

(11) 공개번호 10-2012-0097671
(43) 공개일자 2012년09월05일

- (71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
- (72) 발명자
이균오
경상남도 진주시 내동로348번길 10, 가좌주공그
린빌 아파트 109동 304호 (가좌동)
- 이상열**
경상남도 진주시 진주대로829번길 21, 삼환나우
빌 101동 1801호 (주약동)
- (74) 대리인
김순웅
(뒷면에 계속)

(54) 발명의 명칭 **벼로부터 유래한 1 시스테인 퍼옥시레독신 프로모터**

대표도 - 도1

[illegible]

(72) 발명자

김돌이

경기도 수원시 장안구 화산로125번길 9, 115동
1504호 (천천동, 천천 푸르지오)

임채오

경상남도 진주시 하대로 142, 102동 1005호 (하대
동, 현대아파트)

김재연

경상남도 진주시 식갑로 45, 들말홍한아파트 102
동 1101호 (평거동)

김제현

경상남도 사천시 사천읍 구암두문로 254-9, 이안
애아파트 104동 1102호

유재용

경상남도 밀양시 하남읍 시서안길 9-8

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	609004-5
부처명	농림수산식품부
연구사업명	농림기술개발사업
연구과제명	고부가가치 단백질 생산용 형질전환 작물 개발 사업단
주관기관	전북대학교
연구기간	2009.04.01 ~ 2014.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	CG3313-1
부처명	교육과학기술부
연구사업명	21C프론티어연구개발사업/작물유전체기능연구사업
연구과제명	레독스 샤페론 유전자를 이용한 유용작물 및 유용 단백질 생산 분자 농업 호스트 개발
주관기관	경상대학교
연구기간	2007.06.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 수도 배아 및 호분층에 특이적인 프로모터

청구항 2

서열번호 2의 염기서열을 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 수도 배아 및 호분층에 특이적인 프로모터

청구항 3

서열번호 3의 염기서열을 갖는 뉴클레오타이드를 포함하는 수도 배아 및 호분층에 특이적인 프로모터

청구항 4

제 1항 내지 3항에 따른 프로모터를 포함하는 재조합 벡터

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 pCAMBIA 1301인것을 특징으로 하는 재조합 벡터

청구항 6

제 4항에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 식물체

청구항 7

서열번호 1 내지 3의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는, 수도 배아 및 호분층에 특이적인 프로모터를 포함하는 재조합 벡터에 외래 유전자를 삽입하는 단계; 및 상기 외래 유전자가 삽입된 재조합 식물 발현 벡터를 벼에 형질전환하는 단계를 포함하는 외래 유전자를 수도 배아 및 호분층에서 발현시키는 방법

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 1 시스테인 퍼옥시레독신 프로모터 핵산 분자, 상기 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터를 이용한 형질전환식물 및 형질전환 식물의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분자 생물학이 발전하면서 유전자의 발현을 조절하는 여러 가지 기작이 밝혀져 왔다. 유전자의 발현이라 함은 세포 내에서 일어나는 전사 (transcription) 및 번역 (translation)을 통해 유전자에 입력되어 있는 코드에 따라 단백질을 합성하는 일련의 과정을 일컫는다. 특히, 전사 과정은 유전자 발현의 초기 단계로서, RNA 중합효소가 여러 보조 인자들의 도움을 받아서 유전자의 상위에 존재하는 프로모터 (promoter) 서열에 결합함으로써 개시가 시작되고, 전사인자 (TF, transcription factor)는 그러한 보조 인자들 가운데 하나로서, 프로모터 서열에 직접 결합하는 것으로 알려져 있다. 진핵생물에서는 대표적으로 TFIIA, TFIIB 및 TFIID와 같은 전사인자가 밝혀졌으며, TATA box 및 E-box와 같은 여러 종류의 프로모터 서열이 알려져 있고, 연구자들에 의해 계속 새로운 전사인자 및 프로모터 서열이 밝혀지고 있다.

[0003] 육종이란 가축이나 작물의 유전학적 형질을 개선하여 이용가치가 높은 새로운 품종을 육성하는 것으로, 단순히 기존 품종의 개량 또는 새 품종의 육성에만 그치는 것이 아니라 새로운 종을 만들어내는 것도 포함된다. 육종 기술은 새로운 품종의 출현에 의한 재배작물의 다양성 획득, 다수확성 또는 저생산비성 품종으로 인한 경제적 이익, 작물재배의 지리적인 한계나 계절적인 한계의 극복, 품질의 개선, 냉해?병해?충해에 대한 저항

성의 향상으로 인한 재배안전성의 증대, 그리고 여러 가지 작물의 조생종?만생종?단간종 등의 새 품종을 육성함으로써 윤작체계의 조절이나 작업의 분배를 할 수 있게 되어 경영의 합리화에 유리하다기 때문에 농업의 발달과 더불어 시작되었으며 특히 19세기 이후에 활발하게 이루어졌다.

