



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/05 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 1/12 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0079408

(43) 공개일자 2007년08월07일

(21) 출원번호 10-2006-0010045

(22) 출원일자 2006년02월02일

심사청구일자 2006년02월02일

(71) 출원인 한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자 김한나
대전 동구 가양1동 430-7
정석원
대전 유성구 노은동 559-10 205호
김현순
대전 유성구 궁동 다솔아파트 102동 1007호
전재홍
대전 유성구 도룡동 431-6 현대아파트 101동 604호
정혁
대전 유성구 전민동 엑스포아파트 404동 804호
박연일
대전 유성구 지족동 919 열매마을 7단지 705동 401호

(74) 대리인 최규환

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 남세균 글리코젠 신타제를 이용한 식물체의 광합성과전분함량 증대 방법

(57) 요약

본 발명은 남세균인 시네코시스티스 (Synechocystis sp.) PCC 6803의 글리코젠 신타제(glycogen synthase 또는 slh1393, 이하 *cglgA* 라 함)를 발현하는 형질전환감자에서 감자 잎의 광합성량 증가와 괴경의 전분입자의 크기를 감소시킴과 동시에 전분함량을 증가시킬 수 있음을 보이고 이를 이용하여 식량의 생산성을 증대하고자 하는 것이다.

본 발명의 시아노박테리아 글리코젠 합성 유전자(glycogen synthase, *cglgA*) 발현시 최대 광합성율이 증대되고, 형질전환 식물의 미토콘드리아 관련 암호효율은 대조구와 비교하여 약 2-3배 증가하며, 괴경의 전분 입자 크기는 대조구에 비해

25-35% 감소하나 입자 크기가 일정하며, 전분함량은 대조구에 비해 약 23%까지 증가하는 형질전환 감자 식물체를 제공할 수 있다. 또한 시아노박테리아 글리코젠 합성 유전자(*cglgA*)의 과발현은 감자 괴경의 전분농도 증가와 함께 면적당 감자 생산량의 증가가 가능한 형질전환 감자 식물체를 제공할 수 있다.

대표도

도 2

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호1의 염기서열을 가지는 남세균인 시네크시스티스 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803유래의 글리코젠 신타제 *cglgA*를 암호화하는 DNA.

청구항 2.

다음의 단계를 포함하는 시아노박테리아 글리코젠 합성 유전자(*cglgA*)을 발현하는 형질전환 식물체의 제조방법:

(a) 식물 세포를 다음의 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열로 형질전환하는 단계:(i) *cglgA*를 코딩하는 서열번호1 기재의 뉴클레오타이드 서열; (ii)상기 (i)의 뉴클레오타이드 서열에 작동적으로 연결되며 식물세포에서 작용하여 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; (iii)식물세포에서 작용하여 상기 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 3'-비-해독화 부위;

(b) *아그로박테리움 투메팩ien스*(*Agrobacterium tumefaciens*)-바이너리 벡터 시스템을 이용하여 형질 전환된 식물세포를 선별하는 단계: 및

(c) 상기 형질전환된 식물세포를 재분화 배지에서 재분화하여 재분화 신초를 얻고, 이를 발근 배지에서 배양하여 형질전환 식물체를 수득하는 단계.

청구항 3.

제 2항에 의해 제조되는 식물체는 글리코젠 합성 효소를 발현하며, 기내 배양시 괴경화율이 높고 괴경 산출량과 괴경의 크기 또한 증가하는 특징을 갖는 조직배양에 의해 무성번식되는 형질전환 식물체.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 식물체가 감자임을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 5.

제 3항 또는 제 4항에 있어서, 감자 괴경의 전분 입자 크기가 감소하고 입자 크기 분포가 일정하며, 전분농도 증가와 함께 면적당 감자 생산량의 증가가 가능한 조직배양에 의해 무성번식되는 형질전환 감자 식물체.

청구항 6.

제 4항에 있어서, 식물체의 생육시 암호흡률이 증가하며, 광포화 조건($900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서는 엽록소 당 산소방출량이 증가하여 전체 광합성량이 증가한 조직배양에 의해 무성번식 되는 형질전환 감자 식물체.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 광합성 활동이 향상된 잎과 괴경의 전분입자 크기가 감소하고 전분함량이 증가한 형질전환 감자를 생산하기 위해서, 대지레 감자에 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(cglgA)를 아그로박테리움-관련 잎 조직 형질전환법을 이용하여 도입한 형질전환 감자식물체가 기내 배양시 괴경화율이 높고 괴경 산출량과 괴경의 크기 또한 상당히 증가하는 효과를 보이는 것과 형질전환 감자식물체 괴경의 전분 입자 크기가 감소하고 입자 크기 분포(size distribution)가 일정하며, 전분함량 증가와 함께 면적당 감자 생산량의 증가가 가능한 형질전환 감자 식물체에 관한 것이다.

