(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022 년 3 월 31 일 (31.03.2022)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2022/065759 A1

(51) 국제특허분류:
A01H 1/06 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/012252

(22) 국제출원일: 2021 년 9 월 9 일 (09.09.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0124428 2020 년 9 월 25 일 (25.09.2020) KR

(71) 출원인: 경상국립대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

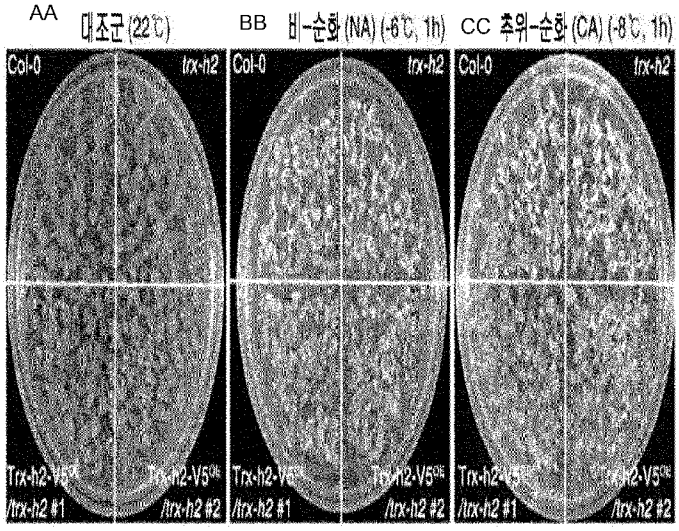
(72) 발명자: 이상열 (LEE, Sang Yeol); 52826 경상남도 진주시 진주역로96번길 15, 102동 3003호, Gyeongsangnam-do (KR). 이은선 (LEE, Eun Seon); 52829 경상남도 진주시 내동로348번길 10, 가좌그린빌 102동 704호, Gyeongsangnam-do (KR). 박정훈 (PARK, Joung Hun); 52829 경상남도 진주시 내동로348번길 10, 가좌그린빌 102동 704호, Gyeongsangnam-do (KR). 위성동 (WI, Seong Dong); 52822 경상남도 진주시 가좌길40번길 8, 행복빌 501호, Gyeongsangnam-do (KR). 강창호 (KANG, Chang Ho); 52502 경상남도 사천시 곤명면 만지2길 20-12, Gyeongsangnam-do (KR). 채호병 (CHAE, Ho Byoung); 52703 경상남도 진주시 순환로 503, 라온프라이빗시티럭스 416호, Gyeongsangnam-do (KR). 팽슬기 (PAENG, Seol Ki); 52827 경상남도 진주시 진주대로500번길 8, 204호, Gyeongsangnam-do (KR). 배수빈 (BAE, Su Bin); 52700 경상남도 진주시 석갑로53번길 10, 들말대경아파트 104동 1305호, Gyeongsangnam-do (KR).

(74) 대리인: 김동완 (KIM, Dong Wan); 06134 서울시 강남구 테헤란로 119, 10층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,

(54) **Title:** COLD-RESISTANT TRANSGENIC PLANT OVEREXPRESSING THIOREDOXIN TRX-H2 PROTEIN

(54) **발명의 명칭:** 티오레독신 TRX-H2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체



AA ... Control (22 °C)
BB ... Non-acclimation (NA) (-6 °C, 1h)
CC ... Cold-acclimation (CA) (-8 °C, 1h)

(57) **Abstract:** The present invention relates to a low-temperature-resistant transgenic plant overexpressing thioredoxin Trx-h2 protein. More specifically, the present invention relates to a cold-resistant transgenic plant that overexpresses C-repeat binding factor 1 (CBF 1) as a cold response transcription factor, and thioredoxin Trx-h2 protein as an interactive partner.

(57) **요약서:** 본 발명은 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 저온 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 추위 응답 전사인자인 C- 반복 결합인자 1(CBF 1)과 상호 활성 파트너인 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다.

WO 2022/065759 A1

[다음 쪽 계속]

AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 티오레독신 TRX-H2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체

기술분야

[1] 본 발명은 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 추위 응답 전사인자인 C-반복 결합인자 1(CBF 1)과 상호 활성 파트너인 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 저온 스트레스는 식물 재배 및 성장에 치명적인 영향을 미치며 농업 작물의 생산성을 제한한다. 저온에 대처하고 동결 내성을 수득하기 위해 식물은 '저온 순응(cold acclimation)'이라는 메커니즘을 작동시켜 동결되지 않은 온도에 노출되었을 때 세포 대사의 대규모 재프로그래밍 및 조직 구조의 재구성을 경험하게 된다. Apetala2/에틸렌 반응 인자 패밀리에 속하는 전사인자인 C-반복 결합 인자(CBF)를 암호화시킨 유전자는 저온 순응에서 가장 중요한 역할을 하게 된다.

[4]

[5] 그러나 CBF 유전자 발현은 저온 신호전달 인자 뿐만 아니라 다양한 식물 호르몬에 의해서도 조절된다. 따라서 CBF는 저온- 및 호르몬- 신호전달 경로 사이의 엇갈린 중심 교차점을 나타낸다. 이는 CBF가 식물 성장 조절 및 저온 스트레스로부터 식물체를 보호하는 다양한 기능을 지니고 있음을 시사한다.

[6]

[7] 비정상적인 CBF의 과발현은 식물체의 동결 내성을 강하게 하지만 식물 성장에 해롭다. 더욱이 cbf1-3 삼중 넉아웃 변이 식물체(이하 cbfs로 지칭됨)는 동결에 매우 민감한 것으로 나타나지만 주위 온도 하에서 종자 발아, 초기 발달 및 스트레스에 대해서는 낮은 민감도를 나타낸다. 이러한 데이터는 따뜻한 조건하에서 CBF 발현의 결정적인 임계값이 필요함을 시사한다.

[8]

[9] 결과적으로 상이한 온도 하에서 CBF 활성의 정확한 제어는 식물이 정상적인 생장 및 내한성을 유지하는 데 중요하다. 저온 조건에서 CBFs 발현의 전사 제어에 대한 광범위한 연구에도 불구하고 그들의 활동 조절의 많은 측면은 애매하게 남아 있다.

[10]

[11] CBF 활성이 어떻게 조절되는지 이해하기 위해, 저온 처리 유무에 관계없이 야생형(에코 타입, Col-0) 아라비돕시스에서 CBF(CBF1-3)의 발현 수준과 단백질

구조를 조사하였다(도 1a). Col-0 식물로부터 추출된 총 단백질을 환원 및 비환원 SDS-PAGE 겔 상에서 분리하고 실험실에서 제조된 항-CBF 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 처리하였다. 따뜻한 조건(22 ℃) 하의 식물에서는 약간의 CBF가 있었으며, 저온(4 ℃) 노출 기간에 따라 증가된 단백질 양이 환원되는 것이 겔에 의해 측정되었다(도 1a; 하부 패널).

[12]

[13] 그러나 비-환원성 겔상의 단백질은 CBF가 22 ℃에서 모노머가 거의 없는 고분자량(HMW) 밴드(올리고머를 나타냄)를 생성함을 나타내었다(도 1a; 상부 패널, 레인 1). 대조적으로 저분자량 올리고머 및 모노머 CBF의 수준은 4 ℃에서 크게 증가한 반면에 CBF 높은 올리고머의 수준은 감소하였다(레인 2-4). 이는 CBF 모노머가 저온-유도 신생합성 뿐만 아니라 고분자량 CBF 올리고머의 저온-의존성 분해 모두로부터 유도됨을 시사한다.

[14]

[15] 이러한 CBF의 고분자량 올리고머에서 저급 올리고머 및 모노머로의 저온 의존적 구조 전환은 저온 스냅에 대한 식물의 초기 반응 및 저온 적응을 유도하는 식물의 능력을 나타내는 것으로 여겨진다.

[16]

[17] CBF의 구조적 전환이 그들의 상호 작용 파트너에 의해 제어될 수 있다고 가정하고, 6 시간 동안 4 ℃에 노출시킨 CBF1-MycOE 아라비돕시스에서 추출된 총 단백질을 사용하여 면역침전(IP)/질량 분석법에 의해 상호 작용 성분을 식별하고자 하였다(도 5a, b).

[18]

[19] 따라서 본 발명자들은 아라비돕시스 trx-h2 넉아웃 변이체와는 달리, Trx-h2 과발현 식물체는 높은 저온 저항성을 지님을 확인하고 저온-매개 산환 환원 변화가 CBF의 구조적 변화인 고분자량 올리고머에서 저급 올리고머 및 모노머로의 저온 의존적 구조 전환과 더불어 기능 활성화를 유도하여 식물체에 저온 저항성을 부여하는 메커니즘을 규명하고 본 발명을 완성하게 된 것이다.

[20]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[21] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 아라비돕시스 trx-h2 넉아웃 변이체와는 달리, Trx-h2 과발현 식물체는 높은 저온 저항성을 지님을 확인코자 한 것이다. 저온-매개 산환 환원 변화가 CBF의 구조적 변화인 고분자량 올리고머에서 저급 올리고머 및 모노머로의 저온 의존적 구조 전환과 더불어 기능 활성화를 유도하여 식물체에 저온 저항성을 부여하는 메커니즘을 규명코자 한 것이다.

[22]

과제 해결 수단

[23] 본 발명의 목적은 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 있어서, 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니는 C-반복 결합인자 1(CBF 1)과 상호 작용하여 CBF 1을 0~10 ℃의 저온에서 고분자량의 올리고머로부터 저분자량의 모노머로 해리 전환시켜 형질전환 식물체에게 저온 저항성을 부여함을 특징으로 하는 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[24]

[25] 이때 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 2번째 아미노산 잔기인 글리신에 의해 세포질에 미리스토일화 되어 있으나 0~10 ℃의 저온에서 세포질로부터 탈미리스토일화 되어 Trx-h2 단백질이 핵으로 트랜스로케이션 되어 CBF 1과 상호 작용하여 CBF 1의 구조적 전환을 야기시켜 식물체에 저온 저항성을 부여함을 특징으로 한다.

[26]

[27] 한편 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 31번째 잔기로부터 133번 잔기 까지 122개의 아미노산을 지닌 잘 보존된 Trx 모티프를 지니며 Trx 모티프 내의 59번째 및 62번째 잔기인 시스테인이 CBF 1과 상호 작용함을 특징으로 한다.

[28]

[29] 또한 상기 C-반복 결합인자 1(CBF 1) 내의 23번, 30번, 100번, 117번 및 137번째 보존된 잔기인 시스테인이 티오레독신 Trx-h2 단백질과 상호 작용함을 특징으로 한다.

[30]

발명의 효과

[31] 본 발명의 효과는 아라비돕시스 trx-h2 넉아웃 변이체와는 달리, 높은 저온 저항성을 지닌 Trx-h2 과발현 식물체를 제공하는 것이다. 저온-매개 산환 환원 변화가 CBF의 구조적 변화인 고분자량 올리고머에서 저급 올리고머 및 모노머로의 저온 의존적 구조 전환과 더불어 기능 활성화를 유도하여 저온 저항성을 지닌 Trx-h2 과발현 식물체를 제공하는 것이다.

[32]

도면의 간단한 설명

[33] 도 1은 본 발명의 세포질 Trx-h2의 저온-매개 탈-미리스토일화는 그의 핵 트랜스로케이션이 CBF 올리고머와 상호 작용하고 이를 모노머로 해리할 수 있게 함을 나타낸 도면이다.

[34]

[35] 도 1a는 CBF의 저온-의존적 발현 및 4℃ 에서 Col-0 식물체에서 올리고머로부터 모노머로의 구조적 전환을 나타낸 것이다. 지시된 시점 동안 4℃에서 배양된 식물로부터 총 단백질을 추출한 후, CBF 수준 및 구조적 변화를

각각 웨스턴 블롯팅에 의한 환원 (하단) 및 비-환원 (상단) SDS-PAGE 겔에서 분석하였다. 겔 오른쪽의'O'와'M'은 CBF 올리고머와 모노머를 나타낸다. 도 1b는 SDS-PAGE 겔에 의해 분석된 His-CBF에 의한 Trx-h2의 시험관내 풀다운 분석 및 대조군으로서 His-MBP에 의한 웨스턴 블롯팅을 나타낸 것이다. 도 1c는 22℃ 또는 4℃에서 6 시간 동안 배양된 CBF-Myc^{OE}식물의 전체 추출물로부터의 CBFs-Myc의 Co-IP를 나타낸 것이다. 도 1d는 4 ℃ 또는 22 ℃에서 6 시간 동안 배양된 N. 벤타미아나 잎에서 공동 발현된 Trx-h2-YN 및 YC-CBF로 수행된 BiFC 분석을 나타낸 것이다. 도 1e는 22 ℃ 또는 4 ℃에서 6 시간 동안 배양된 담배 잎에서 Trx-h2-YFP의 세포 내 위치를 나타낸 것이다. 도 1f는 22 ℃에서 Trx-h2-YFP 또는 Trx-h2 (G/A)-YFP를 나타내는 담배 잎에서 Trx-h2 위치에 대한 Gly의 효과를 나타낸 것이다.(d ~ f)에서 공초점 현미경으로 분석된 YFP 형광을 핵 마커 NLS-RFP (Merge)의 그것과 합체 시켰다. 명 시야 이미지 (Bright)와 스케일 바 (20μm)가 표시된다. 도 1g는 22℃ 또는 4 에서 인큐베이션 시킨 Col-0 식물로부터 핵 및 비-핵 분획을 분리하여, 웨스턴 블롯팅에 의한 Trx-h2의 검출을 나타낸 것이다. 항 히스톤-H3 및 항-PEPC 항체를 핵 및 비-핵 마커로 사용하였다. 도 1h 및 1i는 Trx-h2의 미리스테이트는 22℃ 및 4℃에서 6 시간 동안 배양된 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2 식물(h) 또는 22℃에서 Trx-h2(G/A)-V5^{OE}/trx-h2 의 식물(i) 에서 도 9에 나타난 프로토콜에 의한 측정을 나타낸 것이다. Trx-h2의 미리스토일화 SDS-PAGE 겔에서 검출 가능한 이동성 변화를 유발하지 않았다.

[36]

[37] 도 2는 저온 스트레스 하에서 시험관 내 및 생체 내에서 CBF1의 Trx-h2-매개 환원 및 모노머화를 나타낸 것이다.

[38]

[39] 도 2a 및 2b는 1mM DTT, 1mM H_2O_2(a)및 0.5mM NADPH, 1μM Trx 환원 효소 및 5μM Trx-h2 또는 Trx-h2(C/S)를 포함하는 Trx 시스템과 함께 25 ℃에서 30 분 동안 정제된 His-CBF1의 배양을 나타낸 것이다. (b) 구조적 변화는 비환원/환원 SDS-PAGE 겔 및 웨스턴 블롯팅 에서 분석되었다. 도 2c 및 2d는 웨스턴 블롯팅에 의해 분석된 4℃에서 인큐베이션 된 CBF1-Myc^{OE}/Col-0 (c) 및 CBF1-Myc^{OE} /trx-h2 (d) 식물체 내의 CBF1의 Trx-h2-매개 구조적 해리를 나타낸 것이다. 도 2e 및 2f는 P_{CBF1}:CBF1-Myc/ Col-0 식물에서 산화된 CBF1 모노머로 CBF1 올리고머의 저온-유도된 해리(e)를 나타낸 것이다. 이는 환원 모노머로 전환되지만 P_{CBF1}:CBF1-Myc/trx-h2 의 Trx-h2 결핍 변이체내에서는 아니다 (f). 총 단백질을 추출한 후, mPEG-MAL로 처리하고 비-환원 겔에서 환원- 및 산화 -CBF1을 분리하고 웨스턴 블롯팅을 실시하였다. 2 개의 모노머 밴드는 환원된 (◁) 및 산화된 (◀) CBF1 모노머를 나타낸다. 도 2g 및 2h는 CBF1(C/S)은 시험관내 (g) 및 4 ℃ (h)에서 배양된 담배 잎에서 CBF1(C/S) -Myc를 발현하는 식물에서 산화 환원 변화에 민감하지 않다는 것을 나타낸 것이다. 도 2i 및 2j는 총 글루타티온 수준(GSH + GSSG) (i) 및 GSH/GSSG 비율 (j)에 의해 추정된

아라비돕시스에서의 저온-유도된 세포 산화 환원 변화를 나타낸 것이다. 도 2k 및 2l은 세포가 없는 시스템에서 1 시간 동안 GSH/GSSG 비율이 다른 CBF1-Myc^{OE}/Col-0(k) 및 CBF1-Myc^{OE}/trx-h2 (l) 식물에서 추출된 총 단백질을 인큐베이션 시킨 후 웨스턴 블롯팅으로 CBF1의 구조적 전환을 나타낸 것이다. 오른쪽에 있는 'O'및'M'은 각각 CBF1 올리고머와 모노머를 나타낸다.

[40]

[41] 도 3은 저온 스트레스 하에서의 COR15a 프로모터 및 COR 유전자 발현에 대한 CBF1의 Trx-h2 의존적 결합을 나타낸 것이다.

[42]

[43] 도 3a 내지 도 3d는 6 % 폴리아크릴아미드 겔 상에서 EMSA에 의해 분석된 COR15a 프로모터에 대한 CBF1의 산화 환원-의존적 결합을 나타낸 것이다. 비오틴-표지된 올리고 프로브를 1 mM DTT (a), 1 mM H_2O_2 (b) 및 5 μM Trx-h2 (c) 또는 Trx-h2 (C/S를 포함하는 Trx 시스템의 존재하에 His-CBF1과 함께 배양하였다 (d). His-MBP를 컨트롤로 사용한다. 도 3e는 COR15a 프로모터의 개략도를 나타낸 것이다. P1 및 P2는 qRT-PCR에 대한 프라이머 결합 부위를 나타낸다. 도 3f 및 3g는 22℃ (f) 또는 4℃ (g)에서 6 시간 동안 배양된 다양한 아라비돕시스 유전자형 내에서 P1 및 P2 영역과 CBF1의 결합에 대한 ChIP-qPCR 분석을 나타낸 것이다. 도 3h는 qRT-PCR에 의해 분석된 4 ℃에서의 대조군으로서 사용된 Col-0, trx-h2 식물 및 trx-h3에서의 대표적인 COR 유전자의 발현 수준을 나타낸 것이다.

[44]

[45] 도 4는 Trx-h2는 주로 CBF 신호 전달을 통해 아라비돕시스의 동결 내성을 향상시킴을 나타낸 것이다.

[46]

[47] 도 4a 내지 4f는 2 주령의 비-순응(NA) 및 저온-순응(CA) Col-0, trx-h2, Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2(라인 #1 및 #2)(a-c), 및 Trx-h2(C/S)-V5^{OE}/trx-h2(#1 및 #2) (d-f) 아라비돕시스에 대한 동결 내성 비교를 나타낸 것이다. 도 4g 내지 4i는 cbfs 및 Trx-h2-HA^{OE}/cbfs(#1및 #2)에 의해 분석된 저온 신호 전달에서 Trx-h2 및 CBF 사이의 유전적 관계를 나타낸 것이다. (a-i)에서 냉동 스트레스 후, 식물을 어두운 곳에서 12 시간 동안 4℃로 유지한 후 5 일 동안 22℃로 옮긴 후 사진(a, d, g)을 찍어 회복을 비교하였다. 식물의 동결 내성은 생존율(b, e, h) 및 전해질 누출(%)(c, f, i)에 의해 측정되었다. 도 4j는 본 발명자들의 결과 모델을 나타낸 것이다. 미확인된 데아실라제(가위로 표시됨)에 의한 세포질 Trx-h2의 저온 매개 탈미리스토일화 및 이의 핵 전위는 따뜻한 온도 및 저온 유도된 신생합성 CBF 모노머에 존재하는 CBF 올리고머를 포함하는 모든 산화된 (비활성) CBF를 감소시킨다. 환원된 (활성) CBF 모노머는 COR 유전자를 발현하고 식물에서 동결 내성을 향상시킨다.

[48]

[49] 도 5는 trx-h2 및 cbfs 배경에서 다양한 형태의 CBF1, Trx-h2 및 이들의 변이체를 발현하는 형질 전환 아라비돕시스의 생성을 나타낸 것이다.

[50]

[51] 도 5a는 NOS 터미네이터를 지닌 Col-0 및 trx-h2 배경에서 CaMV 35S 프로모터 (P_{35S}x3)및 그의 고유 프로모터 (P_{CBF1})의 제어 하에 발현된 형질 전환 CBF1-Myc^{OE} 및 P_{CBF1}:CBF1-Myc아라비돕시스의 제조를 위한 DNA 컨스트럭트를 나타낸 것이다. 도 5b 및 5c는 아라비돕시스 과발현체(CBF1-Myc^{OE}/Col-0또는 CBF1-Myc ^{OE}/trx-h2) (b) 및 RT-PCR에 의해 검증된 P_{CBF1}:CBF1-Myc/Col-0및 P_{CBF1} :CBF1-Myc/trx-h2 (c) 식물체내에서 CBF1 과 Trx-h2 mRNA의 발현 분석을 나타낸 것이다. 도 5d는 T-DNA 삽입 녹아웃 변이체 아라비돕시스, trx-h2의 게놈 구조 (SALK_079507)를 나타낸 것이다. T-DNA 삽입 부위 및 정방 (For)/역방 (Rev) 프라이머 결합 부위가 표시되어 있다. ATG 및 TAA는 시작 및 정지 코돈을 나타낸다. 도 5e 유전자형 분석 PCR에 의한 trx-h2 식물에서 Trx-h2 녹아웃의 확인을 나타낸 것이다. 도 5f는 CaMV 35S 프로모터 및 옥토핀 신타제 (OCS)터미네이터의 조절 하에 V5-태그와 융합된 Trx-h2, Trx-h2 (G/A) 및 Trx-h2 (C/S)의 과발현을 위한 DNA 컨스트럭트의 개략도를 나타낸 것이다. 각각의 컨스트럭트를 운반하는 A. 투메파시엔스 균주 GV3101을 trx-h2 변이체로 형질 전환시켜 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2, Trx-h2(G/A)-V5^{OE}/trx-h2, 및 Trx-h2(C/S)-V5^{OE}/trx-h2 과발현 라인을 생성시켰다. 도 5g 및 5h는 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅에 의해 다양한 형질 전환 아라비돕시스에서의 Trx-h2 mRNA (g) 및 Trx-h2 단백질 (h)의 발현 수준 분석을 나타낸 것이다. 다양한 유전자형에서 Trx-h2 mRNA 및 이의 단백질의 발현 수준을 정량적으로 비교하기 위해, ChemiDoc MP 시스템에서 짧은 (중간 패널) 및 긴 (상단 패널) 시간을 노출시키는 2 개의 상이한 블롯이 나타났다. 도 5i 내지 5l은 CRISPR-cas9 시스템 (i) 및 Trx-h2-HA^{OE}/cbfs (j) 아라비돕시스에 의한 cbfs-null 변이체의 제조를 위한 DNA 컨스트럭트. Trx-h2-HA^{OE}/cbfs (라인 # 1 및 # 2) 식물에서 Trx-h2 mRNA (k) 및 이의 단백질 (l)의 발현 수준을 각각 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅에 의해 분석한 것이다. (g-1)에서 튜불린 및 RbcL이 로딩 대조군으로 사용되었다.

[52]

[53] 도 6은 Trx-h2의 아미노산 서열 특성 및 저온에서 CBF1과의 특이적 상호 작용을 나타낸 것이다.

[54]

[55] 도 6a는 아라비돕시스에서 11 개의 세포질 Trx-hs의 N-말단 아미노산 서열 (~ 80 잔기) 및 TermiNator 프로그램에 의해 예측된 추정 아실화 위치의 비교를 나타낸 것이다. 지방산의 변형 패턴에 따라 왼쪽의 노란색 상자는 각각 Trx-hs의 하위 그룹 I (Sub-I), Sub-II의 자홍색 상자, Sub-III의 녹색 상자, Sub-IV의 시안 상자를 나타낸다. 미리스토일화에 필요한 중요 아미노산은 적색 박스(Sub-II의 Gly2), 청색 박스(N-A의 SubaI)로서의 N-α-아세틸화 및 녹색 박스(Sub-IIV의

Cys5)로서 팔미토일화로 강조된다. 활성 부위 Cys 잔기(CXXC 주제)는 적갈색 상자로 강조 표시된다. 도 6b는 Trx-h2 및 그의 포인트 변이체, Trx-h2 (G/A) 및 Trx-h2 (C/S)의 개략도를 나타낸 것이다. 도 6c는 Trx-h2의 서열 특징을 나타낸것이다. Trx-h2의 활성 부위 Cys 잔기 (59 및 62에 위치)는 굵은 체로 표시되고, 미리스토일화 (G)에 필요한 Gly은 녹색으로 표시된다. 보존된 Trx 모티프 (122개 아미노산)는 빨간색 문자로 표시됩니다. NLS-매퍼 프로그램 (17)으로부터 식별된 이분자 핵 위치 신호 (NLS) 시퀀스는 밑줄로 표시된다. 마지막 위치의 별은 정지 코돈을 나타낸다. 도 6d는 4 ℃에서 BiFC에 의해 분석된 대조군으로서 사용된 Trx-h3에는 나타내지 않는 Trx-h2와 CBF1의 상호 작용을 나타낸 것이다.

[56]

[57] 도 7는 저온 조건하에 Col-0 식물에서 항-Trx-h2의 항체 특이성 및 Trx-h2 mRNA 및 단백질의 발현 분석을 나타낸 것이다.

[58]

[59] 도 7a는 실험실에서 제조된 항-Trx-h2 항체의 항체 특이성을 나타낸 것이다. 아라비돕시스의 Col-0, trx-h2 및 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2 과발현 라인으로부터 총 단백질을 추출한 후, 이들을 12 % SDS-PAGE에서 분리하고 Trx-h2 항체를 사용하여 웨스턴 블롯팅 하였다. Ponceau S로 염색된 Rbc L을 로딩 대조군으로 사용하였다. 도 7b 및 7c는 4 ℃에서의 저온 처리 동안 qRT-PCR (b)에 의해 Trx-h2 mRNA의 발현 수준 및 Col-0 식물에서의 웨스턴 블롯 (c)에 의한 단백질 수준을 나타낸 것이다.

[60]

[61] 도 8은 아라비돕시스에서 미리스토일화 Trx-h2의 탐지에 사용되는 프로토콜을 나타낸 것이다. 아지도미리스테이트를 2 주령의 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2 또는 Trx-h2(G/A)-V5^{OE}/trx-h2 아라비돕시스로 진공-침투하여 22℃에서 24시간 동안 인큐베이션 시켰다. 식물로부터 총 단백질을 추출한 후, 포스핀-PEG_3-비오틴과 함께 배양 하였다. 비오티닐-미리스토일화된 Trx-h2-V5를 항-V5 항체에 의해 면역 침전시키고 환원성 SDS-PAGE 겔에서 분리 하였다. 이어서, 비티닐-미리스토일화 된 Trx-h2-V5를 항-비오틴 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 검출하였다. 프로토콜은 배양 세포에서 미리스토일화 단백질의 검출에 사용된 방법의 변형으로 수립하였다.

[62]

[63] 도 9는 따뜻한 온도에서 아라비돕시스 원형질체 세포에 의해 분석된 Trx-h2의 세포 내 국소화를 나타낸 것이다.

[64]

[65] 도 9a는 CaMV-35S 프로모터의 조절하에 발현된 Trx-h2-YFP DNA 컨스트럭트의 개략도를 나타낸 것이다. 도 9b는 따뜻한 온도(22℃)에서 아라비돕시스 원형질체 세포에서 분석된 Trx-h2의 세포 내 위치를 나타낸

것이다. Trx-h2-YFP의 일시적 발현은 공 초점 현미경 (YFP) 하에서 YFP 형광에 의해 가시화되었다. 소포체(ER), 골지 복합체(Golgi complex) 및 2 차 레인(RFP)에서의 핵의 세포 내 마커에 대해 본 발명자들은 각각 mCherry-HDEL, 대두 a-1,2-만노시다제 1-RFP 및 NLS-RFP를 사용하였다. YFP 및 RFP 신호의 겹친 이미지가'병합'패널에 표시되었다. 명 시야 이미지가 제공되었다 (Bright). 스케일 바는 20 μm를 나타낸다.

[66]

[67] 도 10은 5 개의 보존된 Cys 잔기를 함유하는 CBF의 아미노산 서열 특성 및 따뜻한 온도에서 단백질 구조에 대한 Trx-h2의 영향을 나타낸 것이다.

[68]

[69] 도 10a는 적색 박스로 표시된 5 개의 보존된 Cys 잔기(23, 30, 100, 117 및 137에 위치)를 함유하는 아라비돕시스에서의 3 개의 CBF1 ~ 3 아미노산 서열의 비교를 나타낸 것이다. 오른쪽의 숫자는 아미노산 수를 나타낸다. 도 10b 및 10c는 5 개의 보존된 Cys 잔기가 Ser로 대체된 CBF1 (b) 및 CBF1 (C/S) (c)의 도메인 구조를 나타낸 것이다. N- 말단 적색 박스는 핵 위치 신호 (NLS), AP2 도메인의 녹색 박스 및 활성화 도메인의 청색 박스를 나타낸다. 하단의 숫자는 아미노산 위치를 나타낸다. 도 10d는 따뜻한 온도 (22℃) 에서 배양된 다양한 아라비돕시스 유전자형에서 비-환원(상부 패널) 및 환원(하부 패널)-SDS-PAGE 겔에 웨스턴 블롯에 의해 분석된 CBF 단백질 구조에 대한 Trx-h2 효과를 나타낸 것이다. 겔 오른쪽의'O'와'M'은 각각 CBF 올리고머와 모노머를 나타낸다.

[70]

[71] 도 11은 4℃에서의 COR15a 프로모터 및 CBF 발현에 대한 CBF1 결합상의 trx-h2의 효과를 나타낸 것이다.