[0004] 육종의 방법으로는 도입, 분리, 교잡, 잡종강세, 배수성, 돌연변이 등이 있으며, 최근 분자생물학 기술의 발전에 따라 분자 육종법이 주목을 받고 있다.

[0005] 분자 육종법은 분자생물학적 기법을 이용하여 새로운 형질을 생물에 도입하고 이를 선별하는 방법으로써 종래의 육종법에 비해서 시간 및 비용이 적게 들어 경제적이며, 종래의 육종법으로는 얻을 수 없는 이종 간의 형질 도입이 가능하여 각광을 받고 있다. 이러한 분자 육종을 하기 위해서는 대사 과정에 대한 이해, 유용한 유전자, 이를 발현시킬 수 있는 수단 및 다양한 동식물에 대한 형질전환기법 등의 여러 가지 수단들이 필요하며, 특히 원하는 유전자를 원하는 부위에서 원하는 시기에 발현시키기 위한 다양한 프로모터 및 벡터의 개발의 필요성이 지속적으로 요구되고 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 형질전환 식물의 제조에 이용될 수 있는 새로운 조직 특이적 프로모터를 개발하기 위해 연구를 거듭한 결과, 벼의 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터 영역을 분리하고, 수도 배아, 호분층 및 배아로부터 유래된 배양세포에서 특이적으로 발현된다는 점을 확인하고, 이를 이용하여 형질전환 식물체를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 벼로부터 유래한 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자를 제공하고자 한다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프로모터 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프로모터 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물을 제공하고자 한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 프로모터 핵산 분자를 사용하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 벼로부터 유래한 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자를 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은, 상기 프로모터 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은, 상기 프로모터 핵산 분자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은, 상기 신규 프로모터 핵산 분자를 사용하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 방법을 제공하고자 한다.

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명에서 용어 "프로모터"란 폴리머라제에 대한 결합 부위를 포함하고 프로모터 하위 유전자의 mRNA로의 전사 개시 활성을 가지는, 암호화 영역의 상위 (upstream)의 비해독된 핵산서열, 즉, 폴리머라제가 결합하여 유전자의 전사를 개시하도록 하는 DNA 영역을 말하며, mRNA 전사 개시부위의 5' 부위에 위치한다.

[0017] 구체적인 일 양태로서, 본 발명의 프로모터는 벼로부터 분리한 1 시스테인 퍼록시레독신 유전자의 프로모터에 관한 것이다.

[0018] 본 발명에 있어서, 1 시스테인 퍼록시레독신 유전자는 이미 공개되어 있는 벼 게놈 유전자의 염기서열로부터 그 유전자 정보를 확보할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에서 사용되는 1 시스테인 퍼록시레독신 유전자는 미국

