(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0049712
(43) 공개일자 2016년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0147234
(22) 출원일자 2014년10월28일
심사청구일자 2014년10월28일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정기홍
경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 73, 923동 1504호 (영통동, 벽적골9단지아파트)
고현정
경기도 용인시 처인구 동부로 719-12 (해곡동)
유요한
전라북도 익산시 동서로61길 34 205동 1006호 (어양동, 부영2차아파트)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 9 항

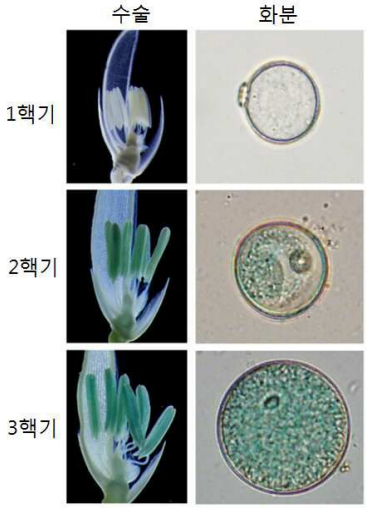
(54) 발명의 명칭 **단자엽 식물의 화분 특이적 프로모터 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 단자엽 식물의 화분 특이적 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 화분 특이적 프로모터는 화분의 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 특이적으로 조절하여 벼를 포함하는 주요 곡물 내지 단자엽 식물체의 화분 발달, 꽃가루 발달 등을 개선함으로써, 생산성이 증대된 작물을 육성하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ00807901
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	식물분자육종사업단
연구사업명	차세대바이오그린 21사업
연구과제명	자포니카와 인디카 사이의 eQTL을 활용한 생산성 강화 신품종 개발
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도용 조성물.

청구항 2

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 형질 전환 세포를 포함하는, 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도는 화분 발달 후기 단계에서 화분 특이적 발현 유도인 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도용 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단자엽 식물체는 벼(Oryza sativa)인 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도용 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항의 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도용 조성물로 형질전환되어 외래 유전자를 단자엽 식물체의 화분에서 특이적으로 발현하는, 형질전환 단자엽 식물체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 단자엽 식물체는 벼(Oryza sativa)인 형질전환 단자엽 식물체.

청구항 7

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 단자엽 식물체를 형질 전환시켜 외래 유전자를 단자엽 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는, 외래 유전자를 화분에서 특이적으로 발현하는 형질 전환 단자엽 식물체의 제조 방법.

청구항 8

하기의 단계들을 포함하는 단자엽 식물체의 화분에서 외래 유전자가 특이적으로 발현되는, 형질 전환 단자엽 식물체의 제조방법:

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 포함하는, 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도용 조성물을 제조하는 단계;

단자엽 식물체에 상기 조성물을 도입하는 단계; 및 상기 조성물이 도입되어 단자엽 식물체 화분에 외래유전자가 특이적으로 발현되는 형질전환 단자엽식물체를 선별하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단자엽 식물체는 벼(Oryza sativa)인 형질 전환 단자엽 식물체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 단자엽 식물의 화분 특이적 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 벼(Oryza sativa)는 세계에서 가장 중요한 식량작물의 하나로 과거 20여년 동안 꾸준히 수량 증대에 힘써왔으나 현재 인구증가 추세로 볼 때 2020년이면 현재의 70%이상에 달하는 수량을 더 생산해야만 될 형편에 놓여있다. 그러나 벼가 재배되는 농지는 세계 각국의 공업화 현상으로 갈수록 줄어들고 육종의 소재가 되는 새로운 유전자원은 고갈되어 외래 유용 유전자의 도입이 요구되고 있다. 다행히 분자생물학의 발달로 외래 유용 유전자의 분리 및 조작이 가능하게 되어 유용 유전자를 벼를 비롯한 많은 식물세포에 형질전환하여 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻음으로서 여러 가지 생명현상을 규명하는 유전자발현 연구는 물론 육종의 좋은 소재가 되고 있다. 이러한 형질전환을 이용한 신품종 생산은 앞으로 다가오는 21세기에는 고부가가치 산업으로 대두함은 물론이며 인류의 가장 큰 문제점으로 부각되는 식량문제를 어느 정도는 해결할 수 있으리라 생각된다.