전분은 광합성을 수행하는 진핵 독립영양생물에서 가장 중요한 형태의 탄소저장원이다 (Ball S and Morell M (2003) Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 54, 207-233). 알파 글루칸인 포도당 중합체로서 1번과 4번 위치에서 결합으로 사슬모양이 형성되고 1번과 6번 결합을 통해서 가지모양이 형성된다. 잎의 엽록체에서는 광합성의 일차산물로서 일시적인 저장형이지만 전분체(amyloplast)에서는 장기간 저장되는 저장형이다. 전분의 크기는 지름이 $50 \mu\text{m}$ 이상 되는 거대한 4차원 구조를 형성하는데 주로 아밀로펙틴(85-90%)과 아밀로스(15-30%)로 구성된다. 아밀로펙틴은 분자량이 10^4 - 10^7 KDa이며 잎에서 볼 수 있는 전분의 경우 1,4결합과 1,6결합이 반 반 정도 형성된 구형의 구조(globular structure)를 보인다. 아밀로스는 그 크기가 10^2 - 10^3 KDa로서 전분체의 저장 전분형에서 약 11-37%를 구성하는데 주로 1,6 결합이 1% 이하이므로 구조가 주로 사슬형이다. 일반적으로 아밀로펙틴은 가지 없는 사슬이 집단화되어 있는 글리코젠과 유사한 구조를 보인다. 전분에는 단백질, 지질과 무기영양소를 포함한다. 곡류의 전분은 0.25-0.5%의 단백질을 포함하지만 감자나 카사바의 경우 단백질 양이 0.1%미만이다.

전분은 주로 밀, 옥수수, 벼, 카사바, 보리, 감자와 고구마 등으로부터 만든다. 전분입자는 화장품이나 토탈 파우더(talcum powder), 탈탄소 복사용지, 플라스틱 필립 제조 등의 제조업에 이용된다. 아밀로스 성분이 높은 전분의 경우 혈당조절용 기능성 식품에 이용된다. 저항 전분(Resistant starch)의 경우 소장에서 소화되지 않고 대장으로 수송되어 발효되는데 그 결과 생성된 짧은 사슬 지방산이 대사되어 건강한 상태를 유지하게 해준다. 아밀로펙틴은 주로 종이의 코팅과 흡착제로 사용되며, 점성도를 변화시키기 위한 시료로서도 사용되고 마감재 석고 판넬을 서로 연결시켜줄 때 사용되기도 한다. 농화학 산업의 경우, 전분은 멀칭, 종자 코팅 등에 사용되며, 제약산업의 경우에는 희석제나 흡착제 그리고 약물전달에 이용되기도 한다.

전분 조성을 조작하고자 하는 시도는 주로 전분대사에 집중되어 왔다. 전분함량이나 조성이 바뀐 형질전환체나 전분돌연변이체 (*ae*, *amf*, *sug*, *wx*, *shr1*, *shr2* 그리고 *flo*)가 보리, 밀, 옥수수, 완두, 벼, 귀리, 밀 등에서 동정되거나 발견됨으로써 저장뿌리에서의 전분 생합성이나 유통(mobilization)의 조절단계에 대한 이해가 가능하게 되었다. 쌍자엽의 경우 유전공학적 기법으로 AGPase 활성도를 변경시킴으로써 전분수율이 30%증가된 감자가 개발되었다 (Stark DM, Timmerman K, Barry GF, Preiss J and Kishore GM (1992) Science 258, 287-292). 또한 대장균의 PPi를 감자에 과량발현시킴으로써 전분함량을 증대시키려는 시도가 있었다 (Geigenberger P et al., (1998) Planta 205, 428-437). 이들의 결과에 의하면 전분함량 조작정도는 감자의 품종에 의해서 결정되는 것 같다. Stark 등(1992)은 러셋 벌뱅크(Russett Burbank) 감자 품종으로 30%의 전분함량 증대를 보고하였지만, 프래리(Prairie) 품종의 경우 AGPase의 활성도가 4-5배 증가했음에도 불구하고 전분함량의 증대는 볼 수 없었다 (Sweetlove LJ, Burrell MM, and ap Rees T (1996) Biochem J 320, 493-498). AGPase 활성도를 조작하려는 시도이외에 엽록체의 ATP-ADP 수송체(transporter)를 증가시킴으로써 감자의 전분 함량을 증대시키려는 시도도 있었다 (Geigenberger P (2001) Plant Physiol 125, 1667-1678). 또한 *SBE*(starch debranching enzyme I)이나 (Flipse E, Suurs L, Keetels CJAM, Kossmann, Jacobsen E and Visser RGF (1996) Planta 198, 340-347) 슈크로즈 신타제(sucrose synthase) 활성도 변화를 동시에 변경(Edwards A, Fulton DC, Hylton CM, Jobling SA, Gidley M, Rossner U, Martin C and Smith AM (1999) Plant J 17, 251-261) 시킴으로써 전분함량, 사슬의 길이, 전분입자의 형태, 전분의 성질 변화를 유도하였다. 최근에는 전분합성에 관여하는 3가지 유전자를 동시에 역방향(antisense) 억제기법으로 억제함으로써 사슬길이가 짧아진 아밀로펙틴과 아밀로스가 거의 없는 감자가 만들어 진 바

