(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0110217
(43) 공개일자 2008년12월18일

(51) Int. Cl.
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0058697
(22) 출원일자 2007년06월15일
심사청구일자 2007년06월15일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
박형철
경남 진주시 초전동 757-1번지
정우식
경남 진주시 가좌동 573-1번지 가좌주동그린빌 아파트 109동1702호
조무제
경남 진주시 주약동 407-1번지 금호석류마을아파트 101동 1302호
(74) 대리인
김동완

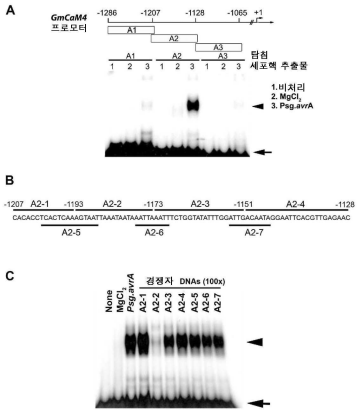
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 칼모듈린 이소폼 4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질발현을 위한 유전자 단편

(57) 요 약

본 발명은 병원체의 자극에 대응하여 발현하는 대두 칼모듈린 이소폼 4(GmCaM4) 프로모터에 있어서, 상기 칼모듈린 이소폼 4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질의 발현을 위한 A/T으로 주로 구성된 20~30개의 뉴클레오타이드를 지니고 2개 이상의 ATTA 모티프를 지닌 유전자 단편을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 유전자 단편과 GmZF-HD1 또는 GmZF-HD2의 DNA-단백질 결합을 통해 시발되는 병원체 자극에 대응하는 단백질 칼모듈린의 발현 방법을 제공한다.

대 표 도



특허청구의 범위

청구항 1

병원체의 자극에 대응하여 발현하는 대두 칼모듈린 이소폼 4(GmCaM4) 프로모터에 있어서, 상기 칼모듈린 이소폼 4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질의 발현을 위한 A/T으로 주로 구성된 20~30개의 뉴클레오타이드를 지니고 2개 이상의 ATTA 모티프를 지닌 유전자 단편

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 유전자 단편은 X-ATTA-Y-ATTA-Z(식 Ⅰ)로 표시됨을 특징으로 하는 유전자 단편:

상기 식에서 X는 1~7개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이고, Y는 3~10개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이며 Z는 0~3개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이다. 단 X, Y, Z의 뉴클레오타이드 염기 중 60% 이상은 아데닌(A) 또는 티민(T)임을 특징으로 한다.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 DNA 결합 단백질은 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1(GmZF-HD1) 또는 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 2(GmZF-HD2)임을 특징으로 하는 유전자 단편

청구항 4

제 1항의 유전자 단편과 GmZF-HD1 또는 GmZF-HD2의 DNA-단백질 결합을 통해 시발되는 병원체 자극에 대응하는 단백질 칼모듈린의 발현 방법

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<9> 본 발명은 칼모듈린 이소폼 4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질 발현을 위한 유전자 단편에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 병원체의 자극에 대응하여 발현하는 대두 칼모듈린 이소폼 4(GmCaM4) 프로모터에 있어서, 상기 칼모듈린 이소폼 4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질의 발현을 위한 A/T으로 주로 구성된 20~30개의 뉴클레오타이드를 지니고 2개 이상의 ATTA 모티프를 지닌 유전자 단편에 관한 것이다.

<10> 식물에서 Ca^{2+}은 광, 식물호르몬, 산화 스트레스, 가뭄, 추위 및 병원체를 포함한 다양한 자극에 반응하는 세포내 두 번째 메신저로서 역할한다. 병원체 공격에 반응하는 초기 이벤트 중의 하나는 칼슘의 규모, 빈도 및 지속기간의 복합 변화와 함께 세포질 자유 칼슘 수치 $[Ca^{2+}]_{cyst}$의 증가이다. Ca^{2+} 유입은 방어-관련 유전자의 활성화, 파이토알렉신 생합성 및 과민성 세포 사멸에 필수적인 것으로 나타났다. Ca^{2+} 신호는 세포내 Ca^{2+}-결합 단백질에 의해 감지되고 세포적 처리를 조절하는 다운스트림 이펙터(effector) 단백질에 의해 변환된다.

<11> 가장 특성화된 Ca^{2+}-결합 단백질 중의 하나인 칼모듈린(CaM)은 EF 핸드(hand)로 표기되는 4개의 헬릭스-루프-헬릭스(helix-loop-helix) Ca^{2+}-결합 모티프를 포함한다. Ca^{2+}-결합 CaM은 다양한 자극에 대한 생리적 반응을 생성하는 대사 효소, 전사 인자, 이온 채널, 단백질 키나제/포스파타제 및 구조 단백질과 같은 수많은 다양한 CaM-결합 단백질의 활성을 조절함으로서 Ca^{2+} 신호를 변환한다. 포유류 세포는 하나 또는 소수의 이소폼을 암호화하는 단지 소수의 CaM 유전자만을 지닌다. 이와는 대조적으로 식물은 수개의 CaM 이소폼을 암호화하는 많은 레퍼토리의 CaM 및 CaM-유사 유전자를 보유한다. 조사된 모든 식물에서 동일한 이소폼을 암호화나는 것을 포함한 CaM 유전자는 접촉, 열 충격, 추위, 광, 옥신 및 병원체와 같은 다양한 외부 자극에 반응하여 차별적으로 발현된다.

<12> 본 발명은 종전 대두(*Glycine max*)에서 5개의 CaM 이소폼(GmCaM1-5)을 클론하였다. 종래의 이소폼 GmCaM1, -2 및 -3은 포유류 CaM과 96% 이상의 동일성을 공유한 반면 분산 이소폼 GmCaM4 및 -5는 GmCaM1에 대해 단지 78%의 동일성을 공유하고; 이들은 식물 내 보고된 최대 분산 이소폼이고 따라서 식물계 및 동물계에서 멀다. GmCaM4의 세포 수치는 병원체 조출 및 염도와 같은 특정 자극에 반응하여 빠르고 극적으로 증가한다. 더욱이 담배 및 아라비돕시스 내 GmCaM4 또는 GmCaM5의 이소(ectopic) 발현은 증가된 수치의 살리실산이 아닌 증가된 수치의 전신 후천적 저항성 유전자 발현에 의해 매개되는 자발적 과민성 반응-관련 손상(병원체 부재시에도)의 형성을 통해 증가된 병원체 저항성을 부여한다. 더욱이 이들 형질전환 식물은 염 내성을 나타내고 높은 수치의 프롤린을 축적할 수 있다. 이들 결과는 특정 CaM 이소폼에 의해 매개되는 Ca^{2+} 신호전달이 식물에서 병원체 및 염 스트레스 저항성을 부여함을 입증한다.

<13> 호메오박스(homeobox) 유전자 패밀리 내 호메오도메인(homeodomain) 단백질은 식물, 동물 및 진균 발달시 전사 인자로서 중요한 역할을 한다. 단자엽 및 쌍자엽 식물의 돌연변이 분석은 잎 발달이 마디(knot)-유사 호메오박스(knox) 유전자와 같은 분열조직-특이적 호메오박스 유전자의 하향-조절에 관련됨을 나타내었다. 이들 유전자의 이소 발현은 잎의 변화된 세포 운명을 유도하고, 이는 초기 잎 발달시 중추적 기능을 나타낸다. 그러나 호메오도메인 단백질이 식물 스트레스 신호전달에 관련됨은 잘 수립되지 않았다. PHD 핑거 수퍼패밀리의 멤버인 PRHP 및 PRHA(아라비돕시스 유래 발병-관련 호메오도메인 단백질)이 진균 또는 박테리아 유인제에 의해 빠르게 자극되는 *pr2* 프로모터 내 125-nt 영역과의 상호작용을 근거로 분리되었다.

<14> 본 발명은 식물이 어떻게 병원체 및 염도와 같은 생물학적 및 환경적 스트레스를 인식하고, 이러한 스트레스에 반응하여 *GmCaM4* 유전자의 전사를 활성화시키기 위해 어떻게 신호가 변환되는지에 대한 이해에 관하여 조사하였다. 이를 위해 GmCaM4 발현을 조절하는 *시스*(*cis*)-작용 요소 및 *트랜스*(*trans*)-작용 인자를 확인하는 것이 중요하다. 본 발명은 병원체 또는 NaCl 노출에 의해 유도되는 단백질에 의해 결합되는 *GmCaM4* 프로모터 내 2개의 영역(-1286 내지 -1065 및 -858 내지 -728)을 종전에 확인하였다. *GmCaM4* 프로모터의 -858 내지 -728 bp 영역 내 GT-1 *시스*-작용 요소는 병원체 및 염 스트레스에 반응하여 GT-1 유사 전사 인자와 상호작용함으로서 *GmCaM4* 발현에 일부 관련되었다. 그러나 *GmCaM4* 프로모터의 -1286 내지 -1065 영역 내 *시스*-작용 요소(들) 및 그의 DNA 결합 단백질은 확인되고 특성화되어야 한다.

<15> 여기서 본 발명은 *GmCaM4* 프로모터의 -1286 내지 -1065 영역 내 보존된 호메오도메인 결합 사이트인 ATTA의 2 반복서열의 존재를 발견하였다. 본 발명은 -1207 내지 -1128 영역 내의 30-nt A/T 풍부 *시스*-작용 요소에 특이적으로 결합하는 2개의 전사 조절제인 GmZF-HD1 및 GmZF-HD2를 분리하기 위해 효소 원-하이브리드 시스템을 사용하였다. 수퍼쉬프트 및 일시적 발현 분석은 GmZF-HD1이 시험관 내에서 형성된 DNA-세포핵 단백질 복합체의 구성요소이고 *GmCaM4* 유전자의 병원체-반응성 발현의 생체 내 전사 조절제로서 기능함을 확인시켰다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<16> 본 발명에서 이루고자 하는 기술적 과제는 병원체의 자극에 대응하여 발현하는 대두 칼모듈린 이소폼 4(GmCaM4) 프로모터를 통해 상기 칼모듈린 이소폼 4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질의 발현을 위한 유전자 단편 부위를 판독하여 DNA 결합 단백질인 Glycine max zinc finger-homeodomain protein 1(GmZF-HD1) 및 Glycine max zinc finger-homeodomain protein 2(GmZF-HD2)를 통한 단백질의 발현을 규명코자 한 것이다.

발명의 구성 및 작용

<17> 본 발명의 목적은 병원체의 자극에 대응하여 발현하는 대두 칼모듈린 이소폼 4(GmCaM4) 프로모터에 있어서, 상기 칼모듈린 이소폼 4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질의 발현을 위한 A/T으로 주로 구성된 20~30개의 뉴클레오타이드를 지니고 2개 이상의 ATTA 모티프를 지닌 유전자 단편을 제공하는 것이다

<18> 또한 상기 유전자 단편은 X-ATTA-Y-ATTA-Z(식 Ⅰ)로 표시되는 식에 있어서, X는 1~7개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이고, Y는 3~10개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이며 Z는 0~3개의 임의의 뉴클레오타이드 염기이다. 단 X, Y, Z의 뉴클레오타이드 염기 중 60% 이상은 아데닌(A) 또는 티민(T)임을 특징으로 한다.

