

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 11 월 1 일 (01.11.2012)



(10) 국제공개번호
WO 2012/148122 A2

- (51) 국제특허분류:
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/002967
- (22) 국제출원일: 2012 년 4 월 18 일 (18.04.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0038932 2011 년 4 월 26 일 (26.04.2011) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **제노마인 (GENOMINE, INC.)** [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 지곡동 601 번지, 790-834 Gyeongbuk (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **이동희 (LEE, Dong Hee)** [KR/KR]; 부산특별시 부산진구 연지동 청구아파트 102-1413, 614-790 Busan (KR). **김국진 (KIM, Kook Jin)** [KR/KR]; 경상북도 포항시 북구 학잠동 대림힐타운 105-1403, 791-784 Gyeongbuk (KR). **이인철 (LEE, In Chul)** [KR/KR]; 경상북도 포항시 남구 대잠동 974-9 센스빌 302, 790-826 Gyeongbuk (KR).
- (74) 대리인: **강경찬 (KANG, Kyung Chan)**; 서울특별시 강남구 역삼1동 832-41 번지 현죽빌딩 13 층, 135-936 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

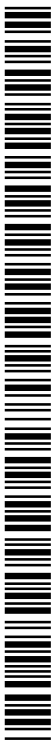
- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: ATPG8 PROTEIN HAVING FUNCTIONS OF INCREASED PRODUCTIVITY, DELAYED AGING, AND RESISTANCE TO STRESS OF PLANT, GENE THEREOF, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭 : 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 A T P G 8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도

(57) Abstract: Disclosed in the present invention are an ATPG8 protein having functions of delayed aging, increased productivity, and resistance to stress of a plant, a gene thereof, and a use thereof. The transformed and overexpressed plant body not only shows a feature of increased productivity, but also features of delayed aging and resistance to stress.

(57) 요약서: 본 발명은 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도를 개시한다. 상기 형질전환되어 과발현된 식물체는 생산성이 증대되는 특성을 보일 뿐만 아니라 노화 지연 특성과 스트레스 내성 특성도 보인다.



WO 2012/148122 A2

명세서

발명의 명칭: 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 A T P G 8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도 기술분야

- [1] 본 발명은 식물의 생산성 증대 기능, 노화 지연 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 ATPG8 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 식물의 노화는 식물 발생의 마지막 단계로서, 세포, 조직, 기관 혹은 생물체 수준에서 나이-의존적 붕괴 과정이며, 생장 및 발생 단계를 거쳐 치사 단계를 유도한다. 식물은 노화가 진행됨에 따라 점차적으로 합성능력이 저하되고 세포 내 구조물과 거대분자들이 순차적으로 분해되면서 세포의 항상성을 잃게 되어, 결국 죽음에 이르게 된다(Thomas et al., 1993). 이러한 식물의 노화는 일련의 연속된 생화학적 및 생리학적 현상으로 유전적으로 계획되어 있어 세포, 조직 및 기관의 수준에서 매우 정교하고, 능동적으로 진행된다.
- [3] 세포 구조에 있어서 노화의 초기 현상은 잎 단백질의 70% 이상을 함유하고 있는 소기관인 엽록체의 분해이다. 대사적인 측면에서 보면, 식물체내 탄소 동화작용이 엽록소와 단백질, 막 지질, 그리고 RNA와 같은 거대분자의 이화작용으로 전환되는 것을 의미한다. 노화를 통하여 증가된 이화 작용 활성화는 생장 동안 동화조직인 잎에 축적된 세포성분들이 종자 혹은 다른 저장 기관의 발달을 위해 공급되는 배출성 세포 성분으로 전환되는 것을 유도한다. 따라서 식물의 노화는 세포가 퇴화하는 과정인 동시에 진화 과정 동안 환경에 적응하기 위해 능동적으로 획득한 유전형질이라고 생각되고 있다(Buchanan-Wollaston et al., 2003; Lim and Nam, 2005; Nam, 1997)
- [4] 이와 같은 식물의 노화는 식물 호르몬 등과 같은 내적 환경요인 및 가뭄, 영양소 제한, 병원균 침투 등과 같은 외적 환경 요인에 의하여 영향을 받는다. 식물 호르몬 중 cytokinin은 생리학적으로 노화 지연 호르몬으로서 이를 이용한 노화조절 기술이 많이 보고되고 있다. Amasino 그룹은 노화 특이적인 *SAG12* 유전자의 promoter에 *IPT* 유전자를 재조합하여 노화 단계 특이적인 cytokinin 합성 조절 방법을 개발하였으며, 상기 방법으로 노화를 지연시킨 담배에서 50%의 생산성 증대를 볼 수 있었다. 같은 방법으로 상추에 도입시켰을 때 수확 후 저장성이 크게 증가되는 것을 알 수 있었다(McCabe et al., 2001). 또한 *SAG12* promoter에 옥수수의 homeobox gene(knotted1)을 발현시킨 담배에서 cytokinin의 level이 증가하였고 잎의 노화도 지연된다는 보고가 있었다. 토마토의 경우 ethylene 조절을 통해 과일의 숙성을 조절한 사례가 보고 되고 있으며, 또한 세포벽 분해와 관련된 polygalacturonase 유전자의 발현을 억제시켜 토마토의 운송성과 저장성을 증가시킨 Flav-O-Savor의 경우가 대표적으로 상업화 된 예가

- 될 수 있다. 사과와 감의 경우, 노화가 지연되도록 육종된 국내 품종의 하나가 ethylene 합성 유전자인 ACC oxidase 유전자의 변이를 동반하고 있음이 보고되었다.
- [5] 최근 노화 조절 현상을 구명하기 위하여 노화 시기에 발현이 유도되는 유전자의 분리 및 이들의 발현 양상 분석에 관한 많은 연구가 수행되었다. 노화 시 발현이 증가되는 유전자들의 분석은 애기장대, 무, 토마토 등에서 연구가 수행되었으며, 이러한 발현 양상 분석을 통해 노화의 pathway들은 매우 복잡한 network을 이루고 있음이 제시되었고, 최근에는 subtractive hybridization과 microarray 등의 방법을 이용하여 노화 시기에 유도되는 유전자들을 다량으로 분리하고 있고, 이들 중 노화 조절 유전자로 추정되는 transcription factor, 혹은 receptor-like kinase 등과 같은 유전자들을 주 target으로 하여 발현 분석을 실시하고 있다. 노화 과정 동안 발현이 증가되는 96개의 전사인자 중 많은 부분은 NAC, WRKY, C2H2-type zinc finger, Ap2/EREBP, 그리고 MYB 도메인을 가지는 단백질들이었다(Lim et al., 2007). WRKY 전사인자 중 WRKY53 유전자의 발현 억제제는 식물체에서 노화지연을 유발하는 반면, 발현 증가는 식물체의 조기 노화 현상을 유발하였다. 따라서 WRKY53 유전자는 식물체 노화에 대한 positive regulator인 것으로 보인다(Miao et al., 2004). 또한 NAC 전사인자 중 AtNAP 유전자도 상기 유전자와 마찬가지로 식물체 노화에 대한 positive regulator인 것으로 보고되고 있다(Guo and Gan, 2006). 한편 Receptor-like kinase 중 하나인 콩의 GmSARK의 발현은 자연 발생적 노화뿐만 아니라 암 처리에 의한 인위적 노화 과정에서도 up-regulation되며, 본 유전자의 억제는 잎 노화의 지연을 유발한다고 알려지고 있다(Li et al., 2006).
- [6] 최근 활성산소종(ROS; reactive oxygen species)이 식물체 노화에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려지고 있다. 특히 peroxysome에서 유래된 catalase isoform들은 APX와 함께 식물체의 노화를 조절한다고 애기장대를 재료로 하여 Zentgraf 그룹에서 제안하고 있다(Zimmermann et al., 2006).
- [7] 한편, 농업적인 측면에서 보면 식물의 노화는 식물의 생장 단계에 대한 제한으로 인하여 작물의 생산성을 제한할 수 있으며 또한 채소 작물 등에서 잎의 황화 현상과 영양소 소실 등과 같은 품질 손실율을 유발할 수도 있다. 따라서 식물 노화에 대한 연구는 기본적으로 식물의 생육 과정에 대한 이해도를 증가시킬 뿐만 아니라 식물 노화 조절을 제공하여 작물의 생산성, 저장성 등과 같은 농업적 형질의 향상을 유발할 수 있다. Gan 등(1995)은 담배에서 노화 조절을 통해 생산성을 최고 50%까지 증가시킬 수 있었으며, 또한 콩(Guamett et al., 1990)과 같은 곡물류에서도 노화 조절을 통해 생산성이 30% 이상의 증대 효과를 얻을 수 있었다. 그러나 여전히 식물 노화를 조절을 통한 생산성 증대에 대한 연구는 극히 제한적이다.
- [8] 이러한 이유에서 식물 분야 생명공학 종사자들은 식물에서 수명 연장에 관여하는 유전자나 단백질 등을 찾아내고자 노력하고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본 발명의 목적은 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질을 제공하는 데 있다.
- [10] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 암호화하는 유전자를 제공하는 데 있다.
- [11] 본 발명의 또 다른 목적은 노화 지연 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.
- [12] 본 발명의 또 다른 목적은 생산량 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.
- [13] 본 발명의 또 다른 목적은 스트레스 내성을 갖는 식물체의 제조 방법을 제공하는 데 있다.
- [14] 본 발명의 기타의 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명은 일 측면에 있어, 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 ATPG8 단백질에 관한 것이다.
- [16] 본 발명자(들)는 하기 실시예에서 확인되는 바와 같이, 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP NP 191646.1)의 염기서열을 기초로 상기 단백질의 유전자를 분리하고 상기 유전자를 애기장대에 형질전환시켜 과발현시켰을 때, 식물의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타나고, 이와 더불어 개체의 생체량 증가 및/또는 종자 생산성 증가라는 생산성 증대 특성도 뚜렷하게 나타남을 확인하였다.
- [17] 이러한 실험 결과는 상기 유전자 및 단백질이 식물체의 노화를 지연시키고 식물의 생산성을 증대시키는 데 관여한다는 것을 의미한다고 할 수 있다.
- [18] 본 발명자들은 상기 유전자를 *ATPG8(AT-hook protein of Genomine 8)* 유전자 및 ATPG8 단백질로 명명하였으며, 이들 염기 서열 및 아미노산 서열은 각각 서열번호 1 및 2에 개시되어 있다.
- [19] 본 발명의 ATPG8 단백질은 하기 (a), (b) 및 (c)의 폴리펩티드들 중 하나이다.
- [20] (a) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드;
- [21] (b) 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드; 및
- [22] (c) 상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드.
- [23] 본 명세서에서, "단백질"이라는 용어는 폴리펩티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용되며, "유전자"라는 용어는 폴리뉴클레오티드와 동일한 의미로서 서로 혼용되어 사용된다.
- [24] 본 명세서에서, "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드와 비교하였을 때 여전히 식물 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을