국립보건원 유전자은행 (NIH GenBank)으로부터 단백질들의 유전정보를 확보할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0019] 본 발명의 프로모터 핵산 분자에 포함되는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열은 최근의 여러 가지 연구기법, 예를 들어 방향성 진화법 (directed evolution) 또는 부위특이돌연변이기술 (site-directed mutagenesis) 등의 방법을 통해 일정 정도 변형이 가능하다. 즉, 본 발명의 본 발명의 1 시스템인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자는 상기한 1 시스템인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자와 기능적으로 동일한 작용을 수행하는 이의 작용성 증가물을 포함하는데, 상기 작용성 증가물은 인위적인 변형에 의해 뉴클레오타이드의 일부 염기서열이 결실 (deletion), 치환 (substitution), 삽입 (insertion) 또는 이들의 조합 (combination)에 의해 변형된 변이체 (variants) 또는 동일한 작용을 수행하는 상기 폴리뉴클레오타이드의 작용성 단편 (fragments)을 포함할 수 있다.
- [0020] 본 기술분야의 당업자라면 이러한 인위적인 변형에 의해 70 % 이상의 상동성이 유지되는 염기서열이 본 발명에서 목적하는 유전자 발현을 위한 프로모터 활성을 보유하는 한, 본 발명의 신규한 프로모터와 균등물로서 본 발명의 권리 범위에 속함을 쉽게 이해할 수 있을 것이다.
- [0021] 따라서, 또 다른 구체적인 일 양태로서, 본 발명의 프로모터 핵산 분자는 상기한 뉴클레오타이드 서열과 70 % 이상의 상동성 (homology)을 나타내고 프로모터 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0022] 본 발명에서 사용된 용어 "상동성"은 야생형 (wild type) 핵산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3으로 정의되는 본 발명의 프로모터의 핵산 서열과 바람직하게는 70 % 이상, 보다 바람직하게는 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 가장 바람직하게는 95 % 이상 동일할 수 있는 DNA 서열을 포함한다.
- [0023] 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2 개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율 (%)로 계산할 수 있으며, 상동성 (%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.
- [0024] 또 다른 구체적인 일 양태로서, 본 발명의 프로모터 핵산 분자는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 또는 이들과 70% 이상의 상동성을 나타내고 프로모터 활성을 가지는 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 (complementary) 뉴클레오타이드 서열을 포함하는데, 바람직하게는, 이들은 상기 뉴클레오타이드와 동등한 프로모터 활성을 가지는 것이 좋다.
- [0025] 본 발명에 사용된 용어, "상보적인"은 뉴클레오타이드 또는 핵산, 예를 들어 이중가닥 DNA 분자의 2개의 가닥 간 또는 올리고뉴클레오타이드 프라이머와 서열분석되거나 증폭될 단일 가닥 핵산 상의 프라이머 결합 부위 간의 하이브리드화 또는 염기 짝지음을 의미한다.
- [0026] 본 명세서에서의 용어 "특이적으로"라는 용어는 프로모터의 발현 활성이 동일한 식물체 내의 적어도 하나 이상의 다른 조직보다 특정한 조직 내에서 더 높다는 것을 의미한다. 프로모터의 발현 활성의 수준은 일반적으로 사용되는 방법을 이용하여 미리 측정된 조직 내에서의 프로모터의 발현수준을 다른 조직 내에서의 것과 비교함으로써 평가된다. 일반적으로 프로모터의 발현수준은 프로모터의 조절 하에서 발현된 유전자 생성물, 예를 들어 단백질 및 RNA 등의 생성량에 의해 측정된다.
- [0027] 본 발명의 프로모터 핵산 분자는 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 분리 또는 제조할 수 있다. 예를 들어, 적절한 프라이머 서열을 이용하여 PCR을 통해 분리할 수 있다. 또한, 자동화된 DNA 합성기를 이용하는 표준 합성기술을 이용하여 제조할 수도 있다.
- [0028] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 신규 1 시스템인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자를 포함하는 벡터에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명의 용어 "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적 유전자를 발현시킬 수 있도록 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 염기서열을 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 상기 용어 "작동 가능하게 연결된"이란 프로모터 서열이 상기 코딩 서열의 전사를 개시 및 매개하도록, 상기 코딩 서열과 프로모터가 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 벡터는 숙주 중에서 복제 가능한 것이면 특별히 한정되지 않으며 당업계에 알려진 임의의 벡터를 이용할 수 있다. 예컨대 플라스미드, 파지 입자, 또는 간단하게 잠재적 게놈 삽입물일 수 있으며, 바람직하게는 pCambia 1301을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 벡터는

적당한 숙주 내로 형질전환된 후, 숙주 계놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 일부 경우엔 계놈 그 자체에 통합될 수 있다.

