



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0167569
(43) 공개일자 2024년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/10 (2018.01)
A01H 6/46 (2018.01) C12N 9/38 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8282 (2013.01)
A01H 5/10 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2023-0106051
(22) 출원일자 2023년08월14일
심사청구일자 2023년08월14일
(30) 우선권주장
1020230064197 2023년05월18일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
전종성
경기도 안양시 동안구 동안로 101, 103동 1302호
보티수안규
경기도 수원시 영통구 덕영대로1673번길 8-11, B02
(74) 대리인
위병갑

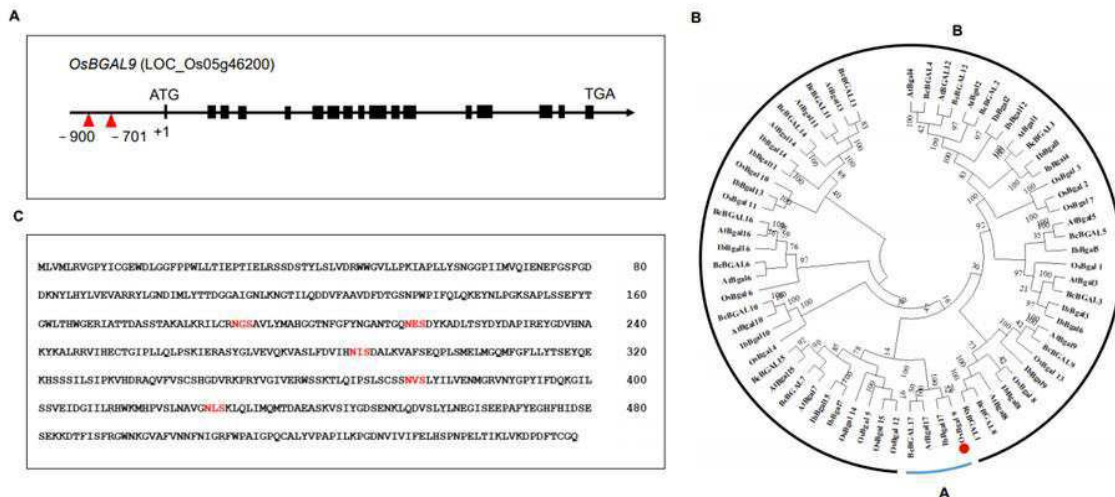
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 벼 생장 촉진 및 스트레스 내성 증가를 위한 OsBGAL9 유전자 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 벼 생장 촉진 및 스트레스 내성 증가를 위한 OsBGAL9 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 벼 유래 OsBGAL9 유전자를 과발현시킨 형질전환 식물체는 고온 및 저온 스트레스에 대해 강한 내성을 가지며, 도열병 및 흰잎마름병에 대해 저항성을 가지는 효과가 있다. 또한, 식물체 줄기 생장이 촉진되는 효과를 가진다. 따라서, 스트레스 내성 증가 및 식물체 생장이 촉진된 형질전환 식물체의 개발을 위해 OsBGAL9 유전자는 매우 유용할 것으로 기대되며, 이를 이용하여 스트레스 내성이 강하며 식물체 줄기 생장이 촉진된 식물체를 얻을 수 있으므로, 경제 작물 등의 수확량 증대 등에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A01H 6/4636 (2022.05)
C12N 15/8226 (2013.01)
C12N 15/8273 (2013.01)
C12N 15/8281 (2013.01)
C12N 9/2471 (2013.01)
C12Y 302/01023 (2013.01)

이찬희

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 251호

(72) 발명자

황빛중

경기도 수원시 영통구 덕영대로1681번길 13 304호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395075425
과제번호	PJ016901012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	신육종기술육종소재개발
연구과제명	유전자교정 기반 성분 개선 육종소재 개발(1주관)
기 여 율	4/10
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2022.04.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711155551
과제번호	2021M3E5E6025387
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오위해평가원팀리노베이션
연구과제명	CRISPR/Cas9 매개 벼 및 배추 F1 Non-GM 교잡종 개발
기 여 율	3/10
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2021.04.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711192205
과제번호	2023R1A2C1003142
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(유형1-1)중견연구
연구과제명	벼 폐화수정 유전자 1d 조절기작 연구
기 여 율	3/10
과제수행기관명	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2023.03.01 ~ 2028.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 포함하는, 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 BGAL9(beta-galactosidase 9)는 벼(*Oryza sativa*) 유래인 것을 특징으로 하는, 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진용 재조합 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 BGAL9(beta-galactosidase 9)은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것인, 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진용 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 스트레스는 생물학적 및 비생물학적 스트레스인 것을 특징으로 하는, 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진용 재조합 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 생물학적 스트레스는 도열병, 흰잎마름병, 키다리병, 벼알마름병, 깨씨무늬병 및 잎집무늬마름병으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 질병에 감염되는 것을 특징으로 하는, 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진용 재조합 벡터.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 비생물학적 스트레스는 고온 또는 저온 스트레스인 것을 특징으로 하는, 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진용 재조합 벡터.

청구항 7

BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자가 도입 또는 과발현된, 형질전환 식물체.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 형질전환 식물체.

청구항 9

제7항의 형질전환 식물체의 종자.

청구항 10

식물에서 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 도입 또는 과발현시키는 단계;를 포함하는, 식물의 스트레스 내성 증가 또는 성장 촉진 방법.

청구항 11

BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환하는 단계;를 포함하는, 스트레스 내성 증가 또는 생장이 촉진된 형질전환 식물체의 제조방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 벼 성장 촉진 및 스트레스 내성 증가를 위한 OsBGAL9 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 벼(*Oryza sativa*)는 종자 생산이 목적인 세계적으로 가장 중요한 작물 중의 하나이나, 벼에는 60 여종 이상의 각종 병해가 발생하고 있고, 해에 따라서 그 피해가 극심할 경우 50~90%의 생산량 감수를 가져 오기도 한다. 또한, 산업화로 인한 온실 가스 증가와 산림 파괴로 인해 지구의 평균 기온이 상승하면서, 이상 기후 현상이 점차 심화되고 있다. 이로 인해 작물들의 생산량이 감소하고 있고, 이는 곧 식량문제로 이어질 가능성이 큰 상황에 놓여있다. 이와 같은 피해는 인류의 안정적 식량 확보의 가장 큰 장애로 대두되어 왔고, 일례로 국내 경우에도 1978년에 통일계 품종에 벼이삭 도열병이 발생하여 식량안보 차원에서 심각한 문제를 일으키고 그 결과로 대량의 쌀을 외국에서 도입하게 되는 등 한동안 사회문제가 된 바 있다.

[0004] 이러한 문제를 해결하기 위하여, 스트레스 내성 유전자 기능이 증가한 식물체를 제조하였으나, 스트레스 내성은 증가한 반면, 식물 생장이 억제되는 문제가 발생하였다. 이와 유사하게 식물 성장을 촉진하면 스트레스 내성이 약화되는 문제가 발생하였다.

[0005] 이에, 본 발명자는 스트레스 내성 증가 및 식물체 생장이 촉진된 형질전환 식물체의 개발을 위하여 OsBGAL9를 발굴해냈으며, 벼의 성장을 촉진함과 동시에 환경 및 병원균에 대한 복합 저항성을 조절하는 유전자로서 농업적인 활용가치가 매우 높다고 판단되어 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌**특허문헌**

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1985668호(2019.05.29.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 포함하는 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진용 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.
- [0009] 또한, 본 발명의 다른 목적은 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자가 도입 또는 과발현된 형질전환 식물체를 제공하는 데 있다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 형질전환 식물체의 종자를 제공하는 데 있다.
- [0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 식물에서 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 도입 또는 과발현시키는 단계를 포함하는 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진 방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환하는 단계를 포함하는 스트레스 내성 증가 또는 생장이 촉진된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 포함하는 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0015] 이어서, 본 발명은 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자가 도입 또는 과발현된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0016] 나아가, 본 발명은 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.
- [0017] 더불어, 본 발명은 식물에서 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 도입 또는 과발현시키는 단계를 포함하는 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진 방법을 제공한다.
- [0018] 마지막으로, 본 발명은 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환하는 단계를 포함하는 스트레스 내성 증가 또는 생장이 촉진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 벼 유래 OsBGAL9 유전자를 과발현시킨 형질전환 식물체는 고온 및 저온 스트레스에 대해 강한 내성을 가지며, 도열병 및 흰잎마름병에 대해 저항성을 가지는 효과가 있다. 또한, 식물체 줄기 생장이 촉진되는 효과를 가진다. 따라서, 스트레스 내성 증가 및 식물체 생장이 촉진된 형질전환 식물체의 개발을 위해 OsBGAL9 유전자는 매우 유용할 것으로 기대되며, 이를 이용하여 스트레스 내성이 강하며 식물체 줄기 생장이 촉진된 식물체를 얻을 수 있으므로, 경제 작물 등의 수확량 증대 등에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 있어서, WT(Wild Type), OsSPL7-OX 및 Osspl7 식물에서 OsSPL7 및 OsBGAL9의 발현을 나타낸 도이다. A 및 B는 벼 ACTIN을 내부 대조군으로 사용하였다. C 및 D는 벼 UBQ5를 내부 대조군으로 사용하였다.
- (A), (C) OsSPL7의 상대적 발현 수준.

(B), (D) OsBGAL9의 상대적 발현 수준.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsBGAL9의 계통수 및 서열 분석을 나타낸 도이다.

(A) OsBGAL9 유전자의 다이어그램(검정 박스: 엑손, 선: 인트론, 빨간 삼각형: HSE 결합 사이트).

(B) OsBGAL9와 다른 패밀리 GH35 단백질의 계통발생학적 관계.

(C) OsBGAL9의 단백질 서열.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsBGAL9 프로모터에서 OsSPL7 결합 부위의 식별을 나타낸 도이다.

(A) OsBGAL9 프로모터에 있는 두 개의 HSE 결합 부위의 다이어그램.

(B) 벼 원형질체에서 전사 활성 분석에 사용되는 구조물의 개략도.

(C)는 형질전환된 원형질체에서 상대적 LUC/GUS 활성.

(D)는 OsSPL7이 OsBGAL9 프로모터에 결합함을 보여주는 Y1H 분석.

(E)는 OsBGAL9 프로모터에서 P형 HSE에 결합하는 OsSPL7을 검출하기 위한 EMSA 분석.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 라인의 생산을 나타낸 도이다.

(A) OsBGAL9에서 CRISPR/Cas9 표적 및 T-DNA 삽입 부위의 다이어그램.

(B) OsBGAL9 과발현 구조의 다이어그램.

(C) CRISPR/Cas9에 의해 생성된 Osbgal9 돌연변이에서 표적 부위의 서열 분석.

(D) HY(Wild Type) 및 T-DNA 삽입 기능 상실 식물 Osbgal9-t에서의 상대 OsBGAL9 발현 수준.

(E)는 RT-qPCR에 의해 결정된 과발현 및 CRISPR/Cas9 기능 상실 식물에서의 상대적인 OsBGAL9 발현 수준.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsBGAL9 과발현 및 Osbgal9 기능 상실 식물의 표현형을 나타낸 도이다.

(A) 성숙한 단계에서 논 재배 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물의 성장 표현형.

(B) 성숙한 단계에서 DJ(Wild Type), OsBGAL9-OX 및 Osbgal9의 식물 높이.

(C) DJ(Wild Type), OsBGAL9-OX 및 Osbgal9의 마디 간 형태.

(D) 각 마디 간의 길이 및 총 줄기 길이에 대한 각 마디 간의 상대적 기여도.

(E) 두 번째 마디의 대표적인 종단면.

(F) 종단면에서 관찰된 두 번째 마디의 셀 길이.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 야생형 대조군 HY와 비교한 Osbgal9-t T-DNA 돌연변이 식물의 표현형을 나타낸 도이다.

(A) 성숙한 단계에서 논에서 자란 Osbgal9-t 및 HY 식물의 성장 표현형.

(B) Osbgal9-t 및 HY 식물의 식물 높이.

(C) HY(Wild Type) 및 Osbgal9-t의 마디 간 형태.

(D) HY(Wild Type) 및 Osbgal9-t 식물의 총 줄기 길이에 대한 각 마디 간의 상대적 기여도.

(E) 두 번째 마디의 대표적인 종단면.

(F) 종단면에서 관찰된 두 번째 마디의 셀 길이.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsBGAL9pro:GUS 식물의 조직화학적 GUS 염색을 나타낸 도이다.

(A) 모종 단계에서 염색된 조직.

(B) 개화 단계에서 염색된 조직.

(C) 서로 다른 조직에서 상대 GUS 및 OsBGAL9 전사체 수준.

- (D) 24시간 동안 저온(4 ℃) 또는 고온(42 ℃)에 노출된 후 염색된 조직.
- (E) 저온 및 고온에 노출된 식물에서 GUS, OsBGAL9 및 OsSPL7의 상대적 전사 수준.
- (F) *Magnaporthe oryzae* 감염 후 48시간 후에 염색된 조직.
- (G) *M. oryzae* 감염 후 GUS, OsBGAL9 및 OsSPL7의 상대적 전사 수준.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 스트레스 조건 하에서 OsSPL7 과발현 및 기능 상실 식물에서 OsBGAL9의 발현을 나타낸 도이다.

- (A) 스트레스 조건 하에서 표시된 유전자형의 식물에서 OsBGAL9의 상대적 발현 수준.
- (B) 스트레스 조건 하에서 DJ(Wild Type) 식물에서 OsBGAL9, OsBGAL2 및 OsBGAL4의 상대적인 발현 수준.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물의 질병 저항성을 나타낸 도이다. 빨간색 별표는 물에 젖은 병변의 기저부 끝을 나타낸다.

