

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 1월 23일 (23.01.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/014162 A1

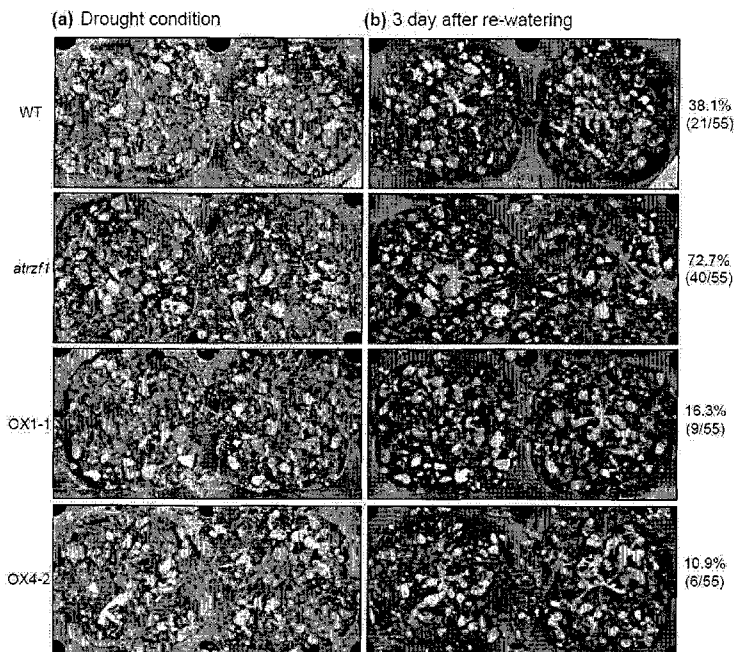
- (51) 국제특허분류: **A01H 5/00** (2006.01) **C12N 15/82** (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/008987
- (22) 국제출원일: 2012년 10월 30일 (30.10.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2012-0077892 2012년 7월 17일 (17.07.2012) KR
- (71) 출원인: 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 500-757 광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 김철수 (KIM, Cheol Soo); 500-764 광주광역시 북구 동림용산로 12, 푸른마른마을주공 4단지아파트 405동 603호, Gwangju (KR). 주현우 (JU, Hyun-Woo); 502-708 광주광역시 서구 동천로 25, 동천마을주공 1단지아파트 104동 403호, Gwangju (KR). 민지희 (MIN, Ji Hee); 500-130 광주광역시 북구 오치동 한국아텔리움아파트 104동 404호, Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울특별시 관악구 인현동 1659-2 청동빌딩 301호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: DROUGHT STRESS RESISTANCE-RELATED GENE AND TRANSGENIC PLANT

(54) 발명의 명칭 : 가뭄 스트레스 저항성 관련 유전자 및 형질전환 식물체

도 9



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for enhancing drought stress resistance of a plant, a transgenic plant having drought stress resistance, and a method for producing a transgenic plant. A plant having a new function and having superior drought resistance can be produced by using the composition for enhancing drought stress resistance of a plant and the method for producing the transgenic plant.

(57) 요약서: 본 발명은 식물체의 가뭄 스트레스 저항성 증진용 조성물, 가뭄 스트레스 저항성을 갖는 형질전환된 식물체 및 상기 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 가뭄 스트레스 저항성 증진용 조성물 및 형질전환 식물체의 제조방법을 이용하면 가뭄 저항성이 탁월한 신기능 식물체를 제조할 수 있다.



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, 공개:
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

【명세서】

【발명의 명칭】

가뭄 스트레스 저항성 관련 유전자 및 형질전환 식물체

5 【기술분야】

본 발명은 가뭄 스트레스 저항성 관련 유전자 및 상기 유전자의 발현이 억제된 형질전환 식물체에 관한 것이다.

【배경기술】

10 진핵세포에서 단백질 유비퀴티네이션은 중요한 번역 후 변형 과정으로 다양한 세포 및 발달 과정을 조절하기 위해 이용된다(Dye and Schulman, 2007). 유비퀴틴화된 단백질은 고등 식물에서 무생체 또는 생체적 스트레스 반응, 호르몬 반응, 세포주기 진행 및 세포 분화에
15 관여한다(Craig et al., 2009; Santner and Estelle, 2009; Marrocco et al., 2010; Ryu et al., 2010). 유비퀴틴(Ubiquitin, Ub)은 8 kDa의 보존적 단백질로 ATP-의존적 방식으로 Ub-활성화 효소 E1(Ub-activating enzyme E1)에 의해 처음 활성화되고, Ub-E2 복합체가 Ub-단백질 리가아제 E3에 결합하면 Ub는 Ub-E2로부터 기질 단백질로 이동하고, 26S 프로테아좀에 의해 인식되고 분해된다(Vierstra, 2003). 단백질 분해를 유도하는 것
20 이외에 DNA 리페어 및 단백질 운송과 같은 분해(degradation)와 무관한 단백질 유비퀴티네이션의 기능 또한 알려져 있다(Chen et al., 2009). 애기장대(Arabidopsis) 유전체에서 1,400개 이상의 유전자가 Ub-E3 리가아제를 코딩하는 것으로 예측된다(Vierstra, 2009). E3 리가아제는 2 그룹으로 분류된다. 한 그룹은 싱글 서브유닛으로서 작용하는 RING(Really
25 Interesting New Gene)/U-BOX 및 HECT(Homology to E6-AP Carboxyl Terminus) E3 효소로 구성된다. 다른 그룹은 SCF(Skp1-Cullin-F box) 및 멀티-서브유닛 복합체로서 기능하는 APC(Anaphase-Promoting Complex)을 포함한다(Gmachl et al., 2000; Tyers and Jorgensen, 2000; Lin et al., 2002). 약 469개의 RING 모티프를 포함하는 E3 리가아제는 애기장대에서
30 3번째로 큰 유전자 패밀리를 구성한다(Mudgil et al., 2004; Stone et al., 2005). Cys-리치 RING 핑거는 1990년대 초기에 처음으로

알려졌으며(Freemont et al., 1991), 크로스 브레이스 배치에서 두 아연 원자를 묶는 보존된 Cys 및 His 잔기의 선형 시리즈(linear series)로 정의된다. RING 핑거는 모티프의 다섯번째 위치에 Cys 또는 His 잔기가 있느냐에 따라서 C_3HC_4 (RING-HC) 및 $C_3H_2C_3$ (RING-H2)의 두 가지 타입으로 나눌 수 있다(Freemont, 2000). 최근 애기장대 RING E3 리가아제가 옥신 신호전달, 아브시스산 신호전달, 브라시노스테로이드 반응, 종자 발아, 유모 성장, 질소원 제한에 대한 대안적 대사과정 및 당 반응과 같은 다양한 세포내 과정에 관여한다는 것이 알려졌다(Stone et al., 2006; Peng et al., 2007; Bu et al., 2009; Santner and Estelle, 2009; Huang et al., 2010). 부분적으로 RING 단백질은 환경적 자극에 대한 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 예를 들면, RING 단백질은 광형태형성(photomorphogenesis), 방어 신호전달, 노화, 추위에 대한 내성 메커니즘, 가뭄, 염분 및 삼투압 스트레스에 관여한다(Yan et al., 2003; Craig et al., 2009; Fujita et al., 2011; Smirnova et al., 2011).

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 활성화 또는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열의 발현이 식물체의 형질에 관여한다는 사실을 도출하였고, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 활성을 억제시키거나 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제시키는 경우 가뭄 스트레스에 대한 저항성이 향상된 형질을 갖는 형질전환 식물체를 수득할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서 본 발명의 목적은 식물체의 가뭄 스트레스 저항성 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 가뭄 스트레스 저항성을 갖는 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제공하는 데 있다.

5 본 발명의 또 다른 목적은 가뭄 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 식물체에 가뭄 스트레스 저항성을 부여하는 방법을 제공하는 데 있다.

10 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제2서열의
15 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 억제제 또는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열의 발현 억제제를 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스 저항성 증진용 조성물을 제공한다.

20 본 발명자들은 식물체의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 활성 또는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열의 발현이 식물체의 형질에 관여한다는 사실을 도출하였고, 서열목록
25 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 활성을 억제시키거나 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열의 발현을 억제시키는 경우 가뭄 스트레스에 대한 저항성이 향상된 형질을 갖는 형질전환 식물체를 수득할 수 있음을 규명하였다.

본 발명에 따르면, 본 발명의 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을
30 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게

명확하다.

뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈(예를 들어, 코돈의 축퇴성에 의해, 아르기닌 또는 세린에
5 대한 코돈은 여섯 개이다), 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다.

상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 핵산 분자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로
10 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
15 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio.* 48:443(1970); Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며,
20 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
25

본 발명에서 사용된 용어 “가뭄 스트레스”란 식물 성장에 있어서 정상적인 수분 공급이 되지 않는 상태로 식물 성장 및 생존에 피해효과를
30

나타내는 모든 종류의 비생물적인(예를 들어, 여러 화학물질을 처리 또는 건조 조건에 노출) 및 생물적인(여러 감염원에 의한 감염) 스트레스 조건들을 포함하는 매우 일반적인 용어로 사용된다.

본 발명에서 스트레스에 “저항성” 또는 “내성” 가진다는 용어는
5 상기와 같은 스트레스에 대하여 그것의 야생형의 손상에 비하여 검출 가능한 강한 저항성을 가지는 것을 의미하며, 본 발명의 형질전환 식물체란 이러한 저항성 또는 내성을 가지는 식물체, 식물체 일부, 식물 조직 또는 식물세포를 의미한다.

본 발명에 따르면, 본 발명에서 이용되는 단백질 억제제는 서열목록
10 제2서열의 아미노산 서열을 갖는 E3 유비퀴틴 리가아제인 AtRZF1 단백질의 활성을 억제하거나 또는 AtRZF1 단백질이 기질과 결합하는 것을 방해하는 억제제를 의미한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 억제제는 바람직하게는 항체, 펩타이드
15 애포타머, 어드넥틴(AdNectin), 어피바디(affibody), 아비머(Avimer), 쿠니쯔 도메인(Kunitz domain) 또는 화합물이다.

본 발명에서 이용될 수 있는 AtRZF1 단백질에 특이적으로 결합하여 활성을 억제하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. AtRZF1 단백질에 대한 항체는
20 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은
25 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
30 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에

필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 AtRZF1 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

본 발명에서 이용될 수 있는 펩타이드 앵타머는 높은 특이성 및 친화성을 가지고 타겟 항원에 결합할 수 있도록 독특한 컨포메이션으로 폴딩되는 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드이다. 이러한 앵타머는 SELEX(Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 방법에 의해 얻을 수 있다(Tuerk and Gold, *Science*, 249:505-510(1990)).

본 발명의 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질(AtRZF1 단백질)에 대한 억제제로서의 화합물은 AtRZF1 단백질의 활성을 억제하거나 AtRZF1 단백질에 결합하는 물질을 스크리닝함으로써 수득할 수 있다. 이 경우, AtRZF1 단백질은 분리된 형태의 AtRZF1 단백질 또는 세포 내에 포함되어 있는 AtRZF1 단백질 등 어떠한 형태의 것도 사용할 수 있다.

본 발명에서 AtRZF1 단백질 억제제로서의 화합물을 스크리닝 하는 방법은 다양한 방식으로 실시할 수 있으며, 특히 당업계에 공지된 다양한 결합 분석(binding assay)에 따라 고속(high throughput) 방식으로 실시할 수 있다. 상기 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질 또는 AtRZF1 단백질은 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광 표지[예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM], 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.

검출가능한 표지가 레이블링된 AtRZF1 단백질 또는 시험물질을

이용하는 경우, AtRZF1 단백질과 시험물질 사이의 결합 발생 여부는 표지로부터 나오는 시그널을 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-
 5 포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스
 10 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.

택일적으로, 시험물질의 AtRZF1 단백질로의 결합 여부는 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 분석할 수도 있다. 예를 들어, 마이크로피지오미터(microphysiometer)를 이용하여 시험물질이 AtRZF1 단백질에 결합하는지 여부를 분석할 수 있다. 마이크로피지오미터는 LAPS(light-addressable potentiometric sensor)를 이용하여 셀이 그의 환경을 산성화하는 속도를 측정하는 분석 도구이다. 산성화 속도의 변화는,
 20 시험물질과 AtRZF1 단백질 사이의 결합에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다(McConnell et al., *Science* 257:1906-1912(1992)).

시험물질의 AtRZF1 단백질과의 결합 능력은 실시간 이분자 상호작용 분석(BIA)를 이용하여 분석할 수 있다(Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63:2338-2345(1991), and Szabo et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-
 25 705(1995)). BIA는 실시간으로 특이적 상호작용을 분석하는 기술로서, 상호작용물(interactants)의 레이블링 없이 실시할 수 있다(예컨대, BIAcore™). 표면 플라즈몬 공명(SPR)에서의 변화는 분자들 사이의 실시간 반응에 대한 지시자(indicator)로 이용될 수 있다.

또한, 상기 스크리닝 방법은, 투-하ybrid 분석 또는 쓰리-
 30 하이브리드 분석 방법에 따라 실시할 수 있다(U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al., *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura et al., *J. Biol. Chem.*

268, 12046-12054, 1993; Bartel et al., *BioTechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi et al., *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; 및 WO 94/10300). 이 경우, AtRZF1 단백질을 베이트(bait) 단백질로 이용할 수 있다. 이 방법에 따르면, AtRZF1 단백질에 결합하는 물질, 특히 단백질을 스크리닝 할 수 있다. 투-하이브리드 시스템은 분할 가능한 DNA-결합 및 활성화 도메인으로 구성된 전사인자의 모듈 특성에 기초한다. 간단하게는, 이 분석 방법은 두 가지 DNA 컨스트럭트를 이용한다. 예컨대, 하나의 컨스트럭트에서, AtRZF1-코딩 폴리뉴클레오타이드를 공지의 전사인자(예컨대, GAL-4)의 DNA 결합 도메인-코딩 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 다른 컨스트럭트에서, 분석 대상의 단백질(“프레이” 또는 “시료”)을 코딩하는 DNA 서열을 상기 공지의 전사인자의 활성화 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 융합시킨다. 만일, 베이트 및 프레이가 인비보에서 상호작용하여 복합체를 형성하면, 전사인자의 DNA-결합 및 활성화 도메인이 인접하게 되며, 이는 리포터 유전자(예컨대, *LacZ*)의 전사를 촉발하게 된다. 리포터 유전자의 발현을 검출할 수 있으며, 이는 분석 대상의 단백질이 AtRZF1 단백질과 결합할 수 있음을 나타내는 것이며, 결론적으로 AtRZF1 단백질 억제제로 이용될 수 있음을 나타내는 것이다.

본 발명에 따르면, 본 발명에서 이용되는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열의 발현 억제제는 바람직하게는 핵산분자 또는 돌연변이 유도제이다.

본 명세서에서 용어 “발현 억제”는 표적 유전자의 기능 저하를 야기하는 뉴클레오타이드 서열상의 변형을 의미하며, 바람직하게는 이에 의해 표적 유전자 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 의미한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 핵산분자는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다.

siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자
 5 녀다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.

siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 쌍을
 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음),
 5 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 쌍을 이루지 않는
 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15
 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는
 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면
 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단
 10 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.
 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8
 염기, 바람직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟
 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽
 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와
 15 같은 천연의 RNA분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA
 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의
 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도
 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면
 특별히 한정되지 않는다.

20 본 명세서에서 용어 “shRNA”는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된
 뉴클레오타이드를 의미하며, *in vivo*상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를
 이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로
 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을
 형성한다.