<19> 또한 상기 DNA 결합 단백질은 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 1(GmZF-HD1) 또는 글리신 맥스 징크 핑거-호메오도메인 단백질 2(GmZF-HD2)임을 특징으로 한다.

<20> 한편, 본 발명의 또다른 목적은 상기 유전자 단편과 GmZF-HD1 또는 GmZF-HD2의 DNA-단백질 결합을 통해 시발되는 병원체 자극에 대응하는 단백질 칼모듈린의 발현 방법을 제공하는 것이다.

<21> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

<22> 칼모듈린(Calmodulin)(CaM)은 식물의 방어 반응에 관련되는 단백질이다. 대두(*Glycine max*)에서 칼모듈린 이소폼 4(*GmCaM4*)의 전사는 병원체 자극 후 30분 이내에 빠르게 유도되나 병원체에 반응하는 *GmCaM4* 유전자의 조절은 아직 규명되지 않았다. 여기서 본 발명은 보존된 호메오도메인(homeodomain) 결합 사이트로서 ATTA 모티프가 2 이상 반복서열을 포함한 유전자 단편을 *GmCaM4* 프로모터(GenBank 수탁번호 AY052528) 내에서 발명하였다. 즉 본 발명의 유전자 단편인 30-nt A/T가 주로 구성된 유전자 단편을 DNA 결합 단백질을 통해 2개의 cDNA 클론을 분리하는데 효모 원-하이브리드(one-hybride) 시스템을 사용하였다.

<23> 2개의 DNA 결합 단백질인 GmZF-HD1(GenBank 수탁번호 AY695729) 및 GmZF-HD2(GenBank 수탁번호 AY695730)은 징크 핑거(zinc finger) 호메오도메인(ZF-HD) 전사 인자 패밀리에 속한다. 도메인 결실 분석은 호메오도메인 모티프가 30-nt *GmCaM4* 프로모터 서열에 결합할 수 있는 반면 2개의 징크 핑거 도메인은 결합할 수 없음을 나타낸다.

<24> 중요하게는 병원체-처리된 세포 유래의 세포핵 추출물로 인큐베이트된 항-GmZF-HD1 항체에 의한 수퍼-쉬프트(super-shifted) 복합체의 형성은 GmZF-HD1과 2개의 호메오도메인 결합 사이트 반복서열 사이의 상호작용은 병원체 자극에 의해 조절됨을 나타낸다.

<25> 최종적으로 아라비돕시스(*Arabidopsis*) 원형질체로의 일시적 발현 분석은 GmZF-HD1이 2개의 반복서열과 특이적으로 상호작용함으로서 *GmCaM4*의 발현을 활성화시킬 수 있음을 확인하였다. 이들 결과는 GmZF-HD1 및 -2 단백질이 병원체에 반응하여 *GmCaM4*의 발현을 활성화시키는 ZF-HD 전사 인자로서 기능함을 나타낸다.

<26> 이하 본 발명을 첨부된 도면의 실험 결과를 통해 더욱 상세히 설명한다.

<27> *GmCaM4* 프로모터 내 병원체-활성화 세포핵 단백질에 대한 결합 사이트의 확인

<28> DNA 결합 분석(전기영동 이동 변화 분석(EMSA)) 및 *GmCaM4* 결실 컨스트럭트로의 아라비돕시스 원형질체 내 일시적 발현 분석을 기반으로 본 발명자들은 *GmCaM4* 프로모터의 2개 영역이 병원체-매개 유전자 조절에 관련됨을 종전 발견하였다. 하나는 *GmCaM4* 프로모터의 -858 내지 -728 영역 내 *GT-1 시스*-작용 요소이다. 그러나 -1286 내지 -1065의 *GT-1 시스*-작용 요소의 업스트림의 또다른 영역은 더욱 특성화되어야 한다. 본 발명에서는 EMSA에 대한 탐침으로 사용된 3개의 중복 단편(A1, A2 및 A3) 내로 220-nt 영역을 분할함으로서 병원체-처리 세포 유래 세포핵 추출물과 특이적으로 상호작용하는 *GT-1 시스*-작용 요소의 핵심 *시스*-작용 요소 업스트림을 확인하고자 하였다(도 1). EMSA 데이터는 A2 탐침(-1207 내지 -1128)과 병원체-처리 세포 유래 세포핵 추출물 사이에서만 안정한 결합 복합체가 형성됨을 나타내었다(도 1A). 본 복합체가 추출물 내의 오염물이 아닌 단백질과 A2 탐침과의 상호작용에서 기인하였음을 먼저 입증하기 위해 본 발명은 65℃에서 5분간 가열되거나 RNase A 또는 단백질분해효소 K로 처리된 추출물 및 프로브로서 A2 영역을 사용하여 EMSA를 수행하였다. 본 발명은 결합 복합체가 열-분안정성이고 단백질분해효소 K에 민감하나 RNase A에는 그렇지 않음을 발견하였고, 이는 본 복합체가 DNA-단백질 복합체임을 확인시켰다(데이터는 나타내지 않음).

<29> 이후 본 발명은 결합 사이트를 지도화하기 위해 7개의 중복 이중-나선 올리고뉴클레오타이드(A2-1 내지 -7)를 고안하였고 프로브로서 A2 영역을 사용하여 경쟁 분석을 수행하였다(도 1B). 표지되지 않은 100-배 몰 과량의 A2-2 올리고뉴클레오타이드는 A2 영역에 대한 세포핵 단백질의 결합을 완전하게 억제하였으나 어떠한 과량의 다른 6개 올리고뉴클레오타이드는 이러한 효과를 지니지 않았다(도 1C). 이후 본 발명은 프로모터 서열 내 전사 인자-결합 사이트를 확인하는 일반적이고 강력하 도구인 DNase I 풋프린팅 분석을 이용하였다. 본 발명은 다양한 농도의 병원체-처리 세포 유래 세포핵 추출물과 함께 프로브로서 A2 영역을 사용하였다. 경쟁 분석(도 1C)에서 발견된 바와 유사하게 약 20-nt(AGTAATTAAATAATAAATTA)(서열번호: 1)를 포함하고 A2-2 서열과 거의 동일한 영역이 세포핵 추출물에 의한 DNase I 분해로부터 보호되었다(도 2). 이러한 결과는 *GmCaM4* 프로모터의 A2-2 영역 내 *시스*-작용 요소가 병원체-활성화 세포핵 단백질(들)과 상호작용함을 나타낸다. DNase I 풋프린팅 분석에 의해 확인된 20-nt 서열 AGTAATTAAATAATAAATTA은 호메오도메인 단백질에 의해 결합되는 모티프로 확인된 2개의 핵심 공통 서열(밑줄)을 포함한다. 경쟁 분석(도 1C)에 나타난 바와 같이 각각 일부 또는 전체 핵심 서열을 포함한 A2-5 및 A2-6 단편은 A2 참침에 대한 세포핵 단백질의 결합을 경쟁적으로 억제하지 않았고, 이는 A2-2 단편의 전체 길이가 세포핵 단백질 결합에 필요함을 나타낸다. 세포핵 단백질 결합에 충분한 전체 서열을 측정하기 위해 본 발명은 5'-말단에서 A2-2 서열을 포함한 다른 길이의 단편을 시험하였다. 이러한 실험 결과는 A2-2 단편에 인접한 추가 10 bp 서열이 병원체-유도 세포핵 단백질의 최대 결합에 필수적임을 나타내었다(데이터는 나타내지 않음). 따라서 본 발명은 또다른 실험을 위해 이러한 30 bp 서열을 사용하였다.

<30> *GmCaM4* 프로모터의 A2 단편을 인식하는 DNA 결합 단백질을 암호화하는 cDNA의 분리

<31> 본 발명은 서열-특이적 방식으로 80-nt A2 영역과 상호작용하는 DNA 결합 단백질을 암호화하는 cDNA를 분리하기 위해 효모 원-하이브리드 선별 시스템을 사용하였다. 이중 리포터 시스템으로서 본 발명은 먼저 *GmCaM4* 프로모터의 80-nt A2 단편의 4개의 일렬 반복서열과 함께 도입된 카피 *HIS3* 및 *lacZ*을 지닌 효모 균주(YM4271)를 구축하였다(도 3A). 수득된 균주에서 *HIS3* 유전자는 기저 수준으로 전사되고 *HIS3* 유전자 생성물의 경쟁적 억제제인 20 mM 3-아미노트리아졸(3-AT)의 존재시가 아닌 히스티딘 결핍된 최소 배지 상에서 생장되었다. 이후 YM4271은 아세트산리튬/폴리에틸렌 글리콜 방법에 의해 대두 cDNA 라이브러리로 형질전환되었고, 약 1.5×10^{7} 형질전환체가 선별되었다. 42개 양성 클론이 히스트딘이 결핍되고 20 mM 3-AT를 함유한 최소 배지 상에서 선택되었다. 플라스미드가 회수되었고 증식을 위해 *E. coli* 숙주 내로 일렉트로포레이트(electroporate)되었다. 분리된 플라스미드 유래 cDNA는 제한 및 서열 분석되었고, 이는 42개 cDNA 클론이 16개의 개별적 그룹으로 분류하였다(표 1)

표 1

본 발명에서 분리된 cDNA 클론의 일반적 특성

그룹	클론	삽입 크기 (kb)	수득된 클론 번호	블라스트 검색 결과
1	5	0.77	22	GmZF-HD1
2	1	0.66	6	GmZF-HD2
3	2	1.3	1	폴리(A) 결합 단백질
4	3	1.2	1	저장 단백질
5	9	0.8	1	페레독신III
6	10	0.3	1	효모 페로몬 수용체
7	11	1.1	1	안키린-유사 단백질
8	13	0.5	1	글루탐산염 디카르복실라제
9	14	0.8	1	이피-유사 단백질
10	16	1.3	1	열충격 단백질
11	18	1.25	1	당단백질
12	25	1.8	1	아스파라긴산염 아미노전이효소
13	27	1.3	1	올리고유리딜레이트 결합 단백질
14	38	1.35	1	리보솜 단백질
15	40	1.4	1	퍼옥시다제
16	42	0.6	1	산소 방출 인핸서

42개 양성 클론은 효모 원-하이브리드 선별에 의해 분리되었고 16개의 개별적 cDNA 그룹으로 분류되었음.

<32>

<33> 16개 대표 cDNA 클론 중에서 전사 조절제를 암호화하는 실제 양성 cDNA를 선택하기 위해 본 발명은 기질로서 5-브로모-4-클로로-3-인돌릴-베타-D-갈락토피라노시드(X-gal)을 사용하여 여과-복제(filter-replica) 방법에 의해 *lacZ* 활성을 조사하였다. *GmZF-HD1* 및 *-2*(각각 Glycine max zinc finger-homeodomain protein1 및 -2)로 명명된 2개의 cDNA 클론(클론 5 및 1)만이 X-gal을 포함한 여과지 상에 청색 콜로니를 형성하였다(도 3B). 선택된 16개 cDNA 클론으로 본 발명은 히스티딘이 부재하나 고농도의 3-AT(60 mM)를 지닌 선택 배지 상에서 세포 생장 분석도 수행하였다. 데이터는 단지 클론 5(*GmZF-HD1*) 및 1(*GmZF-HD2*)만이 60 mM 3-AT를 함유한 배지 상에서 생존함을 다시 나타내었다. 이들 결과는 GmZF-HD1 및 -2 단백질이 *GmCaM4* 프로모터의 A2 영역에 특이적이고 강하게 결합하고 효모 내 이중 리포터 유전자의 전사를 활성화시킴을 확인시켰고, 이는 이들이 병원체-유도 *GmCaM4* 유전자 발현의 전사 조절세로서의 우수한 후보임을 나타낸다.

