



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0114378
(43) 공개일자 2016년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
A01H 5/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8287 (2013.01)
A01H 5/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0040806
(22) 출원일자 2015년03월24일
심사청구일자 2015년03월24일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
허윤강
서울특별시 마포구 신수로 81 경남아너스빌아파트
201동 106호
동상수
대전광역시 유성구 농대로21번길 9, 204호(궁동)
노일섭
전라남도 순천시 생목길 1 벽산아파트 101동 140
2호
(74) 대리인
최규환

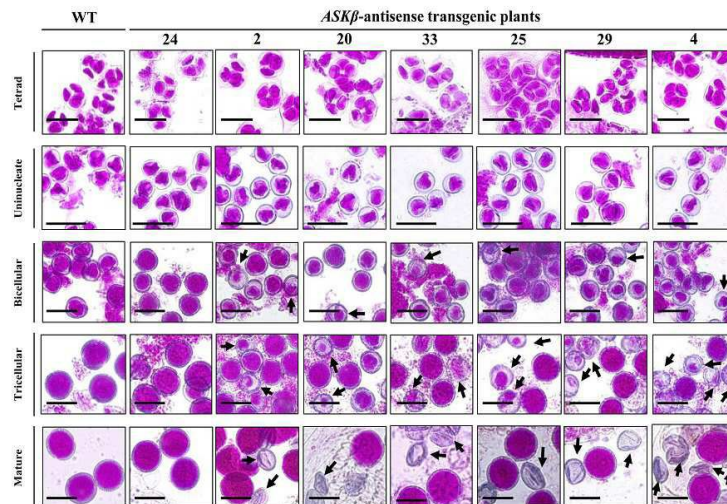
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 식물체의 가임성을 조절하는 애기장대 유래의 *ASKβ* 유전자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 식물체의 가임성을 조절하는 애기장대 유래의 *ASKβ* 유전자 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *ASKβ* 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 가임성을 조절하는 방법, 상기 방법에 의해 가임성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 가임성이 조절된 형질전환 식물체 및 종자에 관한 것이다. 본 발명의 *ASKβ* 유전자를 이용하면 종래의 융성불임 식물체 제조방법에 비해 안정성이 있으며, 융성불임계를 유지하기 위한 다른 유지계통 필요없이 융성불임 식물체를 제조할 수 있다. 따라서 본 발명은 손쉬운 신품종 개발 및 고부가가치의 산업생산에 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A01H 5/10 (2013.01)

C12N 15/8289 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008118
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	국립농업과학원
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	배추기능유전체와 염기서열 정보를 활용한 유용유전자의 대량 발굴
기 여 율	8/10
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	213003-04-2-SB230
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	GSP(Golden Seed Project)
연구과제명	양배추 색소 경로 유전체 분석에 의한 자색발현 관련 분자마커 개발
기 여 율	2/10
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2013.07.25 ~ 2017.05.02

명세서

청구범위

청구항 1

애기장대 유래의 $ASK\beta$ 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 $ASK\beta$ 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 가임성을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 $ASK\beta$ 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 $ASK\beta$ 유전자의 발현을 저해시켜 식물체의 음성불임을 유발하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

애기장대 유래의 $ASK\beta$ 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 $ASK\beta$ 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 가임성이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 $ASK\beta$ 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 $ASK\beta$ 유전자의 발현을 저해시켜 식물체의 음성불임을 유발하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제4항 내지 제6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 가임성이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 가임성이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 9

제7항의 가임성이 조절된 형질전환 식물체의 종자.

청구항 10

애기장대 유래의 $ASK\beta$ 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 가임성 조절용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 식물체의 가임성을 조절하는 애기장대 유래의 $ASK\beta$ 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 애기장대 유래의 $ASK\beta$ 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 $ASK\beta$ 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 가임성을 조절하는 방법, 애기장대 유래의 $ASK\beta$ 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 $ASK\beta$ 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 가임성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 가임성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자, 및 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 애기장대 유래의 $ASK\beta$ 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는

[0001]

재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 가임성 조절용 조성물을 제공한다.

배경 기술

- [0002] 자연 돌연변이 및 유도 돌연변이로 인한 웅성불임(male sterile) 돌연변이는 여러 종의 고등식물에서 보고되어 왔다. 상기 돌연변이는 여러 가지 다른 표현형들과 연관되어 있으며, 이는 구조적 변이들, 예컨대 짧은 화사(filaments), 열개(dehiscence)의 결여 또는 편평한 표면을 가지고, 또한 배우자 형성, 특히 감수분열과 연관된 기능적 결함들도 가진 꽃가루를 포함한다. 이러한 돌연변이들 모두 비기능성 꽃가루를 생성한다. 웅성불임과 관련된 다양한 유전자들이, 애기장대, 밀, 배추, 콩, 토마토, 해바라기 및 골파와 같은 다양한 식물 종들에서 동정되어 왔다.
- [0003] 웅성불임은 유전양식에 따라 핵유전형(genic male sterility)과 세포질유전형(cytoplasmic male sterility)으로 나눌 수 있다. 핵유전형 웅성불임은 생존에 불리하게 작용하기 때문에 발견되는 것으로, 주로 열성유전을 하며 열성동형(homozygously recessive)인 경우에 불임성을 띠게 되기 때문에 불임계의 유지 및 증식에 많은 노력이 소요되고, 또 작물에 따라서는 꽃이 작아 임성(fertility)의 판별이 힘들고, 꽃이 필 때까지 시간이 많이 소요되는 작물에서는 적용이 힘든 단점이 있다.
- [0004] 세포질 웅성불임은 어느 가임계를 교배해도 100% 불임주가 나오기 때문에, 불임주에 여러 가지 가임주를 교배하여 50% 혹은 100% 불임주를 낼 수 있는 개체 및 계통, 즉 유지계통(maintainer)을 찾아내서 심어주어야 하기 때문에 불편한 점은 있으나 불임활용의 소기의 목적을 달성할 수 있다. 하지만 일대잡종 육종을 위해 웅성불임계 획득을 위한 방사선 및 화학 약품을 통한 인위적 웅성불임 유기도 시도된 바가 있으나, 부작용을 해소해야 하는 문제점을 앓고 있다.
- [0005] 일대 잡종종자를 생산하기 위한 웅성불임 식물의 개발 및 연구에 많은 투자를 하고 있지만 현재까지 웅성불임 식물이 가지고 있는 문제점으로 인해 이에 관한 연구 성과는 매우 미비한 실정이다. 만약 이러한 웅성불임계 식물이 가지고 있는 단점들을 극복, 즉 안정성 있는 웅성불임계의 확보 및 다른 유지계통이 필요 없이 불임계를 유지할 수만 있다면, 이를 이용한 손쉬운 신품종 개발 및 고부가가치의 산업생산에 유용하게 이용할 수 있을 것이다. 따라서 안정성 있는 웅성불임계를 확보할 수 있고 다른 유지계통 필요없이 불임계를 유지할 수 있는 신규한 유전자에 대한 요구가 끊임없이 존재하여 왔다.
- [0006] 한편, *GSK3*(Glycogen synthase kinase 3)/*SGG*(SHAGGY-like kinase)는 현재까지 연구된 모든 진핵생물에서 발견된 다기능성 비-수용체 세린/트레오닌 키나아제(non-receptor serine/threonine kinase)이다. *GSK3/SGG*는 동물 인슐린 신호전달 경로에서 처음으로 규명되었고, 세포 운명 지정(cell fate specification), 세포골격 이동, 예정 세포사(programmed cell death) 및 암과 알츠하이머병을 포함한 인간 질병을 포함하는 많은 발달 과정을 조절하는 주요 조절자로 고려된다.
- [0007] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 *GSK3s/SGGs*는 *ASKs*(*Arabidopsis Shaggy-like protein kinases*) 또는 *AtSKs*(*Arabidopsis thaliana Shaggy-like kinases*)로 언급된다. 애기장대는 10개의 *AtSKs*를 포함하는데, 이는 4개의 분기군(clade)으로 분류된다. 분기군 I은 *AtSK11/ASK α*, *AtSK12/ASK γ* 및 *AtSK13/ASK ε*를 포함하고 분기군 II는 *AtSK21/ASK η/BIN2*(BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2), *AtSK22/ASK ι/BIL1*(BIN 2-like 1) 및 *AtSK23/ASK ζ/BIL2*를 포함하며, 분기군 III는 *AtSK31/ASK θ* 및 *AtSK32/ASK β*를 포함하며, 분기군 IV는 *AtSK41/ASK κ* 및 *AtSK42/ASK δ*를 포함한다.
- [0008] *ASKs*는 식물 성장, 발달 및 스트레스 반응에 관련되며, 축적된 증거들은 그들이 통합된 다양한 호르몬 신호에 의해 작용한다는 것을 나타낸다. 모든 *ASKs*는 하나의 티로신 잔기를 포함하는데, 이는 잘 연구된 미토겐-활성화 단백질 키나아제(mitogen-activated protein kinase)의 활성화 루프의 티로신 잔기와 비슷한 자리에 위치한다. *ASK α/AtSK11* 및 *ASK η/AtSK21/BIN2*에서, 티로신 잔기는 인산화되는데, 이들의 키나아제 활성화를 위해 필수적이다.
- [0009] 일반적으로, *ASKs*는 BES1 및 BZR1과 같은 일부 예외를 제외하고, 동물의 *GSK3/SGG*(counterpart)처럼 그들의 활성을 위해 기질의 "프라이밍(priming)" 인산화를 요하는 것으로 나타난다: *GSK3/SGG*에 의해 인산화되기 전에, 종종 기질은 다른 키나아제에 의해 꼭 인산화되어야만 한다. 한번 프라이밍되면, 인산화된 기질은 인산-결합 포켓(pocket)(*GSK-3β*의 경우, 아르기닌 142, 아르기닌 226 및 리신 251)과 상호작용하고, 그에 따라 부분적으로 T-루프 인산화를 대체하는데, 이는 키나아제 활성을 위해 요구된다.
- [0010] *ASKs*의 기질로 추정되는 10개의 동정된 단백질 중에서 5개(PEP 카르복시키나아제 PCK1, 레모린(remorin) 패밀리

단백질, RabGAP/TBC 도메인 포함 단백질 AtGYPC1b 및 글리신-풍부 단백질 및 At3g01160)는 잠재적인 프라이밍 위치에서 인산화된다.

