(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월19일
(11) 등록번호 10-2001823
(24) 등록일자 2019년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8249 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0005493
(22) 출원일자 2018년01월16일
심사청구일자 2018년01월16일
(56) 선행기술조사문헌
The Plant Journal. Vol. 63, No. 2, 페이지 179-188 (2010.05.11.)*
Genbank Accession number EF447275 (2007.03.15.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
안상낙
대전광역시 유성구 어은로 57, 105동 602호(어은동, 한빛아파트)
심규찬
대전광역시 중구 유천로17번길 54(유천동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

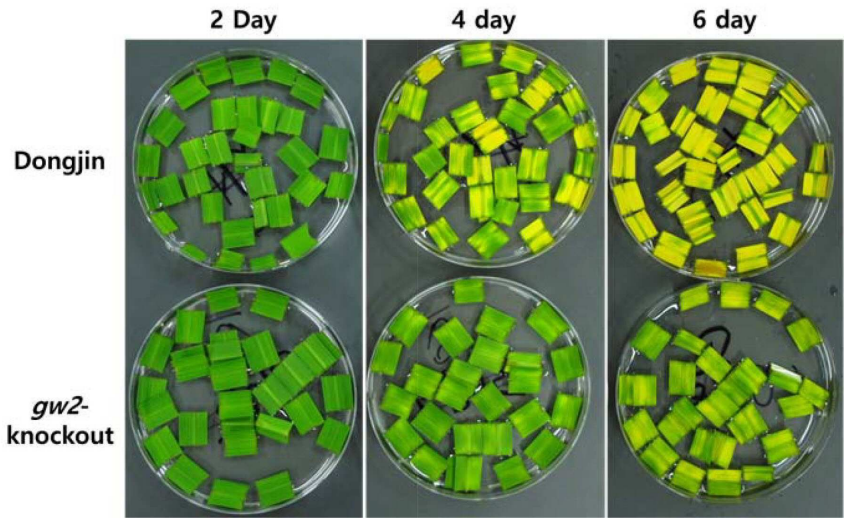
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **식물체의 노화를 조절하는 GW2 유전자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 식물체의 노화를 조절하는 *GW2* 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자는 식물체의 노화를 조절할 수 있으므로, 식물체에서 *GW2* 유전자의 발현을 조절하여 노화가 지연된 식물체를 개발하는데 이용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도6



(72) 발명자

이현숙

대전광역시 중구 동서대로1207번길 9-1 (태평동)

강주원

대전광역시 서구 도산로370번길 11, 3동 304호(용문동, 무지개아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011048

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 식량분자육종사업단

연구사업명 차세대바이오그린21 사업

연구과제명 야생벼 유전자원의 수량안정성 유전자 탐색 이용

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2B2007554

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단 (선도연구지원팀)

연구사업명 기초연구사업 (중견연구)

연구과제명 벼 종자중 조절유전자의 엽록소 및 저항성전분 조절 기능 연구

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2021.02.28

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2(grain width 2) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 식물세포에서 저해하는 단계를 포함하는 식물체의 노화를 지연시키는 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시켜 GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 식물세포에서 저해하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 노화가 지연된 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

제3항의 방법에 의해 제조된 노화가 지연된 형질전환 식물체.

청구항 6

제5항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 7

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 노화를 지연시키기 위한 조성물.

청구항 8

서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현이 저해되어 노화가 지연된 돌연변이 식물체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 저해는 GW2 유전자에 T-DNA가 삽입되어 돌연변이체를 유도하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 노화가 지연된 돌연변이 식물체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물체의 노화를 조절하는 *GW2* 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 벼는 아시아 지역에서 가장 중요한 식량작물이다. 벼의 종자중은 수당립수와 함께 수량을 구성하는 가장 중요한 요소이며, 양적형질유전자좌(QTL, quantitative trait locus)에 의해 조절된다. 종자 크기는 종자중과 밀접한

상관관계를 갖고 있으며, 종자 길이(GL, grain length), 종자 폭(GW, grain width), 종자 두께(GT, grain thickness)에 의해 측정된다.

[0003] 벼(*Oryza sativa*)에서 수 많은 종자형태 변이체들이 발견되었다. 이러한 변이들을 연구하기 위해 다양한 유전자원들을 이용한 교배집단이 육성되었고, 연구결과 종자의 크기와 무게에 관련된 많은 QTL들이 서로 다른 유전적 배경 및 환경에서 탐색되었다. 정교한 맵핑(fine mapping)을 통해 많은 QTL들의 염색체내 위치가 많이 좁혀졌으며, 근동질 유전자계통(NIL, near isogenic line)을 통한 QTL의 특성이 밝혀졌다. 또한 *GS3*, *GW2*, *qSW5/GW5*, *GS5*, *OsSPL16* 등 종자의 형태와 크기를 조절하는 유전자들이 동정되었다.

