



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년08월13일
(11) 등록번호 10-1428629
(24) 등록일자 2014년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0040124
(22) 출원일자 2013년04월11일
심사청구일자 2013년04월11일
(56) 선행기술조사문헌
TAIR, AT5G16460 (<http://www.arabidopsis.org>,
2013.02.11.)
KR1020090119910 A
US20040163144 A1

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
신정섭
서울 성북구 길음로9길 50, 910동 2501호 (길
음동, 길음뉴타운9단지)
최준영
서울 광진구 면목로 32-12, (군자동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 4 항

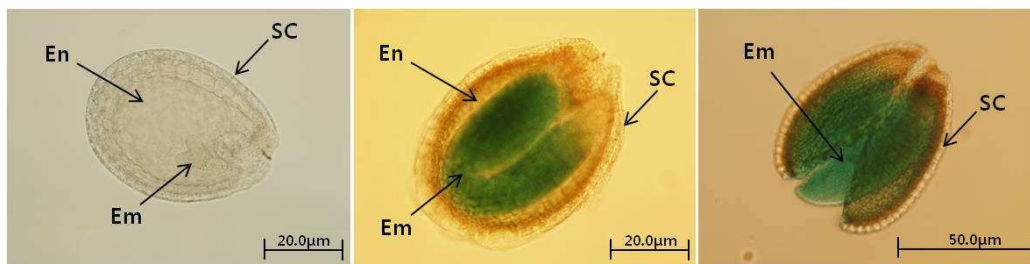
심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 완숙된 종자의 배 (e m b r y o) 조직 특이 프로모터

(57) 요약

본 발명은 식물 종자의 배 (embryo) 특이 발현을 유도하는 애기장대 At5g16460 유전자의 EM (Embryo-specific) 프로모터(서열번호 1), 상기 프로모터를 포함하는 식물 종자의 배 특이 발현벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 식물 종자의 배 (embryo) 조직에서 발현시키는 방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의한 식물 종자의 배 특이적 발현 프로모터는 쌍자엽 식물 종자의 배 (embryo) 조직에서 유전자 발현을 유도하거나, 동일 조직에서 의료 및 유용 단백질을 생산하고자 하는 형질전환 식물체 개발에 이용될 수 있다. 또한 종자의 활력을 조절하여 종자저장 및 발아 기능이 향상된 고부가 가치 신품종 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4b



Em : embryo En : endosperm SC : seed coat

(72) 발명자

정희정

경기 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 902동
1401호 (영통동, 벽적골9단지아파트)

신현영

서울 성북구 종암로19라길 27, 401호 (종암동, 성
우빌라)

배정명

서울 노원구 한글비석로5길 62, 803동 907호 (중계
동, 중계8단지주공아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 609004054SB220

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 [협동] 외래단백질 고효율 과발현 및 대량생산을 위한 식물 시스템 개발

기 여 율 4/10

주관기관 전북대학교

연구기간 2012.04.10 ~ 2013.04.09

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110015848

부처명 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구

연구과제명 식물의 노화와 스트레스 관련 신규 유전자들의 기능과 신호전달 메커니즘 분석

기 여 율 3/10

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201107013055530010300

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 식물 환경스트레스 저항성 및 노화 지연 유전자 대량 발굴, 기능검정과 신호전달 메커니

즘 규명

기 여 율 3/10

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 식물 종자의 배 (embryo) 특이 프로모터.

청구항 2

제1항 기재의 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터.

청구항 3

제2항 기재의 형질전환용 발현벡터를 포함하는 대장균.

청구항 4

제2항 기재의 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 5

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 완숙된 종자의 배 (embryo) 조직 특이 프로모터에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 애기장대 유래 At5g16460 유전자의 프로모터인 염기서열 중 쌍자엽 식물체의 종자 내부 성숙된 배 (embryo) 조직 특이적인 발현을 유도하는 염기서열, 상기 염기서열을 포함하는 식물체 배 조직 발현 재조합 발현벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 쌍자엽 식물체 종자의 배 조직에서 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 작물분자육종은 모든 종(種)의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 계통 단위로만 가능하던 육종기술을 유전자 단위로 끌어내려 무한대의 육종 효과를 미세하게 조절할 수 있다는 측면에서 차세대 농업을 이끌어 갈 핵심적인 기술이다. 이러한 작물분자육종 기술을 이용한 유전자변형 작물의 재배면적과 재배량이 전 세계적으로 지속적으로 증가하고 있으며, 상업화된 유전자변형 신종자의 세계 시장 규모는 2002년 40억 달러에서 2010년 100억 달러(종자와 기술료 포함)로 전체 세계 종자 시장규모 300억 달러 대비 15% 수준이며 종류로는 대두, 옥수수, 면화, 유채가 주 시장을 형성하고 있다.

