



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월29일
(11) 등록번호 10-0833475
(24) 등록일자 2008년05월23일

(51) Int. Cl.

C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0015454

(22) 출원일자 2007년02월14일

심사청구일자 2007년02월14일

(56) 선행기술조사문헌

Mol. Gen. Genet., Vol.224:331-340(2004)

Plant J., Vol.20:185-211(1999)

(73) 특허권자

세종대학교산학협력단

서울 광진구 군자동 98 세종대학교

(72) 발명자

좌남수

경기 용인시 수지구 풍덕천2동 신정마을 현대프라
임아파트 208동1102호

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 10 항

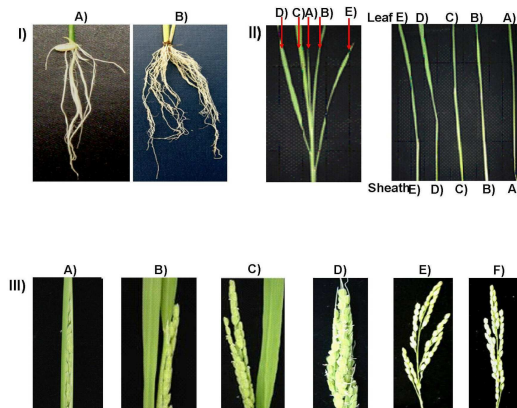
심사관 : 김기연

(54) 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 OsMSRPK1유전자

(57) 요약

본 발명은 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 벼 유래의 OsMSRPK1 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 식물체, 상기 유전자를 이용하여 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 방법, 상기 방법에 의해 식물의 발생 또는 분화가 촉진된 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다. 본 발명에서 분리된 OsMSRPK1 유전자 및 상기 유전자로부터 발현되는 OsMSRPK1 단백질은 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진할 수 있다.

대표도 - 도7



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 등숙기 전 단계의 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 벼 유래의 OsMSRPK1 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 이삭에서는 이삭 돌출 직전에 발현되며, 개화시작까지 발현양이 증가한 후, 개화 만발을 기점으로 줄어들어 종자가 익기 시작하면 발현되지 않는 것을 특징으로 하는 단백질.

청구항 3

제1항의 OsMSRPK1 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

청구항 5

제3항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제5항의 재조합 벡터로 형질전환된 식물체.

청구항 7

제3항의 유전자를 식물체에서 과발현시킴으로써 등숙기 전 단계의 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료 작물류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항의 방법에 의해 식물의 발생 또는 분화가 촉진된 형질전환 식물체.

청구항 10

제9항의 형질전환 식물체의 종자.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 등숙기 전 단계의 식물 (이하, '어린 식물'이라고 함)의 발생 또는 분화를 촉진하는 벼 유래의 OsMSRPK1 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로

형질전환된 식물체, 상기 유전자를 이용하여 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 방법, 상기 방법에 의해 식물의 발생 또는 분화가 촉진된 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

- <14> 모든 살아있는 유기체는 일생동안 생물적, 비생물적 스트레스에 지속적으로 노출되어 있다. 동물은 위험에 노출되어질 경우 피할 수 있지만, 식물은 고착성 생물체로 다양한 스트레스에 대해 동물보다 더 많은 영향을 받게 된다. 그러므로 식물은 자신을 보호하기 위해 비생물적 스트레스 (예를 들면, 수분, 온도, 빛, 염도, 금속과 토질)와 생물적 스트레스 (예를 들면, 바이러스, 박테리아, 곰팡이, 포식동물)를 빠르게 감지하고 반응해야 한다. 식물은 환경 스트레스 및 방어/스트레스 감응을 위한 정교한 네트워크를 가지고 발달되어졌다 (Yang Y. et al., (1997) 11:1621-1639). 그러므로 식물은 움직일 수 없기 때문에, 환경 자극을 빠르게 인식하고 반응하는 메카니즘을 가지게 되었다.
- <15> 식물에서 단백질의 인산화/탈인산화 과정은 이러한 적응에 있어 매우 중요한 역할을 하며 (Umezawa T. et al., (2004) Mol. Gen. Genet. 224:331-340), 어떤 단백질 인산화효소 (PKs)는 식물에서 스트레스 감응과 관련된 신호전달 요인으로서 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 예를 들면, MAPKs (MAP키나아제) 연쇄반응은 식물에서 생물적, 비생물적 스트레스와 관련된 신호전달 경로를 조절하는 중심적인 역할을 한다 (Munnik T. et al., (1999) Plant J. 20:185-211).
- <16> 단백질 인산화효소 (PKs)의 하나인 사이클린-의존성 단백질 인산화효소 (CDKs)는 진핵세포에서 순환을 조절하며, 사이클린-CDK 복합체는 세포 순환 조절에서 중요한 기능을 하는 것으로 보고되었다. CDKs는 모든 진핵세포에서 보존되어지고 세포내 과정을 조절하며, PSTAIRE 모티프, 촉매적 도메인 및 T-고리 영역을 포함하는 세 개의 특징적인 보존 영역을 가지고 있다.
- <17> 벼 (*Oryza sativa* L.)는 아시아를 포함한 많은 나라에서 주식으로 사용하는 만큼 식물 연구를 위한 중요한 모델로서 현재까지 많은 연구가 활발히 진행중이다. 한국공개특허 제2005-0009282호에는 분화를 조절하는 유전자를 동정하는 방법이 기재되어 있다.
- <18> 이에 본 발명자들은 벼 유래의 *OsMSRPK1* 유전자를 연구하던 중, *OsMSRPK1* 유전자가 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 것을 밝히고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <19> 따라서, 본 발명의 목적은 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 벼 유래의 *OsMSRPK1* 단백질을 제공하는 것이다.
- <20> 본 발명의 다른 목적은 상기 *OsMSRPK1* 단백질을 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.
- <21> 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.
- <22> 본 발명의 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.
- <23> 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 식물체에서 과발현시킴으로써 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.
- <24> 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 식물의 발생 또는 분화가 촉진된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <25> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 벼 유래의 *OsMSRPK1* 단백질을 제공한다.
- <26> 벼 품종의 개발을 위해 본 발명자들은 벼유전체지원센터 (RGRC)로부터 획득한 72개의 시그널 후보 클론을 가지고 역상 노던 혼성화를 수행하였다. *OsEDR1* 유전자는 Nipponbare (자포니카형)에서 첫 번째로 발견된 MAPKKKs로, 이 유전자는 다양한 환경적 요인에 의해 빠르게 반응하는 것으로 알려져 있다. 본 발명에서는 *OsEDR1* 유전자가 과발현된 형질전환 벼에서 발현량이 훨씬 증가되어진 새로운 유전자 *OsMSRPK1*를 규명하고, cDNA 클론 (Genbank accession number AK111593)이 다양한 시그널에 대하여 상향조절되어지는 것을 확인하였다. 또한, 본 발명에서는 상기 cDNA를 단백질 인산화효소1에 반응하는 다중의 시그널을 의미하는 *OsMSRPK1* (*Oryza sativa* multiple signaling response protein kinase 1)로 명명하였다.

- <27> 본 발명에 따른 *OsMSRPK1* 단백질의 범위는 벼로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체 내에서 과발현시 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 활성을 의미한다.
- <28> 본 발명에 따른 *OsMSRPK1* 단백질은 이삭에서는 이삭 돌출 직전에 발현되며, 개화시작까지 발현양이 증가한 후, 개화 만발을 기점으로 줄어들어 종자가 익기 시작하면 발현되지 않는 것을 특징으로 한다.
- <29> 또한, 본 발명은 상기 *OsMSRPK1* 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 *OsMSRPK1* 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.
- <30> 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 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, 겹)를 포함할 수 있다.
- <31> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 상기 재조합 벡터는 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다.
- <32> 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- <33> 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- <34> 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잠종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잠종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- <35> 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(포스포노트리신)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <36> 본 발명의 일 구현예에 따른 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건

및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

<37> 상기 터미네이터는, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α -아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 과세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 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.

<38> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다. 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및(또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, 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 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

<39> 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다.

<40> "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

<41> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 *OsMSRPK1* 유전자를 식물체에서 과발현시킴으로써 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진하는 방법을 제공한다.

<42> 식물체에서 *OsMSRPK1* 유전자를 과발현시키는 방법으로는 *OsMSRPK1* 유전자를 포함하고 있는 식물체 또는 *OsMSRPK1* 유전자를 포함하고 있지 않은 식물체 내로 *OsMSRPK1* 유전자를 도입함으로써 수행될 수 있다. 상기에서 "유전자의 과발현"이란 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 *OsMSRPK1* 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다. 식물체 내로 *OsMSRPK1* 유전자를 도입하는 방법으로는 프로모터의 조절을 받는 *OsMSRPK1* 유전자가 포함된 발현 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 방법이 있다. 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 과발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 프로모터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터; 피크위트 모자이크 비루스(FMV)에서 유래한 전장 전사 프로모터 및 TMV의 코트 단백질 프로모터를 들 수 있다. 또한, 단자엽 식물이나 목본식물체에서 *OsMSRPK1* 유전자를 과발현하기 위해서는 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터를 사용할 수 있다.

<43> 본 발명의 방법에 의해 식물의 발생 또는 분화가 촉진될 수 있는 식물체로는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 쌀, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스 등을 포함하는 사료작물류가 포함된다.

<44> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 식물의 발생 또는 분화가 촉진된 형질전환 식물체를 제공한다.