<34> *GmZF-HD1* 및 *-2* cDNA의 서열 분석

<35> *GmZF-HD1* 및 *-2* cDNA 클론의 구조를 조사하기 위해 본 발명은 2개의 cDNA, 각각 약 770-nt 및 660-nt를 서열분

석하였고, 이는 이 둘 모두 전체-길이임을 나타내었다. *GmZF-HD1* cDNA는 약 20 kDa의 예측 분자량을 지닌 추정 단백질을 명기하는 182개 아미노산의 오픈 리딩 프레임을 암호화한다. *GmZF-HD2* cDNA는 약 19.4 kDa의 예측 분자량을 지닌 추정 단백질을 명기하는 176개 아미노산의 오픈 리딩 프레임을 암호화한다(도 4A). 본 발명자는 GenBank/EMBL/DDBJ 데이터베이스(각각 *GmZF-HD1* cDNA 및 *GmZF-HD2* cDNA에 대해 수탁번호 AY695729 및 AY695730)에 2개의 cDNA의 뉴클레오타이드 서열을 기탁하였다. 이후 본 발명자는 GmZF-HD1 및 -2 단백질에 상동적인 서열에 대한 데이터베이스를 검색하였다. 본 발명은 각각의 GmZF-HD 단백질이 2개의 매우 보존된 N-말단 내 징크 핑거(zinc finger) 도메인 및 C-말단 내 DNA 결합 호메오도메인을 지니고, 이는 C3 식물 아라비돕시스의 AtHB24 및 -26 및C4 식물 플라베리아 트리네르비아(*Flaveria trinervia*)의 FtHB1을 포함한 식물 ZF-HD 패밀리 내 상동성의 특성이다(도 4A). 호메오도메인 단백질의 ZF-HD 부류는 플라베리아속의 C4 종 내 포스포엔올피루베이트 카르복실라제의 광합성-관련 엽육육-특이적 유전자 발현에 고나련된다. 최근에는 ZF-HD 전사 조절제가 아라비돕시스 꽃 발달에 중복된 조절적 역할을 하는 것으로 제안되었다. 그러나 ZF-HD 호메오도메인이 병원체 신호전달 및 식물 방어 기작에 관련된다는 증거는 없다.

<36> PHD 핑거 서브-패밀리 내 PRHA는 아라비돕시스 *pr2* 유전자의 전사 조절에 고나련된 것으로 보고되었다. 추론된 아미노산 서열을 비교함으로서 구축된 계통수는 GmZF-HD1 및 -2가 PRHA보다 FtHB1에 더욱 밀접하게 관련됨을 나타낸다(도 4B). 따라서 이들 관찰은 GmZF-HD1 및 -2 단백질이 대두 내 병원체 신호전달에 관련된 신규한 부류의 ZF-HD 단백질을 나타내고 특징적인 징크 핑거 도메인이 단백지 조절에 중요한 역할을 함을 의미한다.

<37> *GmZF-HD1* 유전자의 발현 패턴

<38> 대두 게놈 내 *GmZF-HD1* 유전자의 복제 수는 서던 블럿 분석에 의해 조사되었다. 단순한 패턴의 혼성화가 높은 스트린전시 조건 하에서 관찰되었고, 이는 *GmZF-HD1*이 대두 게놈 내에서 단일- 또는 낮은-복제수로 존재함을 나타낸다(데이터는 나타내지 않음). *GmCaM4*의 조직-특이적 발현 패턴은 대두 식물에서 노던 분석및 형질전환 아라비돕시스 식물 내 프로모터-β-글루쿠로니다제(GUS) 리포터의 발현에 의해 종전 조사되었다. 이들 연구는 *GmCaM4*이 대두 및 형질전환 아라비돕시스 모두에서 정상 후크 및 신장 배축 내에서 초기에 발현됨을 나타내었다. *GmZF-HD1* 발현 프로파일을 측정하기 위해 본 발명은 조직-특이적 RNA로의 노던 분석을 수행하였다. *GmZF-HD1* 전사체는 정상 후크 및 뿌리 내에 풍부하였으나 신장 배축 내에서는 훨씬 덜 풍부하였다. 성숙 배축, 어린 싹 및 종자 내에서는 거의 검출되지 않았다(도 5A). 이들 결과는 대두 모종 내 *GmCaM4*의 발현 패턴과 매우 유사하고, 이는 GmZF-HD1 단백질이 *GmCaM4*의 발현 조절에 관련됨을 나타낸다. *GmCaM4* 유전자 발현이 병원체 처리에 의해 극적으로 유도됨은 종전 보고되었다. 따라서 본 발명은 병원체 처리에 반응한 *GmZF-HD1*의 발현을 조사하였다. *GmZF-HD1*이 정상 조건 하에서 대두 세포 현탁액 내에서 높게 발현되었으나 병원체 처리에 의해 유의적으로 유도되지 않았다(도 5B). 이러한 결과는 병원체에 반응한 *GmCaM4* 유전자 발현의 유도시 *GmZF-HD1* 활성이 전사 수준이 아닌 후-전사 수준에서 제어됨을 나타낸다.

<39> C-말단 호메오도메인은 N-말단 징크 핑거 도메인이 아닌 30-nt *GmCaM4* 프로모터 서열에 결합됨

<40> GmZF-HD1 및 -2가 *GmCaM4* 프로모터 내 보존된 ATTA 호메오도메인 결합 사이트의 2 반복서열을 포함한 30-nt 서열에 결합하는지 여부를 조사하기 위해 본 발명은 *E. coli* 내에서 GST에 융합된 재조합 전체-길이 GmZF-HD1 및 -2 단백질을 제조하였다. 전체-길이 재조합 단백질은 겔 이동 분석시 30-nt 서열에 유사하게 결합 가능하였다(도 6B). 이후 어떠한 도메인(ZF 또는 HD)이 DNA 결합에 관련되는지를 시험하기 위해 본 발명은 각 단백질의 C-말단 HD 결실 유도체(ΔHD) 및 N-말단 ZF 결실 유도체(ΔZF)로 EMSA를 수행하였다(도 6A). 도 6B에 나타난 바와 같이 정제된 결실 돌연변이와 함께 탐침으로서 30-nt 서열을 사용하여 수행된 EMSA는 N-말단 ZF 결실 돌연변이(즉, 호메오도메인만을 포함한 것)는 30-nt 서열에 강하게 결합하나 C-말단 HD 결실 돌연변이(징크 핑거 도메인만을 포함한 것)는 그렇지 않음을 나타내었다(도 6B). 이후 본 발명은 경쟁 분석을 수행하였고 DNA-단백질 복합체 형성이 200-배 몰 과량까지의 비표지 30-nt 경쟁자에 의해 유의적으로 감소됨을 발견하였다(데이터는 나타내지 않음). 호메오도메인만을 포함한 단백질의 30-nt 서열(GmZF-HD1ΔZF 및 -2ΔZF)에 대한 결합 친화력이 전체-길이 단백질(GmZF-HD1 및 -2) 보다 더욱 더 강하고, GmZF-HD1ΔZF 및 GmZF-HD2ΔZF가 이러한 서열에 유사한 친화력으로 결합되었기 때문에 *GmCaM4* 프로모터의 이러한 영역과의 상호작용을 특성화하기 위한 추가 EMSA 실험을 위해 GmZF-HD1ΔZF이 선택되었다.

<41> *GmCaM4* 프로모터 내 GmZF-HD1 결합 사이트의 확인

<42> GmZF-HD1 단백질의 결합 사이트를 더욱 정확히 지도화하기 위해 본 발명은 각각 도 7A에 약술된 바와 같은 5-nt 돌연변이를 지닌 6개 돌연변이화 버전(M1 내지 M6)의 30-nt 서열을 고안하였다. 재조합 GmZF-HD1(ΔZF) 융합 단백질의 야생형 또는 돌연변이화 30-nt 서열에 결합하는 능력이 EMSA 및 경쟁 분석을 이용하여 조사되었다.

도 7B에 나타난 바와 같이 GmZF-HD1(ΔZF) 단백질은 M3, M5 및 M6 서열에 강하게 결합하였고 M4에는 약하게 결합하였으나 M1 또는 M2에는 결합하지 않았다. 이러한 결과를 확증하기 위해 본 발명은 경쟁자로서 각각의 돌연변이화 DNA 서열을 사용하여 경쟁 분석을 수행하였다. 200-배 몰 과량의 M3, M5 또는 M6은 야생형 서열에 의해 부여되는 억제와 유사하게 30-nt 서열에 대한 결합을 거의 완전하게 억제하였다. 한편 경쟁자로서 M1, M2 및 M4는 DNA-단백질 복합체의 형성에 영향을 미치지 않았고, 이는 DNA 결합 분석(도 7C)에서 관찰된 바와 유사하였다. 이들 결과는 GmZF-HD1이 *GmCaM4* 프로모터에 서열-특이적 방식으로 결합하고 2개의 ATTA 반복서열을 포함한 20-nt 서열 AGTA**ATTA**AANNNNNA**ATTA**가 이러한 프로모터 내 추정 핵심 *시스*-작용 요소임을 강하게 나타낸다.

<43> GmZF-HD1은 생체 내 병원체-유도 유전자 발현에 관련된 전사 조절제로서 활성적으로 기능함

<44> GmZF-HD1이 *GmCaM4* 프로모터의 30-nt 서열 및 병원체-처리 대두 세포 현탁액 유래 세포핵 추출물로의 EMSA 실험에서 관찰된 단백질-DNA 복합체의 활성 성분임을 확인하기 위해 본 발명은 친화력-정제된 GST::GmZF-HD1 융합 단백질에 대한 항-GmZF-HD1 폴리클론 항체를 유발하였다. 본 발명은 병원체-처리 세포 유래 세포핵 추출물과 함께 수퍼쉬프트 분석에 이들 항체를 사용하였다(도 8A). 항혈청의 특이성은 재조합 GST::GmZF-HD1 융합 단백질 및 전체 및 세포핵 대두 단백질의 웨스턴 분석에 의해 확인되었다. 항혈청은 전체 박테리아 세포 추출물에서 유래한 어떠한 다른 단백질 또는 어떠한 다른 대두 단백질과도 교차-반응성을 나타내지 않았다(데이터는 나타내지 않음). 겔 이동 반응시 0.5~1 ㎍의 항혈청, 세포핵 추출물 및 30-nt 탐침의 인큐베이션은 DNA-단백질 복합체의 수퍼쉬프트를 명백히 유발하였고(도 8A, 레인 6~8), 이는 전-면역 혈청의 존재시(도 8A, 레인 1) 또는 항혈청 부재시(도 8A, 레인 3)에는 관찰되지 않았다. 이들 관찰은 GmZF-HD1 단백질이 *GmCaM4* 프로모터의 30-nt 서열과 형성된 세포핵 단백질-DNA 복합체의 구성성분이고 이러한 복합체는 세포가 기본 조건이 아닌 병원체에 의해 자극시 형성됨을 강하게 확인시켰다.

