



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0047843
(43) 공개일자 2014년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) C07K 14/415 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0114060
(22) 출원일자 2012년10월15일
심사청구일자 2012년10월15일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
윤대진
경상남도 진주시 평거로39번길 9 107동 1106호
백동원
경남 진주시 금산면 금산로 123, 117동 702호 (금
산홍한골든빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김동완

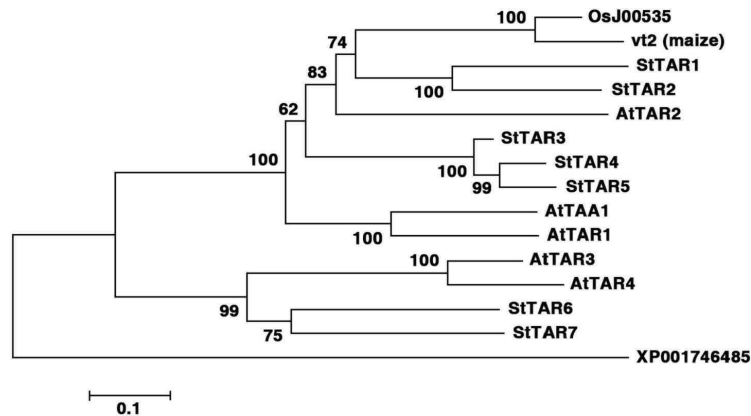
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 아라비돕시스 YUCCA6를 과발현하는 가뭄 저항성이 향상된 형질전환 감자

(57) 요약

본 발명은 감자 식물 내에서 옥신 생합성 경로를 활성화시키는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 YUCCA6 단백질에 관한 것으로, 상기 아라비돕시스 YUCCA6 단백질은 감자 YUCCA 단백질과 동일하게 FMO 확인 모티프, FAD 및 NADP 결합 모티프 및 WL(I/V)VATGENAE 모티프와 F/LATGY 모티프가 그 아미노산 서열 내에 존재함을 특징으로 하는 아라비돕시스 YUCCA6 단백질에 관한 것이다. 또한 본 발명은 아라비돕시스 YUCCA6 단백질(서열번호: 1)을 과발현시켜 옥신 생합성 경로를 활성화시킴으로써 가뭄 저항성을 향상시킨 형질전환 감자를 제공하는 것이다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

김정업

부산 해운대구 양운로37번길 11, 108동 802호 (좌
동, 현대아파트)

박형철

부산 남구 황령대로 504, 102동 507호 (대연동, 대
연삼익비치아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0725

부처명 교육과학기술부

연구사업명 세계수준의 연구중심대학 육성 사업

연구과제명 4차(국고)기후변화대응사업단

기 여 율 1/2

주관기관 한국연구재단

연구기간 2011.09.01 ~ 2012.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0253

부처명 농림수산부

연구사업명 차세대 바이오그린21사업

연구과제명 할로필리즘(halophilism) 및 환경스트레스 관련 유용유전자 확보와 기능해석

기 여 율 1/2

주관기관 농촌진흥청

연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

감자 식물 내에서 옥신 생합성 경로를 활성화시키는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비돕시스 YUCCA6 단백질

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 아라비돕시스 YUCCA6 단백질은 감자 YUCCA 단백질과 동일하게 FMO 확인 모티프, FAD 및 NADP 결합 모티프 및 WL(I/V)VATGENAE 모티프와 F/LATGY 모티프가 그 아미노산 서열 내에 존재함을 특징으로 하는 아라비돕시스 YUCCA6 단백질

청구항 3

아라비돕시스 YUCCA6 단백질(서열번호: 1)을 과발현시켜 옥신 생합성 경로를 활성화시킴으로써 가뭄 저항성을 향상시킨 형질전환 감자

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 형질전환 감자는 좁은 하부 결형의 잎, 증가된 키, 곧은 형상과 수명과 같은 고-옥신 표현형을 나타냄을 특징으로 하는 형질전환 감자

청구항 5

제 3항의 아라비돕시스 YUCCA6 단백질을 과발현하는 형질전환 감자 식물체의 가뭄 저항성은 감소된 수분 손실 및 활성 산소종의 감소에 근거함을 특징으로 하는 형질전환 감자

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 아라비돕시스 YUCCA6를 과발현하는 가뭄 저항성이 향상된 형질전환 감자에 관한 것으로 더욱 상세하게는 아라비돕시스 YUCCA6 단백질(서열번호: 1)을 과발현시켜 옥신 생합성 경로를 활성화시킴으로써 가뭄 저항성을 향상시킨 형질전환 감자에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 옥신은 인돌-3-아세트산(IAA)으로 구성된 식물 호르몬으로서 식물의 성장과 발달의 여러 측면을 조절한다. 옥신 작용의 주요한 특징은 식물 성장에 지속적 영향을 주는 국소적 농도 차이 발생의 조절 및 수송이다. 식물에서 생합성 조절을 통해 옥신 항상성을 엄격히 조절하고 있으며 순간적으로 활성형을 제거할 수 있는 콘주게이션 반응과 퇴화(degradation)를 통해 유지되고 있다. 식물 내에서의 IAA 생합성 경로의 점진적 규명이 지난 수십 년 간 이루어져 왔다.

[0003] 처음부터 옥신 생합성을 위한 트립토판-의존 및 트립토판-비의존 경로가 표지 추적 연구를 통해 확인되었다 (Baldi et al., 1991; Normanly et al., 1993). 트립토판-의존 옥신 생합성은 4개의 중간체를 통해 진행된다 (Zhao, 2011). 이들 중간체는 인돌-3-아세트알독심(IAOx) 인돌-3-피루브산(IPA) 트리프타민(TAM) 및 인돌-3-아

세트아민(IAM)이다. IAA 생합성의 일부 경로의 상대적 중요성은 아직까지 규명되지 않은 채로 남아있다. 옥신 신호 전달 변이체와 폴라(polar)옥신 수송 변이체의 표현형카피(phenocopy) 발달 결함과 같은 기능 상실 변이체의 분석으로부터 그 경로가 규명되고 있다. 유전자를 과발현하는 고-옥신 페노타입과 관련하여 연구되고 있으며 대사 중간체를 정량화하고 우세형(epistasis)을 분석한다. 트립토판으로부터 아라비도시스 내에서 IAA 생합성을 위한 2단계 경로가 관찰되었다.

[0004] 첫 번째 단계는 트랜스아민화에 의해 트립토판을 인돌-3-피루브산(IPA)으로 전환시키는 것이다. 이 반응은 아라비도시스 내에서 트립토판 아미노트랜스퍼라제 패밀리 멤버(TAA1/TAR1/TAR2)에 의해 촉매화 반응된다. 두 번째 단계는 플라빈모노옥시게나제(FMOs)의 YUCCA 패밀리 멤버에 의해 IPA로부터 IAA로 전환되는 반응이다. YUCCA 단백질의 작용은 재조합 YUCCA 단백질의 트리프트아민(TAM)을 기질로 사용한 TAM 경로 분석으로부터 이미 알려져 있으나 최근 아라비도시스의 유전 생화학 연구는 IPA 경로 내에서 YUCCA의 기능이 TAA/TARs와 함께 작용함을 나타내고 있다.

[0005] 다른 제시된 트립토판-의존 경로는 사이토크롬 P450s (CYP79B2/CYP79B3), 니트릴라제, 알데하이드 옥시다제 및 IPA 데카복시라제와 관련되어 있으나, 이 경로는 아직 충분히 규명되지 않았다. IAOx 경로는 CYP79B2/ CYP79B3, CYP83B1, CYP71A13 및 CYP71B15과 같은 사이토크롬 P450s 효소의 작용을 통해 주로 인돌 글루코시놀레이트 또는 카멜렉신(camalexin)을 생성하는 것으로 여겨진다. 그러나 인돌 글루코시놀레이트의 생성을 저해하는 CYP83B1(SUR2) 또는 C-S lyase (SUR1)의 불활성화는 IAOx로부터 IAA로의 경로에 기인하여 옥신의 축적을 야기시킨다.

[0006] 아라비도시스 내의 TAA 패밀리는 3개의 밀접한 관련 유전자(TAA1, TAR1 및 TAR2)로 구성되어있다. 이들 TAA/TAR 유전자의 어떠한 변이도 부분적으로 IPA-결핍을 생성할 수 있으며 이는 어둠 회피, 에틸렌 반응 및 옥신 수송 저해제에 대한 응답의 결함을 나타낸다. 이러한 결함은 옥신을 포함한 성장 배지를 보충함으로써 부분적으로 보완될 수 있다.

[0007] 아라비도시스 YUCCA 패밀리는 11개의 멤버로 되어있다. YUCCA1, YUCCA6, YUCCA5, YUCCA4 및 YUCCA7은 변이체의 활성화-태그 풀로부터 스크리닝 함으로써 확인되었다(Woodward et al., 2005; Kim et al., 2007; Lee et al., 2011). YUC 유전자의 활성화 또는 과발현은 유리 IAA의 증가를 야기시킨다. 이는 또한 연장된 식물배축(elongated hypocotyl), 에피나스틱 코틸레돈(epinastic cotyledons), 하부 결형의 로제트 잎(curled down rosette leaves) 및 강한 에피컬 우세(strong apical dominance)와 같은 옥신 축적에 관련된 발달 장애를 발생시킨다. 단일 YUC 유전자의 변이는 YUCCA 패밀리 멤버 사이의 기능적 중복에 의해 현저한 표현형의 변화를 나타내지 않는다. 그러나 처음부터 생성되는 옥신 생합성에 관련된 YUC 유전자의 중요성은 몇 개의 YUC 유전자의 동시 불활성화에 의해 확인된다. 예를 들면 *yuc1yuc4yuc10yuc11* 변이체는 꽃 기관 형성 및 바스큘러(vascular) 패턴의 형성에 심각한 결함을 나타내고 이와 유사한 발달 결함은 일탈된 옥신 분포를 지닌 변이체에서 발견되는 것이다.

