



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0124668
(43) 공개일자 2011년11월17일

(51) Int. Cl.

A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/65 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)

(21) 출원번호 10-2010-0044181

(22) 출원일자 2010년05월11일

심사청구일자 2010년05월11일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

정인식

서울특별시 강남구 도곡동 삼성래미안아파트 10동1102호

정호용

인천광역시 남동구 서창동 현대모닝사이드아파트 308동 1301호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

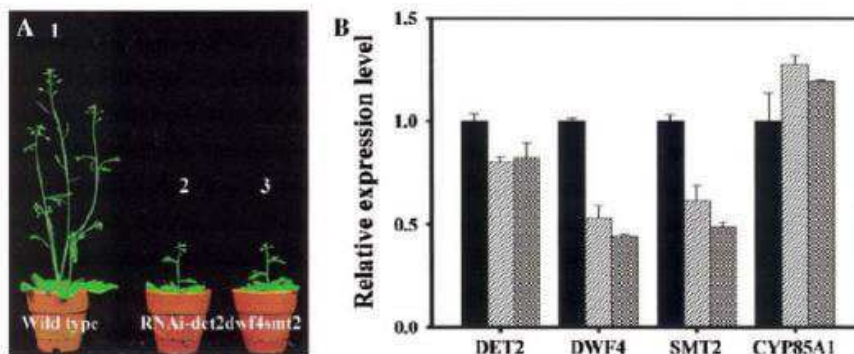
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 캄페스테롤 함량이 증가된 형질전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 캄페스테롤 함량이 증가된 형질전환 식물체를 제공한다. 본 발명의 형질전환 식물체는 캄페스테롤 함량이 높아 콜레스테롤 수치 강하, 관상 심장질환의 예방 또는 치료를 위한 식품 또는 의약의 제조에 이용될 수 있으며, 난쟁이 표현형을 나타내어 조경용, 분화용으로도 적합하다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

김경일

부산광역시 서구 충무동 충무아파트 B동 405호

박중화

서울특별시 송파구 오금동 70-4 302호

이소연

충청남도 예산군 고덕면 상몽리 548-3

스즈 후지오카

일본국 사이타마 351-0198, 와코시, 리켄과학기술
원

최성화

서울특별시 관악구 서림동 신림현대아파트 101동
1018호

이윤형

서울특별시 서초구 서초4동 삼호아파트 8동 1308호

백남인

경기도 수원시 영통구 망포동 쌍용아파트 104동
2001호

최근원

경기도 용인시 기흥구 지곡동 704번지 자봉마을 써
니밸리아파트 113동 601호

특허청구의 범위

청구항 1

2개의 T-DNA 보더 사이에 제초제 저항성 선택마커, 프로모터, 터미네이터 및 스페이서를 포함하고, *det2* 유전자의 RNA 간섭을 위한 센스 염기서열, *dwf4* 유전자의 RNA 간섭을 위한 센스 염기서열 및 *smt2* 유전자의 RNA 간섭을 위한 센스 염기서열과, 이들 각각의 안티센스 염기서열이 스페이서를 사이에 두고 서로 역방향이 되도록 배치되고, 프로모터와 작동가능하게 연결된, 식물 발현용 RNA 간섭 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, *det2* 유전자의 RNA 간섭을 위한 센스 염기서열은 서열번호 3의 염기서열의 DNA 이고, *dwf4* 유전자의 RNA 간섭을 위한 센스 염기서열은 서열번호 6의 염기서열의 DNA 이고, *smt2* 유전자의 RNA 간섭을 위한 센스 염기서열은 서열번호 9의 염기서열의 DNA 이고, 이들 각각의 안티센스 염기서열은 상기 센스 염기서열 각각에 대해 상보적인 서열의 DNA인 식물 발현용 RNA 간섭 재조합 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, RNA 간섭 재조합 벡터는 도 1A에 기재된 pFGC5941-*DET2:DWf4:SMT2* 벡터인 식물 발현용 RNA 간섭 재조합 벡터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 벡터로 형질전환된 미생물.

청구항 5

제4항에 있어서, 미생물은 아그로박테리움 투메파시엔스인 형질전환된 미생물.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 벡터로 형질 전환된 식물체.

청구항 7

제6항에 있어서, 식물체는 야생형과 비교하여 캄페스테롤의 함량이 증가된 형질 전환된 식물체.

청구항 8

제6항의 형질 전환된 식물체로부터 추출하는 것을 특징으로 하는 캄페스테롤의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 기재된 벡터로 형질전환하는 것을 포함하는, 식물체 내 캄페스테롤 함량을 증가시키는 방법.

청구항 10

제6항에 기재된 형질 전환된 식물체로부터 추출된 것을 특징으로 하는 캄페스테롤을 함유하는 식물추출물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 캄페스테롤 함량이 증가된 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 캄페스테롤(campesterol)은 식물계에서 많이 발견되는 식물 스테롤로서, 콜레스테롤과 유사한 화학구조를 갖는

피토스테롤(phytosterol) 중 하나이다. 측쇄의 24번 탄소 위치에 메틸그룹이 존재하는 점에서 콜레스테롤과 다르며, 콜레스탄(cholestane) 계열의 4-데스메틸스테롤(4-desmethylsterol)로 분류된다. 채소, 과일, 견과류 등에 포함되어 있으나, 낮은 농도로 포함되어 있다.

- [0003] 캄페스테롤은 전체-콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 수치를 낮추어 관상심장질환의 위험을 줄이는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 식이 콜레스테롤 흡수와 위장관의 내생적인 콜레스테롤 재흡수를 억제하고, 콜레스테롤을 변으로 배설하여 세럼 콜레스테롤 수치를 줄이며, 담즙산염으로 콜레스테롤을 치환하거나 장 점막에서 콜레스테롤 에스테르화 억제를 통하여 콜레스테롤 수치를 낮추는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 브라시노스테로이드(brassinosteroid)는 배발생, 세포신장, 맥관분화, 생식, 노화를 포함한 다양한 생리학적 과정에 영향을 주는 식물 스테로이드 호르몬이다. 브라시놀리드(brassinolide) 및 카스타스테론(casterone)을 포함하는 브라시노스테로이드는 캄페스테롤로부터 환원, 히드록실화, 에피머화 및 산화를 포함하는 일련의 효소 작용을 거쳐 합성된다.
- [0005] 스테롤 메틸 트랜스퍼라제 2 (STEROL METHYLTRANSFERASE 2; *SMT2*), DE-ETIOLATED2 (*DET2*) 및 DWARF4 (*DWF4*)는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 브라시노스테로이드 생합성에 관여하는 효소이다.
- [0006] 상기 *SMT2*는 C-28 스테롤 메틸 트랜스퍼라제를 매개하며, C28 스테롤(캄페스테롤) 및 C29 스테롤(시토스테롤)의 비율을 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0007] 상기 *DET2*는 스테롤 5 α -리덕타제를 매개하며, (24R)-24-메틸콜레스-4-엔-3온((24R)-24-methylcholest-4-en-3-one)의 (24R)-24-메틸-5 α -콜레스탄-3-온((24R)-24-methyl-5 α -cholestan-3-one)으로의 환원을 촉매하는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 상기 *DWF4* 스테롤 C22 α -히드록시라제를 매개하며, 여러 C-22 히드록실화를 촉매하며, 이는 브라시노스테로이드 생합성 경로에서 중요한 속도-결정단계로 알려져 있다.
- [0009] 이에 본 발명자들은 브라시노스테로이드 생합성 경로를 예의 연구한 결과, 야생형과 비교하여 캄페스테롤 함량이 유의적으로 증가한 형질전환 식물체를 제조하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 캄페스테롤 함량이 증가된 형질전환 식물체를 제공하기 위한 것이다.
- [0011] 본 발명은 또한 캄페스테롤 함량이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로써, 본 발명은 *det2*, *dwf4* 및 *smt2* 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합백터를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 상기 재조합백터로 형질전환된 미생물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한 상기 재조합백터로 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한 상기 재조합백터를 이용하여 식물체 내 캄페스테롤 함량을 증가시키는 방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 상기 형질전환 식물체를 이용하여 캄페스테롤을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 상기 형질전환 식물체로부터 추출된 캄페스테롤을 함유하는 식물 추출물을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 형질전환 식물체는 증가된 캄페스테롤 함량을 가진다. 따라서, 콜레스테롤 수치 강하, 관상 심장질환의 예방 또는 치료를 위한 식품 또는 의약의 제조에 이용될 수 있다. 또한, 본 발명의 형질전환 식물체는 난쟁이 표현형을 나타내기 때문에, 물을 덜 쓰고 바람과 강우 피해에 강하며 종자나 과일을 만드는 데 유리하고, 취급과 채취가 보다 용이하고, 도복저항성이 보다 우수하다. 또한, 화단용 또는 절화용 뿐만 아니라 조경용, 분화용으로도 적합하다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도1A는 본 발명에 따른 RNA 간섭 재조합벡터의 개략도를 나타낸 것이고, 도1B는 벡터용 각 유전자의 전사산물 내 증폭 지역을 나타낸 도이다 (흑색 띠: exon 서열, 적색 띠: 실시예의 서열).
- 도2A는 야생형 식물과 형질전환 식물체(T3)의 표현형을 나타낸 도이고, 도2B는 반-정량적 RT-PCR 분석을 통해 형질전환 식물체(T3) 내 너다운(knock-down) 돌연변이를 확인한 도이다. (그림 중 1번: 야생형 식물; 2번, 3번: 약한 표현형의 det2:dwf4:smt2 RNA 간섭 형질전환 식물체; 4번, 5번: 강한 표현형의 det2:dwf4:smt2 RNA 간섭 형질전환 식물체)
- 도3A는 야생형 식물 및 형질전환 식물체(T4)의 표현형을 나타낸 도이고, 도3B는 실시간 RT-PCR 분석을 통해 형질전환 식물체(T4) 내 너다운 돌연변이를 확인한 도이다. (검은색 막대: 야생형; 사전무늬, 점무늬 막대: 강한 표현형의 det2:dwf4:smt2 간섭 형질전환 식물체)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은, det2, dwf4, 및 smt2 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합벡터, 상기 재조합벡터로 형질전환된 미생물, 및 상기 재조합벡터로 형질전환된 식물체, 상기 형질전환 식물체를 이용한 감페스테일의 제조방법에 관한 것이다.
- [0021] 이하에서 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0022] 본 발명은 det2(De-Etilolated 2), dwf4(dwarf 4), 및 smt2(sterol methyltransferase 2) 유전자에 대한 RNA 간섭 재조합벡터에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터는 아래 언급되는 det2, dwf4, 및 smt2 유전자의 RNA 간섭을 위한 센스 염기서열과, 이들 각각의 안티센스 염기서열을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 RNA 간섭 재조합벡터 내 포함되는 det2 유전자의 RNA 간섭을 위한 서열은 서열번호 1에 기재된 DET2 코딩 서열 (GenBank accession no. U53860)의 일부(센스 염기서열), 즉, 서열번호 1에 기재된 염기서열 중 약 100 내지 약 500 bp 의 DNA를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 DNA를 사용할 수 있다. 또한 형질전환되는 식물체 내에서 발현되어 det2 mRNA와 결합하여 DET2의 발현을 저해할 수 있는 서열번호 3의 염기서열의 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0025] 본 발명의 RNA 간섭 재조합벡터 내 포함되는 dwf4 유전자의 RNA 간섭을 위한 서열은 서열번호 4에 기재된 DWF4 코딩 서열 (GenBank accession no. NM_114926)의 일부(센스 염기서열), 즉, 서열번호 4에 기재된 염기서열 중 약 100 내지 약 500 bp 의 DNA를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 DNA를 사용할 수 있다. 또한 형질전환되는 식물체 내에서 발현되어 dwf4 mRNA와 결합하여 DWF4의 발현을 저해할 수 있는 서열번호 6의 염기서열의 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0026] 본 발명의 RNA 간섭 재조합벡터 내 포함되는 smt2 유전자의 RNA 간섭을 위한 서열은 서열번호 7에 기재된 SMT2 코딩 서열 (GenBank accession no. NM_101884)의 일부(센스 염기서열), 즉, 서열번호 7에 기재된 염기서열 중 약 100 내지 약 500 bp 의 DNA를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 DNA를 사용할 수 있다. 또한 형질전환되는 식물체 내에서 발현되어 smt2 mRNA와 결합하여 SMT2의 발현을 저해할 수 있는 서열번호 7의 염기서열의 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0027] 상기 안티센스 염기서열은 센스 염기서열에 대한 상보적인 서열을 의미한다.
- [0028] 상기 언급된 변이체는 해당 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함하며, 해당 염기서열의 대립유전자형 또는 중간 변이체, 또는 이의 단편들을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 겹)를 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 사용가능한 벡터는 식물 발현용 벡터이다.
- [0030] "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미한다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩

