



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월22일
(11) 등록번호 10-2069045
(24) 등록일자 2020년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/8218 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7016134
(22) 출원일자(국제) 2014년11월20일
심사청구일자 2017년12월28일
(85) 번역문제출일자 2015년06월17일
(65) 공개번호 10-2016-0085208
(43) 공개일자 2016년07월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/066599
(87) 국제공개번호 WO 2015/077447
국제공개일자 2015년05월28일
(30) 우선권주장
61/907,617 2013년11월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20160369288 A1
WO2010086221 A1*
WO2012149009 A2
GenBank: EOY14402.1 (2013. 5.31.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
방글라데시 주트 리서치 인스티튜트
방글라데시 다카 마닉 미아 애비뉴 (우: 1207)
(72) 발명자
알람, 마퀴수들
미국 96816 하와이 호놀룰루 아파트먼트 605 와일
래 애비뉴 3138
이스람, 모함메드, 샤히들
방글라데시 1207 다카 마닉 미아 애비뉴 방글라데
시 주트 리서치 인스티튜트
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스로부터의 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 단백질의 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 이의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 2 종의 황마 식물, 즉, 코르코루스 올리토리우스("C. olitorius") 및 코르코루스 캡슐라리스("C. capsularis")로부터의 WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드, 및 이로부터 유래된 대응하는 폴리펩타이드를 개시한다. 개시된 폴리뉴클레오타이드 서열은 황마에서 섬유질 생성을 향상시키는 데 있어 촉매적 활성을 갖는 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드(WOX4)를 암호화한다. 본 발명은 또한 대응하는 야생형 식물 또는 다른 대조군 식물에 비해 향상된 섬유질 수율을 갖는, WOX4 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 조절된 발현을 지니는 식물에 관한 것이다. 단백질의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/하거나 이루어진 벡터, 발현 작제물 및 숙주 세포가 또한 제공된다. 또한 단백질을 생산하는 방법 및 상기 단백질의 바람직한 특징을 개선시키기 위해 상기 단백질을 변형시키기 위한 방법이 개시된다. 본 발명의 단백질은 식물 생장, 초장(plant height), 섬유질 및 종자 수율을 유도, 개시, 개선 또는 향상시키는 것을 포함하는 다양한 방법에 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8246 (2013.01)

(72) 발명자

아메드, 보르한

방글라데시 1207 다카 마닉 미아 애비뉴 방글라데
시 주트 리서치 인스티튜트

하퀴, 모함메드, 사미울

방글라데시 1207 다카 마닉 미아 애비뉴 방글라데
시 주트 리서치 인스티튜트

알람, 모함메드, 몬주롤

방글라데시 1207 다카 마닉 미아 애비뉴 방글라데
시 주트 리서치 인스티튜트

명세서

청구범위

청구항 1

WUSCHEL-관련 호메오박스4(WUSCHEL-related homeobox4) 폴리펩타이드를 암호화하고, 코르코루스 올리토리우스(*Corchorus olitorius*) 또는 코르코루스 캡슐라리스(*Corchorus capsularis*) 식물로부터 유래된, 단리된 폴리뉴클레오타이드로서, 서열번호 2 또는 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체로 이루어지는 핵산 분자로 이루어지는, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 코르코루스 올리토리우스 식물은 품종 0-4인, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 코르코루스 캡슐라리스 식물은 품종 CVL-1인, 단리된 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 유전자 작제물(construct)로서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물에서 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드의 상동체를 생성하도록 숙주 세포에서 발현가능한, 재조합 유전자 작제물.

청구항 8

제7항에 있어서, 단리된 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 프로모터 영역을 더 포함하고, 상기 프로모터는 상기 핵산 분자의 전사 또는 발현을 향상시키는, 재조합 유전자 작제물.

청구항 9

폴리뉴클레오타이드를 발현시킬 수 있는 제7항의 재조합 유전자 작제물을 포함하는 형질전환체로서, 상기 형질전환체는 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드의 상동체를 생성하는, 형질전환체.

청구항 10

삭제

청구항 11

서열번호 1, 2, 4 또는 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 상보체(complement)로 이루어지는 단리된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 작제물로서, 상기 폴리뉴클레오타이드 서열은 숙주 세포에서 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 제어하는 전사 또는 번역 조절 신호 또는 둘 모두를 함유하는 조절 뉴클레오타이드 서열과 작동가능하게 연관된, 발현 작제물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2013년 11월 22일자로 출원된 미국 가출원 특허 제61/907,617호의 유익을 주장하며; 이 기초출원의 전문은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명의 기술분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 분야에 관한 것이며, WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질(WUSCHEL-related homeobox4 protein: WOX4) 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 식물에서의 발현을 조절함으로써 섬유질 수율-관련 특성을 향상시키기 위한 방법에 관한 것이다. 더 특별하게는, 본 발명은 2종의 황마 식물, 즉, 코르코루스 올리토리우스(*C. olitorius*) 및 코르코루스 캡슐라리스(*C. capsularis*)로부터 단리된 WUSCHEL-관련 호메오박스

4(WOX4) 상동체, 및 황마 식물에서의 인피 섬유의 생산에서 그의 용도뿐만 아니라 이의 유전자이식 황마 식물을 제공한다.

배경 기술

- [0005] 황마는 환경친화적이며 생분해성인 천연 섬유이다. 이는 토지의 단위 면적 당 고바이오매스 생산을 지니는 재생성 자원이다. 100가지 초과 황마 종(야생 친척을 포함)은 천연 인피섬유를 생산한다. 황마는, 피나무과(Tiliaceae), 더 최근에는 아욱과(Malvaceae)로 일단 분류된 코르코루스(*Corchorus*) 속 식물로부터 생산된다. 그러나, 이들 종들 중 둘, 즉, 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스만이 산업적 목적에서의 사용에 적합한 고품질의 섬유를 생산한다. 황마는 천연 섬유이기 때문에, 합성을 보충하거나 또는 대체하는 다양한 방법으로 사용될 수 있고, 산업으로부터 점점 더 많은 주목을 받고 있다. 황마 섬유에 대한 증가된 세계적 요구가 있기 때문에, 황마 섬유 생성의 추가 개선이 필요하다. 따라서, 섬유질 생합성을 연구하고, 이 섬유의 생합성에 연루된 분자 생물학을 탐구함에 있어 상당한 관심이 있다.
- [0006] 황마의 섬유는 2 유형의 섬유질로 구성되고/되거나 포함하는 물관부의 섬유질이다: (i) 세포분열 및 변형을 통해 원생체관부 영역 내 전형성층으로부터 발생하는 일기사부섬유, 및 (ii) 방추형 및 방사조직 시원세포의 활성화에 의해 형성층으로부터 발생하는 이기사부섬유(Maiti and Mitra, 1972. Bull Bot Soc Bengal 26:79-85). 이들 전형성층 및 형성층 조직은 관상요소 분화 저해 인자(tracheary element differentiation inhibitory factor: TIDF) 및 TDIF 수용체(TDR) 막 단백질 키나제에 의해 매개화된 세포간 통신작용을 하는데, 이는 전형성층 세포의 증식을 촉진하고 그들의 물관부 분화를 억제한다(도 1; Hirakawa et al., 2010. Plant Cell, 22:2618-2629; Etchells et al., 2013. Development 140, 2224-2234).
- [0007] WUSCHEL-관련 호메오박스(WOX) 유전자 패밀리는 다양한 배아, 분열조직 및 기관 시원 세포의 개시 및/또는 유지 동안 관련된 기능을 수행한다(Haecker et al., 2004). WUSCHEL-관련 호메오박스(WOX) 유전자 패밀리의 단백질 중에서, WOX4는 TDIF 신호처리 경로의 중요한 조절자로서 작용하고(Hirakawa et al. 2010) 전형성층 및 형성층에서 우선적으로 발현된다(Schrader et al., 2004; Ji et al., 2010 및 Hirakawa et al. 2010). 예를 들어, TDIF-TDR은 아라비도시스(*Arabidopsis*) 및 토마토에서 전형성층/형성층 줄기 세포의 유지를 촉진하는 주요 전사인자 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)의 전사를 유도한다.
- [0008] WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 폴리펩타이드는 식물에서 인피섬유의 개시를 촉매한다. 그러나, 이 폴리펩타이드에 관한 선행기술에 제공된 다수의 특징 보고 또는 기존의 기법은 없다. 미국 특허 제2011/0283420 A1호(참고로 포함됨)는 식물에서 향상된 수율-관련 특성에 대해 wuschel 관련 호메오박스 1-유사(WOX1-유사) 폴리펩타이드를 개시하였다. 다른 유럽 특허 1451301 B1호에서, 식물에서의 체세포배형성의 촉진작용에서 wuschel 유전자의 사용을 개시한다. 최근에, 일부 wuschel 유전자 상동체는 미국 특허 제2010/0100981 A1(참고로 포함됨)에 개시되었다.
- [0009] WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질이 황마 섬유의 생합성 경로에서 중요한 역할을 할 수 있다는 사실에 비추어, WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)의 분자 생물학적 및 유전적 정보를 탐구하고 이용함으로써 산업이 식물 내 섬유질의 생합성에 관한 유전적 접근을 제공하는 것은 바람직하다. 게다가, 각각의 식물 종의 섬유질 생합성 경로 및 유전적 구성은 전형적으로 다르기 때문에, 종-특이적 접근은 또한 황마 식물로부터 섬유질의 수득을 최적화하고, 산업에서 사용을 가능하게 하는 상용성의 결과를 얻는데 바람직할 수 있다.
- ## 발명의 내용
- [0010] 본 발명의 일 양태는, 특히, 인피섬유 형성의 개시를 촉매하는데 수반되고, WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)-유사 서열을 갖는 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스로부터 유래된 유전자 암호화 단백질을 제공하는 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 체관부 섬유질을 유도하는 능력을 갖는 유전자를 제공하여, 이에 의해 암호화된 단백질, 및 이의 용도를 제공한다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물에서뿐만 아니라 다른 인피섬유-생성 식물에서 섬유질의 생성, 성장, 강도 및 수율을 개선하기 위해 활용/이용될 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)의 분자 생물학 및 유전자 정보를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 식물에서 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)의 생합성을 조절함으로써 증가된 섬유 생성을 지니는 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스의 유전자 이식 식물을 얻는 것이다.

- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 개시된 방법의 성능을 용이하게 할 수 있는 특이적 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단리된 폴리뉴클레오타이드를 제공하고, 유전자 이식 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물에 대한 접근을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 추가 목적은 황마 섬유-기반 제품에 대해 섬유 생산을 증가시키기 위한 잠재적인 상업적으로 실현가능한 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명은 체관부 섬유질 형성의 개시를 촉매하는데 수반되고, WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)-유사 서열을 갖는, 서열번호 3으로 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 코르코루스 올리토리우스로부터 단리된 유전자를 추가로 제공한다. 본 발명은 추가로 체관부 섬유질 형성의 개시를 촉매하는데 수반되고, WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)-유사 서열을 갖는, 서열번호 3에 제시된 바와 같은 아미노산 서열에서 하나 또는 복수의 아미노산의 첨가 또는 결실 및/또는 다른 아미노산으로의 대체에 의해 변형된 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자를 제공한다. 본 발명은 서열번호 1에 제시된 핵산, 구체적으로는 그의 DNA 또는 그의 일부를 혼성화하고, 체관부 섬유질 형성의 개시를 촉매하는데 수반되는 단백질을 암호화하며 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)-유사 서열을 갖는, 유전자를 추가적으로 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 체관부 섬유질 형성의 개시를 촉매하는데 수반되고, WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)-유사 서열을 갖는, 서열번호 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 코르코루스 캡슐라리스로부터 단리된 유전자를 제공한다. 본 발명은 추가로 체관부 섬유질 형성의 개시를 촉매하는데 수반되고, WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)-유사 서열을 갖는, 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열에서 하나 또는 복수의 아미노산의 첨가 또는 결실 및/또는 다른 아미노산으로의 대체에 의해 변형된 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 유전자를 제공한다. 본 발명은 서열번호 4에 제시된 핵산, 구체적으로는 그의 DNA 또는 그의 일부를 혼성화하고, 체관부 섬유질 형성의 개시를 촉매하는데 수반되며 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)-유사 서열을 갖는, 단백질을 암호화하는 유전자를 추가적으로 제공한다.
- [0017] 본 발명의 하나의 바람직한 실시형태에 따르면, 사용된 코르코루스 올리토리우스 식물은 품종 0-4이고, 사용된 코르코루스 캡슐라리스 식물은 품종 CVL-1이다.
- [0018] 본 발명의 다른 실시형태는 서열번호 2 및/또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함하는 재조합 유전자 작제물을 개시하되, 폴리뉴클레오타이드는 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물에서 각각 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)의 상동체를 생성하는 숙주 세포에서 발현가능하다.
- [0019] 본 발명의 추가 실시형태는 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 단백질의 상동체를 생성하기 위해 서열번호 2 및/또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 발현시킬 수 있는 재조합 유전자 작제물을 포함하는 형질전환체이다.
- [0020] 본 발명은 또한 체관부 섬유질 개시에 대한 촉매적 활성화에 수반된 단백질을 생성하기 위한 방법을 제공하며, 상기 숙주를 배양 및/또는 재배하는 것을 포함하는 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)-유사 서열을 가진다.
- [0021] 본 발명은 또한 식물 또는 식물 세포의 체관부 섬유질의 개시를 유도하기 위한 방법을 제공하고; 더 나아가 또한 상기 유전자를 식물 또는 식물 세포 내로 도입하는 단계, 및 상기 유전자의 발현을 구동하는 단계를 포함하고/하거나 이루어진 방법이 개시된다.
- [0022] 당업자는 본 발명이 목적을 수행하고 언급된 결과 및 이점뿐만 아니라 그에 고유한 결과 및 이점을 얻기에 상당히 적합하다는 것을 용이하게 인식할 것이다. 본 명세서에 기재된 실시형태는 본 발명의 범주에 대한 제한으로서 의도되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 이들 및 다른 특징, 양태 및 이점은 다음의 상세한 설명 및 특허청구범위를 참조하면 더 용이하게 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 TDIF-TDR 신호처리 경로를 도시한 도면. TDIF-TDR 신호처리는 2개의 경로로 분화하는데, 하나는 섬유질 세포 개시를 촉진하는 체관부 세포 증식에 수반되는 WOX4이고, 다른 것은 유관 줄기 세포의 물관부 분화를 저해하는 가상 인자 X이다.
- 도 2는 코르코루스 올리토리우스로부터의 서열번호 3 및 코르코루스 캡슐라리스로부터의 서열번호 6을 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 단백질을 생성하는 다른 아미노산 서열과 비교하는 계통수를 도시한 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 본 출원의 부분을 형성하는 다음의 상세한 설명 및 수반하는 도면으로부터 더 완전하게 이해될 수 있다.
- [0026] 본 명세서에 제공된 정의 및/또는 방법은 본 발명의 정의하며 본 발명의 실행에서 당업자를 안내한다. 달리 언급되는 경우를 제외하고, 용어는 당업자에 의해 전통적인 어구에 따라 이해되는 것이다. 임의의 정의 및/또는 방법이 본 명세서에 포함된 임의의 특허 또는 비특허 문헌에 또는 그것에서 발견되는 임의의 참고문헌에서 제공된 임의의 정의 및/또는 방법과 불일치되는 정도로, 본 출원에 명확하게 제공/채택된 상기 정의 및/또는 방법이 본 명세서에 사용될 것이라는 것이 이해된다. 단수 용어는 문맥에서 달리 명확하게 지시되지 않는 한, 복수의 대상을 포함한다. 유사하게, 단어 "또는"은 문맥에서 달리 명확하게 지시되지 않는 한, "및"을 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, "A 또는 B를 포함하는"은 A 또는 B, 또는 A 및 B를 포함하는 것을 의미한다. 추가로 핵산 또는 폴리펩타이드에 대해 주어진 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기 및 모든 분자량 또는 분자량 값은 근사값이며, 설명을 위해 제공되는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에 기재된 것과 유사 또는 동일한 방법 및 재료는 본 개시내용의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료는 이하에 기재된다.
- [0027] 본 발명은 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스로부터 추출된 WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질을 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드, 및 이로부터 유래된 대응하는 폴리펩타이드에 관한 것이다. 더 특별하게는, 본 발명은 WUSCHEL-관련 호메오박스4 상동체, 및 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 (둘다 황마 식물의 종임)뿐만 아니라 관련된 유전자 이식 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물에서 향상된 섬유질 수율에서의 그들의 용도를 제공한다. 효소를 암호화하는 본 발명의 게놈 서열은 우선 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 게놈 DNA의 뉴클레오타이드 서열의 다른 식물의 알려진 효소 유전자의 뉴클레오타이드 서열과 비교에 의해 동정된다. 본 발명에 앞서, 이들 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 유전자의 뉴클레오타이드 서열, 리딩 프레임, 엑손 및 인트론의 위치, 효소의 구조, 및 고 섬유 수율 가능성 황마 식물의 개발에서 그들의 잠재적 유용성은 알려져 있지 않았다.
- [0028] 상업적으로 재배된 황마 종인 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스의 게놈 서열 분석은 두 종 모두 섬유 생산을 향상시키기 위한 바람직한 촉매적 활성을 소유하는 효소에 대한 단일 유전자 암호를 가진다는 것을 나타내었다. 뉴클레오타이드 서열은, 추정적 암호 영역, 인트론 및 스플라이싱 접합(splice junction)을 동정할 수 있는 소프트웨어 프로그램, 예컨대 아우구스투스(Augustus), 세미-HMM-기반 핵산 파서(Semi-HMM-based Nucleic Acid Parser: SNAP), 게네이드(Geneid)(게놈 바이오인포메틱스 리서치 랩(Genome BioInformatics Research Lab))에 의해 주석이 달렸다. 암호 영역 및 다른 유전자 특징의 정확한 특성규명을 개선 및 확립하기 위해 뉴클레오타이드 서열의 추가 자동 및 수동 회복(curation)을 수행하였다.
- [0029] 코르코루스 올리토리우스로부터의 30,096 cDNA 및 코르코루스 캡슐라리스로부터의 37,031 cDNA 이상이 부분적으로 또는 완전히 시퀀싱되었다. 그들로부터, 황마에서 섬유질 생산을 향상시킴에 있어서 추정적 역할, 바람직한 촉매적 활성을 지니는 새로운 효소를 암호화하는 각각의 종으로부터의 단일 cDNA를 개발하였다.
- [0030] 오픈 리딩 프레임(ORF)은 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 mRNA로부터 유래된 cDNA 라이브러리의 클론의 전체 또는 부분적 시퀀싱에 따라 분석되었고, 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 그리고 데이터베이스(공용/사적)에서 알려진 서열에 대한 상동성을 결정함으로써 추가로 분석되었다.
- [0031] 본 개시내용과 관련하여, 본 명세서 전체적으로 사용되는 다수의 용어는 상이한 의미를 갖는 것으로 명확하게 표시되지 않는 한, 표시된 의미를 가진다.
- [0032] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "폴리뉴클레오타이드"는 핵산 단편과 같은 뉴클레오타이드 서열이다. 폴리뉴클레오타이드는 합성, 비천연 또는 변경된 뉴클레오타이드 염기를 선택적으로 함유하는 단일- 또는 이중-가닥인 RNA 또는 DNA의 중합체일 수 있다. DNA의 중합체 형태로 폴리뉴클레오타이드는 cDNA, 게놈 DNA, 합성 DNA, 또는 이들의 혼합물/조합물 중 하나 이상의 세그먼트를 포함하고/하거나 이루어질 수 있다. 본 발명의 단리된 폴리뉴클레오타이드는 서열번호 1 및, 서열번호 4로부터 유래된 150개의 연속적 뉴클레오타이드(상류와 하류 둘 다) 중 적어도 하나, 또는 이러한 서열의 상보체(complement)를 포함할 수 있다.
- [0033] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "폴리펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 함께 결합되고 보통 길이로 100개 초과 의 아미노산 서열을 갖는 아미노산의 단일 선형체이다.
- [0034] "단리된"은 천연 상태에서부터 "사람의 손에 의해" 변형됨을 의미한다. 조성물 또는 물질이 자연상태에서 생긴다

면, 그의 본래의 환경으로부터 변화 또는 제거되거나, 또는 둘 다인 경우, "단리되었다". 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 또는 살아있는 식물 또는 동물에 자연적으로 존재하는 폴리펩타이드는 "단리되지" 않지만, 천연 상태의 공존하는 물질로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 본 명세서에 사용되는 용어로서 "단리된다".

[0035] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "유전자"는 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물의 게놈 서열, 특히 황마에서 섬유질 생산을 향상시키기에 있어 바람직한 촉매적 활성화에 수반되는 WUSCHEL-관련 호메오박스4 효소의 폴리펩타이드 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열로서 정의된다. 상기 용어는 상류, 하류의 및/또는 인트론 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자를 추가로 포함할 수 있다.

[0036] "암호 서열" 또는 "암호 영역"은 서열이 발현될 때, 아미노산 또는 폴리펩타이드와 같은 유전자 산물을 생성하는데 필요한 서열 정보를 갖는 핵산 분자를 지칭한다. 암호 서열은 번역 영역 내에서 미번역 서열(인트론 또는 5' 또는 3' 미번역 영역을 포함)을 포함하고/하거나 이루어질 수 있거나, 또는 이러한 개재 미번역 서열(예를 들어, cDNA에서와 같음)이 없을 수 있다.

[0037] 본 명세서에 사용된 바와 같은 "올리고뉴클레오타이드"는 길이로 바람직하게는 10 내지 1000개, 가장 바람직하게는 12 내지 50개 뉴클레오타이드를 포함할 수 있는 짧은 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 일부이다. 본 발명의 실시형태에 대해, 올리고뉴클레오타이드 내에 함유된 뉴클레오타이드는 자연적으로 생기는 뉴클레오타이드의 유사체 또는 유도체일 수 있다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "프라이머"는 표적 핵산 서열에 결합할 수 있고 핵산 합성을 프라이밍 할 수 있는 올리고뉴클레오타이드이다. 본 명세서에 정의된 바와 같은 증폭 올리고뉴클레오타이드는 길이로 바람직하게는 10 내지 50개, 가장 바람직하게는 15 내지 25개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 더 나아가, 본 발명의 증폭 올리고뉴클레오타이드는 화학적으로 합성될 수 있고, 이러한 올리고뉴클레오타이드는 자연적으로 생기는 핵산이 아니다.

[0039] 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 지칭하기 위해 본 명세서 전체적으로 사용되는 약어는 전통적인 한 글자 약어이다. 따라서, 핵산에 포함될 때, 자연적으로 생기는 암호화 뉴클레오타이드는 다음과 같이 약칭된다: 아데닌(A), 구아닌(G), 사이토신(C), 티민(T) 및 유라실(U). 또한, 달리 구체화되지 않는 한, 본 명세서에 제시된 핵산 서열은 5' → 3' 방향이다.

