



등록특허 10-2027542



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년10월01일

(11) 등록번호 10-2027542

(24) 등록일자 2019년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C07K 14/415* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 15/8273 (2013.01)
C07K 14/415 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2018-0086216
 (22) 출원일자 2018년07월24일
 심사청구일자 2018년07월24일
 (56) 선행기술조사문헌
 Genbank Accession number CP002684
 (2017.07.20.)

(73) 특허권자
 전남대학교산학협력단
 광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)
 서강대학교산학협력단
 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
 (72) 발명자
 서미정
 광주광역시 북구 일곡마을로 55, 202동 506호(일곡동, 현대아파트)
 이병하
 서울특별시 마포구 성암로 91, 103동 705호(중동, 현대아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 최규환

전체 청구항 수 : 총 8 항

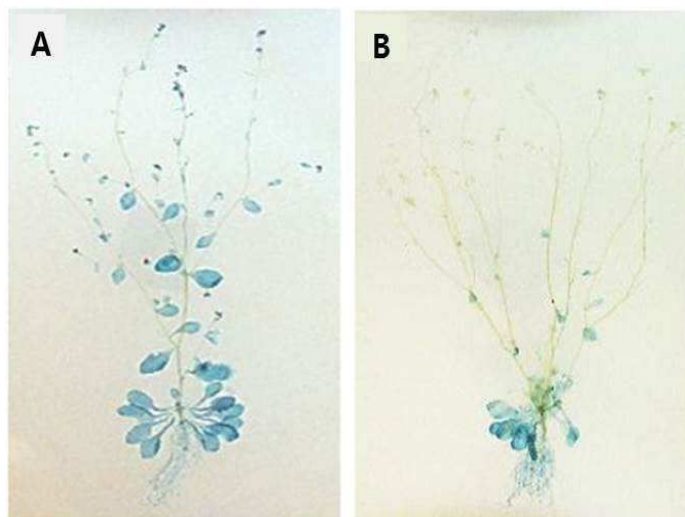
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 애기장대 유래의 습도를 센싱하는 SAGL1 프로모터 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 애기장대 유래의 습도를 센싱하는 SAGL1 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 SAGL1 프로모터를 포함하는 재조합 발현 벡터는 가습 조건에서 프로모터 하류에 연결된 목적 단백질의 발현을 효과적으로 유도할 수 있으므로, 본 발명에 따른 프로모터는 가습 조건에서 유용 단백질의 생산에 사용될 수 있으며, 식물의 습도 센싱에 대한 지표로서 활용 또한 가능할 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12N 15/8257 (2013.01)

G01N 33/5097 (2013.01)

(72) 발명자

김효진

전라남도 장흥군 장흥읍 영전1길 111-7

유시인

경기도 수원시 팔달구 고화로62번길 19-4, 204호(고등동, 그린캐슬)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ013422

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 공용 오믹스 데이터 활용으로 이끼 큐티클 발달 관련 유전자들의 기능 분석 연구

기 여 율 7/10

주관기관 전남대학교 산학협력단

연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1D1A1B03933195

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업

연구과제명 Kelch Repeat F-Box 단백질 기능연구: Vascular Cambium 발달을 중심으로

기 여 율 3/10

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 90% 이상의 상대습도를 센싱하는 SAGL1(SMALL AND GLOSSY LEAVES 1) 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 작동 가능하게 연결시켜 제조된 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 4

제3항에 따른 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시킨 후, 형질전환된 식물체에 90% 이상의 상대습도 조건을 가하여 상기 식물체 내에서 SAGL1 프로모터 하류에 연결된 목적 단백질이 생산되도록 하는 것을 특징으로 하는 식물체 내에서 목적 단백질을 생산하는 방법.

청구항 5

제2항의 식물 발현 벡터에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 90% 이상의 상대습도 조건에서 발현되는 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 6

제5항의 방법에 의해 제조된 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 90% 이상의 상대습도 조건에서 발현되는 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물체.

청구항 8

제6항에 따른 식물체의 형질전환된 종자.