[0003] 유전자변형 작물의 효과를 극대화하기 위해서는 외부에서 삽입된 유전자의 발현을 식물의 발달 시기별, 조직별로 미세하게 조절할 수 있어야 하며 이를 위해 다양한 프로모터의 개발이 이루어져야 한다. 프로모터는 유전자의 발현을 조절하는 조절 유전자로서 특정 프로모터를 사용했을 경우 유용한 유전자를 적절한 시기에 또는 식물체의 특정한 부위에서 발현시킬 수 있어 생명공학을 이용한 새로운 품종 개발에 있어 중요한 기술이라고 할 수 있다. 특히나 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터의 개발은 그 활용도 및 중요성이 매우 크다 할 것이다. 따라서 관련 지적 재산권 확보를 위한 경쟁이 우리나라뿐만 아니라 전 세계적으로 광범위하게 이루어지고 있다.

[0004] 이에 1980년대 초반부터 식물 유전자의 발현을 조절하는 프로모터에 대한 연구가 진행되어 왔다. 꽃양배추 모자이크 바이러스(Cauliflower mosaic virus)의 프로모터가 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도할 것이라고는 가능성이 제시되고(Hohn et al., 1982, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96: 193-236), 상기 프로모터의 염기서열이 밝혀지고(Odell et al., 1985, *Nature* 313:810-812), 식물체내에서 강한 발현이 증명되었다(Sanders et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 1543-58). 그 후 CaMV 35S(특허번호: JP1993192172-A1) 프로모터는 식물에서 가장 많이 쓰이는 보편적인(universal) 프로모터가 되었다.

- [0005] 한편, 식물의 특정 조직 특이적으로 발현을 유도하는 조직 특이 프로모터의 발현에 대한 연구가 꾸준히 진행되어서 뿌리 조직 특이 프로모터 (Elmayan and Tepfer, 1995, *Transgenic Research* 4: 388-396; Xu et al., 1995, *Plant Molecular Biology*, 27: 237-248; Nitz et al., 2001, *Plant Sci.* 161: 337-346; Vaughan et al., 2006, *Journal of Experimental Botany* 57: 3901-3910; Vijaybhaskar et al., 2008, *Journal of Biosciences*, 33:185-193; Jeong et al., 2010, *Plant Physiology*, 153:185-197; Noh et al., 2012, *Transgenic Research* 21: 265-278), 저장뿌리 특이 프로모터 (Herma et al., 2012, *Planta*, 236: 1955-1965; Noh et al., 2012, *Transgenic Research* 21: 265-278), 꽃 조직 특이 프로모터 (van der Meer et al., 1990, *Plant Mol. Biol.* 15: 95-109; Ruiz-Rivero and Prat, 1998, *Plant Mol. Biol.* 36: 639-648; Chiou and Yeh, 2008, *Plant Molecular Biology*, 66: 379-388; Verdonk et al., 2008, *Plant Biotechnology Journal* 6: 694-701; Liu et al., 2011, *Plant Cell Reports* 30: 2187-2194), 약 (anther) 특이 프로모터 (van Tunen et al., 1990, *Plant Cell* 2: 393-401; Kato et al., 2010, *Plant Molecular Biology Reports* 28: 381-387), 종자 특이 프로모터 (Bustos et al., 1989, *Plant Cell* 1: 839-853; Kridl et al., 1991, *Seed Sci Res*, 1: 209-219; Washida et al., 1999, Welham and Domoney, 2000, *Plant Sci.* 159: 289-299; *Plant Mol. Biol.* 40: 1-12; Furtado et al., 2008, *Plant Biotechnology Journal* 6: 679-693; Chung et al., 2008, *Plant Cell Reports*, 27: 29-37) 등이 개발되었다.
- [0006] 최근에는 유전자 변형 작물 제작 시에 삽입 유전자의 발현을 한층 더 미세하게 조절하기 위해서 식물 조직 특이 발현이 한층 더 세분화되고 있는 추세이다. 이를 위하여 종자 특이 프로모터의 경우에는 종자 내부 조직 특이 프로모터들이 개발되고 있는데 배 (embryo) (Dishi et al., 2006, *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 42: 432-438; Kim et al., 2011, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408: 78-83; Jose-Extanyol and Puigdomenech, 2012, *Plant Molecular Biology*, 80: 325-335), 배유 (endosperm) (Hu et al., 2011, *Biotechnol Lett*, 33: 1465-1471; Xu et al., 2010, *Plant Cell Reports*, 29: 1061-1068; Vickers et al., 2006, *Plant Molecular Biology*, 62: 195-214; Choi et al., 2003, *Plant Cell Reports*, 21: 1108-1120), 종피 (seed-coat) (Wu et al., 2011, *Plant Cell Reports*, 30: 75-80; Esfandiari et al., 2012, *Plant Molecular Biology*, DOI 10.1007/s11103-012-9984-0)- 조직 특이 프로모터들이 개발되었다.
- [0007] 현재까지 개발된 대부분의 종자 내부 조직 특이 발현을 유도하는 프로모터의 경우 벼, 밀 등의 단자엽 식물 유전자에서 유래된 단자엽용 프로모터로 개발되었다. 하지만, 이들 단자엽용 프로모터를 쌍자엽에 적용하였을 때 원래의 프로모터 활성이 나타나지 않음은 이미 알려진 사실이다 (Cornejo et al., 1993, *Plant Molecular Biology*, 23: 567-581; Kozuka et al., 1993, *Plant Physiology*, 102: 991-1000).
- [0008] 따라서 쌍자엽 식물과 단자엽 식물의 종자 내부 조직의 구조가 매우 상이하고 단자엽용 프로모터의 활성이 쌍자엽 식물에서 재현되지 않음을 고려할 때, 쌍자엽 식물의 종자 내부 조직을 대상으로 대사공학 및 유용 물질 생산을 가능케 할 쌍자엽 식물의 종자 내부 조직 특이 발현을 유도하는 프로모터 개발에 대한 요구가 계속적으로 있어 왔다.
- [0009] 본 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 등록특허 10-0574563 (2006.04.27)에는 종자 특이적 발현을 보이는 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)의 마이크로솜 올레산 불포화제 (microsomal oleic acid desaturase) 유전자에서 유래된 식물체 고효율 발현 프로모터 및 인트론 (intron)과 이들을 함유하는 식물체 고효율 발현벡터 그리고 이 발현벡터로 형질전환된 식물체에 대해 기재되어 있고, 대한민국 공개특허 10-1996-0702810 (1996.12.09)에는 3개의 키메릭 유전자, 즉, 리신 억제에 비감수성인 디히드로디피콜린산 신타제(DHDDS)를 코딩하며 식물 엽록체 전이 서열에 작동가능하게 연결되어 있는 제1유전자, 리신 풍부 단백질을 코딩하는 제2유전자 및 식물 리신 케토글루타레이트 리덕타제를 코딩하는 제3유전자로서 이들 모두 식물 종자 특이적 조절 서열에 작동가능하게 연결된 유전자에 관해 기재되어 있다. 그러나, 쌍자엽 식물체의 종자 내부 배 (embryo) 조직 특이적인 발현을 유도하는 애기장대 유래 At5g16460 유전자의 프로모터에 대해 알려진 바는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-0574563 (2006.04.27)

