

|                                                                                           |                                    |                                                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
|          | (19) 대한민국특허청(KR)<br>(12) 공개특허공보(A) | (11) 공개번호 10-2014-0135129<br>(43) 공개일자 2014년11월25일          |
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br>C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)<br>A01H 5/00 (2006.01) |                                    | (71) 출원인<br>고려대학교 산학협력단<br>서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) |
| (21) 출원번호                                                                                 | 10-2014-0130442(분할)                | (72) 발명자<br>이호정                                             |
| (22) 출원일자                                                                                 | 2014년09월29일                        | 서울 동대문구 약령시로 25, 107동 1804호 (제기동, 벽산아파트)                    |
| 심사청구일자                                                                                    | 2014년09월29일                        | 김준혁                                                         |
| (62) 원출원                                                                                  | 특허 10-2013-0048219                 | 서울 성북구 화랑로17길 28, 1층 (상월곡동)                                 |
| 원출원일자                                                                                     | 2013년04월30일                        | (74) 대리인<br>김순웅                                             |
| 심사청구일자                                                                                    | 2013년04월30일                        |                                                             |

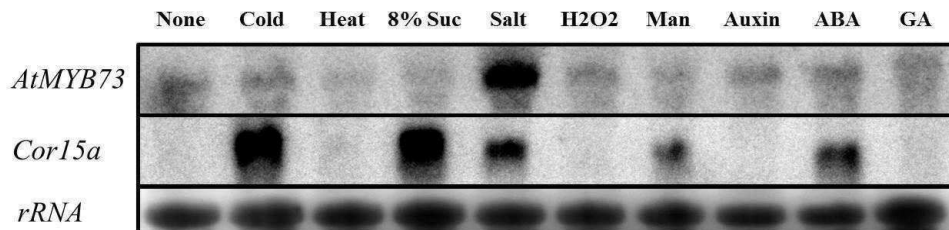
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 식물체의 염분 스트레스를 조절하는 애기장대 MYB73 유전자 및 이 유전자의 프로모터

### (57) 요약

본 발명은 식물체의 염분 스트레스를 조절하는 MYB73 유전자를 이용하여 염분 스트레스 저항성 식물체를 제공하는 것에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 염분 스트레스 특이적 발현을 유도하는 MYB73 유전자의 프로모터(서열번호 2), 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 염분 스트레스 특이적으로 발현시키는 방법에 관한 것이다. 상기 본 발명에 의한 프로모터를 이용하여 외래 유용 유전자를 염분 스트레스 특이적으로 유도함으로써 식물 생육에 영향을 주지 않고, 그 발현을 염분 스트레스에 국한할 수 있다. 나아가, 본 발명에 의한 프로모터에 GUS 유전자가 결합된 벡터로 형질전환된 식물체를 제조하여 식물이 받는 환경 스트레스에 대한 표지 식물로 이용이 가능하다.

대표도 - 도2



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 염분 스트레스 특이적 발현을 유도하는 분리된 *MYB73* 유전자의 프로모터.

### 청구항 2

제1항 기재의 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터.

### 청구항 3

제2항 기재의 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 본 발명은 식물체의 염분 스트레스를 조절하는 애기장대 *MYB73* 유전자 및 이 유전자의 프로모터에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 애기장대 유래의 *AtMYB73* 유전자 발현이 억제된 염분 스트레스 저항성 형질전환 식물체, 및 염분 스트레스 특이적 발현을 유도하는 *MYB73* 유전자의 프로모터에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 식물체의 비생물적 스트레스 (abiotic stress)는 세계 농작물 생산량 감소의 가장 중요한 이유 중 하나이다. 그 중에서 염분 스트레스는 전 세계적인 지구 온난화와 함께 가장 크게 부각되고 있다. 따라서 이러한 염분 스트레스 기작을 연구하는 것은 매우 중요한 주제 중 하나이다. 식물이 염분 스트레스에 놓이게 되면 이온 항상성을 잃게 되어 대사에 큰 영향을 미친다. 그리고 과삼투성 스트레스로 인해 말라서 죽게 된다. 이런 것들을 막기 위해서 많은 곳에서 식물 염분 스트레스 기작에 관한 연구를 진행하고 있다. 그 중 애기장대는 모델 식물로서 가장 많은 연구가 진행되어 왔다.(Boyer JS. Science., 218: 443-448, (1982), Epstein, E. 등, Science., 24:210, 399-404, (1980), Ashraf, M. 등, Biotechnol Adv., 27:744-752, (2009)).

[0003] 한편, 프로모터는 전사조절 인자들이 결합하는 모든 DNA 염기서열부위를 말하여, 일반적으로 전사를 조절할 대상이 되는 유전자의 유전정보를 지니고 있는 DNA 염기서열 앞 부분에 위치한다. 진핵생물에서는 전사조절인자(transcription factor)라고 하는 단백질들이 프로모터 부분에 결합함으로써 RNA 중합효소를 이곳으로 이끌고 오는 일에 관여한다. 프로모터는 이러한 전사조절인자들이 결합하는 모든 DNA 염기서열부위를 지칭한다고도 할 수 있다. 그에 비해 원핵생물에서의 프로모터는 대개 RNA 중합효소가 결합하는 전사시작지점(Transcription Start Site) 바로 근처의 결합부위로 정의된다.