서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0031] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투메파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 이원(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 DNA를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스 (예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0032] 본 발명에서 사용되는 식물 발현 벡터는 RNA 간섭 재조합 벡터로서, 이는 형질전환되는 식물체 내에서 *det2*, *dwf4* 및 *smt2* 유전자에 대한 RNA 간섭을 유도하는 스템 루프형 dsRNA를 생성하도록 설계된 재조합 벡터이다. “스스템 루프”란, 단일 사슬 RNA 상에 존재하는 역방향 반복 서열간 수소결합에 의해 생기는 이중 사슬의 부분(스스템; stem)과 그 사이의 루프 부분으로 구성되는 구조를 말하며, 헤어핀 루프라고도 불린다. 따라서, 본 발명에서 사용되는 식물 발현 벡터는 *DET2*, *DWF4*, *SMT2*에 대한 mRNA의 어느 영역의 센스(혹은 안티센스) RNA를 암호화하는 센스서열(혹은 안티센스)과, 본 센스서열에 상보적인 서열을, 스페이서-영역을 사이에 두어 2개의 서열이 서로 역방향이 되도록 배치시키고 이것을 프로모터와 작동가능하게 연결한 구조를 가지는 DNA를 포함한다. 여기서, 스페이서 영역을 구성하는 DNA는 이에 인접하는 반복 서열이 수소결합을 할 수 있는 한, 그 길이는 특히 제한되지 않지만, 통상 1~10,000 염기이다. 스페이서 영역을 구성하는 DNA의 염기 서열은, 특별히 규정하지 않고 임의의 서열로 할 수 있으며, 바람직하게는 CHSA 유전자 (penunia chalcone synthase A)로부터 얻은 1,352 bp 인트론 (이하 ‘CHSA 인트론’)을 사용할 수 있다.

[0033] 본 발명의 식물 발현 벡터는 또한 선택마커, 프로모터 및 터미네이터를 포함한다.

[0034] 본 발명에서 사용가능한 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate), 포스피노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 Basta 저항성 (BAR) 유전자가 사용된다.

[0035] 본 발명에서 사용가능한 프로모터는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터로서, CaMV35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, 히스톤 프로모터 등이 있으며, 바람직하게는 CaMV35S 프로모터가 사용된다.

[0036] 본 발명에서 사용가능한 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 *rrnB1/B2* 터미네이터 등이 있으며, 바람직하게는 옥토파인 신타아제(ocs) 터미네이터가 사용된다.

[0037] 특히, 본 발명에서 바람직한 RNA 간섭 재조합벡터는 2개의 T-DNA 보더 사이에 제초제 저항성을 가지는 BAR 유전자, CaMV35S 프로모터, 옥토파인 신타아제 터미네이터 및 CHSA 인트론을 포함하고, *det2*, *dwf4* 및 *smt2* 유전자의 RNA 간섭을 위한 센스 염기서열과, *det2*, *dwf4* 및 *smt2* 유전자의 RNA 간섭을 위한 안티센스 염기서열이 CHSA를 사이에 두고 서로 역방향이 되도록 배치되고, 프로모터와 작동가능하게 연결된 식물 발현 재조합벡터이다. 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 벡터는 도 1A에 기재된 pFGC5941-*DET2:DWF4:SMT2* 벡터이다.

[0038] 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터 내 포함되는 *det2* 유전자, *dwf4* 유전자 및 *smt2* 유전자의 RNA 간섭을 위한 센스 염기서열과, 이들의 안티센스 염기서열은 전사산물이 안정한 스템 루프 구조를 형성할 수 있는 한 임의의 순서로 정렬될 수 있으며, 바람직하게는 N-말단쪽으로부터 *det2:dwf4:smt2* 순서로 배치된다.

[0039] 본 명세서에서 유전자와 프로모터가 작동가능하게 연결되었다고 함은 핵산 서열들이 이들의 의도된 기능을 수행하도록 연결된 상태를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터 서열을 목적하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결시킨다는 것은 프로모터 서열이 목적하는 뉴클레오티드 서열의 전사를 지시할 수 있게 하는 방식으로 프로모터 서열과 목적하는 뉴클레오티드 서열을 연결하는 것을 의미한다.

[0040] 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을

이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 숙주 세포에 대한 적당한 배양 배지 및 조건은 당업계에 공지되어 있다. 본 발명에서는 식물체 형질전환에 사용하기 위하여 아그로박테리움 속 균주를 사용하는 것이 바람직하다.

[0041] 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터에 의한 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다.

[0042] 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코딩된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 바람직하게는 아그로박테리움 매개 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[0043] 아그로박테리움 벡터에 의한 식물체의 형질전환을 위한 최적 절차는 형질전환될 식물체의 종류에 따라 다양하다. 아그로박테리움 매개 형질전환을 위한 대표적인 방법은 멸균된 묘목 및/또는 작은 식물체로부터 유래된, 배축, 정단(shoot tip), 줄기 또는 잎 조직의 외식편의 형질전환을 포함한다. 그와 같은 형질전환된 식물체는 유성생식으로 또는 세포 또는 조직 배양에 의해 번식될 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환은 이전에 다수의 상이한 종류의 식물체를 위해 기재되었으며 그와 같은 형질전환을 위한 방법은 당업계에 공지된 문헌에서 찾을 수 있다.

[0044] 본 발명에서 사용가능한 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 이용되는 어떠한 균주라도 사용이 가능하다. 구체적으로 본 발명에서는, 식물시료에 침투하여 외래 유전자를 전달하는데 필요한 병원성이 큰 것으로 알려진 아그로박테리움 투메파시엔스, 더욱 바람직하게는, 하이그로마이신(hygromycin) 저항성 유전자 pCambia 1300 플라스미드가 들어 있는 GV3101 계통의 아그로박테리움 투메파시엔스를 사용할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 형질전환되는 식물체는 본 실시예에서 사용된 애기장대 뿐만 아니라 리아트리스, 에키네시아, 가우라, 플록스 등 경제적으로 사용될 수 있는 식물에 대하여 사용할 수 있다. 본 발명의 RNA 간섭 재조합 벡터로 형질전환된 식물체는 증가된 캄페스테롤 함량 및 난쟁이 표현형을 나타낸다.

[0046] 또한, 본 발명은 상기 RNA 재조합 벡터로 형질전환하는 것을 포함하는, 식물체 내 캄페스테롤의 함량을 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 RNA 재조합 벡터로 형질전환된 식물체로부터 추출하는 것을 특징으로 하는 캄페스테롤의 제조방법에 관한 것이다.

[0048] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체로부터 추출된 식물추출물에 관한 것이다.

[0049] 본 발명의 형질전환 식물체로부터 캄페스테롤의 추출은 식물스테롤의 추출에 관한 당업계에 알려진 통상의 방법에 의하여 행하여질 수 있다.