[0004] *GW2*(grain width 2) 유전자는 RING(Really Interesting New Gene)-type E3 유비퀴틴 리가아제(ubiquitin ligase)를 암호화하고 있으며, 번역된 단백질은 종자의 세포분열을 억제하여 종자의 폭을 작게 만들지만, 돌연변이형 *GW2* 유전자는 종자의 세포분열을 촉진시켜 종자의 폭과 무게를 증가시킨다. 또한 *qSW5*(QTL for seed width on chromosome 5) 유전자는 종자의 폭과 무게를 조절하고, *qSW5* 유전자와 2Mb 거리에 연관되어 있는 *GS5*(grain size 5) 유전자는 종자의 크기를 증가시키는 역할을 한다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1728890호에는 'HOX28 유전자를 이용하여 벼의 생산성을 증가시키는 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1376520호에는 '벼 유래의 OsPrMC3 유전자를 이용한 바이오매스 또는 종자 생산량이 조절된 형질전환 식물체의 제조방법 및 그에 따른 식물체'가 개시되어 있으나, 본 발명의 식물체의 노화를 조절하는 *GW2* 유전자 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 저해시켜 식물체의 노화가 지연되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2(grain width 2) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물체의 노화를 조절하는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 노화가 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 노화가 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 노화 조절용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현이 저해되어 노화가 지연된 돌연변이 식물체를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자는 식물체의 노화를 조절할 수 있으므로, 식물체에서 *GW2* 유전자의 발현을 조절하여 노화가 지연된 식물체를 개발하는데 이용할 수 있다. 또한, 노화가 지연된 식물체는 개체 크기, 종자 크기 또는 종자 생산량에 영향을 주어 작물의 생산량을 향상시킬 수 있으므로, 수확량 확대 및 양질의 쌀을 생산하게 함으로써 경제성이 크게 증진될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 화성벼(*O. sativa* L. cv. Hwaseong), CR7501 계통 벼 및 CR2002 계통 벼의 유전자형을 나탄내 모식도(좌측)와 CR7501 계통 벼의 1, 2, 6 및 10번 염색체의 유전자 지도이다. 검정색 박스; 화성벼에 야생벼(*O. grandiglumis*)의 염색체 단편이 이입된 부분.

도 2는 암조건에서 화성벼(Hwaseong)와 CR2002 계통 벼의 잎 노화를 유도한 후 색 변화를 관찰한 사진이다.

도 3은 암조건에서 화성벼(주황색)와 CR2002 계통 벼(초록색) 잎의 노화를 유도한 후 클로로필 함량을 나태낸 그래프이다. DAI; 배양 후 날짜(days after incubation).

도 4는 광합성 활성을 분석하기 위해 화성벼(주황색)와 CR2002 계통 벼(초록색)의 Fv/Fm 및 이온 누출률(ion leakage rate)를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다. *; $p<0.05$.

도 5는 DAB 염색을 통해 화성벼(Hwaseong)와 CR2002 계통 벼의 항산화 효과를 비교한 사진이다.

도 6은 동진벼(Dongjin)와 *GW2* 유전자-넉아웃(Knockout) 돌연변이체의 암조건에서 잎의 노화를 분석한 것으로, *GW2* 유전자 발현의 저해가 노화 지연에 효과가 있음을 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼(*Oryza sativa*) 유래의 GW2(grain width 2) 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계를 포함하는 식물체의 노화를 조절하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명에 따른 식물체의 노화 조절 방법은, 상기 GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 식물세포에서 저해시켜 야생형에 비해 식물체의 노화를 지연시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 또한, 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제는 GW2 단백질 코딩 유전자에 T-DNA 삽입, 내생 트랜스포존 (transposon), X-레이 또는 γ-레이 조사를 통한 돌연변이 유발, RNAi 또는 안티센스 RNA를 이용하여 GW2 단백질 코딩 유전자의 발현을 억제하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 GW2 단백질 코딩 유전자에 T-DNA를 삽입하여 GW2 단백질 코딩 유전자의 발현을 억제하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에 따른 GW2 단백질의 범위는 벼로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 용어 "기능적 동등물"이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 상기 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 더 더욱 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로, 서열번호 2로 표시되는 단백질과 실질적으로 동질의 생리활성을 나타내는 단백질을 말한다. "실질적으로 동질의 생리활성"이란 식물체의 노화를 조절하는 활성을 의미한다.

[0019] 또한, 본 발명의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자는 식물체의 노화를 조절하는 특징이 있으며, 상기 유전자의 범위는 GW2 단백질을 코딩하는 게놈 DNA, cDNA 및 합성 DNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0021] 본 발명에서 있어서, 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.

[0022] 본 발명의 벡터는 전형적으로 발현 또는 클로닝을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 원핵세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예를 들면, pLλ 프로모터, trp 프로모터, lac

프로모터, T7 프로모터, tac 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 리보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 숙주 세포로서 대장균(*Escherichia coli*)이 이용되는 경우, *E. coli* 트립토판 생합성 경로의 프로모터 및 오퍼레이터 부위, 그리고 파아지 λ의 좌향 프로모터(pLλ 프로모터)가 조절 부위로서 이용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 재조합 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터 또는 히스톤 프로모터일 수 있으며, 바람직하게는 CaMV 35S 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명에 있어서, "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. "항시성(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 항시성 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0025] 본 발명의 재조합 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 벡터는 번역 개시 부위로서 리보솜 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 재조합 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜머파시엔스와 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 바이너리(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.

