(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0039908
(43) 공개일자 2011년04월20일

(51) Int. Cl.
C12N 15/53 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0096951
(22) 출원일자 2009년10월12일
심사청구일자 2009년10월12일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
이호정
서울특별시 강동구 상일동 고덕주공5단지아파트 511동 503호
홍석환
광주광역시 북구 용봉동 전남대학교 농업생명과학대학
오지은
서울특별시 서초구 서초1동 1603-53 우성빌리지 5호
(74) 대리인
손민

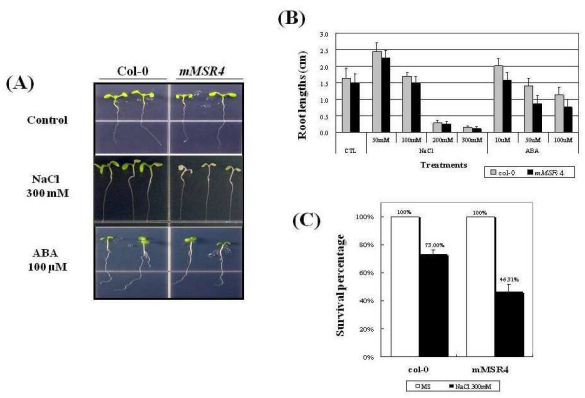
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 식물의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대하여 저항성을 증진시키는 방법

(57) 요 약

본 발명은 스트레스 환경에 대하여 식물의 저항성을 증진시키는 방법에 관한 것으로서, 바람직하게는 MSR 4 유전자와 HSP 70 유전자를 함께 식물에 형질전환하여 식물에서의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대하여 저항성을 증진시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 스트레스 환경에 대하여 저항성을 증진시키는 물질을 스크리닝하는 방법으로서, 보다 바람직하게는 HSP 70 이 포함된 식물세포 또는 식물 엽록체에 후보 물질을 처리하는 단계, 및 상기 단계에 환경 스트레스를 가하여 HSP 70의 발현 정도를 측정하는 단계에 의한 식물의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스 저항성을 증진시키는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20090078046
부처명 한국과학재단
연구관리전문기관
연구사업명 원자력연구개발사업
연구과제명 방사선 조사에 따른 식물스트레스 유전자 발현조절 연구
기여율
주관기관 고려대학교
연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

MSR 4(Methionine sulfoxide reductase 4)유전자와 HSP 70(heat shock protein 70) 유전자를 함께 식물에 형질전환하여 식물에서의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대하여 저항성을 증진시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생물적 스트레스는 바이러스성, 세균성 또는 진균성 병원균에 의한 스트레스인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 비생물적 환경 스트레스는 앱시스 산, 에틸렌, 고농도의 염 또는 산화적 스트레스인 방법.

청구항 4

(a) HSP 70이 포함된 식물세포 또는 식물 엽록체에 후보물질을 처리하는 단계, 및

(b) 상기 후보물질의 존재 및 부재하에 환경 스트레스를 가하여 HSP 70의 발현 정도를 측정하는 단계를 포함하는, 식물의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스 저항성을 증진시키는 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 생물적 스트레스는 바이러스성, 세균성 또는 진균성 병원균에 의한 스트레스인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 비생물적 환경 스트레스는 앱시스 산, 에틸렌, 고농도의 염 또는 산화적 스트레스인 방법.

청구항 7

제3항에 있어서, 상기 HSP 70의 발현 정도의 측정은 2DE(Two-dimensional gel electrophoresis) 또는 웨스턴 블롯 분석인 방법.

청구항 8

서열번호 1의 아미노산 서열 중 141번째 히스티딘(His)이 아르기닌(Arg)으로 치환되거나, 181번째 쓰레오닌(Thr)이 알라닌(Ala)으로 치환되거나, 또는 상기 두 아미노산 잔기가 모두 치환되며, 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대한 민감도를 증진시키는 MSR 변이체 단백질.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 스트레스 환경에 대하여 식물의 저항성을 증진시키는 방법에 관한 것으로서, 바람직하게는 MSR 4 유전자와 HSP 70 유전자를 함께 식물에 형질전환하여 식물에서의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대하여

저항성을 증진시키는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 스트레스 환경에 대하여 저항성을 증진시키는 물질을 스크리닝하는 방법으로서, 보다 바람직하게는 HSP 70 이 포함된 식물세포 또는 식물 엽록체에 후보 물질을 처리하는 단계, 및 상기 단계에 환경 스트레스를 가하여 HSP 70의 발현 정도를 측정하는 단계에 의한 식물의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스 저항성을 증진시키는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 메티오닌(methionine, Met)과 시스테인(cystein)은 두 개의 황(sulfur)을 포함하는 아미노산으로, 산화효소(oxidase), 오존(O_3), 과산화수소(H_2O_2), 방사선, 금속 활성에 의한 산성화 등 생리적, 비생리적 다양성에 의해 쉽게 황(S-)기가 산화되어 단백질의 생물학적 기능을 변화시킨다(Levine R.L. et al., P.N.A.S., 1996, 93(26):15036-15040). 시스테인은 효소의 활성화와 두 개의 황화결합(sulfidebond)에 의한 단백질의 구조에 관여하는 것으로 알려져 있고, 메티오닌은 가장 산화되기 쉬운 아미노산이며, 최근 그 잔기가 항산화 방어 기작의 맨 마지막 단계를 조절하는 중요한 기능을 함이 보고된 바 있다. 메티오닌 설파이드 그룹의 산화는 알-형태(R-form)와 에스-형태(S-form)의 두 가지 형태로 나타나며, 두 개의 다른 단백질인 메티오닌 설폭사이드 리덕타아제(methionine sulfoxide reductase, MSR) A 와 B에 의해 메티오닌으로 환원된다. 이와 같은 역할을 하는 MSR A와 B 단백질은 각기 다른 조직과 다른 세포 내 소기관에서 여러 가지 차별화된 기능을 수행함이 연구되고 있다(Kim HY and Gladyshev VN, Biochemistry, 2005, 44(22):8059-8067; Kim HY and Gladyshev VN, Mol. Biol. Cell, 2004, 15(3):1055-1064). 이와 함께 메티오닌 잔기의 산화된 형태, Met-O의 환원에 필요한 효소인 MSR 효소가 밝혀지기 시작했고(Brot N. and Weissbach H., Arch Biochem Biophys., 1983, 223(1):271-281), 미생물을 포함하는 모든 생물에 존재하는 진화적 관점에서 매우 중요한 효소임이 증명되고 있다(Kryukov G.V. et al., P.N.A.S., 2002,99(7):4245-4250). 또한, MSR A와 MSR B 유전자가 돌연변이(mutation) 또는 과발현된 효모(yeast)를 통해 이들 효소가 세포 내 산화적 스트레스를 방어하는 기능을 수행함이 알려져 있고(Rodrigo M.J. et al., Mol.Genet. Genomics, 2002, 267(5):613-621), 마우스의 MSR A 돌연변이체가 대조군에 비하여 산화적 스트레스 조건에서 수명이 40% 까지 단축되었음이 보고되었다(Moskovitz J. et al., P.N.A.S., 2001, 98(23):12920-12925). 상기와 같은 연구에 의해 MSR 효소가 세포 내 활성산소종(reactiveoxygen species, ROS)에 의한 단백질의 기능을 유지시키는 중요한 기능을 담당하여 생물체의 수명을 조절하는 인자임이 증명되고 있다.