[0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0051] 실시예 1. RNA 간섭 재조합 벡터 제작

[0052] (1) *DET2*, *DWF4*, *SMT2* 전장 cDNA 클로닝

[0053] RT-PCR을 이용하여 애기장대 *DET2* (GenBank accession no. U53860), *DWF4* (GenBank accession no. NM_114926) 및 *SMT2* (GenBank accession no. NM_101884)의 전장 cDNA를 애기장대 잎(leaves)으로부터 획득하여, pGEM-T (Promega, USA) 내 클로닝하여 pGEM-T-*DET2*, pGEM-T-*DWF4* 및 pGEM-T-*SMT2*를 제조하였다.

[0054] 구체적으로, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA)를 이용하여 애기장대 잎으로부터 total RNA를 획득한 후 ImProm-IITM Reverse Transcription System(Promega)을 이용하여 cDNA를 확보하였다. 전체 RNA 1 μ g과 올리고-dt

primer를 70℃에서 5분간 반응시킨후 ImProm-II™ 5X 반응 버퍼, 2.5mM MgCl₂, 0.5mM dNTPs Mix와 ImProm-II™ 역전사효소(reverse transcriptase)를 25℃에서 5분간 반응시킨후 42℃에서 1시간 동안 반응시킨후 70℃에서 15분간 반응시킨후 cDNA를 획득하였다. 획득한 cDNA를 템플리트로 PCR을 수행하였다. PCR에서, 증폭 프로그램은 초기 94℃ 5분, 이어서 94℃ 1분; 55℃ 1분; 72℃ 1분의 30 사이클, 및 최종 연장 72℃ 10분으로 구성되었다. PCR에 사용된 센스 및 안티센스 프라이머 서열은 각각 다음과 같다.

- [0055] det2 센스 및 안티센스 프라이머
- [0056] 5'-ATGGAAGAAATCGCCGATAAAAC-3' (서열번호 10)
- [0057] 5'-TCAGTACACAAAAGGAATAACAG-3' (서열번호 11)
- [0058] dwf4 센스 및 안티센스 프라이머
- [0059] 5'-ATGTTTCGAAACAGAGCATC-3' (서열번호 12)
- [0060] 5'-TTACAGAATACGAGAAACCC-3' (서열번호 13)
- [0061] smt2 센스 및 안티센스 프라이머
- [0062] 5'-ATGGACTCTTTAACACTCTTC-3' (서열번호 14)
- [0063] 5'-TCAAGAACTCTCCTCCGGTG-3' (서열번호 15)
- [0064] 상기 증폭된 각각의 유전자들을 pGEM-T 벡터(Promega)에 결찰(ligation)시켰다. 증폭된 각각의 유전자 3μl, pGEM-T 벡터 1μl 와 T4 DNA 라이게이즈 1μl를 25℃에서 2시간동안 반응시켰다.
- [0065] **(2) pFGC5941-DET2:DWF4:SMT2 재조합 벡터 제작**
- [0066] 상기 제작된 AtDET2, AtDWF4, 및 AtSMT2의 cDNA를 사용하여 pFGC5941-DET2:DWF4:SMT2 를 제조하였다 (도1B).
- [0067] pFGC5941-DET2:DWF4:SMT2 벡터를 제조하기 위하여, det2 455 bp 절편을 pGEM-T-DET2로부터 PCR 증폭하였다. 센스 및 안티센스 프라이머 서열은 각각 다음과 같다.
- [0068] 5'-AAGCTTTCATTTACCCTCTTCG-3' (서열번호 16)
- [0069] 5'-GTCGACGAACCTGGCAATGTAC-3' (서열번호 17)
- [0070] 상기 증폭된 det2 절편을 HindIII 및 Sal I 으로 절단하고, 절단된 절편을 pUC18 내에 결찰(ligation)시켜 pUC18-DET2를 생성하였다. 이어서, dwf4 361 bp 절편을 다음의 프라이머 서열을 이용하여 증폭하였다.
- [0071] 5'-GTCGACGCCGACATGAGACTTC-3' (서열번호 18)
- [0072] 5'-GGTACCGCCATCTCCAAGGATTAA-3' (서열번호 19)
- [0073] 상기 증폭된 dwf4 절편을 Sal I 및 Kpn I으로 절단하고, 절단된 절편을 pUC18-DET2에 결찰시켜, pUC18-DET2:DWF4를 제조하였다.
- [0074] SMT2 289 bp 절편을 다음의 프라이머 서열을 사용하여 증폭하였다.
- [0075] 5'-GGTACCCTAGACGTCGGATGCGGT-3' (서열번호 20)
- [0076] 5'-GAATTCCATAGATCCGGGTTTCAA-3' (서열번호 21)
- [0077] 상기 증폭된 smt2 절편을 KpnI 및 EcoRI으로 절단하고, 절단된 절편을 pUC18-DET2:DWF4에 결찰시켜 pUC18-DET2:DWF4:SMT2를 제조하였다.
- [0078] 다음의 프라이머 서열을 이용하여 DET2:DWF4:SMT2 의 PCR 산물을 획득하였다.
- [0079] 5'-TCTAGAGCGCGCCTCATTTACCCTCTTCGC-3' (서열번호 22)
- [0080] 5'-GGATCCATTTAAATCATAGATCCGGGTTTCAA-3' (서열번호 23)
- [0081] 생성된 PCR 산물을 pFGC5941 벡터 (식물 내 이중가닥 RNA 제조를 위한 이원 벡터 (http://www.chromdb.org/rnai/vector_info.html)의 AscISwaI 및 BamHIXbaI 제한효소 부위를 이용하여 센스 및

안티센스 방향(orientation)으로 찰콘 신타제 인트론(chalcone synthase intron)의 상위 및 하위에 삽입하였다.

[0082] pFGC5941-*DET2:DWF4:SMT2* 벡터내 삽입의 방향성 및 관독 프레임의 적합성을 DNA 시퀀싱으로 확인하였다.

[0083] 실시예 2. 형질전환 균주의 제작

[0084] 식물 형질전환에 사용될 재조합 아그로박테리움 투메파시엔스의 제조를 위해 전기천공법(electroporation)을 사용하여 pFGC5941-*DET2:DWF4:SMT2* 벡터를 포함하는 아그로박테리움 투메파시엔스 GV3101 세포를 제조하였다.

[0085] 구체적으로, 아그로박테리움 컴피턴트 세포(GV3101) 200 μ l에 위에서 제작된 pFGC5941-*DET2:DWF4:SMT2* 재조합 벡터 DNA 1 μ l (50ng/ μ l 이상)를 넣고 ice에 30분간 방치한 후 알코올로 소독된 큐벳에 넣고 미세-전기천공 챔버(Micro-Electroporation Chamber)를 이용하여 2.4kV의 전류를 가한 후 ice로 옮겨주었다.

[0086] 이렇게 전류를 준 아그로박테리움 용액에 LB배지 800 μ l를 넣고 피펫을 이용하여 15ml 튜브로 옮겨서 25 $^{\circ}$ C에서 4시간 동안 키운 뒤 50mg/L의 겐타마이신과 50mg/L의 카나마이신 항생제가 들어간 LB 고체 배지에 도말하여 25 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양하였다.

[0087] 배양된 아그로박테리움 단일 콜로니를 액체 배양하여, 플라스미드 DNA를 추출하여 PCR 방법으로 확인하였다. PCR 조건은 전변성 94 $^{\circ}$ C에서 5분, 변성 94 $^{\circ}$ C 30초, 어닐링 55 $^{\circ}$ C 30초, 신장 72 $^{\circ}$ C 30초, 확장 72 $^{\circ}$ C에서 7분, 그리고 총 30 사이클을 수행하였다. 선별된 아그로박테리움 클론에 서열번호 3의 염기서열을 갖는 DNA가 삽입된 것을 확인하고 식물 형질전환에 사용하였다.

[0088] 실시예 3. 형질전환 식물의 제작

[0089] (1) 아그로박테리움에 의한 감염

[0090] 상기 제조된 형질전환 아그로박테리움을 스피ندا운 후, 10% 수크로스 용액 내 OD₆₀₀ = 0.8 까지 재현탁시키고, 0.05% 농도의 Silwet L-77 (Cat. No. VIS-02, Lehle Seed, USA)에 첨가하고, 충분히 혼합하였다. 파종후 로제트(Rosette) 생성 후 꽃대가 올라온 애기장대에 상기 용액을 격일로 매 3번 애기장대에 분무하였다. 상기 애기장대는 흙에서 발아시켰고, 광주기 16h, 22 $^{\circ}$ C 성장 챔버에서 성장시켰다.

[0091] (2) 형질전환 식물의 선별

[0092] 형질전환 식물 및 비-형질전환 식물로 추정되는 파종 후 본엽이 나온 묘목에 0.4% BASTA (Bayer, 독일)를 1주일 동안 격일로 분무하고, 생존한 묘목을 화분에 옮겼다. 형질전환체 종자를 획득하였다. 발아 후, 형질전환된 식물체를 위와 동일한 방법으로 0.4% BASTA를 사용하여 재선별하였다. 배양조건은 광주기 16h, 22 $^{\circ}$ C이었다.

[0093] 이로써 본 발명자들의 너다운(knock-down) 돌연변이체는 생식에서 현저한 감소를 나타내는 완전 기능-상실 돌연변이체(loss-of-function mutant) 또는 너아웃 돌연변이체와는 달리 우수한 종자 생산성을 나타낼 수 있음을 확인하였으며, 따라서 상업적 이점을 가짐을 알 수 있다. 이러한 종자 생산성은 유전자 발현이 RNAi 식물체 내에서는 잔존하기 때문인 것으로 보인다.

[0094] 실험예 1. 야생형 식물체와 *DET2:DWF4:SMT2* RNA 간섭 형질전환 식물체의 표현형 비교

[0095] (1) T3 세대 형질전환 식물체의 표현형 비교

[0096] 선택 항생 마커를 이용하여 분리 분석에 의하여 T3 세대에서 RNAi 너다운(knock-down) 식물주를 선별하였다. 파종후 본엽이 나왔을 때 0.4% BASTA로 1주일 동안 격일로 분무하였고 배양조건은 광주기 16h의 22 $^{\circ}$ C로 4주 동안 키워 표현형을 관찰하였다. 야생형 식물과 형질전환 식물체 간에는 형태적 차이가 관찰되었다. (도2A) 형질전환 식물체는 명백한 표현형의 변화를 나타내었다. 강한 억제 및 약한 억제에 해당하는 형질전환 식물체는 난쟁이 및 준-난쟁이 표현형을 각각 나타냈다.