[0027] 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 상기 마커 유전자는 항생제 내성 유전자(dominant drug resistance gene)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 및 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 원핵세포의 예로는, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 츄린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세슨스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있다.

[0029] 본 발명의 벡터를 진핵 세포에 형질전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyce cerevisiae*), 곤충세포, 사람세포 (예컨대, CHO 세포주 (Chinese hamster ovary), W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주) 및 식물세포 등이 이용될 수 있다. 숙주세포는 바람직하게는 식물세포이다.

[0030] 본 발명의 벡터를 숙주세포 내로 운반하는 방법은, 숙주 세포가 원핵 세포인 경우, $CaCl_2$ 방법, 하나한 방법 (Hanahan, D., 1983 J. Mol. Biol. 166, 557-580) 및 전기천공 방법 등에 의해 실시될 수 있다. 또한, 숙주세포가 진핵세포인 경우에는, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법, DEAE-덱스트란 처리법, 및 유전자 밤바드먼트 등에 의해 벡터를 숙주세포 내로 주입할 수 있다.

[0031] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및/(또는) 조직 배양기간을 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), 원

형질체의 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 튜머파시엔스 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.

[0032] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

[0033] 상기 형질전환된 식물세포로부터 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 노화가 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 노화가 조절된 형질전환 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 GW2 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기 식물세포를 형질전환시키는 방법은 전술한 바와 같으며, 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 형질전환된 식물세포는 전식물로 재분화되어야 한다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0036] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된 노화가 조절된 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0037] 상기 식물체는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양파 등의 단자엽 식물 또는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 당근, 미나리, 배추, 양배추, 갓무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있고, 바람직하게는 단자엽 식물일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 벼일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는, 식물체의 노화 조절용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 유효성분으로 식물체의 노화를 조절할 수 있는 벼 유래의 GW2 단백질 코딩 유전자를 포함하며, 상기 유전자의 발현이 저해되면, 식물체의 노화를 지연시킬 수 있다.

[0039] 본 발명은 또한, 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현이 저해되어 노화가 지연된 돌연변이 식물체를 제공한다.

[0040] 본 발명의 일 구현 예에 따른 돌연변이 식물체에서, GW2 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 저해는, 상기 GW2 단백질을 코딩하는 유전자에 T-DNA가 삽입되어 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 유전자의 발현을 저해하는 당업계의 통상의 방법이면 모두 가능할 수 있다.

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] **재료 및 방법**

[0043] **1. 식물 재료**

[0044] 본 발명에서 사용된 CR7501 계통은 화성벼(*O. sativa*)를 반복친(recurrent parent)으로, 야생벼인 오리자 그란디글루미스(*O. grandiglumis*; 2n = 48, CCDD, Acc. No. 101154)를 수여친(donor parent)으로 하여 여교배(backcross)를 통해 육성한 것으로, 충남대학교 논(paddy field)에서 CR7501과 화성벼를 다시 교배하여 58개의 F_3 세대와 15개의 F_4 세대(CR2002)를 육성하였다.

[0045] 야생벼의 염색체 이입 단편은 CR7501 계통의 1, 2, 6, 10번 염색체와 CR2002 계통의 2, 10번 염색체에서 확인되었으며(도 1), *GW2* 유전자-넉아웃(*GW2*-KO) 돌연변이체는 *GW2* 유전자에 T-DNA가 삽입되어 *GW2* 유전자의 발현이 저해된 변이체이다. 상기 CR7501와 CR2002 계통의 벼, *GW*-KO 돌연변이체 벼를 암조건에서 유도된 노화(dark-induced senescence, DIS) 분석에 사용하였다.

[0046] **2. DNA 추출 및 QTL 분석**

[0047] 벼의 DNA는 Causse 등(1994, Genetics, 138:1251-1274)의 방법을 이용하여 잎 조직에서 추출하였다. 유전형질 분석(genotyping)은 CR7501과 화성벼 염기서열 간의 다형성에 기반한 11개 SSR 마커를 이용하여 F_3 세대와 F_4 세대에서 수행되었다. PCR은 윤 등(2006, Theoretical and applied genetics, 112(6), 1052-1062)의 방법에 따라 수행되었으며, PCR 산물은 3% Metaphor 아가로스 또는 4% 폴리아크릴아마이드 겔을 사용하여 분리하였다.

[0048] 양적 형질 유전자좌(QTL)는 단일마커 분석법(single-marker analysis)을 통해 분석하였으며, 분산분석(ANOVA)에 의해 표현형(phenotype)이 SSR 마커의 유전자형(genotype)과 유의한 연관성을 나타낼 때 QTL로 확인되었다($p<0.05$). 관찰된 표현형 변이(phenotypic variation)는 결정계수(coefficient of determination, R^2)에 의해 확인되었고, 통계적 분석은 Minitab 16.2.4 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0049] **3. Fv/Fm 값 측정 및 막 이온 누출(membrane ion leakage) 분석**

[0050] Fv/Fm 값은 벼 식물체의 잎 샘플의 중간 부분을 30분 동안 암조건에서 완전 산화(complete oxidation)시킨 후, Hansatech PEA MK2(Hansatech, 영국)로 측정하였다. 이온의 누출율(leakage rate) 분석은 8 mm 직경의 잎 디스크(disc) 3개를 5 mL의 탈이온수(deionized water)에 넣어 27℃의 암조건에서 반응시킴으로써 수행하였다. 전도도는 CON110 도전율계(conductivity meter; Oalton Ins., 미국)로 측정하였고, 총 전도도는 샘플을 121℃에서 10 동안 고압멸균기(autoclave)로 멸균한 후 측정하였으며, 이온 누출율은 초기 전도도를 전체 전도도로 나눈 백분율의 값으로 나타내었다.