[0011] 다른 ASKs와 함께, 분기군 II의 모든 ASKs는 BR(brassinosteroid) 신호전달 경로에 관련된다. BZR1 전사 인자와의 상호작용을 위한 BR 신호전달 경로에 연관된 6개의 ASKs(*ASK α/AtSK11*, *ASK γ/AtSK12*, *ASK η/AtSK21/BIN2*, *ASK ι/AtSK22/BIL1*, *ASK ζ/AtSK23/BIL2* 및 *ASK θ/AtSK31*) 중, 분기군 II의 3개의 ASKs는 BR 신호전달에서 그들의 불필요한 역할이 기능적으로 확인되었다. *ASK η(AtSK21/BIN2)*는 애기장대에서 BR 신호전달의 우세한 음성 조절자로 작용하지만, 분기군 II 및 III의 다른 ASKs는 또한 BES1을 인산화할 수 있다. 예를 들어, *bin2-1* 기능 획득 돌연변이는 BR 결핍처럼 보이고, BIN2 동시억제(co-suppression)는 약한 *bri1* 대립유전자(weak *bri1* allele)에서 관찰된 BR 신호전달 결함을 회복시킬 수 있다. 최근에, 분기군 II의 ASKs는 SnRK2s(Snfl-related kinase 2s)를 인산화함으로써 ABA 신호전달을 양성적으로 조절할 수 있다고 보고되었다. 게다가, 분기군 II의 모든 ASKs는 TDIF(tracheary element differentiation inhibitory factor) 수용체와 상호 작용하고, BES1(BRI1-EMS SUPPRESSOR 1)을 통해 물관 분화를 억제한다.

[0012] 분기군 II에서 다른 유전자들보다 ASKs의 기능은 크게 알려져 있지 않다. 분기군 I의 2개의 ASKs(*ASK α/AtSK11* 및 *ASK γ/AtSK12*)는 특히 꽃받침(sepals) 및 배주 원시세포(ovule primordia)에서 상향-조절되었으며, 안티센스 접근법을 사용한 각각의 유전자의 하향-조절은 꽃받침/꽃잎의 수를 증가시켰고, 암술대/암술머리(styles/stigmas)의 분화를 초래했다. 추가적으로, *ASK θ/AtSK31*의 프라이밍 활성을 감소시키는 점 돌연변이의 도입은 결함이 있는 세포의 확대를 일으켰다. 이어서 *ASK θ/AtSK31*는 BRI1 수용체에 의해서 음성적으로 조절되고, BZR1 및 BES1을 인산화하는 추가적인 ASK인 것으로 나타났다. 염 또는 삼투 스트레스 조건에 의한 일부 ASKs(*ASK ε/AtSK13*, *ASK θ/AtSK31* 및 *ASK δ/AtSK42*)의 유도가 보고되어 있지만, 염 스트레스 반응에서 ASK의 역할은 다른 ASK인 *ASK ι/AtSK22/BIL1*에 대해서만 실험적으로 밝혀져 있다.

[0013] 많은 작물에서 웅성불임은 원예형질이 우수한 F₁ 종자의 생산에 이용된다. 그 결과, 많은 노력들이 해로운 부작용 없이 웅성불임 라인을 구축하는데 초점을 맞춰왔다. 최근 본 발명자는 유전적 웅성임성 식물의 꽃눈에서 다른 발현 양상을 보여주는 *ASK β*의 상동체인 *BrASK β*를 웅성임성-관련 추정 유전자(putative male fertility-related gene)로 동정했다(Dong et al., 2013, PLoS ONE, 8, e72178; "*BrASK2*"는 참고문헌에서 사용된 명칭이다). 본 발명에서 *BrASK β*의 역할에 대해 이해하기 위해, 본 발명자는 애기장대에서 안티센스 기술을 사용하여 *BrASK β*의 상동체인 *ASK β*의 발현을 유전적으로 저해하였고, 결과물로 생성된 표현형을 조사했다. *ASK β* 및 이의 동시발현 유전자의 발현 분석 결과는 형질전환 식물체에서 화분 표현형과 함께 관찰되었으며, *ASK β*가 애기장대에서 화분 발달에 필수적이라는 증거를 제공한다.

[0014] 한국등록특허 제0987396호에 '불투명 심백배유 발현과 웅성불임을 유발시키는 다면발현성을 갖는 식물체의 UGPase1 유전자'에 대해 개시되어 있고, 한국등록특허 제1319265호에 '세포질 웅성 불임성을 가지는 NWB-CMS 양채류 식물체 및 이의 용도'에 대해 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 식물체의 가임성을 조절하는 애기장대 유래의 *ASK β* 유전자 및 이의 용도에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 *ASK β* 유전자의 발현이 조절된 식물체를 이용하여, *ASK β* 유전자가 식물체의 가임성(fertility)에 관여하며, 특히 *ASK β* 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 웅성불임(male sterility)을 유발한다는 것을 확인하였고, 이를 통해 가임성이 조절된 식물체 및 이의 종자를 생산할 수 있는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 애기장대 유래의 *ASK β* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *ASK β* 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 가임성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 애기장대 유래의 *ASK β* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *ASK β* 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 가임성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 가임성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 애기장대 유래의 *ASKβ* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 가임성 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 식물체의 가임성을 조절하는 애기장대 유래의 *ASKβ* 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 *ASKβ* 유전자의 발현을 조절함으로써 식물체의 가임성을 조절한다는 것을 규명하였다. 따라서 상기 유전자를 이용하면 종래의 웅성불임 식물체 제조방법에 비해 안정성이 있으며, 웅성불임계를 유지하기 위한 다른 유지계통 필요없이 웅성불임 식물체를 제조할 수 있다. 따라서 본 발명은 손쉬운 신품종 개발 및 고부가가치의 산업생산에 유용하게 이용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 10개의 ASKs 및 이의 상동체의 계통수 분석 결과이다. 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 및 배추(*Brassica rapa*)의 서열은 정렬되었고, MEGA 소프트웨어(버전 6.0)로 이웃 연결(Neighbor-joining) 방법을 사용하여 계통수를 구축하는데 이용되었다. ◆는 애기장대 ASKs를 나타낸다. 모든 단백질은 선행 연구(Jonak and Hirt, 2002, Trends in Plant Sci., 7, 457-461) 결과와 유사하게 분기(clade) I 내지 II로 클러스터되었다.

도 2는 애기장대 *ASKβ*의 발현 양상을 나타낸 결과이다. qRT-PCR은 야생형(wild-type) 애기장대로 수행되었다. FS1-12는 꽃 단계 1부터 12; FS13-16은 꽃 단계 13부터 16을 나타낸다. 발현 수준은 *ACTIN7*의 발현 수준에 대해 표준화되었다. 데이터는 2회의 생물학적 반복 실험으로부터 얻어졌고, 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 3은 *ASKβ* 안티센스 형질전환 애기장대 식물체의 분석 결과이다. A는 *ASKβ* 유전자의 구조 및 안티센스 구조물을 위한 DNA 절편의 모식도를 나타낸다. 회색 박스는 엑손(exon)을 나타내며, 라인 및 흰색 박스는 각각 인트론 및 UTRs를 나타낸다. 하단에 있는 안티센스 방향의 점선 화살표는 구조물에 사용된 DNA 영역을 보여준다. P로 시작하는 이름을 가진 화살표는 사용된 프라이머의 위치 및 방향을 나타낸다(semi-RT-PCR에 대한 P1과 P2 및 qRT-PCR에 대한 P3). B는 semi-RT-PCR에 의해 측정된 야생형 및 안티센스 형질전환 라인의 꽃눈(floral buds)에서 *AKSβ* 전사체 수준을 나타낸다. *ACTIN7* PCR은 동량의 cDNA가 각 반응에 사용되었는지 확인하기 위해 수행되었다. C는 qRT-PCR에 의해 측정된 *AKSβ* 및 *ASKθ*의 전사체 수준을 나타낸다. 발현 수준은 *ACTIN7*의 발현 수준에 대해 표준화되었고, 야생형 발현 수준에 대해 상대적으로 표현되었다. 오차 막대는 생물학적으로 독립적인 3회의 실험의 표준 편차(SD)를 나타낸다. D는 영양 생장기(vegetative growth)의 야생형 및 *ASKβ* 형질전환 식물 사이에 명백한 차이가 없다는 것을 보여주는 전체 식물체의 표현형을 나타낸다. 막대(bar)는 20 mm이다. E는 *ASKβ* 안티센스 형질전환 라인의 장각(silique) 길이 및 종자의 수를 나타낸 그래프이다. 평균값(mean value) 및 표준편차(SD)는 각 실험에 대하여 18개 식물체를 사용한 3회의 반복 실험으로부터 측정되었다. F는 *ASKβ* 안티센스 형질전환 라인의 장각 길이 및 종자의 수를 나타낸 표현형이다. 0.2N NaOH 및 1% SDS 용액으로 세척된 성숙한 장각의 전체 이미지를 사용하였다. 막대(bar)는 5 mm이다.

도 4는 야생형 및 *ASKβ* 안티센스 형질전환 라인의 웅성 배우자체(male gametophyte) 발달을 나타낸 결과이다. 사배체(tetrad), 단핵(uninucleate), 이세포(bicellular), 삼세포(tricellular) 및 성숙(mature)은 화분 발달의 다양한 단계를 나타낸다. 막대(bar)는 20 μm이다.

