

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0056416 (43) 공개일자 2014년05월12일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)	(72) 발명자 정기홍 경기 수원시 영통구 봉영로1517번길 73, 923동 1504호 (영통동, 벽적골9단지아파트) 문선옥 경기도 용인시 기흥구 영덕동 기흥데시아파트 204동 801호 (뒷면에 계속)
(21) 출원번호 10-2012-0118754 (22) 출원일자 2012년10월25일 심사청구일자 2012년10월25일	(74) 대리인 안소영	

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 뿌리 특이적 프로모터, 이를 포함하는 발현 벡터, 이에 의한 형질 전환 식물체 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 뿌리에 특이적으로 발현하는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 프로모터는 벼의 뿌리의 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 특이적으로 조절함으로써, 벼를 포함하는 주요 곡물의 뿌리에 대한 환경 스트레스 내성 증진을 위한 연구에 활용될 수 있으며, 뿌리 작물의 농업적 형질을 개량하는데 이용될 전망이다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

고현정

경기 용인시 처인구 동부로 719-12, (해곡동)

유요한

전북 익산시 동서로61길 34, 205동 1006호 (어양동, 부영2차아파트)

안진홍

경기도 용인시 기흥구 공세동 133-8번지 대주피오
레아파트 210동 1703호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008079

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 자포니카와 인디카사이의 eQTLs을 활용한 생산성 강화 신품종 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 뿌리에 특이적으로 발현되는 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 3

제2항의 발현 벡터에 의해 형질 전환된 형질전환세포.

청구항 4

제2항에 따른 발현 벡터 또는 제3항에 따른 형질전환세포로 형질 전환된 형질전환 단자엽 식물체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 형질전환 단자엽 식물체는 벼(Oryza sativa)인 형질전환 단자엽 식물체.

청구항 6

제2항의 발현 벡터로 단자엽 식물을 형질 전환시켜 상기 외래 유전자를 단자엽 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 단자엽 식물의 형질 전환 방법.

청구항 7

하기의 단계들을 포함하는 벼의 뿌리에 특이적으로 발현되는 벼 형질전환체의 제조방법:

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제조하는 단계;

벼에 상기 발현 벡터를 도입하는 단계 및

상기 발현 벡터가 도입되어 뿌리에 특이적으로 유전자가 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계.

명 세 서

기술 분야

[0001] 본 발명은 뿌리에 특이적으로 발현하는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 벼(Oryza sativa)는 세계에서 가장 중요한 식량작물의 하나로 과거 20여년 동안 꾸준히 수량 증대에 힘써왔으나 현재 인구증가 추세로 볼 때 2020년이면 현재의 70%이상에 달하는 수량을 더 생산해야만 될 형편에 놓여있다. 그러나 벼가 재배되는 농지는 세계 각국의 공업화현상으로 갈수록 줄어들고 육종의 소재가 되는 새로운 유전자원은 고갈되어 외래 유용유전자의 도입이 요구되고 있다. 다행히 분자생물학의 발달로 외래 유용유전자의 분리 및 조작이 가능하게 되어 유용 유전자를 벼를 비롯한 많은 식물세포에 형질전환하여 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻음으로서 여러 가지 생명현상을 규명하는 유전자발현 연구는 물론 육종의 좋은 소재가 되고 있다. 이러한 형질전환을 이용한 신품종 생산은 앞으로 다가오는 21세기에는 고부가가치 산업으로 대두함은 물론이며 인류의 가장 큰 문제점으로 부각되는 식량문제를 어느 정도는 해결할 수 있으리라 생각된다.

[0003] 현재까지 알려진 형질전환 방법은 80년대에는 원형질체에 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol(PEG))과 전기 충격법(electroporation)으로 많은 형질전환체를 획득하였으며, 90년대 후반에는 유전자총 이용법이 보편화되었으며 최근에는 쌍자엽식물에서 널리 이용되어 왔던 아그로박테리움(Agrobacterium) 이용법도 많이

이용되고있다. 그밖에 화분법(pollen pathway), 미세주사(microinjection) 방법 등이 있다.