보유하기에 충분한 정도의 서열번호 2의 아미노산 서열의 일부분을 포함하는 폴리펩티드로서 정의된다. 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기에 충분하면 되므로, 상기 폴리펩티드의 길이 그리고 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도는 문제되지 않는다. 즉 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 활성이 낮더라도, 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 폴리펩티드라면 그 길이야 어떻든 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"에 포함된다는 것이다. 당업자라면, 즉 본 출원시를 기준으로 공지된 관련 선행기술을 숙지하고 있는 자라면, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 일부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 여전히 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유할 것이라고 기대할 것이다. 그러한 폴리펩티드로서 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드를 들 수 있다. 그것은 일반적으로 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실되더라도 그러한 폴리펩티드는 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가진다고 당업계에 공지되어 있기 때문이다. 물론 경우에 따라서는, N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 단백질의 기능 유지에 필수적이어서 N-말단 부분 또는 C-말단 부분이 결실된 폴리펩티드가 상기 기능을 나타내지 않는 경우가 있을 수 있겠지만, 그럼에도 그러한 비활성의 폴리펩티드를 활성의 폴리펩티드와 구분하고 검출해내는 것은 당업자의 통상의 능력 범위 내에 속한다. 나아가 N-말단 부분 또는 C-말단 부분뿐만 아니라 그 이외의 다른 부분이 결실되더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 가질 수 있다. 여기서도 당업자라면 그의 통상의 능력의 범위 내에서 이러한 결실된 폴리펩티드가 여전히 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 가지는가를 충분히 확인할 수 있을 것이다. 특히 본 명세서가 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 나아가 서열번호 1의 염기서열에 의해 암호화되고 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하는지를 확인한 실시예를 개시하고 있다는 점에서, 서열번호 2의 아미노산 서열에서 일부 서열이 결실된 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것인가를 당업자는 그의 통상의 능력 범위 내에서 충분히 확인할 수 있다는 것이 매우 자명해진다. 그러므로 본 발명에 있어서 상기 "서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드"는 상기 정의와 같이 본 명세서의 개시 내용에 기초하여 당업자가 그의 통상의 능력 범위 내에서 제조 가능한 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 결실된 형태의 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다.

- [25] 또한 본 명세서에서, "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"란 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하지만, 서열번호 2의

아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 기능, 즉 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하는 폴리펩티드를 말한다. 여기서도 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기만 한다면 그러한 폴리펩티드가 가지는 활성의 정도나 아미노산이 치환된 정도는 문제되지 않는다. 바꿔 얘기해서, 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드에 비해 그 활성이 아무리 낮더라도 또 많은 수의 치환된 아미노산을 포함하고 있다고 하더라도 그러한 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 보유하기만 한다면 본 발명에 포함된다는 것이다. 하나 이상의 아미노산이 치환되더라도 치환되기 전의 아미노산이 치환된 아미노산과 화학적으로 등가라면, 그러한 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드는 여전히 본래의 폴리펩티드의 기능을 보유할 것이다. 예컨대, 소수성 아미노산인 알라닌이 다른 소수성의 아미노산, 예를 들면 글리신, 또는 보다 더 소수성인 아미노산, 예를 들면 발린, 류신 또는 이소류신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드는 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 마찬가지로, 음으로 하전된 아미노산 예컨대, 글루탐산이 다른 음으로 하전된 아미노산, 예컨대 아스파르산으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드도 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이며, 또한 양으로 하전된 아미노산, 예컨대 아르기닌이 다른 양으로 하전된 아미노산, 예컨대, 리신으로 치환되더라도 그러한 치환된 아미노산(들)을 가지는 폴리펩티드 또한 활성은 낮더라도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 또한 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단 부분에서 치환된 아미노산(들)을 포함하는 폴리펩티드도 본래의 폴리펩티드가 가지는 기능을 여전히 보유할 것이다. 당업자라면, 그 전술한 바의 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도, 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 가지는 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 여전히 보유하는 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 또한 당업자라면 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하는 폴리펩티드가 여전히 위 기능을 가지는가를 확인할 수 있다. 더구나 본 명세서가 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 개시하고 있고 또한 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지님을 확인한 실시예를 개시하고 있기 때문에, 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 당업자에게 용이하게 실시 가능한 것임이 분명하다. 그러므로 "상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미로서 이해되어야 한다. 이처럼 "상기 (a) 또는 (b)의 폴리펩티드와

실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 하나 이상의 치환된 아미노산을 포함하면서도 여전히 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 가지는 모든 폴리펩티드를 포함하는 의미이지만, 그럼에도 활성의 정도라는 관점에서 봤을 때, 상기 폴리펩티드는 서열번호 2의 아미노산 서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하다. 상기 폴리펩티드는 서열 상동성의 하한에 있어서 60% 이상의 서열 상동성을 지니는 것이 바람직한 반면, 서열 상동성의 상한에 있어서는 당연히 100%의 서열 상동성을 지니는 것이 바람직하다. 보다 더 구체적으로 위 서열 상동성은 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 순서대로 높아질수록 바람직하다. 그리고 본 발명의 "상기 (a) 및 (b)의 폴리펩티드와 실질적으로 유사한 폴리펩티드"는 "서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드" 뿐만 아니라 '서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드'를 포함하므로 전술한 바의 모든 설명은 "서열번호 2의 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드"에 대해서 뿐만 아니라 "서열번호 2의 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드에 실질적으로 유사한 폴리펩티드"에 대해서도 적용되어진다.

- [26] 본 발명은 다른 측면에 있어서, 전술한 바의 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드에 대한 것이다. 여기서 "전술한 바의 폴리펩티드"란 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지니면서 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체를 포함하는 폴리펩티드, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열의 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드, 및 위 폴리펩티드들과 실질적으로 유사한 폴리펩티드를 포함할 뿐만 아니라, 전술한 바의 바람직한 양태의 모든 폴리펩티드들을 포함하는 의미이다. 그러므로 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지니면서, 서열번호 2에 기재된 아미노산 서열 전체 또는 그 실질적인 부분을 포함하는 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드 및 이러한 폴리펩티드들에 실질적으로 유사한 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 나아가 바람직한 양태로서 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 지니면서 전술한 바의 서열 상동성의 순서대로 그 서열 상동성을 지니는 모든 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 아미노산 서열이 밝혀졌을 때, 그러한 아미노산 서열에 기초하여 그러한 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 당업자라면 용이하게 제조할 수 있다.

- [27] 한편 본 명세서에서 상기 "단리된 폴리뉴클레오티드"는 화학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드, 생물체 특히 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 분리된 폴리뉴클레오티드 및 변형된 뉴클레오티드를 함유한 폴리뉴클레오티드를 모두

포함하며, 단일 가닥 또는 이중 가닥의 RNA 또는 DNA의 중합체를 모두 포함하는 것으로서 정의된다.

- [28] 본 발명은 또 다른 측면에 있어, 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.
- [29] 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및 (b) 노화가 지연된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.
- [30] 본 명세서에서, "노화 지연"이란 야생형 식물체에 비하여 식물 수명이 연장된 특성을 말하며, 구체적으로는 잎 및/또는 줄기의 황화 현상 및/또는 괴사 현상이 야생형 식물체 비하여 지연되거나 식물체의 엽록소 함량이 야생형 식물체에 비하여 많거나 식물체의 광합성 효율이 야생형 식물체 비하여 높은 특성 말한다.
- [31] 또한 본 명세서에서, "식물체"란 성숙한 식물, 미성숙 식물(유식물체), 식물 종자, 식물 세포, 식물 조직 등을 포함하는 의미이다. 식물 세포나 식물 조직이 형질전환에 사용될 경우에 형질전환된 식물 세포나 식물 조직은 유럽특허 EP0116718, 유럽특허 EP0270822, 국제특허 WO 84/02913, 문헌[Gould et al. 1991, Plant Physiol 95,426-434] 등에 개시된 방법을 사용하여 성숙한 식물체로 발육·생장시킬 수 있다.
- [32] 또한 본 명세서에서, "식물"이란 노화 지연이 인간에게 유용한 결과를 줄 수 있는 모든 식물을 포함한다. 노화 지연은 생산량 증가 즉 종자 생산성 및/또는 개체의 생체량 증가와 직결되므로, 상기 식물의 의미에는 일차적으로 생산성 증대가 인간에게 유용한 식물인 작물, 예컨대 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 팥, 귀리, 수수, 십자화과 채소(배추, 청경채, 케일, 콜리플라워, 브로콜리, 열무(young radish), 무, 갓 등), 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파, 당근, 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩, 유채, 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구, 바나나 등이 포함될 것이고, 또한 스위치그라스, 억새, 갈대 등과 같은 바이오에너지 작물과 기타 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐, 페레니얼라이그라스, 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합, 튜립 등이 포함될 것이다.
- [33] 또한 본 명세서에서 "서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자"란 첫째 서열번호 2의 아미노산을 암호화하면서도 코돈의 축퇴성(codon degeneracy)으로 인하여 서열번호 1의 유전자와 다른 염기서열을 갖는 유전자와, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 유전자의 동족체(homologue)로서 식물의 노화 지연 기능을 지니면서 식물의 종류에 따른 진화적 경로의 상이로 인하여 서열번호 1의 염기서열과 다른 염기서열로 이루어진 모든 유전자를 포함하는 의미이다. 여기서 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 서열 상동성이 높을수록 바람직하고, 가장

바람직하게는 당연히 100%의 서열 상동성을 지닐 때이다. 한편, 서열 상동성의 하한에 있어서는 상기 유전자가 서열번호 1의 염기서열과 60% 이상의 서열 상동성을 지니는 경우가 바람직할 것이다. 보다 더 구체적으로는 위 서열 상동성이 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 순서대로 높아질수록 바람직하다.