[72]

[73] 도 11a는 시작 코돈 (+1)으로부터 -267 내지 -262(녹색 박스로 표시됨) 및 -439 내지 -444(파란색 박스) 상류에 위치한 CRT/DRE 엘레멘트의 코어 서열을 함유하는 COR15a 프로모터의 뉴클레오티드 서열을 나타낸 것이다. 도 11b는 청색 및 녹색 박스로 표시된 2 개의 CRT/DRE 시스-엘레멘트를 함유하는COR15a 프로모터의 개략도를 나타낸 것이다. 도 11c는 비오틴-표지된 EMSA 프로브의 올리고 뉴클레오티드 서열(시작 코돈의 상류에서 -275 내지 -253 bps)을 나타낸 것이다. 도 11d는 루시퍼라제(LUC) 분석에 사용된 이펙터, 내부 대조군 및 리포터의 DNA 컨스트럭트를 나타낸 것이다. 도 11e는 22 ℃에서 산화(X/XO) 또는 환원(GSH) 조건 하에서 P_{35S}:CBF1을 발현하는 N. 벤타미아나 잎에서 측정된 LUC 활성의 비교를 나타낸 것이다. 도 11f는 LUC 활성을 22 ℃ 또는 4 ℃에서 배양된 P_{35S}:Trx-h2 또는 P_{35S}:Trx-h2(C/S)를 발현하는 담배 잎에서 비교한 것이다. 도 11g는 qRT-PCR에 의해 분석된 4 ℃에서 인큐베이션 Col-0 및 trx-h2 식물에서 CBF1 ~ 3 mRNA의 발현 수준을 나타낸 것이다. 실험에서, trx-h3 식물도 대조군으로 포함되었다. 데이터는 3 개의 독립적인 실험의 평균±SE로

표현된다.

[74]

[75] 도 12는 Trx-h2는 CBF 신호 전달을 통해 토양에서 성장하는 아라비돕시스의 동결 내성을 향상시킴을 나타낸 것이다.

[76]

[77] 도 12a 내지 12c는 다양한 아라비돕시스 유전자형에 대한 동결 내성 비교를 나타낸 것이다. 비-순화(NA) 및 저온 순화(CA) 식물의 제조를 위해 22 ℃에서 토양에서 자란 18일 된 식물을 0 ℃에서 원하는 온도로 2℃/30 분의 속도로 냉각시켜 냉동실에 두었다. 구배 냉각 시스템을 사용하여 2℃/30 분. 식물을 최종 온도에서 1 시간 동안 저장 한 후, 12 시간 동안 4 ℃에서 인큐베이션 시켰다. 식물의 동결 내성 수준은 회수(a), 생존율(b) 및 전해질 누출(%)(c)을 관찰하여 평가하였다. CA 식물의 경우, 동결 시험 전에 4 ℃에서 5일 동안 사전 배양되었다. 저온 신호 전달에서 Trx-h2와 CBF 사이의 유전적 관계는 cbfs 및 Trx-h2-HA^{OE}/cbfs (#1 및 #2) 아라비돕시스를 사용하여 분석하였다.

[78]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[79] 본 발명에 있어서, 저온-반응 전사 인자인 C-반복 결합 인자(CBF)의 활성은 이들이 저온 내성을 조절하지만 온화한 조건 하에서 정상적인 식물 성장을 조절하기 때문에 엄격하게 제어된다. CBF1의 상호 작용 파트너로 확인된 세포질 산화 환원 단백질인 티오레독신(Trx-h2)은 글리신 잔기에서 미리스토일화를 통해 세포질 내막에 고정된다.

[80]

[81] 식물체가 저온에 노출시 미리스테이트가 절단되고 Trx-h2가 핵으로 이동하여 산화된 (비활성) CBF 올리고머 및 모노머로 환원된다. 환원된 (활성) 모노머는 저온 조절된 유전자 발현을 활성화시킨다.

[82]

[83] 따라서 본 발명의 Trx-h2 과발현 식물체는 아라비돕시스 trx-h2 넉아웃 변이체와는 달리 저온 저항성을 지닌다. 저온-매개 산환 환원 변화에 따른 CBF의 구조적 변화 및 기능 활성화는 형질전환 식물체에 저온 저항성을 부여하는 것이다.

[84]

[85] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[86]

[87] 확인된 상호 작용자 중에서 본 발명자들은 서브 그룹 II에 속하는 세포질 산화 환원 단백질인 티오레독신(Trx-h2)의 h2- 타입을 선택하였다(도 5a-c). 여기에는 NLS-mapper 프로그램에 의해 예측되는 C- 말단에 2 개의 활성 부위 시스테인(Cys)과 추정 이분자 핵 위치 신호 (NLS)가 들어 있다. Trx-h2는 세포

수준의 활성산소종(ROS)을 감지하고 신호를 다운스트림 표적 단백질에 전달하는 것으로 알려져 있다.

[88]

[89] Trx-h2의 저온-응답 기능을 이해하기 위해 본 발명자들은 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR) 및 Trx-h2 특이적 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 Col-0 식물에서의 저온 처리 동안 mRNA 및 단백질 수준을 조사하였다(도 7). 본 발명자들은 따뜻한 조건과 차가운 조건 사이의 Trx-h2 수준의 차이를 발견하지 못했으며 이는 Trx-h2가 후번역 수준에서 CBF 활성과 단백질 구조를 조절할 수 있음을 나타낸다.

[90]

[91] 정제된 재조합 Trx-h2 및 히스티딘(His)-태그된 CBF1-3을 지닌 시험관 내 풀다운 분석에 의해 세포질성 Trx-h2와 핵 CBF 사이의 상호 작용을 확인하였다(도 1b). 22 ℃ 또는 4 ℃에서 6 시간 동안 배양된 CBFs-MycOE 아라비돕시스를 사용하여 생체 내 IP 분석에 의해 동일한 결과가 얻어졌으며(도 1c), Trx-h2가 YFP의 N-말단 부분(Trx-h2-YN) 및 CBF는 니코티나 벤타미아나 잎에서 C-말단 YFP(YC-CBF)에 융합되었다(도 1d).

[92]

[93] 그러나 대조군으로서 사용된 Trx-h3는 BiFC에 의해 분석된 CBF 와 상호 작용하지 않았다(도 6d). 이는 Trx-h2가 4 ℃에서 CBF와 특이하게 상호 작용하나 22℃에서 작용하지 않음을 의미한다.

[94]

[95] 세포질 Trx-h2가 핵에서 핵 CBF와 상호 작용하려면 단백질이 저온에 의해 핵으로 이동해야 하는데 이는 담배 잎에서 Trx-h2-YFP의 일시적인 발현으로 나타난다(도 1e). Trx-h2-YFP 신호는 4 ℃에서 분석된 NLS-RFP 형광과 크게 겹쳐지지만, YFP- 형광은 22 ℃에서 세포질 영역에서만 검출되어 세포질 Trx-h2가 핵으로의 트랜스로케이션을 유발했음을 나타낸다.

[96]

[97] 이는 웨스턴 블롯팅으로 Col-0 식물로부터 추출된 단백질의 세포 내 분획화에 의해 확인되었다(도 1g). Trx-h2와 CBF의 상호 작용 친화성과 본 발명에서 조사된 Trx-h2에 의해 조절된 3 개의 아라비돕시스 CBF의 분자 특성을 구별할 수 없기 때문에 본 발명자들은 추가 분석을 위해 대표적인 CBF로 CBF1을 선택하였다.

[98]

[99] Trx-h2의 저온 매개 핵 전위의 분자 메커니즘을 정밀하게 조사하기 위해 본 발명자들은 Myristoylator 프로그램 (myristoylator)으로 그 서열을 분석하고 Trx-h2에 보존된 Gly 잔기, 표준적인 미리스토일화 부위가 포함되어 있음을 확인하였다(도 6a,b). 미리스토일화가Trx-h2의 막 고정 효능 및 세포 국소화에 영향을 미치기 때문에, 본 발명자들은 YFPin 담배 잎과 융합된 Ala에 대한 Gly를

대체하는 Trx-h2 및 Trx-h2(G/A)의 DNA 컨스트럭트를 발현하여 Gly-영향 서브셀 위치를 조사하였다(도 1f). Trx-h2-YFP 형광은 22 ℃에서 주로 세포질에 나타났지만 Trx-h2 (G/A)-YFP 형광의 일부는 핵에서 검출되었다.

[100]

[101] 또한 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2 식물에서 Trx-h2의 온도-의존적 미리스토일화를 분석하기 위해, 12-아지도도데카노산을 식물에 진공-침투 시키고 상이한 온도에서 배양하였다. 항-V5 항체에 접합된 단백질-G 아가로스 비드를 사용하여 비오티닐화 된 아지도미리스토릴화 된 Trx-h2-V5를 면역 침전시키고 ECL 검출 키트 및 항-바이오틴 항체에 의해 검출하였다(도 8). 비오티닐화된 미리스테이트는 22 ℃에서 배양된 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2식물에서만 검출되었고(도 1h), Trx-h2 (G/A)-V5^{OE}/trx-h2 식물에서는 검출되지 않았다(도 1i).

[102]

[103] 결과는 Trx-h2의 Gly2에 부착된 미리스테이트가 아라비돕시스 원형질체 세포를 사용하여 확인된 세포질 내배엽에 단백질을 고정 시킨다는 것을 암시한다(도 9). 그러나 지방산은 4 ℃에서 특정의 저온-감지 가능한 데 아실라제에 의해 분해되어 탈-미리스토일화 된 Trx-h2가 핵으로 트랜스로케이션 될 수 있게 한다.

[104]

[105] 모든 아라비돕시스 CBF는 5 개의 보존된 Cys 잔기를 포함하고(도 10) 다양한 산화 환원 조절 단백질이 산화 환원-의존적 구조적 변화를 나타내고 있기 때문에, 재조합 His-CBF1의 단백질 구조를 22℃ 시험관 내에서 분석하였다. CBF1는 비환원성겔 상에서 몇 개의 불연속적인 크기의 올리고머로 나타난 반면(도 2a; 레인 1) DTT는 올리고머가 모노머 (레인 2)로 분해되었으며 이는 CBF1 올리고머가 이황화 결합에 의해 형성됨을 시사한다. 반대로 H_2O_2는 CBF1 모노머 및 작은 올리고머(레인 4)로부터 고분자량 올리고머의 형성을 유도하였다.

[106]

[107] 마찬가지로 생체 내에서 전자공여체로서 NADPH, Trx 환원효소 및 Trx-h2를 포함하는 Trx 시스템은 CBF1 올리고머를 모노머로 환원 및 분해시키지만(도 2b; 좌측 패널), 산화 환원-비민감성 Trx-h2(C/S)[Cys을 Ser으로 교체]에 의한 것은 아니다(오른쪽 패널). Trx-h2 의존적 구조 전환은 Col-0 및 trx-h2 배경에서 CBF1-Myc^{OE}식물을 적용함으로써 식물에서 확인되었다. 22 ℃에서 성장한 CBF1-Myc^{OE}/Col-0식물에서 추출한 CBF1은 비환원 겔에서 주로 고분자량 올리고머를 나타내었지만(도2c; 레인 1), 저온은 소형 올리고머와 모노머로 점진적으로 분해 시켰다(레인 2 ~ 4). 대조적으로 4℃에서 CBF1-Myc^{OE}/trx-h2 식물에서는 구조적 변화가 검출되지 않았다(도 2d).

[108]

[109] 다음 단계로 본 발명자들은 P_{CBF1}:CBF1-Myc 식물체 내에서 저온 유도 새로

합성된 CBF1의 산화 환원 변화를 조사하였다(도 5a, c). 식물을 냉기에 노출시킨 후, 총 단백질을 추출하고 티올-알킬화제 (MM(PEG) 24-메틸-PEG-말레이미드 (mPEG-MAL))로 처리하여 단백질의 티올 그룹에 결합시켜 분자량을 1,200 Da/mPEG 로 증가시킨다.

[110]

[111] P_{CBF1}:CBF1-Myc/Col-0 식물체에서는 저온 처리를 통해 고분자량 형태의 CBF1가 감소한 반면 환원 및 산화된 CBF1 모노머에 해당하는 2 개의 상한/하한 모노머체 밴드의 양은 증가하였다(도 2e). 그러나 Trx-h2(도 2f)의 부재 하에서 저온은 올리고머 단백질에서 구조적 전환 없이 산화된(그러나 환원되지 않은) CBF1 모노머 형태만을 유도하였다.

[112]

[113] 또한 Ser에 대한 5 개의 보존된 Cys를 Ser 으로 대체시킨 재조합 CBF1(C/S) 단백질(도 10c) 및 CBF1 (C/S)-Myc를 발현하는 담배 잎으로부터 추출된 단백질 모두는 비환원성 겔 내에서 단일 밴드의 산화된 모노머를 생성하였다(도 2g, h).

[114]

[115] 결과는 Trx-h2가 식물체에서 기존의 CBF1 올리고머 및 저온-매개된 데 노보-합성 된 CBF1 모노머를 포함하여 모든 산화된 CBF1 단백질을 감소시켜 저온에서 환원된 CBF1 모노머를 생성 함을 시사한다. 대조적으로 22 ℃에서도 Trx-h2 $(G/A)^{OE}$/trx-h2 식물체는 임계 수준의 CBF 모노머를 생성하며(도 10d), Trx-h2 CBF 모노머 형성에 영향을 미치는 일차 제어는 온도 의존적 로케이션의 영향 일 것이다.

[116]

[117] CBF1의 환원 및 구조적 전환을 가능하게 하기 위해 Trx-h2는 저온 조건에서 환원 된 단백질로서 존재해야 한다. 따라서 본 발명자들은 식물체 내에서 Trx-h2의 세포 산화 환원 상태의 전형적인 지표로서 저온 유발 산화 환원 변화를 세포 내 글루타치온 풀(GSH + GSSG) 및 [GSH]/[GSSG] 비율의 농도를 측정하였다(도 2i, j). 저온은 1.5시간 이내에 글루타치온과 GSH/GSSG 비율의 총량을 급격히 감소시켰다.

[118]

[119] 그러나 저온 처리 후 3-4 시간 내에 정상 수준으로 즉시 회복되었다. 이는 식물이 대량의 항산화 효소를 빠르게 생산하여 Trx-h2가 감소된 상태를 유지할 수 있게 하기 때문일 것이다. 세포 산화 환원 변화는 CBF1-Myc^{OE}/Col-0에서 CBF1의 감소 및 구조적 해리를 야기하였으나 저온 상태의 식물인CBF1-Myc^{OE} /trx-h2에서는 야기 되지 않았다(도2k, l). 이 데이터는 Trx-h2를 통해 ROS가 항산화 네트워크와의 밀접한 연관성을 통해 저온 신호 분자로 작용한다는 것을 시사한다.

[120]

[121] 저온 조건 하에서 Trx-h2 매게 CBF1 감소 및 모노머화 생리학적 중요성을

조사하기 위해 본 발명자들은 COR15a 프로모터의 비오틴-표지 올리고 프로브(대표적인 목적 유전자)와 재조합 His-CBF1 또는 His-MBP(대조군)의 전기 이동 모빌리티 시프트 분석 (EMSA)을 수행하였다(도 11). H_2O_2및 Trx-h2(C/S)가 아닌 DTT 및 Trx-h2와 같은 환원제 처리는 His-CBF1과 상호 작용하는 프로브의 뚜렷한 이동성 이동을 유도하였다(도 3a-d).

[122]

[123] COR15a 프로모터의 P1 및 P2 모티프에 대한 CBF1의 결합 특이성(도 3e)을 다양한 아라비돕시스 유전자형으로부터 추출된 핵 단백질을 사용하여 항-CBF 항체로 염색체 면역 침전법 (ChIP)으로 분석하였다(도 5d-h). 공동-침전된 DNA 단편은 P1 및 P2 프라이머를 사용하여 qRT-PCR에 의해 증폭되었고, 풍부한 DNA 수준은 대조군으로 사용된 TA3 프로모터의 수준에 상대적으로 정량화되었다. 22 ℃에서 배양된 식물체에서 풍부하게 발견되지 않았지만(도 3f), 2 개의 CRT/ DRE 모티프를 포함하는 P2 영역은 4℃에서 Col-0 및 Trx-h2-$V5^{OE}$ /trx-h2 식물체 내의 P1 영역에 비해 크게 증폭되었으나 Trx-h2(C/S)-$V5^{OE}$ /trx-h2식물체 내에서는 증폭 되지 않았다(도 3g).

[124]

[125] 다음 단계로 CBF1이 다양한 이펙터의 존재하에 COR15a 프로모터의 조절하에 루시퍼라제(LUC) 리포터 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는지를 조사하였다 (도 11d). 내부 대조군으로서 사용된 β-글루쿠로니다제(GUS) 활성으로 정규화된 LUC 활성은 GSH-처리된 환원에서 일시적으로 CBF1을 발현하는 담배 잎에서 크게 증가하였지만, 크산틴/크산틴옥시다제(X/XO)-처리된 산화 조건에서는 증가하지 않았다.

[126]

[127] 22 ℃ 및 4 ℃에서 Trx-h2 또는 Trx-h2(C/S)를 발현하는 담배 잎에서 추출한 단백질의 LUC 활성을 비교한 결과, LUC 활성은 4 ℃에서 Trx-h2에 의해 크게 증가하지만 Trx-h2(C/S)에 의해서는 크게 증가하지 않음을 발견하였다(도 11e, f). 마지막으로 본 발명자들은 COR 프로모터에 모든 CBF 결합이 대조군으로 사용된 4℃에서 Col-0 및 trx-h3 식물체 내에서는 모든 대표적인 COR 유전자의 발현을 강력하게 상향 조절하였으나(도 3h)식물체 내에서 모든 CBF가 유사하게 발현 조절 되었음에도 불구하고trx-h2 식물체에서는 상향 조절하지 않았다(도 11g).이러한 결과는 Trx-h2가 저온에서 CBF를 특이적으로 감소시키고 모노머화 하여 다운스트림 COR 유전자의 발현에 필수적임을 나타낸다.

[128]

[129] 식물에서 동결 내성에 대한 Trx-h2 효과를 조사하기 위해 본 발명자들은 다양한 아라비돕시스 유전자형을 사용하였다. 한천 배지에서 성장한 비-순화(NA) 및 저온 순화(CA) 식물을 1 시간 동안 동결 온도에 노출시킬 때 Trx-h2-$V5^{OE}$/trx-h2 (# 1 및 # 2)의 2개의 독립적인 과발현 식물체는 강한 저온 저항성, 높은 생존율 및 낮은 전해질 누출을 나타내었으나(도 4a-c), 반면 trx-h2

및 h2(C/S)-V5^{OE}/trx-h2 식물체는 동결에 민감한 표현형을 나타내었다(도 4d-f).

[130]

[131] 마찬가지로 토양에서 성장한 trx-h2 및 Trx-h2(C/S)-V5^{OE}/trx-h2 식물이 아닌 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2 식물체의 NA- 및 CA- 둘 다 동결을 저항성을 나타내었다(도 12). Trx-h2와 CBF 사이의 유전자 연결을 확인하기 위해 cbfs 배경에서 Trx-h2-HA를 과발현하는 Trx-h2-HA^{OE}/cbfs 아라비돕시스를 생성하고 그들의 mRNA 및 단백질 발현을 확인하였다(도 5i-1). 그런 다음 동결 내성, 생존율(%) 및 이온 누출(%) 에세이 결과는 Trx-h2-HA^{OE}/cbfs가 저온 조건하에서 감소된 동결 내성을 지닌 cbfs 넉아웃 변이체 표현형과 유사하게 나타내었다(도 4g-i 및 도 12). 이는 Trx-h2의 주요 기능이 식물 저온 신호 전달에서 CBF와 유전적으로 연결되어 있음을 나타낸다.

[132]

[133] 빠른 온도 하강에서 생존하기 위한 식물체의 가장 중요한 전략은 온도 변화를 감지하고 저온 적응을 위한 방어 신호를 활성화 할 수 있는 속도이다. 본 발명자들의 결과는 명시적으로 저온 유발 탈-미리스토일화 및 세포질 내막에서 Trx h2의 분비는 이의 핵 트랜스로케이션을 허용하는 분자 메커니즘을 제공한다. 핵 국소화 Trx-h2는 모든 비활성 형태의 산화된 CBF를 감소시키고 모노머화하여 COR 유전자 발현을 활성화시키고 식물에서 동결 내성을 증가시킨다(도 4j).

[134]

[135] 따라서 따뜻한 식물에서 상당히 산화된 (비활성) CBF 올리고머의 존재는 저온에 반응하여 신속하게 활성화되고 CBF 유전자의 저온 유도 및 그의 번역 전에 COR 유전자의 발현을 개시하는 저장소로서 작용할 수 있다. 또한 cbfs 변이 식물체가 따뜻한 온도에서 발아 저하, 난쟁이 및 스트레스 민감도를 나타냈다는 보고를 고려할 때, 본 발명의 결과는 산화된 CBF 올리고머가 정상적인 조건에서 상호 작용 파트너 교환을 통해 식물 생장 및 발달 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

[136]

[137] 세포 필수 단백질의 산화환원-매개 활성 제어 및 구조적 전환은 매우 민감하고 신속한 과정이며 식물 및 동물 모두에서 보존되는 것으로 보인다. 예를 들어 식물에서 PR1(NPR1) 올리고머의 시토졸 비-익스프레서는 병원성 공격시 Trx-h5에 의해 감소되고 핵 트랜스로케이션을 강제하고 체계적 획득 내성에 관여하는 유전자를 활성화하기 위해 구조를 변경한다.

[138]

[139] 마찬가지로 다수의 대사 과정에 관여하는 포유동물 핵 활성화 단백질(AP) 1 및 핵 인자(NF)-κB 의 DNA-결합 및 트랜스 활성화 용량은 산화 환원-촉발된 핵 트랜스로케이션화 Trx에 의해 조절된다.

[140]

[141] 요약하면 본 발명의 결과는 저온 스냅에 대한 식물의 초기 반응을 나타내는

CBF의 산화 환원 의존적 구조적/기능적 조절의 섬세한 프레임 워크를 보여준다. 저온 순화를 유도하는 식물의 능력을 조작하면 냉동 내성이 향상되고 작물 수확량이 향상되는 품종의 개발이 촉진될 수 있을 것이다.

[142]

[143] 이하 본 발명을 실시예를 통해 더욱 상세히 설명한다.

[144]

[145] (실시예 1)식물 재료 및 성장 조건

[146]

[147] 아라비돕시스 탈리아나 표현형 Col-0을 야생형 (WT)으로 하여 Trx-h2, Trx-h2(C/S) 및 Trx-h2(G/A)를 과발현하는 형질전환 라인을 생성하기 위해 사용하였다. ABRC(미국 오하이오주 오하이오 주립대)에서 얻은 T-DNA 삽입 넉아웃 변이체 trx-h2(SALK_079507)도 Col-0 배경이었다. 모든 유전자형의 식물을 22 시간 동안 광 16시간/암 8시간 광주기 하에서 3 % 수크로스 및 0.25 % 피타-겔(pH 5.8)을 함유하는 MS 배지에서 성장시켰다. 담배 (Nicotiana benthamiana) 식물을 100 $mE{\cdot}m^{-2}s^{-1}$ 이하의 광감도로 26 ℃에서 성장시켰다.

[148]

[149] (실시예 2)Trx-h2 및 CBF 재조합 단백질의 발현 및 정제

[150]

[151] 야생형 WT 또는 변이체 Trx-h2 및 CBF1-3 유전자의 전장 cDNA를 pET28a 발현 벡터에 삽입하고, 대장균 BL21 (DE3) pLysS 세포로 형질 전환시키고, 37 ℃에서 LB 배양하였다. 배양이 600 nm에서 광학 강도 0.5-0.6에 도달한 후, 이소프로필 -β-D-티오갈락토피라노시드(IPTG)를 최종 농도 1mM가 되게 첨가하여 단백질 발현을 유도하였다. 이어서 배양을 30 ℃에서 5 시간 동안 성장시켰다.

[152]

[153] 세포를 원심분리에 의해 수확하고 1.8 mM KH_2PO_4(pH8.0), 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl 및 10 mM Na_2HPO_4를 함유하는 완충액에 재현탁 시켰다. 초음파 처리에 의해 세포를 파괴한 후, 단백질을 Ni-NTA 아가로스 겔(인스코팜, 대전)을 사용하여 정제 하였다. His-태그된 CBF (His-CBF)를 100 mM 이미다졸로 용출시키고 그의 융합된 Trx-h2를 트롬빈 절단에 의해 용출시켰다. 재조합 단백질을 20 mM HEPES-NaOH(pH 8.0) 완충액에 대해 투석하고 생화학적 분석에 사용하였다.

[154]

[155] (실시예 3) 동형 접합 trx-h2 넉아웃 변이체 라인의 확인 및 Trx-h2, Trx-h2 (C/S) 및 Trx-h2 (G/A)를 과발현하는 마라비돕시스 형질 전환주의 생성

[156]

[157] trx-h2 변이체의 동형접합체는 유전자형 분석에 의해 동정되었다. Trx-h2-$V5^{OE}$ /trx-h2, Trx-h2 (C/S)-$V5^{OE}$/trx-h2, Trx-h2(G/A)-$V5^{OE}$/trx-h2 및 Trx-h2-HA^{OE}/cbfs의 과발현 라인 준비하기 위하여 Trx-h2, Trx-h2(C/S) 및 Trx-h2(G/A)의 cDNA를 표 1

에 나타난 프라이머를 이용하여 증폭하고 바이너리 벡터 pCAMBIA 1300에 클로닝 하였다. V5-태그와 융합되고 CaMV 35S 프로모터의 다운스트림에서 pEarlyGate301(pEG301) 벡터에 라이게이션 되었다.

[158]

[159] 생성된 플라스미드를 아그로박테리움 튜메파시엔스 균주 GV3101에 도입하고 플로랄 딥 방법을 통해 trx-h2 및 cbfs 변이 식물을 형질 전환시키는데 사용하였다. 적절한 항생제가 보충된 MS-플레이트에서 T1 형질전환 라인을 선택한 후, 형질 전환 유전자의 발현을 웨스턴 블롯 및 RT-PCR 분석에 의해 분석하였다. 동형 접합 T3 라인을 모든 시험에 사용하였다. CBF1-Myc^{OE}/trx-h2 및 P_{CBF1}:CBF1-Myc/trx-h2 식물은 각각 동형접합 CBF1-Myc^{OE}및 P_{CBF1} :CBF1-Myc아라비돕시스를 trxh-2 식물과 교차시킴으로써 생성되었다.

[160]

[161] (실시예 4) 면역 침전 (IP) / 질량 분석법에 의한 CBF1-상호작용 단백질의 확인

[162]

[163] 아라비돕시스에서 CBF1의 상호 작용 파트너를 확인하기 위해, 총 단백질 (100 mg)을 6 시간 동안 4 ℃에 노출된 2 주령 CBF1-MycOE 묘목으로부터 추출하고 항-Myc 아가로스(Sigma-Aldrich, 세인트루이스, 미주리, 미국)를 사용하여 면역 침강 시켰다. CBF1-Myc-상호 작용 단백질을 4 ℃에서 50mM 트리스-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT 및 0.1 % NP40을 함유하는 완충액으로 3 회 세척하였다. 단백질을 SDS-PAGE 로딩 염료와 혼합하고, 90 ℃에서 5 분 동안 가열하고 SDS-PAGE로 분리하였다. 단백질은 매트릭스 보조 레이저 탈착/이온화 플라이트 시간(MALDI-TOF)/TOF-mass spectrometry에 의해 확인하였다.

[164]

[165] (실시예 5) Trx-h2에서 미리스틸화 그룹 감지

[166]

[167] 식물에서 Trx-h2에 공유적으로 부착된 미리스틸(C14) 그룹은 도 8에 요약된 절차를 사용하여 검출하였다. 이 프로토콜은 이전에 세포 배양 단백질에 사용된 방식으로부터 변형되었다. Trx-h2-V5로부터 미리스틸 그룹을 검출하기 위해, 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해된 40 μM의 12-아지도도데칸산(미리스틱산, 아지드)(Life Technologies, Camarillo, USA)을 2 주령 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2 또는 Trx-h2(G/A)-V5^{OE}/trx-h2 묘목으로 진공-침투시키고 22℃ 에서 1 일간 배양하였다.

[168]

[169] 이들 묘목을 액체 N_2에서 그라운드 하여 총 단백질을 IP 완충제를 사용하여 추출하였다. 용액을 12,000μg에서 10 분 동안 원심 분리한 후, 상등액(250μg 단백질)을 37 ℃에서 2 시간 동안 250μM 포스핀-PEG_3-비오틴과 반응시켰다. 항-V5 항체(Thermo Fisher Scientific, IL, USA, USA)에 접합된 단백질-G 아가로스

비드를 사용하여 비오티닐화된 단백질을 4 ℃에서 면역 침전시키고 SDS-PAGE에 의해 분리하고 웨스턴 블롯팅에 의해 검출하였다. 비오틴화된 아지도미리스토일화 Trx-h2-V5는 항-비오틴(Abcam, MA, USA) 및 ChemiDoc ™ MP 시스템(BioRad, 독일 뮌헨)을 사용하는 항-V5 항체를 지닌 ECL 검출 키트를 사용하여 검출하였다.

[170]

[171] (실시예 6) CBF1의 산화-환원 의존 구조 전환 분석

[172]

[173] CBF1의 산화 환원-의존적 구조 전환을 25 ℃에서 15 분 동안 산화제 또는 환원제(각각 H_2O_2 또는 DTT)와 함께 배양된 정제된 재조합 His-CBF1 또는 His-CBF1(C/S) 단백질을 사용하여 시험관 내에서 시험하였다. NADPH, Trx 환원효소 및 Trx-h2 또는 Trx-h2(C/S)를 포함하는 Trx 시스템을 사용하여 His-CBF1에 대한 Trx-h2의 환원력의 영향을 25 ℃에서 30 분 동안 분석하였다. 처리 후, 환원 및 비 환원 SDS-PAGE 겔에서 단백질을 분리하고, 항-His(Abcam, Cambridge, MA, USA) 및 항-Trx-h2 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 단백질 구조를 감지하였다. CBF1의 산화 환원-의존적 구조 전환은 또한 2주령 된 CBF1-Myc^{OE} /Col-0식물을 사용하여 생체 내에서 분석되었다.

[174]

[175] CBF1의 구조적 변화 동안 Cys 잔기의 기능적 역할을 Myc-tag를 함유하는 pCAMBIA 벡터에 라이게이션된 변이 CBF1(C/S) 유전자를 사용하여 분석하여 pCAMBIA-Myc-CBF1(C/S) 플라스미드를 생성하였다. 이 플라스미드를 A. 튜메파시엔스 균주 GV3101로 형질전환 시켰으며 이는 4주령의 니코티나 벤타미아나 잎에 침투하는데 사용되었다. 이들 식물을 4 ℃에서 1, 3 또는 6 시간 동안 냉각 처리하였다. 액체-N_2로 침윤된 잎을 동결 및 분쇄한 후, 전체 단백질을 조직 분말로부터 추출하였다. CBF1 및 CBF1(C/S)의 생체 내 구조를 조사하기 위해 SDS-PAGE에 의해 비환원 겔에서 단백질을 분리하고 항-Myc 항체를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 검출하였다.