[0003] 현재까지 알려진 형질전환 방법은 80년대에는 원형질체에 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol(PEG))과 전기충격법(electroporation)으로 많은 형질전환체를 획득하였으며, 90년대 후반에는 유전자총 이용법이 보편화되었으며 최근에는 쌍자엽식물에서 널리 이용되어 왔던 아그로박테리움(Agrobacterium) 이용법도 많이 이용되고있다. 그밖에 화분법(pollen pathway), 미세주사(microinjection) 방법 등이 있다.

[0004] 프로모터는 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성할 수 있으며, 그 기능에 따라서 다음과 같이 분류할 수 있다.

[0005] 첫째로 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있다. 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquithin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C 유전자(OsOc1)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(참조: 등록번호 10-0429335). 이들은 식물형질전환 기본 운반체 내에 선발마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체 내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다.

[0006] 둘째로, 종자 특이적 프로모터를 들 수 있다. 대표적인 예로서 벼 주요 저장 단백질 유전자의 프로모터들로서 황금쌀(golden rice) 개발에 사용된 벼 글루테린(glutelin) 프로모터가 현재까지 외떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는 경우에 많이 사용되고 있고, 쌍떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는데 주로 사용되는 프로모터로는 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 및 애기장대의 종자에서 감마 토코페롤 메틸기 전이효소(γ-tocopherol methyl transferase:γ-TMT) 유전자 발현을 유도함으로써 비타민 E 생성을 증진시킨 연구에 사용된 당근 유래 DC-3 프로모터, 들깨 유래 올레오신(oleosin) 프로모터의 종자 특이발현 유도 특허출원(참조: 특허출원번호 10-2006-0000783) 사례가 있다. 상기 종자 특이적 프로모터들은 주로 종자 자체가 식량이나 식품 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용되고 있다.

[0007] 셋째로, 뿌리 특이 발현 프로모터이다. 애기장대 퍼옥시다제(peroxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 특이적 발현을 확인하였고, 최근 고구마 유래의 매즈 유전자(ibMADS)와 당 유도성 에이디피 글루코즈 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에서 특이 발현을 유도하며 당근, 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함을 확인하여 특허 등록(대한민국 등록번호 제10-0604186호, 제10-0604191호)된 바 있다.

[0008] 넷째로 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스 (rbcS: ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 RolD 프로모터, 감자 유래 괴경 특이 발현 유도 파타틴 (patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과실 성숙 특이 발현 유도 피디에스 (PDS: phytoene synthase) 프로모터 등이 있다.

[0009] 한편, 소포자로부터 성숙 화분으로의 발달과정은 웅성 배우자를 만드는 식물의 생식세대에 속하고 비교적 짧은 주기이나 종자식물의 존재 여부에 근간이 되는 중요한 생물학적 과정이며, 이러한 발생과정에 관여하는 유전자들은 농업적 활용도가 매우 크다. 특히, 소포자 및 화분 조직에서만 특이적으로 발현하는 프로모터를 포함하는 형질전환용 벡터를 제작함으로써 화분의 활성이 증가된 형질전환체를 육성하는데 이용될 수 있다. 이와 같은 방

식으로 육성된 개체는 벼를 비롯한 주요작물에서 화분의 활성을 증가시켜 생산성을 증대시키는 등 농업적 활용도가 매우 크다.

[0010] 하지만 다른 조직 특이적 프로모터와 대비하여 화분 특이적으로 작용할 수 있는 프로모터에 관한 연구가 매우 부족한 실정이다. 화분의 발달은 온도와 밀접한 관계를 맺고 있으며 특히 저온 또는 고온에서는 화분의 발달이 저해된다. 현대는 지구의 기후변화로 인해 작물이 고온이나 이상저온에 노출될 위험이 크며 그로 인해 화분 발달 장애로 인한 생산성 감소가 발생할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 화분에서의 유전자 발현을 조절할 수 있는 프로모터의 개발은 중요하다. 그러므로 개발자의 의도에 따라 보다 정밀하게 화분에서의 발현을 조절할 수 있는 새로운 프로모터에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록 특허 제10-1185845호