있다. 단자엽의 경우, 보리 품종인 히말라야 292(Himalaya 292)의 경우 전분합성 효소 II(starch synthase II)의 단일염기 치환이 생길 경우 아밀로스 함량이 70%에 이른다 (Morell MK, Kosar-Hashemi B, Cmiel M, Samuel MS, Chandler P, Rahman S, Bulton A, Batey L and Li Z (2003) Plant J 34, 173-185). 귀리의 경우 역방향(antisense) 기법으로 *gbssI* (granule bound starch synthase)를 억제시킬 경우 아밀로스 함량이 감소된 17종의 형질전환라인을 확보하였다. 밀의 경우 전분 가지형성 효소(starch branching enzyme)의 활성도가 변화될 경우 형질전환체에서 A형의 전분입자가 증가한다 (Davis JP, Repellin A, Boa M, Hucl P, Colleoni C, and Chibbar RN (2001) In, Proc. 5th Canadian Plant Tissue Culture and Genetic Engineering Workshop, Saskatoon 22). 또한 밀에서는 *gbssI*(granule bound starch synthase) 유전자가 결손될 경우 아밀로스 함량이 현저하게 감소된다. 옥수수는 AGPase 활성도 변화에 의해서 전분함량이 18% 증가하였다 (Giroux MJ (1996) PNAS 93, 5824-5829).

전분함량과 조성이 식물에 따라서 다르지만 전분 그 자체로는 응용적인 측면에 한계가 있다. 따라서 화학적 혹은 물리적인 방법으로 전분을 필요한 목적에 맞게 변경할 필요가 있다. 공정과정이 아니라 식물체 내에서 전분구조 변경을 하는 경우가 보다 잇점이 있다. 이러한 식물체내 변형의 예로는 전분의 인산화 정도, 아밀로스나 아밀로펙틴 중 어느 한 종류의 전분만 있고 다른 전분은 거의 없는 경우, 전분 입자 크기가 일정할 경우 등이 있을 것이다.

현재까지 식물에서 전분의 합성 메커니즘을 분석하고 조작하는 데 많은 진보가 있었음에도 불구하고 열쇠효소간의 상호작용 및 대사조절에 대해서는 명확하게 알려지지 않고 있다. 예를 들어 강낭콩의 러그(rug) 돌연변이체는 전분생산량을 조작하려고 의도되었으나 지질과 저장 단백질의 비이상적인 양적변이가 수반되어 주름진 종자가 생산되었다.

세균에서의 글리코젠 생합성은 ADP-글루코오스 피로포스포릴라제(ADP-glucose pyrophosphorylase), 글리코젠 합성 효소(glycogen synthase) 그리고 글리코젠 가지형성 효소(glycogen branching enzyme)에 의해서 합성된다. 글리코젠 가지형성 효소(glycogen branching enzyme)에 의해서 글리코젠의 구조가 결정된다. 남세균의 주요 탄수화물 저장체는 글리코젠으로서 약 10%의 1,6 결합을 갖는다. *Synechocystis* sp. PCC 6803의 경우 하나의 글리코젠 가지형성 효소(glycogen branching enzyme)과 2개의 글리코젠 합성효소(glycogen synthase)를 갖고 있다 (Yoo SH, Spadling MH and Jane J-L (2002) Carbohydrate Res 337, 2195-2203).

전분대사는 식물의 정상적인 성장과 발달에 필요하다. 남세균에서 AGPase가 손실되는 돌연변이가 일어나는 경우 전분생합성 경로가 남세균의 최대광합율이 저해되므로 생장이 억제된다(Miao X, Wu Q, Wu G, and Zhao N (2003) Biotech Lett 25, 391-396). 고등식물에서도 역시 전분합성 경로의 AGPase가 소실되는 경우 생장의 저하가 수반된다는 보고는 고등식물의 정상적인 성장과 발달에 전분의 생합성이 매우 중요함을 시사한다 (Lin TP, Casper T, Somerville CR, and Preiss J (1988) Plant Physiol 86, 1131-1135, Sun JD, Okita T, and Edwards GE (1999) Plant Physiol 119, 267-276). 포화광과 이산화탄소 농도조건에서는 광합성율이 전분과 탄소대사율에 의해서 조절된다. 즉, 전분의 생합성율이 탄소대사율을 조절하며, 종종 전분집적이 일어나지 않을 경우 광합성능이 감소된다 (Stark DM, Timmerman K, Barry GF, Preiss J and Kishore GM (1992) Science 258, 287-292).

