul et al., 1997)을 통하여, 스캐폴드들 (002913, 037286, 026604, 023736, and 081294)에서 5개의 유사체를 확인할 수 있었다. 덴드로그램으로 제시된 계통유전학적 관계는 *OsAsr1*이 옥수수의 *ZmAsr1*과 가장 높은 상동성을 갖는다는 것을 보여준다 (도 2). ASR 단백질들은 4개의 주 그룹으로 분류되며 (Hong et al., 2002), *OsAsr1*은 *ZmAsr1*과 관련있는 그룹 I에 속한다. 100개 이상의 *OsAsr1* cDNA 서열이 GenBank 데이터베이스에 등록되어 있고, 이와 같은 사실은 본 발명의 유전자가 풍부-발현 유전자 패밀리에 속한다는 것을 나타내는 것이다. 또한, *OsAsr1* 유사체들은 식물종에서만 발견되었다.

*OsAsr1*의 DNA 젤-블롯 분석

3가지 자포니카 재배종에 대한 DNA 젤-블롯 분석의 결과는 *OsAsr1* 유전자의 단일 카피만을 나타내었다 (도 3). 이러한 결과는 포칼리 품종 실험 결과 (Vaidyanathan et al., 1999)와 일치하는 것이다. 상이한 저온 내성을 갖는 상기 3개지 재배종에 대한 제한효소처리-단편 길이로부터 명확한 다형성이 없음을 알 수 있었다.

저온 스트레스에 의한 *OsAsr1*의 유도

본 발명자들은 다른 조직에서 그리고 다양한 비생물성 조건에서 발현되는 유전자를 조사하기 위하여 RNA 젤-블롯 분석을 이용하였다. *OsAsr1* 전사체를 캘러스를 제외한 모든 조직 및 기관에서 검출하였고 (도 4a), 그리고 *OsAsr1* 전사체를 저온, 건조, 염 그리고 ABA처리로 유도하였으며, 건조 및 염 스트레스 처리 3 시간 후에, 이들의 최대값에 도달하였다 (도

4d 및 4e). 상기 전사체의 크기는 약 0.9 kb이고, 이는 본 발명의 *OsAsr1* cDNA 클론이 전장임을 나타내는 것이다. 상기 전사체는 유식물체의 신초와 뿌리, 플렉 잎의 잎집에서 높은 수준으로 존재하였고, 노드 I 및 II 사이의 인터노드에서 가장 풍부하게 존재하였으며, 이는 *OsAsr1* 유전자가 기관-선호성 발현을 함을 보여준다.

*OsAsr1*은 성숙 식물체의 잎에서는 바탕 수준으로 발현되었으나, 성숙된 꽃에서는 더 풍부하게 발현되었다. 흥미롭게도, 저온은 상기 두 기관에서의 전체적 전사체양을 상승시켰다 (도 4b). 저온 처리는 유식물체 단계에서 전사체양을 증가시켰고, 4℃ 보다는 12℃에서 전사체의 양의 증가가 더욱 명확하였다 (도 4c). 저온-반응성 *OsAsr1* 축적은 신초에 제한적이고, 이와 같은 사실은 유전자 발현의 기관-특이성 스트레스 반응을 보여준다.

*OsAsr1*은 ABA-유도성이기 때문에 (Vaidyanathan et al., 1999), 본 발명자들은 저온 스트레스의 유도 키네틱스 대 ABA의 유도 키네틱스를 비교하였다. 전사체 수준은 3시간 동안의 저온 스트레스 후에 최대값을 나타낸 반면, ABA 처리는 보다 느린 속도로 증가를 시켰고, 6시간 이후에 최대값을 나타내었다 (도 4c). 성장 온도 (12, 20, 및 30℃)의 생리학적 범위에서의 *OsAsr1* 발현을 저온-내성 재배종 오대 및 저온-민감성 재배종 남양 21 사이에 비교를 하였다. 그러나, 본 발명자들은 상기 재배종 사이의 유전자 발현의 명확한 차이를 관찰할 수 없었다.

조직 수준에서 *OsAsr1* 유전자의 저온-유도 발현 패턴을 규명하고자, RNA 인 시/트 혼성화를 실시하였다. 잎에서, 유도는 엽육 조직에 한정되었고, 표피 또는 관 조직에서는 발견되지 않았다 (도 5의 E 및 G). 꽃은 저온 스트레스의 주요한 타겟 기관이기 때문에, 꽃에 대하여 혼성화를 실시하였다. heading 전 4일째 미성숙 꽃을 12℃에서 4일 동안 저온처리하였다. 이어, 스트레스를 받은 꽃의 내영 및 외영의 엽육 세포로부터 *OsAsr1* 전사체를 검출할 수 있었다 (도 5의 A 및 C). 저온 스트레스를 받지 않은 대조군 꽃에서 *OsAsr1* 발현 패턴은 저온 스트레스를 받은 꽃과 유사하였으나, 발현양은 저온 스트레스를 받은 꽃 보다 훨씬 낮았다.

형질전환 식물체에서의 *OsAsr1* cDNA의 발현

*OsAsr1*의 기능을 연구하기 위하여, *OsAsr1* cDNA를, 센스 또는 안티센스 방향으로, 옥수수 유비퀴틴 프로모터 (P_{UBI})에 의해 조절되도록 위치시켜, 최종적으로 벡터 pSK167 및 pSK168를 각각 얻었다 (도 6a). 아그로박테리움-중재 공동배양 방법을 통하여 20 개체의 형질전환 식물체를 생성시키고, 벼 지놈에 트랜스진이 삽입되었는지 여부를 DNA 젤-블롯 분석으로 확인하였다. 카피수는 일작으로 하나 내지 둘이었으나, 셋 이상의 카피도 검출되었다 (도 6b). 형질전환 식물체는 T1 및 T2 세대에서 뚜렷한 형태학적 변화를 보이지 않았다.

*OsAsr1*의 변화된 발현이 형질전환 벼에서 저온 내성을 초래하는 지 여부를 검사하기 위하여, RNA 젤-블롯 분석을 실시하였다 (도 6c). 전체적으로, *OsAsr1* 전사체 양은 형질전환 식물체에서 야생형 보다 높게 나타났다. 형질전환 식물체에서 혼성화된 전사체의 크기는 야생형 보다 조금 컸다. 2가지 강한 과발현자, S2 및 S15는 추가적인 실험을 위해 선택하였다.

저온 스트레스 하에서 형질전환 식물체의 클로로필 형광 측정

저온 처리 (4℃) 후의 저온 내성의 표지자로서의 클로로필 형광을 측정하였다. 광계 II의 활성을 나타내는 Fv 대 Fm의 비율은 식물체에서 기능 손상을 평가하는 데 이용된다 (Genty et al., 1989). 본 발명자들의 야생형 분리자에서 대하여, 저온에 의해 Fv/Fm은 점차적으로 감소하였다. 이러한 감소는 저온 스트레스에 의해 야기된 광억제의 정도를 보여준다 (Krause, 1994). 스트레스를 유도하기 전 Fv/Fm 값은 0.84 ± 0.01 이었다. 6시간의 저온 처리 후, Fv/Fm은 조금 감소하였고, 값의 명확한 변화는 형질전환체 및 야생형에서 모두 관찰되지 않았다. 그러나, 24시간 처리 후, 야생형에 대한 Fv/Fm 값은 상당히 감소하여, 0.25 ± 0.021 에 도달하였다 (도 7). 반대로, 과발현 S2 및 S15의 Fv/Fm 값은 각각 0.53 ± 0.049 및 0.60 ± 0.067 이었다. 상기 비율은 야생형보다 약 2배 정도의 값이고 (도 7), 이는 형질전환 식물체가 높은 저온 내성을 갖는다는 것을 나타내는 것이다.