(특허문헌 0002) 대한민국 등록 특허 제10-1015972호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신이 아닌 화분에 국한하여 발현시킬 수 있는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 형질전환 세포, 이 발현 벡터 또는 형질전환 세포를 포함하는 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도용 조성물, 이로 형질전환된 단자엽 식물체 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 식물의 조직 또는 기관 특이적인 유전자 발현을 조절할 수 있는 프로모터들을 발굴함으로써, 식물의 특정 조직 또는 기관에 국한시켜 목적 유전자를 특이적으로 발현 또는 저해할 수 있는 시스템을 확립하고자 하였다. 이 과정에서 벼의 LOC_Os09g30446의 프로모터가 식물의 다른 조직보다 화분에서 특이적으로 발현이 이루어짐을 확인하였고, 이에 따라 상기 프로모터를 확보하여 이를 포함하는 발현벡터를 제조한 후 이를 식물에 도입하여 형질전환시킨 형질전환체에서 화분 특이적으로 리포터 유전자가 발현됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0014] 보다 상세하게 본 발명자들은 공개된 벼 에피메트릭스(affymetrix) 자료 983종을 수집하였고, 이들을 17개 기관별로 재분류를 하였다. 에피메트릭스 어레이(affymetrix array)는 한 번의 실험으로 57000 종의 프로브에 의해서 대변되는 유전자 발현을 분석 가능케 하며, 대규모로 수집된 에피메트릭스 어레이(affymetrix array) 자료의 재구성을 통해서 만들어진 기관별 발현 양상은 상당히 높은 재현성을 보여 주었다. 이 자료의 발현 패턴별 분석을 통해서 다양한 기관 및 조직 특이적 유전자들이 분리되었다. 그 중에서 본 발명자들은 화분에서 중요한 형질 발현에 필요한 프로모터 발굴에 관심을 가졌다.

[0015] 상기 방법을 통해서, 672 종의 유전자가 다른 유전자들에 비하여 화분에서 높은 발현 양상을 보여 주었다.

[0016] 이러한 유전자에 의해서 조절되는 유전자 발현양상은 이들 프로모터 3' 방향에서 GUS reporter 유전자를 발현시켜 그 활성을 식물체 내에서 측정함으로써 정밀하게 분석되었다.

[0017] 염기서열 해독 정보를 참고로 하여 LOC_Os09g30446의 ATG 앞 프로모터영역을 게놈 DNA PCR를 통해서 분리하고 pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다.

[0018] 이렇게 분리된 프로모터를 pGA3383 벡터에 넣어, 형질전환된 식물체를 제작하였다. 형질전환된 식물체에서 GUS 반응을 검증함으로써, 해당 프로모터를 이용하여 식물의 화분 특이적 유전자 발현을 유도할 수 있음을 알 수 있었다.

[0019] 특히, 본원 발명의 화분 특이적 유전자 발현의 유도는 화분 발달 중기 내지 후기 단계에 강하게 발현된다.

[0020] 예컨대 화분의 발달 단계를 보면 다음과 같다: 수술의 화분낭에서는 각 화분 모세포가 감수분열을 거쳐 반수체 상태의 사분체를 형성한다. 이후 사분체는 수술의 융단조직에서 분비되는 callase의 작용에 의해 소포자로 분리된다(1핵기). 각각 분리된 소포자들은 비대칭적인 유사분열을 거쳐 큰 영양 세포와 작은 생식 세포로 구성된 소포자로 발달한다(2핵기). 영양핵 세포는 더 이상의 유사분열 과정을 거치지 않고 정핵을 운반하는 통로인 화분관 신장에 필요한 영양분을 공급해 주는 역할을 한다. 생식핵 세포는 또 한 번의 유사분열을 거쳐 2개의 정세포를 만든다(3핵기). 본원 발명은 이러한 화분 발달 과정 중 중기, 후기 단계인 2 핵기 내지 3 핵기에서 특히 강한 발현을 보인다.

[0021] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 벼의 LOC_Os09g30446의 프로모터를 포함하는 화분 특이적 프로모터를 제공한다.

[0022] 프로모터는 유전자의 환경적, 시기적 및 조직적 발현을 조절하는 필수적인 요소로서, 본 발명에 따른 화분 특이적 프로모터를 사용하여 식물체 내에서 외래 유용 유전자의 발현 부위를 화분 특이적으로 유도할 수 있다.