[0003] 한편, 최근 메티오닌의 산성화가 뇌 단백질에 영향을 주어 파킨슨씨병(α-synuclein), 알츠하이머(α-amyloid peptide), 그리고 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jacob disease) 등 신경성 퇴행성 뇌질환을 유발함이 보고되었다(Uversky V.N. et al., FEBS Lett., 2002,517(1-3):239-244); Schoneich C., Arch. Biochem. Biophys., 2002, 397(2):370-376;Hill A.F. et al., Brain, 2003, 126(Pt6):1333-1346). 현재까지의 연구 결과는 산화된 Met-O를 메티오닌으로 환원시키는 MSR A와 B 효소는 세포 내의 항산화 기능뿐만 아니라 단백질들의 활성이나 분해 등에 직접적으로 관여하는 생물체의 생명현상을 유지하는데 아주 중요한 역할을 함을 입증하였다.

[0004]

[0005] 또한, 식물의 경우 애기장대의 전체 게놈 염기서열의 완성으로 다른 생물체에 비해 많은 수의 MSR A와 B의 유전자를 가지고 있음이 밝혀졌다. MSR A는 5개의 유전자가, 및 MSR B는 9개의 유전자가 게놈에 존재하고(Vieira Dos Santos C. et al., Plant Physiol., 2005, 138(2):909-922), 각 유전자의 조직 특이적 발현이나 세포 내 위치가 아직까지 모두 입증되지는 않았지만 MSR A의 경우, 엽록체로 위치하는 단백질이 빛의 산화적 스트레스에 관여하고 있음이 보고되었고(Romero H.M. et al., Plant Physiol., 2004, 136(3):3784-3794; Bechtold U. et al., Plant Cell, 2004, 16(4):908-919), MSR B도 9개의 유전자 중 엽록체로 위치하는 두 개의 단백질이 수분과 광산화에 의한 비생물적 스트레스와 곰팡이에 의한 생물적 스트레스에 의해 효소 활성 반응이 증가됨이 최근 발표되었다(Vieira Dos Santos C. etal., Plant Physiol., 2005, 138(2):909-922). 이처럼 식물의 MSR에 관한 연구는 아직 초기 단계이며 주로 엽록체에 위치하는 효소의 기능만이 연구되고 있을 뿐이며, 식물의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법 및 이를 위한 물질과 관련하여, 특히 HSP(heat shock protein)와 MSR과의 관계를 통한 상기 물질의 선별에 관해서는 전무한 상태이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 본 발명의 MSR 유전자를 식물에 형질전환시킬 경우, 고염 및 산화적 스트레스에 대한 민감성 증가 및 MSR 4 유전자와 HSP 70 유전자를 함께 식물에 형질전환하여 식물에서의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대한 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하고, 이를 이용할 경우 식물의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대하여 저항성을 증진시킬 수 있을 것이라는 사실에 착안하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은, MSR 4 유전자와 HSP 70 유전자를 함께 식물에 형질전환하여 식물에서의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스 저항성을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은, HSP 70이 포함된 식물세포 또는 식물 엽록체에 후보물질을 처리하는 단계, 및 상기 단계에 환경 스트레스를 가하여 HSP 70의 발현 정도를 측정함으로써, 식물의 환경 스트레스 저항성을 증진시키는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

과제 해결수단

[0009] 하나의 양태로서 본 발명은, MSR 4(methionine sulfoxide reductase 4) 유전자와 HSP 70(heat shock protein 70) 유전자를 함께 식물에 형질전환하여 식물에서의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대하여 저항성을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

[0010] 본 발명에서의 용어 "MSR(methionine sulfoxide reductase)"이란, 단백질의메티오닌 잔기가 메티오닌 설폭사이드(methionine sulfoxide)로 산화되었을 경우, 이것을 메티오닌(Methionine)으로 환원시키는 역할을 하는 단백질을 말하며, 바람직하게는 Genbank Accession No. NP_194243.1(서열번호 1)의 서열정보를 가지는 단백질을 말한다. 본 발명에서는 MSR 4 유전자를 식물에 형질전환시킴으로서 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법을 이용한다면, 상기와 같은 스트레스에 대하여 식물의 저항성을 증진시키는 물질을 선별할 수 있다.

[0011] 본 발명에서는 MSR 4 유전자가 식물 환경 스트레스에 대해 갖는 기능을 확인하기 위하여, MSR 4의 돌연변이 복제물을 이용한 실험을 수행하였다. 이와 관련하여 사용된 본 발명에서의 용어, 'mMSR 4(methionine sulfoxide)4'란, 산화된 메티오닌을 환원시키는 역할을 하는 MSR 펩타이드의 일종인 MSR 4의 돌연변이 복사체를 의미하며, 바람직하게는 His^{141}이 Arg로, Thr^{181}이 Ala으로 대체된 돌연변이 MSR 4를 말한다. 본 발명에서의 실시예에 따르면, 상기 mMSR 4로 형질전환된 애기장대는 고염이라는 비생물적 환경 스트레스 하에서 식물의 뿌리 길이 및 생존율이 저하됨을 보였으며, 활성 산소종 즉, ROS(Reactive Oxigen Species) 염색이 강하게 되었음을 확인하였고, 이로부터 mMSR 4로 형질전환된 애기장대가 활성 산소 소거 효과가 떨어짐을 알 수 있었다(실시예 6).

[0012] 또한, 본 발명에서의 용어, 'HSP(heat shock protein)'란, 일명 열충격단백질이라고도 불리우며, 열, 저산소증 또는 방사능 등과 같은 스트레스 환경에서 작용하며 세포를 보호하는 역할을 하는 세포 구성 단백질로 알려져 있다.

[0013] 본 발명에서 적용할 수 있는 식물의 스트레스 환경에는 바이러스성, 세균성 또는 진균성 병원균을 포함하는 생물적 스트레스 및 고온, 건조, 저온, 과산화수소 및 고농도의 염을 포함하는 비생물적 환경 스트레스가 있으며, 바람직한 비생물적 스트레스에는 고농도의 염을 들 수 있다.

[0014] 한편, 본 발명에서 사용된 식물인 '애기장대(*Arabidopsis thaliana*)'는 개화식물로서 십자화과(Brassicaceae)

에 속하며 농업적인 중요성은 가지고 있지 않으나, 현대 식물학에 있어 모델 식물로 널리 사용되고 있으며 유전학과 분자생물학적 연구에 매우 중요한 식물로 널리 연구되고 있다.

[0015] 본 발명에서는 MSR 4의 타켓이 HSP 70이라는 것을 최초로 규명하였으므로, 생물적 및 비생물적 환경 스트레스에 대하여 식물의 저항성을 증진시키는 방법 및 상기와 같은 환경에서 식물의 저항성을 증진시킬 수 있는 물질을 선별하는 방법에 있어서, MSR 4와 열충격단백질인 HSP 70을 함께 형질전환 시킨 애기장대를 사용할 수 있다.

[0016] 구체적으로, 본 발명자들은 다양한 실험예를 통하여, MSR 4의 아미노산 서열 중 His^{141} 이 Arg로, Thr^{181} 이 Ala로 치환된 돌연변이 복제물인 mMSR 4로 형질전환 시킨 애기장대에서 비생물적 환경 스트레스인 고염에 노출시켰을 때, 정상 대조군에 비하여 뿌리 길이 및 생존율의 저하를 나타냄을 확인하였으며(도 1), 정상 대조군에 비하여 산화적 스트레스 대한 민감도가 높음을 확인함으로써(도 2), MSR 4가 식물의 스트레스 저항성을 증진시키는 물질임을 확인하였다. 한편, 식물 호르몬 중, 스트레스 호르몬이라고 불릴 정도로 각종 스트레스 예를 들면, 식물이 냉해(low temperature stress), 한해(water stress), 염해(salt stress)등의 스트레스를 받으면 그 함량이 증가하는 앱시스 산(abscisic acid, ABA)을 mMSR 4로 형질전환 된 식물에 투여할 경우 어떠한 영향을 미치는지 확인해 본 결과, 앱시스 산(abscisic acid, ABA)의 처리에도 불구하고 돌연변이 된 mMSR 4로 형질전환 된 애기장대에서 뿌리 길이가 정상 대조군에 비하여 저하됨을 나타낸 것으로 보아 스트레스 환경과 관련하여 MSR 4의 역할이 매우 중요함을 확인할 수 있었다. 나아가, MSR 4의 표적 단백질을 확인하기 위하여 proteomic analysis를 수행한 결과, 고염 상태에서 정상 대조군에 비하여 mMSR 4로 형질전환 시킨 애기장대에서 HSP 70의 발현량이 현저히 낮음을 확인함으로써, HSP 70이 MSR 4의 표적 단백질임을 최초로 규명하였다(도 4).