- [0004] 프로모터는 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성할 수 있으며, 그 기능에 따라서 다음과 같이 분류할 수 있다.
- [0005] 첫째로 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스 (CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있다. 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C유전자(Os0c1)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(참조: 등록번호 10-0429335). 이들은 식물형질전환 기본 운반체 내에 선발마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다. 이러한 프로모터들은 조직-선택성 또는 기관-선택성이 결여되어 있기 때문에 형질전환시킨 선발마커 등이 전체 식물에서 발현됨으로써, 식물체 생장을 지연시키는 결과를 초래한다. 또한 프로모터의 특성상 도입한 유전자의 발현을 목적하는 기관에 국한되어 충분히 발현시키지 못하므로 형질전환체의 경제성이 떨어지게 된다.
- [0006] 둘째로, 종자 특이적 프로모터를 들 수 있다. 대표적인 예로서 벼 주요 저장 단백질 유전자의 프로모터들로서 황금쌀(golden rice) 개발에 사용된 벼 글루테린(glutelin) 프로모터가 현재까지 외떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는 경우에 많이 사용되고 있고, 쌍떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는데 주로 사용되는 프로모터로는 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 및 애기장대의 종자에서 감마 토코페롤 메틸기 전이효소(γ -tocopherol methyl transferase: γ -TMT) 유전자 발현을 유도함으로써 비타민 E 생성을 증진시킨 연구에 사용된 당근 유래 DC-3 프로모터, 들깨 유래 올레오신(oleosin) 프로모터의 종자 특이발현 유도 특허출원(참조: 특허출원번호 10-2006-0000783) 사례가 있다. 상기 종자 특이적 프로모터들은 주로 종자 자체가 식량이나 식품 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용되고 있다.
- [0007] 셋째로, 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스 (rbcS: ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 Ro1D 프로모터, 감자 유래 괴경 특이 발현 유도 파타틴 (patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과실 성숙 특이 발현 유도 피디에스 (PDS: phytoene synthase) 프로모터 등이 있다.
- [0008] 넷째로 뿌리 특이 발현 프로모터이다. 애기장대 퍼옥시다제(oxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 특이적 발현을 확인하였고, 최근 고구마 유래의 매즈 유전자(ibMADS)와 당 유도성 에이디피 글루코즈 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에서 특이 발현을 유도하며 당근, 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함을 확인하여 특허 등록(대한민국 등록번호 제10-0604186호, 제10-0604191호)된 바 있다.
- [0009] 그 외에도 현재 개발이 계속 진행 중이지만, 개발자의 의도에 따라 보다 정밀하게 유전자 발현의 장소를 조절할 수 있는 새로운 프로모터, 예컨대 특정한 기관(꽃잎, 뿌리, 잎, 줄기 등)에서만 발현되어야 하는 유전자(예, 화색, 응성 불임, 화형, 특정 대사관련 물질, 방어물질 등)를 형질 전환시킬 경우, 특정 기관이나 시기에만 작동하는 프로모터들이 앞으로 계속 개발될 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) (KR) 10-2008-0048817
(특허문헌 0002) (KR) 10-2008-0067325

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신이 아닌 뿌리에만 국한하여 발현시킬 수 있는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 식물의 조직 또는 기관 특이적인 유전자 발현을 조절할 수 있는 프로모터들을 발굴함으로써, 식물의 특정 조직 또는 기관에 국한시켜 목적 유전자를 특이적으로 발현 또는 저해할 수 있는 시스템을 확립하고자 하였다. 이 과정에서 벼의 LOC_Os10g09110의 프로모터가 꽃잎, 자방, 잎, 수술, 암술, 종자 등에서는 발현되지 않고 뿌리에서 특이적으로 발현이 이루어짐을 확인하였고, 이에 따라 상기 프로모터를 확보하여 이를 포함하는 발현벡터를 제조한 후 이를 식물에 도입하여 형질전환 시킨 형질전환체에서 뿌리 특이적으로 리포터 유전자가 발현됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0013] 보다 상세하게 본 발명자들은 공개된 벼 에피메트릭스(affymetrix) 자료 983종을 수집하였고, 이들을 17개 기관 별로 재분류를 하였다. 에피메트릭스 어레이(affymetrix array)는 한 번의 실험으로 57000 종의 프로브에 의해서 대변되는 유전자 발현을 분석 가능케 하며, 대규모로 수집된 에피메트릭스 어레이(affymetrix array) 자료의 재구성을 통해서 만들어진 기관별 발현 양상은 상당히 높은 재현성을 보여 주었다. 이 자료의 발현 패턴별 분석을 통해서 다양한 기관 및 조직 특이적 유전자들이 분리되었다. 그 중에서 본 발명자들은 뿌리에서 중요한 형질 발현에 필요한 프로모터 발굴에 관심을 가졌다.