- [0030] 또한, 본 발명의 벡터는 필요에 따라 선택 마커 (selection marker)를 포함할 수 있다. 선택 마커는 벡터로 형질전환된 세포를 선별하기 위한 것으로, 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들이 사용될 수 있다. 선택제 (selective agent)가 처리된 환경에서는 선택 마커를 발현하는 세포만 생존하므로 형질전환된 세포를 선별할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 벡터는 1 시스템인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자를 포함하는 조절 서열과 목적 유전자를 포함하는 코딩서열을 작동적으로 연결시켜 다양한 목적 단백질을 재조합적으로 생산할 수 있다. 상기 코딩서열은 예를 들면, 전체 유전자, 또는 그의 일정한 영역을 코딩하는 서열일 수 있다. 코딩서열의 예는 아미노산이나 뉴클레오타이드의 대사 산물과 연관되어 있는 유전자의 코딩서열일 수 있으며, 본 발명은 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 또한, 본 발명의 벡터는 정량화할 수 있는 단백질을 코딩하는 유전자 (이하, '리포터 유전자'라 함)가 발현되도록 프로모터의 하위 (downstream)에 연결시켜 프로모터 활성정도를 측정할 수도 있다. 리포터 유전자로는 GUS를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0033] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명에 따른 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3의 신규한 프로모터 핵산 분자를 삽입하기 위한 벡터로서, 벡터의 형질전환에 사용 가능한 서플벡터인 pCAMBIA 1301을 이용하였다. 또한, 상기 벡터에 프로모터 활성을 측정하기 위한 리포터유전자로서 GUS를 코딩하는 gusA유전자를 포함시키고, 선택마커로서 카나마이신과 하이그로마이신 내성 유전자를 포함시켜, 최종적으로 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3의 프로모터를 포함하는 벡터를 제작하였다.
- [0034] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 벡터로 형질전환된 형질전환체에 관한 것이다. 본 발명의 형질전환체는 벡터를 프로모터가 작용할 수 있는 양태로 숙주세포 내에 도입시키는 것에 의해 구축될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 용어 "형질전환"은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제 가능하게 되는 것을 의미한다.
- [0036] 본 발명의 벡터를 형질 전환시키는 방법은 핵산을 세포 내로 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 숙주세포에 따라 당 분야에서 공지된 바와 같이 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 (CaPO₄) 침전, 염화칼슘 (CaCl₂) 침전, 미세주입법 (microinjection), 폴리에틸렌글리콜 (PEG)법, DEAE-덱스트란법, 양이온 리포솜법, 및 초산 리튬-DMSO법 등이 있다.
- [0037] 상기 숙주 세포로는 DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현 효율이 높은 숙주를 사용하는 것이 좋는데, 원핵 및 진핵을 포함한 모든 미생물을 사용 가능하다.
- [0038] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법 Krens F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74), 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 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.
- [0039] 상기 형질전환체는 이에 한정되지는 않으나, 미생물로서는 대장균 (*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*), 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*), 스태필로코쿠스 (*Staphylococcus*) 또는 아그로박테리움 투머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)일 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 형질전환체는 이에 한정되지는 않으나, 식물 또는 식물세포일 수 있으며, 이 때, 상기에서 식물이란 전체 식물 (whole plant), 식물의 일부분, 캘러스, 식물 조직, 식물 세포 및 식물 종자를 모두 포함한다. 상기 본 발명에 따른 방법이 적용될 수 있는 식물체로는 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물이 포함되며, 바람직하

게는 벼, 밀, 보리, 애기장대, 담배, 토마토, 고구마일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 벼를 사용하였다.

[0041] 식물세포의 배양은 식물의 일부를 모체로부터 분리하여 적당한 조건 아래에서 무균적으로 배양하여 생육시키는 것으로 조직 절편의 액체 배양, 조직 절편의 캘러스 배양, 원형질체 배양 등 당업자에게 공지된 어떠한 방식의 것에 의할 수 있으며, 그 배양 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 배양된 식물세포를 식물로 분화시키는 것은 캘러스, 원형질체 형태의 배양된 식물세포를 적당한 조건 아래에서 분화를 유도하여 식물의 조직 또는 식물로 분화시키는 것으로 그 분화 조건 및 방법은 당업자에게 공지된 조건 및 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0042] 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 본 발명에 따른 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3의 프로모터를 포함하는 벡터 pCAMBIA1301 아그로박테리움에 형질전환시켜 목적 유전자를 과발현시킬 수 있는 형질전환체를 제조하였다.

[0043] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기한 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터 핵산 분자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체를 배양하는 단계를 포함하는 목적 유전자의 발현 방법에 관한 것이다.

[0044] 본 발명에서 "목적 유전자의 발현"이란 것은 상기 목적 유전자를 발현시켜 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 생산하는 것을 의미할 수 있다. 본 발명에서 목적 유전자를 발현하는 방법은 상기 목적 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질전환체 (숙주세포)를 배양하여 상기 목적 유전자가 코딩하는 단백질을 발현시키는 방법이며, 이를 통해 상기 단백질이 관여되는 생합성 경로의 최종산물을 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0045] 이러한 본 발명의 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터는 수도 배아 및 호분층, 배아로부터 유래한 캘러스에서 높은 전사 유도 활성을 나타낸다. 수도 배아 및 호분층은 단백질 함량이 높고 배젖 조직으로부터 기계적 분리가 용이하여 바이오 의약품을 포함한 고부가 단백질을 발현시키고 분리하기에 적합하기 때문에, 본 발명의 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터는 고부가 단백질의 생산을 통한 바이오 산업 분야에서 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터 부위를 분석한 모식도이다.
 도 2는 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터 pCAMBIA 1301의 모식도이다.
 도 3은 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 벼의 종자에서 GUS의 활성을 비교한 그림이다.
 도 4는 형질전환 벼의 종자에서 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터로 인한 GUS활성을 정량적으로 분석한 그림이다.
 도 5는 형질전환 벼의 배아로부터 유래한 칼루스에서 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터로 인한 GUS 활성을 정량적으로 분석한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 통하여 구체적으로 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0048] 실시예 1. 1 시스테인 퍼록시레독신 유전자의 5' franking region의 클로닝