[0017] 따라서, 본 발명은 MSR 4 및 HSP 70을 함께 애기장대에 형질전환시켜 HSP 70의 발현량을 증가시킴으로써, 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대한 저항성을 증진시킬 수 있으며, 또한 HSP 70이 포함된 식물체에 임의의 후보 물질을 처리한 다음 HSP 70의 발현량의 증감을 확인함으로써 상기 물질이 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 저항성을 증진 또는 감소시킬 수 있는지 여부를 판단할 수 있다.

[0018] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 식물의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대하여 저항성을 증진시키는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 바람직하게 HSP 70 이 포함된 식물세포 또는 식물 엽록체에 후보물질을 처리하는 단계, 및 상기 단계에 환경 스트레스를 가하여 HSP 70의 발현 정도를 측정하는 단계를 포함하는, 식물의 환경 스트레스 저항성을 증진시키는 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

[0019] 한편, 본 발명은 HSP 70이 포함된 식물세포 또는 엽록체에 후보 물질을 투여하여 HSP 70의 발현량 증감을 확인함으로써, 해당 후보 물질을 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대한 저항성 증진용 물질로 판정할 수 있고, 이를 통하여 상기와 같은 스트레스 환경에 대한 저항성 증진용 물질을 스크리닝할 수 있다.

[0020] 본 발명에서의 용어, '후보 물질' 이란, 생물적 및 비생물적 환경 스트레스에 대하여 저항성을 증진시킬 수 있을 것으로 예상되는 모든 물질을 의미하며, MSR 4의 표적 단백질인 HSP 70의 발현량을 직접 또는 간접적으로 변화시킴으로써, 상기 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대하여 저항성을 증진시킬 수 있는 능력을 측정하는 대상을 말한다. 예컨대 단백질, 올리고펩티드, 소형 유기 분자, 다당류, 폴리뉴클레오타이드 및 광범위한 화합물 등의 임의 분자를 포함한다. 이러한 후보 물질은 또한 천연 물질뿐 아니라 합성 물질을 모두 포함한다.

[0021] 바람직한 일 양태로서, 본 발명은 HSP 70이 포함된 식물체의 식물세포 또는 엽록체에 상기에서 언급한 후보 물질의 예를 식물체에 투여하여 HSP 70의 발현량의 변화를 측정하되, HSP 70의 발현량이 감소하면 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 저항성이 없는 물질로 판정할 수 있으며, 반대로 HSP 70의 발현량이 증가하면 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 저항성을 증진시킬 수 있는 물질로 판정할 수 있다.

[0022] 본 발명에서, HSP 70의 발현량의 확인은 'mRNA 발현수준 확인' 및 '단백질 발현 수준 확인'을 들 수 있으며, 본 발명에서의 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대한 식물의 저항성 증진용 물질을 선별하기 위하여 식물체

에서 HSP 70의 mRNA 발현 정도를 확인하는 과정은 mRNA의 양을 측정하는 것이다. 이를 위한 분석 방법으로는 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯(Northern blotting), DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에서 '단백질 발현수준 확인'이란, 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대하여 식물의 저항성을 증진용 조성물을 선별하기 위하여 HSP 70으로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 바람직하게는, 상기 유전자의 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 또한, 상기 단백질의 발현 확인은 HSP 70 단백질에 대한 특이적 항체를 이용하여 면역 측정법에 의해 단백질의 양을 확인할 수 있으며, 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블롯, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역 분석법 (radioimmunoassay, RIA), 방사선 면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 (rocket) 면역 전기 영동, 조직 면역 염색, 면역 침전 분석법 (immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법 (complement fixation assay), FACS 및 단백질 칩 (protein chip)등이 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한 단백질의 양을 확인하는 방법으로서 항체를 이용하는 경우에는, 표적 단백질에 특이적이고 검출 가능한 표지에 연결된 제2항체를 첨가할 수 있으며, 검출은 또한 제2항체를 첨가한 후, 제2항체에 대한 결합 친화도를 가지며, 검출 가능한 표지에 연결된 제3항체를 첨가할 수도 있다. 제2항체 또는 제3항체에 검출될 수 있는 표지는 적절한 발색성 기질과 배양시 발색을 나타내는 효소가 사용될 수 있다. 검출 가능한 부분은 분광학적, 효소적, 광화학적, 생화학적, 생체전자공학적, 면역화학적, 전기적, 광학적 또는 화학적 수단으로 검출가능한 조성물을 포함할 수 있으며, 예를 들면, 형광 마커 및 염료, 자성 표지, 연결된 효소, 질량 분광 태그, 스핀 표지, 전자 전달 공여자 및 수용자 등이 있으나 상기 예들에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 이처럼 바람직하게 본 발명의 HSP 70의 발현량 확인 방법은 당업계에서 사용되는 통상의 발현 확인 방법을 제한없이 사용할 수 있다. 또한 발현량의 확인은 당업자의 선택 또는 필요에 따라 mRNA 수준 또는 이들에 의해 코딩되는 단백질 수준으로부터 측정될 수 있으며, 그 예로 mRNA의 경우 해당 서열에 상보적인 프라이머 또는 프로브 서열을 통해 확인할 수 있고, 단백질의 경우, 단백질 또는 이의 단편에 결합하는 항체를 사용함으로써 확인할 수 있다. 바람직하게 본 발명은 단백질 수준에서 상기 발현 양상을 확인하기 위해서는 2DE(Two-dimensional gel electrophoresis) 및 웨스턴 블롯을 사용할 수 있다. 또한, 식물체에 후보 물질의 투여 후 HSP 70 발현량의 증가를 확인함으로써 상기 후보 물질을 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스 증가용 조성물을 스크리닝할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명에서 상기 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물일 수 있으며, 상기 쌍자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추,감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 샐러리 및 유채일 수 있고, 상기 단자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 벼,보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파일 수 있다.

[0025]

[0026] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열 중 141번째 히스티딘(His)이 아르기닌(Arg)으로 치환되거나, 181번째 쓰레오닌(Thr)이 알라닌(Ala)으로 치환되거나, 또는 상기 두 아미노산 잔기가 모두 치환되며, 생물적 또는 비생물적 환경 스트레스에 대한 민감도를 증진시키는 MSR 변이체 단백질에 관한 것이다.

[0027] 본 발명의 실시예에서는 돌연변이 된 His^{141}과 Thr^{181}이 MSR 효소 활성에 주요한 역할을 함을 밝혔으므로, 이와 같은 MSR 돌연변이 단백질은 MSR 기능 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

효 과

[0028] 본 발명에 의한 형질전환된 식물체는 염에 대한 산화적 스트레스에 대하여 저항성이 높은 형질전환 식물체를 이용할 경우, 생물적 또는 비생물적 스트레스에 대하여 저항성을 증진시킬 수 있는 조성물을 생산할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0029] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0030] **실시예 1. 식물 재료 및 성장/스트레스 처리 조건**

[0031] 유전자 도입 및 애기장대 생태형 중에서 Col-0을 사용하여 실험을 진행하였다. 식물을 2 % 수크로스가 첨가된 0.6 % 아가 MS (Murashige and Skoog) 배지에 접종하였다. 종자는 4 ℃에서 3일간 처리하고 종자를 발아시켜 스트레스 처리 전 70 % 습도에서 23 ± 1 ℃, 16 시간 광주기와 8 시간 암주기에서 생육하였다.