생존율

유식물체 단계에서의 형질전환 식물체의 생존율을 위조 및 재성장 시험으로 측정하였다. 우선, 스트레스 후의 위조 (즉, 위조 유식물체의 수 대 저온 처리 유식물체의 총수의 비율)의 양을 평가하여 저온 처리의 임계적 길이를 결정하였다. 저온에 5일 동안 노출한 후, 저온-내성 재배종, 오대 및 스테자레 (Stejaree) 45는, 각각 10/18 (55.6%) 및 8/20 (40%)의 위조 비율을 나타내었다 (표 1). 이러한 위조 비율은 6일 동안의 스트레스 후에 약 75%로 증가하였다. 반대로, 본 발명의 *OsAsr1* 형질전환의 모주, 동진은 5일 동안의 스트레스 후 17 식물체 중 12 개체 (70.6%)가 위조 증상을 나타내었다. 상기 위조 비율은 6일 스트레스 후에 약 94%까지 증가하였다. 저온-민감성 인디카 x 자포니카 재배종, 밀양 23은 단지 4일 스트레스

후에 100%의 위조를 보였다. 따라서, 동진에 의한 저온 스트레스 내성에 대한 임계적 시간 길이는 약 5 내지 6일임을 알 수 있었다. 이러한 추정치에 기초하여, 6일 동안 T2 형질전환 식물체를 저온 처리하였다. S2 식물체로부터 얻은 34 개체의 유식물체 중 23 개체 (68%)는 저온 처리 후 위조를 보였고, S15 식물체의 15 개체 유식물체 중 10 개체 (67%)도 이러한 증상을 보였다. 반대로, 야생형 식물체의 66 유식물체 중 63 개체 (96%)가 위조를 보였다. 안티센스 형질전환 식물체도 조사하였고, 위조 발생은 A3, A12 및 A14에서, 각각 9/9 (100%), 9/11 (82%), 및 10/11 (91%)이었다.

T3 세대에서 실시한 재성장 시험은 히그로마이신 선택 후, 형질전환 유전자에 대한 동형접합주를 분석하는 것을 포함하였다. S15 식물체의 35 개체 유식물체 중 14 개체 (40%)는 4엽의 활발한 발달을 보였다. 반대로, 약한 *OsAsr1*-발현주로부터 유래된 S18 식물체는 단지 35 식물체 중 7 개체 (20%)의 재성장을 보였다. 그럼에도 불구하고, 야생형-분리 대조군 식물체는 훨씬 낮은 재성장율, 즉 105 식물체 중 9 개체 (9%)를 보였다. 유사한 결과가 A3 식물체에서도 관찰이 되었는데, 70 식물체 중 단지 7 개체 (10%)만이 반응을 나타내었다. 종합하건대, 상기 실험결과는 *OsAsr1* 전사체를 과발현하는 형질전환 식물체는 저온 스트레스에 대하여 증가된 내성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 안티센스 식물체에서도 같이 *OsAsr1* 발현이 억제된 경우 내성의 정도는 뚜렷하게 변화되지 않았다.

[표 1]
벼 재배종 및 형질전환 *OsAsr1* 벼의 저온 스트레스 내성

재배종 또는 라인	저온 처리 기간 (일)							
	0	3	4	5	6	7	10	12
오대(Odae)	0/18*	2/20	5/20	10/18	13/17	17/18	19/19	19/19
스테자레 (Stejaree) 45	0/18	0/20	6/20	8/20	15/20	18/19	20/20	19/19
합천앵미 (Hapchunaengmi)	0/18	0/20	4/20	8/20	10/20	18/19	20/20	19/19
추청 (Chuchung)	0/18	0/19	5/20	9/20	18/19	19/19	20/20	20/20
동진 (Dongjin)	0/20	6/20	6/20	12/17	17/18	17/18	20/20	19/19
남양 (Namyang) 21	0/19	10/16	12/20	16/18	18/18	19/19	19/19	20/20
밀양 (Milyang) 23	0/19	13/18	17/17	17/17	17/17	19/19	19/19	20/20
형질전환 S2	-	-	-	-	23/34	-	-	-
형질전환 S15	-	-	-	-	10/15	-	-	-
야생형	-	-	-	-	63/66	-	-	-
* 위조된 유식물체의 수/저온처리 유식물체의 수								

아라비도시스 *CBF1*을 발현하는 형질전환 식물체에서의 *OsAsr1* cDNA의 발현

CRT/DRE 중심 서열은 *OsAsr1*의 추정 프로모터 부위에 위치하며, 상기 유전자는 CBF1에 의해 조절된다. 이에, 본 발명자들은 *Arabidopsis CBF1* cDNA를 발현하는 형질전환 벼 식물체를 제조하였다. RNA 젤-블롯 실험을 통하여, CBF1 전사인자를 강하게 발현하는 형질전환 식물체 (18-2 및 18-3)에서 *OsAsr1* 유전자의 발현이 증가함을 알 수 있었다 (도 8). 형질전환 식물체에서 *OsAsr1*의 발현은 저온 스트레스에 의해 보다 더 증가되었다.

형질전환 *OsAsr1* 식물체의 염 내성

유식물체 단계에서 형질전환 식물체의 생존율을 위조 (wilting) 시험으로 측정하였다. 정확한 실험을 위하여, 두 개의 자연 형 벼 품종, 자포니카 품종인 '동진' 그리고 인디카 품종인 'Tachung Native' (TN1)을 사용하여 염 내성을 보여주었다. 10 일령 유식물체를 200 mM NaCl을 포함하는 0.1% (w/v) Hyponex 용액인 영양배지에 옮겼다. 센스 형질전환 식물체를 1 일 그리고 안티센스 형질전환체를 12 시간 동안 30°C에서 처리하고, 다시 NaCl이 없는 신선한 영양배지로 옮기고 정상 조건에서 2 일 배양하였다. 완전하게 위조된 식물체의 3 내지 4개의 잎이 명백한 퇴락을 나타낼 때, 스트레스 후 위조가 결정되었다.

염-내성 품종인 TN1은 회복 후 위조 비율 (wilting ratio)이 36.1 ± 8.4 %이었다 (도 9, 도 10, 표 2). 대조적으로, 발명의 *OsAsr1* 형질전환체의 모라인 (parental line)인 '동진'은 회복 2일 후에 86 식물체 중 66 식물체에서 위조 증상이 나타났 다 (77 ± 22.5 %). 자연형 분리성 식물체로부터 유도된 58 유식물체 중 39 유식물체 (67 ± 4.1 %)는 회복 2일 후 위조되