<45> GmZF-HD1이 이러한 병원체-유도 복합체의 구성성분임을 입증한 후 본 발명은 본 단백질이 30-nt 서열에 대해 의존적 방식으로 생체 내 다운스트림 전사를 활성화시키는지 여부를 조사하였다. 이를 위해 본 발명은 *pDe1 151-8* 내 콜리플라워 모자이크 바이러스(*CaMV*) *35S* 최소 프로모터의 업스트림을 클론시킨 *GmCaM4* 프로모터의 A2 영역의 4개 일렬 반복서열과 GUS 유전자의 융합에 의해 구축된 GUS 리포터 플라스미드를 지닌 아라비돕시스 잎 엽육 원형질체를 사용하였다. 또한 본 발명은 *CaMV 35S* 프로모터 뒤에 전체-길이 *GmZF-HD1* cDNA를 삽입시킴으로서 이펙터 플라스미드를 구축하였다. 도 8C에 나타난 바와 같이 리포터 컨스트럭트 단독으로 트랜스펙트된 세포는 벡터로 형질전환된 대조군 세포와 비교시 약 2.9-배의 GUS 활성 증가를 나타내었고, 이는 내인성 아라비돕시스 단백질이 리포터 컨스트럭트 내 프로모터 서열을 인식함을 나타낸다. 이펙터 단백질 GmZF-HD1으로의 동시-발현은 약 5.1-배로 GUS 활성을 증가시켰다. 이들 결과는 GmZF-HD1 단백질이 전사 조절제로서 활성적으로 기능하고 병원체-유도 *GmCaM4* 유전자 발현과 관련된다는 결론을 지지한다.

<46> 칼슘 결합 단백질 또는 칼로듈린과 같은 중요한 세포 반응 매개체를 활성화시키기 위해 식물이 어떻게 병원체 감염 및 높은 환경 염도와 같은 스트레스를 인식하고 변환하는지를 이해하는 것은 중요하다. 본 발명자는 병원체 및 염도와 같은 환경 스트레스에 의해 유도된 *GmCaM4* 유전자 발현이 *GmCaM4* 프로모터의 -858 내지 -728 영역 내 *GT-1 시스*-작용 요소(GAAAAA)에 대한 GT-1-유사 전사 인자의 결합에 의해 부분적으로 매개됨을 발견한 바 있다. 이에 더하여 본 발명자는 GT-1 *시스*-작용 요소의 -1286 내지 -1065 영역 업스트림이 병원체-자극된 *GmCaM4* 유전자 조절에 관렴됨도 보고한 바 있다. 본 발명에서는 병원체 반응에 관련된 *GmCaM4* 프로모터 내 보존된 호메오도메인 결합 사이트 ATTA의 반복서열을 확인하였다. *시스*-작용 요소에 결합하는 전사 인자를 분리하기 위해 본 발명은 효모 원-하이브리드 시스템을 사용하여 대두 cDNA 라이브러리를 선별하였고 *GmCaM4* 프로모터의 A2 영역(80 bp)와 특이적으로 상호작용하는 호메오도메인 DNA 결합 단백질을 암호화하는 2개의 cDNA 클론 *GmZF-HD1* 및 *-2*를 클론하였다(도 3). 식물 내에서 수행된 종전 효모 원-하이브리드 선별은 87.8%(실제 36개/41개 총 클론)의 성공률을 지녔다. 본 발명에서는 66.7%(실제 28개/42개 총 클론)의 성공률을 획득하였고, 이는 본 선별이 *GmCaM4* 프로모터에 결합하는 신규한 단백질을 분리하는데 유효함을 나타낸다.

<47> 호메오도메인은 인간, 초파리, 선충(*C. elegans*) 및 식물과 같은 다양한 생물에서 가장 중요한 DNA-결합 모티프 중의 하나이고 단백질-DNA 상호작용에 대한 모델 시스템으로서 널리 연구되고 있다. 호메오도메인-DNA 복합체의 첫 번째 결정 구조는 Kissinger, C.R. et al., Cell, 63, 579-590 (1990)에 나타났고 호메오도메인-DNA 복합체의 하위 구조는 매우 유사한 것으로 판명되었다. 또한 본 발명의 데이터는 징크 핑거가 아닌 호메오도메인이 서열-특이적 DNA 결합에 관련됨을 나타낸다(도 6B). 대부분의 호메오도메인은 핵심 공통 서열로서 ATTA에 결합한다.

<48> *GmCaM4* 프로모터 내 GmZF-HD1 및 -2 결합 사이트를 정확하게 지도화하기 위해 본 발명은 박테리아로 수행된 재조합 GmZF-HD 단백질을 사용하여 EMSA를 수행하였다(도 6). 재조합 GmZF-HD1 및 -2 단백질은 *GmCaM4* 프로모터의 30-nt 서열에 특이적으로 결합하였고(도 6B), 이는 병원체-처리 세포 유래 세포핵 추출물에서 수득된 결과와 일치한다(도 1A, 1C 및 도 2). 항-GmZF-HD1 항체를 사용한 수퍼쉬프트 분석은 GmZF-HD1이 *GmCaM4* 프로모터의 30-nt 서열과 DNA-단백질 복합체를 형성하는 세포핵 추출물의 실체 구성성분임을 확인시켰다(도 8A). 더욱 상세한 EMSA 및 일련의 돌연변이 올리고뉴클레오타이드로의 경쟁 분석은 *GmCaM4* 프로모터 내 보존된 ATTA 호메오도메인 결합 사이트의 2 반복서열이 GmZF-HD1 및 -2 단백질과의 전체 결합 활성에 필수적임을 나타내었다(도 7A, B 및 C). 생체 내 *GmCaM4* 유전자 조절시 GmZF-HD1 및 -2의 기능적 역할도 아라비돕시스 원형질체로 수행된 일시적 발현 분석에 의해 확인되었다(도 8C). 최근 아라비돕시스 징크 핑거 호메오도메인 단백질 ATHB33이 식물 내 다른 호메오도메인 단백질과 유사한 ATTA 핵심 서열(밑줄)을 포함한 20 bp 서열(AGTGTCTTGTAATTAAAA)에 결합함이 보고되었다. 이와 대조적으로 본 발명은 30 bp 서열 내 ATTA 핵심 서열 둘 모두 GmZF-HD1 단백질의 전체 결합에 필수적임을 나타내었다(도 7). 이들 데이터는 GmZF-HD1 단백질이 다른 식물 호메오도메인 단백질이 인식하지 않는 별개의 프로모터 모티프를 인식함을 나타낸다. 이들 차별성은 다른 타겟 프로모터의 조절시 중추 역할을 한다.

<49> 병원체 자극후 GmZF-HD1 및 -2 단백질이 어떻게 조절되는지는 아직 명확하지 않다. 이러한 반응 기작을 더 잘 이해하기 위해 병원체 노출 전후의 GmZF-HD1 및 -2의 위치화가 측정되어야 한다. ZF-HD 패밀리 멤버는 2개의 매우 보존된 N-말단 징크 핑거 도메인 및 C-말단 호메오도메인을 지닌다. 또한 Windhvel, A. et al. (Plant Mol. Biol., 45, 201-214 (2001))은 2개의 보존된 N-말단 모티프가 동종- 또는 이형이합체 형성과 관련된 신규한 이합체화 도메인을 구성함을 입증하였다. 두 번째 징크 핑거 도메인의 돌연변이유발은 매우 보존된 시스테인 잔기가 단백질-단백질 상호작용에 필수적임을 나타내었다. GmZF-HD1 및 -2의 경우 N-말단 ZF에 대해 결실된(즉, 호메오도메인만을 포함한) 돌연변이가 이러한 사이트를 포함한 30-nt 서열에 여전히 강하게 결합하기 때문에 *GmCaM4* 프로모터 내 ATTA 반복서열에 대한 결합은 이합체화(동종- 또는 이형이합체화)를 필요로 하지 않는다. 징크 핑거를 통한 이합체화가 결합을 안정화시킬 수 있기 때문에 이러한 결과는 예측되지 않았다. 여기서 본 발명은 N-말단 징크 핑거 도메인 절제된 2개의 단량체가 감소된 입체적 방해로 인해 밀접하게 간격을 유지하는 결합 사이트에 용이하게 접근하는 것으로 추정한다.

<50> 본 발명은 GmZF-HD1의 세포핵으로의 전위가 *GmCaM4* 프로모터의 전사 조절에 중요한 모델을 제안한다. 이러한 제안은 3가지 관찰을 기반으로 한다: 1) 병원체 처리시 GmZF-HD1 전사체 수치의 유의적인 증가가 존재하지 않고(도 5B); 2) GmZF-HD 단백질이 병원체가 처리되지 않은 세포 유래 추출물이 아닌 병원체-처리된 세포 유래 세포핵 추출물 내에 존재하고(도 1A); 3) 후-번역적으로 변형되지 않는 박테리아에서 발현된 재조합 GmZF-HD1 및 -2이 단백질이 DNA 결합 활성을 나타내기 때문에 후-번역 변형이 *GmCaM4* 프로모터의 GmZF-HD의 결합에 중요한 역할을 하는 것으로 보이지 않는다(도 6 및 7). 따라서 가능한 시나리오는 병원체 공격에 반응하여 세포질 내에 존재하는 알려지지 않은 억제 단백질이 GmZF-HD1 및 -2 전사 인자가 *GmCaM4* 프로모터와 상호작용할 수 있는 세포핵 내로 진입하는 것을 더 이상 방지할 수 없게 된다는 것이다. GmZF-HD1 및 -2는 작은 단백질(각각 20 및 19.4 kDa)이고 따라서 대체로 이들은 세포핵 위치화 신호 서열 없이 세포핵 내로 용이하게 확산될 수 있다. 자극되지 않은 세포에서 추출된 세포핵 단백질은 *GmCaM4* 프로모터 내 보존된 호메오도메인 결합 사이트에 결합하지 않았고, 이는 GmZF-HD1 및 -2가 기본 조건 하에서는 세포핵 내에 존재하지 않음을 나타낸다. 이러한 모델의 최상의 예는 박테리아 병원체에 노출된 동물 세포 내 NF-κB 전사 인자의 활성화가 될 것이다. NF-κB는 세포질 내 IκB의 억제로부터 방출된 후 면역 반응 유전자 발현을 조절하는 세포핵 내로 전위된다. 이러한 제안은 본 발명의 데이터와 일치하나 대안적 모델이 제안될 수 있다. 예를 들어 후-번역 변형이 DNA 결합이 아닌 최적 GmZF-HD 활성에 중요하게 된다. 또한 전사적 상향-조절이 발생하지 않더라도 병원체 감염시 단백질 발현이 증가된다(노던 분석에 의한 판단시).

