



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0101401  
(43) 공개일자 2008년11월21일

(51) Int. Cl.

*C12N 15/29* (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0048162

(22) 출원일자 2007년05월17일

심사청구일자 2007년05월17일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

강규영

경남 진주시 주악동 현대아파트 117동 1104호

김선태

경남 진주시 망경동 130-17번지

강영현

경남 하동군 옥종면 청룡리 주포 244-7번지

(74) 대리인

최규환

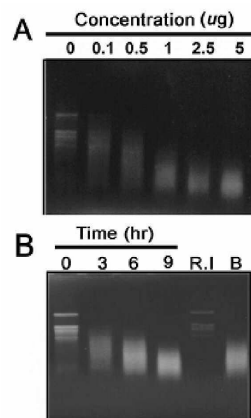
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 벼 유래의 리보뉴클레아제 활성을 가지는 O s P R -10단백질

### (57) 요약

본 발명은 벼 (*Oryza sativa* L. japonicatype) 유래의 리보뉴클레아제 활성을 가지는 병원관련 단백질 OsPR-10에 관한 것으로, 보다 구체적으로 상기 OsPR-10 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 단백질의 식물체 조직에서 발현위치, 상기 유전자를 *E. coli*에서 발현시켜 얻은 재조합 OsPR-10 단백질, 상기 재조합 단백질의 리보뉴클레아제 활성, 상기 유전자를 이용하여 리보뉴클레아제 활성을 증가시키는 방법, 상기 방법에 의해 식물의 리보뉴클레아제 활성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다. 본 발명에서 분리된 벼 유래 병원관련 단백질 OsPR-10은 리보뉴클레아제 활성을 가지는 항바이러스 단백질로 이들은 이황화결합 또는 이합체 형성과 유지에 의한 것으로 식물에서 구조상의 자가 방어 메카니즘으로 작용할 수 있다.

대표도 - 도6



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 리보뉴클레아제 활성을 가지는 벼 유래의 OsPR-10 단백질.

### 청구항 2

제1항의 OsPR-10 단백질을 코딩하는 유전자.

### 청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 유전자.

### 청구항 4

제1항의 상기 단백질의 벼 식물체 내에서 발현위치.

### 청구항 5

제3항의 유전자를 포함하는 재조합 OsPR-10 단백질

### 청구항 6

제5항의 재조합 단백질로 형질전환된 식물체

### 청구항 7

제 3항의 유전자를 식물체에서 과발현시킴으로써 리보뉴클레아제 활성을 증가시키는 방법.

### 청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용 작물류; 사과나 무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료 작물류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9

제 7항의 방법에 의해 리보뉴클레아제 활성이 증가된 형질전환 식물체.

### 청구항 10

제 9항의 형질전환 식물체의 종자.

## 명 세 서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<18> 본 발명은 벼 유래의 리보뉴클레아제 활성을 가지는 병원관련 단백질 OsPR-10에 관한 것으로, 보다 구체적으로 상기 OsPR-10 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 단백질의 식물체 조직에서 발현위치, 상기 유전자를 *E. coli*에서 발현시켜 얻은 재조합 OsPR-10 단백질, 상기 재조합 단백질의 리보뉴클레아제 활성, 상기 유전자를 이용하여 리