[176]

[177] (실시예 7) 티올-트래핑 분석

[178]

[179] CBF1의 티올-트래핑 분석은 Col-0 또는 trx-h2 변이체 배경(PCBF1 : CBF1-Myc/Col-0 또는 P_{CBF1}:CBF1-Myc/trx-h2)에서 고유 프로모터 하에 CBF1-Myc를 발현하는 2주령 된 아라비돕시스 식물체를 사용하여 생체 내에서 수행되었다. MS-배지에서 성장한 식물을 4 ℃에서 1, 3 또는 6 시간 동안 저온 처리하였다. 이어서 식물 조직을 액체-N_2에서 동결 및 분쇄하고 2 % SDS, 62.5mM Tris-HCl(pH 6.8), 7.5 % 글리세롤, 0.01 % 브로모페놀 블루 및 프로테아제 저해제 칵테일을 함유하는 SDS 샘플 완충액을 사용하여 식물 조직으로부터 총 단백질을 추출하였다. 추출물을 1 시간 동안 티올-표지 시약, MM(PEG)

24-메틸-PEG-말레이미드 (mPEG-MAL)(Thermo Fisher Scientific, IL, USA)로 1 시간 동안 처리하고 12,000μg에서 10 분 동안 원심분리 하였다. 상등액 중의 단백질을 비환원 SDS-PAGE 겔에서 분리하고 항-Myc 항체로 웨스턴 블롯팅하여 검출하였다.

[180]

[181] (실시예 8) 정량적 실시간 PCR (qRT-PCR)에 의한 RNA의 분리 및 정량

[182]

[183] RNA 정제 키트(Macherey-Nagel, D퓌ren, 독일)를 사용하여 총 RNA(2μg)를 분리하고 cDNA 합성 키트(Thermo Fisher Scientific, 미국 일리노이주 록포드)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이후, 10 ng의 cDNA를 다음 조건 하에서 qRT-PCR의 주형으로 사용하였다 : 95 ℃에서 5 분 배양 후 95 ℃에서 30 초, 56 ℃에서 30 초, 72 ℃에서 1 분. 유비퀴틴 10(UBQ10) 및 액틴 2(ACT2) 유전자를 내부 대조군으로 사용하였다. 유전자-특이적 프라이머를 사용하여 각각의 샘플에 대해 3 개의 독립적 인 실험을 수행 하였다(표 1).

[184]

[185] (실시예 9) 공동 면역 침전 (Co-IP) 분석

[186]

[187] CBF-Myc^{OE} 식물을 액체 N_2에서 냉동시키고 미세 분말로 분쇄하였다. 50mM Tris-HCl(pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5 % NP-40, 1mM PMSF 및 프로테아제 억제제 칵테일을 함유하는 IP 완충액을 사용하여 지면 조직으로부터 총 단백질을 추출하였다. 분리된 단백질을 항-Myc 아가로스 비드와 함께 4 ℃에서 밤새 인큐베이션 시킨 후, IP 버퍼로 3번 세척하였다. 침전물로부터 CBF-Myc 결합 단백질을 90 ℃에서 1 분간 가열하여 용출시킨 후 SDS-PAGE에서 분리하였다. CBF 및 Trx-h2 단백질은 각각 항-Myc(Cell Signaling Technology, 미국 미주리주 베벌리) 및 항-Trx-h2 항체를 사용하여 ECL 검출 키트(GE Healthcare Life Science, 미국 뉴저지주 사우스 플레인 필드)에 의해 검출되었다.

[188]

[189] (실시예 10) Bimolecular 형광 보완 (BiFC) 분석

[190]

[191] 특정 조건 하에서 Trx-h2와 CBF 사이의 상호 작용은 BiFC 분석을 사용하여 분석하였다. 실험을 위해 Trx-h2 및 CBF 플라스미드를 게이트웨이 BiFC-바이너리 벡터 pDONR221에 개별적으로 클로닝하고 pDONR221 : Trx-h2 및 pDONR221 : CBF를 제조하였다. Trx-h2-YN 플라스미드는 TFP-h2를 YFP의 N-말단 단편(YN)과 융합시킴으로써 생성되는 반면, YC-CBF 플라스미드는 3 개의 CBF 각각을 YFP(YC)의 C-말단 단편과 융합시킴으로써 조립된다. 이들 플라스미드를 A. 튜메파시엔스 균주 GV3101에 도입하고 형질 전환된 세포를 사용하여 4 주령의 니코티나 벤타미아나의 잎에 침윤시켰다. 이들 식물을 26 ℃에서 2 일 동안 인큐베이션 한 후 6 시간 동안 4 ℃에 노출시켰다. YFP에 의해

생성된 형광 신호를 FV10-ASW 3.1 소프트웨어를 사용하여 공 초점 현미경으로 분석하였다.

[192]

[193] (실시예 12) 핵 및 비-핵 분획의 세포 내 분획화

[194]

[195] 4℃ 에서 6 시간 저온 처리 및 비-처리 Trx-h2-V5^{OE}/trx-h2 핵 및 비-핵 단백질의 분획화를 위해 CelLytic PN 추출 키트(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 제조사의 지시에 따라 사용되었다. 식물 조직을 액체-N_2에서 동결시키고 분쇄하여 분말을 만들고 1x 핵 분리 완충제 (NIB)와 혼합하였다. 샘플을 1,260μg에서 10 분 동안 원심 분리하여 비-핵분획을 함유하는 상청액을 핵 및 다른 세포 내 세포 소기관을 함유하는 펠렛 으로부터 분리하였다. 펠렛을 10 % Triton X-100 (NIBA)을 함유하는 1x NIB 완충액에 재현탁 시켰다. 10 % Triton X-100을 0.3 %의 최종 농도로 첨가하여 소기관 막을 용해시키고, 1x NIBA 완충액 중의 용해물을 1.5M 수크로스 쿠션에 적용하였다. 용액을 12,000 xg에서 10 분 동안 원심분리하여 핵의 반 순수 제제를 수득하였다. 펠렛을 핵 추출 완충액에 재현탁 시키고 핵 분획으로 사용하였다. 핵 및 비-핵 분획의 순도는 핵 표준 마커인 항-히스톤 H3 항체(Abcam, MA, USA, MA) 및 항-PEPC 항체(Agrisera, V^{bb}nn^{bb}s, Sweden)를 사용한 웨스턴 블롯팅에 의해 확인되었다.

[196]

[197] (실시예 13) 총 글루타치온 풀(GSH + GSSG) 및 GSH/GSSG 비율의 측정

[198]

[199] 저온 스트레스 하에서 Col-0 식물의 산화 환원 변화는 4 ℃에서 일정 시간 배양된 2 주령 아라비돕시스에서 글루타티온(GSH + GSSG) 및 GSH/GSSG의 총 수준을 측정함으로써 추정되었다. 액체-N_2로 식물로부터 추출된 20mg의 조직-분말을 2 % 메타-인산 및 2mM EDTA를 함유하는 200$\mu\ell$의 용해 완충액에 용해시켰다. 용액을 13,000 xg에서 15 분 동안 원심분리 한 후, 상등액의 pH를 10 % 시트르산 나트륨으로 5.6으로 조정하였다. 이어서 티올 그린 지시제(비형광 염료)를 함유하는 50 μl GSH 분석 혼합물(GAM)과 30 ℃에서 30 분 동안 반응시켜 50 μl 상등액 중의 GSH 수준을 측정하였다. 반응 생성물로부터 방출된 형광은 GEMINI, XPS-분광형 광도계 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA)에 의해 측정되었고 GSH 함량은 GSH 표준 곡선으로부터 정량화되었다.

[200]

[201] 또한 50 ℃ 상등액 중의 글루타티온(GSH + 2GSSG)의 총량은 30 ℃에서 30 분간 NADPH, GSH-리덕타제 및 티올 그린 지시제를 함유하는 50$\mu\ell$의 총 글루타치온 분석 혼합물(TGAM)과 반응시켜 측정하였으며, GSSG를 2GSH로 형광에 의한 글루타치온(GSH)의 총량을 평가한 후, GSG 수준은 TGAM36에 의해 평가된 [GSH + GSSG]의 총 농도에서 GAM에 의해 측정된 GSH 수준을 빼서 계산되었다. GSH 및 GSSG의 농도는 3 회 이상의 독립적인 실험으로부터

측정되고 평균화되었다.

[202]

[203] (실시예 14)전기영동 이동 시프트 분석 (EMSA)

[204]

[205] EMSA를 수행하기 위해, 바이오틴-표지된 올리고 뉴클레오티드 프로브(표 1)를, 라이트 시프트 화학 발광 EMSA 키트(미국 일리노이주 록포드 소재의 Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 처리하였다. 재조합 CBF1(5μg)을 40 mol의 비오틴 표지 프로브 및 25 ng/μl Poly(dI-dC) 결합 완충제를 함유하는 20 μl의 반응 혼합물과 25 ℃에서 30 분 동안 배양하여, 반응 생성물을 6 % 폴리아크릴 아미드 겔에 리졸브 시켰다. CBF1에 결합된 프로브를 하전된 Hybond-N 막으로 옮기고 항-비오틴 항체(Abcam, Cambridge, MA, USA)로 웨스턴 블롯팅하여 검출 하였다.

[206]

[207] (실시예 15) 니코티나 벤타미아나 잎에서 CBF1의 전사 활성화 분석

[208]

[209] CBF1의 Trx-h2-매개 트랜스 활성화를 식물체 내에서 분석하였다. 이펙터 컨스트럭트(P_{35S}:CBF1, P_{35S}:Trx-h2, 또는 P_{35S}:Trx-h2(C/S)) 또는 내부 대조군(P35S)을 갖는 리포터 컨스트럭트 (P_{35S}:GUS) 을 보유하는 A. 튜메파시엔스 균주 GV3101의 세포: GUS)를 4주령 된 니코티나 벤타미아나 잎에 침윤시켰다. 2 일간 배양 후, 식물을 4 ℃에서 24 시간 동안 저온 처리하였다. 이어서 잎 조직을 액체-N_2에서 냉동시키고 분쇄하여 분말을 제조하였다. IP 완충액으로 조직 분말로부터 총 단백질을 추출한 후, 추출물(100 μg 단백질/20 μl IP 완충액)을 80 μl의 GUS/LUC 반응 완충액(50 mM Na_2PO_4, pH7.0, 10 mM EDTA, 10mM β-머캅토 에탄올 및 0.1 % 트리톤 X-100)과 혼합하였다.

[210]

[211] 용액에 100 μl의 LUC 기질(20 mM 트리신, 2.7 mM $MgSO_4$, 30 mM DTT, 1 mM 루시페린 및 0.5 mM ATP)을 10 분 동안 반응시켰다. LUC 활성은 GloMax® 20/20 Luminometer(Promega, Madison, WI 53711 USA)를 사용한 발광 변화에 의해 측정되었다. 또한 GUS 활성을 분석하기 위해 단백질 추출물을 16.7 % 메탄올, 1.1mM 4-메틸우벨리페릴-β-D-글루쿠로나이드 수화물(MUG)을 함유하는 GUS/LUC 기질 용액과 혼합하고 10 분 동안 반응시켰다(Sigma-Aldrich, 세인트루이스, 미주리, 미국). 130mM Na_2CO_3를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, GUS 활성은 GUSINI를 지닌 MUG 형광을 측정하여 XPS 분광형광계로 각각 364 및 447 nm의 여기 및 방출 파장에서 각각 측정 분석하였다. LUC 활성은 GUS 활성(내부 대조군)에 대해 정규화 되었고 LUC 활성은 3 번 측정 후 평균치로 나타내었다.

[212]

[213] (실시예 16) 크로마틴 면역 침전 (ChIP) 분석

[214]

[215] COR15a 프로모터에서 CRT/DRE DNA 모티프에 대한 CBF1의 결합은 4℃ 또는 22℃에서 6 시간 동안 인큐베이션 된 2 주령 아라비돕시스 모종으로부터 추출된 단백질로 ChIP 분석을 사용하여 분석되었다. 수확된 식물 조직(3 g)을 동결시키고 액체-N_2에서 분쇄하였다. CBF1-결합된 염색질 복합체는 60mM HEPES, 1M 슈크로스, 5 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 0.6% Triton X-100, 1 μg/ml 펩스타틴 A 및 프로테아제 억제제 칵테일(미니-완전 타블렛)(Roche, Basel, Switzerland)을 함유하는 용해 완충액 (pH 8.0)을 사용하여 조직 분말에서 분리되었다.

[216]

[217] 단백질/크로마틴 복합체가 1 % 포름알데히드에 의해 가교된 후, 항-CBF 항체 또는 토끼 IgG 혈청(음성 대조군으로 사용됨) 및 연어 정자 DNA/단백질-아가로즈(밀로 포어, 벌링턴, MA, 미국)를 사용하였다. 아가로스 비드를 하기 완충액으로 순차적으로 세척 하였다. 먼저 저염 완충액(150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA 및 20mM Tris-HCl, pH 8.0) 및 고염 완충액 (500mM NaCl, 0.1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2mM EDTA 및 20mM Tris-HCl, pH 8.0)으로 세척하고. 다음으로 LiCl 세척 완충액(250mM LiCl, 1 % Nonidet P-40, 1 % 데옥시콜레이트, 1mM EDTA 및 10mM Tris-HCl, pH 8.0) 및 최종적으로 TE 완충액 (10mM Tris-HCl, pH 8.0) 및 1 mM EDTA)으로 세척한다. 1 % SDS 및 0.1 M $NaHCO_3$를 함유하는 용리 완충액을 사용하여 단백질/DNA 복합체를 용출시켰다. 단백질/DNA 복합체로부터 5M NaCl의 존재하에 65℃에서 밤새 인큐베이션 함으로써 단백질을 제거하였다.

[218]

[219] 잔류 단백질이 프로테이나제 K에 의해 분해된 후, DNA를 페놀/클로로포름/이소아밀알코올 추출에 의해 정제하고 에탄올 침전에 의해 침전시켰다. 정제된 DNA를 TE 완충액(pH 8.0)에 재현탁시킨 후, 표적 DNA 단편의 농축을 정량적 PCR(qPCR)에 의해 결정하였다. 표적 DNA의 상대적 농축은 먼저 UBQ10 유전자(내부 대조군)에 대한 정규화에 의해 입력에서 상응하는 양의 표적 DNA에 대하여 계산함으로써 계산되었다. qPCR에 사용된 프라이머는 표 1에 나열되어 있다.

[220]

[221] (실시예 17) 동결 내성 분석

[222]

[223] 토양에서 자란 18 일된 아라비돕시스와 22 ℃의 MS-한천 배지에서 자란 2 주된 식물을 4 ℃에서 5 일 동안 저온 적응 시키거나 처리하지 않았다. 이들은 냉동실(RuMED4001, 슈투트가르트, 독일)에서 냉동 온도에 노출시켰다. 냉동실의 온도는 원하는 온도에 도달할 때까지 30 분당 2 ℃의 속도로 0 ℃에서 하강시켜 식물을 1 시간 동안 보관하였다.

[224]

[225] 비-순화된(NA) 냉동 스트레스(-6℃)의 처리를 위해 22℃에서 MS-한천 배지에서 성장한 2 주령 된 아라비돕시스 모종(대조군)을 지시된 온도에서 1 시간 동안 냉동실에 유지하고, 0℃로부터 -2℃/h의 구배 냉각 시스템으로 원하는 온도로 냉각시킨다. 그리고 저온순화(CA) 처리(-8℃)의 경우 동결 스트레스를 처리하기 전에 식물을 4 ℃에서 5 일 동안 사전 배양하였다. 식물을 어두운 조건 하에서 4 ℃에서 12 시간 동안 인큐베이션하고 회복을 위해 22℃에서 5 일 동안 추가로 인큐베이션 하였다.

[226]

[227] 다양한 아라비돕시스 유전자형의 동결 내성은 형태 표현형, 생존율(동결 후 회복된 녹색 식물의 백분율) 및 전해질 누출(%; 토양에서 자란 4 주령 식물의 완전히 발달된 로제트 잎으로 측정)을 WT 식물체와 비교 측정하여 평가하였다. 식물의 전해질 누출을 측정하기 위해 적어도 3 세트의 다음 실험이 수행되었고 평균±표준 오차(SE)로 나타내었다. 하나의 절개된 리플렛을 100 ㎕의 증류수를 함유하는 시험관에 넣고 이를 순환조에 0 ℃에서 1 시간 동안 두었다.

[228]

[229] 각 튜브에 아이스 크리스탈을 첨가한 후, 튜브를 순환조에서 인큐베이션 시키고, 그의 온도는 원하는 온도에 도달할 때까지 30 분당 2 ℃의 속도로 감소하도록 프로그램 하였다. 원하는 온도에서 1 시간 동안 튜브를 인큐베이션 한 후, 튜브를 점진적으로 해동할 수 있도록 즉시 얼음조로 옮겼다. 해동 후, 튜브 내의 모든 내용물을 20 ml의 증류수를 함유하는 새로운 튜브로 옮기고 밤새 흔들었다. 용액의 전도도는 전도도 측정기(Cole-Parmer Instrument, Vernon Hills, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 이어서 리플렛을 함유하는 튜브를 100 ℃에서 15 분 동안 고압 멸균하고, 진탕기에서 실온으로 냉각시키고 용액의 전도도를 다시 측정하였다. 오토클레이브 전후의 전해질 누출 비율은 동결 응력으로 인한 막 손상의 지표로 사용되었다.

[230]

[231] [표1]

프라이머	서열(5'→3')
식물체 변형을 위한 컨스트럭트용 프라이머	
Trx-h2 F (*Cla*I)	ATCGATATGGGAGGAGCTTTATCAACT
Trx-h2 R (*Xba*I)	TCTAGATGCTCTGAGTTTGCTAACTTTCTT
Trx-h2(C/S) F	GGCCTCATGGTCCGGACCATCTAGGATGA
Trx-h2(C/S) R	TCATCCTAGATGGTCCGGAGCATGAGGCC
Trx-h2(G/A) F (*BamH*I)	GGATCCATGGCAGGAGCTTTATC
RT-PCR 및 지노타입 **PCR** 용 프라이머	
Trx-h2 F	ATGGGAGGAGCTTTATCAAC
Trx-h2 R	TTATGCTCTGAGTTTGCTAA
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
Tubulin F	CCAACAACGTGAAATCGACA
Tubulin R	TCTTGGTATTGCTGGTACTC
정량적 실시간 **PCR** 용 프라이머	
Trx-h2 qF	ACAGCTGCAGGGACCGAAT
Trx-h2 qR	CCGAGCGGAAGAGCTAAACTT
UBQ10qF	GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG
UBQ10qR	AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT
ACT2 qF	CTTGCACCAAGCAGCATGAA
ACT2 qR	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT
COR15a II F	ACGAAACGATTCTATTACAAGTAATGA
COR15a II R	GCCCAAATGAGTTGAAACCACAAAC
COR15a III F	GCCGACATACATTTGTTTCTATTACA
COR15a III R	GTGGTTTTCAGAAAGAAGAAGAAAAA
TA3 FW	CTGCGTGGAAGTCTGTCAAA
TA3 RW	CTATGCCACAGGGCAGTTTT
BiFC 에세이에 사용된 컨스트럭트용 프라이머	
Trx-h2 attB1 F	AAAAAGCAGGCCATATGGGAGGAGCTTTATCAAC
Trx-h2 attB2 R	AGAAAGCTGGGTTATGCTCTGAGTTTGCTAA

[232]

프라이머	서열 (5'→3')
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCCAT
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT
CBF1 F	ATGAACTCATTTTCAGCTTTTTCTGAA
CBF1 R	TTAGTAACTCCAAAGCGACACGTC
CBF1 attB1 F	AAAAAGCAGGCCATATGAACTCATTTTCAG
CBF1 attB1 R	AGAAAGCTGGGTTAGTAACTCCAAAGCGAC
CBF2 F	ATGAACTCATTTTCTGCCTTTTCTGA
CBF2 R	TTAATAGCTCCATAAGGACACGTCATC
CBF2 attB1 F	AAAAAGCAGGCCATATGAACTCATTTTCTG
CBF2 attB1 R	AGAAAGCTGGGTTAATAGCTCCATAAGGAC
CBF3 F	ATGAACTCATTTTCTGCTTTTTCTGAAA
CBF3 R	TTAATAACTCCATAACGATACGTCGTCAT
CBF3 attB1 F	AAAAAGCAGGCCATATGAACTCATTTTCTG
CBF3 attB1 R	AGAAAGCTGGGTTAATAACTCCATAACGAT
시험관 내 풀-다운 에세이를 위한 컨스트럭트용 프라이머	
Trx-h2 F (*BamH*I)	GGATCCAATGGGAGGAGCTTTATCA
Trx-h2 R (*Hind*III)	AAGCTTTTATGCTCTGAGTTTGCTAACTTT
CBF1 F (*EcoR*I)	GAATTCATGAACTCATTTTCAGCT
CBF1 R (*Hind*III)	AAGCTTTTAGTAACTCCAAAGCGA
CBF2 F (*EcoR*I)	GAATTCATGAACTCATTTTCTGCCT
CBF2 R (*Hind*III)	AAGCTTTTAATAGCTCCATAAGGACAC
CBF3 F (*EcoR*I)	GAATTCATGAACTCATTTTCTGCTT
CBF3 R (*Hind*III)	AAGCTTTTAATAACTCCATAACGAT
점-변환된 **CBF1**을 위한 컨스트럭트용 프라이머	
CBF1 C23, 30S F	AGTCCGACGTTGGCCACGAGTAGT
CBF1 C23, 30S R	ACTACTCGTGGCCAACGTCGGACT
CBF1 C100S F	CAAGTCTCAACTTCGCTGACT
CBF1 C100S R	AGTCAGCGAAGTTGAGACTTG
CBF1 C117S F	AGCGCCAAGGATATCCAAA
CBF1 C117S R	TTTGGATATCCTTGGCGCT

[233]

프라이머	서열 (5'→3')
CBF1 C137S F	CGAGTGATACGACGACCA
CBF1 C137S R	TGGTCGTCGTATCACTCG
EMSA 에세이를 위한 컨스트럭트용 프라이머	
CRT/DRE F'	ATTTCATGGCCGACCTGCTTTTT
CRT/DRE R'	AAAAAGCAGGTCGGCCATGAAAT
일시적인 트랜스액티베이션 에세이를 위한 컨스트럭트용 프라이머	
P_{COR15a} F	TATTTCATATTGAATTAGGAGATGTTACTG
P_{COR15a} R	GAAGCTGCTCTGCTTGGCTC
P_{COR15a} attB1 F	AAAAAGCAGGCCATTATTTCATATTGAAT
P_{COR15a} attB2 R	AGAAAGCTGAAGCTGCTCTGCTT

청구범위

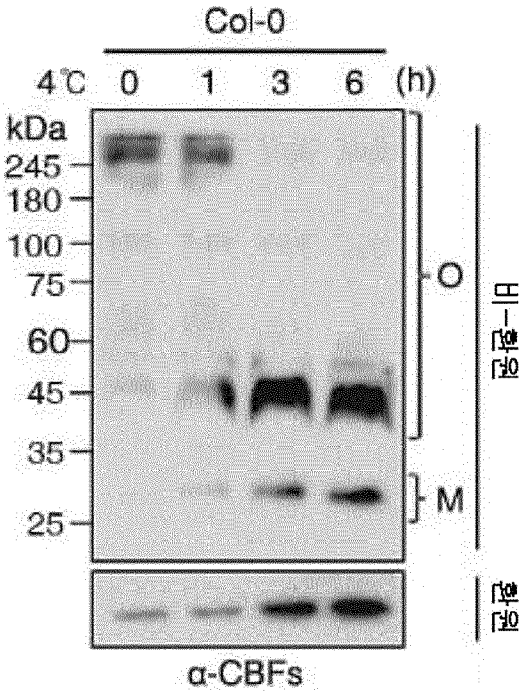
[청구항 1] 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체에 있어서, 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 서열번호: 2의 아미노산 서열을 지니는 C-반복 결합인자 1(CBF 1)과 상호 작용하여 CBF 1을 0~10 ℃의 저온에서 고분자량의 올리고머로부터 저분자량의 모노머로 해리 전환시켜 형질전환 식물체에게 저온 저항성을 부여함을 특징으로 하는 티오레독신 Trx-h2 단백질을 과발현하는 추위 저항성 형질전환 식물체.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 2번째 아미노산 잔기인 글리신에 의해 세포질에 미리스토일화 되어 있으나 0~10 ℃의 저온에서 세포질로부터 탈미리스토일화 되어 Trx-h2 단백질이 핵으로 트랜스로케이션 되어 CBF 1과 상호 작용하여 CBF 1의 구조적 전환을 야기시켜 식물체에 저온 저항성을 부여함을 특징으로 하는 추위 저항성 형질전환 식물체.

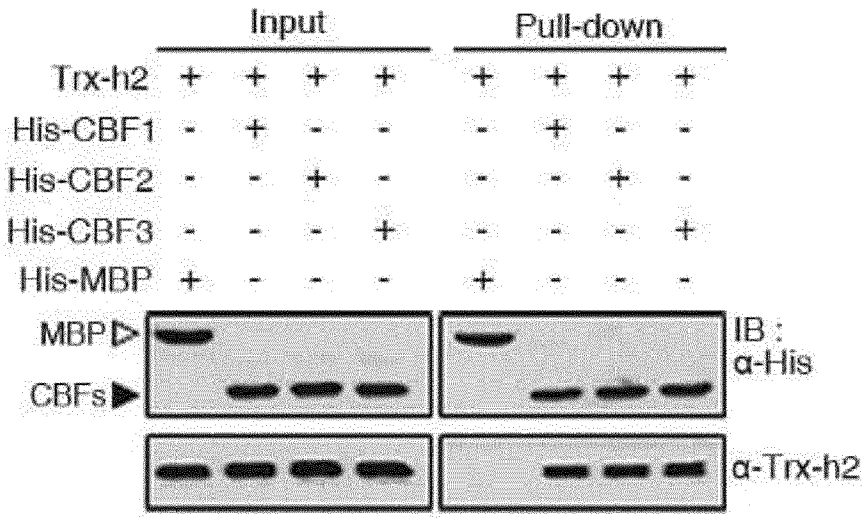
[청구항 3] 제 2항에 있어서, 상기 티오레독신 Trx-h2 단백질은 31번째 잔기로부터 133번 잔기 까지 122개의 아미노산을 지닌 잘 보존된 Trx 모티프를 지니며 Trx 모티프 내의 59번째 및 62번째 잔기인 시스테인이 CBF 1과 상호 작용함을 특징으로 하는 추위 저항성 형질전환 식물체.

[청구항 4] 제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 C-반복 결합인자 1(CBF 1) 내의 23번, 30번, 100번, 117번 및 137번째 보존된 잔기인 시스테인이 티오레독신 Trx-h2 단백질과 상호 작용함을 특징으로 하는 추위 저항성 형질전환 식물체.