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 애기장대 유래의 습도를 센싱하는 SAGL1 프로모터 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 애기장대 유래의 습도를 센싱하는 SAGL1 프로모터 및 상기 프로모터를 이용한 재조합 식물 발현 벡터에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프로모터(promoter)는 구조유전자(gene)의 상부 쪽에 연결되어 있는 유전체(genome) 부위로서, 이에 연결된 구조유전자가 mRNA로 전사(transcription)되도록 조절하는 역할을 한다. 프로모터에는 여러 일반 전사인자

(general transcription factor)들이 결합함으로써 활성화(activation)되는데, 보편적으로 유전자 발현을 조절하는 TATA box, CAT box 등의 염기서열을 가지고 있다. 생체의 기본대사에 필요한 단백질들은 세포 내에서 일정 농도를 유지하여야 하므로 이들 유전자에 연결된 프로모터는 일반 전사인자의 작용만으로도 항상 활성화되어 있다. 이에 반하여 평시에는 역할이 없고 특수한 상황 하에서만 기능이 요구되는 단백질들은 해당 구조유전자의 발현을 유도하는 유도성 프로모터(inducible promoter)가 연결되어 있다. 즉 유도성 프로모터에는 생물체의 발달과정에서, 또는 주변으로부터의 환경적 요인에서 오는 외부 자극에 의해 활성화된 특이 전사인자(specific transcription factor)가 결합함으로써 활성화된다.

[0003] 유전자 전이(transformation)를 통한 형질전환 식물체를 개발함에 있어 항시적이면서 강한 발현을 하는 프로모터들, 예를 들어 꽃양배추 모자이크 바이러스 35S(CaMV 35S) 프로모터(Odell et al., Nature 313: 810-812, 1985)가 널리 사용되고 있다. 그러나 이러한 프로모터에 연결된 특정 유전자의 항시적이고 과다한 발현(overexpression)은 생체대사에 불필요한 대량의 단백질이 주는 유독효과로 인하여 형질전환 식물체가 발아가 되지 않거나 왜소하게 되는 등의 부작용이 나타나는 경우가 많다. 대표적인 예로서, CaMV 35S 프로모터를 사용하여 환경 스트레스 전사인자 유전자 *DREB1A*를 과발현시킨 애기장대가 저온 및 가뭄 조건에 대하여 저항성이 증진되는 것은 관찰되었으나, 성장이 저해되어 왜소증(dwarfed phenotype)을 보이면서 아미노산 프롤린 및 수용성 당류의 생산이 함께 증가하는 것이 확인되었다. 이러한 부작용은 CaMV 35S 프로모터 대신 환경 스트레스 관련 유전자인 *rd29A*의 유도성 프로모터를 사용함으로써 최소화할 수 있다(Kasuga et al, Nat. Biotechnol. 17: 287-291, 1999).