보뉴클레아제 활성을 증가시키는 방법, 상기 방법에 의해 식물의 리보뉴클레아제 활성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- <19> 지구상의 거의 모든 식물은 다양한 환경스트레스에 노출되어져 있다. 이는 식물의 성장, 발달, 생산성 등에 큰 영향을 미치게 되는데, 식물은 생존본능을 통해 다양한 방어체제를 가동하며 적극적으로 환경 스트레스에 대항하게 된다. 그런 과정 동안에 대부분의 식물은 소위 병원관련 유전자 (PRs) (Dixon and Lamb 1990, Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 41: 339-367)라 불리는 많은 단백질을 합성하거나 축적한다. 현재까지 많은 연구를 통해 PRs는 PR-1에서 PR-17까지 17개의 독립적인 부분으로 그룹화 되어 있다 (Van Loon and Van Strien 1999, Physiol Mol Plant Pathol 55: 85-97).
- <20> 지금까지 많은 벼 유래 PR-10 단백질이 확인되어졌다. 프로벤아졸-유도된 단백질로 알려진 PBZ1 (Midoh and Iwata 1996, Plant Cell Physiol 37: 9-18)은 처음으로 확인되어졌으며 세 개의 동종체 PBZ1 유전자인 PR-10a, PR-10b, PR-10c가 규명되어졌다 (McGee et al. 2001, Mol Plant Microbe Interact 14: 877-886). 자스몬산 및 살리실산에 의해 유도되어지는 JIOsPR-10 (Jwa et al. 2001, Biochem Biophys Res Commun 286: 973-983)가 밝혀졌으며 최근에는 단백질체 분석을 통해 염, 건조, 벼도열병 감염에 의해 뿌리에서 특이적으로 발현되는 새로운 RSOsPR10 (Hashimoto et al. 2004, Plant Cell Physiol 45: 550-559)가 규명되어졌다. 게다가 PBZ1을 포함하는 벼 유래 PR-10 유전자는 자스몬산 (JA) (Jwa et al. 2001, Biochem Biophys Res Commun 286: 973-983; Rakwal et al. 1999, Plant Physiol Biochem 41: 453-457; Lee et al. 2001, Mol Plant Microbe Interact 14: 527-535; McGee et al. 2001, Mol Plant Microbe Interact 14: 877-886; Moons et al. 1997, Plant Cell 9: 2243-2259; Kim et al. 2003, Proteomics 3: 2368-2378 and 2004, Proteomics 4: 3569-3578), 살리실산(SA) (Jwa et al. 2001, Biochem Biophys Res Commun 286: 973-983; McGee et al. 2001, Mol Plant Microbe Interact 14: 877-886), 앱시스산 (ABA) (Lee et al. 2001, Mol Plant Microbe Interact 14: 527-535; Moons et al. 1997, Plant Cell 9: 2243-2259), 키네티 (Rakwal et al. 2003, Plant Physiol Biochem 41: 453-457)을 포함한 식물 호르몬과 저온 및 건조 (Hashimoto et al. 2004, Plant Cell Physiol 45: 550-559)와 같은 비생물학적 스트레스에 감응하는 것으로 확인되어졌다.
- <21> 한편, PRs 그룹 중에서 벼 유래 병원관련 단백질 10 (OsPR-10)은 다양한 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Breiteneder et al. 1989, EMBO J 8: 1935-1938; Warner et al., 1993 and 1994, Plant Mol Biol 19: 555-561; Constabel and Brisson 1995, Mol Plant Microbe Interact 8: 104-113; Swoboda et al. 1996, Physiol Plant 96: 433-438; Huang et al. 1997, Plant Mol Biol 34: 681-686; Barratt and Clark 1991, Planta 184: 14-23; Crowell et al. 1992, Plant Mol Biol 18: 459-466; Mylona et al. 1994, Plant Mol Biol 26: 39-40.; Walter et al. 1996, Eur J Biochem 239: 281-293; Sikorski et al. 1999, Plant Sci 149:125-137). 특히 발달조직에서 많은 발현이 이루어지고 리보뉴클레아제 활성을 나타내는 것으로도 보고된 바 있다 (Moiseyev et al. 1997, FEBS Lett 407: 207-210).
- <22> 병원균에 감염된 식물은 다수의 유전자 발현이 증가함으로써 병원균의 감염에 반응하며, 발현된 유전자 중에는 질병에 대한 저항과 관련되는 것도 있다. 이들 유전자들 중에는 병원관련단백질(PR-protein)과 항생제 단백질을 코딩하는 것들이 포함되어 있다. PR 단백질이란 병원성 조건에서 혹은 관련 조건 하에서 유도되는 식물 단백질을 말하며, 활성식물방어의 구성성분으로서 보다 빠르게 발현되며 내성 식물이 독성이 없는 병원균에 의해 도전 받는 불화합성 반응에 보다 큰 정도로 발현된다.
- <23> 비록, 많은 PR 단백질의 생물학적 및/혹은 생화학적 기능이 수십 년간 연구되었지만, 키틴분해효소와  $\beta$ -1,3-글루카나제와 같은 단지 소수의 PR 단백질의 촉매적 활성만이 명확하게 밝혀져 있고, 식물방어 반응에 관여하는 다른 PR 단백질의 역할에 대해서는 규명되어 있지 않다. PR 단백질은 현재 14군으로 분류되며, PR-10 군에 있어서 항미생물 활성을 포함한 생물학적 특징들에 대해서는 보고되어 있지 않다.
- <24> PR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성은 몇몇 작물에서만 보고되어져 있으며, 벼에서는 PR-10 단백질의 기능 및 세포내 발현위치, 리보뉴클레아제 활성에 대해 거의 보고되어져 있지 않다.
- <25> 이에 본 발명자들은 벼 유래 OsPR-10 단백질의 기능을 연구하던 중, 세포내 발현위치를 웨스턴 블롯과 면역조직화학염색 분석을 통해 확인하고, 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 발현패턴 및 스트레스 저항성을 증가시키는 방법과 이항화결합이나 이합체 형성에 의존하는 리보뉴클레아제 활성을 가지는 항바이러스 단백질로 식물의 구조상의 자가 방어 메카니즘으로 작용할 수 있다는 것을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <26> 따라서, 본 발명의 목적은 벼 유래의 리보뉴클레아제 활성을 가지는 OsPR-10 단백질을 제공하는 것이다.
- <27> 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.
- <28> 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질의 벼 식물 내 발현위치를 제공하는 것이다.
- <29> 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 제공하는 것이다.
- <30> 본 발명의 다른 목적은 재조합 OsPR-10 단백질을 제공하는 것이다.
- <31> 본 발명의 다른 목적은 재조합 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 제공하는 것이다.
- <32> 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 식물체에서 과발현시킴으로써 리보뉴클레아제 활성을 증가하는 방법을 제공하는 것이다.
- <33> 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 리보뉴클레아제 활성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공하는 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

- <34> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진, 벼 유래의 리보뉴클레아제 활성을 가지는 OsPR-10 단백질을 제공하는 것이다.
- <35> 본 발명에서는 OsPR-10 단백질이 벼도열병에 관여한다는 것을 기초로 하여 도열병에 감염된 벼 잎으로부터 리보뉴클레아제 활성을 가지는 것을 확인하였다. 본 발명에 따른 OsPR-10 단백질의 범위는 벼로부터 분리된 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 상기 단백질의 기능적 동등물을 포함한다. "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 식물체 내에서 과발현시 리보뉴클레아제 활성을 증가시키는 활성을 의미한다.
- <36> 또한, 본 발명은 상기 OsPR-10 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다. 본 발명의 유전자는 OsPR-10 단백질을 코딩하는 게놈 DNA와 cDNA를 모두 포함한다. 바람직하게는, 본 발명의 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함할 수 있다.
- <37> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 유전자를 포함하는 재조합 OsPR-10 단백질을 제공한다. 바람직하게는 상기 유전자를 *E. coli*에서 발현시켜 얻은 재조합 단백질을 의미한다.
- <38> 또한, 본 발명은 벼 식물체 부위에 따른 상기 OsPR-10 단백질의 발현위치를 제공한다.
- <39> 본 발명에서 벼 식물의 잎, 꽃, 줄기, 뿌리를 포함한 성숙한 조직에서 OsPR-10의 발현을 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인한 결과, OsPR-10이 성숙된 식물의 뿌리 및 꽃에서 비특이적 밴드의 생성없이 현저하게 발현량이 증가되어지며 모든 발달 조직에서 많은 발현이 이루어지며 면역염색시험을 통해 OsPR-10 단백질이 뿌리와 꽃에 위치하고 있다는 것을 확인하였다 (도 1 참조).
- <40> 또한, 본 발명은 벼 유래의 OsPR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 제공한다.
- <41> OsPR-10 단백질은 서열분석에 기초하여 유사성이 PR-10 분류에 포함되어진다. 몇몇 PR-10 단백질은 리보뉴클레아제 활성을 가지는 것으로 알려져 있다. 하지만 이들 단백질의 리보뉴클레아제 활성은 그들의 발현패턴을 통해 병원균에 감응하는 것으로 알려져 있지만, 벼에서 그 활성은 명확하게 보고되어져 있지 않다 (McGee et al. 2001 Midoh et al. 1996 Jwa et al. 2001 Hashimoto et al. 2004). 따라서 본 발명에서는 몇몇 작물에서만 보고되어져 있는 PR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 벼에서 처음으로 밝히고, OsPR-10 단백질의 리보뉴클레아제(RNase) 활성이 이합체의 이황화결합의 형성과 유지에 따른다는 것을 확인하였다.
- <42> 또한, 본 발명은 재조합 OsPR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 제공한다.
- <43> 재조합 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 확인하기 위해, 본 발명에서는 RNase 활성을 분석하기 위한 리보뉴클레아제가 포함된 겔을 사용하였다. 리보뉴클레아제 활성을 확인한 결과, OsPR-10 단백질은 비환원성 (DTT가 없는) 음성적 겔에서는 리보뉴클레아제 활성을 나타내었지만, 환원성 겔에서는 활성을 나타내지 않았다 (도 7A 참조). 이러한 결과는 이합체화물 또는 분자내 이황화결합의 형성과 유지에 따른다는 것을 나타내면서 b-머크캡토에탄

