



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월05일
(11) 등록번호 10-1337243
(24) 등록일자 2013년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0069628
(22) 출원일자 2012년06월28일
심사청구일자 2012년06월28일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100022553 A
KR100809736 B1

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박연일
대전광역시 유성구 은구비남로 55 열매마을7단지
705동 401호
신동호
대전광역시 서구 관저북로 80 원앙마을2단지아파트
205동 1203호
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 9 항

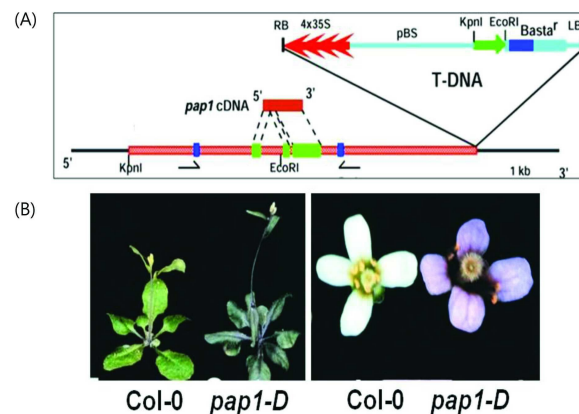
심사관 : 유진오

(54) 발명의 명칭 A t P T R 2 유전자의 안토시안 생합성 조절자로서의 용도

(57) 요약

본 발명은 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법, 상기 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008205
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21 사업
연구과제명	남세균 유전체 기반 작물형질 개량용 유용유전자원 발굴
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교
연구기간	2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 안토시안 생합성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현을 증진시켜 식물체의 안토시안 생합성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 발현의 조절은 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 식물로의 도입 및 발현에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 6

제5항의 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 8

제6항에 따른 식물체의 종자.

청구항 9

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 애기장대 유래의 AtPTR2 유전자의 안토시안 생합성 조절자로서의 용도에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법, 상기 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체 및 이의 종자 및 상기 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 안토시아닌은 식물의 꽃, 열매, 줄기 또는 잎 등의 색깔을 결정할 뿐 아니라 성장 및 발달에 있어서도 아주 중요한 기능을 한다. 안토시아닌은 꽃잎에서 곤충 등 꽃가루 매개자를 유혹하고, 열매 및 씨앗에서 종자의 분산을 돕는다. 또한, 안토시아닌을 포함한 플라보노이드 화합물은 곤충 및 외부 스트레스에 대한 식물의 손상을 보호하는 기능을 하고, 특히 활성산소 등에 의한 손상을 막기 위해 항산화제로서의 기능을 한다(Gould et al., 2004 J. Biomed. Biotechnol. 5, 314-320).
- [0003] 식물에서 안토시아닌 생합성 경로는 잘 알려져 있다. 식물체 내 안토시아닌 축적은 플라보노이드 생합성 경로에 포함된 주요 효소들을 암호화하는 구조 유전자군의 조절과 이들 구조 유전자들의 발현을 조절하는 조절 유전자들에 의해 이루어진다. 금어초, 페튜니아 및 애기장대에서 CHS(chalcone synthase), CHI(chalcone isomerase), F3H(flavanone 3-hydroxylase) 등은 플라보노이드계 화합물의 초기 합성에 관여하는 EBGs(early biosynthetic genes)로서 다양한 플라보노이드 화합물 생합성 기작에 모두 공통으로 관련되어 있으며, 초기에 발현이 이루어진다. 한편 DFR(dihydroflavonol 4-reductase), LDOX(leucoanthocyanidin oxygenase), ANR(anthocyanidin reductase), UF3GT(UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase) 등은 LBGs(late biosynthetic genes)로서 EBG들의 발현이 이루어진 후 나중에 발현되며, 안토시아닌 생합성 경로의 후반부를 담당하고 있다.
- [0004] 식물체에서 안토시아닌의 축적은 다양한 환경 자극에 반응하여 조절되는 것으로 알려져 있다. 특히 빛, 온도, 당, 식물호르몬 및 무기염류 등은 식물체의 안토시아닌 생합성에 있어 아주 중요한 인자들이며, 이들의 상호작용에 의해 다양한 조직 및 세포에서 색소 축적이 조절된다. 따라서 안토시아닌 생합성에 있어 이들 인자의 상호작용을 밝히는 것은 식물체의 안토시아닌 색소 축적 및 식물 2차 대사 기작을 이해하는 데 있어 매우 중요하다. 이전의 연구에서 다양한 빛 조건 하에서 안토시아닌의 생합성 변화를 연구하여 빛이 아주 중요한 인자 중 하나임이 밝혀졌으며, 특히 인산의 결핍, 저온 스트레스 및 당의 증가는 빛에 의해 야기되는 안토시아닌 축적에 있어 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려졌다(Lea et al., 2007 Planta. 225, 1245-1253). 또한, 식물의 성장 및 발달에 있어 식물 호르몬 및 당은 매우 복잡한 네트워크를 형성하여 상호작용하고 있는 것으로 드러났다. 안토시아닌 생합성에 있어 수크로즈, 호르몬 에틸렌, 시토키닌, 지베렐린 및 앱시스산의 상관관계에서 당에 의한 안토시아닌 생합성에 에틸렌 및 지베렐린에 의해서 억제되는 것으로 알려져 있다.
- [0005] 내적 및 외적 요인에 의한 안토시아닌 생합성은 구조 유전자에서 조절된다. 현재까지 당에 의한 안토시아닌 생합성 축적은 R2R3 MYB 전사인자인 PAP1(production of anthocyanin pigment 1) 및 PAP2, WD-40 단백질인 TTG1, 그리고 bHLH(basic helix-loop-helix) 전사인자인 TT8, GL3 및 EGL3로 구성된 MBW(MYB-bHLH-WD40) 전사복합체에 의해서 조절되는 것으로 알려져 있다(Quattrocchio et al., 2006 Plant Cell 18, 1274-1291). 반면에 R3 MYB 전사인자인 MYBL2는 TT8과 상호작용하여 LBW(MYBL2-bHLH-TTG1) 복합체를 형성하여 안토시아닌 생합성에 있어 억제적 조절자(negative effector)로 작용한다. 다시 말해서 안토시아닌 생합성은 MBW 및 LBW 복합체 간의 경쟁적 관계에 의해서 조절된다. 상기 복합체 이외에 MYB11, 12, 111, 113 및 114는 복합체를 형성하지 않고 독립적으로 안토시아닌 생합성 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려졌다. 당에 의한 안토시아닌 생합성 증가는 PAP1 발현이 촉진되는 반면 MYBL2 발현이 억제됨으로서 유도된다. 반면 에틸렌 및 당에 의한 안토시아닌 생합성 억제는 PAP1 발현을 억제함으로써 일어난다. 시토키닌에 의한 당 유도 경로의 축적은 PAP1 발현의 축적을 통해서 나타나는 것으로 알려졌다. 이와 같이 전사수준에서 PAP1 전사인자의 발현 조절은 안토시아닌 생합성 경로에서 매우 중요함을 알 수 있다. 그럼에도 불구하고 당 및 호르몬의 신호에 의해서 PAP1의 전사를 조절하는 경로에 대해서는 밝혀진 바는 없다.
- [0006] 본 발명의 AtPTR2 유전자는 애기장대에 존재하는 총 54개의 펩티드 수송체(peptide transporter) 중의 하나로서, At2G02040으로 명시되어 있으며, 펩티드 수송체의 서브패밀리-2에 속한다. 박테리아의 펩티드 수송체는 질소 및 탄소원으로서 펩티드를 이용하는데 연관되어 있고, 세포 벽 재생, 주화성 및 포자 형성 같은 세포 내 기작에 연관되어 있으며, 동물의 펩티드 수송체는 소장에서 단백질 영양의 필수 역할인 작은 펩티드의 흡수를 매개하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 식물에서 펩티드 수송체의 뚜렷한 생리활성 작용은 밝혀지지 않았다. 식물의 펩티드 수송체는 펩티드 및 니트레이트의 영양물 섭취에 중요할 뿐만 아니라 이들 수송체가 옥신, 병원성 독소 및 다른 발달 과정에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 이전의 연구에서, AtPTR2-B 유전자의 센스(sense) 또는 안티센스(antisense)의 재조합 발현에 의해 AtPTR2-B 단백질이 과발현 또는 발현억제되면, 형질전환된 애기장대의 발아를 지연시키고 종자 발달을 멈추게 하는 식물의 성장 및 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다(Song et al., 1997 Plant Physiol. 114, 927-935). 본 발명에서는 AtPTR2 유전자가 안토시아닌 생합성 경로 조절 전사인자 일종인 PAP1의 전사체 수준을 조절하는 신규한 기능을 확인하였다.
- [0007] 한국등록특허 제0809736호에는 '안토시아닌 생합성 억제 활성을 가진 MYB60 유전자와 상기 유전자가 도입된 형질전환 상추 및 그 제조방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2009-0111404호에는 '안토시아닌 생합성 촉진