본 발명에서는 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cgI/gA*)를 대지레 감자에 도입한 형질전환 감자 식물체가 중간 광도($250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 조건에서 잎 면적당 산소 방출량은 차이가 없으나, 광포화 조건($900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서는 클로로필 당 산소방출량은 크게 증가하였고, 미토콘드리아-관련 암호흡율이 또한 증가하여 전체 광합성량이 증가하고, 감자 괴경의 전분입자의 크기가 일정하게 약 30% 감소하여 전분함량 증가와 함께 면적당 감자 생산량이 증가한 형질전환 감자 식물체를 대량 생산할 수 있음을 알아내어 본 발명의 완성에 이르게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명자들은 대지레 감자에 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cgI/gA*)를 아그로박테리움-관련 잎 조직 형질전환법을 이용하여 도입한 형질전환 감자식물체가 광포화 조건에서 클로로필 당 산소배출량이 증가하여 광합성 활동이 증대되고 또한 괴경화율이 높아지고 괴경 전분함량과 괴경의 크기 또한 상당히 증가하는 효과를 보이는 것과 형질전환 감자 식물체 괴경의 전분농도 및 입자크기의 변화와 함께 면적당 감자 생산량의 증가가 가능한 형질전환 감자 식물체를 제조함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 남세균인 시네코시스티스 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803유래의 글리코젠 신타제 *cgI/gA*를 암호화하는 DNA와 이를 발현하는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 글리코젠 합성 효소를 발현하며, 기내 배양시 괴경화율이 높고 괴경 산출량과 괴경의 크기 또한 상당히 증가하는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 감자 괴경의 전분 입자 크기가 감소하고 입자 크기 분포(size distribution)가 일정하며, 전분농도 증가와 함께 면적당 감자 생산량의 증가가 가능한 형질전환 감자 식물체를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 식물체의 생육시 암호흡률이 증가하며, 광포화 조건($900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)에서는 클로로필 당 산소방출량이 증가하는 형질전환 감자 식물체를 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위한 본 발명은 남세균인 시네코시스티스 (*Synechocystis* sp.) PCC 6803 유래의 글리코젠 신타제 *cglgA*를 암호화하는 DNA, *cglgA* 유전자를 pCAMBIA1300-35SNOS에 재조합하여 작성한 식물 유전자 발현용 바이너리 벡터 pCAM1393, 벡터 pCAM1393로 형질전환 시켜서 *cglgA*가 발현되는 형질전환식물체의 제조방법, *cglgA*가 발현되어 기내 배양시 괴경화율이 높고 괴경 산출량과 괴경의 크기 또한 상당히 증가하는 효과를 보이는 것과 형질전환 감자식물체 괴경의 전분크기가 감소하고 크기 분포(size distribution)가 일정하며, 전분농도 증가와 함께 면적당 감자 생산량의 증가된 특성을 갖는 형질전환 감자 식물체를 특징으로 한다.

전술한 바와 같이 본 발명은 남세균 시네코시스티스 sp. PCC 6803 유래의 *cglgA*를 클로닝하는 것이다.

또한 본 발명은 *cglgA*를 감자에 형질도입함으로써 잎의 광합성능과 괴경의 전분함량을 변경시키고자 하는 것이다.

보다 구체적으로 본 발명은 남세균 시네코시스티스 sp. PCC 6803 유래의 *cglgA* 분리하고 이를 과량 발현 벡터에 삽입한 다음 아그로박테리아를 이용하여 감자 대지레 품종에 도입시키는 것으로 이루어진다. *cglgA*가 과발현된 감자는 잎에서 최대광합성율과 호흡율이 증가하였으며, 괴경의 발달과 전분함량의 증가하였으나 전분 크기 감소가 수반되었다.

이에 실시 예를 통하여 본 발명을 상세히 설명한다.

실시예1 ; *cglgA*을 가지는 플라스미드 제작

cglgA 유전자를 야생종 남세균에서 추출한 DNA를 주형으로 하여 아래와 같은 OE1393F(서열목록2)와 OE1393R(서열목록3)의 두 프라이머를 사용하여 1.476 kbs의 *cglgA* 유전자 (서열목록 1) 내에 증폭되도록 PCR하고 이를 제한효소 BamHI과 SacI으로 처리하고, 이와 별도로 제한효소 BamHI과 SacI으로 처리한 플라스미드 pCAMBIA1300-35SNOS와 라이게이션시켰다. 이에 의해 *cglgA* 유전자가 삽입된 약 12kb 크기의 플라스미드 pCAM1393을 얻었다 (도 1).