[0051] **4. DAB 염색을 통한 분석**

[0052] 디아미노벤지딘(3,3'-Diaminobenzidine, DAB) 염색은 김 등(2012, Phytochemistry, 74, 69-78)에 기재된 방법을 일부 수정하여 수행하였다. 과산화수소(H_2O_2) 함량을 측정하기 위해, 벼의 잎을 분리하여 명조건의 25℃에서 8시간 동안 1 mg/ml의 3,3'-DAB-HCl(pH 3.8) 용액에서 배양하였다. 벼 잎에 나타난 어두운 갈색점은 과산화수소-DAB의 산화된 반응으로 인해 생성된 것이다.

[0053] **실시예 1. 화성벼와 CR7501 계통 벼의 작물 특성 비교 분석**

[0054] 화성벼와 CR7501 계통 벼의 총 12가지 작물 특성을 비교하였다(표 1). 그 중, 낟알 길이(grain length), 낟알 폭(grain width) 및 낟알 두께(grain thickness)는 화성벼에 비해 CR7501 계통의 벼에서 증가하였으며, 특히 천립중(1000-grain weight)은 화성벼에 비해 CR7501 계통의 벼에서 약 1.3배 이상 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0055] 또한, 클로로필 함량은 각 라인의 개체 3개의 잎을 사용하여 출수기(heading stage) 및 출수 한 달 후(1 month after heading stage), 총 2번에 걸쳐 측정하였다.

[0056] 그 결과, 출수기에 측정한 클로로필 함량(chlorophyll content Ⅰ) 및 출수 한 달 후에 측정한 클로로필 함량(chlorophyll content Ⅱ) 모두 화성벼에 비해 CR7501 계통의 벼에서 높게 확인되었다. 다만, 화성벼와 CR7501 결과가 통계적으로 유의하지 않았지만, 이는 작은 크기의 샘플과 환경적 차이에 의한 것으로 사료되었다.

표 1

화성벼와 CR7501 계통 벼의 작물 특성 비교 분석

Trait	Hwaseoung	CR7501	*P*-value
Plant height (cm)	97.2 ± 4.00*	100.4 ± 3.84	0.000
Tiller number	13.4 ± 1.80	10.0 ± 2.73	0.001
Spikelet per panicle	109 ± 14.67	123 ± 19.10	0.002
Grain fertility (%)	91 ± 0.05	75 ± 0.07	0.000
Stem diameter (mm)	4.47 ± 0.24	5.26 ±0.48	0.000
Panicle length (cm)	21.2 ± 1.28	19.35 ± 1.04	0.000
First internode diameter (mm)	1.72 ± 0.12	1.99 ± 0.14	0.000
Grain length (mm)	7.14 ± 0.45	7.46 ± 0.17	0.002
Grain width (mm)	3.29 ± 0.13	3.83 ± 0.10	0.000
Grain thickness (mm)	2.20 ± 0.06	2.56 ± 0.10	0.000
1000-grain weight (g)	25.8 ± 0.68	32.90 ± 1.04	0.000
Chlorophyll content I (mg/m^2)	440.42 ± 16.38	456.25 ± 37.57	0.108
Chlorophyll content II (mg/m^2)	180.91 ± 50.57	215.40 ± 50.86	0.068

*; 모든 측정결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 통계학적 유의성 검정은 student's t-test으로 검정하였음.

[0057]

[0058] **실시예 2. 클로로필 관련 QTL 분석**

[0059] 상기 측정된 클로로필 함량과, CR7501 및 화성벼 염기서열 간의 다형성에 기반한 SSR 분자 마커를 이용한 유전자형 결과를 이용하여 분산분석(ANOVA)을 수행한 결과, F_3과 F_4 세대에서 총 4개의 유의한 QTL을 확인하였다. 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 4개의 QTL은 염색체 1, 2, 6, 10번에 각각 존재하였고, 특히 염색체 2번의 RM12813과 RM12983 사이에 존재하는 *qCC2*는 출수기 및 출수 한달 후 단계에서 반복적으로 탐지되었다. 표현형 변이를 나타내는 결정계수(R^2)는 *qCC2*가 24.63%로 가장 높았으며, 이를 통해 *qCC2* 유전자가 클로로필 함량을 조절할 수 있음을 확인하였다.