도 5는 *ASKβ*-상호작용 추정 유전자의 분석 결과이다. A는 *ASKβ* 및 동시발현 화분 발달-관련 유전자의 기능적 분류 및 발현 양상; B는 PLACE 데이터베이스에서 POLLENILELAT52로 어노테이션되고(annotated), *ASKβ* 및 이의 32개의 동시발현 유전자에 존재하는 보존된 모티프 1의 서열 로고(Sequence Logo); C는 PLACE 데이터베이스에서 MYB1AT로 어노테이션되고, 분석된 모든 유전자에 존재하는 보존된 모티프 3의 서열 로고(Sequence Logo); D는 해당 돌연변이 식물 백그라운드의 *ASKβ* 발현 수준에 대한 야생형 식물의 *ASKβ* 발현 수준; E는 상기 데이터에 따른 *tdf1* 돌연변이 백그라운드에서 *ASKβ* 및 이의 6개의 동시발현 유전자의 발현 수준이다.

도 6은 *ASKβ*의 업스트림 및 다운스트림 추정 유전자의 qRT-PCR 분석 결과이다. 도면들은 표 2에 요약된 것처럼 그들의 추정 기능 또는 발현에 따라 그룹화되었다. 세포기질 분해를 위한 *BCP1*; 정세포 발달을 위한 *DAF1*, *PCR11* 및 *TIP5;1*; 이세포화(two-celled) 화분을 위한 *ATLTP6*; 수정 중단을 위한 *ACA9*이다. 야생형 및 *ASKβ* 안티센스 형질전환 라인의 상대적인 전사체 수준은 하기와 같이 나타났다: A는 *TDF1* 및 *MYB80*; B는 *BCP1*; C는 *DAF1*, *PCR11* 및 *TIP5;1*; D는 *ATLTP6*; 및 E는 *ACA9*이다. 발현 수준은 *ACTIN7*의 발현 수준에 대해 표준화되었고,

생물학적으로 독립적인 3회의 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타냈다.

도 7은 야생형 및 *ASK β* 안티센스 형질전환 식물체의 화분 입자를 DAPI로 염색한 결과이다. 각 발달 단계 및 유전형을 위해, 상단 및 하단의 패널은 각각 명시야 현미경(bright-field microscope) 및 형광 현미경(fluorescence microscope) 이미지를 나타낸다. 비정상 화분 입자 또는 염색되지 않은 화분 입자는 화살표로 표시되었다. 막대(bar)는 10 μ m이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 *ASK β* 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *ASK β* 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 가임성을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0023] 본 발명에 따른 *ASK β* 단백질의 범위는 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환, 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시된 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 *ASK β* 단백질을 암호화하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 식물체의 가임성을 조절하는 특징이 있으며, *ASK β* 단백질을 암호화하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 상기 "유전자 발현 조절"은 식물체 내의 *ASK β* 유전자의 발현을 증가시키거나 또는 감소시키는 것을 말한다.
- [0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 식물체의 가임성을 조절할 수 있는 방법으로, 서열번호 1의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 *ASK β* 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 융성불임을 유발시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 용어 "재조합"은 세포가 이중의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이중의 펩티드 또는 이중의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.
- [0028] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.
- [0029] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 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 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 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 바이너리(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.

- [0030] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate), 포스포노트리신(phosphinothricin) 및 글루포시네이트(glufosinate)와 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.
- [0033] 본 발명의 식물 발현 벡터에서, 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 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.
- [0034] 상기 "유전자 과발현"이란 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 상기 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다. 식물체 내로 상기 유전자를 도입하는 방법으로는 프로모터의 조절을 받는 상기 유전자가 포함된 발현 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 방법이 있다. 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 과발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 프로모터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, CaMV의 35SRNA 및 19S RNA 프로모터; 피크워크 모자이크 바이러스(FMV)에서 유래한 전장 전사 프로모터 및 TMV의 코트 단백질 프로모터를 들 수 있다.
- [0035] 식물체에서 유전자의 발현을 저해하는 방법으로는 당업계에 공지된 여러 가지 방법을 이용할 수 있다. 상기 "유전자의 발현 저해"에는 유전자 전사의 저해 및 단백질로의 번역 저해가 포함된다. 또한, 유전자 발현이 완전히 정지된 것뿐만 아니라 발현이 감소된 것도 포함된다.
- [0036] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens et al., 1982, Nature 296: 72-74; Negrutiu et al., 1987, Plant Mol. Biol. 8: 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito et al., 1985, Bio/Technol. 3: 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202: 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein et al., 1987, Nature 327: 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EPA 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 바이너리 벡터 기술을 이용하는 것이다.
- [0037] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물이다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 짝 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 애기장대 유래의 *ASKβ* 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 가임성이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 *ASKβ* 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0040] 본 발명의 일 구현 예에 따른 제조 방법에서, ASK β 단백질을 암호화하는 유전자는 서열번호 1의 염기서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 식물체의 가임성을 조절할 수 있는 방법으로, 상기 ASK β 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물세포에 형질전환시켜 ASK β 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 웅성불임을 유발시킬 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일구현 예에 따른 제조 방법에서, 식물체의 가임성을 조절하기 위해, ASK β 유전자에 T-DNA를 삽입하여 기능상실 돌연변이체를 제조하는 방법은 당업계에 공지된 일반적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 기능상실 돌연변이체는 바람직하게는 ASK β 유전자에 T-DNA를 삽입한 단일 변이체일 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 가임성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.
- [0044] 또한 본 발명에 따른 방법이 적용될 수 있는 식물체로는 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양과 등의 단자엽 식물이 될 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이다. 상기 식물체는 바람직하게는 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 또한, 본 발명은, 애기장대 유래의 ASK β 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 유효성분으로 함유하는 식물체의 가임성 조절용 조성물을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 식물체의 가임성 조절용 조성물은 유효성분으로서 본 발명의 애기장대 유래의 ASK β 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 가임성을 조절할 수 있는데, 예를 들면, 상기 유전자의 발현을 저해시켜 웅성불임을 유발할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0048] 재료 및 방법

[0049] 1. 식물 재료 및 성장 조건

- [0050] 애기장대(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh var. Columbia (Col-0))가 형질전환을 위해 사용되었다. 애기장대 식물체는 $140 \pm 2 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{sec}$ 의 광 강도 및 빛 처리 16시간의 장일 주기로 $22 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 에서 재배되었다. 종자는 배양토가 포함된 화분($60 \times 60\text{mm}$)에 파종되었고, 3일 동안 4°C 에서 계층화한 후 배양실로 옮겨졌다. 식물체는 습도를 증가시키고, 동등한 발아를 돕기 위해 초기 5-6일 동안 투명한 폴리에틸렌 뚜껑 아래에 보관했다. 시험관 내(*in vitro*) 배양을 위해, 종자는 0.1% 트리톤(triton) X-100(Sigma, USA)을 포함하는 30% 표백제로 멸균되었고, 4°C 에서 3일 동안 계층화한 후, 1/2 강도의 MS 배지(Duchefa Biochemie, The Netherlands), 1% 수크로스 및 0.8% 한천을 포함하는 사각 플레이트($100 \times 100 \times 20 \text{ mm}$)에 파종되었다.

[0051] 2. 안티센스 구조물 및 식물 형질전환

- [0052] ASK β (AT3G16610)의 전장 코딩 서열은 AKS-P2 프라이머 세트(표 1)를 사용하여 제1가닥 cDNA로부터 클로닝되었고, T&A 클로닝 벡터(RBC T&A Cloning kit, Real Biotech Corporation, Taiwan)로 삽입되었다. 이의 서열 및 방향을 확인한 후에, ASK β 단편은 식물 형질전환을 위해 pCambia 3300-35S 바이너리 벡터로 서브클로닝되었다. 애기장대 식물체는 상기 언급된 바이너리 플라스미드를 포함한 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101을 사용하여 꽃 침지법으로 형질전환되었다(Clough and Bent, 1998, Plant J., 16, 735-743). T0 형질전환체는 25mg/ml 글루코시네이트(Sigma-Aldrich, USA)를 포함하는 MS 플레이트 상에서 선발되었고, 게놈 DNA PCR로 확인되었다. 이어서 T0 라인은 자가 수분되었고, 3:1 분리비에 따른 T2 식물체는 추가의 실험을 위해 글루코시네이트로 선발되었다.

표 1

[0053] 본 발명에 사용한 프라이머

프라이머 이름	프라이머 염기서열				크기 (bp)	목적
	서열 번호	정방향 (5'-3')	서열 번호	역방향 (5'-3')		
AKS β -P1	3	ATGCGATTTTGGGAGCGCCA	4	TGTGCCACGGCTGAGCTTTGA	314	ASK β 유전자 발현 분석
AKS β -P2	5	CGATGAATGTGGTGGGAGATTAACG	6	CATCTGCGTAGAGAAGCAGCCATTAACC	1354	ASK β 풀 CDS 영역, 안티센스 구조물, gDNA PCR
ASK β -P3	7	GCGGAGATTAACGAGTATTGCC	8	CAGAATCTTTCTCGTACGACG	145	ASK β 유전자 발현, qRT-PCR
ASK θ	9	GCTTCGGGTGCGACCTCC	10	CTCGCGGTGGCATTTCG	275	ASK θ 유전자 발현
TDF1	11	GAGCGATTTCTCTCTCGGACC	12	GATGTATTCGGCTTCGATGTTGAAATG	112	유전자 발현 분석
MYB80	13	GTCTCCTGCCGTGACGCTTGGA	14	AATCTCCTCTTGATCAACCCTTCTCCC	124	유전자 발현 분석
DAF1	15	CTCAGGAAGTGCAGTGGACATCATT	16	CTAATGCAGCCCTTGGTAATAGC	218	유전자 발현 분석
BCP1	17	TACTCCTGGTGACGGTGACGTTGCA	18	AACGACGACCGCAGAGACGC	133	유전자 발현 분석
PCR11	19	CGGGTATGGAGGAAGCAGTCTCTAC	20	CCGATGACCAAGTCCAAATCGC	177	유전자 발현 분석
ACA9	21	TCTCTGTGATTGACAGAGAGGTAAGAGA	22	TCGTCTCACCCAGCTTTCTTC	225	유전자 발현 분석
TIP5;1	23	CGAAAGAAATTGATGAGAAGAATGATT	24	AGCCATCAATTCCTTGAAGACATG	165	유전자 발현 분석
ATTL6	25	CTCCTCTTCGGAATCGAAGCTCA	26	TTGAAATTAAGCCTTCTCTCTCG	113	유전자 발현 분석
35S	27	CAATCCACTTGCTTTGAAGAC	28	CCATCATTGCGATAAAGGAAAG	135	형질전환 식물체 확인을 위한 gDNA PCR
At Actin7	29	AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT	30	GAGGATAGCATGTGGAAGTGAAGAA	96	내부 컨트롤