[0032] **실시예 2. 애기장대의 유전자 증폭 및 형질전환**

[0033] 특정 점 돌연변이를 포함하는 애기장대 MSR 4를 코딩하는 전장 cDNA를 PCR로 증폭하여 pBI121로 클로닝하였으며, CaMV(cauliflower mosaic virus) 35S 프로모터로 발현을 유도하였다. 형질전환 식물을 얻기 위해, 애기장대(Agrobacterium)-매개 형질 전환체를 Lee et al.에 따른 방법으로 수행하였으며, 모든 실험에서 동종접합 형질전환 T_4 식물체(Homozygous T_4 transgenic plant)를 사용하였다.

[0034] **실시예 3. ABA 또는 고염도(High Salt)에 대한 반응**

[0035] mMSR 4 line과 야생형인 애기장대에서의 고염에 대한 환경 스트레스에 대하여 어떠한 변화를 보이는지 확인하기 위하여, MSR 활성을 Moskovitz et al.에 개시된 바대로 측정하였다. 반응 혼합액(100 ℓ)은 20 mM Tris-Cl (pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, 30 mM KCl, 20 mM DTT(dithiothreitol), 1 mM dabsylated L-methionine-R, S-sulfoxide 및 MSR을 포함한다. 반응은 1, 3 또는 5 h 동안 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 그 다음 100 ℓ 아세토니트릴(acetonitrile)을 첨가하여 반응을 멈추게 하고, 샘플을 원심분리하여 상층액 20 ℓ을 pre-column Supelguard LC-18 (Supelco Inc.)을 포함하는 Supelcosil LC-18T (Supelco Inc.) column에 주입하였다. 상기 컬럼을 0.5 mℓ/ℓ 트리에틸아민(triethylamine) 및 30 % 아세토니트릴을 포함한 0.14 M 소듐 아세테이트 완충액(sodium acetate buffer, pH 6.1)로 사전-평형을 유지시켰다. linear acetonitrile gradient (from 30 to 70 %)를 컬럼에 적용하고 dabsylated 산물은 1 ml/min 유속으로 436 nm 흡광도에서 Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies)로 분석하였다.

[0036] **실시예 4. MSR(Methionine sulfoxide reductase) 효소 활성 분석**

[0037] MSR(Methionine sulfoxide reductase) 활성을 Moskovitz et al.에 개시된 바에 따라 측정하였다. 반응 혼합액(100 ℓ)은 20 mM Tris-Cl (pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, 30 mM KCl, 20 mM DTT (dithiothreitol), 1 mM dabsylated L-methionine-R, S-sulfoxide 및 MSR을 포함한다. 반응은 1, 3 또는 5 시간 동안 37 ℃에서 인큐베이션하였다. 그 다음 100 ℓ의 아세토나이트릴(acetonitrile)을 첨가하여 반응을 정지시키고, 샘플을 원심분리하여 상층액 20 ℓ을 pre-column Supelguard LC-18 (Supelco Inc.)을 포함하는 Supelcosil LC-18T (Supelco Inc.) column에 주입하였다. 상기 컬럼을 0.5 mℓ/ℓ 트리에틸아민(triethylamine) 및 30 % 아세토나이트릴을 포함한 0.14 M 아세트산 나트륨 완충액 (pH 6.1)로 사전-평형을 유지시켰다. 아세토나이트릴의 선형 구배(linear acetonitrile gradient) (30 내지 70 %)를 컬럼에 적용하고 dabsylated 산물은 1 mℓ/min 유속으로 436 nm 흡광도에서 Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies)로 분석하였다.

[0038] **실시예 5. 노던 블롯 분석(Northern blot analysis)**

[0039] 애기장대 야생형 Col-0 식물은 3주 동안 빛이 있는 성장 챔버에서 2 % 수크로스가 첨가된 표준 MS 0.6 % 아가에서 키웠다. 접종한 다음 만니톨(mannitol), ABA (100 mM) 또는 NaCl (300 mM)을 처리하였다. 공지된 바대로 전체 seedlings (0.3 g)으로부터 전체 RNA를 추출하였다. 전체 RNA (20 ㎍)를 각 레인에 첨가하고 38 % 포름알데

하이드를 포함한 1.5 % (w/v) 아가로즈 겔에서 전기영동으로 분리하였다. RNA를 Hybond™-XL membrane (Amersham Biosciences, NY)으로 옮기고, 10x SSC, 50x Denhardt`s solution, 20 % (w/v) SDS 및 10 mg/mℓ 분해 연어 정자 DNA(salmon sperm DNA)를 포함한 완충액에서 1시간 동안 42 ℃에서 사전-혼성화하였다. ^{32}P-random-primed probe를 18시간 동안 42 ℃에서 맴브레인으로 분리하여 혼성화하였다. 30분 동안 45 ℃, 1X SSC, 0.1 % SDS에서 블롯을 두 차례 세척하였고, 그 다음 30분 동안 45 ℃, 0.1x SSC, 0.1 % SDS에서 재세척하였다. 혼성화를 시각화하기 위해, 맴브레인을 X-ray 필름에 노출시켜서 현상하였다. 프로브로는 *Cor15a* 및 *KIN1* cDNAs를 사용하였다.

[0040] **실시예 6. ROS (H_2O_2) staining**

[0041] 7일 가량 된 묘목에서 H_2O_2 검출을 약간 변형된 Thordal-Christensen et al.에 따른 방법으로 수행하였다. 묘목을 50 mM PBT 완충액 (potassium phosphate)으로 수차례 세척하고 0.3 mg DAB (3,3-diamionbenzidine)를 포함한 1 mℓ PBT에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 색깔 반응을 위해, 1 ℓ, 30 % H_2O_2 를 각 튜브에 첨가 한 후, 각 묘목을 5분 동안 PBT로 두 차례 세척하였으며, 샘플은 100 % 메탄올로 탈수하였다.

[0042] **실시예 7. 2DE(Two-dimensional gel electrophoresis) 및 웨스턴 블롯 분석**

[0043] 실시예 7-1. 단백질 샘플 준비

[0044] 배양된 박테리아 세포 팰렛을 냉-PBS로 두 차례 세척하고 Sonoplus (Bandelin Electronic, Germany)를 사용하여 10초 동안 초음파 분리하였다. 식물 조직을 7 M 요소(urea), 2 M 싸이오요소(thiourea), 4% (w/v) CHAPS (3-([3-cholamidopropy]dimethyammonio)-1-propanesulfonate), 1% (w/v) DTT (dithiothreitol), 2 % (v/v) pharmalyte 및 1 mM 벤지아미딘(benzamidine)을 포함하는 샘플 용해 용액에서 균질화하였다(PowerGen125, Fisher Scientific). 단백질을 vortexing하여 실온에서 1시간 동안 추출하였다. 15 ℃에서 1시간 동안 15,000 *g* 로 원심분리한 후에 불용성 시료는 제거하고 용해 분획은 2DE를 위해 사용하였다. 단백질 함량 분석은 브래드포드 분석법(Bradford et al., 1976)으로 정량하였다.

[0045] 실시예 7-2. 2DE

[0046] PG dry strips은 7 M 요소(urea), 2 M 싸이오요소(thiourea), 2 % CHAPS, 1 % DTT 및 1 % pharmalyte로 12 내지 16시간 동안 평형시켰다. 샘플(200 μg)중 IEF(Isoelectric focusing)은 제조사의 지침에 따라 Multiphor II electrophoresis unit 및 EPS 3500 XL power supply (Amersham Biosciences)으로 20 ℃에서 수행하였다. IEF를 위해, 샘플 주입 동안 전압을 3시간 이상 150부터 3,500 V까지 증가시켰고, 96 kVh에 도달할 때까지 지속적으로 3,500 V를 유지시켰다. second dimension separation 전에, 스트립(strip)을 1% DTT를 포함하고, 그 다음 2.5 % 요오드아세트아미드(iodoacetamide)를 포함하는 equilibration buffer (50 mM Tris-Cl (pH6.8), 6 M 요소(urea), 2 % SDS 및 30 % 글리세롤(glycerol))에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. Equilibrated strip을 SDS-PAGE 겔 (20 x 24 cm, 10-16 %)로 주입하고, 분리는 제조사에 지침에 따라 Hoefer DALT 2D system (Amersham Biosciences)로 수행하였다. 겔을 1,700 Vh 동안 20 ℃에서 작동시켰으며, 그 다음 Oakley et al. (1980)에 개시된 바에 따라 실버 스테인(silver staine)하였으나, 고정된 것을 탈락시키고, 글루타르알데히드로 감작시켰다.