[0097] (2) T4 세대 형질전환 식물체의 표현형 비교

[0098] 상기 T3세대에서 나타난 특성이 다음 세대에 유전되는지 조사하기 위하여, 도 2A에 보여진 바와 같은 4번, 5번 난쟁이주로부터 BASTA-저항성 T4 식물체를 수확하였다. 위와 동일하게 파종후 본엽이 나왔을 때 0.4% BASTA로 1주일 동안 격일로 분무하였고 배양조건은 광주기 16h의 22 $^{\circ}$ C로 4주 동안 키워 표현형을 관찰하였다. 상기 형질전환 식물체는 명백한 변형된 표현형을 나타내었다(도3a). 한편, 상기 형질전환 식물체의 형태계측 분석 결과는 하기 표1과 같았다.

[0099] [표1] 야생형 및 T4 형질전환 식물체의 형태계측 분석

기관 크기 ^a (n=20)	야생형 ^b	RNAi-det2dwf4smt2 ^b
개화 높이	360.85±7.67	78.55±3.52
옆면 길이	57±1.33	33.7±2.17
옆면 폭	19.5±0.46	15.05±0.60
로제트 직경	106.5±2.52	63.95±4.09
잎자루 길이	15.55±0.59	8.1±0.76
꽃자루 길이	3.8±0.23	4.8±0.21
장각과 길이	14.85±0.29	nd

nd: not determined

a: mm 길이

[0100] b: 상기 결과는 20 식물체로부터 얻은 측정치의 평균±SD 임

[0101] 위 표1에 나타난 바와 같이 형질 전환 식물체는 짧은 개화 높이, 더짧은 옆면, 더짧은 잎자루를 가졌다.

[0102] 실험예 2. RNA 분리 및 발현 패턴 확인

[0103] (1) T3 세대 형질전환 식물체의 RNA 분리 및 반-정량적 RT-PCR 분석

[0104] 반-정량적 RT PCR 분석을 통해 각 형질전환체 주로부터 분리된 RNA를 이용하여 DET2, DWF4, SMT2 및 CYP85A1 유전자의 전사 수준을 확인하였다.

[0105] 구체적으로, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen,USA)를 이용하여, 위 실험예 1.(1)에서 얻은 T3 세대 애기장대 잎 으로부터 전체 RNA를 분리하였다.

[0106] 분리한 RNA를 DNaseI (Takara, 일본)-처리 전체 RNA를 ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega,USA)과 제조사 지시에 따른 올리고-dT 프라이머를 사용하여 역전사하였다. 이어서, 제1 가닥 cDNA를 DET2, DWF4, SMT2 및 CYP85A1 유전자-특이적 프라이머와 내부 표준 18S rRNA 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였다.

[0107] 하기 프라이머 세트로 DET2 유전자를 증폭하여 780 bp 단편을 제조하였다.

[0108] 5'-ATGGAAGAAATCGCCGATAAAACC-3' (서열번호 24)

[0109] 5'-ACACAAAAGGAATAACAGCTTTAC-3' (서열번호 25)

[0110] 하기 프라이머 세트로 DWF4 유전자를 증폭하여 1,540 bp 단편을 제조하였다.

[0111] 5'-ATGTTGAAACAGAGCATCATAC-3' (서열번호 26)

[0112] 5'-GAATACGAGAAACCCTAATAGGC-3' (서열번호 27)

[0113] 하기 프라이머 세트로 SMT2 유전자를 증폭하여 1,080 bp 단편을 제조하였다.

[0114] 5'-ATGGACTCTTTAACACTCTTC-3' (서열번호 28)

[0115] 5'-AGAACTCTCCTCCGGTGACTC-3' (서열번호 29)

[0116] 하기 프라이머 세트로 CYP85A1 유전자를 증폭하여 1,150 bp 단편을 제조하였다.

[0117] 5'-GCTCGCTTCTGTCTCTCA-3' (서열번호 30)

[0118] 5'-TCATCCCCTCCTATTTC-3' (서열번호 31)

[0119] 내부 표준 18S rRNA 프라이머는 하기의 세트를 사용하였다.

[0120] 5'-GGATGGGTCGGCCGGTC-3' (서열번호 32)

[0121] 5'-CAGGCTGAGGTCTCGTTC-3' (서열번호 33)

[0122] PCR에서, 증폭 프로그램은 초기 94℃ 5분, 이어서 94℃ 1분; 55℃ 1분; 72℃ 1분의 28-35 사이클, 및 최종 연장

72 °C 10분으로 구성되었다. 상기 실험을 세 번 이상 반복하여 유사한 결과를 얻었다.

[0123] RT-PCR 분석 결과를 도2B에 나타내었다. 도2B에 나타난 바와 같이, 형질전환 식물체 내 DET2, DWF4, SMT2 유전자의 mRNA 수준은 야생형의 수준에 비하여 감소되었음을 확인하였다. 유전자 발현의 억제는 강한 억제와 약한 억제 군으로 분류되었다. 이는 투여량-종속적 난쟁이증을 나타낸다.

[0124] 한편, DET2, DWF4, SMT2의 전사수준과 달리, CYP85A1은 형질전환 식물체 내에서 상향-조절되었다. 이는 브라시노스테로이드 생합성 유전자의 피드백 조절 기전과 일치하는 것으로, 감소된 브라시노스테로이드 생합성 또는 잘못된 응답은 CYP85A1을 포함한 생합성 유전자의 발현을 탈-억제한다. 따라서, 본 발명의 형질전환 식물체 내에 CYP85A1의 증가된 전사 수준은 전체 생합성 활성 및 이어지는 시그널 반응이 형질전환에 의한 RNA 간섭 효과 때문에 하향 조절되었음을 시사한다.

[0125] (2) T4 세대 형질전환 식물체의 RNA분리 및 실시간 정량 RT-PCR 분석

[0126] 위 실시예 1.(1)과 동일한 방법으로 위 실험예 1.(2)에서 얻은 T4 세대 애기장대 잎으로부터 cDNA를 획득하였다. DNase I (Takara, 일본)-처리 전체 RNA의 역전사를 올리고-dT 프라이머 및 First-Strand cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostics GmbH, 독일)을 이용하여 수행하였다. 정량적 실시간 PCR을 위하여, 유전자-특이적 PCR 프라이머 및 Taq-Man 검정용 형광생성 프로브를 Assays-by-Design Service (Applied Biosystems, USA)에 의해 디자인하였다. 제조사의 지시에 따라 TaqMan Universal PCR Master Mix and 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)을 이용하여 유전자 발현을 분석하였다. 증폭 조건은 50°C 2분의 초기 사이클, 95°C 10분 한 사이클, 이어서 95°C 15초, 60°C 1분의 40 사이클이었다.

[0127] 형질전환 식물체의 분석에서, 정량적 실시간 PCR을 위하여 사용된 유전자-특이적 프라이머 및 프로브는 다음과 같다:

[0128] [DET2-용]

[0129] 정방향: 5'-TTTGGAGAGGCGATTGAGTG-3' (서열번호 34)

[0130] 역방향: 5'-CTCTTCCTTGAACCTGGCAATG-3' (서열번호 35)

[0131] DET2-프로브

[0132] FAM-TGGGCTGTTATGACTTGGTCTTGGG-NFQ;

[0133] [DWF4-용]

[0134] 정방향: 5'-CAGAGGATGAAGCAGAGATGAG-3' (서열번호 36)

[0135] 역방향: 5'-TGAGATCGAGAATTTGCTCCG-3' (서열번호 37)

[0136] DWF4-프로브

[0137] FAM-ACAGACGATGATCTTTTGGGATGGGT-NFQ;

[0138] [SMT2-용]

[0139] 정방향: 5'-CCAAAAGAAATCGAAACCGCC-3' (서열번호 38)

[0140] 역방향: 5'-GCGTCTTTGTGAGATTTCCG-3' (서열번호 39)

[0141] SMT2-프로브

[0142] FAM-TGTCCCATCCCCACTCGTATATGT-NFQ;

[0143] [CYP85A1-용]

[0144] 정방향: 5'-ACAGAGCAGAAAACAGAGTGAG-3' (서열번호 40)

[0145] 역방향: 5'-GAAGGAGAGCGGAACAGAG-3' (서열번호 41)

[0146] CYP85A1-프로브

[0147] FAM-TGGGAGCAATGATGGTGATGATGGG-NFQ;

[0148] [18S rRNA-용]

[0149] 기-디자인된 프라이머 및 프로브

[0150] (Taqman assay-on-demand gene expression products, Applied Biosystems).

[0151] 18S rRNA의 증폭은 실시간 PCR 결과의 표준화를 위하여 사용하였다.

[0152] RT-PCR 분석 결과인 각 유전자의 상대적 발현수준을 도3B에 나타내었다. 도3B에 나타난 바와 같이, 형질전환 식물체 내 DET2, DWF4, SMT2 유전자의 mRNA 수준은 야생형의 수준에 비하여 감소되었음을 확인하였다. 즉, 형질전환 식물체로부터 DET2, DWF4, SMT2 유전자의 mRNA 수준이 약 20, 56, 52%까지 하향-조절되었음이 확인되었다. 한편, CYP85A1 유전자의 발현은 최대 27%까지 상향-조절되었음이 확인되었다.

[0153] **실험예 3. 스테롤 및 브라시노스테로이드 프로파일 분석**

[0154] 위 실험예 1.(2)에서 얻은 T4 세대 애기장대의 줄기, 꽃, 잎, 장각과의 대기 중 부분 20g을 수확하여, 스테롤 및 브라시노스테로이드의 정제 및 정량을 수행하였다. 상기 정제 및 정량은 [Fujioka et al., Plant Physiology 2002 Oct;130(2):930-9, An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway]에 기재된 방법에 따라 수행하였다. 분석결과를 하기 표2에 나타내었다.