<51> 현재 분리된 *시스*-작용 요소가 다른 발달 및 환경 신호에 반응하는지 여부 또는 신호 또는 중복 DNA 모티프가 예를 들어 파슬리 페닐알라닌 암모니아 리아셀(*pal1*) 유전자 및 콩 *pal2* 유전자와 같은 다수의 조절 인자에 결합하는지 여부는 아직 알려져 있지 않다. 본 발명은 GmZF-HD1 및 *GmCaM4* 유전자의 발현 패턴이 대두 모종 조직과 매우 유사하고(도 5A), *GmCaM4* 프로모터의 결합 및 활성 제어시 GmZF-HD1 단백질에 대한 역할과 일치함을 관찰하였다. 이들의 유전자 발현 중복 패턴은 세포핵 내로의 외부 병원체-특이적 신호의 변환에 반응한 *GmCaM4*의 전사적 활성에도 중요하다.

<52> 개괄적으로 본 발명은 신규한 부류의 식물 호메오도메인 단백질인 GmZF-HD1 및 GmZF-HD2가 식물 병원체에 노출 후 *GmCaM4* 프로모터 내 보존된 호메오도메인 결합 사이트 ATTA의 2 반복 서열을 포함한 30-nt A/T 풍부 DNA 서

열에 특이적으로 결합함을 나타내었다. 따라서 본 발명의 결과는 식물 방어 신호전달 경로의 유의적인 구성성분으로서 GmZF-HD 전사 인자에 의한 *GmCaM4* 유전자의 조절을 강하게 지지한다.

<53> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

<54> (실시예 1) 식물 세포 배양, 박테리아 및 효모 균주

<55> 대두 세포 현탁액(*Glycine max* L. cv. Williams 82; W82)은 0.75 mg/l 벤질 아데닌으로 보충된 MS 배지 내에서 배양되었고 130 rpm으로 진탕하면서 암조건의 25℃에서 유지되었다. *avrA*를 지닌 슈도모나스 시린개 pv 글리시네아(*Pseudomonas syringae* pv *glycinea*)(*Psg. avrA*)가 생장되었고 Rajasekhar, V.K. et al., Plant Physiol., 120, 1137-1146 (1999)에 기술된 바와 동일하게 조작되었다. 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*) 균주 XL-1 블루 MRF'(Stratagene La Jolla, CA)가 클로닝에 사용되었다. 글루타티온 S-전이효소(GST) 융합 단백질은 E. coli BL21(pLys S) DE3 내에서 발현되었다. 효모 균주 YM4271(*MAT a, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, leu2-3, 112, trp1-901, tyr1-501, gal4-Δ512, gal80-Δ538, ade5::hisG*)은 효모 원-하이브리드 선별(Clontech) 내에서 리포터 벡터로의 형질전환용 숙주로 사용되었다.

<56> (실시예 2) 효모 원-하이브리드 선별에 의한 *GmZF-HD1* 및 *GmZF-HD2* cDNA의 분리

<57> 효모 원-하이브리드 선별은 MATCHMAKER 원-하이브리드 시스템(Clontech)를 사용하여 수행되었다. 타겟 리포터 컨스트럭트를 제조하기 위해 추정 *시스*-작용 요소를 포함한 *GmCaM4* 프로모터(위치 -1207 내지 -1128 bp)의 A2 영역의 4개의 일렬 반복서열이 *pLacZi*의 *SmaI*와 *XhoI* 사이트 및 *pHisi*의 *SmaI* 사이트 내로 삽입되었다. 2개의 발현 플라스미드는 YM4271 내로 동시에 형질전환되었다. 3000-mL 배양액 유래의 세포는 대두 cDNA 라이브러리로 형질전환되었고 20 mM 3-아미노트리아졸(3-AT)를 함유하나 His 및 Leu이 결핍된 합성 최소 배지 상에 도말되었다. 대두 cDNA 라이브러리는 효모 발현 벡터 *pAD-GAL4-2.1*(Stratagene) 및 4일령의 연푸른 대두 배축 조직의 정상 및 신장 영역(자엽으로부터 0.3~1.3 cm)에서 분리된 RNA를 사용하여 구축되었다. 5일간 30℃에서 인큐베이션 후 양성 콜로니는 YPD 내에서 배양되었고 20 mM, 45 mM 또는 60 mM 3-AT를 함유하나 His 및 Leu이 결핍된 배지 상에서 선택되었다. 이후 콜로니는 여과지에 옮겨지고 β-갈락토시다제 활성에 대해 시험되었다. 플라스미드는 양성 콜로니에서 추출되었고 *E. coli* 내에서 증폭되었고 서열분석을 위해 정제되었다.

<58> (실시예 3) 대두 세포핵 추출물의 제조 및 전기영동 이동 변화 분석(EMSA)

<59> 세포핵 단백질 추출물은 Nagao, R.T. et al., Plant Mol. Biol., 21, 1147-1162 (1993)에 기술된 바와 같이 대두 세포 현탁 배양액(W82)에서 제조되었다. Bradford 단백질 분석 키트(Bio-Rad)로의 단백질 농도 측정을 위해 일정량이 채취되었고 추출물의 일정량은 시험관 내에서 -70℃로 동결되었다. EMSA는 [^{32}P]-표지 DNA 탐침을 사용하여 Park, H.C. et al., Plant Physiol., 135, 2150-2161 (2004) 및 Hong, J.C. et al., Plant J., 8, 199-211 (1995)에 기술된 바와 같이 수행되었다. 대두 세포핵 추출물 또는 GST 융합 단백질은 결합 완충액(20 mM Hepes, pH 7.9, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 2 ㎍ 폴리 dI/dC, 50 mM KCl, 15% 글리세롤) 내에서 실온으로 10분간 예비-인큐베이트된 후 40 Kcpm의 말단-표지 탐침으로 20분간 인큐베이트되었다. 수득된 단백질-DNA 복합체는 0.5X TBE 완충액 내의 비-변성 8% 폴리아크릴아마이드 겔 내에서 전기영동되었다. 겔은 건조되었고 X-선 필름에 노출되었다.

<60> (실시예 4) DNase I 풋프린팅(footprinting) 분석

<61> DNase I 풋프린팅 분석은 *GmCaM4* 프로모터의 -1207 내지 -1128 bp를 포함한 118 bp DNA 단편 및 *Sph*I과 *Spe*I 사이트 사이의 *pGEM-T* Easy 벡터(Promega) 서열을 사용하여 Galas, D.J. and Schmitz, ANucl, Acids Res., 5, 3157-3170 (1978) 및 Maxam, A.M. and Gilbert, W., Methods Enzymol., 65, 499-560 (1980)에서 기술된 바와 같이 수행되었다. 단편은 *Spe*I 사이트에서 α-^{32}P 동위원소로 표지되었다. 10 mM Hepes pH 7.9, 60 mM KCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 7% 글리세롤 및 1 mM DTT를 함유한 DNA-세포핵 단백질 결합 혼합물(100 ㎕)은 실온에서 20분간 예비-인큐베이트되었고 1 유니트의 DNase I 보조인자 용액(50 ㎕)이 첨가되었고 인큐베이션은 실온에서 3분간 지속되었다. 100 ㎍의 단백질분해효소 K를 포함한 중지 용액(100 ㎕)이 즉시 첨가되었고 인큐베이션은 55℃에서 30분간 지속되었다. 총 반응 혼합물은 트리스-포화 페놀로 추출되었고 생성물은 25 ㎕ 3 M 아세트산 나트륨, pH 5.2 및 500 ㎕ 100% 에탄올을 첨가함으로써 침전되었다. 최종 펠렛은 서열분석 로딩 완충액(0.1 M NaOH:포름아마이드 [1:2], 0.1% 브로모페놀 블루, 0.1% 자일렌 시아놀) 내에 재현탁되었고 혼합물은 2분간 100℃로 가열되었고 얼음 위에서 냉각되었고 8% 폴리아크릴아마이드-우레아 DNA 서열분석 겔 상에서 로드되었다.

<62> (실시예 5) *E. coli* 내에서의 GST::GmZF-HD1 및 -2 융합 단백질의 발현

<63> 전체 길이 *GmZF-HD1* 및 *GmZF-HD2* cDNA 클론은 각각 발현 벡터 *pGEX-2T-1inker1*(Amersham Pharmacia Biotech)의 *Bam*HI 및 *Xho*I 사이트 내로 클론되었다. 수득된 컨수트럭트는 서열분석에 의해 확인되었고 *E. coli* BL 21(pLys S) DE3 내로 도입되었고 GST 융합 단백질은 제조사(Amersham Pharmacia Biotech)의 지침에 따라 글루타티온-아가로스 비드를 사용하여 발현되었고 정제되었다.

<64> (실시예 6) RNA 겔 블럿 분석

<65> 4-일 연푸른 대두(*Glycine max* L. cv. Williams) 모종에서 채추된 다양한 조직 및 진공 여과에 의해 여과지 상에 수집된 W82 세포가 총 RNA의 분리에 사용되었다. RNA 겔 블럿 분석은 Park, H.C. et al., Plant Mol. Biol., 50, 59-69 (2002)에 기술된 바와 같이 수행되었다. 정상 배축, 신장 배축, 성숙 배축, 어린 싹, 종자, 뿌리 및 병원체-처리된 대두 세포 현탁액(*Psg. avrA*)에서 준비된 총 RNA(각 표본의 20 ㎍)는 1.5% 포름알데하이드/아가로스 겔 상에서 분리되었고 나일론막(Hybond N+, Amersham) 위로 옮겨졌고 *GmZF-HD1* cDNA 탐침과 혼성화되었다. 혼성화 및 세척은 높은 스트린전시 조건 하에서 수행되었다.

<66> (실시예 7) 항체 제조 및 수퍼쉬프트(supershift) 분석

<67> GmZF-HD1 항체는 토끼의 GST::GmZF-HD1 단백질에 대해 유발되었다(경상대학교 동물 배양 시설). 단백질 A-Sepharose 컬럼이 토끼 항체의 IgG 분획을 분리하는데 사용되었다. 1.0 mM 트리스-HCl(pH 8.0)의 1/10 부피를 첨가함으로써 본래 혈청의 pH를 8.0으로 적정한 후 항체 용액은 100 mM 트리스-HCl(pH 8.0)의 10 컬럼 부피로 포괄적으로 세척된 후 10 mM 트리스-HCl(pH 8.0)으로 세척되었다. 항체는 0.1 M 글리신-HCl(pH 2.5)로 용출되었고 1 M 트리스-HCl(pH 8.0) 0.1 부피로 즉시 중화되었다. 수퍼쉬프트 분석은 친화력-정제된 항-GST::GmZF-HD1 항체와 세포핵 추출물을 함께 예비-인큐베이트시킴으로써 수행되었고, 이후 표본은 EMSA를 위해 처리되었다. 대조군 실험은 동일한 함량의 결합 반응 혼합물 내 전-면역 항혈청의 IgG 분획을 인큐베이트시킴으로써 수행되었다.