[0047] 실시예 7-3. 이미지 분석(Image analysis)

[0048] 디지털화된 이미지의 정량 분석을 제조사의 지침에 따라 PDQuest (version 7.0, BioRad) software로 수행하였다. 각 스팟에 대한 단백질 존재도는 전체 valid spot intensity에 따라 표준화하였다. 대조군 또는 정상 샘플에 비교하였을 때, 발현에 있어서 2-fold deviation 초과의 유의적인 변화를 나타내는 단백질 스팟을 선택하였다.

[0049]

[0050] 실시예 7-4. MALDI-TOF 분석 및 데이타 베이스 조사

[0051] 단백질 스팟의 In-gel enzymatic digestion을 Shevchenko et al. (1996)에 의해 개시된 바에 따라 수행하였다. 단백질 분석을 Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences)으로 수행하였다. 펩타이드를 337 nm에서 N2 laser로 증발시켰다. 수득한 각 스펙트럼은 300 laser shot의 누적 평균을 의미한다. Rockefeller University search program ProFound (http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)는 peptide mass fingerprinting으로 단백질 존재를 확인하는 데 사용하였다. 스펙트라는 internal standard에 따라 trypsin auto-digestion ion peaks *m/z* (842.510, 2211.1046)로 보정하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해, 마우스-항-HSP 단일클론 항체를 Stressgen Bioreagents Corp (Anti-HSP 70/Hsc70; Cat# SPA-820)로부터 구입하였다.

[0052] **실시예 8. Statistical analyses**

[0053] 데이터를 평균± 표준편차 (SE)로 나타내었다. 비교는 그룹간 Students *t*-tests로 하였다.

[0054] **결과**

[0055] **1. mMSR 4 형질전환 식물체는 염 스트레스에 민감하다.**

[0056] 본 발명자는 형질전환 식물인 과발현 mMSR 4 의 내염성을 비교하였다. 전장 MSR 4 cDNA를 CaMV35S 프로모터에 의해 유도된 발현 벡터 pBI121 내로 클로닝하였다. 본 발명자는 RT-PCR을 통해서 MSR 4 유전자의 돌연변이 복제물(mMSR 4)을 얻었다. 돌연변이 유전자 서열은 His^{141} 을 Arg으로, Thr^{181} 을 ALa으로 대체된 결과로부터 두 개의 지점에서 대체가 일어난 것을 알 수 있었다. 본 발명자들은 mMSR 4 cDNA를 과발현시키는 6개의 T_4 세포주를 만들었다. 상기 세포주들이 mMSR 4 transcrip를 고 수준으로 발현시키는지 여부를 측정하기 위해 본 발명자는 14일 가량 된 형질전환 묘목들을 노던 블롯 분석(Northern blot analysis)을 수행하였다. 놀랍게도, 본 발명자는 세 개의 mMSR 4 line들이 MSR 4 transcript (data not shown) 수준이 감소됨을 발견하였다. mMSR 4 line들은 전체 발생 프로그램에서 growth performance에서 어떠한 변화도 확인되지 않았다. 그러나, 정상 성장 조건하에서 Col-0 ecotype (wild-type)의 배경을 비교해볼 때, mMSR 4 식물은 크기 및 높이 면에서 뿐만 아니라 발아 및 뿌리 무게 면에 있어서 현저히 변화가 적었다. 본 발명자는 염 스트레스에 대하여 mMSR 4 line의 표현형(phenotype)들을 조사하였다. 10일 가량 된 묘목을 정상 MS 배지에서 발아시킨 다음, 다른 농도의 NaCl, ABA 또는 만니톨(mannitol)을 포함하는 배지로 옮겼다. 야생형에 비교해본 결과, mMSR 4 line이 염 스트레스에 대하여 민감성이 증가되었음을 보였으며, 생존율 역시 현저히 떨어짐을 확인할 수 있었다(도 1). 그러나 만니톨 처리에 있어서는 mMSR 4 line와 야생형 간에 육안으로 확인 가능한 차이점을 보이지 않았다(도 1).

[0057] **2. 염 스트레스에 대하여, mMSR 4 형질전환 식물체는 야생형에 비하여 ROS 축적량이 많다.**

[0058] mMSR 4 transgenic line은 염에 대하여 민감성이 증가되었으며, 본 발명자는 염 스트레스 동안 MSR 4 전사 수준에서 어떠한 변화를 보이는지 조사하였다. 야생형과 14일 가량 된 묘목에 0, 1, 2, 또는 4 h 동안 300 mM NaCl을 처리한 다음, MSR 4 발현을 노던 블롯 분석을 통해 조사하였다. 야생형 식물과 비교해 볼 때, MSR 4 transcript의 수준은 mMSR 4 transgenic line (도 2A)에서 현저히 감소되었으며, 이는 mMSR 4 cDNA가 염 처리로 인한 스트레스 동안에 endogenous MSR 4 cDNA의 co-suppression에 기인한 것임을 암시한다. 비생물적 스트레스-반응 유전자(abiotic stress-responsive genes)의 역할은 상당수의 식물 시스템에서 잘 알려져 있으며, 본 발명자 역시 mMSR 4 묘목들의 증가된 염에 대한 민감성이 이러한 유전자들의 발현 감소에 기인한 것인지 여부를 확인하기 위해 노던 블롯 분석을 수행하였다. Cor15a 및 KIN1가 내염성에서 주요한 역할을 하는 유전자이기 때문에 본 발명자는 이 유전자들의 발현이 20일 가량 된 야생형과 mMSR 4 묘목에서 염에 대한 스트레스에 대한 것인지 조사하였다(도 2A). MSR 단백질은 산화적 스트레스 반응과 연관이 있으며, mMSR 4 발현이 관련이 있기 때문에 mMSR 4 line에서 억제되며, 이처럼 형질전환 식물체는 감소된 ROS 소거 효과가 감소됨으로서 산화적 스트

레스를 더 겪을수도 있다. 따라서, 본 발명자는 2시간 동안 300 mM NaCl을 처리한 후 14일 가량 된 야생형과 mMSR 4 묘목간에 ROS level을 비교해 보았다. 예상대로, 야생형보다 mMSR 4 lines에서 보다 강한 ROS 염색을 확인하였으며(도 2B), 이는 이러한 식물들이 Cor15a 및 KIN1 와 같은 염 스트레스-반응 유전자(salt stress-responsive genes)를 성공적으로 발현시킴에도 염에 대하여 더 민감해짐을 의미한다.

[0059] **3. mMSR 단백질은 감소된 MSR 효소 활성 및 그의 이소 발현(ectopic expression)으로 인하여 성장이 현저히 저해된다.**

[0060] 다음으로, 본 발명자는 mMSR 4에서 두 개의 아미노산 대체가 어떠한 MSR 활성에서의 결함으로 인한 것인지 여부를 조사하였다. 본 발명자는 dabsylated methionine 및 methionine sulfoxide가 이 효소가 산화된 메티오닌을 감소시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위해 측정함에 있어서, HPLC (high-performance liquid chromatography)를 사용하여 mMSR 활성을 분석하였다.