<45> 본 발명에 따른 식물의 발생 또는 분화가 촉진된 식물은 당업계의 통상적인 방법인 유성번식 방법 또는 무성번

식 방법을 통해 수득할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 식물체는 꽃의 수분과정을 통하여 종자를 생산하고 상기 종자로부터 번식하는 과정인 유성번식을 통해 수득할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 *OsMSRPK1* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환한 다음 통상적인 방법에 따라 캘러스의 유도, 발근 및 토양 순화의 과정인 무성번식 방법을 통해 수득할 수 있다. 즉, *OsMSRPK1* 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 식물의 절편체를 당업계에 공지된 적합한 배지에 치상한 다음 적정 조건으로 배양하여 캘러스의 형성을 유도하고, 신초가 형성되면 호르몬 무첨가 배지로 옮겨 배양한다. 약 2주 후 상기 신초를 발근용 배지에 옮겨서 뿌리를 유도한다. 뿌리가 유도된 다음 이를 토양에 이식하여 순화시킴으로써 발생 또는 분화가 촉진된 식물을 수득할 수 있다. 본 발명에서 형질전환 식물은 전체 식물체뿐만 아니라 그로부터 수득될 수 있는 조직, 세포 또는 종자를 포함할 수 있다.

<46> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<47> 실시예

<48> 재료 및 방법

<49> 1. cDNA 클론 제조

<50> 병원균에 대한 저항성과 관련이 있는 72개의 주요한 시그널링 후보 클론은 벼 유전체지원센터로부터 지원받았다 (RGRC, Tsukuba, Japan).

<51> 2. Dot-blot 혼성화

<52> 추정되는 벼 MAPK cDNA 클론은 벼 유전체지원센터(RGRC)로부터 지원받았다. cDNA (각 2 μ g)는 DNA 변성용액 (0.5N NaOH 와 1.5M NaCl)으로 변성시키고 65°C에서 5분간 가열하였다. 변성된 DNA는 2XSSC와 혼합하고 96-웰 dot blot manifold blotter를 이용하여 나일론막 (HybondN⁺ Amersham Pharmacia Biotech, USA)으로 옮겼다. 막은 *OsEDR1*이 과발현된 형질전환 벼의 [α -³²P]dCTP-표지된 전체 cDNA를 가지고 혼성화시켰다. 이 cDNA는 트리졸 시약 (Clontech, USA)을 사용하여 형질전환된 잎으로부터 추출한 전체 RNA로부터 합성하였다. 혼성화된 막은 65°C에서 1시간 동안 2XSSC와 0.1% SDS로 세척하고, 65°C에서 1시간 동안 0.2X SSC와 0.1% SDS로 다시 한번 세척한 다음 2일 동안 -80°C에서 X-선 필름에 노출시켰다.

<53> 3. 식물 성장조건 및 시료채취

<54> 본 발명에서 사용한 유식물 Nipponbare (*Oryza sativa* L. 자포니카형)과 종자는 100% 에탄올로 30초간 멸균하고, 2% 표백제 (NaClO)로 20분 동안 흔들어서 씻게 한 다음 증류수를 사용하여 4-5회 세척하였다. 멸균된 1/2 MS (2.15g MS + 15g 수크로스 + 3g phyta gel / 1L) 배지에 과종한 다음, 성장 챔버(28°C, 70% 습도, 백색형광)에서 성장시켰다. 젖은 와트만 3MM 거름종이가 깔린 페트리-디쉬에서 종자를 발아시킨 다음 토양으로 옮겼다. 식물 재료를 채취한 다음, 사용할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

<55> 4. 벼 게놈 DNA 추출

<56> 벼 샘플은 액체질소로 냉동시킨 다음 막자사발과 막자를 이용하여 곱게 갈고, 1.5 ml 용량의 마이크로튜브에 샘플 100-200 mg을 넣고, 추출완충용액[2%w/v CTAB, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris-HCl, pH8.0, 0.2% 베타-머캅토에탄올] 0.7 ml을 첨가한 다음, 균질화시켰다. 균질화된 용액에 페놀/클로로포름/이소아밀알콜 (25:24:1) 혼합용매 0.7 ml을 가하고 조심스럽게 섞어주었다. 이 용액은 5회 간격으로 거꾸로 섞어주면서 65°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양액을 13,000rpm에서 15분간 원심분리하고, 1.5 ml의 깨끗한 마이크로튜브로 상등액을 옮기고, 동일 부피의 클로로포름/이소아밀알콜 (24:1)을 가하고 5분간 서서히 섞어주었다. 이 용액을 13,000rpm에서 15분간 원심분리하고, 깨끗한 마이크로튜브 (1.5 ml)로 옮기고 동일 부피의 100% 이소프로판올을 가하였다. 5회간 흔들어준 다음 -2°C에서 30분간 배양시켰다. 배양한 이 용액을 5,000rpm에서 15분간 원심분리하고, 70% 에탄올 1 ml을 가하여 세척하였다. 그런 다음 에탄올을 제거하고 공기 중에서 건조시킨 후 50ul TE에 용해시켰다.

<57> 5. 서던 블롯 분석

<58> 벼 (*Oryza sativa* L. japonicatype cv. Nipponbare) 게놈 DNA는 과종 후 2주된 잎으로부터 추출하였다. 게놈 DNA (5 μ g)는 제한효소 *HindIII*, *EcoRV*, *SacI*, *XbaI*, *EcoRI*로 절단하고, 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하여 분리하였다. DNA 변성을 위해, 게놈 DNA가 포함된 아가로스 겔은 변성용액과 중성용액으로 세척하였다.

게놈 DNA는 나일론 막 (HybondN⁺ Amersham Pharmacia Biotech, USA)에 옮긴 후, [α -³²P]dCTP-표지된 (Mgaprime DNA labeling system, Amersham) *OsMSRPK1* 유전자 특이 프로브를 가지고 혼성화시켰다. 혼성화된 막은 2X SSC와 0.1% SDS로 65℃에서 1시간 동안 약하게 세척한 다음 0.2X SSC와 0.1% SDS로 65℃에서 1시간 동안 보다 강하게 세척하고, 2일 동안 -80℃에서 X-선 필름에 노출시켰다.

<59> 6. 화학약품 처리

<60> 벼 (*Oryza sativa* L. japonicatype cv. Nipponbare) 식물은 25℃, 70% 상대습도, 백색형광 (파장 390-500nm, 150mol m⁻² s⁻¹, 12hr 광주기)하에서 성장시켰다. 2주된 유식물의 성장한 잎의 중간 부분 (2 cm)을 이용한 모든 처리는 기존에 보고된 방법으로 실시하였다 (Agrawal et al., (2002) Biochem. Biophys. Res. Commun. 294(5): 1009-1016). 잎 단편은 Milli Q 물이 담긴 페트리 디쉬에서 배양하고 다른 단편은 JA (자스몬산), SA (살리실산), Cd (염화카드뮴), 10mM CHX (사이클로헥시미드), 0.1% CT (키토산), 1M OA (오카다산), 10mM H₂O₂ (과산화수소) 150mM NaCl (염화나트륨)용액 각각 100 μM을 처리하였다. 건조하기 위해 상기 단편들을 빈 페트리 디쉬로 옮겼다. 자외선 빛 (UV-C, 254 nm)은 Hitachi (Japan) 살균램프를 이용하여 15 cm 거리에서 조사한 다음, 연속 광으로 처리하였다. 잎 또는 잎 단편조각은 다양한 간격으로 샘플을 취하고 -80℃에서 즉시 냉동시켰다. 오존(O₃) 처리의 경우, 포트에 있는 유식물은 훈증 챔버로 옮겨서 0.2ppm O₃으로 처리하였다. 대조군 식물은 여과하고 대기 중에서 방치시켰다. 오존은 제조하여 사용하였으며, ML9810 O₃ 분석기 (Lear Siegler Measurement Controls, USA)로 농도를 모니터링하였다.