25 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 유전자 발현을 조절하며,
 전장 20-50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-45개 뉴클레오타이드, 보다
 바람직하게는 20-40개 뉴클레오타이드, 보다 더욱 더 바람직하게는 20-30개
 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21-23개의 뉴클레오타이드로 구성된
 단일 가닥 RNA분자를 의미한다. miRNA는 세포내에서 발현되지 않는
 30 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는
 2이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며,

상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.

본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.

본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.

본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 올리고 본 발명의 안티센스 뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(trans의 cation), 성숙(maturation) 또는

다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 10 내 40 염기이다.

상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여
 5 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995).
 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은
 10 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다.
 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-me 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-
 15 하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 돌연변이 유도제는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질에 대한 gDNA(genomic DNA)에 삽입되는 식물 형질전환용 벡터이며, 보다 바람직하게는 T-DNA이다.

본 명세서에서 용어 “T-DNA”는 *Agrobacterium* 종의 Ti(tumor-inducing) 플라스미드의 전달(transfer) DNA로서 숙주 식물세포의 핵으로 전달되는 DNA 절편을 말한다. T-DNA의 양 끝 가장자리에는 25 bp의 반복서열이 존재하며, 전달은 왼쪽 경계(left border)에서 전달이 시작되어 오른쪽 경계(right border)에서 종료된다. 박테리아 T-DNA는 약 20,000 bp
 25 길이로서 이들의 삽입에 의하여 타겟 유전자를 붕괴시킴으로서 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis)를 일으키는 데에 사용되며, 삽입된 T-DNA 서열은 돌연변이를 일으킬 뿐 아니라 타겟 유전자를 표지하기도 한다. 목적으로 하는 유전자로의 T-DNA의 삽입은 T-DNA 컬렉션(The SAIL collection)으로부터 특정 T-DNA를 선정하여 이용함으로써 유도할 수 있다.
 30 각각의 T-DNA 컬렉션에 대한 염색체 삽입 위치가 알려져 있으므로 특정 유전자로의 T-DNA 삽입이 가능하다(Alonso et al., *Science*, vol. 301, no.

5633, p. 653-657(2003)).

본 발명에 따르면, 본 발명자들은 Ti 플라스미드의 형질도입을 통하여 *AtRZF1* 유전자의 발현억제 돌연변이체를 제작하였으며, T-DNA 보더 프라이머(border primer)와 T-DNA가 삽입된 부위의 앞, 뒤 부분의 프라이머를 이용하여 지노타이핑 PCR을 진행한 결과 T-DNA가 첫 번째 엑손에 삽입된 것을 확인하였으며, 발현억제 돌연변이체의 RNA를 추출하여 RT-PCR의 방법으로 유전자의 발현이 억제되었음을 확인하였다(도 7a).

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자가 불활성화(inactivated)된 가뭄 스트레스 저항성을 갖는 형질전환된 식물세포를 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자가 불활성화(inactivated)된 가뭄 스트레스 저항성을 갖는 형질전환된 식물체를 제공한다.

본 발명에 따르면, 본 발명에서 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자가 불활성화(inactivation)는 *atrzf1* 유전자의 돌연변이를 유도함으로써 실시할 수 있다. 바람직하게는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질에 대한 gDNA(genomic DNA)에 T-DNA를 삽입(insertion) 하여 실시한다.

본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(*Methods of Enzymology*, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오티드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환 시킬 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton et al. *Cell* 11:263:271(1977)), 직접 외래성 폴리뉴클레오티드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환시킬 수 있다(Lorz et al. *Mol. Genet.* 199:178-182;(1985)). 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다.

일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이 외래성

폴리뉴클레오티드로 형질전환된 아그로박테리움
 투메페이시언스(*Agrobacterium tumefaciens*)로 식물 세포나 종자 등을
 감염시키는 방법이다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및
 5,416,011 호). 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물
 5 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.

본 명세서에서, 용어 “식물(체)”는 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한
 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두
 포함하는 의미로서 사용된다.

본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물체는 특별하게 제한되지
 10 않는다. 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물로는 상치, 배추, 감자 및
 무를 포함하는 대부분의 쌍자엽 식물(dicotyledonous plant) 또는 벼, 보리,
 바나나 등의 단자엽 식물(monocotyledonous plant)을 모두 이용될 수
 있으며, 특히 토마토와 같이 과피가 얇아 노화에 따른 품질 저하가 급격히
 나타나는 식용 채소 또는 과일 그리고 잎이 주된 상품으로 거래되는 식물
 15 등에 적용할 경우 저장 효율을 높이는 데 효과적이다. 바람직하게는, 본
 발명의 방법은 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를
 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박,
 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류;
 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채를
 20 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도,
 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스,
 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스,
 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 툴페스큐 및 페레니얼라이그라스를
 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 식물체에 적용된다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를
 포함하는 가뭄 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는
 방법을 제공한다:

(a) 식물 세포의 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자를
 30 불활성화(inactivation) 시키는 단계; 및

(b) 상기 식물세포로부터 가뭄 스트레스 저항성이 증진된 형질전환

식물체를 수득하는 단계.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 식물 세포에서 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자의 불활성화는 식물의 gDNA에 있는 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자(서열목록 제3서열)에 T-DNA를 삽입(insertion) 하여 실시한다.

T-DNA는 식물 형질전환용 재조합 벡터에 포함된 형태로 식물세포에 도입된다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물 형질전환용 재조합벡터는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 바이너리 벡터이다.

본 명세서에서 용어 “바이너리 벡터”는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는데 필요한 유전자를 가진 플라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말한다. 본 발명의 형질전환용 아그로박테리움은 본 발명의 상기 뉴클레오타이드 서열의 발현에 적합한 것이면 어느 것이라도 좋고, 특히 본 발명에서 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101이 바람직하다.

본 발명의 재조합 벡터를 아그로박테리움에 도입하는 방법은 당업자에게 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있으며, 예를 들면 입자 충격법(particle bombardment), 전기천공법(electroporation), 형질감염법(transfection), 리튬아세테이트법(lithium acetate method) 및 열충격법(heat shock) 등이 있다. 바람직하게는 전기천공법을 사용한다.

형질전환된 식물세포의 선별은 형질전환 배양물을 선택제(예: 대사 억제제, 항생제 및 제초제)에 노출시켜 실시될 수 있다. 형질전환되고 선택제 내성을 부여하는 표지 유전자를 안정되게 포함하고 있는 식물세포는 상기한 배양물에서 성장하고 분할한다. 예시적인 표지는, 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자, 글리코포스페이트 내성 유전자 및 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(nptII) 시스템을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 식물 원형질 또는 다양한 익스플랜드로부터 식물체의 발달 또는 재분화시키는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 아그로박테리움에 의해 도입된 외래 유전자를 포함하는 식물체의 발달 또는

재분화는 당업계에 공지된 방법에 따라 달성될 수 있다(참조: 미합중국 특허 제 5,004,863, 5,349,124 및 5,416,011 호).

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 식물체에 가뭄 스트레스 저항성을 부여하는 방법을 제공한다:

(a) 식물 세포의 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자를 불활성화(inactivation) 시키는 단계; 및

(b) 상기 식물세포로부터 가뭄 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 식물체의 가뭄 스트레스 저항성 증진용 조성물, 가뭄 스트레스 저항성을 갖는 형질전환된 식물체 및 상기 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

(b) 본 발명의 가뭄 스트레스 저항성 증진용 조성물 및 형질전환 식물체의 제조방법을 이용하여 가뭄 저항성이 탁월한 신기능 식물체를 제조할 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 AtRZF1 단백질의 구조적 특징을 나타낸 그림이다. (a) *AtRZF1* 단백질 보존된 부분의 구조를 나타내는 모식도임. 신호 펩타이드의 예측은 소프트웨어 프로그램 간에 일치하지 않았음. RING-H2 징크 핑거 모티프 부위의 일차 구조는 검은 상자로 표시하였음. (b) C3H2C3-타입 RING 모티프 일라인먼트를 통해 다른 식물 종으로부터 *AtRZF1*의 아미노산 서열 및 다른 AtRZF1 호몰로그를 유추함. AtRZF1(At3g56580), AtRHC1a(At2g40830), AtRHC2a(At2g39720), AtSIS3(At3g47990), *Oryza sativa* RHC1a(OsRZF1; NP_001044543) 및 *Zea mays* RHC1a(ZmRHC1a; NP_001149547)의 서열을 나타냈으며, 검정색 및 회색 음영은 각각 일치 및 유사한 아미노산을 나타냄.

도 2는 예측된 AtRZF1의 아미노산 서열 및 그와 비교하여 연관된

서열들을 나타낸 것이다. AtRZF1(At3g56580), OsRHC1a(NP_001044543) 및 ZmRHC1a(NP_001149547)의 서열을 나타냈으며, 검정색 및 회색 음영은 각각 일치 및 유사한 아미노산을 나타냄. 갭(gap)은 얼라인먼트를 최적화하기 위해 삽입되었음. RING H2-타입 징크 핑거 도메인(186-226)은 얼라인먼트 상에서 검정색 선으로 표시하였음.

도 3은 AtRZF1-EGFP 융합 단백질의 세포 내 분포를 나타낸 그림이다. 35S-EGFP 및 25S-AtRZF1-EGFP 컨스트럭트는 PEG 매개 방법을 이용하여 애기장대 잎 원형질체로 형질전환 시켰음. 융합단백질의 분포는 형광현미경을 이용하여 가시화되었음. 스케일 바는 10 μ m를 나타냄.

도 4는 형질전환 애기장대 식물에서 *AtRZF1* 프로모터-GUS 발현 패턴을 확인한 결과이다. (a) 7일령 유묘 식물의 GUS 염색 결과임. (b) 3주령 형질전환 식물의 완전히 확장된 로제트 잎에서 GUS 발현을 확인한 결과임. (c) 4주령 형질전환 식물의 꽃에 대한 GUS 염색 결과임. (d) 수술에서의 GUS 발현을 확인한 결과임. (d) GUS 활성은 화분(pollen)에서 강하게 검출됨.

도 5는 물 부족 스트레스 하에 애기장대의 *AtRZF1* 유전자의 발현을 나타낸 그림이다. 만니톨(a) 또는 가뭄(b) 반응에 대한 *AtRZF1*의 발현을 정량적 RT-PCR로 분석한 결과를 나타냄. 총 RNA 샘플은 가뭄조건 또는 400 mM 만니톨을 처리한 14일령 식물을 각 시간대 별로 수득하였음. 에러 바는 3개의 독립적인 샘플에 대한 표준 편차를 나타냄. 다양한 비생물학적 스트레스의 유무에 따른 14일령 애기장대 유묘에서의 *AtRZF1* 또는 RAB18의 발현 차이는 $P < 0.01(**)$ 로 유의성을 나타냄. RAB18 유전자는 가뭄 또는 만니톨 스트레스에 대한 대조군으로서 사용되었음.

도 6은 인 비트로에서 *AtRZF1*의 E3 유비퀴틴 리가아제 활성을 측정한 결과이다. 정제된 MBP-AtRZF1을 E1, E2, 유비퀴틴 및 ATP와 함께 37°C에서 1시간 배양함. 폴리 유비퀴틴 체인은 항-유비퀴틴(a) 및 항-MBP(b) 항체를 이용하여 가시화하였음. E1 또는 E2의 생략은 유비퀴티네이션의 손실을 야기함. MBP는 음성 대조군으로서 이용되었음. 왼쪽 숫자는 단백질 마커의 분자량(kDa)을 나타냄.

도 7은 삼투압 스트레스 저항성에 대한 *atrzf1* 돌연변이 라인의 영향을 나타낸 결과이다. (a) 야생형(WT), *atrzf1* 돌연변이 및 AtRZF1을

발현하는 두개의 비의존적 형질전환 식물(OX1-1 및 OX4-2)에서 *AtRZF1*의 발현 레벨은 2주령 유묘로부터 추출한 총 RNA를 이용하여 RT-PCR 방법으로 측정함. RT-PCR 데이터는 액틴8 유전자의 mRNA 수준에 맞추어 표준화하였음. (b) 삼투압 스트레스는 식물 떡잎의 녹화(greening)에 영향을 미침. 씨앗은 400 mM 만니톨을 추가적으로 포함하거나 포함하는 않는 MS 아가 플레이트에 뿌리고, 8일간 성장시킨 후, 녹색 떡잎을 갖는 유묘의 수를 측정하였음(3배수 측정, n=50). 에러 바는 표준편차를 나타냄. 같은 조건에서 성장한 야생형, *atrzf1* 돌연변이 및 *AtRZF1* 형질전환 식물간의 차이는 $P < 0.01(**)$ 로 유의성을 나타냄.

도 8은 *atrzf1* 돌연변이 식물의 삼투압 스트레스 저항성을 확인한 결과이다. 씨앗은 400 mM 만니톨을 추가적으로 포함 또는 포함하지 않는 MS 아가 플레이트에 뿌리고 8일간 성장시킴. *atrzf1* 돌연변이 식물은 삼투압 스트레스 조건하에서 야생형 및 *AtRZF1* 과발현(OX1-1 및 OX4-2) 식물에 비해 더욱 진한 녹색을 나타냄. 스케일 바: 10 mm.

도 9는 *atrzf1* 돌연변이 식물의 가뭄 스트레스 저항성을 확인한 결과이다. *atrzf1* 돌연변이 식물은 가뭄 스트레스 조건하에서 야생형 및 *AtRZF1* 과발현(OX1-1 및 OX4-2) 식물에 비해 더욱 진한 녹색을 나타냈으며, 보다 잘 성장하였음. (a) 2주령 식물을 10일간 급수하지 않음. (b) 재급수 3일 후 생존율을 측정함.

도 10은 야생형, *atrzf1* 및 *AtRZF1* 과발현 식물에서 물 부족 및 전해질 누출을 측정한 결과이다. (a) 2주령 야생형, *atrzf1* 및 2개의 비의존적 *AtRZF1* 과발현 식물에서 물 부족을 정량화한 것임. 동일한 발달 단계의 로제트 잎을 채취하고, 채취한 후 다양한 시점에 무게를 측정함. 물 손실은 초기 무게에 대한 백분율로 계산함. 데이터는 5개의 잎을 각각 7회씩 측정하여 평균값 및 표준편차로 나타냄. 별표는 야생형과 비교하여 통계학적으로 유의한 차이를 나타냄 [$0.05 > P > 0.01(*)$ 또는 $P < 0.01(**)$]. (b) 가뭄 스트레스 하에서 야생형, *atrzf1* 및 두개의 비의존적인 *AtRZF1* 과발현 형질전환 식물 잎에서의 전해질 누출 측정 결과를 나타냄. 2주령 식물을 정상 또는 가뭄 조건에서 10일간 성장시키고 잎 조직을 조심스럽게 채취한 후, 전해질 누출을 측정하였음. 데이터는 7개의 잎을 각각 7회씩 측정하여 평균값 및 표준편차로 나타냄. 동일

조건에서 성장한 야생형, 돌연변이 및 형질전환 식물간의 차이는 $0.05 > P > 0.01(*)$ 또는 $P < 0.01(**)$ 로 유의적인 수준이었음.

도 11은 스트레스 관련 유전자(P5CS1, P5CR, RAB18, RD29A, RD29B, AOX1a, COR15A, ERD15 및 ERD1)의 발현 정도를 측정한 결과이다. 2주령 야생형, *atrzf1* 및 두개의 비의존적인 *AtRZF1* 과발현 형질전환 식물을 정상 또는 가뭄 조건에서 10일간 성장시킴. 총 RNA는 식물로부터 수득하였고, 표 1에 기재된 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 qPCR을 수행하였음. 각 바(bar)는 가뭄스트레스에 대한 반응으로서 대조군과 비교하여 발현 유도가 증가된 P5CS1, P5CR, RAB18, RD29A, RD29B, AOX1a, COR15A, ERD15 및 ERD1 유전자의 상대적 발현정도를 나타냄. 데이터 값은 3회 반복 실험을 통해 수득하였으며, 액틴8 유전자의 mRNA 수준에 맞추어 표준화하였음. 가뭄 스트레스 유무에 따른 애기장대 유묘에서의 P5CS1, P5CR, RAB18, RD29A, RD29B, AOX1a, COR15A, ERD15 및 ERD1 발현 차이는 $0.05 > P > 0.01(*)$ 또는 $P < 0.01(**)$ 로 유의적인 차이를 나타냄.