[0049] 조직특이적인 프로모터로서의 기능적인 특성을 분석하기 위하여 AUG 번역 시작 코돈으로부터 1,920bp 상위 (업스트림)을 포함하고 있는 1 시스테인 퍼록시레독신 5' franking region을 분리하고, 5' RLM-RACE (RNA ligase-mediated rapid amplification of 5' cDNA ends)를 이용하여 1시스테인 퍼록시레독신의 전사 개시 위치를 확인하였다. 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터의 서열을 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)를 이용하여 분석하고 cis-regulatory

element 서열로 추정되는 부위를 확인하였다.

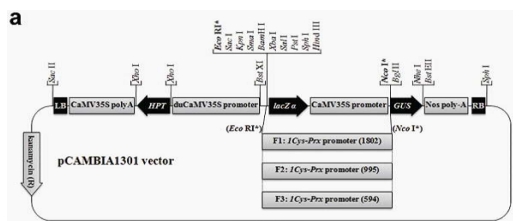
- [0050] 도 1에 나타난 바와 같이 TATA 박스, CAAT 박스 및 ABRE, ARE, CAT-box, CCGTCC-box, RYE 와 W-box 등 cis-regulatory element 서열을 포함하는 영역을 확인하였으며, -1814~96 bp까지의 서열을 F1, -1007~96 bp까지의 서열을 F2, -606~96 bp까지의 서열을 F3로 표시하였다.
- [0051] **실시예 2. 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터를 포함하는 재조합 벡터의 제작 및 형질전환 식물에서의 GUS 활성 비교**
- [0052] 1 시스테인 퍼록시레독신의 5' flanking 부위의 생물정보학적인 분석을 통해 전사 개시 위치로부터 상위 (업스트림)방향 (-)으로 1814, 1007, 606 bp의 영역이 가능한 프로모터 후보 부위로 선택되었다 (도1).
- [0053] 96 bp 5' -UTR을 포함하고 있는 F1, F2, F3 각각의 프로모터 부위는 벼의 genomic DNA로부터 PCR 을 통해 증폭되었으며, *EcoRI*과 *NcoI* 제한효소를 이용하여 대조군인 CaMV35S 부위에 대신 삽입하였다. 발현 패턴과 프로모터의 활성을 분석하기 위하여, 분리된 5' -UTR 을 포함하고 있는 프로모터 부위를 GUS 리포터 유전자와 연결되어 이원벡터인 pCambia 1301에 삽입하였다 (도 2). 이후 상기 벡터는 아그로박테리움 매개의 형질전환을 통해 벼로 도입되었다.
- [0054] F1, F2, F3의 세 가지 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터에 의한 GUS의 활성을 확인하기 위해서, 형질전환 벼의 종자를 조직화학적 염색하였다. 도 3에 나타낸바와같이 세 가지의 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터에 의한 GUS 활성은 수도 배아와 호분층에서 특이적으로 높게 나타났다. 이는 대조군인 CaMV 35S 프로모터에 의한 GUS 활성보다 더 강력한 것이다.
- [0055] **실시예 3. 형질전환 식물체에서 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터에 의한 GUS 활성의 정량적 분석**
- [0056] 형질전환 식물체의 종자에서 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터에 의한 GUS발현 정도를 평가하였다.
- [0057] 형광분석 결과 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터 F1, F2, F3는 각각 21.9 ± 1.8 , 24.9 ± 3.3 , 23.4 ± 3.4 pmol (4-MU/min/ μ g protein) 을 나타냈다 (도 4). 특히 1시스테인 퍼록시레독신 프로모터는 수도 배아 및 호분층에서만 특이적으로 발현되는 것으로 나타났다.
- [0058] 또한, 배아유래의 칼루스에서 F1, F2, F3 1시스테인 퍼록시레독신 프로모터에 의한 GUS 의 활성은 전체 종자에서 관찰되는 것보다 두 배 이상 되는 것으로 확인되었으며, ABA 처리시 더욱 증가하였다 (도 5).
- [0059] 지금까지의 실험 결과를 통해, 종자 특이적인 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터는 바이오기술 개발에 적합한 조직에 특이적으로 강한 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다. 1 시스테인 퍼록시레독신 프로모터는 호분층 및 배아에서 재조합 단백질의 생산에 실용적으로 이용될 수 있는데, 수도를 비롯한 단자엽 식물의 종자에서 배아 및 호분층은 단백질 함량이 높고 배젖 조직으로부터 기계적 분리가 용이하여 바이오 의약품을 포함한 고부가 단백질을 발현시키고 분리하기에 적합하여 특히 유용하다.