올과 DTT같은 환원성 물질로부터 무효화되는 것을 의미한다.

- <44> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 OsPR-10 유전자를 식물체에서 과발현시킴으로써 리보뉴클레아제 활성을 증가시키는 방법을 제공한다.
- <45> 식물체에서 OsPR-10 유전자를 과발현시키는 방법으로는 OsPR-10 유전자를 포함하고 있는 식물체 또는 OsPR-10 유전자를 포함하고 있지 않은 식물체 내로 OsPR-10 유전자를 도입함으로써 수행될 수 있다. 상기에서 "유전자의 과발현"이란 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 OsPR-10 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다. 식물체 내로 OsPR-10 유전자를 도입하는 방법으로는 프로모터의 조절을 받는 OsPR-10 유전자가 포함된 발현 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 방법이 있다. 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 과발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 상기 프로모터의 예로는 이에 한정되지는 않으나, CaMV의 35S RNA 및 19S RNA 프로모터; 피크위트 모자이크 비루스(FMV)에서 유래한 전장 전사 프로모터 및 TMV의 코트 단백질 프로모터를 들 수 있다. 또한, 단자엽 식물이나 목본식물체에서 OsPR-10 유전자를 과발현하기 위해서는 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터를 사용할 수 있다.
- <46> 본 발명의 방법에 의해 리보뉴클레아제 활성이 증가될 수 있는 식물체로는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 쌀, 귀리, 수수를 포함하는 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근을 포함하는 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스 등을 포함하는 사료작물류가 포함된다.
- <47> 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 리보뉴클레아제 활성이 증가된 형질전환 식물체를 제공한다.
- <48> 본 발명에 따른 리보뉴클레아제 활성이 증가된 식물은 당업계의 통상적인 방법인 유성번식 방법 또는 무성번식 방법을 통해 획득할 수 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 식물체는 꽃의 수분과정을 통하여 종자를 생산하고 상기 종자로부터 번식하는 과정인 유성번식을 통해 획득할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 OsPR-10 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환한 다음 통상적인 방법에 따라 캘러스의 유도, 발근 및 토양 순화의 과정인 무성번식 방법을 통해 획득할 수 있다. 즉, OsPR-10 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질전환된 식물의 절편체를 당업계에 공지된 적합한 배지에 치상한 다음 적정 조건으로 배양하여 캘러스의 형성을 유도하고, 신초가 형성되면 호르몬 무첨가 배지로 옮겨 배양한다. 약 2주 후 상기 신초를 발근용 배지에 옮겨서 뿌리를 유도한다. 뿌리가 유도된 다음 이를 토양에 이식하여 순화시킴으로써 스트레스 저항성이 증가된 식물을 획득할 수 있다. 본 발명에서 형질전환 식물은 전체 식물체뿐만 아니라 그로부터 획득될 수 있는 조직, 세포 또는 종자를 포함할 수 있다.
- <49> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- <50> 실시예
- <51> 재료 및 방법
- <52> 1. 식물재료
- <53> 온실에서 네 번째 내지 다섯 번째 잎이 성장된 단계의 벼 (*Oryza sativa* L. japonicatype) 모종에 비생물학적 스트레스를 처리하였다. 돌연변이체 (*sp11* 및 *sp12*)는 본 발명을 위해 서울대학교에서 제공받았다.
- <54> 2. 스트레스 처리
- <55> 광유도 노화처리에서는 벼의 네 번째 내지 다섯 번째 잎을 20 mL 증류수가 담긴 페트리 디쉬에 옮기고 잎의 노화 정도에 따라 배양하면서 전체 엽록소 함량 변화를 관찰하였다. 상처처리의 경우, 잎에 상처를 낸 다음 4, 8, 12, 24시간 후에 시료를 채취하였다. 벼 식물체는 열 및 저온 스트레스 처리를 위해 42℃, 4℃ 배양기로 옮겨서 3, 6, 9시간 간격으로 관찰하였다.
- <56> 3. 웨스턴-블롯 분석 (Western blot analyses)
- <57> 단백질은 Mg/NP-40 완충용액을 이용하여 추출하고 PEG 4000으로 분획을 얻은 다음 기존에 보고된 방법 Kim et al. (2001, Electrophoresis 22: 2103-2109)으로 분석을 실시하였다. PEG로 분획화된 시료는 SDS-PAGE로 분석하

고 반건조 전기영동 시스템 (Hoefer, San Francisco, CA, USA)을 이용하여 PVDF 멤브레인으로 옮겼다

<58> 블러트된 막은 7% w/v 무지방 건조 우유가 포함된 TTBS (50 mM Tris-HCl pH 8.2, 0.1% v/v Tween 20 및 150 mM NaCl)에서 2시간 동안 반응을 차단시켰다. 차단후 막은 TTBS로 1000배 희석된 폴리클로날 안티세럼으로 배양시켰다. 항원-항체 상호작용은 2시간 동안 실시하였다. 막은 20분 동안 TTBS로 3회 세척하고 이차항체 goat anti-rabbit IgG 항체를 TTBS로 5000배 희석시킨 양고추냉이 과산화효소(horseradish peroxidase)와 공유결합시키고 단백질 밴드를 확인하였다. TTBS로 생성된 밴드를 세척한 다음 면역블롯 신호를 ECL (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA).를 이용하여 확인하였다.