- (A) *M. oryzae* P06-6 접종 후 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 잎의 대표적인 질병 표현형.
- (B) *M. oryzae* P06-6 접종 후 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 잎의 병변 길이.
- (C) *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(Xoo) PX099 접종 후 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 잎의 대표적인 질병 표현형.
- (D) Xoo PX099 접종 후 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 잎의 병변 길이.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 있어서, Osbgal9-t 식물의 질병 저항성을 나타낸 도이다. 빨간색 별표는 물에 젖은 병변의 기저부 끝을 나타낸다.

- (A) *M. oryzae* P06-6 접종 후 Osbgal9-t 잎의 대표적인 질병 표현형.
- (B) *M. oryzae* P06-6 접종 후 Osbgal9-t 잎의 병변 길이.
- (C) Xoo PX099 접종 후 Osbgal9-t 잎의 대표적인 질병 표현형.
- (D) Xoo PX099 접종 후 Osbgal9-t 잎의 병변 길이.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물의 내한성 및 내열성을 나타낸 도이다.

- (A) 저온 노출 후 DJ(Wild Type), OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물체의 표현형.
- (B) 고온 노출 후 DJ(Wild Type), OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물체의 표현형.
- (C) 저온 노출 후 DJ(Wild Type), OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물체의 생존율.
- (D) 고온 노출 후 DJ(Wild Type), OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물체의 생존율.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 있어서, Osbgal9-t 및 HY(Wild Type)의 내열성 및 내한성을 나타낸 도이다.

- (A) 4 ℃에서 72시간 동안 저온 스트레스 처리로부터 1주일 회복 후 HY(Wild Type) 및 Osbgal9-t 모종의 표현형.
- (B) 42 ℃에서 24시간 동안 고온 스트레스 처리로부터 1주일의 회복 후 HY(Wild Type) 및 Osbgal9-t 모종의 표현형.
- (C) 저온 스트레스에 따른 회복 후 Osbgal9-t 묘목의 생존율.
- (D) 고온 스트레스에 따른 회복 후 Osbgal9-t 묘목의 생존율.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsBGAL9의 세포내 지역화를 나타낸 도이다. 파란색 화살표는 원형질해를 거친 세포를 나타내며, 흰색 화살표는 세포벽의 GFP 신호를 나타낸다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 있어서, 재조합 OsBGAL9 및 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물에서의 Bgal 활성을 나타낸 도이다.

- (A) HEK293 세포에서 생산된 정제된 재조합 OsBGAL9의 SDS-PAGE 및 Coomassie Brilliant Blue 염색.
- (B) X-Gal 또는 ONPG를 기질로 사용한 재조합 OsBGAL9의 Bgal 활성 검정.

(C) 재조합 OsBGAL9의 In-gel 활성 분석.

(D) OsBGAL9-OX 및 OsBGAL9 기능 상실 식물에서 ONPG에 대한 Bgal 활성 분석.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 있어서, Osbgal9-t 돌연변이 및 HY(Wild Type)에서 ONPG에 대한 Bgal 활성을 나타낸 도이다.

(A) 두 번째 마디에서 ONPG에 대한 Bgal 활성 분석.

(B) 앞에서 ONPG에 대한 Bgal 활성 분석.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 있어서, OsBGAL9 과발현 및 Osbgal9 기능 상실 식물의 앞에서 BGAL의 상대적 발현 수준을 나타낸 도이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 있어서, 열 변성 재조합 OsBGAL9(대조군; 상단 패널) 및 활성 OsBGAL9(하단 패널)와 함께 인큐베이션한 후 자일로글루칸 올리고머의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DJ(Wild Type), OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 두 번째 마디의 단면에서 세포벽 구성 요소의 면역 탐지를 나타낸 도이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에 있어서, HY(Wild Type) 및 Osbgal9-t 두 번째 마디 간 단면에서 세포벽 성분의 면역 탐지를 나타낸 도이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에 있어서, DJ(Wild Type), OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 돌연변이 식물의 두 번째 마디 간에서 AGP의 Yariv 염색을 나타낸 도이다.

(A) β -D-glucosyl Yariv 시약(β -GlcY)으로 염색.

(B) β -D-galactosyl Yariv 시약(β -GalY)으로 염색.

도 21은 본 발명의 일 실시예에 있어서, HY(Wild Type) 및 Osbgal9-t 돌연변이 식물의 두 번째 마디에서 AGP의 Yariv 염색을 나타낸 도이다.

(A) β -D-glucosyl Yariv 시약(β -GlcY)으로 염색.

(B) β -D-galactosyl Yariv 시약(β -GalY)으로 염색.

도 22는 본 발명의 일 실시예에 있어서, DJ(Wild Type), OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 돌연변이 식물의 두 번째 마디 간 세포벽 구성 비교를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현 예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0024] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0025] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.

[0027] 일 측면에서, 본 발명은 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 포함하는 식물의 스트레스 내성 증가 또는 생장 촉진용 재조합 벡터를 제공한다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 “BGAL9(beta-galactosidase 9)”는 락토오스(lactose)를 갈락토오스(galactose)로

당분 분해를 촉진하는 효소를 나타내며, 당분을 분해하여 글루코스(glucose)와 갈락토오스로 변환시킨다.

- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어 “OsBGAL9(*Oryza sativa* beta-galactosidase 9)”는 벼의 생장과 발달, 그리고 특정 생물학적 상황에서 중요한 역할을 한다. 이 유전자의 활성화는 특정 스트레스 조건에 의해 조절되며, 이로 인해 벼가 외부 환경 변화에 적응하고 생존할 수 있게 도와준다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 OsBGAL9는 세포벽에 국한된 단백질인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 BGAL9(beta-galactosidase 9)는 벼(*Oryza sativa*) 유래인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에서 용어 “벼”는 학명이 *Oryza sativa* L.이며, 일년생 초본식물이고, 본 발명에서의 벼에는 자포니카(Japonica)형, 인디카(Indica)형 및 자바니카(Javanica)형으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 BGAL9(beta-galactosidase 9)은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 스트레스는 생물학적 및 비생물학적 스트레스인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 생물학적 스트레스는 도열병, 흰잎마름병, 키다리병, 벼알마름병, 깨씨무늬병 또는 잎집무늬마름병으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 질병, 더 바람직하게는 도열병 또는 흰잎마름병에 감염되는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 비생물학적 스트레스는 고온 또는 저온 스트레스인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 고온 스트레스는 온도가 30 ℃ 이상, 바람직하게는 35 ℃ 이상, 더 바람직하게는 42 ℃ 이상인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 저온 스트레스는 온도가 15 ℃ 이하, 바람직하게는 10 ℃ 이하, 더 바람직하게는 4 ℃ 이하인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 일 측면에서, 본 발명은 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자가 도입 또는 과발현된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양과로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상, 더 바람직하게는 벼인 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 일 측면에서, 본 발명은 형질전환 식물체의 종자를 제공한다.
- [0045] 일 측면에서, 본 발명은 식물에서 BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 도입 또는 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물의 스트레스 내성 증가 또는 성장 촉진 방법을 제공한다.
- [0047] 일 측면에서, BGAL9(beta-galactosidase 9)를 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 식물체에 도입하여 형질전환하는 단계를 포함하는, 스트레스 내성 증가 또는 생장이 촉진된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 재조합 OsBGAL9 및 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물은 Bgal 활성이 있는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 OsBGAL9가 AGPs의 갈락토오스 잔기를 가수분해하는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 AGPs의 변형은 식물체를 생장시키는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은

아니다.

[0052] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0054] <실시예 1> OsBGAL9 돌연변이 제작

[0055] 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 OsBGAL9의 T-DNA 삽입 기능 상실 돌연변이인 Osbgal9-t(PFG_1C-06424.L)는 자포니카(japonica) 벼 종자 유형인 Hwayoung(HY, 야생형)을 사용하였으며, T-DNA와 유전자 특이 프라이머(서열번호 2 및 3)(표 1 참조)를 이용한 게놈 PCR에 의해 호모 접합주를 분리하여 검증하였다.

[0056] CRISPR/Cas9 유전자 편집을 통해 OsBGAL9의 기능 상실 돌연변이 라인인 Osbgal9-1 및 Osbgal9-2 를 생성하였으며, 이는 벼 재배 품종 Dongjin(DJ, 야생형)을 사용하여 생성하였다. 효과적인 PAM(Protospacer Adjacent Motif)를 찾고 오프 타겟 효과를 피하기 위하여 CRISPR 다이렉트 프로그램을 사용하여 가능한 타겟 시퀀스를 스크리닝하였다. single guide RNA(sgRNA, 서열번호 4 및 5)를 진입 벡터 pOs-sgRNA에 복제한 다음 게이트웨이 시스템을 사용하여 대상 벡터 pH-Ubi-cas9-7에 복제하였다. 생성된 구조물은 아그로박테리움 투메파시언스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개 형질전환에 의해 DJ로 형질전환되었다. 돌연변이 유전자형은 특정 프라이머(서열번호 6 및 7)로 PCR 증폭 후 표적 부위에 인접한 게놈 영역의 Sanger 시퀀싱에 의해 결정되었다.

[0057] 또한, OsBGAL9 과발현 라인인 OsBGAL9-OX는 pGA3438 재조합 벡터에 옥수수 Ubiquitin1(UBI) 프로모터를 사용하여 OsBGAL9 코딩 서열을 함유하여 생성하였다. OsBGA9의 cDNA를 서열번호 25의 염기서열로 표시하였다. OsBGAL9 과발현 재조합 벡터를 아그로박테리움 투메파시언스(*Agrobacterium tumefaciens*) 매개 형질전환에 의해 DJ(Wild Type)로 형질전환되었다. 벼 식물체는 낮 동안 30 °C에서 14시간, 밤 동안 20 °C에서 10시간의 명암 주기로 온실에서 또는 여름의 자연 환경 조건에서 재배하였다.

표 1

Primer name		Primer Sequence	서열번호
Bgal_T-DNA	F	TGCCATTGTGCAAGTGTACCC	서열번호 2
	R	GCCGCATGTGAAATCTGGATCC	서열번호 3
Bgal9_sgRNA	F	GGCAAAAATTGAAAGAGCTAGTTA	서열번호 4
	R	AACTAACTAGCTCTTTCAATTTT	서열번호 5
Bgal9 PCR 프라이머	F	GGAGTATGGGGACGTGCATAAT	서열번호 6
	R	TTCTTACCTGGCCCATCAGTTC	서열번호 7

[0061] <실험예 1> OsBGAL9 발현 및 기능 분석

[0062] 이전 연구에서 OsSPL7을 과발현하는 식물(OsSPL7-OX)에서 OsBGAL9의 발현이 증가함을 확인하였으며, 본 발명에서는 OsSPL7을 과발현하는 식물(OsSPL7-OX) 및 OsSPL7 기능 상실 식물(Ossp17)에서 OsBGAL9의 발현을 확인하였다.

[0063] OsBGAL9 발현을 확인하기 위하여 RNA 분리 및 RT-qPCR 분석을 수행하였다. 수집한 시료로부터 총 RNA는 제조업체의 지침에 따라 Qiagen RNeasy mini kit을 사용하여 추출되었다. 총 RNA 2 µg을 ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Toyobo, Osaka, Japan)를 사용하여 일차 cDNA로 합성하였다. qPCR은 특정 프라이머(서열번호 23 및 24)와 Prime Q-Master Mix 2X(GENTBIO)를 사용하여 Rotor-Gene 6000 실시간 증폭 시스템

(Corbett Research, Sydney, Australia)에서 수행되었다. UBIQUITIN5(OsUBQ5; LOC_Os01g22490)(서열번호 8 및 9) 및 ACTIN(OsACT; LOC_Os03g61970)(서열번호 10 및 11) 유전자는 하기 표 2를 참조하여 사용되었다. OsBGAL9의 발현을 확인한 결과를 도 1에 나타내었다.

표 2

Primer name		Primer Sequence	서열번호
OsBGAL9	F	GGGGATTTCACCTTGGTTACT	서열번호 23
	R	CTTCTGGCAACTTCAACAAGGT	서열번호 24
OsUBQ5	F	GCACAAGCACAAGAAGGTGA	서열번호 8
	R	GCCTGCTGGTTGTAGACGTA	서열번호 9
OsACT	F	GTCTTGTGAGCTTTGCATGGT	서열번호 10
	R	ACAAACGAGCTTGGATCTACC	서열번호 11

도 1에서 보듯이, OsSPL7-OX에서 OsBGAL9의 발현이 상승함을 확인하였다. 도 1A 및 B는 벼 ACTIN을 내부 대조군으로 사용하였으며, 도 1C 및 D는 벼 UBQ5를 내부 대조군으로 사용하였다.

이를 통해, 전사 인자 OsSPL7에 의해 OsBGAL9의 발현이 조절된다는 것을 확인하였다.

NCBI와 PlantPAN 3.0 온라인 데이터베이스에서 OsBGAL9 프로모터를 BLAST에 검색한 결과, ATG로부터 900bp와 701bp 상류(upstream)에 위치한 두 개의 P-type HSE 결합 부위(TTCNNGAANN TTC)가 존재한다는 것 확인하였으며, 이를 도 2A에 나타내었다.

OsBGAL9의 기능을 확인하기 위하여, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 들겨자(*Brassica campestris*), 고구마(*Ipomoea batatas*), 벼(*Oryza sativa*) 및 무의 단백질 서열을 분석하고, 이를 기반으로 계통수를 재구성하였다. 이 계통수는 OsBGAL9가 애기장대의 AtBGAL17, 무의 BcBGAL17 및 고구마의 IbBGAL17과 함께 A 그룹에 속하며, 다른 BGAL은 B 그룹에 속한다는 것 보여주었으며, 이를 도 2B에 나타내었다.