도면

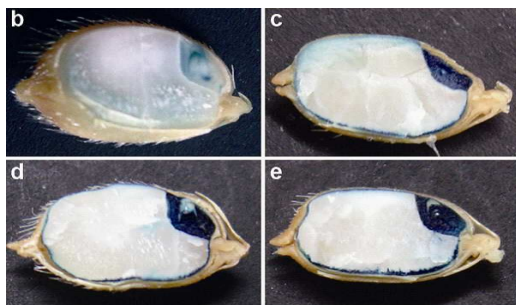
도면1

CTTCAACATTAAACGAGAAGATTTTGACTTTTAAAGGGAATGGAGGACCTCCACAGGTCTCGCAAACCCCTATCTTTAAACCCCTCAAACACATAGGGCC -1705
 TGGTAAAGGGATTTGGTAGTATAAGAGAGCTGTCGATGTTTGATGTGCGGATCTCCGGTATTTGTCATAGTATGGGGATCGTTGGTACTATGATATATACGCGAG -1605
 ACTGAGCAATAAAGAGCGGAGCGGATTTTATACAGGTCGGGCGCCCTGAATGTGCAAGTAATACCCAACTACTCTGCTCGCGGAACGCGGTATTAC -1505
 TCTATTACCATAATCACTACTAGTACATATTTGGGATAACCTATCAAACTGTTGTCGATGGCGGTGTGAAGGTCTTGACTGCTAGTGCATGATACACAGT -1405
 TAGCCTTCTCTCTCGAATCGCATCGGCGSAGTACAGACAGCGCTATATCTCTCTCTGCTGACAGTATCCGTAGGCGACCGTAAAGGACTAGCCATGCT -1305
 ATCTCGAAGTCGATATCTGGGCTCTTGCTCTGGGATGTGCAACTGATATGTTGGTCTCTGTTGTTCCATGATGTATGTTGGTGGGCTGCTCCATG -1205
 TGGGTGTGTCCTCTCTCTCTTAGGGGGTCTGTATTTATACCATAGGTCGCCCTTGTCCAAAGTAGCACTAGGCGAAGCATATATAGCATCTAAG -1105
 TAGTCTGTTGCTGTTCCAGTAAACTCTGTTATCTTTCTTTCTATCCGGAAGTCTCTCTATATCTGATAGTGTCTCGCTATAGGACATGGTATGTTG -1005
 GGTCTACCGAGATTTAGTCAACTACTATTAGTATGTGATATCCATAACCTGACAGAGCCAGACTATACAGCTTCCAAACATTGATCTTTATCAACC -905
 TGAAGATGAATCTCCCTCAAAATATGTAAGTCTCTCCACTCTCTCACTCTCCCTTCACTCAGAGATCTCTCAACTCTATAACCGCATCTGCTCCAG -805
 ACCATAATTTGATGTGACAGTTTCTCTCTGCTCGCAACAAATTTGTAGATATATGGAATGAGTTTGTAGGGGTGCTTCTCTATCATACATCATCC -705
 CAGACTAGGATTTTGACGCTCCACAAATTTATTTCTTCCCACTACATGATATTTATTTTATTTTCTTTGCTAATCGGATGCTATGTCAGTGTGACGCTG -605
 ATCAATACTACCTCGGATCTTTTGTGACGCTTTTATATAGTTAAGGATATCCGGTTAGGAGACCTCAGACAGATTTCTGCTGATAAATGAGAGGAGCT -505
 CTGTGTGAATCTAGGCGCTTCTCACTTTGATGCCATTTTCAATCTATACAAATTTTGGTAAAGTTGTCAAAAAAATGTGGCTCATATTAGTTTGTGCTGA -405
 AATTTTGGTATAATAAGAAATCTCGCAAAATTTTGACAGATTCACAAATTTTGGTAATACCAAAATTTGGTAAAGTTT -305
 TTTTTCATCAAGATGAATAGCGCTTGCTGCTTTCTTGAGGATACCAACCGATCCAAATTTGACAAAGCTTCCCGCATGGGCGGCACGATCACTTACGG -205
 TGGCGTGAGAAGATCCAGATTTGACGCTCTGGGATGGGGGATGACGCTACCAAGCTACCACTCACTCTCTCACTTATATATATGCTGTGCTTCACTCCAG -105
 AGCGGCTGCTGCTGTCGACAGCTTTGCAATTCGACGAGCTCATAGTTTCTTCTCTGCTTCCGCTCCAGTCTAGGCGACAGCTGTGCTGCCG -5
 ATGCGAGGCTCACCATCGCGACACCTGGCTCCCAACTGGAGCTGAGCTCACCGACGCAAGTATCCGATCCAGACTCTGGTGGCGACCACTATGTCA -96
 M P G L T I G D T V P N L E L D S T T H G K I R I H D F V G D T Y V (33)
 TCTCTCTCCACCCCGTatatacaactacaactacaactcgtcgatctcacattctcatctcggtagtagtgtgtgtgagtcgagtgtgcatccgagt 236
 I L F S H P (39)
 gattgattgaatgacgtgctgagtcgag 32

