(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년11월28일
(11) 등록번호 10-0780486
(24) 등록일자 2007년11월22일

(51) Int. Cl.
*C12N 15/29* (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0129543
(22) 출원일자 2006년12월18일
심사청구일자 2006년12월18일
(56) 선행기술조사문헌
NCBI database의 database accession no. D50317, GI:2627057(2002.03.23.)
Plant Physiology, Vol.136:2862-2874(2004.)

(73) 특허권자
**경희대학교 산학협력단**
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내
**포항공과대학교 산학협력단**
경상북도 포항시 남구 효자동 산31
(72) 발명자
**전종성**
경기 안양시 동안구 평촌동 인덕원 대우 아파트 115동 1004호
**안진흥**
경북 포항시 남구 지곡동 포항공대 교수아파트 9동 1803호
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**최규환**

전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 김기연

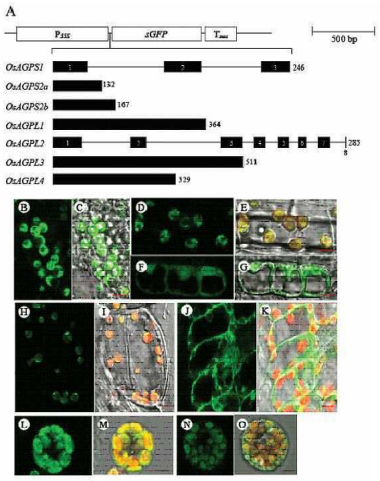
# (54) 벼 OsAGPL1 유전자, OsAGPL3 유전자 또는OsAGPL4 유전자 및 상기 유전자로 형질전환된 식물

## *(57) 요 약*

본 발명은 각 유전자의 코딩 단백질이 벼 세포 내의 색소체에 특이적으로 위치하며, 서열번호 1의 염기서열을 가지는 OsAGPL1 유전자, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 OsAGPL3 유전자 및 서열번호 3의 염기서열을 가지는 OsAGPL4 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택된, 벼 유래의 ADP-글루코스 파이로포스포릴라아제(OsAGP)의 큰 서브유닛(large subunit)을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질 전환된 식물, 상기 식물의 종자, 상기 유전자 산물의 세포 내 위치를 결정하는 방법, 상기 형질전환 식물의 제조

방법 및 상기 방법에 의해 제조된 형질전환 식물로부터 분리된 전분에 관한 것이다.

*대표도* - 도1



(72) 발명자

**이상규**

경기 용인시 기흥구 구갈동 380 한성 아파트 110동 505호

**한무호**

경기 수원시 권선구 서둔동 334-7 한성빌라 가동 203호

**엄준섭**

경기 용인시 기흥구 구갈동 380 한성 아파트 105동 608호

**부성희**

경기 용인시 기흥구 보라동 민속마을 쌍용아파트 109동 1003호

**한태룡**

경기 용인시 수지구 상현동 금호베스트빌 251동 1803호

**강홍규**

대구 수성구 범물동 신화 아파트 101동 1110호

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

각 유전자의 코딩 단백질이 벼 세포 내의 색소체에 특이적으로 위치하며, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 OsAGPL3 유전자 및 서열번호 3의 염기서열을 가지는 OsAGPL4 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택된, 벼 유래의 ADP-글루코스 파이로포스포릴라아제(OsAGP)의 큰 서브유닛(large subunit)을 코딩하는 유전자.

### 청구항 2

제 1항에 따른 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터.

### 청구항 3

제 2항에 따른 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 벼(Oryza sativa L.) 식물.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

제 3항에 따른 벼(Oryza sativa L.) 식물의 종자.

### 청구항 7

제 2항에 따른 벡터로 벼(Oryza sativa L.) 식물 세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 벼(Oryza sativa L.) 식물 세포로부터 형질전환 벼(Oryza sativa L.) 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 벼(Oryza sativa L.) 식물의 제조 방법.

### 청구항 8

제 2항에 따른 벡터로 벼(Oryza sativa L.) 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 OsAGPL3 및 OsAGPL4로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 벼(Oryza sativa L.) 세포 내 특정 위치로 타겟팅하는 방법.