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-1996-0702810 (1996.12.09)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 쌍자엽 식물의 종자 내부 배 (embryo) 조직 특이 발현을 유도하는 **Embryo-specific** (EM) 프로모터의 염기서열을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 EM 프로모터를 포함하는 식물체 형질전환용 벡터 및 이에 의해 형질전환된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 발현벡터로 형질전환된 식물체를 이용하여 목적단백질을 생산하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 식물 종자의 배 (embryo) 특이 프로모터를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 형질전환용 발현벡터를 포함하는 대장균을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 프로모터를 증폭하기 위한 서열번호 4 및 서열번호 5로 표시되는 PCR용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0020] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0021] 본 발명자들은 상기 목적을 달성하기 위해 애기장대 TAIR/ATTED DB를 이용하여 종자 특이적 발현을 보이는 At5g16460 유전자의 프로모터 부위를 클로닝하여서 종자의 배 (embryo) 조직 특이적인 발현을 유도하는 프로모터를 제작하였으며 애기장대 형질전환체에서 동일 프로모터의 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0022] 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 식물 종자의 배 (embryo) 특이 프로모터 (EM promoter)를 제공한다.
- [0023] 본 발명에 있어, '프로모터(promoter)'란, 일반적으로 전사를 개시하는 지점을 포함하는 암호화 부위의 상류 쪽에 위치하는 유전자 부위로, 흔히 유전자 발현을 조절하는 TATA 박스, CAAT 박스 부위, 외부 자극에 반응하여 유전자 발현에 영향을 주는 부위 및 위치와 방향에 상관없이 거의 모든 유전자의 발현을 촉진하는 인핸서 등으로 이루어져 있다. 또한, 이러한 프로모터 중에는 모든 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터 및 시간 또는 위치 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터가 있으며, 바람직하게 본 발명에 따른 프로모터는 종자의 배에서 특이적으로 발현하는 애기장대의 At5g16460 유전자 프로모터이다. 따라서, 본 발명에 의한 상기 프로모터는 쌍자엽 식물 종자의 배 (embryo)에서 목적 유전자의 발현을 유도시킬 수 있다.
- [0024] 상기 프로모터의 DNA 염기서열은 애기장대 At5g16460 유전자의 코딩 시퀀스의 번역개시 부위로부터 -1 내지 -882에서 유래된 것을 특징으로 한다. 본 발명의 종자의 배 특이 프로모터는 상기 서열번호 1의 염기서열뿐만 아니라 상기 서열번호 1의 염기서열의 일부 염기가 치환, 결실 또는 부가된 변형서열로서 배 특이 프로모터 활성을 나타내는 염기서열을 포함한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터를 제공한다. 바람직하게 본 발명은 상기 프로

모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물체의 배 특이 재조합 발현백터를 제공한다.