[0004] 현재 형질전환 식물에서 외래 유전자의 발현을 염분 스트레스에만 국한하고자 할 경우 다른 스트레스에는 발현이 되지 않는 새로운 프로모터에 대한 요구가 계속해서 있어 왔다.

[0005] 한편, 식물에서 많은 종류의 MYB 단백질들은 염기 특이적인 DNA 결합(binding)을 통해서 특정 유전자들의 발현을 조절하여 대사과정 및 발육 과정의 전사 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 애기장대에는 약 125종이 알려져 있다. MYB 단백질, 예컨대 *AtMYB2*, *AtMYB52*, *AtMYB15* 및 *AtMYB44*는 또한 ABA 및 비생물학적 스트레스 반응을 조절한다고 보고되어 있다.

[0006] MYB 단백질은 ABA 및 스트레스 반응뿐만 아니라 다수의 기타 세포 과정에 관여한다. 일련의 최근 연구들은 *MYB52*를 포함하는 다수의 MYB 유전자가 2차세포벽 생합성 조절에 관여한다는 것을 보여줬다. 예를 들어, *MYB58* 및 *MYB63*은 리그닌 생합성의 조절자들이고, *MYB103*, *MYB85*, *MYB52* 및 *MYB54*는 2차벽 비후를 제어한다. MYB 전사 인자들 사이에는 계층적인 관계가 존재하며, *MYB52*가 애기장대(*Arabidopsis*)에서의 2차 세포벽 형성을 위한 마스터 스위치인 MY46의 다운스트림 표적들 중 하나임이 증명된 바 있다.

[0007] 또한, 본 발명자들은 대한민국 특허등록 제10-1093243호에 애기장대의 공변세포에 특이적인 *AtMYB60* 프로모터를

사용하여 형질 전환된 식물체에서 목적 단백질을 생산하는 방법 및 상기 방법에 의해 생산된 목적 단백질에 관한 개시한 바 있다. 대한민국 공개특허 제2012-0097555호에는 애기장대 유래 MYB52 유전자로 식물체를 형질전환 시킴으로써 식물의 가뭄 내성 및 ABA에 대한 민감성을 조절하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 가뭄 내성 및 ABA에 대한 민감성이 조절된 식물체 및 그의 종자에 관해 기재되어 있다. 또한, 대한민국 특허등록 제10-1049874호에는 감자에서 유래된 내염성 또는 내한발성 유전자 StMyb 및 이의 용도에 관해 기재되어 있다.

[0008] 현재, 애기장대 *MYB73* 유전자의 식물체의 염분 스트레스를 조절 기능 및 이 유전자의 프로모터가 염분 스트레스 특이적 발현을 유도한다는 것에 대해 알려진 바는 없다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 특허등록 제10-1093243호(2011.12.14)  
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2012-0097555호(2012.09.05)  
(특허문헌 0003) 대한민국 특허등록 제10-1049874호(2011.07.19)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명자들은 애기장대 유래 *MYB73* 유전자가 염분 스트레스를 조절하며, 상기 유전자의 프로모터가 염분 스트레스 특이적 발현을 유도한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 애기장대 유래의 *MYB73* 유전자를 이용하여 식물체의 염분 스트레스 저항성을 증진시키는 방법, 염분 스트레스 저항성 식물체를 제조하는 방법 및 이 방법에 의해 제조된 염분 스트레스 저항성 식물체를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은, 염분 스트레스 특이적 발현 유도 *MYB73* 유전자의 프로모터를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 AtMYB73 (myb domain protein 73, NCBI accession no.: NP 195443.1)의 발현을 억제하여 식물체의 염분 스트레스 저항성을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 *MYB73* 유전자가 녹아웃(knock-out)된 염분 스트레스 저항성 식물체를 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 염기서열을 가지며, 염분 스트레스 특이적 발현을 유도하는 분리된 *MYB73* 유전자의 프로모터를 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터를 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.

[0019] 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 MYB73 (myb domain protein 73)의 발현을 억제하거나 상기 MYB73 (myb domain protein 73)의 과발현을 유도하여 식물체의 염분 스트레스 저항성을 조절하는 방법을 제공한다.