[0004] 그러한 이유로 식물체 조직에서 모든 시간대에 항시적으로 발현을 유도하는 프로모터 대신 특정 조건 또는 특정 시기에 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 유도성 프로모터를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되어 왔다. 학술적으로는, 미생물이나 동물에서 분리된 프로모터를 식물에 도입하고 화학물질을 유도체로 사용하여 목적 단백질의 생합성을 촉발하는 유도성 프로모터 시스템이 많이 개발되었다. 지금까지 화학물질에 의한 발현 유도 시스템으로서 식물에 적용된 화학물질의 예로는, 스테로이드제인 텍사메타손(dexamethasone), 항생제 테트라사이클린(tetracycline), 구리이온, IPTG 등이 알려져 있다. 그러나 이들 화학물질의 가격이 극히 고가이고, 화학물질 자체가 유독한 효과를 발생하기도 하며, 모든 식물에 적용되지 못하는 등의 문제점이 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1147807호에는 '애기장대의 스트레스 유도성 파이토시스타틴 AtCYS2 프로모터'에 대해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1293638호에는 '식물 조직 특이적인 BrLRP1 프로모터'에 대해 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 애기장대 유래의 습도를 센싱하는 SAGL1 프로모터 및 이의 용도에 대해 아직 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 SAGL1 단백질을 코딩하는 유전자의 프로모터 서열을 확보하여 SAGL1 프로모터 영역을 리포터 유전자와 연결하여 재조합 식물 발현 벡터를 제작하였다. 그 후, 상기 SAGL1 프로모터 하류에 리포터 유전자를 연결한 재조합 발현 벡터로 애기장대 식물체를 형질전환하여 형질전환 식물체를 제조하였고, 형질전환 식물체에서 리포터 유전자의 활성을 분석한 결과, 낮은 습도 조건에 비해 높은 습도 조건에서 리포터 유전자의 활성이 현저히 우수함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 습도를 센싱하는 SAGL1 프로모터를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시킨 후, 형질전환된 식물체에 가습 조건을 가하여 상기 식물체 내에서 SAGL1 프로모터 하류에 연결된 목적 단백질이 생산되도록 하는 것을 특징으로 하는 식물체 내에서 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하는 단계; 및 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 가습 조건에서 발현되는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 가습 조건에서 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터에 형광 리포터 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하여 식물체를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 식물체의 형광을 측정하는 단계를 포함하는 대기 중의 상대습도를 측정하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 SAGL1 프로모터 및 상기 프로모터를 포함하는 재조합 발현 벡터는 가습 조건에서 목적 단백질의 발현을 효과적으로 유도할 수 있으므로, 본 발명에 따른 프로모터를 함유하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된 식물체는 가습 조건에서 유용 단백질의 생산에 사용될 수 있으며, 식물의 습도 센싱에 대한 지표로서 활용 가능할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 *pSAGL1::GUS* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 식물체에서 GUS 단백질의 발현 양상을 조직화학적 분석 방법을 통해 확인한 결과이다. A는 10일령의 유묘(seedling)이며; B 내지 F는 5~7주령 애기장대의 뿌리(B); 로제트 잎(C); 줄기(D); 꽃 기관(E); 및 장각(F)을 나타낸 것이다.

도 2는 *pSAGL1::GUS* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 식물체에서 GUS 단백질의 발현이 습도의 변화에 의해 조절되는지 여부를 확인하기 위해, 배양 병에서 생장시킨 6주 된 형질전환 애기장대 식물체를 병마개를 열기 전(A)과 32시간 동안 열고 난 후(B)에 GUS의 발현 양상을 조직화학적 분석방법을 통해 확인한 결과이다.

도 3은 토양에서 생장시킨 4주 된 형질전환 애기장대 식물체(*pSAGL1::GUS*)의 잎을 플라스틱 시트로 덮은 경우(오른쪽)와 덮지 않은 경우(왼쪽)에 GUS의 발현 양상을 조직화학적 분석방법을 통해 확인한 결과이다.

도 4는 습도 조건에 따른 SAGL1 단백질의 안정성을 확인하기 위해, CaMV 35S 프로모터 조절 하에 6x Myc 및 *SAGL1::eYFP*의 구축물을 포함하는 아그로박테리움을 담배(*N. benthamiana*) 잎에 침윤시킨 후, 플라스틱 시트로 잎을 랩핑하거나(상대습도 90% 이상) 랩핑하지 않고(상대습도 50~60%) 48시간 동안 생육시킨 후, 면역블랏으로 SAGL1 단백질의 안정성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 유래의 습도를 센싱하는 SAGL1 프로모터를 제공한다.

[0016] 상기 습도를 센싱하는 SAGL1 프로모터는 애기장대에서 분리된 것으로, SAGL1(SMALL AND GLOSSY LEAVES 1) 단백질을 코딩하는 유전자의 프로모터이다.

[0017] 본 발명에 따른 SAGL1 프로모터에 있어서, 상기 습도는 상대습도가 61% 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 상대습도가 80% 이상인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상대습도가 90% 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] SAGL1(SMALL AND GLOSSY LEAVES 1) 단백질은 Kelch 모티프를 포함하고 있는 E3 유비퀴틴 리가제로, 주요 왁스 성분인 초장쇄 알칸(alkanes)의 생산에 관여하는 효소인 CER3(*eceriferum3*)의 안정성을 조절하여 애기장대에서 큐티클 왁스 생합성을 음성적으로 조절하는 단백질이다.