도 12는 야생형, *atrzf1* 돌연변이 및 *AtRZF1* 과발현 식물의 잎에서 프롤린 함량을 측정한 결과이다. 2주령 식물을 정상 또는 가뭄 조건 하에서 10일간 성장시키고, 잎 조직을 조심스럽게 채취한 후, 프롤린 함량을 측정함. 에러 바는 표준편차를 나타냄. 동일 조건하에서 성장한 야생형, 돌연변이 및 형질전환 식물 간의 차이는 $P < 0.01(**)$ 로 유의적인 차이를 나타냄.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

재료 및 방법

AtRZF1 과발현 식물체(OX1-1 및 OX4-2) 제작

2 주령 애기장대 잎으로부터 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 총 RNA 를 추출한 다음, 전장 *AtRZF1* cDNA(*At3g56580*)를 얻기 위해 RT-PCR 을 수행하였다. 유전자 증폭을 위하여, 정방향 5'-TCTAGAATGTCAAGTATTCGGAATAC-3' (*XbaI* 부위는 밑줄) 프라이머와 역방향 5'-GTCGACATAGTCAAAAGGCCATCCAC-3' (*SaII* 부위는 밑줄) 프라이머를 가지고, 94℃에서 30 초, 55℃에서 30 초, 72℃에서 1 분으로 해서 총 35 사이클을 반복하여 PCR 을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM T-easy 벡터에 클로닝한 후, 염기서열 결정 분석을 통해 *AtRZF1* 유전자의 염기서열을 검정하였다. 염기서열이 검정된 올바른 *AtRZF1* cDNA 분자들은 프라이머에 포함된 제한효소 *XbaI* 및 *SaII* 을 처리한 후, 식물발현벡터 pBI121-1 플라스미드 내 *XbaI* 및 *SaII* 부분에 클로닝하였다. 식물발현벡터에 클로닝된 *AtRZF1* 유전자들을 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 세균에 도입시킨 후, 형질전환된 *Agrobacterium* 을 가지고 진공 형질전환법(Bechtold and Pelletier, 1998)을 이용하여 애기장대 식물체에 형질전환 시켰다. 형질전환 시킨 3 세대 후, 서로 다른 우수 순종(homozygous) 12 개의 식물체들을 확보하였고, 그 중 2 개의 과발현 식물체(OX1-1 및 OX4-2)들을 가지고 가뭄스트레스와 관련된 표현형을 분석하였다. 서로 다른 2 개의 우수 순종 과발현 식물체(OX1-1 및 OX4-2)들은 카나마이신 항생제 저항성 분석 결과, 싱글 로커스임을 확인할 수 있었다.

우수 순종(homozygous) *atrzf1* 돌연변이 식물체 분석

AtRZF1 유전자의 엑손 부분에 T-DNA 가 삽입된 SALK_024296(*atrzf1*)는 Salk Institute 의 애기장대 T-DNA 삽입 컬렉션으로부터 수득하였다(Alonso et al., 2003). T-DNA 삽입에 대한 동형접합성(homozygous) 식물체를 선별하기 위해, 유전자 특이적 프라이머(정방향: 5'-TCTAGAATGTCAAGTATTCGGAATAC-3', 역방향: 5'-GTCGACATAGTCAAAAGGCCATCCAC-3')를 이용하였다. *atrzf1* 돌연변이체 및 야생종 애기장대 식물체(에코타입, Col-0)로부터 지노믹 DNA 를 추출한 후, 유전자 특이적 프라이머를 가지고 PCR 분석을 수행하였다. PCR 수행 결과, WT 에서는 *AtRZF1* 유전자에 대한 PCR 증폭 산물을 얻을 수 있는 반면,

atrzf1 돌연변이체의 지놈 DNA로부터는 *AtRZF1* 유전자에 대한 PCR 증폭 산물을 얻을 수 없었다. 이후 T-DNA 삽입 여부는 유전자 특이적 정방향 프라이머 및 T-DNA 좌측 보더 특이적 프라이머(5' - GCGTGGACCGCTTGCTGCACCT-3')를 조합하여 확인하였다. T-DNA 는 *AtRZF1* 유전자의 첫 번째 엑손 부위에 삽입됨을 알 수 있었다. 우수 순종(homozygous) *atrzf1* 돌연변이 식물체를 확보하기 위해 PCT 조건은 94℃에서 30 초, 57℃에서 30 초, 72℃에서 1 분으로 설정하고, 총 35 사이클을 반복하여 PCR 을 수행하였다. 또한, *atrzf1* 돌연변이 식물체로부터 *AtRZF1* 유전자의 전사 발현 여부를 알기 위하여 RT-PCR 을 수행하였다. RT-PCR 을 수행하기 위하여 발아 후, 10 일 된 *atrzf1* 돌연변이 유식물체로부터 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 총 RNA 를 추출하였다. cDNA 를 합성하기 위해 총 RNA 농도는 5 µg 을 사용하였고 올리고-(dT)₁₅ 프라이머와 SuperScript II 역전사 효소(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 cDNA 를 합성하였다. 합성된 cDNA 와 *AtRZF1* 유전자 특이적 프라이머를 가지고 PCR 를 수행하였다. PCR 은 94℃에서 30 초, 55℃에서 30 초, 72℃에서 1 분의 조건으로 총 27 사이클을 반복하여 PCR 을 수행하였다. RT-PCR 수행 결과, *atrzf1* 돌연변이 식물체는 *AtRZF1* 유전자의 전사 발현이 되지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 *atrzf1* 돌연변이 식물체는 *AtRZF1* 유전자에 대해 녹-아웃 식물체임을 말해준다. RT-PCR 수행 조건에 대한 적합 여부의 판단은 애기장대 *Actin8* 유전자를 대조군으로 사용하였다. *Actin8* 유전자의 프라이머는 정방향 5' - CCTTGCTGGTCGTGACCTTACTGA-3' 및 역방향 5' -CTCTCAGCACCGATCGTGATCACT-3' 프라이머 세트를 이용하였다. *Actin8* 유전자 증폭 발현 PCR 수행은 94℃에서 30 초, 55℃에서 30 초, 72℃에서 1 분으로 해서 총 24 사이클을 반복하여 PCR 을 수행하였다.

성장 조건 및 스트레스 유도

식물에 대한 삼투압 스트레스는 2 주령 애기장대 유묘(seedling)를 400 mM 만니톨을 포함하는 용액에 담가 유도하였다. 샘플은 삼투압 스트레스 유도 후 0, 6, 12 및 24 시간에 수득하였다.

가뭄 스트레스를 유도하기 위해 유묘를 3 일 동안 정상 살수하여 성장시킨 다음 2 주 후, 식물을 두 그룹으로 분리하였다. 한 그룹은 10 일간 물을 공급하지 않음으로써 가뭄 스트레스를 유도하였고, 대조군은 정상적으로 물을 공급하였다.

5 회수된 유묘는 즉시 액체질소로 동결시킨 다음 -80℃에 보관하였다.

애기장대 원형질체에서의 *AtRZF1*-EGFP 재조합 단백질 분포

AtRZF1-GFP 컨스트럭트의 일시적 발현을 위해 *AtRZF1* 의 ORF(open reading frame)를 프라이머(5' -TCTAGAATGTCAAGTATTCGGAATAC-3' 및 5' -CCCTTGCTCACCATATAGTCAAAAGGC-3')를 이용하여 증폭시키고, EGFP 유전자는 10 5' -GCCTTTTGACTATatggtgagcaaggg-3' 및 5' -GAGCTCAGTTATCTAGATCC-3' 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 두 PCR 결과물을 어닐링 시킨 다음 5' -TCTAGAATGTCAAGTATTCGGAATAC-3' 및 5' -GAGCTCAGTTATCTAGATCC-3' 프라이머를 이용하여 재증폭시킨 후, pGEM T-이지 벡터로 삽입 시키고 DNA 15 시퀀싱을 실시하였다. 상기 제작한 컨스트럭트를 *Xba*I 및 *Not*I 제한효소를 이용하여 절단한 다음, pBI221 로 삽입시켜 클로닝하였다. *AtRZF1*-EGFP 재조합 유전자는 PEG(polyethylene glycol)를 이용하여 애기장대 원형질체 세포로 형질전환시켰다(Abel and Theologis, 1994). *AtRZF1*-EGFP 및 EGFP 의 발현은 형질전환 후 12 시간에 측정하였다. 형질전환된 원형질체는 슬라이드 20 글라스에 올려놓은 후, FluoView1000 공초점 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다. 이미지는 FV10-ASW 1.7A 소프트웨어(Olympus)를 이용하여 처리함으로써 획득하였다.

정량적 PCR(qPCR)을 이용한 가뭄 스트레스 관련 유전자들의 발현 분석

25 정량적 PCR(Quantitative real-time PCR, qPCR)에는 Roter-Gene 6000 정량적 PCR 기계(Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia)를 이용하였고, 유전자 발현 분석은 RG6000 1.7 소프트웨어 프로그램(Corbett Research)을 이용하여 분석하였다. 총 RNA 는 스트레스를 처리한 혹은 처리하지 않은 2 주 된 식물체들로부터 RNeasy Plant Mini kit(Qiagen 30 Valencia, CA, USA)에 의해 추출하였고, qPCR 을 하기 위해 각 샘플의 총 RNA 농도는 100 ng 을 사용하였으며, SensiMix 원-스텝 키트 (Quantance,

London, UK)를 이용하여 각 유전자들의 정량적 PCR 을 수행하였다. qPCR 수행 절차 조건은 다음과 같다. 첫 번째, 42℃에서 30 분; 두 번째, 95℃에서 10 분; 세 번째, 95℃에서 15 초; 네 번째, 55℃에서 30 초; 다섯 번째, 72℃에서 30 초의 조건으로 PCR 을 수행한 후, 다시 세 번째부터 다섯 번째까지 35 회 반복하여 PCR 을 수행하였다.

정량적 PCR 에 이용된 유전자 특이적 프라이머는 표 1 과 같다.

【표 1】

유전자	프라이머 서열(5 ‘-3’)
<i>AtRZF1 (At3g56580)</i>	정방향: CAGAAGCACCAATGGAAGAG 역방향: GTCGACATAGTCAAAAGGCCATCCAC
<i>P5CS1 (At2g39800)</i>	정방향: CGACGGAGACAATGGAATTGT 역방향: GATCAGAAATGTGTAGGTAGC
<i>P5CR (At5g14800)</i>	정방향: GATGGAGATTCTTCCGATTCC 역방향: CCAGCTGCAACAGAAACCAGA
<i>RAB18 (At5g66400)</i>	정방향: CGATCCAGCAGCAGTATGAC 역방향: TTCGAAGCTTAACGGCCACC
<i>RD29A (At5g52310)</i>	정방향: GACGGGATTTGACGGAGAAC 역방향: CCGCCACATAATCTCTACCC
<i>RD29B (At5g52300)</i>	정방향: CGTCCTTATGGTCATGAGC 역방향: GCCTCATGTCCGTAAGAGG
<i>AOX1a (At3g22370)</i>	정방향: GGGTATCATTGATTGATTA 역방향: GTTATGATGATATCAATGGT
<i>COR15A (At2g42540)</i>	정방향: CAGCGGAGCCAAGCAGAGCAG 역방향: CATCGAGGATGTTGCCGTCACC
<i>ERD15 (At2g41430)</i>	정방향: CCAGCGAAATGGGGAAACCA 역방향: ACAAAGGTACAGTGGTGGC
<i>ERD1 (At5g51070)</i>	정방향: GTAAGGTCATTCTTTCATAGATG 역방향: CTGAAGTTCACCCCTTCCAAGTG
<i>Actin8 (At1g49240)</i>	정방향: CCTTGCTGGTCGTGACCTTACTGA

역방향: CTCTCAGCACCGATCGTGATCACT

인 비트로 자가-유비퀴티네이션 어세이

전장(full-length) *AtRZF1* cDNA 는 다음의 프라이머를 이용하여 증폭시켰다: 5' -GAATTCATGTCAAGTATTCGGAATAC-3' (*EcoRI* 부위는 밑줄) 및 5' -GTCGACATAGTCAAAAGGCCATCCAC-3' (*Sa/I* 부위는 밑줄). PCR 산물은 *EcoRI* 및 *Sa/I* 을 이용하여 절단하고 pMAL P2x 벡터(New England BioLabs, Beverly, MA, USA)로 삽입하였다. 상기 플라스미드는 *E. coli* BL21 스트레인에 형질전환하여 발현을 유도하였고, 아밀로스 레진(New England BioLabs)을 이용하여 친화성크로마토그래피를 실시하여 단백질을 정제하였다. 인 비트로 자가-유비퀴티네이션 어세이는 Auto-ubiquitinylation kit(Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)를 이용하여 실시하였다.

면역 블롯팅

반응 샘플은 12% SDS-PAGE 겔을 이용하여 전기영동하여 분리한 다음, 세미-드라이 트랜스퍼(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 PVDF(polyvinylidene fluoride) 멤브레인으로 이동시켰다. 멤브레인은 BSA/PBS-T 버퍼[1% BSA(bovine serum albumin)과 0.2% 트윈 20 이 포함된 PBS(phosphate-buffered saline) 용액 (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH7.4)] 용액을 가지고 상온에서 2 시간 동안 가볍게 흔들면서 멤브레인을 블로킹 시켰다. 블로킹된 멤브레인은 PBS-T 버퍼[0.2% Tween 20 이 포함된 PBS 용액(137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH7.4)] 용액으로 상온에서 10 분 동안 3 번 반복해서 세척한 후, 1:10,000 으로 희석시킨 1 차 항-MBP(Maltose Binding Protein) 항체(New England BioLabs) 또는 1:500 으로 희석시킨 1 차 항-Ub 항체(Enzo Life Sciences)가 첨가된 BSA/PBS-T 버퍼 용액에 멤브레인을 넣은 다음, 4°C에서 12 시간 동안 가볍게 흔들면서 배양시켰다. 배양된 멤브레인을 PBS-T 버퍼 용액으로 상온에서 10 분 동안 3 번 반복해서 세척한 후, 1:10,000 으로 희석시킨 2 차 항-마우스 항체-퍼옥시다아제 결합(New England BioLabs) 또는 1:5,000 으로 희석시킨 2 차 항-토끼 IgG 항체-HRP 결합(Enzo Life

Sciences)이 첨가된 BSA/PBS-T 버퍼 용액에 멤브레인을 넣은 다음, 상온에서 2 시간 동안 가볍게 흔들면서 배양시켰다. 배양된 멤브레인을 PBS-T 버퍼 용액으로 상온에서 10 분 동안 6 번 반복해서 세척한 후, Supersignal West Pico ECL Substrate kit(Thermo Scientific)를 이용,
 5 멤브레인을 X-선 필름 위에 노출시켰다.