<61> 7. 정량적인 역전사효소(RT)-PCR

<62> 전체 RNA는 QIAGEN Rneasy Plant Mini 키트 (QIAGEN, Maryland, USA)를 이용하여 벼 조직으로부터 분리하였다. 전체 RNA 시료는 시료에 포함된 게놈을 제거하기 위해 RT-PCR을 수행하기 전에 RNase가 없는 DNase (Stratagene, La Jolla, CA, USA)를 처리하였다. 단일 가닥 cDNA는 벼에서 추출한 10μg의 전체 RNA를 가지고 제조처에서 제공한 실험방법에 따라 StartaScript™ RT-PCR 키트 (Stratagene, USA)를 사용하여 50μl 반응 혼합물로 제조하였다. 50μl 반응 혼합물은 상기 단일가닥 cDNA 1.0μl, 200mM dNTPs, 다음 각각의 특이적 프라이머 세트 [*OsMSRPK1* 특이적 프라이머 (5'-AGCAAGGAGCACTACCACCACC-3'(서열번호 3) 및 5'-TCCAGACTCAGGGCTTGTAACC-3'(서열번호 4))] 10 pmol과 0.5U taq 중합효소 (TaKaRa Ex Taq Hot Start Version, TaKaRa Shuzo Co. Ltd., Shiga, Japan)를 포함하고 있다. 증폭 사이클 파라미터는 먼저 97℃에서 5분간 전처리하여 변성시킨 후, 95℃에서 45초, 55℃에서 45초, 72℃에서 1분으로 이 사이클을 30회 반복하여 증폭시킨다. 마지막 사이클이 끝날 때 연장 단계로 72℃에서 10분간 추가적으로 더 증폭시켰다 (TaKaRa PCR Thermal Cycle Dice, Model TP600, Tokyo, Japan). PCR이 완료된 후, 전체 반응 혼합물에 10X 로딩 완충용액 2.0μl을 가하여 강하게 섞어주고, 이 용액 10μl을 취하여 1.6% 아가로스 겔 (Agarose ME, Cat. No. 50013 R, Iwai Chemicals, Tokyo, Japan)에 흡착시키고, 1X TAE 완충용액이 들어있는 Mupid-ex 전기영동장치(ADVANCE, Tokyo, Japan)를 이용하여 100V에서 30분간 전기영동을 실시하였다. 겔은 1X TAE 완충용액 100 ml속에 에티디움 브로마이드(50 mg/ml) 20μl가 포함된 용액으로 10분간 착색시킨 다음, 여분의 에티디움 브로마이드 용액을 씻어주고 UV-트랜스일루미네이터 (ATTO, Tokyo, Japan)를 이용하여 착색된 밴드를 관찰하였다. 각각 밴드의 세기(면적)은 ATTO lane과 spot 분석기로 정량하였다 (ATTO, Japan). RT-PCR 대조군은 특이적 벼 액틴 유전자 프라이머 세트 (5'-TCCATCTGGCATCTCTCAG-3'(서열번호 5) 및 5'-GTACCCGCATCAGGCATCTG-3'(서열번호 6))를 사용하여 상대적인 면적으로부터 밴드의 값을 정량하였다.

<63> 8. 벡터 구축물의 설계

<64> *OsMSRPK1* 유전자가 과발현된 벡터를 설계하기 위해, 유전자는 올리고머 (5'-TCT AGACACTTGGCTTCTCTCTCTCTC-3'(서열번호 7) 및 5'-GGATCCATAGGCCAGATCATGCAGGTGGG-3'(서열번호 8))를 이용하여 증폭시키고 pBluescript SK⁻ 벡터로 서브 클론하였다. pBluescript SK⁻ 벡터에 포함된 *OsMSRPK1* cDNA (2079 bp)의 ORF는 절단효소 *XbaI* 및 *BamHI*로 절단하고, pCambia1300 이중 벡터의 멀티클로닝 부분인 *XbaI* 및 *BamHI*에 꽃 양배추 모자이크 바이러스 (CaMV) 35S 프로모터의 하부를 삽입하였다. *OsMSRPK1* cDNA의 ORF가 완성되면 순간적인 위치 분석을 위해 pK7WGF2 벡터 (VIB, Belgium)를 서브 클론하였다. cDNA는 Gateway DNA 제조합 시스템 (Invitrogen, USA)을 이용하여 서열을 완성하였다. *OsMSRPK1* 유전자의 전체 ORF는 두 단계 PCR 증폭과정에서 부합되는 attB 서열을 가지고 있는 PCR 프라이머로 증폭하였다. 첫 단계 증폭에서 사용된 PCR 프라이머는 5'-AAAAAGCAGGCTCCCGAGTAAGAAGAGGAAGCAATC-3'(서열번호 9) 및 5'-AGAAAGCTGGGTGAGTTATACACCAGCACCTCTCC-3'(서열

번호 10) (attB 서열은 굵은체로 나타내었다)이다. 얻어진 PCR 산물은 두 번째 PCR 반응을 위한 주형으로 첫 번째 PCR 산물 DNAs에 attB 서열을 추가하여 증폭시켰다 (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'(서열번호 11) 및 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'(서열번호 12)) 새롭게 추가된 attB 서열은 밑줄로 나타내었고, 기존에 포함된 attB 서열은 굵은체로 표시하였다). *OsMSRPK1* ORF가 포함된 PK7WGF2 벡터는 양과세포에서 위치확인을 위해 사용하였다.

<65> **9. 아그로박테리움으로 *OsMSRPK1* 형질전환**

<66> *OsMSRPK1* 유전자는 동결융해법으로 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*A. tumefaciens*) 균주인 LBA4404에 형질전환시켰다. 적격 세포는 30℃, 5ml LB 액체 배지에서 단일 콜로니를 밤새도록 배양시켜 제조하고, 이 배양액 2 ml에 50 ml LB 액체배지를 첨가하고 세포의 밀도가 OD₆₀₀ = 0.4~0.6일 때까지 밤새도록 배양하였다. 배양액은 4℃, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하고, 얼음 속에서 20mM CaCl₂ 용액 1 ml를 가하여 재현탁하였다. 2 μl DNA와 100 μl LBA4404 적격 세포를 합하고, 1분 동안 액체질소로 냉동시킨 후, 37℃ 항온조에서 5분간 배양시켰다. 이 용액에 1 ml LB 액체배지를 가하고, 진탕 배양기에서 30℃ 온도조건으로 2~4 시간 동안 배양시켰다. 배양액을 5,000rpm에서 5분간 원심분리하여 침전된 세포를 모아 LB 카나마이신과 스펙티노마이신을 살포하고, 30℃에서 2일간 배양하였다.

<67> **10. 아그로박테리움을 이용한 캘러스 형질전환**

<68> Nipponebare (자포니카형)에서 *OsMSRPK1* 유전자의 과발현 이중벡터를 설계하기 위해 아그로박테리움 튜머파시엔스 균주 LBA4404을 사용하여 표준실험방법 (Hiei Y et al., (1994) Plant J. 6(2):271-282)을 약간 변형시켜 형질전환시켰다. 형질전환된 캘러스는 *in vitro*에서 배양하는 동안 하이그로마이신 수준이 점점 증가되어지는 선택 배지 [(2N6 배지 (1L), 하이그로마이신 (10mg/L) 및/또는 포스포노트리신 (PPT, 3 mg/L), 세포탁심 (250 mg/L))에서 선발하였다.

<69> 선발된 캘러스는 재생 배지로 [MS 4.3g, MS 비타민 (10% 이노시톨, 0.05% 니코틴산, 0.05% 염산피리독신, 0.1% 염산티아민) 1 ml, 3% 수크로스, 3% 소르비톨, 0.2% 카사미노산, 1.1% MES, pH5.8, 0.4% 젤란 겔을 오토클레이브한 후에, NAA (2 mg/L), 키네티 (1 mg/L), 세포탁심 (250 mg/L), 하이그로마이신(30 mg/L)을 첨가] 옮겼다. 형질전환되어 선발된 캘러스를 shooting 및 rooting한 다음 유식물을 물에서 3-4일간 순응시킨 후, 비닐하우스 내에 있는 토양에서 성장시켰다.

<70> T₁ 라인의 종자는 하이그로마이신 저항성으로 분석하고 하이그로마이신 저항성을 가진 유식물은 기능 분석과 T₂ 동종접합체 선발을 위해 사용하였다.

<71> **11. 입자 충격 분석**

<72> GFP 융합 단백질은 CaMV 35S 프로모터 내에 있는 GFP C, N-말단을 가진 전체 길이의 *OsMSRPK1* 유전자를 가지고 구축하였다. N-말단기 융합부분은 프라이머 (5'-AAAAAGCAGGCTGGGGAGCGATTCATG-3'(서열번호 13) 및 5'-AGAAAGCTGGGTTCTTTTGGCTAA-3'(서열번호 14))로 설계하고, 이 프라이머를 이용하여 증폭하였다. 다음으로 두 번째 PCR 산물은 attB1,2 프라이머 (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'(서열번호 15) 및 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'(서열번호 16))를 이용하여 증폭하였다. 증폭시킨 다음 생성된 PCR 산물은 pDONR 벡터 (invitrogen, gateway vector)로 서브 클론하고, pK7WGF2 (invitrogen, gateway vector) 벡터로 다시 해독하였다. C-말단기 융합부분은 Cambia::GFP 카세트 이중벡터의 MCS에 있는 *XbaI*, *BamHI* 부분을 이용하여 *OsMSRPK1* 유전자의 ORF (open reading frame)를 클론하였다.

<73> 일시적인 위치 확인 분석을 위해, Pro35S::GFP::*OsMSRPK1* 구축물 DNA는 Qiagen 플라스미드 미니프랩 키트 (Qiagen, USA)를 이용하여 플라스미드로 정제하였다. 플라스미드 DNA는 텅스텐 입자와 혼합하고, Pro35S::GFP::*OsMSRPK1* 구축물 플라스미드로 덮힌 입자들은 입자 충격에 의해 양과세포에 형질전환시켰다. 양과 샘플은 페트리 플레이트에서 MS배지로 교체하였다. 표피세포에서 발현된 GFP 영상은 GFP-최적화된 ND 필터세트 (Olympus, Japan)를 이용한 형광현미경을 사용하여 확인하였다. 분석조건은 밝은 빛, GFP 필터 (여기; 450 500nm, 분할기; FT510nm, 여기; BP515-565nm), DAPI 필터 및 FITC 필터 (여기; 450 490nm, 분할기; FT510nm, 방출; LP515nm) 조건으로 실시하였다. 디지털 영상은 I.CAMSCOPE 디지털 카메라 (Sometech, Korea) 와 소프트웨어 (MicroFire, USA)가 장착된 올림푸스 IX 70 형광현미경 (Olympus)을 이용하여 측정하였다.