기능을 가지는 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 이들의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 AtPTR2 유전자의 안토시안 생합성 조절자로서의 용도에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 PAP1 유전자가 과발현된 *pap1-D* 돌연변이체를 모본으로 하여 T-DNA로 형질전환하여 무작위로 T-DNA가 삽입된 이중 돌연변이체 집단을 구축하여 안토시안 색소 축적이 억제되거나 또는 더욱 많이 증가하는 돌연변이체를 선발한 후, T-DNA가 삽입된 위치를 동정하여 PAP1(production of anthocyanin pigment 1)의 전사 또는 전사체 조절에 관여하는 유전자를 발굴한 결과, 펩티드 수송체의 일종인 AtPTR2가 PAP1 발현 수준을 조절하여 안토시안 함량이 조절되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 AtPTR2 유전자를 이용한 애기장대 안토시안 생합성 조절 방법을 통하여 식물체의 안토시안 축적 및 함량을 조절할 수 있어 산업적으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 *pap1* 유전자 3' 말단 UTR 부근에 T-DNA가 삽입된 부위(A) 및 *pap1-D* 돌연변이체의 표현형 분석(B)을 나타낸다. Basta는 바스타 저항성(barstar resistance)을 나타내고, Kan은 카나마이신 저항성(Kanamycin resistance), LB는 왼쪽 보더(left border), RB는 오른쪽 보더(right border), 4X 35S는 35S의 4 카피를 나타낸다. Col-0는 애기장대 야생형인 Columbia-0를 나타내고, *pap1-D*는 PAP1 유전자가 과발현된 돌연변이체를 나타낸다.

도 2는 약한 빛 세기($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 생장한 야생형, *pap1-D* 및 R219 2차 돌연변이체 계통에서 안토시안 함량을 나타낸다. Col-0는 애기장대 야생형인 Columbia-0, *pap1-D*는 PAP1 유전자가 과발현된 돌연변이체, R219는 *pap1-D* 식물체에 T-DNA 삽입을 통해 안토시안 함량이 야생형 수준으로 감소되어 선별된 식물체를 의미한다.