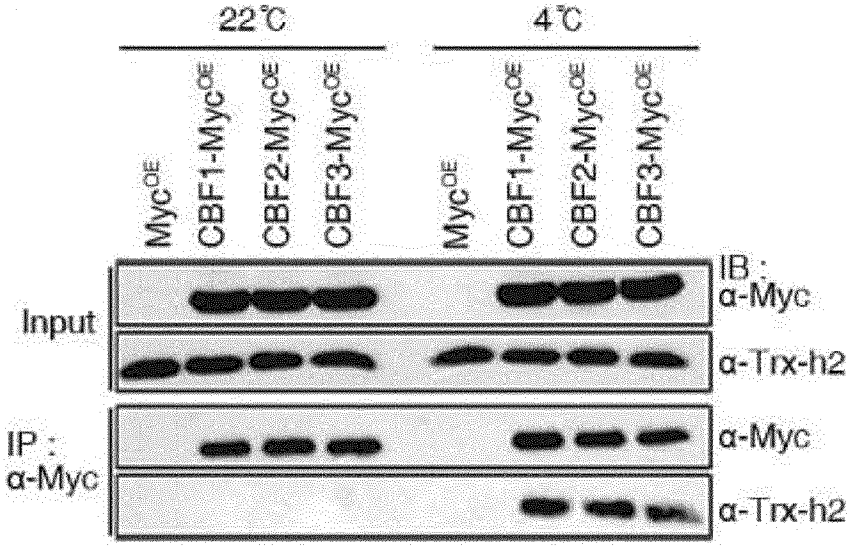
[도1a]


Col-0
4℃ 0 1 3 6 (h)
kDa
245
180
100
75
60
45
35
25
O
M
비-환원
환원
α-CBFs

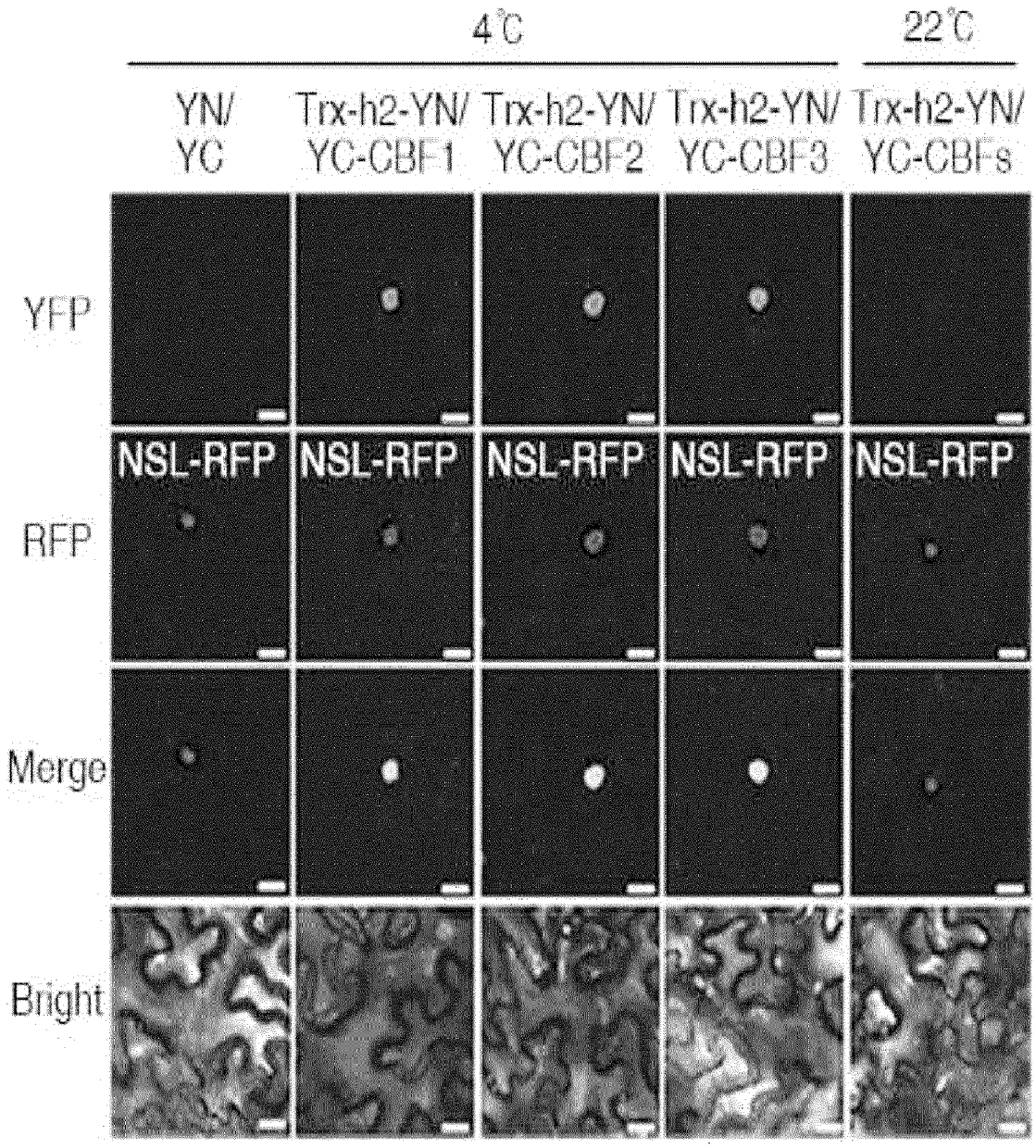
[도1b]


Input
Pull-down
Trx-h2 + + + + + + + +
His-CBF1 - + - - - + - -
His-CBF2 - - + - - - + -
His-CBF3 - - - + - - - +
His-MBP + - - - + - - -
MBP
CBFs
IB :
α-His
α-Trx-h2

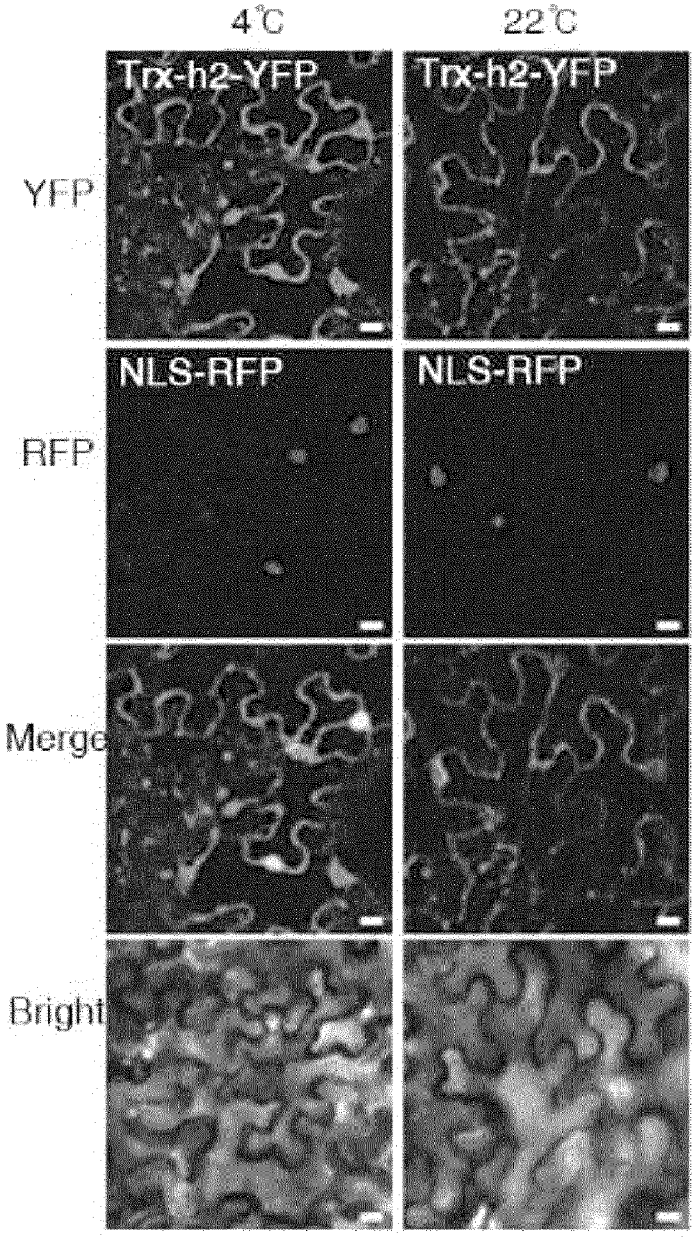
[도1c]


22℃
4℃
Myc^OE
CBF1-Myc^OE
CBF2-Myc^OE
CBF3-Myc^OE
Input
IB :
α-Myc
α-Trx-h2
IP :
α-Myc
α-Myc
α-Trx-h2

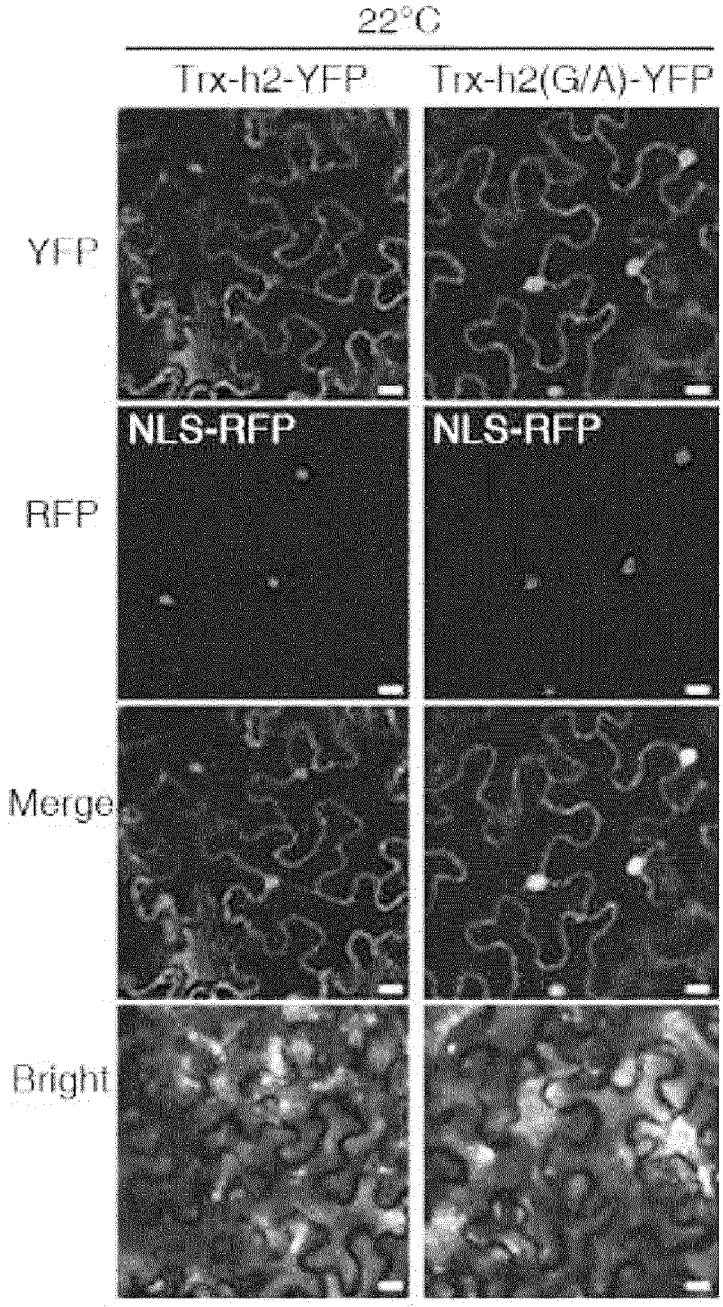
[도1d]


4℃
22℃
YN/ YC
Trx-h2-YN/ YC-CBF1
Trx-h2-YN/ YC-CBF2
Trx-h2-YN/ YC-CBF3
Trx-h2-YN/ YC-CBFs
YFP
RFP
NSL-RFP
Merge
Bright

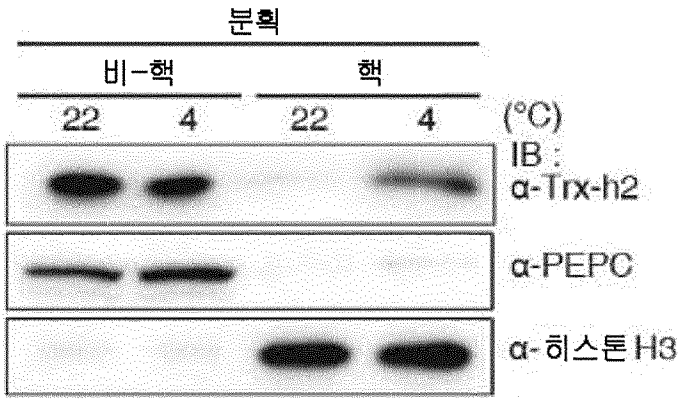
[도1e]



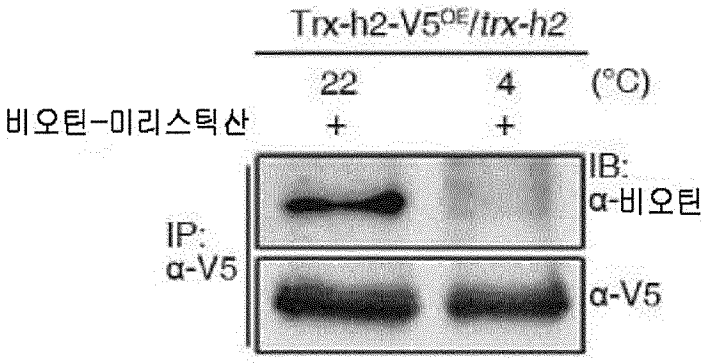
[도1f]


22°C
Trx-h2-YFP
Trx-h2(G/A)-YFP
YFP
RFP
NLS-RFP
NLS-RFP
Merge
Bright

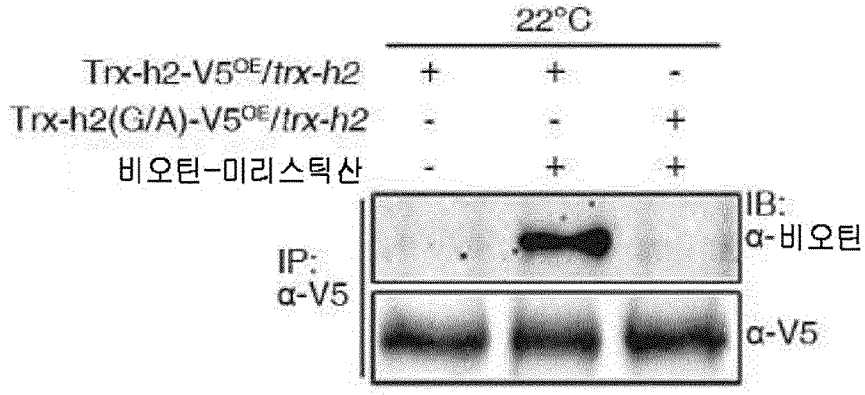
[도1g]


분획
비-핵
핵
22
4
22
4
(°C)
IB :
α-Trx-h2
α-PEPC
α-히스톤 H3

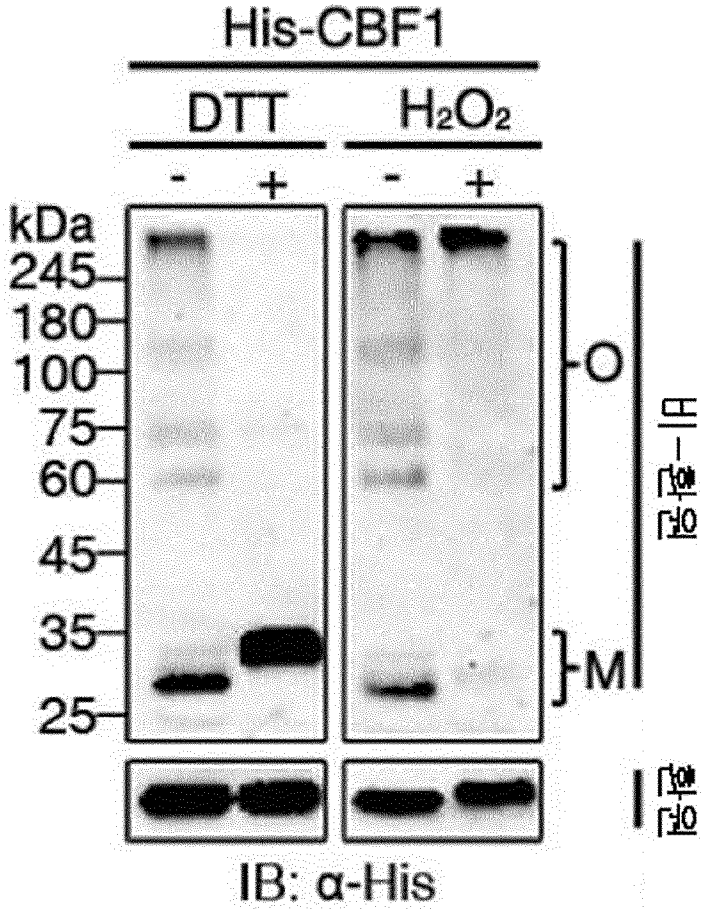
[도1h]


Trx-h2-V5OE/trx-h2
22
4
(°C)
비오틴-미리스틱산
+
+
IB:
α-비오틴
IP:
α-V5
α-V5

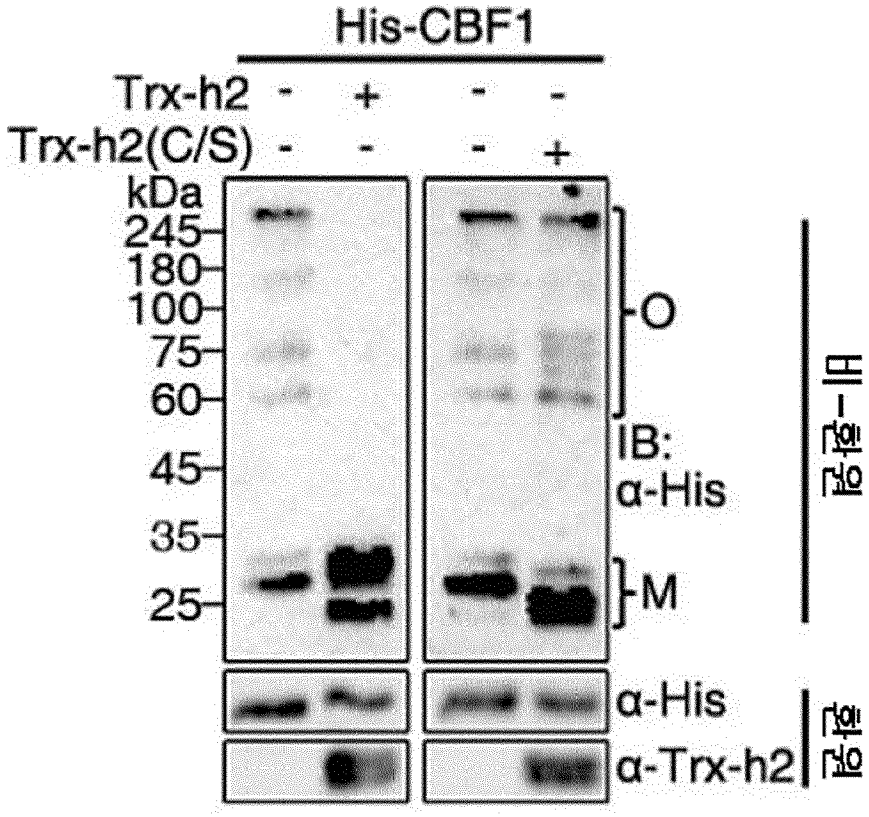
[도1i]


22°C
Trx-h2-V5OE/trx-h2
+
+
-
Trx-h2(G/A)-V5OE/trx-h2
-
-
+
비오틴-미리스틱산
-
+
+
IB:
α-비오틴
IP:
α-V5
α-V5

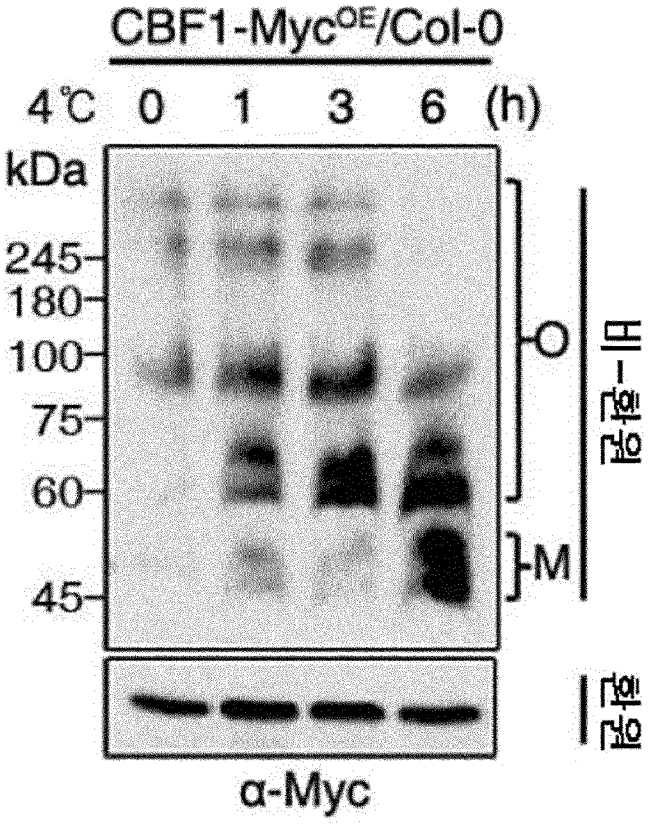
[도2a]


His-CBF1
DTT
H2O2
-
+
-
+
kDa
245
180
100
75
60
45
35
25
O
M
산화된 단량체
환원된 단량체
IB: α-His

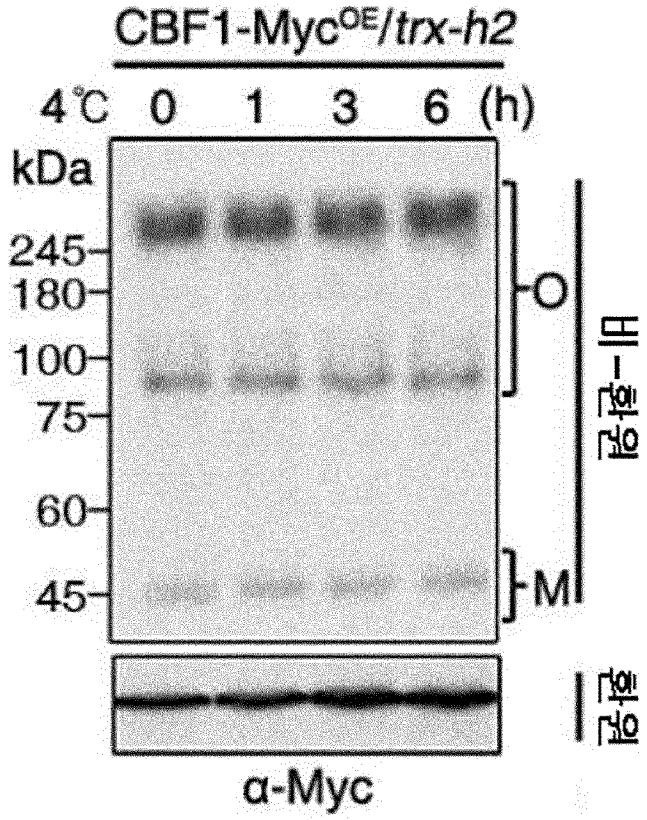
[도2b]


His-CBF1
Trx-h2 - + - -
Trx-h2(C/S) - - - +
kDa
245
180
100
75
60
45
35
25
O
M
IB:
α-His
α-His
α-Trx-h2
비-환원
환원

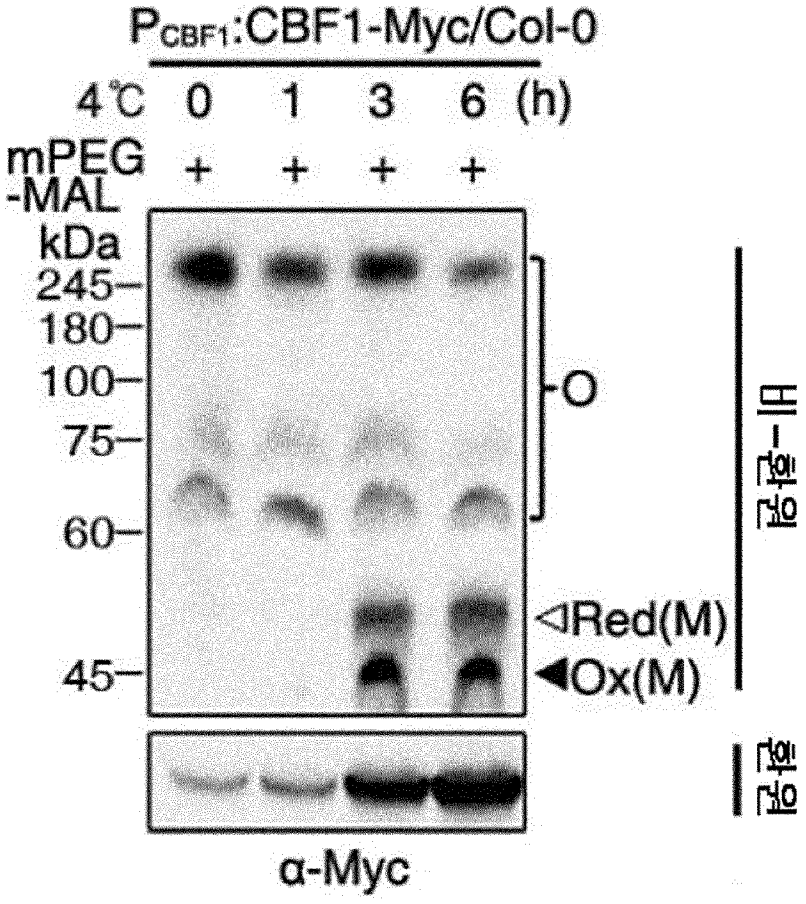
[도2c]


CBF1-Myc^OE/Col-0
4℃ 0 1 3 6 (h)
kDa
245
180
100
75
60
45
O
M
비-환원
환원
α-Myc

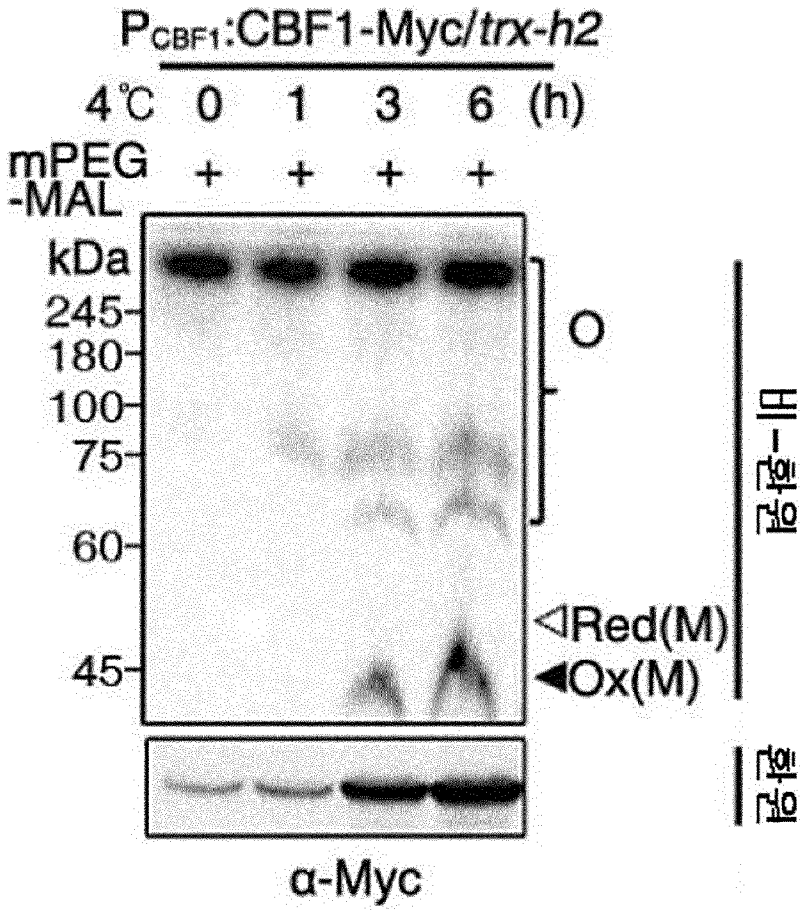
[도2d]


CBF1-Myc^OE/trx-h2
4℃ 0 1 3 6 (h)
kDa
245
180
100
75
60
45
O
M
비-환원
환원
α-Myc

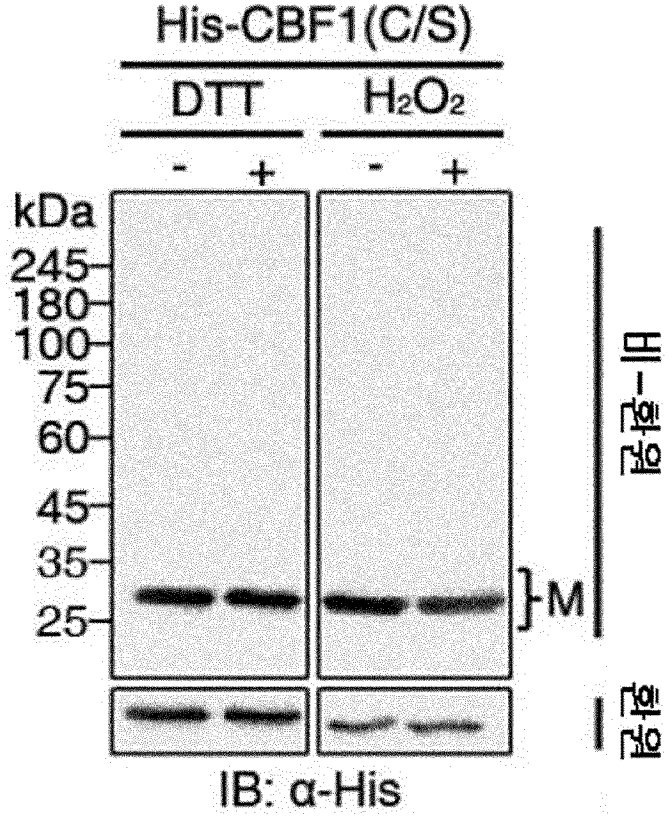
[도2e]


P_CBF1:CBF1-Myc/Col-0
4℃ 0 1 3 6 (h)
mPEG -MAL + + + +
kDa
245
180
100
75
60
45
O
◁Red(M)
◀Ox(M)
비-환원
환원
α-Myc

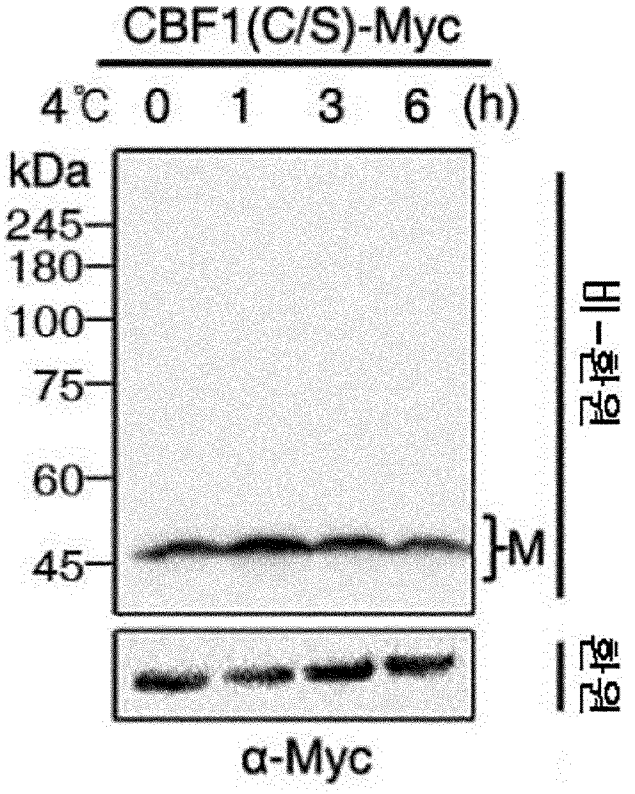
[도2f]


PCBF1:CBF1-Myc/trx-h2
4℃ 0 1 3 6 (h)
mPEG -MAL + + + +
kDa
245
180
100
75
60
45
O
◁Red(M)
◀Ox(M)
비-환원
환원
α-Myc

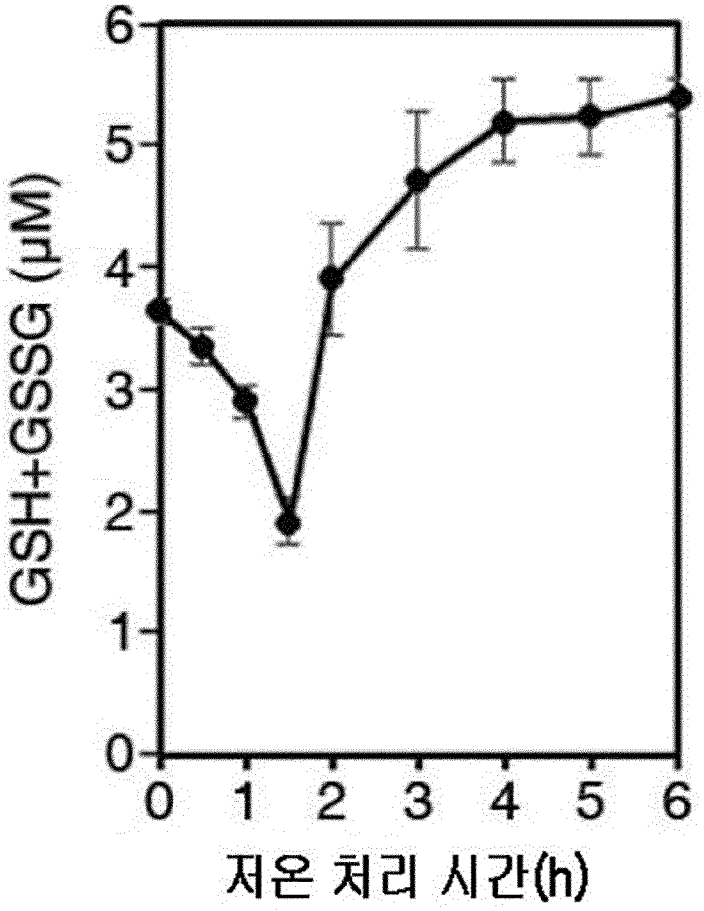
[도2g]