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 단백질의 세포 내 위치는 색소체인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 11

제 7항의 방법에 의해 제조된 형질전환 벼(Oryza sativa L.) 식물로부터 분리된 전분.

## 명 세 서

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<14> 본 발명은 각 유전자의 코딩 단백질이 벼 세포 내의 색소체에 특이적으로 위치하며, 서열번호 1의 염기서열을 가지는 OsAGPL1 유전자, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 OsAGPL3 유전자 및 서열번호 3의 염기서열을 가지는

OsAGPL4 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택된, 벼 유래의 ADP-글루코스 파이로포스포릴라아제(OsAGP)의 큰 서브유닛(large subunit)을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터, 상기 발현 벡터로 형질 전환된 식물, 상기 식물의 종자, 상기 유전자 산물의 세포 내 위치를 결정하는 방법, 상기 형질전환 식물의 제조 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 형질전환 식물로부터 분리된 전분에 관한 것이다.

<15> 다당류인 전분은 화학적으로 균질한 기본성분, 즉 글루코스 분자들로 제조된 중합체로 중합정도와 글루코스 사슬의 분지정도가 서로 다른 다양한 형태의 분자 복합혼합물을 구성한다. 그리고 전분은 식물의 생산기관에서 광합성의 최종산물이 되고 저장기관에서는 주 저장형태가 된다. 따라서 전분 합성에 관여하는 절차들을 완전히 이해하는 것은 벼, 옥수수, 밀 같은 곡류에서 생산성을 높이며 다양한 용도로 변형이 가능한 전분을 합성할 수 있는 식물을 제공하는 것으로 특히 중요하다. 번식방법이 다른 상기 식물을 제공할 수 있는 가능성은 재조합 DNA 기술로 전분-생성 식물의 전분 대사의 특이적인 유전적 변형에 있다. 그러나 필요한 조건은 상기 효소로 코딩되는 각 DNA 분자를 분리할 뿐만 아니라 그 유전자를 동정하는 것이다.

<16> 식물체에서 전분의 합성은 주요 효소인 아데노신 5' 디포스페이트 글루코스 (ADP-Glc) 파이로포스포릴라아제(AGP)에 의해 이루어진다. AGP는 글루코스-1-포스페이트 (Glc-1-P)와 아데노신 5' 트리포스페이트 (ATP)를 이용하여 ADP-Glc과 파이로포스페이트 (PPi)를 생산하는 단계를 촉매 한다. 이렇게 만들어진 ADP-Glc 는 α-1,4-글루칸 합성 동안 활성화된 글루코실 공여자(glucosyl donor)로 작용한다.

<17>

<18> 박테리아 AGP는 4개의 같은 서브유닛(subunit)으로 구성된 호모테트라머(homotetramer) 구조로 이루어진 반면 고등 식물체는 두 개의 큰 서브유닛 (LSU)과 두 개의 작은 서브유닛 (SSU)으로 구성된 헤테로테트라머(heterotetramer)를 형성하는 구조를 이룬다. 작은 서브유닛 (SSU)은 촉매작용을 하는 서브유닛이고, 큰 서브유닛 (LSU)의 기능은 잘 밝혀져 있지 않지만 촉매 작용과 조절작용 모두에 관여한다고 알려져 있다.

<19> AGP 활성은 곡물 배유의 색소체가 아닌 세포질에 주로 존재하고 곡물의 다른 조직과 곡물이 아닌 다른 식물 조직에서는 색소체에 존재 한다 . 여러 연구에서 대부분의 AGP 활성이 곡물 배유의 세포질에  주로 존재하고 배유의 백색체에는 거의 존재하지 않는다는 것을 밝혔다. 옥수수의 발달하고 있는 배유에서 세포 소기관별로 분리 후 AGP 활성을 측정한 결과 단지 5%의 AGP 활성이 색소체에 존재하였고 세포질에 대부분의 활성이 존재하였다 (Denyer 등, (1996) Plant Physiol 112:779-785 ). 또한 보리 배유에서는 15%의 활성만이 색소체에 존재 하였다 (Thorbjrnsen 등 (1996a) Plant J 10: 243-2).