[0155] [표2] 야생형 및 T4 형질전환 식물체의 내생적 스테롤 및 브라시노스테로이드 수준

화합물	내생적 수준 (ng/g FW)	
	야생형	RNAi-det2dwf4smt2
스테롤		
시토스테롤	218,000	75,900
스티그마스테롤	2,300	710
24-메틸렌콜레스테롤	2,720	13,600
캄페스테롤	44,200	186,000
(24R)-24-메틸-콜레스테-4-엔-3-온	149	518
(24R)-24-메틸-콜레스탄-3-온	6.8	21.9
캄페스타놀	375	1,570
6-옥소캄페스타놀	44.2	128
브라시노스테로이드		
6-디옥소카타스테론	0.81	0.15
6-디옥소테아스테론	0.02	0.01
3-디히드로-6-디옥소테아스테론	0.34	0.05
6-디옥소티파스테롤	1.15	0.5
6-디옥소카스타스테론	2.79	0.54
카타스테론	nd	nd
테아스테론	nd	nd
3-디히드로테아스테론	nd	nd
티파스테롤	0.24	0.09
카스타스테론	0.39	0.21
브라시놀리드	nd	nd

[0156] nd: not detectable

[0157] 위 표2에 나타난 바와 같이, 삼중 녀다운 형질전환 식물체의 캄페스테롤 함량은 186 μ g/g FW 이었다. 이러한 함량은 야생형 내 수준 (44.2 μ g/g FW)보다 4.2 배 높은 것이다. 캄페스테롤을 포함한 피토스테롤은 인간 건강에 매우 중요하며, 특히 캄페스테롤은 콜레스테롤-저하 효과 및 항암 효과를 나타내는 것으로 널리 알려져 있다.

[0158] 한편, 시토스테롤 및 스티그마스테롤 함량은 각각 야생형 수준의 35, 31%까지 감소하였다. 형질전환 식물체에서, 6-디옥소카타스테론 (6-deoxocathasterone: DeoxoCT), 6-디옥소테아스테론 (6-deoxoteasterone: 6-DeoxoTE), 3-디히드로-6-디옥소테아스테론 (3-dehydro-6-deoxoteasterone: 6-Deoxo3DT), 6-디옥소티파스테롤 (6-deoxotyphasterol: 6-DeoxoTY), 6-디옥소카스타스테론(6-deoxocastasterone: 6-DeoxoCS), 티파스테롤 (typhasterol: TY), 및 카스타스테론 (castasterone: CS)의 수준은 각각 야생형 식물 내 수준의 19, 50, 15, 43, 19, 38 및 54%까지 감소하였다. 카타스테론(cathasterone: CT), 테아스테론(teasterone: TE), 3-디히드로테아스테론 (3-dehydroteasterone: 3-DT) 및 브라시놀리드(brassinolide: BL)는 야생형 또는 형질전환 식물

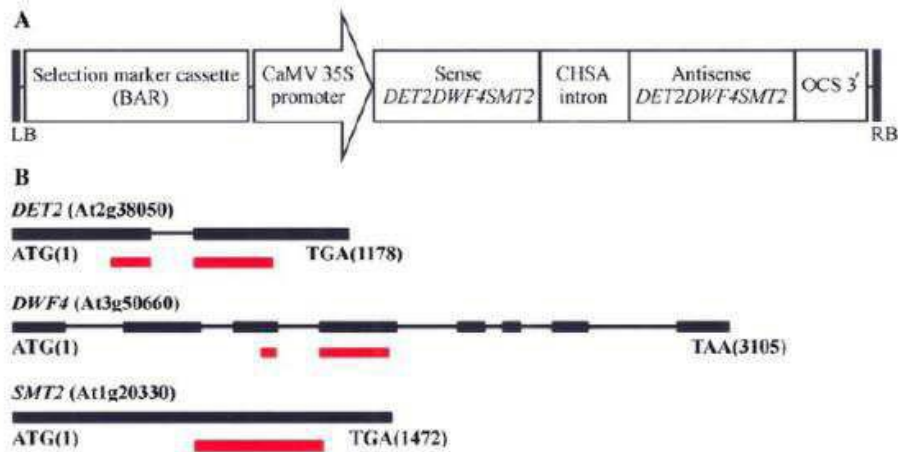
체에서 검출되지 않았다.

[0159]

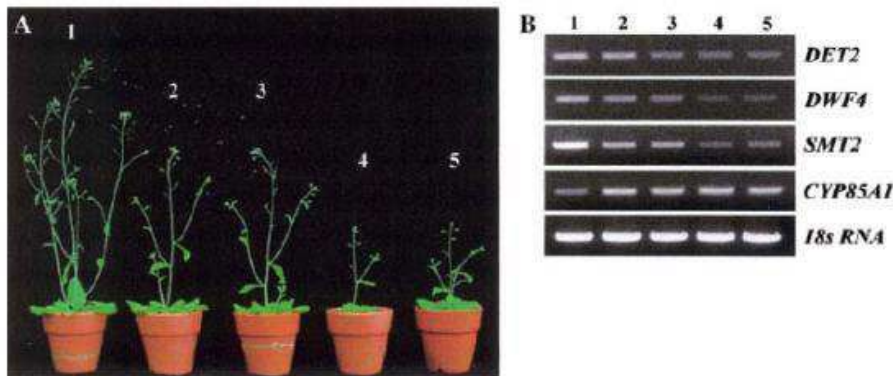
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

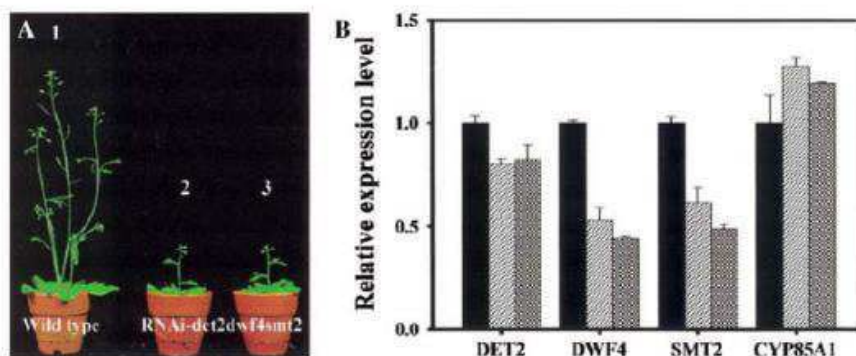
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> Transformed plants having increased campesterol contents
 <130> P10-019-KHU
 <160> 41
 <170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 789
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana
 <220><221> CDS
 <222> (1)..(786)
 <223> DET2 (Genbank accession no. U53860)
 <400> 1

atg gaa gaa atc gcc gat aaa acc ttc ttc cga tac tgt ctc ctc act 48
 Met Glu Glu Ile Ala Asp Lys Thr Phe Phe Arg Tyr Cys Leu Leu Thr

1 5 10 15
 ctt att ttc gcc ggc cca cca acc gcc gtc ctt ctg aaa ttc ctc caa 96
 Leu Ile Phe Ala Gly Pro Pro Thr Ala Val Leu Leu Lys Phe Leu Gln

20 25 30
 gct cct tac ggt aaa cac aac cgt acc gga tgg ggt ccc acc gta tct 144
 Ala Pro Tyr Gly Lys His Asn Arg Thr Gly Trp Gly Pro Thr Val Ser

35 40 45
 cca ccg att gct tgg ttc gtc atg gag agc cca acc ttg tgg ctc act 192

Pro Pro Ile Ala Trp Phe Val Met Glu Ser Pro Thr Leu Trp Leu Thr
 50 55 60

ctc ctc ctc ttc ccc ttt ggt cgt cac gct ctc aac cct aaa tct cta 240
 Leu Leu Leu Phe Pro Phe Gly Arg His Ala Leu Asn Pro Lys Ser Leu

65 70 75 80
 ctt cta ttc tct cct tat ctc att cat tac ttc cac cgc acc atc att 288
 Leu Leu Phe Ser Pro Tyr Leu Ile His Tyr Phe His Arg Thr Ile Ile

85	90	95	
tac cct ctt cgc ctc ttc cgc agc tcc ttc ccc gcc ggt aaa aac gga			336
Tyr Pro Leu Arg Leu Phe Arg Ser Ser Phe Pro Ala Gly Lys Asn Gly			
100	105	110	
ttt ccg atc acc atc gcc gcc ttg gct ttc acc ttt aat ctc ctc aat			384
Phe Pro Ile Thr Ile Ala Ala Leu Ala Phe Thr Phe Asn Leu Leu Asn			
115	120	125	
ggt tat atc cag gcg agg tgg gtt tcg cat tac aag gat gac tac gaa			432
Gly Tyr Ile Gln Ala Arg Trp Val Ser His Tyr Lys Asp Asp Tyr Glu			
130	135	140	
gac gga aac tgg ttc tgg tgg cgg ttt gtt atc ggt atg gtg gtt ttc			480
Asp Gly Asn Trp Phe Trp Trp Arg Phe Val Ile Gly Met Val Val Phe			
145	150	155	160
ata acc ggc atg tat ata aat atc acg tcg gac cgc act ttg gta cga			528
Ile Thr Gly Met Tyr Ile Asn Ile Thr Ser Asp Arg Thr Leu Val Arg			
165	170	175	
ttg aag aaa gag aac cgg gga ggt tat gtg ata ccg aga gga ggc tgg			576
Leu Lys Lys Glu Asn Arg Gly Gly Tyr Val Ile Pro Arg Gly Gly Trp			
180	185	190	
ttc gag ttg gta agc cgt ccg aat tat ttt gga gag gcg att gag tgg			624
Phe Glu Leu Val Ser Arg Pro Asn Tyr Phe Gly Glu Ala Ile Glu Trp			
195	200	205	
ttg ggc tgg gct gtt atg act tgg tct tgg gcc ggt att gga ttt ttt			672
Leu Gly Trp Ala Val Met Thr Trp Ser Trp Ala Gly Ile Gly Phe Phe			
210	215	220	
ctg tac acg tgt tcc aat ttg ttt ccg cgt gca cgt gcg agt cac aag			720
Leu Tyr Thr Cys Ser Asn Leu Phe Pro Arg Ala Arg Ala Ser His Lys			
225	230	235	240
tgg tac att gcc aag ttc aag gaa gag tat ccc aag act cgt aaa gct			768
Trp Tyr Ile Ala Lys Phe Lys Glu Glu Tyr Pro Lys Thr Arg Lys Ala			