[0023] 본 발명은 벼의 LOC_Os09g30446의 프로모터로서, 외래 유전자의 발현이 화분에 특이적으로 이루어지도록 유도하는 화분 특이적 프로모터(이하 '본 발명의 프로모터'라 함)를 제공한다.

[0024] LOC_Os09g30446은 monovalent cation:proton antiporter-2 family protein을 암호화하는 것으로 알려져 있으며, 11개의 exon으로 구성되어 있다. 본 유전자의 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 갖는다.

[0025] 또한 본 발명은 상기 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제공한다.

[0026] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서 발현 벡터는 재조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입 시 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제 가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 게놈 내에 통합되는 것들을 포함한다.

[0027] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 프로모터를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 pCAMBIA계열, pGA계열, pGWB계열, 예컨대, pGA3383, pCAMBIA3301, pCAMBIA3300, pGA3426, pGA3780, pGWB12, pGWB14와 같은 Ti-plasmid 및 이에 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다. 이들 벡터는 본 발명의 프로모터 및 외래 유전자를 포함하며 화분 특이적으로 외래 유전자 발현에 현저한 효과를 가진다.

[0028] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편을 포함한다.

[0029] "본 발명의 프로모터"와 "기능적으로 동등한 절편"은 본 발명의 프로모터와 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다. 또한, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 프로모터는 공개된 벼 게놈 서열 상, LOC_Os09g30446의 앞쪽에 위치하는 서열로, 서열번호 1로 표시되는 염기 서열 중 일부가 변경, 추가 또는 삭제되더라도 공개된 벼 게놈 서열 상 LOC_Os09g30446의 앞쪽에 위치한 서열과 상동성이 유지되어 실질적으로 동등한 효과를 나타낸다면 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.

[0030] 본 발명의 발현 벡터는 3' 방향에 목적 단백질에 대한 유전자가 발현되도록 한다. 바람직하게 상기 발현벡터는 화분에 특이적으로 발현시키고자 하는 유용한 외래 유전자를 포함할 수 있다. 상기 외래 유전자는 화분에서 발현을 원하는 어떠한 유전자라면 무엇이든 무방하다.

[0031] 상기 발현벡터는 통상의 벡터에 본 발명의 프로모터를 도입한 것일 수 있으며, 이처럼 본 발명의 프로모터를 도입하여 발현벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.

[0032] 또한 본 발명은 상기 벡터에 의해 형질 전환된 형질 전환 세포를 제공한다.

[0033] 상기한 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 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; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.

[0035] 또한 본 발명은 상기 발현 벡터 또는 상기 형질 전환 세포를 포함하는 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도용 조성물을 제공한다. 화분 특이적 발현 유도용 조성물은 단자엽 식물체에 외래 유전자를 도입하여 단자엽 식물체의 화분에서 외래 유전자의 발현을 특이적으로 유도할 수 있다. 본 발명에 있어서, 단자엽 식물체는 본 발명의 일실시양태에 따른 벼(Oryza sativa)를 포함하여 단자엽 식물로 구분되는 식물체 모두를 제한없이 포함한다. 본 발명에 있어서, 화분 특이적 발현 유도는 단자엽 식물체의 화분에 특이적인 발현을 의미한다. 본 발명의 일실시양태에 따르면, 화분 특이적 발현 유도는 화분 발달 중기 내지 후기에 보다 강하게 유도된다.

[0036] 또한 본 발명은 상기 벡터, 상기 형질전환 세포 또는 이를 포함하는 외래 유전자의 화분 특이적 발현 유도용 조성물로 형질 전환된 단자엽 식물체를 제공하며, 바람직하게 단자엽 식물체는 벼이다. 이러한 형질 전환 단자엽 식물체는 도입된 외래 유전자가 단자엽 식물체 화분에 특이적으로 발현되는 특성을 나타낸다.

[0037] "본 발명의 형질전환 단자엽 식물체"와 "기능적으로 동등한 형질전환 단자엽 식물체"는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 변이체와 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 이용하여 제조된 형질 전환 단자엽 식물체로써, 단자엽 식물체 전신에서 프로모터 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 단자엽 식물체이다.