이를 통해, OsBGAL9가 다른 식물 특이적 BGAL들과 관련이 없는 군집에 속한다는 것을 보여주며, 동물의 BGAL과 유사한 기능을 가질 수 있다는 것을 확인하였다.

OsBGAL9의 단백질 서열을 분석하여 N-글리코실화 부위가 존재하는지 분석하였다. 도 2C에서 보듯이, NetNGlyc-1.0을 통한 단백질 서열 분석에서는 다섯 개의 추정 N-글리코실화 부위(적색 표시)가 확인되었으며, 이는 OsBGAL9 활성화는 N-글리코실화가 필요할 수 있다는 것을 의미한다. N-글리코실화는 단백질에 당분 분자가 결합되는 과정으로, 당분 분자가 단백질 안에 삽입되어 단백질의 구조와 기능에 영향을 줄 수 있다.

이를 통해, OsBGAL9의 활성화는 N-글리코실화가 필요할 수 있다는 것을 확인하였으며, 이는 단백질의 기능 조절에 중요한 역할을 할 수 있는 것을 의미한다.

<실험예 2> OsSPL7과 OsBGAL9의 상호작용 확인

2-1. 전사 인자 OsSPL7의 OsBGAL9 조절 확인

OsBGAL9이 전사 인자 OsSPL7에 의해 직접 조절되는지 확인하기 위하여, Oc 부유세포로부터 분리한 벼 원형질체를 사용하여 전사 활성 분석을 수행하였다.

반딧불이 루시페라제(LUC) 리포터(reporter) 유전자의 상류(upstream)에 OsBGAL9 프로모터(promoter)(서열번호 12 및 13)를 복제하고, 콜리플라워 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus; CaMV) 35S 프로모터의 하류(downstream)에 OsSPL7 코딩 시퀀스를 이펙터 구조로 복제하였다(도 3B).

도 3C에서 보듯이, 35S:OsSPL7로부터의 OsSPL7의 과발현은 OsBGAL9pro:LUC 리포터 구조물에 비해 상당한 LUC 활성을 유발하였다.

[0081] 이를 통해, OsBGAL9이 전사 인자 OsSPL7에 의해 직접 조절된다는 것을 확인하였다.

[0083] 2-2. OsSPL7과 OsBGAL9 프로모터의 상호작용 확인

[0084] OsSPL7과 OsBGAL9 프로모터(서열번호 12 및 13)의 직접적인 상호작용을 확인하기 위하여, HIS 리포터 유전자를 사용하여 효모 원-하이브리드(Yeast 1 Hybrid; Y1H) 시스템을 수행하였다.

[0085] Y1H 시스템은 유전자의 DNA 결합 단백질과 DNA 시퀀스 사이의 상호작용을 조사하는 실험 기법으로, 유전자의 프로모터 영역에 특정 단백질의 결합 여부를 확인하기 위해 사용된다. OsSPL7의 전체 길이 코딩 서열은 NdeI(서열번호 14) 및 BamHI(서열번호 15) 제한효소 부위(표 3)를 포함하는 PCR 프라이머를 사용하여 증폭되었으며, pGADT7(Clontech, USA)에서 효모 GAL4 활성화 도메인을 암호화하는 서열로 인프레임에서 클로닝되어 pGADT7-OsSPL7이 생성되었다. OsBGAL9의 1,079bp 프로모터 영역을 PCR 프라이머(서열번호 6 및 7)를 사용하여 증폭하고 pHIS2 리포터 벡터(Clontech, USA)에 클로닝하여 리포터 구조물 pHIS2-OsBGAL9pro:HIS3를 생성하였다. 이를 효모 균주 AH109에 도입하여 형질전환시켰으며, 형질전환체는 30 °C에서 Trp 및 Leu(SD-Trp/-Leu)이 결여된 SD(Synthetic Defined) 배지에서 선별되었다. 양성 형질전환체의 결합 능력을 확인하기 위하여 5mM 3-AT(Amino Triazole)가 포함된 SD-Trp/-Leu/-His 배지에 스폿팅하여 결합 능력을 검사하였다. 비어 있는 pGADT7과 pHIS2-OsBGAL9pro의 조합을 포함하는 효모 세포는 음성 대조군으로 사용되었다. Y1H 실험 결과를 도 3D에 나타내었다.

[0086] 도 3D에서 보듯이, SD 배지에서 Leu, Trp 및 His가 결핍한 상황에서 3-AT(SD/-Leu/-Trp/-His/+3AT)가 존재할 때, OsSPL7이 OsBGAL9 프로모터 단편에 결합하는 것을 나타내는 형질전환체의 생장을 확인하였다.

[0087] 이를 통해, OsSPL7이 OsBGAL9 프로모터와 직접적인 상호작용을 한다는 것을 확인하였다.

표 3

[0089]

Primer name		Primer Sequence	서열번호
SPL7-NdeI	F	CCCATATGATGGAGAGTTCCAACCTGGG	서열번호 14
SPL7-BamHI	R	CGGGATCCTCAGGTATGCAGAGTCTGCT	서열번호 15
SPL7-EcorI	F	GGAATTCACATGGAGAGTTCCAACCTGGG	서열번호 16

[0091] 2-3. OsSPL7의 OsBGAL9 프로모터 HSE 결합 확인

[0092] 재조합된 OsSPL7이 OsBGAL9 프로모터의 HSE(서열번호 17 및 18)에 결합하는지 확인하기 위하여, EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay)를 수행하였다.

[0093] EMSA는 단백질과 DNA 사이의 상호작용을 조사하는 실험 기법으로, 단백질의 DNA 결합 능력을 확인하고 단백질-DNA 복합체의 형성 여부를 시각적으로 분석하기 위해 사용된다. OsSPL7의 코딩 서열은 EcoRI(서열번호 16)와 BamHI(서열번호 15) 제한효소 부위(표 3)를 포함하는 PCR 프라이머를 사용하여 증폭되었으며, pMAL-c2X 벡터 내 maltose-binding protein(MBP) 서열의 인프레임 및 하류(downstream)에 클로닝되어 *E. coli* 균주인 BL21로 형질전환시켰다. 재조합된 MBP-OsSPL7은 제조업체의 프로토콜(New England BioLabs, Korea)에 따라 amylose magnetic beads를 사용하여 정제되었다. HSE cis-elements의 3' 바이오틴(biotin)으로 표시된 프로브(서열번호 19)는 Bionics(Daejeon, Korea)에서 합성되었다. 제조사의 프로토콜에 따라 LightShift Chemiluminescent EMSA 키트(Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 DNA 겔 이동 분석을 수행하였다. MBP-OsSPL7에 융합된 재조합 OsSPL7의 존재 하에서 표지된 프로브에 대한 이동성을 도 3E에 나타내었다.

[0094] 도 3E에서 보듯이, 이동된 밴드의 강도는 비표지된 프로브가 추가됨에 따라 감소하였다. 반면, OsSPL7은 이동된 밴드의 결여에 의해 입증되는 바와 같이 HSE 단편에서 돌연변이가 있는 프로브에 결합하지 않았다.

[0095] 이를 통해, OsSPL7이 OsBGAL9 프로모터의 P-type HSE 요소에 직접 결합하여 OsBGAL9의 전사를 활성화시키는 것을 확인하였다.

- [0097] <실험예 3> OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 표현형 특성 분석
- [0098] 3-1. OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 OsBGAL9 발현 수준 측정
- [0099] OsBGAL9의 기능을 이해하기 위하여, OsBGAL9의 T-DNA 돌연변이인 Osbga19-t를 얻었으며, CRISPR/Cas9 유전자 편집을 통해 두 개의 OsBGAL9 기능 상실 돌연변이 라인(Osbga19-1, Osbga19-2)을 얻었으며, 형질 검사를 위해 두 개의 OsBGAL9 과발현 라인(OsBGAL9-OX1, OsBGAL9-OX2)을 생산하였다(도 4A 및 B). OsBGAL9 기능 상실 돌연변이 라인(Osbga19-1, Osbga19-2)에서 표적 단편의 시퀀싱 결과, 각 돌연변이에서 단일 염기의 삽입이 감지되었다. Osbga19-1은 시토신(C), Osbga19-2은 티민(T)이 삽입되었다(도 4C). 또한, Osbga19 돌연변이와 OsBGAL-OX 식물에서의 OsBGAL9 발현 수준은 Osbga19 돌연변이 식물에서 감소하였으며, OsBGAL-OX 식물에서 증가하였다(도 4D 및 E).
- [0101] 3-2. OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 OsBGAL9 표현형 특성 분석
- [0102] OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 표현형 특성을 분석하기 위하여, 조직학적 분석 및 마디 간 세포 길이를 측정하였다.
- [0103] 개화 단계에서 벼 발에서 자란 벼의 두 번째 마디에서 5 mm 두께의 조직을 FAA(37% 포르말데하이드/착색아세트산/95% 에탄올/이온 교환 수지화된 물의 50:5:10:35 부피비)에 고정하였다. 하룻 밤 동안 고정된 조직은 순차적으로 농도가 달라지는 에탄올을 이용하여 탈수처리되었다. 조직을 Paraplast Plus(Sigma, St. Louis, MO, USA)에 삽입하고, 미세 절단기를 사용하여 8~10 μ m 두께로 절단되었다. 미세 절단 조직은 0.1%(w/v) 톨루이딘 블루(toluidine blue)로 염색되었으며, Olympus BX61 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 두 번째 마디의 종단면은 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 세포 크기를 정량화하였다.
- [0104] 벼 발에서 10주령인 Osbga19-1, Osbga19-2 식물은 야생형(Wild Type) 대조군인 동진(DJ) 품종과 비교하여 왜소한 표현형을 나타내었다(도 5A 및 B). 이는 T-DNA 삽입 기능 상실 돌연변이인 Osbga19-t 식물에서 관찰한 것과 유사한 결과를 나타내었다(도 6A 및 B). 반면, OsBGAL-OX 식물은 식물의 높이가 증가하였다(도 5A 및 B). 식물의 높이가 감소하였듯이, OsBGAL9-OX 및 DJ 식물에 비해 Osbga19 돌연변이(Osbga19-1, Osbga19-2) 식물에서 마디 간 길이가 크게 감소하였다(도 5C 및 D). 이와 같이, Osbga19-t 식물에서 야생형 대조군인 화영(HY)과 비교하여 마디 간 길이가 감소하였다(도 6C 및 D). DJ, OsBGAL9-OX 및 Osbga19 돌연변이 식물의 두 번째 마디의 종단면을 제조하여 세포 크기를 측정하였다. OsBGAL9-OX는 두 번째 마디에서 평균 세포 길이가 9~14% 증가하였으며, Osbga19-1 및 Osbga19-2는 평균 세포 길이가 30~37% 감소하였다(도 5E 및 F). 이와 마찬가지로, Osbga19-t 식물은 HY와 비교하여 두 번째 마디의 평균 세포 길이가 45.9% 감소하였다(도 6E 및 F).
- [0105] 이를 통해, OsBGAL9가 마디 간 조직의 세포 신장에 중요한 역할을 하며, OsBGAL9 과발현 및 기능 상실 식물에서 식물 높이를 변화하게 만든다는 점을 확인하였다.
- [0107] <실험예 4> OsBGAL9 발현 패턴 분석
- [0108] 4-1. OsBGAL9의 시간적 및 공간적 발현 패턴 분석
- [0109] OsBGAL9의 시간적 및 공간적 발현 패턴을 조사하기 위하여, OsBGAL9 프로모터(서열번호 12 및 13)의 제어 하에 β -GLUCURONIDASE(GUS)를 발현하는 형질전환 벼 식물의 조직화학적 염색을 수행하였다. GUS PCR 프라이머를 서열번호 21 및 22에 나타내었다.
- [0110] GUS 분석은 유전자 발현의 위치와 수준을 조사하기 위한 표지자 분석 방법 중 하나로, GUS 유전자를 원하는 유전자의 프로모터 영역과 연결하여 전사 활동을 나타내는 GUS 효소의 활성을 측정한다. OsBGAL9pro:GUS 구축물은 변형된 pCambia1300-Gateway-GUSplus 벡터에서 GUS의 상류 OsBGAL9의 시작 코돈 업스트림 1.9-kb 프로모터(서열번호 20) 영역을 클로닝하여 얻었다. 생성된 플라스미드는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 매개 형질전환을 사용하여 벼에 도입되었다. T3 동형접합 계통은 모든 자손의 하이그로마이신(hygromycin) 내성에 기초하여 선택되었다. 8주 된 식물의 조직을 수확하고 얼음 위의 90%(v/v) 아세톤에서 30분 동안 배양하고 실온에서 10분 동안 진공 상태에 두었으며, GUS 염색 분석으로 분석하였다.
- [0111] GUS 염색 분석 결과, 개화 단계의 벼에서 마디 간 조직에서 강한 GUS 신호를 감지하였으나, 2주된 벼에서는 감지하지 못하였다(도 7A 및 B). GUS 및 OsBGAL9의 역전사 정량적 PCR(RT-qPCR) 분석을 수행하였으며, 수행 결과

OsBGAL9는 줄기 신장 동안 우선적으로 발현되며 이는 OsBGAL9 과발현 및 기능 상실 돌연변이에서 관찰된 식물 높이의 차이를 유발한다(도 7C).