245	250	255	
gtt att cct ttt gtg tac tga			
Val Ile Pro Phe Val Tyr			
260			
<210> 2			
<211> 262			
<212> PRT			
<213> Arabidopsis thaliana			
<400> 2			
Met	Glu	Glu	Ile
Ala	Asp	Lys	Thr
Phe	Phe	Arg	Tyr
Cys	Leu	Leu	Thr
1	5	10	15
Leu	Ile	Phe	Ala
Gly	Pro	Pro	Thr
Ala	Val	Leu	Leu
Lys	Phe	Leu	Gln
20	25	30	
Ala Pro Tyr Gly Lys His Asn Arg Thr Gly Trp Gly Pro Thr Val Ser			
35	40	45	
Pro	Pro	Ile	Ala
Trp	Phe	Val	Met
Glu	Ser	Pro	Thr
Leu	Trp	Leu	Thr
50	55	60	
Leu	Leu	Leu	Phe
Pro	Phe	Gly	Arg
His	Ala	Leu	Asn
Pro	Lys	Ser	Leu
65	70	75	80
Leu	Leu	Phe	Ser
Pro	Tyr	Leu	Ile
His	Tyr	Phe	His
Arg	Thr	Ile	Ile
85	90	95	
Tyr	Pro	Leu	Arg
Leu	Phe	Arg	Ser
Ser	Phe	Pro	Ala
Gly	Lys	Asn	Gly
100	105	110	
Phe	Pro	Ile	Thr
Ile	Ala	Ala	Leu
Ala	Phe	Thr	Phe
Asn	Leu	Leu	Asn
115	120	125	
Gly	Tyr	Ile	Gln
Ala	Arg	Trp	Val
Ser	His	Tyr	Lys
Asp	Asp	Tyr	Glu
130	135	140	
Asp	Gly	Asn	Trp
Phe	Trp	Trp	Arg
Phe	Val	Ile	Gly
Met	Val	Val	Phe
145	150	155	160
Ile	Thr	Gly	Met
Tyr	Ile	Asn	Ile
Thr	Ser	Asp	Arg
Thr	Leu	Val	Arg
165	170	175	

Leu Lys Lys Glu Asn Arg Gly Gly Tyr Val Ile Pro Arg Gly Gly Trp
180 185 190
Phe Glu Leu Val Ser Arg Pro Asn Tyr Phe Gly Glu Ala Ile Glu Trp
195 200 205
Leu Gly Trp Ala Val Met Thr Trp Ser Trp Ala Gly Ile Gly Phe Phe
210 215 220
Leu Tyr Thr Cys Ser Asn Leu Phe Pro Arg Ala Arg Ala Ser His Lys
225 230 235 240
Trp Tyr Ile Ala Lys Phe Lys Glu Glu Tyr Pro Lys Thr Arg Lys Ala

245 250 255
Val Ile Pro Phe Val Tyr

260

<210> 3

<211> 455

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(455)

<223> DET2 fragment for RNAi

<400> 3

tcatttacc tcttcgcctc ttccgcagct ccttccccgc cggtaaaaac ggatttccga 60

tcaccatcgc cgccttgget ttcaccttta atctcctcaa tggttatatac caggcgaggt 120

gggtttcgca ttacaaggat gactacgaag acggaaactg gttctggtgg cggtttgtta 180

tcggtatggt ggttttcata accggcatgt atataaatat cacgtcggac cgcactttgg 240

tacgattgaa gaaagagaac cggggagggt atgtgatacc gagaggaggc tggttcgagt 300

tggtaagccg tccgaattat tttggagagg cgattgagtg gttgggctgg gctgttatga 360

cttggtcttg ggccggtatt ggattttttc tgtacacgtg ttccaatttg tttccgcgtg 420

cacgtgcgag tcacaagtgg tacattgccca agttc 455

<210> 4

<211> 1542

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220><221> CDS

<222> (1)..(1539)

<223> DWF4 (GenBank accession no. NM_114926)

<400> 4

atg ttc gaa aca gag cat cat act ctc tta cct ctt ctt ctt ctc cca 48

Met Phe Glu Thr Glu His His Thr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Pro

1 5 10 15

tcg ctt ttg tct ctt ctt ctc ttc ttg att ctc ttg aag aga aga aat 96

Ser Leu Leu Ser Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Leu Lys Arg Arg Asn

20 25 30

aga aaa acc aga ttc aat cta cct ccg ggt aaa tcc ggt tgg cca ttt 144

Arg Lys Thr Arg Phe Asn Leu Pro Pro Gly Lys Ser Gly Trp Pro Phe

35 40 45

ctt ggt gaa acc atc ggt tat ctt aaa ccg tac acc gcc aca aca ctc 192

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

50 55 60

ggt gac ttc atg caa caa cat gtc tcc aag tat ggt aag ata tat aga 240

Gly Asp Phe Met Gln Gln His Val Ser Lys Tyr Gly Lys Ile Tyr Arg

65 70 75 80

tcg aac ttg ttt gga gaa cca acg atc gta tca gct gat gct gga ctt 288

Ser Asn Leu Phe Gly Glu Pro Thr Ile Val Ser Ala Asp Ala Gly Leu

85 90 95

aat aga ttc ata tta caa aac gaa gga agg ctc ttt gaa tgt agt tat 336

Asn Arg Phe Ile Leu Gln Asn Glu Gly Arg Leu Phe Glu Cys Ser Tyr

100 105 110

cct aga agt ata ggt ggg att ctt ggg aaa tgg tcg atg ctt gtt ctt 384

Pro Arg Ser Ile Gly Gly Ile Leu Gly Lys Trp Ser Met Leu Val Leu

115 120 125

gtt ggt gac atg cat aga gat atg aga agt atc tcg ctt aac ttc tta 432

Val Gly Asp Met His Arg Asp Met Arg Ser Ile Ser Leu Asn Phe Leu

130 135 140

agt cac gca cgt ctt aga act att cta ctt aaa gat gtt gag aga cat 480

Ser His Ala Arg Leu Arg Thr Ile Leu Leu Lys Asp Val Glu Arg His
145 150 155 160

act ttg ttt gtt ctt gat tct tgg caa caa aac tct att ttc tct gct 528
Thr Leu Phe Val Leu Asp Ser Trp Gln Gln Asn Ser Ile Phe Ser Ala
165 170 175

caa gac gag gcc aaa aag ttt acg ttt aat cta atg gcg aag cat ata 576
Gln Asp Glu Ala Lys Lys Phe Thr Phe Asn Leu Met Ala Lys His Ile
180 185 190

atg agt atg gat cct gga gaa gaa gaa aca gag caa tta aag aaa gag 624

Met Ser Met Asp Pro Gly Glu Glu Glu Thr Glu Gln Leu Lys Lys Glu
195 200 205

tat gta acttttc atg aaa gga gtt gtc tct gct cct cta aat cta cca 672
Tyr Val Thr Phe Met Lys Gly Val Val Ser Ala Pro Leu Asn Leu Pro
210 215 220

gga act gct tat cat aaa gct ctt cag tca cga gca acg ata ttg aag 720
Gly Thr Ala Tyr His Lys Ala Leu Gln Ser Arg Ala Thr Ile Leu Lys
225 230 235 240

ttc att gag agg aaa atg gaa gag aga aaa ttg gat atc aag gaa gaa 768
Phe Ile Glu Arg Lys Met Glu Glu Arg Lys Leu Asp Ile Lys Glu Glu
245 250 255

gat caa gaa gaa gaa gaa gtg aaa aca gag gat gaa gca gag atg agt 816
Asp Gln Glu Glu Glu Glu Val Lys Thr Glu Asp Glu Ala Glu Met Ser
260 265 270

aag agt gat cat gtt agg aaa caa aga aca gac gat gat ctt ttg gga 864

Lys Ser Asp His Val Arg Lys Gln Arg Thr Asp Asp Asp Leu Leu Gly
275 280 285

tgg gtt ttg aaa cat tcg aat tta tcg acg gag caa att ctc gat ctc 912
Trp Val Leu Lys His Ser Asn Leu Ser Thr Glu Gln Ile Leu Asp Leu
290 295 300

att ctt agt ttg tta ttt gcc gga cat gag act tct tct gta gcc att 960
Ile Leu Ser Leu Leu Phe Ala Gly His Glu Thr Ser Ser Val Ala Ile