- [34] 또한 본 명세서에서, "과발현"이란 야생형 식물체에서 발현되는 수준 이상의 발현을 의미한다. 이러한 "과발현"여부는 상기 서열번호 1의 유전자나 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열로 이루어진 유전자(예컨대 cDNA)를 정량하여 직접적으로 결정하거나 그 유전자가 암호화하는 단백질을 정량하여 간접적으로 정량할 수 있다.
- [35] 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 단계 (a)는 유전공학적 방법으로 수행될 수 있다.
- [36] 유전공학적인 방법은 (i) 상기 서열번호 1의 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에 삽입시키는 단계, 및 (ii) 그 발현벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하여 구성된다.
- [37] 본 명세서에서, "작동 가능하게"란 어떤 유전자의 전사 및/또는 번역이 영향을 받도록 연결된다는 의미이다. 예컨대 어떠한 프로모터가 그것에 연결된 어떤 유전자의 전사에 영향을 준다면 그 프로모터와 그 유전자는 작동 가능하게 연결된 것이다.
- [38] 또 본 명세서에서, "조절 서열"이란 그것의 존재가 그것에 연결된 유전자의 전사 및/또는 번역에 영향을 미칠 수 있는 모든 서열을 포함하는 의미이며, 이러한 조절 서열에는 프로모터 서열, 전사종결 서열(polyadenylation **signal**), 복제 개시점을 포함한다.
- [39] 또한 본 명세서에서, "프로모터"는 당업계에 알려진 통상의 의미를 따르는데, 구체적으로는 어떤 유전자의 전사 개시점을 기준으로 상류(5'쪽)에 위치하고, DNA-의존 RNA 중합효소에 대한 결합 부위, 전사 개시점, 전사 인자 결합 부위 등을 포함하는, 하나 이상의 유전자의 전사를 제어하는 기능을 갖는 핵산 서열을 의미한다. 이러한 프로모터는 그것이 진핵생물 유래일 경우 전사 개시점 상류에 있는 TATA 박스(통상 전사 개시점(+1) -20 내지 -30 위치에 존재), CAAT 박스(통상 전사 개시 부위와 비교하여 대략 -75 위치에 존재), 5'인핸서, 전사 억제 인자 등을 포함한다.
- [40] 사용 가능한 프로모터는 그것에 연결된 서열번호 1의 유전자를 과발현시킬 수 있는 프로모터라면 구성적 프로모터(모든 식물체 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터), 유도성 프로모터(특정 외부 자극에 반응하여 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터 또는 특정 발달 시기나 특정 조직에서 특이적으로

발현을 유도하는 프로모터) 모두 사용될 수 있다. 사용 가능한 구성적 프로모터의 대표적인 예로는 콜리폴라워 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터를 들 수 있고, 그 밖에 유비퀴틴(ubiquitin) 계열의 프로모터(Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18, 675-689; EP0342926; Cornejo et al., 1993, Plant Mol. Biol. 23, 567-581), 베타액틴 프로모터(Zhang et al. 1991, The Plant Cell 3, 1155-1165) 등을 들 수 있다. 사용 가능한 유도성 프로모터의 예로는 구리 이온에 의해 활성화되는 효모 메탈로티오네인 프로모터(Mett 등, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 90:4567, 1993), 치환 벤젠설폰아미드에 의해 활성화되는 In2-1 및 In2-2 프로모터(Hershey 등, Plant Mol. Biol., 17:679, 1991), 글루코코르티코이드에 의해 조절되는 GRE 조절 서열(Schena 등, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 88:10421, 1991), 에탄올 조절성 프로모터(Caddick 등, Nature Biotech., 16:177, 1998), 리블로스 비스-포스페이트 카르복실라제(ssRUBISCO)의 소 서브유니트에서 유래한 광 조절성 프로모터(Coruzzi 등, EMBO J., 3:1671, 1984; Broglie 등, Science, 224:838, 1984), 만노핀 신타제 프로모터(Velten 등, EMBO J., 3:2723, 1984), 노팔린 신타제(NOS) 프로모터, 옥토판 신타제(OCS) 프로모터, 열 충격 프로모터(Gurley 등, Mol. Cell. Biol., 6:559, 1986; Severin 등, Plant Mol. Biol., 15:827, 1990) 베타 글루테린(glutelin) 프로모터, 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 등을 들 수 있다.

- [41] 전사 종결 서열은 poly(A) 첨가 신호(polyadenylation signal)로 작용하는 서열로서 전사의 완결성 및 효율성을 높이기 위한 것이다. 사용될 수 있는 전사 종결 서열의 예로는 노팔린 신타아제(NOS) 유전자의 전사 종결 서열, 베타 α -아밀라아제 RAmy1 A 유전자의 전사 종결 서열, 아그로박테리움 투메파시엔스의 옥토판인(Octopine) 유전자의 전사 종결 서열, 밀 열 쇼크 단백질 17의 전사 종결 서열, 밀 유비퀴틴 유전자의 전사 종결 서열, 베타 글루테린 유전자의 전사 종결 서열, 베타 락테이트 디하이드로게나제 유전자의 전사 종결 서열 등을 들 수 있다.
- [42] 상기 발현백터는 선별 마커 유전자를 포함할 수 있다. 여기서 "마커 유전자"란 그러한 마커 유전자를 포함하는 식물체의 선별을 가능하게 하는 형질을 암호화하는 유전자를 의미한다. 마커 유전자는 항생물질 내성 유전자일 수 있고 제초제 내성 유전자일 수도 있다. 적합한 선별 마커유전자의 예로는 아데노신 데아미나제의 유전자, 디히드로폴레이트 리덕타제의 유전자, 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라제의 유전자, 티미딘 키나제의 유전자, 크산틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제의 유전자, 포스펜노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자 등을 들 수 있다.
- [43] 본 명세서에서, 상기 "형질전환"이란 왜래 유전자가 도입됨에 의한 숙주 식물체의 유전자형의 변형을 의미하며, 그 형질전환에 사용된 방법과 상관없이 그 왜래 유전자가 숙주 식물체, 더 정확하게는 숙주 식물의 세포 내로 도입되어

세포의 게놈에 통합된 것을 의미한다. 여기서 왜래 유전자에는 동종성 유전자와 이종성 유전자가 포함되는데, "동종성 유전자"란 숙주 유기체 또는 그와 동일한 생물종의 내인성 유전자를 의미하며, "이종성 유전자"란 그것이 형질전환되는 유기체에서는 존재하지 않는 유전자를 말한다. 예컨대 애기장대 유래 유전자는 애기장대 식물에게는 동종성 유전자이지만 토마토 식물에서는 이종성 유전자가 된다.

- [44] 한편, 외래성 유전자로 식물을 형질전환시키는 방법은 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있는데, 예컨대 유전자 총을 사용한 직접적인 유전자 전달 방법, 프로탈 딥(*floral dip*)을 이용한 *in planta* 형질전환 방법, 화분 매개 형질전환 방법, 원형질체의 형질전환 방법, 바이러스 매개 형질전환 방법, 리포좀 매개 형질전환 방법 등을 사용할 수 있다. 또한 특정 식물체에 적합한 형질전환 방법을 선택하여 사용할 수도 있는데, 예컨대 옥수수를 형질전환시키는 방법은 미국특허 US 6,140,553, 문헌(Fromm et al, 1990, *Bio/Technology* 8, 833-839), 문헌(Gordon-Kamm et al, 1990, *The Plant Cell* 2, 603-618) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있으며, 벼를 형질전환시키기 위한 방법은 문헌(Shimamoto et al, 1989, *Nature* 338, 274-276), 문헌(Datta et al 1990, *Bio/Technology* 8, 736-740), 국제특허 WO 92/09696, 국제특허 WO 94/00977, 국제특허 WO 95/06722 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다. 또 토마토나 담배 형질전환에 있어서는 문헌(An G. et al., 1986, *Plant Physiol.* 81: 301-305), 문헌 (Horsch R.B. et al, 1988, In: *Plant Molecular Biology Manual A5*, Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp 1-9), 문헌(Koornneef M. et al, 1986, In: Nevins DJ. and R.A. Jones, eds. *Tomato Biotechnology*, New York, NY, USA, Alan R. Liss, Inc. pp 169-178) 등에 개시된 방법을 사용할 수 있다.
- [45] 일반적으로 식물을 형질전환시킴에 있어 많이 사용되는 것이, 형질전환된 아그로박테리움으로 유식물체, 식물 종자 등을 감염시키는 방법이다.
- [46] 이러한 아그로박테리움이 매개된 형질전환 방법은 당업계에 잘 공지되어 있으며(Chilton 등, 1977, *Cell* 11:263:271; 유럽특허 EP 0116718; 미국특허 US 4,940,838), 특정 식물체에 적합한 방법도 당업계에 공지되어 있다. 예컨대 목화에 대해서는 미국특허 US 5,159,135, 콩에 대해서는 미국특허 US 5,824,877, 옥수수에 대해서는 미국특허 US 5,591,616 등을 참조할 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환 방법은 Ti-플라스미드를 이용하는데, 이 플라스미드에는 T-DNA를 식물 세포의 게놈으로 통합시킬 수 있는 좌우 경계(*border*) 서열이 포함될 것이다.
- [47] 한편, 상기 (b) 선별 단계는 형질전환된 식물체를 발육·성장시켜, 잎의 황화 현상의 진행 정도나 잎의 괴사 현상의 진행 정도 등을 통해 육안으로 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 나아가 엽록소 함량, 광합성 효율 등을 정량하는 방법, 상기 방법들을 혼합한 방법 등을 통하여 선별할 수 있다.

- [48] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.
- [49] 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및 (b) 생산성 증대 특성을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.
- [50] 본 명세서에서, "생산성 증대 특성"이란 식물체의 전체, 줄기, 뿌리 및/또는 잎의 생체량(biomass; 크기 및/또는 질량)이 야생형 식물체에 비하여 증가한 특성 및/또는 식물체의 종자의 생산성(식물 1개체 당 종자의 수 및/또는 질량)이 야생형 식물체에 비하여 증가한 특성을 말한다.
- [51] 상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적 방법에 대해서는 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.
- [52] 상기 (b) 단계는 식물체의 생체량 및/또는 종자 생산성을 비교하여 선별하거나, 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 또는 이들의 방법을 혼합하여 선별할 수도 있다.
- [53] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 스트레스 내성 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.
- [54] 본 발명의 스트레스 내성 식물체의 제조 방법은 (a) 식물체에서 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 과발현시키는 단계 및 (b) 스트레스 내성 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성된다.
- [55] 본 명세서에서, "스트레스"는 가뭄 스트레스 및/또는 산화적 스트레스를 의미한다.
- [56] 상기 (a) 단계는 유전공학적으로 수행될 수 있는데, 이러한 유전공학적 방법에 대해서는 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.
- [57] 상기 (b) 단계는 식물체의 스트레스 내성을 비교하여 선별하거나(예컨대 잎의 황화 현상의 진행 정도, 잎의 괴사 현상의 진행 정도, 잎 및/또는 줄기의 생체량, 엽록소 함량, 광합성 효율 등) 형질전환 시에 선별 마커 유전자가 함께 형질전환될 경우에는 선별 마커 유전자를 이용하여 선별할 수 있으며, 또는 이들의 방법을 혼합하여 선별할 수도 있다.
- [58] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 노화를 지연시키는 방법에 관한 것이다.
- [59] 본 발명의 식물체의 노화를 지연시키는 방법은 (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현벡터에

- 삽입시키고 (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.
- [60] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명의 식물체의 생산성 증대 방법에 관한 것이다.
- [61] 본 발명의 식물체의 생산성 증대 방법은 (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현백터에 삽입시키고 (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.
- [62] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법에 관한 것이다.
- [63] 본 발명의 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법은 (a) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현백터에 삽입시키고 (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함한다.
- [64] 상기 방법들에서 상기 (a) 및 (b) 단계는 상기 본 발명의 노화가 지연된 식물체의 제조 방법과 관련하여 설명한 바와 같다.
- [65] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 노화 지연 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.
- [66] 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 *ATPG8* 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자로 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.
- [67] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.
- [68] 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 *ATPG8* 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG8* 이 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체이다.
- [69] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 상기 본 발명의 스트레스 내성 식물체의 제조 방법에 의하여 얻어진, 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 1의 염기서열과 유사한 서열을 갖는 유전자가 과발현된 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체에 관한 것이다.
- [70] 바람직한 측면에 있어서, 상기 식물체는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 *ATPG8* 단백질을 암호화하는 유전자, 특히 서열번호 1의 염기서열을 갖는 유전자 *ATPG8* 이 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성을 갖는

형질전환 식물체이다.