[0113] 4-2. OsBGAL9의 생물학적 및 비생물학적 스트레스 반응 분석

[0114] OsSPL7이 생물학적 및 비생물학적 스트레스 반응에서 기능을 수행하므로, OsSPL7 및 OsBGAL9의 잠재적 공동 발현을 조사하였다. OsBGAL9pro:GUS 리포터가 있는 2주 된 벼를 저온(4 °C), 고온(42 °C) 및 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae*) 감염과 같은 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 노출시킨 후, OsSPL7 및 OsBGAL9의 발현을 측정하였다.

[0115] 벼를 비생물학적 스트레스에 노출시키기 위하여, 절반 강도의 MS(Murashige 및 Skoog) 배지에서 발아된 20개의 동형접합 OsBGAL9 과발현 및 Osbgal9 기능상실 식물을 비생물적 스트레스 처리를 위해 현장 조건으로 옮겨졌다. 내열성 평가를 위하여, 3주령 벼는 상대 습도가 높은(> 90%) 생장실에서 42 °C로 24시간 동안 노출되었으며, 1주 동안 회복을 위해 현장 조건에서 유지되었다. 내한성을 평가하기 위하여, 3주령 벼는 4 °C에서 72시간 동안 노출되었으며, 회복을 위해 현장 조건에서 유지되었다. 생존율을 1주 후에 생존하는 식물체의 수를 기준으로 계산하였다. 유전자형당 3개의 생물학적 복제물이 사용되었다.

[0116] 비생물학적 스트레스에 벼를 노출시킨 결과, 비생물학적 스트레스에 노출된 벼에서 GUS 활성이 증가하였으며, 대조군 벼에서는 GUS 활성이 관찰되지 않았다(도 7D). 또한, 비생물학적 스트레스에 노출된 벼에서 OsBGAL9 및 OsSPL7의 발현이 대조군에 비해 증가하였다(도 7E).

[0117] 벼를 생물학적 스트레스에 노출시키기 위하여, 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae*) P06-6 균주는 한천배지(V8 Juice medium, 80 mL/L)(Campbell's Soup Company, Camden, NJ)에서 배양한 후, 되고 이를 사용하여 벼 도열병 접종을 수행하였다. 지속적인 형광등 아래에서 2주 동안 배양한 후, 포자들을 수집하여 포자 농도가 5×10^6 mL⁻¹에 도달할 때 까지 물에 현탁시켰다. 5주령 상처난 벼의 잎에 포자 현탁액을 접종하여 스팟 접종하였다. 접종 10일(DPI, Days Post-Inoculation) 후, 잎 샘플을 채취하여 사진을 찍었으며, 질병 병변의 길이(갈색 영역)는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 측정되었다.

[0118] 생물학적 스트레스에 벼를 노출시킨 결과, 생물학적 스트레스에 노출된 벼에서 GUS 활성이 증가(도 7F)하였으며, OsBGAL9 및 OsSPL7의 발현이 대조군에 비해 증가하였다(도 7G).

[0119] OsSPL7이 없을 경우 생물학적 및 비생물학적 스트레스에 대한 OsBGAL9 발현의 유도가 현저히 감소하였으며, OsSPL7의 과발현은 OsBGAL9의 발현을 촉진하였다(도 8A). 반면, OsBGAL2 및 OsBGAL4와 같은 다른 BGAL은 스트레스 처리에 대한 발현에 거의 또는 전혀 변화가 없었다(도 8B).

[0120] 이러한 결과는 OsBGAL9가 정상적인 생장 조건에서는 주로 줄기 내에서 발현되고, 극한 온도와 병원체 공격 시에는 전체 식물체에서 발현되는 이중 발현 모드를 나타내는 것을 의미한다.

[0122] <실험예 5> OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 생물학적 및 비생물학적 스트레스 반응 분석

[0123] OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 생물학적 및 비생물학적 스트레스 반응을 분석하기 위하여, OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 벼를 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae*) 또는 흰잎마름병균(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(Xoo))에 감염시켰으며 저온(4 °C) 또는 고온(42 °C)에 노출시켰다.

[0124] 벼를 생물학적 스트레스에 노출시키기 위하여, 벼 도열병균(*Magnaporthe oryzae*) 또는 흰잎마름병균(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(Xoo))에 감염시켰으며, 벼 도열병균 감염은 상기 실험예 4-2와 동일하게 수행하였다. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*(Xoo) PX099 균주는 펩톤 자당 한천배지(10 g/L sucrose, 10 g/L peptone, 1 g/L L-glutamate, 15 g/L agar, pH 6.8)에서 배양하고, 멸균수에 현탁하여 OD₆₀₀이 0.6에 도달하게 하였다. 5주령 벼를 접종하기 위하여, 잎 자르기 방법을 사용하였으며 Xoo 감염의 성공 여부는 물에 젖은 병변의 길이를 기준으로 평가되었으며, 이는 12일(DPI) 후에 관찰되고 측정되었다.

[0125] 생물학적 스트레스에 OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 벼를 노출시킨 결과, 벼 도열병균(*M. oryzae*) 접종 후 10일(DPI)에서 OsBGAL9-OX 식물은 향상된 저항성을 보인 반면, Osbgal1 식물은 대조군인 DJ에 비해 벼 도열병균에 더 취약하였다(도 9A 및 B). 이와 유사하게, 흰잎마름병균(Xoo) 접종 후 10일(DPI)에서 OsBGAL9-OX 식물은 물에 젖

은 병변의 길이가 더 짧았고, Osbga19 식물에서는 더 길었다(도 9C 및 D). 또한, Osbga19-t 식물을 벼 도열병균 (*M. oryzae*) 또는 흰잎마름병균(*Xoo*)에 감염시킨 결과, 대조군인 HY에 비하여 벼 도열병균에 취약하였으며, 흰 잎마름병균 감염에 의한 물에 젖은 병변의 길이가 더 길었다(도 10A 내지 D).

[0126] 이를 통해, OsBGAL9가 벼 도열병균(*M. oryzae*) 및 흰잎마름병균(*Xoo*)에 대한 저항성을 향상시키는데 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

[0127] 비생물학적 스트레스인 저온(4 ℃) 또는 고온(42 ℃)에 노출은 상기 실험에 4-2와 동일하게 수행하였으며, 비생물학적 스트레스에 OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 벼를 노출시킨 결과, 저온 노출 후 1주일 동안 OsBGAL9-OX 식물은 DJ에 비해 생존율이 현저히 높았다. 반면, Osbga19 식물은 소수의 벼만 생존하였다(도 11 A 및 C). 고온 노출 후 1주일 동안 Osbga19-1 및 Osbga19-2 식물은 심한 시들림과 엽록소 결핍이 나타났다(도 11B 및 D). 이와 마찬가지로, Osbga19-t 식물을 저온(도 12A 및 C) 또는 고온(도 12B 및 D)에 노출시켰을 경우 HY보다 저온 및 고온 스트레스에 더 큰 민감도를 보였다.

[0128] 이를 통해, 증가된 OsBGAL9 발현이 저온 및 고온 스트레스에 대한 내성을 향상시킨다는 것을 확인하였다.

[0130] <실험예 6> OsBGAL9의 세포내 지역화 분석

[0131] OsBGAL9의 세포내 지역화를 분석하기 위하여, 35S:OsBGAL9-GFP 도입유전자를 품고 있는 형질전환 식물에서 OsBGAL9-GFP(Green Fluorescent Protein, 녹색 형광 단백질) 융합과 관련된 GFP 신호를 추적하여 OsBGAL9의 세포내 지역화를 조사하였다.

[0132] OsBGAL9의 세포내 지역화를 분석하기 위하여, 종결 코돈이 결여된 OsBGAL9의 전체 길이 코딩 서열을 PCR 프라이머(서열번호 6 및 7)를 사용하여 증폭하고 pENTR™/D-TOP0™ 벡터(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)에 클로닝하였다. OsBGAL9 cDNA는 시퀀싱에 의해 확인되었고 Gateway LR Clonase(Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA)를 사용하여 C 말단에 위치한 GFP 태그와 함께 바이너리 대상 벡터 pH7FWG2로 재조합되었다. OsBGAL9-GFP 구조체는 아그로박테리움-매개 형질전환에 의해 벼 캘러스(callus)로 형질전환되었다. 공초점 현미경(LSM510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany)을 사용하여 OsBGAL9의 세포내 지역화를 관찰하였으며, GFP 형광은 488 nm에서 들뜨고 490-540nm(GFP 패널)에서 대역 통과 필터로 검출되었다.

[0133] OsBGAL9의 세포내 지역화 분석을 한 결과, 뿌리 표피 세포의 경계에서 GFP 형광을 감지하여 원형질막 또는 세포벽 지역화를 측정하였다. OsBGAL9의 지역화를 명확히 하기 위하여, 공초점 스캐닝 전에 15분 동안 30%(w/v) 자당 용액에서 벼를 배양하여 원형질 분해를 유도하였다. GFP 신호는 세포벽에 남아있는 반면, 원형질막은 수축되어 세포벽에서 떨어져나갔다(도 13). 이는 OsBGAL9가 세포벽에 국한된 단백질임을 의미한다.

[0135] <실험예 7> 재조합 OsBGAL9, OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 Bgal 활성 확인

[0136] 7-1. 재조합 OsBGAL9 생성

[0137] OsBGAL9이 BGAL임을 확인하기 위하여, 재조합 OsBGAL9를 생산하여 in vitro 활동 분석을 수행하였다.

[0138] 대장균(*Escherichia coli*)과 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)에서 재조합된 OsBGAL9를 생산하는 것은 실패하였으나, HEK293 세포에서 분비형으로 신호 펩타이드가 없는 재조합된 OsBGAL9(아미노산 27-673)를 성공적으로 생산하였다. OsBGAL9 코딩 서열은 단백질 분비를 위한 쥐 Igκ 체인 리더 서열과 C-말단 myc 에피토프(epitope)/6 탠덤(tandem) 히스티딘 태그 사이에 인프레임으로 클로닝되었다. 이는 pSecTag2 포유 동물 발현 벡터(Invitrogen, MA, USA)에 삽입되었다. OsBGAL9 발현 구조물은 제조업체의 규정에 따라 FreeStyle 293 발현 시스템(Invitrogen)을 사용하여 HEK293 세포에 전사되었다. 5일 동안 배양한 후, 배양액을 니켈 수지 칼럼에 통과시켜 분비된 재조합 OsBGAL9를 정제하였다. 정제된 단백질은 SDS-PAGE와 Coomassie Brilliant Blue 염색을 통해 확인되었다(도 14A).

[0140] 7-2. 재조합 OsBGAL9의 Bgal 활성 분석

[0141] 생성한 재조합 OsBGAL9의 Bgal 활성을 분석하기 위하여, 두 가지 전형적인 합성 Bgal 기질인 X-Gal(5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactoside)과 ONPG(ortho-Nitrophenyl-β-galactoside)로 활성 분석을 수행하였다.

X-Gal은 Bgal 효소가 이를 분해할 때 파란색 생성물을 형성하며, ONPG은 Bgal 효소가 이를 분해할 때 노란색 생성물을 형성한다. 따라서, X-Gal과 ONPG을 Bgal의 기질로 사용하면 Bgal의 활성을 시각적으로 확인할 수 있다.

[0142] 용액 내 활성 분석을 위해 반응 혼합물(100 μ l)은 10 μ g 재조합 OsBGAL9, 100 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0) 및 0.5 mM X-Gal 또는 1 mM ONPG를 기질로 포함하였다. 대조군 반응은 OsBGAL9 대신에 HEK293 세포에서 생성된 정제된 재조합 OsXOAT12를 사용하였다. 37 °C서 20분 동안 반응 혼합물을 배양한 후, 반응 혼합물의 색상 변화를 평가하였다.

[0143] 합성 Bgal 기질인 X-Gal과 ONPG을 사용하여 OsBGAL9의 Bgal 활성을 분석한 결과, 재조합 OsBGAL9가 각각 특징적인 파란색과 노란색 생성물 형성하였으므로 같이 두 기질을 분해할 수 있음을 확인하였다. 반면, 대조군인 재조합 OsXOAT12은 어떠한 색상변화도 관찰되지 않았으므로, 두 기질을 분해하지 않았음을 확인하였다(도 14B).

[0144] 생성한 재조합 OsBGAL9의 Bgal 활성을 분석하기 위하여, in-gel 활성 분석을 수행하였다. in-gel 활성 분석은 단백질의 효소 활성을 측정하는 기술 중 하나이며, 전기영동을 통해 단백질을 분리한 후, 겔 내에서 특정 기질 또는 효소 활성을 확인하는 것을 의미한다.

[0145] in-gel 활성 분석은 clear-native PAGE를 사용하여 수행한 다음 X-Gal 기질과 함께 배양하였다. 정제된 재조합 OsBGAL9(15 μ g)를 대조군인 재조합 OsXOAT12와 함께 4 °C에서 겔 러닝 버퍼(50 mM Bis-Tris, 50 mM tricine, pH 7.0)를 사용하여 native PAGE 4-16% Bis-Tris 겔(Invitrogen)에서 실행되었다. 겔을 100 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)에서 간단히 행구고 Bgal 활성을 검출하기 위해 0.5 mM X-Gal을 함유하는 동일한 완충액에서 1시간 동안 배양하였다. In-gel 활성 이미지를 기록한 후, 동일한 완충에 동일한 겔을 Coomassie Brilliant Blue로 단백질에 대해 염색하였다. 3개의 개별 형질감염을 수행하였으며, 이러한 형질감염으로부터 정제된 재조합 OsBGAL9는 활성 분석을 위한 생물학적 복제물로 사용되었으며 대표적인 이미지가 제시되었다.