[0008] 몇 개의 증거들이 IAA 생합성의 동일한 경로 내에서 YUCCA의 업스트림에 TAA가 배치됨을 나타낸다. *yuc1yuc2yuc4yuc6* 변이체의 묘목은 IPA의 축적을 나타내고 이는 YUCCA가 다른 생성체로의 IPA 전환에 기능하는지를 예측할 수 있게 한다. 또한 어둠 회피, 에틸렌 저항성 및 옥신 수송 저해제에 대한 저항성 등이 *taa* 변이체의 표현형이고 이는 *yuc* 변이체의 결함을 포함하고 있는 식물체 내에서 전사될 수 있는 것이다. 이는 또한 이들이 동일한 경로 내에서 작용함을 예측할 수 있게 한다. 마지막으로 YUC 과발현 라인의 옥신 과생성 표현형은 기능적 TAA 유전자에 의존적이고 이는 TAA가 트립토판을 IPA로 전환시키기 위해 필요한 것임을 확인시키면서 반면에 YUCCA 기능은 IPA를 IAA로 전환시키는 것이다.

[0009] 아라비도시스 YUC 유전자의 토마토, 옥수수, 벼 및 페튜니아에서의 오르소로그(ortholog)의 조사를 통하여 식물 발달 효과 측면에 근거하여 옥신 생합성 기능을 확인하였다(Exposito-Rodriguez et al., 2007; Yamamoto et

al., 2007). YUCCA-유사 FMO를 코드화하는 6개의 유전자를 토마토(*ToFZY1* to *ToFZY6*)에서 확인하였으며 박테리아에서 발현된 *ToFZY1*은 예측한 효소 활성을 나타내었다. 페튜니아 *FLOOZY* (*FZY*)의 불활성화는 옥신 결핍 발달 표현형 특징과 관련되어 있었으며 비정상적인 과발현은 옥신 축적을 야기시켰다.

[0010] YUCCA-유사 단백질(*OsYUCCA1-14*)을 코드화하는 14개의 유전자를 벼에서 확인하였다(Fujino et al., 2008; Gallavotti et al., 2008). *OsYUCCA1*의 과발현은 IAA 축적 및 고-옥신 표현형과 관련되어 있으며 반면에 안티센스 발현은 옥신-비민감성 변이체의 발달 표현형 특성과 관련되어 있었다. *AtYUC*의 옥수수 오르소로그 *SPARSE INFLORESCENCE1* (*spi1*)의 불활성화는 옥신 결핍 조건하에서 예측되는 측면(lateral) 기관 및 보조 분열조직(meristem)의 초기 성장 결핍과 관련되어 있다. *ZmYUC*의 감소된 전사 수준은 감소된 IAA 수준과 상호 관련된다. 옥수수 *VANISHING TASSEL2* (*VT2*)는 TAA 패밀리 단백질을 암호화시킨다. *vt2* 옥수수 변이체의 표현형은 *spi1* 변이체의 표현형과 유사하고 *spi1 vt2* 이중 변이체 내에서는 과장되지 않기 때문에 이는 TAA 및 YUCCA 단백질이 관련된 옥신 생합성을 위한 2단계 경로는 기능적이고 옥수수 내에서 중요한 것임을 암시한다.

[0011] YUC 유전자의 활성화 또는 억제는 스트레스 응답에 변화를 초래할 수 있다. 활성-태그 아라비도시스 변이체 *yuc7-1D*는 증가된 YUC7의 발현에 기인하여 총 옥신의 증가된 수준을 포함하고 이는 고옥신 식물체에서 관찰된 것과 유사한 표현형을 나타낸다. *yuc7-1D* 변이체는 가뭄 스트레스에 저항성을 지니고 가뭄-응답 유전자가 변이체 내에서 상향-조절 되어있다. 벼 *CONSTITUTIVELY WILTED1* (*OsCOW1*)는 YUCCA의 동족체인 벼 단백질을 코드화한다. *Oscow1*의 불활성화는 시든 잎과 물 결핍을 구조적으로 나타내며 이는 뿌리와 슈트(shoot) 비율의 조절 불가에 따른 결과인 것이다.

[0012] 따라서 본 발명자들은 옥신 생합성 경로를 활성화시키는 YUCCA 패밀리의 유전자를 감자 식물에 도입하여 가뭄 저항성이 향상된 형질전환 감자를 개발하기 위해 연구하던 중, 데이터베이스 검색에 근거하여 8개의 추정 YUCCA 및 5개의 추정 TAA 패밀리 멤버를 감자 게놈으로부터 추출(<http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/>; Potato Genome Sequencing Consortium, 2011)한 후 그 중 특정 YUCCA 유전자인 *AtYUCCA6* 유전자로 감자를 형질전환 시킴으로써 *AtYUCCA6*를 과발현하는 가뭄저항성 뿐만 아니라 고옥신 표현형을 나타내는 형질전환 감자 식물을 개발하고 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 옥신 생합성 경로를 활성화시키는 YUCCA 패밀리의 유전자를 감자 식물에 도입하여 가뭄 저항성이 향상된 형질전환 감자를 개발코자 한 것이다. 이에 따라 데이터베이스 검색에 근거하여 8개의 추정 YUCCA 및 5개의 추정 TAA 패밀리 멤버를 감자 게놈으로부터 추출한 후 그 중 특정 YUCCA 유전자인 *AtYUCCA6* 유전자로 감자를 형질전환 시킴으로써 *AtYUCCA6* 단백질을 과발현하는 가뭄저항성 뿐만 아니라 고옥신 표현형을 나타내는 형질전환 감자 식물을 개발코자 한 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 목적은 감자 식물 내에서 옥신 생합성 경로를 활성화시키는 서열번호: 1의 아미노산 서열을 지니는 아라비도시스 YUCCA6 단백질을 제공하는 것이다.

[0015] 이때 상기 아라비도시스 YUCCA6 단백질은 감자 YUCCA 단백질과 동일하게 FMO 확인 모티프, FAD 및 NADP 결합 모티프 및 WL(I/V)VATGENAE 모티프와 F/LATGY 모티프가 그 아미노산 서열 내에 존재함을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 아라비도시스 YUCCA6 단백질(서열번호: 1)을 과발현시켜 옥신 생합성 경로를 활성화

시킴으로써 가뭄 저항성을 향상시킨 형질전환 감자를 제공하는 것이다.

[0017] 이때 상기 형질전환 감자는 좁은 하부 컬형의 잎, 증가된 키, 곧은 형상과 수명과 같은 고-옥신 표현형을 나타냄을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 아라비도시스 YUCCA6 단백질을 과발현하는 형질전환 감자 식물체의 가뭄 저항성은 감소된 수분 손실 및 활성 산소종의 감소에 근거함을 특징으로 하는 형질전환 감자를 제공하는 것이다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 효과는 옥신 생합성 경로를 활성화시키는 YUCCA 패밀리의 유전자를 감자 식물에 도입하여 가뭄 저항성이 향상된 형질전환 감자를 제공하는 것이다. 이에 따라 특정 YUCCA 유전자인 AtYUCCA6 유전자로 감자를 형질전환시켜 AtYUCCA6 단백질을 과발현하는 가뭄저항성 뿐만 아니라 고옥신 표현형을 나타내는 형질전환 감자 식물을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 감자 내에서 트립토판 트랜스아미나제-유사 유전자의 확인을 나타낸 것이다.

(A) 계통발생 나무는 아라비도시스와 감자의 TAA/TAR-유사 유전자의 관련도를 나타낸다. 이웃에 위치한 나무는 선택된 TAA/TAR 호모로그의 추정 단백질 서열로부터 생성하였다. 진균류 *Monosiga brevicollis*(XP_001746485)의 호모로그 서열을 외부 그룹으로 나타낸다. 가지에 기재된 숫자는 2,000 부트스트랩에 근거한 신뢰치를 나타낸다. 스케일 바는 아미노산 당 치환을 나타내고 3개의 클레이드가 하프 블라켓으로 표시되었다.

(B) 아라비도시스 TAA1과 감자의 추정 TAR 유전자에 따른 추론 아미노산 서열의 정렬을 나타낸 것이다. 서열은 Bioedit를 사용하여 정렬하였다.

(C) 감자의 추정 TAR 단백질 내에서 발견되는 보존 도메인의 예측치이다. 도메인 소스는 Alliinase_C를 위한 pfam04864, EGF-유사 도메인을 위한 pfam04863 및 방향족 아미노트랜스퍼라제 도메인을 위한 COG0436이다.

도 2는 YUCCA-유사 단백질을 암호화한 감자 유전자의 확인을 나타낸 것이다.

(A) AtYUC6와 감자 YUC-유사 유전자의 추정 아미노산 서열의 비교이다. 서열은 Bioedit을 이용하여 정렬되었다. 식물 YUCCA 단백질 내에서 보존된 모티프는 적절한 위치에서 청색으로 나타낸다.

(B) YUC 유전자의 계통 발생 분석이다. 아라비도시스(At), 감자, 페튜니아(Ph), 토마토(To) 및 옥수수(Zm)의 YUCCA 단백질은 이웃에 위치한 나무로 나타내진다. 가지에 기재된 숫자는 2,000 부트스트랩에 근거한 신뢰치를 나타내고 스케일 바는 아미노산 위치 당 0.1 치환을 나타낸다. 두 개의 진균류에서 발견되는 YUCCA 호모로그로부터 추정된 단백질 서열을 외부 그룹으로 사용하였다(*Eremothecium cymbalariae*로부터의 XP_003644965와 *Ajellomyces capsulata*로부터의 EER39118). 이 나무의 구축에 사용된 유전자의 접근번호는 표 1에 나타내었다.