[0038] 본 발명의 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 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. 예를 들어, 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, Nature327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스(Agrobacterium tumefaciens) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 이러한 형질전환체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0039] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터로 단자엽 식물체를 형질 전환시켜 외래 유전자를 단자엽 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는, 외래 유전자를 화분 특이적으로 발현하는 형질 전환 단자엽 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0040] 바람직하게, 상기 발현 벡터 또는 상기 형질 전환 세포를 포함하는 외래 유전자의 단자엽 식물체 화분 특이적 발현 유도용 조성물을 제조하는 단계; 단자엽 식물체에 상기 조성물을 도입하는 단계; 및 상기 조성물이 도입되어 단자엽 식물체 화분에 외래유전자가 특이적으로 발현되는 형질전환 단자엽 식물체를 선별하는 단계를 포함하는 형질 전환 단자엽 식물체의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0041] 본 발명의 화분 특이적 프로모터는 화분의 형질 개선에 필요한 유전자 발현을 특이적으로 조절하여 벼를 포함하는 주요 곡물 내지 단자엽 식물체의 화분 발달의 개선이나 웅성불임 식물 육성을 통한 생산성 증대 작물을 육성하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 히트맵(heatmap)으로 선발된 화분 특이적 발현 유전자들과 그들의 발현 양상을 나타내는 도이다.

도 2는 LOC_Os09g30446 유전자의 상세한 마이크로어레이 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 LOC_Os09g30446 프로모터를 포함하는 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 나타낸 도이다.

도 4는 LOC_Os09g30446의 프로모터에 의한 소포자 발달 시기별 발현 양상을 확인한 도이다.

도 5는 LOC_Os09g30446 프로모터의 화분 특이적 발현을 확인하기 위해 형질전환체의 여러 조직에서 GUS 발현을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 아래의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0044] **<실시예 1> 화분에 특이적으로 발현되는 벼 유전자 대량 선별**

[0045] 화분에 특이적으로 발현하는 유전자를 선별하기 위하여, 공개된 마이크로어레이 데이터베이스인 NCBI GEO(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)에서 수집된 983종의 벼 에피메트릭스 마이크로어레이(affymetrix microarray) 자료를 17개 기관별/조직별로 재구성하여 유전자 발현 분석용 데이터베이스를 구축하였다.

[0046] 이를 표 1에 나타내었다.

[0047] 표 1. 기관별/조직별로 재구성된 유전자 발현 분석용 데이터베이스

순서	기관/조직	샘플숫자
1	캘러스 /현탁 세포	42
2	잎	129
3	끝잎	121
4	화분	150
5	순(shoot)	164
6	줄기	8
7	전체 절간(Whole_internode)	9
8	쌤(SAM)	27
9	원추꽃차례(Panicle)	112
10	성장중인 꽃밥 (Developing_anther)	44
11	성숙된 꽃밥(Mature_anther)	20
12	씨방/암술머리	17
13	내화류 외화영(Palea_lemma)	4
14	씨앗	32
15	배(Embryo)	3
16	배낭(Embryo sac)	27
17	내배유(Endosperm)	15

[0048]

[0049] K-means clustering 분석 방법을 이용하여, 상기 표 1에 제시된 유전자 발현 분석용 데이터베이스 중 화분에서 발현이 높은 유전자 그룹을 분리하였다.

[0050] 이는 마이크로어레이 자료 분석용 소프트웨어인 MeV의 K-means clustering 분석 방법을 사용하여 수행하였으며, 기관별/조직별 발현 분석용 데이터베이스 중 화분에서 발현이 우선적인 672 종의 유전자가 분리되었다.

[0051] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0052] 도 1에 나타낸 바와 같이, 노란색에 가까울수록 강한 발현을 보이는 유전자에 해당하며 파란색에 가까울수록 발현이 낮아지게 된다. 즉, 17개의 재구성된 유전자 데이터베이스 중 화분에서 우선적 발현을 보인 672종의 유전자를 확인할 수 있었다.

[0053] **<실시예 2> 마이크로 어레이 데이터 분석을 통한 조직별 발현 분석**

[0054] 마이크로어레이 데이터베이스 분석을 통한 LOC_Os09g30446 유전자의 조직별 발현 양상을 분석하였으며 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0055] 도 2에 나타낸 바와 같이, 전반적인 조직에서 노란색을 띄는 것을 확인 할 수 있으며, 이는 LOC_Os09g30446 프로모터에 의한 유전자의 조직별 발현이 전신에서 일어남을 보여준다.