[0040] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "상보적" 및 이들의 유도체는 A의 T 또는 U와의 쌍 및 C의 G와의 쌍의 잘 공지된 규칙에 의해 핵산의 짝지움과 관련하여 사용된다. 상보체는 "부분적" 또는 "상보적"일 수 있다. 부분적 상보체에서, 핵산 염기 중 일부만이 염기 짝지움 규칙에 따라 매칭되는 한편; 완전 또는 전체 상보체에서, 모든 염기는 짝지움 규칙에 따라 매칭된다. 핵산 가닥 간의 상보성 정도는 당업계에 잘 공지된 핵산 가닥 간의 혼성화 효율 및 강도에 대해 상당한 효과를 가질 수 있다. 상기 혼성화의 효율 및 강도는 검출 방법에 따른다.

[0041] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "숙주 세포"는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하고/하거나 이루어진 핵산 작제물 또는 발현 벡터를 이용하는 형질전환, 형질감염, 형질도입, 발현 등이 되기 쉬운 임의의 세포 유형을 포함한다. 적합한 숙주 세포는 진균 및/또는 식물 세포, 특히 식물 세포를 생성하는 인피 섬유투를 포함한다.

[0042] 용어 "작동가능하게 연결된"은 일반적으로 본 명세서에서 제어 서열이 폴리펩타이드의 암호 서열의 발현을 지시하도록 폴리뉴클레오타이드 서열의 암호 서열에 대해 적절한 위치에 제어 서열이 위치된 입체배치를 의미한다. 예를 들어, 프로모터는 그것의 해당 암호 서열의 발현에 영향을 미칠 때, 즉, 암호 서열이 프로모터의 전사 제어하에 있을 때, 암호 서열과 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0043] "벡터"는 일반적으로 다른 핵산 세그먼트가 세그먼트의 복제 또는 발현을 초래하도록 작동가능하게 삽입될 수 있는 플라스미드, 파지, 코스미드, 효모 또는 바이러스와 같은 레플리콘(replicon)을 지칭한다. 용어 "벡터"는 또한 그것이 연결된 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 한 유형의 벡터는 추가적인 DNA 세그먼트가 결합될 수 있는 환형 이중-가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 다른 유형의 벡터는, 추가적인 DNA 세그먼트가 바이러스 게놈 내로 결합될 수 있는 경우 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 그들이 도입되는 숙주 세포에서 자율적 복제를 할 수 있다(예를 들어, 박테리아의 복제기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유류 벡터). 다른 벡터는 숙주 세포 내로 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 마찬가지로 복제된다. 게다가, 특정 벡터는 그들이 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본 명세서에서 "재조합 발현 벡터"(또는 단순히, "발현 벡터")로서 지칭된다. 일

반적으로, 재조합 DNA 기법에서 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 벡터 형태이기 때문에 상호호환적으로 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동일한 기능을 하는 이러한 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터(예를 들어, 레플리콘 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노 관련 바이러스)를 포함하는 것으로 의도된다.

[0044] 용어 "핵산 작제물" 또는 "DNA 작제물"은 때때로 암호 서열 또는 적절한 조절 서열에 작동가능하게 연결되고 세포를 형질전환하기 위해 벡터에 삽입된 서열을 지칭하기 위해 사용된다. 이 용어는 용어 "형질전환 DNA" 또는 "이식유전자"와 상호호환적으로 사용될 수 있다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "프로모터"는 하류 유전자의 전사를 지시하는 작용을 하는 핵산 서열을 지칭한다. 프로모터는 일반적으로 표적 유전자가 발현 중인 숙주 세포에 적절할 것이다. 다른 전사 및 번역 조절 핵산 서열(또한 "제어 서열"로 지칭됨)과 함께 프로모터는 주어진 유전자를 발현시키는데 필요하다. 일반적으로, 전사 및 번역 조절 서열은 프로모터 서열, 리보솜 결합 부위, 전사 시작 및 중단 서열, 번역 시작 및 중단 서열 및 인핸서 또는 활성인자 서열을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0046] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "WUSCHEL 폴리펩타이드" 또는 "WUS 폴리펩타이드"는 wuschel 활성을 갖는, 즉, 식물에서 줄기 세포의 개시 및 유지에 수반되는 폴리펩타이드를 의미한다. Wuschel 활성은 줄기 세포를 포함하는 세포 성장을 자극한다. Wuschel은 도메인의 루프 및/또는 회전에서 추가 아미노산 잔기를 포함하는 '비전형적'(동물 호메오도메인 모티프에 비해) 나선-루프-나선-대-나선 호메오도메인 모티프를 포함하는 식물 호메오도메인 단백질이다. Wuschel 단백질은 다른 보존된 모티프, 예컨대 2개의 보존된 wuschel C-말단 도메인, 즉, (E/R)TLPLFP 및 A(A/S)LEL(S/T)L 도메인을 추가로 포함하고/하거나 이루어질 수 있다. 상기 용어는 또한 상기 언급한 기능 중 임의의 하나를 지니는 단편, 변이체 및 상동체를 포함한다.

[0047] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "상동체"는 당해 비변형 단백질에 대해 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입을 갖는 펩타이드, 올리고펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질 및 효소를 포함하고 그들이 유래된 비변형 단백질과 유사한 생물학적 및 기능적 활성을 갖는 단백질을 지칭한다.

[0048] 결실은 단백질로부터의 하나 이상의 아미노산의 제거를 지칭한다.

[0049] 삽입은 단백질에서 사전결정된 부위에 도입되는 하나 이상의 아미노산 잔기를 지칭한다. 삽입은 N-말단 및/또는 C-말단의 융합뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산의 서열내 삽입을 포함할 수 있다. 일반적으로, 아미노산 서열 내의 삽입은 약 1 내지 10개 잔기 규모의 N- 또는 C-말단의 융합보다 더 작을 것이다.

[0050] 치환은 단백질 아미노산의 유사한 특성(예컨대, 유사한 소수성, 친수성, 항원성, α -나선 구조 또는 β -시트 구조를 형성 또는 파괴하는 특성)을 갖는 다른 아미노산으로의 대체를 지칭한다. 아미노산 치환은 전형적으로 단일 잔기를 갖지만, 폴리펩타이드 상에 놓인 기능적 제약에 따라서 클러스터링될 수 있고, 1 내지 10개 아미노산의 범위에 있을 수 있으며; 삽입은 보통 약 1 내지 10개의 아미노산 잔기의 규모를 가질 수 있다. 아미노산 치환은 바람직하게는 보존적 아미노산 치환이다. 보존적 치환표는 당업계에 잘 공지되어 있다(예를 들어 문헌 [Creighton (1984) Proteins. W.H. Freeman and Company (Eds)] 및 이하의 표 1 참조).

표 1

[0051]

| 보존된 아미노산 치환의 예 | | | |
|----------------|----------|-----|---------------|
| 잔기 | 보존적 치환 | 잔기 | 보존적 치환 |
| Ala | Ser | Leu | Ile; Val |
| Arg | Lys | Lys | Arg; Gln |
| Asn | Gln; His | Met | Leu; Ile |
| Asp | Glu | Phe | Met; Leu; Tyr |
| Gln | Asn | Ser | Thr; Gly |
| Cys | Ser | Thr | Ser; Val |
| Glu | Asp | Trp | Tyr |
| Gly | Pro | Tyr | Trp; Phe |
| His | Asn; Gln | Val | Ile; Leu |
| Ile | Leu, Val | | |

[0052] 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입은 당업계에 잘 공지된 펩타이드 합성 기법, 예컨대 고체상 펩타이드 합성 및/또는 임의의 다른 합성 기법을 사용하여, 또는 재조합 DNA 조작에 의해 용이하게 만들어질 수 있다. 단백질의

치환, 삽입 또는 결실 변이체를 생성하기 위한 DNA 서열의 조작을 위한 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, DNA 내 사전결정된 부위에서 치환 돌연변이를 제조하기 위한 기법은 당업자에게 잘 공지되어 있고, M13 돌연변이유발, T7-Gen 시험관내 돌연변이유발(오하이오주 클리블랜드에 소재한 USB), 빠른 변화 부위 지정 돌연변이유발(Quick change site directed mutagenesis)(캘리포니아주 샌디에이고에 소재한 스트라타젠(Stratagene)), PCR-매개 부위-지정 돌연변이유발 또는 다른 부위-지정 돌연변이유발 프로토콜을 포함한다.

[0053] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "생물학적으로 활성인 부분"은 코르코루스 올리토리우스 또는 코르코루스 캡슐라리스 식물에서 체관부 섬유질질의 조성에서의 개시, 형성, 향상 또는 변화를 촉매하기 위한 생물학적 활성을 갖는 WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질의 단편을 지칭할 수 있다. WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질의 생물학적으로 활성인 부분은 전장 WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질보다 아미노산을 더 적게 포함하고, WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질의 적어도 하나의 활성을 나타내는, WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질의 아미노산 서열, 예를 들어, 서열번호 3 또는 서열번호 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열로부터 유래되거나 또는 충분히 동일한 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 폴리펩타이드를 포함한다. 전형적으로, 생물학적으로 활성인 부분은 WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질의 적어도 하나의 활성을 지니는 도메인 또는 모티프를 포함한다. WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질의 생물학적으로 활성인 부분은, 예를 들어, 길이로 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222 또는 223개의 아미노산인 폴리펩타이드일 수 있다.

[0054] WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질은 서열번호 3 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질은 서열번호 3 또는 서열번호 6과 실질적으로 동일하고, 서열번호 3 또는 서열번호 6의 단백질의 기능적 활성을 보유하며, 천연 대립유전자 변이 또한 돌연변이유발에 기인하여 아미노산 서열이 다르다. 다른 실시형태에서, WUSCHEL-관련 호메오박스4 단백질은 서열번호 3 또는 서열번호 6에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0055] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "도메인"은 진화적으로 관련된 단백질 서열의 배열에 따른 특이적 위치에서 보존된 아미노산의 세트를 지칭한다. 다른 위치에서 아미노산이 상동체 간에 다를 수 있지만, 구체적 위치에서 고도로 보존된 아미노산은 단백질의 구조, 안정성 또는 기능에 필수적일 가능성이 있는 아미노산을 나타낸다. 단백질 상동체 패밀리의 정렬된 서열에서 그들의 높은 보존도에 따라 동정하면, 그들은 당해 임의의 폴리펩타이드가 이전에 동정된 폴리펩타이드 패밀리에 속하는지 여부를 결정하기 위한 식별자로서 사용될 수 있다.

[0056] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "모티프"는 진화적으로 관련된 단백질의 서열에서 짧은 보존 영역을 지칭한다. 모티프는 도메인의 빈번하게 고도로 보존된 부분이지만, 또한 단지 도메인의 부분일 수 있거나, 또는 (모티프의 모든 아미노산이 정해진 도메인 밖에 속한다면) 보존된 도메인 밖에 위치될 수 있다.