[0026] 본 발명에 있어, '발현백터'란 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 식물체의 배 특이 발현 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현백터 내에 포함될 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어, '작동 가능하게 연결(operably linked)' 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란, 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0028] 상기 본 발명에 따른 발현백터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 백터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 At5g16460 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입함으로써 제조할 수 있다. 따라서 본 발명에 사용될 수 있는 백터로 다양한 클로닝 부위를 가지고 있는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 Ti 플라스미드 등의 플라스미드가 있고, 식물 바이러스 백터가 있으며, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 백터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라면 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 백터라면 어떠한 백터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 pBI101 백터를 이용하여 EM promoter::GUS 발현백터를 제조하였다.

[0029] 본 발명에 있어서, '목적 단백질'이란 본 발명의 프로모터에 의해 식물체의 배 (embryo)에서 특이적으로 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 단백질을 말하며, 바람직하게는 외인성 단백질이거나 또는 내인성 단백질 및 리포터 단백질일 수 있다. 상기 외인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연적으로 존재하지 않는 단백질을 말하며, 상기 내인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연적으로 존재하는 유전자에 의해 발현된 단백질을 말한다. 또한, 상기 리포터 단백질은 리포터 유전자에 의해 발현된 단백질로서 그 존재에 의해서 세포 내에서의 그의 활성을 알려주는 표지 단백질을 말한다. 본 발명의 일 실시예에서는 청색 발색 유전자인 GUS가 연결된 형태의 리포터 시스템이 내재되어 있는 pBI101 백터에 본 발명의 애기장대 EM 프로모터를 GUS 유전자의 상류부분에 작동가능하게 연결한 재조합 발현백터 EM promoter::GUS를 제조하였다. 상기 외래 유전자는 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.

[0030] 본 발명의 배 특이 프로모터의 전사활성에 의하여 발현되는 목적 단백질 유전자의 예로는, 형질전환 대상 식물체가 유채, 들깨 및 참깨 등의 유지작물인 경우 지방산 생합성 및 조절 관련 유전자 등을 들 수 있고, 단백질의 생성 및 축적량이 다른 식물에 비해 상대적으로 높은 콩 및 알팔파 등의 두과식물인 경우 경제적으로 부가가치가 높은 항체 유전자 등을 들 수 있고 사료작물로 대표적인 옥수수의 경우 돼지 설사병, 구제역 바이러스 등의 경구 백신(edible vaccine) 유전자 등을 들 수 있고, 종자로 장기간 보관, 유통되는 대부분의 작물의 경우 수확 후 저장성을 높이도록 각종 병 저항성에 관련된 유전자 등을 들 수 있으며, 그 외에도 토코페롤, 베타카로틴 등과 같이 특정 영양 성분을 작물의 종자에서 강화하려는 경우에는 관련 물질대사경로의 생합성 유전자 등을 들 수 있으나, 여기에 한정되지 않고, 본 발명의 배 특이 프로모터를 사용하여 조절될 수 있는 각종 목적 단백질을 코딩하는 유전자들이 포함될 수 있다.

[0031] 그러므로 본 발명의 프로모터를 이용한다면 식물체의 종자 등을 섭취하는 작물의 경우, 유용한 목적 단백질을 식물체의 종자에서 발현시킴으로써 종자와 함께 목적 단백질을 함께 섭취할 수 있는 작물을 개발할 수 있다. 또는, 식물체 내에서 생산된 목적 단백질을 당업계에 알려진 적절한 방법에 따라 추출하여 사용할 수도 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 배 특이적 재조합 발현백터로 형질전환된 식물세포 및 식물체를 제공한다. 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현백터는 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 식물 세포내로 도입할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 재조

합 발현백터를 식물 세포내로 도입하는 방법으로는, 제한 없이 당해 공지된 방법이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 염화칼슘(CaCl_2) 및 열 쇼크(heat shock) 방법, 입자 총 충격법(particlegunbombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공(electroporation) 및 PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법 등과 같은 방법들이 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 At5g16460 유전자의 EM 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물발현백터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 종자에 특이적으로 발현시키는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0034] 본 발명은 또한, 1) At5g16460 유전자의 EM 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물발현백터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 2) 상기 형질전환된 식물체의 배(embryo) 조직 내에서 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명에서 상기 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물이고, 상기 쌍자엽 식물은 이에 제한되지는 않으나, 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 셀러리 및 유채일 수 있고, 상기 단자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양과일 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한 애기장대 At5g16460 유전자의 EM 프로모터를 클로닝하기 위한 서열번호 4 및 서열번호 5로 표시되는 PCR용 프라이머 세트를 제공한다. 상기 프라이머 세트를 이용하여 클로닝 효율을 높일 수 있다.