[0014] 상기 방법을 통해서, 84 종의 유전자가 다른 유전자들과 대비하여 뿌리에서 높은 발현 양상을 보여 주었다.

[0015] 이러한 유전자에 의해서 조절되는 유전자 발현양상은 이들 프로모터 3' 방향에서 GUS reporter 유전자를 발현시켜 그 활성을 식물체 내에서 측정함으로써 정밀하게 분석되었다.

[0016] 염기서열 해독 정보를 참고로 하여 LOC_Os10g09110의 ATG 앞 1,978 bp까지의 프로모터를 게놈 DNA PCR를 통해서 분리하고 pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다.

[0017] 이렇게 분리된 프로모터를 pGA3383 벡터에 넣어, 형질전환된 식물체를 제작하였다. 형질전환된 식물체에서 GUS 반응을 검증함으로써, 해당 프로모터를 이용하여 식물의 뿌리 특이적 유전자 발현을 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

[0018] 본 발명은 벼의 LOC_Os10g09110의 프로모터로서, 외래 유전자의 발현이 뿌리에 특이적으로 이루어지도록 유도하는 뿌리 특이적 프로모터(이하 '본 발명의 프로모터'라 함)를 제공한다.

[0019] LOC_Os10g09110의 게놈 DNA 크기는 1982bp이며 cytochrome P450을 암호하며, 두 개의 exon으로 구성되어 있으며, 354개 아미노산으로 번역되어 단백질을 만든다. LOC_Os10g09110의 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 가지며, LOC_Os10g09110의 유전자 서열은 서열번호 2에 제시하였다.

[0020] 즉, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 벼의 LOC_Os10g09110의 프로모터를 포함하는, 외래 유전자의 뿌리 특이적 발현을 위한 프로모터를 제공한다.

[0021] 프로모터는 유전자의 환경적, 시기적 및 조직적 발현을 조절하는 필수적인 요소로서, 본 발명에 따른 뿌리 특이적 프로모터를 사용하여 식물체 내에서 외래 유용 유전자의 발현 부위를 뿌리 특이적으로 유도할 수 있다.

[0022] 또한 본 발명은 상기 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0023] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 제조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서, 발현 벡터는 제조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 제조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입시, 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제가 가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 게놈 내에 통합되는 것들을 포함한다.

[0024] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 프로모터를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 pCambia계열 또는 pGA계열의 벡터, 예컨대, pGA3383, pCambia1381, pCambia1391, pGWB3와 같이 Ti-plasmid에서

파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 보다 바람직하게는 pGA3383이 사용 될 수 있다.

- [0025] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편을 포함한다.
- [0026] "본 발명의 프로모터"와 "기능적으로 동등한 절편"은 본 발명의 프로모터와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 발현 벡터는 3' 방향에 목적 단백질에 대한 유전자가 발현되도록 한다.
- [0028] 바람직하게는 상기 발현벡터는 뿌리에 특이적으로 발현시키고자 하는 유용한 외래 유전자를 포함할 수 있다.
- [0029] 상기 외래 유전자는 뿌리 생성, 발달 등과 같은 뿌리의 특성과 관련된 것이면 무엇이든 무방하다. 식물이 생장하기 위해서는 양분과 물의 흡수가 중요하며, 그 역할을 뿌리가 담당하고 있다. 또한 뿌리는 식물체를 고정시키고, 이차대사산물을 합성하기도 한다. 뿌리털 발달과 관련된 유전자로서 예컨대 벼의 *ROOT HAIRLESS1*, *EXPA17* 등이 있으며, 관근 발달과 관련된 유전자로 예컨대 벼의 *CROWN ROOTLESS1*, 옥수수 *ROOTLESS CONCERNING CROWN AND SEMINAL ROOTS* 등이 있을 수 있다. 또한 *OsNAC10a*와 같은 스트레스에 반응하는 유전자 등의 외래유전자를 뿌리 특이적으로 발현시키는데 본 발현 벡터를 이용할 수 있다.
- [0030] 상기 발현벡터는 통상의 벡터에 본 발명의 프로모터를 도입한 것일 수 있으며, 이처럼 본 발명의 프로모터를 도입하여 발현벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.
- [0031] 또한 본 발명은 상기 벡터에 의해 형질 전환된 형질 전환 세포를 제공한다.
- [0032] 상기한 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 아그로박테리움, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게, 형질전환 세포는 아그로박테리움 속 미생물인 형질전환 세포가 이용될 수 있다.
- [0033] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.
- [0034] 또한 본 발명은 상기 벡터 또는 상기 형질전환 세포로 형질 전환된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0035] "본 발명의 형질전환 식물체"와 "기능적으로 동등한 형질전환 식물체"는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 변이체와 비교하여 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 이용하여 제조된 형질전환 식물체로서, 뿌리에서의 특이적 프로모터 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 식물체이다.
- [0036] 본 발명의 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen.Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 형질전환되는 단자엽 식물체는 본 실시예에서 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)를 포함한 단자엽 식물을 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0038] 바람직하게는 벼(*Oryza sativa* L.)가 사용된다.