[0057] 도메인의 식별을 위한 전문가용 데이터베이스, 예를 들어, 스마트(SMART)(Schultz et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 5857-5864; Letunic et al. (2002) Nucleic Acids Res 30, 242-244), 인터프로(InterPro)(Mulder et al., (2003) Nucl. Acids. Res. 31, 315-318), 프로사이트(Prosite)(Bucher and Bairoch (1994), A generalized profile syntax for biomolecular sequences motifs and its function in automatic sequence interpretation. (In) ISMB-94; Proceedings 2nd International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Altman R., Brutlag D., Karp P., Lathrop R., Searls D., Eds., pp53-61, AAAI Press, Menlo Park; Hulo et al., Nucl. Acids. Res. 32:D134-D137, (2004)), 또는 Pfam(Bateman et al., Nucleic Acids Research 30(1): 276-280 (2002))가 존재한다. 단백질 서열의 인실리코(in silico) 분석을 위한 도구의 세트는 ExPASy 프로테오믹스(proteomics) 서버에 대해 이용가능하다(Swiss Institute of Bioinformatics (Gasteiger et al., ExPASy: The Proteomics Server for In-Depth Protein Knowledge and Analysis, Nucleic Acids Res. 31:3784-3788(2003)). 도메인 또는 모티프는 또한 서열 정렬에 의하는 것과 같은 일상적인 기법을 사용하여 동정될 수 있다.

[0058] 본 발명의 목적을 위해, "유전자 이식", "이식유전자" 또는 "재조합체"는, 예를 들어 본 발명에 따른 핵산 서열, 발현 카세트 또는 벡터, 재조합 방법에 의해 초래된 모든 해당 작제물을 이용하여 형질전환된 핵산 서열 또는 유기체를 포함하고/하거나 이루어진 핵산 서열, 발현 카세트, 유전자 작제물 또는 벡터에 대한 의미이며, 이때: (a) 본 발명의 방법에서 유용한 단백질을 암호화하는 핵산 서열, 또는 (b) 본 발명에 따른 핵산 서열과 작동가능하게 연결된 유전자 제어 서열(들), 예를 들어 프로모터, 또는 (c) a) 및 b)는 그들의 천연 유전자 환경에 위치되지 않거나 또는 재조합 방법에 의해 변형되었다. 변형은, 예를 들어, 하나 이상의 뉴클레오타이드

잔기의 치환, 첨가, 결실, 역위 또는 삽입의 형태를 취할 수 있다. 천연 유전자 환경은 본래 식물에서의 천연 게놈 또는 염색체 좌위 또는 게놈 라이브러리에서의 존재를 의미하는 것으로 이해된다. 게놈 라이브러리의 경우에, 핵산 서열의 천연 유전자 환경은 바람직하게는 적어도 부분적으로 유지된다. 환경은 적어도 한 측에 대해 핵산 서열에 축적하고, 약 50 bp, 바람직하게는 약 500 bp의 서열 길이를 가진다. 자연적으로 생기는 발현 카세트 - 예를 들어 상기 정의한 바와 같은 본 발명의 방법에서 유용한 폴리캡타이드를 암호화하는 대응하는 핵산 서열과 핵산 서열의 천연 프로모터의 자연적으로 생기는 조합 -는 이 발현 카세트가 비천연, 합성("인공적") 방법, 예를 들어 돌연변이유발 치료에 의해 변형될 때, 유전자 이식 발현 카세트가 된다. 적합한 방법은, 예를 들어 미국 특허 제5,565,350호(참고로 포함됨) 또는 WO 00/15815호에 기재되어 있다(참고로 포함됨).

[0059] 따라서 본 발명의 목적을 위한 유전자 이식 식물은 본 발명의 방법에서 사용되는 핵산이 상기 식물의 게놈 내 그들의 천연 좌위에 있지 않은 해당 식물을 포함하는 것으로 이해되며, 따라서 핵산은 상동성으로 또는 이종성으로 발현될 수 있다. 그러나, 언급한 바와 같이, 유전자 이식은 또한 본 발명에 따르거나 또는 본 발명의 방법에서 사용되는 핵산은 식물의 게놈에서 그들의 천연 위치에 있지만, 서열은 천연 서열에 대해 변형되었다는 것 및/또는 천연 서열의 조절 서열이 변형되었다는 것을 의미한다. 유전자 이식은 바람직하게는 핵산의 상동성 또는 바람직하게는 이종성 발현이 일어나는 게놈 내 비천연 좌위에서 본 발명에 따른 핵산의 발현을 의미하는 것으로 이해된다.

[0060] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "도입" 또는 "형질전환"은 전달을 위해 사용되는 방법과 관계없이, 숙주 세포 내로 외인성 폴리뉴클레오타이드의 전달을 포함한다. 기관형성이든 배아발생이든 후속 클론을 증식시킬 수 있는 식물 조직은 본 발명의 유전자 작제물 및 그것으로부터 재생된 전체 식물로 형질전환될 수 있다. 선택된 특정 조직은 형질전환 중인 특정 종에 대해 이용가능하고 가장 적합한 클론 증식 시스템에 따라서 다를 것이다. 예시적인 조직 표적은 엽편, 화분, 배아, 자엽, 하배축, 자성배우자체, 유합 조직, 기존의 분열조직(예를 들어, 정단분열조직, 액아, 및 뿌리 분열조직), 및 유도 분열조직 조직(예를 들어, 자엽 분열조직 및 하배축 분열조직)을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 내로 일시적으로 또는 안정하게 도입될 수 있고, 예를 들어 플라스미드로서 비통합 형태로 유지될 수 있다. 대안적으로, 이는 숙주 게놈 내로 통합될 수 있다. 이어서, 얻어진 형질전환된 식물 세포는 당업자에게 공지된 방식으로 형질전환 식물을 재생하기 위해 사용될 수 있다.

[0061] 외래 유전자의 식물의 게놈 내로의 전달은 형질전환으로 불린다.

[0062] 식물 종의 형질전환은 이제 상당히 일상적인 기법이다. 유리하게는, 임의의 몇몇 형질전환 방법은 적합한 선조 세포 내로 관심 대상의 유전자를 도입하는데 사용될 수 있다. 식물 조직 또는 식물 세포로부터 형질전환 및 재생에 대해 기재된 방법은 일시적 또는 안정한 형질전환을 위해 이용될 수 있다. 형질전환 방법은 리포솜의 사용, 전기천공법 및 유리 DNA 흡수를 증가시키는 화학물질, 식물 내로 직접적으로 DNA의 주사, 입자총, 바이러스 또는 화분을 사용하는 형질전환 및 마이크로투사(microprojection)를 포함한다. 유전자 이식 농작물을 포함하는 유전자 이식 식물은 바람직하게는 아그로박테리움(Agrobacterium)-매개 형질전환을 통해 생성된다. 유리한 형질전환 방법은 식물에서의 형질전환이다(Sajib et. al. Plant Cell Tiss. Organ Cult. (2008) 95, 333-34).

[0063] 일반적으로, 형질전환 후에, 식물 세포 또는 세포 그룹화는 관심 대상의 유전자와 공동 전달된 식물-발현가능 유전자에 의해 암호화된 하나 이상의 마커 존재에 대해 선택되고, 이 후에 형질전환된 물질은 전체 식물로 재생된다. 형질전환된 식물을 선택하기 위해, 형질전환에서 얻은 식물 물질은 대체로 형질전환된 식물이 비형질전환 식물과 구별될 수 있는 선택적 조건으로 실시된다. 예를 들어, 상기 기재한 방식으로 얻은 종자를 심을 수 있고, 초기 성장 기간 후에, 분무에 의해 적합하게 선택될 수 있다. 추가 가능성은, 적절하다면 멸균 후에 적합한 선택 작용제를 사용하여 한천 플레이트 상에서 종자를 생장시키는 것으로 이루어지며, 따라서 형질전환 종자만이 식물로 생장할 수 있다. 대안적으로, 형질전환 식물은 상기 기재한 것과 같은 선택적 마커의 존재에 대해 선별된다.

[0064] DNA 전달 및 재생 후에, 추정적으로 형질전환된 식물은 또한, 예를 들어 사우던 분석을 사용하여, 관심 대상의 유전자의 존재, 복제수 및/또는 게놈 조직화에 대해 평가될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 새로 도입된 DNA의 발현 수준은 노던 및/또는 웨스턴 분석(둘 다 당업자에게 잘 공지되어 있음)을 사용하여 모니터링될 수 있다.

[0065] 발생된 형질전환 식물은 클론의 증식 또는 고전적 육종 기법과 같은 다양한 수단에 의해 증식될 수 있다. 예를 들어, 제1 발생(또는 T1) 형질전환 식물은 그 자체일 수 있고, 동형접합적 제2 발생(또는 T2) 형질전환체가 선택될 수 있으며, 이어서, T2 식물은 고전적 육종 기법을 통해 추가로 증식될 수 있다. 발생된 형질전환 유기체

는 다양한 형태를 취할 수 있다. 예를 들어, 그들은 형질전환 세포 및 비형질전환 세포의 키메라; 클론 형질전환체(예를 들어, 발현 카세트를 함유하도록 형질전환된 모든 세포); 형질전환 및 비형질전환 조직의 접합물(예를 들어, 식물에서, 비형질전환 자손에 접합된 형질전환 뿌리)일 수 있다.

[0066] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "증가된 발현" 또는 "과발현"은 본래의 야생형 발현 수준에 추가적인 임의의 발현 형태를 지칭한다.

[0067] 유전자 또는 유전자 산물의 발현을 증가시키기 위한 방법은 당업계에 잘 보고되어 있고, 예를 들어, 적절한 프로모터에 의해 구동되는 과발현, 전사 인핸서 또는 번역 인핸서의 사용을 포함한다. 프로모터 또는 인핸서 구성요소로서 작용하는 단리된 핵산은 관심 대상의 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산의 발현을 상향조절하기 위한 폴리뉴클레오타이드의 비상동이 아닌 형태의 적절한 위치(전형적으로 상류)에서 도입될 수 있다. 예를 들어, 내인성 프로모터는 돌연변이, 결실 및/또는 치환에 의해 생체내에서 변경될 수 있거나(Kmiec, 미국 특허 제 5,565,350호; Zarling et al., WO9322443호), 또는 단리된 프로모터는 유전자의 발현을 제어하기 위해 본 발명의 유전자의 적절한 배향 및 거리에서 식물 세포 내에 도입될 수 있다.

[0068] 폴리펩타이드 발현이 요망된다면, 폴리뉴클레오타이드 암호 영역의 3'-말단에서 폴리아데닐화 영역을 포함하는 것이 일반적으로 바람직하다. 폴리아데닐화 영역은 천연 유전자로부터 유래되거나, 다양한 다른 식물 유전자로부터 유래되거나, 또는 T-DNA로부터 유래될 수 있다. 첨가될 3' 말단 서열은, 예를 들어, 노팔린 합성효소 또는 옥토펙 합성효소 유전자로부터 유래되거나, 또는 대안적으로 다른 식물 유전자로부터, 또는 덜 바람직하게는 임의의 다른 진핵 유전자로부터 유래될 수 있다.

[0069] 인트론 서열은 또한 부분적 암호 서열의 암호 서열에 첨가되어 5' 미번역 영역(untranslated region: UTR) 또는 사이토졸에 축적하는 성숙 메시지의 양을 증가시킬 수 있다. 식물과 동물 발현 작제물 둘 다에서 전사 단위 내에 스플라이싱 가능한 인트론의 포함은 mRNA와 단백질 수준 둘 다에서 유전자 발현을 1000배까지 증가시키는 것으로 나타났다(Buchman and Berg (1988) Mol. Cell Biol. 8: 4395-4405; Callis et al. (1987) Genes Dev 1:1183-1200). 유전자 발현의 이러한 인트론 향상은 전사 단위의 5' 말단 근처에 위치될 때 전형적으로 가장 크다. 메이즈 인트론 Adh1-S 인트론 1, 2 및 6의 사용, 브론즈(Bronze)-1 인트론은 당업계에 공지되어 있다. 일반적인 정보에 대해: 문헌[The Maize Handbook, Chapter 116, Freeling and Walbot, Eds., Springer, N.Y. (1994)]을 참조한다.