도 3은 고-옥신 함량과 관련된 AtYUC6 형질전환 감자 식물의 발달 표현형 디스플레이를 나타낸다.

(A) 7주령의 형질전환 식물(#104 및 #105)은 형질전환되지 않은 식물(WT)과 달리 좁고 하부-컬 형상의 잎을 나타낸다.

(B) 잎의 각도와 높이의 비교이다. 7주령의 식물로 측정하였다. 잎은 토양 라인에서부터 식물의 꼭대기까지 순서대로 카운트된다. 잎의 각도는 4번째, 5번째 및 6번째 잎으로부터 결정된다.

도 4는 AtYUC6 과발현 형질전환 감자 식물체의 수명을 나타낸다.

7월령의 형질전환되지 않은 라인(WT)과 10월령의 AtYUC6 형질전환된 라인(T104 및 T105)을 나타내었다. 10월령의 형질전환된 식물 내에서 여러개의 새로이 나타난 슈트 중 하나를 삽입도(inset) 내에 나타내었다.

도 5는 AtYUCCA6 과발현 형질전환 감자 식물체 내에서 감소된 줄기덩이(Tuber) 생성을 나타낸다.

(A-C)는 야생형, T104 및 T105의 하나의 식물체로부터 감자 줄기덩이의 형상을 나타낸다. 야생형, T104 및 T105의 하나의 식물체로부터 대표적인 줄기덩이를 (A)에 나타내었고 줄기덩이의 전체무게를 (B)로 줄기덩이의 갯수를 (C)로 나타내었다. 감자 식물체는 온실 하우스 내의 토양에서 성장되었고 줄기덩이는 식물이 사멸된 후인 11개월째에 수확하였다. 각각의 식물로부터 측정된 줄기덩이의 전체 무게와 개수를 기록하였다. 평균으로 표준편차와 함께 나타낸다(n=3).

도 6은 AtYUC6 형질전환된 감자 식물의 수분 결핍 스트레스에 대한 저항성을 나타낸다.

(A) 수분 결핍에 대한 생존력을 확인하였다. 충분히 물을 공급받은 4월령의 형질전환된 (T104) 및 야생형(WT) 식물을 물을 공급하지 않은 즉시(가뭄 0일째), 12일째(가뭄 12일째) 및 18일째(가뭄 18일째)에 측정하였다. 수분공급을 다시 시작하고 7일 뒤에(다시 수분공급 한지 7일째) 식물의 사진을 촬영하였다.

(B) 잎에서 시든의 증상을 확인하였다. 지정된 라인에서 같은 화분 내에서 식물을 4개월간 성장시키고 (A)에서와 같이 수분 결핍을 적용하였다. 물공급 중단 12일 후에 야생형(WT) 및 2개의 AtYUC6 형질전환된 라인(T104 및 T105)의 잎을 나타낸다.

(C) 상대적인 수분 함량을 측정하였다. (B)에서 나타난 잎의 상대적 수분 함량을 묘사하였다. 측정치는 평균으로 표준편차와 함께 나타낸다(n=4).

도 7은 AtYUC6 과발현이 잎에서의 낮은 ROS 함량과 연관됨을 나타낸다.

(A) 과산화수소 함량이 야생형(WT) 및 AtYUC6 형질전환 감자 라인(T104 및 T105)의 3월령의 식물의 잎 내에서 측정된다. 측정치는 평균으로 표준편차와 함께 나타낸다(n=4).

(B) TBARS 함량을 3월령의 감자 식물체의 잎 내에서 측정한다. 측정치는 평균으로 표준편차와 함께 나타낸다(n=4).

(C) 감자 잎 내의 항산화 효소의 전사 수준은 정량적 RT-PCR 및 ACTIN 전사 수준 측정으로 일반화된다. 상기 감자 라인의 7주령 식물체의 잎으로부터 추출된 전체 RNA를 측정한다. 측정치는 평균으로 표준편차와 함께 나타낸다(n=3). 심볼: SOD, 슈퍼옥사이드 디스뮤타아제; APX, 아스코르베이트 페록시다아제; CAT2, 카탈라제 2. FeSOD, CuZnSOD, APX 및 CAT2의 Genbank 접근번호는 표 1에 나타내었다.

(D) 과산화수소 함량은 3주령의 야생형(WT)과 아라비도시스 *yuc6-1D* 식물체의 잎으로부터 측정되었다. 측정치는 평균으로 표준편차와 함께 나타낸다(n=4).

(E) 고광도의 스트레스 하에서 떨어진 잎 내의 ROS 축적을 DAB 염색을 통해 조사한다. 4°C 고광도 아래에서 DAB 염색액 내에서 인큐베이트 시킨 상기 라인의 3주령의 아라비도시스 식물체의 3번째 또는 4번째의 떨어진 로제타 잎을 사진 촬영하였다.

도 8은 AtYUC6 과발현 형질전환 감자 식물체가 야생형의 식물체보다 키가 더 크게 성장함을 나타낸다.

(A) AtYUC6 형질전환 감자 식물체와 야생형 내의 YUC6 전사 수준을 RT-PCR 분석하였다. ACTIN 발현 수준을 대조군으로 나타냈다.

(B) 두 개의 독립적인 형질전환 라인(T104 및 T105)의 감자식물체 및 야생형 감자 식물체(WT)의 사진을 촬영하였다. 사진은 재배 후 각각 2주째(위의 사진)와 6주째(아래의 사진)에 촬영되었다.

(C) 땅에서 자란 두 개의 독립적인 형질전환 라인의 성장 측정이다. 줄기 성장은 (B)에서 나타난 바와 같이 야생형(WT) 및 AtYUC6 형질전환 감자 라인(T104 및 T105)의 식물체를 시간-의존적으로 측정하였다. 측정치는 평균으로 표준편차와 함께 나타낸다(n=8).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 인돌-3-아세트산(IAA)은 식물의 주요 옥신으로 트립토판-의존 및 트립토판-비의존 경로를 통해 생성된다. 아라비도시스 탈리아나 내에서 주요 경로는 트립토판으로부터 2가지 반응을 통해 IAA를 생성한다.

[0022] 첫 번째 단계는 트립토판 아미노트랜스퍼라제를 통해 트립토판을 인돌-3-피루브산(IPA)로 전환시키는 단계이고 이어서 YUCCA 단백질 효소에 의한 IPA를 IAA로 전환시키는 속도-제한 단계이다.

- [0023] 본 발명자들은 아라비돕시스 YUCCA 단백질의 서열과 50~70%의 상동성을 지니는 추정 아미노산 서열을 지닌 8개의 추정 *StYUC* (*Solanum tuberosum* YUCCA) 유전자를 확인하였다. 모든 유전자는 캐노니컬(canonical) 보존된 YUCCA 서열: FATGY 모티프, FMO 시그네처 서열, FAD-결합 및 NADP-결합 서열을 포함한다. 또한 5개의 유전자는 아라비돕시스 트립토판 아미노트랜스퍼라제와 50% 이내의 아미노산 서열 상동성을 지닌 것으로 확인되었다.
- [0024] 아라비돕시스 *AtYUC6*를 구조적으로 과발현하는 형질전환 감자(*Solanum tuberosum* cv Jowon)는 좁은 하부 껍질의 잎, 증가된 키, 곧은 형상과 수명과 같은 고-옥신 표현형을 나타내었다.
- [0025] *AtYUC6*를 과발현하는 형질전환 감자 식물체는 감소된 수분 손실에 근거하여 향상된 가뭄 저항성을 보이는 것으로 나타났다. 표현형은 잎 내의 활성 산소종의 감소된 수준과 연관성을 지니고 있다.
- [0026] 본 발명에서 개발된 감자 내의 옥신 생합성의 기능적인 YUCCA 경로는 환경에 대한 식물 응답을 변화시키는 것으로 판단된다.
- [0027] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0028] 1. 추정 감자 TAA/TAR 및 YUCCA 유전자의 확인
- [0029] 감자 게놈 데이터베이스의 BLAST 검색(<http://potatogenomics.plantbiology.msu.edu/>)을 통해 TAA/TAR 단백질에 동족체인 7개의 추정 감자 단백질을 확인하였다. 계통발생 분석을 통해 3개의 별개 클레이드(clade)를 확인하였다.
- [0030] 하나의 클레이드는 AtTAR3, AtTAR4와 StTAR6 및 StTAR7의 2개의 감자 호몰로그로 구성되어 있고 반면에 두 번째 클레이드는 옥수수 vt2 단백질, AtTAR2, StTAR1 및 StTAR2과 결합되어있다. 세 번째 클레이드는 AtTAA1, AtTAR1, StTAR3, StTAR4 및 StTAR5를 포함한다(도 1a).
- [0031] 감자 TAR은 아라비돕시스 TAA/TAR1/TAR2 단백질과 약 50 %의 추정 아미노산 서열 상동성을 나타낸다. 또한 TAA/TAR 단백질의 방향족 아미노트랜스퍼라제 도메인과 alliinase_C의 특성을 포함한다(도 1b, 1c). AtTAR3 및 AtTAR4와 동일한 클레이드에 속하는 유일한 감자 오르소로그인 StTAR6 및 StTAR7은 AtTAR3 및 AtTAR4에서 발견되는 EGF-유사 도메인을 포함한다. 이 도메인은 2개의 다른 클레이드 내에 분포하는 옥수수 vt2, AtTAA1, AtTAR1, AtTAR2 및 StTAR1-5 내에는 존재하지 않는다(도 1c). 이 분석은 StTAR1-5가 AtTAR1/AtTAA1/AtTAR2와 비교하여 유사한 역할을 하는 것을 암시한다.
- [0032] 감자 데이터베이스의 검색을 통해 추정 YUCCA 단백질을 코드화하는 8개의 유전자를 확인하였다(도 2 및 표 1). 감자 YUCCA 단백질은 아라비돕시스 YUCCA 단백질과 비교하여 50 내지 70 %의 추정 아미노산 서열 상동성을 나타낸다. 벼, 옥수수, 페튜니아, 감자, 아라비돕시스 및 감자의 YUC 유전자의 계통 분석은 2개의 진균 YUC-유사 서열에 근원하여 있고 모든 확인된 클레이드 내에서 감자 YUC 이소폼의 분포가 지지되었다(도 2b).
- [0033] 동물 및 식물 FMO와 유사한 YUCCA 단백질은 FAD 보결(prosthetic) 그룹을 포함하고 있고 기질 분자의 산화 작용의 보조효소로서 작용하는 NADPH를 이용한다. 8개의 모든 추정 감자 YUCCA 단백질은 FMO와 YUCCA 단백질을 특징화시키는 2개의 보존된 GxGxxG 모티프를 지닌다. 이 GxGxxG 모티프는 단백질의 N-말단에 근접하여있고 이는 예