- [0039] 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.
- [0040] 또한 본 발명은 상기 벡터로 단자엽 식물을 형질 전환시켜 상기 외래 유전자를 단자엽 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 단자엽 식물의 형질 전환 방법을 제공한다.
- [0041] 바람직하게, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 벡에 상기 발현벡터를 도입하는 단계; 및 상기 발현벡터가 도입되어 벼의 뿌리에 특이적으로 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 식물의 형질 전환 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명의 프로모터는 뿌리에 특이적으로 발현하는 프로모터로써, 뿌리의 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 특이적으로 조절하여 벼를 포함하는 주요 곡물의 뿌리에 대한 환경 스트레스 내성 증진을 위한 연구에 활용될 수 있으며, 뿌리 작물의 농업적 형질을 개량하는데 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 히트맵(heatmap)으로 뿌리에서 우선적 발현을 보이는 분리된 유전자와 그 발현 양상을 나타내는 도이다.
- 도 2는 LOC_0s10g09110 유전자의 뿌리에서 우선적 발현을 나타내는 마이크로 어레이 결과를 나타내는 도이다.
- 도 3은 LOC_0s10g09110 프로모터 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 나타낸 도이다.
- 도 4는 LOC_0s10g09110 프로모터의 뿌리 특이적 발현을 GUS staining을 통해 형질전환 식물체에서 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 아래의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

<실시예 1> 뿌리에 특이적으로 발현되는 벼 유전자 대량 선별

- [0046] 뿌리에 특이적으로 발현하는 유전자를 선별하기 위하여, 공개된 마이크로어레이 데이터베이스인 NCBI GEO(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)에서 수집된 983종의 벼 에피메트릭스 마이크로어레이(affymetrix microarray) 자료를 17개 기관별/조직별로 재구성하여 유전자 발현 분석용 데이터베이스를 구축하였다.

- [0047] 이를 표 1에 나타내었다.

- [0048] 표 1. 기관별/조직별로 재구성된 유전자 발현 분석용 데이터베이스

순서	기관/조직	샘플숫자
1	캘러스 /현탁 세포	42
2	잎	129
3	끝잎	121
4	뿌리	150
5	순(shoot)	164
6	줄기	8
7	전체 절간(Whole_internode)	9
8	썸(SAM)	27
9	원추꽃차례(Panicle)	112
10	성장중인 꽃밥(Developing_anther)	86
11	성숙된 꽃밥(Mature_anther)	37
12	씨방/암술머리	17
13	내화류 외화영(Palea_lemma)	4
14	씨앗	32
15	배(Embryo)	3
16	배낭(Embryo sac)	27
17	내배유(Endosperm)	15

- [0049]

[0050] K-means clustering 분석 방법을 이용하여, 상기 표 1에 제시된 유전자 발현 분석용 데이터베이스 중 뿌리에서 발현이 높은 유전자 그룹을 분리하였다.

[0051] 이는 마이크로어레이 자료 분석용 소프트웨어인 MeV의 K-means clustering 분석 방법을 사용하여 수행하였으며, 기관별/조직별 발현 분석용 데이터베이스 중 뿌리에서 발현이 우선적인 84 종의 유전자가 분리되었다.

[0052] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0053] 도 1에 나타난 바와 같이, 노란색에 가까울수록 강한 발현을 보이는 유전자에 해당하며 파란색에 가까울수록 발현이 낮아지게 된다. 즉, 17개의 재구성된 유전자 데이터베이스 중 뿌리에서 우선적 발현을 보인 84종의 유전자를 확인할 수 있었다.