[0070] 2개의 아미노산 서열의 또는 2개의 핵산 서열의 동일성%를 결정하기 위해, 서열은 최적의 비교 목적을 위해 정렬될 수 있다(예를 들어, 갭은 최적의 정렬을 위해 제1 및 제2 아미노산 중 하나 또는 둘 다 또는 핵산 서열에 도입될 수 있고, 비동일 서열은 비교 목적을 위해 무시될 수 있다). 비교 목적을 위해 정렬된 기준 서열의 길이는 기준 서열 길이의 적어도 95%일 수 있다. 이어서, 대응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드는 비교될 수 있다. 제1 서열 내 위치가 제2 서열 내 대응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드에 의해 점유될 때에, 분자는 해당 위치에서 동일하다(본 명세서에 사용되는 바와 같은 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동일하다). 두 서열 간의 동일성%는 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이며, 두 서열의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 수, 각각의 갭의 길이를 고려한다.

[0071] 서열의 비교 및 두 서열의 동일성%의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다. 일 실시형태에서, 두 아미노산 서열 간의 동일성%는 블로섬(Blosum) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 중 하나, 및 갭 가중치 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하여 GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 이용가능)에서 GAP 프로그램에 포함되는 니들만 및 분슈(Needleman and Wunsch)(J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 두 뉴클레오타이드 서열 간의 동일성%는 NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 갭 가중치 40, 50, 60, 70 또는 80 및 길이 가중치 1, 2, 3, 4, 5 또는 6을 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>) GAP 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 다른 실시형태에서, 두 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열 간의 동일성%는 PAM120 가중치 잔기표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하여 ALIGN 프로그램(버전 2.0 또는 2.0U) 내로 포함되는 문헌[E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17 (1988))]의 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다.

[0072] 두 서열 간의 동일성을 결정하기 위해 사용될 수 있는 예시적인 컴퓨터 프로그램은, 예를 들어, www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST에서 공공연하게 접근가능한 BLAST 프로그램, 예를 들어, BLASTN, BLASTX 및 TBLASTX, BLASTP 및 TBLASTN의 세트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0073] 서열 검색은 전형적으로 젠뱅크(GenBank) DNA 서열 및 기타 공용 데이터베이스에서 핵산 서열에 대해 주어진 핵산 서열을 평가할 때, BLASTN 프로그램을 사용하여 수행된다. BLASTX 프로그램은 젠뱅크 단백질 서열 및 기타 공용 데이터베이스에서 아미노산 서열에 대한 모든 리딩 프레임에서 번역된 핵산 서열을 검색하는데 바람직하다.
- [0074] 2 이상의 서열 간의 "동일성%"를 결정하기 위해 선택한 서열의 바람직한 정렬은, 예를 들어 CLUSTAL-W 프로그램을 사용하여 수행된다.
- [0075] 제시한 바와 같이, 본 발명의 일 실시형태는 각각 서열번호 2 및 서열번호 5로 제시되는 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 포함하고/하거나 이루어진 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스에서 발견되는 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드이다. 대응적으로, 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 각각의 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드는 서열번호 3 및 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 가진다. 본 발명의 실시형태에 따르면, 서열번호 3은 코르코루스 올리토리우스-유래 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 상동체의 폴리펩타이드 서열을 지칭하며, 서열번호 6은 코르코루스 캡슐라리스-유래 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 상동체의 폴리펩타이드 서열을 지칭한다. 이들 효소는 둘 다 식물에서 섬유질 세포의 생합성을 프라임하기 위한 개시제 분자를 촉매하기 위해 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물에서 섬유질의 생합성 경로에 존재한다.
- [0076] 본 발명은 또한 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물로부터의 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 상동체를 암호화하는 유전자 서열을 제공한다.
- [0077] 일 실시형태에서, 서열번호 1에서 예시되는 1250bp 길이 폴리뉴클레오타이드는 코르코루스 올리토리우스로부터 단리된 전장 유전자이다. 이 유전자 서열은 유전자의 상류와 하류 둘 다로부터 적어도 150개의 연속적 뉴클레오타이드를 포함한다. 이는 또한 유전자의 인트론 서열을 제공한다.
- [0078] 다른 실시형태에서, 서열번호 4에서 예시되는 1237 bp 길이 폴리뉴클레오타이드는 코르코루스 캡슐라리스로부터 단리된 전장 유전자이다. 이 유전자 서열은 유전자의 상류와 하류 둘 다로부터 적어도 150개의 연속적 뉴클레오타이드를 포함한다. 이는 또한 유전자의 인트론 서열을 제공한다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 실시형태는, 서열번호 2 및/또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 서열번호 2는 코르코루스 올리토리우스-유래 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 상동체 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭하며, 서열번호 5는 코르코루스 캡슐라리스-유래 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 상동체 서열의 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.
- [0080] 또 다른 실시형태에서, WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드, 또는 이들의 생물학적으로 활성인 단편을 암호화할 수 있는 단리된 핵산 분자는 서열번호 2, 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이들의 임의의 상보체의 전체 길이에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9% 이상 동일한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0081] 일 실시형태에서, 서열번호 2에 예시된 669bp 길이 폴리뉴클레오타이드는 약 25.54kD의 실측 분자량을 지니는, 서열번호 3에서와 같이 222개 아미노산 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 나타내는 전장 cDNA 클론 암호화된 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 단백질이다. 서열번호 3의 SMART 분석을 통해, 이는 서열 내 호메오박스 도메인의 존재를 나타낸다. 이는 식물의 중요한 발생 과정의 전사 조절에 수반되는 DNA-결합 인자이다. 이는 식물의 유관 세포 증식에 수반된 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 단백질이다.
- [0082] 일 실시형태에서, 서열번호 5에 예시된 672bp 길이 폴리뉴클레오타이드는 약 25.67kD의 실측 분자량을 지니는, 서열번호 6에서와 같은 223개 아미노산 폴리펩타이드를 암호화하는 오픈 리딩 프레임을 나타내는 전장 cDNA 클론 암호화된 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 단백질이다. 서열번호 6의 SMART 분석을 통해, 이는 서열 내 호메오박스 도메인의 존재를 나타낸다. 이는 식물의 중요한 발생 과정의 전사 조절에 수반되는 DNA-결합 인자이다. 이는 식물의 유관 세포 증식에 수반된 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 단백질이다.
- [0083] 본 발명의 실시형태에 따르면, 서열번호 2에 예시된 단리된 폴리뉴클레오타이드는 코르코루스 올리토리우스 식물로부터 단리된 전체 RNA를 사용하여 유전자의 보존된 영역의 PCR 증폭에 의해 얻어질 수 있고, 서열번호 5는 코르코루스 캡슐라리스 식물로부터 단리된 전체 RNA를 사용하여 이 유전자의 보존된 영역의 PCR 증폭에 의해 얻어질 수 있다. 앞서 언급한 설명에서 제시한 바와 같이, 적용된 코르코루스 올리토리우스 식물은 0-4 품종이고, 적용된 코르코루스 캡슐라리스는 CVL-1 품종이다.

- [0084] 본 발명의 다른 실시형태는, 서열번호 2 및/또는 서열번호 4에 제시된 뉴클레오타이드 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 유전자 작제물이 개시되되, 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포에서 발현가능하고, 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물에서 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 단백질의 상동체를 생성하도록 번역가능하다. 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물로부터 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)의 증폭, 클로닝 및 서열화를 위한 절차는 실시예 2에서 추가로 상술된다. 바람직하게는, 재조합 유전자 작제물은 폴리뉴클레오타이드 주형의 발현을 향상시키기 위해 작동가능하게 연결된 프로모터 영역을 추가로 포함한다. 특이적 프로모터의 전사 제어 하에서, 이어서, 서열번호 2 및/또는 서열번호 4의 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 재조합 유전자 작제물 내에서의 암호 영역의 발현은 향상되어 더 고수율의 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 단백질을 야기할 수 있다.
- [0085] 본 발명의 실시형태에 따르면, 조절된 발현은 증가된 발현 또는 활성, 예를 들어, WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드 암호화 핵산 분자의, 예를 들어, 서열번호 2 및 서열번호 5를 암호화하는 핵산 분자의 과발현이다. 핵산 또는 유전자, 또는 유전자 산물의 발현을 증가시키기 위한 방법은 당업계 잘 보고되어 있고, 실시예는 정의의 부문에서 제공된다.
- [0086] 본 발명은 또한 상기 본 명세서에 정의된 바와 같은 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드를 암호화하는 임의의 핵산의 식물에서 도입 및 발현을 포함하는, 대조군 식물에 비해 향상된 섬유질 수율을 갖는 유전자 이식 식물의 생산을 위한 방법을 제공한다.
- [0087] 더 구체적으로는, 본 발명은 무효(null) 대조군 식물에 비해 향상된 섬유질 수율을 갖는 유전자 이식 식물의 생산을 위한 방법을 제공하되, 상기 방법은:
- [0088] (i) WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드-암호화 핵산을 포함하고/하거나 이루어진 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드-암호화 핵산 또는 유전자 작제물을 식물 또는 식물 세포에 도입 및 발현시키는 단계; 및
- [0089] (ii) 섬유질 세포 생장 및 발생을 촉진하는 조건하에서 식물 세포를 배양하는 단계를 포함한다.
- [0090] 본 발명의 다른 양태는 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이며, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 분자를 포함하는 코르코루스 올리토리우스 식물로부터 유래된다:
- [0091] a) 서열번호 2에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자; 및
- [0092] b) 서열번호 2에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자.
- [0093] 특정 실시형태에서, 코르코루스 올리토리우스 식물은 품종 0-4이다.
- [0094] 본 발명의 다른 양태는 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이며, 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 분자를 포함하는, 코르코루스 캡슐라리스 식물로부터 유래된다:
- [0095] a) 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자; 및
- [0096] b) 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자.
- [0097] 특정 실시형태에서, 코르코루스 캡슐라리스 식물은 품종 CVL-1이다.
- [0098] 본 발명의 다른 양태는 서열번호 3에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단리된 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드, 또는 이의 생물학적으로 활성인 단편에 관한 것이되, 상기 폴리펩타이드는 개시, 형성, 향상 및 변형을 촉매하는 것으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 기능을 포함함으로써 코르코루스 올리토리우스 식물에서 체관부 섬유질의 조성을 변형시킨다.
- [0099] 특정 실시형태에서, 코르코루스 올리토리우스 식물은 품종 0-4이다.
- [0100] 특정 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 포함한다.