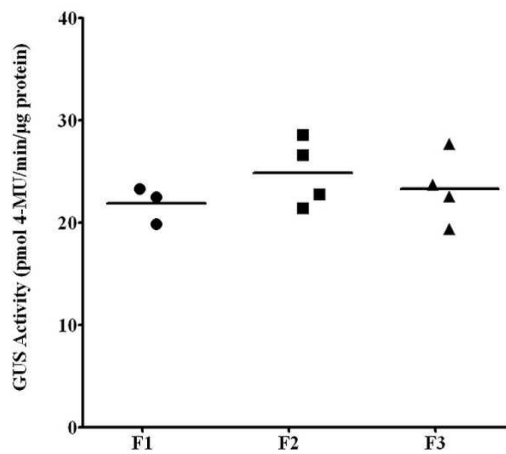
도면2



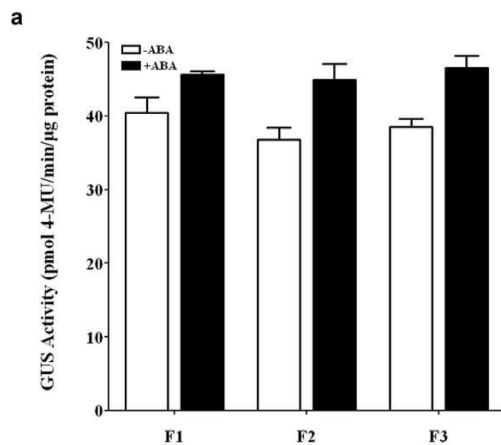
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> 1 Cys-Prx promoter from Oryza sativa L.

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1910

<212> DNA

<213> F1 1 Cys-Prx promoter from Oryza sativa L.

<400> 1

gaattcttcc cttcaacatt aaccagaaga agattttgac ttttaaggga atggaggacc 60

tccacaggtc ctgcaaaacc ctatctttaa ccctccaaa acatagggcc tggtaaaggg 120

atttggtagt ataagagcct gtcgatgttt gatgtcgcga ttccggtatt tgcatagtat 180

ggggatcggtt ggtactatga tatacgcgag actgaggtaa aagagacgga gacagggatt 240

ttatatacagg ttcggggcccc tgaattgtca ggtaataaacc caacatcctg ttggccgaag 300
 ccggtattac tcttattcac cataatcaca ctagtacaat atttgggata acctatcaaa 360
 ctgttgtcga tatggcgggtg tgaagggtctg actcgtagtc gataacagtg tagccttcct 420
 cctcgaatcc gcatccggcg agatcagaga cagcgcctata tctctcctgc tgacagtatc 480
 cgtaggcacc gtaagggact agccatgcct atctctgaag tcgatatctg gcgtcttctg 540
 ttggcgtatg tcaacttgta tgttgtggct tctgttttc catgtatgtt gtggtgggtg 600

 tcttccatgg tgggtgtgtc ctctctctc ttagggggtc ttgtatttat acccataggt 660
 gtcccttctt ccaagtagaa ctagggaac caatatgaat acaatctaag tagtcttctg 720
 cgtttccatg taaaactctg gttatctttt ctatccgga actcctccta tatctgtagg 780
 ttgcttccgt ataggacatg gtatgtagtg ggtcctaccg agatttagtc aactactatt 840
 aggtatgtga tatccataac cctgacagag ccagacttat cagcttccaa aacatttgat 900
 ctttatcacc tgaagaatga atctccccta caaattatgt agttcttccc attcctccat 960
 ctccccttca ctgagagatc tctcaactc tataaccag ctcctcagg accataagtt 1020

 tgatgtacag ttttcttctg gtctgcacaa atttttaga tatatggaaa ctgagttttt 1080
 aggggtgtct ttctatcca tacatcatcc cagactagga ttgttgaccc tccacatttt 1140
 atttcttccc acttacatgt atttattttt tattctttgc taatcggatg ctatgtcagt 1200
 gaaaccaggc atcaatacta cctcgggatc ttttttggga cggttttata tagttaaggt 1260
 attccggtta ggagacctca gacagatttc gtgtataaat tgaggggacgt ctggtgaact 1320
 tagggcctgt tcactttgat gccattttca atcttacc aaatttggtaa agttgtcaaa 1380
 aaaaatgtgg ctacatttag tttgtctcta aattttggta actatataag aaatcctgcc 1440