[0054] <실시예 2> 마이크로 어레이 데이터 분석을 통한 LOC_0s10g09110 유전자의 조직별 발현 분석

[0055] 마이크로어레이 데이터베이스 분석을 통한 LOC_0s10g09110 유전자의 조직별 발현 양상을 분석하였으며 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0056] 도 2에 나타난 바와 같이, LOC_0s10g09110 유전자의 조직별 발현은 뿌리에서 강한 것을 확인 할 수 있으며 이는 뿌리에서의 발현이 우선적임을 의미한다.

[0057] <실시예 3> 뿌리 우선적 발현을 위한 프로모터의 클로닝

[0058] LOC_0s10g09110의 프로모터를 클로닝하기 위하여 작성된 프라이머들과 주형인 동진 벼 (*Oryza sativa* L. japonica cultivar-group) 게놈 DNA를 이용하여 PCR을 실시하였다. 주형 DNA는 100 ng으로 사용하였고, 각 프라이머는 5 pmol로 사용하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 68℃에서 300초를 4회 반복한 후; 95℃에서 30초, 62℃에서 30초, 68℃에서 300초를 35회 반복하고 마지막으로 68℃, 10분으로 하였다. 프로모터 클로닝용 프라이머는 아래 표 2에 나타내었다.

[0059] 표 2. LOC_0s10g09110의 프로모터 클로닝용 프라이머

Primer name	Sequencing (5'-3')	비고
Os10g09110-pro_ BamHI (서열번호 3)	GGATCCATGACAGCGAAGGGCAGAGG	벼 염색체 10의 genomic sequence (OSJNBa0061H20)
Os10g09110-pro_ XbaI (서열번호 4)	TCTAGAGGTCGTAGCAAAACGTGCAAC	

[0060]

[0061] PCR 산물은 전기영동하여 크기를 확인하고, pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다. 클로닝한 DNA를 BamHI과 HpaI으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pGA3383 벡터(promoter-GUS cloning용 벡터)와 라이게이션을 14℃에서 12시간 진행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50μl과 혼합하여 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에 1분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 3시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩하였다. 미니 프랩으로 얻은 DNA를 제한 효소 BamHI과 HpaI을 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로스 젤을 분리 하고 밴드를 확인하였다. 얻어진 클로닝 DNA의 염기 서열 분석을 하여 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다. 이렇게 만들어진 LOC_0s10g09110 프로모터 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 도 3에 나타내었다. 염기서열 분석은 capillary sequencing 법으로 하였으며(마크로젠 의뢰), 염기서열분석은 NGUS1, RB(right border), 및 프로모터 내 서열을 이용한 프라이머들을 사용하였고, 이를 표 3에 나타내었다.

표 3. 염기 서열 분석을 위한 프라이머

Primer name	Sequencing (5'-3')
NGUS1(서열번호 5)	AACGCTGATCAATTCCACAG
RB_backbone-F2(서열번호 6)	TCGCACGGAATGCCAAGCA
Os10g091110-seq_1(서열번호 7)	GATGGAATGCGCCAAACAAG
Os10g091110-seq_2(서열번호 8)	GTTCGTAGCCGACGATCTG

상기 분석 결과를 서열목록 1에 나타내었으며, LOC_Os10g091110 유전자의 ATG 앞에 1,978 bp 프로모터 서열에 해당하는 프로모터가 뿌리에 우선적으로 발현하는 프로모터에 해당한다.

<실시예 4> 형질전환 세포의 제작

상기 실시예 3에서 제작한 식물 발현용 벡터를 추출하였다.

아그로박테리움 컴피턴트 셀(Agrobacterium tumefaciens LB4404) 50 μ l와 2 μ g의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 액체질소에 75초 넣은 후, 37 $^{\circ}$ C 오븐에 5분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28 $^{\circ}$ C 셰이킹 인큐베이터에 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩한 후, BamHI과 HpaI을 사용하여 효소 절단 후 사이즈를 확인하였다.

상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 이용하여 벼의 형질 전환 실험에 사용하였다.

<실시예 5> 형질전환 식물체의 제작

N6D 고체 배지에서 동진벼 종자를 7일 정도 28 $^{\circ}$ C 생장실에서 키워서 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스를 상기 실시예 4에서 얻은 식물 발현용 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 72시간 키운 세포와 혼합하여 N6D-Acetosyringone 을 포함한 배지에서 22 $^{\circ}$ C 암처리하며 생장실에 방치하였다.