실험결과

AtRZF1(At3g56580)의 아미노산 서열 분석

본 실험에서 아미노산 서열은 전체 애기장대 유전체 시퀀스 분석에서 C3H2C3-타입 RING-H2 핑거 유전자 패밀리에 속하는 At3g56580 을 분석한 것이다(Stone et al., 2005). At3g56580 는 963 bp 이며, 320 개의 아미노산으로 구성된 단백질을 코딩하고 있는 하나의 ORF 를 가지며, 상기 단백질의 분자량은 35.8 kDa 이다. 여러 소프트웨어 프로그램(<http://ihg.gsf.de>; <http://hannibal.biol.uoa.gr>)을 이용하여
 15 At3g56580 단백질의 신호 펩타이드 서열을 예측하였다(도 1a). 도 1b 를 살펴보면, 추정된 아미노산 서열이 RING-H2 징크 핑거 단백질 패밀리와 높은 상동성을 갖는 것으로 나타났다. *A. thaliana* At3g56580 유전자는 *AtRZF1* 으로 지정된다. *AtRZF1* 및 쌀과 옥수수로부터 알려지지 않은 단백질 오솔로그 간의 아미노산 서열 얼라인먼트는 도 2 에 나타냈다. AtRZF1
 20 단백질과 벼 혹은 옥수수에서의 오솔로그 단백질 간의 아미노산 서열을 비교한 결과, 36-70% 동일성 및 43-75% 유사성의 호몰로지 값을 얻을 수 있었다.

AtRZF1 은 단일 RING 도메인을 포함하며, 그것의 중심 부위는 다른 식물 RING 단백질 및 애기장대의 해당 부위와 39-95% 동일성을 갖는 부위를
 25 말한다. SIS3(Sugar-insensitive 3)를 제외한 이러한 단백질들의 기능은 알려져 있지 않다. SIS3 는 유비퀴틴 E3 리가아제를 코딩하고 있으며, 초기 유묘 발달 동안에 당류 신호전달의 양성 조절자로 작용한다(Huang et al., 2010). 41 개 아미노산 RING 모티프에서 Cys-X₂-Cys-X₁₄-Cys-X₁-His-X₂-His-X₂-Cys-X₁₀-Cys-X₂-Cys 서열은 잘 보존(도 1b)되어 있기 때문에, *AtRZF1* 은
 30 C3H2C3-타입 RING-H2 단백질로 분류된다(Jensen et al., 2005).

AtRZF1 단백질의 세포 내 분포

도 1 에서 예측된 도메인에 대한 *AtRZF1* 아미노산 서열을 조사하기 위해 몇몇 소프트웨어 프로그램을 이용하였다. Mitoprot2(<http://ihg.gsf.de>) 및 PredSL(<http://hannibal.biol.uoa.gr>) 프로그램은 *AtRZF1* 이 아미노산 1-23 에서 미토콘드리아 신호 펩타이드를 갖는다고 예측하였다. 반면, PredSi 프로그램(<http://www.predisi.de>)은 *AtRZF1* 이 신호 펩타이드를 갖고 있지 않다고 예측하였다. 따라서, *AtRZF1* 이 신호 펩타이드를 갖고 있는지 여부는 확실치 않다.

AtRZF1 의 세포 내 분포를 측정하기 위해, GFP 리포터 유전자를 *AtRZF1* 암호 영역에 삽입하여 애기장대 원형질 세포에서 *AtRZF1*-EGFP 재조합 단백질 생산할 수 있는 컨스트럭트를 제조하였다. 도 3 에서 보는 바와 같이, *AtRZF1*-EGFP 컨스트럭트의 형광 시그날은 애기장대 엽육 원형질세포의 세포질에서 검출되었다. 이러한 결과는 *AtRZF1* 의 세포 내 분포가 세포질-분포 단백질과 같다는 것을 나타낸다.

애기장대에서 *AtRZF1* 의 발현

AtRZF1 의 기능에 대한 정보를 얻기 위해, 1.146-kb *AtRZF1* 프로모터-GUS 재조합 컨스트럭트를 포함하는 애기장대 형질전환 식물을 조직화학 GUS 염색하여 *AtRZF1* 의 초기 발현 패턴을 평가하였다. 형질전환 식물의 전체 유묘, 특히 관다발에서 GUS 활성이 강하게 나타났다(도 4a-b). 꽃에서는 꽃받침(도 4c), 수술(도 4d) 및 화분(도 4e)에서 GUS 염색이 관찰되었다. 애기장대에서 전장유전체 발현 분석 결과, *AtRZF1* 의 발현은 삼투압 스트레스에 의해 감소하였다(<http://jsp.weigelworld.org>). 인 비보에서 *AtRZF1* 의 기능을 확인하기 위해, 삼투압 스트레스 조건 하에서 2 주령 애기장대 유묘의 *AtRZF1* mRNA 축적을 정량적 RT-PCR 을 이용하여 평가하였다. 도 5a 에서 보는 바와 같이, *AtRZF1* 의 전사 레벨은 만니톨 처리 24 시간 후 약 3 배 감소하였다. 가뭄 스트레스 하에서 애기장대 잎에서의 *AtRZF1* 발현 또한 감소하였다(도 5b). 삼투압 스트레스-유도 RAB18(responsive to ABA)(Huang et al., 2008) 유전자는 물 부족 스트레스에 대한 대조군으로 사용되었다(도 5a-b). 이러한 결과들은 *AtRZF1* 가 가뭄 조건에 의해 조절된다는 것을 강하게 시사한다.

AtRZF1 의 인 비트로 유비퀴틴 E3 리가아제 활성

RING 도메인 단백질은 유비퀴티네이션에 관여하는 E3 리가아제의 한 종류이다(Lorick et al., 1999). *AtRZF1* 단백질은 C₃H₂C₃-타입 RING-H₂ 단백질의 멤버이며(도 1b), E3 리가아제 활성에 대해서는 기존에 알려진 바가 없다(Kim et al., 2012). 이에, 본 발명자들은 유비퀴티네이션 과정에서 E3 리가아제로서의 *AtRZF1* 기능을 확인해보고자 하였다. 인 비트로 분석법을 이용하여 *AtRZF1* 에 대한 E3 리가아제 활성을 측정하였다(도 6). 재조합 MBP-*AtRZF1* 단백질은 *E. coli* 에서 생산하였으며, 아밀로스 레진을 이용하여 정제하였다. E1 및 E2 가 존재할 때, 유비퀴티네이션된 MBP-*AtRZF1* 단백질은 항-Ub(도 6a) 및 항-MBP(도 6b) 항체를 이용한 면역블롯팅에 의해 검출되었다. E1 또는 E2 가 없을 경우, MBP-*AtRZF1* 의 유비퀴티네이션 활성은 관찰되지 않았다. 도 6 에서 보는 바와 같이, 고분자 유비퀴티네이션 밴드는 *AtRZF1* 에 의해 생산되며, 이러한 결과는 *AtRZF1* 가 인 비트로에서 Ub E3 리가아제 활성을 갖는다는 것을 나타낸다.

AtRZF1 과발현에 따른 가뭄 스트레스 민감성

AtRZF1 의 인 비보 기능을 조사하기 위해, 애기장대에서 35S 프로모터의 조절에 의한 *AtRZF1* 과발현을 유도하였다. 12 개 동형 접합성 라인(T₃ generation)을 수득하였고, 표현형 특성 평가를 위해 이식유전자의 높은 발현 레벨을 나타내는 2 개 라인(OX1-1 및 OX4-2)을 선별하였다(도 7a). *AtRZF1* 과발현 라인 및 야생형 식물을 비교한 결과, 형태학적 변화 또는 성장 저해는 나타나지 않았다(도 8). 애기장대에서 *AtRZF1* 의 기능을 평가하기 위해, At3g56580-tagged T-DNA 삽입 돌연변이체(SALK_024296)를 수득하였다. *atrzf1* 돌연변이 식물체는 At3g56580 유전자의 1 번 엑손에 T-DNA 를 삽입함으로써 제작하였고, 결과적으로 내재적(endogenous) *AtRZF1* 유전자의 발현은 저해된다. At3g56580 유전자 1 번 엑손에 T-DNA 이 삽입되었는지 여부는 PCR 을 이용하여 확인하였다. 동형접합성은 확립되었으며, *AtRZF1* 의 발현은 RT-PCR 을 통해 확인하였다(도 7a).

만니톨을 포함하는 발아 조건에서 *AtRZF1* 발현에 대한 효과를 측정하기 위해, 야생형, *atrzf1* 돌연변이 및 *AtRZF1* 과발현 식물의 씨앗을

400 mM 만니톨을 추가적으로 포함하는 MS 배지에서 발아시킨 다음, 건조 스트레스 반응에서 *AtRZF1* 과발현 식물의 생존율을 측정하기에 앞서 8 일간 성장시켰다(도 8). 400 mM 만니톨 조건에서 야생형 식물의 잎의 약 35%가 녹화(greening)된 것과 비교하였을 때, OX1-1 및 OX4-2 라인은 15% 이하로 녹화가 진행되었다(도 7b). 반면, *atrzf1* 돌연변이 라인은 발아 후 8 일 시점에 약 80%가 생존하였다(도 7b). 상기 결과에서 보는 바와 같이, *AtRZF1* 과발현 식물은 떡잎 발달 면에서 삼투압 스트레스에 과민성을 나타내며, *atrzf1* 돌연변이 및 *AtRZF1* 과발현 식물은 가뭄 스트레스에 따른 반응으로 상반된 표현형을 갖는다.

다음으로, 본 발명자들은 극심한 가뭄 스트레스에 대한 *atrzf1* 돌연변이 식물의 반응을 조사하였다. 가뭄 스트레스에 대한 반응성을 더욱 증가시키기 위해, 야생형, *atrzf1* 돌연변이 및 *AtRZF1* 과발현 식물을 정상 성장 조건에서 2 주간 성장시킨 다음, 완전히 건조된 땅에서 10 일간 급수를 하지 않았다. 그 다음 재 급수를 실시하여 상기 식물들의 생존율을 측정하였다. 도 9 에서 보는 바와 같이, 대부분의 야생형 및 *AtRZF1* 과발현 식물은 심각하게 시들고 손상되었으며(도 9a), 재급수 3 일 후 성장율은 야생형 식물 38.1%(55 개 중 21 개), OX1-1 라인 16.3%(55 개 중 9 개) 및 OX4-2 라인 10.9%(55 개 중 6 개)으로 나타났다(도 9b). 이러한 결과는 형질전환 식물이 야생형 식물에 비해 물 부족에 더욱 민감하다는 것을 나타낸다. 반면, *atrzf1* 돌연변이는 심각한 가뭄 조건 후에도 상대적으로 건강한 상태를 보였다(도 9a). 재급수 3 일 후, *atrzf1* 돌연변이의 생존율을 72.7%(55 개 중 40 개)였다(도 9b). 이러한 결과는, *atrzf1* 돌연변이 식물이 *AtRZF1* 과발현 식물과 비교하여 심각한 가뭄 스트레스에 높은 저항성을 갖는다는 것을 의미한다.

AtRZF1 과발현 식물의 가뭄 민감성

가뭄 스트레스에 대한 반응을 평가하기 위해, 식물의 CRWL(cut rosette water loss rates)을 측정하였다. 잎으로부터 물 손실을 측정하기 위해, 야생형, *atrzf1* 돌연변이 및 *AtRZF1* 과발현 식물에서 비슷한 사이즈, 나이 및 위치를 갖는 잎을 분리하고 공지된 방법(Sang et al., 2001)에 따라 잎 무게의 감소를 측정하였다. 잎 분리 후, *AtRZF1* 과발현 식물의

5 있는 야생형 및 *atrzf1* 돌연변이 식물에 비해 대기 조건 하에서 증량
 감소가 더 크다(도 10a). 물 감소는 잎 분리 후 시간이 경과할수록 더욱
 분명하게 나타났다. 또한, 가뭄 스트레스는 세포 사멸의 마지막 단계인
 세포 원형질막 붕괴를 수반한다. 이것은 전해질 누출을 통해 편리하게
 10 정량화할 수 있다(Nanjo et al., 1999). *atrzf1* 돌연변이 식물은 야생형 및
AtrZF1 과발현 식물과 비교하여 잎의 낮은 멤브레인 이온 누출을 나타내기
 때문에 가뭄으로 유도되는 표현형이 늦게 나타난다(도 10b). 이러한
 결과들은 가뭄의 생리학적 과정이 유도하는 표현형은 야생형 및 *atrzf1*
 돌연변이 식물보다 *AtRZF1* 과발현 식물에서 보다 일찍 나타난다는 것을
 10 가리킨다.

가뭄 스트레스 관련 유전자들의 발현

델타-P5CS1(Pyrroline-5-Carboxylate Synthase1), 델타-
 P5CR(Pyrroline-5- Carboxylate Reductase), RAB18, RD29A(Responsive to
 15 Dessication 29A), RD29B, AOX1a(Alternative Oxidase1a), COR15A(Cold-
 Regulated 15A), ERD15(Early Responsive to Dehydration 15) 및 ERD1
 유전자의 발현은 스트레스에 의해 유도된다(Savouré et al., 1997;
 Strizhov et al., 1997; Tran et al., 2006; Vanlerberghe et al., 2009;
 Lim et al. 2010). 상세하게는, P5CR, RAB18 및 ERD15 의 발현은 염분 및
 20 가뭄 스트레스에 의해 발현된다. 도 11 은 가뭄 조건에 의해 야생형 및
atrzf1 돌연변이 식물보다 *AtRZF1* 과발현 OX1-1 및 OX4-2 식물에서 P5CS1,
 P5CR, RAB18, RD29A, RD29B, AOX1a, COR15A, ERD15 및 ERD1 을 포함하는
 스트레스-유도발현 유전자의 전사체가 감소하는 것을 나타낸다. 가뭄
 조건하에서 상기 9 개 유전자의 전사는 야생형 식물보다 *atrzf1* 돌연변이
 25 식물에서 더욱 많이 유도된다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때, 본 발명의
 발현 데이터는 *AtRZF1* 은 가뭄 스트레스 관련 유전자에 있어서 음성적으로
 작용한다고 사료된다.

가뭄 스트레스 하에서 *atrzf1* 돌연변이의 고 프로린 함량

30 P5CS1 및 P5CR 유전자의 전사체는 *atrzf1* 돌연변이 식물에서
 증가하기 때문에, 본 발명자들은 야생형 및 형질전환 식물의 본잎(rosette

leaves)에서 프롤린 함량을 측정하였다. 야생형, *atrzf1* 돌연변이 및 *AtRZF1* 과발현 식물에서 프롤린 축적에 대한 차이를 측정하기 위해 가뭄 조건 10 일 후에 잎에서 프롤린 함량을 측정하였다. 스트레스를 받기 이전에는 모든 유묘에서 프롤린 함량은 비슷하게 낮은 수준을 나타냈다(도 12). 가뭄 스트레스 하에서, 프롤린 함량은 야생형, *atrzf1* 돌연변이 및 *AtRZF1* 과발현 식물 간에 현저한 차이를 나타냈다. 프롤린 함량에 있어서, *atrzf1* 돌연변이는 야생형 및 *AtRZF1* 과발현 식물에 비해 높은 수준을 나타냈다. 가뭄 조건에 의해 증가되는 프롤린 함량은 *AtRZF1* 과발현 식물보다 야생형 식물에서 더 높게 나타났다(도 12). 이러한 결과는 *AtRZF1* 이 가뭄 조건에서 프롤린 생산에 음성적으로(negatively) 작용한다는 것을 의미한다.