었다. 2 개의 강력한 과발현체인 S2 및 S15를 스트레스 내성 시험에 사용하였다. 각각의 T3 라인식물체는 동질 접합성 식물체였다. 동질접합성 T3 형질전환 식물체를 염 스트레스 처리하였으며, 센스 식물체에 대해서는 1일 그리고 안티센스 식물체에 대해서는 12 시간 처리하였다. 이러한 염-처리 시간은 참고 문헌에서 참조하였다 (Kim S.H., PhD thesis, Sogang University, 2004). S2-1 식물체로부터 수득한 94 유식물체 중 26 유식물체($27 \pm 11\%$)는 위조를 나타내었다. 또한, S2-2 식물체로부터 수득한 88 유식물체 중 27 유식물체($31 \pm 8\%$)는 위조를 나타내었다. 하지만, S15-1 식물체로부터의 73 유식물체 중 33 유식물체($45 \pm 22\%$)는 그러한 증상을 나타내었으며, S15-2 식물체로부터의 88 유식물체 중 34 유식물체($39 \pm 5\%$)는 위조를 나타내었다. 대조적으로, 안티센스 형질전환 식물체를 스트레스 처리 12 시간 후에 조사한 결과, A3-1 및 A2-1에서 위조 발생 정도가 각각 38/53 ($72 \pm 3\%$) 및 30/67 ($45 \pm 23\%$)이었다. 회복 5 일 후에서, 위조 비율은 64/73 ($73 \pm 4\%$) TN1 식물체, 86/86 ($100 \pm 0\%$) 동진 식물체, 58/58 ($100 \pm 0\%$) NT-S2 식물체, 87/94 ($93 \pm 3\%$) S2-1 식물체, 75/88 ($85 \pm 2\%$) S2-2 식물체, 71/73 ($97 \pm 4\%$) S15-1 식물체 및 87/88 ($99 \pm 2\%$) S15-2 식물체로 증가하였다. 모든 실험은 3회 반복되었다. 이 결과에 기초하여, *OsAsr1*의 과발현은 벼에 염 내성을 부여하며, *OsAsr1*안티센스 라인은 자연형에 비하여 증가된 염 민감도를 보여준다는 것을 알 수 있다.

[표 2]
벼 품종 및 형질전환 *OsAsr1*벼의 염 스트레스 내성

라인	위조된 수	총수	위조 ^a (%)
TN1	32	88	36 ± 8
동진	66	86	77 ± 3
NT-S2	39	58	67 ± 4
S2 -1	26	94	27 ± 11
S2 -2	27	88	31 ± 8
S15-1	33	73	45 ± 22
S15-2	34	88	39 ± 5
A3 -1	38	53	75 ± 3
A3 -2	30	67	45 ± 23
NT-S2	17	50	34 ± 4

^a 위조 식물체 수/ 총 식물체 수 (위조 식물체 수의 백분율). 위조 식물체의 수는 식물체의 3 내지 4개의 잎이 염 스트레스 처리 후 2일 회복 시에 위조된 것을 나타낸다.

형질전환 *OsAsr1*식물체의 건조 내성

형질전환 *OsAsr1*식물체의 건조 내성을 평가하였다. 정확한 실험을 위하여, 건조 내성을 두 개의 자연형 벼 품종, Sangnambatbyeo 및 동진을 사용하여 나타내었다 (표 3, 도 11 및 12). 14 일령 유식물체를 성장 챔버에서 배양하고 (30°C , 명/암 주기 16/8 시간), 그 다음 4 일 동안 물을 공급하지 않았다. 본 발명의 T3 형질전환 식물체를 4 일 동안 건조 처리하였다. 완전하게 위조된 식물체의 3 내지 4개의 잎이 명백한 퇴색을 나타낼 때, 스트레스 후 위조가 결정되었다 (Lee, S.C., Huh, K.W., An, K., An, G., and Kim, S. R. 2004b Ectopic expression of a cold-inducible transcription factor. CBF1/DREB1b, in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) Mol. Cells 18: 107-114).

60 S2-1 유식물체 중 11 유식물체($18 \pm 12\%$)가 위조를 보였다. 또한, 61 S2-2 유식물체 중 15 유식물체($25 \pm 10\%$)가 위조를 보였다. 하지만, 4 일 스트레스 후에 S15-1 식물체로부터의 51 유식물체 중 14 유식물체($27 \pm 13\%$)가 그러한 증상을 나타내었으며, S15-2 식물체로부터의 58 유식물체 중 17 유식물체($29 \pm 4\%$)가 위조를 보였다. 또한, 건조 내성에 대하여 안티센스 형질전환 식물체를 조사하였다. 안티센스 식물체 인 A3-1 및 A3-2는 41/45 ($91 \pm 12\%$) 및 38/51 ($75 \pm 3\%$)의 민감도를 각각 나타내었다. 모든 실험은 3회 반복 하였다. 이러한 데이터는 *OsAsr1*의 과발현은 벼에게 건조 내성을 부여하며, *OsAsr1*안티센스 라인은 자연형에 비하여 높은 건조 민감도를 보인다는 것을 시사한다.

[표 3]
벼 품종 및 형질전환 *OsAsr1*벼의 염 스트레스 내성

라인	위조된 수 ^a	총수	위조 (%)
SNB	25	57	44±6
동진	64	100	64±6
NT-S2	35	59	59±3
S2 -1	11	60	18±12
S2 -2	15	61	25±10
S15-1	14	50	28±13
S15-2	17	58	29±4
A3 -1	38	53	90±12
A3 -2	30	67	79±3

^a WT 및 T3 식물체의 3 내지 4개의 잎이 건조 스트레스 처리 후 7일 회복 시에 완전하게 위조된 WT 및 T3 식물체의 수

발명의 효과

상술한 바와 같이, 본 발명은 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질을 제공한다. 또한, 본 발명은 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자를 제공한다. 본 발명은 벡터, 형질전환체를 제공한다. 한편, 본 발명은 저온, 염 또는 건조 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체 및 그 제조방법을 제공한다. 본 발명의 OsAsr1 유전자 및 단백질은 식물체에 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성을 증진하는 데 매우 유효하다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

참조 문헌

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schafler, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

An, G., Ebert, P.R., Mitra, A., and Ha, S.B. 1988. Binary vectors. *In* Plant Molecular Biology Manual. Edited by Gelvin, S.B., Schilperoort, R.A. The Netherlands. pp. A3 1-19. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Boothe, J.G., Sonnichsen, F.D., de Beus, M.D., and Johnson-Flanagan, A.M. 1997. Purification, characterization, and structural analysis of a plant low-temperature-induced protein. *Plant Physiol.* 113: 367-376.

Cakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., and Atanassova, R. 2003. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 2165-2180.

Canel, C., Bailey-Serres, J.N., and Roose, M.L. 1995. Pummelo fruit transcript homologous to ripening-induced genes. *Plant Physiol.* 108: 1323-1325.

Chandler, P.M., and Robertson, M. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 113-141.

Chang, S., Puryear, J.D., Dias, M.A.D.L., Funkhouser, E.A., Newton, R.J., and Cairney, J. 1996. Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): isolation and characterization of cDNA clones. *Physiol. Plant* 97: 139-148.