발명의 효과

[0037] 상술한 바와 같이 본 발명은 애기장대 At5g16460 유전자의 EM 프로모터 부위에 관한 것으로서 이는 쌍자엽 식물의 성숙된 종자 내부의 배(embryo) 조직 특이적인 발현을 유도한다. 쌍자엽 식물의 성숙된 종자에서는 배 조직이 종자의 대부분을 차지하는 가장 큰 조직이다. 그러므로 본 발명에 의한 식물 종자의 배 특이적 프로모터는 쌍자엽 식물 종자의 배(embryo) 조직에서 유전자 발현을 유도하거나, 동일 조직에서 의료 및 유용 단백질을 생산하고자 하는 형질전환 식물체 개발에 이용될 수 있다. 또한 종자의 활력을 조절하여 종자저장 및 발아 기능이 향상된 고부가 가치 신제품 개발에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명의 프로모터에 의해 발현이 조절될 것으로 예상되는 At5g16460 유전자의 RT-PCR을 통한 조직별 발현 양상을 나타내는 도면. MS (완숙 종자)는 종자 꼬투리 내부에서 발달하고 있는 종자이며, PS(수확 후 종자)는 수확 후 꼬투리에서 분리되어 건조 과정을 거친 종자임.

도 2는 본 발명을 위한 프로모터 클로닝을 위한 PCR 결과를 나타내는 도면.

도 3은 본 발명에 의한 프로모터 클로닝에 이용한 pBI101 벡터 모식도.

도 4a는 본 발명에 의한 EM 프로모터의 조절로 GUS의 조직별 발현양상을 분석한 결과를 나타내는 도면.

도 4b는 본 발명에 의한 EM 프로모터의 조절로 GUS의 종자 성숙 단계별 내부 발현양상을 분석한 결과를 나타내는 도면. 왼쪽 도면은 미숙 종자로 종자의 배가 발달하기 시작하여 심장형으로 형성된 배의 도면, 가운데 도면은 배가 발달하여 자엽을 형성한 성숙 배 단계 도면, 오른쪽 도면은 가운데 도면과 동일한 발달 단계 종자의 배와 종피를 분리한 사진을 나타냄.

도 4c는 본 발명에 의한 EM 프로모터의 조절로 GUS의 종자 발현양상을 분석한 결과 해석을 위해 사용된 참고 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0040] **실시예 1. 종자에서 특이적으로 발현하는 유전자(At5g16460) 선발 및 확인**

[0041] 종자에서 특이적으로 발현하는 유전자를 확보하기 위해, TAIR/ATTED DB에 공개된 affymetrix 25k(ATH1) array 결과를 토대로 종자에서만 발현하는 유전자들을 선발한 후, 기존에 발표된 논문에서 종자에 특이적으로 발현하는 패턴을 확인할 수가 없는 유전자들을 선발하였다. 그 중 At5g16460에 위치한 유전자를 선발하였다.

[0042] 종자 특이적으로 발현할 것으로 추정되는 At5g16460의 발현이 실제로 종자에서만 발현이 되는지 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

[0043] RT-PCR에 이용할 표준 cDNA를 합성하기 위해 TRI REAGENT[®](TRI REAGENT[®] - RNA/DNA/PROTEIN ISOLATION REAGENT, MOLECULAR RESEARCH CENTER, INC.)을 이용하여, 5주 된 애기장대(Arabidopsis thaliana ecotype Columbia)의 각 조직, 즉 꽃(flower), 줄기(inflorescence), 잎(leaf), 뿌리(root), 성숙 종자(mature seed)와 수확 후 꼬투리를 제거시켜 건조 과정을 거친 종자(post harvest seed)의 전체 RNA(total RNA)를 추출하였다.