<68> (실시예 8) 아라비돕시스 원형질체의 일시적 발현 분석

<69> *GmCaM4* 프로모터 내 A2 영역의 사합체가 최소-46 *CaMV 35S* 프로모터-GUS 리포터 유전자(A2 영역-m35S-GUS)에 융합되었다. 이펙터 플라스미드를 구축하기 위해 전체-길이 *GmZF-HD1* cDNA가 *35SC4PPDK* 프로모터 및 *nos* 터미네이터를 포함한 식물 발현 벡터(*pHBT95*) 내로 삽입되었다. 아라비돕시스 엽육 원형질체의 분리 및 폴리에틸렌 글리콜-매개 DNA 트랜스펙션은 Abel, S. and Theologis, A., Plant J., 5, 421-427 (1994)에 기술된 바와 같이 수행되었다. 각각의 형질전환에서 아라비돕시스 원형질체 현탁액(ml 당 5 × 10^6)는 10 ㎍의 리포터 컨스트럭트 단독으로 또는 15 ㎍의 이펙터 컨스트럭트 또는 벡터 DNA 대조군(*pHBT95*)과 함께 트랜스펙트되었다. 트랜스펙트된 원형질체는 암조건에서 16시간 동안 W5 용액 내에서 인큐베이트되었다. 글루쿠로니다제(GUS) 발현은 Jefferson, R.A. et al., EMBO J. 6, 3901-3907 (1987)에 기술된 바와 같이 기질인 4-메틸 움벨리페릴 글루쿠로니드로 형광계측기로 검출되었다. LUC 분석은 제조사의 지침에 따라 Promega 루시페라제 분석 시스템을 이용하여 수행되었다. 트랜스펙션 효율을 표준화시키기 위해 Luehrsen, K.R. et al., Methods Enzymol., 216, 397-414 (1992)에 기술된 바와 같이 *CaMV 35S 프로모터-LUC 대조군 벡터 pJD 300*가 각 실험에서 구축되었다.

발명의 효과

<70> 본 발명의 효과는 병원체의 자극에 대응하여 발현하는 대두 칼모듈린 이소폼 4(GmCaM4) 프로모터를 통해 상기 칼모듈린 이소폼 4 프로모터 내의 DNA 결합 단백질의 발현을 위한 유전자 단편 부위를 판독하여 DNA 결합 단백질인 Glycine max zinc finger-homeodomain protein 1(GmZF-HD1) 및 Glycine max zinc finger-homeodomain protein 2(GmZF-HD2)를 통한 단백질의 발현을 개발한 것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 *GmCaM4* 프로모터 내 병원체-반응성 단백질 결합 사이트의 확인을 나타낸 것이다. 도 1A는 겔 이동 변화 분석(EMSA)에 사용된 *GmCaM4* 프로모터에서 유래된 DNA 단편의 개략도 및 $MgCl_2$(레인 2, $MgCl_2$) 또는 *avrA*를 지닌 슈도모나스 시린개 pv 글리시네아(*Pseudomonas syringae* pv *glycinea*)(*Psg. avrA*)(레인 3, *Psg. avrA*)로 처리된 W82 대두 세포 현탁 배양액에서 준비된 세포핵 추출물과의 결합 패턴을 나타낸다. 비-처리(레인 1)는 자유 DNA 탐침을 나타낸다. *GmCaM4* 전사 시작 사이트의 업스트림 단편 위치가 나타나 있다. 도 1B는 경쟁자

로 사용된 *GmCaM4* 프로모터 A2 영역에 대응하는 올리고뉴클레오타이드(A2-1 ~ A2-7)을 나타낸다. 도 1C는 경쟁적 겔 이동 변화 분석을 나타낸다. DNA 결합 반응은 비표지 경쟁자(A2-1 ~ A2-7)를 예비-인큐베이트시킨 후 탐침으로서 ^{32}P-표지된 A-2 단편을 첨가함으로써 수행되었다. 100-배 몰 과량의 경쟁자 DNA가 각 반응 혼합물에 첨가되었다. 자유(화살) 및 단백질-복합된(화살촉) 탐침은 8% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리되었고 방사능 사진으로 촬영되었다.

<2> 도 2는 병원체-반응성 단백질에 의해 결합된 *GmCaM4* 프로모터의 A2 영역의 DNase I 풋프린팅 분석을 나타낸 것이다. 말단-표지 단편은 *Psg. avrA*-처리된 W82 대두 세포 유래 세포핵 단백질 0, 5, 10, 20 또는 25 ㎍으로 인큐베이션 후 DNase I으로 분해되었다. 수득된 DNA 단편은 정제되었고 6% 비변성 폴리아크릴아마이드 서열분석 겔 상에서 전기영동되었다. GA, G+A 서열분석 래더(ladder)(비-암호화 나선); 레인 1, 세포핵 단백질 부재; 레인 2~5, 각각 5, 10, 20 및 25 ㎍ 세포핵 단백질. DNase I-보호된 영역은 직선으로 나타내었고 서열이 나타나 있다.

<3> 도 3은 *GmCaM4* 프로모터의 A2 영역에 결합하는 단백질을 암호화하는 cDNA 클론의 분리를 나타낸 것이다. 도 3A는 효모 내 선택에 의한 cDNA 분리 전략을 나타낸다. 효모 발현 벡터 *pAD-GAL4-2.1* 내에서 구축된 대두 cDNA 라이브러리는 *GmCaM4* 프로모터의 A2 영역의 4개 일렬 반복서열의 조절 하에서 이중 리포터 유전자 *HIS*3 및 *lacZ*를 지닌 YM4271 세포 내로 형질전환되었다. 효모 발현 cDNA 라이브러리는 대두 단백질에 대한 *GAL4* 활성화 도메인(AD)의 N-말단 융합을 암호화한다. $P_{minHIS3}$은 *HIS*3 유전자의 최소 프로모터를 나타내고, $P_{minCYC1}$은 *CYC1* 최소 프로모터를 나타낸다. P_{ADH1}은 알코올 탈수소효소 1(*ADH1*) 프로모터를 나타내고, T_{ADH1}은 *ADH1* 터미네이터를 나타낸다. 도 3B는 *GmCaM4* 프로모터의 A2 영역과 GmZF-HD1 및 -2의 특이적 상호작용을 나타낸다. 나타낸 클론(좌측 상단)을 지닌 효모 형질전환체는 20 mM(우측 상단) 또는 60 mM(좌측 하단) 3-AT의 존재시 생장되었다. 16개 양성 클론 중 9개가 본 도면에 나타나 있다. 번호는 표 1에 나타난 대표 클론을 나타낸다. YPD 배지 내에서 생장된 효모 콜로니의 β-갈락토시다제 활성은 여과-승강(filter-lift) 분석(우측 하단)에 의해 측정되었다.

<4> 도 4는 GmZF-HD1 및 -2의 아미노산 서열 정렬 및 계통발생적 분석을 나타낸 것이다. 도 4A는 플라베리아 트리네르비아(FtHB1) 및 아라비돕시스 탈리아나(AtHB24 및 AtHB26)과의 GmZF-HD1 및 -2 아미노산 서열 정렬을 나타낸다. 매우 보존된 도메인 Ia, Ib 및 II는 사각형으로 표시되었고 동일한 잔기는 흑색 사각형 내 백색 문자로 나타내었고 대시(dash)는 잔기의 부재를 나타내고 호메오도메인의 트리헬릭스(trihelix)-DNA 결합 영역은 밑줄쳐있다. 도 4B는 식물 호메오도메인 단백질의 계통수를 나타낸다. 하기 단백질에 대한 GenBank 수탁번호는 괄호안에 나타나 있다: GmHB1 (AW760234), ATHB24 (AC006439), ATHB28 (AL049862.1), ATHB25 (AB011479), OsHB1 (AC007858), FbHB4 (Y18581), FbHB2 (Y18579), FtHB1 (Y18577), FbHB3 (Y18580), ATHB26 (AB011483), ATHB27 (AB007647), BEL1 (U39944), ATH1 (X80126), ATHB2 (X68145), ATHB6 (X67034), PRHA (L21991), GL2 (L32873), ATML1 (U37589), STM (U32344), KN1 (X61308), KNAT3 (X92392).

<5> 도 5는 대두 내 *GmZF-HD1* mRNA의 발현 패턴을 나타낸 것이다. 도 5A는 다양한 대두 조직 내 *GmZF-HD1* 유전자 발현의 노던 블럿 분석을 나타낸다. 도 5B는 대두 세포 현탁액 내 병원체(*Psg. avrA*) 처리 후 GmZF-HD1 전사체의 시간경과에 따른 발현을 나타낸다. 정상 배축(정상), 신장 배축(신장), 성숙 배축(성숙), 어린 싹, 종자, 뿌리 및 병원체 처리된 대두 세포 현탁액에서 제조된 총 RNA(20 ㎍)가 1.5% 포름알데하이드/아가로스 겔 상에서 분리되고 나일론막으로 옮겨지고 ^{32}P-표지된 *GmZF-HD1* cDNA 탐침과 혼성화되었다. 총 RNA의 동일한 로딩을 검증하기 위해 에티듐 브로마이드로 염색함으로써 rRNA가 가시화되었다.

<6> 도 6은 GmZF-HD1 및 -2의 DNA 결합 활성을 나타낸 것이다. 도 6A는 GmZF-HD1 및 -2 GST 융합 컨스트럭트의 개략도를 나타낸 것이다. 번호는 융합 컨스트럭트 내 경계 위치를 나타낸다. 도메인 경계의 아미노산 위치가 나타나 있다. 도 6B는 *GmCaM4* 프로모터의 A2-2 영역을 포함한 30-nt 서열과 재조합 GmZF-HD1 및 -2 단백질의 상호작용을 나타낸다. ^{32}P-표지 30-nt 올리고뉴클레오타이드는 재조합 GmZF-HD1 또는 -2 단백질 또는 GST 단독의 존재시 인큐베이트되었다. 모든 레인은 10 ㎍의 각 박테리아 추출물을 포함한다 자유(화살) 및 단백질-복합된(화살촉) 탐침은 8% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리되었고 방사능사진 촬영되었다.