- Christensen, A.H., Sharrock, R.A., and Quail, P.H. 1992. Maize polyubiquitin gene: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol. Biol.* 18: 675-689.
- De Datta, S.K. 1981. The climatic environment and its effects on rice production. In *Principles and Practices of Rice Production*, Edited by De Datta, S.K., pp. 9-40. John Wiley & Sons, Chichester UK.
- Dure, L. 3rd. 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.* 3: 363-369.
- Furumoto, T., Hata, S., and Izui, K. 2000. Isolation and characterization of cDNAs for differentially accumulated transcripts between mesophyll cells and bundle sheath strands of maize leaves. *Plant Cell Physiol.* 41: 1200-1209.
- Gale, M.D., and Devos, K.M. 1997. Comparative genetics in the grasses. *Plant Mol. Biol.* 35: 3-15.
- Genty, B., Briantais, J.M., and Baker, N.R. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta* 990: 87-92.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K., and Somerville, C. 1994. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3-desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 106: 1615-1621.
- Gilmour, S.J., Artus, N.N., and Thomashow, M.F. 1992. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 18: 13-21.
- Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D., and Thomashow, M.F. 2000. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiol.* 124:1854-1865.
- Guy, C. 1999. Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1: 231-242.
- Hagit, A.Z., Pablo, A.S., and Dudy, B.Z. 1995. Tomato *Asr1* mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Sci.* 110: 205-213.
- Hiilovaara-Teijo, M., Hannukkala, A., Griffith, M., Yu, X.M., and Pihakaski-Maunsbach, K. 1999. Snow-mold-induced apoplastic proteins in winter rye leaves lack antifreeze activity. *Plant Physiol.* 121: 665-74.
- Hong, S.T., Chung, J.E., An, G., and Kim, S.R. 1998. Analysis of 176 expressed sequence tags generated from cDNA clones of hot pepper by single-pass sequencing. *J. Plant Biol.* 41: 116-124.
- Hong, S.H., Kim, I.J., Yang, D.C. and Chung, W.I. 2002. Characterization of an abscisic acid responsive gene homologue from *Cucumis melo*. *J. Exp. Bot.* 53: 2271-2272.
- Houde, M., Dhindsa, R.S., and Sarhan, F. 1992. A molecular marker to select for freezing tolerance in Gramineae. *Mol. Gen. Genet.* 234: 43-48.
- Igarashi, Y., Yoshiba, Y., Sanada, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Wada, K., and Shinozaki, K. 1997. Characterization of the gene for delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L. *Plant Mol. Biol.* 33: 857-865.
- Iusem, N.D., Bartholomew, D.M., Hitz, W.D., and Scolnik, P.A. 1993. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening. *Plant Physiol.* 102: 1353-1354.

- Jeanneau, M., Gerentes, D., Foueillassar, X., Aivy, M., Vidal, J., Toppan, A., and Perez, P. 2002. Improvement of drought tolerance in maize: towards the functional validation of the *Zm-Asr1* gene and increase of water use efficiency by over-expressing C4-PEPC. *Biochimie* 84: 1127-1135.
- Jeon, J.S., Chung, Y.Y., Lee, S., Yi, G.H., Oh, B.G., and An, G. 1999. Isolation and characterization of an anther-specific gene, *RA8*, from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 39: 35-44.
- Joachim, V.B., Francesco, S., and Christiane, G. 1994. Transcripts accumulating during cold storage of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers are sequence related to stress-responsive genes. *Plant Physiol.* 104: 445-452.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol.* 17: 287-291.
- Kim, S.-R., Lee, S., Kang, H.-G., Jeon, J.-S., Kim, K.-M. and An, G. 2003. A complete sequence of the pGA1611 binary vector. *J. Plant Biol.* 46: 211-214.
- Kirsten, R., Jaglo-Ottosen, S.J., Gilmour, D.G., Zarka, O.S., Michael, F., and Thomashow, M.F. 1998. *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106.
- Kishor, P.B.K., Hong, Z., Miao, G.H., Hu, C.A.A., and Verma, D.P.S. 1995. Overexpression of delta-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiol.* 108: 1387-1394.
- Krause, G.H. 1994. Photoinhibition of photosynthesis: an evaluation of damaging and protective mechanism. *Physiol. Plantarum* 74: 566-574.
- Kurkela, S., and Borg-Franck, M. 1992. Structure and expression of *kin2*, one of two cold- and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 19: 689-692.
- Lee, S., Jeon, J.S., Jung, K.H., and An, G. 1999. Binary vectors for efficient transformation of rice. *J. Plant Biol.* 42: 310-316.
- Lee, T.M., Lur, H.S., and Chu, C. 1993. Role of abscisic acid in chilling tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. I. Endogenous abscisic acid levels. *Plant Cell Environ.* 16: 481-490.
- Lin, C., and Thomashow, M.F. 1992. DNA sequence analysis of a complementary DNA for cold-regulated *Arabidopsis* gene *cor15* and characterization of the COR15 polypeptide. *Plant Physiol.* 99: 519-525.
- Lim, J.N. 1998. Report of a research on new crop cultivar development. Rural development administration, Korea. pp. 191-193.
- Maskin, L., Gubeshlat, G. E., Moreno, J.E., Carrari, F. O., Frankel, N., Sambade, A., Rossi, M., and Iusem, N.D. 2001. Differential expression of the members of the Asr gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Sci.* 161: 739-746.
- Mbeguie-A-Mbeguie, D., Gomez, R.M., and Fils-Lucaon, B. 1997. Molecular cloning and nucleotide sequence of an abscisic acid-stress-ripening induced (ASR)-like protein from apricot fruit (acc. No. U93164). Gene expression during fruit ripening. (PGR97-166). *Plant Physiol.* 115: 1288.
- Mizoguchi, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H., and Shinozaki, K. 1993. ATMPKs: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 336: 440-444.

- Monroy, A.F., Castonguay, Y., Laberge, S., Sarhan, F., Verzina, L.P., and Dhindsa, R.S. 1993. A new cold-induced alfalfa gene is associated with enhanced hardening at subzero temperature. *Plant Physiol.* 102: 873-879.
- Murashige, T., and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum* 15: 473-495.
- Nicholas, K.B., and Nicholas, H.B. 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. [Http://www.cris.com/~Ketchup/genedoc.html](http://www.cris.com/~Ketchup/genedoc.html).
- Nishiyama, I. 1984. Climatic influence of pollen formation and fertilization. *In* S Edited by Tsunoda N. T. pp. 153-171. *Biology of Rice*, Japan Sci.Soc. Press, Tokyo.
- Nylander, M., Svensson, J., Palva, E.T., and Welin, B.V. 2001. Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 45: 263-279.
- Roger, S.O., and Bendich, A.J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *In* Plant Molecular Biology Manual, Edited by Gelvin, S.B., and Schilperoort, R.A. pp. A6 1-10 Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Rossi, M., and Iusem, N.D. 1994. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) genomic clone homologous to a gene encoding an abscisic acid-induced protein. *Plant Physiol.* 104: 1073-1074.
- Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K., and Izui, K. 2000. Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23: 319-327.
- Schneider, A., Salamini, F., and Gebhardt, C. 1997. Expression patterns and promoter activity of the cold-regulated gene ci21A of Potato. *Plant Physiol.* 113: 335-345.
- Schreiber, U., Bilger, W., and Neubauer, C. 1994. Chlorophyll fluorescence as a noninvasive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. *In* Ecological Studies, Vol. 110: Ecop.
- Scott, D.M., Michael, L.N., and Andrew, D.H. 1999. Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiol.* 120: 945-949. multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., and Shinozaki, K. 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant cell* 13: 61-72.
- Silhavy, D., Hutvagnet, G., Barta, E., and Banfalvi, Z. 1995. Isolation and characterization of a water stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Mol. Biol.* 27: 587-595.
- Steponkus, P.L. 1984. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 35: 543-584.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., and Thomashow, M.F. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 1035-1040.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 2002. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29: 417-426.

Thomashow, M.F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50: 571-599.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive hysiology of Photosynthesis, Edited by Schulze, E.D. and Caldwell, M.M. pp. 49-70. Springer Verlag, Berlin.

Yu, J. et al., 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). Science 296: 79-92.

Vaidyanathan, R., Kuruvilla, S., and Thomas, G. 1999. Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. Plant Sci. 140: 25-36.

Wang, C.S., Liau, Y.E., Huang, J.C., Wu, T.D., Su, C.C. and Lin, C.H. 1998. Characterization of a desiccation related protein in lily pollen during development and stress. Plant Cell Physiol. 39: 1307-1314.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

서열목록 제 2 서열의 아미노산 서열을 포함하며 식물체에서 과발현되는 경우 상기 식물체에 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성을 증진시키는 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질 또는 상기 단백질과 80% 이상의 아미노산 서열 상동성을 나타내는 단백질.