<74> **12. Gus 염색 분석**

<75> *OsMSRPK1* 프로모터 분석을 위해, 본 발명에서는 벼 게놈 서열 분석을 이용하여 GUS 리포트 유전자를 가진 pBI101 벡터로부터 *OsMSRPK1* 유전자의 2.1kb 프로모터 DNA 서열을 설계하였다 (도 10A 참조). 클로닝 후, T_3 애기장대 형질전환 동질 접합체를 이용하여 Gus 염색을 수행하였다. 10일 후 염록체를 제거하기 위해 30분 동안 유식물에 차가운 아세톤을 가한 다음 5분 동안 증류수에 방치하였다. 형질전환 식물체의 Gus 활성은 GUS 조직학적 완충 용액인 100mM NaPO₄ (pH7.0), 0.5mMK₃ [Fe(CN₆)], 10mM EDTA, 0.5mM K₄[Fe(CN₆)], 0.5 mg/ml X-glu, 0.1% 트리톤X-100 및 전체 부피의 1/5 메탄올을 가하여 배양함으로써 측정하였다. 식물 조직은 37℃에서 24시간 동안 배양시켰다. Gus 염색 후, 세척용 완충용액 (20% 메탄올, 0.24N 염산)을 시료에 가하고, 60℃에서 40분 동안 방치하였다. 실온, 60% 에탄올 (0.7% NaOH가 첨가됨) 완충 용액 속에서 시료를 20분간 배양한 다음 시료를 세척하기 위해 40%, 20% 에탄올을 가하였다. 시료는 1시간 이상 50% 글리세롤 용액에서 방치하였다. Gus 활성은 Ziess 영상 현미경 2.0 (Japan)을 사용하여 측정하였다.

<76> **실시예 1: *OsMSRPK1* 유전자의 특성 및 기능적 분석**

<77> Nipponbare (*Oryza sativa* L. japonica-type)에서 첫 번째로 발견된 MAPKKs군인 *OsEDR1* 유전자는 다양한 외부의 생물적, 비 생물적 스트레스에 대해서 초기에 매우 빠르게 반응하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명에서는 벼 유전체지원센터 (RGRC)로부터 72개의 중요한 시그널링 후보 클론을 제공받아 식물의 방어/스트레스 시그널 전사경로에 관여하는 유전자를 결정하기 위해 72개의 시그널 전사와 관련된 클론을 가지고 역상 노던 혼성화 (reverse northern hybridization)를 수행하였다.

<78> 야생형 벼 및 형질전환된 벼 식물로부터 mRNA를 추출한 다음 합성된 프로브인 전체 cDNA를 사용하여 새로운 PKs를 선택, 확인하였다 (도 1 참조). 그것의 발현된 프로파일을 기초로 하여 본 발명에서는 이 유전자를 오리자 사티바 다중 스트레스 반응성 단백질 인산화효소 (*Oryza sativa* multiple stress-response protein kinases)를 의미하는 *OsMSRPK1* 유전자로 명명하였다.

<79> *OsMSRPK1* cDNA는 3116bp 길이로 2097 뉴클레오타이드의 ORF (open reading frame)을 포함하는 693개의 아미노산 폴리펩티드로 구성되어 있었다. *OsMSRPK1* 유전자의 아미노산 서열은 벼 OsCDC2a 및 OsCDC2b와 각각 49%, 47% 동일성을 가지고 있었다. 이 유전자의 아미노산 서열 정렬은 세린/트레오닌 인산화효소 도메인을 가지는 CDK1 (CDC2)와 구별되어 나타났다. 비록 *OsMSRPK1* 유전자가 MAPK 유사 유전자 그룹이지만, *OsMSRPK1* 도메인 분석에서 CDK1 (CDC2)군과 PK 군으로 분류되는 것을 입증하였다. CDKs는 PSTAIRE 모티프, 촉매성 도메인, T-고리 영역을 포함한 세 개의 특징적인 보존된 영역을 가지고 있으며, 두 개의 타입 (PSTAIRE 그룹, 비-PSTAIRE 그룹)으로 나뉘어져 있다. *OsMSRPK1* 유전자가 비록 CDK 단백질의 세 개의 특징적인 보존 영역을 가지고 있지만, 비-PSTAIRE 그룹 또한 포함하고 있다 (도 2 참조).

<80> 벼 및 다른 식물의 CDK 단백질은 CLUSTALW 프로그램 1.83 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)으로 NCBI 데이터베이스를 이용하여 분석하였다.

<81> *OsMSRPK1* 유전자는 다른 CDK 단백질보다 C-말단기 부분이 더 길고, 이 유전자에 의해 해석된 아미노산 폴리펩티드는 다른 CDKs 군과 45-55% 아미노산 동일성을 보였다 (도 3 참조). 다른 CDC2 (CDK1) 단백질과 *OsMSRPK1*의 계통도를 살펴보면, 벼 OsCDC2L2와 100% 동일성을 가졌으며, 벼 OdCDC2L1과는 68%의 높은 상동성을 보였다. 이것은 식물과 동물 사이에서 약간의 차이를 보였다 (도 4 참조).

<82> **실시예 2: *OsMSRPK1* 유전자의 게놈 서던 분석**

<83> 본 발명에서는 벼 전체 게놈에서 *OSMSRPK1*의 유전자 카피를 찾기 위해 서던 블롯을 실시하였다. 게놈 DNA는 *HindIII*, *EcoRV*, *SacI*, *XbaI*, *EcoRI* 절단효소로 절단하였다. DNA 겔 블롯팅을 이용하여, *OSMSRPK1*이 벼 전체 게놈에서 단일 카피라는 것을 알 수 있었다.

<84> **실시예 3: 다양한 환경 인자에 대한 *OsMSRPK1* 유전자의 시간 경과 분석**

<85> *OsEDR1* 과발현 형질전환된 벼에서 *OsMSRPK1* 유전자의 발현량이 현저하게 상향 조절되었기 때문에, 방어 시그널링에서 이 유전자의 역할은 다양한 환경적 요인(JA, SA, H₂O₂, CT, NaCl, 카드뮴, UV-C 조사, 단백질 인산화효소 저해제, 오존)에 대해 반응하는 것으로 규명되어졌다. 시그널링 분자[JA, SA, H₂O₂, 진균 유인제 (CT)]는 단자엽 및 쌍자엽 식물에서 방어/스트레스 시그널링 감응을 포함한다. RT-PCR은 특이적 벼 액틴 유전자 프라이머 세트 (5'-TCCATCTTGGCATCTCTCAG-3' (서열번호 17) 및 5'-GTAC CCGCATCAGGCATCTG-3' (서열번호 18))를 사용하였다.

<86> 전사적 발현은 내적, 외적 자극에 반응하는 인산화효소에 의해 발현된 30분 후 관찰하였다 (도 6 참조). *OsMSRPK1* 유전자의 전사적 행동은 다양한 스트레스 처리에 따라 발현되는 양상을 정밀하게 분석하기 위해 30-120분 시간프레임으로 실험하였다. 상처 및 JA 처리했을 때, 30분에서 현저하게 발현된 *OsMSRPK1* 유전자는 시간이 경과함에 따라 전사수준이 빠르게 감소되었지만, 반면에 90분이 경과한 후에는 서서히 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. SA 및 과산화수소를 처리한 경우, 30분에서 전사 수준은 축적되었고 120분이 경과했을 때 거의 초기 수준까지 서서히 감소되는 것을 확인하였다. NaCl 및 한발 스트레스에 노출될 경우, mRNA 수준은 30분에서 현저하게 증가하였고, 90분이 경과할 때까지 거의 변화가 없었다. UV-C 처리에 따른 전사 수준은 60분이 경과했을 때 약간의 증가를 보였지만, 시간이 경과함에 따라 변화가 거의 없었으며 CHX (진핵 세포 단백질 합성 저해제)를 처리한 경우는 30분일 때 현저하게 증가되어 시간이 경과함에 따라 거의 변화가 없음을 확인할 수 있었다 (도 6 참조). 이러한 다양한 스트레스에 따른 전사수준의 차이는 *OsMSRPK1* 유전자가 양성(positive) 조절자로서 방어시스템에 관여한다는 것을 나타낸다.

<87> **실시예 4: *OsMSRPK1*의 발생 단계 및 조직 특이적 발현 패턴**

<88> Nipponbare (*Oryza sativa* L. 자포니카형) 벼에서 *OsMSRPK1* 유전자의 작용을 알아보기 위해, *OsMSRPK1*의 발달 단계별 조절 패턴을 RT-PCR을 이용하여 성숙기의 다른 단계에서 이삭뿐만 아니라 잎, 엽초, 뿌리에서 분석하였다. 각각 기관별 특이성을 피하기 위해 같은 단계의 각각 5개의 라인으로 RT-PCR을 수행하였다.

<89> 뿌리를 제외한 벼의 전 생육기간과 모든 기관에서 발현이 확인되었으나, 발현 양에서 차이가 있었다 (도 8 참조). 과종 후 90일 지난 서로 다른 다섯 개의 성장단계별 잎과 줄기를 가지고 RT-PCR을 실시한 결과 잎과 줄기 모두 바깥쪽보다는 안쪽에서 전사 수준이 높았다. 이삭의 경우 이삭돌출 직전, 이삭 돌출 직후, 개화시작, 개화만발, 종자 약간 익음, 종자 완전히 익음의 6가지 단계로 나누어 실시하였다 (도 7 참조). 그 결과 이삭 돌출 직전에 약간의 발현이 관찰되었으며 개화 시작까지 발현 정도가 급격히 증가하다가 개화 만발을 기점으로 급격하게 감소하여 종자가 익기 시작하면 발현되는 것을 관찰할 수 없었다. 이러한 결과는 *OsMSRPK1* 유전자가 식물체가 완전히 성장한 성체보다는 성장하기 전인 어릴 때 방어 기작과 발달에 있어서 보다 중요한 역할을 한다는 것을 입증해준다.