[0061] 그러나, dabsylated methionine 수준은 배지에 E. coli BL21에서 과발현된 재조합 mMSR 4을 포함하였을 때 크게 감소하였다(도 6). 이와 같은 결과는 돌연변이 된 잔기인 His^{141} 과 Thr^{181} 가 MSR 효소 활성에 주요한 역할을 함을 의미한다. 그러나, co-suppression으로 인하여 야생형보다 더 낮은 수준을 보임에도 불구하고 endogenous MSR 4 유전자로부터 몇몇 활성 MSR 4 단백질은 발현할 수도 있다. MSR 4 유전자의 기능을 확립하기 위하여 본 발명자는 이소 발현(ectopic expression)을 갖는 transgenic plant line를 만들었다. 노던 블롯 분석은 정상 조건에서 MSR 4 transcript의 고 수준을 갖는 transgenic line을 발견하기 위하여 수행하였다(도 3A). 이들 중 MSR 4-ox #2가 가장 높은 발현 수준을 보이며, 뿌리 성장도 가장 많이 증가했음을 나타내었다(도 3B 및 3C)

[0062] **4. 2DE separation을 이용한 Proteomic analysis은 염 스트레스를 받는 동안 mMSR 식물체에서 HSP(heat shock protein)의 수준을 감소시키는 것으로 드러났다.**

[0063] mMSR 4 line이 왜 염 스트레스에 대하여 취약한지 그리고 MSR 4에 대한 가능성 있는 표적 단백질을 확인하기 위하여 본 발명자는 proteomic analysis를 수행하였다. mMSR 4 과 야생형 묘목은 MS medium에서 14일 동안 키운 다음, 염 배지로 옮겨 5시간 동안 방치하였다. 2DE 분석 후에, 본 발명자는 mMSR 4 line에서 발현이 낮게 보이는 단백지 스팟들을 선별한 다음, 그들을 대상으로 MALDI/TOF-MS를 수행하였다. 본 발명자는 적어도 세 개의 생물학적 복제물에 대한 유효 데이터를 보이는 단백질들을 동정하였다.

[0064] 또한, 야생형과 mMSR 4 line에서 발현된 대표적인 단백질의 2DE 분석 결과는 도 4에 나타나 있으며, 패널 A에서 번호가 매겨진 스팟들은 MALDI-TOF analysis (상업적 서비스)로 분석하여 동정하였다. 단백질의 서열 중에서, 엽록체 열 충격 단백질의 감소된 수준을 확인하였다(도 6). 상기 결과를 확인하기 위하여, 본 발명자는 염 스트레스에 따른 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 확인하였으며, mMSR 4 line은 야생형보다 HSP70 단백질의 낮은 존재도를 나타내었음을 확인하였다(도 4B).

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 ABA 또는 고염도(High Salt)에 대한 반응을 나타낸 도이다.

[0066] (a) 특정 스트레스 조건에 대한 표현형 관찰(Phenotypic observations)은 고농도의 스트레스 처리에 대한 것으로 확인되었다. (b) 야생형(wild-type) 및 mMSR4 묘목의 뿌리길이를 측정하였다. 스트레스 처리를 위해 NaCl (50, 100, 200 or 300 mM) 또는 ABA (10, 50 or 100 M)를 MS 배지 (1.2 % 아가)에 첨가하였다. (c) 야생형 및 mMSR4 #19의 생존률 및 사진을 나타내었다. 전체 200개의 묘목들을 대조군 또는 mMSR4 #19로부터 산출하였다. (a), (b) 및 (c)를 위하여, 구근(seed)을 MS 배지 (1.2 % 아가)에서 발아시켰으며, 10일령 묘목을 특정 시료가

처리된 MS 배지로 옮겼다.

[0067] 도 2는 AtMSR4 발현 수준을 나타낸 도이다.

[0068] (a) AtMSR4의 전사 수준을 노던 블롯(Northern blot analysis)으로 조사하였다. 20일 가량 된 Col-0 및 mMSR4 애기장대(Arabidopsis) 묘목은 300 mM NaCl로 처리하였다. 전체 RNA 로딩 컨트롤의 사진을 확인하였다. ^{32}P-표지된 MSR4 cDNA는 혼성화를 위한 프로브로 사용하였다. (b) H_2O_2 확인을 DABS 염색 전 2시간 동안 300 mM NaCl로 처리한 14일 가량 된 Col-0 및 mMSR4 애기장대 묘목에서 수행하였다.

[0069] 도 3은 애기장대에서 MSR4의 이상 발현을 확인한 도이다.

[0070] (A) AtMSR4 전사 수준을 노던 블롯 분석으로 조사하였다. 20일 가량 된 Col-0 및 MSR4 과발현한 애기장대 묘목(라인 2, 3 및 6)이 분석하는 동안 모아진 정상 MS 배지에서 키웠다. 전체 RNA 로딩 컨트롤의 사진을 확인하였다. ^{32}P-표지된 MSR4 cDNA는 혼성화를 위한 프로브로 사용하였다. (C) 구근을 MS 배지 (1.2 % 아가)에서 발아시켜서 5일가량 되는 묘목을 특정 처리를 포함하는 MS 배지에 옮겼으며, 사진 찍기 전에 7일 이상 키웠다. 정량 결과는 (B)에 나타나 있다.

[0071] 도 4는 고염 처리에서의 mMSR4의 2-DE 분석을 나타낸 도이다.

[0072] 2주령 된 mAtMSR4, 즉 애기장대 mMSR4 묘목들은 대조군 배지 및 샘플(A 대조군) 또는 300 mM NaCl을 4시간 동안 처리한 (B)에서 키웠다. 원과 직각형의 표기는 각각 감소 및 증가된 발현을 갖는 스팟을 의미한다. 발현에 있어서 큰 차이를 보이는 특정 단백질은 MALDI-TOF로 분석하였다.

[0073] 도 5는 펩타이드 MSR 서열을 나타낸 도이다.

[0074] (A)애기장대 MSR 1, 2, 3 및 4 아미노산 서열의 배열을 나타낸 것이다. (B) 다른 종으로부터 유래한 애기장대 MSR4 및 MSR4 단백질로부터 아미노산 서열 간 배열을 나타낸 것이며, 별표는 mMSR의 아미노산 서열에서의 돌연변이를 의미한다.

[0075] 도 6은 대장균(Escherichia coli)에서 발현된 재조합 mMSR4의 효소 활성을 나타낸 도이다.

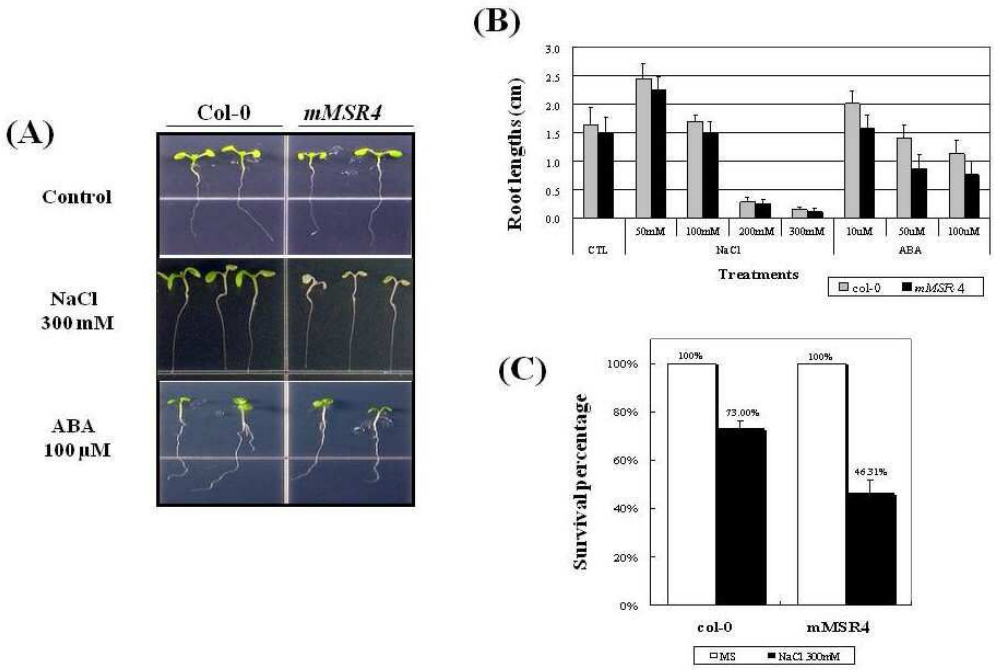
[0076] 재조합 AtMSR4 발현을 AtMSR4를 포함한 pET28a로 형질전환된 대장균(Escherichia coli(BL21))에서 1 mM IPTG로 유도하였다. Dabsylated substrate을 과발현된 세포 용해물에서 야생형 AtMSR4(a) 또는 1시간 동안 37 ℃에서 mMSR4 세포 용해물이 있는 상태로 인큐베이션하였다.