[0146] in-gel 활성 분석을 수행하여 OsBGAL9의 Bgal 활성을 분석한 결과, OsBGAL9 단백질 밴드가 X-Gal 기질에 대해 Bgal 활성을 나타내는 것을 확인하였다(도 14C).

[0148] 7-3. OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 Bgal 활성 분석

[0149] OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 Bgal 활성을 분석하기 위하여, 벼에서 단백질을 추출하여 Bgal 활성을 분석하였다.

[0150] 두 번째 마디 또는 잎에서 수집한 약 2 g의 조직을 액체 질소로 분쇄하였다. 분쇄한 분말을 50 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 4.5), 1M 염화나트륨 및 1X 프로테아제 억제제(Sigma, Mannheim, Germany) 용액에 첨가되고 얼음 위에서 1시간 동안 두었다. 그 후, 20분 동안 4 °C, 3,220 RCF에서 원심분리한 후, 상층액을 Amicon Ultra 원심 여과 장치(Millipore)로 옮겨서 4 °C, 3,220 RCF에서 10분 동안 원심분리하여 흐름을 제거하였다. 제거 후, 10 mL 20 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 5.0)을 첨가하여 컬럼을 세척하고 20분 동안 4 °C, 3,220 RCF에서 원심분리하였다. 마지막으로 프로테아제 억제제 용액이 포함된 10 mL 20 mM 아세트산나트륨 완충액(pH 5.0)과 Amicon Ultra 필터 장치에 남아 있는 액체 2mL를 4 °C, 3,220 RCF에서 5분 동안 원심분리한 후 수집하였다. 단백질의 총량은 Bradford(1976)에 따라 Bradford assay(Thermo fisher Scientific, Korea)로 정량하였다. Bgal 활성은 ONPG를 기질로 사용하여 측정하였다. 반응 혼합물은 400 μ l의 20 mM 소듐 아세테이트 완충액(pH 5.0), 500 μ l의 2 mM 기질 및 100 μ l의 단백질 추출물(100 μ g/mL)을 포함하였다. 이러한 반응 혼합물은 37 °C에서 60분 동안 배양되었다. 0.5 M 탄산나트륨 500 μ l를 첨가하여 반응을 정지시켰으며, 흡광도는 420 nm에서 측정되었다.

[0151] 합성 Bgal 기질인 ONPG을 사용하여 OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 Bgal 활성을 분석한 결과, OsBGAL9-OX 식물은 DJ 식물과 비교하여 마디 간에서 ONPG에 대해 50% 더 높은 Bgal 활성을 보인 반면, Osbgal9 식물은 DJ와 비교하여 약 70% 감소를 보였다(도 14D). 그러나 잎에서 Bgal 활성은 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물 모두 DJ 보다 더 높은 활성을 나타냈으므로 OsBGAL9 발현과 상관관계가 없었다(도 14D). 이와 유사하게, Osbgal9-t 식물은 대조군인 HY와 비교하여 식물의 마디 간에서 Bgal 활성이 감소(도 15A)하였으며, 잎에서 Bgal 활성이 증가(도 15B)하였다.

[0152] OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물의 잎에서 모든 Bgal의 발현 수준을 측정하였으며, 그 결과 DJ에 비해 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물의 잎에서 OsBGAL1, OsBGAL3, OsBGAL6 및 OsBGAL7의 발현이 증가하였으며 OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물의 잎에서 ONPG에 대한 더 높은 활성이 나타났다(도 16). 이를 통해, 잎에서 Bgal의 활성이 DJ보다 높게 나타난 이유가 다른 BGAL 유전자의 발현 때문인 것을 확인하였다.

[0154] <실험예 8> OsBGAL9 기능 상실 및 과발현 식물의 세포벽 구성에 따른 BGAL9 활성 확인

[0155] 8-1. 자일로글루칸 올리고머에 대한 OsBGAL9 활성 분석

[0156] 자일로글루칸 올리고머(xyloglucan oligomer)는 세포벽에서 발견되는 다당체 성분이며, “X”는 자일로스-치환된 G를 나타내며, L은 갈락토스-자일로스-치환된 G를 나타낸다.

[0157] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 BGAL 중 하나인 AtBGAL10이 자일로글루칸 올리고머 XLLG의 비환원 말단에서 두 번째 치환된 글루코스(G)에 위치한 갈락토스 잔기를 가수분해 할 수 있으므로, 이와 유사한 OsBGAL9가 가수분해 활성을 가지는지 확인하기 위하여 *Arabidopsis mur2(murus 2)* 돌연변이에서 추출한 자일로글루칸을 endo- β -1,4-glucanase(E-CELTR, Megazyme, Wicklow, Ireland)로 분해하여 제조한 XXXG, XLXG/XXLG 및 XLLG를 포함하는 자일로글루칸 올리고머 혼합물과 제조한 OsBGAL9를 배양하였다.

[0158] 자일로글루칸 올리고머에 대한 OsBGAL9 활성을 분석하기 위해 반응 혼합물(40 μ L)에는 100 mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0), 제조한 OsBGAL9 10 μ g 및 자일로글루칸 올리고머 10 μ g이 포함되어 있다. 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양한 후, 반사 모드에서 Bruker Autoflex ToF 질량 분석기(Billerica, MA, 미국)를 사용하여 MALDI-TOF(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) 질량 분석법으로 반응 혼합물 내 자일로글루칸 올리고머의 질량을 분석하였다. 스펙트럼은 적어도 500회 레이저 샷의 평균이었다. 자일로글루칸 올리고머는 *Arabidopsis mur2(murus 2)* 돌연변이에서 추출한 xyloglucan을 endo- β -1,4-glucanase로 분해하여 준비하였다.

[0159] 질량 분석기를 사용하여 질량 스펙트럼을 조사한 결과, 열 변성 제조한 OsBGAL9(대조군)와 제조한 OsBGAL9와 함께 배양된 샘플을 비교하였을 때, XLG(m/z 1247) 및 XLLG (m/z 1409)에 해당하는 질량의 상대 신호 강도에 유의한 차이가 없음을 확인하였다(도 17).

[0160] 이를 통해, 자일로글루칸의 갈락토스 잔기가 OsBGAL9의 표적이 될 가능성이 없음을 확인하였다.

[0162] 8-2. 갈락토스 잔기에 대한 OsBGAL9의 활성 분석

[0163] 갈락토스(galactose) 잔기는 다른 세포벽(세포벽 중 pectic galactan으로 구성된 rhamnogalacturonan I(RG-I) 및 AGP)에도 존재한다. 따라서, OsBGAL9의 갈락토스 잔기에 대한 가수분해 활성 대상을 더 자세히 조사하기 위하여, OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물의 두 번째 마디를 사용하여 LM5, LM26(for β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked in pectic RG-I side chain) 및 JIM16(for β -(1 $\rightarrow$ 4)-linked in pectic RG-I side chain)과 같은 여러 단일 클론 항체로 면역 표지 분석을 수행하였다.

[0164] 7주령 DJ, OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물의 두 번째 마디를 수집하여, 1~3 mm의 작은 조각을 자르고 60분 동안 진공 침투 후, 고정 용액(1.6%(w/v) 파라포름알데히드(paraformaldehyde), 0.2%(w/v) 글루타르알데히드(glutaraldehyde), 1%(v/v) 트립톤(Triton X-100) in 25 mM 인산 완충액(sodium phosphate buffer))에 4 $^{\circ}$ C, 24시간 동안 두었다. 샘플을 25 mM 인산 완충액(pH 7.1)으로 3회 세척한 후, 물로 세척하였다. 샘플을 순차적으로 농도가 달라지는 에탄올을 이용하여 탈수하고, 자일렌(xylene)으로 제거하고, 파라핀(paraffin)에 포매하였다. 조직 단면(20 μ m)을 파라핀 슬라이서(RM2265, Leica)로 절단하였다. 마지막으로, 마지막으로 100% 자일렌, 자일렌:에탄올(1:1, v/v), 에탄올(100, 95, 85, 70, 50, 30%(v/v)) 순으로 탈왁스를 5~10분 동안 수행하였다.

[0165] 단면을 3%(w/v) 무지방 분유를 함유하는 1X 인산나트륨 완충액(PBS, pH 7.1)에서 30분 동안 차단하고, 실온에서 60분 동안 LM5, LM26 또는 JIM16(Agrisera, Sweden)과 함께 배양하였다. 단면을 PBS(pH 7.1)로 최소 3회 세척하고 이차 Fluor 488 항-쥐 항체(Thermo Fisher Scientific)와 함께 배양하였다. 단면을 PBS로 여러 번 세척한 후, 증류수로 추가로 세척하고 건조 후 봉입제(CitiFluor™ AF1, Germany)를 이용하여 대비염색되었다. 488nm로 자극되는 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Olympus FV3000, Tokyo, Japan)을 사용하여 형광 이미지를 얻었다.

[0166] 도 18에서 VB(Vascular Bundle)는 혈관 다발을 의미하고, Epi는 표피를 의미한다. DJ, OsBGAL9-OX 및 Osbgal9 식물의 혈관 다발 및 표피에서 LM5 및 LM26의 수준은 유사하게 나타났다. 그러나 JM16에 대한 표지는 Osbgal9에서 증가하고 OsBGAL9-OX에서는 DJ에 비해 감소하였다(도 18). 또한, Osbgal9-t 식물에서도 LM5 및 LM26의 수준은 유사하였으나, JM16에 대한 표지는 대조군인 HY에 비해 증가하였다(도 19).

[0168] **8-3. 아라비노갈락톤 단백질(AGPs)에 대한 OsBGAL9 활성 분석**

[0169] AGPs(Arabinogalactan Proteins)는 식물 세포의 매트릭스에서 원형질막 고정 또는 세포외 분비 단백질로 발견되는 하이드록시프롤린(Hyp)이 풍부한 당단백질 계열으로, 탄수화물 사슬과 연결되어 있다. AGPs는 세포 성장 및 발달에 중요한 역할을 한다.

[0170] OsBGAL9의 세포벽에 존재하는 AGPs에 대한 활성을 조사하기 위하여, AGPs를 분포 및 정량화하는 데 널리 사용되는 화학 물질인 β -D-glucosyl Yariv 시약(β -GlcY) 및 β -D-glucosyl Yariv 시약(β -GalY)로 염색하여 분석하였다.

[0171] 개화 단계에 있는 DJ, OsBGAL9-OX 및 Osbga19 식물의 두 번째 마디의 횡단면을 사용하였다. 손으로 자른 절편을 β GlcY(2 mg/mL β -D-glucosyl in 0.15 M NaCl)(Biosupplies Australia, Cat#100-2) 및 시약 β GalY(2 mg/mL β -D-galactosyl in 0.15 M NaCl)(Biosupplies Australia, Cat#100-8a)에서 60분 동안 실온 배양하고, 증류수로 3회 세척하였다. 그 후, Olympus BX61 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 사진 촬영을 하였다.

[0172] AGPs에 대한 OsBGAL9의 활성을 분석한 결과, Osbga19 식물의 줄기 부분에서 AGPs가 상당히 증가하고 OsBGAL9-OX 식물에서는 감소한 것을 확인하였다(도 20). 이와 유사하게, Osbga19-t 식물에서 대조군인 HY에 비하여 AGPs가 증가한 것을 확인하였다(도 21).

[0174] DJ, OsBGAL9-OX 및 Osbga19 식물의 세포벽 알코올 불용성 잔류물(Alcohol Insoluble Residue, AIR) 분획을 기체-액체 크로마토그래피로 분석하였다.

[0175] DJ, OsBGAL9-OX 및 Osbga19 식물의 두 번째 마디 조직으로부터 얻은 냉동 시료를 액체 질소 아래에서 분쇄하고, 균질화기(Polytron homogenizer);를 사용하여 70%(v/v) 에탄올에 3회 현탁시켰다. AIR은 10,000 g에서 5분 동안 원심분리하여 수집하고, 무수 에탄올과 100% 아세톤을 사용하여 순차적으로 세척하였다. 최종 잔류물을 진공 오븐에서 60 °C로 건조시켰다. 세포벽 중성 당(알디톨 아세테이트)을 정량하기 위하여, AIRs 5 mg를 70% 황산 용액과 30분 동안 실온에서 반응시킨 후, 내부 표준으로 이노시톨(inositol)을 첨가하고 최종 농도 6%(v/v) 황산이 되도록 물로 희석하였다. 105 °C에서 120분 동안 가열한 후, 25%(w/v) 암모늄 용액으로 처리하였다. DMSO에서 수소화붕소나트륨(sodium borohydride)으로 환원시킨 후, 용액을 40 °C에서 90분 동안 가열하고 빙초산, 무수초산, 1-메틸이미다졸, 디클로로메탄 및 물로 순차적으로 처리하였다. 가수분해된 세포벽 당의 알디톨 아세테이트를 포함하는 유기층을 물로 3회 세척한 후, 당을 30 m $\times$ 0.25 mm (i.d.) 실리카 모세관 칼럼 DB 225(Alltech Assoc., Deerfield, IL, USA)가 장착된 기체-액체 크로마토그래피(model 6890; Hewlett-Packard)를 사용하여 분석하였다.

[0176] 기체-액체 크로마토그래피를 사용하여 당을 분석한 결과, DJ, OsBGAL9-OX 및 Osbga19 식물의 세포벽 알코올 불용물 잔류물(AIR) 분획물에서 당 함량(glucose, galactose, arabinose 및 xylose)에는 유의한 차이가 발견되지 않았다(도 22).