[0056] **<실시예 3> 화분 특이적 발현을 위한 프로모터의 클로닝**

[0057] LOC_Os09g30446의 프로모터를 클로닝하기 위하여 작성된 프라이머들과 동진 벼 (Oryza sativa L. japonica cultivar-group) 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시하였으며 이때 사용된 프라이머 서열(서열번호 2 및 서열번호 3)은 표 2에 나타내었다. 주형 DNA는 100 ng로 사용하였고, 각 프라이머는 5 pmol로 사용하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 68℃에서 300초를 4회 반복한 후; 95℃에서 30초, 62℃에서 30초, 68℃에서 300초를 35회 반복하고 마지막으로 68℃, 10분으로 하였다. PCR 산물은 전기영동하여 크기를 확인하고, pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다. 클로닝한 DNA를 XbaI과 XhoI으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pGA3383 벡터(promoter-GUS cloning용 벡터)와 라이게이션을 14℃에서 12시간 진행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50㎕과 혼합하여 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에 1분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 3시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프렙하였다. 미니 프렙으로 얻은 DNA를 제한 효소 XbaI과 XhoI을 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로즈 젤을 분리하고 밴드를 확인하였다. 이렇게 해서 얻어진 클로닝 DNA를 다시 염기 서열 분석을 하여 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다. 염기서열 분석은 (주)마크로젠 의뢰하여 진행하였으며, 염기서열분석은 서열번호 4와 5을 사용하였으며 그 서열을 표 3에 나타내었다.

[0058] 표 2. LOC_Os09g30446의 프로모터 클로닝용 프라이머

Primer name	Sequencing (5'-3')	비고
Os09g30446-pro_XbaI (서열번호 2)	GTCTAGAGCTGCAGATATCGATGCTGG	벼 염색체 9의 BAC clone (OSJNBa0087J09)
Os09g30446-pro_XhoI (서열번호 3)	CTCGAGCACCAACGTATCTGTGACAA	

[0059]

[0060] 표 3. 염기 서열 분석을 위한 프라이머

Primer name	Sequencing (5'-3')
NGUS1(서열번호 4)	AACGCTGATCAATTCCACAG
RB_backbone-F2(서열번호 5)	TCGCACGGAATGCCAAGCA

[0061]

[0062] 상기 서열을 서열번호 1에 나타내었으며, LOC_Os09g30446 유전자의 ATG 앞에 약 1,500 bp 프로모터 서열에 해당한다.

[0063] **<실시예 4> 형질전환 세포의 제작**

[0064] 상기 실시예 3에서 제작한 식물 발현용 벡터를 추출하였다.

[0065] 아그로박테리움 컴피턴트 셀(Agrobacterium tumefaciens LB4404) 50㎕와 2㎍의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 액체질소에 75초 넣은 후, 37℃ 오븐에 5분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프렙한 후, XbaI과 XhoI을 사용하여 효소 절단 후 사이즈를 확인하였다.

[0066] 상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 이용하여 벼의 형질 전환 실험에서 사용하였다.

[0067] **<실시예 5> 형질전환 식물체의 제작**

[0068] N6D 고체 배지에서 동진벼 종자를 7일 정도 28℃ 생장실에서 키워서 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스를 상기 실시예 3에서 얻은 식물 발현용 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 72시간 키운 세포와 혼합하여 N6D-Acetosyringone 을 포함한 배지에서 22℃ 암처리 생장실에 방치하였다.

[0069] 아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 헹구어 낸 다음 N6D 고체 배지에서 hygromycin 선발을 1차(hygromycin 30 mg/L), 2차 (hygromycin 40 mg/L)에 걸쳐서 계대 배양을 통해 진행하였다. 선발은 28℃ 생장실에서 각각 2주 씩 합해서 4 주 동안 이루어졌다. 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR

(hygromycin 40 mg/L) 고체배지에 옮겨 4주 28℃ 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0070] **<실시예 6> 형질전환 식물체를 이용한 화분 특이적 발현 검증**

[0071] 재분화된 식물체의 화분 특이적 GUS 발현을 확인하기 위하여, 소포자 발달 시기별 화분을 GUS 염색 처리를 하여 GUS 발현을 확인하고, 재분화된 식물체의 성숙한 종자에서 발아한 7일째 유묘, 형질전환체의 성숙한 지엽 및 암술을 채취한 후 GUS 염색 처리를 하여 화분 특이적인 GUS 발현을 확인하였다.