[0044] 정량한 전체 RNA(total RNA) 5 µg과 2.5 µM anchored-oligo(dT)₁₈ primer, 1x (8 mM MgCl₂) transcriptor reverse transcriptase reaction buffer, 20U protector RNase inhibitor, 1mM deoxynucleotide mix, 10U transcriptor reverse transcriptase를 전체 20 µl가 되도록 잘 섞은 다음 55℃에서 70분간 처리하였다. 이후 transcriptor reverse transcriptase의 불활성화를 위해서 85℃에서 5분간 처리하였다. 위와 같은 방법으로 조직별 cDNA pool을 만들었으며, 이 cDNA pool을 RT-PCR의 주형 (template)으로 사용하였다.

[0045] Tair site의 염기서열을 바탕으로 protein coding region에서 프라이머 1, 2(표 1의 서열번호 2, 3)를 합성하였고, Gene Amp[®] PCR System 2700 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 95℃에서 5분간 초기 변성 후, 95℃ 20초, 60℃ 20초, 72℃ 30초를 30회 실시하였다.

표 1

RT-PCR용	5'-ATTAATCGAAGAATTGGAGTATTTTCAGTTG-3'	서열번호 2
프라이머	5'-CGGCTTTTGTCTTGGC-3'	서열번호 3

[0047] 내적대조군(internal control)으로는 *EF1a*를 사용하였으며, 조직별 cDNA pool에서 *EF1a*의 전사 양이 거의 동일함을 확인하였다. 상기 At5g16460 유전자 특이 프라이머를 이용한 RT-PCR의 결과는 도 1과 같다. 도 1에 나타난 바와 같이 At5g16460 유전자가 꽃, 잎, 줄기, 뿌리에서는 발현하지 않고, 완숙된 종자에서만 강하게 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

[0048] **실시예 2: 애기장대 At5g16460 유전자의 프로모터 클로닝**

[0049] 상기 유전자의 프로모터로 추정되는 부위는 882 염기쌍(base pair)으로 추정하였다. 먼저 야생 애기장대의 게놈 DNA(gDNA)를 추출하고, 5' 말단에는 *Hind*III을 3' 말단에는 *Bam*HI을 포함하고 있는 서열번호 4 및 서열번호 5로 표시되는 프라이머 세트를 합성하였다(표 2 참조).

표 2

프로모터 클로닝용 프라이머	5'-AAGTAAGCTTGGCTACGGAGTTTCGATG-3'	서열번호 4
	5'-CAAAGGATCCACGGTTTCTGTTTATGAAATG-3'	서열번호 5

[0051] 상기 gDNA를 주형으로 하여 서열번호 4 및 5로 표시되는 프라이머 세트와 교정(proofreading) 기능을 갖는 DNA 중합효소인 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Phusion[®] DNA Polymerase, Thermo Scientific)를 이용하

여 프로모터 부위를 증폭하였다. 그리고 이때 PCR 반응은 Gene Amp[®] PCR System 2700 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 98℃에서 1분간 초기 변성 후, 98℃에서 10초, 58℃에서 30초 72℃에서 40초로 30회 PCR을 수행하였다.

[0052] PCR로 얻은 산물이 902 (제한효소 서열 포함) 염기쌍인지를 아가로스 젤 상에서 확인하고(도 2 참조), 이 PCR 산물을 *Hind*III과 *Bam*HI 제한효소로 말단을 자른 다음 GUS 리포터 유전자를 가지고 있는 pBI101 벡터(vector)의 *Hind*III과 *Bam*HI 사이트에 클로닝하였다. 이후 대장균(*E.coli*) 콜로니로 colony-PCR을 수행하여 PCR 산물이 삽입된 것을 확인하고(도 2 참조), 그 중 하나의 클론을 시퀀싱(sequencing)한 결과 정확한 염기서열이 클로닝되었음을 확인하였다(서열번호 1 참조).

[0053] 실시예 3: At5g16460 프로모터의 애기장대 형질전환

[0054] At5g16460의 EM 프로모터 클로닝에 이용한 pBI101 벡터는 레프트 보드(left board)와 라이트 보드(right board) 사이에 GUS(β -glucuronidase) 리포터 유전자를 가지고 있으며 식물에 형질전환시킬 수 있는 바이너리 벡터(binary vector)이다(도 3 참조).

[0055] 이 벡터를 아그로박테리움(*Agrobacterium*, GV3101)에 형질전환을 한 후 꽃침지(flower dipping, Clough et al., Plant J., 16(6): 735-743, 1998) 방법으로 애기장대에 형질전환을 하였다. 형질전환 애기장대를 항생제 카나마이신이 함유된 배지에서 선별하였다.