표 2

F_3 및 F_4 세대에서 분산분석(ANOVA)에 기초한 클로로필 함량에 대한 QTL 분석

Trait	Generation	QTL	Chr.	Marker	*P*-value	R^2 (%)	H/H[a)]	G/G
Chlorophyll content I[b)]	F_3	*qCC1*	1	RM11302-RM11315	0.002	3.48	442	452
	F_4	*qCC2*	2	RM7288-RM12983	0.029	10.76	546	570
	F_4	*qCC10*	10	RM24903	0.020	15.38	542	571
Chlorophyll content II[b)]	F_3	*qCC2*	2	RM12813	0.018	10.68	173	189
	F_4	*qCC2*	2	RM12813-RM7288	0.001	24.63	497	545
	F_3	*qCC6*	6	RM584	0.018	10.62	454	434

a; H/H, Hwaseong homozygotes (화성벼 동형접합체).
G/G, *O. grandiglumis* homozygotes (야생벼 동형접합체).
b; Chlorophyll conent Ⅰ; 출수기(heading stage)에 측정.
Chlorophyll conent Ⅱ ; 출수 한 달 후(1 month after heading).

[0060]

[0061] **실시예 3. 벼의 노화 현상 및 클로로필 함량 분석**

[0062] 암조건에서 벼의 노화 현상과 상기 *qCC2* 간의 관련성을 분석하기 위해, 화성벼와 야생벼의 2번 염색체 단편(*qCC2*) 및 10번 염색체 단편(*qCC10*)만 포함된 CR2002 계통의 벼 잎을 채취하여 27℃, 암조건의 3 mM MES 버퍼(pH 5.8)에서 배양함으로써, 벼의 노화를 유도하였다.

[0063] 그 결과, 화성벼의 경우 2~3일 후에 잎의 색이 노란색으로 변하였으나, CR2002 계통의 경우 3~5일 후에 노란색

으로 변한 것을 확인하였다(도 2).

[0064] 또한, 노화 현상에 따른 클로로필 함량 변화를 분석하기 위해, CCM-300(OPTI-SCIENCE)을 이용하여 화성벼와 CR2002 계통 벼의 클로로필 함량을 측정하였다.

[0065] 그 결과, 암조건에서 유도된 노화 과정에서 CR2002 계통 벼의 클로로필 a와 클로로필 b 함량 및 총 클로로필 함량은 화성벼 보다 증가하였고, 클로로필 a/클로로필 b의 비율은 배양 4일 후부터 CR2002 계통 벼가 화성벼에 비해 높은 수준을 유지하는 것으로 확인되었다. 이를 통해, CR2002 계통의 벼에서 클로로필의 분해가 더 늦게 시작됨으로써 벼의 노화 현상이 지연될 수 있음을 알 수 있었다(도 3).

[0066] **실시예 4. 벼의 광합성 및 항산화 활성 분석**

[0067] 암조건에서 노화가 진행되는 동안 벼의 광합성 및 항산화 활성을 분석하기 위해, 광합성 능력 지표인 Fv/Fm 값과 이온 누출률을 측정하였고(도 5), 항산화 활성을 분석하기 위해 DAB 염색을 수행하였다. Fv/Fm값은 광계 2(photosystem Ⅱ)의 최대 양자 효율을 분석하기 위해 널리 사용되는 매개변수로, 형광도 최대치(maximum value of fluorescence, Fm)에 대한 최대 변형 형광도(maximum variable fluorescence, Fv)의 비율을 의미한다.

[0068] 광합성 활성을 분석한 결과, 노화 유도 6일차에서, 화성벼의 Fv/Fm 값은 0.47으로 확인되었고 CR2002 계통 벼의 Fv/Fm 값은 0.63으로 확인되어, 화성벼와 CR2002 계통 벼 간에 유의한 차이가 있는 것으로 확인되었다(도 4A). 반면 이온 누출률은 화성벼와 CR2002 계통 벼 간에 유의한 차이가 없는 것으로 확인되었다(도 4B).

[0069] 또한, 항산화 활성을 분석한 결과, CR2002 계통의 벼 잎은 화성벼의 잎 보다 갈색점의 수가 적게 나타나는 것을 알 수 있었는데(도 5), 갈색점이 DAB 용액과 과산화수소(H_2O_2)의 반응으로 형성되는 것을 감안할 때, CR2002 계통의 벼에서 항산화 활성이 화성벼보다 높은 것을 알 수 있었다.

[0070] 상기 결과를 통해 *qCC2*가 포함된 CR2002 계통의 벼는 화성벼에 비해 광합성 활성이 우수하고, 항산화 활성에 의해 벼의 노화가 지연된 것일 수 있음을 유추할 수 있었다.