청구항 2.

상기 제 1 항의 비생물성 스트레스-유도성 OsAsr1 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산분자.

청구항 3.

제 2 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제 1 서열의 뉴클레오타이드 서열 중 서열번호 67-480의 뉴클레오타이드 서열인 것을 특징으로 하는 핵산분자.

청구항 4.

상기 제 2 항 또는 제 3 항의 핵산 분자를 포함하는 벡터.

청구항 5.

상기 제 4 항의 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체.

청구항 6.

다음의 단계를 포함하는 저온, 염 또는 건조 스트레스 내성이 증진된 형질전환 식물체의 제조방법:

(a) 식물 세포 또는 식물 조직을 상기 제 4 항의 벡터로 형질전환하는 단계;

(b) 형질전환된 식물세포 또는 식물조직을 선별하는 단계; 및

(c) 상기 형질전환된 식물세포 또는 식물조직으로부터 식물체를 재분화시켜 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 7.

제 6 항에서 있어서, 상기 식물체는 벼, 보리, 밀 또는 옥수수인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8.

상기 제 6 항 또는 제 7 항의 제조방법에 의해 제조된 저온, 염 또는 건조 스트레스에 대한 내성이 증진된 형질전환 식물체.

도면

도면1

```

OsAsr1 : MAEEK--HHHHLFPHK---KDEPATGVDS--YGEVYT----- : 32
Maize : MAEEKH--HHHHLFPHK---KDEEQEQLAGGGYGESAEY----- : 35
Tomato1 : MAEEKH-QHHHHLFPHK----- : 16
Tomato2 : MEEK--HHHHLFPHK----- : 15
Tomato3 : MAEEK--QHHLFPHK----- : 14
Tomato4 : MAEEKH-QHHHHLFPHK----- : 16
Potato1 : --KHH--FGGLFHHHNEEDTPVEKTTYETTYGESEKSTYGEKTSYGGDTYGEKTTTFGDDNKYGE : 65
Potato2 : MEEK--HHHHLFPHKDK----- : 16
Grape : MEEK--HHHHLFPHK---DKPVDDAVPYSNAYSDDTYS----- : 35
Apricot : MEEK--HHHGLFPHKDEDRPIETSDYPQSGGYDEGRGTS---GYGGGGGGYGGGGYGGGGGGYGD : 64
Melon : MEEEGQHHLFPHK----- : 17
Pummelo : ----- : -
Pine1 : MEEKQ--HHHLFHHHEDG-----GE : 20
Pine2 : -----HHKEDENDNPPSEVVYFETTTA-----YGD : 25
Pine3 : -----HHKEDG----- : 7
Pine4 : MEEKH--HHHLFHHKEDSENVVPSEVCAETTTA-----YGD : 37

Zn2+ DNA binding site

OsAsr1 : SETVTTEVVAG----- : 43
Maize : TEATVTEVVST----- : 46
Tomato1 : -----NKE----- : 19
Tomato2 : -----DKA----- : 18
Tomato3 : -----NRE----- : 17
Tomato4 : -----NKE----- : 19
Potato1 : KTSYGDDTYGEKPTS YGGDNTYGEKTSYGGKDDNKYGEKTSYGEKDDNKYGEKTSYGDSDYGEKPSYGGG : 135
Potato2 : ----- : -
Grape : DTSYATDGVSG----- : 46
Apricot : NTAYSGEGRPGSGYGGGG----- : 82
Melon : -----KEG----- : 20
Pummelo : -----MAG----- : 3
Pine1 : QVIESTDVYAA----- : 31
Pine2 : EVIQSADVYAT----- : 36
Pine3 : -----ESADVRDE----- : 15
Pine4 : EVIQSADVYAA----- : 48

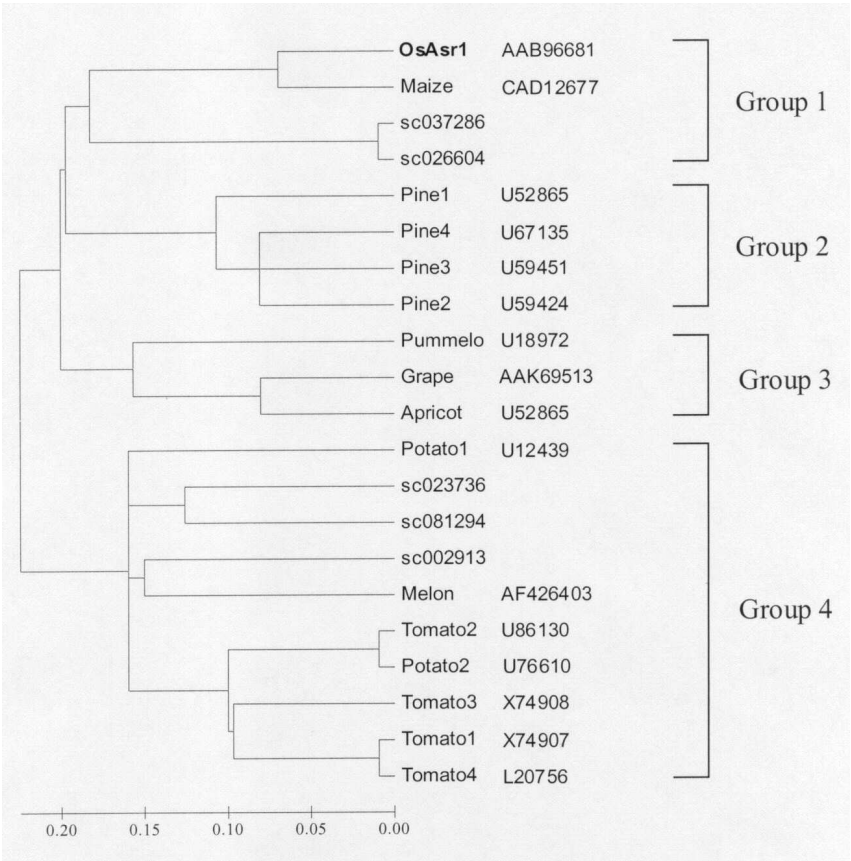
OsAsr1 : -----GQDE-----YERMKKEKQKHKHKLSEAALAAAGAPALYER : 80
Maize : -----GENE-----YDEYK--EQKHKHKLSEAALAAAGAPALYER : 82
Tomato1 : -----DEGG-----PVDYKKEVKKHSHLEKI SELTVAAGALALHEK : 56
Tomato2 : -----EEG-----PVDYKKEIKHHSHLEKI SELTVAAGALALHEK : 54
Tomato3 : -----EEGG-----PVDHKKKVKKHSHLQKI SELTVAAGALALHEK : 54
Tomato4 : -----DEGG-----PVDYKKEVKKHSHLEKI SELTVAAGALALHEK : 56
Potato1 : DDNKYGEKTSYGNEEGGYGGVGETTNYEENESETKTSEDKKKEKHHKHEEI GGLTVAAGALALHEK : 205
Potato2 : -----EEEG-----PVDYKKEKHHKHEIQIGKLGTVAGAYALHE : 52
Grape : -----YAAETTEVLADD-----PAPDYKKEKHHKHEHLSEL TVAAGALALHEK : 92
Apricot : -----GYGESADYSDGGRYKETAAYGTTGTNE---SEIDYKKEKHHKHELEP TAAAGVYFALHEK : 143
Melon : -----EESS-----DVVDYKKEKHHKHEHLSEL TAAAGALALHEK : 58
Pummelo : -----KEEE-----FDYKKEKHHKHEHLGGLTAGAGAPRLES : 39
Pine1 : -----GNVD-----EYKAKKDEKHHKHEHLSEM TVAAGALALHEK : 69
Pine2 : -----GNVNSD-----EYKAKKEKHHKHEEVGGLXMATGAPALHEK : 76
Pine3 : -----GNVKSE-----EKAKKEKHHKHEETGLTVAAGALALHEK : 53
Pine4 : -----GEVNDK-----FAEYKARKEKHHKHEELGGLTVAAGALALHEK : 91

OsAsr1 : HEAKKDPENAHKHKITEETAAATAAVAGGAFHEHHEK KDKHSABESTGEKKHHLFG----- : 138
Maize : HEAKKDPENAHKHKIEEVAATAAVAGGAFHEHHEK KDKHDAEAGGEKKHHFFG----- : 140
Tomato1 : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 114
Tomato2 : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 115
Tomato3 : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 78
Tomato4 : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 114
Potato1 : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 263
Potato2 : KHEAKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 109
Grape : HSEKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 149
Apricot : HSEKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 200
Melon : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 152
Pummelo : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 98
Pine1 : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 126
Pine2 : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 131
Pine3 : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 108
Pine4 : HEAKKDPENAHKHKIEEIMAAVAVAGGAFHEHHEK KDAKKEKKEVEGGHHHHHHY----- : 153

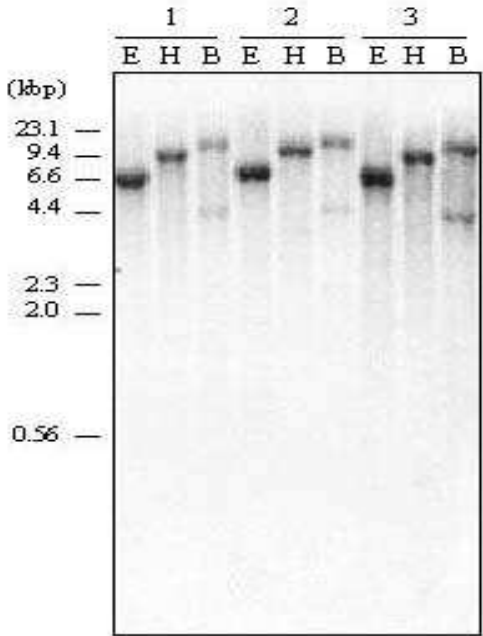
```