His-CBF1(C/S)
DTT
H2O2
- + - +
kDa
245
180
100
75
60
45
35
25
M
비-환원
환원
IB: α-His

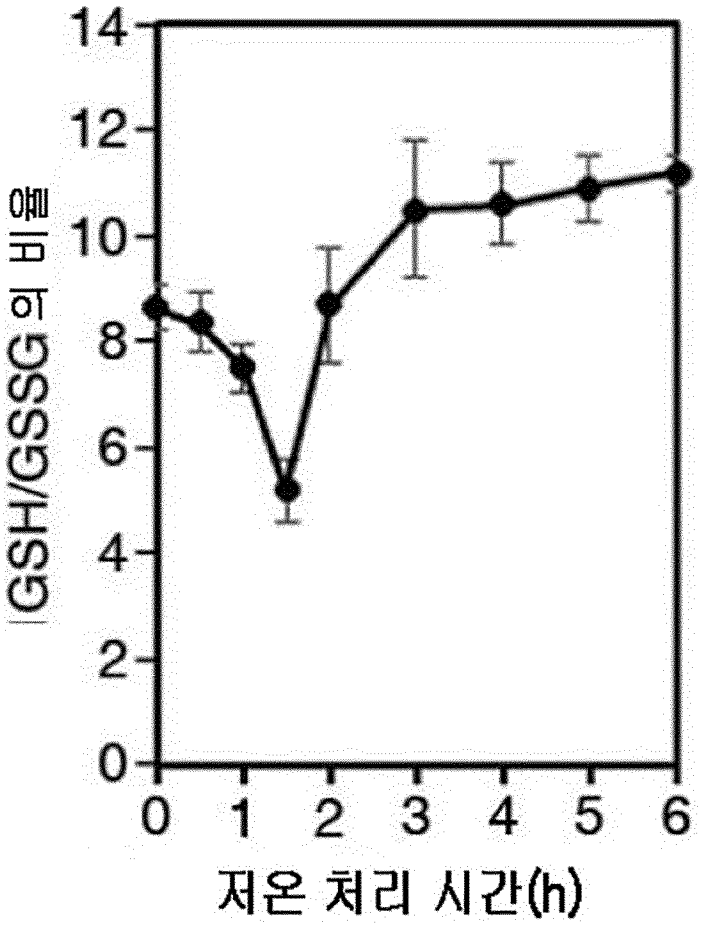
[도2h]


CBF1(C/S)-Myc
4℃ 0 1 3 6 (h)
kDa
245
180
100
75
60
45
M
비-환원
환원
α-Myc

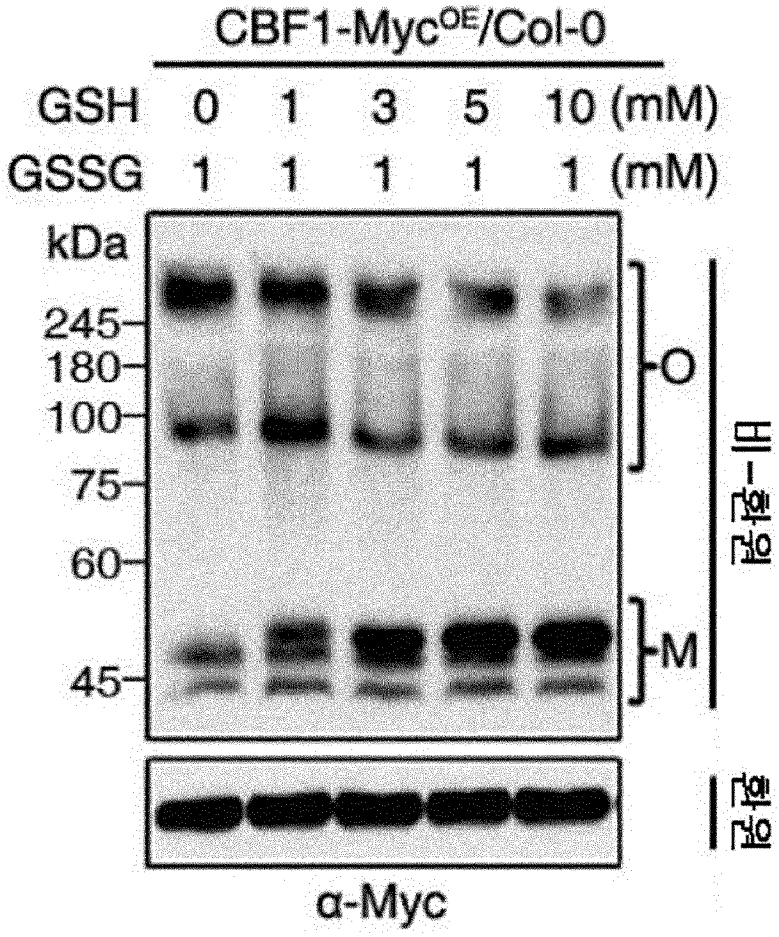
[도2i]


GSH+GSSG (μM)
0
1
2
3
4
5
6
0 1 2 3 4 5 6
저온 처리 시간(h)

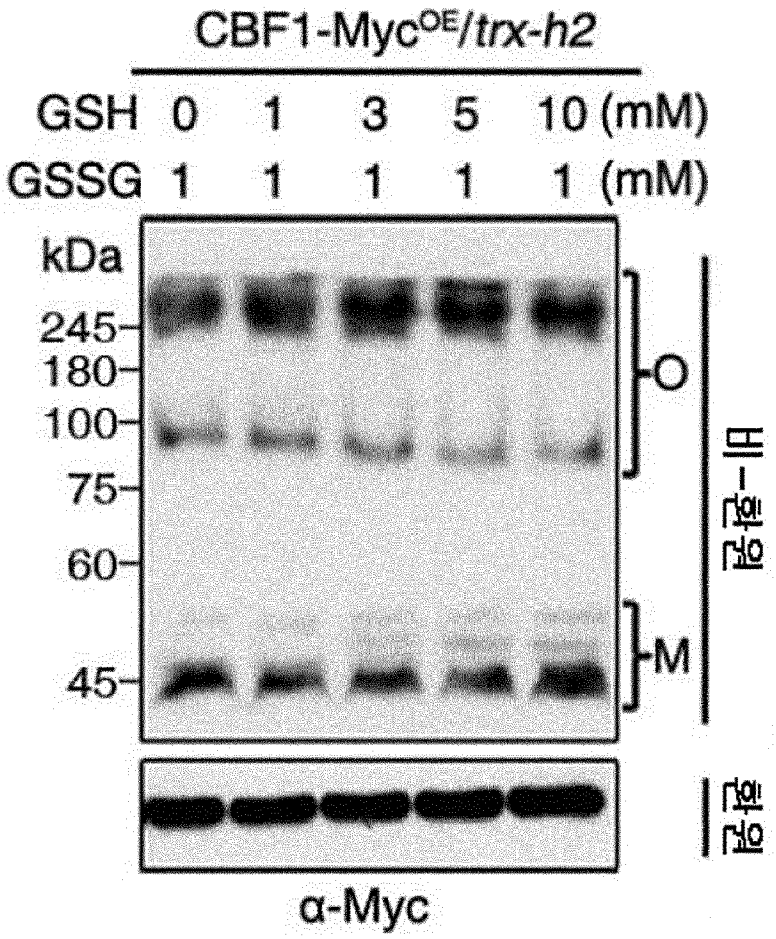
[도2j]


14
12
10
8
6
4
2
0
GSH/GSSG 의 비율
0 1 2 3 4 5 6
저온 처리 시간(h)

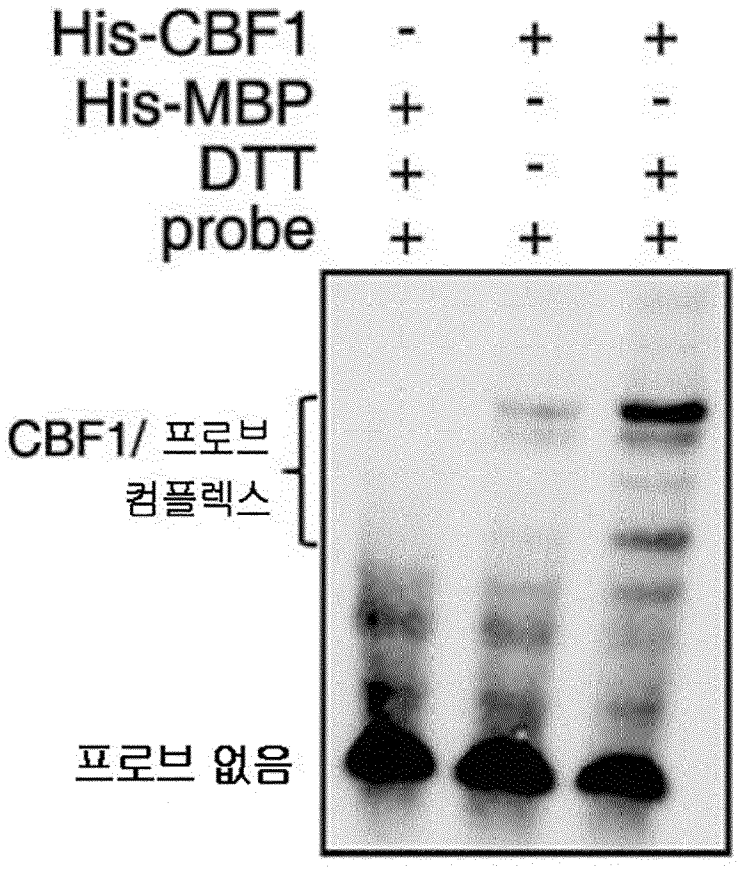
[도2k]


CBF1-Myc^OE/Col-0
GSH 0 1 3 5 10 (mM)
GSSG 1 1 1 1 1 (mM)
kDa
245
180
100
75
60
45
O
M
비-환원
환원
α-Myc

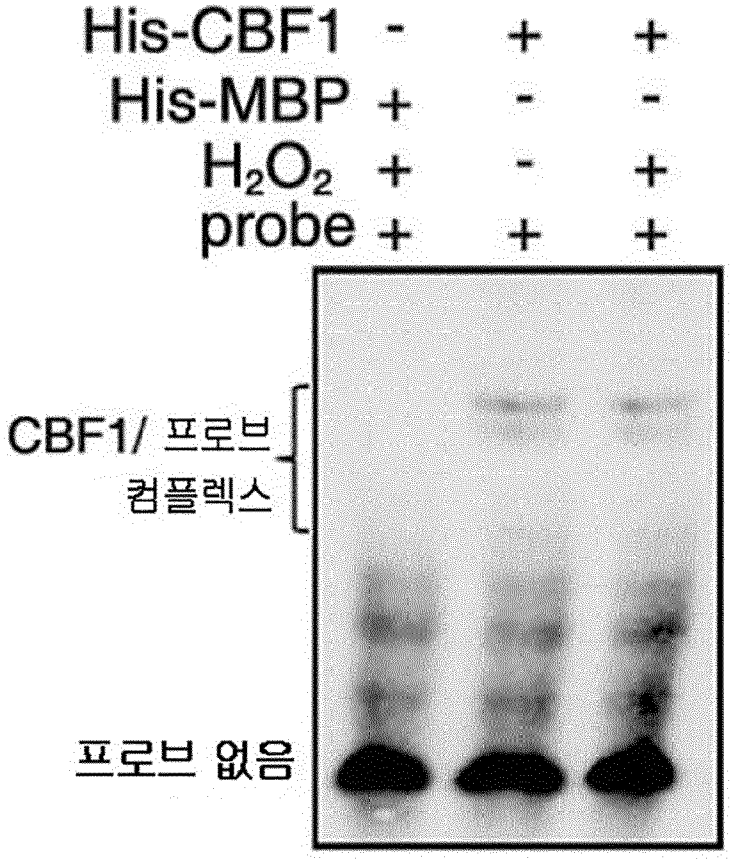
[도2l]


CBF1-Myc^OE/trx-h2
GSH 0 1 3 5 10 (mM)
GSSG 1 1 1 1 1 (mM)
kDa
245
180
100
75
60
45
O
M
비-환원
환원
α-Myc

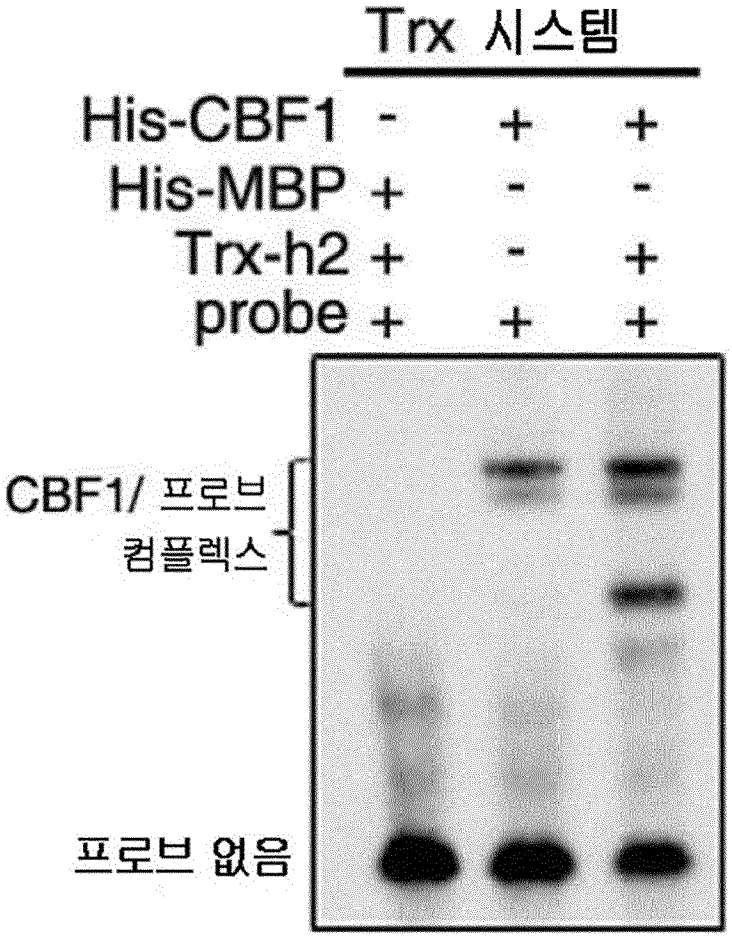
[도3a]


His-CBF1 - + +
His-MBP + - -
DTT + - +
probe + + +
CBF1/ 프로브
컴플렉스
프로브 없음

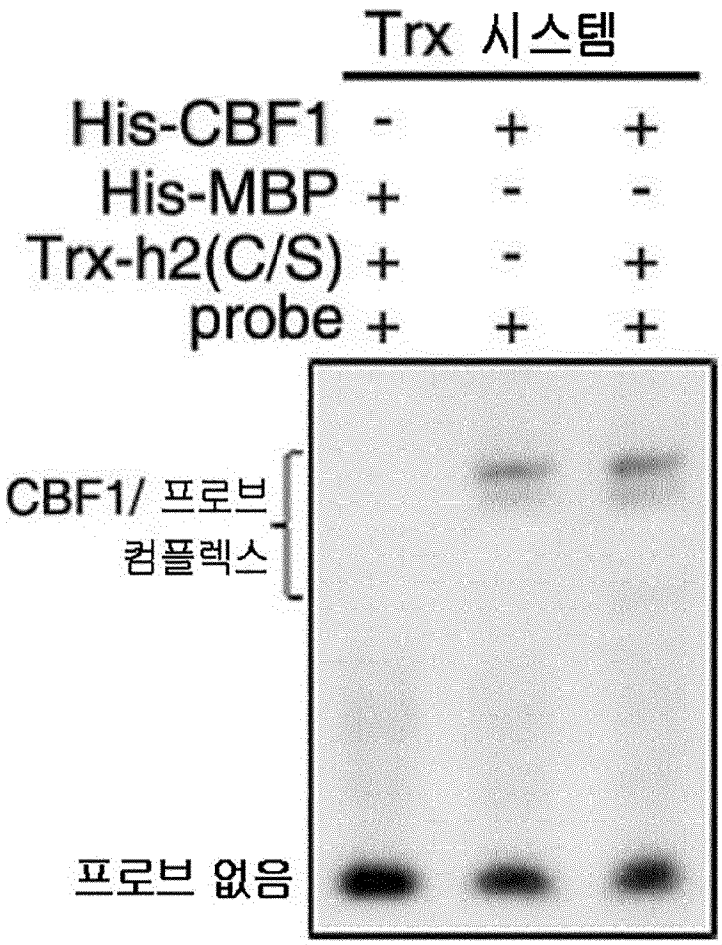
[도3b]


His-CBF1 - + +
His-MBP + - -
H_2O_2 + - +
probe + + +
CBF1/ 프로브
컴플렉스
프로브 없음

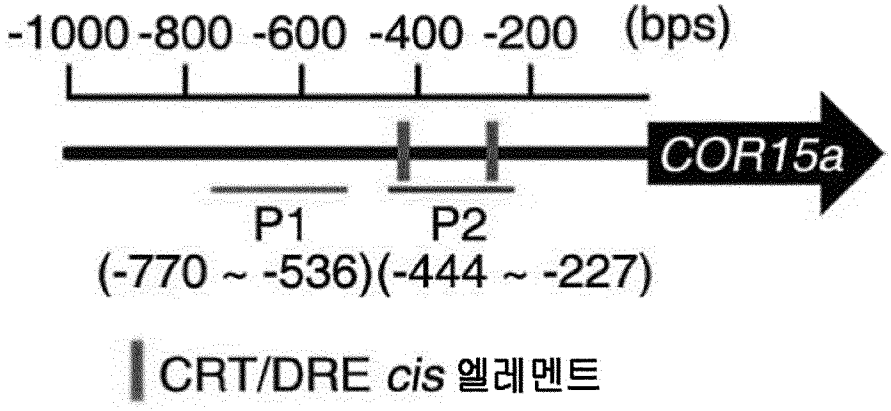
[도3c]


Trx 시스템
His-CBF1 - + +
His-MBP + - -
Trx-h2 + - +
probe + + +
CBF1/ 프로브
컴플렉스
프로브 없음

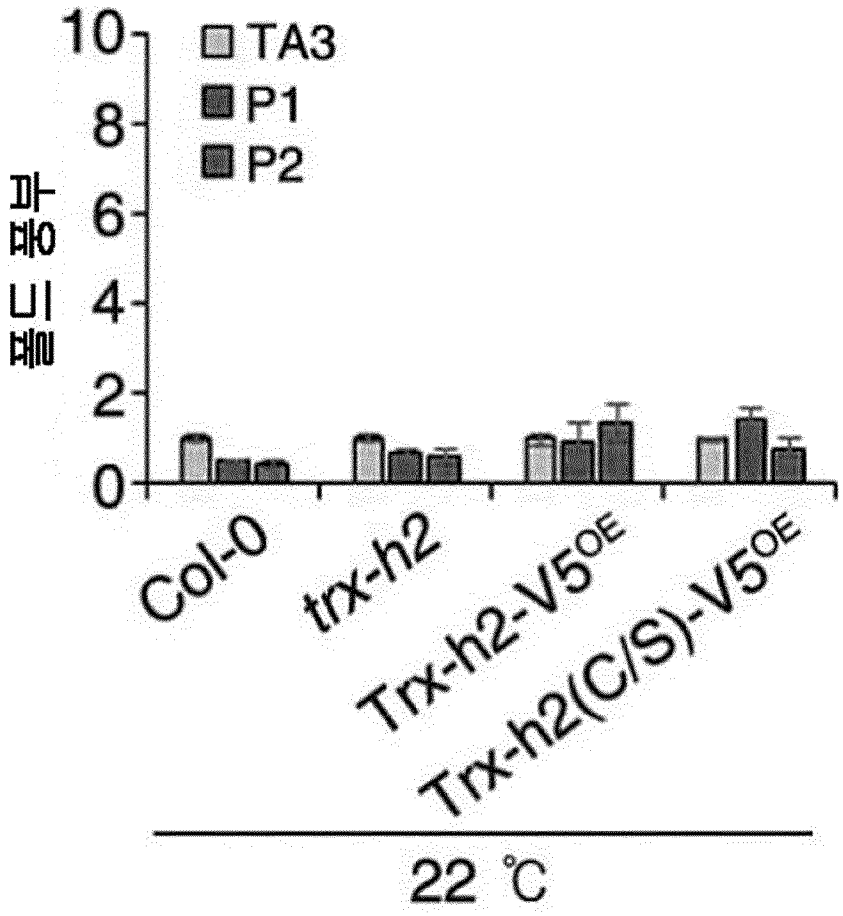
[도3d]


Trx 시스템
His-CBF1 - + +
His-MBP + - -
Trx-h2(C/S) + - +
probe + + +
CBF1/ 프로브
컴플렉스
프로브 없음

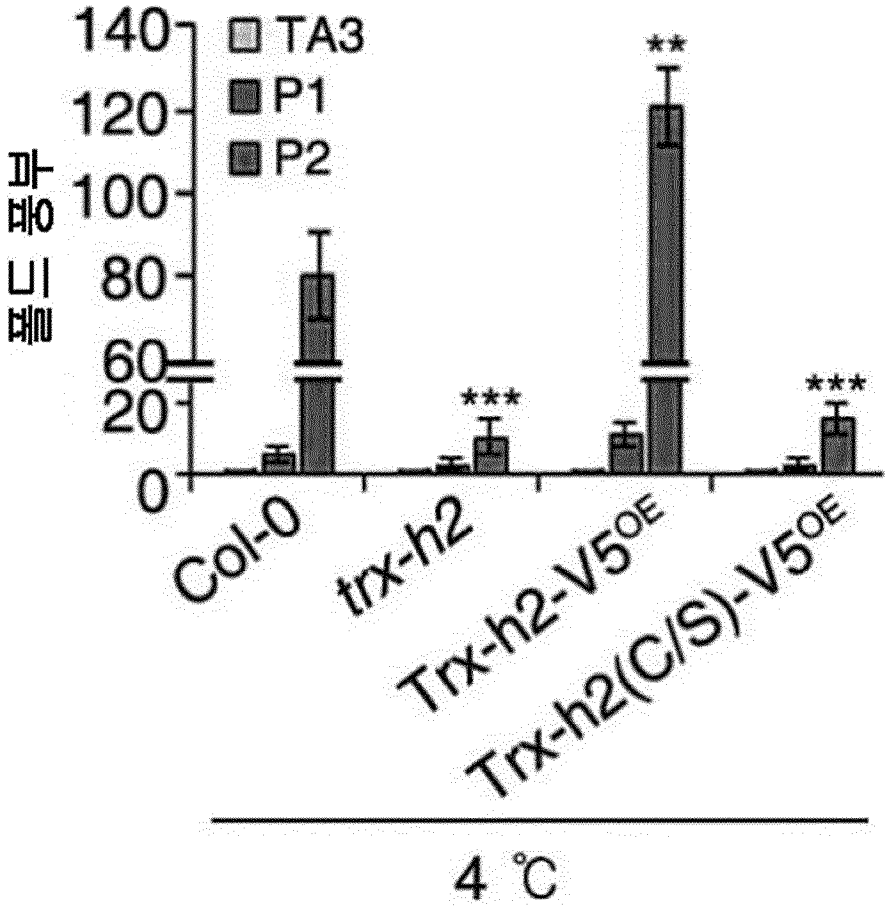
[도3e]


-1000 -800 -600 -400 -200 (bps)
COR15a
P1
P2
(-770 ~ -536)(-444 ~ -227)
CRT/DRE cis 엘레멘트

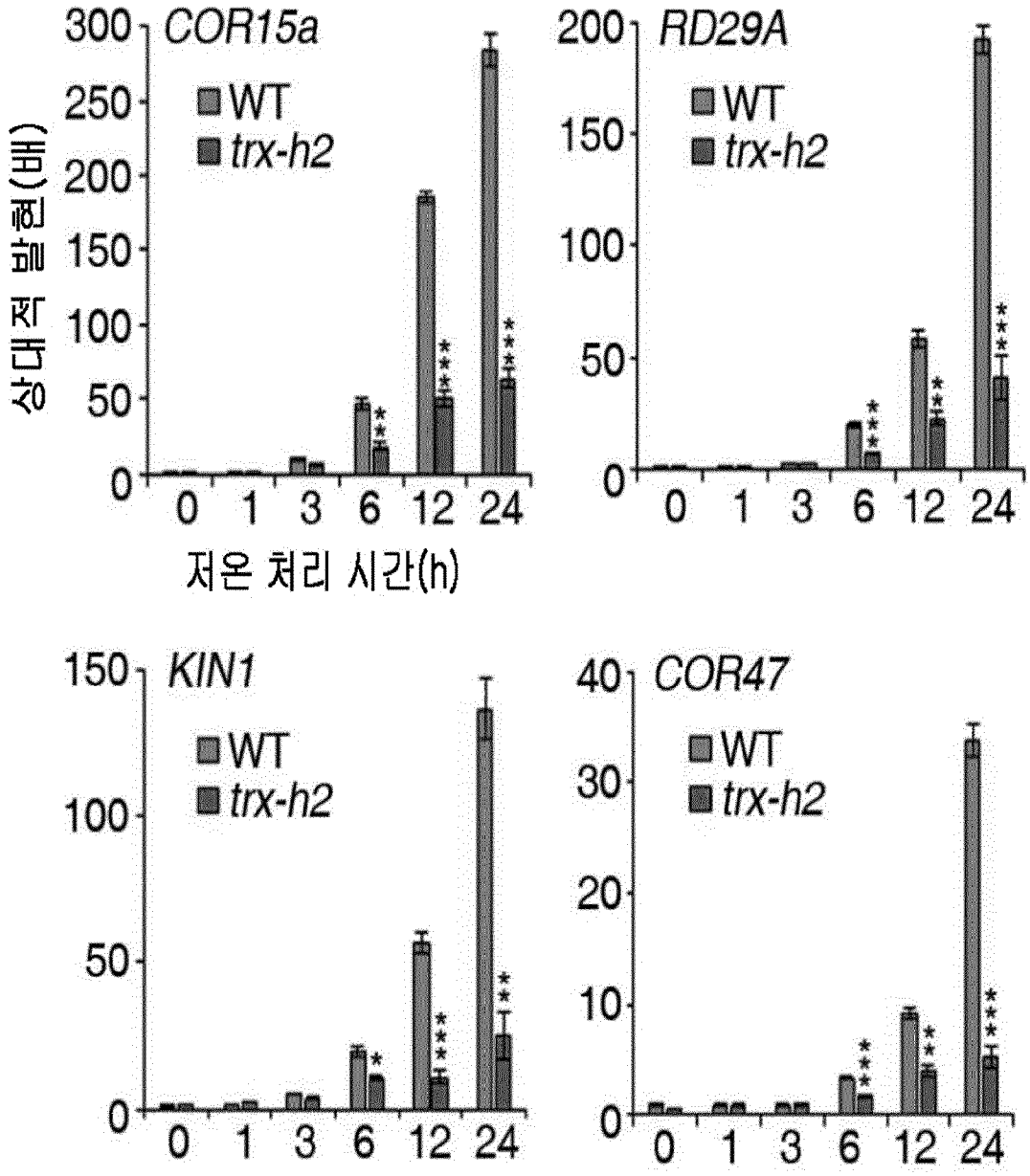
[도3f]


TA3
P1
P2
파종 비율
10
8
6
4
2
0
Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE
Trx-h2(C/S)-V5OE
22 ℃

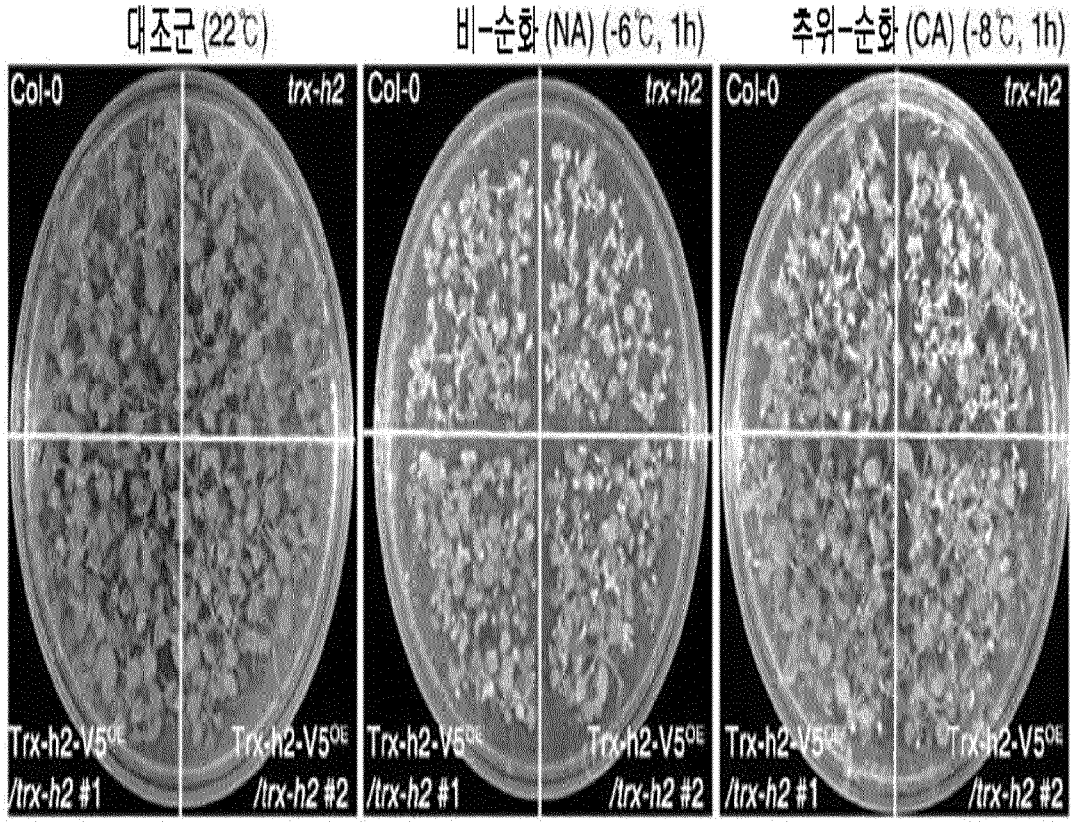
[도3g]