<20> 쌀 AGP 유전자 집단은 두개의 작은 서브유닛 (SSU) 유전자, OsAGPS1과 OsAGPS2, 4개의  큰 서브유닛 (LSU) 유전자, OsAGPL1, OsAGPL2, OsAGPL3, OsAGPL4 (Akihiro 등, (2005) Plant Cell Physiol 46: 937-94; Ohdan 등, (2005) J Exp Bot 56:3229-3244; Hirose 등, (2006) Physiol Plant 128:425-435)로 구성된다. OsAGPS2는 두개의 전사체를 만드는데 이것을 각각 OsAGPS2a와 OsAGPS2b라 명명한다 (Ohdan 등, (2005) J Exp Bot 56:3229-3244). 벼에서와 마찬가지로 보리와 밀에서도 AGPS2에 대하여 두개의 전사체를 만드는 것으로 알려져 있다 (Luo 등, (1997) Z Naturforsch [C] 52:807-811).

<21> 이에 본 발명자들은 벼에서 전분 합성을 조절하는 효소인 AGP 단백질인 3개의 큰 서브유닛 (largel subnit) 단백질 OsAGPL1, OsAGPL3 및 OsAGPL4에 대한 유전자를 각각 분리하고, 상기 유전자와 GFP 융합 구축물을 통하여 상기 단백질이 벼 세포 내의 색소체에 특이적으로 위치한다는 사실을 밝혔다.

## *발명이 이루고자 하는 기술적 과제*

<22> 따라서, 본 발명의 목적은 벼 세포 내의 색소체에 특이적으로 위치하는 벼 유래의 ADP-글루코스 파이로포스포릴라아제(OsAGP) 코딩 유전자를 제공한다.

<23> 또한, 본 발명의 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

<24> 또한, 본 발명의 목적은 상기 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물 및 상기 식물의 종자를 제공한다.

<25> 또한, 본 발명의 목적은 상기 재조합 식물 발현 벡터를 이용한 상기 유전자 산물의 세포 내 위치를 결정하는 방법을 제공한다.또한, 본 발명의 목적은 상기 재조합 식물 발현 벡터를 이용한 형질전환식물체의 제조 방법을 제공한다.

<26> 또한, 본 발명의 목적은 상기 방법에 의해 제조된 형질전환 식물로부터 분리된 전분을 제공한다.

## *발명의 구성 및 작용*

<27> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 각 유전자의 코딩 단백질이 벼 세포 내의 색소체에 특이적으로 위치하며, 서열번호 1의 염기서열을 가지는 OsAGPL1 유전자, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 OsAGPL3 유전자 및 서열번호 3의 염기서열을 가지는 OsAGPL4 유전자로 이루어지는 군으로부터 선택된, 벼 유래의 ADP-글루코스 파이로포스포릴라아제(OsAGP)의 큰 서브유닛(large subunit)을 코딩하는 유전자를 제공한다.

<28> 본 발명의 유전자에 의해 코딩되는 단백질은 벼 세포 내의 색소체에 특이적으로 위치하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 유전자 표기에서 Os는 벼(Oryza sativa L.)를 나타내며, AGP는 ADP-글루코스 파이로포스포릴라아제를 나타내며, L은 큰 서브유닛을 나타낸다.

<29> 벼의 게놈 (IRGSP, 2005)의 BLAST 서칭을 통하여 2개의 작은 서브유닛 (SSU) (OsAGPS1과 OsAGPS2)과 네 개의 큰 서브유닛 (LSU) (OsAGPL1, OsAGPL2, OsAGPL3, and OsAGPL4), 총 여섯 개의 AGP 유전자를 분리하였다 (표 1 참조). 본 연구에서 AGP 유전자들은 [Ohdan 등, (2005) J Exp Bot 56:3229-324] 과 [Hirose 등, (2006) Physiol Plant 128:425-43]의 명명법에 따라 명명하였다.

<30> 벼의 배유에서는 AGP 활성이 주로 세포질에 있다고 알려져 있다. 또한 잎에서 전분 합성은 색소체의 AGP 활성에 의해 조절된다고 알려져 있다. 잎과 종자에서 전분합성을 하기 위해 중요한 OsAGP 서브유닛이 어떤 것인지 알아보기 위하여 첫 번째로 모든 OsAGP 서브유닛의 세포내 위치를 추적하기로 하였다.