측되는 FAD 결합부위이다. 또한 단백질의 중심부를 향하여 위치한 모티프는 예측되는 NADP의 결합부위이다(도 2a).

[0034] F/LATGY 모티프는 N-산화 촉매 효소로 작용하는 것으로 여겨져 있고 FMO 및 아라비도시스 YUCCA 단백질 내에서 보존되어 있다. 이는 감자 YUCCA 단백질의 C-말단에 인접하여 존재하는 것으로 여겨진다. 6개의 감자 YUCCA 단백질은 LATGY 모티프를 포함하고 있으며 반면에 StYUC7 및 StYUC8은 FATGY 모티프를 지닌다(도 2a).

[0035] 이는 AtYUC10 및 AtYUC11이 StYUC7 및 StYUC8과 동일한 클레이드에 속함을 나타내고 있으며 LATGY 대신에 FATGY 서열을 공유함을 통해 확인할 수 있는 것이다(도 2a 참조). 모든 식물 FMO는 FMO 시그네이처 서열 모티프 FxGxxxHxxxxy/F를 지니고 있다. 이는 감자 YUCCA 단백질에서도 동일하게 적용된다. WL(I/V)VATGENAE 모티프는 식물 FMO에만 배타적으로 존재하고 YUCCA 패밀리의 단백질 내에 고도로 보존되어 있다. StYUC1-6는 완전한 WL(I/V)VATGENAE 모티프를 포함한다. WL(I/V)VATGENAE 모티프는 AtYUC10/YUC11를 결핍하고 있다. 또한 동일한 클레이드에 속하는 StYUC7 및 StYUC8 내에서 변형되어 있다(도 2b). AtYUC6의 가장 인접하게 관련되어 있는 것은 StYUC2로 확인되었다.

[0036] 2. AtYUC6를 과발현하는 감자 식물은 고-옥신 함량의 형태학적 특징 변화를 나타낸다

[0037] 감자 내에서 옥신 함량을 위한 YUCCA 경로의 중요성을 확인하기 위해 본 발명자들은 *CaMV35S* 프로모터의 조절하에 *AtYUC6*를 과발현하는 형질전환 감자 식물체(*Solanum tuberosum* L. cv. Jowon)를 생성하였다. 변형된 *pCAMBIA1300pt-YUC6* 컨스트럭트는 아라비도시스 YUC6 과발현 라인을 생성하기 위해 이미 생성되었던 것이고 이를 이용하여 형질변환 시킨다. 13개의 감자 과발현 라인이 분리되었으며 2개의 라인(T104 및 T105)이 *AtYUC6*의 발현 수준 비교를 나타내기 위해 본 발명에서 사용되었다(도 8a). T104 및 T105 라인은 형질전환되지 않은 대조 식물체(WT)와 초기에는 유사하게 성장하였으나 줄기 신장(elongation)이 대조 식물체보다 빠르게 성장하였다(도 8b 및 8c).

[0038] 모든 과발현 라인에서 고-옥신 함량과 관련된 일반적인 형태학 상의 특이점이 나타난다. 형질전환 식물체는 대조군 식물체에 비해 높은 키를 지니며 곧게 서 있다(도 3 및 도 8b). 형질전환되지 않은 대조군과 비교하여 *AtYUC6* 감자 식물의 잎은 더 긴 잎꼭지(petiole)를 지니고 아래 방향으로 좁고 결화된 형상을 나타낸다(도 3a). *AtYUC6* 과발현 감자 라인에서 페티올과 줄기 사이에 각도는 형질변환되지 않은 대조군에 비해 작았다(도 3b). 신장된 하부 꺾임 형상 잎과 긴 하이포코틸(hypocotyl)과 같은 형태학적 표현형이 아라비도시스 *yuc6-ID* 및 *yuc7-ID* 유전자 활성 변이체 및 CYP79B2 과발현 라인과 같은 증가된 옥신 레벨을 지닌 식물체에서 관찰되었다.

[0039] *AtYUC6*를 과발현하는 형질전환 감자 식물체는 *AtYUC6* 과발현 아라비도시스 라인에서 보고된 바와 같은 녹색-유사 표현형을 유지하는 현상이 관찰되었다. 도 4에 나타난 바와 같이 *AtYUC6* 감자 식물체는 아직도 살아있고 10개월에 새로운 보조 슈트를 발전시킬 수 있으나 형질전환되지 않은 식물체는 7개월 후에 사멸하였다.

[0040] *AtYUC6*를 과발현하는 형질전환 감자 식물체는 형질전환되지 않은 감자 식물체에 비해 더 길게 푸르름을 유지하지만 형질전환 식물체 내에서 줄기(tuber) 생성은 증가되지 않았다(도 5a). 도 5b 및 도 5c에 나타난 바와 같이 총 튜버 무게 및 식물체 당 튜버의 수는 형질전환되지 않은 감자 식물체에 비해 낮게 나타났다.

[0041] 3. AtYUC6를 과발현하는 감자 식물은 가뭄 저항성을 나타낸다

[0042] 아라비도시스 내에서 가뭄 저항성의 표현형을 제공하는 *AtYUC7*의 과발현을 고려하여 *AtYUC6*를 과발현하는 형질

전환 감자 식물체의 물 결핍 저항성 능력을 형질전환되지 않은 감자 식물과 비교하여 보았다(도 6). 4개월 된 감자 식물에 18일간 물을 공급하지 않았다. 도 6a 및 6b에 나타난 바와 같이 물 중단 12일 째에 형질전환 되지 않은 감자 식물 잎은 시든 반면 *AtYUC6* 형질전환된 감자 식물은 팽팽하게 유지되었다. 물 공급 중단 후 18일까지는 형질전환된 감자 식물과 형질전환되지 않은 감자 식물간의 시든 현상은 더 큰 차이를 나타내었다. 19일 째에 물 공급을 다시 시작하고 가뭄-스트레스 식물의 생존을 7일 후에 평가하였다.

[0043] 형질전환되지 않은 감자 식물은 아무 개체도 이 스트레스 테스트를 통과하지 못하였으나 형질전환된 감자 식물체 4개 모두는 생존하였다(도 6a). 형질전환 *AtYUC6* 감자 식물체 내의 상대적 수분 함량은 형질전환되지 않은 식물체보다 높았으며 이는 가뭄 저항성 표현형을 지님을 나타내는 것이다(도 6c). 대조 실험으로써 이소-형 *AtYUC6* 과발현체가 가뭄 저항성을 나타내는지를 아라비돕시스를 통해 시험하였다. 5주간 아라비돕시스 식물체에 물 공급을 중단시켰을 때 야생형 식물체(Col-0 *g11*) 잎의 경우 *AtYUC6*를 과발현하는 형질전환체 *yuc6-1D*의 잎보다 14일 이후부터 현저하게 시든 현상이 나타났다. 대조적으로 상기 기능이 결핍된 변이체의 경우 야생형보다 물 결핍에 더욱 민감하였다.

[0044] 가뭄 스트레스는 다양한 식물체 내에서 산화 스트레스 증가 및 ROS 축적을 나타냄이 이미 알려져있다. 이에 따라 *AtYUC6* 형질전환 감자 라인의 잎의 과산화수소 함량을 측정한다. T104 및 T105 내에서 과산화수소의 함량은 동일한 성장조건 하에서 형질전환되지 않은 대조군 잎에 비해 오직 30 내지 40 % 정도만 측정된다(도 7a). 다수의 ROS는 매우 활성적이며 이들 ROS의 축적이 조절되지 않는다면 지방, 단백질 및 핵산을 산화시킨다. *AtYUC6* 형질전환 및 형질전환되지 않은 감자 식물체의 잎에서 지질 과산화화를 티오바비티루산 활성종(TBARS)의 형성을 통해 측정한다. 도 7b에 나타난 바와 같이 TBARS의 수준은 형질전환되지 않은 대조군에 비해 형질전환된 감자 라인의 잎에서 크게 감소되었다. 이는 과산화수소 함량의 차이와 일치하는 것이다(도 7a).