아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 행구어 낸 다음 N6D 고체 배지에서 hygromycin 선발을 1차(hygromycin 30 mg/L), 2차 (hygromycin 40 mg/L)에 걸쳐서 계대 배양을 통해 진행하였다. 선발은 28 $^{\circ}$ C 생장실에서 각각 2주 씩 합해서 4 주 동안 이루어졌다. 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L) 고체배지에 옮겨 4주 28 $^{\circ}$ C 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28 $^{\circ}$ C 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

<실시예 6> 형질전환 식물체를 이용한 뿌리 우선적 발현 검증

재분화된 식물체의 기관 특이적 GUS 발현을 확인하기 위하여, 수확한 종자를 10개씩 28 $^{\circ}$ C에서 7일간 배양한 후 모든 개체를 GUS 염색 처리 하였다.

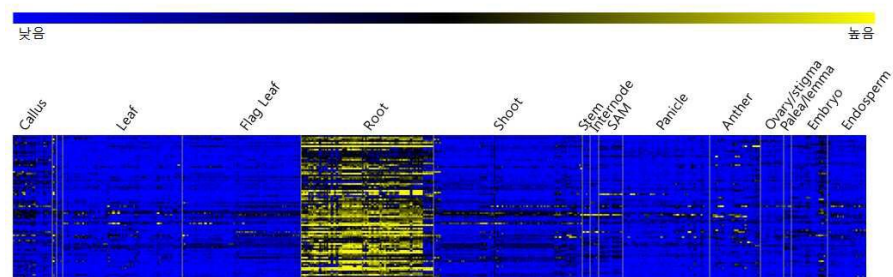
GUS 용액은 0.5M sodium phosphate buffer 200ml, 12.5mM potassium ferricyanide 100ml, 12.5mM potassium ferrocyanide 100ml, 0.5M EDTA 20ml, 10% Triton X-100 50ml, 10ml 의 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-gluc 1g과 Methanol 200ml을 넣고 증류수로 1L의 부피를 맞추어 제조되었다. 각 계통의 식물체를 모두 15ml의 GUS 염색액에 24시간 처리 한 후 70% 에탄올과 100% 에탄올을 순차적으로 이용하여 상온에서 탈색하였다.

도 4에 나타난 바와 같이, 형질전환 식물체들은 뿌리에서만 파란색으로 염색된 것을 볼 수 있으며, 이는 뿌리에서 우세한 GUS발현은 보이고 있는 것이다. 뿌리의 중심주를 중심으로 GUS발현은 관찰되며, 생장점 등에서도 강한 GUS발현을 보인다. 그러나 성숙된 잎과 줄기, 꽃에서의 GUS발현은 관찰되지 않았다.

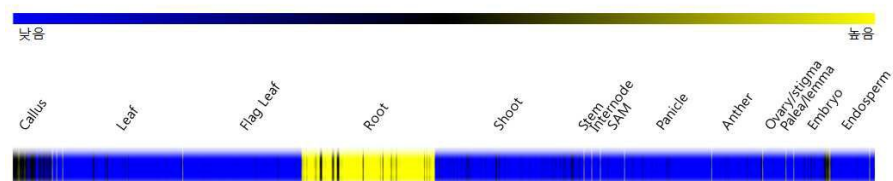
상기 도 2 및 도 4의 결과를 토대로 LOC_Os10g091110의 프로모터는 뿌리에서 우선적인 발현을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

도면

도면1



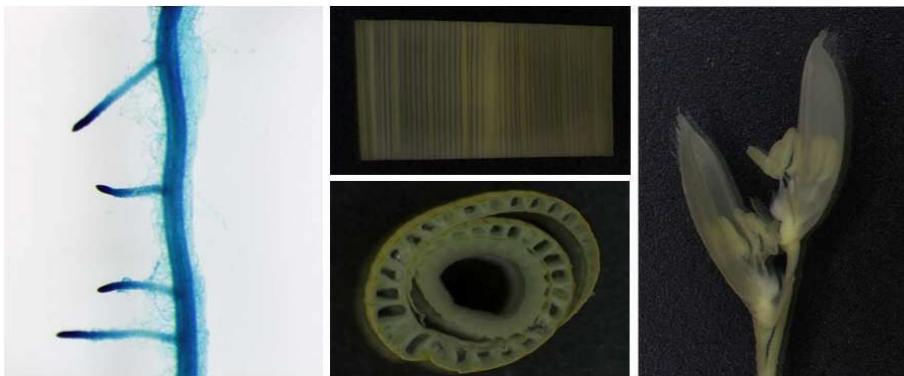
도면2



도면3

R B	LOC_Os10g09110 의 프로모터	GUS	Tnos	P35S	HPH	T7te	L B
--------	--------------------------	-----	------	------	-----	------	--------