[0077] 도 7은 도 4A에서 선택된 단백질 스팟의 확인을 나타낸 도이다.

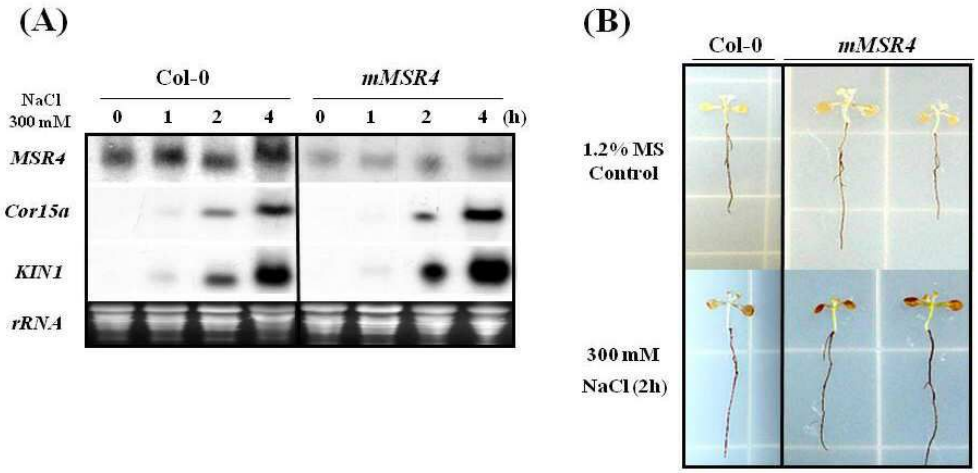
[0078] 농도에서 현저한 차이를 보이는 스팟을 MALDI-TOF 분석 및 데이터베이스 조사를 위해 선택하였다. 본 발명자는 대조군과 시료 처리된 샘플 간 적어도 3.15-배의 절대적 변화가 있는 4개의 스팟을 동정하였다($p \leq 0.05$).

도면

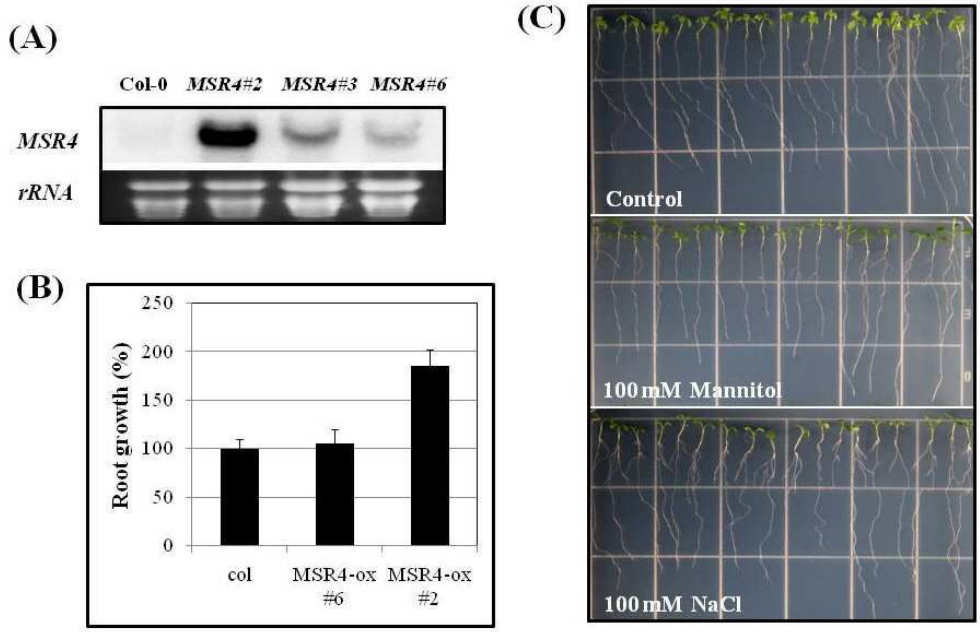
도면1


(A)
Col-0
mMSR4
Control
NaCl
300 mM
ABA
100 μM
(B)
Root lengths (cm)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CTL
50mM
100mM
200mM
300mM
10uM
50uM
100uM
NaCl
ABA
Treatments
col-0
mMSR4
(C)
Survival percentage
100%
80%
60%
40%
20%
0%
100%
73.00%
100%
46.31%
col-0
mMSR4
MS
NaCl 300mM

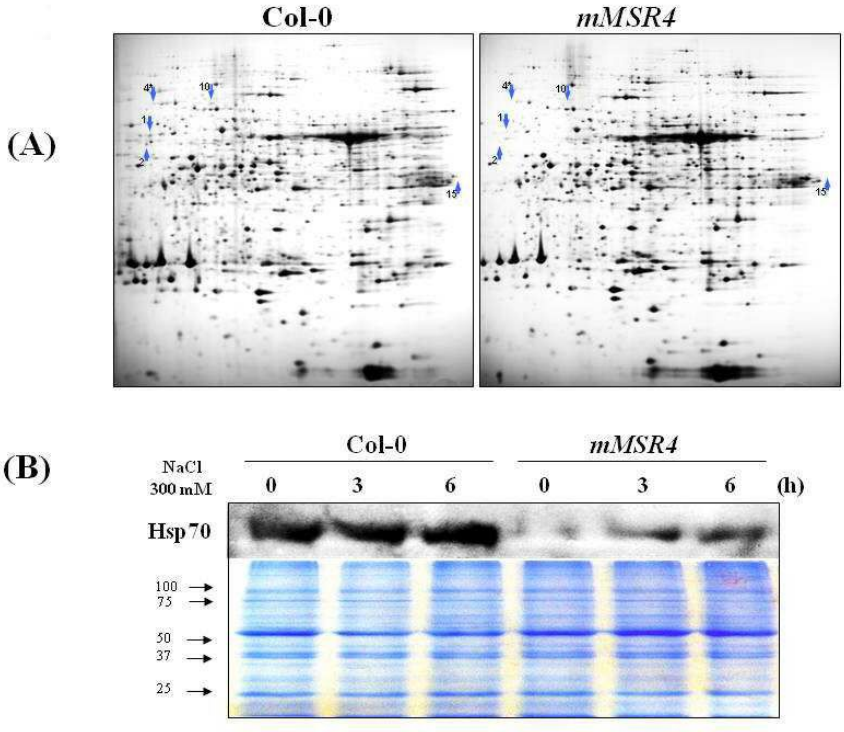
도면2


(A)
Col-0
mMSR4
NaCl
300 mM
0
1
2
4
0
1
2
4
(h)
MSR4
Cor15a
KIN1
rRNA
(B)
Col-0
mMSR4
1.2% MS
Control
300 mM
NaCl (2h)