[0045] 형질전환 *AtYUC6* 감자 식물체 내에서 ROS 함량 및 지질 과산화화의 감소의 가능한 메카니즘은 ROS 제거 효소의 전사 활성화로 추측된다. 그러나 철 수퍼옥사이드 디스무타제(FeSOD), 아스코르베이트 퍼옥시다제(APX), 카탈라제 2(CAT2)와 같은 항산화 효소의 전사 수준은 형질전환되지 않은 대조군에 비해 *AtYUC6* 형질전환 감자 라인의 잎에서 크게 변화되지 않았다. 물론 구리-아연 수퍼옥사이드 디스무타제(CuZnSOD)의 발현은 모든 형질전환 라인에서 조금 증가하였다(도 7c).

[0046] 잎 내의 *AtYUC6* 과발현과 낮은 ROS 함량간의 연결은 아라비돕시스 내에서 관찰되었다(도 7c 및 7e). *yuc6-1D* 활성 변이체의 잎 내의 과산화수소 함량은 야생형 잎 내의 과산화수소 함량의 70% 수준이었다(도 7d). 과산화수소를 높은 강도의 광선으로 조사하여 잎의 염색을 디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드(DAB)에 의해 시각화시켰을 때 과산화수소 축적에 관련된 갈색의 변화가 *yuc6-1D* 잎보다 야생형 잎에서 더욱 신속히 관찰되었다(도 7e). 이는 가뭄 저항성과 잎의 ROS 함량간에 반비례 관계가 성립하고 감자 및 아라비돕시스 모두에 있어서 *AtYUC6* 과발현 식물체와 관련되어 있음을 나타내는 것이다.

[0047] 옥신 생합성의 YUCCA 경로는 이끼 내지 단자엽 및 쌍자엽 식물 등의 광범위한 식물류에서 성장에 관련되어 있으며 IAO 경로는 십자화과 식물에 한정되어 있다. *AtYUC6*를 과발현하는 형질전환 감자 식물 내에서 고-옥신 표현형을 유추함으로써 옥신 생합성을 위한 YUCCA 경로가 감자 내에도 존재함을 나타내는 것이다. 비록 IAA 생합성 경로 내에서는 아라비돕시스 YUCCA와 TAA/TARs로 기능하지만 이들이 다른 종으로 확장될 수 있는지 여부는 아직까지 밝혀지지 않았다.

[0048] 본 발명자들은 감자 게놈 내에서 5개의 TAA/TAR-유사 및 8개의 YUCCA-유사 단백질을 암호화시킨 유전자를 확인하였다. 감자 YUCCA 및 TAA/TARs이 옥신 생합성의 선형 경로 내에서 작용하는지 여부는 유전학 및 생화학적 연구를 통한 증거가 더욱 필요할 것으로 판단된다.

- [0049] 8개 모두의 추정 감자 YUCCA 단백질은 FMO 확인 모티프, FAD 및 NADP 결합 모티프와 같은 YUCCA 및 FMO 시그네이처 모티프를 지닌다. 또한 WL(I/V)VATGENAE 모티프와 F/LATGY 모티프가 존재하며 이는 감자 YUCCA의 생화학적 기능이 아라비도시스 YUCCA와 매우 유사함을 제시하는 것이다.
- [0050] 글루코시놀레이트 대사 내에서 작용하는 FMO_{GS-OXI}를 포함하는 16개의 클레이드 III의 FMO는 F/LATGY 대신에 HCTGYK 모티프를 포함한다. 반면 모든 아라비도시스 및 추정 감자 YUCCA는 F/LATGY 모티프를 포함한다. 아라비도시스, 벼, 감자 및 옥수수 내에서 발견되는 다수의 YUC 유전자는 그 고유한 기능과 오버래핑 기능을 모두 지니고 있다. 감자 YUC 유전자(*ToFZY1* 내지 *ToFZY 6*)의 발현은 일시적 및 공간적으로 조절되고 각각의 *ToFZY*의 특징적인 발현 패턴은 다른 *ToFZY*와 함께 고유한 기능과 오버래핑 기능을 모두 지니고 있음을 나타낸 것이다. 감자 YUC 패밀리의 각각의 멤버에 대한 오버랩된 역할과 발현 패턴 및 그 고유 기능의 상세한 기술이 매우 가치있는 것이다.
- [0051] *AtYUC6*를 과발현하는 아라비도시스와 감자 식물체 모두는 가뭄 저항성을 나타내고 녹색 표현형을 유지시킨다(도 4 및 도 6). 아라비도시스의 활성 변이체 내에서 YUC7의 과발현은 가뭄 저항성을 증가시키고 반면 YUC8 (*OsYUC8/OsCOW1/OsNAL7*)의 불활성화는 지속적으로 표현형의 시들을 야기시킨다. *Oscow1* 식물체의 잎에서 시듬 표현형 또는 수분 결핍은 뿌리와 슈트 비율의 감소를 야기시킨다. 그러나 아라비도시스의 *yuc6-1D* 활성화 변이체 내에서 중요한 뿌리 덩어리의 증가는 관찰되지 않았다.
- [0052] 활성산소종(ROS)의 생성은 식물체 내에서 환경 스트레스의 필연적 결과이다. 많은 연구가 ROS 생성은 가뭄 스트레스에서 증가되는 것으로 나타내고 있다. ROS 생성은 식물체 내에서 ROS-제거 능력보다 우세해질 때 해로운 것이다. 따라서 ROS의 축적은 매우 정밀하게 조절되어야 하며 이에 따라 세포 손상 및 사멸을 피할 수 있다.
- [0053] 본 발명자들의 데이터는 *AtYUC6* 과발현에 의해 추론되는 가뭄저항성 표현형이 ROS 대사 내에 매개함을 밝혀준다. 본 발명자들은 ROS의 수준이 아라비도시스 뿐만 아니라 감자 내에서 *AtYUC6*의 과발현을 통해 감소됨을 확인하였다(도 7). *AtYUC6* 과발현 식물체의 감소된 ROS 수준은 ROS 생성의 감소 또는 ROS 제거를 활성화 함으로써 유도되는 것이다.
- [0054] 본 발명자들은 형질전환 *AtYUC6* 감자 내에서 CuZnSOD의 전사 수준이 약간 증가하나 FeSOD, APX 및 CAT2와 같은 다른 ROS 제거 효소의 전사 수준은 크게 변하지 않음을 확인하였다(도 7c). 세포 공간 및 발달 시간 내에서 YUC-관련된 가뭄 저항성 표현형과 연관하여 ROS 제거 활성 및 전체적 전사의 보다 상세한 분석이 아직 이루어지지 않았다.
- [0055] YUC 과발현은 호르몬 크로스토크의 조절에 의해 가뭄 저항성을 야기시킨다. 이와 같은 가능성은 YUC 과발현 식물체 내에서 옥신의 축적 현상에 근거한 것으로 이는 다른 호르몬의 합성 함량 또는 분포의 조절을 유도하는 것이다. 하나의 후보 호르몬인 앱식산(ABA)는 가뭄 스트레스 하에서 식물체 내에 축적되는 것으로 알려져 있다. 또한 기공을 통하여 수분 균형을 조절하고 삼투압 스트레스 순응 유전자의 발현을 조절하는 것이다. 옥신은 ABA의 생성을 자극할 수 있다. 또 다른 설명은 물 부족시 ROS의 생성이 ABA 신호화와 대사 상태간에 크로스토크를 매개하는 것으로 지적되고 있다. YUC7을 과발현하는 아라비도시스 식물체가 옥신 함량을 증가시키고 가뭄 저항성을 나타내며 *RD29A*와 같은 ABA 응답 유전자의 발현을 증가시킨다.
- [0056] 그러나 YUC7 과발현 식물체 내에서 기공(stomatal aperture)은 야생형에 비해 크게 변화하지 않기 때문에 YUC7 과발현의 가뭄 저항성에 대한 효과는 ABA에 의해서 크게 매개되지 않거나 식물체 내에서 증가된 옥신 함량 및 YUC 발현은 기공(stomatal aperture) 위에서 ABA 효과를 감소시키는 것이다. 감자 및 아라비도시스 내에서 *AtYUC6* 과발현에 의해 제공되는 가뭄 저항성에 관한 호르몬 크로스토크 역할의 가능성은 더욱 많은 연구가 필요

하다.

[0057] 감자는 주요 식량 작물이나 상대적으로 많은 수관(canopy)에 의해 병행 위치한 얇은 뿌리 시스템의 발달을 요구하기 때문에 다른 작물에 비해 수분 스트레스에 매우 민감하다. 또한 감자는 낮은 함수 능력을 지닌 모래 같은 토양에서 전형적으로 성장한다. 본 발명의 결과는 감자 내에서 YUC 발현의 조절이 잎의 ROS 함량을 감소시키고 이에 따라 YUC 과발현이 예를 들면 열, 염도 또는 빛과 같은 강한 ROS 인자에 의한 다른 스트레스의 저항성을 증가시키기 위한 매우 효과적인 수단으로 제시된다. *AtYUC6* 과발현 식물체 내의 향상된 가뭄 저항성과 ROS 수준 저하 간의 관련성은 가뭄 저항성을 발달시키기 위한 또 다른 기회를 제공하기 위한 더 많은 연구가 요구되고 식물 발달 내에 YUC 과발현의 원하지 않는 영향을 피할 수 있다.