[0054] 3. 역전사(Revers transcription) PCR 및 qRT-PCR

[0055] 각 샘플의 총 1 μ g의 RNA가 ReverTra Ace- α 키트(Toybo, Osaka, Japan)를 사용하여 제1가닥 cDNA 합성을 위해 사용되었다. 합성된 cDNA의 농도는 NanoDrop ND-1000(Thermo Scientific)을 사용하여 측정되었고, cDNA는 PCR을 위해 12.5ng/ μ l로 희석되었다. Semi-RT-PCR은 일반적으로 94 $^{\circ}$ C에서 5분 동안의 변성에 이어서 25회 반복의 3단계 반응(94 $^{\circ}$ C에서 30초, 54 $^{\circ}$ C에서 30초 및 72 $^{\circ}$ C에서 60초)이 수행되었다. qRT-PCR을 위해서, 95 $^{\circ}$ C에서 30초 동안의 전-변성이 수행되었고, 이어서 40회 반복의 3단계 반응(95 $^{\circ}$ C에서 5초, 60 $^{\circ}$ C에서 20초 및 72 $^{\circ}$ C에서 15초)이 수행되었다. 본 발명에 사용된 모든 프라이머에 대한 서열 정보는 표 1과 같다. Semi-RT-PCR 산물은 1.5% 아가로스 겔에서 분리되었고, EtBr(ethidium bromide)을 사용하여 염색되었다.

[0056] 4. 화분 생존도(pollen viability), 반초박 절편(semithin sections) 및 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색

[0057] 화분의 생존도 및 발달 진행을 확인하기 위해, 야생형(wild-type) 및 ASK β S 안티센스 형질전환 라인으로부터 수집된 꽃이 카르누아 용액(알코올:클로로포름:아세트산 = 6:3:1)에서 2시간 동안 고정되었다. 이어서 꽃밥(anthers)은 절단되었고, 말라카이트 그린(Malachite green), 푸크신 산(acid fuchsin) 및 오렌지 G(Orange G)를 포함하는 용액을 사용하여 이전에 기술된 방법(Peterson et al., 2010, Int. J. Plant Biol., 1, e13)으로 염색되었다. 반초박 절편(semi-thin section)은 이전에 기술된 방법(Javelle et al., 2011, J. Vis. Exp., 57, e3328)으로 준비되었다. 꽃 샘플은 잘라서 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 밤새(overnight)

고정되었다. 이어서, 샘플은 에탄올:히스토초이스 제거 시약 (ethanol:Histochoice Clearing Agent; Sigma-Aldrich, USA) 시리즈에서 점진적으로 탈수되었고, 파라핀으로 침윤시켰다. 절편은 8 마이크론 두께로 절단되었고, 슬라이드 위에 얹어졌다. 파라핀은 히스토-클리어(Histo-clear) 및 에탄올 시리즈를 사용하여 슬라이드로부터 제거되었다. 샘플은 광학 현미경하에서 관찰하기 위해 0.05%(w/v) 톨루이딘 블루 O(toluidine blue O)로 염색되었다.

[0058] DAPI 염색을 위해, 꽃밥은 포셉(forceps)을 사용하여 현미경 슬라이드 상에서 파쇄되었고, DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 염색 용액(100mM NaPO₄, pH 7.5, 1mM EDTA, 3μg/ml DAPI; Sigma-Aldrich, high grade) 안에서 커버슬립 (coverslip)으로 부드럽게 눌러졌다. 슬라이드는 상온에서 5-10분 동안 배양되었고, DAPI 필터 세트가 있는 형광 현미경(Olympus, BX51)하에서 관찰되었다.

[0059] 5. 계통수(phylogenetic tree) 구축

[0060] 애기장대 및 배추(*Brassica rapa*)의 GSK/SGG-연관 아미노산 서열은 TAIR 및 BRAD 데이터베이스 (www.arabidopsis.org 및 http://brassicadb.org/brad/)에서 쿼리(query) 및 100의 컷오프 값(cutoff value)으로 *ASKβ*의 전장 아미노산 서열을 이용한 BLAST 검색에 의해 동정되었다. 검색된 서열은 ClustalX2.0로 정렬되었다. 계통수(phylogenetic tree)는 "페어와이즈 딜리션(pairwise deletion)" 옵션 및 "프와손 컬렉션(Poisson correction)" 모델 및 1000회 반복의 부트스트랩(bootstrap) 분석을 채택한 이웃 연결(Neighbor-joining) 방법을 사용하여 MEGA 프로그램으로 생성되었다.

[0061] 6. 동시발현(co-expression) 및 유전자 네트워크(gene network) 분석

[0062] 게놈-전체 동시발현 분석(genome-wide co-expression analysis)을 가능하게 하는 발현 앵글러(Expression Angler)는 *ASKβ*의 기능과 유사한 기능을 가질 수 있는 유전자를 탐색하기 위해 사용되었다(Toufighi et al., 2005, Plant J., 43, 153-163). 피어슨 상관 계수에 대해 0.8의 컷오프 임계 값(cutoff threshold)이 검색에 사용되었다. 확인된 유전자의 시간적 및 공간적 발현 양상이 애기장대 eFP 브라우저 (http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi)를 사용하여 조사되었다(Winter et al., 2007, PLoS ONE, 2, e718). 기능적 분류를 위한 클러스터(Cluster) 분석 및 GO 축적(GO enrichment) 분석은 각각 TIGR 다중-실험 뷰어(Multi-Experiment Viewer; http://www.tm4.org/mev.html) 및 agriGO(http://bioinfo.cau.edu.cn/agriGO/index.php)를 사용하여 수행되었다(Du et al., 2010, Nucleic Acids Res. 38, W64-70). 유전자 네트워크는 GeneMANIA에 의해 생성되었고(Zuberi et al., 2013, Nucleic Acids Res., 41, W115-122), 싸이토스케프(Cytoscape; Version 3.1.0)를 사용하여 수정되었다(Shannon et al., 2003, Genome Res., 13, 2498-2504).

[0063] 7. 모티프 분석

[0064] *ASKβ*와 동시발현되는 유전자의 프로모터 서열에서 전사인자 결합 위치 또는 DNA 모티프는 하기 방법으로 동정되었다. 각 유전자에 대해, 전사 개시 위치로부터 500bp 업스트림 서열이 TAIR(www.arabidopsis.org)에서 확인되었다. 업스트림 영역에서 보존된 DNA 모티프는 MEME 스위트 버전 4.9.1에서 실행된 기대 최대화 알고리즘(expectation maximization algorithm)을 사용하여 검색되었다(Bailey et al., 2009, Nucleic Acids Res., 37, W202-208). 6-50 뉴클레오티드 길이의 모티프는 "서열 당 0 또는 1 발생(zero or one occurrence per sequence)" 옵션을 사용하여 두 가닥 모두에서 검색되었다. E-값 ≤ 1.00E+02을 갖는 모티프는 PLACE를 사용하여 알려진 모티프와 그들의 유사성에 대해 평가되었다(Higo et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27, 297-300).

[0065] 실시예 1. SGG(Shaggy-like kinase) 유전자는 애기장대와 배추 사이에서 보존된다.

[0066] 배추(*Brassica rapa*)의 GMS(genic male sterility)에 대한 이전의 연구에서, *ASKβ*의 상동체인 *BrASKβ*(*B. rapa*의 유전자 *Bra003440*, http://brassicadb.org/brad의 유전자 ID)는 특히 사배체기 이후의 임성 꽃눈(fertile buds)에서 발현된다는 것이 밝혀졌고, GMS(genic male sterility) 추정 유전자로 동정되었다. *ASKβ*(따라서 *BrASKβ*)의 잠재적인 기능을 더 이해하기 위해, 생물정보학적 분석을 수행했다.

[0067] 쿼리(query)로 애기장대 *ASKβ* 전장 단백질 서열을 사용하여 애기장대 및 배추 데이터베이스(www.arabidopsis.org 및 <http://brassicadb.org/brad/>)에서 연관 유전자에 대해 검색했다. 검색 결과는 애기장대 및 배추에서 각각 10개 및 18개 유전자를 포함하여 많은 수의 *ASKβ* 연관 유전자가 각 식물의 게놈에 존재한다는 것을 보여준다. 선행 연구는 10개의 애기장대(*AtSKs*)에 *SGG*(*shaggy-like kinases*)가 그들의 서열 유사성을 기반으로 4개의 분기군(I, II, III 및 IV)으로 분류될 수 있다는 것을 보여주었다. 우리의 데이터베이스에서 동정된 28개의 서열 모두를 사용한 계통학적 분석은 배추의 모든 상동체가 애기장대 서열과 마찬가지로 4개의 분기로 클러스터되고, 1 내지 3개의 배추 상동체는 각각의 *ASK* 서열과 밀접하게 연관된다는 것을 보여주었다(도 1).

[0068] 또한 애기장대의 *ASKβ*(*At3g16610*)가 *Bra003440*(*BrASKβ*)와 가장 밀접하게 연관된다는 것을 확인하였고, *Bra007577*가 *ASKβ* 및 *BrASKβ*와 함께 분류할 수 있는 배추의 다른 유전자라는 것을 발견했다. 배추의 불임성 또는 임성 꽃눈에서의 *BrASKβ*의 발현 양상 및 *BrASKβ*와 *ASKβ*의 91%의 아미노산 서열 동일성을 고려하여, *ASKβ*가 애기장대에서 웅성 배우자형성(male gametogenesis) 동안 역할을 수행한다는 것을 추정하였다.