실시예 2; 식물재료 및 조직배양 및 형질전환

형질전환이 잘되는 감자인 대지레 품종을 사용하였다. 증식용 기내배양에는 MS 염, 30g/L 설탕, 스타바(Staba) 비타민, 100 mg/L, 이노시톨(pH5.8)가 첨가된 기내 줄기 증식용 배지를 사용하였다. 표면 살균한 줄기를 치상하여 기내 줄기를 유향하였으며, 매 2주마다 계대배양을 하였다. 배양기 내의 환경조건은 광도 2,500~3,500 lux, 16시간의 광주기, 23℃의 온도를 조절하였다. 감자의 경우 기내 소괴경 형성을 위해 증식용 배양조건에서 2~3주 동안 자란 기내 줄기를 한마디씩 절단하여 설탕농도가 90g/L 로 증가된 기내 소괴경 형성용 배지에서 유도하였다. 배양환경은 암배양, 17℃로 하였다. 3~4주 정도 자란 기내 줄기에서 건전한 잎을 채취하여 형질전환에 사용하였다. 감자는 50~80개 정도의 잎 절편을 YEP 배지에서 $\text{OD}_{600}=0.6$ 정도 자란 아그로박테리아 10 mL과 10분 동안 공동 배양하였다. 그리고 캘러스 유향 배지에 옮기고 이를 후에 재생 배지로 옮겨 2주마다 새로운 재생배지로 교환해 주었다. 약 한달 후에 신초가 발생하기 시작하였고 이를 선별 배지에서 2주간 배양하였다 (도2). 선별된 식물체들을 사용하여 소괴경을 형성하고 이를 온실에서 재배하여 수확한 감자들에서 광합성율과 전분 합성 정도를 측정하였다. 이들로부터 기내소괴경의 형성능을 비교하여 1번과 6번 계통의 경우 괴경 형성능이 대조구에 비해 촉진되는 결과를 얻었다(도5).

실시예 3; *cglgA* 과발현 형질전환체의 분리

총 RNA는 페놀/SDS 방법으로 추출하였다. 총 RNA 25 μ g을 2.2M 포름알데하이드가 포함된 1.2% 아가로스 젤에 분리시킨 후 나일론 멤브레인으로 터보 블터터 시스템(Turbo blotter system, Schleicher and Schuell Co.)을 이용하여 전이시키고 UV 크로스링커(UV crosslink)로 고정시켰다. PCR DIG 생합성 키트(Roche Molecular Biochemicals)을 이용해 디옥시제닌(digoxigenin, DIG)이 표지된 프로브를 S111393-F(서열목록4)와 S111393-R(서열목록5)을 이용하여 제작하였다.

혼성화는 혼성화액(DIG Easy Hyb.)에서 65 $^{\circ}$ C, 1hr 동안 전혼성화 반응시킨 후 프로브를 첨가하고 50 $^{\circ}$ C에서 16hr동안 혼성화시켰다. 멤브레인을 실온에서 세척 완충액 I (2 $\times$ SSC, 0.1%(w/v)SDS)으로 5분씩 두 번 세척하고 65 $^{\circ}$ C에서 세척 완충액 II (0.1 $\times$ SSC, 0.1% (w/v)SDS)로 15분씩 두 번 세척했다. 신호의 검출은 DIG 발광 검출 키트 (Roche Molecular Biochemicals)에서 제공된 방법에 의해 수행하였다. 대조구 감자 대지레의 잎과 뿌리에서 *cglgA* 유전자 발현은 볼 수 없었으나 형질전환체 1, 4, 5 및 6 계통에서 *cglgA* 유전자가 다량 발현됨을 알 수 있었다 (도 3).

실시예 4; 과발현체 잎의 광합성과 호흡

전분합성이 증대되면 광합성 산물인 3탄당 인산 (triose-phosphate)의 이용율이 증대되기 때문에 잎의 광합성율이 증가한다. *cglgA*가 과발현될 경우 잎에서의 전분합성율이 증가할 것이므로 잎의 광합성율 증대가 기대된다. 이를 확인하고자 형질전환체의 잎을 이용하여 개스상태의 산소농도를 측정하는 Clark형 산소전극(Oxygraph, Hanasatech, UK)을 이용하여 암호흡율과 포화광에서의 최대광합성율을 조사하였다 (도 4). 과발현체에서 야생종에 비해 호흡율은 현저하게 증가하였으나 최대광합성율에서는 차이가 미비하였다.