논의

AtRZF1 유전자는 C3H2C3-타입 RING 징크 핑거 단백질을 코딩하며, 가뭄 반응에서 중요한 역할을 한다. 물 부족 반응 어세이에서 *atrzf1* 돌연변이는 가뭄 조건에 대해 덜 민감한 반면, *AtRZF1* 과발현 식물은 더욱 민감하였다. 이러한 결과는 *AtRZF1* 이 씨앗의 발아 및 초기 유묘 발달 동안에 가뭄 반응을 음성적으로 조절한다는 것을 의미한다. 결과적으로 본 발명은 *AtRZF1* 과발현 형질전환 식물 및 *atrzf1* 돌연변이 식물은 물 부족 및 이온 누출에 있어서 현저한 차이를 나타낸다(도 10a). *AtRZF1* 과발현 라인의 잎들은 현저한 물 부족 증가를 나타내었고, 야생형 및 *atrzf1* 돌연변이 잎들과 비교하였을 때 가뭄 조건 하에서 멤브레인 이온 누출도 증가하였다(도 10b).

P5CS1, P5CR, RAB18, RD29A, RD29B, AOX1a, COR15A, ERD15 및 ERD1 을 포함하는 스트레스-유도 유전자의 전사 레벨은 가뭄 조건 후, 야생형 및 *atrzf1* 돌연변이 식물에 비해 *AtRZF1* 과발현 식물에서 보다 더 감소하였다(도 11a-c). 이러한 결과는 *AtRZF1* 이 가뭄 스트레스 반응에서 음성적으로 작용한다는 것을 증명한다. *atrzf1* 돌연변이는 야생형 및 *AtRZF1* 과발현 식물에 비해 현저한 가뭄 저항성을 나타냈다. 식물세포에서 프롤린의 축적은 삼투압 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있다(Szabados and Savaouré, 2010). *atrzf1* 돌연변이 식물에서 프롤린의 축적은 야생형 및

AtRZF1 과발현 식물에 비해 더 높은 수준이며(도 12), 이는 *AtRZF1* 이 삼투압 관련 요소들의 조절을 통해 가뭄 민감성 유도에 관여한다는 것을 시사한다. *AtRZF1* 은 RING 핑거 단백질의 하나로 인용된다. 몇몇 RING 핑거 단백질은 유비퀴틴 E3 리가아제로 작용하여

5 유비퀴티네이션/단백질분해효소복합체 과정에 있어서 중요한 역할을 수행한다(Smalle and Vierstra, 2004), *AtRZF1* 의 유비퀴틴 E3 리가아제 활성은 인 비트로 분석법을 이용하여 측정하였다. 측정 결과, *AtRZF1* 단백질은 E1 및 E2 효소가 존재하는 가운데 MBP-*AtRZF1* 재조합 단백질의 자가 유비퀴티네이션을 발생시킴으로써 실제로 E3 리가아제 활성을 갖는

10 것으로 나타났다(도 6). 흥미롭게도, 많은 E3 유비퀴틴 리가아제는 스트레스 반응에 있어서 음성 조절자로서 작용한다. 예컨대, HOS1(High Expression of Osmotically Responsive Genes 1)은 ICE1(Inducer of CBP Expression 1)(Chinnusamy et al., 2007)을 유비퀴틴화 시킴으로써 저온 반응성 유전자의 발현을 조절하며, DRIP1(DREB2A-Interacting Protein 1)은

15 DREB2A(Dehydration-Responsive Element Binding protein 2A)의 유비퀴티네이션을 타겟으로 하여 결과적으로 이들의 불안정화 및 스트레스 반응을 하향조절을 유도한다(Qin et al., 2008). *AtCHIP*(HSC70-Interacting Protein)의 카르복실 말단은 PP2A(Protein Phosphatase 2A)의 A 서브유닛을 모노유비퀴티네이션 시키고 그것의 활성을 증가시킨다는 것이 보고되었으나,

20 *AtCHIP* 과발현 애기장대는 저온 스트레스에서 민감성이 증가되었다(Yan et al., 2003). 신규한 E3 리가아제인 KEG(Keep on Going) 단백질은 최근 AGA 에 의해 조절된다는 것이 밝혀졌다(Stone et al., 2006). KEG 는 ABA 신호전달의 양성 조절자인 ABI5(ABA Insensitive 5)와 상호작용하여 ABI5 를 분해시킨다. ABA 는 자가-유비퀴티네이션을 통해 KEG 분해를 촉진시키며,

25 KEG 및 ABI5 간의 균형을 유지시킨다. 게다가, 몇몇 E3 리가아제는 비생물학적(abiotic) 스트레스의 양성 조절자로서 활성을 나타낸다. 이러한 단백질들은 RHA2a(RING-H2 Finger A2a)(Bu et al., 2009) 및 *AtAIRP1*(ABA Insensitive RING Protein 1)(Ryu et al., 2010)을 포함하며, 이들은 ABA 신호전달의 여러 측면에 관여한다. RHA2a 에 의해 표적화된 단백질들은 ABA

30 신호전달 과정의 음성 조절자라고 예상된다. *AtAIRP1* 의 과발현은 씨앗 발아

및 기공 폐쇄(stomatal closure) 동안에 ABA 과민증을 유발하며, 결과적으로 가뭄 스트레스 내성을 야기한다.

상기 결과들에 기초하여, 본 발명자들은 E3 리가아제으로써 작용하는 *AtRZF1* 가 유비퀴틴-단백질분해효소 복합체를 통해 *AtRZF1* 기질의 분해를 매개한다는 가설을 도출하였다. *AtRZF1* 은 그 자체로 가뭄 반응을 음성적으로 조절하는 것으로 알려져 있으며, 본 발명자들은 *AtRZF1* 에 의해 분해되는 단백질들이 물 부족 스트레스의 양성 조절자이며, 이러한 분자들을 제거하면 가뭄 반응을 활성화 시키는 효과를 가질 것이라고 예상하였다. 따라서, *AtRZF1* 의 타겟 단백질 및 그들의 상호작용과 같은 *AtRZF1* 의 기능 연구는 식물에서 가뭄 반응 네트워크를 완전히 이해하는데 필수적이다.

참고문헌

1. Abel S, Theologis A. 1994. Plant Journal 5: 421-427.
- 15 2. Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, et al. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis. Science 301: 653-657.
3. Bu Q, Li H, Zhao Q, Jiang H, Zhai Q, Zhang J, Wu X, Sun J, Xie Q, Wang D, Li C. 2009. Plant Physiology 150:463-481.
4. Chen ZJ, Sun LJ. 2009. Molecular Cell 33:275-286.
- 20 5. Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. 2007. Trends in Plant Science 12:444-451.
6. Craig A, Ewan R, Mesmar J, Gudipati V, Sadanandom A. 2009. Journal of Experimental Botany 60:1123-1132.
7. Dye BT, Schulman BA. 2007. Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure 36:131-150.
- 25 8. Freemont PS. 2000. Current Biology 10:R84-R87.
9. Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J. 1991. Cell 64:483-484.
10. Fujita Y, Fujita M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2011. Journal of Plant Research 124:509-525.
- 30 11. Gmachl M, Gieffers C, Podtelejnikov AV, Mann M, Peters JM. 2000. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 97:8973-8978.

12. Harb A, Krishnan A, Ambavaram MMR, Pereira A. 2010. *Plant Physiology* 154:1254-1271.
13. Huang D, Wu W, Abrams SR, Cutler AJ. 2008. *Journal of Experimental Botany* 59:2991-3007.
- 5 14. Huang Y, Li CY, Pattison DL, Gray WM, Park S, Gibson SI. 2010. *Plant Physiology* 152:1889-1900.
15. Jakab G, Ton J, Flors V, Zimmerli L, Metraux J.P, Mauch-Mani B. 2005. *Plant Physiology* 139:264-274.
16. Jensen RB, Jensen KL, Jespersen HM, Skriver K. 1998. *FEBS Letters*
10 436:283-287.
17. Kim SJ, Ryu MY, Kim WT. 2012. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 420:141-147.
18. Lim GH, Zhang X, Chung MS, Lee DJ, Woo YM, Cheong HS, Kim CS. 2010. *New Phytologist* 185:103-113.
- 15 19. Lin HK, Wang L, Hu YC, Altuwaijri S, Chang CS. 2002. *The EMBO Journal* 21:4037-4048.
20. Marrocco K, Bergdoll M, Achard P, Criqui MC Genschik P. 2010. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 631-639.
21. Mudgil Y, Shiu SH, Stone SL, Salt JN, Goring DR. 2004. *Plant*
20 *Physiology* 134:59-66.
22. Nanjo T, Kobayashi M, Yoshiba Y, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1999. *FEBS Letters* 461:205-210.
23. Peng M, Hannam C, Gu H, Bi YM, Rothstein SJ. 2007. *Plant Journal* 50:320-337.
- 25 24. Qin F, Sakuma Y, Tran LS, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K., Tanokura M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2008. *Plant Cell* 20:1693-1707.
25. Ryu MY, Cho SK, Kim, WT. 2010. *Plant Physiology* 154:1983-1997.
26. Santner A, Estelle M. 2009. *Nature* 459:1071-1078.
- 30 27. Savouré A, Hua XJ, Bertauche N, Montagu MV, Verbruggen N. 1997. *Molecular and General Genetics* 254:104-109.

28. Smalle J, Vierstra RD 2004. Annual Review of Plant Physiology 55:555-590.
29. Smirnova OG, Stepanenko IL, Shumnyia VK. 2011. Biology Bulletin Reviews 1:314-324.
- 5 30. Stone SL, Hauksdottir H, Troy A, Herschleb J, Kraft E, Callis J. 2005. Plant Physiology 137:13-30.
31. Stone SL, Williams LA, Farmer LM, Vierstra RD, Callis J. 2006. Plant Cell 18:3415-3428.
32. Strizhov N, Ábrahám E, Ökrész L, Blickling S, Zilberstein A,
10 Schell J, Koncz C, Szabados L. 1997. Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in Arabidopsis. 12:557-569.
33. Szabados L, Savoure A. 2010. Trends in Plant Science 15:89-97.
- 15 34. Tran LSP, Nakashima K, Sakuma Y, Osakabe Y, Qin F, Simpson SD, Maruyama K, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2006. Plant Journal 49:46-63.
35. Tyers M, Jorgensen P. 2000. Current Opinion in Genetics & Development 10:54-64.
- 20 36. Vanlerberghe GC, Cvetkovska M, Wang J. 2009. Physiologia Plantarum 137:392-406.
37. Vierstra RD. 2003. Trends in Plant Science 8:135-142.
38. Vierstra RD. 2009. Nature Reviews Molecular Cell Biology 10:385-397.
- 25 39. Yan J, Wang J, Li Q, Hwang JR, Patterson C, Zhang H. 2003. A Plant Physiology 132:861-869.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은

30

명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의
등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

(a) 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질의 억제제 또는 (b) 서열목록 제2서열의 아미노산 서열을 코딩하는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열의 발현 억제제를 포함하는 식물체의 가뭄 스트레스 저항성 증진용 조성물.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 단백질의 억제제는 항체, 펩타이드 앵타머, 어드넥틴(AdNectin), 어피바디(affibody), 아비머(Avimer), 쿠니즈도메인(Kunitz domain) 또는 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 발현 억제제는 핵산 분자 또는 돌연변이 유도제인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 발현 억제제로서 돌연변이 유도제는 서열목록 제2서열의 아미노산 서열로 이루어진 단백질에 대한 gDNA(genomic DNA)에 삽입되는 식물 형질전환용 벡터인 것을 포함하는 조성물.

【청구항 5】

E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자가 불활성화(inactivated)된 가뭄 스트레스 저항성을 갖는 형질전환된 식물세포.

【청구항 6】

E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자가 불활성화(inactivated)된 가뭄 스트레스 저항성을 갖는 형질전환된 식물체.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 식물체는 식량 작물류, 채소 작물류, 특용

작물류, 화훼류 및 사료 작물류로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 식물체.

【청구항 8】

5 다음의 단계를 포함하는 가뭄 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 제조하는 방법:

(a) 식물 세포의 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자를 불활성화(inactivation) 시키는 단계; 및

10 (b) 상기 식물세포로부터 가뭄 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자에 T-DNA 삽입(insertion) 하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

다음의 단계를 포함하는 식물체에 가뭄 스트레스 저항성을 부여하는 방법:

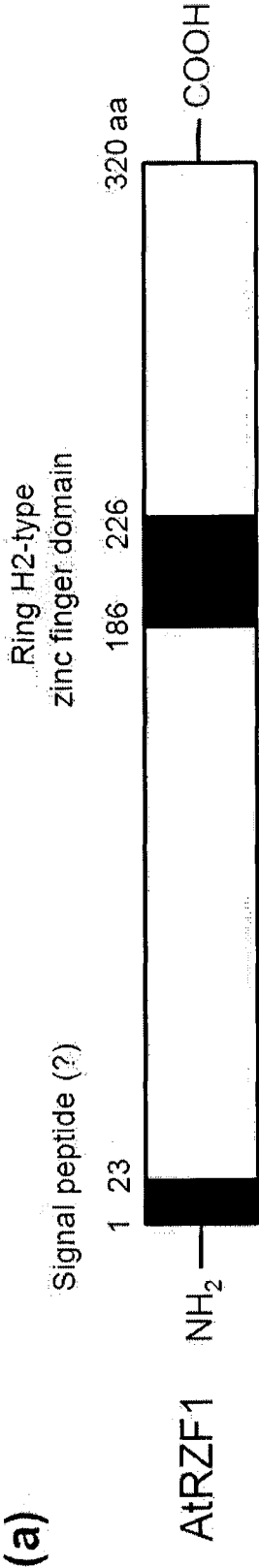
20 (a) 식물 세포의 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자를 불활성화(inactivation) 시키는 단계; 및

(b) 상기 식물세포로부터 가뭄 스트레스 저항성이 증진된 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

【청구항 11】

25 제 10 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 E3 유비퀴틴 리가아제 *atrzf1* 유전자에 T-DNA 삽입(insertion) 하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

Figure 1



(b) C3H2C3-type E3 ubiquitin ligase

		C	C	C	C	H	H	C	C	C		
AtRZF1	186	CPVCK	DEFE	LKSEA	QMPC	HIYH	SDCIV	PWL	VQHNS	CPVC	226	
AtRHC1a	190	CPVCK	DEFE	LGSEA	QMPCN	HIYH	SDCIV	PWL	VQHNS	CPVC	230	
AtRHC2a	201	CAVCK	NEFL	KSARE	EMPCN	HIYH	PD	CI	PWL	AI	RNSCPVC	241
AtSIS3	235	CLIC	LEFH	GH	EVRG	PCAHN	HVE	CI	DQWL	RL	NVKKCPRC	275
OsRZF1	192	CPVCT	DKFE	VG	TEARE	MPCKHLY	HA	ECI	PWL	VQHNS	CPVC	232
ZmRHC1a	193	CPVCK	DEFE	LGEA	ARQ	IPCKH	VYH	SDCIV	PWL	RL	HNSCPVC	233