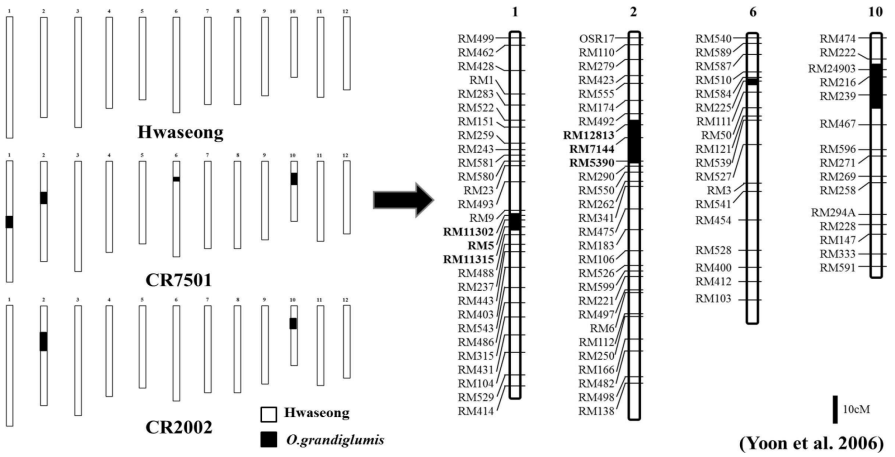
[0071] **실시예 5. *GW2* 유전자 분석**

[0072] 야생벼 염색체 단편 *qCC2*는 대략 2.6 Mb 크기로, *GW2*, *NAC13* 및 *NAC44* 유전자를 포함하고 있다. 상기 3개의 유전자 중, *GW2* 유전자는 곡식의 크기를 조절하고, RING-type E3 유비퀴틴 리가아제(ubiquitin ligase)를 코딩하는 유전자이다. *GW2* 유전자와 벼 노화와의 관련성을 확인하기 위해, 동진벼와 *GW2* 유전자를 넉아웃시킨 돌연변이체(*GW2*-Knockout)의 잎을 암조건에서 배양하여 노화를 유도하였다.

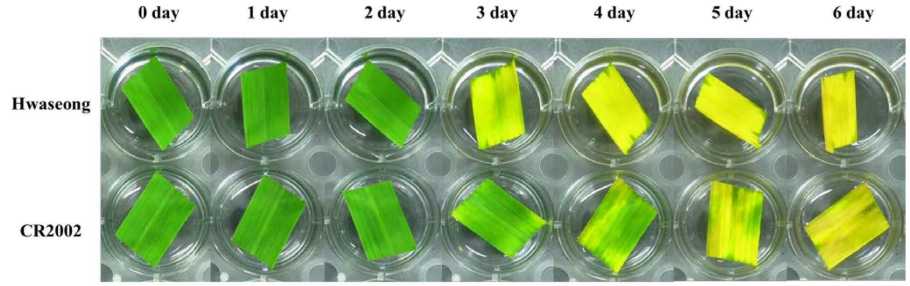
[0073] 그 결과, 동진벼의 잎은 배양 4일째에 노란색으로 변하였지만, *GW2* -넉아웃 돌연변이체의 잎은 배양 6일째에 노란색으로 변하는 것을 관찰할 수 있었다(도 6). 이를 통해, *GW2* 유전자가 식물체의 노화가 지연되는 후기녹체성(stay-green character)과 관련되어 있음을 알 수 있었고, *GW2* 유전자가 노화를 지연시킨 식물체의 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대하였다.