실시예 5; 과발현체 괴경의 발달과 전분함량

*cglgA*가 과발현될 경우 괴경의 생장과 전분함량에 미치는 영향을 조사하였다. 대조구에 비해서 괴경의 생중량은 거의 차이가 없었으나 4번 계통의 경우 괴경 크기가 약 130% 증가하였다 (도 5). 괴경의 발달 또한 *cglgA* 과발현에 의해 촉진되었는데, 1번과 6번 라인의 경우 8일째의 괴경화가 완료된 반면 대조구 대지레의 경우 약 50%정도 였다 (도 6). 괴경에서의 전분 함량을 측정하였다. 전분 함량 측정은 온실에서 배양한 감자를 수확해서 생중량을 잰 후 잘라서 60 $^{\circ}$ C에서 완전히 건조시킨 후 막자사발로 곱게 마쇄하였다. 8M HCl 2.5ml과 DMSO 10ml을 첨가하여 55 $^{\circ}$ C 진탕기에서 30분간 반응시켰다. 증류수 25ml을 넣어 식힌 후 5N NaOH로 pH4.0~5.0으로 맞춘 다음 여과시켜(Whatmann filter paper No.41) 전분을 추출하였다. 반응시약은 전분분석 키트(Boehringer Mannheim Co., BM207 748)를 사용하였다. 대조구로서 시약 기준액(blank)을 설정하고 각 시료(sample) 반응물과 함께 키트 반응용액(kit solution)을 처리하여 생성된 NADPH의 양을 자외선-가시광선 분광스펙트럼분석계(UV-visible Recording Spectrophotometer)의 340nm에서 흡광값을 측정해 전분 함량을 계산하였다. 우선, 단계 I에서 시약 기준액(blank)에는 용액① 200 μ l와 SDW 100 μ l를 처리하고 시료(sample)에는 용액① 200 μ l와 시료용액 100 μ l를 처리하여 15분 동안 55~60 $^{\circ}$ C 진탕기에서 반응시켰다. 3분간 용액을 식힌 후 단계II를 진행시켰다. 시약기준액과 시료에 각각 용액② 1ml과 증류수 1ml을 처리하여 3분간 실온에서 반응시킨 후 340nm에서 흡광값 A_1 을 측정하였다. 단계 III에서는 혼탁용액을 20 μ l씩 처리하여 10~15분간 실온에서 반응시키고 340nm의 파장에서 흡광값 A_2 를 측정하였다. 흡광값이 일정하지 않을 때는 2분 간격으로 최고치 이하로 값이 떨어질 때까지 측정하였다.

생중량당 전분 함량이 *cglgA*의 과발현에 의해서 증가하였는데 4번 계통의 경우 약 20% 증가하였다 (도 7).

실시예 6; 과발현체의 전분 조성과 전분입자 크기

글리코젠 신타제인 *cglgA*가 과발현된 과발현체에서 글리코젠과 유사한 아밀로펙틴의 비율이 증가하는 조성의 변화와 동시에 전분입자 크기변화가 기대되었다. 따라서 대조구 대지레와 과발현체 괴경에서 요오드로 전분입자를 염색한 후 광학현미경하에서 전분조성과 크기를 전분입자의 색깔과 크기를 측정함으로써 조사하였다. 전분 염색은 괴경의 일정한 부위를 동일한 크기로 자르고 괴경 조직의 전분을 KI-I₂ 용액에서 약 1분간 염색하고 증류수로 1시간이상 탈염색한 후에 광학현미경으로 일정한 100배의 배율로 관찰하여 크기를 측정하였다.

대조구나 과발현체 식물 모두에서 전분입자는 거의 대부분이 진한 청색으로 염색되었다. 붉은 갈색을 띠는 아밀로펙틴의 입자를 거의 볼 수 없었으므로, 대조구나 과발현체 괴경의 경우 아밀로스가 주요 저장형임을 알 수 있었다. 대조구의 경우 전분입자의 크기 (장축의 지름, μ m)는 약 7~66 μ m였으나 과발현체의 경우 7~53 μ m 였다. 따라서 입자의 최소크기는 차이가

없었으나 최대크기가 약 20%정도 감소하였다. 동시에 대조구의 경우 전분입자 변이가 매우 커서 크기별로 거의 유사하게 분포하였으나 과발현체의 경우 평균 약 $22\mu\text{m}$ 크기를 갖는 균질한 입자를 갖고 있었다. 그 결과 전분입자의 평균크기도 대조구의 $31\mu\text{m}$ 에 비해서 과발현체에서 20- $24\mu\text{m}$ 로 약 25-35% 감소하였다 (도 8).

발명의 효과

이상의 실시 예를 통하여 명백하게 나타난 바와 같이, 본 발명은 *cglgA* 유전자를 이용하여 높은 광도 조건($900\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)에서 식물체의 광합성 효율을 증가시키는 방법을 제공하는 효과가 있다. 또한, 광합성 효율의 증가가 기내 배양시 괴경 화율이 높고 괴경 무게와 괴경의 크기 또한 상당히 증가시키는 효과 있음을 확인하였다. 동시에 전분 입자크기를 일정하게 감소시킬 수 있음을 확인하였다. 결과적으로 본 발명은 광합성 효율을 증가시켜 괴경의 전분농도 증가와 크기의 변화와 함께 면적당 감자 생산량의 증가가 가능한 우수한 감자 식물체를 제공하여 품종을 개발할 수 있는 방법을 제공함으로써 농업, 전분 가공산업 및 식물종자산업의 발전에도 유용할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cglgA*)가 식물체에서 발현되도록 재조합된 식물체 전이용 벡터의 모식도이며,

도 2는 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cglgA*)를 발현하는 형질전환 식물체가 재생과 괴경을 형성하는 모습으로, (A)는 잎의 캘러스로부터의 형질전환 식물체의 재생, (B)는 소괴경 유도 후 약 9일 후에 기내소괴경의 형성, (C)는 괴경 유도 후 한달 후의 대조구 대지레 감자의 소괴경, (D)는 괴경 유도 후 한달 후의 형질전환 감자의 소괴경 모습이다.