- [0101] 본 발명의 다른 양태는 서열번호 6에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 단리된 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드, 또는 이의 생물학적으로 활성인 단편에 관한 것이며, 상기 폴리펩타이드는 개시, 형성, 향상 및 변형을 촉매하는 것으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 기능을 포함함으로써 코르코루스 캡슐라리스 식물에서 체관부 섬유질의 조성을 변형시킨다.
- [0102] 특정 실시형태에서, 코르코루스 캡슐라리스 식물은 품종 CVL-1이다.
- [0103] 특정 실시형태에서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 포함한다.
- [0104] 본 발명의 다른 양태는:
- [0105] a) 서열번호 2 또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이들의 상보체를 포함하는 핵산 분자; 및
- [0106] b) 서열번호 2 또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이들의 상보체에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 유전자 작제물에 관한 것인; 폴리뉴클레오타이드는 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스 식물에서 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드의 상동체를 생성하기 위해 숙주 세포에서 발현가능하다.
- [0107] 특정 실시형태에서, 상기 작제물은
- [0108] a) 서열번호 2 또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자; 또는
- [0109] b) 서열번호 2 또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자에 작동가능하게 연결된 프로모터 영역을 추가로 포함하되, 상기 프로모터는 핵산 분자의 전사 또는 발현을 향상시킨다.
- [0110] 본 발명의 다른 양태는:
- [0111] a) 서열번호 2 또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자; 및
- [0112] b) 서열번호 2 또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드를 발현시킬 수 있는 재조합 유전자 작제물을 포함하는 형질전환체에 관한 것인; 상기 형질전환체는 WUSCHEL-관련 호메오박스4 폴리펩타이드의 상동체를 생성한다.
- [0113] 본 발명의 다른 양태는 대조군 식물에 비해 증가 또는 향상된 섬유질 수율을 갖는 식물 또는 유전자 이식 식물을 생성하는 방법에 관한 것인:
- [0114] a) i) 서열번호 2 또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자; 및 ii) 서열번호 2 또는 서열번호 5에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 상보체를 포함하는 핵산 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 유전자 작제물을 식물 세포에 도입하는 단계; 및
- [0115] b) 식물 성장 및 발생을 촉진하기 위한 조건 하에서 식물 세포를 배양하는 단계; 및
- [0116] c) i) 서열번호 3 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 또는 이의 생물학적으로 활성인 단편; 및 ii) 서열번호 3 또는 서열번호 6에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩타이드를 발현시키는 단계를 포함한다.
- [0117] 본 발명에 의해 제공되는 서열은 또한 요구되는 과정에서 효소가 더 양호하게 수행되도록 할 수 있는 특징을 지니는 신규한 효소의 합리적 변형 또는 설계를 위한 예비 물질로서 사용될 수 있다.
- [0118] 본 개시내용은 첨부하는 특허청구범위뿐만 아니라 앞서 언급한 설명에 함유된 것을 포함한다. 본 발명은 특이도를 지니는 그의 바람직한 형태로 기재되지만, 바람직한 형태의 본 개시내용은 단지 예로서 만들어지고, 구성의 상세한 설명에서 수치 변화 및 부분의 조합 및 배열은 본 발명 및 특허청구범위의 범주로부터 벗어나는 일 없이 의존할 수 있다는 것이 이해된다.
- [0119] 다양한 참고문헌이 본 명세서에 열거되며, 이의 개시내용은 그의 전문이 참고로 포함된다.

[0120] 실시예

[0121] 다음의 실시예는 그것에 기재된 구체적 실시형태로 예시하는 것으로 본 발명에 대한 임의의 의도 없이 본 명세서에 기재된 구체적 실시형태를 제한하는 것으로 의도된다.

[0122] 실시예 1 프라이머의 설계 및 합성

[0123] 본 연구에서 사용한 프라이머는, 완전한 ORF를 이용하여 수동으로 서열을 선택함으로써 또는 유사한 유전자가 다른 식물로부터 성공적으로 단리된 경우의 데이터베이스를 사용하여, 수동으로 생성한 전사체로부터 그리고 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스의 게놈 서열로부터 예측한 "유전자 모델"로부터 설계하였다. NCBI BLAST, BLASTP, RPS-BLAST, BLASTX 및 PSI-BLAST를 사용하여 전사체로부터 얻은 뉴클레오타이드 서열의 비교 생물정보학적 분석을 수행하여, 관련 유전자의 상동체를 그리고 유전자의 적절한 식별에 대해 동정하였다. 다중 서열을 "유전자 풀"로부터 발견하였을 때 clustalW 버전 1.82를 통해 뉴클레오타이드 서열 정렬을 수행하였다. 이어서, 정렬을 편집하였다. 유전자 특이적 프라이머(정방향과 역방향 둘 다)를 수동으로 또는 프라이머(Primer) 3 플러스 툴을 통해 선택하고 나서, 프라이머를 맞춤 합성하였다.

[0124] 본 연구에서 사용되는 모든 올리고뉴클레오타이드를 합성하고, 인테그레이티드 DNA 테크놀로지스(Integrated DNA Technologies: IDT)로부터 획득하였다. 약 100pmol의 저장액을 오토클레이브 ddH₂O에서 준비하고 나서 사용을 위해 알리쿼드 중에서 약 -20℃에서 저장하였다.

| 프라이머 | 서열번호 | 올리고뉴클레오타이드 서열 | cDNA로부터 |
|-------|------|-----------------------|---------|
| 명칭 | | | 증폭된 산물 |
| COL F | 1 | CCATGGGAAACATGAAGGTGC | 682 |
| COL R | 1 | TGAAACGTCATCATCTGCCT | |
| CCA F | 4 | CCATGGGAAACATGAAGGTGC | 675 |
| CCA R | 4 | TTCATGATCTGCCTTCCGGG | |

[0125]

[0126] 실시예 2 코르코루스 올리토리우스 및 코르코루스 캡슐라리스로부터의 WUSCHEL-관련 호메오박스4의 증폭, 클로닝 및 서열화

[0127] 전체 RNA를 문헌[Chomczynski P and Sacchi N]에 의해 이미 기재된 바와 같이(산 구아니디늄 티오사이아네이트-페놀-클로로포름 추출에 의한 RNA 단리), MS 배지 상에서 생장시킨 3일령의 파종물로부터 단리시켰다(Anal Biochem 1987, 162: 156-159). RNA의 질 또는 무결성을 아가로스 겔 전기영동에 의해 확인하고 나서, 표준 절차에 따라 써모 사이언티픽 나노 드롭 2000(Thermo Scientific Nano Drop 2000)을 사용하여 정량화하였다. cDNA 제1 가닥을 제조업자의 설명서에 따라 슈퍼스크립트 III 역 전사효소(SuperScript III reverse transcriptase)(인비트로젠(Invitrogen))를 사용하여 합성하였다. 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 cDNA로부터 유전자를 증폭시켰다. PCR 반응물(50μl)은 1μl의 cDNA, 20pmol의 각각의 프라이머, 5μl의 10X PCR 완충제, 5μl의 2.5 mM dNTP 혼합물 및 1.0 단위의 PfuTaq DNA 중합효소를 함유하였다. 다음의 조건을 사용하여 열순환기(Thermal Cycler)(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems))에서 PCR을 수행하였다: 대략 95℃에서 약 5분 동안 초기 변성 후 35주기의 대략 95℃에서 약 30초 동안 변성, 대략 59 내지 61℃에서 약 30초 동안 어닐링 및 대략 72℃에서 약 1분 동안 연장, 대략 72℃에서 약 7분 동안 최종 연장. 1X TAE 완충제를 사용하여 1% 아가로스 겔에 의해 PCR 산물을 분석하고 나서, 제조업자의 설명서에 따라 퀴아젠(QIAGEN) 겔 추출 키트로부터 앰플리콘을 용리시켰다. 정제한 PCR 산물을 pCR(등록상표)8/GW/TOPO(등록상표) TA 클로닝 키트(인비트로젠)에 결합시키고 나서, 수용성(competent) 대장균(*E. coli*) 세포(인비트로젠)로 형질전환시켰다. 플라스미드를 제조업자의 설명서에 따라 QIAprep 스핀 미니프랩 키트(퀴아젠)를 사용하여 추정적 균집으로부터 단리시켰다. 삽입의 존재를 유전자 특이적 프라이머를 사용함으로써 확인하고 나서, 양성 플라스미드에 서열화를 실시하였다.

[0128] 실시예 3 서열의 분석

[0129] 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열을 각각 BLASTN 및 BLASTP 프로그램에 의해 분석하였다. 다른 식물로부터

보고한 서열을 ClustalW를 이용하여 정렬하였다. 이웃 결합(Neighbour Joining: NJ)을 사용하여 계통발생분석을 수행하였다.

[0130] 실시예 4 섬유질 생합성의 경로 구성

[0131] 섬유질 생합성에서 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4)의 역할을 보여주는 자동 대사 경로 재구성을 아라비도시스 게놈과 비교하여 코르코루스 올리토루스 및 코르코루스 캡슐라리스 단백질로부터의 오솔로그(ortholog)를 동정함으로써 구성하였다. 코르코루스 올리토루스 및 코르코루스 캡슐라리스 게놈 내에서 암호화된 WUSCHEL-관련 호메오박스4(WOX4) 측매된 효소적 반응을 패스웨이 스튜디오(Pathway Studio)에 대한 레스넷-플랜트 3.0(Resnet-Plant 3.0) 데이터베이스에서만 아니라 대사 경로 데이터베이스로부터 이용가능한 효소 반응을 사용하여 구성하였다.

[0132] 참고문헌에 의한 포함

[0133] 본 명세서에 인용된 모든 미국 특허, 미국 공개 특허 출원 및 공개된 PCT 출원은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0134] 균등론

[0135] 본 발명의 몇몇 실시형태가 기재되고 본 명세서에 예시되었지만, 당업자는 기능을 수행하고/하거나 본 명세서에 기재된 결과 및/또는 이점 중 하나 이상을 얻기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 용이하게 생각할 것이고, 각각의 이러한 변화 및/또는 변형은 본 발명의 범주 내인 것으로 여겨진다. 당업자는 일상적인 일인 실험, 본 명세서에 기재된 발명의 구체적 실시형태에 대한 다수의 동등물을 사용하여 인식하거나, 확인할 수 있다. 따라서, 앞서 언급한 실시형태는 단지 예로서 제시되며, 첨부하는 특허청구범위 및 그에 대한 동등물의 범주 내에서; 본 발명은 구체적으로 설명되고 특허청구되는 것과 다르게 실행될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

서열번호 : 1
길이 : 1250 bp
유형 : DNA
특징명/설명 : 150 bp 5' UTR 및 150 bp 3' UTR 을 포함하는 인트론, 엑손
유기체 : 황마, 코르코루스 올리토루스

```
ACCTCATCATTTGGTCTTGGTTCTTCAAAGCACCACCTCATATCCCACTTTCTTTTCTTTTCTTTT
TTTTAAAATTTTTATTTTTTGGGTTAAATTTATTTTTGTTATTATATAATCAGAGCATTCTCCCCAT
CATTCACTCCTTCACCATGGGAAACATGAAGGTGCATCAGTTGGCACGTGGCTTATGGGAGCATGAA
CCCTCCCTCTCCCTTGGTTGCAAGCGCTTACGCCCTCTTGCTCCCAAGCTCCACCCCTTCTCTTCCC
CTGATCATACTTCCGTCTCTCTTTTCGACCTTAAGACCTTCATTTCGTCCCGAAAGTGGCCCCGAAA
ACTTTGCCCTTCTGACGACAAGCGAGATTCTCATTCTCCCCAGGTACTTACAAATATCCATGAAATG
AAACCCTTTTTATTTTTTCCAATGATGTATATAATTAGTGGGGAAGGATAAGATTTTGAACCTTACGATG
AACATAACAGTGTGGAAAGTTGATAATCAAAGGTTAAGAATGTGAAGCTGAACTTTTTTCTTTTTT
TTTGGTTATGTAGGTGGAAACGCACCCAGGGGGAACGCGGTGGAATCCGACGCAAGAGCAGATAGGG
ATATTGGAGATGCTGTATAGAGGTGGGATGCGAACTCCAAATGCACAGCAAATAGAACAGATCACTG
CACAGTTAGGCAAGTACGGGAAGATCGAAGGCAAAAACGTTTTCTATTGGTTCCAAAACCACAAAGC
ACGCGAAAGGCAAAAGCAGAAGCGTAACAGTCTTGGTCTTAGCCATTCTCCAGAACTCTGCTCCC
ATTACCACCATAACTTTGGACTCTAGGGTAAGTTCAAACCAACAAAACCCCTTTCTTTGTATATATAT
AACGGTTAGTTTTTGTATTTTACTTCTTATAAACAGCAATTAACATTAATGTTTTTGTATATATA
TAGGGGGAAGTAATGGAGAGAGAGGAGGATAGTCCATATAAGAGAAAGTGTAGGAGCTGGTCATTTG
AGTACTTAGAAGAAGAAAGCAGATCATCATCGTCAAGAGGAGGAAAAACAGAACTCTGGAGCT
TTTCCCATTGCACCCGGAAGGCAGATGATGGACGTTTCAACTTTGAAAAACAAGGAAAAAGGGAAGC
TTAACCCAAAACCAAAAAGACTGCTACAAAACCCAAAACCTCTGTTCCCATTTATGAAATGATAAACA
TATGCTTTGATGATCCATGATGATGATGATGATAATGAAGCTGA
```