[0056] 실시예 4: 형질전환된 애기장대의 조직 화학적 염색 분석

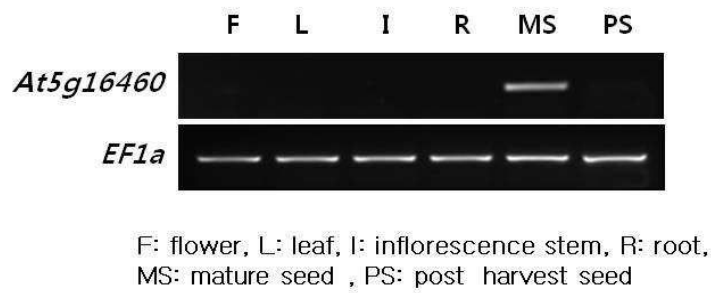
[0057] 선별된 형질전환 식물체의 각 조직으로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하여 조사하였다. 종자를 제외한 식물체의 각 조직은 1 mM X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronidase), 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담가 37℃에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 70% 에탄올을 첨가하여 2시간 동안 클로로필을 제거하는 과정을 3회 반복한 후, 100% 에탄올에 보관하면서 관찰하였다. 그 결과, 도 4와 같이 종자를 제외한 전 조직-뿌리, 줄기, 잎, 꽃에서 GUS 염색이 관찰되지 않았다. 이 결과는 At5g16460 유전자의 EM 프로모터가 뿌리, 줄기, 잎, 꽃 등의 조직에서는 프로모터 활성이 없음을 나타낸다.

[0058] 반면에 형질전환 식물체의 종자를 GUS 유전자의 기질인 X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronidase)가 들어있는 수용액에서 37℃에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 에탄올과 아세트익에시드를 9:1의 비율로 섞은 용액으로 25℃에서 24시간 동안 1차로 색소를 제거한 후, 90% 에탄올에서 30분 동안 세척하는 과정을 2회 반복했다. 그리고 1 ml의 30% glycerol에 2.5 g의 Chloral hydrate을 첨가한 용액으로 25℃에서 24시간 동안 2차로 색소를 제거한 후에 Nomarski 렌즈를 이용하여 광학현미경(Olympus model BX-51) 하에서 GUS의 활성을 관찰하였다. 이러한 관찰 결과 배(embryo) 발달 초기에는 GUS염색이 관찰되지 않다가 배가 완전히 성숙된 종자의 자엽에서는 GUS 염색이 강하게 나타났다(도 4a ~ 도 4c 참조). 이러한 결과는 EM 프로모터가 성숙된 종자의 배 (embryo) 조직 특이적으로 강한 프로모터 활성을 보임을 나타낸다.