[0019] 일반적으로 프로모터는 RNA 중합효소가 결합하여 전사개시를 유도하는 부분을 포함하며 프로모터의 염기서열에 따라 RNA 합성 정도가 결정되기 때문에 프로모터에 따라 유전자의 발현 강도가 다를 수 있다.

[0020] 프로모터의 발현 활성의 수준은 일반적으로 사용되는 방법을 이용하여 특정 조건에서 측정된 프로모터의 발현수준을 일반적인 정상 조건 또는 비교 조건에서의 것과 비교함으로써 평가되는데, 프로모터의 조절 하에서 발현된 유전자 생성물, 예를 들어 단백질 및 RNA 등의 생성량(발현수준) 또는 생성된 단백질의 활성에 의해 프로모터의 발현수준 또는 강도(세기)를 측정할 수 있다.

[0021] 또한, 상기 프로모터 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 상동체의 염기 서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기 서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기 서열이다. 구체적으로, 상기 프로모터 서열은 서열번호 1의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는

95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

[0023] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 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.

[0024] 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. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0025] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투메파시엔스와 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.

[0026] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스포노트리신(phosphinotricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따른 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타-아밀라아제 RAmY1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0028] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 식물 발현 벡터에서, 상기 재조합 식물 발현 벡터는 본 발명의 SAGL1 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동가능하게 연결시켜 제조된 것일 수 있다. 본 발명에서, "작동가능하게 연결된"은 이중 단백질을 발현하기 위한 단위로서 기능하는 발현 카세트의 성분을 말한다. 예를 들면, 단백질을 코딩하는 이중 DNA에 작동가능하게 연결된 프로모터는 이중 DNA에 해당하는 기능적 mRNA의 생산을 촉진한다. 상기 프로모터와 목적 단백질을 코딩하는 유전자의 연결 방법은 PCR, 제한효소 절단 및 라이게이션법 등 당업자에 의해 용이하게 실시될 수 있는 통상의 기술을 사용할 수 있다.

[0029] 상기 목적 단백질은, 외래 단백질과 혼용되어 사용될 수 있고, 발현하는 형질전환된 숙주세포에서는 정상적으로는 존재할 수 없는 단백질을 의미한다. 또한, 목적하는 생성물은 그 자체가 생물학적으로 활성인 단백질이거나 전사 후 특정 유전자의 불활성화에 관여하는 RNA일 수 있고, 상기 생물학적으로 활성인 단백질은, 예컨대 효소, 호르몬, 항체, 사이토카인 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 목적 단백질은 일반적으로 센스 방향으로 벡터 내에 존재할 것이지만, 특정 유전자를 불활성화시키기 위하여 안티센스 방향으로 존재할 수도 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시킨 후, 형질전환된 식물체에 가습 조건을

가하여 상기 식물체 내에서 SAGL1 프로모터 하류에 연결된 목적 단백질이 생산되도록 하는 것을 특징으로 하는 식물체 내에서 목적 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 가습 조건은 상대습도가 61% 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 상대습도가 80% 이상인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상대습도가 90% 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 목적 단백질은 전술한 바와 같다.

[0032] 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 잠종 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., 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-코딩된) 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.

[0033] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다.

[0034] "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명은 상기 식물 발현 벡터에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하는 단계; 및

[0036] 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 가습 조건에서 발현되는 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 가습 조건은 전술한 바와 같다.

[0038] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 식물 발현 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 투머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 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.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 목적 단백질을 코딩하는 유전자가 가습 조건에서 발현되는 형질전환 식물체 및 이의 형질전환된 종자를 제공한다. 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 완두 등의 쌍자엽 식물 또는 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리, 양과 등의 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이며, 더욱 바람직하게는 애기장대 또는 담배 식물체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터에 형광 리포터 단백질을 코딩하는 유전자를 재조합하여 식물체를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환된 식물체의 형광을 측정하는 단계를 포함하는 대기 중의 상대습도를 측정하는 방법을 제공한다. 본 발명의 프로모터는 습도가 높을수록 유전자의 발현을 많이 증가시키므로, 형질전환된 식물체의 형광이 강하면 대기 중의 상대습도는 높은 것으로, 형광이 약하면 상대습도는 낮은 것으로 판단할 수 있는 것이다. 상기 형광 리포터 단백질은 GUS(beta-glucuronidase), GFP(green fluorescent protein), YFP(yellow fluorescent protein) 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[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 및 성장 조건