[0058] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0059] (실시예 1) 식물 재료 및 성장 조건

[0060] 적절한 아이소제닉(isogenic) 라인을 모든 실험에서 비교하였다. 아라비도시스 탈리아나 *yuc6-1D* 변이체는 *Col-0 g11* 에코형이다. 아라비도시스 식물은 ProMix PGX (Premier Horticulture) 및 Turface 소성 클레이(Profile Products)의 2:1 혼합물 내에서 성장시키고, 성장 챔버는 $100 \sim 120 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ 의 광도와 16 hr light/8 hr의 암 조건 하에서 23°C로 유지시킨 것이다. 감자 식물(*Solanum tuberosum* L. cv. Jowon)은 22-24°C의 온실 내의 MetroMix 360 (Scotts)에서 성장시킨다. 가뭄 저항성 시험을 위해 수분을 충분히 공급시킨 조건 하에서 성장한 감자 식물을 선별하였다. 수분 공급을 중단하고 식물체를 주기적으로 사진 촬영 하였다. 대조군과 시험군 사이에 현저한 차이가 발생하였을 때 수분 공급을 재개하고 식물을 주기적으로 사진 촬영 하였다.

[0061] (실시예 2) 형질전환 감자 식물의 생성

[0062] pCambia1300-PT-AtYUC6 플라스미드를 구축하고 이미 보고된 바와 같이 아라비도시스의 아그로박테리움-매개 형질전환을 위해 사용한다. 감자 형질전환을 위해 3주령의 감자 식물체(*Solanum tuberosum* L. cv. Jowon)의 잎을 0.5% 소듐 하이포클로리트에 의해 살균시키고 멸균수로 수차례 린스시킨다. 살균된 잎을 5 mm X 5 mm 조각으로 구분시키고 하루동안 미리 조절된 배지에 놓는다. pCambia1300-PT-AtYUC6를 포함하는 아그로박테리움 튜메파 시엔스(strain GV3101)을 적당한 항생제를 포함하는 YEP 배지에서 28°C에서 2일간 성장시키고 형질전환 전에 10 시간 동안 청결 배지 내에서 부분 배양시킨다. 박테리아를 10분간 준비된 잎 디스크와 함께 동시 배양시킨다. 잎 디스크를 MS 염, 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-D) (2 mg/L), 수크로즈 (30 g/L) 및 젤라이트 (2 g/L)를 포함하는 감자 동시 배양 배지에 이동시키고 25°C에서 2일간 암조건 하에서 인큐베이션 시킨다. 각각의 잎 디스크를 MS 염, 수크로즈 (30 g/L), 제아틴 (2 mg/L), NAA (0.01 mg/L), GA3 (0.1 mg/L), 젤라이트 (2 g/L), 카르베니실린 (500 mg /L) 및 하이그로마이신 (5 mg /L)을 포함하는 선별배지에 배치시킨다. 발생하는 하이그로마이신-내성 슈트를 MS 염, 수크로즈 (30 g/L), 젤라이트 (2 g/L)를 포함하는 뿌리 유도 배지에 이전시킨다. 4주 후에 묘목을 토양으로 이동시킨다.

[0063] (실시예 3) 유전자 발현 분석

[0064] 총 RNA를 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 2주령 의 감자 식물체 잎으로부터 추출하였다. ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 2 μg 의 총 RNA로부터 60분간 55°C에서 20 μL 반응량 내에서 cDNA를 합성하였다. 모든 RNA 시료의 역전사를 oligo-(dT)₂₀를 이용하여 수행하였다. 감자 내에서 ROS-관련 유전자 발현 수준을 CFX96™ Real-Time Systems(Bio-Rad Laboratories,

Hercules, CA)을 이용하여 정량적 실시간 PCR에 의해 측정한다. 감자 ROS 관련 유전자를 위한 프라이머 서열은 이미 보고된 것을 사용하였다. ACTIN을 RNA 일반화를 위해 사용한다. QuantiMix SYBR Kit (PKT, Yuseong-gu, Daejeon, Korea)을 다음과 같은 25 μ l PCR 반응을 위해 사용하였다. 50℃에서 10분간, 95℃에서 10분간 및 95℃에서 15초간 40 사이클, 60℃에서 15초간 및 72℃에서 15초간 사이클링 시켰다. 로드 샘플 내의 상대 발현 수준을 CFX Manager Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 계산하고 3회 분석하였다. qRT-PCR 및 RT-PCR에 사용된 프라이머 서열을 표 2에 나타내었다.

[0065] (실시예 4) 활성산소종 측정 및 정량화

[0066] 3,3'-디아미노벤지딘(DAB) 염색을 과산화수소를 시각화하기 위해 떨어진 잎에 수행한다. 3주령 아라비도시스 식물체로부터 세 번째 및 네 번째 로제트 잎을 수분 하에서 컷 시킨다. 잎자루(petiole)를 DAB 염색 용액(1 mg/ml, pH 3.8)에 4℃에서 높은 광도 하에 일정기간동안 침지시킨다. 인큐베이션 기간 종료시 엽록체가 제거될 때까지 잎을 60℃에서 70% 에탄올로 인큐베이션 시킨 후 사진촬영 하였다.

[0067] 3주령 아라비도시스 식물체의 잎과 3월령 감자 식물체의 떨어진 잎을 과산화 수소의 정량화를 위해 사용한다. 과산화수소는 Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 지침에 의해 사용하여 측정한다. 형광측정 (여기, 530 nm; 방출, 590 nm)을 SpectraMax GEMINI XPS 스펙트로플루오르메터 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA) 및 SoftMax Pro 5 소프트웨어를 사용하여 시행한다. 0 내지 10 μ M의 농도 범위에서 과산화수소를 이용하여 표준 곡선을 작성하고 TBARS를 기술한 방법으로 정량화한다.

[0068] (실시예 5) 상대 수분함량(RWC) 측정

[0069] 잎의 생중량(fresh weight)을 즉시 측정하였다. 잎은 4℃에서 하룻밤 탈이온수에 의해 인큐베이션 시키고 이의 생중량을 과량의 수분을 제거시키기 위한 필터 페이퍼와 함께 잎을 블로팅한 후에 측정한다. 수화 중량을 결정한 후에 잎을 2일 동안 80℃의 오븐에서 건조시킨다. 건조된 잎을 그의 건조 중량을 측정하기 전에 2시간 동안 실온에서 평형화시킨다. 상대 수분 함량을 다음식에 의해 계산한다. $RWC = (\text{생중량} - \text{건조중량}) / (\text{충분히 수화시킨 후의 생중량} - \text{건조중량})$

[0070] (실시예 6) 계통발생 나무의 구축 및 우세형 검색

[0071] 감자 내의 추정 YUCCA 패밀리의 단백질 서열을 S. tuberosum Group Phureja DM1-3 516R44 (CIP801092) genome annotation v3.4 ([http://www.potatogenome.net/index.php/Data:Potato Genome Sequencing Consortium](http://www.potatogenome.net/index.php/Data:Potato%20Genome%20Sequencing%20Consortium), 2011)내에서 blastp (e<0.00001)의 AtYUCCA6 호모로그로써 검색하였다. 감자 내의 추정 TAA/TAR 패밀리의 단백질 서열을 아라비도시스 TAA/TAR 단백질 서열을 입력함으로써 blastp (e<0.00001)와 함께 감자 게놈으로부터 조회한다. MEGA5 (www.megasoftware.net/)에 의해 이웃에 위치한 나무로 생성되고 이는 ClustalW에 의한 단백질 호모로그 서열 정렬에 기반하여 2,000 부트스트랩과 부분 삭제 옵션을 이용하여 제공된 것이다. 모든 분석에 사용된 서열의 접근 번호를 표 1에 나타내었다. 추정 감자 TAR 단백질 내의 보존된 도메인의 예측치를 NCBI Conserved Domain Search로부터 발견하였다.

[0072]

본 발명에서 언급된 유전자의 접근 번호

유전자명	서열 접근번호	종 명
AtYUC1	At4g32540	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtYUC2	At4g13260	<i>A. thaliana</i>
AtYUC3	At1g04610	<i>A. thaliana</i>
AtYUC4	At5g11320	<i>A. thaliana</i>
AtYUC5	At5g43890	<i>A. thaliana</i>
AtYUC6	At5g25620	<i>A. thaliana</i>
AtYUC7	At2g33230	<i>A. thaliana</i>
AtYUC8	At4g28720	<i>A. thaliana</i>
AtYUC9	At1g04180	<i>A. thaliana</i>
AtYUC10	At1g48910	<i>A. thaliana</i>
AtYUC11	At1g21430	<i>A. thaliana</i>
OsYUC1	Os01g064540	<i>Oryza sativa</i>
OsYUC2	Os05g052670	<i>O. sativa</i>
OsYUC3	Os01g073220	<i>O. sativa</i>
OsYUC4	Os01g022430	<i>O. sativa</i>
OsYUC5	Os12g32750	<i>O. sativa</i>
OsYUC6	Os07g043590	<i>O. sativa</i>
OsYUC7	Os04g012870	<i>O. sativa</i>
OsYUC8	Os03g016200	<i>O. sativa</i>
OsYUC9	Os01g0273800	<i>O. sativa</i>
OsYUC10	Os01g0274100	<i>O. sativa</i>
OsYUC11	Os12g0189500	<i>O. sativa</i>
PhFZY	AY039108	<i>Petunia hybrid</i>
StYUC1	PGSC0003DMP400045264*	<i>Solanum tuberosum</i>
StYUC2	PGSC0003DMP400025571*	<i>S. tuberosum</i>
StYUC3	PGSC0003DMP400020547*	<i>S. tuberosum</i>
StYUC4	PGSC0003DMP400025916*	<i>S. tuberosum</i>
StYUC5	PGSC0003DMP400038092*	<i>S. tuberosum</i>
StYUC6	PGSC0003DMP400034817*	<i>S. tuberosum</i>
StYUC7	PGSC0003DMP400066598*	<i>S. tuberosum</i>
StYUC8	PGSC0003DMP400068682*	<i>S. tuberosum</i>
ToFZY1	AM177498	<i>Solanum lycopersicum</i>
ZmSPI1	EU910941	<i>Zea mays</i>
ZmYUC	DQ995287	<i>Z. mays</i>
XP_003644965	XP_003644965	<i>Eremothecium cymbalariae</i>
EER39118	EER39118	<i>Ajellomyces capsulata</i>
감자 액틴	X55751	<i>S. tuberosum</i>
감자FeSOD	AY172650	<i>S. tuberosum</i>
감자CuZnSOD	AF355460	<i>S. tuberosum</i>
감자APX	AB041343	<i>S. tuberosum</i>
감자CAT2	AY500290	<i>S. tuberosum</i>
AtTAA1	At1g70560	<i>A. thaliana</i>
AtTAR1	At1g23320	<i>A. thaliana</i>
AtTAR2	At4g24670	<i>A. thaliana</i>
AtTAR3	At1g34040	<i>A. thaliana</i>
AtTAR4	At1g34060	<i>A. thaliana</i>
vt2	Zm2G127308	<i>Z. mays</i>
OsJ00535	EAZ10701.1	<i>O. sativa</i>
XP_001746485	XP_001746485	<i>Monosiga brevicollis</i>