도 3은 중간 빛 세기($140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 생장한 야생형, *pap1-D* 및 R219 2차 돌연변이체 계통에서 안토시안 함량을 나타낸다.

도 4는 중간 빛 세기($140 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서 설탕 농도에 따른 야생형, *pap1-D* 및 R219 2차 돌연변이체 계통에서 안토시안 함량을 나타낸다.

도 5는 R219의 T-DNA 삽입 위치 및 TAIR T-DNA 돌연변이체 집단 중 R219에 T-DNA 태깅(tagging)된 계통(R219-1 : Salk_079073C, R219-2 : Salk_CS870709, R219-3 : Salk_CS818494)을 나타낸다.

도 6은 야생형, *pap1-D* 및 R219 돌연변이에서 AtPTR2 전사체 함량을 나타낸다.

도 7은 R219 2차 돌연변이체 계통에서 T-DNA가 pap1 유전자의 3' 말단 UTR 부근에 삽입됨을 나타낸다.

도 8은 야생형, *pap1-D* 및 R219 식물체에서 구조 및 조절 유전자 전사체 함량을 나타낸다.

도 9는 야생형 Col-0, *R219-1* 및 *R219-2* 돌연변이체에서 R219 전사체 함량을 나타낸다.

도 10은 야생형 Col-0, *R219-1* 및 *R219-2* 돌연변이체에서 안토시안 함량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자의 식물에서의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명에서는 PAP1 유전자가 과발현된 *pap1-D* 돌연변이체를 모본으로 하여 T-DNA로 형질전환하여 무작위로 T-DNA가 삽입된 이중 돌연변이체 집단을 구축하여 안토시안 색소 축적이 억제되거나 또는 더욱 많이 증가하는 돌연변이체를 선발한 후, T-DNA가 삽입된 위치를 동정하여 PAP1(production of anthocyanin pigment 1)의 전사 또는 전사체 조절에 관여하는 유전자를 발굴한 결과, 애기장대 펩티드 수송체(peptide transporter)의 일종인 AtPTR2가 T-DNA의 삽입에 의해 돌연변이가 유도될 경우 안토시안 생합성을 조절하는 전사인자인 PAP1의 전사체 수준을 조절함으로써 결국에는 안토시안 생합성을 조절하는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에서는 AtPTR2의 PAP1 Suppressor2(PSR2)로서의 기능을 확인하였다.
- [0018] 본 발명의 AtPTR2 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 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. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제체를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법에서, 상기 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현을 저해하여 식물체의 안토시안 생합성을 감소시키거나, AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현을 증진시켜 식물체의 안토시안 생합성을 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체의 안토시안 생합성을 조절하는 방법에서, 상기 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현의 조절은 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 식물로의 도입 및 발현에 의해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시켜 AtPTR2 단백질 코딩 유전자의 발현을 조절하는 단계를 포함하는 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0022] 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.
- [0023] 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.
- [0024] 재조합 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.

[0025] 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) 또는 포스포노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명의 재조합 벡터에서, 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "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.

[0027] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α -아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투머파시엔스(*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.

[0028] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0029] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0030] 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 중에 대해서 당업계에 주지되어 있다(*Handbook of Plant Cell Culture*, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0031] 본 발명의 일 구현 예에 따른 형질전환 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 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 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 안토시안 생합성이 조절된 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.

[0033] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래 AtPTR2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 식물체의 안토시안 생합성 조절용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 유효성분으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하며, 상기 유전자를 식물체에 형질전환시킴으로써 식물체의 안토시안 생합성을 조절할 수 있는 것이다.

[0034] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 재료 및 방법

[0036] 식물 재료 및 성장 조건

[0037] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 야생형인 Col-0(Columbia-0), Ws(Wassilewskija), 돌연변이체 또는 과량발현 형질전환 식물(도 1)을 사용하였다. 애기장대를 4.44g/L MS(Murashige 및 Skoog) 염과 0.7% 한천 분말, 60mM 설탕 또는 5.5mM 포도당을 함유한 pH 5.7의 배지에서 생장시켰다. 모든 종자는 4℃의 암소에서 5일 동안 저온 처리를 거친 뒤, 18시간의 광 조건 및 6시간의 암 조건이 반복되는 광주기를 거친 후에 22℃의 배양실로 옮겨 12일간 생장시켰다. 필요에 따라 0, 70, 140 및 240 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 광도의 빛을 조사시켰다. 필요 시 애기장대를 4.44g/L MS 염과 0.7% 한천 분말을 포함한 배지에 엿당, 포도당, 과당, 만니톨 및 팔라티노스를 각각 60mM씩 첨가하거나, 포도당 및 과당을 각각 30mM씩 혼합하여 첨가한 후 pH 5.7로 조절하여 생장시켰다. 또한 에틸렌 생합성을 억제하거나 수용체 기능을 억제하기 위해서 60mM 설탕이 첨가된 MS 배지에 10 μM ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid)와 100 μM AgNO₃를 각각 첨가하였다.