- [0044] 애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 종자를 표백제 용액으로 표면 살균 후, 토양(SunGro Mix #5) 또는 1/2 MS 한천배지(MS salts(Caisson Laboratories) containing 0.3% gelite(Duchefa), 1% sucrose 및 pH 5.8)에 파종하였다. 4℃에서 2~3일 동안 층화(stratification) 후, 애기장대 식물체는 제어된 환경(100 μmol photons/m²/s, 22~23℃, 16/8h 명/암 광주기)에서 생육시켰으며, 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물체도 상기 제어된 환경에서 생육시켰다.
- [0045] **2. SAGL1 프로모터가 삽입된 발현 벡터 제작 및 이를 이용한 형질전환 식물체 제조**
- [0046] 애기장대 유래의 *SAGL1* 유전자의 대기 중 습도에 따른 발현 양상을 관찰하기 위해, 애기장대에서 *SAGL1*의 전사체 수준을 정량적 RT-PCR 방법을 이용하여 확인하였다. 5주 동안 생육한 애기장대 잎을 플라스틱 시트로 랩핑하여 고습의 조건에 노출시킨 후 *SAGL1*의 전사체 수준을 확인한 결과, 고습에 노출하기 전보다 고습에 노출되었을 때 상기 유전자의 전사체 수준이 증가하였다. 이에 *SAGL1* 전사체 발현의 조절에 관여하는 프로모터 영역을 분리하기 위해, PlantPAN (<http://PlantPAN2.itps.ncku.edu.tw>) 데이터베이스를 이용하여 상기 유전자의 프로모터 영역을 예측하였다. *SAGL1* 유전자를 검색한 뒤 전사시작지점/5'UTR-End 설정값을 1300/100으로 설정하여 예측되는 *SAGL1* 프로모터 염기서열을 설정하였다. 이에 상기 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 영역을 확보하였다.
- [0047] 상기 확보한 *SAGL1* 프로모터 영역과 GUS 리포터 유전자가 융합된 구축물을 제조하기 위해, *SAGL1* 개시 코돈의 상류 1,493bp 단편을 애기장대 C24 생태형의 게놈 DNA 및 프라이머 세트 F7A10 p*Bam*HI-F(서열번호 2, ATTCGGATCTTTTGTGGGTAACCTGTCA) 및 F7A10 p*Nco*I-R(서열번호 3, ATAGCCATGGCTTCAAACTCGAAGTTCATA)을 사용하여 PCR로 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T easy vector(Promega)에 클로닝한 후 ABI3730 DNA analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 서열을 분석하고, 약 1.5kb의 *SAGL1* 프로모터의 염기서열(서열번호 1)을 수득하였다. 상기 *SAGL1* 프로모터를 포함하는 *Bam*HI/*Nco*I 절편을 GUS 리포터 유전자와 융합한 후, pCambia1381 바이너리 벡터에 서브 클로닝하여 pCambia1381-*SAGL1p*-GUS를 얻었다. 이를 아그로박테리움 튜메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 균주에 형질전환하였으며, 형질전환된 아그로박테리움은 꽃대침지법(floral dipping)으로 애기장대 식물체에 도입되거나, 침윤(infiltration) 방법으로 담배 식물체에 형질도입되었다.
- [0048] *SAGL1::eYFP* 융합 단백질을 구축하기 위해, *SAGL1* 유전자의 CDS를 CaMV 35S 프로모터 및 Rubisco 소단위 터미네이터를 포함하는 pPZP212 바이너리 벡터에 클로닝하여 p*SAGL1::eYFP* 구축물을 수득하였다. 정지 코돈이 없는 *SAGL1*의 CDS는 *SAGL1_Sac*I_F 및 *SAGL1_Sma*I_R 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다.
- [0049] **3. GUS 조직화학적 분석**
- [0050] 형질전환 식물체는 30 μg/mL의 하이그로마이신 B를 이용하여 선별하였으며, T2 세대 식물체는 GUS 발현 관찰에 사용되었다. 고습도 조건의 실험을 위해, 1/2 MS 한천 배지 용기에 덮개를 씌운 상태로 종자를 3~6주 동안 발아시켰으며, 용기 덮개를 32시간 동안 개방한 후 시료들을 염색하였다. 일부 유묘(seedling)들은 토양에 이식하여 2주 동안 재배시켰다. 모든 조직은 100mM의 X-Gluc을 함유한 GUS 염색 용액으로 37℃에서 하룻밤 염색한 후, 75%(v/v) 에탄올을 사용하여 엽록소를 제거하고 시료들을 현미경으로 관찰하였다.
- [0051] **4. 인 비트로 번역블롯 분석**
- [0052] *SAGL1*의 단백질 안정성 분석을 위해, CaMV 35S 프로모터에 의해 구동되는 *SAGL1::eYFP* 또는 6xMYC 구축물로 형질전환된 아그로박테리움 균주를 담배 잎에 침윤시키고, 12시간 후에 플라스틱 시트지로 랩핑하거나(90% 이상 상대습도) 랩핑하지 않았으며(50~60% 상대습도), 침윤 36시간 후에 각 조건의 담배 잎을 수확하였다. 총 단백질은 추출 버퍼를 이용하여 추출하였으며, 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였으며, YFP 및 MYC 단백질은 항-GFP 및 항-MYC 항체를 이용하여 면역학적으로 검출하였다.
- [0053] **실시예 1. 리포터 유전자 발현을 통한 고습도 조건에서의 *SAGL1* 프로모터 발현 경향 분석**
- [0054] *SAGL1* 유전자의 발현 패턴을 조사하기 위해, *SAGL1* 프로모터 영역을 리포터 유전자와 연결하여 제조한 pCambia1381-*SAGL1p*-GUS 발현 벡터로 형질전환된 애기장대 식물체(p*SAGL1::GUS*)를 제조하였다. 형질전환된 애기장대의 각 조직에서의 GUS 활성을 조직화학적 염색 방법으로 분석하였다. 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 10일 된 유묘(seedling), 뿌리, 잎 배수조직(leaf hydathode), 꽃밥 및 5~7 주된 식물의 발달 종자와 잎, 줄기, 꽃받침, 꽃잎 및 장각(silique)을 포함한 기관에서 GUS 발현이 관찰되었다(도 1).
- [0055] 또한, *SAGL1*의 발현이 대기 중 습도의 변화에 의해 조절되는지 여부를 확인하기 위해, 배양병에서 성장시킨 6주 된 형질전환된 애기장대 식물체(p*SAGL1::GUS*)를 병마개를 열기 전과 열고 난 후 32시간 후에 각각 염색하였다.