<90> **실시예 5: 세포 내에서 *OsMSRPK1* 유전자의 위치**

<91> *OsMSRPK1*GFP 융합 단백질의 위치를 확인하기 위해, 본 발명에서는 두 개의 구축물 (*OsMSRPK1::GFP*, *GFP::OsMSRPK1*)을 사용하였다 (도 9A 참조). 입자 충격을 이용한 양과 표피세포에서 *OsMSRPK1::GFP*는 *GFP::OsMSRPK1*보다 강한 형광을 띠고 감지되었다. *OsMSRPK1::GFP* 구축물은 주로 핵에 위치하고 있었으며, GFP 벡터는 핵과 세포질에 모두 위치하고 있었다 (도 9B 참조).

<92> *OsMSRPK1* 유전자의 아미노산 서열 분석을 실시한 결과는 [Psort version 6.4 (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>)]에서 확인할 수 있다. *OsMSRPK1* 유전자는 236-240번째 아미노산에서 PAKKKA 핵으로 위치하고 있는 시그널을 가지고 있었다. 이러한 결과는 *OsMSRPK1* 유전자는 핵으로 위치한 다음 성장인자 및 외부 스트레스에 대하여 유전자를 발현시키는 역할을 한다는 것을 나타낸다.

<93> **실시예 6: 형질전환 벼를 이용한 기능적 분석**

<94> *OsMSRPK1* 유전자의 기능적 분석을 위해 본 발명에서는 두 개의 형질전환 라인 (과발현 및 유전자 발현억제 구축물)을 제작하였다. 본 발명자들은 10개의 과발현 형질전환 라인 (T_2 종자)을 보유하고 있으며 T_3 세대를 제조하고 있다. 기능적 분석 결과, 야생형과 비교했을 때 외관상 큰 차이는 관찰되지 않았다. 그래서 본 발명에서는 RT-PCR을 이용하여 *OsMSRPK1* mRNA 수준에서 차이를 확인하였다.

<95> RT-PCR을 이용하여 *OsMSRPK1* 과발현된 형질전환 라인을 분석한 결과, 각 개체마다 다른 mRNA 수준으로 발현되었다. 증가된 mRNA 발현 양과 동일하게 병 저항성 관련 유전자인 *PBZ1* mRNA 수준도 증가되는 것을 관찰할 수 있었다 (도 10B 참조). 이러한 결과는 *OsMSRPK1*이 식물에서 방어기작 뿐만 아니라 발달단계에도 관여한다는 것을 의미한다.

<96> **실시예 7: 이중 시스템을 이용한 *OsMSRPK1* 프로모터 분석**

<97> 본 발명에서는 프로모터 분석 프로그램을 이용하여 *OsMSRPK1* (2.1kb DNA 서열) 유전자의 프로모터 분석을 실시한 후(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>), 네 개의 구축물을 설계하였다 (도 11A, B 참조). 애기장대를 이용한 *OsMSRPK1* 프로모터 분석에서 GUS-활성은 주근, 측면뿌리, 주근 정단에서는 없었지만, 떡잎과 첫 번째 잎에서 다소 활성을 가지는 것을 관찰할 수 있었다. 묘조-하배측 부분에서는 상대적으로 조금 더 강한

GUS-활성을 보였다. 한편, 다양한 호르몬에 의한 *OsMSRPK1*의 반응성을 알아보기 위해 *OsMSRPK1* 프로모터 (2.1kb)::GUS 구축물을 포함한 10일된 애기장대 식물체에 다양한 호르몬 (IAA: 10uM, ETP: 200uM, JA; 25uM, SA: 25uM, GA: 10uM, ABA: 50uM, PBZ: 125uM)을 처리하였다. 호르몬을 처리한 다음, GUS-활성을 Ziess 이미지 2.0 (Japan) 현미경으로 관찰한 결과, JA, SA, GA, ABA 및 PBZ를 처리했을 때는 호르몬을 처리하지 않은 대조구보다 강하게 Gus-활성을 보였지만, IAA 및 ETP에서는 대조구와 비슷한 양상을 보였다 (도 12 참조).

발명의 효과

<98> 본 발명에서 분리된 *OsMSRPK1* 유전자 및 상기 유전자로부터 발현되는 *OsMSRPK1* 단백질은 어린 식물의 발생 또는 분화를 촉진할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 Dot-blot 혼성화를 이용하여 mRNA 수준이 상향 조절되는 것으로부터 *OsMSRPK1* 유전자를 동정한 것이다. 이 분석은 72개의 추정 단백질 인산화효소, 야생형 벼 (*japonicarice* cv. Nipponbare (NPB)의 전체 cDNA 프로브, *OsEDR1*이 과발현된 형질전환 벼를 이용하여 실시하였다. A: *OsPR1a* 유전자, B: *OsEDR1*-과발현된 라인에서 *OsMSRPK1*.
- <2> 도 2는 벼 CDC2와 *OsMSRPK1* 유전자의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 일치하는 아미노산은 별표(*)로 나타낸 것이고, 유사한 것은 콜론(:)으로 표시하였다. *OsMSRPK1* 유전자의 세 개의 보존된 도메인과 벼의 *CDK1* (*CDC2*) 단백질을 각각 I: PSTAIRE 모티프, II: 촉매성 도메인, III: T-고리 영역으로 나타내었다. 보존된 인산화부분은 화살표로 표시하였다.
- <3> 도 3은 *OsMSRPK1* 유전자 및 다른 CDC2 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이다. 별표 (*)로 표시한 부분은 정확하게 보존된 아미노산 잔기, 아미노산 유사성 (·, :)은 CLUSTAL-W 규정에 근거한 것이다.
- <4> 도 4는 *OsMSRPK1* 유전자와 다른 CDC2 (*CDK1*) 단백질의 계통도를 나타낸 것으로, 계통도는 CLUSTALW 1.83 (CLUSTALW: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>)를 사용하여 설계하였다.
- <5> 도 5는 *OsMSRPK1* 유전자의 게놈 서던 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다. 잎으로부터 추출한 게놈 DNA (1 μ g)을 *HindIII*, *EcoRI*, *SacI*, *XbaI*, *EcoRI* 로 절단하고 0.8% (w/v) 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하여 분리한 다음, 나일론 막 (Hybond-N+, Amersham)에서 분석하였다. 막은 높은 스트린전시 조건으로 [α -³²P]dCTP 표지된 *OsMSRPK1* cDNA 프로브로 혼성화하였다. M으로 표시한 것은 분자량 마커를 나타낸다 (*HindIII* 효소로 절단된 λ DNA)
- <6> 도 6은 다양한 환경 스트레스에 대하여 시간이 경과함에 따른 *OsMSRPK1* 유전자의 발현을 분석한 결과이다. 잎 단편은 JA, SA, Cd을 각각 100 μ M, 10mM CHX, 0.1% CT, 1M OA, 10mM H₂O₂ 및 150mM NaCl을 처리하였다. 각각의 처리 후 잎 단편은 페트리 디쉬에서 건조처리하고, 자외선 (UVC 254nm)을 15 cm 거리에서 조사시켰다. 잎과 잎 단편은 시간별로 샘플을 채취하고 전체 RNA는 RT-PCR을 실시하여 cDNA를 합성하기 위해 추출하였다. 밴드 세기는 NIH 이미지 프로그램으로 분석한 것으로 벼 액틴의 밴드 세기와 비교해서 나타낸 것이다.
- <7> 도 7은 야생형 벼(Nipponbare, 자포니카형)의 조직과 특이적인 발달 단계를 나타내는 그림으로, (I). 뿌리: A) 어린 뿌리: 파종 후 10일 경과, B) 성체 뿌리: 파종 후 90일 경과 (II). 엽초: 파종 후 90일 경과, A) 가장 안쪽의 기관 (어린 단계), E) 가장 바깥쪽 기관 (완전히 성장한 단계), III). 곡물의 이삭 A) 이삭 돌출 직전, B) 돌출 시기, C) 개화시작 시기, D) 완전히 개화된 시기, E) 초기 입자성장 시기, F) 완전히 입자 성장된 시기를 나타낸다.
- <8> 도 8은 벼 식물의 조직과 발달 단계에서 *OsMSRPK1* 유전자의 발현패턴을 나타낸 것으로, 조직 특이적인 발현양상을 확인하기 위해 *OsMSRPK1* 유전자 특이적 프라이머를 가지고 RT-PCR을 실시하였다. 액틴은 조직 비특이적인 유전자 발현 마커이다. I). 뿌리: a) 어린 뿌리: 파종 후 10일 경과, b) 성체 뿌리: 파종 후 90일 경과 II). 엽초: 파종 후 90일 경과, a) 가장 안쪽의 기관 (어린 단계), e) 가장 바깥쪽 기관 (완전히 성장한 단계), III). 곡물의 이삭 a) 돌출 직전 b) 돌출 시기 c) 개화 시작 시기 d) 완전히 개화한 시기 e) 초기 입자성장 시기 f) 완전히 입자 성장된 시기를 나타낸다.
- <9> 도 9는 세포내 위치확인을 위해 실시한 *OsMSRPK1::GFP* 분석으로 핵에서 형광을 관찰할 수 있었다. (A) *OsMSRPK1::GFP* 융합단백질의 설계도. (B) GFP-태깅된 *OsMSRPK1* 융합 구축물은 입자분사방법에 의해 양과 세포에

도입하였다. 양파세포는 25℃에서 24시간 동안 배양하고 형광현미경을 이용하여 발현을 관찰하였다.