StTAR3	PGSC0003DMP400013574*	<i>S. tuberosum</i>
StTAR4	PGSC0003DMP400013575*	<i>S. tuberosum</i>
StTAR1	PGSC0003DMP400031550*	<i>S. tuberosum</i>
StTAR5	PGSC0003DMP400044074*	<i>S. tuberosum</i>
StTAR2	PGSC0003DMP400047032*	<i>S. tuberosum</i>
StTAR6	PGSC0003DMP400032773*	<i>S. tuberosum</i>
StTAR7	PGSC0003DMP400041298*	<i>S. tuberosum</i>

표 2

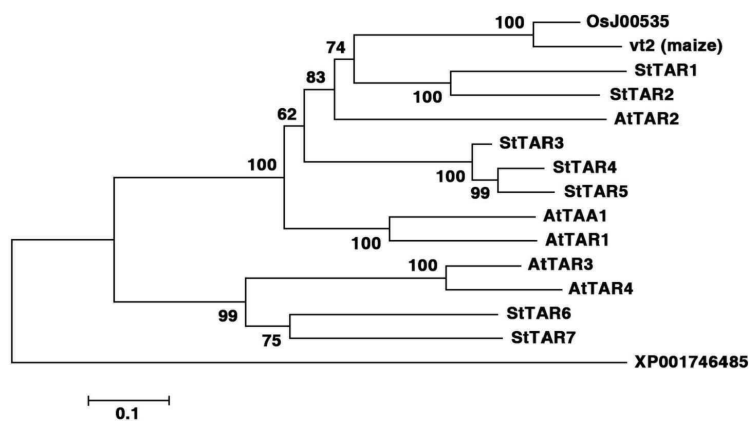
[0073]

정량적 RT-PCR 및 RT-PCR에 사용된 프라이머

감자FeSOD-정방	TGCTGAAAATCCTCTTGTTTTGGG (서열번호:2)
감자FeSOD-역방	TTCGGTTTTCTCGCTAAGCAGG (서열번호:3)
감자 액틴-정방	CCATGTTCCCTGGTATTGCTGA (서열번호:4)
감자 액틴-역방	TCGTCATACTCTGCCTTTGCAATC (서열번호:5)
감자CuZnSOD-정방	TGGAAGAGCTGTTGTTGTTTCATGC (서열번호:6)
감자CuZnSOD-역방	AAGGCTCAGCCGCTCCAATAAA (서열번호:7)
감자APX-정방	TTTCCGCCTCCTTGTGAGAAA (서열번호:8)
감자APX-역방	TCCAACAACCTCCAGCGAGCTTT (서열번호:9)
감자CAT2-정방	CAAGAAAATGTTTCGCGTTGTGC (서열번호:10)
감자CAT2-역방	TTGATGATGTTCTTCAAGCACCAAA (서열번호:11)
감자 액틴-RT-정방	GCTGGGTTTGCTGGAGATGAT (서열번호:12)
감자 액틴-RT-역방	GTGGTACGACCACTGGCATACA (서열번호:13)
AtYUCCA6-RT-정방	CGTCGTATCTGCGTCGTC (서열번호:14)
AtYUCCA6-RT-역방	CAACATCTCTCGTGGTAGGAC (서열번호:15)

도면

도면1a



도면1b

AITAA1	10	20	30	40	50	60	70	80
StTAR3	10	20	30	40	50	60	70	80
StTAR1	10	20	30	40	50	60	70	80
StTAR2	10	20	30	40	50	60	70	80
AITAA1	90	100	110	120	130	140	150	160
StTAR3	90	100	110	120	130	140	150	160
StTAR1	90	100	110	120	130	140	150	160
StTAR2	90	100	110	120	130	140	150	160
AITAA1	170	180	190	200	210	220	230	240
StTAR3	170	180	190	200	210	220	230	240
StTAR1	170	180	190	200	210	220	230	240
StTAR2	170	180	190	200	210	220	230	240
AITAA1	250	260	270	280	290	300	310	320
StTAR3	250	260	270	280	290	300	310	320
StTAR1	250	260	270	280	290	300	310	320
StTAR2	250	260	270	280	290	300	310	320
AITAA1	330	340	350	360	370	380	390	400
StTAR3	330	340	350	360	370	380	390	400
StTAR1	330	340	350	360	370	380	390	400
StTAR2	330	340	350	360	370	380	390	400
AITAA1	410	420	430	440	450			
StTAR3	410	420	430	440	450			
StTAR1	410	420	430	440	450			
StTAR2	410	420	430	440	450			

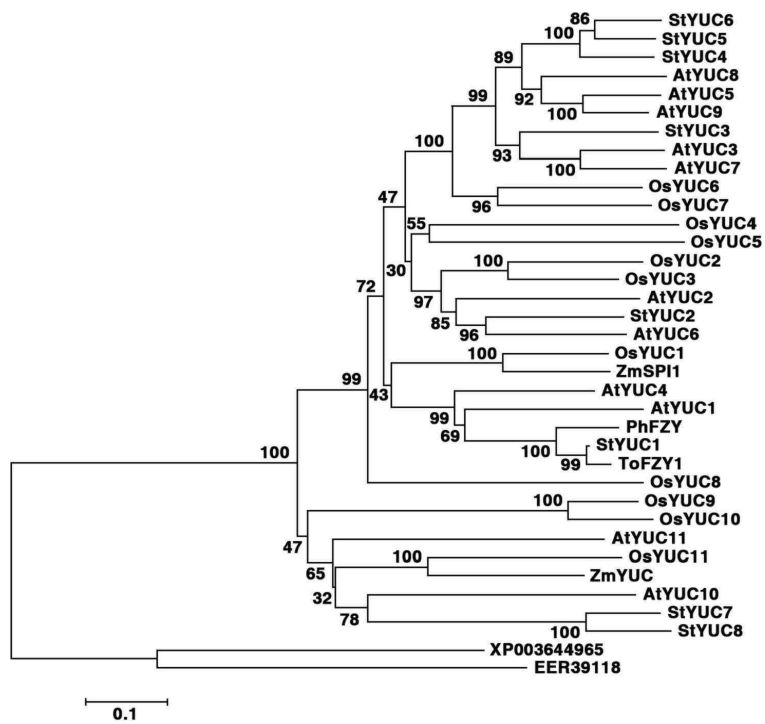
도면1c

Protein Domain	StTAR1	StTAR2	StTAR3	StTAR4	StTAR5	StTAR6	StTAR7
Alliinase_C domain	5.52e-172	6.94e-174	2.94e-168	5.35e-160	3.37e-155	2.10e-95	4.11e-164
EGF-like domain	NS	NS	NS	NS	NS	1.16e-23	1.15e-26
Aromatic aminotransferase domain	6.27e-23	3.31e-21	1.71e-12	1.42e-12	1.42e-15	1.53e-04	6.59e-14

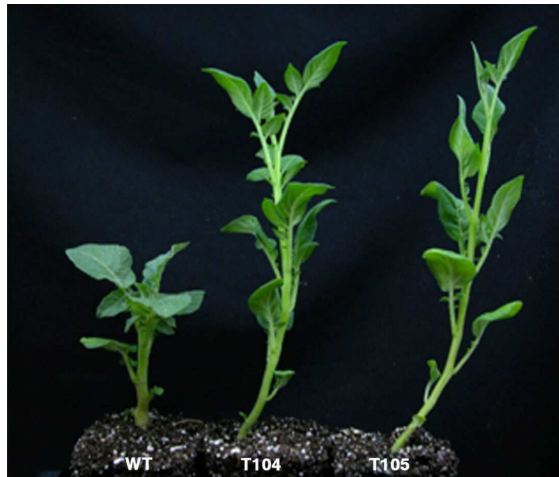
도면2a

AIYUC6	50	60	70	80	170	180	190	200
SIYUC3	50	60	70	80	170	180	190	200
SIYUC2	50	60	70	80	170	180	190	200
SIYUC4	50	60	70	80	170	180	190	200
SIYUC6	50	60	70	80	170	180	190	200
SIYUC5	50	60	70	80	170	180	190	200
SIYUC1	50	60	70	80	170	180	190	200
SIYUC7	50	60	70	80	170	180	190	200
SIYUC8	50	60	70	80	170	180	190	200
	GxGxxG				WL(I/V)ATGENAE			
	FAD-binding				FxGxxxHxxxY/F			
					FMO identifying			
AIYUC6	210	220	230	240	330	340	350	360
SIYUC3	210	220	230	240	330	340	350	360
SIYUC2	210	220	230	240	330	340	350	360
SIYUC4	210	220	230	240	330	340	350	360
SIYUC6	210	220	230	240	330	340	350	360
SIYUC5	210	220	230	240	330	340	350	360
SIYUC1	210	220	230	240	330	340	350	360
SIYUC7	210	220	230	240	330	340	350	360
SIYUC8	210	220	230	240	330	340	350	360
	GxGxxG				F/LATGY			
	NADP-binding							