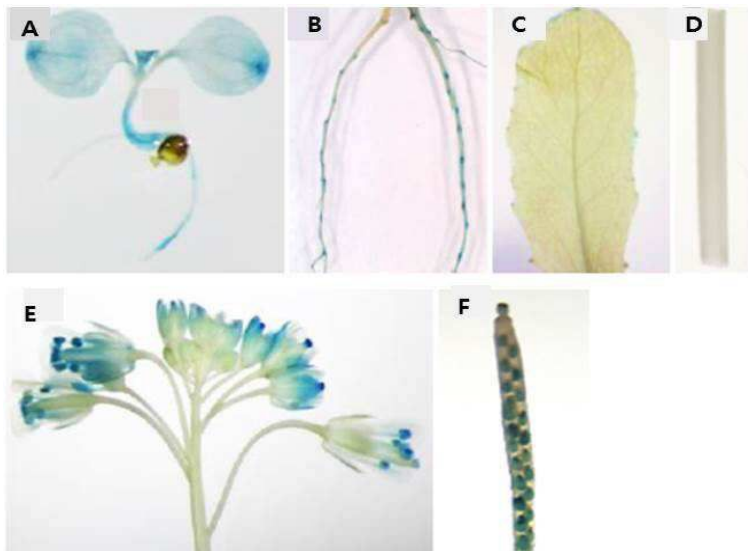
그 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 *GUS* 발현은 병마개를 열기 전(고습 조건)의 형질전환 식물체의 지상부를 포함한 모든 기관에서 관찰되었지만, 병마개를 열고난 후의 형질전환 식물체 지상부 부분에서는 *GUS* 발현이 상당히 감소되었음을 확인할 수 있었으며(도 2), 토양에서 자란 4주 된 *pSAGL1::GUS* 형질전환 식물체의 잎을 플라스틱 시트로 덮었을 경우(고습 조건)에는 *GUS* 발현이 관찰되었으나, 플라스틱 시트로 덮지 않았을 때에는 *GUS* 발현이 관찰되지 않았다(도 3). 이러한 결과는 상대적으로 습도가 높고(약 90% 이상), 낮은(약 50-60%) 조건하에서 *SAGL1*의 발현이 업-다운 조절된다는 것을 의미하였다.