도면4



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Root-specific promoter, Expression vector comprising the same, transformed plants thereby and method for preparation thereof
- <130> p12-089-KHU
- <160> 8

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1978

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220><221> promoter

<222> (1)..(1978)

<223> Promoter of LOC_Os10g09110

<400> 1

atgacagcga agggcagagg cggcgtcggc gcgacggagg ccgaggacgg accggcggat 60

gcagcgccgg ggcgatagag gtcgaggatg acgggccggg gaggcggcgc gatggaggcg 120

gactggcgga gcacggaggg tggagggcgg agggcggaga gcggaggcgg cgccggtgcc 180

agtgcggtgg agggctagag gctgaaggcg gagcccgga ggtggaggcg gcgccggcac 240

ggtggaggcc gaggcggcac tgtggaggcg gaaggcggag gcggtgccgg cgccgtggaa 300

ccggaggcgg cgcggtggag gcgccgtgac cgagccgagc gcgagtgcgc gacgcgatgg 360

ggaattgggg agaggcggcg ctgcatgagg ctctgtgggac cgtgggagga gggagtggct 420

gtgtggttgc ctctagggtt tagtagttta ctgggcttat tgggcatcct aggccttattg 480

ggacacaatt cggttttctc ggttaattcg gttaactgag agcaatgacc gaattaccgc 540

aataaatctc agtctttcaa tggccaagac cggactacta accgaatttc tcggtcttgg 600

tgtcggctctt ttcggttcgg ttcttcggtt cggctcttatt ttgccaccc ctagttaaa 660

gccccatagac ccattgtagg tgatgtaaca ctttgtttct gtgattgcgc caaacaagat 720

ggaatgcgcc aaacaagccc ataggctcat ttaggtgat gcaacacctt gtttctgtat 780

agtattttct ttttaaaaaa attatgggac ccatctgtca tacatctcct tcccctctct 840

ctccactatc tctctcacag ggcgcgcatg ggtgggaggt gggcggtggc gggggcggct 900

gtgtggcgag cggcaacggc gacgccacct cctcaccgca accgctctga aacgaccgac 960

atattccaca agaagagtag aatataagtc tatagcatat atcttcataa acatcggtta 1020

ctcagagata tgcacatcag agtagcatag cagaaacatc gtattggttc cagttattac 1080

aataccatag atacagctca agacaagcct cgagcgataa cagcgtaata atacacaaac 1140

cctaaaagct cagcaaatat gcagtacact agaaattcac aagtactgct acagatattg 1200

ctactaacca tattaacgtt actgtacta ctacaaatac tactactgcc actgtacta 1260

ccatagccac tacaggcact gtatgaacca tgcatatcat atcataataa acttattgtt 1320

tttgccgtcg ctacgtggcc gcattcctct tgctacagtg caacagtgat ccctccgttc 1380
 glagccgcac gatctgatac gtttcttcga tctagttata taaaaattat tatagtcaat 1440
 ctacagatta tcatagtctt ttctggttgt catccatgac ttgagttcct tcacttccaa 1500
 ccaaaatctt cattagaaat tagggccgtg tatagttctt tgggccaaaa ttttttaat 1560
 tatacgtaca cacctttgaa gtattagatg tagactaata ataatacaaa ttacagattc 1620
 cgctgtaaa ttgcgagacg aatttataaa gcctaattaa tctgtcatta gcaaagtgtt 1680
 actgtagcat cacattgtca aatcatggcg caattaggct caaaagattc gtctcacaat 1740

ttacatgtaa actatacaat taatTTTTT cgtccatatt taatgcccta tacatatgtc 1800
 caaacatttg atgtgatatt ttggccaaa aatttttagg atctaaacac acctagggtg 1860
 ggaacataga gtatgttacg accgaaatgg caaacaataa acagtcttca tcagcaagca 1920
 atgcagcagt atatacacac aaggacaggt gaggtgagtt gcacgttttg ctacgacc 1978