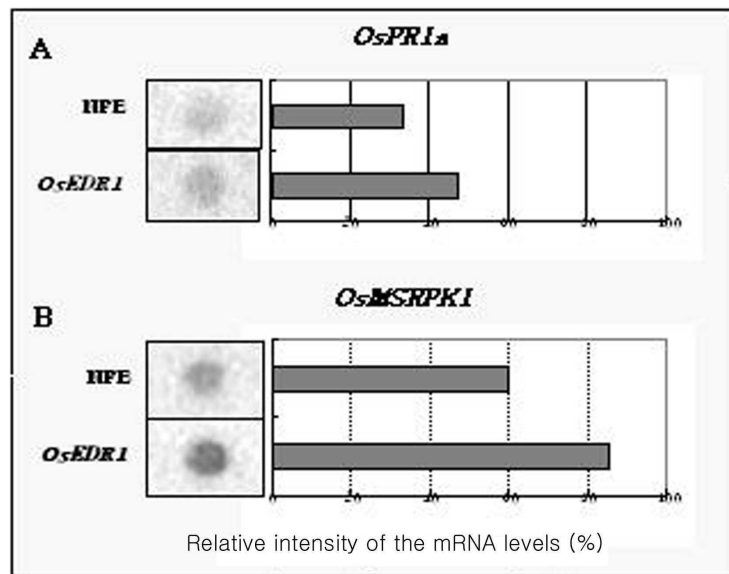
<10> 도 10은 *OsMSRPK1* 유전자가 과발현된 형질전환 벼에서 방어/발달에 관여하는 다른 유전자의 발현을 분석한 결과를 나타낸 것이다. (A) 과발현 구축물은 *OsMSRPK1* 전체 ORF가 삽입된 pCamLA 벡터를 이용하여 만들었다. (B) 전체 RNA는 형질전환된 식물로부터 추출하였다. RT-PCR은 조직 비특이적인 유전자 발현을 위해 프라이머 세트 [*PBZ1* (프로베나졸 유도성 유전자), *JA myb* (자스몬산 유도성 유전자), *OsBZ8* (ABA 유도성 유전자) 및 *actin1*]를 가지고 실시하였다. CON; 형질 전환되지 않은 대조구 식물, R1, R2, R3, R4, 및 R5; *OsMSRPK1*이 발현된 각각의 형질전환 벼 식물라인.

<11> 도 11은 *OsMSRPK1* 프로모터 및 *OsMSRPK1* 프로모터::GUS 구축물의 분석을 나타낸 것으로, (A) 시그널스캔 프로그램을 이용한 *OsMSRPK1* 프로모터 분석 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan>), ① Myc 전사인자 ② Myb 전사인자 ③ 화분 특이적 cis 조절 원소, ④ 벼 WRKY71 (W-box) 결합부분 ⑤ 지베렐린 (GA) 반응 복합체의 중요한 원소.

<12> 도 12는 GUS 단백질을 이용한 *OsMSRPK1* 유전자 조절 패턴 및 다양한 호르몬 처리에 따른 GUS 축적의 변화를 나타낸 것으로, *OsMSRPK1* 프로모터 (2.1kb)::GUS 구축물을 가진 애기장대의 파종 후 10일 식물을 가지고 다양한 호르몬 처리 (IAA: 10uM, ETP: 200uM, JA: 25uM, SA: 25uM, GA: 10uM, ABA: 50uM, PBZ: 125uM)을 처리하였다. A; 떡잎, B; 첫 번째 잎 C; 묘조-하배축(shoot-hypocotyl) 접합부분 D: 접합 부분 E; 결뿌리, F; 주근 정단.

도면

도면1



도면2

```

OscDC2a -----MEQYEKEEKIGEGTY 15
OscDC2b -----MEQYEKEEKIGEGTY 15
OscSRPK1 EAADDDYPAGHLSDSDFEGEDCRSEIPECTRSPPRCINMLQGCRSVDEFEERLNTINEGTY 360
          |
          |
OscDC2a GVVVYRKRRHTNETIALKKIRLEQDEGVFSTAIRISLLKEHHGNIVRLQDVVHS--E 73
OscDC2b GVVVYRKRRHTNETIALKKIRLEQDEGVFSTAIRISLLKEHHGNIVRLQDVVHS--E 73
OscSRPK1 GVVVYRKRRHTNETIALKKIRLEQDEGVFSTAIRISLLKEHHGNIVRLQDVVHS--E 73
          |
          |
OscDC2a KRIYLVFEYLDLDLKKHMDSCPEFAKNPTLIKSYLYQLRGVAYCHSHRVILHRDLKPCNL 133
OscDC2b KRIYLVFEYLDLDLKKHMDSCPEFAKNPTLIKSYLYQLRGVAYCHSHRVILHRDLKPCNL 132
OscSRPK1 RDIFHVMYMEHDLKGVMEINMOP-QSQSEVCKMLQLLEGVYKLVHNDVILHRDLKPCNL 479
          |
          |
OscDC2a LIDRRNTNALKLADFGGLARAFGIPVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGSRQYSTPVDNWSVGC 193
OscDC2b LIDRRNTNALKLADFGGLARAFGIPVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGSRQYSTPVDNWSVGC 192
OscSRPK1 LLNRRG-ELKICDFGLSRQYGSPLKPYTQLVTLWYRAPEILLGAKDYSTADNWSVGC 538
          |
          |
OscDC2a FAEMVYKQPLFPDSEIDELFKIFRVLGTPNEQSWPGVSSLPDYKSAFFPKWQAQDLATV 253
OscDC2b FAEMVYKQPLFPDSEIDELFKIFRVLGTPNEQSWPGVSSLPDYKSAFFPKWQAQDLATV 252
OscSRPK1 MCELLSKGFLFNGKSEIDQLDKIFRTILGTPDENIWPFGYKSLPGATVKEGKOTHNRLDKF 598
          |
          |
OscDC2a -----PTLDPSGLDLISKMLRDPKRNARAALHEHYFKDLEVA----- 294
OscDC2b -----PTLDPSGLDLISKMLRDPKRNARAALHEHYFKDLEVA----- 292
OscSRPK1 RAVSFTGGPMLSEAGFDLLNRLTYDPEKRISAEDALNHEWFRELPFRSKDFNFTFPAL 658
          |
          |
OscDC2a -----
OscDC2b -----
OscSRPK1 NEQDRRFKHKMKSPDPLEEQRMKEQGNNGDRGLFG 693