NLS

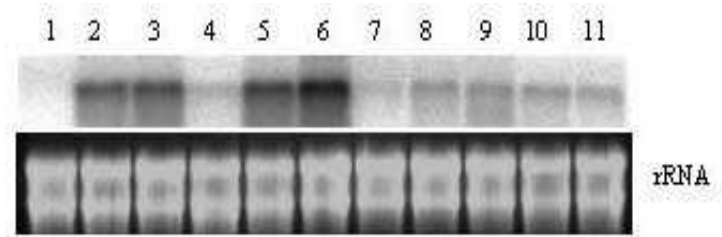
도면2



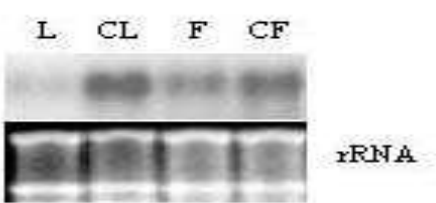
도면3



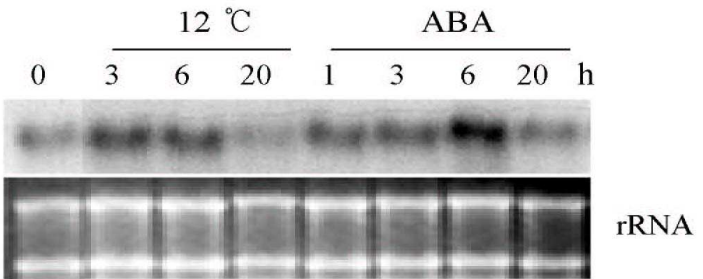
도면4a



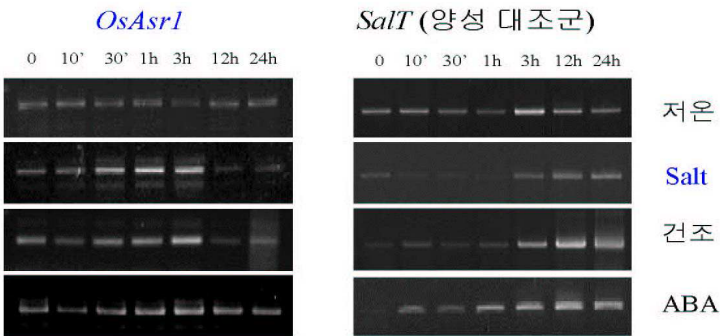
도면4b



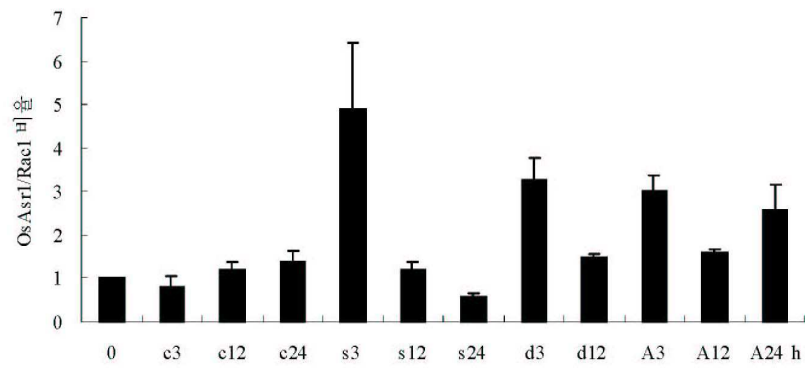
도면4c



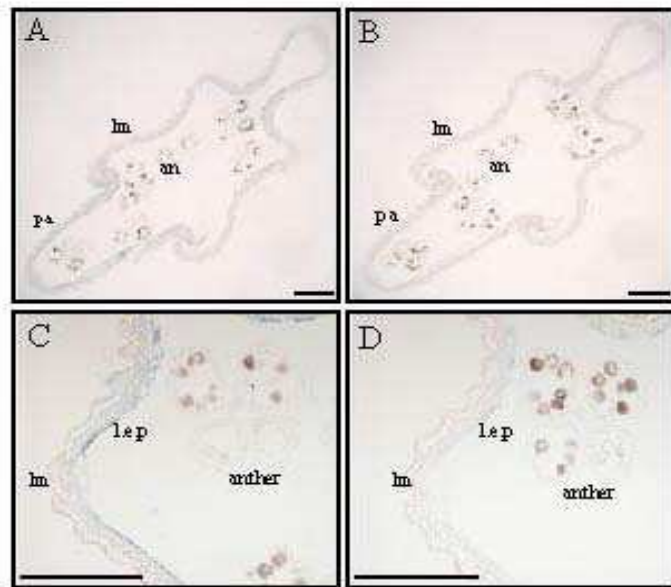
도면4d



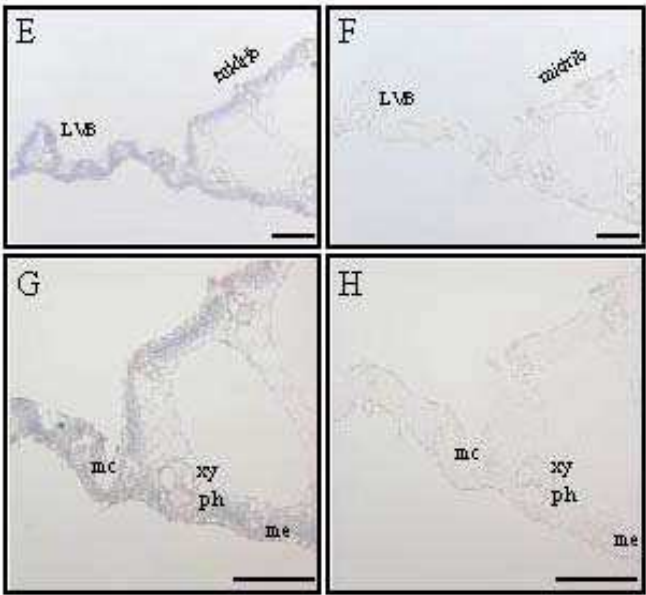
도면4e



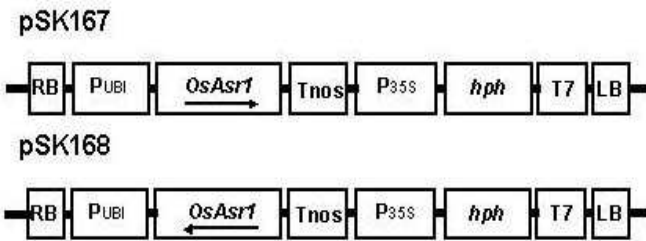
도면5a



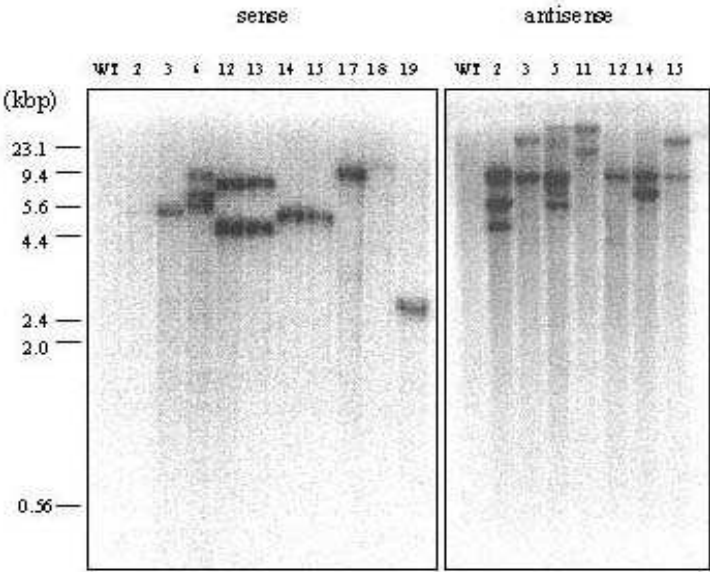
도면5b



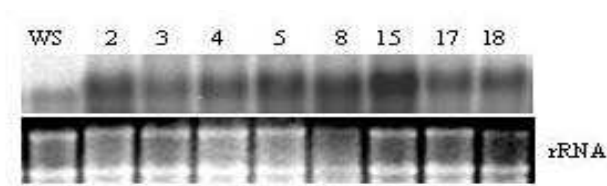
도면6a



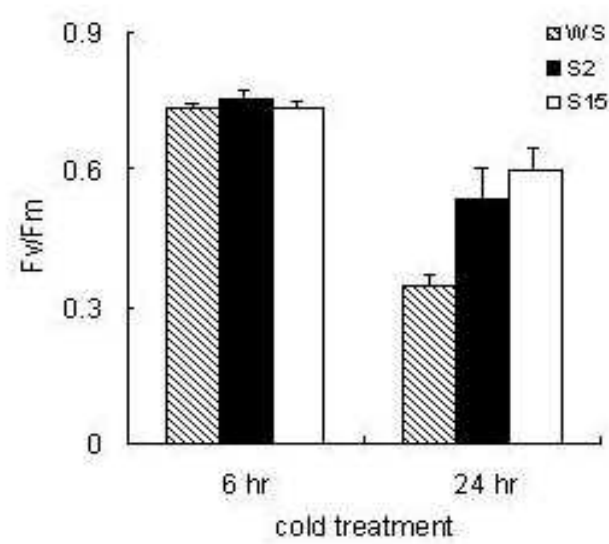
도면6b



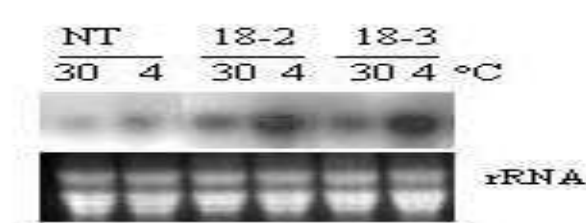
도면6c



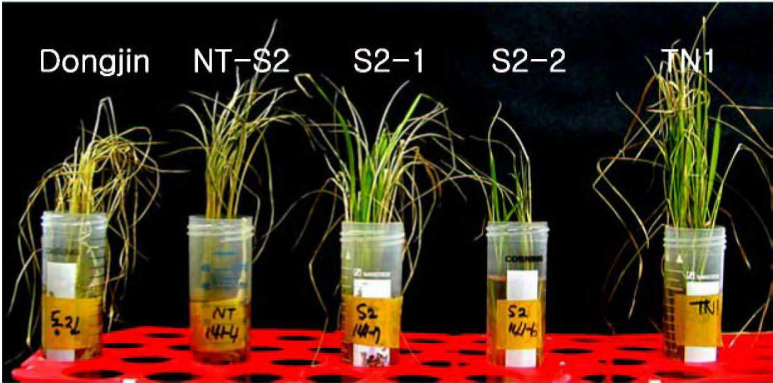
도면7



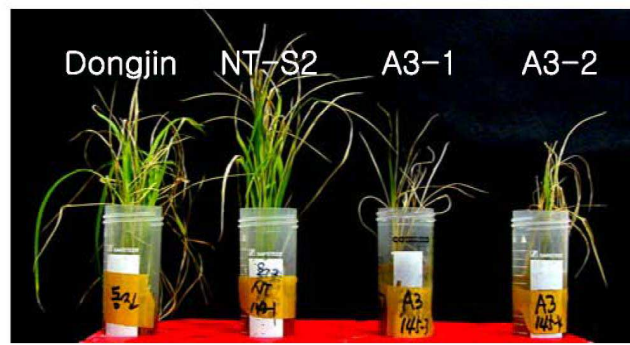
도면8



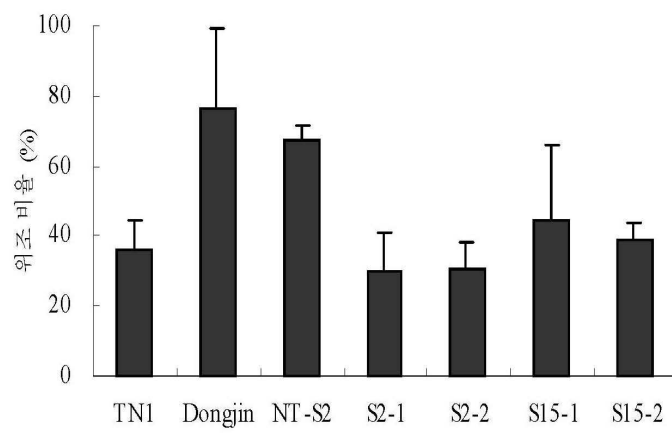
도면9a



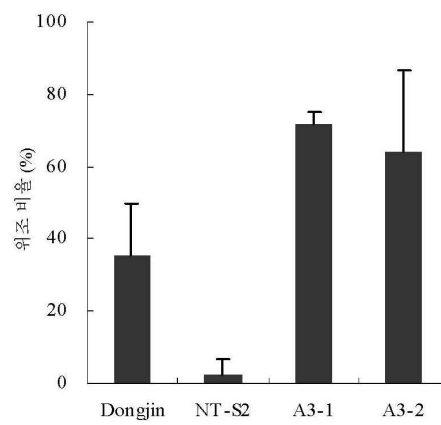
도면9b



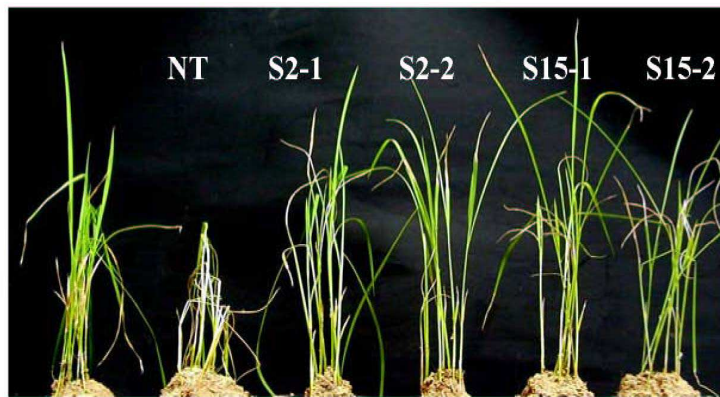
도면10a



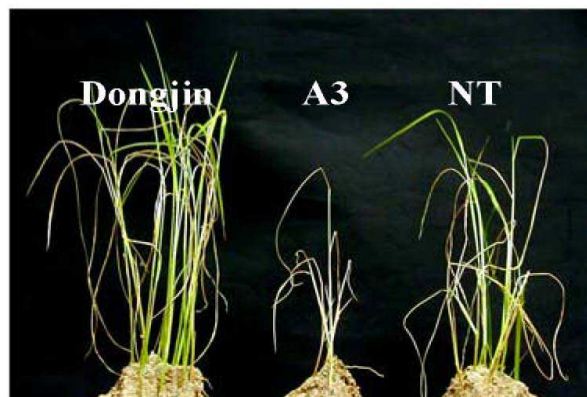
도면10b



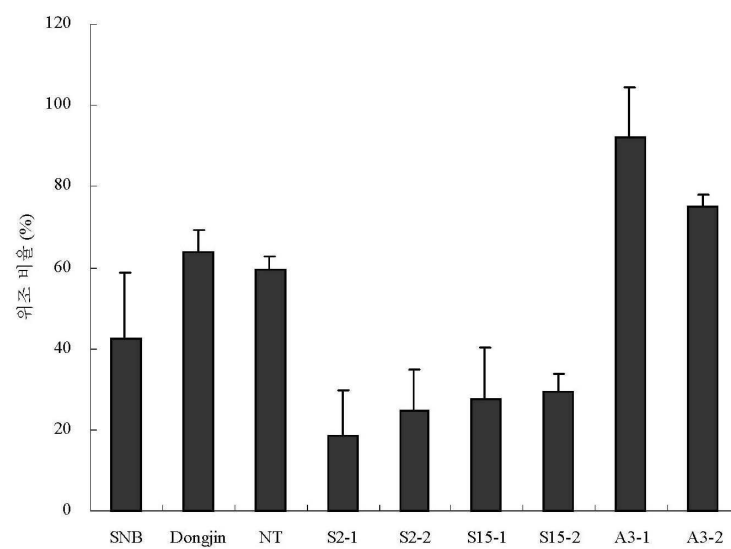
도면11a



도면11b



도면12



서열목록

<110> Sogang University

<120> Stress-Inducible OsAsr1 Gene and Protein Enhancing Tolerance to

Abiotic stress

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 838

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<222> (67)..(480)

<400> 1