- [0021] 즉, 본 발명의 일 양태에 의하면, AtMYB73 (myb domain protein 73, NCBI accession no.: NP 195443.1)의 발현을 억제하여 식물체의 염분 스트레스 저항성을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0022] 이에 한정되는 것은 아니나, 상기 MYB73 억제는 MYB73 단백질 코딩 유전자의 돌연변이, MYB73에 대한 RNAi 또는 MYB73 단백질 저해제에 의해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 1의 염기서열을 갖는 MYB73 (myb domain protein 73) 유전자 (NCBI accession no.: NM\_119889.2)의 발현을 억제하는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야의 공지의 기술을 이용할 수 있다. 상기 MYB73 단백질 코딩 유전자의 돌연변이는 MYB73 단백질 코딩 유전자의 녹아웃 돌연변이일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, MYB73 유전자를 TRV 벡터에 재조합하여 작성한 VIGS(Virus induced gene silencing)용 벡터로 식물체를 형질전환하여 상기 유전자의 발현을 억제할 수 있다(Chung, E., Seong, E., Kim, Y.-C., Eun Joo Chung, E. J., Oh, S.-K., Lee, S., Park, J. M., Joung, Y. H., and Choi, D.(2004) A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang).Mol. Cells 17: 377-380.; Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M. and Baulcombe, D.C. (2001) Tobacco rattle virus as a vector analysis of gene function by silencing. Plant J. 25, 237-245).
- [0024] 상기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 변이체는 염기 서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, MYB73 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 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.
- [0025] 본 발명은 MYB73 (myb domain protein 73) 유전자의 발현이 억제된 염분 스트레스 저항성 식물체를 제공한다. 바람직하게 서열번호 1의 염기서열을 갖는 MYB73 유전자가 녹아웃(knock-out)된 염분 스트레스 저항성 식물체이다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 MYB73 EXON KO 돌연변이 식물을 제작하여 염분 스트레스 하에서 야생형에 비해 저항성이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다(도 2 참조).
- [0026] 본 발명에 따른 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료작물류일 수 있다. 바람직하게는, 상기 식물체는 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 셀러리 및 유채 등의 쌍자엽 식물일 수 있으며, 가장 바람직하게는 애기장대이다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 돌연변이 식물체의 종자를 제공할 수 있다. 바람직하게는, 상기 종자는 쌍자엽 식물의 종자일 수 있으며, 가장 바람직하게는 애기장대의 종자이다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 2의 염기서열을 가지며, 염분 스트레스 특이적 발현을 유도하는 분리된 MYB73 유전자의 프로모터를 제공한다.
- [0029] 본 발명에 있어, "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. 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼  $\alpha$ -아밀라아제 RAm1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토판인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있다.

나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0030] 상기 프로모터의 DNA 염기서열은 애기장대 MBY73 유전자의 코딩 시퀀스의 번역개시 부위로부터 -1 내지 -1000 염기쌍에서 유래된 것을 특징으로 한다. 본 발명의 염분 스트레스 발현 유도 특이 프로모터는 상기 서열번호 2의 염기서열뿐만 아니라 상기 서열번호 2의 염기서열의 일부 염기가 치환, 결실 또는 부가된 변형서열로서 배 특이 프로모터 활성을 나타내는 염기서열을 포함한다.

[0031] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터를 제공한다. 바람직하게 본 발명은 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물체의 염분 스트레스 발현 유도 특이 재조합 발현벡터를 제공한다.

[0032] 본 발명에 있어, '발현벡터'란 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 염분 스트레스 특이 발현 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어, '작동 가능하게 연결(operably linked)' 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란, 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0034] 상기 본 발명에 따른 발현벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 MYB73 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입함으로써 제조할 수 있다. 따라서 본 발명에 사용될 수 있는 벡터로 다양한 클로닝 부위를 가지고 있는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 Ti 플라스미드 등의 플라스미드가 있고, 식물 바이러스 벡터가 있으며, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라면 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 pMDC162 벡터를 이용하여 MYB73 pro::GUS 발현벡터를 제조하였다.

[0035] 본 발명에 있어서, '목적 단백질'이란 본 발명의 프로모터에 의해 염분 스트레스 하에서 특이적으로 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 단백질을 말하며, 바람직하게는 외인성 단백질이거나 또는 내인성 단백질 및 리포터 단백질일 수 있다. 상기 외인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연적으로 존재하지 않는 단백질을 말하며, 상기 내인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연적으로 존재하는 유전자에 의해 발현된 단백질을 말한다. 또한, 상기 리포터 단백질은 리포터 유전자에 의해 발현된 단백질로서 그 존재에 의해서 세포 내에서의 그의 활성을 알려주는 표지 단백질을 말한다. 본 발명의 일 실시예에서는 청색 발색 유전자인 GUS가 연결된 형태의 리포터 시스템이 내재되어 있는 pMDC162 벡터에 본 발명의 애기장대 MYB73 프로모터를 GUS 유전자의 상류부분에 작동가능하게 연결한 재조합 발현벡터 MYB73 pro::GUS를 제조하였다. 상기 외래 유전자는 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.