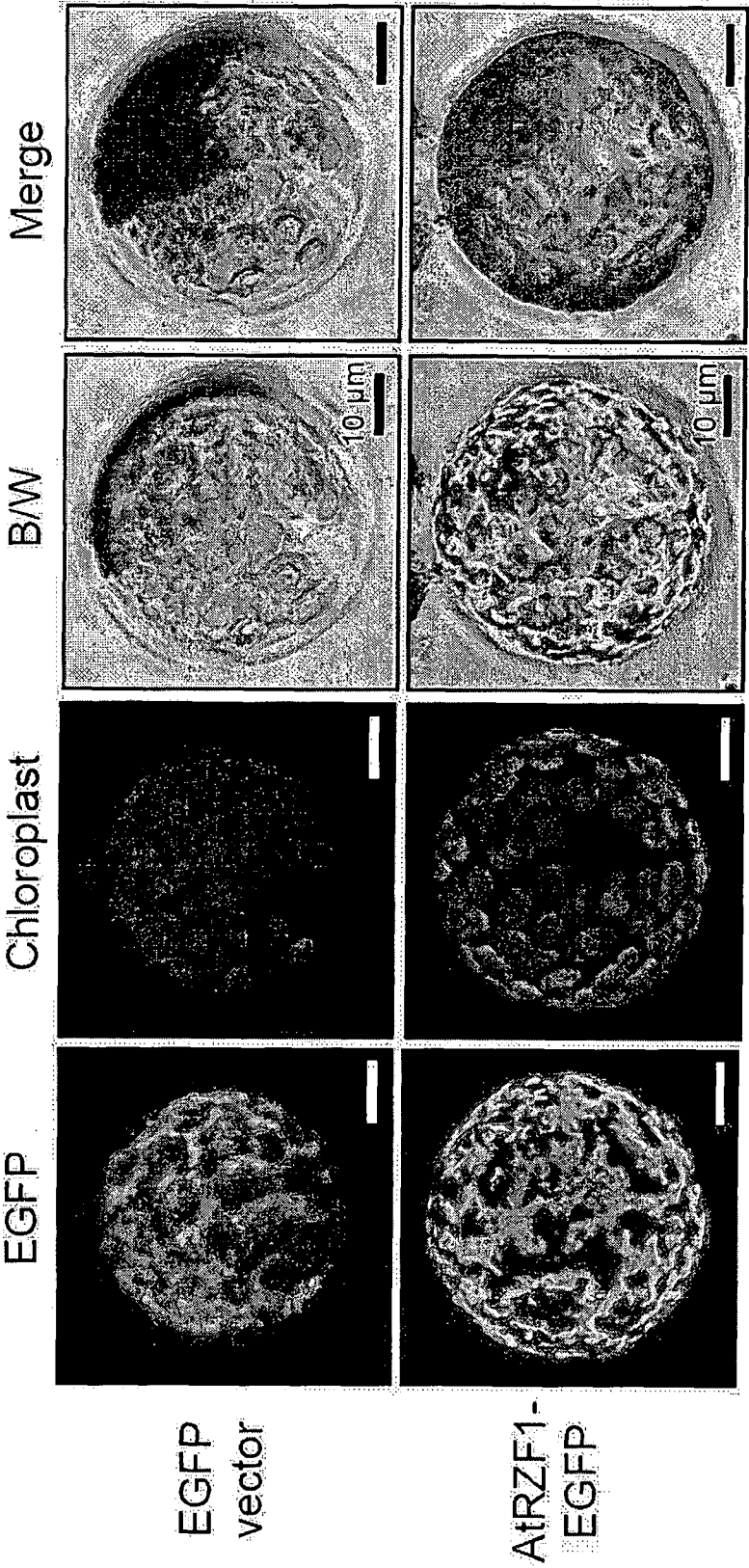
2/14

5 2

AtRZF1	1	MSSIR	-----	NTHWCHRCQRAVWLR	---	DAVCSYCGGGFVEEI	-	DIGPS	-----	RAHR	-	DVER
OsRHCl a	1	MEN-R	-----	ATHWCYACRRF	IRVSGQ	---	DITCPNNDGFI	QEI	SI	IG	SLNTYGI	EDPSFDER
ZmRHCl a	1	MSSATPAPARHRTCT	TYWICYQCGRA	IR	ISCPSTDMFC	PCFCGRF	HEE	VDP	-----	PTAR	-----	
AtRZF1	51	DFTFDLMEAFSA	FMRSR	LAERSYDRE	ISG	---	RLGSA	GSF	SNLAPLLIFGGQAP	RI	AGC	DNSSVEA
OsRHCl a	58	DRSEGVMEAMSD	LMRQR	LAEMGRNRV	DFHGTRGAS	SSHQGRQ	PTVRP	MLIFGS	NAEDRV	SS	SEEADIL	
ZmRHCl a	57	HGFPPAHFLPH	FHFHQ	QYACRRRW	VIYG	-----	EEPTV	PGRAF	QPAFAQ	GPAP	PPAPAPA	
AtRZF1	117	FVNGAAPGIG	---	LARGTNA	-----	GDYFFGPGLEEL	IEQLSSG	THRGPP	PAPK	SS	ILALPTIKITQ	
OsRHCl a	127	LRGRR	---IG	---	ADR-PNE	---	SRRLV	GPSLE	ALFEQL	LLHNNRQ	GGPPAPQ	SAIDSPVWKINL
ZmRHCl a	116	LVGRRRVSPPPAP	VPRRP	STPPAMDE	GDYFMGN	LSLIEEL	IQ	-NDRFG	HAPAP	FP	SAIDSLPTRVAG	
AtRZF1	177	KHLS	SSDSHCPVCKDE	FEELKSEA	QMPCH	HIYHSDC	IVPWL	VQHNSCPVCR	KELPS	RGSS	-	STQSSQNR
OsRHCl a	184	RHLRD	-DPHCPVCT	KFENG	CEA	EMPCKH	YHACI	PWL	VQHNSCPVCR	FLPSS	SHRSG	STRSSSTH
ZmRHCl a	185	AHLS	SDG-SQCPVCK	ELFELGEAA	Q	PKHV	YHSDC	IVPWL	RIHNSCPVCR	YQLP	FC	NG---SSQ
AtRZF1	246	STNR	---	ENSR	---	R	RN	---	IFSNLW	PFSS	---	SSSSTQNRRTNNT
OsRHCl a	253	SNEAL	SHGVARS	DADVPV	VARSD	ES	---	RN	EMH	---	GSFSEL	WPFD
ZmRHCl a	248	---	---	AAFRG	CSNGN	NRN	LE	EMERE	PLTMVQ	WGPFS	WLP	PPR---CMLDPGDAWEHCQGRGH
AtRZF1	283	ATA	FE	GHYHH	QQQQQQ	QH	QH	QQ	QSS	HM	GYS	GWPFDY
OsRHCl a	313	VHDPAC	---	---	---	QMTYSE	WH	DI	---	---	---	---
ZmRHCl a	301	DAADAC	---	---	---	AFYAW	MR	SL	LI	---	---	---