[0072] GUS 용액은 0.5M sodium phosphate buffer 200ml, 12.5mM potassium ferricyanide 100ml, 12.5mM potassium ferrocyanide 100ml, 0.5M EDTA 20ml, 10% Triton X-100 50ml, 10ml 의 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-gluc 1g과 Methanol 200ml을 넣고 증류수로 1L의 부피를 맞추어 제조되었다. 각 계통의 식물체를 GUS 염색액에 24시간 처리한 후 70% 에탄올과 100% 에탄올을 순차적으로 이용하여 상온에서 탈색하였다. 단, 화분의 경우 탈색을 위한 에탄올 처리시 화분의 수축 및 손상을 우려하여 에탄올 처리 후 신속히 현미경으로 관찰하였다.

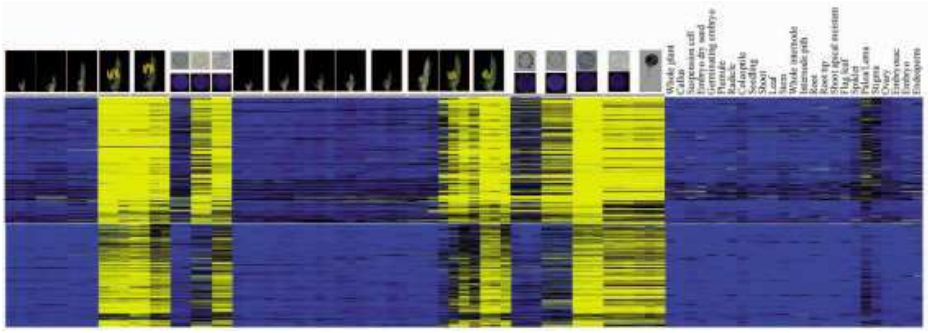
[0073] 도 4는 소포자 발달 시기별 화분의 GUS 염색 결과를 나타낸다. 도 4에 나타낸 바와 같이, 소포자 발달 시기에 따라 GUS 발현이 이루어지는 것을 확인하였으며, 특히 화분 발달 중기 내지 후기에 강한 발현이 나타났다.

[0074] 또한, 도 5는 a) 발아 후 7일째 유묘; b) 성숙한 지엽(flag leaf); c) 암술의 GUS 발현한 결과를 보여준다. 도 5에 나타낸 바와 같이, 형질전환 식물체들은 잎, 뿌리, 암술 등에서 GUS 발현이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었으며, LOC_Os09g30446의 프로모터는 화분 특이적으로 발현을 유도함을 확인하였다.

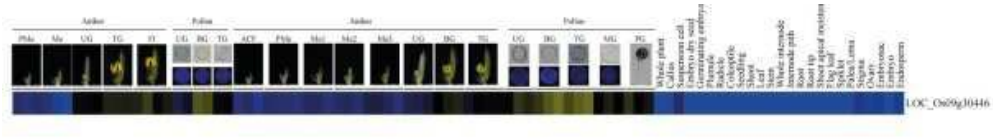
[0075] 상기 도 2, 도 4 및 도 5의 결과를 토대로 LOC_Os09g30446의 프로모터는 화분 특이적으로 외래 유전자의 발현을 유도함을 알 수 있었다. 즉, 상기 분석 결과를 통해 LOC_Os09g30446 유전자의 ATG 앞 쪽 약 1.5kb에 해당하는 서열이 화분 특이적 프로모터로 작용할 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1