```

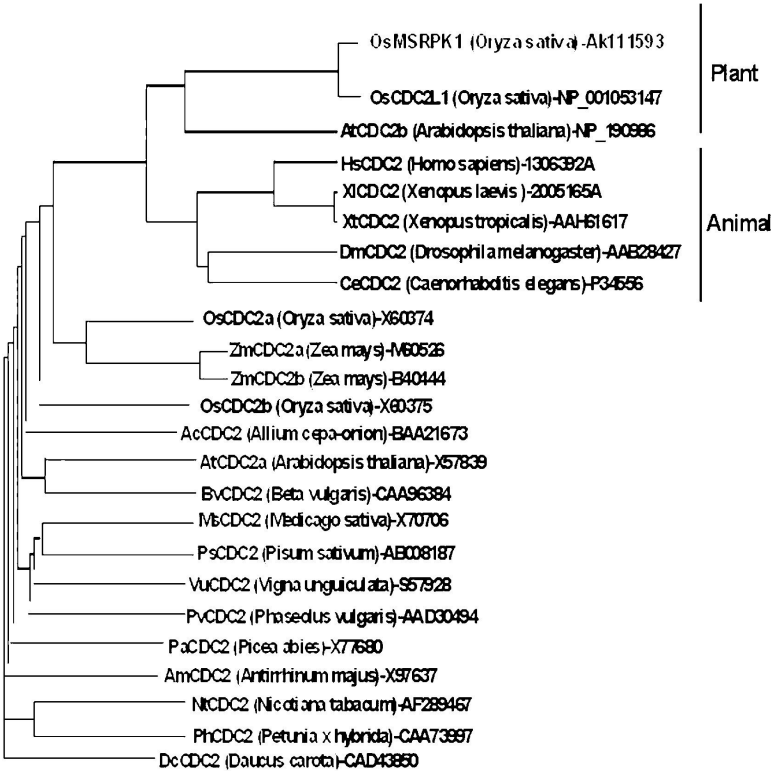
도면3

```

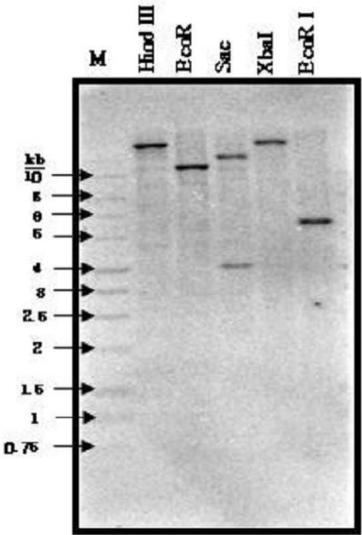
OscDC2b-K60375 -----MEQYEKEEKIGEGTY 14
AtCDC2a-K57839 -----MEQYEKEEKIGEGTY 14
OscDC2a-K60374 -----MEQYEKEEKIGEGTY 14
Zncdc2a-M60526 -----MEQYEKEEKIGEGTY 14
OscSRPK1-AK111593 EAADDDYP-AGHLSDSDFEGEDCRSEIPECTRSPPRCINMLQGCRSVDEFEERLNTINEGTY 359
HsCDC2-NP_277025 EAVSGITPQSSALTEGVDVPSFALSPILKQLKPKYTPALQGCRCVDEFEERLNTINEGTY 218
          |
          |
OscDC2b-K60375 YGVVYRKRRHTNETIALKKIRLEQDEGVFSTAIRISLLKEHHGNIVRLQDVVHS--E 72
AtCDC2a-K57839 YGVVYRKRRHTNETIALKKIRLEQDEGVFSTAIRISLLKEHHGNIVRLQDVVHS--E 72
OscDC2a-K60374 YGVVYRKRRHTNETIALKKIRLEQDEGVFSTAIRISLLKEHHGNIVRLQDVVHS--E 72
Zncdc2a-M60526 YGVVYRKRRHTNETIALKKIRLEQDEGVFSTAIRISLLKEHHGNIVRLQDVVHS--E 72
OscSRPK1-AK111593 YGVVYRKRRHTNETIALKKIRLEQDEGVFSTAIRISLLKEHHGNIVRLQDVVHS--E 72
HsCDC2-NP_277025 YGVVYRKRRHTNETIALKKIRLEQDEGVFSTAIRISLLKEHHGNIVRLQDVVHS--E 72
          |
          |
OscDC2b-K60375 EKKIYLVFEYLDLDLKKHMDSCPEFAKNPTLIKSYLYQLRGVAYCHSHRVILHRDLKPCNL 131
AtCDC2a-K57839 EKKIYLVFEYLDLDLKKHMDSCPEFAKNPTLIKSYLYQLRGVAYCHSHRVILHRDLKPCNL 132
OscDC2a-K60374 EKKIYLVFEYLDLDLKKHMDSCPEFAKNPTLIKSYLYQLRGVAYCHSHRVILHRDLKPCNL 132
Zncdc2a-M60526 EKKIYLVFEYLDLDLKKHMDSCPEFAKNPTLIKSYLYQLRGVAYCHSHRVILHRDLKPCNL 132
OscSRPK1-AK111593 RDIFHVMYMEHDLKGVMEINMOP-QSQSEVCKMLQLLEGVYKLVHNDVILHRDLKPCNL 478
HsCDC2-NP_277025 MDKIYIVMYMEHDLKGVMEINMOP-QSQSEVCKMLQLLEGVYKLVHNDVILHRDLKPCNL 337
          |
          |
OscDC2b-K60375 LIDRRNTNALKLADFGGLARAFGIPVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGSRQYSTPVDNWSVGC 191
AtCDC2a-K57839 LIDRRNTNALKLADFGGLARAFGIPVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGSRQYSTPVDNWSVGC 192
OscDC2a-K60374 LIDRRNTNALKLADFGGLARAFGIPVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGSRQYSTPVDNWSVGC 192
Zncdc2a-M60526 LIDRRNTNALKLADFGGLARAFGIPVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGSRQYSTPVDNWSVGC 192
OscSRPK1-AK111593 LLNRRG-ELKICDFGLSRQYGSPLKPYTQLVTLWYRAPEILLGAKDYSTADNWSVGC 537
HsCDC2-NP_277025 LLNRRG-ELKICDFGLSRQYGSPLKPYTQLVTLWYRAPEILLGAKDYSTADNWSVGC 536
          |
          |
OscDC2b-K60375 IFAMVYKQPLFPDSEIDELFKIFRVLGTPNEQSWPGVSSLPDYKSAFFPKWQAQDLATV 250
AtCDC2a-K57839 IFAMVYKQPLFPDSEIDELFKIFRVLGTPNEQSWPGVSSLPDYKSAFFPKWQAQDLATV 251
OscDC2a-K60374 IFAMVYKQPLFPDSEIDELFKIFRVLGTPNEQSWPGVSSLPDYKSAFFPKWQAQDLATV 251
Zncdc2a-M60526 IFAMVYKQPLFPDSEIDELFKIFRVLGTPNEQSWPGVSSLPDYKSAFFPKWQAQDLATV 251
OscSRPK1-AK111593 MCELLSKGFLFNGKSEIDQLDKIFRTILGTPDENIWPFGYKSLPGATVKEGKOTHNRLDKF 596
HsCDC2-NP_277025 IFGELLTQKPLFPKSGEIDQINKVFKDLGTPSEKIWPFGYSELPAVKMTFSEHPYNNLRK 456
          |
          |
OscDC2b-K60375 -----PTLDPSGLDLISKMLRDPKRNARAALHEHYFKDLEVA----- 292
AtCDC2a-K57839 -----PTLDPSGLDLISKMLRDPKRNARAALHEHYFKDLEVA----- 294
OscDC2a-K60374 -----PTLDPSGLDLISKMLRDPKRNARAALHEHYFKDLEVA----- 294
Zncdc2a-M60526 -----PTLDPSGLDLISKMLRDPKRNARAALHEHYFKDLEVA----- 294
OscSRPK1-AK111593 KRAVSFTGGPMLSEAGFDLLNRLTYDPEKRISAEDALNHEWFRELPFRSKDFNFTFPAL 656
HsCDC2-NP_277025 RFG-----ALLSDQGFLLNKLTYFPGRISAEDALNHEWFRELPFRSKDFNFTFPAL 509
          |
          |
OscDC2b-K60375 -----
AtCDC2a-K57839 -----
OscDC2a-K60374 -----
Zncdc2a-M60526 -----
OscSRPK1-AK111593 ALNEQDRRFK-----KMKSPDPLEEQRMKEQGNNGDRGLFG----- 693
HsCDC2-NP_277025 AKSEQQRVKGTSPPFPEGGLYSGLDLDELKTEGHLTTTNOGASAAAGPGFSLK 565