[0038] **형질전환 및 RSE-PCR(Restriction Site Extension-PCR)**

[0039] *pap1-D* 형질전환 돌연변이체로부터 T-DNA가 삽입된 부분을 동정하기 위해 RSE-PCR(restriction site extension-polymerase chain reaction)을 실시하였다. RSE-PCR이란 DNA에 삽입된 알려지지 않은 게놈 DNA 단편의 효과적인 분리를 위해 구축한 방법으로, 1차 RSE-PCR의 첫 번째 사이클에서 제한효소로 절단된 DNA 단편이 확장되고, 그 후의 2차 네스티드(nested)-PCR 과정 동안 타겟 단편이 특이적으로 증폭된다. RSE-PCR은 큰 게놈 식물체에서 알려지지 않은 부위에 알려지지 않은 DNA로부터 태깅된 서열(T-DNA 또는 트랜스포존)을 밝힐 수 있는 고 효율의 방법이다. 식물체 100mg을 액체질소를 이용하여 막자사발에서 분쇄한 후, DNA 추출 용액(50mM Tris-HCl pH 7.4, 250mM NaCl, 25mM EDTA, 0.5% SDS)을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 페놀/클로로포름 용액 추출 및 에탄올 침전을 통하여 게놈 DNA를 정제한 후, 약 500ng의 게놈 DNA를 제한효소로 절단하였다. T-DNA 특이적인 보더(border) 프라이머 및 임의적인 arbitrary 프라이머(표 1)를 이용하여 1차 RSE-PCR을 실시하여 T-DNA 단편을 증폭하였다. 상기 증폭된 T-DNA 단편을 주형으로 이용하여 2차 네스티드-PCR을 실시한 후, 아가로스 겔에 전기영동하여 증폭된 단편을 분리하였다. 상기 분리된 단편을 겔 정제 키트를 이용하여 정제한 후, 시퀀싱하여 T-DNA 삽입부위를 확인하였다.

표 1

[0040] RSE-PCR 분석에서 사용한 프라이머 목록

프라이머	서열 (5' → 3')
L1	TCTCCATAATAATGTGTGAGTAGTTCAGATAAGGG (서열번호 3)
L2	TGTGAGTAGTTCAGATAAGGAATTAGGGTTCCTA (서열번호 4)
L3	TGTTTACACCACAATATATCCTGC (서열번호 5)
L4	GGTTTCGCTCATGTGTTG (서열번호 6)
ADkpn	GTAATACGACTCACTATAGGGCGTACC (서열번호 7)
ADPst	GTAATACGACTCACTATAGGGCTGCAG (서열번호 8)
ADSac	GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCTC (서열번호 9)
AP	GTAATACGACTCACTATAGGGC (서열번호 10)

[0041] **RNA 추출, RT-PCR 및 실시간 정량 PCR 분석**

[0042] 0.1g의 식물체를 액체 질소로 얼려 막자 사발에서 분쇄한 후, RNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 추출하였다. cDNA를 합성하기 위하여 추출한 총 RNA 1 μg 을 15개의 티민(thymine)이 연결된 올리고 dT 프라이머 및 dNTP와 함께 65℃ 항온수조에서 5분간 반응시켜 단일가닥을 생성한 뒤, 역전사효소인 SuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen, USA)를 첨가하여 42℃ 항온수조에서 1시간 동안 역전사 시켰다. 총 20 μl 의 반응액을 끓는 물에 5분간 반응시켜 역전사효소의 활성을 제거한 후, 핵산 분해 효소가 없는 물(nuclease-free water) 80 μl 를 첨가하여 1/5로 희석하였다. mRNA 발현 정도를 비교하기 위한 RT-PCR은, 합성된 cDNA 2 μl 를 주형으로 하고, 각 유전자와 상보적인 10pmole의 프라이머(표 2) 1 μl 를 Taq-중합효소 혼합물(Taq-polymerase Mixture, Bioneer, Korea)에 첨가하여 증합효소연쇄반응(PCR)을 수행하였다. PCR은 DNA Engine(BioRAD, USA)을 이용하여 각 PCR 산물이 포화되지 않는 조건으로 반복횟수를 결정하였다. 합성된 PCR 산물을 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ EtBr(ethidium bromide)이 포함된 1% 아가로스 겔에서 전기영동 하였고, GELDOC2000

농도계(densitometer) 및 영상 분석 시스템(BioRad, USA)으로 확인하였다. 실시간 정량 PCR(Quantitative Real-Time PCR)을 수행하기 위해, RT-PCR 방법과 같이 주형 cDNA 및 프라이머를 섞어준 후, 10 μ l의 iQTMSYBR Green Supermix(BioRad, USA)를 섞어 Exicycler 96(Bioneer, Korea)을 이용하여 순환 역치(cycle threshold, C_T)를 얻었다. 각 유전자의 C_T를 유비퀴틴의 C_T로 나눈 후, 그 역수를 취하여 mRNA 발현 정도를 비교하였다.

표 2

[0043]