[0136]

서열번호 : 2
길이 : 669 bp
유형 : DNA
유기체 : 황마, 코르코루스 올리토리우스
특징명/설명 : CDS
위치 : (1) (669)

ATGGGAAACATGAAGGTGCATCAGTTGGCACGTGGCTTATGGGAGCATGAACC
CTCCCTCTCCCTTGGTTGCAAGCGCTTACGCCCTCTTGCTCCCAAGCTCCACCCT
TCCTCTTCCCCTGATCATACTTCCGTCTCCTCTTTCGACCTTAAGACCTTCATTCTG
TCCCGAAAGTGGCCCCCGAAAACCTTTGCCCTTCTGACGACAAGCGAGATTCTCA
TTCTCCCCAGGTGGAAACGCACCCAGGGGGAACGCGGTGGAATCCGACGCAAG
AGCAGATAGGGATATTGGAGATGCTGTATAGAGGTGGGATGCGAACTCCAAAT
GCACAGCAAATAGAACAGATCACTGCACAGTTAGGCAAGTACGGGAAGATCGA
AGGCAAAAACGTTTTCTATTGGTTCCAAAACCACAAAGCACGCGAAAGGCAAA
AGCAGAAGCGTAACAGTCTTGGTCTTAGCCATTCTCCCAGAACTCTGCTCCCA
TTACCACCATAACTTTGGACTCTAGGGGGGAAGTAATGGAGAGAGAGGAGGAT
AGTCCATATAAGAGAAAGTGTAGGAGCTGGTCATTTGAGTACTTAGAAGAAGA
AAGCAGATCATCATCGTCGAGTCAAGAGGAGGAAAACAGAACTCTGGAGCTTT
TCCCATTGCACCCGGAAGGCAGATGA

서열번호 : 3
길이 : 222
유형 : PRT
유기체 : 황마, 코르코루스 올리토리우스

MGNMKVHQLARGLWEHEPSLSLGCKRLRPLAPKLHPSSSPDHTSVSSFDLKTFFIRPESGPRKLCPSD
DKRDSHSPQVETHPGGTRWNPTQEIQIGILEMLYRGGMRTPNAQQIEQITAQLGKYGKIEGKNVFWF
QNHKARERQKQKRNSLGLSHSPRNSAPITTTITLDSRGEVMEREEDSPYKRKCRSWSFEYLEEESRSS
SSSQEEENRTLELFLHPEGR*

[0137]

서열번호 : 4
길이 : 1237 bp
유형 : DNA
특징명/설명 : 150 bp 5' UTR 및 150 bp 3' UTR 을 포함하는 인트론, 엑손
유기체 : 황마, 코르코루스 캡슐라리스

TCACAAGTCAACCTCACCTCATCATTTGGTCTTGGTTCTTCAAAGCACCTCATATCCCACTTCC
TTTTTCAATTTTAAATTTTTTTGGGGTTAAATTTATTTGGTTATATAATCAGAGCATTCTCCCAT
CATTCACTCCTTACCATGGGAAACATGAAGGTGCATCAGTTGGCACGTGGCTTATGGGAGCATGAA
CCCTCCCTCTCCCTTGGTTGCAAGCGCTTACGCCCTCTTGCTCCCAAGCTCCACCCTTCTCTTCCC
CTGATCATACTTCCGTCTCTCTTTTCGACCTTAAGACCTTCATTGCTCCCGAAAGTGGCCCCCGGAA
ACTTTGCCCTTCTGACGACAAGCGAGATTCTCATTCTCGCCAGGTACTTAAAAATTAATATCCATGA
AATAATTTGTGGGGAAGGATAAGTTTGAACCTTAATGCATAATAACAGTGTGGAACTTAATAGGTT
AAGAATATTTGAAGAACTTCTATATATATGAAGCTGAACTTTTGTGGTGTGTAGGTGGAACG
CACCCAGGGGGAACGCGGTGGAATCCGACGCAAGAGCAGATAGGGATACTGGAGATGCTGTATAGAG
GTGGGATGCGAACTCCAAATGCACAGCAAATAGAACAGATCACTGCACAGCTAGGCAAGTACGGCAA
GATCGAAGGCAAAAACGTTTCTATTTGGTTCCAAAACCACAAAGCACGCGAAAGGCAAAAGCAGAAG
CGTAACAGTCTTGGTCTTAGCCATTCTCCAGAACTCAGCTCCCATTAACACTATAACTTTGGACA
CTAGGGTAAGTTCAAACCAACAAAACCTTTCTGTGTATATATATATAACGGTTAGTTTTTAGTT
TTTACTTCTTATAAACAGAGAAAATTAACAATGTTTGTGTTTATATATATATAGGGGGAAGTAATGG
AAAGAGAGGAGGATAGTCCATATAAGAGAAAAGTGTAGGAGCTGGTCTTTTGAGTACTTAGAAGAAGA
AAGCAGATCATCATCGTCGAGTCAAGAGGAGGAAAACAGAACTCTGGAGCTTTTCCCATTGCACCCG
GAAGGCAGATCATGAAGGGGGTTTCAACTTTCAACTTTCAACTTTCAACTTTCAAAATGAAGGGAAA
AGGGAAGCTTAACCCAAAACCAAAAGACTGCTACAAAACCCAAAACCTCTGTTCCTTATGAAAT
GATAAACTTATGCTTTGATGATCGATCCATG

서열번호 : 5
길이 : 672
유형 : DNA
유기체 : 황마, 코르코루스 캡슐라리스
특징명/설명 : CDS
위치 : (1) (672)

ATGGGAAACATGAAGGTGCATCAGTTGGCACGTGGCTTATGGGAGCATGAACCTCCCTCTCCCTTG
GTTGCAAGCGCTTACGCCCTCTTGCTCCCAAGCTCCACCCTTCTCTTCCCCTGATCATACTCCGT
CTCCTCTTTTCGACCTTAAGACCTTCATTGCTCCCGAAAGTGGCCCCCGAAACTTTGCCCTTCTGAC

GACAAGCGAGATTCTCATTTCTCGCCAGGTGGAACGCACCCAGGGGGAACGCGGTGGAATCCGACGC
AAGAGCAGATAGGGATACTGGAGATGCTGTATAGAGTGGGATGCGAACTCCAAATGCACAGCAAAT
AGAACAGATCACTGCACAGCTAGGCAAGTACGGCAAGATCGAAGGCAAAAACGTTTCTATTGGTTC
CAAAAACCACAAAGCACGCGAAAGGCAAAAGCAGAAGCGTAACAGTCTTGGTCTTAGCCATTCTCCCA
GAAACTCAGCTCCCATTAACACTATAACTTTGGACACTAGGGGGGAAGTAATGGAAAGAGAGGAGGA
TAGTCCATATAAGAGAAAAGTGTAGGAGCTGGTCTTTTGAGTACTTAGAAGAAGAAAGCAGATCATCA
TCGTGCGAGTCAAGAGGAGGAAAAACAGAACTCTGGAGCTTTTCCCATTGCACCCGGAAGGCAGATCAT
GA

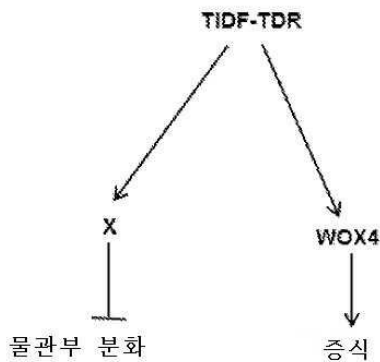
서열번호 : 6
길이 : 223
유형 : PRT
유기체 : 황마, 코르코루스 캡슐라리스

MGNMKVHQLARGLWEHEPSLSLGCKRLRPLAPKLHPSSSPDHTSVSSFDLKTFFIRPESGPRKLCPSD
DKRDSHSRQVETHPGGTRWNPTQEIQIGILEMLYRGGMRTPNAQQIEQITAQLGKYGKIEGKNVFWF
QNHKARERQKQKRNSLGLSHSPRNSAPITTTITLDTRGEVMEREEDSPYKRKCRSWSFEYLEEESRSS
SSSQEEENRTLELFPLHPEGRS*

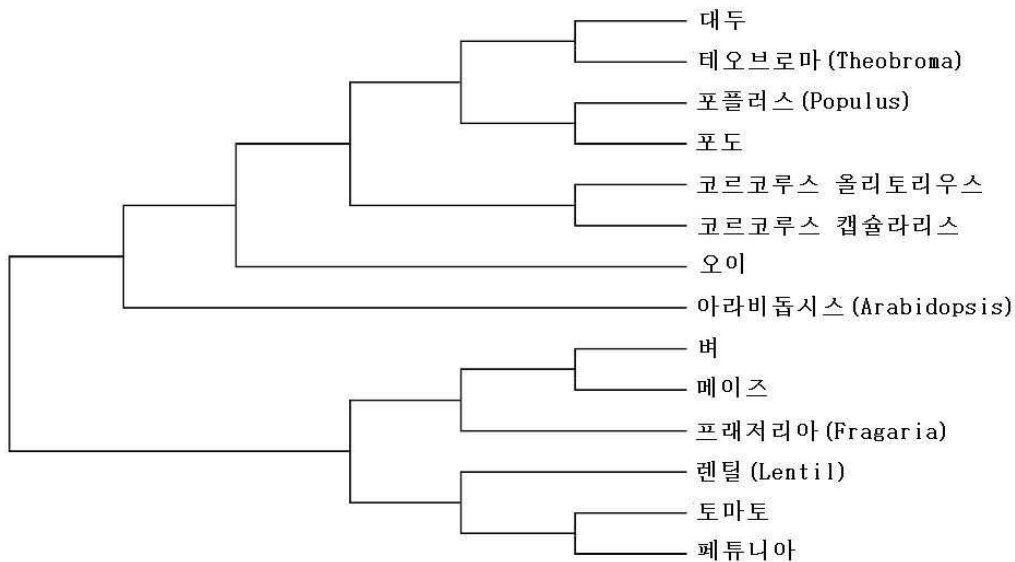
[0140]

도면

도면1



도면2



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BANGLADESH JUTE RESEARCH INSTITUTE

<120> NUCLEOTIDE SEQUENCE ENCODING WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 (WOX4)
 PROTEIN FROM CORCHORUS OLITORIUS AND CORCHORUS CAPSULARIS AND
 METHODS OF USE FOR SAME