<31> OsAGPS2a 와 OsAGPS2b는 첫 번째 엑손에 해당하는 단백질 서열만 틀리고 나머지 열 번째까지의 엑손은 모두 같았다. 타깃P 프로그램을 사용하여 분석한 결과 OsAGPS2a는 N-말단기에 트랜지트 펩타이드 부위를 가지고 있는 반면 OsAGPS2b는 그렇지 않았다 (Emanuelsson 등, (2000) J Mol Biol 300:1005-101, http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP). OsAGPS2a는 이미 밝혀진 OsAGPS1의 트랜지트 펩타이드 부위와 유사하다 (Sikka 등, (2001) Plant Sci 161: 461-46; 데이터 미제시). 이러한 발견은 서로 다른 엑손 1을 사용함으로써 OsAGPS2유전자는 두개의 단백질을 발현하게 되고 이것은 서로 다른 세포질 위치를 가지는 것을 가능하게 한다. 큰 서브유닛(LSU) 이소형 중 OsAGPL1, OsAGPL3, OsAGPL4의 N-말단기 부위는 트랜지트 펩타이드를 가지고 있다고 생각되어진다. OsAGPL2는 트랜지트 펩타이드를 가지고 있지 않는 것으로 보이며 따라서 세포질에 존재할 것으로 생각된다.

<32> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

<33> 본 발명에서는 AGP 활성 유전자 이소형의 세포내 위치를 파악하기 위하여 OsAGP::GFP 융합 벡터를 제작하였다 (도 1 참조). 예측되는 신호 시퀀스를 포함하는 게놈 DNA 혹은 cDNA 가 실험에 사용되었다. 이 벡터들은 벼에 형질전환 하거나 옥수수의 원형질체에 형질전환하였다. 각각의 벡터에 대한 약 10개의 서로 다른 형질 전환체를 얻어서 실험하였다.

<34> 본 발명의 결과 OsAGPS1::GFP 융합 단백질은 형질전환 calli의 백색체와 잎의 엽록체에 존재하는 것으로 밝혀졌다 (도 1B, C 참조). OsAGPS2a::GFP 융합 단백질은 잎의 엽록체에 존재하는 것으로 밝혀졌다 (도 1D, E 참조). 반면 OsAGPS2b::GFP 융합 단백질은 벼 뿌리에서 세포질에 존재하는 것으로 밝혀졌다 (도 1F, G 참조). OsAGPL::GFP 융합 단백질들 중 OsAGPL2::GFP 융합 단백질만이 잎의 세포질에 존재하는 것으로 밝혀졌다 (도 1J, K 참조). 나머지 OsAGPL1, OsAGPL3, OsAGPL4와 GFP 융합 단백질들은 벼 잎 (도 1H, I 참조)과 옥수수 원형질체를 통해서 (도 1L-O 참조) 잎의 엽록체에 존재하는 것으로 밝혀졌다.

<35> 본 발명에서는 식물 발현 벡터 중의 하나인 pJJ461 벡터를 이용하였다. 식물 발현 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 이원(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.

<36> 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 진핵세포 배양에 대해 디히드로폴레이트 환원효소 또는 네오마이신 내성을 포함한다. 가장 널리 이용되는 식물 형질전환 마커는 Tn5로부터 분리된 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 II(nptII) 유전자이며, 또 다른 마커 유전자는 항생제 하이그로마이신에 내성을 부여하는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자이다. 본 발명에서는 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제 유전자를 이용하였다.

<37> 본 발명의 일 구현예에 따른 식물 발현 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, 구성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다. 본 발명에서는 CaMV 35S 프로모터를 이용하였다.

<38> 터미네이터는 노팔린 신타아제(NOS) 또는 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다. 본 발명에서는 NOS 터미네이터를 이용하였다.

<39> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 식물을 제공한다. 상기 식물은 단자엽 뿐만 아니라 쌍자엽 식물이 될 수 있다. 이들은 바람직하게는 유용한 식물이며, 특히 곡식 (밀, 보리, 귀리, 호밀 등), 벼, 옥수수, 콩 또는 감자와 같은 전분-저장 식물 또는 전분-합성 식물이다. 가장 바람직하게는 상기 식물은 벼이다.