TA3
P1
P2
파종 비율
140
120
100
80
60
20
0
**
***
***
Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE
Trx-h2(C/S)-V5OE
4 ℃

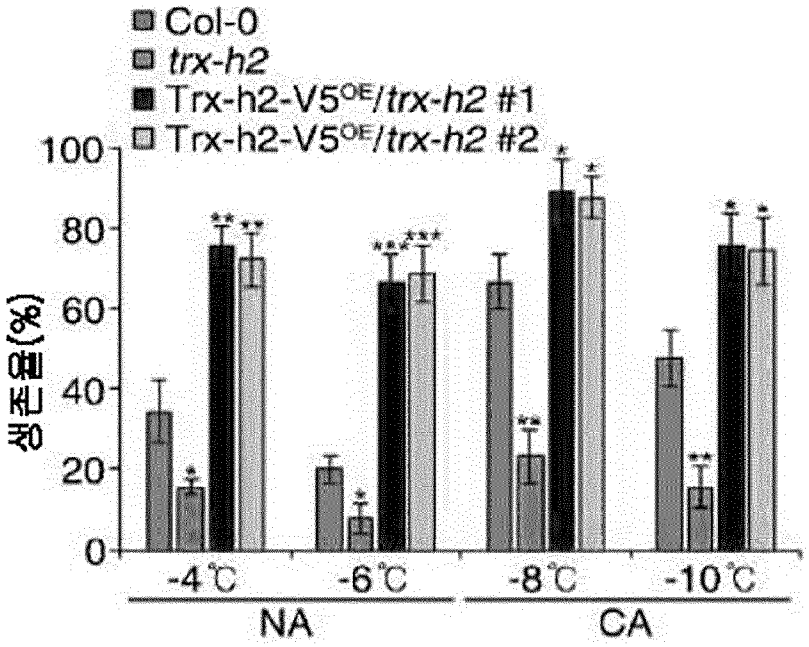
[도3h]



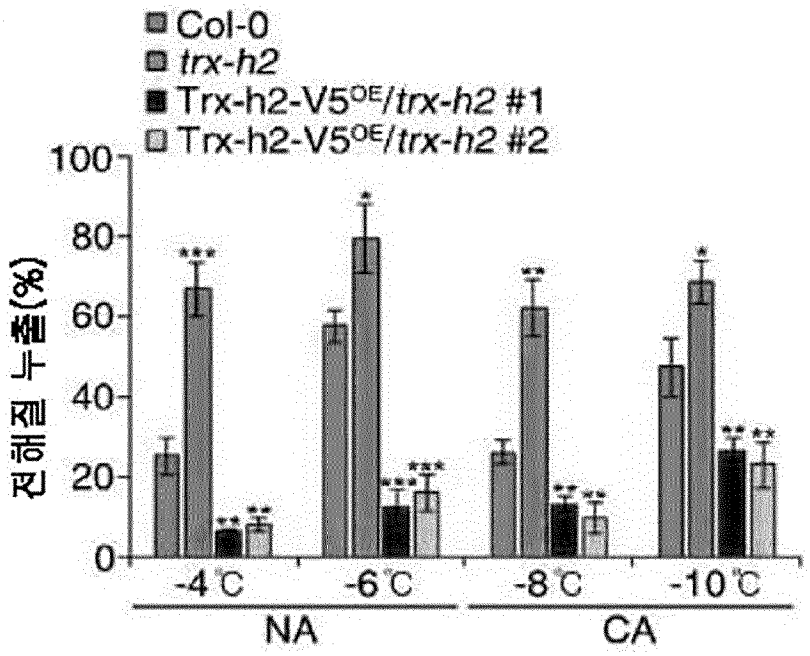
[도4a]


대조군 (22℃)
비-순화 (NA) (-6℃, 1h)
추위-순화 (CA) (-8℃, 1h)
Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE /trx-h2 #1
Trx-h2-V5OE /trx-h2 #2

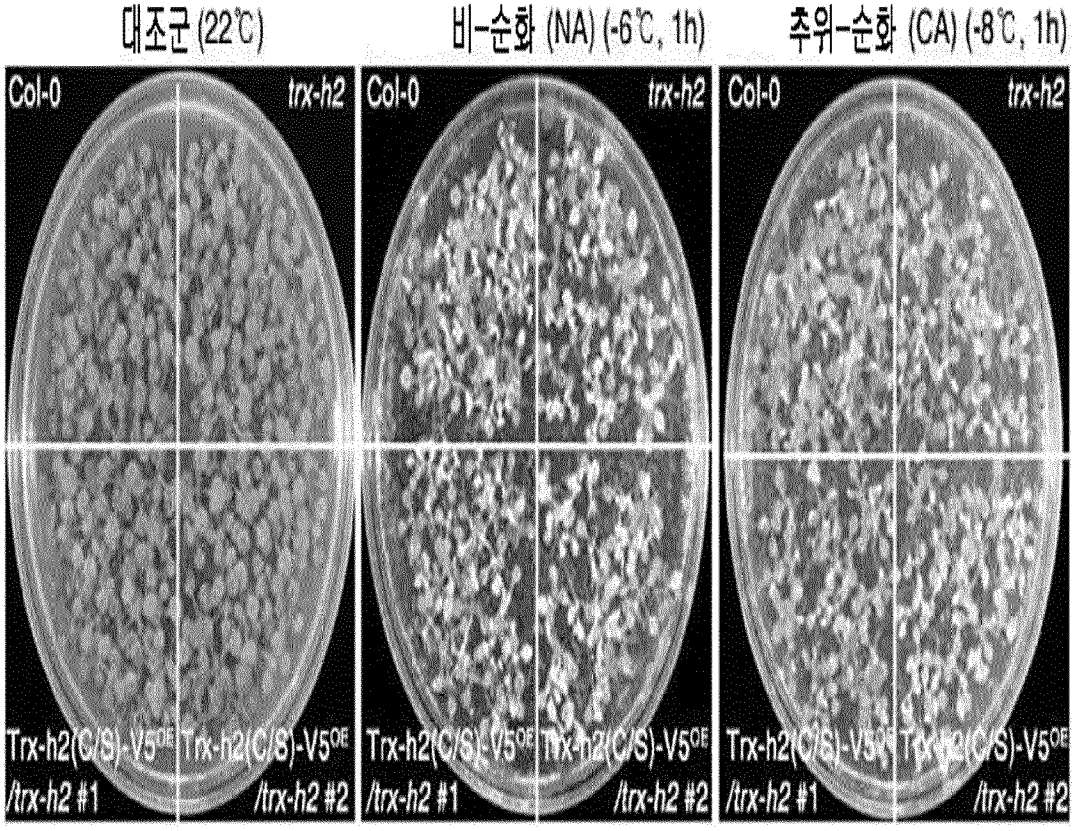
[도4b]


Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE/trx-h2 #1
Trx-h2-V5OE/trx-h2 #2
생존율(%)
100
80
60
40
20
0
-4℃
-6℃
-8℃
-10℃
NA
CA

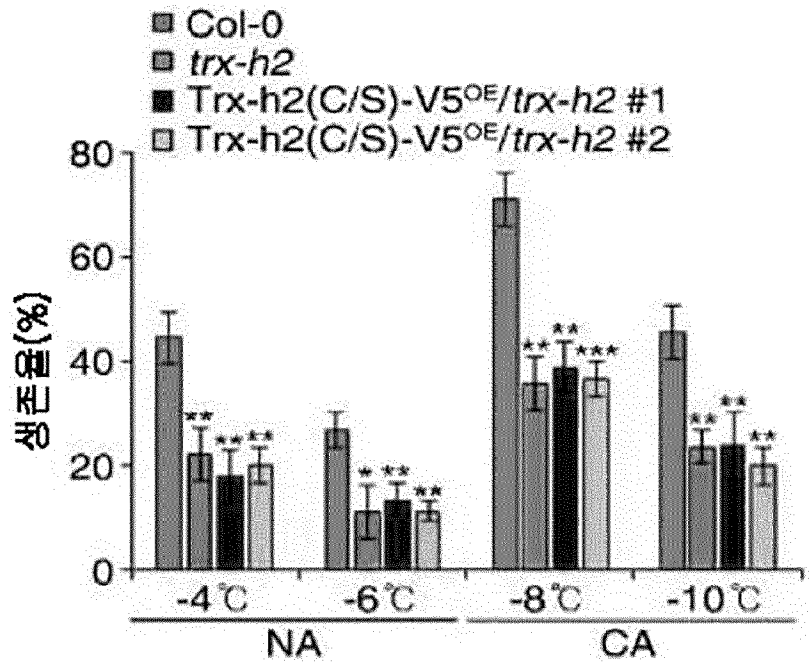
[도4c]


Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE/trx-h2 #1
Trx-h2-V5OE/trx-h2 #2
전해질 누출(%)
100
80
60
40
20
0
-4℃
-6℃
-8℃
-10℃
NA
CA

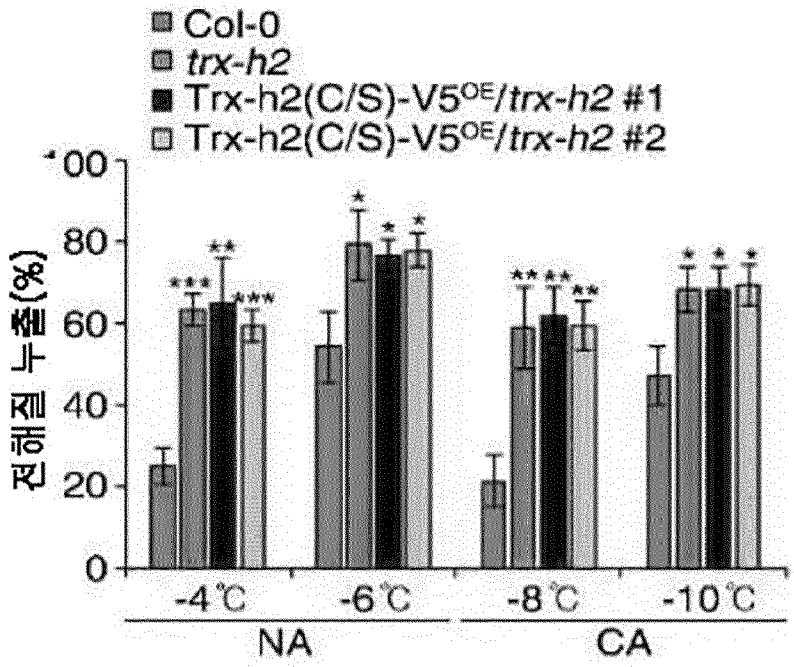
[도4d]


대조군 (22℃)
비-순화 (NA) (-6℃, 1h)
추위-순화 (CA) (-8℃, 1h)
Col-0
trx-h2
Trx-h2(C/S)-V5OE /trx-h2 #1
Trx-h2(C/S)-V5OE /trx-h2 #2

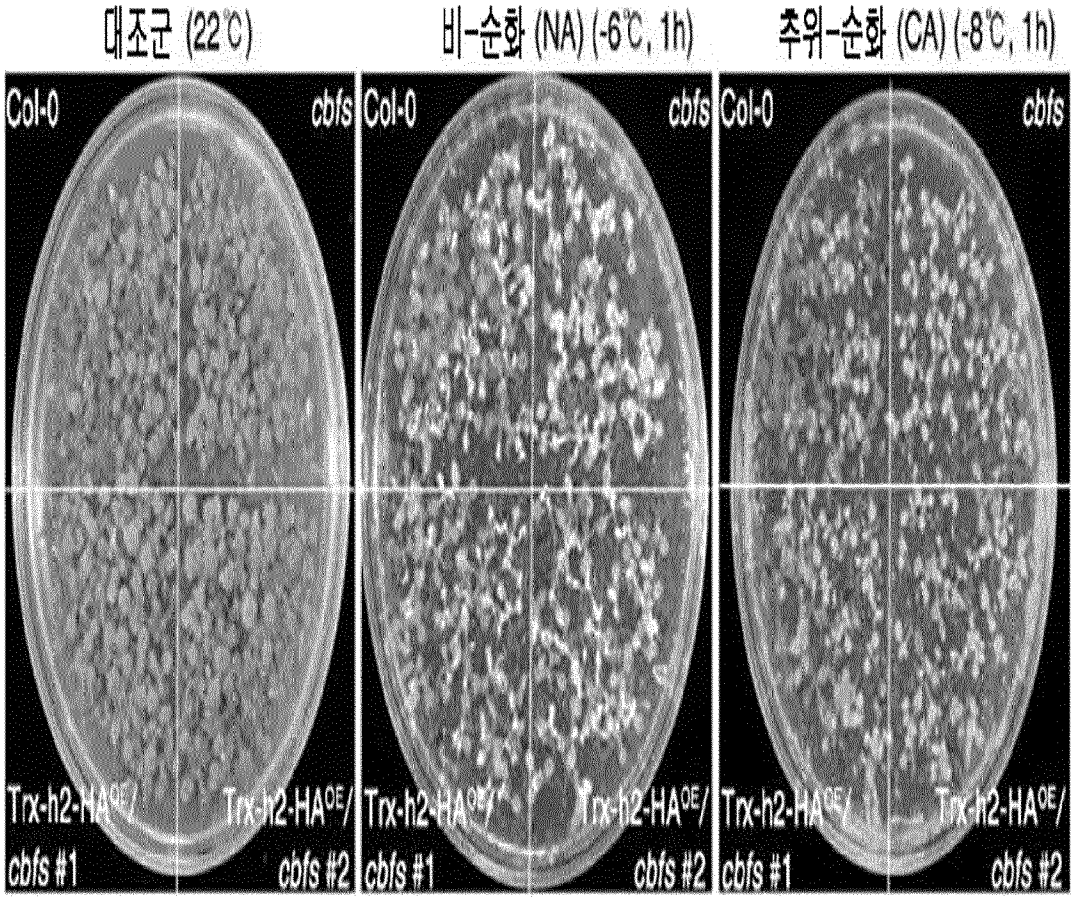
[도4e]


Col-0
trx-h2
Trx-h2(C/S)-V5OE/trx-h2 #1
Trx-h2(C/S)-V5OE/trx-h2 #2
생존율(%)
80
60
40
20
0
-4℃
-6℃
-8℃
-10℃
NA
CA

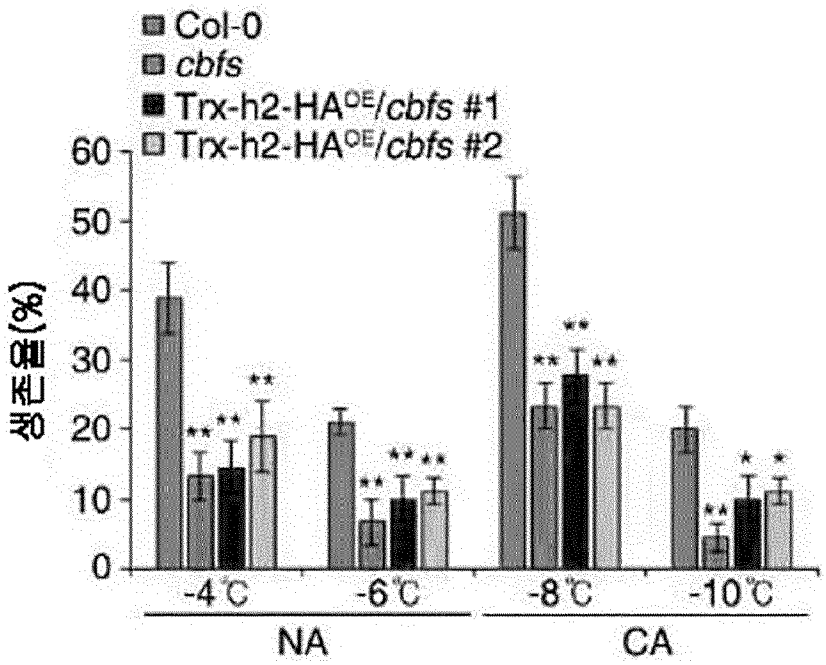
[도4f]


Col-0
trx-h2
Trx-h2(C/S)-V5OE/trx-h2 #1
Trx-h2(C/S)-V5OE/trx-h2 #2
전해질 누출(%)
100
80
60
40
20
0
-4℃
-6℃
-8℃
-10℃
NA
CA

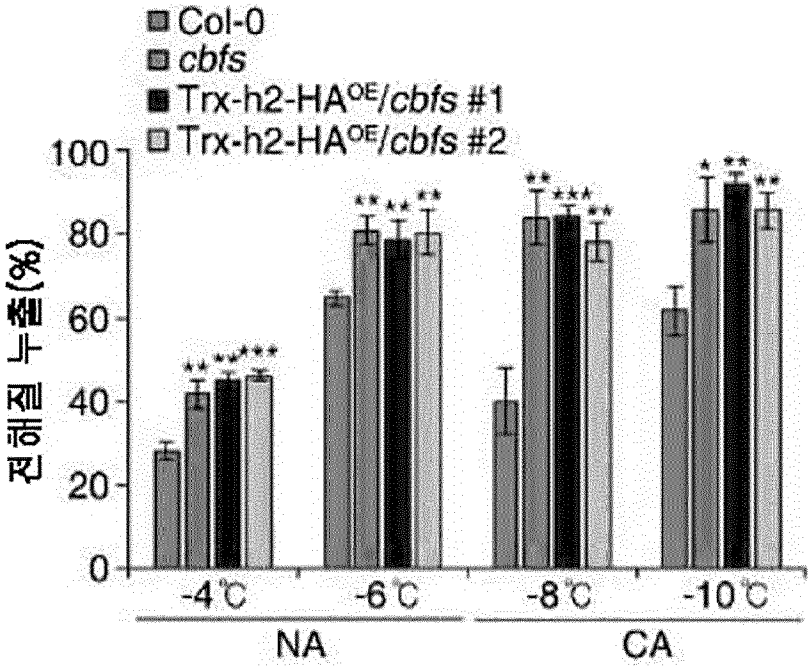
[도4g]


대조군 (22℃)
비-순화 (NA) (-6℃, 1h)
추위-순화 (CA) (-8℃, 1h)
Col-0
cbfs
Trx-h2-HA^OE/cbfs #1
Trx-h2-HA^OE/cbfs #2

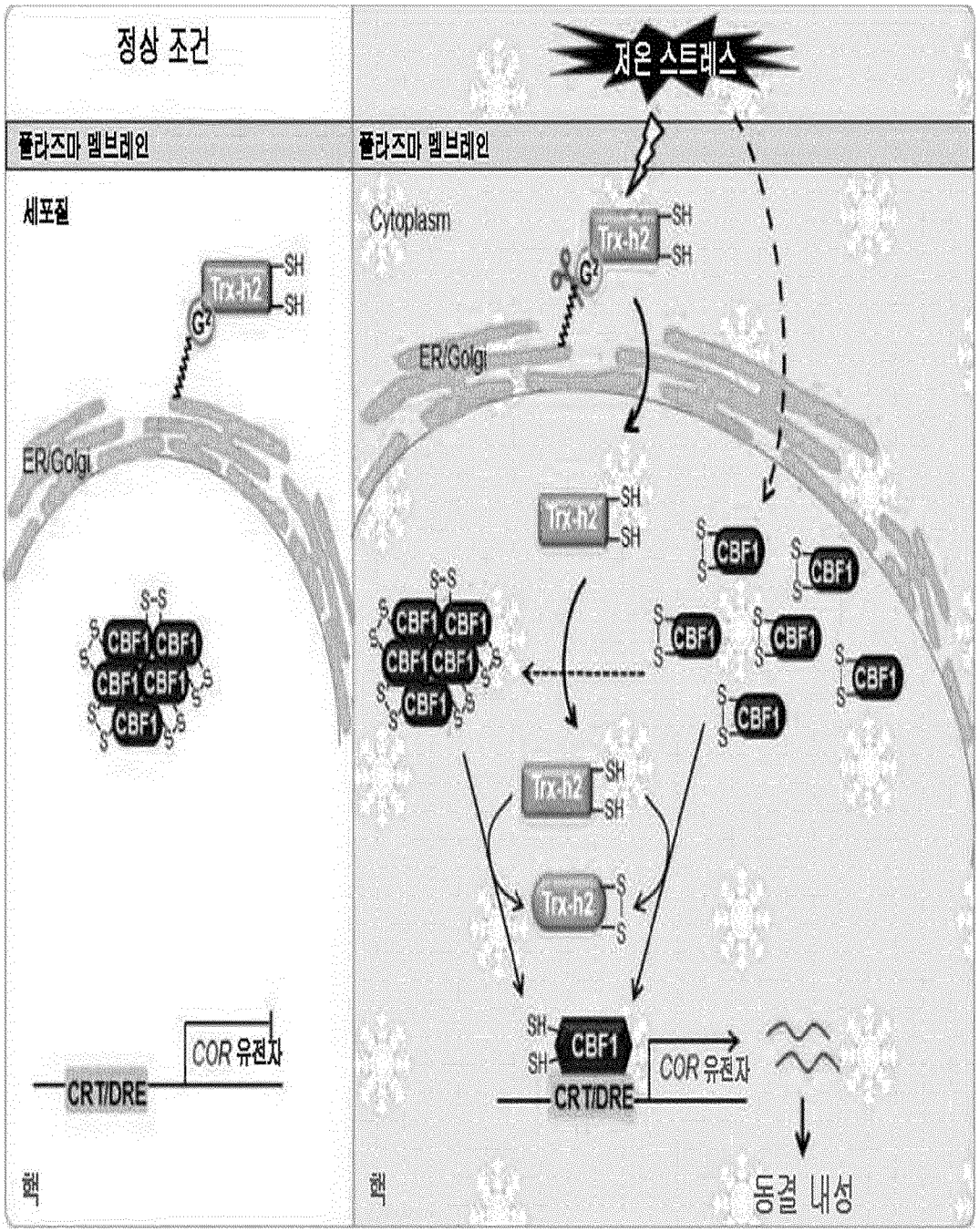
[도4h]


Col-0
cbfs
Trx-h2-HA^OE/cbfs #1
Trx-h2-HA^OE/cbfs #2
생존율(%)
60
50
40
30
20
10
0
-4℃
-6℃
-8℃
-10℃
NA
CA

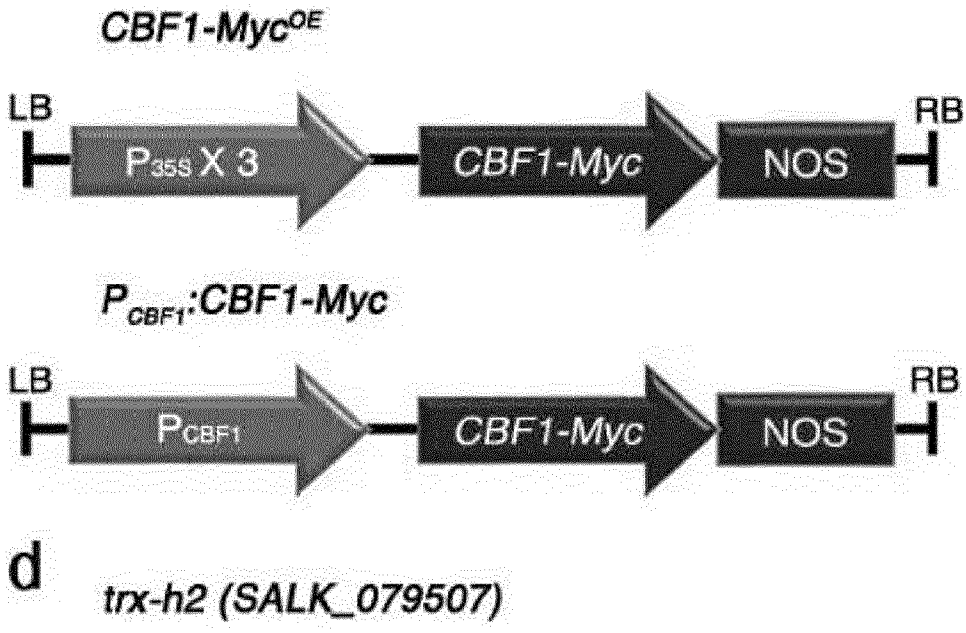
[도4i]


Col-0
cbfs
Trx-h2-HA^OE/cbfs #1
Trx-h2-HA^OE/cbfs #2
전해질 누출(%)
100
80
60
40
20
0
-4℃
-6℃
-8℃
-10℃
NA
CA

[도4j]

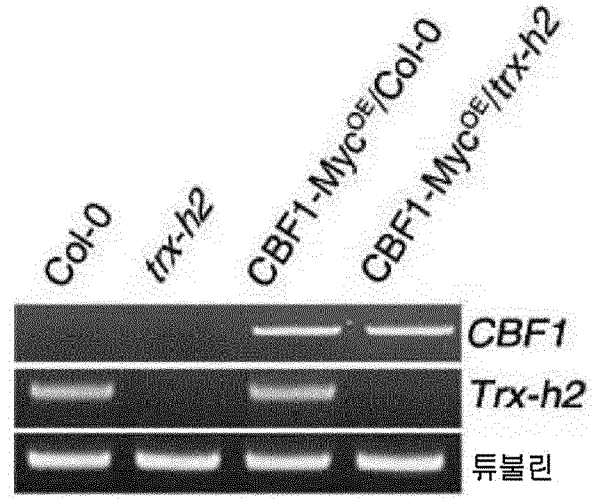

정상 조건
저온 스트레스
플라즈마 멤브레인
플라즈마 멤브레인
세포질
Cytoplasm
Trx-h2
SH
SH
G
ER/Golgi
CBF1
S-S
COR 유전자
CRT/DRE
핵
핵
동결 내성

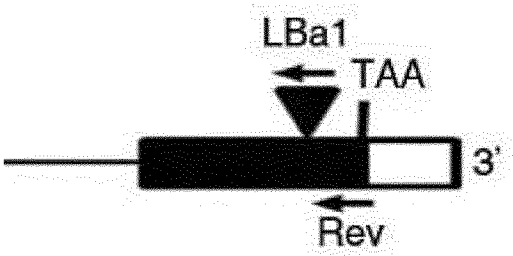
[도5a]



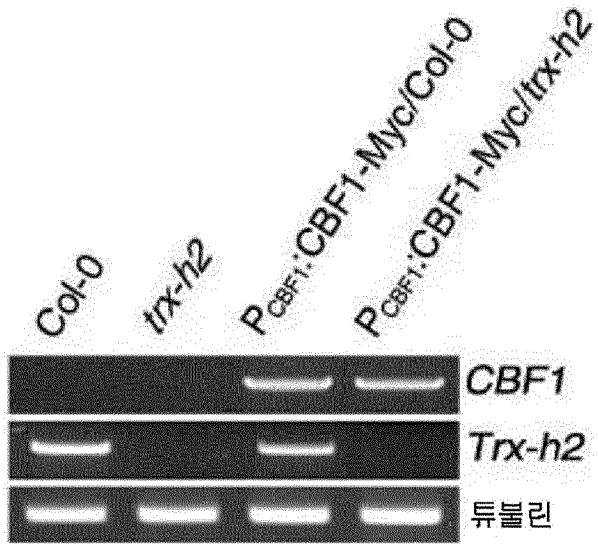
d *trx-h2 (SALK_079507)*

[도5b]

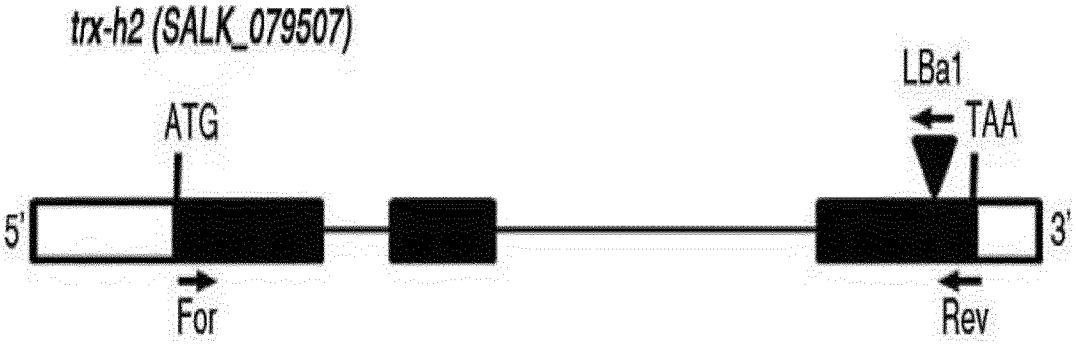




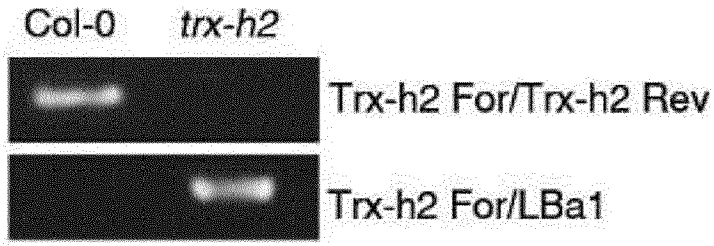
[도5c]



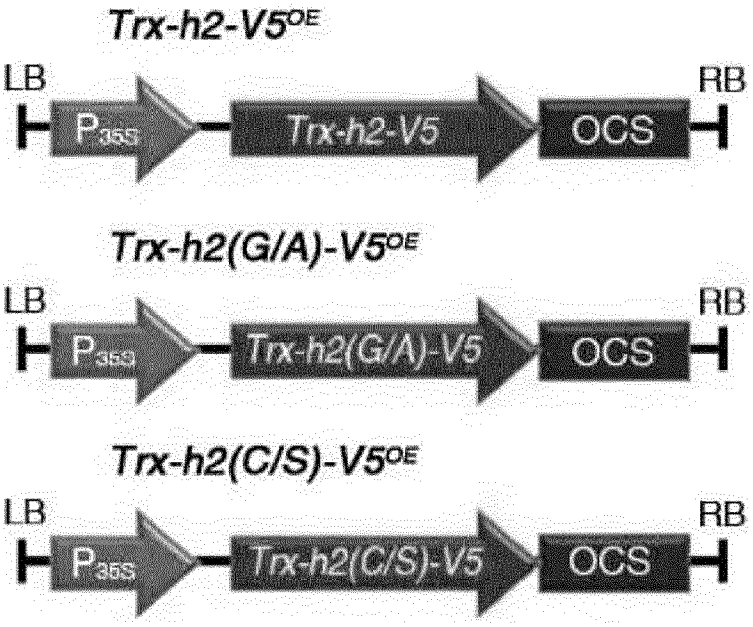
[도5d]