- [71] 본 명세서에서, 상기 "형질전환 식물체"는 성숙한 식물로 발육·성장할 수 있는 식물 세포, 식물 조직, 또는 식물 종자에 상기 유전자가 도입되어 형질전환된 경우뿐만 아니라 형질전환된 식물과의 교배에 의해 계놈이 변형된 식물체, 식물 종자, 식물 세포를 포함한다.

발명의 효과

- [72] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG8* 단백질과 그 유전자를 제공할 수 있다. 상기 유전자는 노화 지연 기능을 갖고 생산성 증대 기능을 가지므로, 이 유전자로 식물체를 형질전환시킬 경우, 식물의 노화를 지연시키고, 식물의 생산성 증대 기능을 갖도록 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [73] 도 1은 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG8* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터의 구조(모식도)를 나타낸 것이다.
- [74] 도 2는 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₁ 식물을 발아 후 60일 동안 생육한 애기장대의 사진이다.
- [75] Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구
- [76] *ATPG8 ox-10*: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₁ 식물
- [77] 도 3은 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대의 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [78] Wt: 애기장대 야생형
- [79] *ATPG8 ox-5*: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인
- [80] *ATPG8 ox-9*: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인
- [81] *ATPG8 ox-10*: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인
- [82] 도 4는 애기장대 야생형의 다양한 식물 기관에서 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [83] S: seedling, R: root, Ar: arial region, GL: green leaf, YL: yellow leaf, St: stem, F: inflorescence organ
- [84] 도 5는 상기 도 1의 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대의 T₂ 라인을 발아 후 50일과 70일 동안 생육한 애기장대의 사진이다.
- [85] Con: 애기장대 야생형 혹은 대조구
- [86] *ATPG8 ox-5*: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인
- [87] *ATPG8 ox-9*: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인
- [88] *ATPG8 ox-10*: pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터로 형질전환된 애기장대 T₂ 라인
- [89] 도 6은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된

- 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.
- [90] 도 7은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.
- [91] 도 8은 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.
- [92] 도 9는 자엽 생성 후 12일부터 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 40일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT*를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. *CAB2*은 엽록소 a/b 결합 단백질 유전자이고, *SEN4* 및 *SAG12*는 노화 유전자로서, 노화 마커 유전자들이다.
- [93] 도 10은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 표현형을 관찰한 그림이다.
- [94] 도 11은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 엽록소 함량을 조사한 그림이다.
- [95] 도 12는 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 광합성 효율을 Fv/Fm로 조사한 그림이다.
- [96] 도 13은 발아 후 21일째 애기장대 야생형(Con), 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 암상태를 유지하여 매 2일마다 12일까지 잎의 노화 마커 유전자의 발현 양상을 qRT-PCR을 통하여 분석한 결과를 나타낸 것이며, *ACT*를 PCR 양성 대조구로 사용하였다. *CAB2*, *SEN4*, 그리고 *SAG12*는 노화 마커 유전자이다.
- [97] 도 14는 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 표현형적 변화를 도시한 그림이다.
- [98] 도 15은 발아 후 30일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어난 식물의 잎 무게 변화를 도시한 그림이다.
- [99] 도 16은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 표현형 변화를 도시한 그림이다.

[100] 도 17은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 엽록소 함량 변화를 도시한 그림이다.

[101] 도 18은 발아 후 25일째 애기장대 야생형 혹은 대조구(Con)와 노화 지연이 유도된 변이체 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*, 그리고 *ATPG8 ox-10*의 3-4번 좌엽을 detach하여 6일간 H₂O₂를 처리한 잎의 광합성 효율 변화를 Fv/Fm로 도시한 그림이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[102] 이하 본 발명의 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[103] <실시예 1> 애기장대로부터 식물의 노화 지연 기능을 갖고 또 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG8* 유전자의 분리

[104] 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG8* 유전자를 애기장대로부터 분리하기 위하여 다음과 같은 과정을 수행하였다.

[105] <실시예 1-1> 애기장대의 재배 및 배양

[106] 애기장대는 토양을 담은 화분에서 재배하거나, 2% 수크로즈(sucrose, pH 5.7)와 0.8% 아가(agar)가 포함된 MS(Murashige and Skoog salts, Sigma, USA) 배지를 넣은 펠트리 디쉬에서 재배하였다. 화분에서 재배할 때는 22°C의 온도에서 16/8시간 명암 주기로 조절되는 생장 조절기(growth chamber)내에서 재배하였다.

[107] <실시예 1-2> RNA 추출과 cDNA 라이브러리의 제조

[108] 애기장대 cDNA 라이브러리를 만들기 위해서 여러 분화 단계의 애기장대 전체 기관으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 추출된 전체 RNA로부터 Superscript III Reverse Transcriptase (INVITROGEN, USA)을 이용하여 cDNA를 합성하였다.

[109] <실시예 1-3> 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는 *ATPG8* 유전자분리

[110] 애기장대의 DNA 결합 단백질 관련 단백질(DNA-binding protein-related, GeneBank accession number NP 191646.1)의 염기서열을 기초로 하여 서열번호 3으로 표시되고 제한효소 *BglIII*의 서열이 포함된 정방향 프라이머(*BglIII*/AT3G60870 SOE-F, 5'-AGA TCT ATG GAT GAG GTA TCT CGT TCT CA -3')와, 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *XbaI*의 서열이 포함된 역방향 프라이머(*XbaI*/AT3G60870 SOE-R, 5'-TCT AGA TTA GAA AGA CGG TCG TTG CGT TC-3')를 합성하였다. 상기 두 프라이머를 사용하여 상기 <실시예 1-2>에서 제조된 애기장대 cDNA로부터 PCR(polymerase chain reaction)을 이용하여 전장 cDNA를 증폭하고 분리하였다.

[111] 상기 분리된 cDNA의 분석 결과, 약 28.4 kDa의 분자량을 갖는 265개의 아미노산을 암호화하는 798bp 크기의 전사 해독 틀(ORF)을 가지고 있으며, 1

개의 엑손(exon)으로 구성되어 있음을 확인하였고, AT-hook 도메인을 가지고 있어 이를 *ATPG8*(AT-hook protein of *Genomine 8*)로 명명하였다. 상기 유전자가 암호화하는 ATPG8 단백질의 등전점(isoelectric point)은 8.11로 나타났다(이하 유전자는 이탤릭체를 사용하여 "*ATPG8*" 혹은 "*ATPG8* 유전자"라 하고, 단백질은 "*ATPG8*" 혹은 "*ATPG8* 단백질"이라고 한다).

- [112] <실시예 2> *ATPG8* 유전자에 대한 센스 구성체(construct)가 도입된 형질전환 애기장대의 제조 및 노화와 생산성 증대에 대한 특성 분석
- [113] <실시예 2-1> *ATPG8* 유전자에 대한 센스 구성체가 도입된 형질전환 애기장대의 제조
- [114] 상기 유전자가 식물의 노화 지연 기능 및 생산성 증대 기능을 갖는지를 확인하기 위하여 *ATPG8* 유전자가 센스 방향으로 도입된 형질전환 애기장대를 제조하여 *ATPG8* 전사체의 발현을 변화시켰다.
- [115] 서열번호 3로 표시되고 제한효소 *Bgl*III의 서열이 포함된 정방향 프라이머 및 서열번호 4로 표시되고 제한효소 *Xba*I의 서열이 포함된 역방향 프라이머를 이용하여 애기장대의 cDNA로부터 PCR을 이용하여 *ATPG8* cDNA를 증폭하였다. 상기 DNA를 제한효소 *Bgl*III와 *Xba*I으로 절단하고, 유도성 프로모터(inducible promoter)인 *SEN1* 프로모터의 조절을 받도록 제작한 pCSEN 벡터에 센스 방향으로 클로닝하여 *ATPG8* 유전자에 대한 센스 구성체인 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 제작하였다. 상기 *SEN1* 프로모터는 식물의 생장 단계에 따라 발현되는 유전자에 대해 특이성을 갖는다.
- [116] 한편, 도 1은 pCSEN 벡터에 *ATPG8* 유전자가 센스 방향으로 도입된 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 도시한 그림이다. 도 1에서 BAR는 바스타 제초제에 대한 저항성을 부여하는 *BAR* 유전자(phosphinothricin acetyltransferase gene)를 가리키고, RB는 오른쪽 경계(Right Border), LB는 왼쪽 경계(Left Border), P35S는 CaMV 35S 프로모터, 35S-A는 CaMV 35S RNA polyA, PSEN은 *SEN1* 프로모터, Nos-A는 노파린 합성 유전자(nopaline synthase gene)의 polyA를 가리킨다.
- [117] 상기 pCSEN-*ATPG8* 재조합 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 일렉트로포레이션(electroporation)방법을 이용하여 도입시켰다. 형질전환된 아그로박테리움 배양액을 28°C에서 O.D.₆₀₀ 값이 1.0이 될 때까지 배양하였고, 25°C에서 5,000rpm으로 10분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다. 수확된 세포를 최종 O.D.₆₀₀ 값이 2.0이 될 때까지 Infiltration Medium (IM; 1X MS SALTS, 1X B5 vitamin, 5% sucrose, 0.005% Silwet L-77, Lehle Seed, USA) 배지에 현탁하였다. 4주된 애기장대를 진공 챔버(vacuum chamber)에 있는 아그로박테리움 현탁액에 침지시키고, 10분 동안 10⁴ Pa의 진공 하에 두었다. 침지 후, 애기장대를 24시간 동안 폴리에틸렌 백(polyethylene bag)에 두었다. 이후, 형질전환된 애기장대를 계속 성장시켜 종자(T₁)를 수확하였다. 대조구로는 형질전환되지 않은 야생형(wild type) 애기장대 또는 *ATPG8* 유전자가 포함되지

않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대를 사용하였다.

[118] <실시예 2-2> T₁과 T₂ 형질전환 애기장대의 특성 분석

[119] 상기 <실시예 2-1>에서와 같이 형질전환한 애기장대에서 수확한 종자는 0.1% 바스타(Basta) 제초제(경농, 한국) 용액에서 30분 동안 침지시키고 배양함으로써 선별하였다. 이후 형질전환한 애기장대의 생육 동안 상기 화분에 바스타 제초제를 5회 처리한 후, 각 화분에서의 애기장대 성장 변화를 조사하였다.

[120] pCSEN-ATPG8 벡터로 형질전환된 T₁ 애기장대 AT8-10은 대조구(ATPG8 유전자가 포함되지 않은 벡터(pCSEN 벡터)만으로 형질전환된 애기장대 혹은 야생형 애기장대)와 발아 후 60일째 그들의 표현형을 비교하여 볼 때, 놀랍게도 AT8-10 변이체 라인은 노화 지연의 뚜렷한 표현형적 특징을 가졌으며, 또한 흥미롭게도 종자 수확량 증가와 개체 크기 증가와 같은 생산성 증대 특징을 가졌다(도 2).