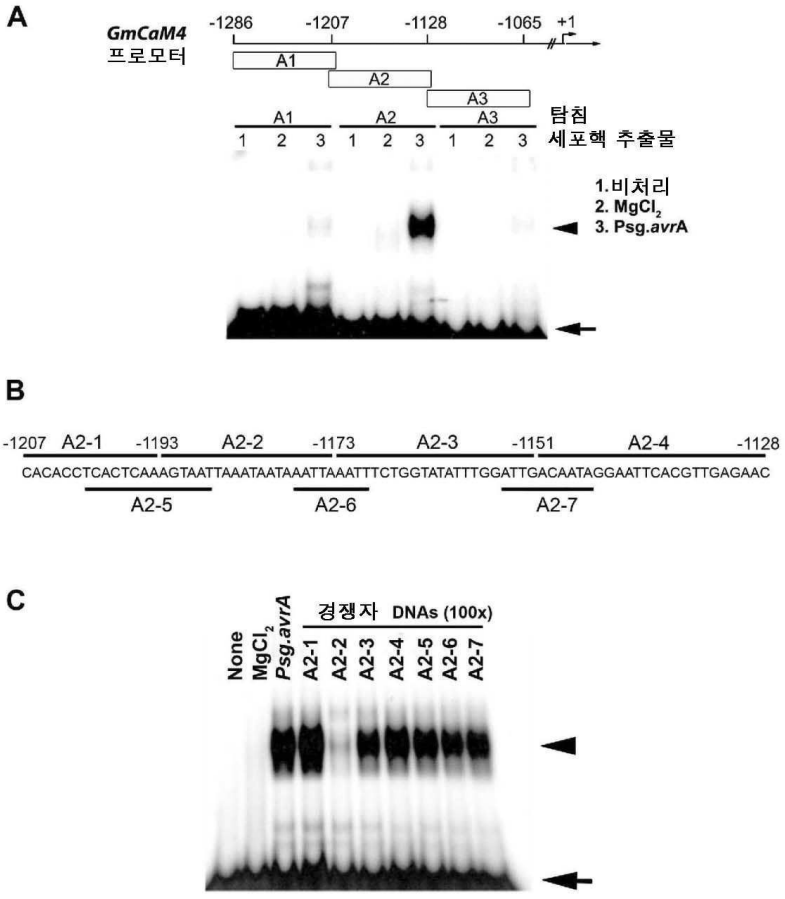
<7> 도 7은 GmZF-HD1 단백질과 *GmCaM4* 프로모터 유래 30-nt 올리고뉴클레오타이드와의 특이적 상호작용을 나타낸 것이다. 도 7A는 프로브 또는 탐침으로 사용된 *GmCaM4* 프로모터의 30-nt 단편(WT) 및 돌연변이화 단편(M1 내지 M6)의 뉴클레오타이드 서열을 나타낸다. 도 7B는 재조합 GmZF-HD1과 30-nt DNA(WT) 및 돌연변이 단편(M1 내지 M6)과의 DNA-결합 활성을 나타낸다. 방사성 탐침은 재조합 GmZF-HD1 또는 GST 단독 존재시 인큐베이트되었다.

도 7C는 경쟁자로서 30-nt DNA(WT) 및 돌연변이화 단편(M1 내지 M6)을 사용한 경쟁적 겔 이동 변화 분석을 나타낸다. DNA 결합 반응은 비표지 경쟁자의 부재 또는 존재시 재조합 GST-융합 GmZF-HD1 단백질 및 ^{32}P-표지 30-nt DNA 단편(WT)로 수행되었다. 각 경장자 DNA(200-배 몰 과량)가 반응 혼합물에 첨가되었다. 자유(화살) 또는 단백질-복합된(화살촉) 탐침은 8% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리되었고 방사능사진 촬영되었다.

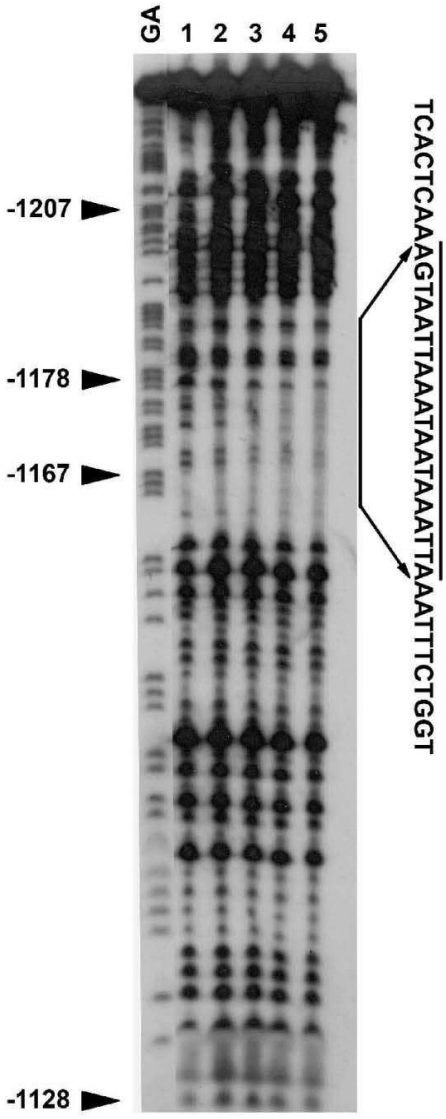
<8> 도 8은 GmZF-HD1 단백질에 의한 *GmCaM4* 프로모터의 직접적인 상호작용 및 활성화를 나타낸 것이다. 도 8A는 항-GmZF-HD1 항체를 사용한 겔 이동 수퍼-쉬프트 분석을 나타낸다. GST::GmZF-HD1 단백질에 대해 유발된 다양한 농도의 폴리클론 항체가 *GmCaM4* 프로모터의 ^{32}P-표지 30-nt DNA 단편 및 병원체-처리 대두 세포 현탁 배양액 유래 세포핵 추출물로 형성된 단백질-DNA 복합체와 인큐베이트되었다. 레인 1은 전면역 혈청을 포함하고, 레인 2는 1 ㎍의 친화력-정제된 GmZF-HD1 항체를 포함하고, 레인 3은 세포핵 추출물만을 포함한다. 병원체-처리 세포 유래 세포핵 추출물은 탐침으로서 *GmCaM4* 프로모터의 ^{32}P-표지 30-nt 단편을 첨가하기 전 0.1 ㎍(레인 4), 0.3 ㎍(레인 5), 0.5 ㎍(레인 6), 0.7 ㎍(레인 7) 또는 1 ㎍(레인 8)의 친화력-정제된 GmZF-HD1 항체로 예비인큐베이트되었다. 자유(화살) 또는 단백질-복합된(화살촉) 탐침은 8% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 분리되었고 방사능사진 촬영되었다. 도 8B는 아라비돕시스 원형질체 내 일시적 발현 분석에 사용된 이펙터 및 리포터 컨스트럭트의 개략도를 나타낸다. 이펙터 컨스트럭트에서 *GmZF-HD1* cDNA는 CaMV 35S 프로모터와 Nos 터미네이터(Nos-T) 사이에 삽입되었다. 리포터 컨스트럭트에서 *GmCaM4* 프로모터의 30-nt 단편을 포함한 A2 영역의 4개의 일렬 반복서열이 최소 TATA 프로모터-GUS 컨스트럭트의 업스트림에 서브클론되었다. 도 8C는 아라비돕시스 원형질체 내 *GmCaM4* 프로모터 활성 상의 GmZF-HD1 단백질의 효과를 나타낸다. GmZF-HD1 및 *GmCaM4* 프로모터의 A2 영역이 없는 빈 벡터가 대조군으로 사용되었다. 형질전환 효율을 표준화하기 위해 *CaMV 35S* 프로모터-루시페라제(LUC) 플라스미드가 각 실험에서 동시-트랜스펙트되었다. 데이터는 3회 독립적 표본으로부터의 결과의 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 번호는 벡터 대조군에서 수득된 수치와 비교시 상대적 발현 증가를 나타낸다.

도면

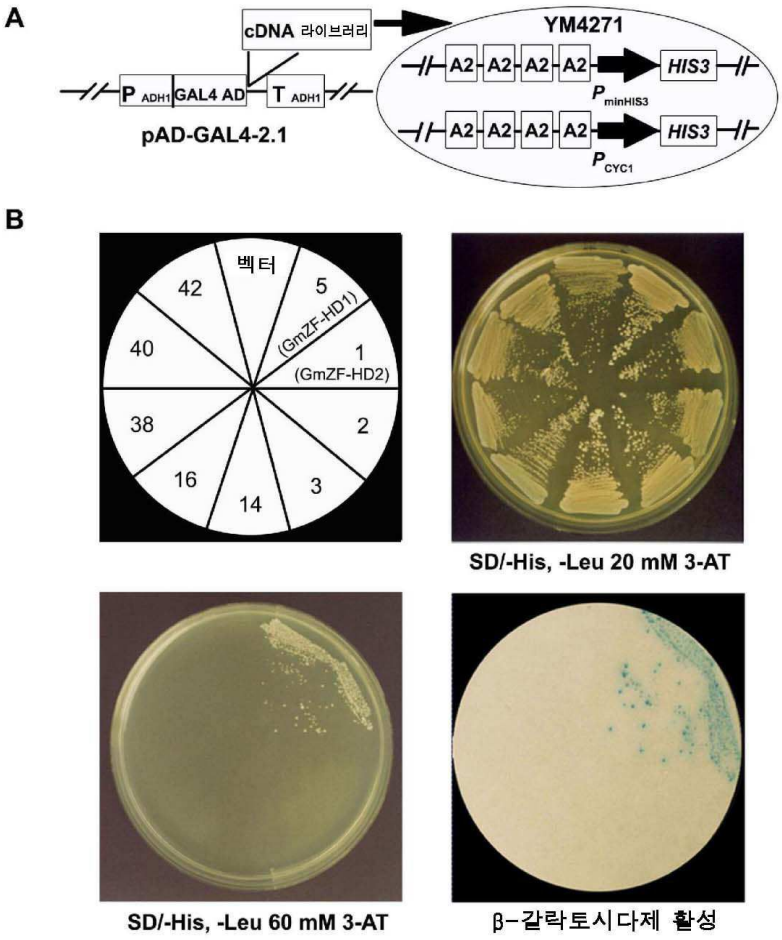
도면1


A
GmCaM4
프로모터
-1286
-1207
-1128
-1065
+1
A1
A2
A3
탐침
세포핵 추출물
1 2 3 1 2 3 1 2 3
1. 비처리
2. MgCl2
3. Psg.avrA
B
-1207
A2-1
-1193
A2-2
-1173
A2-3
-1151
A2-4
-1128
CACACCTCACTCAAAGTAATTAAATAATAAATTAAATTTCTGGTATATTTGGATTGACAATAGGAATTCACGTTGAGAAC
A2-5
A2-6
A2-7
C
경쟁자 DNAs (100x)
None
MgCl2
Psg.avrA
A2-1
A2-2
A2-3
A2-4
A2-5
A2-6
A2-7