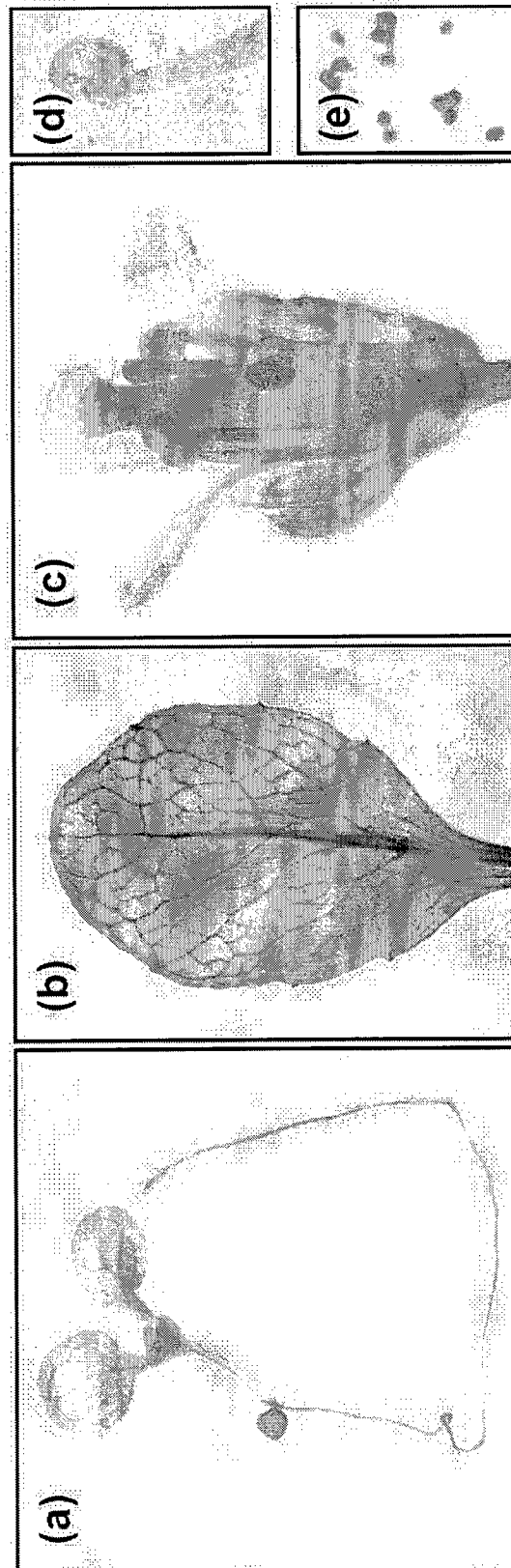
3/14

도 3

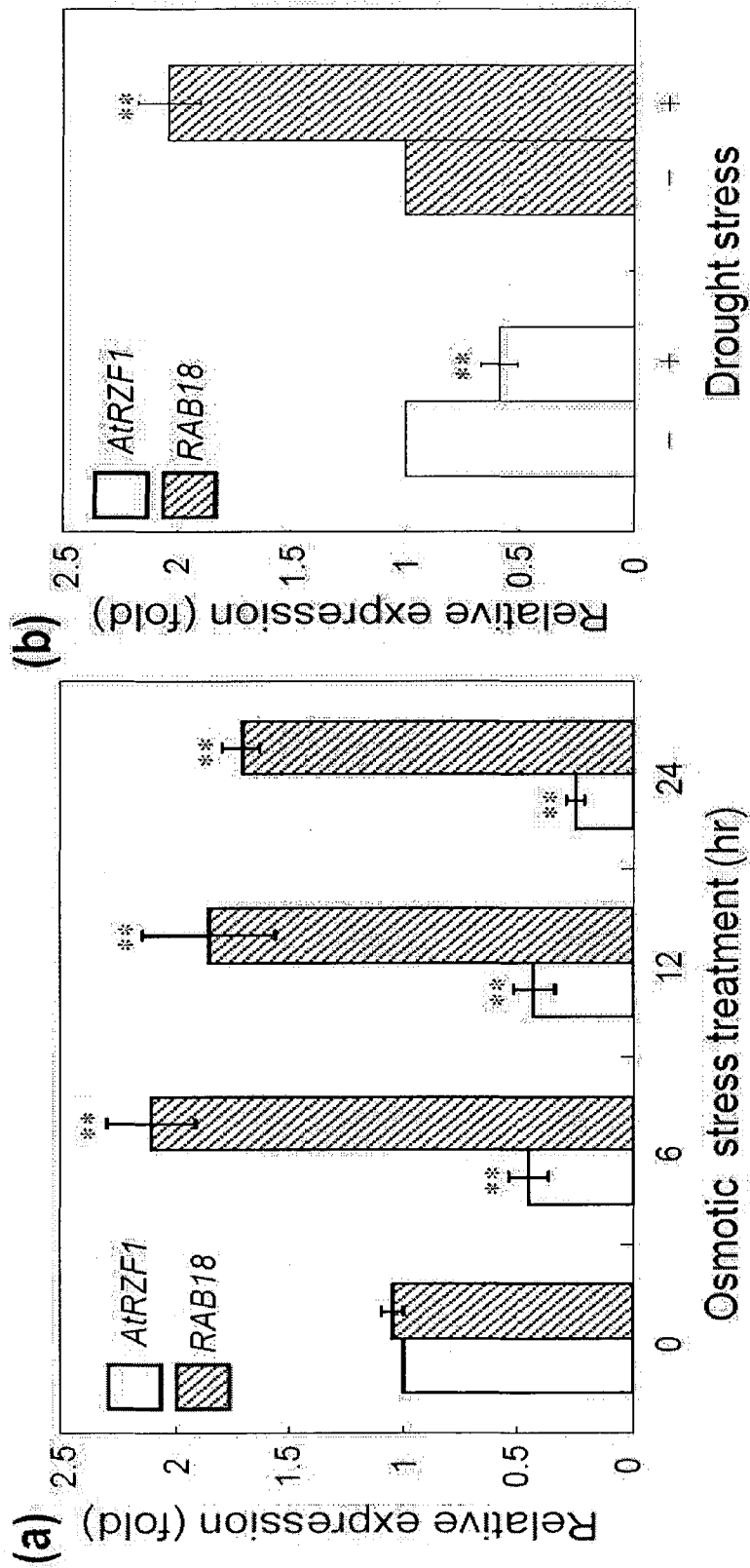


4/14

도 4

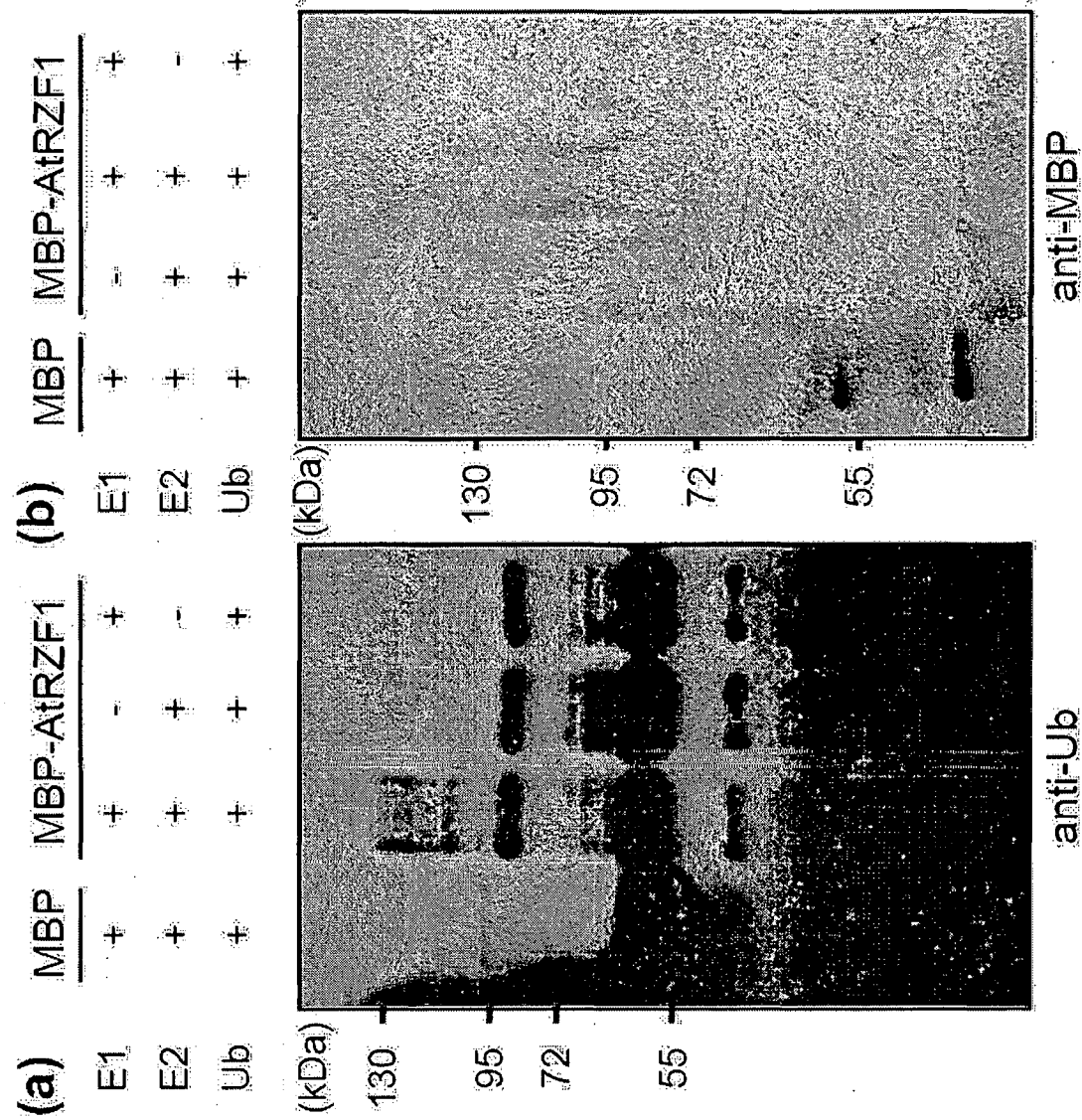


5/14
도 5



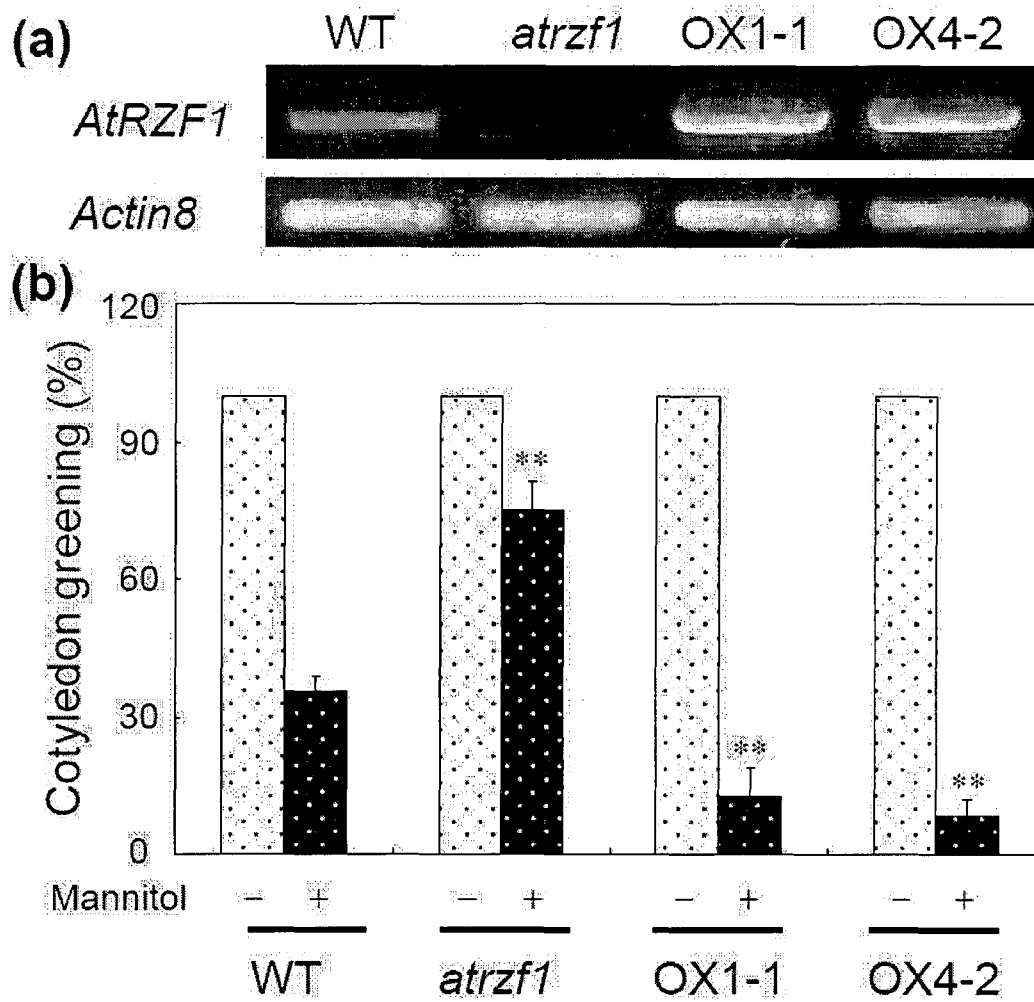
6/14

도 6

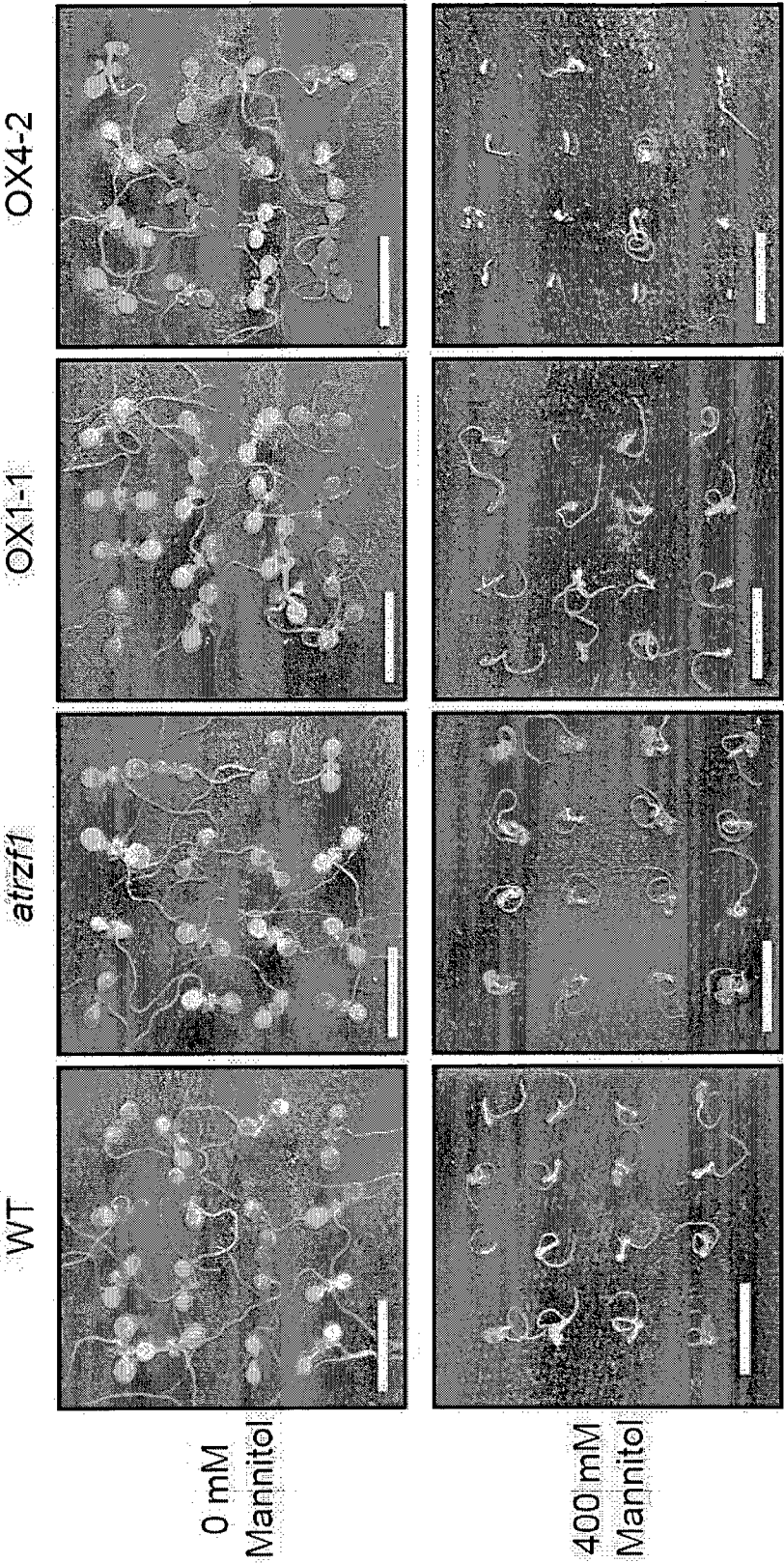


7/14

도 7



도 8

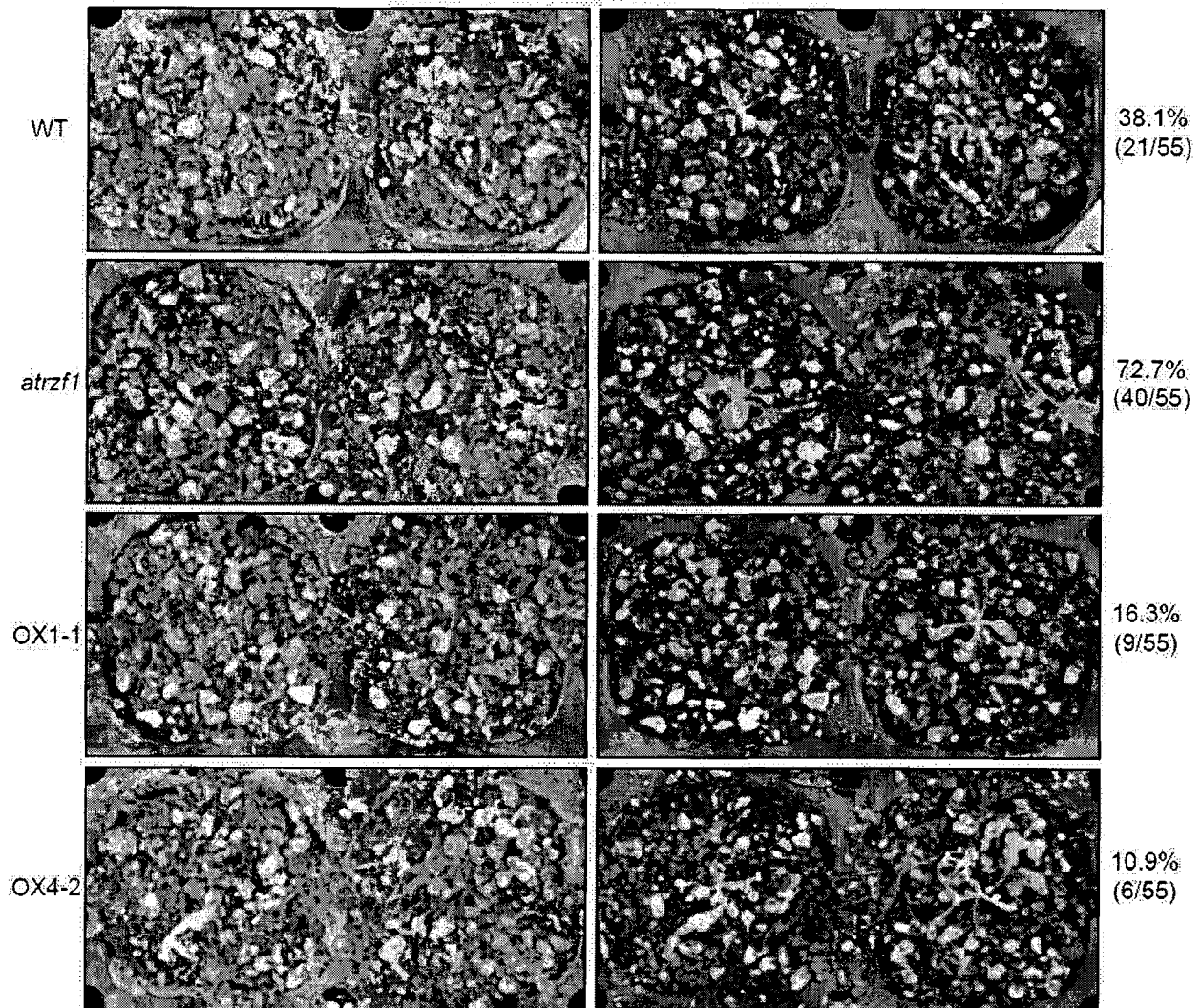


9/14

도 9

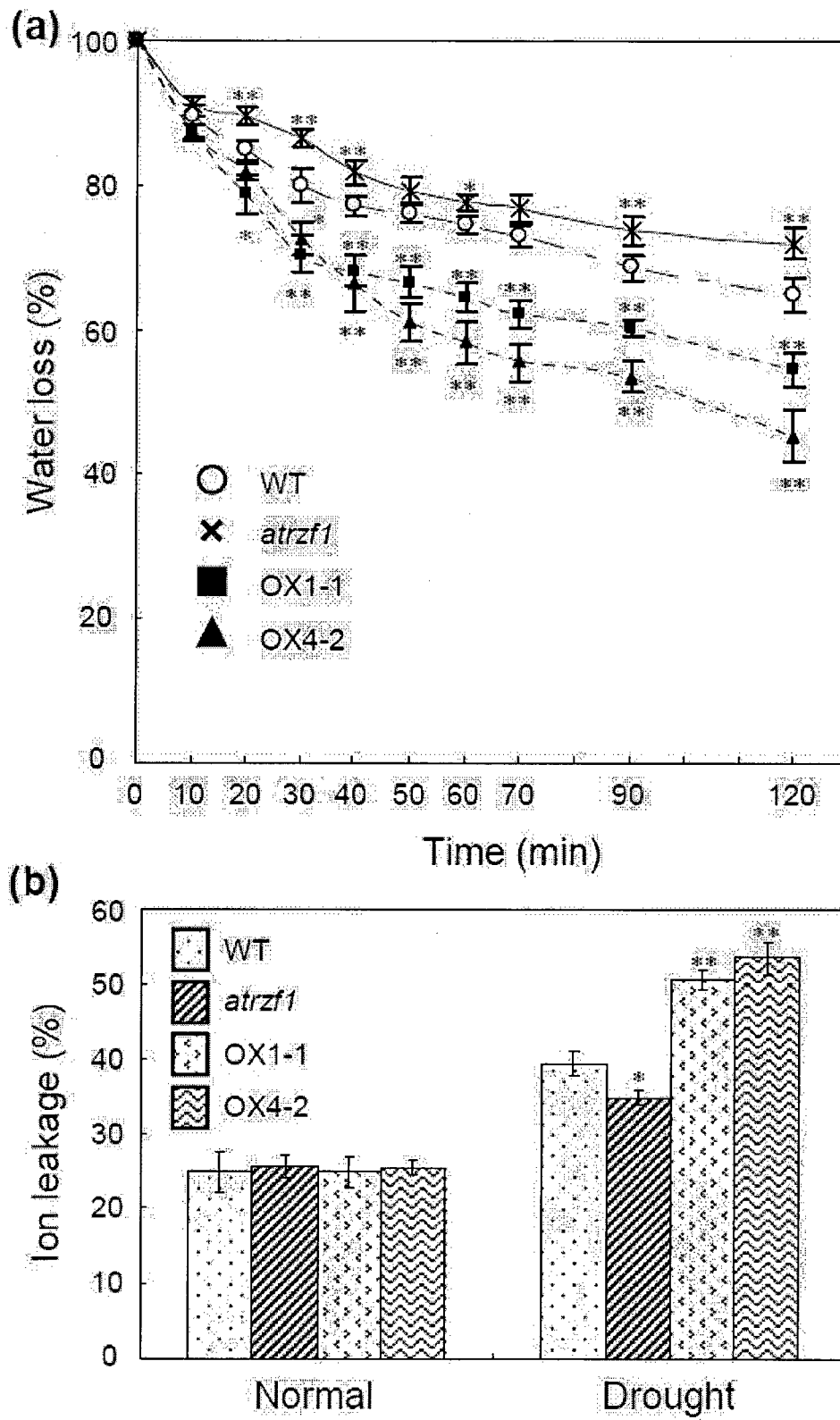
(a) Drought condition

(b) 3 day after re-watering

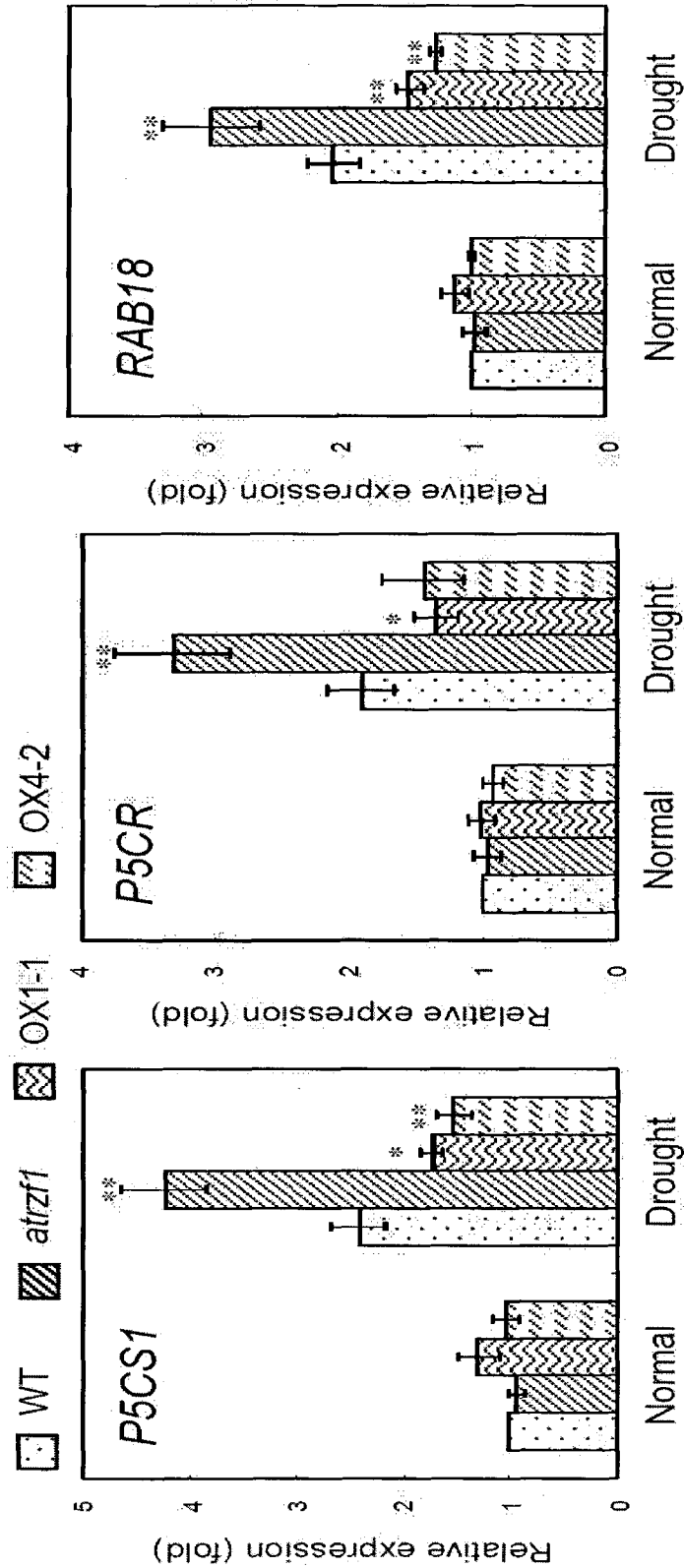


10/14

도 10

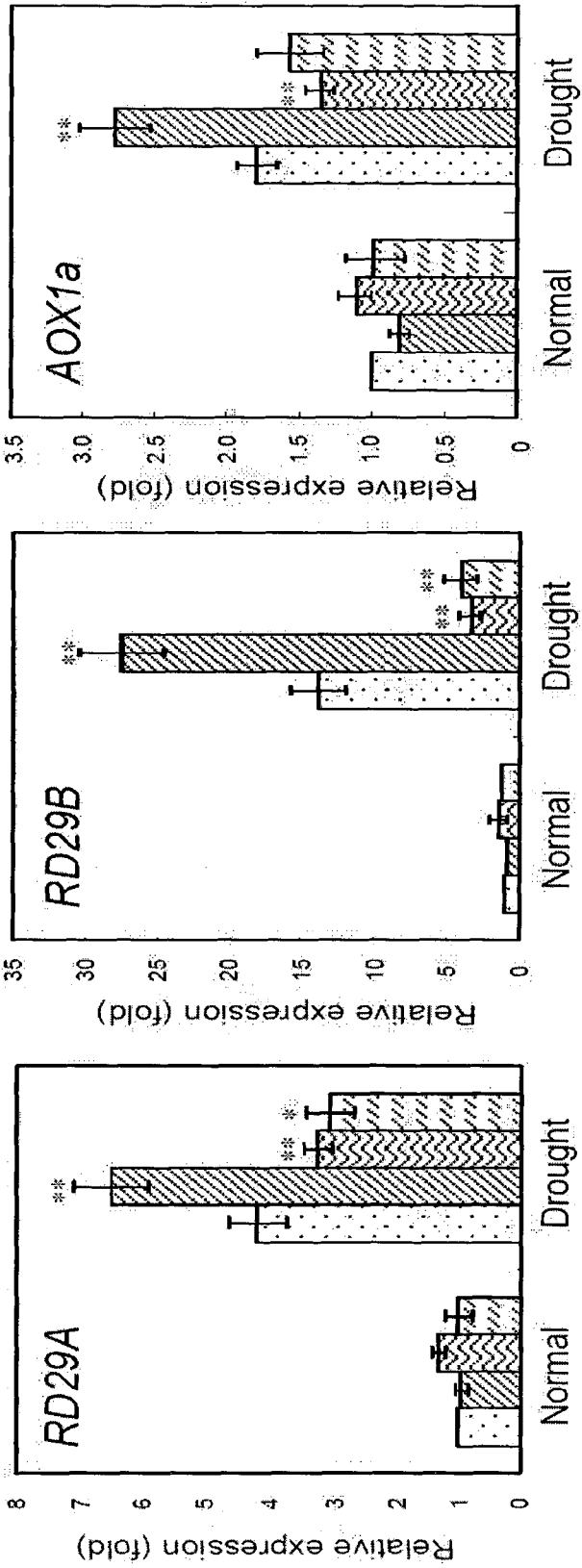


도 11a



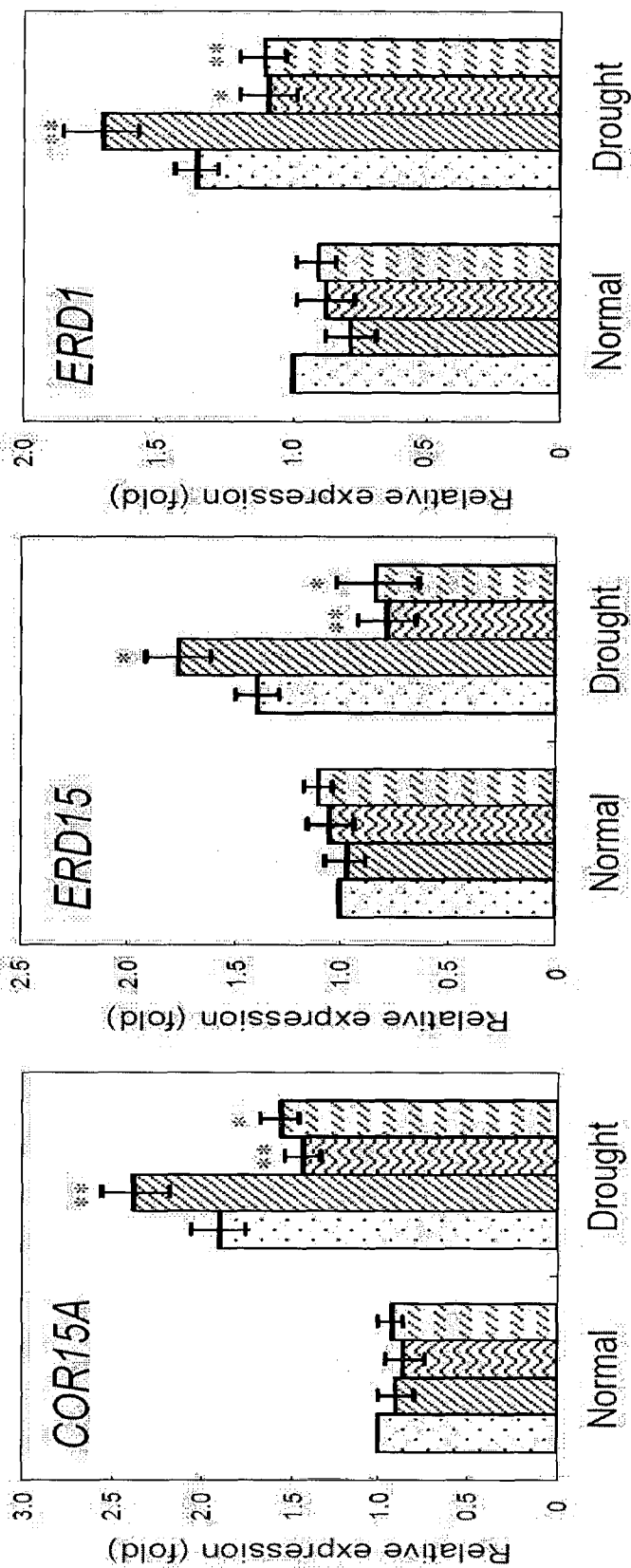
12/14

도 11b



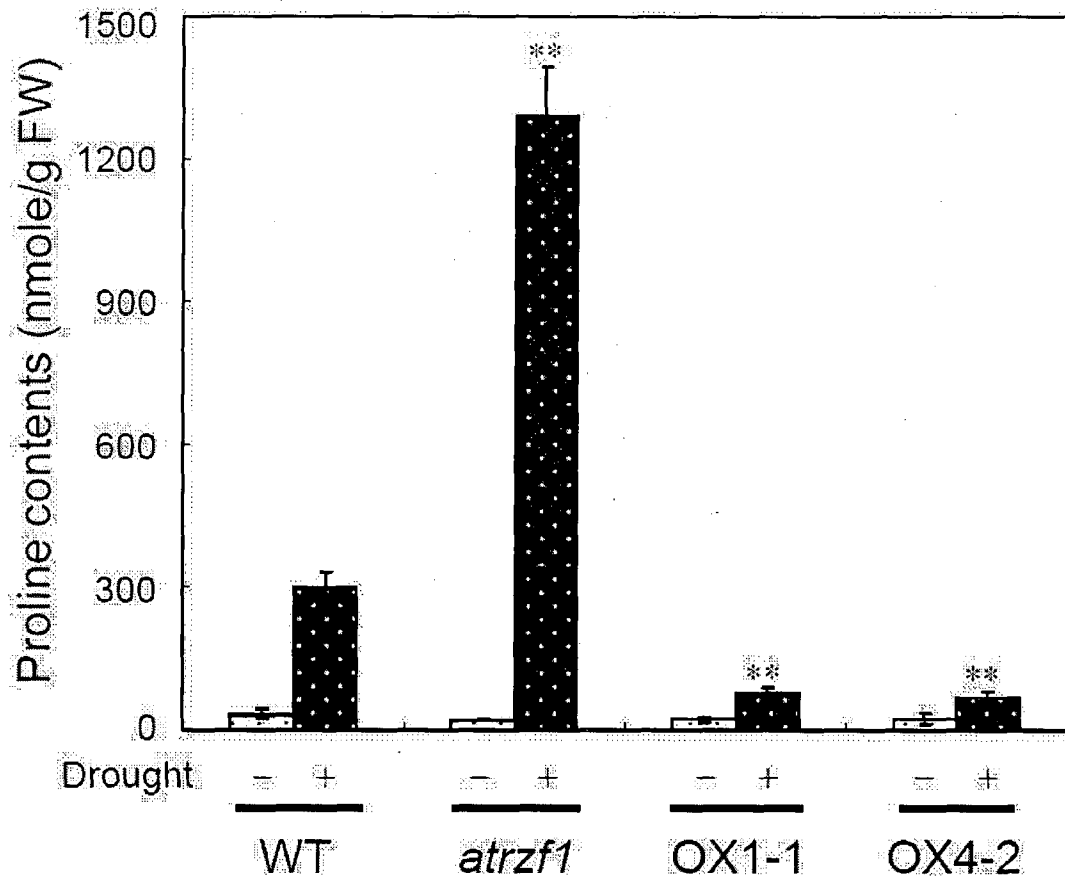
13/14

도 11c



14/14

도 12



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/008987**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****A01H 5/00(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H 5/00; C12N 15/63; C12N 15/29; C12N 15/82; A01H 1/06; C07K 14/415

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: E3 ubiquitin ligase, drought stress tolerance, gene inactivation

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZENG, Li-Rong et al., Classificaion, Expression Pattern, and E3 Ligase Activity Assay of Rice U-Box-Containing Proteins, Mol. Plant, 2008, vol. 1, no. 5, pp. 800-815. See abstract, page 806 and figure 5.	1-11
A	LEE, Jae-Hoon and KIM, Woo Taek, Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in Arabidopsis, Molecules and Cells, March 2011, vol. 31, no. 3, pp. 201-208. See abstract.	1-11
A	KR 10-2011-0071821 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 29 June 2011 See abstract and claims 1-11.	1-11
A	US 2011-0321197 A1 (SCHON, Hardy et al.) 29 December 2011 See abstract and exemple 5.	1-11
A	KR 10-2012-0035543 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) 16 April 2012 See abstract and claim 5.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 MARCH 2013 (08.03.2013)

Date of mailing of the international search report