305	310	315	320	
gct ctc gct atc ttc ttc ttg caa gct tgc cct aaa gcc gtt gaa gag				1008
Ala Leu Ala Ile Phe Phe Leu Gln Ala Cys Pro Lys Ala Val Glu Glu				
	325	330	335	
ctt agg gaa gag cat ctt gag atc gcg agg gcc aag aag gaa cta gga				1056
Leu Arg Glu Glu His Leu Glu Ile Ala Arg Ala Lys Lys Glu Leu Gly				
	340	345	350	
gag tca gaa tta aat tgg gat gat tac aag aaa atg gac ttt act caa				1104
Glu Ser Glu Leu Asn Trp Asp Asp Tyr Lys Lys Met Asp Phe Thr Gln				
	355	360	365	
tgt gtt ata aat gaa act ctt cga ttg gga aat gta gtt agg ttt ttg				1152
Cys Val Ile Asn Glu Thr Leu Arg Leu Gly Asn Val Val Arg Phe Leu				
	370	375	380	
cat cgc aaa gca ctc aaa gat gtt cgg tac aaa gga tac gat atc cct				1200
His Arg Lys Ala Leu Lys Asp Val Arg Tyr Lys Gly Tyr Asp Ile Pro				
385	390	395	400	
agt ggg tgg aaa gtg tta ccg gtg atc tca gcc gta cat ttg gat aat				1248
Ser Gly Trp Lys Val Leu Pro Val Ile Ser Ala Val His Leu Asp Asn				
	405	410	415	
tct cgt tat gac caa cct aat ctc ttt aat cct tgg aga tgg caa cag				1296
Ser Arg Tyr Asp Gln Pro Asn Leu Phe Asn Pro Trp Arg Trp Gln Gln				
	420	425	430	
caa aac aac gga gcg tca tcc tca gga agt ggt agt ttt tcg acg tgg				1344
Gln Asn Asn Gly Ala Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Phe Ser Thr Trp				
	435	440	445	
gga aac aac tac atg ccg ttt gga gga ggg cca agg cta tgt gct ggt				1392
Gly Asn Asn Tyr Met Pro Phe Gly Gly Gly Pro Arg Leu Cys Ala Gly				
	450	455	460	
tca gag cta gcc aag tta gaa atg gca gtg ttt att cat cat cta gtt				1440
Ser Glu Leu Ala Lys Leu Glu Met Ala Val Phe Ile His His Leu Val				

465	470	475	480	
ctt aaa ttc aat tgg gaa tta gca gaa gat gat aaa cca ttt gct ttt				1488
Leu Lys Phe Asn Trp Glu Leu Ala Glu Asp Asp Lys Pro Phe Ala Phe				
	485	490	495	
cct ttt gtt gat ttt cct aac ggt ttg cct att agg gtt tct cgt att				1536
Pro Phe Val Asp Phe Pro Asn Gly Leu Pro Ile Arg Val Ser Arg Ile				
	500	505	510	
ctg t aa				1542

Leu

<210> 5

<211> 513

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 5

Met Phe Glu Thr Glu His His Thr Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Pro

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ser Leu Leu Leu Phe Leu Ile Leu Leu Lys Arg Arg Asn

20 25 30

Arg Lys Thr Arg Phe Asn Leu Pro Pro Gly Lys Ser Gly Trp Pro Phe

35 40 45

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

50 55 60

Gly Asp Phe Met Gln Gln His Val Ser Lys Tyr Gly Lys Ile Tyr Arg

65 70 75 80

Ser Asn Leu Phe Gly Glu Pro Thr Ile Val Ser Ala Asp Ala Gly Leu

85 90 95

Asn Arg Phe Ile Leu Gln Asn Glu Gly Arg Leu Phe Glu Cys Ser Tyr

100 105 110

Pro Arg Ser Ile Gly Gly Ile Leu Gly Lys Trp Ser Met Leu Val Leu

115 120 125

Val Gly Asp Met His Arg Asp Met Arg Ser Ile Ser Leu Asn Phe Leu

130 135 140
 Ser His Ala Arg Leu Arg Thr Ile Leu Leu Lys Asp Val Glu Arg His
 145 150 155 160
 Thr Leu Phe Val Leu Asp Ser Trp Gln Gln Asn Ser Ile Phe Ser Ala
 165 170 175
 Gln Asp Glu Ala Lys Lys Phe Thr Phe Asn Leu Met Ala Lys His Ile
 180 185 190

 Met Ser Met Asp Pro Gly Glu Glu Glu Thr Glu Gln Leu Lys Lys Glu
 195 200 205
 Tyr Val Thr Phe Met Lys Gly Val Val Ser Ala Pro Leu Asn Leu Pro
 210 215 220
 Gly Thr Ala Tyr His Lys Ala Leu Gln Ser Arg Ala Thr Ile Leu Lys
 225 230 235 240
 Phe Ile Glu Arg Lys Met Glu Glu Arg Lys Leu Asp Ile Lys Glu Glu
 245 250 255
 Asp Gln Glu Glu Glu Glu Val Lys Thr Glu Asp Glu Ala Glu Met Ser

 260 265 270
 Lys Ser Asp His Val Arg Lys Gln Arg Thr Asp Asp Asp Leu Leu Gly
 275 280 285
 Trp Val Leu Lys His Ser Asn Leu Ser Thr Glu Gln Ile Leu Asp Leu
 290 295 300
 Ile Leu Ser Leu Leu Phe Ala Gly His Glu Thr Ser Ser Val Ala Ile
 305 310 315 320
 Ala Leu Ala Ile Phe Phe Leu Gln Ala Cys Pro Lys Ala Val Glu Glu
 325 330 335

 Leu Arg Glu Glu His Leu Glu Ile Ala Arg Ala Lys Lys Glu Leu Gly
 340 345 350
 Glu Ser Glu Leu Asn Trp Asp Asp Tyr Lys Lys Met Asp Phe Thr Gln
 355 360 365
 Cys Val Ile Asn Glu Thr Leu Arg Leu Gly Asn Val Val Arg Phe Leu
 370 375 380
 His Arg Lys Ala Leu Lys Asp Val Arg Tyr Lys Gly Tyr Asp Ile Pro

385 390 395 400
Ser Gly Trp Lys Val Leu Pro Val Ile Ser Ala Val His Leu Asp Asn

 405 410 415
Ser Arg Tyr Asp Gln Pro Asn Leu Phe Asn Pro Trp Arg Trp Gln Gln

 420 425 430
Gln Asn Asn Gly Ala Ser Ser Ser Gly Ser Gly Ser Phe Ser Thr Trp

 435 440 445
Gly Asn Asn Tyr Met Pro Phe Gly Gly Gly Pro Arg Leu Cys Ala Gly

 450 455 460
Ser Glu Leu Ala Lys Leu Glu Met Ala Val Phe Ile His His Leu Val

465 470 475 480

Leu Lys Phe Asn Trp Glu Leu Ala Glu Asp Asp Lys Pro Phe Ala Phe

 485 490 495
Pro Phe Val Asp Phe Pro Asn Gly Leu Pro Ile Arg Val Ser Arg Ile

 500 505 510

Leu

<210> 6

<211> 361

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(361)

<223> DWF4 fragment for RNAi

<400> 6

gccggacatg agacttcttc tgtagccatt gctctcgcta tcttcttctt gcaagcttgc 60

cctaaagccg ttgaagagct tagggaagag catcttgaga tcgagagggc caagaaggaa 120

ctaggagagt cagaattaaa ttgggatgat tacaagaaaa tggactttac tcaatgtgtt 180

ataaatgaaa ctcttcgatt gggaaatgta gttaggtttt tgcatcgcaa agcactcaaa 240

gatgttcggt acaaaggata cgatatccct agtgggtgga aagtgttacc ggtgatctca 300

gccgtacatt tggataattc tcgttatgac caacctaatc tctttaatcc ttggagatgg 360

c 361

<210> 7

<211> 1086

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220><221> CDS

<222> (1)..(1083)

<223> SMT2 (GenBank accession no. NM_101884)

<400> 7

atg gac tct tta aca ctc ttc ttc acc ggt gca ctc gtc gcc gtc ggt 48

Met Asp Ser Leu Thr Leu Phe Phe Thr Gly Ala Leu Val Ala Val Gly

1 5 10 15

atc tac tgg ttc ctc tgc gtt ctc ggt cca gca gag cgt aaa ggc aaa 96

Ile Tyr Trp Phe Leu Cys Val Leu Gly Pro Ala Glu Arg Lys Gly Lys

20 25 30

cga gcc gta gat ctc tct ggt ggc tca atc tcc gcc gag aaa gtc caa 144

Arg Ala Val Asp Leu Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ala Glu Lys Val Gln

35 40 45

gac aac tac aaa cag tac tgg tct ttc ttc cgc cgt cca aaa gaa atc 192

Asp Asn Tyr Lys Gln Tyr Trp Ser Phe Phe Arg Arg Pro Lys Glu Ile

50 55 60

gaa acc gcc gag aaa gtt cca gac ttc gtc gac aca ttc tac aat ctc 240

Glu Thr Ala Glu Lys Val Pro Asp Phe Val Asp Thr Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

gtc acc gac ata tac gag tgg gga tgg gga caa tcc ttc cac ttc tca 288

Val Thr Asp Ile Tyr Glu Trp Gly Trp Gly Gln Ser Phe His Phe Ser

85 90 95

cca tca atc ccc gga aaa tct cac aaa gac gcc acg cgc ctc cac gaa 336

Pro Ser Ile Pro Gly Lys Ser His Lys Asp Ala Thr Arg Leu His Glu

100 105 110

gag atg gcc gta gat ctg atc caa gtc aaa cct ggt caa aag atc cta 384

Glu Met Ala Val Asp Leu Ile Gln Val Lys Pro Gly Gln Lys Ile Leu

115	120	125	
gac gtc gga tgc ggt gtc ggc ggt ccg atg cga gcg att gca tct cac			432
Asp Val Gly Cys Gly Val Gly Gly Pro Met Arg Ala Ile Ala Ser His			
130	135	140	
tcg cga gct aac gta gtc ggg att aca ata aac gag tat cag gtg aac			480
Ser Arg Ala Asn Val Val Gly Ile Thr Ile Asn Glu Tyr Gln Val Asn			
145	150	155	160
aga gct cgt ctc cac aat aag aaa gct ggt ctc gac gcg ctt tgc gag			528
Arg Ala Arg Leu His Asn Lys Lys Ala Gly Leu Asp Ala Leu Cys Glu			
165	170	175	
gtc gtg tgt ggt aac ttc ctc cag atg ccg ttc gat gac aac agt ttc			576
Val Val Cys Gly Asn Phe Leu Gln Met Pro Phe Asp Asp Asn Ser Phe			
180	185	190	
gac ggt gct tat tcc atc gaa gcc acg tgt cac gcg ccg aag ctg gaa			624
Asp Gly Ala Tyr Ser Ile Glu Ala Thr Cys His Ala Pro Lys Leu Glu			
195	200	205	
gaa gtg tac gca gag atc tac agg gtg ttg aaa ccc gga tct atg tat			672
Glu Val Tyr Ala Glu Ile Tyr Arg Val Leu Lys Pro Gly Ser Met Tyr			
210	215	220	
gtg tcg tac gag tgg gtt acg acg gag aaa ttt aag gcg gag gat gac			720
Val Ser Tyr Glu Trp Val Thr Thr Glu Lys Phe Lys Ala Glu Asp Asp			
225	230	235	240
gaa cac gtg gag gta atc caa ggg att gag aga ggc gat gcg tta cca			768
Glu His Val Glu Val Ile Gln Gly Ile Glu Arg Gly Asp Ala Leu Pro			
245	250	255	
ggg ctt agg gct tac gtg gat ata gct gag acg gct aaa aag gtt ggg			816
Gly Leu Arg Ala Tyr Val Asp Ile Ala Glu Thr Ala Lys Lys Val Gly			
260	265	270	
ttt gag ata gtg aag gag aag gat ctg gcg agt cca ccg gct gag ccg			864
Phe Glu Ile Val Lys Glu Lys Asp Leu Ala Ser Pro Pro Ala Glu Pro			
275	280	285	