[121] 이러한 형질전환 애기장대의 표현형 변화를 보다 정확히 확인하기 위하여 T₁ 형질전환 애기장대로부터 T₂ 형질전환 종자를 받아 이들 라인의 표현형을 조사하였다. 우선, T₂ 형질전환 애기장대를 3일 동안 저온 처리(4°C)한 T₂ 형질전환 종자를 화분에서 재배한 후 바스타 제초제 처리를 통하여 형질전환 애기장대를 선별하였다.

[122] 선별된 노화 지연 표현형을 가지는 변이체의 ATPG8 유전자의 발현 양상을 분석하기 위하여 자엽 생성 후 20일 동안 생육한 애기장대 야생형과 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10 변이체의 잎으로부터 RNasey Plant Mini Kit (QIAGEN, Germany)을 사용하여 전체 RNA를 각각 추출하였다. 각각 1μg의 RNA를 주형으로 하고, Superscript III Reverse Transcriptase(INVITROGEN, USA)을 이용하여 65°C에서 5분; 50°C에서 60분; 및 70°C에서 15분의 조건으로 cDNA를 합성하였다. 이후, 합성된 cDNA를 주형으로 하고, 하기 ATPG8 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 ACT 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 94°C에서 2분간 가열하여 주형 DNA를 변성시킨 후, 94°C에서 1분; 55°C에서 1분 30초; 및 72°C에서 1분을 한 사이클로 하여 총 30회 반복 수행한 다음, 72°C에서 15분간 최종 반응시켜 수행하였다. 이후, 1% 아가로스 겔 전기영동으로 PCR 산물을 확인하였으며, 그 결과는 도 3에 도시되었다. 애기장대 야생형에 비하여 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10 변이체의 ATPG8 유전자의 발현이 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 사실은 본 변이체들이 ATPG8 유전자의 과발현체임을 증명하고 있다.

[123] 표 1

[Table 1]

ATPG8 유전자와 *ACT* 유전자 발현을 위한 프라이머 서열번호

No.	유전자 명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	<i>ATPG8</i>	ATGCAAGATGCGACATCGTTT (서열번호 5)/ ATAAGCTTCACCTGGCAACGAA (서열번호 6)
2	<i>ACT</i>	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACCAGCCTTC (서열번호 8)

- [124] 한편 애기장대 야생형의 *ATPG8* 유전자의 식물체 기관별 발현 양상을 분석하기 위하여 애기장대 야생형의 다양한 발달 단계에서 기관별 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하고 이를 주형으로 하여 *ATPG8* 유전자와 PCR 양성 대조구로 사용된 *ACT* 유전자에 대해 하기 [표 1]의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과는 도 4에서 도시된 바와 같이, *ATPG8* 유전자의 발현은 주로 줄기에서 이루어지는 것을 확인할 수 있었으나, 다른 *ATPGs* 유전자와는 다르게 잎에서의 발현은 현저히 낮음을 알 수 있었다. 또한 발달 초기의 유식물(seedling)과 뿌리, 그리고 꽃에서는 유전자의 발현이 현저히 낮음을 알 수 있었다. 이러한 사실로 미루어보아 본 유전자는 식물의 줄기에서 주로 기능을 가져 식물의 노화 조절에 관여할 것으로 판단되는 반면, 뿌리와 발달 초기의 유식물 등 식물의 발달 초기에는 기능을 거의 가지지 않은 것으로 판단된다.
- [125] 선별된 애기장대 T₂ 형질전환 라인들의 표현형 확인은 발아 후 50일째, 그리고 70일째 수행하였다(도 5). pCSEN-*ATPG8* 구성체를 가지고 있는 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10* 변이체 라인은 애기장대 대조구(Con)와 비교하여 볼 때, T₁ 변이체와 마찬가지로 식물체의 노화 지연 현상이 뚜렷하게 나타났으며, 아울러 이들 변이체들은 노화 지연 표현형뿐만 아니라 노화 지연 동안 개체 크기와 종자 생산량에서도 뚜렷한 증가 현상이 유발되었다. 이러한 노화 지연 현상과 생산성 증대는 라인 마다 약간씩 차이가 있었는데 이는 도 3에서 나타나듯이 유전자의 과발현이 라인 마다 조금씩 차이가 있음에 기인하는 것으로 판단된다. 흥미로운 사실은 노화 지연 형질이 강력한 *ATPG8 ox-9*는 생산성 증대에 있어서 큰 표현형적 차이를 못 가지는 반면, 노화 지연 형질이 강하지 않는 *ATPG8 ox-5*와 *ATPG8 ox-10*는 생산성 증대에 있어서 대조구에 비하여 종자 수확량 증가 및 개체 크기 증가와 같은 큰 표현형적 특징을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 본 유전자의 발현량 조절은 생산성 증대와 노화 지연에 대한 표현형적 특징을 가진 식물을 임의로 제작할 수 있을 것으로 판단된다.
- [126] <실시예 3> *ATPG8* 과발현 변이체의 노화 조절에 대한 특성 분석
- [127] *ATPG8* 과발현 변이체의 노화 지연 형질을 확인하기 위하여, T₂ 세대에서 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽(rosette leaf)을 매 4일마다 표현형 관찰, 잎

엽록소 함량, 그리고 광합성 활성을 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

[128] <실시에 3-1> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 잎의 표현형적 변화

[129] 자엽 생성 후 12일 이후부터 3-4번 좌엽을 매 4일마다 40일까지 잎의 표현형을 관찰하였다. 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 24일 이후 잎의 황화 현상이 진행되어 32일째부터 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10의 경우 잎의 황화 현상이 36일부터 진행되었으며 잎의 괴사 현상은 40일째에도 거의 일어나지 않고 있음을 확인할 수 있었다(도 6). 이러한 사실로 미루어보아, ATPG8 유전자는 식물체 노화 지연에 있어 중요한 역할을 담당하리라고 판단된다.

[130] <실시에 3-2> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 엽록소 함량 변화

[131] 엽록소의 함량 측정을 위해 각 시료 잎을 80% (V/V) acetone을 사용하여 엽록소를 추출하였다. 엽록소 함량은 663.2 nm와 664.8 nm의 흡광 계수를 이용하여 Lichtenthaler와 Wellburn의 방법(Biochemical Society Transduction 603:591~592, 1983)에 따라 측정하였다. 그 결과, 도 7에 도시된 바와 같이, 야생종의 경우 엽록소 함량이 자엽 생성 후 24일 이후부터 급격한 감소를 보이며 32일째 엽록소의 함량이 거의 0%가 되었으나, ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10의 경우 자엽 생성 후 32일이 되었을 때도 측정 초기의 80% 이상의 엽록소 함량을 보임을 확인할 수 있었다.

[132] <실시에 3-3> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 광합성 효율 변화

[133] 오 등의 방법(Plant Mol. Biol. 30:939, 1996)을 이용하여 광합성 효율을 측정하였다. 우선 각 DAE(day after emersion)의 잎을 15분간 암 처리한 후, 식물 효율 분석기(Plant Efficiency Analyzer)(Hansatech)를 이용하여 엽록소의 형광을 측정하였다. 광합성 효율은 엽록소의 형광도 특성을 이용한 PSII(photosystemII)의 광화학적 효율(photochemical efficiency)로 나타내었는데, 형광도 최대치(maximum value of fluorescence; Fm)에 대한 최대 변형 형광도(maximum variable fluorescence; Fv)의 비율(Fv/Fm)로 나타내었다. 상기 수치가 높을수록 광합성 효율이 우수함을 나타낸다.

[134] 그 결과, 도 8에 도시된 바와 같이, 야생종은 자엽 생성 후 28일 이후부터 급격히 감소하기 시작해 32일 이후부터 활성이 대부분 사라졌으나, ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10의 경우 자엽 생성 후 36일까지 활성 변화가 거의 일어나지 않다가 40일째 라인에 따라 정도의 차이는 있지만 약 20% 범위 정도만 활성 소실이 일어났다. 상기 결과로부터, ATPG8 과발현 변이체는 야생종에 비해 잎의 수명이 훨씬 긴 표현형을 갖는 것으로 나타났으며, 이러한 수명연장의 효과는 ATPG8 유전자에 의한 엽록소 함량 감소 및 광합성 효율 감소로 표현되는 노화에 따른 생화학적 변화가 지연됨으로써 유발되는 것으로 생각된다.

- [135] <실시예 3-4> ATPG8 과발현 변이체의 나이-의존적 노화에 따른 노화 관련 유전자의 발현 변화
- [136] 야생종과 ATPG8 *ox-5*, ATPG8 *ox-9*, 그리고 ATPG8 *ox-10* 변이체에서 노화 관련 유전자(senescence associated gene; SAG)들의 발현을 비교하기 위해, 잎 발달 과정 동안 시간 경과에 따른 ATPG8 유전자와 각 노화 관련 유전자들의 발현 양상을 qRT-PCR 분석을 통해 확인하였다.
- [137] Total RNA의 분리는 WelPrep™ Total RNA Isolation Reagent (JBI)를 이용하였으며, DNase I (Ambion)을 처리한 후, 정량을 통해 0.75ug을 ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)을 이용해 first cDNA를 합성하였다.
- [138] ATPG8 유전자 및 노화에 대한 마커(marker) 유전자들에 대한 정량적인 분석은 Applied Bio-systems의 7300 Real Time PCR System을 이용한 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 과정을 통해 확인하였다. 노화 마커 유전자로는 SAG12, SEN4 및 CAB2 유전자를 사용하였으며, qRT-PCR 양성 대조구로는 ACT 유전자를 사용하였다. 사용된 프라이머는 하기 표 2에서 제시하였다.
- [139] 표 2

[Table 2]

노화관련 유전자의 발현을 위한 프라이머 서열번호

No	유전자명	정방향/역방향 프라이머(서열번호)
1	CAB2	CCGAGGACTTGCTTTACCCC (서열번호 9)/ AACTCAGCGAAGGCCTCTGG (서열번호 10)
2	SEN4	CGTCGATGACACACCCATTAGAG(서열번호 11)/ CATCGGCTTGTTCTTTGGAAAC(서열번호 12)
3	SAG12	ACGATTTTGGCTGCGAAGG (서열번호 13)/ TCAGTTGTCAAGCCGCCAG (서열번호 14)
4	ACT	ATGGCCGATGGTGAGGATATTC (서열번호 7)/ CACCAGCAAAACCAGCCTTC (서열번호 8)
5	ATPG8	ATGCAAGATGCGACATCGTTT (서열번호 5)/ ATAAGCTTCACCTGGCAACGAA (서열번호 6)

- [140] 야생종의 경우, CAB2(엽록소 a/b 결합 단백질)와 같은 광합성에 관련된 유전자의 발현은 시간이 지날수록 노화에 비례하여 감소하였다. 그러나 ATPG8 과발현 변이체들에서는 정도의 차이는 있으나, 이들 유전자의 발현 감소 양상이 지연됨을 알 수 있었다. 한편, SAG12 및 SEN4와 같은 노화 관련 유전자들은 노화단계에서 그 발현이 증가되는 것으로 알려져 있다. SEN4와 SAG12 경우 야생종에서 자엽 생성 후 28일 이후 급격히 증가하여 32일째 최대의 발현치를 가지는데 비해, ATPG8 *ox-5*, ATPG8 *ox-9*, 그리고 ATPG8 *ox-10* 변이체 모두는

*SEN4*와 *SAG12*의 발현이 자엽 생성 후 36일째까지 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 한편 *ATPG8* 유전자의 발현 양상을 조사해보면, 전체적으로 *ATPG8* 유전자 과발현 변이체들은 야생형에 비하여 발현 수준이 현저히 높으며 노화 동안 라인별로 정도의 차이는 있지만 24일에서 28일 사이에 작은 피크를 가졌다가 점진적으로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 이러한 감소 현상을 가짐에도 불구하고 여전히 야생형에 비해서는 높은 발현 수준을 유지하고 있는 것으로 나타났다(도 9). 이러한 사실을 종합해보면 *ATPG8* 유전자는 분자적 수준에서 노화의 시작을 지연하여 이후 엽록소 함량, 광합성 효율 등과 같은 생리적 현상을 조절함으로써 결과적으로 표현형적으로 잎 수명의 연장을 유발하는 것으로 판단된다.