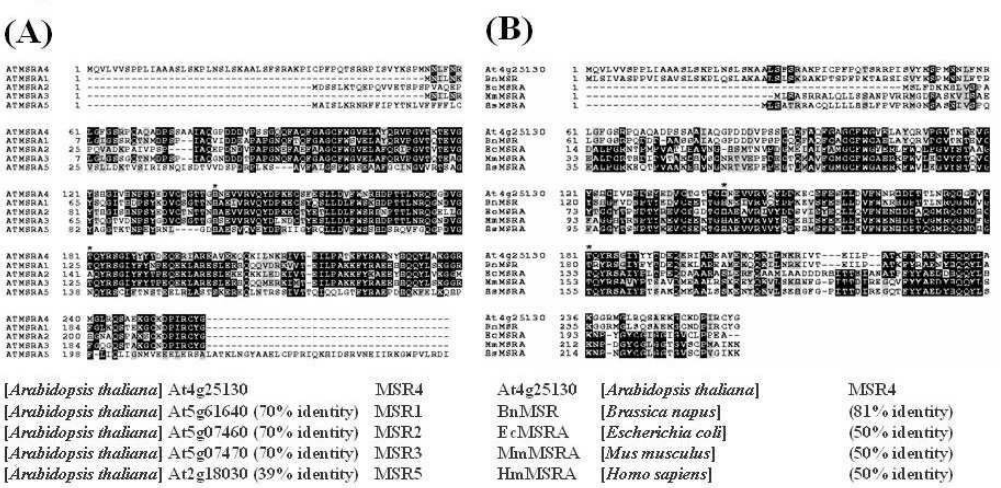
도면3


(A)
Col-0
MSR4#2
MSR4#3
MSR4#6
MSR4
rRNA
(B)
Root growth (%)
250
200
150
100
50
0
col
MSR4-ox #6
MSR4-ox #2
(C)
Control
100 mM Mannitol
100 mM NaCl

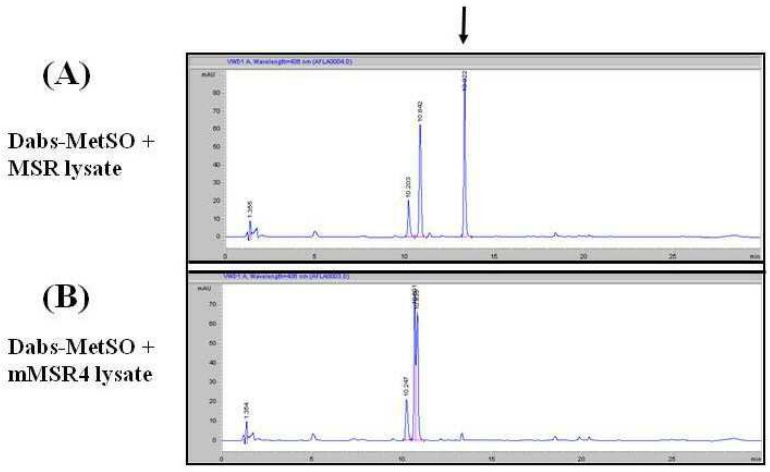
도면4


(A)
Col-0
mMSR4
(B)
NaCl
300 mM
Col-0
mMSR4
0
3
6
0
3
6
(h)
Hsp70
100
75
50
37
25

도면5


(A)
(B)
[Arabidopsis thaliana] At4g25130 MSR4
[Arabidopsis thaliana] At5g61640 (70% identity) MSR1
[Arabidopsis thaliana] At5g07460 (70% identity) MSR2
[Arabidopsis thaliana] At5g07470 (70% identity) MSR3
[Arabidopsis thaliana] At2g18030 (39% identity) MSR5
At4g25130 [Arabidopsis thaliana] MSR4
BnMSR [Brassica napus] (81% identity)
EcMSRA [Escherichia coli] (50% identity)
MmMSRA [Mus musculus] (50% identity)
HmMSRA [Homo sapiens] (50% identity)

도면6


(A)
Dabs-MetSO + MSR lysate
(B)
Dabs-MetSO + mMSR4 lysate

도면7

Spot #	pI	Average quantity		Fold Change (A/B)	Protein ID	MIPS code
		col-0 (A)	*mMSR-ox* (B)			
1	4.13	**907.13**	**145.22**	**6.25**	AtTUB4 (tubulin beta-4 chain)	At5g44340
2	4.39	**382.44**	**86.61**	**4.42**	AtUGT74B1 (UDP-glucosyl transferase 74B1)	At1g24100
3	4.43	660.13	423.19	1.56		
4*	4.47	**148.19**	**46.97**	**3.15**	AtHSP70-3 (heat shock cognate 70 kDa protein 3)	At3g09440
5	4.49	537.62	256.09	2.10		
6	4.53	394.71	240.98	1.64		
7	4.59	88.63	50.46	1.76		
8	4.67	416.54	248.84	1.67		
9	4.71	347.56	161.51	2.15		
10*	4.82	**452.50**	**110.45**	**4.10**	AtHSP70 (heat shock protein 70)	At3g12580
11	5.08	451.25	292.54	1.54		
12	5.10	748.09	464.05	1.61		
13	5.11	2107.61	1365.50	1.54		
14	7.29	1009.07	841.30	1.20		
15	8.26	**211.22**	**1370.56**	**0.15**	AtGAPC-2 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)	At1g13440

서 열 목 록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
<120> A METHOD FOR PROMOTING RESISTANCE AGAINST BIOLOGICAL OR ABIOLOGICAL ENVIRONMENTAL STRESS IN PLANTS

<130> PA090288KR

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 258
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(258)
<223> peptide methionine sulfoxide reductase, MSR 4

<400> 1
Met Gln Val Leu Val Val Ser Pro Pro Leu Ile Ala Ala Ala Ser Leu
1 5 10 15

Ser Lys Pro Leu Asn Ser Leu Ser Lys Ala Ala Leu Ser Phe Ser Arg
20 25 30

Ala Lys Pro Ile Cys Pro Phe Pro Gln Thr Ser Arg Arg Pro Ile Ser
35 40 45

Val Tyr Lys Ser Pro Met Asn Asn Leu Phe Asn Arg Leu Gly Phe Gly
50 55 60

Ser Arg Pro Gln Ala Gln Ala Asp Pro Ser Ser Ala Ala Ile Ala Gln
65 70 75 80

Gly Pro Asp Asp Asp Val Pro Ser Ser Gly Gln Gln Phe Ala Gln Phe
85 90 95

Gly Ala Gly Cys Phe Trp Gly Val Glu Leu Ala Tyr Gln Arg Val Pro
100 105 110

Gly Val Thr Lys Thr Glu Val Gly Tyr Ser His Gly Ile Val His Asn
115 120 125

Pro Ser Tyr Glu Asp Val Cys Thr Gly Thr Thr Gly His Asn Glu Val
130 135 140

Val Arg Val Gln Tyr Asp Pro Lys Glu Cys Ser Phe Glu Ser Leu Leu
145 150 155 160

Asp Val Phe Trp Asn Arg His Asp Pro Thr Thr Leu Asn Arg Gln Gly
165 170 175

Gly Asp Val Gly Thr Gln Tyr Arg Ser Gly Ile Tyr Tyr Tyr Thr Asp
180 185 190

Glu Gln Glu Arg Ile Ala Arg Glu Ala Val Glu Lys Gln Gln Lys Ile
195 200 205

Leu Asn Lys Arg Ile Val Thr Glu Ile Leu Pro Ala Thr Lys Phe Tyr
210 215 220

Arg Ala Glu Asn Tyr His Gln Gln Tyr Leu Ala Lys Gly Gly Arg Met
225 230 235 240

Gly Leu Arg Gln Ser Ala Glu Lys Gly Cys Lys Asp Pro Ile Arg Cys
245 250 255

Tyr Gly