<59> 4. 조직부분 제조 및 면역조직화학염색법

<60> 꽃 및 뿌리 조직부분을 PBS-완충용액 포름알데히드(4% 포름알데히드 w/v)로 고정시킨 다음 기존에 보고된 방법 (Kim et al. 2004, Proteomics 4: 3569-3578)으로 분석하였다.

<61> 조직은 수송체로 크실렌을 사용하여 Paraplast Plus (Sigma)로 내장시키고 핸드 마이크로톰으로 절단하고 poly-L-lysine-coated 현미경 슬라이드로 옮겼다. 면역조직화학적 염색을 위해, 이 부분을 0.02% 소듐아지드 및 0.05% 트윈-20이 포함된 PBS에 2% BSA가 포함된 차단 완충액에서 1시간 동안 상온에서 배양시켰다. 이 부분을 정제된 0.1% 트윈-20 및 차단완충액 (1:1, v/v)이 포함된 희석된 완충액에서 일차항체와 2시간 동안 배양시켰다. 조직표본은 각각 10분 동안 PBS-T로 3회 행군 다음 1시간 동안 알칼리 인산화효소와 공유결합된 anti-rabbit IgG 항체 (1:300) 와 반응시킨 후 PBS-T로 10분 동안 행군 다음 시료를 가시화하기 위해 NBT/BCIP 용액에서 20분 동안 배양시켰다.

<62> 5. *E. coli*에서 재조합 OsPR-10 단백질의 생성

<63> 본 발명에서 분리된 벼 유래의 OsPR-10 단백질의 cDNA (서열번호 1) 및 아미노산 서열(서열번호 2)은 기존에 보고된 단백질 정보와 동일하였다 (Gen Bank No. AF416604). OsPR-10에 의해 형질전환된 *E. coli*에서 발현된 재조합 OsPR-10 단백질을 얻기 위해, cDNA 정방향 프라이머 (5' -GGATCCGCATCCACCAACAGCTG-3' : 서열번호 3) 및 역방향 프라이머 (5' -TGATGACGATTAGTTGTAAG -3' : 서열번호 4)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 pGEM-T 벡터(Promega)로 서브클론하였다. *Bam*HI 및 *Pst*1으로 절단된 전이해독프레임(ORF)은 pQE30 벡터 (Qiagen, Chatsworth, CA)로 클론하였다. *E. coli* 세포는 플라스미드 pQE30::OsPR-10로 감염시키고 OD600이 0.6에 도달할 때까지 LB배지에서 30℃로 성장시켰다. IPTG는 1 mM의 최종 농도에서 첨가하고 단백질의 발현을 위해 30℃에서 5-6시간 동안 계속해서 배양시켰다. *E. coli* 세포에서 발현되어진 재조합 OsPR-10 단백질은 Ni-NTA 정제키트를 사용하여 정제하였다.

<64> 6. OsPR-10 단백질의 자리지정 돌연변이 유발

<65> OsPR-10의 돌연변이 유발은 Ansal di (1996, Anal Biochem 23: 110-111)에 의해 보고된 방법으로부터 유래된 PCR-기초된 기술을 사용하여 수행하였다. 간단하게 기술하면, 두개의 분리된 PCR 반응은 자리 지정 돌연변이 프라이머 및 두 개의 유전자 특이적 프라이머 세트를 사용하여 실시하였다. pQE30::OsPR-10 구축물은 돌연변이 단백질의 카세트생성을 위한 주형으로 사용되었다. 돌연변이 생성을 유발하기 위해, 유전자 특이적인 정방향 프라이머 (5' -GGATCCGCATCCACCAACAGCTG-3' : 서열번호 5) 및 역방향 프라이머 (5' -TGATGACGATTAGTTGTAAG -3' : 서열번호 6)를 사용하였다. OsPR-10 (C81S) 돌연변이체를 제조하기 위해, 5 '-올리고데옥시뉴클레오티드 프라이머 (5' -GGACGTGGACAAGTCCGAGTGCAAG-3' : 서열번호 7) 및 3 ' 프라이머 (5' -CCAGCGTCGACTTGGACTCGGACTT-3' : 서열번호 8)를 사용하였다. OsPR-10 (C83S) 돌연변이체를 제조하기 위해서, 5 '올리고데옥시뉴클레오티드 프라이머 (5' -GGACGTGGACAAGTCCGAGTCCAAG-3' : 서열번호 9) 및 3 ' 프라이머 (5' -CCAGCGTCGACTTGGACTCGCACTT-3' : 서열번호 10)를 사용하였다. 또한 OsPR-10 (C81/83S) 이중 돌연변이를 제조하기 위해, 5 '-올리고데옥시뉴클레오티드 프라이머 (5' -GGACGTGGACAAGTCCGAGTCCAAG-3' : 서열번호 11) 및 3 ' 프라이머 (5' -CCAGCGTCGACTTGGACTCGGACTT-3' : 서열번호 12)를 사용하였다. 두개의 프라이머 PCR 산물을 혼합하고 변성시킨 다음 어닐링을 실시하였다. pfu DNA 폴리머라제를 사용하여 확장하고 확장된 부분은 유전자 특이적 정방향 및 역방향 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 두 번째 PCR 산물은 아가로스 겔 전기영동에 의해 분리하고 발현벡터 pQE30으로 클론하였다 (도 5 참조).