```

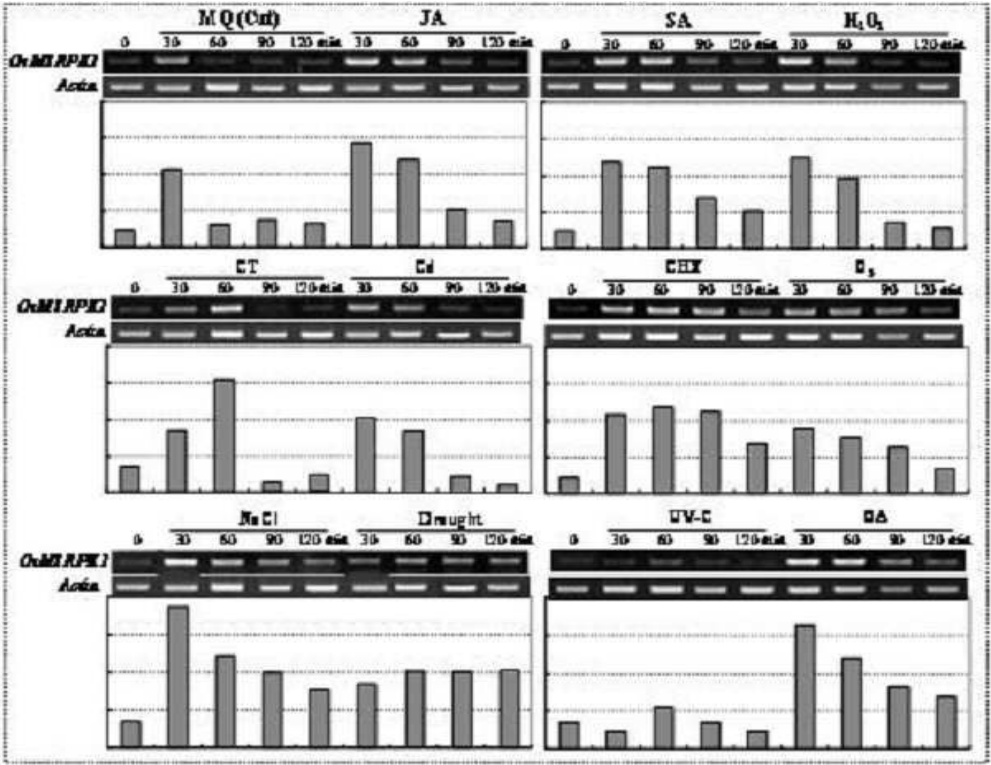
도면4



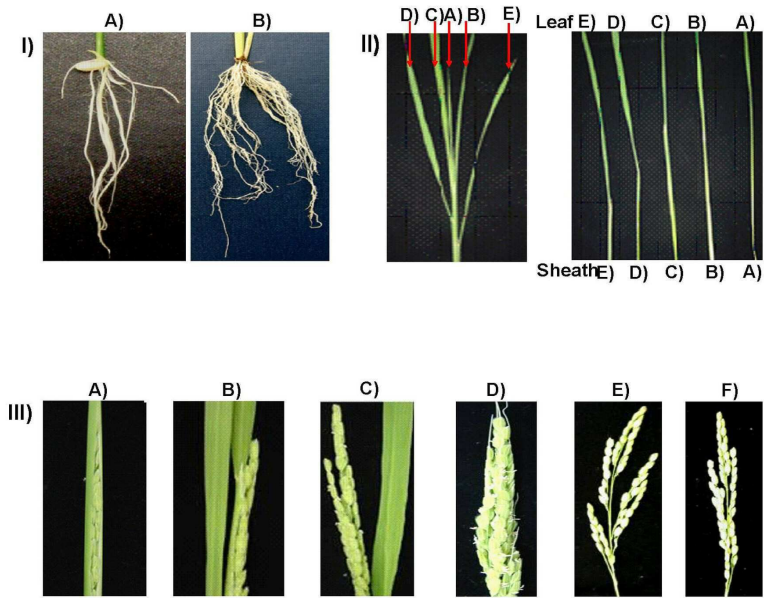
도면5



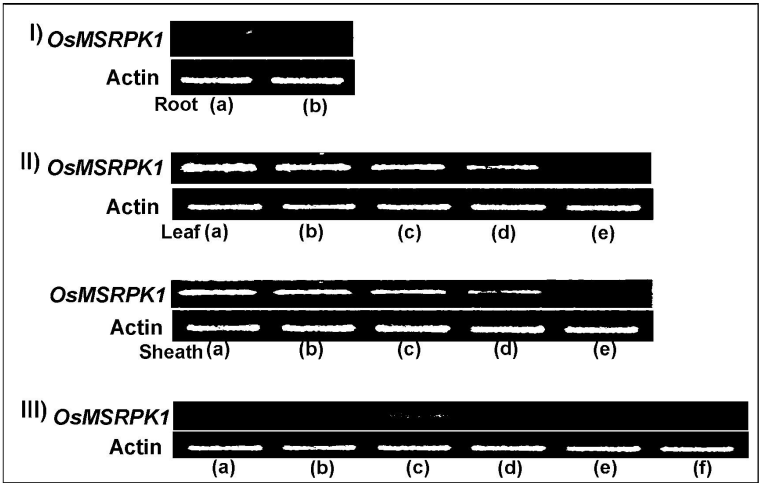
도면6



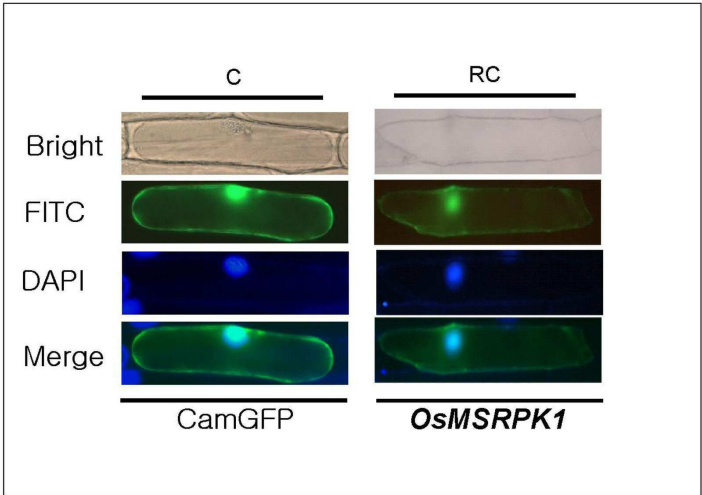
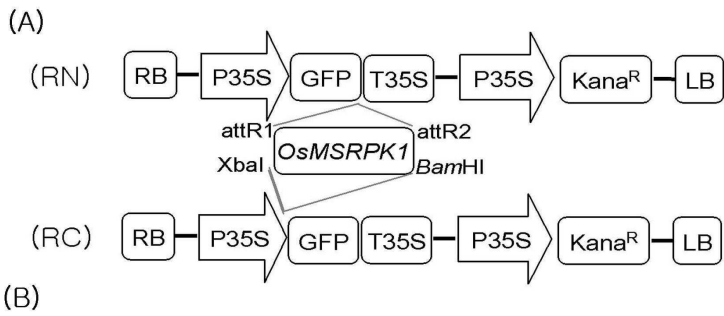
도면7



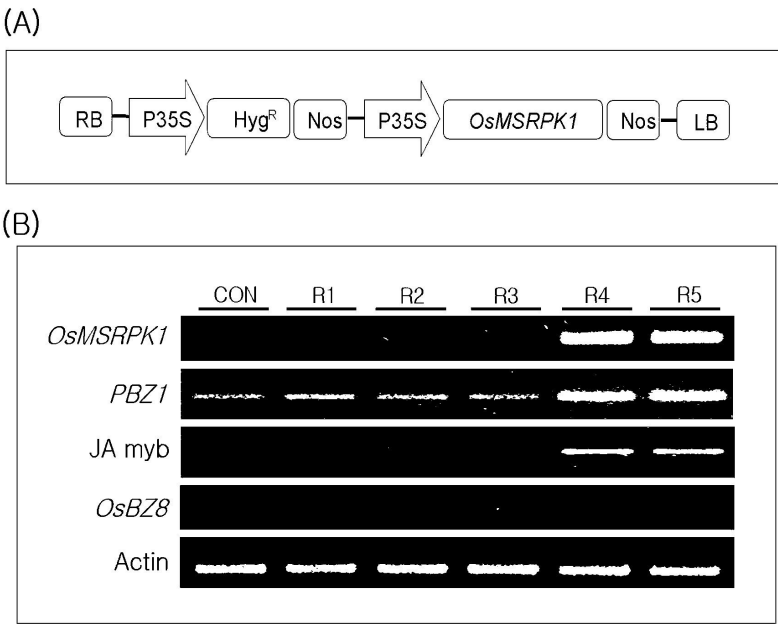
도면8



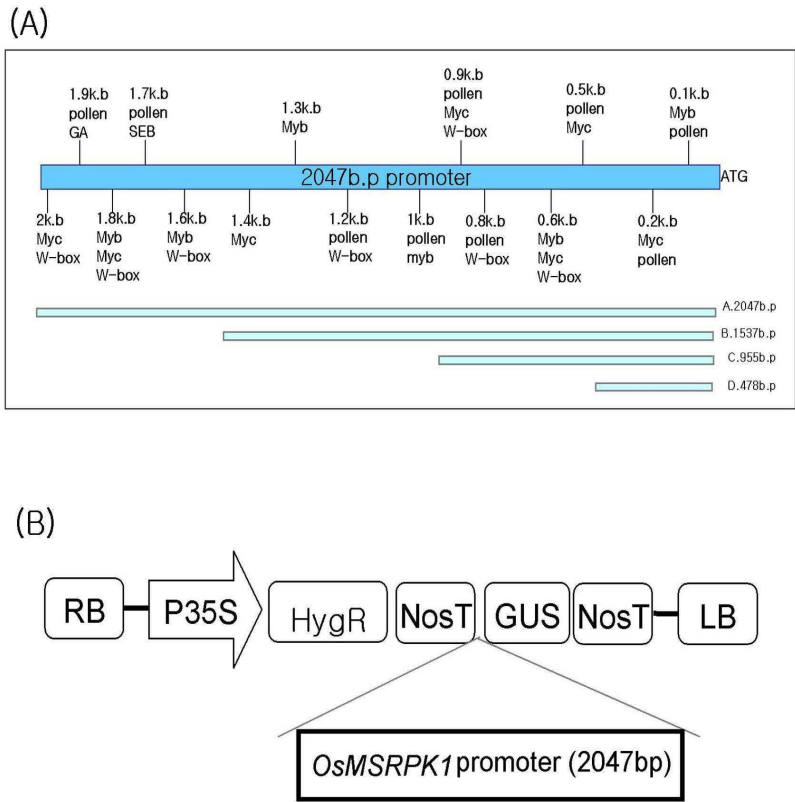
도면9



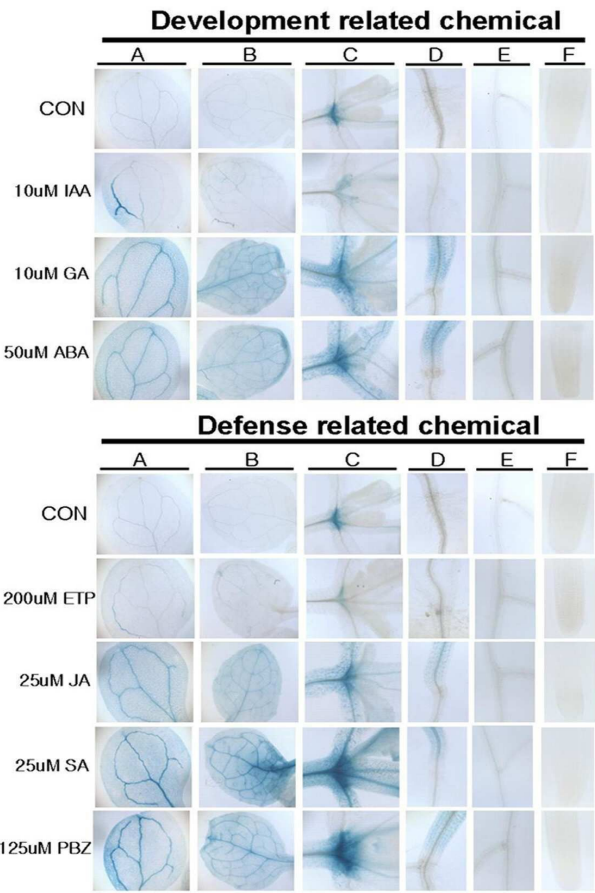
도면10



도면11



도면12



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)