[0036] 본 발명의 염분 스트레스 특이 프로모터의 전사활성에 의하여 발현되는 목적 단백질 유전자의 예로는, 형질전환 대상 식물체가 유채, 들깨 및 참깨 등의 유지작물인 경우 지방산 생합성 및 조절 관련 유전자 등을 들 수 있고, 단백질의 생성 및 축적량이 다른 식물에 비해 상대적으로 높은 콩 및 알팔파 등의 두과식물인 경우 경제적으로 부가가치가 높은 항체 유전자 등을 들 수 있고 사료작물로 대표적인 옥수수의 경우 돼지 설사병, 구제역 바이러스 등의 경구 백신(edible vaccine) 유전자 등을 들 수 있고, 종자로 장기간 보관, 유통되는 대부분의 작물의 경우 수확 후 저장성을 높이도록 각종 병 저항성에 관련된 유전자 등을 들 수 있으며, 그 외에도 토코페롤, 베타카로틴 등과 같이 특정 영양 성분을 작물의 종자에서 강화하려는 경우에는 관련 물질대사경로의 생합성 유전

자 등을 들 수 있으나, 여기에 한정되지 않고, 본 발명의 염분 스트레스 특이 프로모터를 사용하여 조절될 수 있는 각종 목적 단백질을 코딩하는 유전자들이 포함될 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 염분 스트레스 발현 유도 특이적 재조합 발현벡터로 형질전환된 식물세포 및 식물체를 제공한다. 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현 벡터는 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 식물 세포내로 도입할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터를 식물 세포내로 도입하는 방법으로는, 제한 없이 당해 공지된 방법이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 염화칼슘( $\text{CaCl}_2$ ) 및 열 쇼크(heat shock) 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공(electroporation) 및 PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법 등과 같은 방법들이 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 *MYB73* 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 염분 스트레스에 특이적으로 발현시키는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0039] 본 발명은 또한, 1) *MYB73* 유전자 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 2) 상기 형질전환된 식물체에 염분 스트레스를 처리하여 식물체 내에서 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법을 제공한다. 상기 식물은 전술한 바와 같다..

### 발명의 효과

[0040] 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명에 의하여 *MYB73* 유전자의 발현은 염분 스트레스에 특이적으로 발현되고 있음을 밝혀졌다. 나아가, *MYB73* 유전자 발현이 억제되는 경우에 식물의 염분 스트레스 저항성이 매우 향상되는 것으로 확인되어 본 발명에 의하면 염분 스트레스 저항성 식물체를 제공할 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은 염분 스트레스 특이적 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터 및 상기 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공하여, 유전공학적 방법으로 변형된 단백질 또는 외래 유용 유전자 도입에 의한 단백질 등과 같은 목적 단백질을 염분 스트레스 특이적으로 유도함으로써 식물 생육에 영향을 주지 않고, 그 발현을 염분 스트레스에 국한하는 효과가 있다.

[0042] 나아가, 본 발명에 의한 프로모터에 GUS 유전자가 붙은 벡터로 형질전환된 식물체를 제조하여 식물이 받는 환경 스트레스에 대한 표지 식물로 이용이 가능하며, 또한 본 발명에 의한 프로모터는 애기장대의 염분 스트레스에 관여하는 *MYB73* 유전자의 프로모터로서 이를 이용한 식물체의 형질전환을 통해 염분 스트레스에 연관되어 있는 다양한 유전자들의 조절 기작을 연구하는데 유용하게 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 식물 MYB 전사인자 종류를 개략적으로 나타내는 도면이다.

도 2는 애기장대 내 스트레스 처리시 본 발명에 의한 애기장대 식물체 *MYB73* 유전자의 발현 정도를 노던 블라팅으로 확인한 사진이다.

도 3은 본 발명에 의한 *MYB73* 유전자의 발현이 억제된 애기장대 식물이 염분 스트레스 저항성을 나타낸다는 것을 보여주는 도면이다.

도 4는 본 발명에 의한 *MYB73* GUS 벡터 구조를 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명에 의한 애기장대 식물체 발현벡터 *MYB73* pro::GUS로 형질전환된 애기장대에 염분 스트레스를 시간별로 처리한 후 GUS의 발현 양상을 확인한 사진이다.