tcacttccat ctcattctcc taattgtcat cactagcttc tagctagctt aattaattaa 60

ttagcc atg gcg gag gag aag cac cac cac ctg ttc cac cac aag 108

Met Ala Glu Glu Lys His His His His Leu Phe His His Lys

1 5 10

aag gac gac gag ccg gcc acc gga gta gac tcc tac ggc gag ggc gtc 156

Lys Asp Asp Glu Pro Ala Thr Gly Val Asp Ser Tyr Gly Glu Gly Val

15 20 25 30

tac acg tcg gag acg gtg acc acc gag gtg gtc gcc ggc ggc cag gac 204

Tyr Thr Ser Glu Thr Val Thr Thr Glu Val Val Ala Gly Gly Gln Asp

35 40 45

gag tac gag agg tac aag aag gag gag aag cag cac aag cac aag cag 252

Glu Tyr Glu Arg Tyr Lys Lys Glu Glu Lys Gln His Lys His Lys Gln

50 55 60

cac ctc ggc gag gcc ggc gcc ctc gcc gcc ggc gcc ttc gcc ctg tat 300

His Leu Gly Glu Ala Gly Ala Leu Ala Ala Gly Ala Phe Ala Leu Tyr

65 70 75

gag aag cac gag gcg aag aag gac ccg gag aac gcg cac agg cac aag 348

Glu Lys His Glu Ala Lys Lys Asp Pro Glu Asn Ala His Arg His Lys

80 85 90

atc acg gag gag atc gcg gcc acg gcg gcg gtc ggc gcc ggc ggc tac 396

Ile Thr Glu Glu Ile Ala Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Gly Gly Tyr

95 100 105 110

gcc ttc cac gag cac cac gag aag aag aag gac cac aag agc gcc gag 444

Ala Phe His Glu His His Glu Lys Lys Lys Asp His Lys Ser Ala Glu

115 120 125