도면

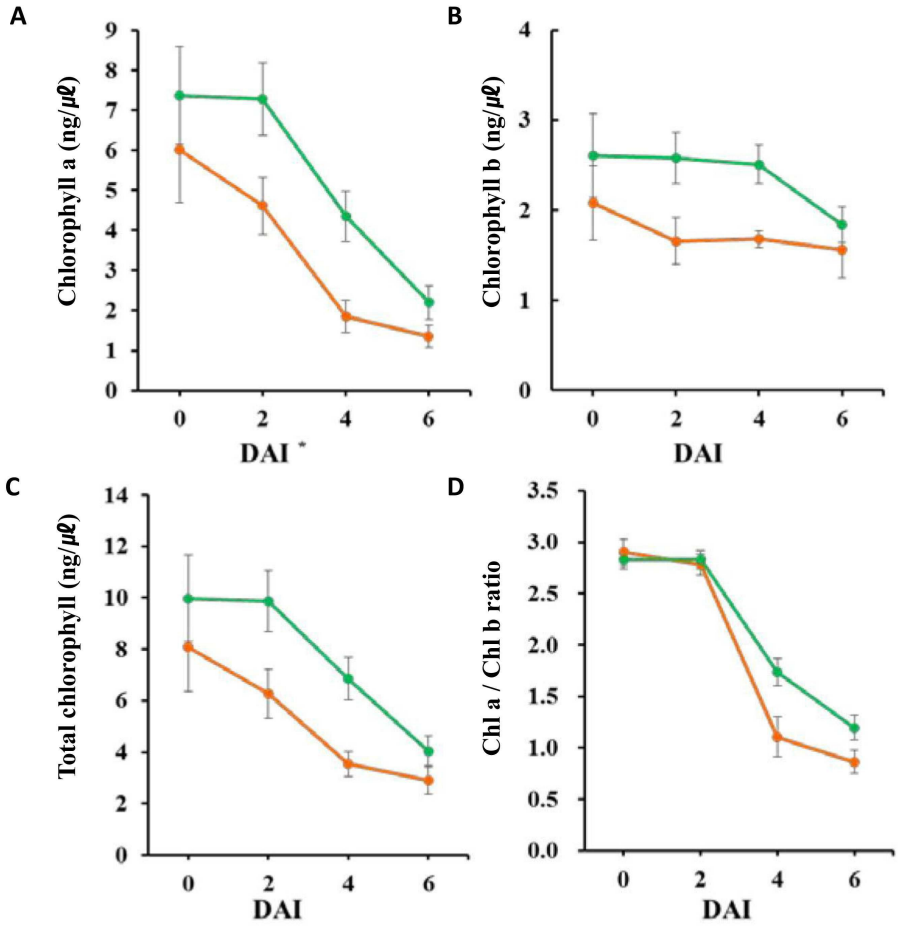
도면1



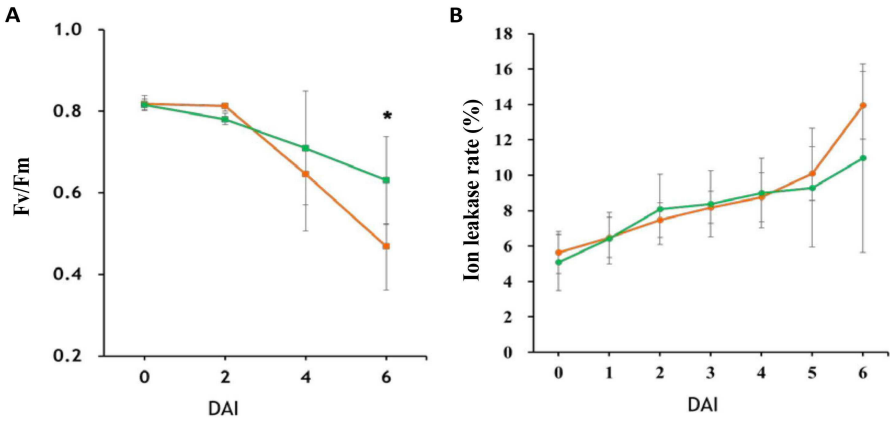
도면2


0 day
1 day
2 day
3 day
4 day
5 day
6 day
Hwaseong
CR2002

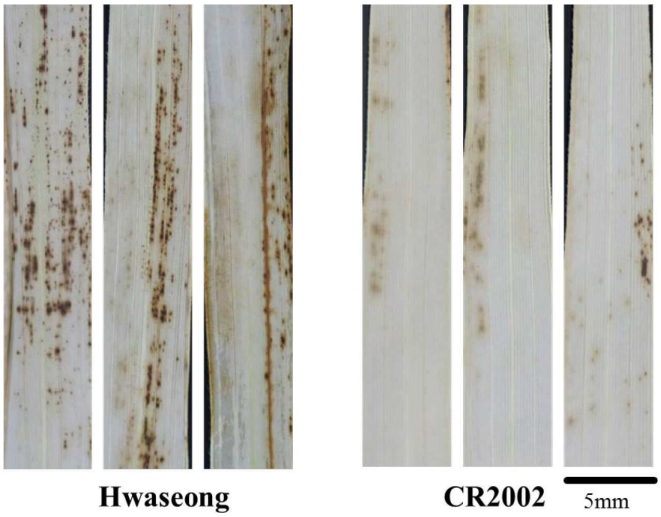
도면3


A
Chlorophyll a (ng/μl)
DAI *
B
Chlorophyll b (ng/μl)
DAI
C
Total chlorophyll (ng/μl)
DAI
D
Chl a / Chl b ratio
DAI

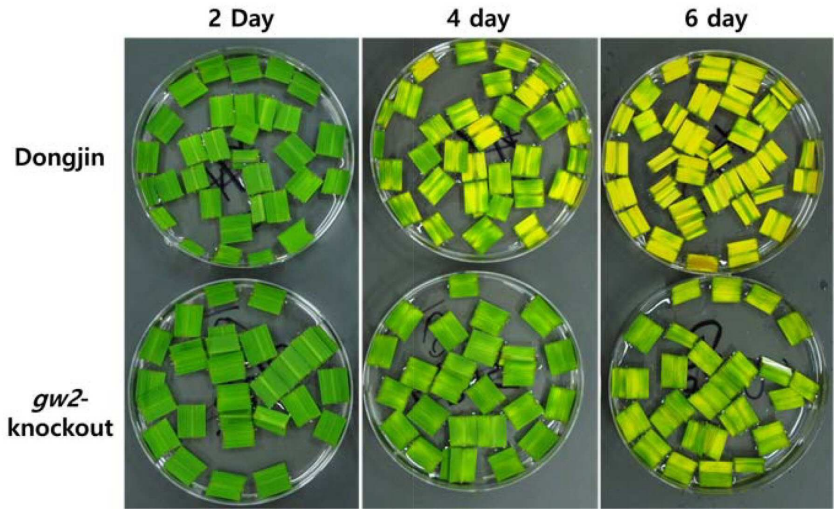
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> GW2 gene regulating senescence of plant and uses thereof