도 6은 본 발명에 의한 애기장대 식물체 발현벡터 *MYB73* pro::GUS로 형질전환된 애기장대에 ABA, Mannitol, ABA

+ Fluridon을 시간별로 처리한 후 GUS의 발현 양상을 확인한 사진이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 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.
- [0045] 실시예 1. MYB73 유전자의 염분 스트레스에 대한 발현 양상을 노던 블라팅으로 확인
- [0046] MYB73 유전자가 염분 스트레스에만 특이적으로 반응하는지 보기 위해서, 다양한 스트레스를 처리 한 후 노던 블라팅(northern blotting)을 해보았다.
- [0047] 저온 처리 및 고온 처리는 각각 4℃, 37℃에서 하였고, Sucrose 8 %, NaCl 200 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM, Mannitol 100 mM, IAA 10 μM, 그리고 ABA 10 μM, GA 10 μM 농도로 1 X MS 용액에 희석하여 처리하였고 6시간 이후의 발현을 노던 혼성화 (Northern hybridization)법으로 분석하였다. 그리고 상기 스트레스들이 제대로 처리된 것을 확인하기 위해서, 저온(Cold), 가뭄(Drought) 그리고 ABA에 반응하는 *Cor15a* 유전자를 표지 유전자로서 활용하였다.
- [0048] 노던 블라팅은 구체적으로 발아 후 2주일 된 Wild-type 애기장대 성체의 mRNA를 ATA 방법을 통해 추출하였다. 20 μg의 mRNA를 1% agarose/2M MOPS/2.2M formaldehyde gel에서 90V로 2시간 전기영동을 한 후 Hybond-XL membrane(GE Healthcare: RPN 303S)에 이틀 transfer 시켰다. 이후 1200x100 μJ/cm<sup>2</sup> 로 UV crosslinking을 하고 hybridization buffer로 1hr 동안 65℃에서 pre-hybridization을 하였다. probe로는 MYB73 유전자를 [32P]-dCTP (50 μCi)로 random primer mixture와 dNTP mixture를 같이 넣어 1시간 incubation을 통해 labeling을 한다. 표지된 probe를 65℃에서 membrane과 함께 18시간 hybridization시켰다. 1xSSC/0.1% SDS solution으로 15분간 2번, 0.1xSSC/0.1% SDS solution으로 10분간 한번 42℃에서 washing 한 후 BAS에 붙여 카셋트에 하루 암반응시킨 후 Multiplex Bio-Imaging System(Fujifilm : FLA-7000)을 통해서 이미지를 현상하였다.
- [0049] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, MYB73 유전자의 발현이 염분 스트레스에만 특이적으로 강하게 반응하는 것을 확인하였다.
- [0050] 실시예 2. 염분 스트레스에 저항성 있는 MYB73KO 유전자
- [0051] 염분 스트레스에 특이적으로 반응을 하는 MYB73 유전자가 염분 스트레스 저항성과 어떠한 관련이 있는지 알아보기 위하여, Col-0 와 MYB73 UTR KO, MYB73 EXON KO 두 개의 돌연변이 식물의 묘목을 염분 스트레스 처리하여 저항성 양상을 확인해 보았다.
- [0052] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, MYB73 유전자 발현이 억제된 MYB73 KO 돌연변이 식물들이 염분 스트레스 하에서 야생형에 비해 저항성이 현격히 증가함을 알 수 있었다. 따라서, MYB73 유전자가 염분 저항성에 네거티브한 영향을 주고 있다는 것을 알 수 있었다.
- [0053] 실시예 3. 본 발명에 의한 애기장대 MYB73 프로모터 클로닝(MYB73 promoter cloning)
- [0054] 발아 후 2주일 된 Wild-type 애기장대 성체의 gDNA 추출하였다. 이 gDNA를 주형으로 MYB73 1kb promoter 양끝자리 20bp와 같은 서열을 갖는 프라이머(F-GATTGGGTAAAAACGCTCCA, R-GCCGGATCTTTTATCGGAT)를 이용하여 PCR 하였다. 이때 PCR 조건은 denaturation 95℃ 5분, annealing 57℃ 1분, polymerization 70℃ 1분, 총 40cycle로 진행하였다.
- [0055] 그 후 전기영동을 통하여 증폭된 MYB73의 프로모터를 확인하고, 젤에서 용출하였다. 용출된 DNA 조각(1kb)을 topo vector(pCR 8/GW/TOPO : invitrogen)에 삽입하고 이를 다시 GUS vector인 pMDC162 vector에 LR reaction(LR Clonase® : invitrogen)하였다(도 4 참조). 이후 E.coli cell(TOP10 cell : invitrogen)에 열충격 (heat shock transformation) 방법으로 형질전환한 후 콜로니 (colony)가 생성될 때까지 배양하였다(37도, 12시간). 이후 생성된 콜로니 (colony)를 다시 LB 배지에 다시 배양 후 플라스미드 벡터 (plasmid vector)를 추

출하였다.

#### [0056] 실시예 4. MYB73 프로모터로 형질전환된 식물체 제작

[0057] 실시예 3에서 준비된 MYB73 pro::GUS vector를 아그로박테리아에 전기충격 (electric shock transformation) 방법으로 형질전환한 후 배양하였다. 형질전환된 아그로박테리아를 꽃침지법(floral dipping transformation)을 통해 준비된 야생형 (wild-type) 애기장대에 형질전환하였다. 이후 형질전환된 식물로부터 씨를 수확하고 3세대 까지 자가수분 (selfing)하여 homologous line을 확보하였다. 이후 GUS 염색액 (GUS staining solution)을 이용하여 식물을 염색하였다.