<66> 7. 리보뉴클레아제 활성 분석 (RNase assay)

<67> 본 발명에서는 정제된 OsPR-10 단백질은 벼 잎으로부터 제조된 전체 RNA 및 DNA 5 μg이 포함된 반응혼합물의 리보뉴클레아제 활성 및 디옥시리보뉴클레아제 활성을 측정하기 위해 상온에서 3시간부터 9시간까지 배양시켰다. 배양 후, 단백질은 페놀-클로로포름 처리에 의해 제거하고 RNA 및 DNA는 포름알데히드-변성된 아가로스 겔 또는

0.8% 아가로스 겔로 분리하였다. 아크릴아미드 겔에서 리보뉴클레아제 활성을 측정하기 위해, Yen 및 Green (1991, Plant Physiol 97: 1487-1493)에 의해 기준에 보고된바 있는 리보뉴클레아제가 포함된 조건에서 겔을 제조하였다. 전체 벼 잎 RNA 또는 효모 tRNA는 약간 변형하여 기질로 사용하였다. 전체 단백질은 단백질 분해효소 저해제가 포함된 PBS 각테일로 추출하였다. 단백질 추출물은 0-30%, 30-60% 및 60-85% 농도에서 암모늄 설페이트 침전물을 사용하여 분획화하였다. 단백질은 효모 tRNA 2.4 mg/ml이 포함된 SDS-12% 아크릴아미드 겔로 분리시켰다. 전기영동을 실시한 다음, 겔은 세척, 배양, 스테닝하였다. 모든 실험과정은 55℃ 배양 과정을 제외하고 상온에서 실시하였다. SDS는 25% 이소프로판올로 10분 동안 세척하고 10 mM Tris-HCl (pH 7.5)용액으로 최종 세척해주었다. 겔은 100 mM Tris-HCl에서 1시간 동안 배양시킨 다음, 10 mM Tris-HCl로 10분 동안 행구어 주고 10 mM Tris-HCl에 0.2% (w/v) 톨루이딘 블루 0 (시그마)가 포함된 용액으로 10분 동안 착색시켰다.

<68> **실시예 1: 발달조직에서 OsPR-10 단백질의 발현**

<69> 벼 식물의 잎, 꽃, 줄기, 뿌리를 포함한 성숙한 조직에서 OsPR-10의 구성적 발현은 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 분석하였다. 그 결과 OsPR-10이 성숙된 식물의 뿌리 및 꽃에서 비특이적 밴드의 생성없이 현저하게 발현량이 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 줄기에서는 발현되어지는 것을 관찰할 수 있었지만 잎에서는 관찰되어지지 않았다 (도 1A 참조). 각각의 조직에서 OsPR-10의 축적은 다른 개화단계에서 샘플을 채취하고 웨스턴 블롯 분석을 실시하여 발현량을 관찰하였다 (도 1B 참조). 그 결과 OsPR-10 단백질은 모든 발달 단계에서 확인되었지만 종자 발달단계에서는 거의 확인되지 않았다. 뿌리에서 단백질의 분포를 측정하기 위해, 본 발명에서는 3일 경과된 뿌리조직을 잘라서 사용하였다. 측정결과 OsPR-10 단백질의 수준은 뿌리부, 줄기성장부, 발달부를 통해 뿌리로부터 위로 갈수록 점점 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다 (도 1C 참조).

<70> **실시예 2: 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 의한 OsPR-10 단백질의 발현**

<71> 본 발명자들은 이미 OsPR-10 단백질(Kim et al. 2003 and 2004)이 벼도열병에서 중요한 역할을 수행한다는 것을 규명하였다. 본 발명에서는 OsPR-10 단백질이 자스몬산, 살리실산, 벼도열병 뿐만 아니라 lesion mimic mutant (*spl1* 및 *spl2*), 노화, 상처, 저온, 건조 스트레스에 의해서도 발현이 유도되어지는 것을 확인하였다. 전체 단백질은 *spl1* 및 *spl2*로부터 추출하고 SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다. 본 발명에서는 벼 잎은 도열병(KJ401)에 감염시켜서 사용하였고, 현탁 배양세포는 양성대조구로서 곰팡이 유인제로 처리하였다 (도 2A 참조). 웨스턴 블롯 분석결과 야생형 식물과 비교했을 때 OsPR-10 단백질은 *spl1* 및 *spl2*에서 축적되어 나타났다(도 2B 참조). 잎의 노화는 광 또는 암조건에 의해 유도된 세포사의 발달과정이다. 본 발명에서는 분리된 벼 잎의 노화를 관찰하는 동안 OsPR-10 단백질의 축적을 확인하였다. 잎 노화성분은 전체 엽록소 함량의 변화를 측정하여 확인하고, 도 3A에서 알 수 있듯이, OsPR-10 단백질의 발현은 엽록소 함량이 80%로 떨어졌을 때 시작되어 점점 노화된 잎에서 엽록소 함량이 감소되어지는 기능이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 식물에서 상처는 생물학적 스트레스에 의해 야기되는 것으로 병원균에 의해 유도되는 것과 유사한 반응을 보인다. 본 발명에서는 도구를 이용하여 상처를 낸 다음 4, 8, 12, 24시간이 경과했을 때 OsPR-10 단백질의 발현을 관찰하였다. 웨스턴 블롯 분석을 통해 상처 후 4시간에서 OsPR-10 단백질의 발현이 증가되어지며, 12시간이 경과했을 때 가장 높은 수준으로 발현이 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다 (도 3B 참조). 또한 비생물학적 스트레스 조건에 따른 OsPR-10 단백질의 발현을 확인하기 위해, 본 발명에서는 벼 잎 및 줄기를 건조, 열(42℃) 및 저온 (4℃)상태로 노출시켰다. 도 3C에서 알 수 있듯이, 웨스턴 블롯 분석결과 저온 및 건조처리로 인해 줄기에서만 OsPR-10 단백질의 발현량이 급속도로 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다. 또한 저온처리 후 3시간 이내에 OsPR-10 단백질의 발현이 증가되어지는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 OsPR-10 단백질은 열 스트레스 처리에 의해서는 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다.