[0069] **실시예 2. 애기장대에서 *ASKβ* 발현 양상은 화분 발달에서 이의 추정 기능을 제시한다.**

[0070] *ASKβ*의 가능한 기능을 유추하기 위해, *ASKβ*의 시각적 및 공간적 발현 양상은 다양한 야생형(wild-type) 애기장대 조직에서 qRT-PCR 및 반-정량 RT-PCR을 사용하여 조사되었다(도 2). 상대적으로 낮은 *ASKβ*의 발현 수준이 뿌리, 로제트 잎, 줄기 및 장각(silique)에서 검출되었다. 이와 대조적으로, 상당히 높은 발현 수준은 꽃눈에서, 특히 "꽃 단계 13-16"의 후기에 검출되었다. 실험 결과와 일치하게, 2개의 독립적인 공개 데이터세트(independent publicly available datasets)는 *ASKβ*가 꽃 조직에서 대부분 발현된다는 것을 나타낸다. 발달 중인 화분에서 *ASKβ*를 포함한 그룹 III *ASKs*의 보고된 발현을 기반으로, *ASKβ*의 주요 기능이 다른 조직이나 세포 유형에는 거의 또는 전혀 역할이 없고 화분 발달과 관련되어 있다는 것을 추정하였다.

[0071] **실시예 3. *ASKβ* 수준의 녹-다운(knock-down)은 감소된 임성을 초래한다.**

[0072] *ASKβ* 발현이 감소된 식물체의 표현형을 관찰하기 위해 안티센스 기술을 사용하였다. *ASKβ*(*SAIL_66_D05*)의 프로모터 영역에 삽입물을 포함하는 라인은 존재하지만, *ASKβ*의 코딩 영역에 T-DNA 삽입물을 포함하는 삽입 식물체 라인은 공개되어있지 않다. 그러나 반-정량 RT-PCR에 의해 검출된 것처럼, *ASKβ* 발현의 감소는 야생형(WT, wild-type)과 비교하여 삽입 동형접합 식물체에서 검출되지 않았다. 이러한 결과는 우리가 안티센스 기술을 채택하게 했다. 안티센스 구조물은 항시성 CaMV 35S 프로모터의 조절하에 있는 전체 *ASKβ* 코딩 영역을 포함했다(도 3A). 글루포시네이트 선발 후에, T0 형질전환체는 *AKS-P2* 및 35S 프라이머 세트를 이용한 게놈 DNA PCR에 의해 추가로 확인되었다. 7개의 독립적인 T2 형질전환 라인에서, *ASKβ* 발현에 의한 다양한 영향이 검출되었다(도 3B 및 C): 4개 라인(라인 4, 25, 29 및 33)은 70% 이상의 *ASKβ* 발현 감소를 보여주었고, 2개의 라인(라인 2 및 20)은 10 내지 30% 감소를 나타냈으며, 1개의 라인(라인 24)는 감소가 나타나지 않았다. *ASKβ*에서 관찰된 발현의 변화와 달리, *ASKθ*(*ASKβ*에 가장 밀접하게 연관된 분기군 III의 다른 *ASK*)의 발현 수준은 단지 약간 감소되거나 감소되지 않는 것으로 나타났다. 영양생장(vegetative growth) 동안, 형질전환 식물체와 야생형(WT, wild-type) 식물체 사이의 표현형 차이는 관찰되지 않았다(도 3D). 또한 *ASKθ* 및 *ASKβ*의 발현 수준 사이의 상관관계를 관찰하지 못했고(도 3C), *ASKα* 또는 *ASKγ*의 안티센스 하향조절에 대해 보고된 꽃 표현형이 없었기 때문에, 본 발명의 *ASKβ* 안티센스 발현의 영향이 상당히 특이적이라고 추정했다. 안티센스 형질전환 식물에서 장각 크기 및 장각 당 종자의 수를 포함한 생식 특성(reproductive traits)은 식물의 표현형에 비해 유의한 차이를 나타냈다. 가장 중요하게, 종자 수는 *ASKβ*의 감소된 발현에 의해 크게 영향을 받았으나, *ASKθ*에 의해서는 영향 받지 않았다(도 3D 및 E).

[0073] **실시예 4. *ASKβ*의 하향조절은 단핵기(uninucleate stage) 이후의 소포자(microspore) 발달에서 결함을 이끈다.**

[0074] 이전에 *ASKβ* 발현이 화분에서 관찰되었기 때문에, 안티센스 형질전환 라인의 감소된 임성의 가능한 원인 한 가지가 *ASKβ* 안티센스 식물체의 중단된 화분 발달이라는 것을 의심했다. *ASKβ* 안티센스 라인의 꽃밥은 야생형(WT, wild-type, (Col-0)) 형태를 나타낸다는 것을 발견했다. 그러나 생존도 검사를 위해, 변형된 알렉산더 염색법(Alexanders stain)을 성숙한 화분 입자에 적용했을 때, 형질전환 식물체의 화분의 상당수가 발육이 중단된

것이 발견되었다. 화분 발육이 중단된 표현형의 심각성은 *ASKβ* 발현에 대한 안티센스 효과의 강도와 명확한 상관관계를 보여주었다(도 3). 화분 발달에서 *ASKβ*의 기능을 규명하는 첫 번째 단계로서, 다양한 발달 단계에서 야생형(WT, wild-type)과 *ASKβ* 안티센스 식물의 발달하는 웅성 배우자체(male gametophyte)의 형태가 알렉산더 염색 후에 광학 현미경 하에서 체계적으로 비교되었다(도 4). 사배체기(tetrad stage) 이전의 야생형(WT, wild-type)과 *ASKβ* 안티센스 식물 사이에는 두드러진 차이가 없었다(데이터 미제시). 도 4에 개시한 바와 같이, 소포자(microspore)는 사배체기 및 단핵기에 야생형(WT, wild-type)과 *ASKβ* 안티센스 식물에서 매우 유사했다. 그러나 명백한 차이가 상기 단계 이후에 관찰되었다. 이세포기(bicellular stage)부터 성숙기까지, 야생형(WT, wild-type) 소포자는 점진적으로 커지는 형태의 전형적인 원형을 나타냈다. 반면에, 안티센스 형질 전환 라인의 일부 *ASKβ* 소포자는 세포질 수축(cytosol shrinkage)의 현상을 나타냈으며, 이는 온전한 화분 입자로 발달하는 것의 실패가 원인인 것으로 나타났다. *ASKβ* 안티센스 화분의 결함은 삼세포기(tricellular stage)에 더 명백하게 나타났다. 일부 성숙 화분 입자의 내부 물질 손실은 더 작거나 쪼그라든 화분 입자의 생산을 야기했다. *ASKβ* 녹-다운(knock-down)은 융단조직 발달 및 분화에도 영향을 미치고, 그것 때문에 간접적으로 화분 발달에 결함이 발생하는지 조사하기 위해, 반초박 횡단 절편(semithin transverse section)을 꽃밥 단계 8에서 13으로부터 제작되었다. 꽃밥 단계 8에서, 소포자는 융합조직 벽(callose wall)의 분해에 따라 사배체(tetrad)로부터 분리되었다. 꽃밥 단계 9부터 12(꽃 단계 10에서 12)에 소포자는 화분 입자로 발달한다. 융단조직(tapetum) 분해는 단계 10 및 11 동안 발생한 반면, 삼세포 반수체(tricellular haploid) 화분 입자를 형성시키는 화분 유사분열(pollen mitosis)은 꽃밥 단계 12 동안 관찰되었다. 단계 13 및 14에는, 꽃밥 열개(dehiscence) 및 꽃밥 세포의 수축이 각각 발생했다. 결함 화분 입자를 생산하는 *ASKβ* 안티센스 형질전환 식물체에서, 융단조직 분화는 야생형(WT, wild-type) 식물의 분화와 동일한 것으로 보였다. 이들 라인에서 관찰된 정상 꽃밥 형태 및 융단조직 분화는 *ASKβ* 수준의 억제가 꽃밥의 포자체 조직(sporophytic tissue)에 영향을 주지 않고, 분명하게 소포자 발달을 방해한다는 것을 나타낸다.

[0075] 실시예 5. 일부 *ASKβ* 동시발현 유전자는 화분 발달의 후기 단계에 관련된다.

[0076] 화분 발달 동안 *ASKβ*가 어떻게 기능하는지에 대한 단서를 얻기 위해, "발현 앵글러(Expression Angler)"를 사용하여 *ASKβ*와 동시발현되는 유전자를 분석했다. 총 641개의 동시발현 유전자가 분리되었고, agriGO에서 단일 축적 분석 장비(singular enrichment analysis tool)를 사용한 GO 어노테이션(gene ontology annotation) 분석이 수행되었다. 32개의 유전자가 포함된 "화분 발달 과정(GO:0009555)" 범주의 유전자들이 고도로 나타났다(p 값 = $1.30E-11$)(표 2). 이들 32개 유전자의 발현 양상은 애기장대 eFP 브라우저(<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>)를 사용하여 재구축하였다(도 5A). *ASKβ* 뿐만 아니라 이들 유전자 모두는 삼세포기 및 성숙기의 화분 입자에서 고도로 발현되었고, 이는 *ASKβ* 안티센스 표현형에 대한 시간 프레임(frame)과 일치한다(도 4). 상기 언급된 32개 유전자의 기능은 표 2에 요약되어 있으며, 이들 유전자의 많은 녹-아웃들은 정세포(sperm cell) 분화, 화분벽 조립(assembly) 및 화분관(pollen tube) 성장의 후기 단계에서 화분 발달에 영향을 미치는 것으로 보고되어 왔다.

[0077] 동시발현 유전자는 동일한 또는 유사한 전사 인자(들)에 의해 조절되는 경향이 있기 때문에, *ASKβ*의 조절에 대한 정보를 얻기 위해 이들 유전자의 프로모터 서열을 분석했다. CREs(cis-regulatory elements)는 종종 전사 개시 위치의 500bp 업스트림 영역 내에 분포되어 있고, 그들의 분포는 주로 프로모터의 전사 활성을 결정한다. *ASKβ* 및 32개의 동시발현 유전자의 프로모터 영역의 분석은 $E \leq 1.00E+02$ 의 컷오프 값에서 6개의 보존된 CREs를 확인했다. 특히, PLACE 데이터베이스에서 *POLLENILELAT52* 및 *MYB1AT*로 어노테이션된(annotated) 2개의 CRE 모티프(모티프 1 및 3)는 모든 프로모터 영역에서 발견되었다(도 5B 및 C). *POLLENILELAT52*는 화분-특이적 활성화를 지정하고, 토마토 *lat52* 유전자에서 처음으로 규명되었으며, *MYB1AT*는 MYB 인식을 위한 CRE이다.