<40> 본 발명은 또한 종자, 모, 꺾꽂이와 같은 본 발명의 식물의 번식물질도 포함할 수 있다.

<41> 재조합 구축물은 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 트랜스벡션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포; 진균 세포, 예를 들면, 효모 세포; 곤충 세포, 예를 들면, 초파리 S2 및 스포돕테라 Sf9 세포; 동물 세포, 예를 들면, CHO, COS 및 Bowes 흑색종 세포; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 숙주 세포에 대한 적당한 배양 배지 및 조건은 당업계에 공지되어 있다. 본 발명에서는 OsAGP 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 아그로박테리움 튜머파시엔스 매개 형질전환을 이용하여 벼를 형질전환시켰다.

<42> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 형질전환 식물의 종자를 제공한다. 바람직하게는, 상기 식물은 벼이나, 이에 제한되지 않는다.

<43> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계; 및

<44> 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 식물의 제조 방법을 제공한다.

<45> 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및/또는 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

<46> 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacterium tumefiaciens)에 의해 매개될 수 있다. 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다.

<47> 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.

<48> 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에서, 상기 식물 세포는 벼 유래이나, 이에 제한되지 않는다.

<49> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는 OsAGPL1, OsAGPL3 또는 OsAGPL4 단백질의 세포 내 위치를 결정하는 방법을 제공한다. 본 발명의 OsAGPL1, OsAGPL3 또는 OsAGPL4 유전자를 녹색형광단백질과 같은 검출가능한 표지자에 작동가능하게 연결하여, 이를 식물 세포, 바람직하게는 벼 세포에 형질전환한 후, 이의 발현 패턴을 관찰하면, 상기 OsAGPL1, OsAGPL3 또는 OsAGPL4 단백질의 세포 내 위치를 알 수 있는 것이다. 그 결과, 상기 단백질은 벼 세포 내의 색소체에 특이적으로 분포한다는 것을 알 수 있었다. 유사한 방식으로, OsAGPL1, OsAGPL3 또는 OsAGPL4 유전자의 발현 산물인 mRNA의 세포 내 위치도 알아낼 수 있는 것이다.

<50> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 형질전환 식물의 제조 방법에 의해 제조된 형질전환 식물로부터 분리된 전분을 제공한다.

<51> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

<52> 식물 재료로 모든 벼 식물체는 경희대학교 소유의 논에서 여름 동안 자연 상태에서 재배하였다.

<53> [실시예 1] 세포내 위치 추적을 위한 OsAGP::GFP 융합 단백질 제작

<54> OsAGP 이소형의 세포내 위치를 확인하기 위하여 단백질의 N-말단기를 포함하는 부분적인 게놈 DNA 혹은 cDNA를 프레임에 맞게 녹색형광단백질(GFP)과 융합하였다.

<55> OsAGPS1과 OsAGPL2 게놈 DNA 부위는 5' 비번역 영역(UTR)에 존재하는 XbaI 제한효소 부위를 포함하는 정방향 프라이머와 (OsAGPS1에 대한 5'-GCTCTAGATGAAGCCTCTGACACTCCACTGTA-3'(서열번호 4)와 OsAGPL2에 대한 5'-GCTCTAGACAGGTTTGTCTGGGACTTTGAGTA-3'(서열번호 5)) 유추되는 신호 시퀀스가 포함된다고 생각되는 적당한 엑손 부위에 존재하는 SmaI 혹은 BamHI 제한효소 부위를 포함하는 역방향 프라이머 (OsAGPS1 에 대한 5'-TCCCCCGGGTTGCAAATTCAATGATCCTCCCTTC-3'(서열번호 6)과 OsAGPL2에 대한 5'-CGGGATCCTATAGCTGAGGAAGCTGGTATCAAC-3'(서열번호 7))를 PCR에 사용하였다.