#### [0058] 실시예 5. 식물호르몬 등 화학적/물리적 처리에 따른 목적 단백질 발현양상

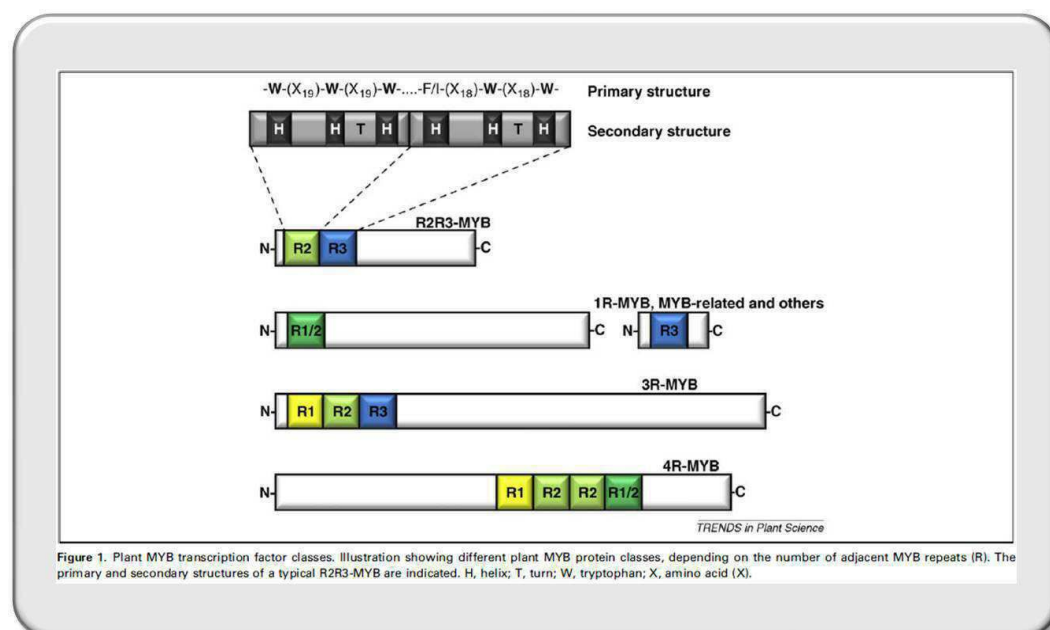
[0059] 본 발명에 의한 프로모터를 포함하는 각 벡터의 프로모터 뒤에 GUS 유전자를 삽입하였고, 이를 1.2%-아가 배지에 과중하여 4일간 생육한 애기장대 Col-0에 형질전환하였다. 형질전환된 식물을 과중하여 2주일간 생육한 뒤 각 200 mM NaCl, 10  $\mu$ M ABA, 10  $\mu$ M ABA + 10  $\mu$ M Fluridon(ABA inhibitor), 200mM Mannitol에 1, 3, 6, 24 시간 동안 스트레스 처리 후 GUS 염색을 진행하였다. 애기장대를 GUS 염색한 후 agar 4% 배지 위에 표본을 만들어 leica사의 해부 현미경(stereoscopic microscope) (모델명: leica EZ 4D)을 사용하여 8x 로 관찰하였다.

[0060] 그 결과, 염분 스트레스를 처리한 식물에서만 대조군과 비교해 특이적으로 실험군에서 GUS 발현이 많이 발현되는 것을 확인하였다 (도 5). 하지만 다른 스트레스를 처리한 식물에서는 대조군과 실험군에서 차이가 없었다 (도 6). 따라서 본 발명에 의한 프로모터는 ABA에 의한 스트레스 저항성 발현 신호전달 경로와 독립적인 발현 양상을 보인다.

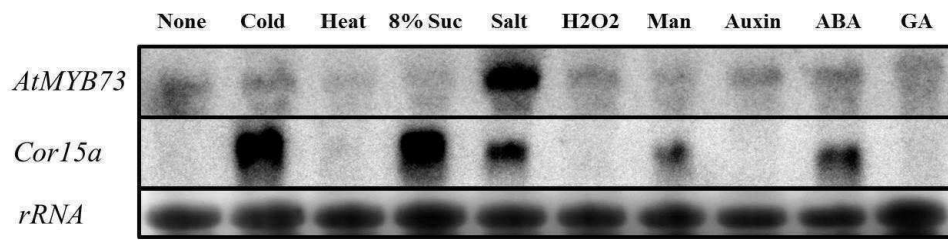
[0061] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