<210> 2
 <211> 1982
 <212> DNA
 <213> Oryza sativa
 <220><221> gene
 <222> (1)..(1982)
 <223> LOC_0s10g09110
 <400> 2

atatacacac aaggacaggt gaggtgagtt gcacgttttg ctacgacat ggcgttcttc 60

ctccctctcg cgttctccct ctctctcgcc gtcattctcg cctacgtcct ccagtcctc 120
 gccgacgtc gccgccggt gccgccaggc cgtggccgc tgccgtgat cggcaacctc 180
 caccagctcg accacctgcc gcaccgtcc ctgcgcgcc tcgccgcgcg ccacgggccg 240
 ctcatgtcg tccgctcgg caccgtcgc gccgtcgtcg cgtcgtcgcc ggagatggcg 300
 cgggaggtcc tgcagcgga caacccgac atcgccgcca ggtccttcgg cgactccatg 360
 cgcgccggcg gccactgca gaactccgtg gtttgcctgc ccccgcccg caggtggcgc 420
 gccctgcggc ggctcagcac cgtcgggctc ttctcgccgc gccggctcga cgccatgagg 480

gtctcctgg aggagaaggt ggccgagctt gtccgccgcg tgtccggcca cggcgcgcg 540
 ggcgaggccg tggacgtggg ccacgccgcg cacgtcgccg cgctgggct cctgtcgcgc 600
 accatgttct ccgtcgacct cgaccccgag gcggcgcgcg aggtgagcga catcgtggac 660
 gaggcgtcgg tgctgggcac cgggccgaac gtctccgact tcttcccggc gatcgcgccg 720
 gccgacctcc agggagtctg ccggaggatg gcgaggctgg tgaagaggat gtacgccatc 780

attgacgagc agatcgagcg gaggatgcat ggccgcaccg ccggcgagcc acgcaagaac 840
gacctgctcg acgtgatgct ggaggagggg gagagtaaag aagatagcaa cgaaattaac 900

cgatgatcca tccgtggact ttttacagtg agtacttgta caacttgcgg acggatatta 960
atttgtgaat aaaacaaact tttatatacg tgttcttagc gatctaaaac catcagctga 1020
aaaataaact tcgattaaaa acctcaaaat cagatccaaa ttttaaggttg aaattcaaat 1080
tttgactgat aaatataagc ataagcgaag agataagacc cttgttatca tgcattgacta 1140
atttatattaa ttttagctaaa attattgaac cagctttcta atttaaattt ggattacaat 1200
ttttcgtttt gattaaattt tgtaatttaa ccaagtaaat ttcattgata attctaaact 1260
caagtttcat ttgctgtagg atttggtcac tggaggagag acgacttttc acacaatgga 1320

gtgtgcaatg gcagaactat tgcagtgtcc aaactcgatg agaagggtgc acgaactcaa 1380
gagtgtgata ggagcgaac aacaaatgga tgaacatgat attaccaaac tgccttacc 1440
ccatacgagg ccgaagccac gatagaaata caagggttaca ccattcctaa gggagcgaaa 1500
gtgcttataa acttgtgggc gatcaatcga tgcgccaaca catggaccga gccagataag 1560
ttcatgccag agaggttcta cgatagtac attactttca tggggaggga ttttcaacta 1620
attccttttg gagctggaaa gcgcatttgc cttggattgc cactagctca cagaatggtc 1680
catttgatgc ttggctcgtt gctacaccga ttcacatgga cattgccagc tgaggctggg 1740

aaaaatggag tggatatgag ggagaggttt gggttaacac tatcatttgt tgctccctc 1800
tatgtaatag ctcaagaaat acaataagaa acatgtgact tttttatgat gaagaataga 1860
agaacattac aaatgtaatg cgatgatagc tgctctaaat atgtaatcac ccaagatatt 1920
ttctgataca cgaagtattg taaaacaaaa ataggatgtg aagtgagtgt aattcaactg 1980
gc 1982

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer of Os10g09110-pro_BamH1

<400> 3

ggatccatga cagcgaaggg cagagg 26

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer of Os10g09110-pro_Xba1

<400> 4

tctagaggtc gtagcaaac gtgcaac 27

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer of NGUS1

<400> 5

aacgctgac aattccacag 20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer of RB_backbone_F2

<400> 6

tcgcacggaa tgccaagca 19

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer of Os10g09110-seq_1

<400> 7

gatggaatgc gccaaacaag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer of Os10g09110-seq_2

<400> 8

gttcgtagcc gcacgatctg 20