<56> 단백질의 N-말단기 쪽에 해당하는 OsAGPS2a, OsAGPS2b, OsAGPL1의 cDNA에 대한 5'쪽 부분은 5' 비번역 영역(UTR)에 존재하는 KpnI 혹은 XbaI 제한 효소 부위를 포함하는 정방향 프라이머와 (OsAGPS2a에 대한 5'-GCTCTAGAAATGGCGATGGCGGCAGCCATGGG-3'(서열번호 8), OsAGPS2b에 대한 5'-GCTCTAGATGCA ACCATGAATGTATTGGCATC-3'(서열번호 9), OsAGPL1에 대한 5'-GCTCTAGAAAC GATGCAGTTCAGCAGTG-3'(서열번호 10))과 유추되는 신호 시퀀스가 포함된다고 생각되는 적당한 엑손 부위에 존재하는 BamHI 혹은 XhoI 제한효소 부위를 포함하는 역방향 프라이머 (OsAGPS2a과 OsAGPS2b에 대한 5'-CGGGATCCTGACTTCAACGAACCCTTCATTCTT-3'(서열번호 11), OsAGPL1에 대한 5'-CGGGATCCTGACTTCAACGAACCCTTCATTCTT -3'(서열번호 12))를 PCR에 사용하였다.

<57> 증폭된 조각은 적당한 제한효소로 잘라서 이중벡터인 pC1300intC로부터 만들어진 pJJ461 벡터의 프로모터와 sGFP 사이에 삽입하였다 (Ouwerkerk 등, (2001) Planta 213:370-3; GenBank Accession Number AF234296). 이렇게 만들어진 벡터는 아그로박테리아 매개 방법을 통하여 (Jeon 등, (2000) Plant J 22:561-5) 벼에 형질전환 하였다. 형질전환 벼는 40 mg/L 하이그로마이신 B가 포함된 배지에서 선별하였다.

<58> OsAGPL3와 OsAGPL4의 세포내 위치를 확인하기 위하여 N-말단기 부위를 프레임에 맞춰 녹색형광단백질과 융합하였다. OsAGPL3과 OsAGPL4 cDNAs의 유추되는 신호 시퀀스가 포함된다고 생각되는 5' 부위를 포함하는 정방향 프라이머 (OsAGPL3에 대한 5'-GCTCTAGATAGACGCGTAGT GATGGCGGCGAT-3'(서열번호 13)과 OsAGPL4에 대한 5'-GCTCTAGAATGGCGACCTGCTCGTGGGC-3'(서열번호 14))와 역방향 프라이머 (OsAGPL3에 대한 5'-CGGGATCCAGATGACTAATCCATCTGCAATTA-3'(서열번호 15)와 OsAGPL4에 대한 5'-CGGGATCCAGATAACTGTACCATCTGGA-3'(서열번호 16))를 PCR에 사용하였다. 증폭된 DNA는 적당한 제한효소로 잘라서 pBluescript로부터 만들어진 pJJ1450의

35S 프로모터와 녹색형광단백질 사이에 삽입하였다. 완성된 OsAGPL3::GFP와 OsAGPL4::GFP 벡터는 Jang과 Sheen (1994)의 방법에 따라 옥수수 원형질체에 일시적인 발현을 통하여 확인하였다.

<59> 그 결과, OsAGPS1::GFP 융합 단백질은 형질전환 calli의 아밀로플라스트(도 1B 및 C) 및 잎의 엽록체(데이타 미제시)에 존재한다는 것을 나타내었다. OsAGPS2a::GFP 형질전환 식물에서, GFP 신호는 또한 잎의 엽록체에서 발견된 반면(도 1D 및 E), OsAGPS2b::GFP 형질전환 식물에서, GFP 융합 단백질은 뿌리의 세포질에 존재하였다 (도 1F 및 G). 시험한 OsAGPL::GFP 융합 단백질 중에서, 단지 OsAGPL2::GFP가 잎의 세포질에 배타적으로 위치하는 것으로 밝혀졌는데(도 1J 및 K), 이는 OsAGPL2가 세포질에 존재하는 유일한 큰 서브유닛(LSU) 이소형이라는 것을 나타낸다. OsAGPL1, OsAGPL3 및 OsAGPL4의 나머지 GFP 융합 단백질은 잎 (도 1H 및 I) 및 옥수수 원형질체 (도 1L-O)의 엽록체에서 검출되었는데, 이는 상기 OsAGPL 이소형이 색소체 표적화된 단백질이라는 것을 나타낸다.