[0056] 실시예 2. 상대적 높은 습도 조건에서 *SAGL1* 단백질의 안정성 증가 확인

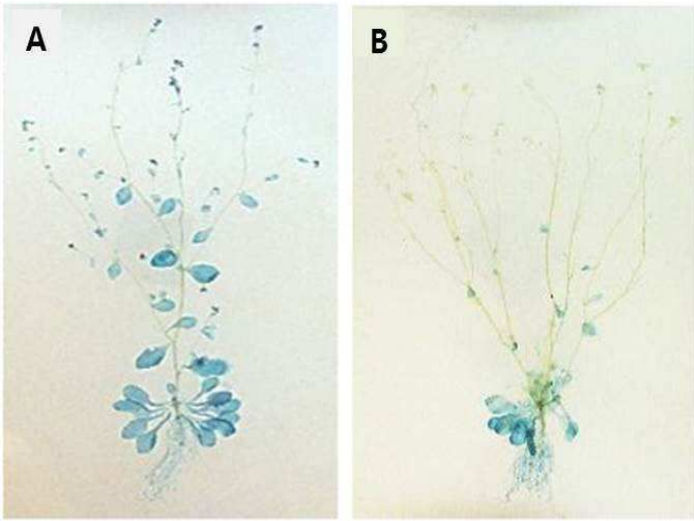
[0057] 다른 대기 습도에 대한 반응으로 *SAGL1* 단백질 안정성을 조사하기 위해, *SAGL1::eYFP* 및 pBA002-6xMYC 구축물(Seo et al., 2011, . Plant Cell, 23: 1138-1152)을 담배(*N. benthamiana*) 잎에 침윤시킨 후, 잎을 랩핑하거나(상대습도 90% 이상) 랩핑하지 않고(상대습도 50-60%) 48시간 동안 생육시켰다. 이후에, 형광신호가 관찰된 잎으로부터 총 단백질을 추출하였으며, 항-GFP 및 항-MYC 항체를 이용하여 면역 블롯 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 4에 개시한 바와 같이 내재 대조군인 MYC 단백질의 발현은 거의 동등하게 발현되었으나, 형광신호의 세기 및 YFP의 단백질 발현 수준은 랩핑하지 않은 잎(50-60% 상대습도)보다 랩핑한 잎(90% 이상 상대습도)에서 더 높게 나타났으며(도 4), 이를 통해 *SAGL1* 단백질이 상대적으로 낮은 습도 조건에 비해 높은 습도에서 더 안정하다는 것을 확인할 수 있었다.