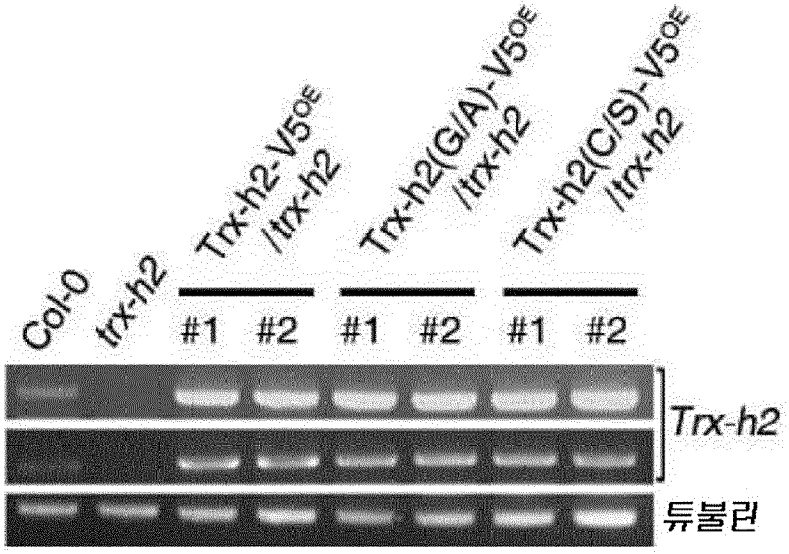
[도5e]



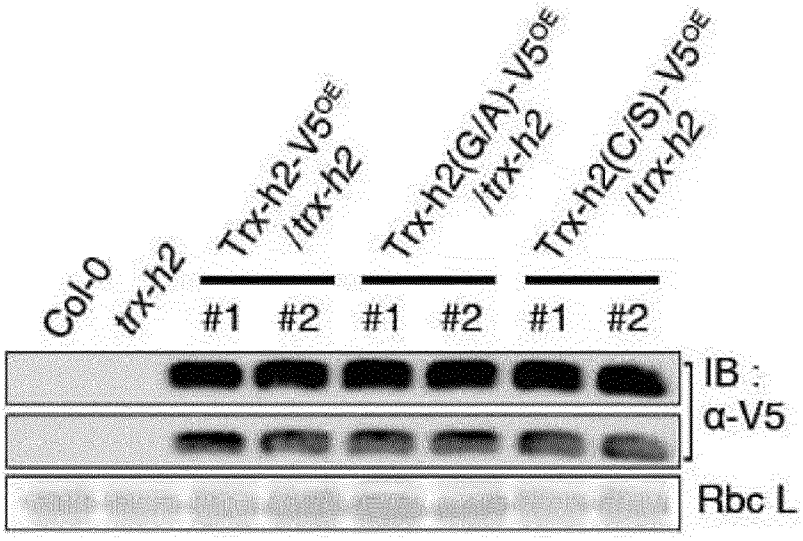
[도5f]



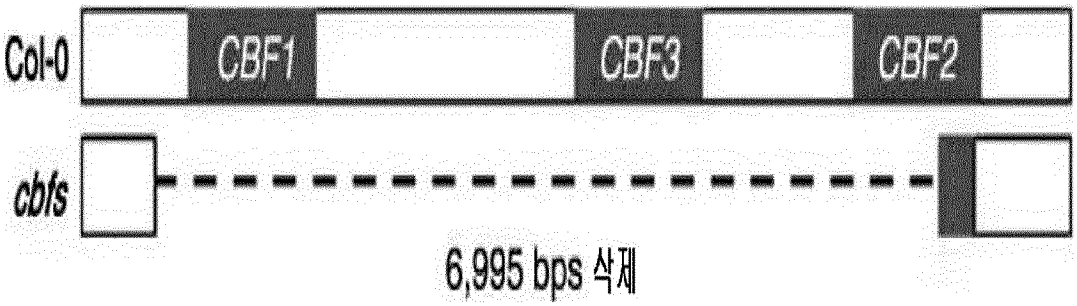
[도5g]



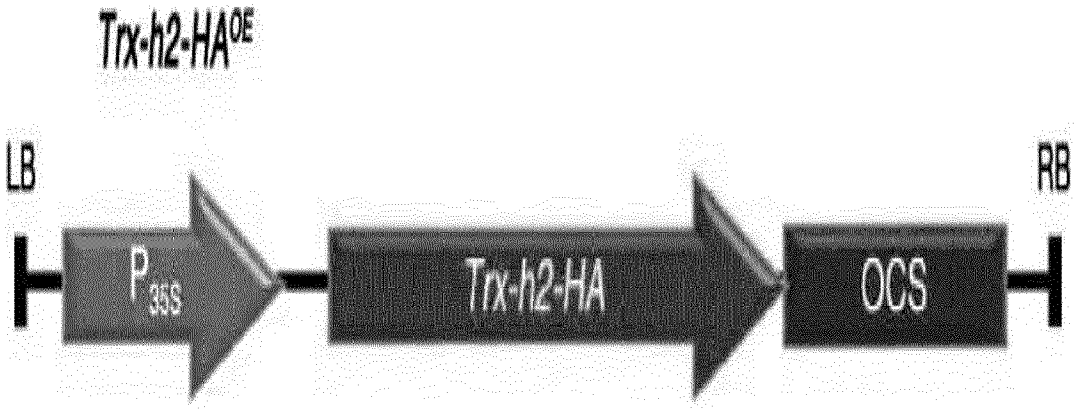
[도5h]



[도5i]



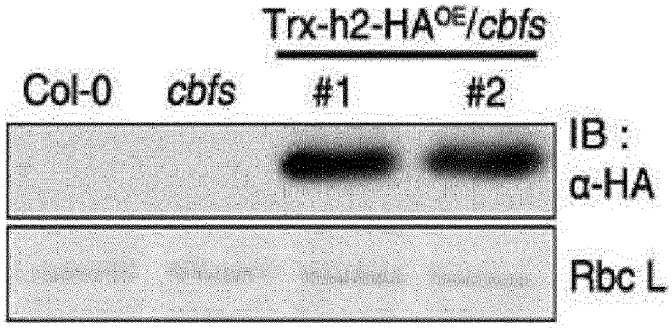
[도5j]



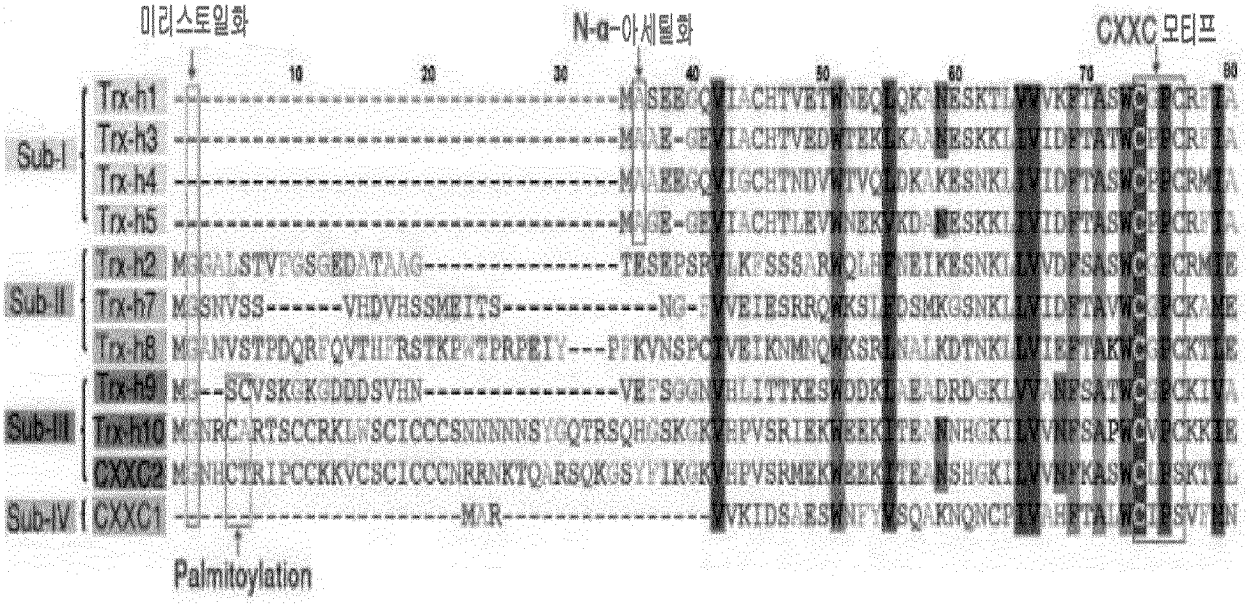
[도5k]


Trx-h2-HA^OE/cbfs
Col-0
cbfs
#1
#2
Trx-h2
튜불린

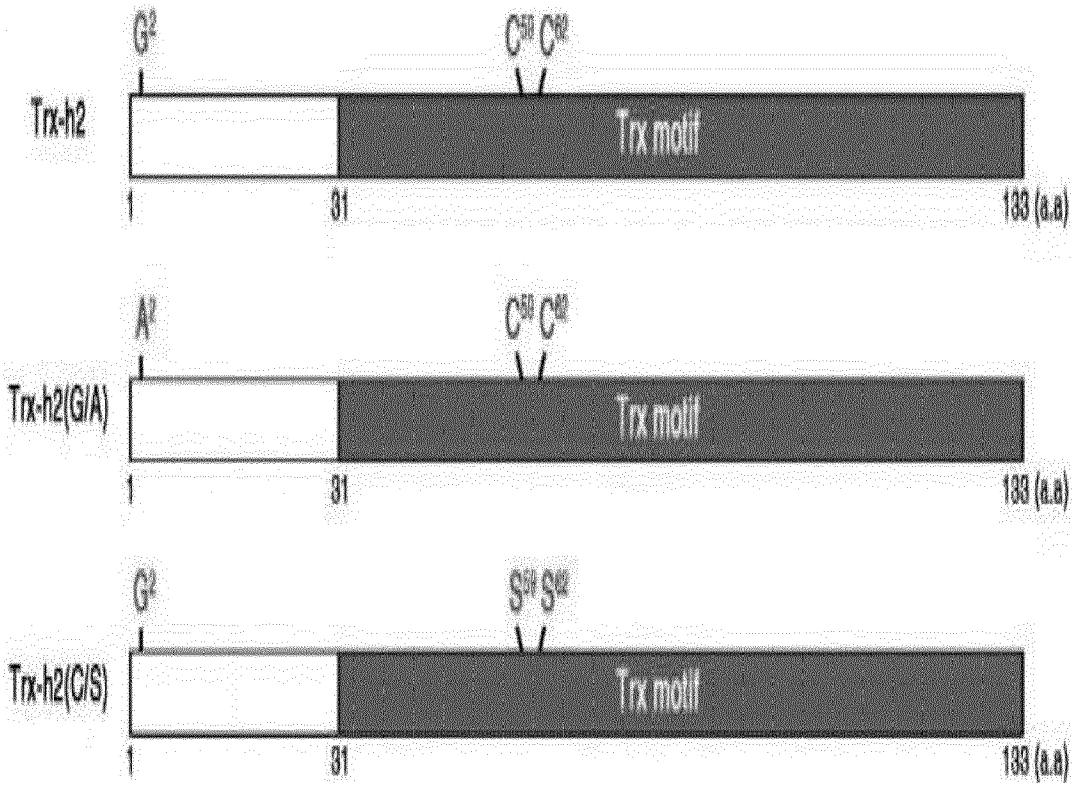
[도5l]


Trx-h2-HA^OE/cbfs
Col-0
cbfs
#1
#2
IB :
α-HA
Rbc L

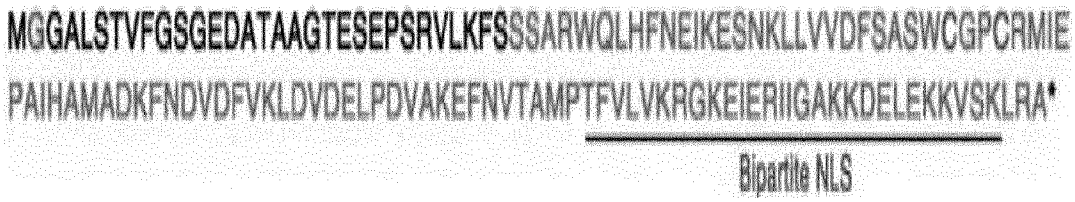
[도6a]


미리스토일화
N-α-아세틸화
CXXC 모티프
Trx-h1
Trx-h3
Trx-h4
Trx-h5
Trx-h2
Trx-h7
Trx-h8
Trx-h9
Trx-h10
CXXC2
CXXC1
Sub-I
Sub-II
Sub-III
Sub-IV
Palmitoylation

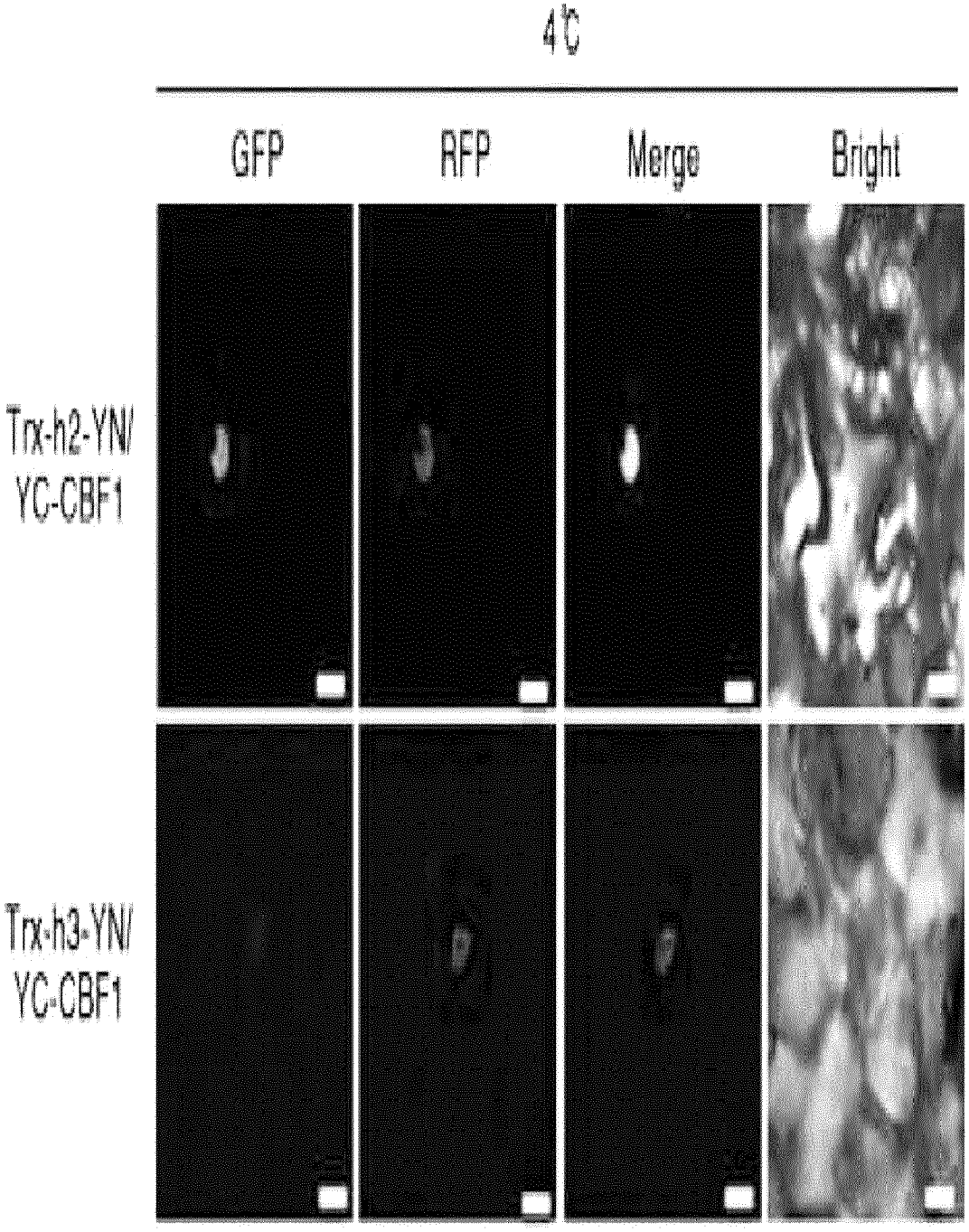
[도6b]


G2
C53 C56
Trx-h2
Trx motif
1
31
133 (a.a)
A2
C53 C56
Trx-h2(G/A)
Trx motif
1
31
133 (a.a)
G2
S53 S56
Trx-h2(C/S)
Trx motif
1
31
133 (a.a)

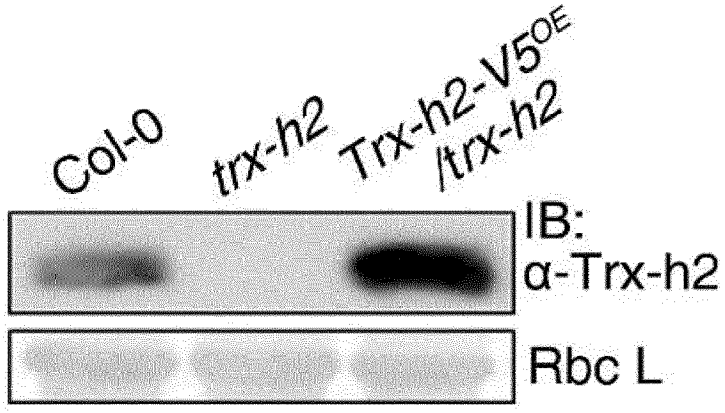
[도6c]


MGGALSTVFGSGEDATAAGTESEPSRVLKFSSSARWQLHFNEIKESNKLLVVDFSASWCGPCRMIE
PAIHAMADKFNDVDFVKLDVDELPDVAKEFNVTAMPTFVLVKRGKEIERIIGAKKDELEKKVSKLRA*
Bipartite NLS

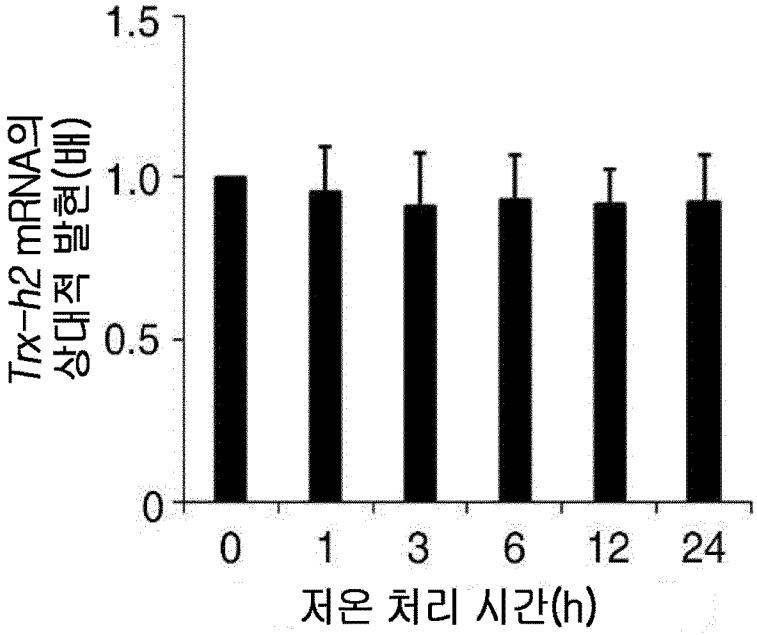
[도6d]


4℃
GFP
RFP
Merge
Bright
Trx-h2-YN/
YC-CBF1
Trx-h3-YN/
YC-CBF1

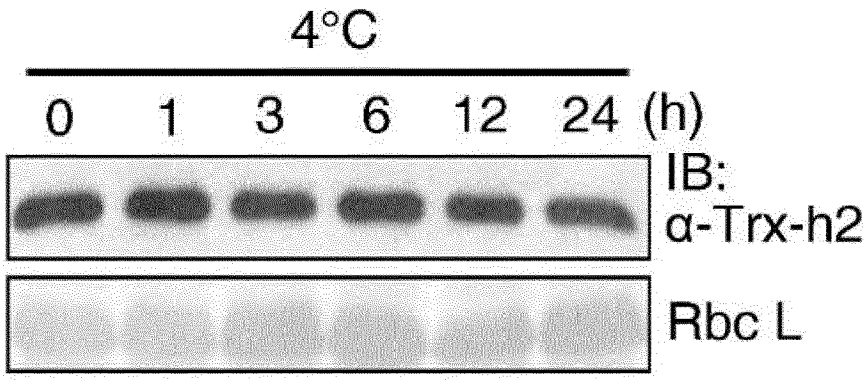
[도7a]


Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE
/trx-h2
IB:
α-Trx-h2
Rbc L

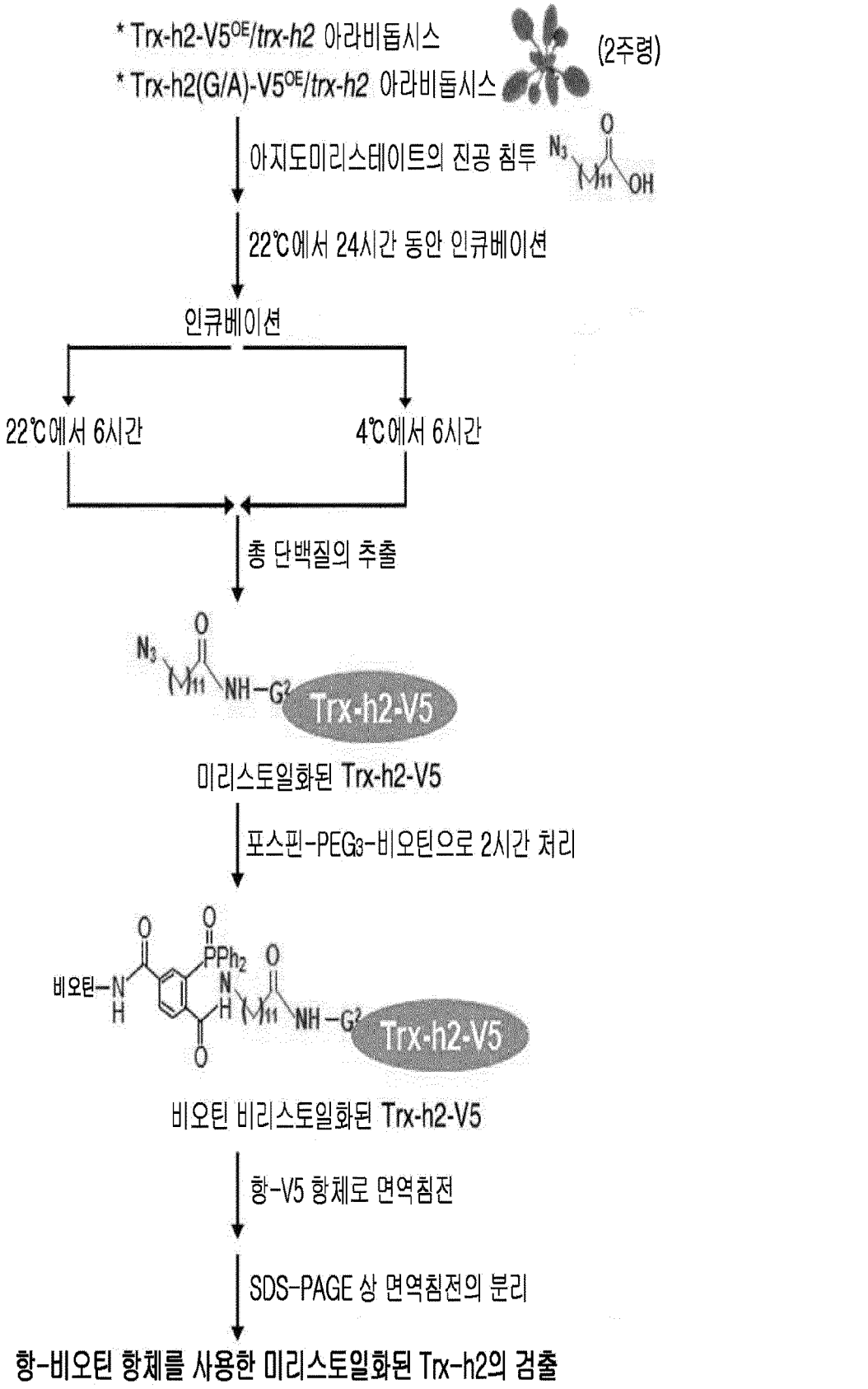
[도7b]


1.5
1.0
0.5
0
Trx-h2 mRNA의 상대적 발현(배)
0
1
3
6
12
24
저온 처리 시간(h)

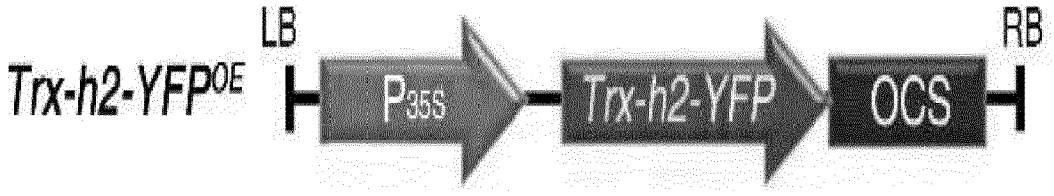
[도7c]


4°C
0
1
3
6
12
24
(h)
IB:
α-Trx-h2
Rbc L

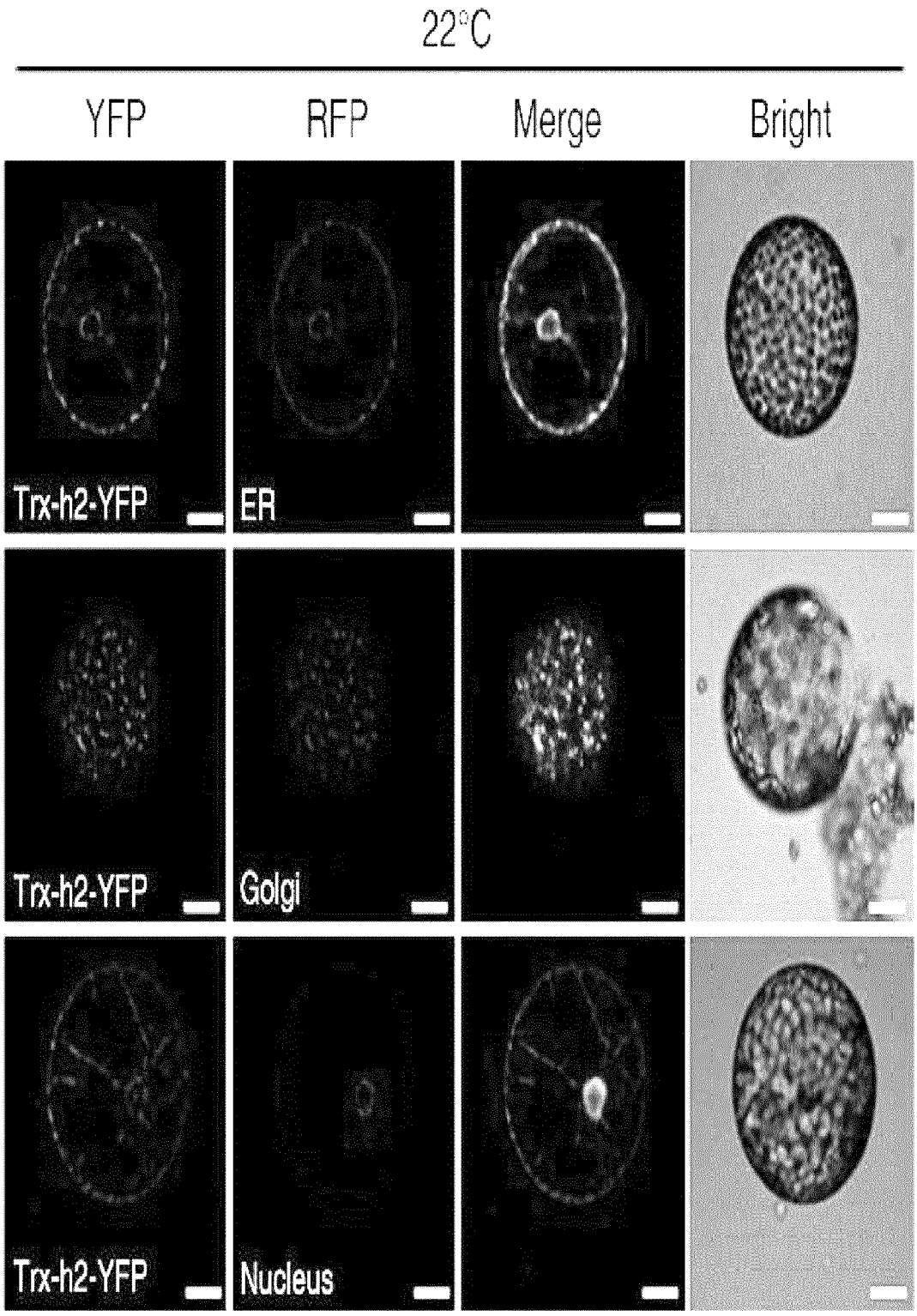
[도8]


* Trx-h2-V5OE/trx-h2 아라비돕시스
* Trx-h2(G/A)-V5OE/trx-h2 아라비돕시스
(2주령)
아지도미리스테이트의 진공 침투
22℃에서 24시간 동안 인큐베이션
인큐베이션
22℃에서 6시간
4℃에서 6시간
총 단백질의 추출
Trx-h2-V5
미리스토일화된 Trx-h2-V5
포스핀-PEG3-비오틴으로 2시간 처리
비오틴
Trx-h2-V5
비오틴 미리스토일화된 Trx-h2-V5
항-V5 항체로 면역침전
SDS-PAGE 상 면역침전의 분리
항-비오틴 항체를 사용한 미리스토일화된 Trx-h2의 검출