RT-PCR 분석에서 사용한 프라이머 목록

Gene	서열 (5' → 3')		Use
	Forward (F)	Reverse (R)	
<i>R219-1</i>	1F;TGAGACATGGACAGGTAACAGG (서열번호 11)	1R;AGTCACCAATACATTCCGCTG (서열번호 12)	Mutants screening
<i>R219-2</i>	2F;TCGAAATCCGGAGATTATTCC (서열번호 13)	2R;TCTTCACATTTCATGGAAGG (서열번호 14)	
<i>R219-3</i>	3F;CTTGACAAAGCCGCTGTTATC (서열번호 15)	3R;GAACCTGGAACCTCATTTC (서열번호 16)	RT-PCR
<i>R219</i>	5F;CATTCGACACAGCAAGCG (서열번호 17)	5R;GAGCCAAGGCACTGCACA (서열번호 18)	
<i>PAP1</i>	F;AGACATTACGCCATTCTACAAC (서열번호 19)	R;GTCGCTTCAGGAACCAAAATATCT (서열번호 20)	
<i>ACT2</i>	F;ATTCAGATGCCAGAAGTCTTGT (서열번호 21)	R;GAAACATTTTCTGTGAACGATTCTT (서열번호 22)	
<i>18S rRNA</i>	F;CCTGCGGCTTAATTTGACTC (서열번호 23)	R;CCGGATCATTCAATCGGTA (서열번호 24)	
<i>ACTIN2</i>	F;GCTGAGAGATTAGATGCCCA (서열번호 25)	R;GTGGATTCCAGCAGCTTCCAT (서열번호 26)	Q-PCR
<i>CHS</i>	F;GGCAAAGAAGCGGCAGTGAAG (서열번호 27)	R;CGGAAGGACGAGACCAAGAAG (서열번호 28)	
<i>DFR</i>	F;CTTTGTTCTGTCACCGTTCG (서열번호 29)	R;TCCTTCCTCAGATAAATCAGCCTCC (서열번호 30)	
<i>LDOX</i>	F;GTTTGACGCTTTTCTACGAGG (서열번호 31)	R;TGAGCAAAAGTCCGTGGAGG (서열번호 32)	
<i>UF3GT</i>	F;TGTCAGATCGTTTGGTTCC (서열번호 33)	R;GATTCTTCCTCACTTCTCAC (서열번호 34)	
<i>PAP1</i>	F;CAAGAGGTAGATATTTGGTTCC (서열번호 35)	R;CTATACAAACGCAAAATG (서열번호 36)	
<i>PAP2</i>	F;ATGGAGAAGGCAATGGCATCAAG (서열번호 37)	R;CCAGCAATCAAGGACCACCTATTTC (서열번호 38)	
<i>TTG1</i>	F;CTCCGCTCATCTCCGGTCACAG (서열번호 39)	R;CAACGGCGCACAAACTCGCTCG (서열번호 40)	
<i>TT8</i>	F;GGCGGTTCAATCTGTGGAC (서열번호 41)	R;CTGTTGGCTCCTCTTAACG (서열번호 42)	
<i>EGL3</i>	F;GGATTCAACGGTTAGGTCAG (서열번호 43)	R;ATCATCTTCTGCGATTCTCTC (서열번호 44)	
<i>GL3</i>	F;GAGCAACAGAGAAATGTGAAGAC (서열번호 45)	R;GTTCTGATGATGATGACGA (서열번호 46)	
<i>MYBL2</i>	F;GCCCATTCGAAGTACCAA (서열번호 47)	R;AGCGTTTCTTGACCTGTTGA (서열번호 48)	

[0044]

안토시아닌 추출 및 정량

[0045]

각 조건에서 12일간 생장한 식물을 처리구 당 20개의 유식물을 취하여 600 μ l의 추출 용액(1% HCl이 포함된 메탄올)에 담귀 4℃ 암소에서 6시간 동안 보관하였다. 이후 증류수 200 μ l 및 클로로포름 200 μ l를 순서대로 첨가하고 12,000rpm으로 5분간 원심분리하여 얻어진 상층액을 UV-VIS 분광기(Shimadzu, Japan)를 이용하여 530nm 및 657

nm에서 흡광도를 측정하였다. $A_{530}-0.33A_{657}$ 의 수식에 대입하여 얻어진 안토시아닌의 양을 추출에 이용된 식물 개체의 수로 나누어 주었다.

[0046] **실시예 1. PAP1 과발현체의 2차 돌연변이 유도를 통한 안토시아닌 색소 생합성에 관련된 새로운 돌연변이주의 선발**

[0047] PAP1(production of anthocyanin pigment 1) 유전자가 과발현된 *pap1-D* 돌연변이체를 모본으로 하여 T-DNA로 형질전환한 후, 무작위 T-DNA 삽입 이중 돌연변이체 집단을 구축하였다. 형질전환을 통해서 총 832계통의 T2 돌연변이주를 선발할 수 있었으며, 이들 중 444 계통은 T-DNA가 1 카피 삽입된 돌연변이주로 항생물질 선발에서 나타났으며, 134 계통은 2 카피, 82 계통은 3 카피 이상 T-DNA가 삽입된 것으로 나타났다. 덧붙여, 172 계통은 멘델의 분리비를 따르지 않는 것으로 나타났다. 또한, 1 카피 T-DNA가 삽입된 444 계통 중 219 계통은 *pap1-D* 타입의 표현형을 보여 안토시아닌 색소의 과축적을 보여 주었으며, 165 계통은 *pap1-D* 표현형이 억제되어 야생형과 비슷하게 색소축적이 거의 유도되지 않았다. 반면에 60종은 야생형과 *pap1-D* 돌연변이의 중간 정도의 안토시아닌 색소가 축적되었다.

[0048] 상기 T-DNA가 삽입된 돌연변이주 중에서 1 카피 T-DNA가 삽입된 444 계통의 표현형을 관찰하여 안토시아닌 색소 축적이 억제되거나 또는 더욱 더 많이 증가하는 돌연변이체를 선발하였다. 그 후 T-DNA가 삽입된 위치를 동정하여 PAP1의 전사 또는 전사체의 안정성 조절에 관여하는 유전자를 발굴하였다. 도 1A에 나타난 바와 같이, 모본으로 사용한 *pap1-D* 돌연변이주는 PAP1 유전자의 3'UTR 부근에 CaMV의 35S 증폭자(enhancer)가 삽입되어 PAP1 유전자의 발현이 촉진되어 식물체 전반에 걸쳐 과도한 안토시아닌 색소의 축적이 이루어지는 변이체이다. 또한, 대조군으로 사용한 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 야생형인 Columbia-0(Col-0) 및 *pap1-D* 돌연변이체의 표현형을 도 1B에 나타내었다.