<130> WO/2015/077447

<140> PCT/US2014/066599

<141> 2014-11-20

<150> US61/907,617

<151> 2013-11-22

<160> 12

<170> PatentIn version 2.0

<210> 1

<211> 1250

<212> DNA

<213> Corchorus olitorius

<400> 1

```

acctcatcat ttggtcttgg ttcttcaaag caccacctca tatcccactt tctttttctt      60

ttcttttttt taaaattttt attttttggg ttaaatttat ttttgttatt atataatcag      120
agcattctcc ccatcattca ctcttcacc atgggaaaca tgaagggtgca tcagttggca      180
cgtggcttat gggagcatga accctccctc tcccttgggt gcaagcgctt acgcctctt      240
gtccccaagc tccacccttc ctcttccctt gatcatactt ccgtctcttc ttctgacctt      300
aagaccttca ttcgtcccga aagtggcccc cgaaaacttt gcccttctga cgacaagcga      360
gattctcatt ctccccaggt acttacaaat atccatgaaa tgaaacctt ttatttttcc      420
aatgatgtat ataattagtg gggaaggata agattttgaa cttacgatga acaataacag      480

tgtggaagt tgataatcaa aggttaagaa tgtgaagctg aaactttttt cttttttttg      540
gttatgtagg tggaaacgca cccaggggga acgcggtgga atccgacgca agagcagata      600
gggatatttg agatgctgta tagaggtggg atgcgaactc caaatgcaca gcaaatagaa      660
cagatcactg cacagttagg caagtacggg aagatcgaag gcaaaaacgt tttctattgg      720
ttccaaaacc acaaagcacg cgaaaggcaa aagcagaagc gtaacagtct tggctttagc      780
cattctccca gaaactctgc tccattacc accataactt tggactctag ggtaagtcca      840
aaccaacaaa accctttctt tgtatatata taacggttag tttttagttt ttacttctta      900

taaacagcaa ttaacattaa tgtttttggt tatatatata gggggaagta atggagagag      960
aggaggatag tccatataag agaaagtgtg ggagctgggc atttgagtac ttagaagaag     1020
    
```

aaagcagatc atcatcgtcg agtcaagagg aggaaaacag aactctggag cttttcccat 1080
 tgcaccgcga aggagatga tggacgtttc aactttgaaa aacaaggaaa aagggaagct 1140
 taacccaaaa ccaaaaagac tgctacaaaa cccaaaactc tgttcccatt tatgaaatga 1200
 taaacatatg ctttcatgat ccatgatgat gatgatgata atgaagctga 1250

<210> 2

<211> 669

<212> DNA

<213> Corchorus olitorius

<400> 2

atgggaaaca tgaaggtgca tcagttggca cgtggcttat gggagcatga accctccctc 60
 tcccttgggtt gcaagcgctt acgccctctt gctcccaagc tccacccttc ctcttccctt 120
 gatcatactt ccgtctcctc tttcgacctt aagaccttca ttcgtcccga aagtggcccc 180
 cgaaaacttt gcccttctga cgacaagcga gattctcatt ctccccaggt ggaaacgcac 240
 ccagggggaa cgcggtggaa tccgacgcaa gagcagatag ggatattgga gatgctgtat 300
 agaggtggga tgcgaactcc aaatgcacag caaatagaac agatcactgc acagttaggc 360
 aagtacggga agatcgaagg caaaaacgtt ttctattggt tccaaaacca caaagcacgc 420

gaaaggcaaa agcagaagcg taacagtctt ggtcttagcc attctcccag aaactctgct 480
 cccattacca ccataacttt ggactctagg ggggaagtaa tggagagaga ggaggatagt 540
 ccatataaga gaaagtgtag gagctgggtca tttgagtact tagaagaaga aagcagatca 600
 tcatcgtcga gtcaagagga ggaaaacaga actctggagc ttttccatt gcacccggaa 660
 ggcagatga 669

<210> 3

<211> 222

<212> PRT

<213> Corchorus olitorius

<400> 3

Met Gly Asn Met Lys Val His Gln Leu Ala Arg Gly Leu Trp Glu His

1 5 10 15
 Glu Pro Ser Leu Ser Leu Gly Cys Lys Arg Leu Arg Pro Leu Ala Pro
 20 25 30
 Lys Leu His Pro Ser Ser Ser Pro Asp His Thr Ser Val Ser Ser Phe
 35 40 45

Asp Leu Lys Thr Phe Ile Arg Pro Glu Ser Gly Pro Arg Lys Leu Cys

50 55 60

Pro Ser Asp Asp Lys Arg Asp Ser His Ser Pro Gln Val Glu Thr His

65 70 75 80

Pro Gly Gly Thr Arg Trp Asn Pro Thr Gln Glu Gln Ile Gly Ile Leu

85 90 95

Glu Met Leu Tyr Arg Gly Gly Met Arg Thr Pro Asn Ala Gln Gln Ile

100 105 110

Glu Gln Ile Thr Ala Gln Leu Gly Lys Tyr Gly Lys Ile Glu Gly Lys

115 120 125

Asn Val Phe Tyr Trp Phe Gln Asn His Lys Ala Arg Glu Arg Gln Lys

130 135 140

Gln Lys Arg Asn Ser Leu Gly Leu Ser His Ser Pro Arg Asn Ser Ala

145 150 155 160

Pro Ile Thr Thr Ile Thr Leu Asp Ser Arg Gly Glu Val Met Glu Arg

165 170 175

Glu Glu Asp Ser Pro Tyr Lys Arg Lys Cys Arg Ser Trp Ser Phe Glu

180 185 190

Tyr Leu Glu Glu Glu Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ser Gln Glu Glu Glu

195 200 205

Asn Arg Thr Leu Glu Leu Phe Pro Leu His Pro Glu Gly Arg

210 215 220

<210> 4

<211> 1237

<212> DNA

<213> *Corchorus capsularis*

<400> 4

tcacaagtca acctcacctc atcatttggt ctggttctt caaagcacca cctcatatcc 60

cacttccttt ttcaattttt aattttttt ggggttaaatt ttatttggtt atataatcag 120

agcattctcc ccatcattca ctcttcacc atgggaaaca tgaaggtgca tcagttggca 180

cgtggcttat gggagcatga accctccctc tcccttggtt gcaagcgctt acgccctctt 240

gctcccaagc tccacccttc ctcttccctt gatcatactt cegtctcttc tttcgacctt 300
aagaccttca ttcgtcccga aagtggcccc cggaaacttt gcccttctga cgacaagcga 360
gattctcatt ctgccaggt acttaaaaat taatatccat gaaataattt gtggggaagg 420
ataagttttg aacttaatgc ataataacag tgtggaaact taataggta agaataattg 480
aagaacttct atatatafga agctgaaact tttttgtggt gttgtagggt gaaacgcacc 540
cagggggaac gcggtggaat ccgacgcaag agcagatagg gatactggag atgctgtata 600
gaggtgggat gcgaactcca aatgcacagc aaatagaaca gatcactgca cagctaggca 660

agtacggcaa gatcgaaggc aaaaacgttt tctattggtt ccaaaaccac aaagcacgcg 720
aaaggcaaaa gcagaagcgt aacagtcttg gtcttagcca ttctcccaga aactcagctc 780
ccattaccac tataactttg gacactaggg taagttcaaa ccaacaaaac cttttctgtg 840
tataatatata tataacggtt agtttttagt ttttacttct tataaacaga gaaaattaac 900
aatgtttgtg tttatatata tataggggga agtaatggaa agagaggagg atagtccata 960
taagagaaag ttaggagct ggtcttttga gtacttagaa gaagaaagca gatcatcatc 1020
gtcagtgcaa gaggaggaaa acagaactct ggagcttttc ccattgcacc cggaaggcag 1080

atcatgaagg gggtttcaac tttcaacttt caactttcaa ctttcaaat gaagggaaaa 1140
gggaagctta acccaaaacc aaaaagactg ctacaaaacc caaaactctg ttcccattta 1200
tgaaatgata aacttatgct ttgatgatcg atccatg 1237

<210> 5

<211> 672

<212> DNA

<213> *Corchorus capsularis*

<400> 5

atgggaaaca tgaaggtgca tcagttggca cgtggcttat gggagcatga accctccctc 60
tcccttgggt gcaagcgtt acgccctctt gctcccaagc tccacccttc ctcttccctt 120
gatcatactt cegtctcttc tttcgacctt aagaccttca ttcgtcccga aagtggcccc 180

cggaaacttt gcccttctga cgacaagcga gattctcatt ctgccaggt ggaaacgcac 240
ccagggggaa cgcggtgga tccgacgcaa gagcagatag ggatactgga gatgctgtat 300
agaggtagga tgcgaactcc aaatgcacag caaatagaac agatcactgc acagctaggc 360
aagtacggca agatcgaagg caaaaacgtt ttctattggt tccaaaacca caaagcacgc 420
gaaaggcaaa agcagaagcg taacagtctt ggtcttagcc attctcccag aaactcagct 480
cccattacca ctataacttt ggacactagg ggggaagtaa tggaaagaga ggaggatagt 540

ccatataaga gaaagtgtag gagctggtct tttagtact tagaagaaga aagcagatca 600

tcacgtcga gtcaagagga ggaaaacaga actctggagc ttttccatt gcacccggaa 660

ggcagatcat ga 672

<210> 6

<211> 223

<212> PRT

<213> *Corchorus capsularis*

<400> 6

Met Gly Asn Met Lys Val His Gln Leu Ala Arg Gly Leu Trp Glu His

1 5 10 15

Glu Pro Ser Leu Ser Leu Gly Cys Lys Arg Leu Arg Pro Leu Ala Pro

20 25 30

Lys Leu His Pro Ser Ser Ser Pro Asp His Thr Ser Val Ser Ser Phe

35 40 45

Asp Leu Lys Thr Phe Ile Arg Pro Glu Ser Gly Pro Arg Lys Leu Cys

50 55 60

Pro Ser Asp Asp Lys Arg Asp Ser His Ser Arg Gln Val Glu Thr His

65 70 75 80

Pro Gly Gly Thr Arg Trp Asn Pro Thr Gln Glu Gln Ile Gly Ile Leu

85 90 95

Glu Met Leu Tyr Arg Gly Gly Met Arg Thr Pro Asn Ala Gln Gln Ile

100 105 110

Glu Gln Ile Thr Ala Gln Leu Gly Lys Tyr Gly Lys Ile Glu Gly Lys

115 120 125

Asn Val Phe Tyr Trp Phe Gln Asn His Lys Ala Arg Glu Arg Gln Lys

130 135 140

Gln Lys Arg Asn Ser Leu Gly Leu Ser His Ser Pro Arg Asn Ser Ala

145 150 155 160

Pro Ile Thr Thr Ile Thr Leu Asp Thr Arg Gly Glu Val Met Glu Arg

165 170 175

Glu Glu Asp Ser Pro Tyr Lys Arg Lys Cys Arg Ser Trp Ser Phe Glu

180 185 190
Tyr Leu Glu Glu Glu Ser Arg Ser Ser Ser Ser Ser Gln Glu Glu Glu

195 200 205
Asn Arg Thr Leu Glu Leu Phe Pro Leu His Pro Glu Gly Arg Ser

210 215 220

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223

> Description of Unknown: WUSCHEL C-terminal domain

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Glu or Arg

<400> 7

Xaa Thr Leu Pro Leu Phe Pro

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown: WUSCHEL C-terminal domain

peptide

<220><221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Ala or Ser

<220><221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Ser or Thr

<400> 8

Ala Xaa Leu Glu Leu Xaa Leu

1 5

<210

> 9

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 9
 ccatgggaaa catgaagtg c 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 10
 tgaaacgtcc atcatctgcc t 21
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 11
 ccatgggaaa catgaagtg c 21
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 12
 ttcatgatct gccttccggg 20