tgg tgg act agg ctt aag atg ggt agg ctt gct tat tgg agg aat cac 912
 Trp Trp Thr Arg Leu Lys Met Gly Arg Leu Ala Tyr Trp Arg Asn His
 290 295 300
 att gtg gtt cag att ttg tca gcg gtt gga gtt gct cct aaa gga act 960
 Ile Val Val Gln Ile Leu Ser Ala Val Gly Val Ala Pro Lys Gly Thr
 305 310 315 320
 gtt gat gtt cat gag atg ttg ttt aag act gct gat tat ttg acc aga 1008
 Val Asp Val His Glu Met Leu Phe Lys Thr Ala Asp Tyr Leu Thr Arg
 325 330 335
 gga ggt gaa acc gga ata ttc tct ccg atg cat atg att ctc tgc aga 1056
 Gly Gly Glu Thr Gly Ile Phe Ser Pro Met His Met Ile Leu Cys Arg
 340 345 350
 aaa ccg gag tca ccg gag gag agt tct tga 1086
 Lys Pro Glu Ser Pro Glu Glu Ser Ser
 355 360
 <210> 8
 <211> 361
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 8
 Met Asp Ser Leu Thr Leu Phe Phe Thr Gly Ala Leu Val Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Ile Tyr Trp Phe Leu Cys Val Leu Gly Pro Ala Glu Arg Lys Gly Lys
 20 25 30
 Arg Ala Val Asp Leu Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ala Glu Lys Val Gln
 35 40 45
 Asp Asn Tyr Lys Gln Tyr Trp Ser Phe Phe Arg Arg Pro Lys Glu Ile
 50 55 60
 Glu Thr Ala Glu Lys Val Pro Asp Phe Val Asp Thr Phe Tyr Asn Leu
 65 70 75 80
 Val Thr Asp Ile Tyr Glu Trp Gly Trp Gly Gln Ser Phe His Phe Ser
 85 90 95

Pro Ser Ile Pro Gly Lys Ser His Lys Asp Ala Thr Arg Leu His Glu

100 105 110

Glu Met Ala Val Asp Leu Ile Gln Val Lys Pro Gly Gln Lys Ile Leu

115 120 125

Asp Val Gly Cys Gly Val Gly Gly Pro Met Arg Ala Ile Ala Ser His

130 135 140

Ser Arg Ala Asn Val Val Gly Ile Thr Ile Asn Glu Tyr Gln Val Asn

145 150 155 160

Arg Ala Arg Leu His Asn Lys Lys Ala Gly Leu Asp Ala Leu Cys Glu

165 170 175

Val Val Cys Gly Asn Phe Leu Gln Met Pro Phe Asp Asp Asn Ser Phe

180 185 190

Asp Gly Ala Tyr Ser Ile Glu Ala Thr Cys His Ala Pro Lys Leu Glu

195 200 205

Glu Val Tyr Ala Glu Ile Tyr Arg Val Leu Lys Pro Gly Ser Met Tyr

210 215 220

Val Ser Tyr Glu Trp Val Thr Thr Glu Lys Phe Lys Ala Glu Asp Asp

225 230 235 240

Glu His Val Glu Val Ile Gln Gly Ile Glu Arg Gly Asp Ala Leu Pro

245 250 255

Gly Leu Arg Ala Tyr Val Asp Ile Ala Glu Thr Ala Lys Lys Val Gly

260 265 270

Phe Glu Ile Val Lys Glu Lys Asp Leu Ala Ser Pro Pro Ala Glu Pro

275 280 285

Trp Trp Thr Arg Leu Lys Met Gly Arg Leu Ala Tyr Trp Arg Asn His

290 295 300

Ile Val Val Gln Ile Leu Ser Ala Val Gly Val Ala Pro Lys Gly Thr

305 310 315 320

Val Asp Val His Glu Met Leu Phe Lys Thr Ala Asp Tyr Leu Thr Arg

325 330 335

Gly Gly Glu Thr Gly Ile Phe Ser Pro Met His Met Ile Leu Cys Arg

	340	345	350
Lys Pro Glu Ser Pro Glu Glu Ser Ser			
	355	360	
<210>	9		
<211>	288		
<212>	DNA		
<213>	Arabidopsis thaliana		
<220><221>	misc_feature		
<222>	(1)..(288)		
<223>	SMT2 fragment for RNAi		
<400>	9		
ctagacgtcg gatgcggtgt cggcgggtccg atgcgagcga ttgcatctca ctgcgagct			60
aacgtagtcg ggattacaat aaacgagtat caggtgaaca gagctcgtct ccacaataag			120
aaagctggtc tcgacgcgt ttgcgaggtc gtgtgtggta acttcctcca gatgccgttc			180
gatgacaaca gtttcgacgg tgcttattcc atcgaagcca cgtgtcacgc gccgaagctg			240
gaagaagtgt acgcagagat ctacaggggtg ttgaaacccg gatctatg			288
<210>	10		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	DET2 sense primer		
<400>	10		
atggaagaaa tcgccgataa aac			23
<210>	11		
<211>	23		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	DET2 anti-sense primer		
<400>	11		
tcagtacaca aaaggaataa cag			23
<210>	12		
<211>	19		
<212>	DNA		

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DWF4 sense primer	
<400>	12	
	atgttcgaaa cagagcatc	19
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	DWF4 anti-sense primer	
<400>	13	
	ttacagaata cgagaaaccc	20
<210>	14	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SMT2 sense primer	
<400>	14	
	atggactctt taacactctt c	21
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SMT2 anti-sense primer	
<400>	15	
	tcaagaactc tcctccgtg	20
<210>	16	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sense primer for DET2 RNAi	
<400>	16	
	aagctttcat ttaccctctt cg	22
<210>	17	

<211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-sense primer for DET2 RNAi
 <400> 17
 gtcgacgaac ttggcaatgt ac 22
 <210> 18
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for DWF4 RNAi
 <400> 18
 gtcgacgccg gacatgagac ttc 23
 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-sense primer for DWF4 RNAi
 <400> 19
 ggtaccgcca tctccaagga ttaa 24
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for SMT2 RNAi
 <400> 20
 ggtaccctag acgtcggatg cggt 24
 <210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-sense primer for SMT2 RNAi
 <400> 21

gaattccata gatccgggtt tcaa 24

<210> 22

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for DET2:DWF4:SMT2

<400> 22

tctagaggcg cgcctcattt accctcttcg c 31

<210> 23

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> anti-sense primer for DET2:DWF4:SMT2

<400> 23

ggatccattt aaatcataga tccgggtttc aa 32

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for T3 qRT-PCR (DET2)

<400> 24

atggaagaaa tcgccgataa aacc 24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense primer for T3 qRT-PCR (DET2)

<400> 25

acacaaaagg aataacagct ttac 24

<210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for T3 qRT-PCR (DWF4)

<400> 26

atgttcgaaa cagagcatca tac 23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense primer for T3 qRT-PCR (DWF4)

<400> 27

gaatacagaga aaccctaata ggc 23

<210> 28

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for T3 qRT-PCR (SMT2)

<400> 28

atggactctt taacactctt c 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-sense primer for T3 qRT-PCR (SMT2)

<400> 29

agaactctcc tccggtgact c 21

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer for T3 qRT-PCR (CYP85A1)

<400> 30

gtctgcttct gtctctca 18

<210> 31

<211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-sense primer for T3 qRT-PCR (CYP85A1)
 <400> 31
 tcatccctc ctatttc 18
 <210> 32
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for 18s rRNA
 <400> 32
 ggatgggtcg gccggtc 17
 <210> 33
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 ><223> anti sense primer for 18s rRNA
 <400> 33
 caggctgagg tctcgttc 18
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for T4 qRT-PCR (DET2)
 <400> 34
 tttggagagg cgattgagtg 20
 <210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti-sense primer for T4 qRT-PCR (DET2)
 <400> 35
 ctcttccttg aacttgcaa tg 22

<210> 36
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for T4 qRT-PCR (DWF4)
 <400> 36
 cagaggatga agcagagatg ag 22
 <210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti sense primer for T4 qRT-PCR (DWF4)
 <400> 37
 tgagatcgag aatttgctcc g 21
 <210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for T4 qRT-PCR (SMT2)
 <400> 38
 ccaaaagaaa tcgaaaccgc c 21
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> anti sense primer for T4 qRT-PCR (SMT2)
 <400> 39
 gcgtctttgt gagattttcc g 21
 <210> 40
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sense primer for T4 qRT-PCR (CYP85A1)
 <400> 40

acagagcaga aaacagagtg ag

22

<210> 41

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti sense primer for qRT-PCR (CYP85A1)

<400> 41

gaaggagagc ggaacagag

19