[0049] **실시예 2. 빛 세기에 따른 안토시아닌 함량**

[0050] R219 돌연변이는 *pap1-D* 표현형이 야생형 수준으로 억제된 165 계통 중의 하나이다. 안토시아닌 함량은 빛의 세기 및 파장에 의존한다. 애기장대의 경우 암소에서는 안토시아닌 축적이 일어나지 않으며 빛 세기가 증가함에 따라 색소 함량 축적이 증가하는데, $240 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 까지 증가한다(Jeong et al., 2010 Plant Physiol. 154, 1514-1531). 따라서 AtPTR2가 빛의 세기와 무관하게 PAP1을 억제하는지 조사하고자 낮은 빛 세기와 중간 빛 세기 조건에서 안토시아닌 함량 변화를 측정하였다. 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이 약한 빛 세기와 중간 빛 세기 조건의 토양에서 성장된 R219 계통은 야생형과 비슷한 안토시아닌 함량을 보임으로써 *pap1-D*의 표현형을 거의 100% 억제(suppression)함을 알 수 있었다.

[0051] **실시예 3. 설탕(sucrose) 농도에 따른 안토시아닌 함량**

[0052] 당(sugar)은 애기장대를 포함함 식물의 안토시아닌 생합성을 촉진한다. 애기장대의 경우 포도당이나 과당에 비해 설탕(sucrose) 또는 엿당(maltose)이 안토시아닌 생합성을 촉진한다. 반면에 다른 이당류인 팔라티노스(palatinose) 및 삼투조절자 만니톨(mannitol)은 안토시아닌 생합성에 영향을 미치지 못한다. 애기장대의 안토시아닌 생합성을 촉진하는 설탕 농도에 따른 안토시아닌 함량을 조사하였다. 도 4에서 나타난 바와 같이 설탕 농도 증가에 따라서 안토시아닌 함량이 현저하게 증가하였다. 예를 들어 90mM의 설탕 농도에서는 야생형 및 *pap1-D*가 대조구에 비해 각각 6배 및 10배 증가하였다. 그러나 r219 돌연변이체에서는 *pap1-D* 표현형을 현저하게 억제하였으며, 심지어 야생형과 비교해 적은 축적을 보였다.

[0053] **실시예 4. R219 계통의 유전형 특성 분석**

[0054] R219 계통에서 T-DNA가 삽입된 부분을 T-DNA를 포함하는 DNA 절편을 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 이용하여 RSE-PCR(restriction site extension-PCR) 기법으로 조사하였다.

[0055] T-DNA가 삽입된 위치를 확인한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 T-DNA가 AtPTR2 유전자의 네 번째 엑손 부위에 삽입되어 있었다. T-DNA 삽입에 의해서 AtPTR2 전사체 수준이 감소하였음을 확인할 수 있었다. 3' 말단 특이 프

라이머 세트(5F 및 5R)를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과, 도 6에서와 같이 야생형 및 *pap1-D* 과발현체에 비해서 r219 돌연변이체에서 mRNA 양이 현저하게 감소하였다. 이는 T-DNA 삽입에 의해 PAP1 mRNA의 전사체 수준이 현저하게 감소함을 의미한다.

[0056] 또한, *pap1-D*에서와 같이 r219 돌연변이체에서 항생제 *PAP1* 유전자에 삽입된 바스타(barstar)를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 이용하여 DNA를 증폭한 결과 r219 돌연변이체에서도 바스타가 증폭된 PCR 밴드를 얻을 수 있었다(도 7). 상기 결과는 R219 돌연변이 계통의 PAP1이 3' UTR 부근에 T-DNA가 삽입되어 유지되고 있음을 나타낸다.