도 3은 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cglgA*)가 형질전환 식물체들에서 괴경 형성 기간 동안 감자의 잎 및 괴경에서 발현됨을 보여주는 노던 분석결과이고,

도 4은 대조구 대지레 감자와 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cglgA*)를 발현하는 형질전환 식물체 잎의 암 호흡율과 광합성에 의한 산소 발생율의 비교이며,

도 5은 대조구 대지레 감자와 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cglgA*)를 발현하는 형질전환 식물체들의 기내 소괴경의 크기 및 무게를 비교하며,

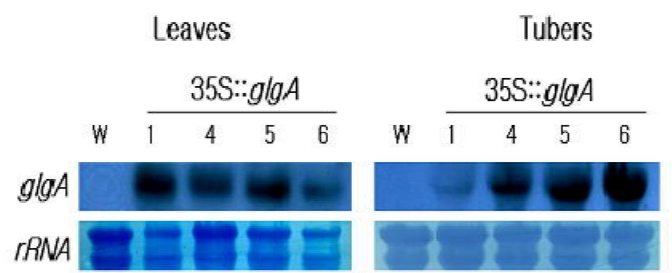
도 6는 대조구 대지레 감자와 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cglgA*)를 발현하는 형질전환 식물체들의 시험관내 괴경화율을 나타내고,

도 7는 대조구 대지레 감자와 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cglgA*)를 발현하는 형질전환 식물체 괴경의 생체량당 전분 함량 모식도이고,

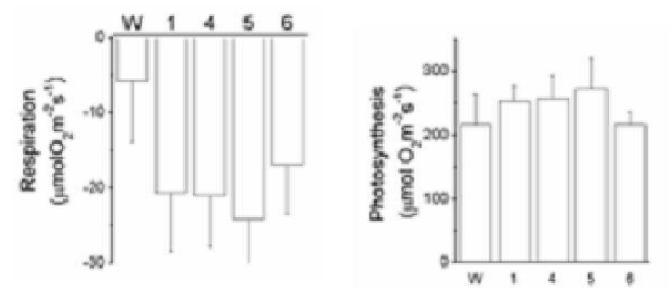
도 8은 대조구 대지레 감자와 시네코시스티스 PCC 6803 전분 합성 유전자(*cglgA*)를 발현하는 형질전환 식물체들의 기내 소괴경의 전분입자를 비교한 것으로서 WT은 대조구 대지레, OE1, 4, 및 5는 각각 형질전환 식물체를 의미한다.