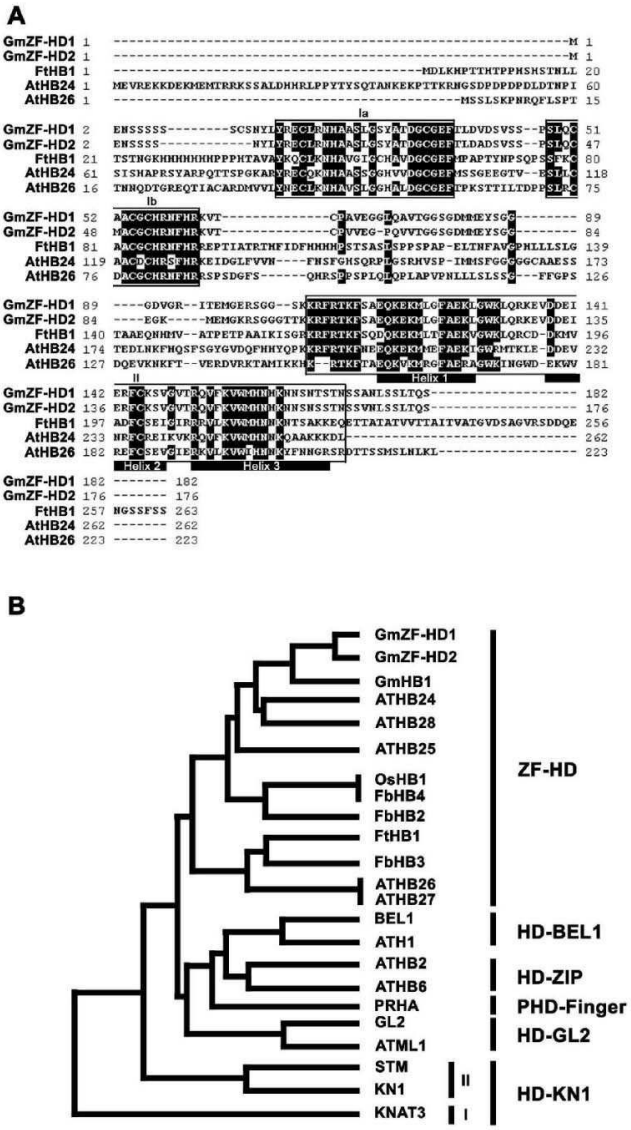
도면2


GA
1
2
3
4
5
-1207
-1178
-1167
-1128
TCACTCAAGTAATTAAATAATAAATTAAATTTCTGGT

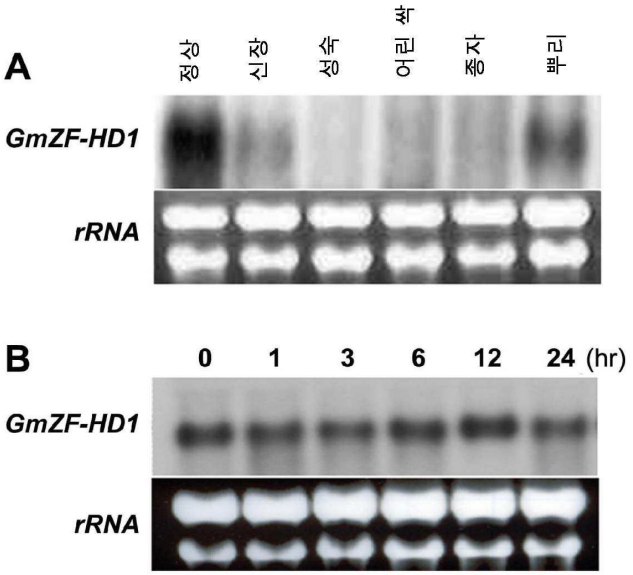
도면3


A
cDNA 라이브러리
YM4271
P ADH1
GAL4 AD
T ADH1
pAD-GAL4-2.1
A2
HIS3
P minHIS3
P CYC1
B
벡터
5
(GmZF-HD1)
1
(GmZF-HD2)
2
3
14
16
38
40
42
SD/-His, -Leu 20 mM 3-AT
SD/-His, -Leu 60 mM 3-AT
β-갈락토시다제 활성

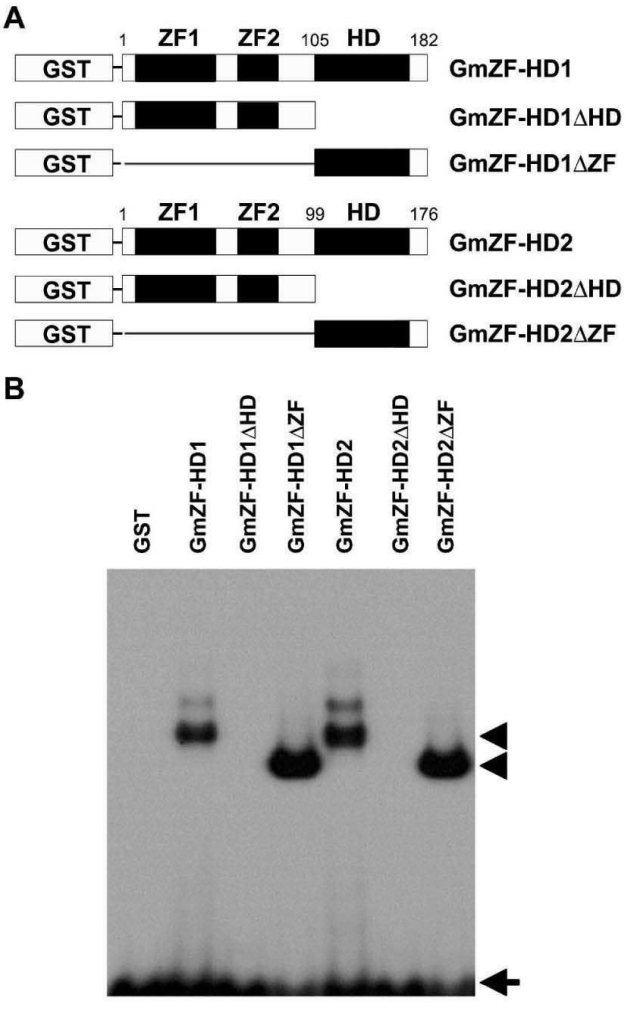
도면4


A
GmZF-HD1
GmZF-HD2
FtHB1
AtHB24
AtHB26
Ia
Ib
II
Helix 1
Helix 2
Helix 3
B
GmZF-HD1
GmZF-HD2
GmHB1
ATHB24
ATHB28
ATHB25
OsHB1
FbHB4
FbHB2
FtHB1
FbHB3
ATHB26
ATHB27
BEL1
ATH1
ATHB2
ATHB6
PRHA
GL2
ATML1
STM
KN1
KNAT3
ZF-HD
HD-BEL1
HD-ZIP
PHD-Finger
HD-GL2
HD-KN1
II
I

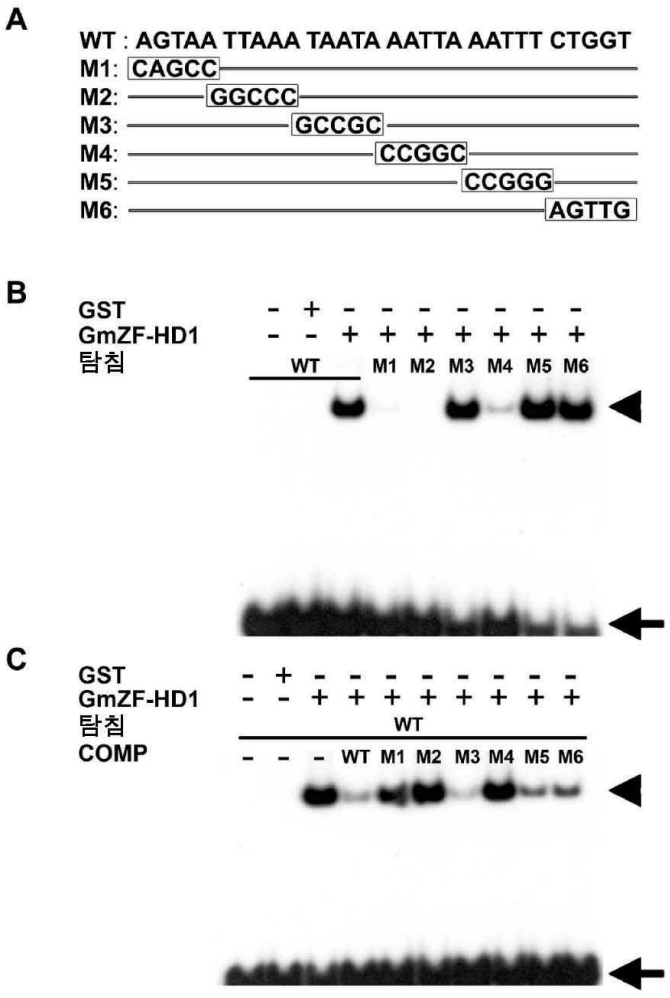
도면5


A
정상
신장
성숙
어린 싹
종자
뿌리
GmZF-HD1
rRNA
B
0
1
3
6
12
24 (hr)
GmZF-HD1
rRNA

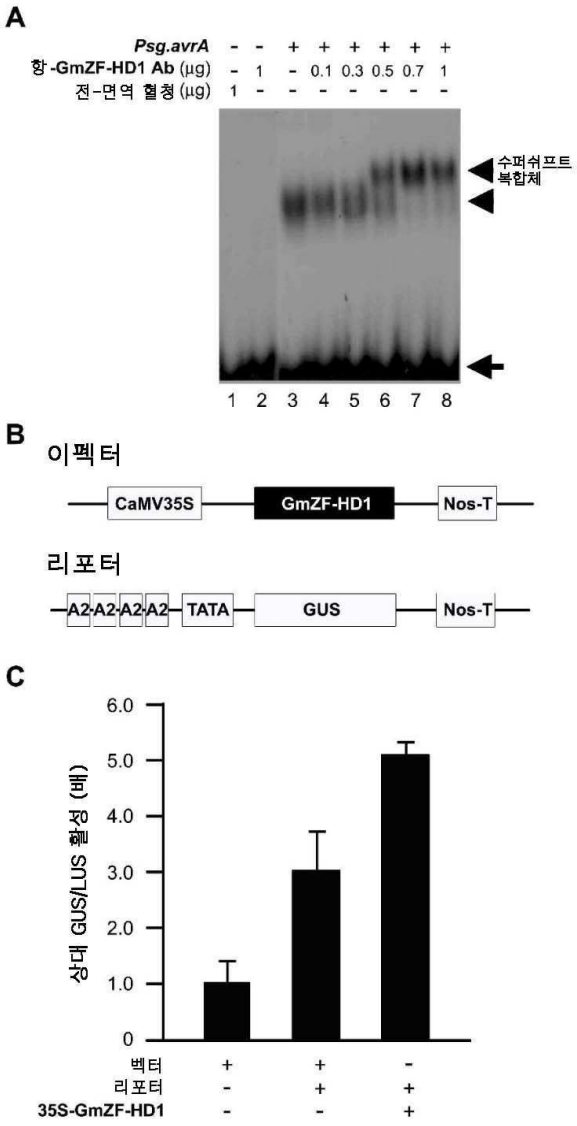
도면6


A
1
ZF1
ZF2
105
HD
182
GST
GmZF-HD1
GmZF-HD1ΔHD
GmZF-HD1ΔZF
1
ZF1
ZF2
99
HD
176
GmZF-HD2
GmZF-HD2ΔHD
GmZF-HD2ΔZF
B
GST
GmZF-HD1
GmZF-HD1ΔHD
GmZF-HD1ΔZF
GmZF-HD2
GmZF-HD2ΔHD
GmZF-HD2ΔZF

도면7


A
WT : AGTAA TTAAA TAATA AATTA AATTT CTGGT
M1: CAGCC
M2: GGCCC
M3: GCCGC
M4: CCGGC
M5: CCGGG
M6: AGTTG
B
GST
GmZF-HD1
탐침
WT M1 M2 M3 M4 M5 M6
C
GST
GmZF-HD1
탐침
COMP
WT
WT M1 M2 M3 M4 M5 M6

도면8



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
<120> Gene fragment for activation of DNA binding protein in calmodulin isoform 4 promoter

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Glycine max

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(20)
<223> Calmodulin isoform 4

<400> 1
agtaattaaa taataaatta 20