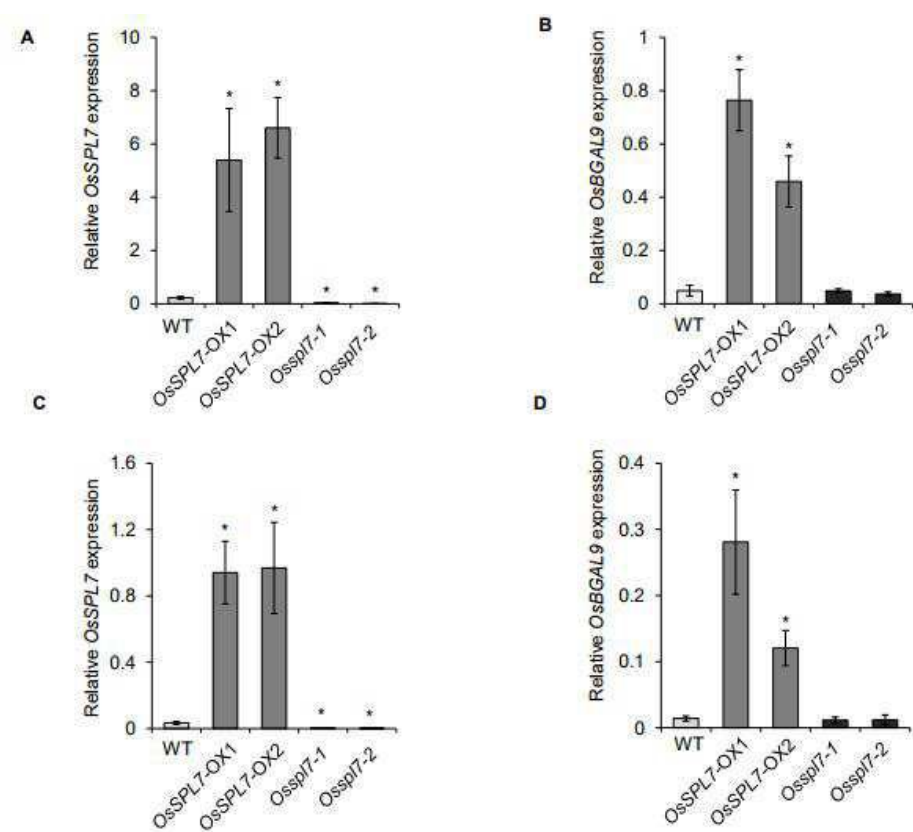
[0177] 이를 통해, OsBGAL9가 AGPs의 galactose 잔기를 가수분해하는데 기능하고 있음을 확인하였다.

[0178] 상기와 같은 결과를 통해, OsBGAL9가 AGPs의 구성을 변형시키지만 펙틴이나 자일로글루칸에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다. OsBGAL9 기능의 손실은 AGP 글리칸의 축적과 관련된 감소된 줄기 성장 표현형으로 이어졌으며, 두 번째 마디 간 세포벽 당 구성 요소에서 Osbga19 돌연변이는 유의미한 변화를 나타내지 않았다. 이는 OsBGAL9가 세포벽 생합성에서 중요한 역할을 하지 않는 반면, AGP의 변형이 세포 신장에 중요하다는 것을 의미한다. 이를 통해, 아라비노갈락탄(arabinogalactan)이 산화적 가교결합에 의한 세포벽의 경직화에 관여할 수 있다는 점에서 온도 스트레스에 대한 OsBGAL9-OX 및 Osbga19의 변경된 내성에 영향을 미쳤다는 것을 의미한다.

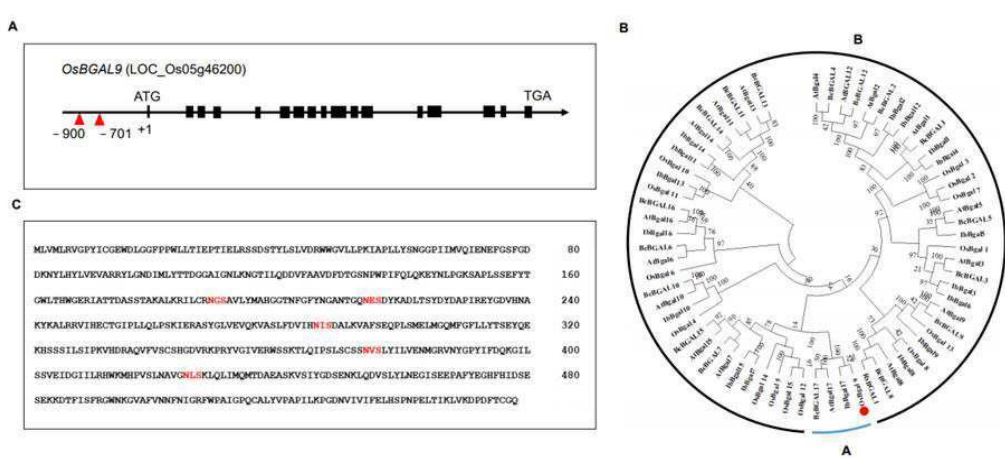
[0180] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예, 실험예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