[141] <실시예 3-5> *ATPG8* 과발현 변이체의 암 처리에 따른 노화 특성 분석

[142] 노화를 촉진한다고 알려진 요인인 암 처리에 대한 *ATPG8* 과발현 변이체의 잎의 노화 지연 형질의 특성을 분석하기 위하여 T₂ 세대에서 발아 후 21일째 3-4번 좌엽(rossette leaf)을 detach하여 3mM MES

완충용액(2-[N-morpholino]-ethanesulfonic acid, pH 5.8)에 부유시킨 후, 암 상태를 유지하여 매 2일마다 표현형 관찰, 잎 엽록소 함량, 광합성 효율 및 노화관련 유전자 발현을 상기 <실시예 3-1 내지 3-4>와 동일한 방법으로 측정하여 야생종 애기장대와 비교하였다.

[143] 그 결과, 애기장대 야생형의 경우 암처리 후 4일 이후부터 잎의 황화 현상이 진행되어 8일째 잎이 괴사(necrosis) 상태에 접어들었다. 반면 *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우 잎의 황화 현상이 12일 이후부터 나타나고 있음을 확인할 수 있었다(도 10). 엽록소 함량에 있어서 야생종의 경우, 엽록소 함량이 암처리 4일 이후 급격한 감소를 가져 6일 이후 암 처리하지 않은 상태의 약 10% 이하의 수치를 나타냈으나, *ATPG8 ox-5*, *ATPG8 ox-9*와 *ATPG8 ox-10*의 경우, 대부분 6일째에도 60% 이상의 엽록소 함량을 나타냈다(도 11). 암 처리에 의한 광합성 효율 변화는 엽록소 함량 변화와 같이 *ATPG8* 과발현 변이체에서 활성 감소가 현저히 지연됨을 알 수 있었다(도 12).

[144] 또한, 노화 지표 유전자인 *SEN4*와 *SAG12*, 그리고 광의존적 유전자인 *CAB2*의 발현을 상기 <실시예 3-4>와 동일한 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 13에 도시된 바와 같이, 야생형이 암 처리 후 4일째 *SAG12*의 발현이 현저히 증가하고 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 동안 거의 발현되지 않았다. *SEN4*의 발현에 있어서, 야생형의 경우 암 처리 초기 동안 발현이 현저히 증가하여 6일째 최고치를 나타내는 반면, 과발현 변이체에서는 암 처리 동안 야생형에 비하여 현저히 낮은 발현양을 나타내었다. 한편 *ATPG8* 유전자의 경우, 야생형에서는 거의 발현이 없는데 비해, 과발현 변이체에서는 암 처리 시 증가 현상을 보여 6일째 최고치를 가지고 이후 감소함을 알 수 있었다. 그러나 전체적인 발현량은 야생형에 비하여 현저히 높은 것으로 나타났다. 이러한 사실로 미루어 보아 *ATPG8* 유전자는 노화 지표 유전자의 발현 시기를

늦추거나 혹은 발현율을 억제시켜 노화를 지연시키는 것으로 판단된다.

[145] <실시예 5> ATPG8 과발현 변이체의 스트레스에 대한 특성 분석

[146] <실시예 5-1> ATPG8 과발현 변이체의 가뭄 스트레스에 대한 특성 분석

[147] ATPG8 유전자의 과발현 변이체에 대한 가뭄 저항성(drought tolerance) 분석은 발아 후 30일된 식물을 16일 동안 가뭄을 처리하고, 그 동안에 일어나는 전체 식물의 표현형적 변화와 식물 개체당 잎의 무게 변화를 비교하여 가뭄에 대한 저항성 정도를 확인하였다. 그 결과는 도 14와 15에 도시되었다. 야생형 애기장대는 가뭄에 의해 잎의 황화 현상이 급속히 진행됨을 알 수 있었으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 16일 동안의 가뭄 처리에 의하여 초기의 20% 정도까지 현저히 감소함을 알 수 있었다. 그에 비하여 ATPG8 유전자의 과발현 변이체인 ATPG8 ox-5, ATPG8 ox-9와 ATPG8 ox-10은 16일 동안의 가뭄 처리에도 잎의 녹화가 여전히 진행되고 있으며, 또한 잎의 무게에 있어서도 야생형에 비하여 거의 2배 이상인 40에서 60%의 무게를 유지함을 알 수 있었다. 이러한 사실은 ATPG8이 가뭄 스트레스 하에서도 식물의 수분 보유를 최대한 가능하게 해 식물의 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

[148] <실시예 5-2> ATPG8 과발현 변이체의 H₂O₂ 스트레스에 대한 특성 분석

[149] ATPG8 과발현 변이체의 산화적 스트레스에 대한 저항성을 조사하기 위하여 3mM MES 용액에 50mM H₂O₂을 첨가하여 발아 후 25일 된 3, 4번 잎을 detach하여 floating한 후 매 3일 간격으로 6일 동안 엽록소 함량과 광합성 효율을 측정하여 H₂O₂ 스트레스에 대한 저항성 정도를 조사하였다. 애기장대 야생형에 비하여 ATPG8 과발현 변이체에서는 잎의 황화 현상 지연과, 또한 엽록소 함량 및 광합성 효율의 감소에 있어서도 지연됨을 확인할 수 있었다. 특히 광합성 효율의 경우 야생형은 6일 동안의 H₂O₂ 스트레스 처리에 의해 50% 정도까지 감소하였으나, ATPG8 과발현 변이체에서는 거의 100%를 유지하고 있어 광합성 효율의 감소가 거의 일어나지 않고 있음을 알 수 있었다(도 16, 17과 18). 이러한 사실은 ATPG8이 식물의 산화 스트레스에 대한 저항성을 제공한다는 것을 의미한다.

[150] 따라서 ATPG8 유전자는 식물의 가뭄 및 산화적 스트레스에 대한 내성을 제공하여 스트레스 저항성 작물 개발에 있어 많은 장점을 제공할 것으로 생각된다.

[151]

서열목록 Free Text

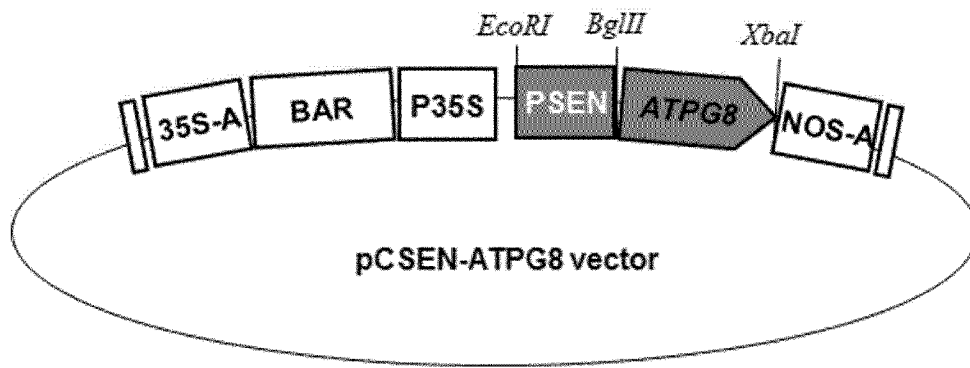
[152] 서열목록 있음

청구범위

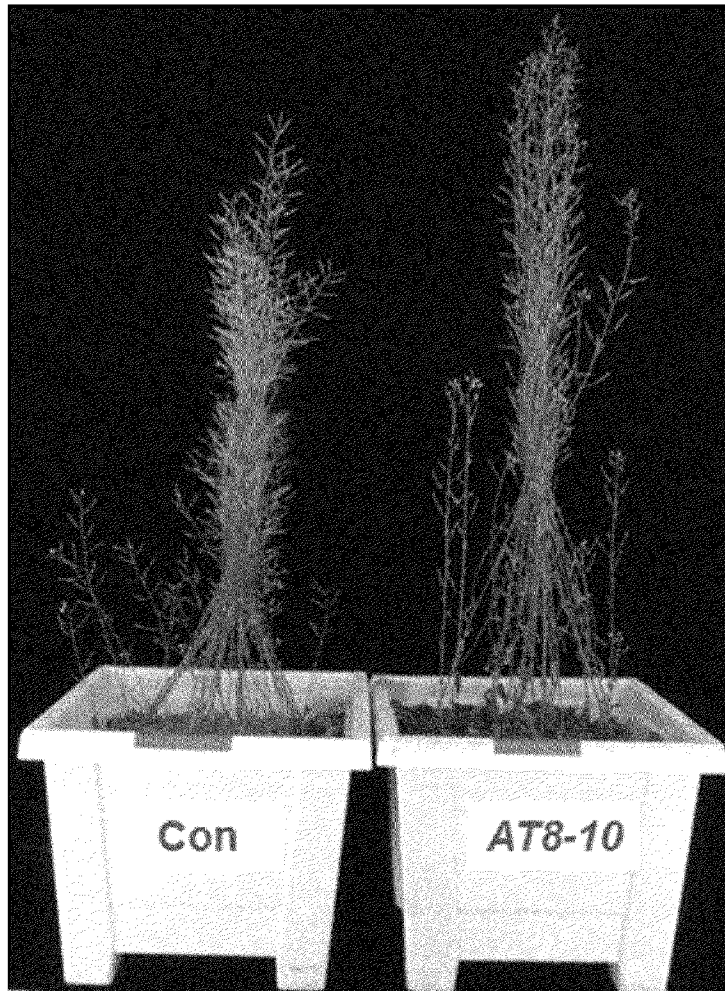
- [청구항 1] 서열번호 2에 개시된 아미노산 서열과 90% 이상의 서열 상동성을 갖고, 식물의 노화 지연 기능, 생산성 증대 기능 및 스트레스 내성 기능을 갖는 *ATPG8* 단백질.
- [청구항 2] 제1항의 단백질을 암호화하는 *ATPG8* 유전자.
- [청구항 3] (a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현백터에 삽입시키는 단계, (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및 (c) 노화가 지연된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 노화가 지연된 식물체의 제조 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 노화가 지연된 식물체의 제조 방법.
- [청구항 5] (a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현백터에 삽입시키는 단계, (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및 (c) 생산성이 증대된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 생산성 증대 특성을 갖는 식물체의 제조 방법.
- [청구항 7] (a) 제2항의 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현백터에 삽입시키는 단계, (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계, 및 (c) 생산성이 증대된 표현형을 갖는 식물체를 선별하는 단계를 포함하여 구성되는 스트레스 내성 식물체의 제조 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열을 포함하는 유전자인 것을 특징으로 하는 스트레스 내성 식물체의 제조 방법.
- [청구항 9] (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현백터에 삽입시키는 단계, 및 (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 노화를 지연시키는 방법.
- [청구항 10] (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현백터에 삽입시키는 단계, 및