[0057] 실시예 5. 안토시안 생합성 유전자 전사체 함량

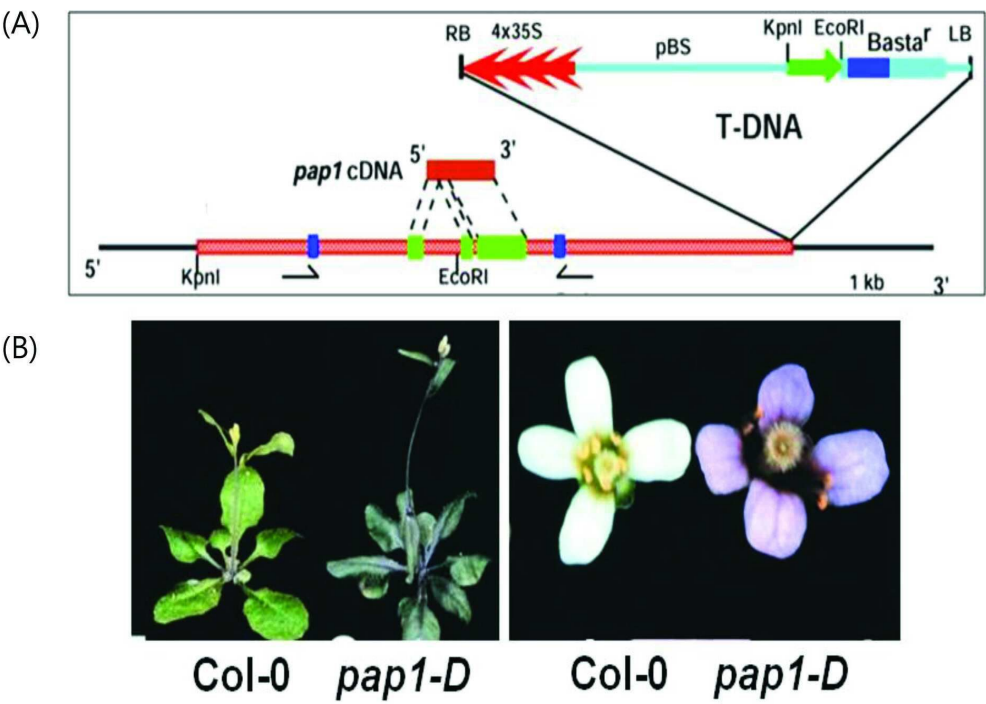
[0058] PAP1은 안토시안 생합성 경로의 뒷 단계에 관여하는 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다. 알려진 바와 같이 *pap1-D* 과발현 돌연변이체에서 안토시안 생합성 경로의 앞 단계에 관여하는 CHS(chalcone synthase)의 전사체 함량은 야생형과 큰 차이가 없었으나, 안토시안 생합성 경로의 뒷 단계에 관여하는 유전자인 DFR(dihydroflavonol 4-reductase), LDOX(leucoanthocyanidin oxygenase) 및 UF3GT(UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase)의 전사체 함량은 야생형에 비해 10 ~ 90 배 이상 높았다(도 8). 반면에 r219 돌연변이체에서는 PAP1 전사체가 *pap1-D*에 비해 수백 배 감소하였을 뿐만 아니라 야생형에 비해 30% 낮게 유지되었다. 상기 결과는 R219가 PAP1 전사체 수준을 조절함을 나타낸다.

[0059] 실시예 6. AtPTR2 돌연변이체에서 안토시안 및 PAP1 전사체 함량

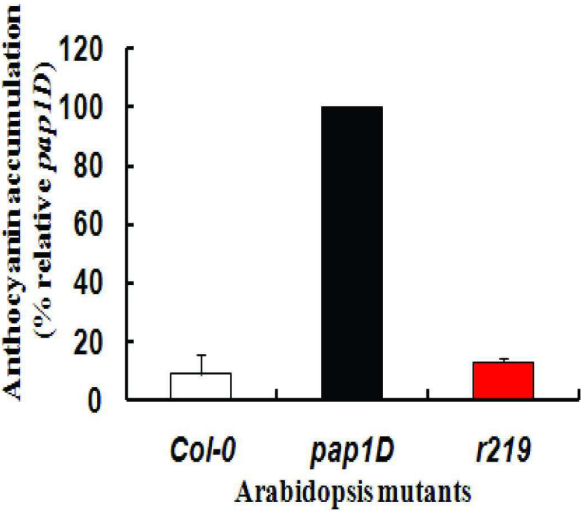
[0060] 애기장대에는 펩티드 수송체(peptide transporter)로 54개의 유전자를 가지고 있는데, AtPTR2는 서브패밀리-2에 포함되며 At2G020400으로 명시되어 있다. AtPTR2 유전자의 안티센스(antisense) 재조합 발현 결과 AtPTR2 유전자는 식물의 종자 발달 및 개화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. R219 돌연변이 라인은 T-DNA가 본 발명의 AtPTR2 유전자의 네 번째 엑손 부위에 삽입된 결과로 나타났다(도 5). 상기 결과는 AtPTR2가 발현되지 않을 경우 *pap1-D* 표현형이 사라짐을 의미한다. 이는 AtPTR2가 PAP1 발현을 조절하며 그 결과 안토시안 생합성 경로를 조절함을 의미한다. 따라서 AtPTR2가 PAP1 전사체 조절에 관여할 가능성을 조사하고자 T-DNA 삽입 돌연변이 집단(<http://www.arabidopsis.org>) 중에서 R219의 두 번째 및 네 번째 위치의 엑손에 T-DNA가 삽입된 라인인 *R219-1*, *R219-2* 및 *R219-3*(도 5)을 확보한 후 순계라인을 구축하였다. 구축된 순계라인의 R219 유전자 발현은 세 돌연변이종 모두에서 야생형에 비해서 현저하게 감소하였다(도 9). 또한, 안토시안 함량도 야생형에 비해 모두 감소하였는데, *R219-3*에서 야생형에 비해서 50% 수준을 유지하였다(도 10).