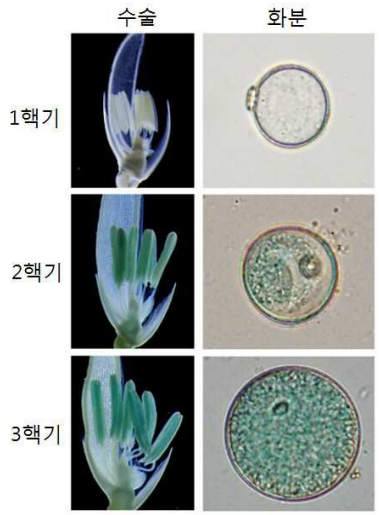
도면2



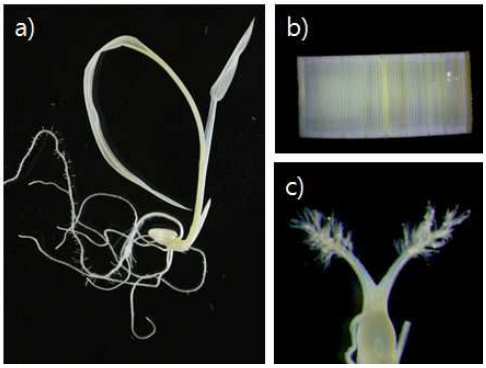
도면3

RB	LOC_Os09g30446의 프로모터	GUS	Tnos	P35S	HPH	T7te	LB

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> A pollen specific promoter in monocotyledones and use thereof

<130> P14-088-KHU

<160> 5

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1445

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220><221> promoter

<222> (1)..(1445)

<223> LOC Os09g30446 promoter

<400> 1

gctgcagata tcgatgctgg tggtctcctt cgtgctcggc cacgtcctcc gccgccgcaa 60

ggtctactac atccccgagg ccagcgcctc cctcctcatc ggtatgtgtt cccacccagt 120

tacagcattt tgggcttgtg gaaactgaag aatgccgatc gtcgctgagg gtcctatcga 180

ttcatgtgtc tgacttcgcg atcgttgtgt atttgcgacg ccgtgcgatg ctttgagcta 240

gcgcatttga tgcgggggtg atcgtgtttg gtgttgttta ctgacgccga atgaactgtt 300

tattcacacg atgtttagtg gcgagcagta acggtgtgag tgtgtgatta ggaggaacgg 360

cttcgactgt gcgtttatgc acaaatcaga cgaacaaatt ttgcattcac gacgcgcgct 420

gtagtctagt tcgagctgtg cttttccaaa atttactgtc gatggttgag gattggttgt 480

aacaggtgag ggctttggag gataaaatga acctttaaaa agttggcatg tagcgcaaac 540

agatgtcttt tccttcagat aagcgtattt ccgttacatt tcagtagctt agcttttact 600

gatttctgat tatctaagat aagtgatgtg acatttgggt ttattctagc tacgttttat 660

ttggatcatc cggtggatta tcatatacta tttgccttgg aaataaaaca ccctagctaa 720

gatggatctt accattttat ttaatagttt gtagagccta gaggtacatt gaaaatgtta 780

gaatcgtatg acaccatatt attacgaaat tatttaatag cttttcttgt cagggatgat 840

tgttggcggc cttgctaaga tatcaaacac tcaaagaagt attaggtgat aatatttctt 900

attactcact gtatacaatt tttccctgca aaatatgaca tcgctgttaa gtctgaacat 960

tttgtggtgt tcatttgctt tattaattca ggagatggtt caattttcgg gaggacttct 1020

tccttctttt cttacttcct ccaattatat tatatccttt tttgtatctt gattttgttt 1080

tttaattact tgtacggaaa tttaccatgt tttacttgac tgaatcttac tcagtctgga 1140

ttcagcttag caccagtaag tgtggaattc ttggatcctc ttagttagtt aaattctact 1200

cttcgttggt taaattctat cattctcagc taattatatc atatttttc ctgatagaaa 1260

ccattctttt caaattttgg tgccattata acatttgcaa tcttgggaac cttcattgct 1320

tctattgtca ctggtctttt agtgtaagag tatcttctat attgcctcca ttcctattcg 1380

ctgatattta tttcatctat aaaaatgtaa tttatatttt tccatttgtc acagatacgt 1440

tggtg 1445

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os09g30446 pro XbaI

<400> 2

gtctagagct gcagatatcg atgctgg 27

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os09g30446 pro XhoI

<400> 3

ctcgagcacc aacgtatctg tgacaa 26

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NGUS1

<400> 4

aacgctgatc aattccacag 20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RB backbone F2

<400> 5

tcgcacggaa tgccaagca 19