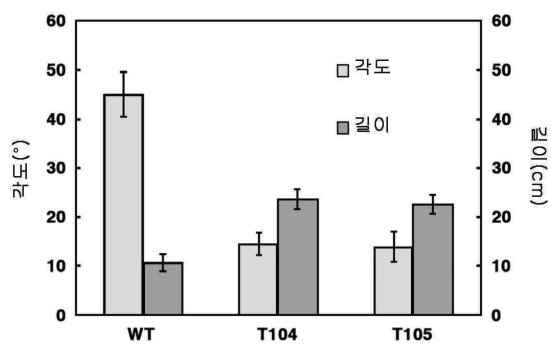
도면2b



도면3a



도면3b



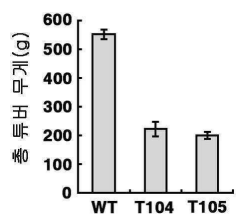
도면4



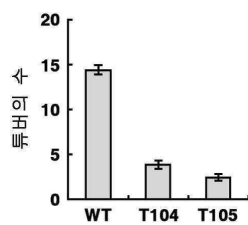
도면5a



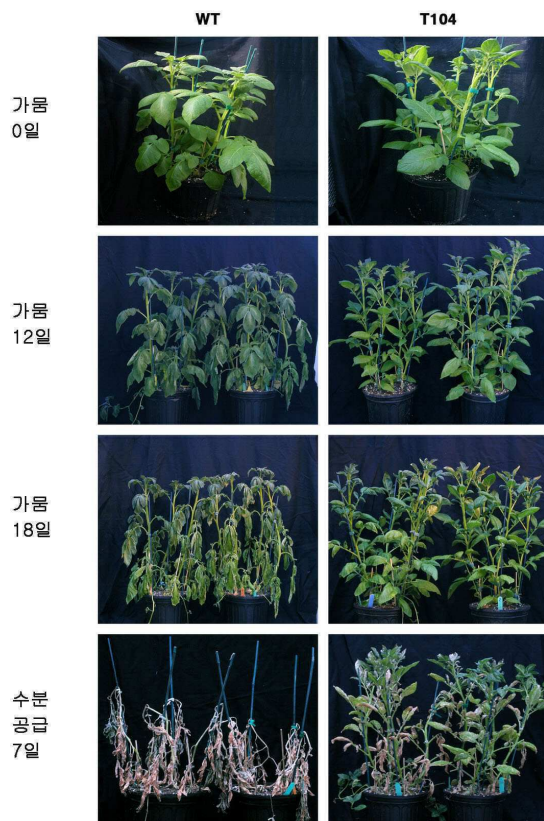
도면5b



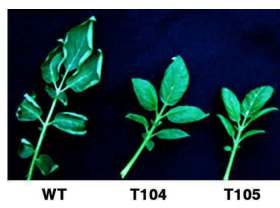
도면5c



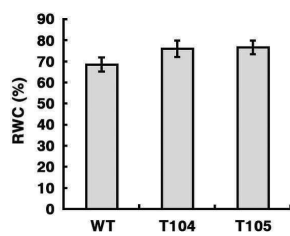
도면6a



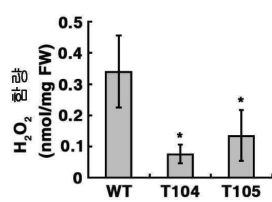
도면6b



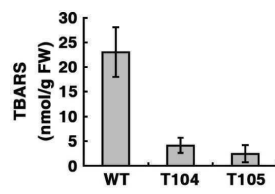
도면6c



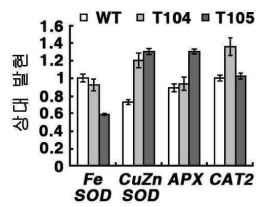
도면7a



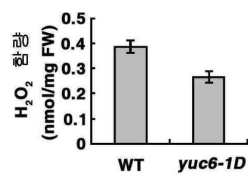
도면7b



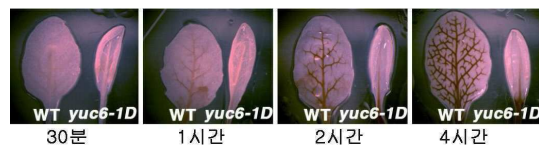
도면7c



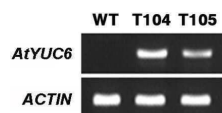
도면7d



도면7e



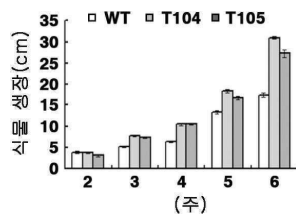
도면8a



도면8b



도면8c



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Transgenic potato having enhanced resistance to water deficit
over-expressing arabidopsis YUCCA6

<130> KP-924

<160> 15

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 417

<212> PRT

<213> Arabidopsis

<400> 1

Met Asp Phe Cys Trp Lys Arg Glu Met Glu Gly Lys Leu Ala His Asp

1 5 10 15

His Arg Gly Met Thr Ser Pro Arg Arg Ile Cys Val Val Thr Gly Pro

20 25 30
 Val Ile Val Gly Ala Gly Pro Ser Gly Leu Ala Thr Ala Ala Cys Leu
 35 40 45
 Lys Glu Arg Gly Ile Thr Ser Val Leu Leu Glu Arg Ser Asn Cys Ile
 50 55 60
 Ala Ser Leu Trp Gln Leu Lys Thr Tyr Asp Arg Leu His Leu His Leu
 65 70 75 80
 Pro Lys Gln Phe Cys Glu Leu Pro Ile Ile Pro Phe Pro Gly Asp Phe
 85 90 95

 Pro Thr Tyr Pro Thr Lys Gln Gln Phe Ile Glu Tyr Leu Glu Asp Tyr
 100 105 110
 Ala Arg Arg Phe Asp Ile Lys Pro Glu Phe Asn Gln Thr Val Glu Ser
 115 120 125
 Ala Ala Phe Asp Glu Asn Leu Gly Met Trp Arg Val Thr Ser Val Gly
 130 135 140
 Glu Glu Gly Thr Thr Glu Tyr Val Cys Arg Trp Leu Val Ala Ala Thr
 145 150 155 160
 Gly Glu Asn Ala Glu Pro Val Val Pro Arg Phe Glu Gly Met Asp Lys

 165 170 175
 Phe Ala Ala Ala Gly Val Val Lys His Thr Cys His Tyr Lys Thr Gly
 180 185 190
 Gly Asp Phe Ala Gly Lys Arg Val Leu Val Val Gly Cys Gly Asn Ser
 195 200 205
 Gly Met Glu Val Cys Leu Asp Leu Cys Asn Phe Gly Ala Gln Pro Ser
 210 215 220
 Leu Val Val Arg Asp Ala Val His Val Leu Pro Arg Glu Met Leu Gly
 225 230 235 240

 Thr Ser Thr Phe Gly Leu Ser Met Phe Leu Leu Lys Trp Leu Pro Ile
 245 250 255
 Arg Leu Val Asp Arg Phe Leu Leu Val Val Ser Arg Phe Ile Leu Gly
 260 265 270
 Asp Thr Thr Leu Leu Gly Leu Asn Arg Pro Arg Leu Gly Pro Leu Glu

275 280 285
 Leu Lys Asn Ile Ser Gly Lys Thr Pro Val Leu Asp Val Gly Thr Leu
 290 295 300
 Ala Lys Ile Lys Thr Gly Asp Ile Lys Val Cys Ser Gly Ile Arg Arg

 305 310 315 320
 Leu Lys Arg His Glu Val Glu Phe Asp Asn Gly Lys Thr Glu Arg Phe
 325 330 335
 Asp Ala Ile Ile Leu Ala Thr Gly Tyr Lys Ser Asn Val Pro Ser Trp
 340 345 350
 Leu Lys Glu Asn Lys Met Phe Ser Lys Lys Asp Gly Phe Pro Ile Gln
 355 360 365
 Glu Phe Pro Glu Gly Trp Arg Gly Glu Cys Gly Leu Tyr Ala Val Gly
 370 375 380

 Phe Thr Lys Arg Gly Ile Ser Gly Ala Ser Met Asp Ala Lys Arg Ile
 385 390 395 400
 Ala Glu Asp Ile His Lys Cys Trp Lys Gln Asp Glu Gln Val Lys Lys
 405 410 415
 Ile

<210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 tgctgaaaat cctcttggtt tggg
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 3

24

ttcgggttttc tcgctaagca gg 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

ccatgttccc tggattgct ga 22

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

tcgtcatact ctgcctttgc aatc 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

tggaagagct gttgttgctc atgc 24

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

aaggctcagc cgctccaata aa 22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8
tttccgcctc cttgttgaga aa 22

<210> 9
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 9
tccaacaact ccagcgagct tt 22

<210> 10
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 10
caagaaaatg ttcgcgttgt gc 22

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 11
ttgatgatgt tcttcaagca ccaa 25

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer

<400> 12
gctgggtttg ctggagatga t 21

<210> 13
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

gtggtacgac cactggcata ca

22

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

cgtcgtatct gcgtcgtc

18

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

caacatctct cgtggtagga c

21