[0059] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

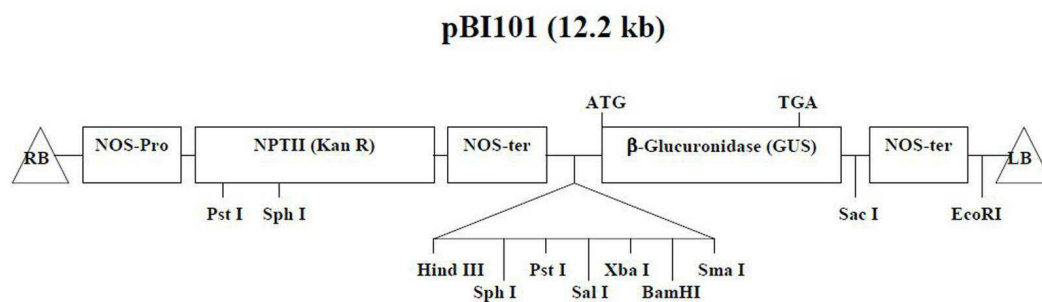
도면1



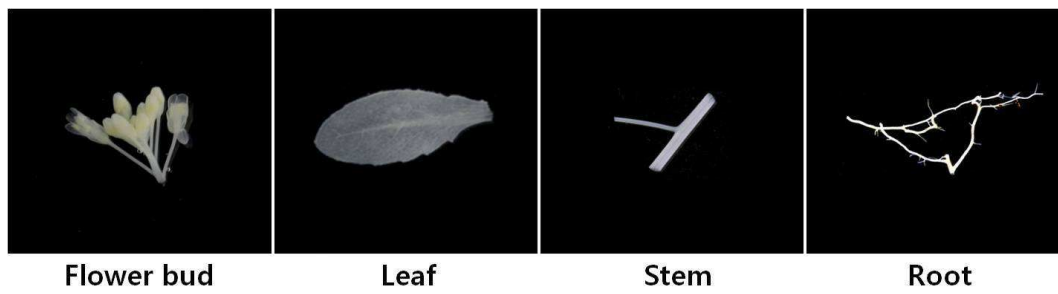
도면2



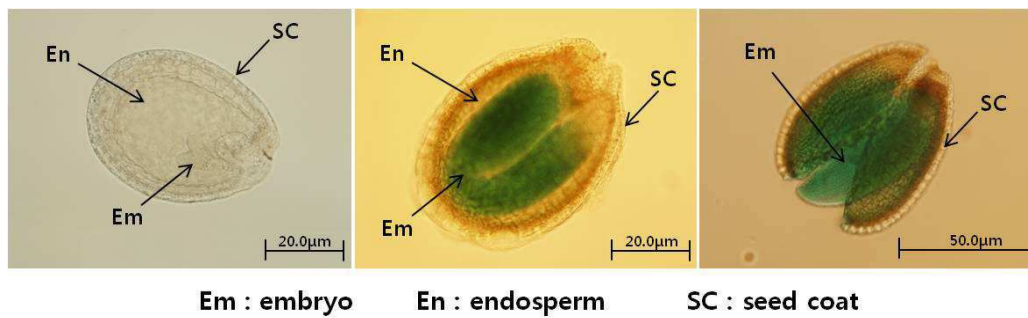
도면3



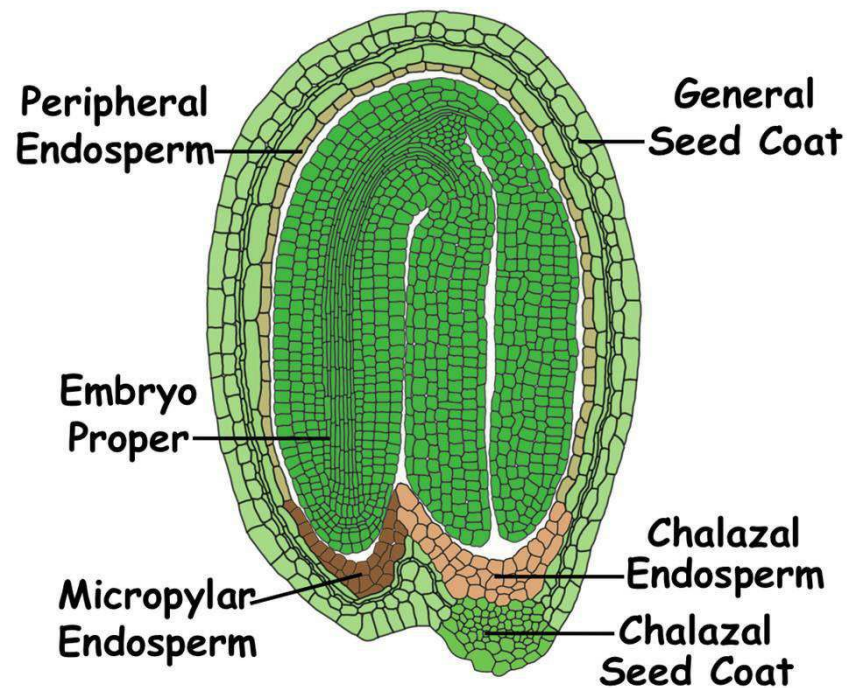
도면4a



도면4b



도면4c



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> Promoter for directing matured embryo-specific expression

<130> P11-130308-02

<160> 5

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 882

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

ggctacggag ttctgatcgc agattattta tctttagtta aaaaaaagta ttaaaataaa 60

taaaaaaagg aatattttcc tatttcctga aaaggatatt atagagtgtg gtacgggtgca 120

tattaagact ttgcgcacca ttttcctaata atatatcgt tcaaatccac ttgctttatt 180

ctttttatcg ctttgcaaat tcaaacataa aaatagtaaa gaattttatg accaaatgta 240

tgaattaaat aataataaat agactgtaca ttttgtacat tcatgcacga ctagactttt 300

ttgtttcgta catgatctct aatagagctt tgacaaaaaa aaatgacctc taagagaaaa 360

ttagaaactt attatatctt attgcaaaaa gttaagattt taatccattt gggttttgat 420

ttttctggat caattatctc tattttccag tatgaattat acggaaaaca acattataat 480

aatatcactt tactttgtaa actatactct ataagttaaa aaaaaatact atttttgtta 540

atatgtgttt tttttgtta agggttttat tttgtttat atgttacatg atataacatg 600

ttaacatatg ttaatgtaga tacaagagc tgaataccgg aactaaaac cagatccaac 660

acttcaggat aagctaattt acccatacaa ttttttctc tcatatgaaa tgattctggt 720

ataatcacta tgatctcatt gcaccaacgt ggcactactc aagaacacga accaacacgt 780

atcaattttc tcatgcaaat gaaaaacata ttttatatga ctctatgaca gcgactttta 840

tctatccata ttttatcgat cattcataa aacagaaacc gt 882

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 2

attaatcgaa gaattggagt atttcagttg 30

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 3

cggttttgt cctggc 17

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 4

aagtaagctt ggctacggag ttctgatg 28

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR PRIMER

<400> 5

caaaggatcc acggtttctg ttttatgaaa tg 32