도면

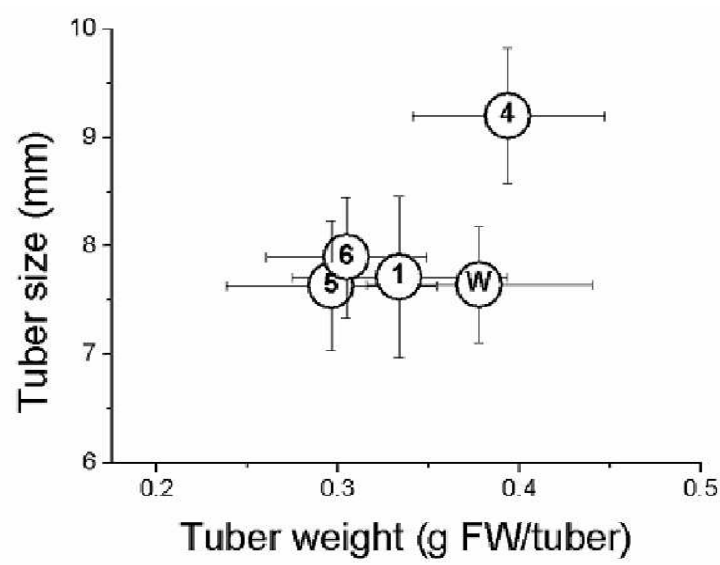
도면3



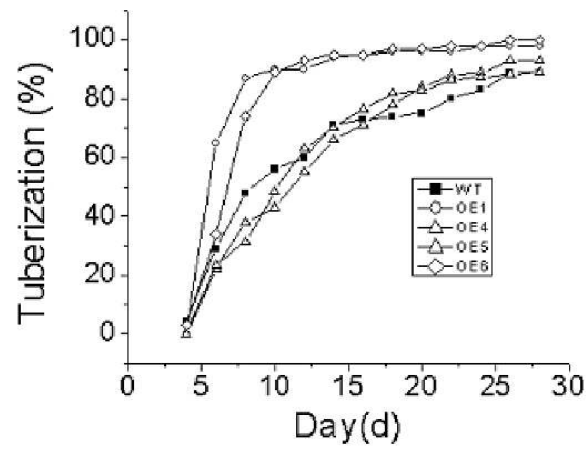
도면4



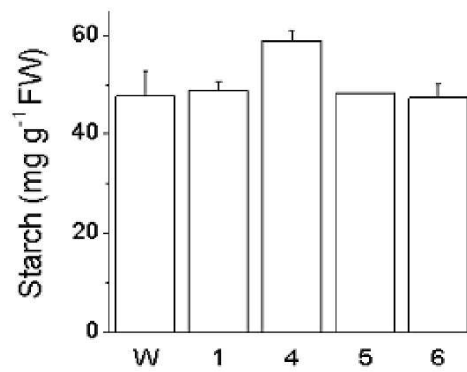
도면5



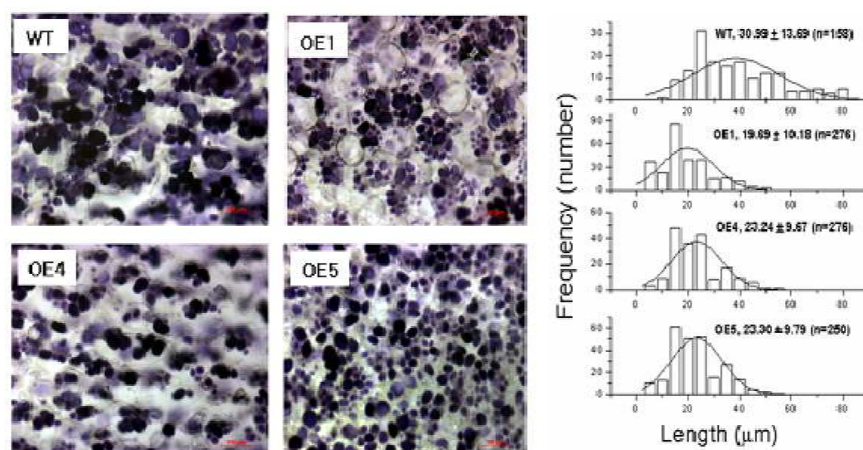
도면6



도면7



도면8



서열목록

<110> Chungnam National University University-Industry Collaboration Foundation

<120> Manipulation of photosynthesis and starch content of higher

plants by a cyanobacterial glycogen synthase

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1476

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 1

atgtacatcg ttcaaattgc ctcagaatgc gccccgtca ttaaggctgg gggattgggg	60
gatgttattt acggcctaag ccgtgaattg gaactgcggg gccattgcgt cgagctaatac	120
ctacccatgt acgattgcat gcgctatgac cacatctggg gtttacacga tgcttaccgc	180
aacctagagg tgccctggta tggaagctca atcttctgtg atgttttttg tggctggggt	240
cacggtaggc tctgcttctt cattcagccc aaatcttctg ataacttttt caatcgggggt	300
cattattatg gcgctctaga cgaccatatg cgctttgcct ttttctcaa ggcggccatg	360
gagtttttgc tacgcagtaa caaacgcccc gacattatcc actgccacga ttggcaaacg	420
ggactggtgc cggtgttggt gtatgaaatt taccgtttcc atggcatgga ccatcaacgg	480
gtttgttaca ccatccacaa tttcaaacac caggggtattg ctggagccaa tattctccac	540
gccactgggc tcaataatga cagttattat ttcagctacg atcgcttgca ggataatttc	600
aatcccaatg cgattaactt catgaagggg ggcattgtct actccaacta tgtcaacacc	660
gtttcccccc accatgcttg ggaagccgt ttttccgata tttcctgtgg cttgggccat	720
accctggaaa tccatcagca aaaattcggc ggtattttga acggtttgga ttacgaagtg	780
tggaaccag aaattgatcc tttactggcg agtaacttca gtgtcaaac ctttggcgat	840
aaggcaaaaa ataagcaagc gttacgggaa agattactgt tagaaacgga tgataaaaaa	900
cccatgctct gctttatttg ccgcttgat ggacaaaaag gtgtgcactt ggtgcatcac	960
tccatctact acgccctcag ccaggagagc caatttgtcc tgctcggctc cgccaccgaa	1020
cccaatctga gcaaattggt ctggcatgaa aaacaacatc tcaacgataa ccccaatgtc	1080
catctagagt tgggctttga cgaggagctg gccacttaa tttacggagc ggcgacatt	1140
attgtggtgc ccagtaacta cgaaccctgt ggtttgacct aaatgattgg tctgcgttat	1200

ggggccgttc cggtggtgcg gggagtaggc ggtttggttaa atactgtttt cgaccgggat 1260
 tatgaccaga accatcccc ggagaaacgt aatggttttg ttttctatca accggatgag 1320
 tatgccctgg aaacggccct cagtcgggcg atcgcttgt ataaggatga tcccgtaggct 1380
 tttaaaacct tggccttgca gggcatggcc tacgactact cttggaataa accagggctc 1440
 caatatgtgg aagcctacga atacatccgg gcttaa 1476

<210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Synechocystis PCC6803

<400> 2
 ggcggatcca tgtacatcgt tcaaattgcc 30

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Synechocystis PCC6803

<400> 3
 acggagctct taagcccgga tgtattc 27

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Synechocystis PCC6803

<400> 4
 atgtacatcg ttcaaattgc c 21

<210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Synechocystis PCC6803

<400> 5
 ttgtggatgg tgtaacaaac c 21