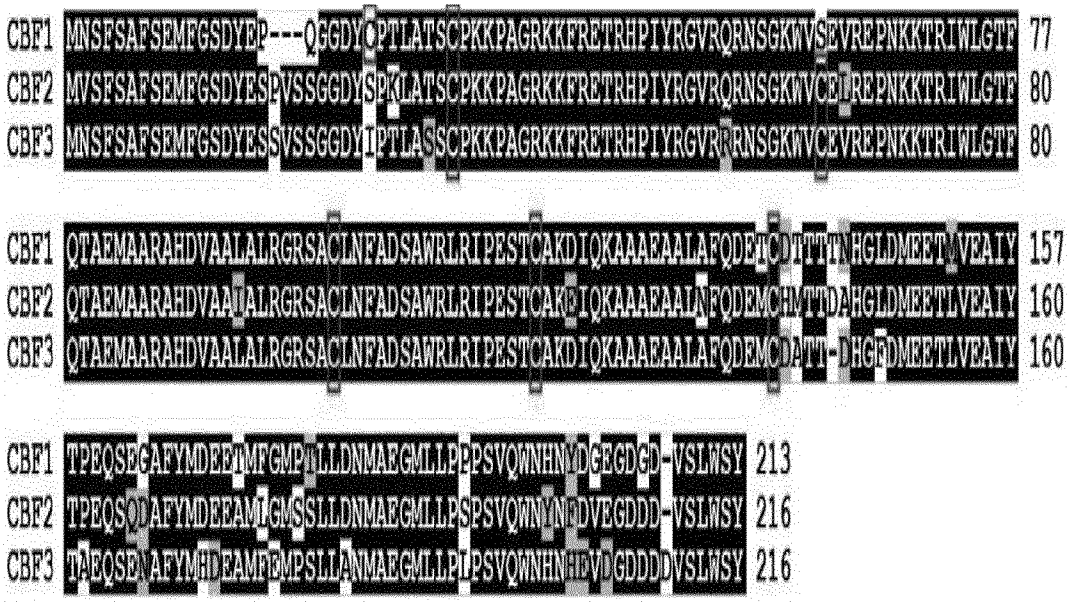
[도9a]


Trx-h2-YFPOE
LB
P35S
Trx-h2-YFP
OCS
RB

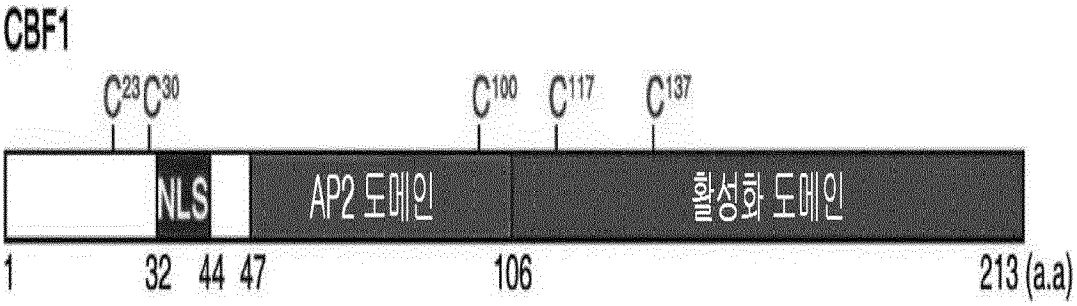
[도9b]


22°C
YFP
RFP
Merge
Bright
Trx-h2-YFP
ER
Trx-h2-YFP
Golgi
Trx-h2-YFP
Nucleus

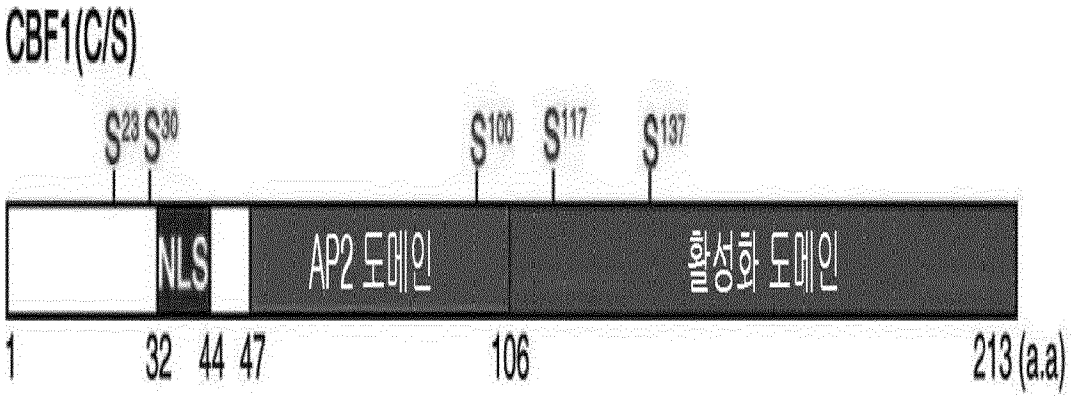
[도10a]



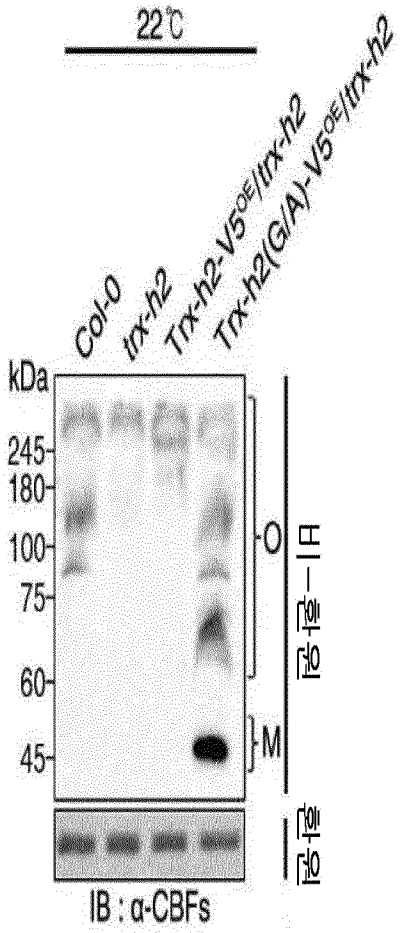
[도10b]



[도10c]



[도10d]



[도11a]

-500 ttattttgtgtaggcttttggtagatttgggcttgcaaacccaaattaacttgttggccgacatacatttgtttc

-425 tattacaaatttaacaacaaacgtcaataaatacacgtgaaggaaatgagaacgaccctcttaagtagtactgga

-350 aattgaaaaaaagaaatctagaaatgctaacatgtaagttttgttaccaaaaatgcaatttgtatgtagccaca

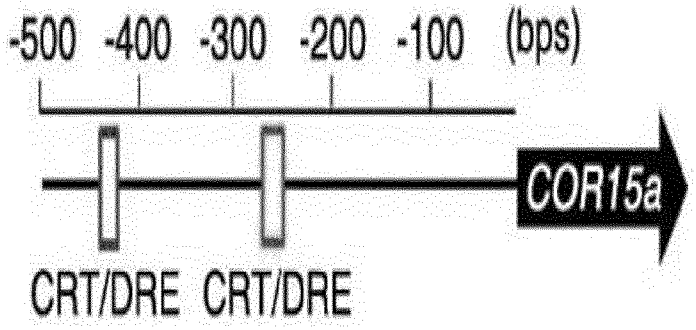
-275 atttcatggccgacctgcttttttttttcttcttctttctgaaaaccacaaatatgattacacgtggcctgaaaag

-200 aacgaacagaaactcggtaatgtgcaaaaaatatcttactcttaatacgtgtaattttggagtgtaataggtcta

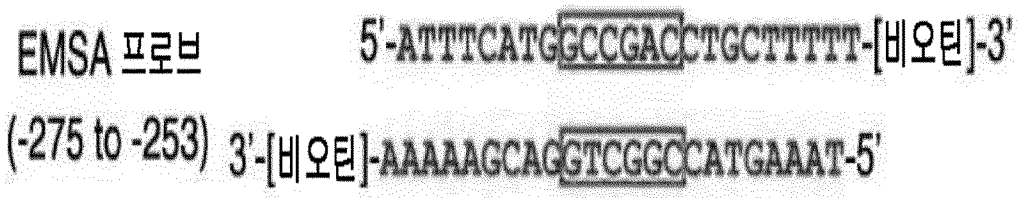
-125 tcgatctataaaacgatactattggagattagattcttctcatctcactttgttcatctaaaaactcctcctttc

-50 atttccaaacaaaaacttcttttattctcacatcttaaagatctctctcATG

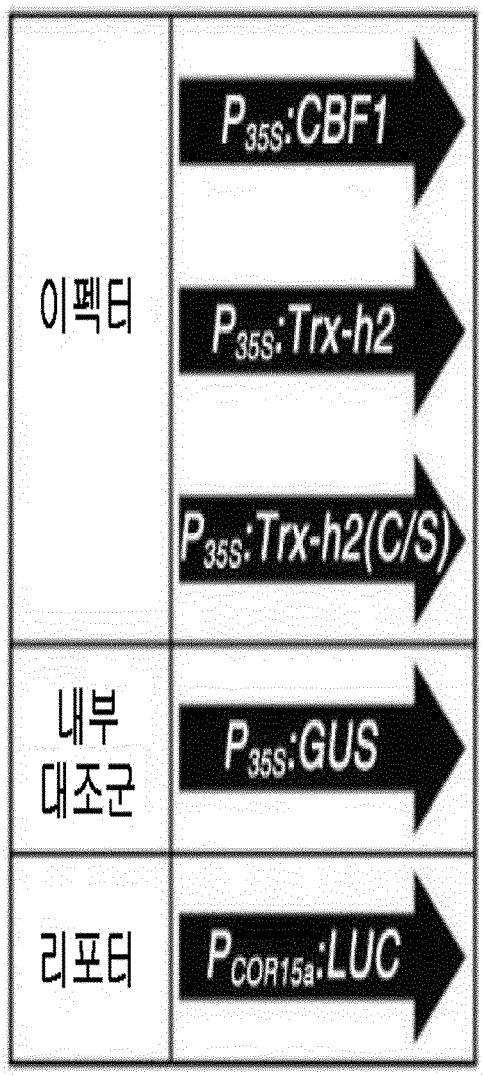
[도11b]



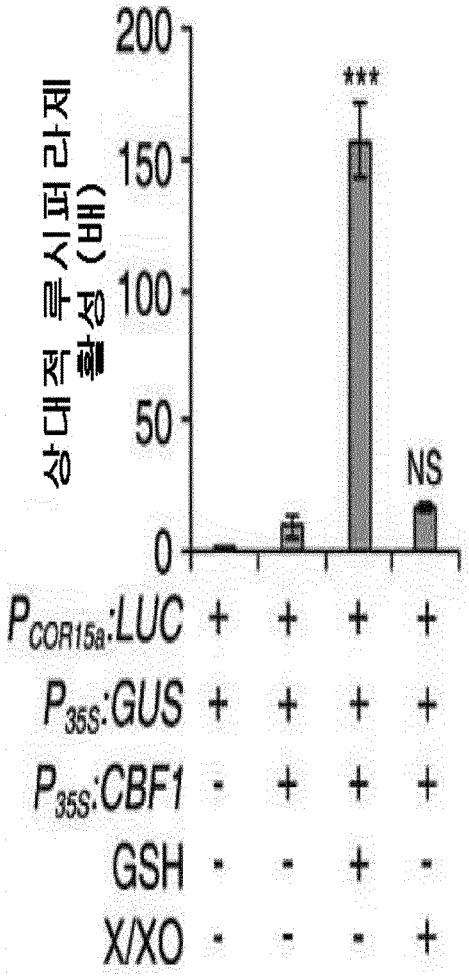
[도11c]


EMSA 프로브
(-275 to -253)
5'-ATTTCATGGCCGACCTGCTTTTT-[비오틴]-3'
3'-[비오틴]-AAAAAGCAGGTCGGCCATGAAAT-5'

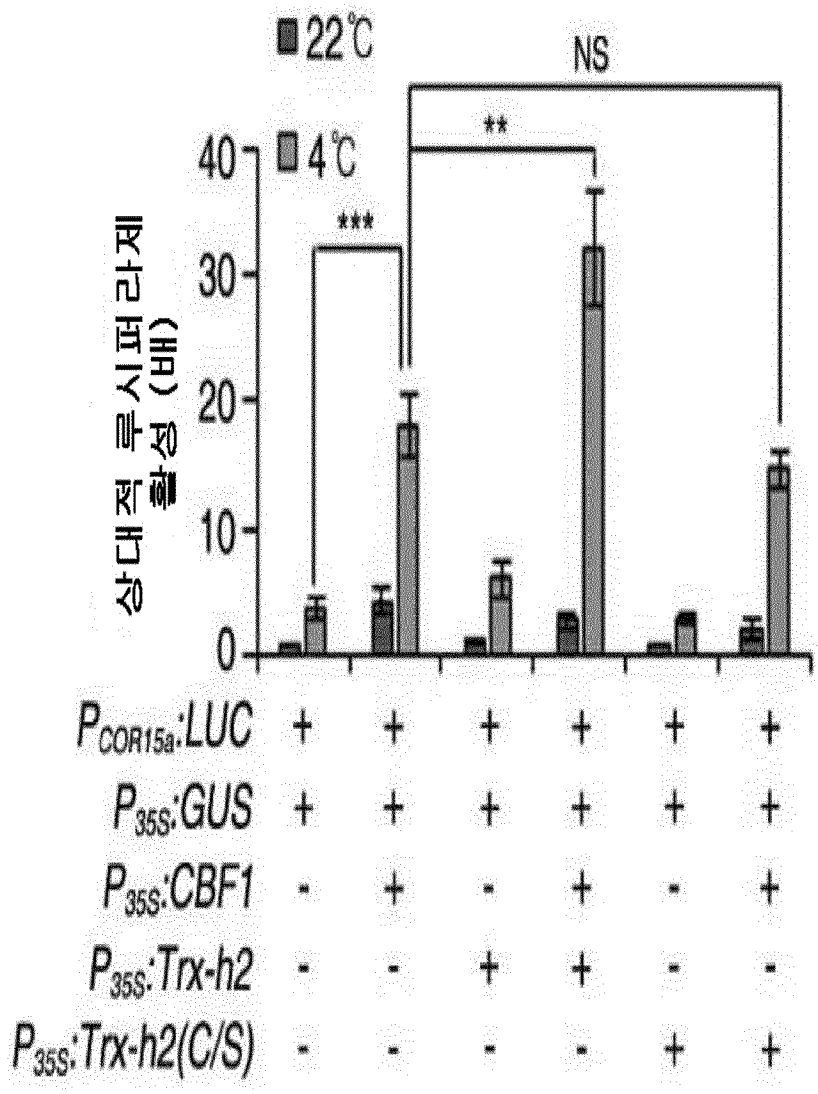
[도11d]


이펙터
내부 대조군
리포터
P35S:CBF1
P35S:Trx-h2
P35S:Trx-h2(C/S)
P35S:GUS
PCOR15a:LUC

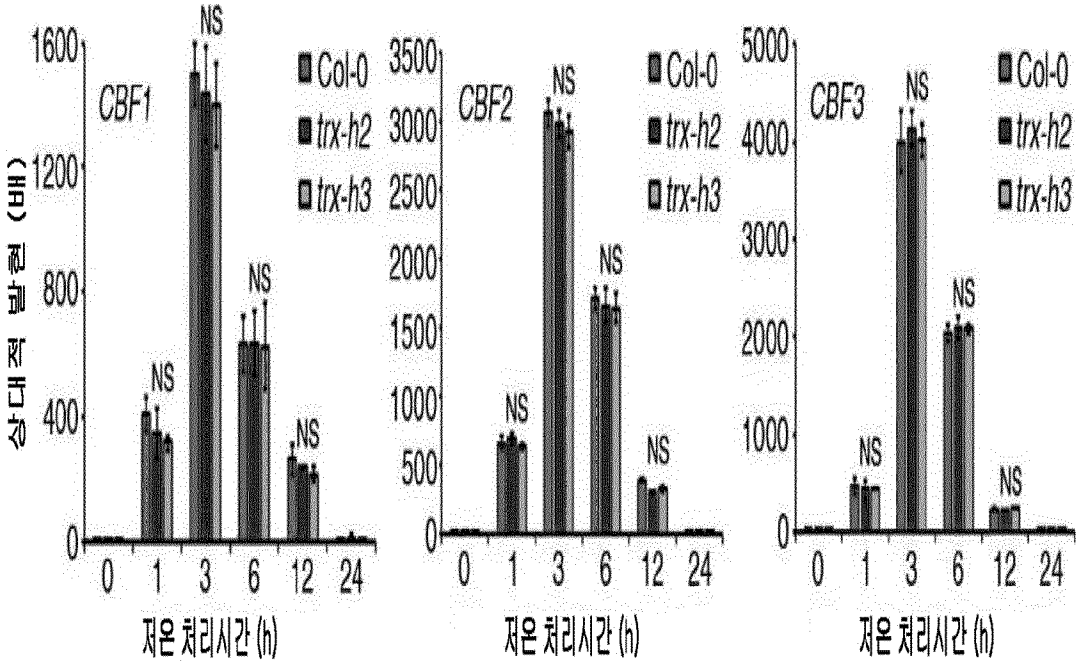
[도11e]


상대적 루시퍼라제 활성 (배)
200
150
100
50
0
***
NS
P_{CCR15a}:LUC + + + +
P_{35S}:GUS + + + +
P_{35S}:CBF1 - + + +
GSH - - + -
X/XO - - - +

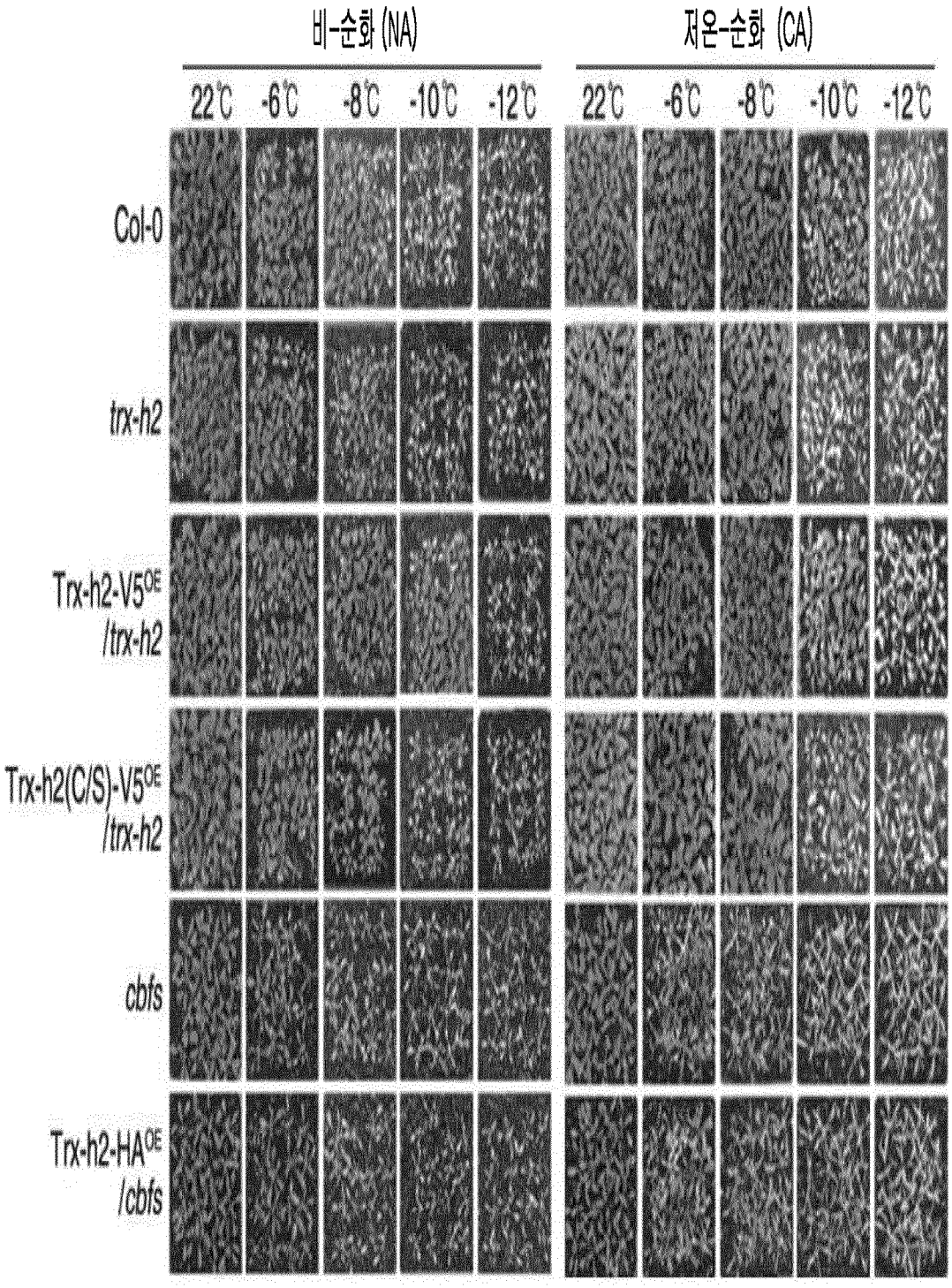
[도11f]


22℃
4℃
NS
**
***
상대적 루시퍼라제 활성 (배)
0
10
20
30
40
P_{COR15a}:LUC + + + + + +
P_{35S}:GUS + + + + + +
P_{35S}:CBF1 - + - + - +
P_{35S}:Trx-h2 - - + + - -
P_{35S}:Trx-h2(C/S) - - - - + +

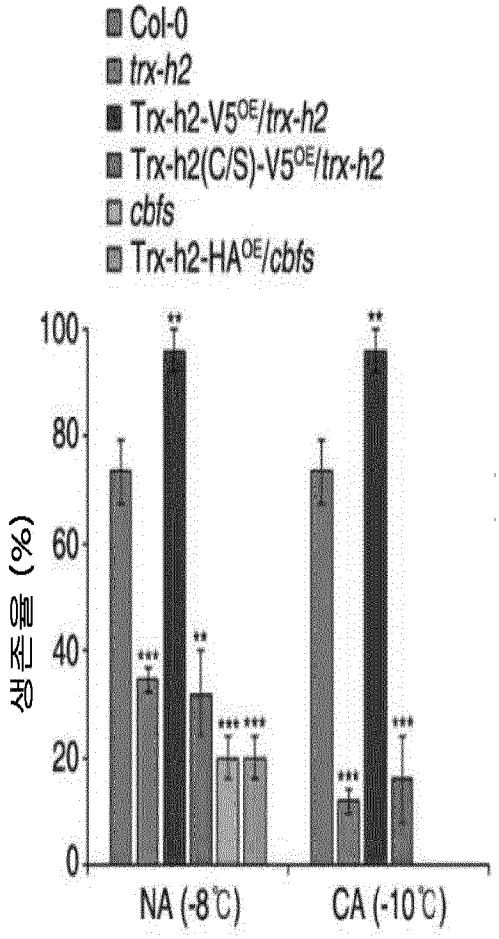
[도11g]


CBF1
CBF2
CBF3
Col-0
trx-h2
trx-h3
NS
상대적 발현 (배)
저온 처리시간 (h)
0 1 3 6 12 24

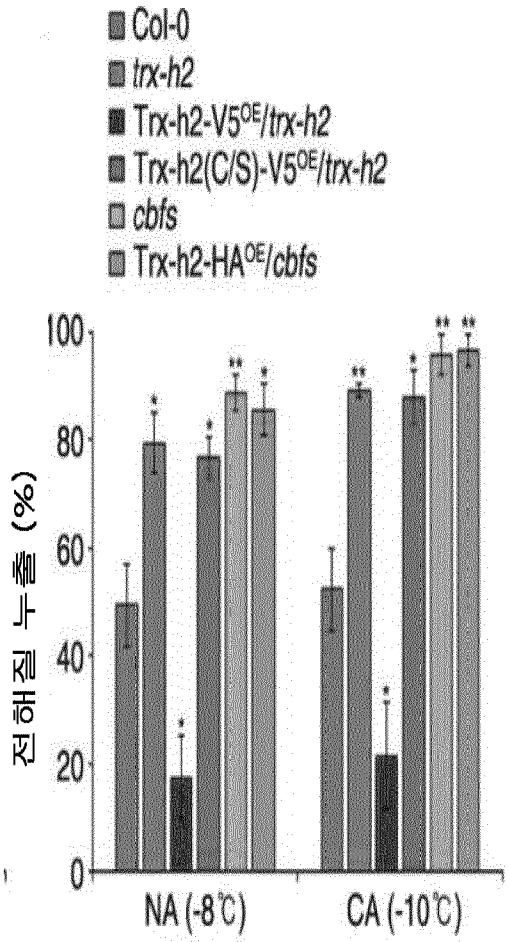
[도12a]


비-순화 (NA)
저온-순화 (CA)
22℃
-6℃
-8℃
-10℃
-12℃
Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE /trx-h2
Trx-h2(C/S)-V5OE /trx-h2
cbfs
Trx-h2-HAOE /cbfs

[도12b]


Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE/trx-h2
Trx-h2(C/S)-V5OE/trx-h2
cbfs
Trx-h2-HAOE/cbfs
생존율 (%)
100
80
60
40
20
0
NA (-8℃)
CA (-10℃)

[도12c]


Col-0
trx-h2
Trx-h2-V5OE/trx-h2
Trx-h2(C/S)-V5OE/trx-h2
cbfs
Trx-h2-HAOE/cbfs
전해질 누출 (%)
100
80
60
40
20
0
NA (-8℃)
CA (-10℃)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/012252

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01H 1/06(2006.01)i; **C12N 15/82**(2006.01)i; **C07K 14/415**(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01H 1/06(2006.01); C07H 21/04(2006.01); C07K 1/00(2006.01); C07K 14/415(2006.01); C12N 15/29(2006.01); C12N 15/82(2006.01)

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

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 티오레독신 h2(Thioredoxin h2), C-반복 결합인자 1(C-repeat-binding factor 1), 상호작용(interaction), 추위 저항성(cold resistance), 형질전환 식물체(transgenic plant)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1163714 B1 (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 09 July 2012 (2012-07-09) See paragraphs [0098] and [0106]; and tables 2-3.	1-4
A	US 5891859 A (THOMASHOW, Michael F. et al.) 06 April 1999 (1999-04-06) See abstract; column 1; and claim 1.	1-4
A	US 2003-0135878 A1 (CHO, Myeong-Je et al.) 17 July 2003 (2003-07-17) See entire document.	1-4
A	ACHARD, Patrick et al. The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. The Plant Cell. 2008, vol. 20, pp. 2117-2129. See entire document.	1-4
A	WO 2018-002851 A1 (BENSON HILL BIOSYSTEMS, INC.) 04 January 2018 (2018-01-04) See entire document.	1-4

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 December 2021	**23 December 2021**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	LEE, Eun Seon et al. Redox-dependent structural switch and CBF activation confer freezing tolerance in plants. Nature Plants. 21 June 2021(online publication date), vol. 7, pp. 914-922. See pages 914-915 and 918-920; and figures 1-2 and 4.	1-4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/012252

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/012252

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-1163714 B1	09 July 2012	KR 10-2011-0043985 A	28 April 2011
US 5891859 A	06 April 1999	EP 0955807 A1	17 November 1999
		US 5892009 A	06 April 1999
		US 5965705 A	12 October 1999
		WO 98-09521 A1	12 March 1998
US 2003-0135878 A1	17 July 2003	EP 1162875 A2	19 December 2001
		EP 1162875 B1	14 May 2003
		EP 1163266 A2	19 December 2001
		JP 2002-539824 A	26 November 2002
		JP 2003-523172 A	05 August 2003
		US 2003-0150010 A1	07 August 2003
		US 2005-0015831 A1	20 January 2005
		US 6380372 B1	30 April 2002
		US 6784346 B1	31 August 2004
		US 6833493 B2	21 December 2004
		US 7179964 B2	20 February 2007
		WO 00-58352 A2	05 October 2000
		WO 00-58453 A2	05 October 2000
WO 2018-002851 A1	04 January 2018	CN 109563519 A	02 April 2019
		EP 3478846 A1	08 May 2019
		US 2020-0165622 A1	28 May 2020

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/012252

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A01H 1/06(2006.01)i; **C12N 15/82**(2006.01)i; **C07K 14/415**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A01H 1/06(2006.01); C07H 21/04(2006.01); C07K 1/00(2006.01); C07K 14/415(2006.01); C12N 15/29(2006.01); C12N 15/82(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 티오레독신 h2(Thioredoxin h2), C-반복 결합인자 1(C-repeat-binding factor 1), 상호작용(interaction), 추위 저항성(cold resistance), 형질전환 식물체(transgenic plant)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1163714 B1 (이화여자대학교 산학협력단) 2012.07.09 단락 [0098], [0106]; 표 2-3 참조.	1-4
A	US 5891859 A (THOMASHOW, MICHAEL F. 등) 1999.04.06 요약; 컬럼 1; 청구항 1 참조.	1-4
A	US 2003-0135878 A1 (CHO, MYEONG-JE 등) 2003.07.17 전체 문헌 참조.	1-4
A	ACHARD, PATRICK 등, 'The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism', The Plant Cell, 2008, 20권, 페이지 2117-2129 전체 문헌 참조.	1-4
A	WO 2018-002851 A1 (BENSON HILL BIOSYSTEMS, INC.) 2018.01.04 전체 문헌 참조.	1-4

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌
"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년12월22일(22.12.2021)	**2021년12월23일(23.12.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

한인호

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2021/012252

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	LEE, EUN SEON 등, 'Redox-dependent structural switch and CBF activation confer freezing tolerance in plants', Nature Plants, 2021.06.21(온라인 공개일), 7권, 페이지 914-922 페이지 914-915, 918-920; 도면 1-2, 4 참조.	1-4

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/012252

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

   a. ☑ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
      - ☑ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일

   b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

   c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
      - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
      - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/012252

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1163714 B1	2012/07/09	KR 10-2011-0043985 A	2011/04/28
US 5891859 A	1999/04/06	EP 0955807 A1	1999/11/17
		US 5892009 A	1999/04/06
		US 5965705 A	1999/10/12
		WO 98-09521 A1	1998/03/12
US 2003-0135878 A1	2003/07/17	EP 1162875 A2	2001/12/19
		EP 1162875 B1	2003/05/14
		EP 1163266 A2	2001/12/19
		JP 2002-539824 A	2002/11/26
		JP 2003-523172 A	2003/08/05
		US 2003-0150010 A1	2003/08/07
		US 2005-0015831 A1	2005/01/20
		US 6380372 B1	2002/04/30
		US 6784346 B1	2004/08/31
		US 6833493 B2	2004/12/21
		US 7179964 B2	2007/02/20
		WO 00-58352 A2	2000/10/05
		WO 00-58453 A2	2000/10/05
WO 2018-002851 A1	2018/01/04	CN 109563519 A	2019/04/02
		EP 3478846 A1	2019/05/08
		US 2020-0165622 A1	2020/05/28