<60> 또한, 조직 특이적인 발현 분석을 수행한 결과, OsAGPS2b와 OsAGPL2의 전사체가 벼 종자에 많이 존재한다는 것을 밝혔다. 이러한 결과는 세포질의 OsAGP 작은 서브유닛 (SSU)과 큰 서브유닛 (LSU)이 벼의 종자 배유에서 전분 합성에 중요한 역할을 할 것이라 예측할 수 있었다.

<61> 분리된 7개의 유전자를 하기 표 1에 정리하였다.

<62> [표 1] 분리된 7개의 유전자 종류 및 특징.

<63>

| 유전자 | Locus | cDNA 길이 | 세포내 위치 | 잎과 성장 배유에서 mRNA와 단백질의 다량분포위치 | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | mRNA | 단백질 |
| OsAGPS1 | LOC_Os09g12660 | AK073146 | 색소체 | 배유 초기단계 | 배유 |
| OsAGPS2a | LOC_Os08g25734 | AK071826 | 색소체 | 잎 | 잎 |
| OsAGPS2b | LOC_Os08g25734 | AK103906 | 세포질 | 배유 중기에서 말기 | 배유 |
| OsAGPL1 | LOC_Os05g50380 | AK100910 | 색소체 | 배유 초기단계 | ND |
| OsAGPL2 | LOC_Os01g44220 | AK071497 | 세포질 | 배유 중기에서 말기 | 배유 |
| OsAGPL3 | LOC_Os03g52460 | AK069296 | 색소체 | 잎 | ND |
| OsAGPL4 | LOC_Os07g13980 | AK121036 | 색소체 | 잎과 배유 | ND |

<64> ND : 확인되지 않음.

## *발명의 효과*

<65> 본 발명에 따르면, 첫째, 벼의 조직에 따라 그 유전자가 발현되는 양상이 상이하고, 둘째, AGP 활성 단백질의 발현 위치에 따라 그 역할도 다르다는 것을 알 수 있었다.

## *도면의 간단한 설명*

<1> 도 1은 벼와 옥수수 원형질체에서 AGP 이소형의 세포내 위치를 파악하기 위한 OsAGP::GFP 융합 단백질의 벡터지도를 나타내는 것으로,

<2> A: 본 발명에 이용된 OsAGP::GFP 융합 구축물의 모식도;

<3> B, C: 벼의 calli에서 OsAGPS1::GFP 융합 구축물의 발현신호;

<4> D, E: 벼의 잎에서의 OsAGP2a::GFP 융합 구축물의 발현위치;

<5> F, G: 벼의 뿌리에서 OsAGP2b::GFP 융합 구축물의 발현신호;

<6> H, I: 벼의 잎에서 OsAGPL1::GFP 융합 구축물의 발현신호;

<7> J, K: 벼의 잎에서 OsAGPL2::GFP 융합 구축물의 발현신호;

<8> L, M: 옥수수 원형질체에서 OsAGPL3::GFP 융합 구축물의 발현양상;

<9> N, O: 옥수수 원형질체에서 OsAGPL3::GFP 융합 구축물의 발현양상.