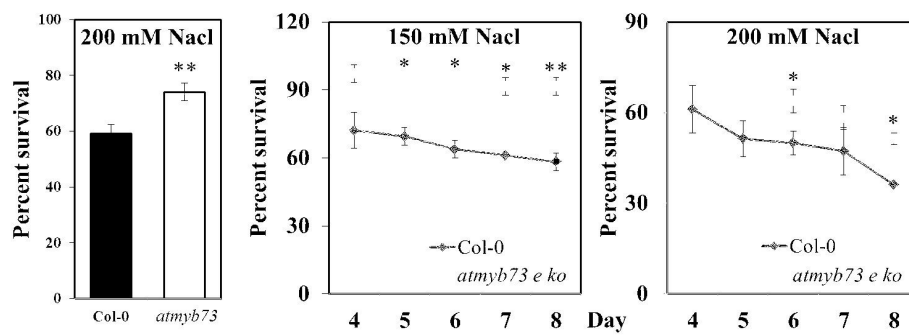
### 도면1



도면2

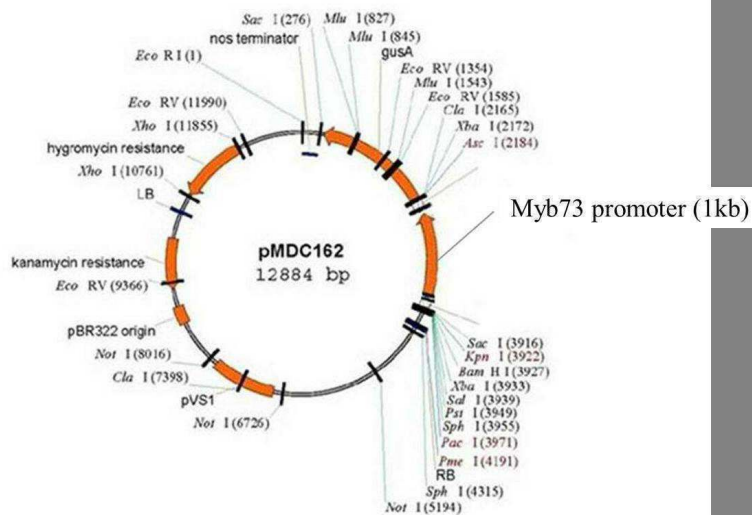


도면3

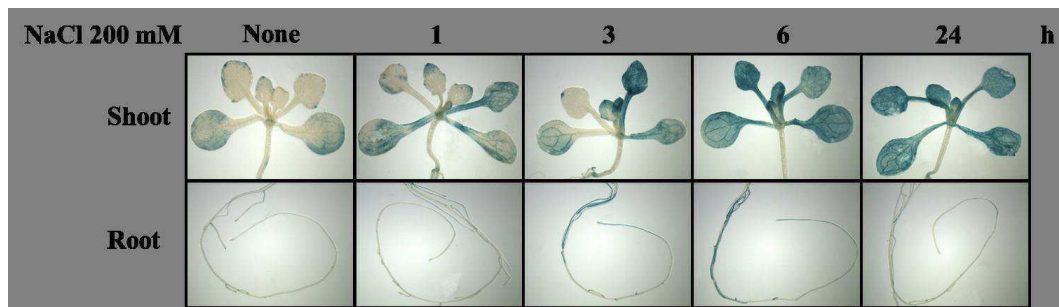


도면4

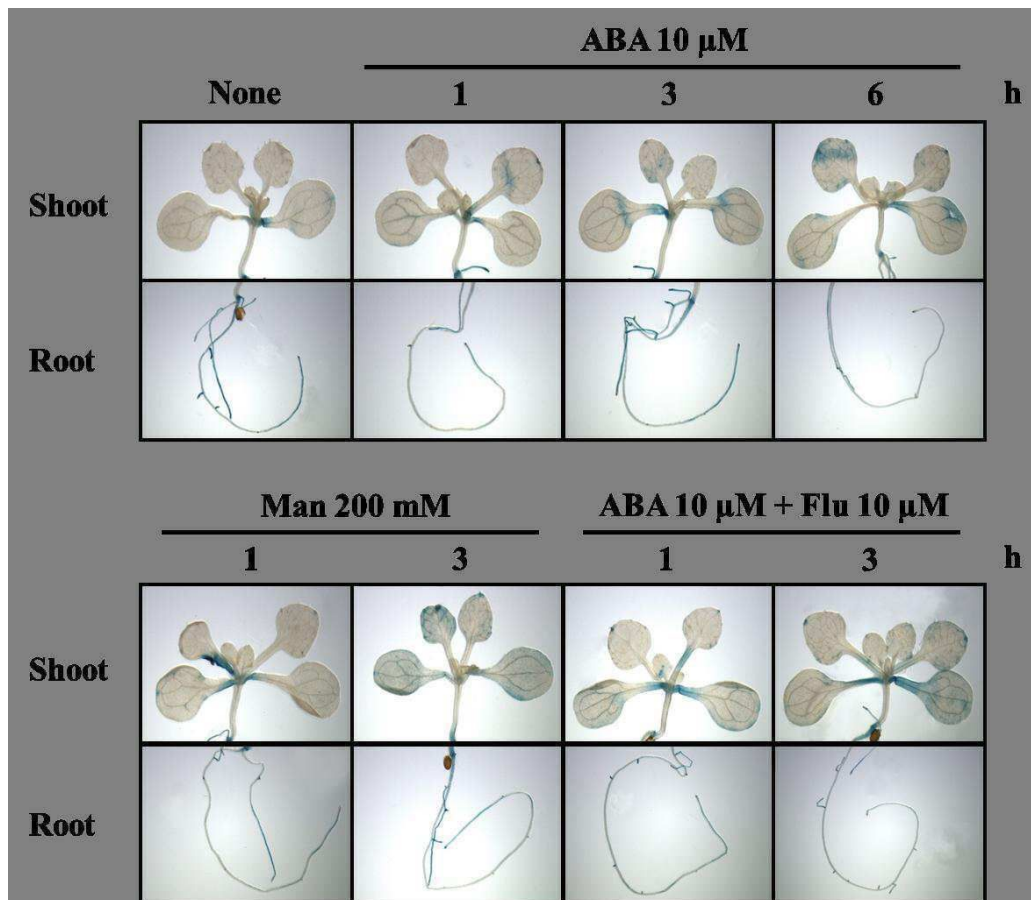
Myb73 GUS vector structure



도면5



도면6



## 서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> MYB73 gene regulating salt stress of plant and promoter thereof
- <130> P11-130218-01
- <160> 2
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 963
- <212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atgtcaaacc cgacccgtaa gaatatggag aggattaaag gtccatggag tccagaagaa | 60  |
| gatgatctgt tgcagaggct tgttcagaaa catggtccga ggaactggtc ttgattagc  | 120 |
| aaatcaatcc ctggacgttc cggcaaatct tgcgtctcc ggtggtgtaa ccagctatct  | 180 |
|                                                                   |     |
| ccggaggtag agcaccgtgc tttttcgcag gaagaagacg agacgattat tcgagctcac | 240 |
| gctcggtttg gtaacaagt ggctacgac tctcgtcttc tcaatggacg aaccgataac   | 300 |
| gctatcaaga atcattggaa ctgcacgtg aagcgaata gcagcgtcga agggcaaagt   | 360 |
| tgtgattttg gtggtaatgg agggatgat ggtaattag gagaagagca accgttgaaa   | 420 |
| cgtacggcga gtggtggtg tgggtctctg actggcttgt atatgagtc cgggaagtcca  | 480 |
| tcgggatctg acgtcagcga gcaatctagt ggtggtgcac acgtgtttaa accaacggtt | 540 |
| agatctgagg ttacagcgtc atcgtctggt gaagatctc caacttatct tagtttgtct  | 600 |
|                                                                   |     |
| cttccttgga ctgacgagac ggttcgagtc aacgagccgg ttcaacttaa ccagaatacg | 660 |
| gttatggacg gtggttatac ggcggagctg tttccggtta gaaaggaaga gcaagtggaa | 720 |
| gtagaagaag aagaagcga ggggatatct ggtggattcg gtggtgagtt catgacggtg  | 780 |
| gttcaggaga tgataaggac ggaggtgagg agttacatgg cggatttaca gcgaggaaac | 840 |
| gtcggtggtg gtagttctgg cggcggaggt ggcggttcgt gtagccaca aagtgtaaac  | 900 |