- (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 생산성을 증가시키는 방법.
- [청구항 11] (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자를 그것을 과발현시킬 수 있는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현백터에 삽입시키는 단계, 및
- (b) 그 발현백터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는 식물체의 스트레스 내성을 증가시키는 방법.
- [청구항 12] 제3항 기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 노화 지연 특성을 갖는 형질전환 식물체.
- [청구항 13] 제5항 기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 생산성 증대 특성을 갖는 형질전환 식물체.
- [청구항 14] 제7항 기재의 방법에 의하여 얻어진 것으로서, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 유전자가 도입되어 과발현됨으로써 스트레스 내성 특성을 갖는 형질전환 식물체.

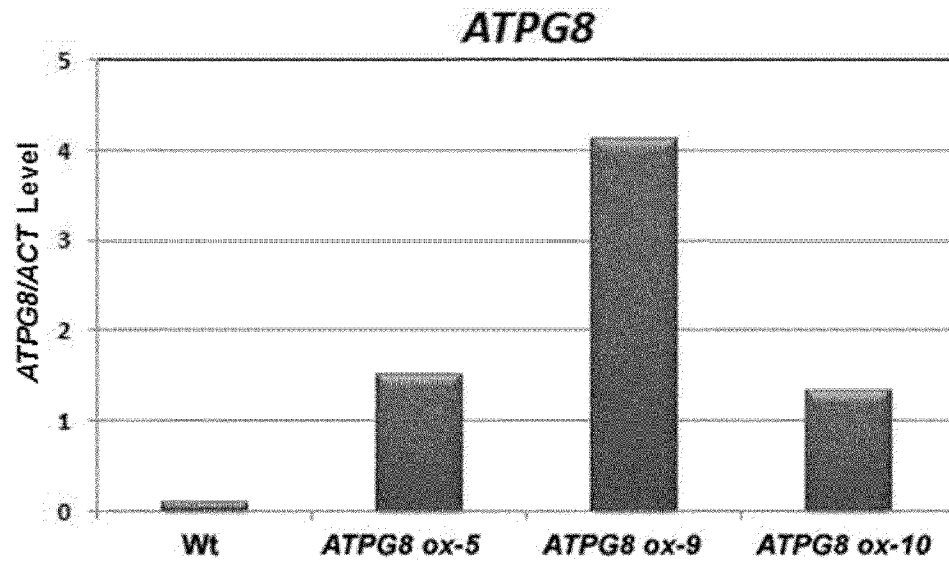
[Fig. 1]



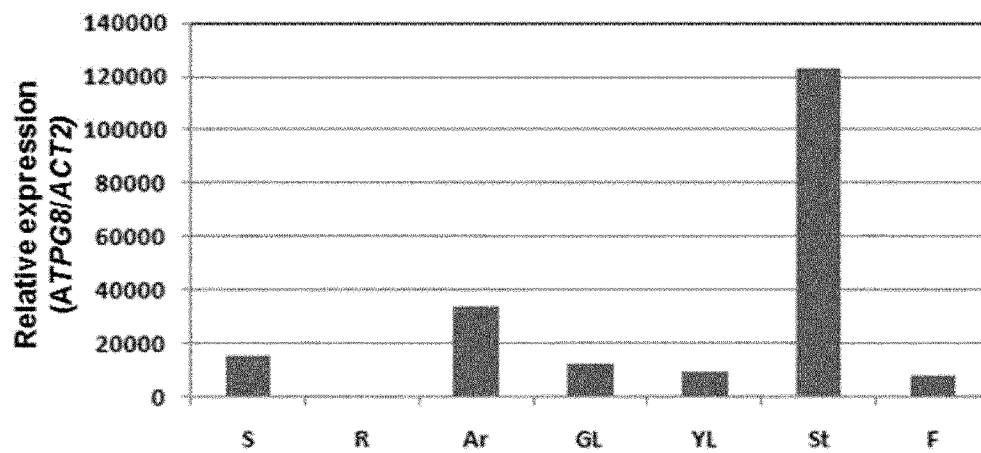
[Fig. 2]



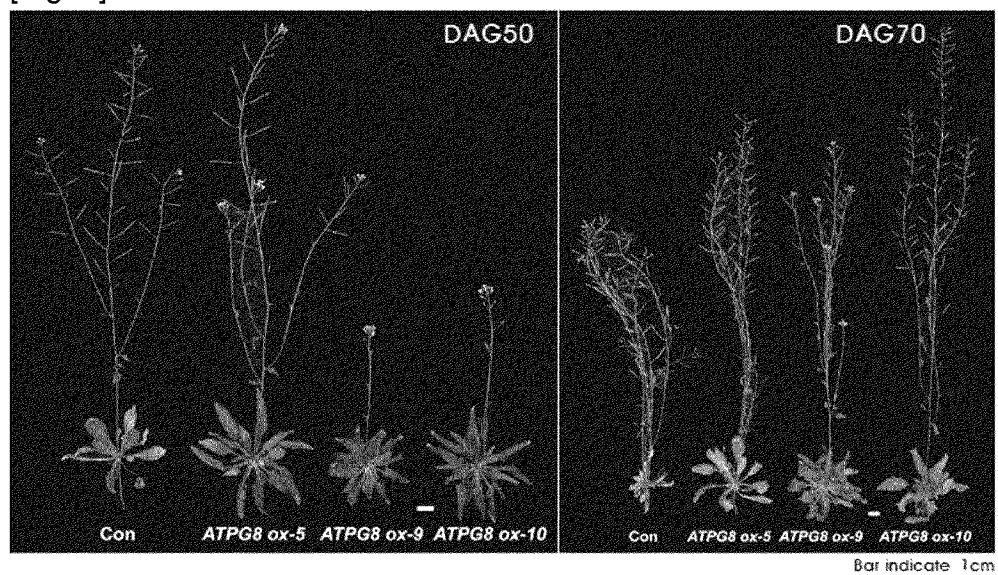
[Fig. 3]



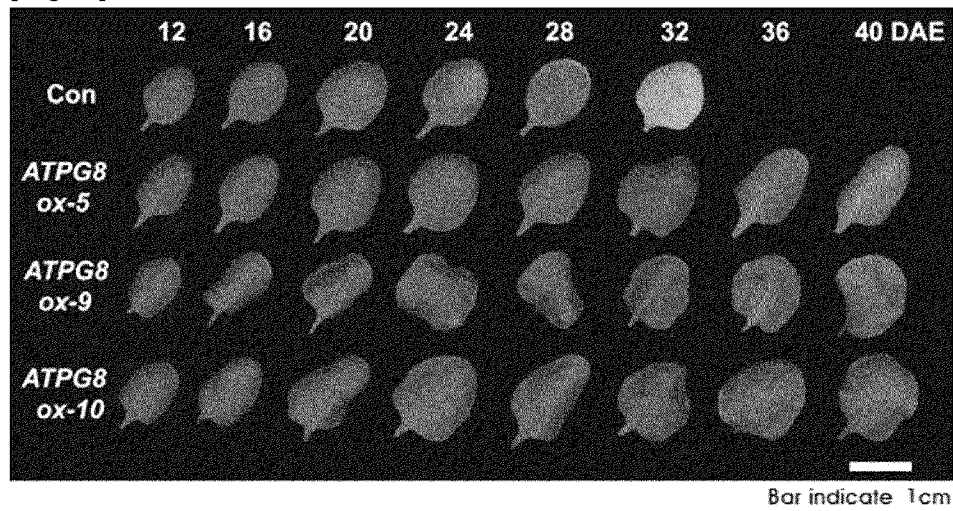
[Fig. 4]



[Fig. 5]

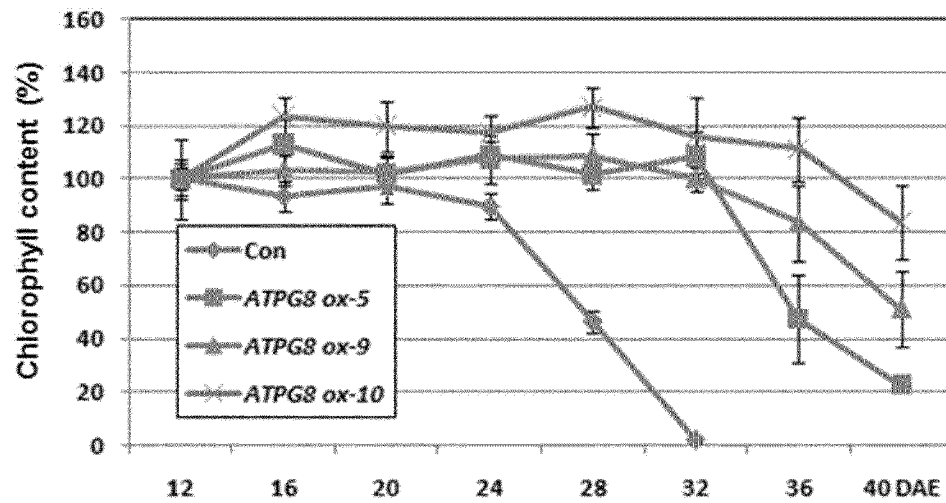


[Fig. 6]