gag tcc acc ggc gag aag aag cac cac ctc ttc ggc tgatcgacct 490

Glu Ser Thr Gly Glu Lys Lys His His Leu Phe Gly

130

135

catcacaacg tcgccggcgg cggcgacgac ctgccgtac gtcgccggcc gccgtgtcgt 550
cgatttgtgt gtgtaataat ttgtcttctt ctgcatgcgt ggtgttgctg tttttcaciaa 610
gagtctccgg cctcgaccag tgagaggctg acaggtgggg ccgtgagttc agcttgtgtt 670
gcttgatttt ctctgcagcc ttgccctctg tgtgtccaaa taagtgggtg gcatggctct 730
ctccgtgtca tgtatcaatg tttttttatc tgtactttgt acaagtgaag caatatttat 790
cgaaccttga ctttctccaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 838

<210> 2

<211> 138

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Ala Glu Glu Lys His His His His Leu Phe His His Lys Lys Asp
1 5 10 15

Asp Glu Pro Ala Thr Gly Val Asp Ser Tyr Gly Glu Gly Val Tyr Thr
20 25 30

Ser Glu Thr Val Thr Thr Glu Val Val Ala Gly Gly Gln Asp Glu Tyr
35 40 45

Glu Arg Tyr Lys Lys Glu Glu Lys Gln His Lys His Lys Gln His Leu
50 55 60

Gly Glu Ala Gly Ala Leu Ala Ala Gly Ala Phe Ala Leu Tyr Glu Lys
65 70 75 80

His Glu Ala Lys Lys Asp Pro Glu Asn Ala His Arg His Lys Ile Thr
85 90 95

Glu Glu Ile Ala Ala Thr Ala Ala Val Gly Ala Gly Gly Tyr Ala Phe
100 105 110

His Glu His His Glu Lys Lys Lys Asp His Lys Ser Ala Glu Glu Ser
115 120 125

Thr Gly Glu Lys Lys His His Leu Phe Gly
130 135