| agccgtcgtg ttgggtttag agagtttata gtgaaccaa tcggaattgg gaagatggag  | 960 |
| tag                                                               | 963 |

<210> 2

<211> 1001

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| aaaaggatat aaatatagag agaataaaac gtagaagtta acgatttttt ttgtgagtg  | 60  |
| tcactttaga tggaaaatga aatgattggg taaaaacgct ccacctgtaa aacagagagt | 120 |
| ggaagaaacg ctctgtgta cgagcgtact ctctcttcaa aagaaaacaa atctctcaa   | 180 |
| aaaaaagaag aacaattgaa aaaaaaaaag caaatctcaa actcaaagta catatactta | 240 |
| cttgacacgt gttaatatac agctgtatcc caagtcccca accgtttttc ctggaagatt | 300 |
| ctctgtcttc cacgctcgat gttaacctca cacaacgct tatctcccaa aacgcctttt  | 360 |
|                                                                   |     |
| ccaatcgcca acgtgtttta tttttggttt aaaataaata tctgttcaa tcatacaaac  | 420 |

|                                                                   |      |
|-------------------------------------------------------------------|------|
| acgtaaatgt tgicaatttt ttatatacca aacgttaacg aggtttgtac gtagccatt  | 480  |
| tatggacaca taattatgaa catataaaca atggttaatc atacgtttaa attaattaaa | 540  |
| ttcaccaata tttttttgac tgaatgagtc aaaattgttt aacgagtaac gaccataatt | 600  |
| atcagttttt attttttatt gtttgaacta ccatagtatt ccgtttaaca ctgagcaaat | 660  |
| ctctttatta atagagaaaa cggttttatt tgtttccttc tataaaattt gtttttaata | 720  |
| atacgttaga tatttttatg cagttaagga taatattaca ctgtaaagtt taactagttt | 780  |
|                                                                   |      |
| aatatcgttt ctgttaaadc gataagaaaa aattaccggt tgaaccggtg acccttttgc | 840  |
| ccactccttt ctctataaaa tactctctct tcttgctctt atcctcttca accaaaaagc | 900  |
| ttttcttccc aacacacaca aaaaaaaaaa ctgtaacgac caaaaaaaaa gaggacgcgt | 960  |
| tagaagaaaa aaaaagaaca atccgataaa aagatccggc g                     | 1001 |