도면

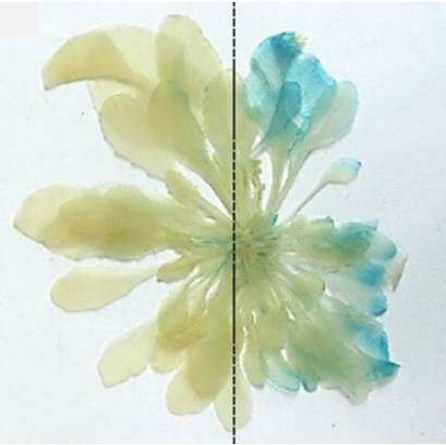
도면1



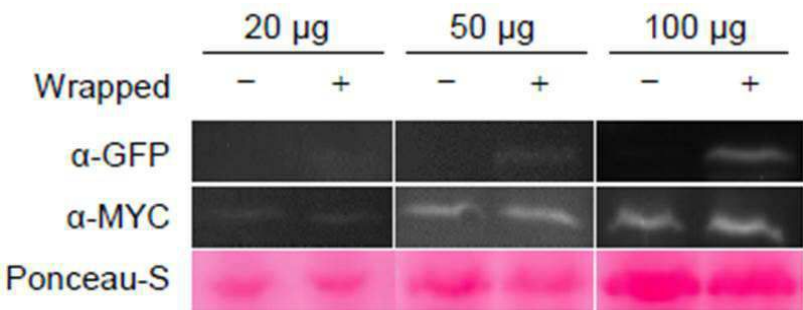
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY
SOGANG UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION
- <120> SAGL1 promoter sensing humidity from Arabidopsis thaliana and

uses thereof

<130> PN18154

<160> 3

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1492

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

tttgttgggg taacttgica tttttttttt aatataactt gtcgttatta ccttagtatac 60

aacgaaatat gaaattatct ctaagatccc ttatgaattc gaaaatctcc catttcacgc 120

taccaccaat ggaggctccc ctggggactt tgctgctttc actaaacgtg gagtgacatt 180

cgactgtttt ctctacgatg tactctgcag tagtctatac ttatcaattc aaaaatatca 240

cacttataca aaaaacagaa aaattgcaca acaactatg attcatctaa atattgacta 300

cataaaactt cgatttataa cttatgggtg gctctctttt tttctttgtt gccttaaaga 360

gaagagggaa cattttgata aatatccttg tactcaatta ttattatgga tagacatatac 420

gttttgatg taitctacat ctagtatttg aaaattgtgg tgtatgtatt ctaaataattc 480

cgtgtcccat tccatacgac aaaatcgtcc ccttctttta aatcttttga tgaagtgggt 540

gaaaaattga catataatta aatgtatatg aattaaattt attgtagat actatatagt 600

ccaaacatac cattcgtaag gcatcaatta gcttaatttg ttgtccaaac aatttatatt 660

taaatacact gacagattcc gcccatTTaa ttataagtac aacggtttta gtgcttgtc 720

cattttaaat atttttttac tacaataaaa acatataaac ttgacgatta atatgaattt 780

catccaatga aaaaagtctg aaagaatcat aattatgtgt tagaatgact gatatggttt 840

gaaataccaa atcaaaaact tttgttttcc actttccaac aaaaagttag cgcataattga 900

catggaaata atcaatgttt ctttcaccg gtaaattatt attcacaatc tttaggttgc 960

tcccttaaatt aattgacctt tataatttaa ctaaaagtaa tataatttgg attacatata 1020

tagtttaatt taatgtgttt tacaataaca cattagtatg ttttgggtt aatcttaca 1080

atgggtgacc aaagaaaaaa caaatcttac accttttttg actattttac tagctccatt 1140

aatttcaagg tcgataataa aatatagtat taatcacatt tcattcaata aactctagat 1200

tctgtaataa caaaaaataa aataataaaa cactagatta ataataggta tttaatacca 1260

aagcttttac tttgttttcc cgagaagaga gagagagaga gacctaccag tcccattttc 1320

cgtgttcaga gagcgaagtg gaaggtgggt cacgttttcg tctaattctcc gactatcact 1380

gagattggac catttggttt ctgggtttct ttgggtcaga taaagttaca agcttgagaa 1440

ttctcgatct gtggtttttg tttctgtttc ttatgaactt cgagttttga ag 1492

<210> 2

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

attcgatcc tttgttggg gtaactgtc a 31

<210> 3

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

atagccatgg cttcaaaact cgaagttcat a 31