<130> PN17453

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1278

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

atggggaaca ggataggggg gaggaggaag gcgggggtgg aggagaggta cacgaggccg 60

caggggctgt acgagcacag ggacatcgac cagaagaagc tccggaagct gatcctcgag 120

gccaagctcg cgccgtgcta catgggcgcc gacgacgccg ccgccgccgc cgacctcgag 180

gagtgcccca tctgcttcct gtactaccca agtcttaacc gatcaaagtg ttgctcaaaa 240

gggatatgca ccgagtgctt tctccaaatg aaaccaactc acactgctca gcctacacaa 300

tgtccattct gcaaaactcc cagttatgct gtggagtatc gtggtgtaaa gacaaaggag 360

gaaaggagca tagaacaatt tgaagagcag aaagtcatag aagcacaaat gaggatgcgc 420

cagcaagcac ttcaagatga agaagataag atgaaaagaa aacagaacag gtgctcttct 480

agcagaacaa tcacaccgac caaagaagtg gagtatagag atatttgcag cacatccttt 540

tcagtgccgt cataccgatg tgctgagcaa gaaactgaat gctgttcatc ggaaccttca 600

tgctctgccc agactagcat gcgccctttc cattctaggc ataaccgtga tgataacatt 660

gacatgaata tagaggatat gatggttatg gaagcgattt ggcgttccat tcaggagcag 720

ggaagtatag ggaatcctgt ctgtggcaac tttatgcctg taactgagcc atctccgcgt 780

gaacgccagc cattcgttcc agctgcttct ctagaaatac ctcatggtgg tggattttcc 840

tgtgcggttg cggcaatggc tgagcaccag ccacccagta tggacttctc ttacatggct 900

ggcagcagcg cattcccagt tttcgacatg ttccggcgac catgcaacat tgctggtgga 960

agcatgtgta atctggagag ctcaccggag agctggagcg ggatagcacc aagctgcagc 1020

agggaagtgg taagagaaga aggagagtgc tcggctgacc actggtcgga gggtgcagag 1080

gccggaacaa gctacgcggg ctcagacatc gtggcagatg ccgggaccat gccgcagctg 1140

cctttcgccg agaacttcgc catggcgcca agccacttcc gcccggagag catcgaagaa 1200

cagatgatgt tttccatggc tctttcttta gcagatggtc atggaagaac acactcgcaa 1260

gggttggcat ggttgtag 1278

<210> 2

<211> 425

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 2

Met Gly Asn Arg Ile Gly Gly Arg Arg Lys Ala Gly Val Glu Glu Arg

1 5 10 15

Tyr Thr Arg Pro Gln Gly Leu Tyr Glu His Arg Asp Ile Asp Gln Lys

20 25 30

Lys Leu Arg Lys Leu Ile Leu Glu Ala Lys Leu Ala Pro Cys Tyr Met

35 40 45

Gly Ala Asp Asp Ala Ala Ala Ala Ala Asp Leu Glu Glu Cys Pro Ile

50 55 60

Cys Phe Leu Tyr Tyr Pro Ser Leu Asn Arg Ser Lys Cys Cys Ser Lys

65 70 75 80

Gly Ile Cys Thr Glu Cys Phe Leu Gln Met Lys Pro Thr His Thr Ala

85 90 95

Gln Pro Thr Gln Cys Pro Phe Cys Lys Thr Pro Ser Tyr Ala Val Glu

100 105 110

Tyr Arg Gly Val Lys Thr Lys Glu Glu Arg Ser Ile Glu Gln Phe Glu

115 120 125

Glu Gln Lys Val Ile Glu Ala Gln Met Arg Met Arg Gln Gln Ala Leu

130 135 140

Gln Asp Glu Glu Asp Lys Met Lys Arg Lys Gln Asn Arg Cys Ser Ser

145 150 155 160

Ser Arg Thr Ile Thr Pro Thr Lys Glu Val Glu Tyr Arg Asp Ile Cys

165 170 175

Ser Thr Ser Phe Ser Val Pro Ser Tyr Arg Cys Ala Glu Gln Glu Thr

180 185 190

Glu Cys Cys Ser Ser Glu Pro Ser Cys Ser Ala Gln Thr Ser Met Arg

195 200 205

Pro Phe His Ser Arg His Asn Arg Asp Asp Asn Ile Asp Met Asn Ile

210 215 220

Glu Asp Met Met Val Met Glu Ala Ile Trp Arg Ser Ile Gln Glu Gln
225 230 235 240
Gly Ser Ile Gly Asn Pro Val Cys Gly Asn Phe Met Pro Val Thr Glu
245 250 255
Pro Ser Pro Arg Glu Arg Gln Pro Phe Val Pro Ala Ala Ser Leu Glu
260 265 270
Ile Pro His Gly Gly Gly Phe Ser Cys Ala Val Ala Ala Met Ala Glu
275 280 285
His Gln Pro Pro Ser Met Asp Phe Ser Tyr Met Ala Gly Ser Ser Ala

290 295 300
Phe Pro Val Phe Asp Met Phe Arg Arg Pro Cys Asn Ile Ala Gly Gly
305 310 315 320
Ser Met Cys Asn Leu Glu Ser Ser Pro Glu Ser Trp Ser Gly Ile Ala
325 330 335
Pro Ser Cys Ser Arg Glu Val Val Arg Glu Glu Gly Glu Cys Ser Ala
340 345 350
Asp His Trp Ser Glu Gly Ala Glu Ala Gly Thr Ser Tyr Ala Gly Ser
355 360 365

Asp Ile Val Ala Asp Ala Gly Thr Met Pro Gln Leu Pro Phe Ala Glu
370 375 380
Asn Phe Ala Met Ala Pro Ser His Phe Arg Pro Glu Ser Ile Glu Glu
385 390 395 400
Gln Met Met Phe Ser Met Ala Leu Ser Leu Ala Asp Gly His Gly Arg
405 410 415
Thr His Ser Gln Gly Leu Ala Trp Leu
420 425