표 2

[0078] 화분 발달과 연관된 *ASKβ* 및 이의 동시발현 유전자

로커스	베이트에 대한 R-값	유전자 이름	발현 양상	녹아웃의 표현형
At3g21180	0.983	ACA9	화분에 주로 발현	종자 세트 감소; 화분관 성장과 수정 결함
At1g24520	0.977	BCP1	이배체 tapetum 및 반수체 소포자	화분 세포질 변성 및 세포 함량 손실
At4g05330	0.967	AGD13	—	5-10% 이세포화 화분 입자
At3g57390	0.965	AGL18	웅성 및 자성 배우자체, 화분	—

At3g62230	0.964	DAF1	화분 정세포	—
At5g64510	0.958	TIN1	높은 화분 발현	비정상적인 화분 표면형태
At2g32460	0.953	MYB101	—	잘못 배열된 정세포 단위
At3g01040	0.947	GAUT13	화분 입자 및 화분관	화분관 성장 결함
At2g02970	0.945	APY6	성숙한 화분 입자 발현	화분외피 양상의 사소한 변화
At5g39400	0.935	ATPTEN1	화분 입자에 독점적으로 발현	유사분열 후 화분 세포 사멸
At3g47440	0.934	TIP5;1	화분 정세포	외인성 질소의 부재하에 화분관 결함
At4g35700	0.934	DAZ3	화분 정세포	—
At1g53320	0.916	ATTLP7	—	이세포화 화분 입자
At2g35210	0.904	RPA	—	성숙한 화분입자 및 세포질 분해로 정세포 없음
At2g03060	0.902	AGL30	개화조직	감소된 화분 입성
At5g22000	0.894	RHF2A	수술 및 심피	입성 및 자성 배우체의 형성 결함
At3g10470	0.893	—	—	—
At1g68610	0.889	PCR11	화분 정세포	—
At1g47270	0.885	ATTLP6	—	이세포화 화분 입자
At5g15470	0.875	GAUT14	화분 입자 및 화분관	화분관 성장 결함
At5g59030	0.868	COPT1	배아, 상체, 화분 및 뿌리	강화된 영양 유도 화분 기형 표시
At5g39650	0.867	DAU2	화분 정세포	—
At5g23670	0.849	LCB2	애기장대에서 흔히 발현	돌연변이 엔도메브레인 및 내막층 결핍을 포함한 화분
At3g50310	0.848	MKKK20	화분 정세포	—
At5g02390	0.838	DAU1	화분 정세포	—
At2g18080	0.834	EDA2	—	—
At5g53520	0.829	ATOPT8	화분 정세포	—
At1g18750	0.829	AGL65	개화조직	감소된 화분 입성
At1g22130	0.827	AGL104	개화조직	감소된 화분 입성
At1g77980	0.824	AGL66	개화조직	감소된 화분 입성
At2g42380	0.818	ATBZIP34	배우체 및 포자체 조직	기형 및 잘못 놓인 핵; 외피형태 결함
At1g19890	0.814	ATMGH3	화분 정세포	—

[0079] 실시예 6. *TDF1*(*TAPETAL DEVELOPMENT AND FUNCTION 1*) 및 6개의 화분-발현 유전자는 각각 *ASKβ*의 업스트림 추정 조절자 및 다운스트림 구성요소이다.

[0080] 애기장대에서 꽃밥 및 화분 발달을 조절하는 전사 인자는 돌연변이 분석을 이용하여 잘 연구되었고, 많은 다운스트림 추정 유전자도 마이크로어레이 분석에 의해 밝혀졌다. 이러한 이전에 얻어진 데이터셋으로부터, *ASKβ* 및 이의 동시발현 유전자의 발현 수준을 얻었고, 목적 유전자의 야생형(WT, wild-type) 및 돌연변이체 사이의 비율로 그들을 재구성했다(도 5D 및 E). 음성 배우자체 발달을 위한 잘 알려진 전사 인자의 돌연변이체 백그라운드(background) 중, *ASKβ* 발현은 *tdf1* 백그라운드에서만 강하게 감소된 반면(도 5D), 다른 MYB 전사인자인 MYB80(MYB103으로도 알려짐)에서는 어떠한 효과도 나타나지 않았다. 이러한 결과는 *TDF1*이 *ASKβ* 전사를 위한 필수적인 업스트림 전사인자인 반면, 분석에 사용된 다른 전사인자는 필수적이지 않다는 것을 나타낸다. 게다가, 32개 중 6개의 *ASKβ* 동시발현 유전자는 *tdf1* 돌연변이체에서 하향조절되었는데(도 5E), 이는 그들이 *TDF1*의 다운스트림에서 발현되고, *ASKβ*에 의해 조절될 수도 있다는 가능성을 제기한다: *At1g24520/BCP1*(*Brassica campestris* pollen protein 1의 상동체), *At3g62230/DAF1*(DUO1-Activated F-box 1), *At3g47440/TIP5;1*(추정 aquaporin TIP5-1), *At1g68610/PCR11*(plant cadmium resistance 11), *At3g21180/ACA9*(autoinhibited calcium ATPase 9) 및 *At1g47270/TLP6*(Tubby-like protein 6).

[0081] *ASKβ* 전사 캐스케이드(cascade)에서 업스트림 또는 다운스트림 유전자의 위치에 대한 우리의 가설을 확인하기 위해, 본 발명자는 야생형(WT, wild-type) 및 *ASKβ* 안티센스 형질전환 라인의 꽃눈을 사용하여 qRT-PCR을 수행하였다(도 6). 상기 분석에서, *TDF1*- 및 *MYB80*-의존 전사 조절에서 *ASKβ*의 위치를 좁히기 위해 *TDF1*의 다운스트림 유전자인 *MYB80*도 포함시켰다. 야생형(WT, wild-type) 식물과 비교하여, *ASKβ* 안티센스 형질전환 라인에서 *TDF1* 및 *MYB80*의 발현 수준은 변하지않았다(도 6A). *ASKβ* 발현이 *MYB80*의 돌연변이에 의해 영향 받지 않는 것을 감안하면(도 5D), 이러한 결과는 (1) *ASKβ*가 전사적으로 *TDF1*의 다운스트림을 조절한다는 것과 (2) *ASKβ* 및 *MYB80*은 *TDF1*의 다운스트림의 분리된 지점에 위치한다는 것을 나타낸다. 6개의 *ASKβ* 동시발현 유전자 및 *TDF1*-조절 유전자는 표 1에 요약된 것처럼 추정된 그들의 기능 또는 발현 특성에 의해 분류될 수 있다. *BCP1* 및

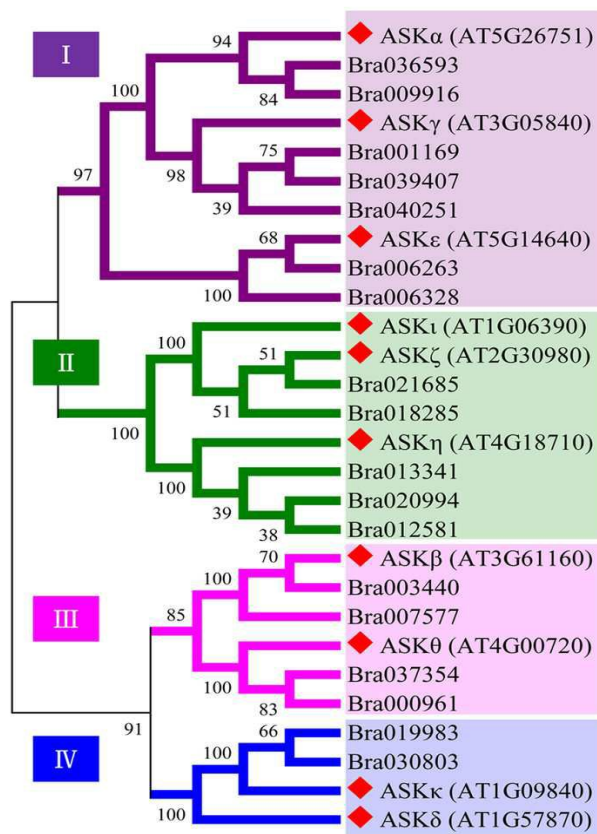
*ATLTP6*의 넥-아웃 돌연변이는 각각 세포기질 분해 및 후기 화분 발달에서의 결함을 유발한다. *DAF1*, *PCR11* 및 *TIP5;1*은 정세포 형성에 관련된 반면, *aca9* 화분은 종자 세트의 80% 이상의 감소를 나타낸다. *ASKβ*의 다운스트림 유전자에 대해 예상된 것처럼, 조사된 6개 유전자의 발현 양상은 야생형(WT, wild-type) 및 다양한 *ASKβ* 수준을 갖는 안티센스 형질전환 라인의 *ASKβ*의 발현 양상과 매우 유사했다(도 6B-E).

[0082] 실시예 7. *ASKβ* 억제제 이세포기(bicellular stage)에서 정세포 형성에 영향을 미친다.