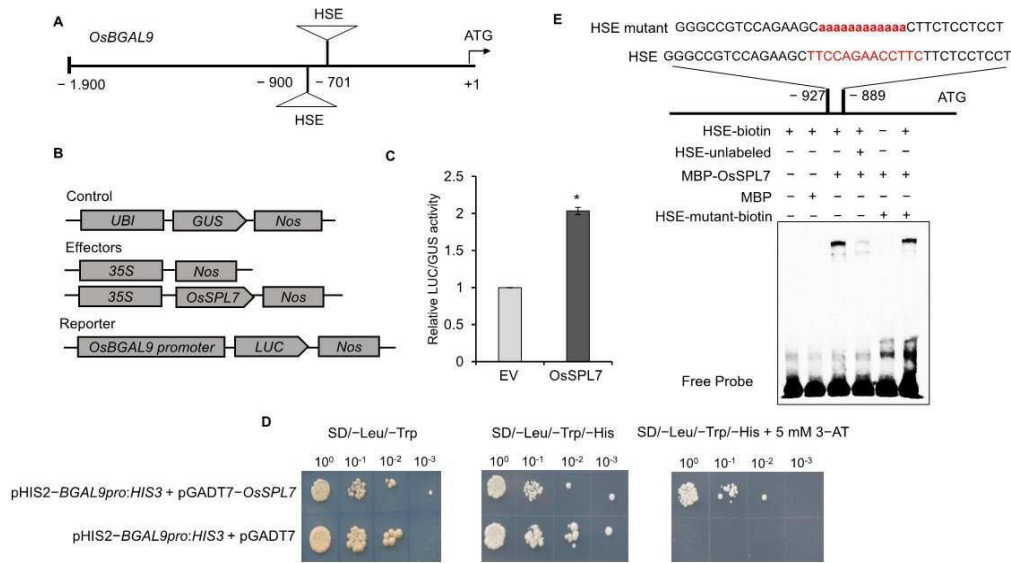
도면1



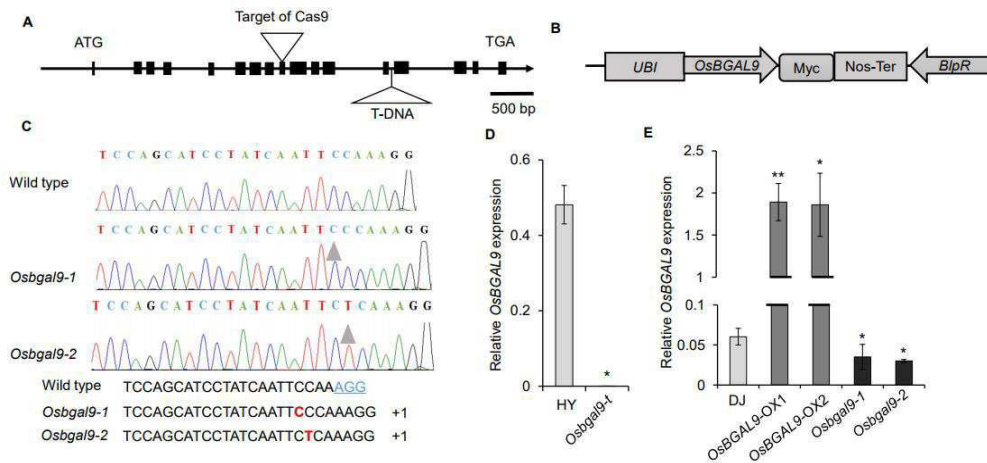
도면2



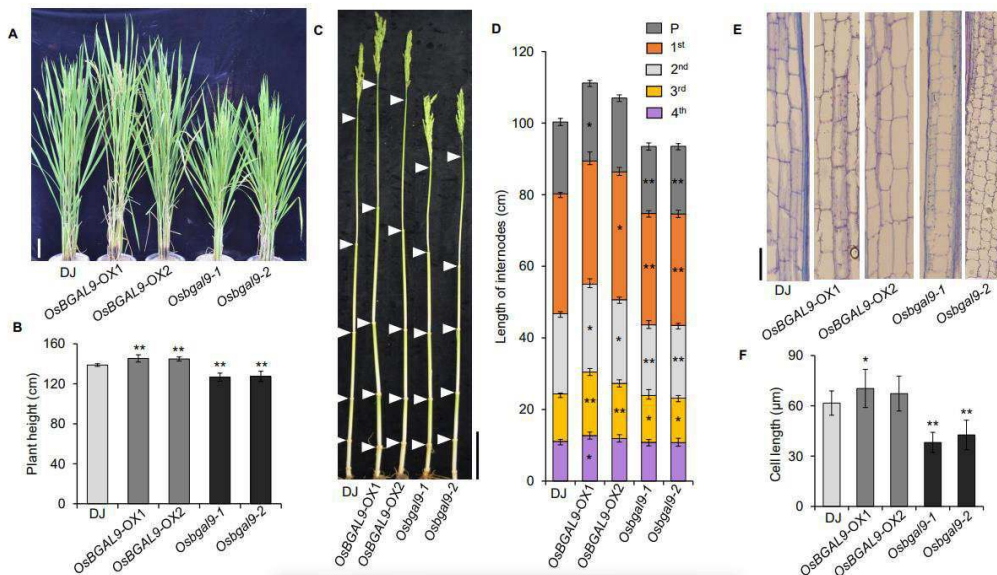
도면3



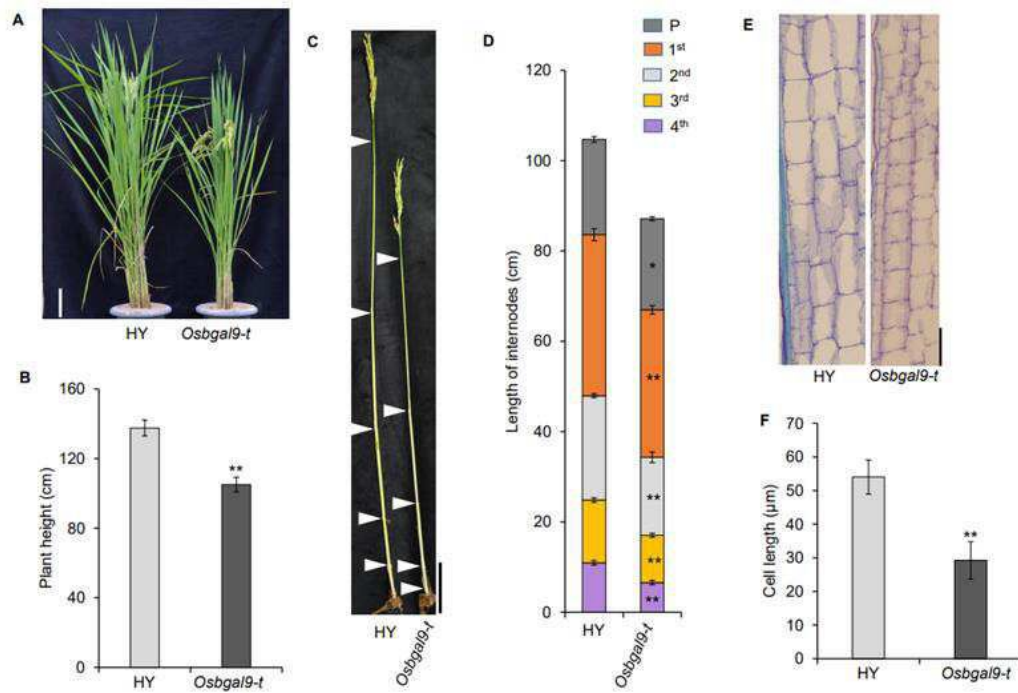
도면4



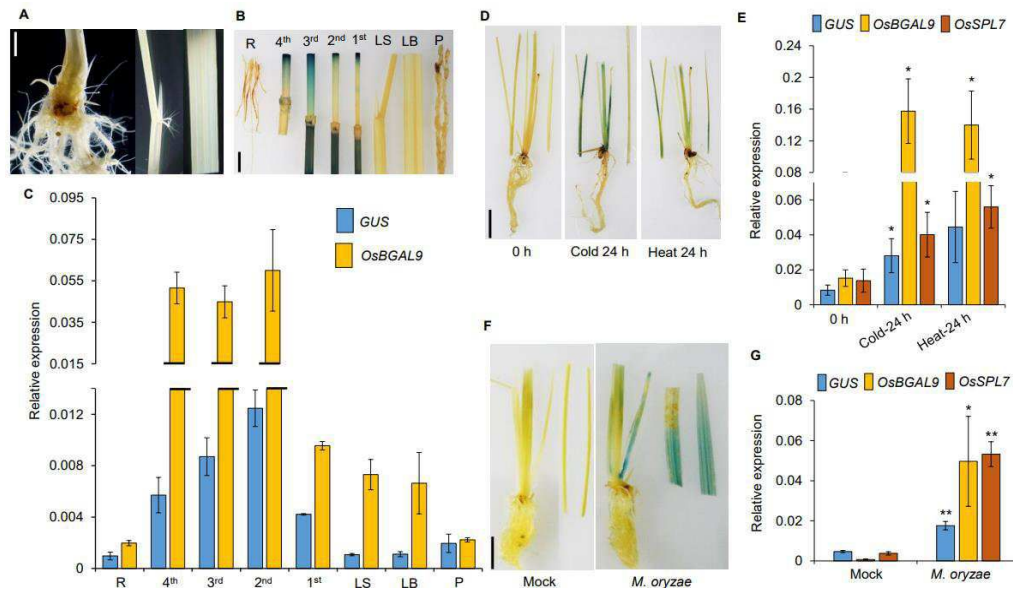
도면5



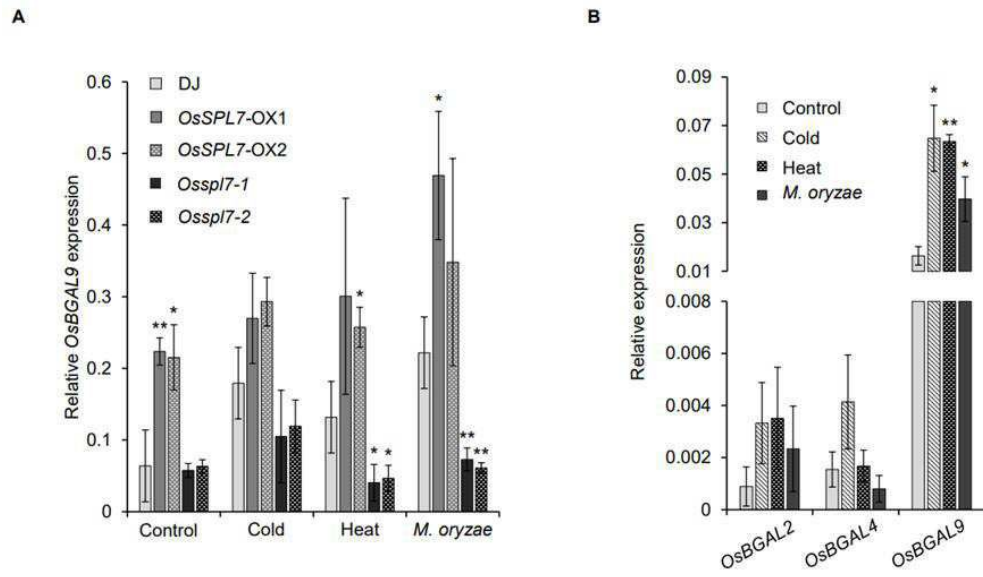
도면6



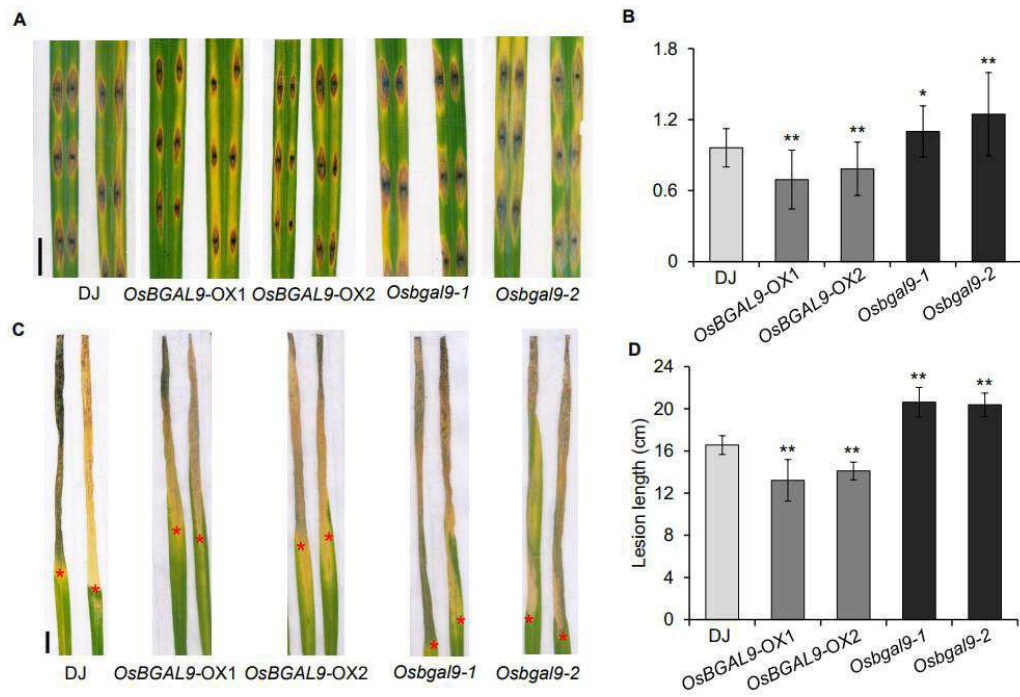
도면7



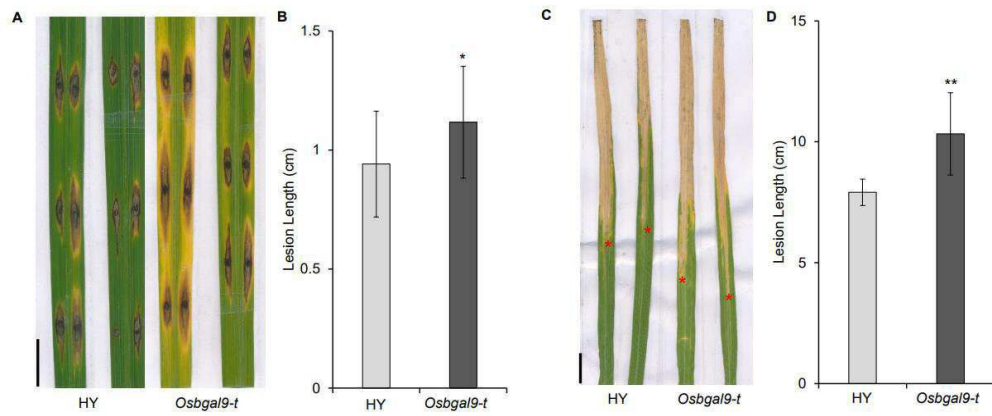
도면8



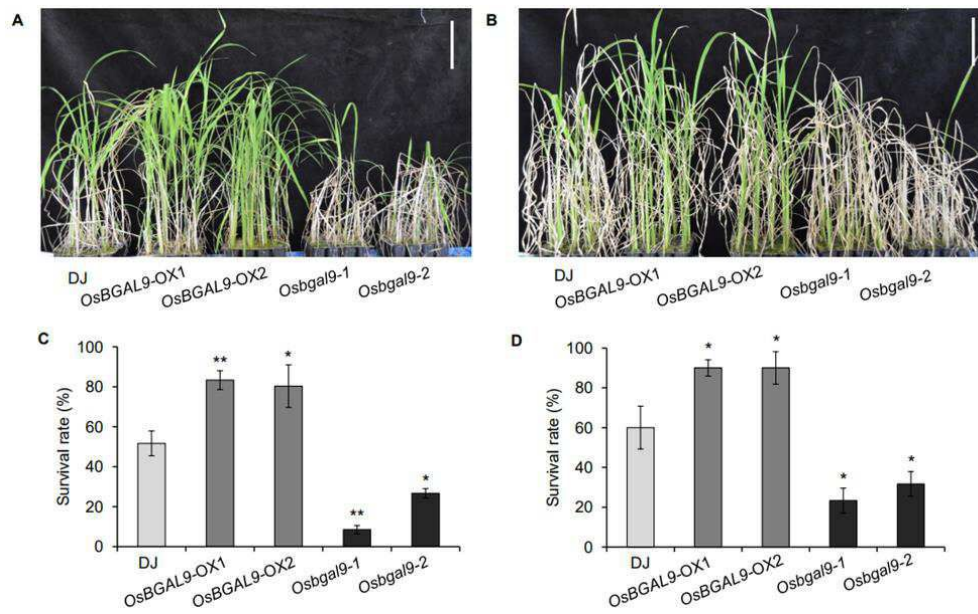
도면9



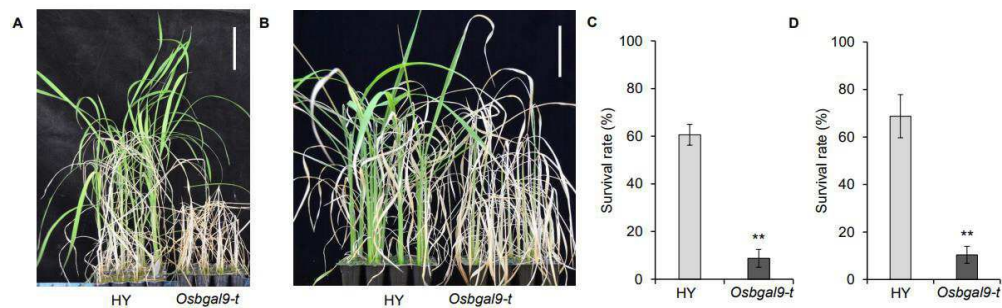
도면10



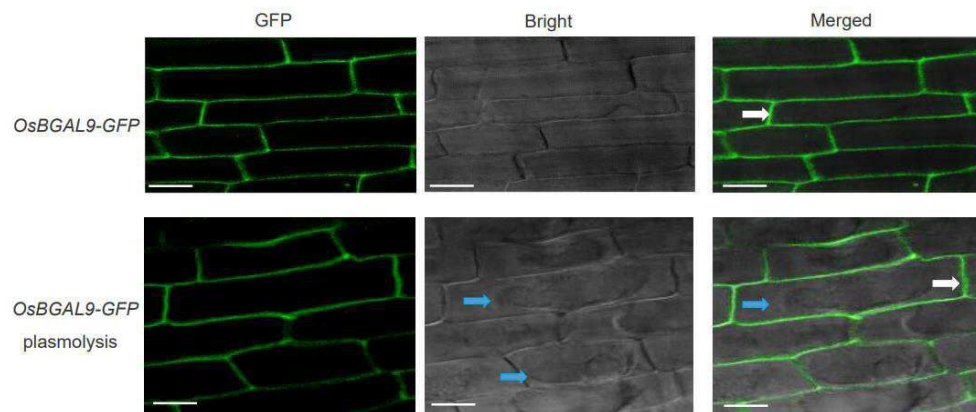