<10> 도 2는 벼의 배유와 잎에 존재하는 OsAGP 작은 서브유닛과 큰 서브유닛 이소형 사이의 시공간적 복합체 형성 모델을 나타낸 것으로,

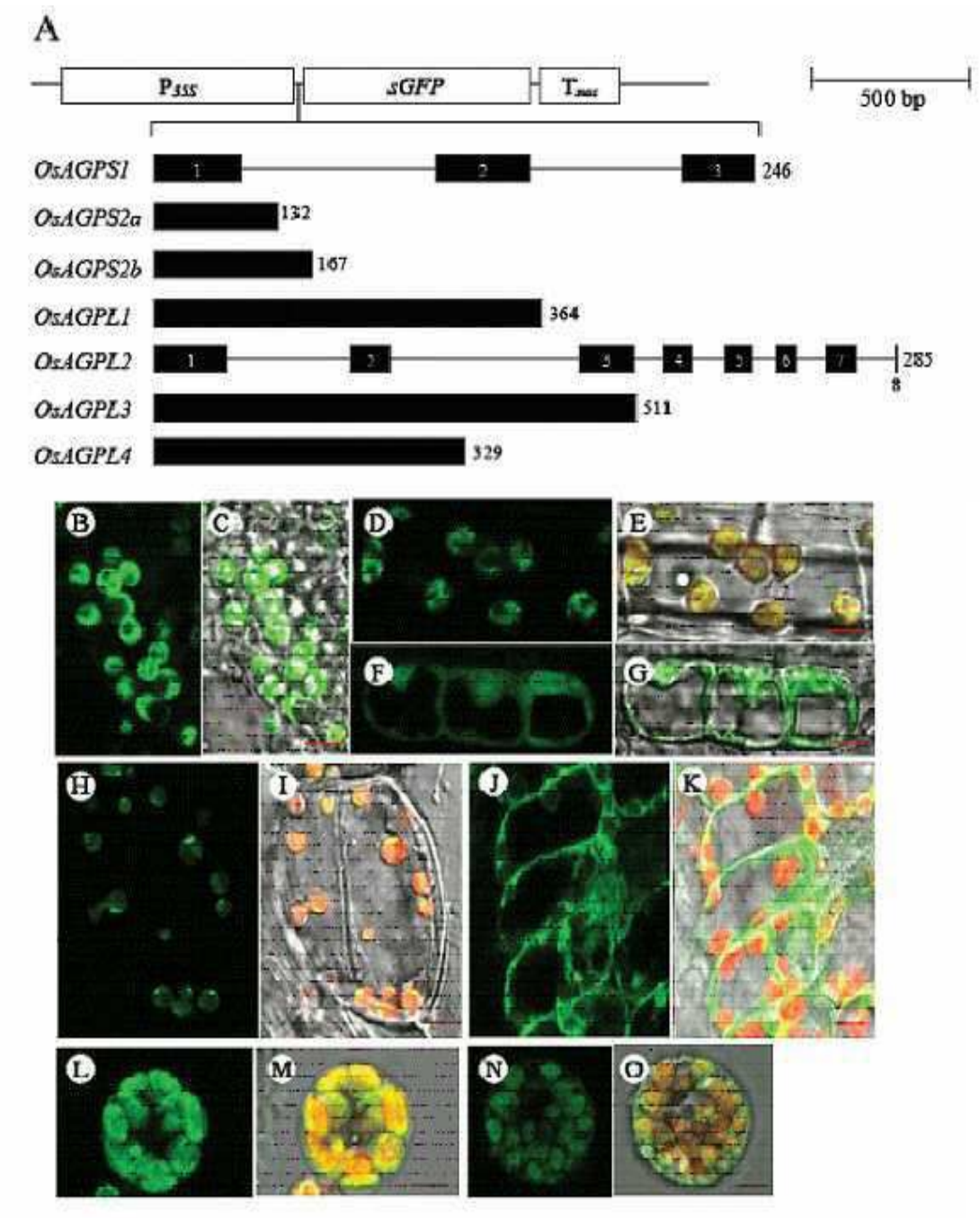
<11> A: 벼의 잎에 있는 엽록체에서 형성되는 OsAGPS2a(S2a)/OsAGPL3(L3) 헤테로테트라머 복합체;

<12> B: 벼의 배유생성 초기단계의 OsAGPS1(S1)/OsAGPL1(L1)과 OsAGPS2b(2b)/OsAGPL2(L2) 복합체;

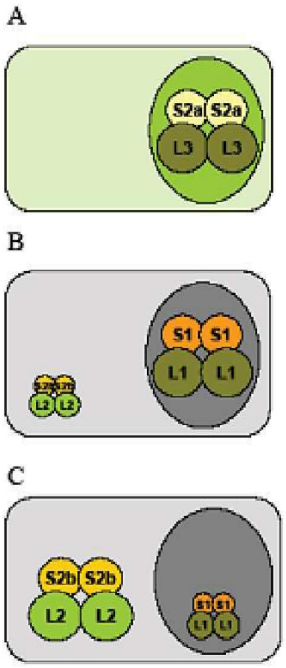
<13> C: 벼의 배유생성 중간단계의 OsAGPS1/OsAGPL1과 OsAGPS2b/OsAGPL2복합체.

## 도면

### 도면1



도면2




서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부