11 MARCH 2013 (11.03.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/008987

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0071821 A	29.06.2011	NONE	
US 2011-0321197 A1	29.12.2011	AR076157A1	26.05.2011
		AU 2009-306575 A1	29.04.2010
		CA 2740257 A1	29.04.2010
		CN 102264907 A	30.11.2011
		EP 2350289 A1	03.08.2011
		MX 2011004270 A	13.07.2011
		WO 2010-046221 A1	29.04.2010
KR 10-2012-0035543 A	16.04.2012	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01H 5/00(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01H 5/00; C12N 15/63; C12N 15/29; C12N 15/82; A01H 1/06; C07K 14/415

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:E3 유비퀴틴 리가아제, 가뭄 스트레스 저항성, 유전자 불활성화

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LI-RONG ZENG, et al., Classification, Expression Pattern, and E3 Ligase Activity Assay of Rice U-Box-Containing Proteins, Mol. Plant, 2008, Vol. 1, No. 5, pp. 800-815. 요약, 페이지 806 및 도면 5 참조.	1-11
A	JAE-HOON LEE and WOO TAEK KIM, Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in Arabidopsis, Molecules and Cells, March 2011, Vol.31, No.3, pp. 201-208. 요약 참조.	1-11
A	KR 10-2011-0071821 A (연세대학교 산학협력단) 2011.06.29 요약 및 청구항 1-11 참조.	1-11
A	US 2011-0321197 A1 (SCHON HARDY 외 9명) 2011.12.29 요약 및 실시예 5 참조.	1-11
A	KR 10-2012-0035543 A (경상대학교산학협력단) 2012.04.16 요약 및 청구항 5 참조.	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 03월 08일 (08.03.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 03월 11일 (11.03.2013)

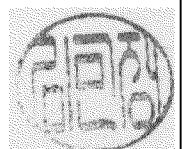
ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

김민정

전화번호 82-42-481-5550



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0071821 A	2011.06.29	없음	
US 2011-0321197 A1	2011.12.29	AR076157A1	2011.05.26
		AU 2009-306575 A1	2010.04.29
		CA 2740257 A1	2010.04.29
		CN 102264907 A	2011.11.30
		EP 2350289 A1	2011.08.03
		MX 2011004270 A	2011.07.13
		WO 2010-046221 A1	2010.04.29
KR 10-2012-0035543 A	2012.04.16	없음	