<72>

<73> **실시예 3: OsPR-10 단백질의 벼 식물체 내 위치확인**

<74> OsPR-10의 발달, 조직-특이적인 발현양상을 확인하기 위해, 본 발명에서는 출수기의 꽃과 뿌리에서 면역조직화학적 염색분석을 실시하였다 (도 4 참조). 면역위치 확인시험결과 OsPR-10은 특이적으로 꽃의 안검점과 바깥검점에서 발현되어지지만 (도 4 F2, F3, F7 참조) 화분과 씨방 조직에서는 관찰할 수 없었다 (도 4 F4 및 F5 참조). OsPR-10은 목질생성조직/세포외층을 포함한 뿌리의 세포외층 및 내피의 안부분에서 확인되어졌다 (도 4 R3-6 참조). 비생물학적 스트레스에 노출된 잎과 자엽초에서 OsPR-10은 관다발조직에서 발견되어졌다. 이러한 결과는 벼 도열병에 감염된 잎에서 단백질의 위치패턴을 설명해준다 (Kim et al. 2004, Proteomics 4: 3569-3578).

<75>

<76> **실시예 4: 재조합 OsPR-10의 리보뉴클레아제 활성**

<77> 재조합 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 확인하기 위해, 본 발명에서는 RNase 활성을 분석하기 위해 리보뉴클레아제가 포함된 겔을 사용하였다. OsPR-10 단백질은 비환원성 (DTT가 없는) 음성적 겔에서는 리보뉴클레아제 활성을 나타내었지만, 환원성 겔에서는 활성을 나타내지 않았다 (도 7A 참조). 이러한 결과는 이합체화물 또는 분자내 이황화결합의 형성과 유지에 따른다는 것을 나타내면서 b-머캅토포에탄올과 DTT같은 환원성 물질로부터 무효화되는 것을 의미한다. 도 7C에서 보면 밴드들 사이에서 크기가 작을수록 더 강한 활성을 나타내며 이합체 형성이 실질적으로 OsPR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있다. OsPR-10 단백질 단량체는 가장 약한 리보뉴클레아제 활성을 나타내었다. 따라서, 본 발명에서는 OsPR-10의 리보뉴클레아제 활성이 단백질 구조 결정에 중요한 역할을 담당한다는 것을 확인할 수 있었다. 이것을 증명하기 위해 본 발명에서는 두개의 시스테인 잔기를 세린으로 교환한 돌연변이체를 제조하였다 (OsPR-10 C81S, C83S 및 C81S/C83S). 돌연변이체의 서열은 pQE 30 발현벡터로 클론하고 재조합 단백질을 발현하기 위해 사용하였다. 리보뉴클레아제 활성을 가지는 것으로 확인된 밴드에서는 확인되지 않았으며 돌연변이체 추출물은 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다 (도 7C 참조). 리보뉴클레아제 활성을 비교하기 위해, 본 발명에서는 *E. coli*에서 발현된 재조합 돌연변이 단백질로부터 돌연변이 단백질을 정제하였다. 도 7C, 7D에서 보면 C83S 돌연변이는 아크릴아미드 및 아가로스 겔에서 거의 활성을 나타내지 않았으며 이러한 결과는 두개의 시스테인 잔기 사이의 이황화결합이 PR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 나타내는 것을 의미한다.

<78>

<79> **실시예 5: 비환원성 겔에서 벼 식물체내의 OsPR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성**

<80> 본 발명에서는 벼 자체의 OsPR-10 단백질이 리보뉴클레아제 활성을 가진다는 것을 확인하기 위해, 벼 도열병이 감염된 벼 잎에서 비환원성 2-DE 겔을 실시하였다. RNase 활성을 측정하기 위해 60-85% 분획을 사용하였으며 OsPR-10 항체를 사용하여 확인하였다 (도 4 참조). 겔은 SDS-PAGE 분석에서 보여준 것과 유사한 리보뉴클레아제 활성을 보여주었다 (도 8A, B, C 참조). 2-DE 겔에서 스팟 1, 2, 3, 4는 벼 도열병에 감염된 후 72시간이 경과했을 때 리보뉴클레아제 활성을 나타내었다 (도 8D 참조). 효소 활성 스팟을 확인하기 위해, 본 발명에서는 네개의 스팟을 용리시켰다. 스팟 1은 OsPR-10 항체와 반응한 것이다 (도 8E 및 8F 참조).

**발명의 효과**

<81> 본 발명에서 벼 유래 OsPR-10 단백질은 이황화결합이나 이합체 형성에 의존하는 리보뉴클레아제 활성을 가지는 항바이러스 단백질로, 식물체에서 항진균성 및 항바이러스 활성을 증가시켜 구조상의 자가 방어 메카니즘으로 작용할 수 있다.

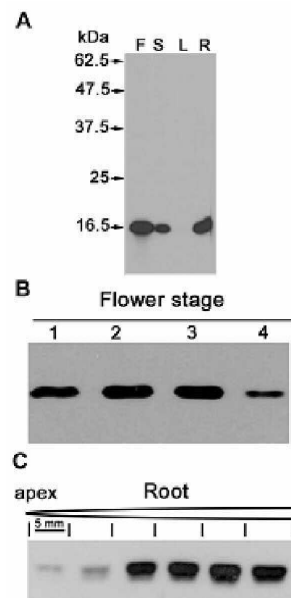
**도면의 간단한 설명**

- <1> 도 1은 발달조직에서 OsPR-10 단백질의 축적을 나타낸 것으로,
- <2> A) 성숙한 벼 식물에서 OsPR-10 단백질의 발현 (F: 꽃, S: 줄기, L: 잎, R: 뿌리).
- <3> B) 개화시기에 따른 OsPR-10 단백질의 발현 (lane 1; 휴면단계, 2; 개화단계, 3; 발달단계, 4; 종자발달단계)
- <4> C) 뿌리에서 OsPR-10 단백질의 발현분포
- <5> 도 2는 벼에서 병원균 감염과 같은 생물학적 스트레스에 대한 OsPR-10의 발현을 나타낸 것이다.
- <6> 도 3은 벼에서 노화, 건조, 저온, 상처와 같은 비생물학적 스트레스에 의한 OsPR-10의 발현을 나타낸 것이다.
- <7> 도 4는 꽃과 뿌리에서 OsPR-10 단백질의 면역학적 위치를 나타낸 것으로,
- <8> 원추꽃차례 (출수기)의 횡단면 (F1-F3) 및 종단면(F4-F7)과 줄기성장부에서 뿌리부분의 횡단면 (R1, 2, 3, 5, R6) 및 종단면 (R4)을 anti-OsPR-10와 배양시켰다. 조직은 (F1, F4, F6, R1, R2)은 음성 대조구로서 anti-OsPR-10-free serum으로 처리하였다. 푸른색 신호는 OsPR-10 단백질의 축적을 나타낸다.
- <9> 도 5는 OsPR-10 단백질의 돌연변이 유발을 확인하기 위한 pQE30::OsPR-10 구축물과 정제된 OsPR-10 단백질을 나타낸 것이다.