도면11



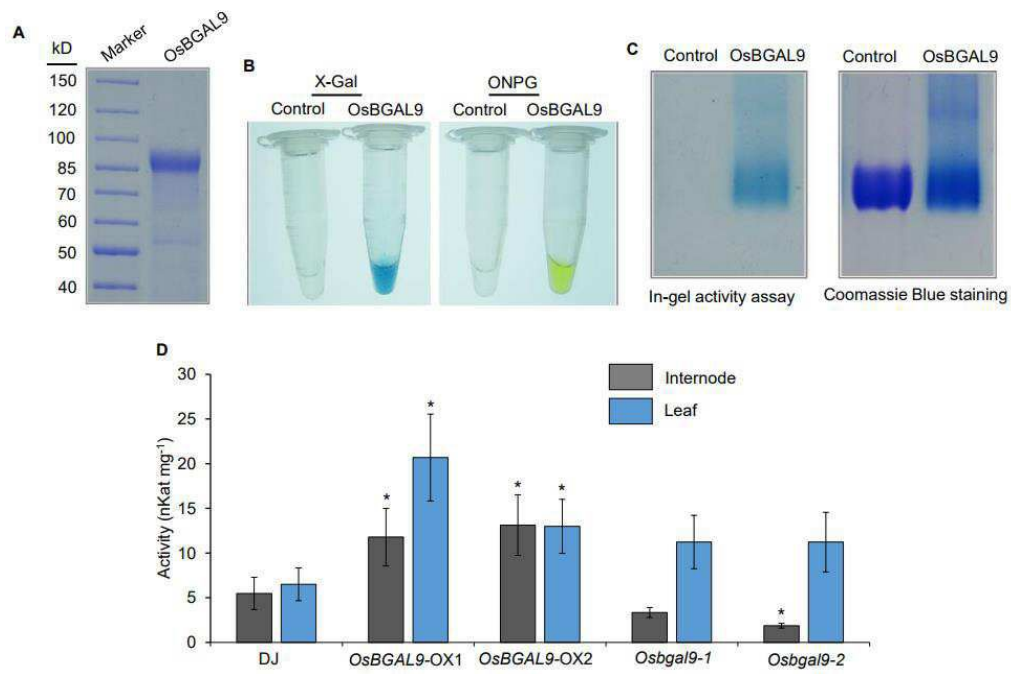
도면12



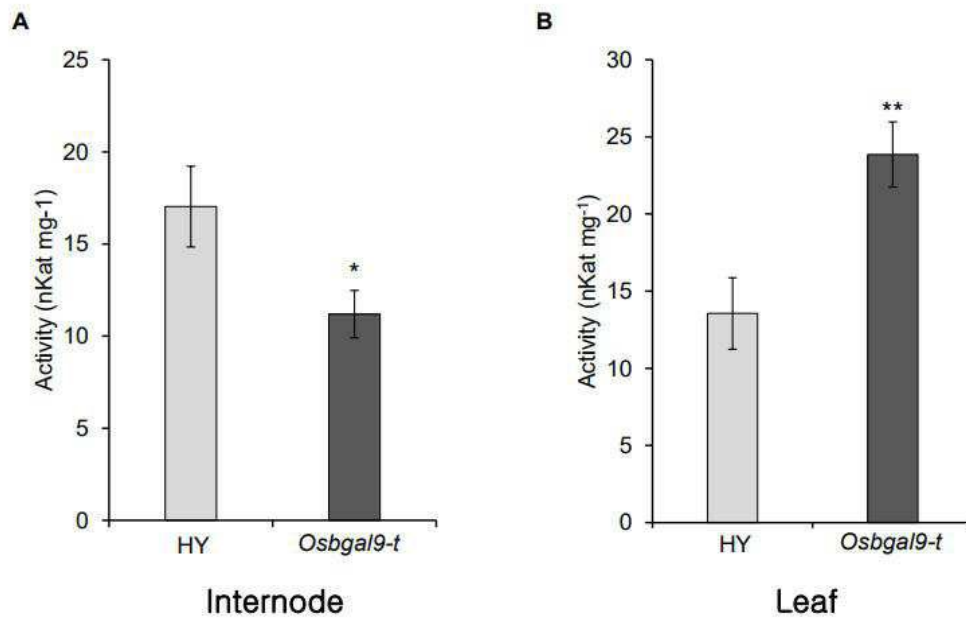
도면13



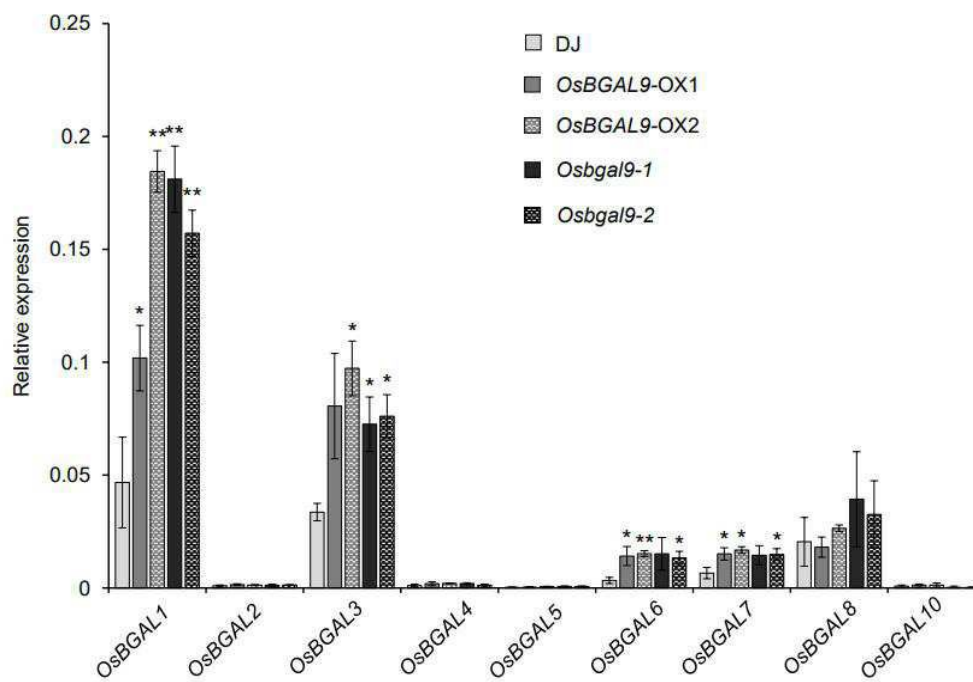
도면14



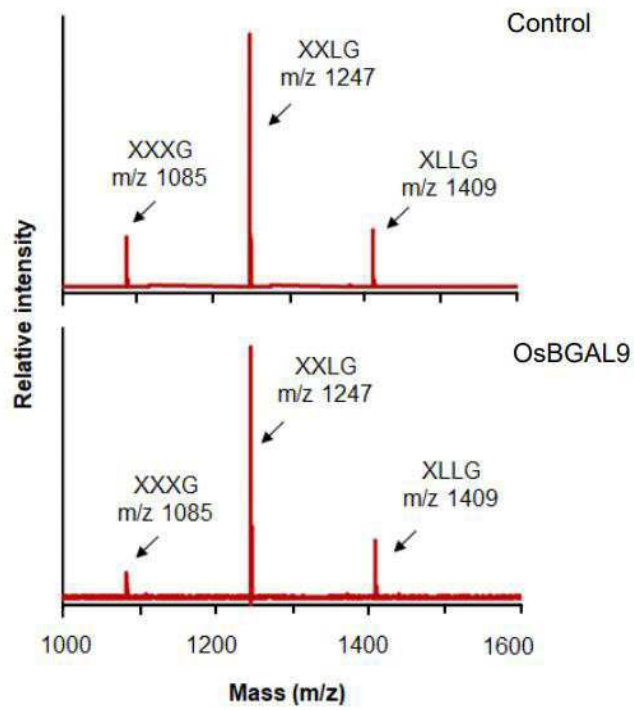
도면15



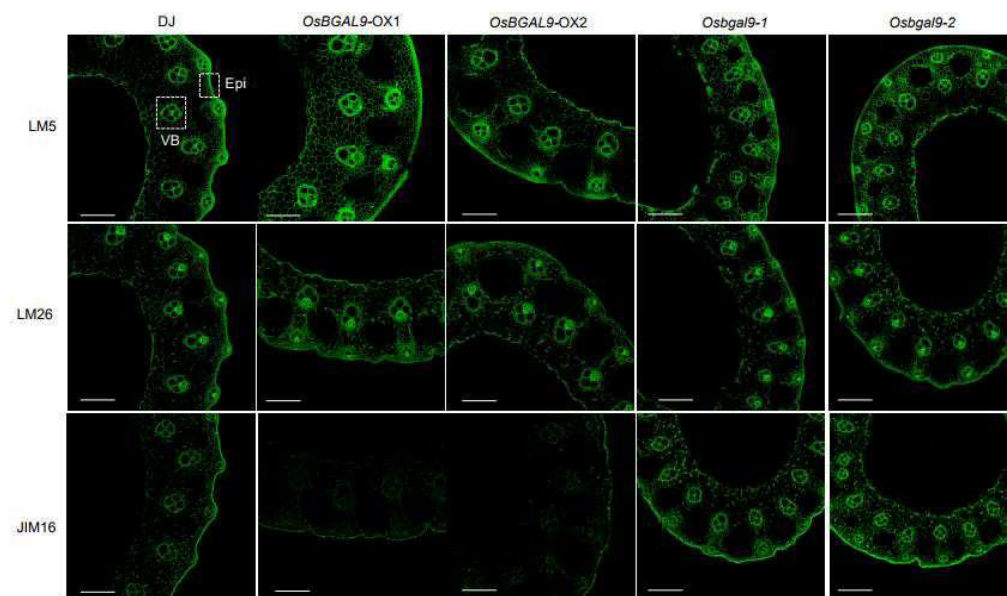
도면16



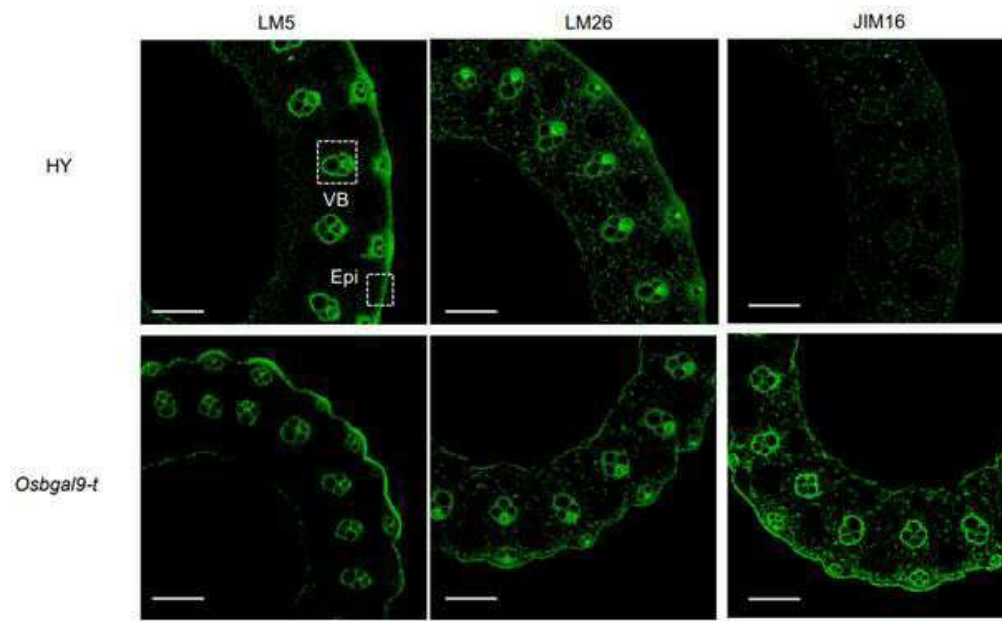
도면17



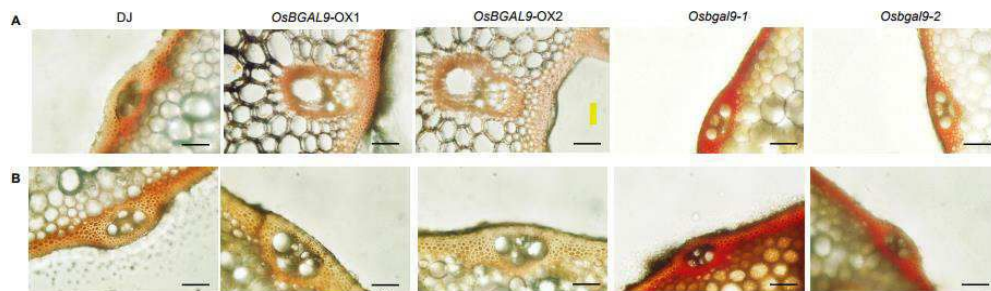
도면18



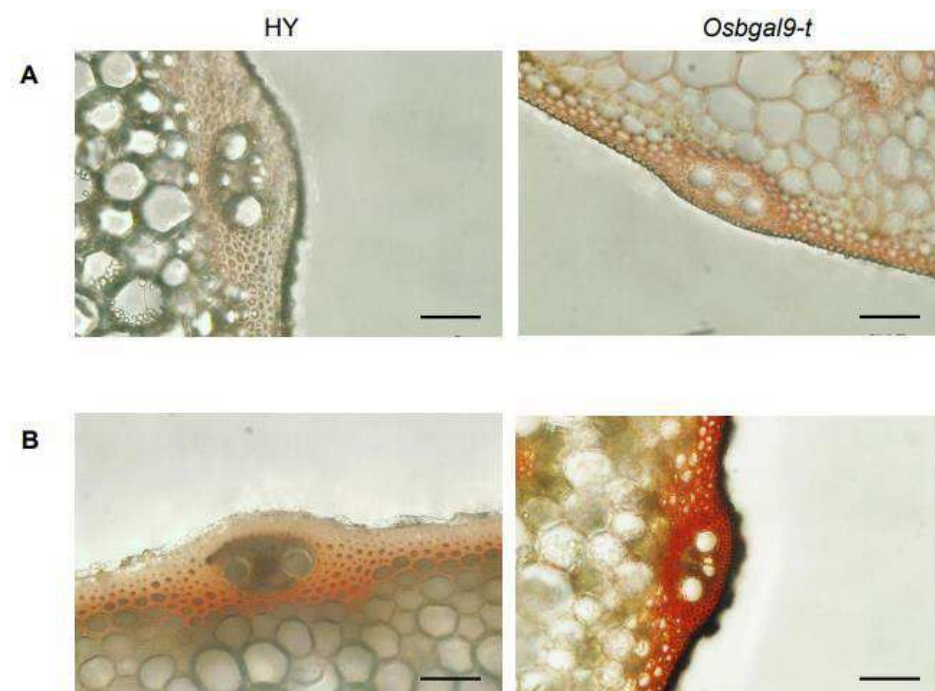
도면19



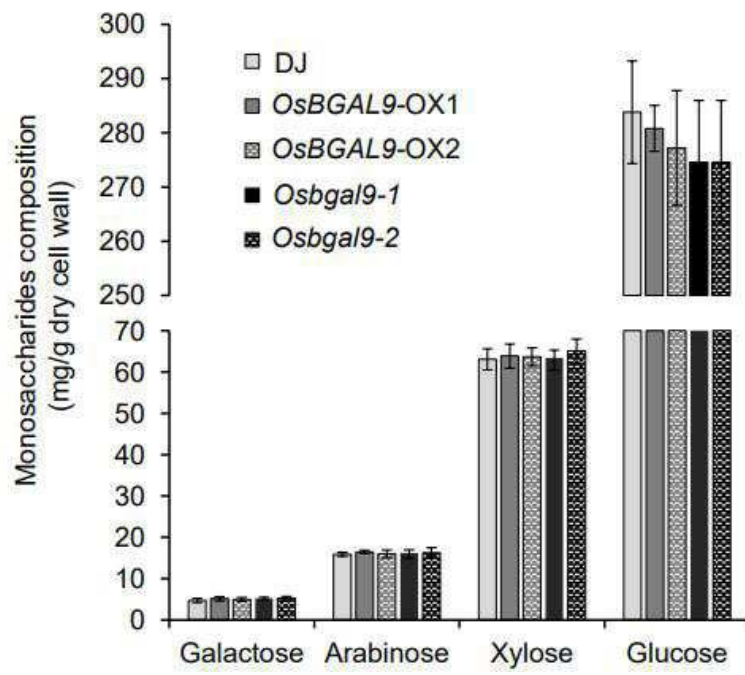
도면20



도면21



도면22



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.