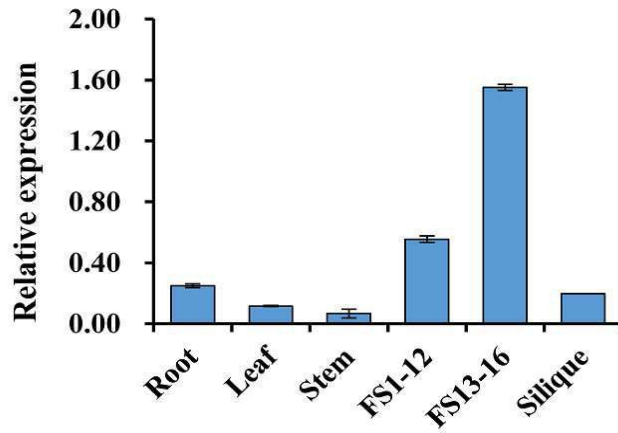
[0083] DAPI 염색은 화분 발달의 후기 동안 핵의 수, 형태 및 위치의 시각화를 용이하게 한다. 단핵 소포자에서, *ASKβ* 안티센스 식물의 DAPI-염색 화분은 정상적인 것으로 나타났다(도 7). 그러나 이세포기의 일부 화분 입자는 세포질 및 핵의 손실 때문에, 약간 더 작고 비정상적인 형태로 나타났다. 화분 입자의 전체적인 결함은 삼세포 및 성숙한 화분에서 더 분명해졌다. 따라서 발현 분석 결과와 함께, 상기 결과는 *ASKβ*가 후기 화분 발달에 요구되는 많은 중요한 유전자들의 활성화를 통해 애기장대 소배우자체형성(microgametogenesis)에서 중요한 역할을 수행한다는 결론을 이끈다.