도면

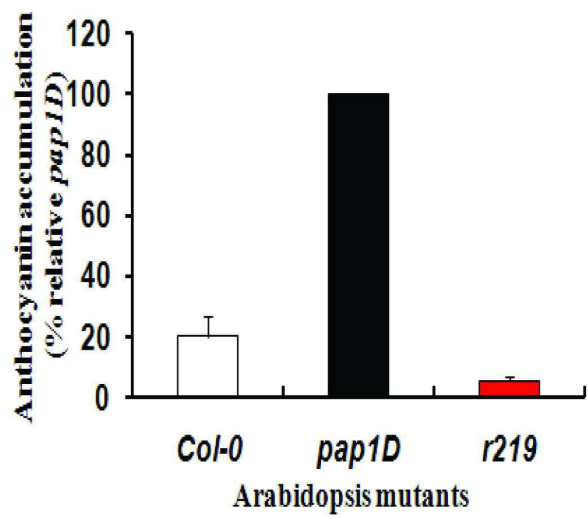
도면1



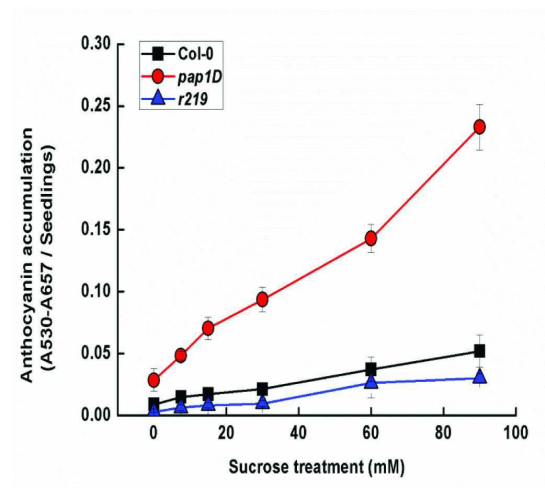
도면2



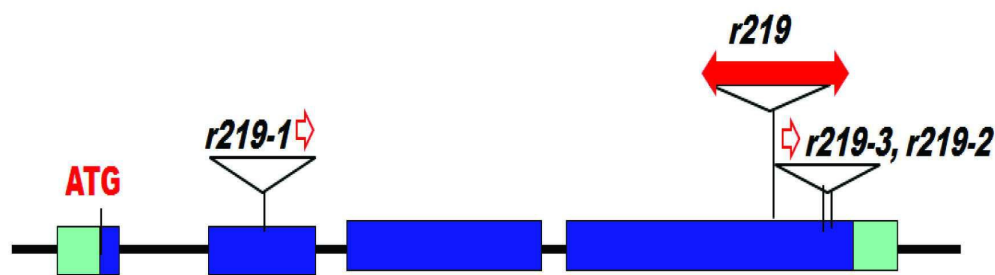
도면3



도면4



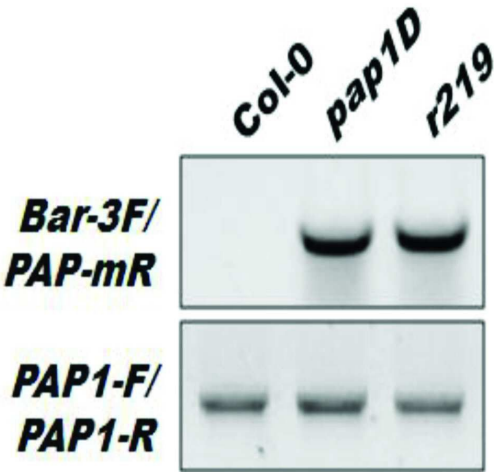
도면5



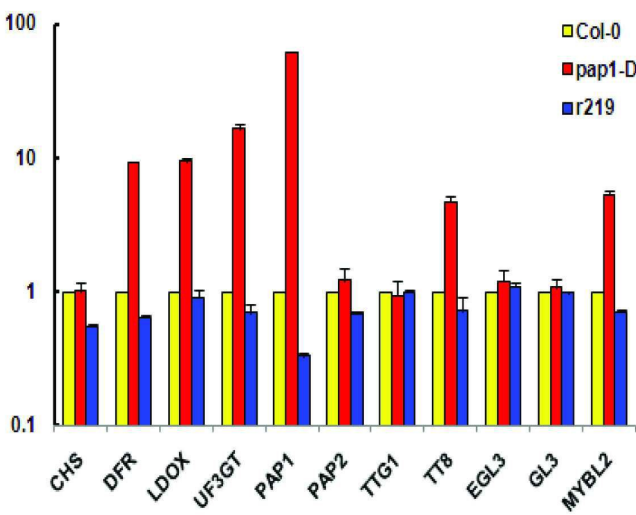
도면6



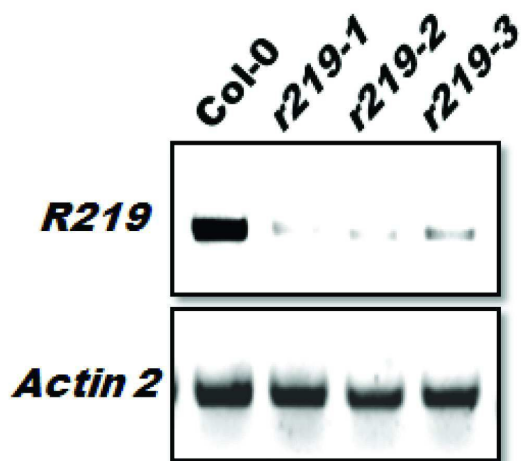
도면7



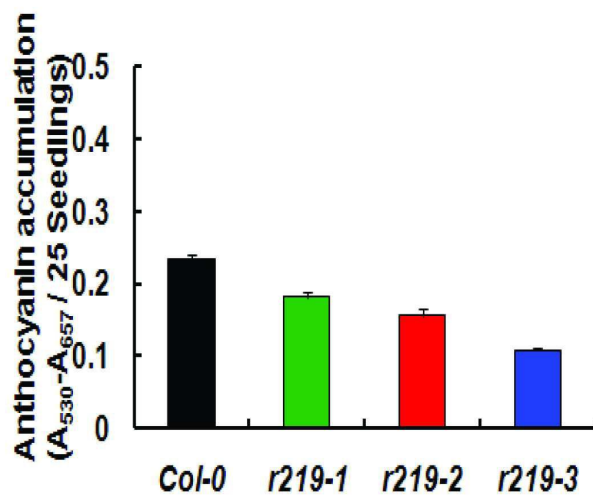
도면8



도면9



도면10



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)