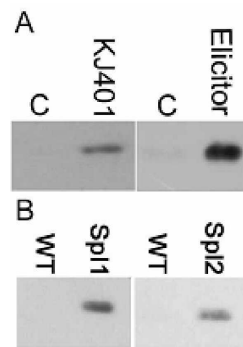
- <10> 도 6은 *E. coli*로부터 분리한 재조합 OsPR-10 단백질의 리보뉴클레아제(RNase) 활성을 나타낸 것이다. RNase 활성은 벼 잎으로부터 전체 RNA (5 )을 사용하여 측정하고 아가로스 겔에서 분석하였다. RNA 양은 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5 으로 하고 배양시간은 3, 6, 9시간 간격으로 측정한 결과이다.
- <11> 도 7은 OsPR-10 단백질의 이합체물 형성 및 리보뉴클레아제 활성과의 관계를 나타낸 것이다.
- <12> A) 무 변성 겔을 사용하여 DTT 존재(+), 부재(-)시의 OsPR-10 RNase 활성.
- <13> B) 환원성 및 비환원성 SDS-PAGE에서 OsPR-10 단백질의 형태변화를 나타낸 것으로 시료는 12.5% SDS-PAGE 겔에서 분리하고 Coomassie 블루시약으로 가시화시켰다 (오른쪽). 단백질 확인은 웨스턴 블롯 분석을 통해 실시하였다 (왼쪽).
- <14> C) 비환원성 겔에서 OsPR-10 돌연변이 및 야생형의 SDS-PAGE 및 RNase 활성을 나타낸 것으로, 단백질의 분리패턴 (야생형, C81S, C83S, C81/83S)은 웨스턴 블롯 분석을 통해 확인하였다.
- <15> D) 야생형 및 C83S 돌연변이의 RNase 활성을 아가로스 겔에서 분석한 결과이다. 음성대조구로서 BSA (10  $\mu$  g/ml)을 사용하였다.
- <16> 도 8은 native OsPR-10 단백질의 리보뉴클레아제 활성을 나타낸 것으로,
- <17> 병원균에 노출시킨 잎으로부터 비환원성 조건에서 추출한 단백질 (150 )의 2-DE를 사용하여 RNase 활성을 측정하였다. A) 비감염 샘플 B) 감염된 후 48시간 (C), 72시간 (D) 배양 경과 후 샘플. SDS-PAGE에서 용리된 각 샘플의 스팟 (E) 및 2-DE (F).