도면

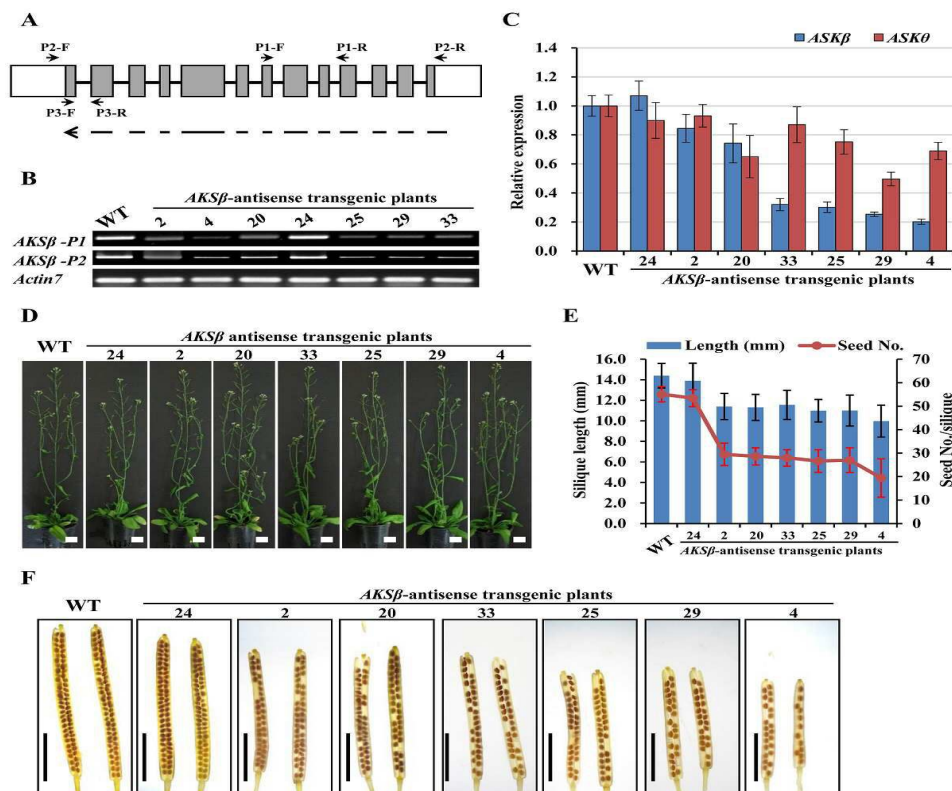
도면1



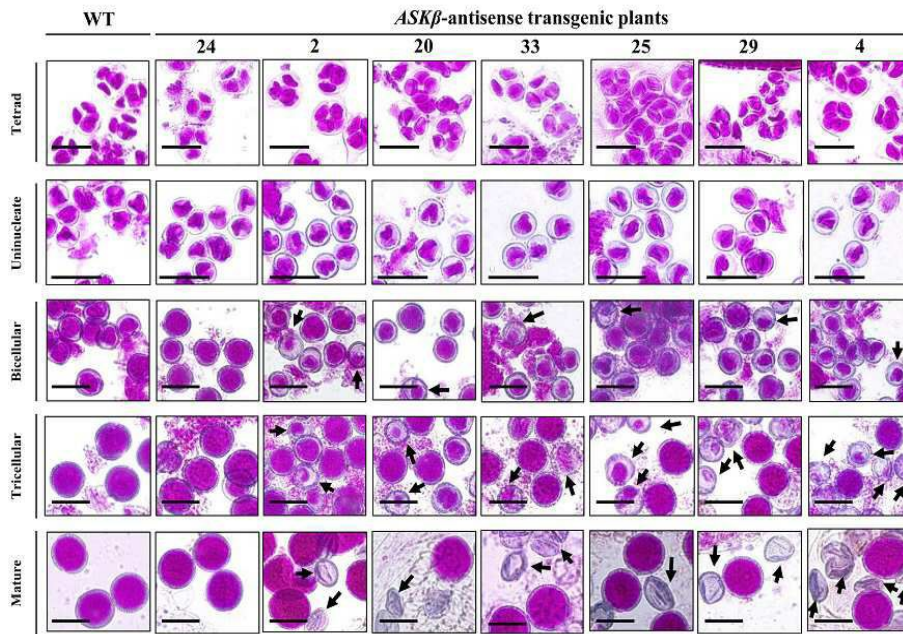
도면2



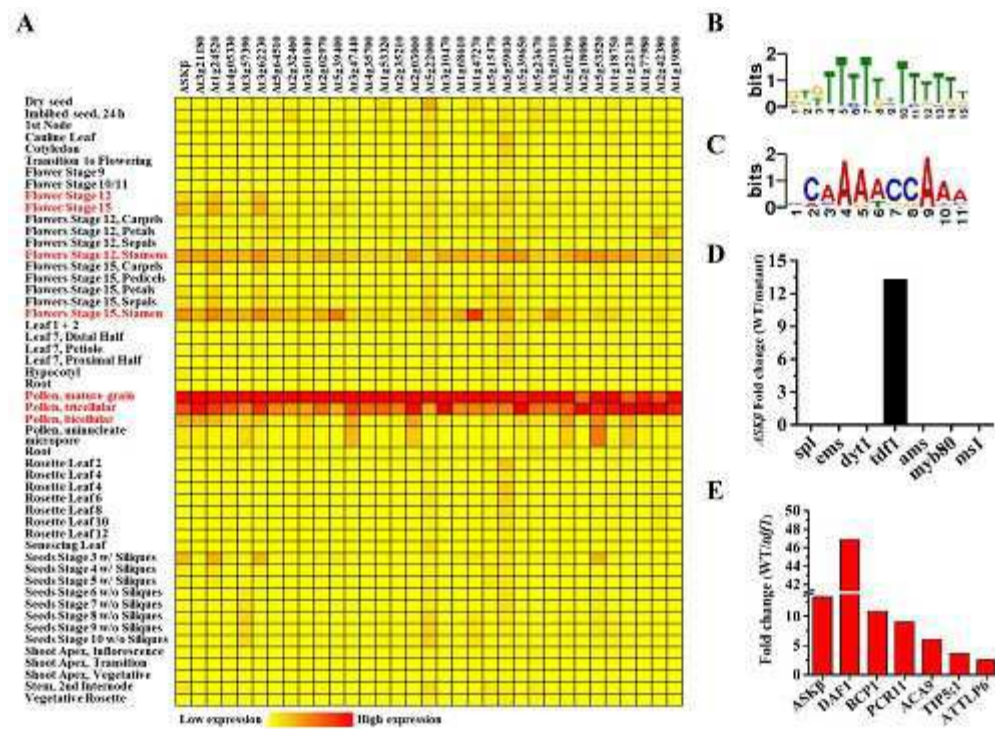
도면3



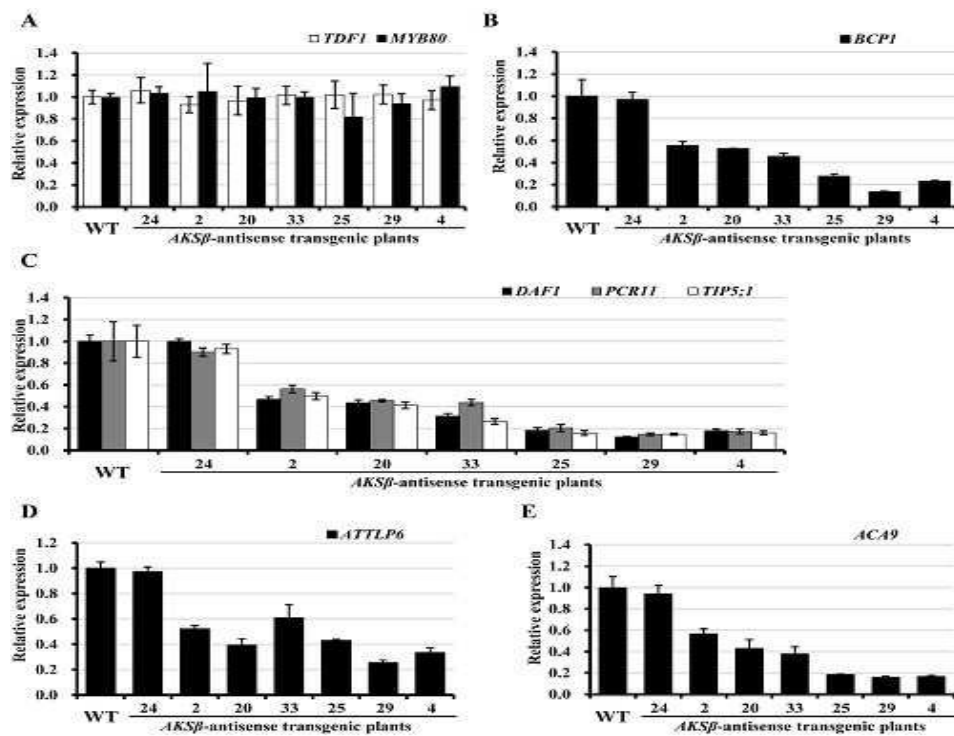
도면4



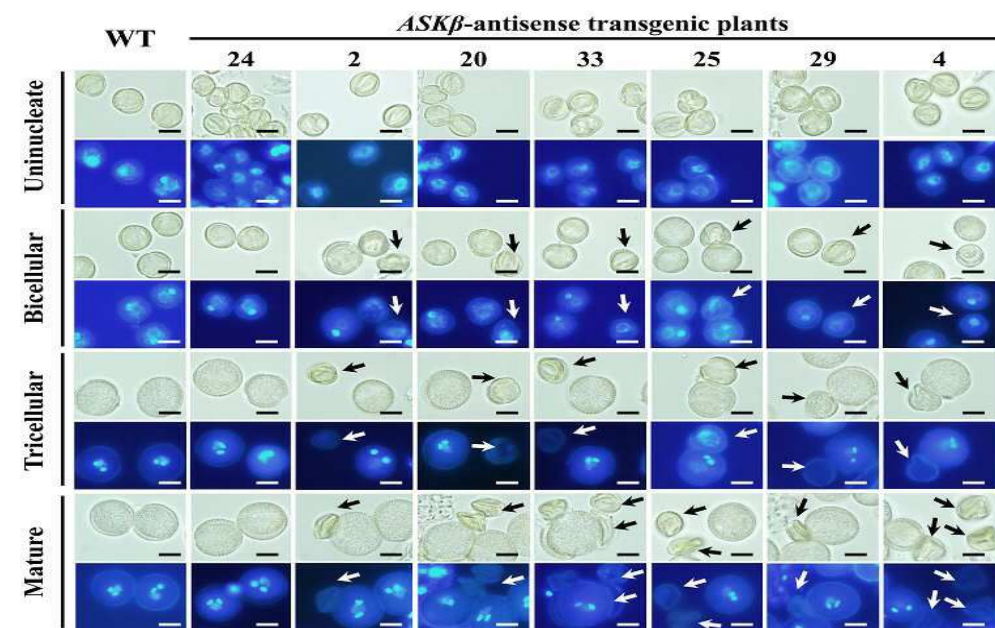
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> ASKbeta gene from *Arabidopsis thaliana* controlling fertility of plant and uses thereof
- <130> PN14341
- <160> 30

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1317

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

atgaatgtgg tgcggagatt aacgagtatt gcctctggac gtaatttcgt ttctttctgat 60

aacgtaggag aaactgagac gccgagatca aagcctaacc agaatcgtga agaaacagag 120

tctacggaaa ctacgtcgta cgagaaagat tctgtctctt cctcagagaa ctctgatcat 180

ttaccaaagg aaatccgtga ggtgggactt ggagatgaca aggatatgga ctgtggaatc 240

atcaaggga atggaacaga atctggacgg attattacca ccaaaaagaa gggtttgaat 300

gatcaaaaag acaagacaat ctcttacaga gctgaacatg taattggcac tggctcattc 360

ggtgttgtct ttcaggctaa gtgcttagag acggaagaaa aagtagcaat aaagaaagt 420

ttacaggaca agagatacaa aaacagagaa cttcagatca tgcaaatgct tgatcatcct 480

aatgtcgttg agctcaagca ttctttcttt tccacgactg agaaagacga gctttatctt 540

aacctgttc ttgagtatgt acccgagact atttaccgcg cttccagatc ttacaccaag 600

atgaatcagc atatgccttt gatttataatt cagctctaca cctatcagat ttgccgtgct 660

atgaattatc tgcataagt ggttggagtg tgcaccgtg acattaagcc gcagaatctg 720

ttggtcaata atgttacga tgaagtaaag atatgcgatt ttgggagcgc caaatgctg 780

attccaggag aaccaaatat atcttacata tgctcaaggt attacagac tcctgaactc 840

atatttggag caaccgaata cacaagtgcg atcgatatgt ggtctgtagg ttgtgtcatg 900

gctgagcttt ttcttggaca tcctctattc cctggagaaa ccagtgttga tcaattgggtg 960

gagatcatta agattttagg gacaccagca agagaagaga taaagaacat gaatcctcgt 1020

tacaatgatt ttaagttccc tcagatcaaa gctcagccgt ggcacaagat ttcccgaga 1080

caggtatctc cagaagcaat ggatcttgcc tctagattgc tccagtattc accaaacctg 1140

agatgcacag cgcttgaagc atgtgcacac ccattcttcg atgatctgag agacccgaga 1200

gcatccttgc ctaatggaag agcacttccct ccattgtttg atttcacagc tcaagaactt 1260

gctggggcat ctgttgaact gcgtcatcgc ttaatacctg agcatgcaag gaaatga 1317

<210> 2

<211> 438

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Asn Val Val Arg Arg Leu Thr Ser Ile Ala Ser Gly Arg Asn Phe

1	5	10	15
Val Ser Ser Asp Asn Val Gly Glu Thr Glu Thr Pro Arg Ser Lys Pro			
20	25	30	
Asn Gln Asn Arg Glu Glu Thr Glu Ser Thr Glu Thr Thr Ser Tyr Glu			
35	40	45	
Lys Asp Ser Val Ser Ser Ser Glu Asn Ser Asp His Leu Pro Lys Glu			
50	55	60	
Ile Arg Glu Val Gly Leu Gly Asp Asp Lys Asp Met Asp Cys Gly Ile			
65	70	75	80

Ile Lys Gly Asn Gly Thr Glu Ser Gly Arg Ile Ile Thr Thr Lys Lys			
85	90	95	
Lys Gly Leu Asn Asp Gln Lys Asp Lys Thr Ile Ser Tyr Arg Ala Glu			
100	105	110	
His Val Ile Gly Thr Gly Ser Phe Gly Val Val Phe Gln Ala Lys Cys			
115	120	125	
Leu Glu Thr Glu Glu Lys Val Ala Ile Lys Lys Val Leu Gln Asp Lys			
130	135	140	
Arg Tyr Lys Asn Arg Glu Leu Gln Ile Met Arg Met Leu Asp His Pro			

145	150	155	160
Asn Val Val Glu Leu Lys His Ser Phe Phe Ser Thr Thr Glu Lys Asp			
165	170	175	
Glu Leu Tyr Leu Asn Leu Val Leu Glu Tyr Val Pro Glu Thr Ile Tyr			
180	185	190	
Arg Ala Ser Arg Ser Tyr Thr Lys Met Asn Gln His Met Pro Leu Ile			
195	200	205	
Tyr Ile Gln Leu Tyr Thr Tyr Gln Ile Cys Arg Ala Met Asn Tyr Leu			
210	215	220	

His Gln Val Val Gly Val Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu			
225	230	235	240

Leu Val Asn Asn Val Thr His Glu Val Lys Ile Cys Asp Phe Gly Ser
 245 250 255
 Ala Lys Met Leu Ile Pro Gly Glu Pro Asn Ile Ser Tyr Ile Cys Ser
 260 265 270
 Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Glu Tyr Thr
 275 280 285
 Ser Ala Ile Asp Met Trp Ser Val Gly Cys Val Met Ala Glu Leu Phe
 290 295 300
 Leu Gly His Pro Leu Phe Pro Gly Glu Thr Ser Val Asp Gln Leu Val
 305 310 315 320
 Glu Ile Ile Lys Ile Leu Gly Thr Pro Ala Arg Glu Glu Ile Lys Asn
 325 330 335
 Met Asn Pro Arg Tyr Asn Asp Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala Gln
 340 345 350
 Pro Trp His Lys Ile Phe Arg Arg Gln Val Ser Pro Glu Ala Met Asp
 355 360 365
 Leu Ala Ser Arg Leu Leu Gln Tyr Ser Pro Asn Leu Arg Cys Thr Ala
 370 375 380
 Leu Glu Ala Cys Ala His Pro Phe Phe Asp Asp Leu Arg Asp Pro Arg
 385 390 395 400
 Ala Ser Leu Pro Asn Gly Arg Ala Leu Pro Pro Leu Phe Asp Phe Thr
 405 410 415
 Ala Gln Glu Leu Ala Gly Ala Ser Val Glu Leu Arg His Arg Leu Ile
 420 425 430
 Pro Glu His Ala Arg Lys

435

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

atgcgatttt gggagcgcca	20
<210> 4	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
tgtgccacgg ctgagctttg a	21
<210> 5	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
cgatgaatgt ggtgcggaga ttaacg	26
<210> 6	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
catctgcgta gagaagcagc cattaacc	28
<210> 7	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 7	
gcggagatta acgagtattg cc	22
<210> 8	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	

<400>	8	
cagaatcttt ctcgtacgac g		21
<210>	9	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
gcttcgggtc ggacctcc		18
<210>	10	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
ctcgcgggtg gcatttcg		18
<210>	11	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
gagcgatttc cttctctcgg acc		23
<210>	12	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
gatgtattcg gcttcgatgt tgaaatg		27
<210>	13	
<211>	23	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gtctcctgcc gttgcagctt gga 23

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

aatctcctct tgatcaacca cttctccc 28

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

ctcaggaagt gcagtggaca tcatt 25

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

ctaatgcagc cctttggtaa tagc 24

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

tactcctggg gacgggtgacg ttgca 25

<210> 18

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 aacgacgacc gcagagacgc 20
 <210> 19
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 cgggtatgga ggaagcagtc tctac 25
 <210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 ccgatgacca agtccaaatc gc 22

 <210> 21
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 tctctgtgat tgacagagag gtaagaga 28
 <210> 22
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 22
 tcgtctcacc cagctttctt c 21

<210> 23
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 23
 cgaaagaaat tgatgagaag aatgatt 27

<210> 24
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 24
 agccatcaat ttccttgaag acatg 25

<210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 25
 ctctcttcg gaatcgaagc tca 23

<210> 26
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 26
 ttgaaattaa aagccttctc ttctcg 26

<210> 27
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400>	27	
caatccactt gctttgaaga c		21
<210>	28	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	28	
ccatcattgc gataaaggaa ag		22
<210>	29	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	29	
agtggtcgta caaccgtat tgt		23
<210>	30	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	30	
gaggatagca tgtggaactg agaa		24