 aaaattttga caagttatca aaattttggc cactataaat tttggtaata ccaaaatttg 1500
 gtaaggtttt ttttttcac aaagtgaata ggcgcttggc cttttctgag ctaaaccgag 1560
 tccaaattcc aaaagctctc ccgacatggg ccgccacgat cagtttcagg tggccgtgag 1620
 aagattccag aatggacggt catggggatg ggggaggtca acacgactca caaaggtata 1680
 gtaggaggcg cggtgccac gagacgaggt acgtggcccc catgcagcac gccgtggcga 1740
 cacctctgca cactgatcaa ctccactcac ctactcctc acctataaaa atgcttcgat 1800
 ctactccag tctccagtgc cttcgtctcg acagtttgc attgcagcag ctcataagtt 1860

 tcttcttctg tttctctccc agtgctaagg cagcacagtc gttcgtcgcc 1910

<210> 2

<211> 1103

<212> DNA

<213> F2 1 Cys-Prx promoter from Oryza sativa L.

<400> 2

gtgggtccta ccgagattta gtcaactact attaggtatg tgatatccat aaccctgaca	60
gagccagact taccagcttc caaaacattt gatctttatc acctgaaaga tgaatctccc	120
ctacaaatta tgtagttctt cccattcttc catctccctc tcaactcagag atctctctca	180
ctctataacc cagctccctc aggaccataa gtttgatgta cagttttctt ctggctgca	240
caaattttgt agatataagg aaactgagtt tttaggggtg tctttctat ccatacatca	300
tcccagacta ggattgttga ccctccacat tttatttctt cccacttaca tgtatttatt	360
ttttattctt tgctaactcg atgctatgtc agtgaaacca ggcatcaata ctacctggg	420
atcttttttt ggacggtttt atatagttaa ggtattccgg ttaggagacc tcagacagat	480
ttcgtgtata aattgaggga cgtctgggtga acttagggcc tgttcacttt gatgccattt	540
tcaatcttac caaattttgg taaagtgtc aaaaaaatg tggctacatt tagtttgctg	600
ctaaattttg gtaactatat aagaaatcct gccaaaattt tgacaagta tcaaaatttt	660
ggccactata aattttggta ataccaaaat ttggtaaggt ttttttttc atcaaagtga	720
ataggcgctt ggtcctttct gagctaaacc gagtccaaat tccaaaagct ctcccgacat	780
gggccgccac gatcagtttc aggtggccgt gagaagattc cagaatggac ggtcatgggg	840
atgggggagg tcaacacgac tcacaaaggt atagtaggag gcgcggctgc cagcagacga	900
ggtacgtggc cccatgcag cagccgtgg cgacacctct gcacactgat caactccact	960
cacctactc ctccctata aaaatgcttc gatctcactc cagctccag tgccttcgtc	1020
tcgacacgtt tgcatcgag cagctcataa gtttcttctt cgtttctgct cccagtgcta	1080
aggcagcaca gtcgttcgtc gcc	1103

<210> 3

<211> 702

<212> DNA

<213> F3 1 Cys-Prx promoter from Oryza sativa L.

<400> 3

gcatcaatac tacctcgga tcttttttg gacggtttta tatagttaag gtattccggt	60
taggagacct cagacagatt tcgtgtataa attgaggac gcttggtgaa cttaggcct	120
gttactttg atgccatttt caatcttacc aaattttggt aaagttgtca aaaaaatgt	180
ggctacattt agtttgcgc taaattttgg taactatata agaaatcctg ccaaaatttt	240
gacaagttat caaaattttg gccactataa attttggtta taccaaaatt tggtaaggtt	300
tttttttca tcaaagtga taggcgcttg gtcctttctg agctaaaccg agtccaaatt	360

ccaaaagctc tcccgacatg ggccgccacg atcagtttca ggtggccgtg agaagattcc	420
agaatggacg gtcattggga tgggggaggt caacacgact cacaaggtg tagtaggagg	480
cgcggtgcc acgagacgag gtacgtggcc cccatgcagc acgccgtggc gacacctctg	540
cacactgac aactccactc acctcactcc tcacctataa aaatgcttcg atctcactcc	600
agtctccagt gccttcgtct cgacacgttt gcattgcagc agtcataag ttctttcttc	660
gtttctgctc ccagtgctaa ggcagcacag tcgttcgtcg cc	702