## 도면

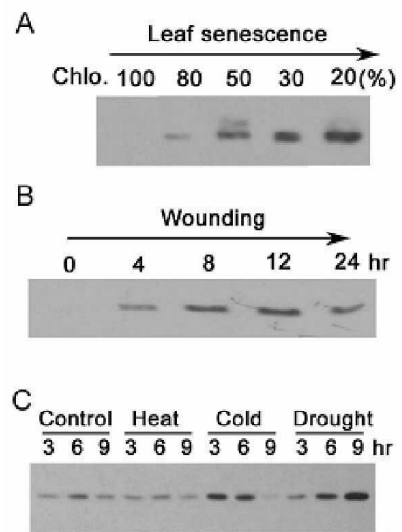
### 도면1



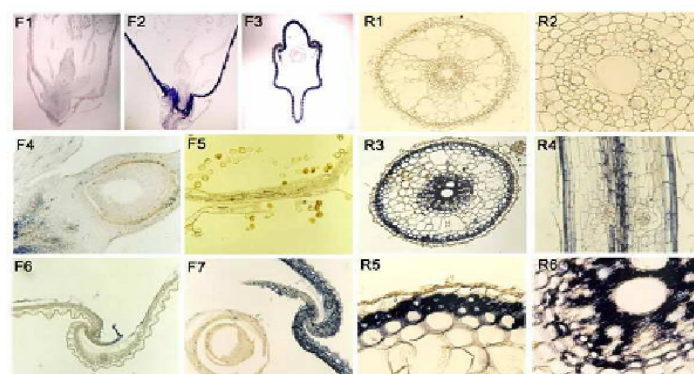
도면2



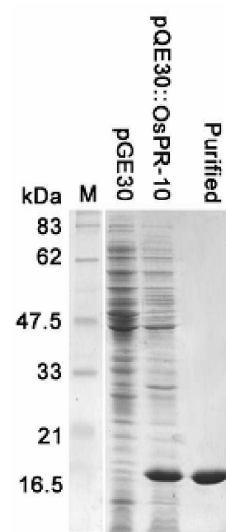
도면3



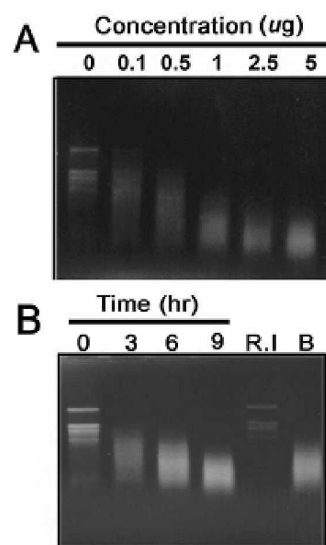
도면4



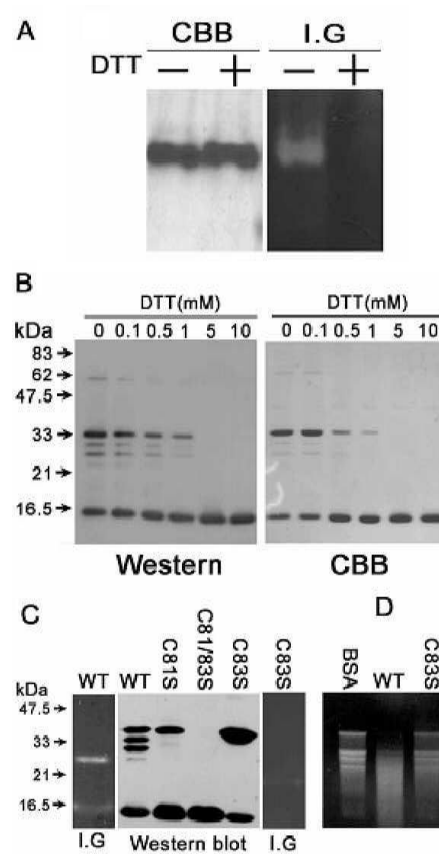
도면5



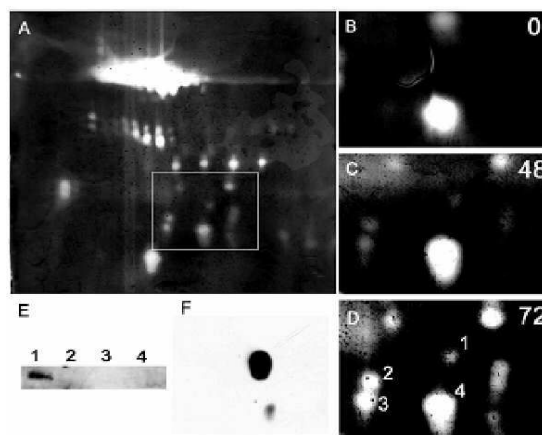
도면6



## 도면7



## 도면8



## 서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> OsPR-10 protein isolated from rice(*Oryza sativa* L.japonicatype) functioning as a ribonuclease

<160> 12

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 848

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

gcagcggcaa agcaagtgat ctcttttagct cggatcatct ctgcatttgc atttgagct 60

gctcgtcacg gcaatggcat ccaccaacag ctggaccac gagatcgagt cgccggtggc 120

cgcgccgcgc ctgttccgcg ccgccgtcat ggactggcac acccttgccc ccaagatcgc 180

ctccacatc gtcgccagcg cccaccccggt cgagggcgac ggagcgtcg gcagcgtcag 240

gcagttcaac ttcacctcag ccatgccatt cagccacatg aaggagagcg tggagttcct 300

ggacgtggac aagtgcgagt gcaagtcgac gctggtggag ggcgcgcgca tcggcaaggc 360

gatcgagacg gcgacgtcgc acatcaaggt ggagccggcg gcgaacggcg ggagcgtcgt 420

gaagtgaggag tccacgtaca agctcctccc cggagtggag gtgaaggacg agatcaccaa 480

ggctaaggag tccctcaccg gcattttcaa gaccgccgag gcctacctca tcgccaaccc 540

ggacgcttac aactaaatcg tcatcatgcc tatgccccca aaatatgttt gataatattt 600

gatctttgcg agtgtgtatg atcgaataa agctgcttcc aagcagtgat tgagaagtga 660

gcagcgagaa gcttggtgtg tggtttggtt gctgtcggag aatggttttg tttagcatga 720

tgctgtcaac accggctatg ttaatgtatct atctagcatc tacctgttgg ttttgctgg 780

gaataaaaac atactataaa agataatgag ctcggaagct actatctgtg aaaaaaaaaa 840

aaaaaaaaa 848

<210> 2  
 <211> 160  
 <212> PRT  
 <213> Oryza sativa

<400> 2  
 Met Ala Ser Thr Asn Ser Trp Thr His Glu Ile Glu Ser Pro Val Ala  
 1 5 10 15

Ala Pro Arg Leu Phe Arg Ala Ala Val Met Asp Trp His Thr Leu Ala  
 20 25 30

Pro Lys Ile Ala Ser His Ile Val Ala Ser Ala His Pro Val Asp Gly  
 35 40 45

Asp Gly Ser Val Gly Ser Val Arg Gln Phe Asn Phe Thr Ser Ala Met  
 50 55 60

Pro Phe Ser His Met Lys Glu Arg Leu Glu Phe Leu Asp Val Asp Lys  
 65 70 75 80

Cys Glu Cys Lys Ser Thr Leu Val Glu Gly Gly Gly Ile Gly Lys Ala  
 85 90 95

Ile Glu Thr Ala Thr Ser His Ile Lys Val Glu Pro Ala Ala Asn Gly  
 100 105 110

Gly Ser Val Val Lys Val Glu Ser Thr Tyr Lys Leu Leu Pro Gly Val  
 115 120 125

Glu Val Lys Asp Glu Ile Thr Lys Ala Lys Glu Ser Leu Thr Gly Ile  
 130 135 140

Phe Lys Thr Ala Glu Ala Tyr Leu Ile Ala Asn Pro Asp Ala Tyr Asn  
 145 150 155 160

<210> 3  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3  
ggatccgcat ccaccaacag ctg

23

<210> 4  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer

<400> 4  
tgatgacgat ttagttgtaa g

21

<210> 5  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer

<400> 5  
ggatccgcat ccaccaacag ctg

23

<210> 6  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer

<400> 6  
tgatgacgat ttagttgtaa g

21

<210> 7  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 7  
 ggacgtggac aagtcgagt gcaag 25

<210> 8  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 8  
 ccagcgtcga cttgcactcg gactt 25

<210> 9  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 9  
 ggacgtggac aagtgcgagt ccaag 25

<210> 10  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> primer

<400> 10  
ccagcgtcga cttggactcg cactt 25

<210> 11  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer

<400> 11  
ggacgtggac aagtcgagt ccaag 25

<210> 12  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> primer

<400> 12  
ccagcgtcga cttggactcg gactt 25