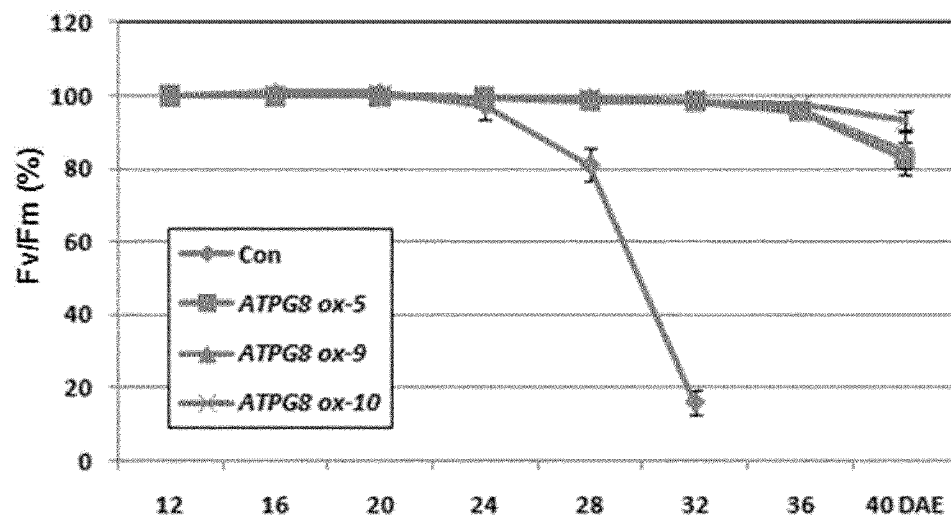


Bar indicate 1cm

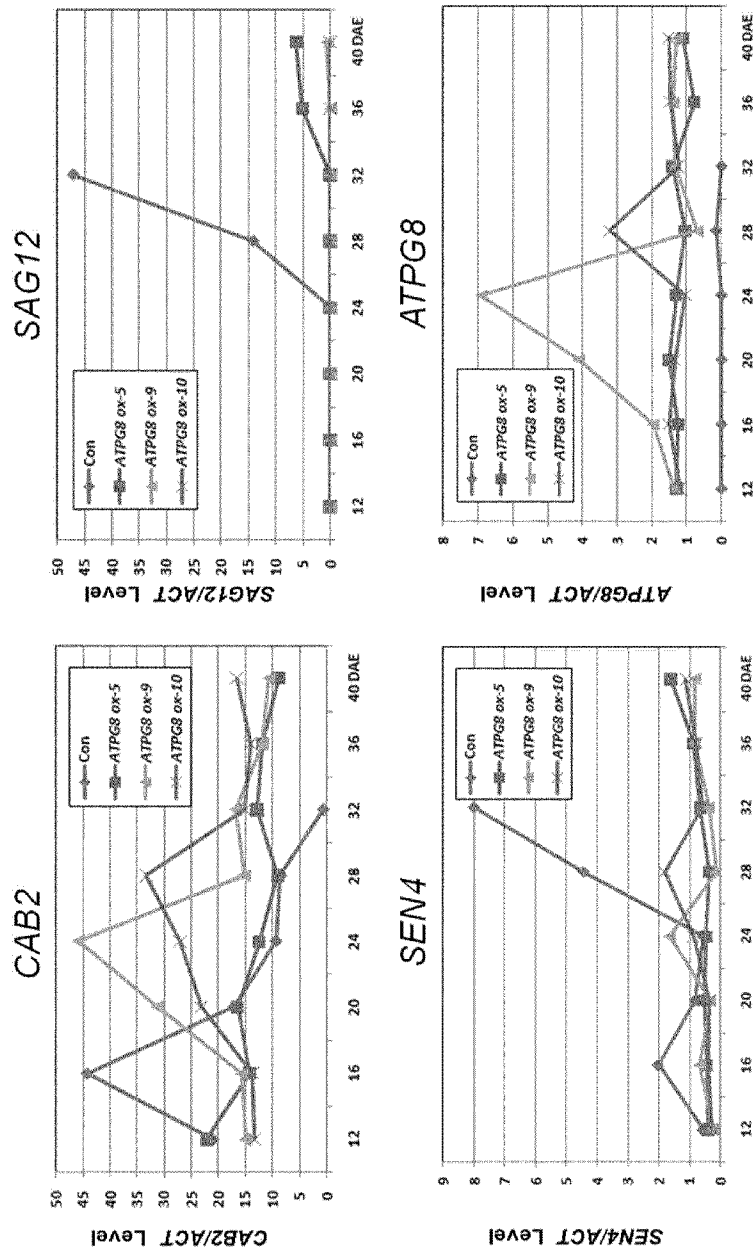
[Fig. 7]



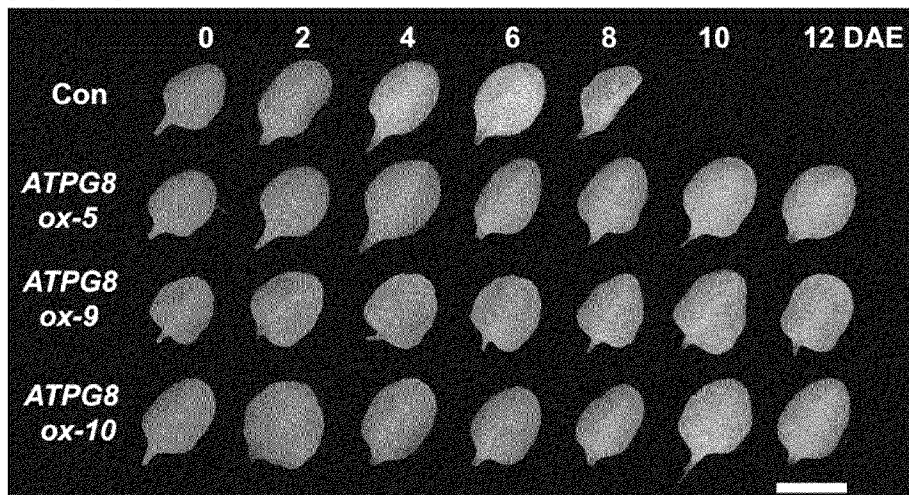
[Fig. 8]



[Fig. 9]

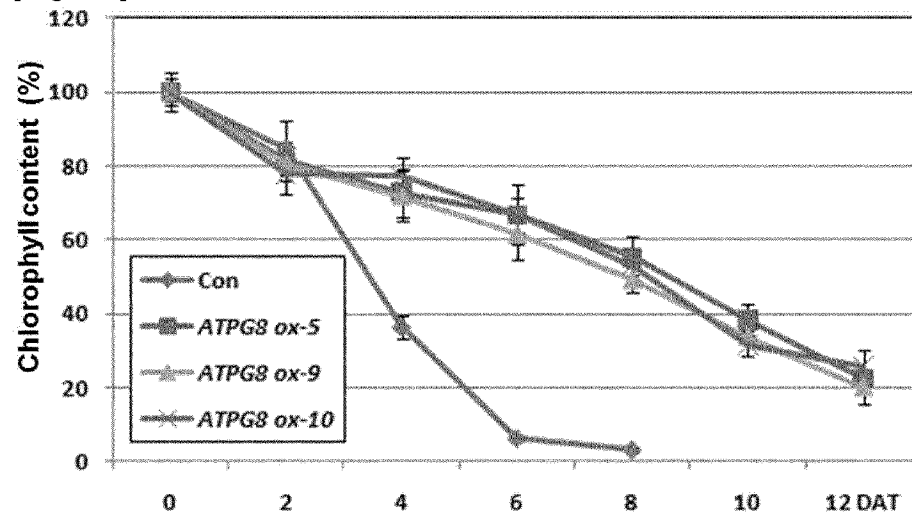


[Fig. 10]

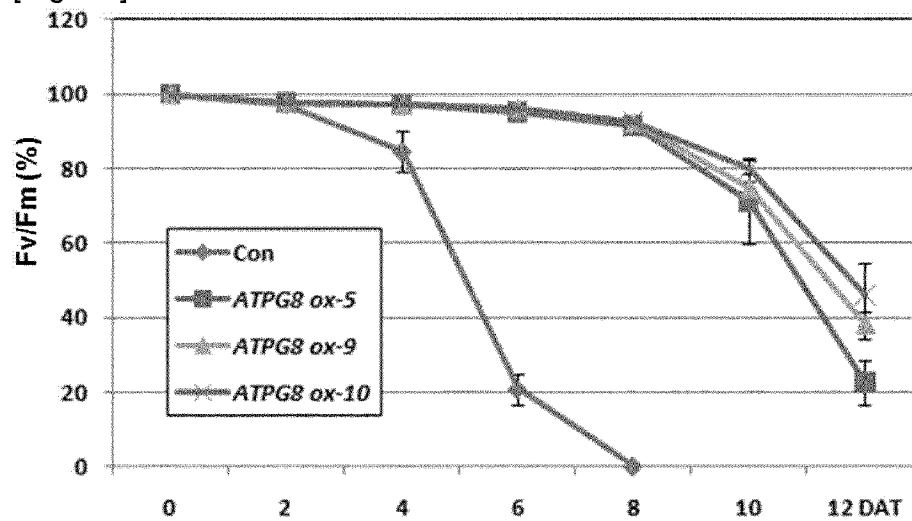


Bar indicate 1cm

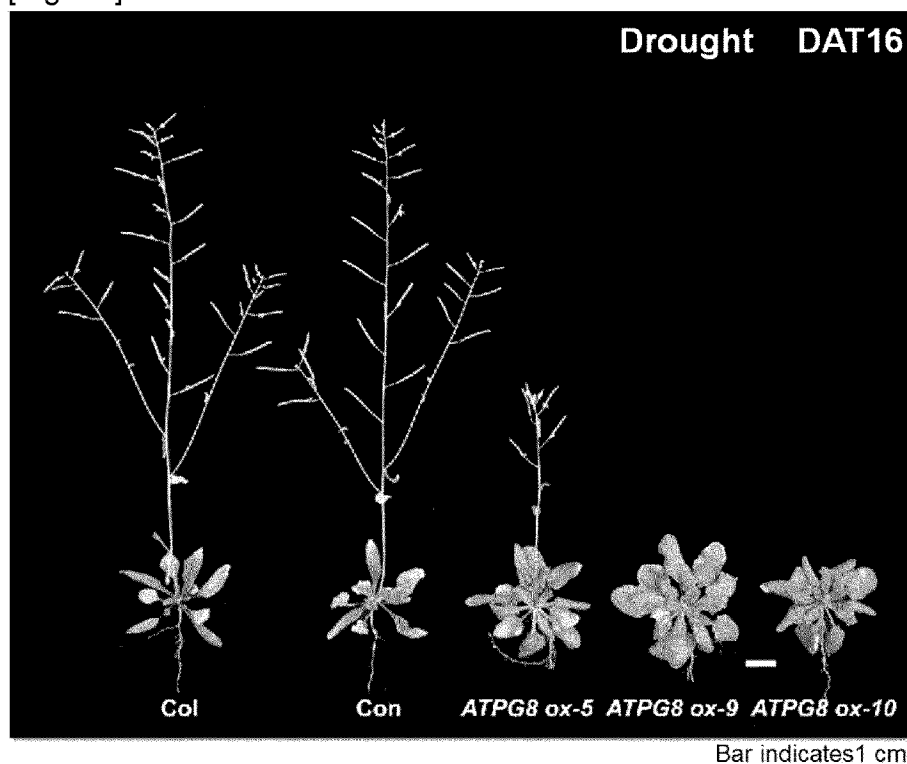
[Fig. 11]



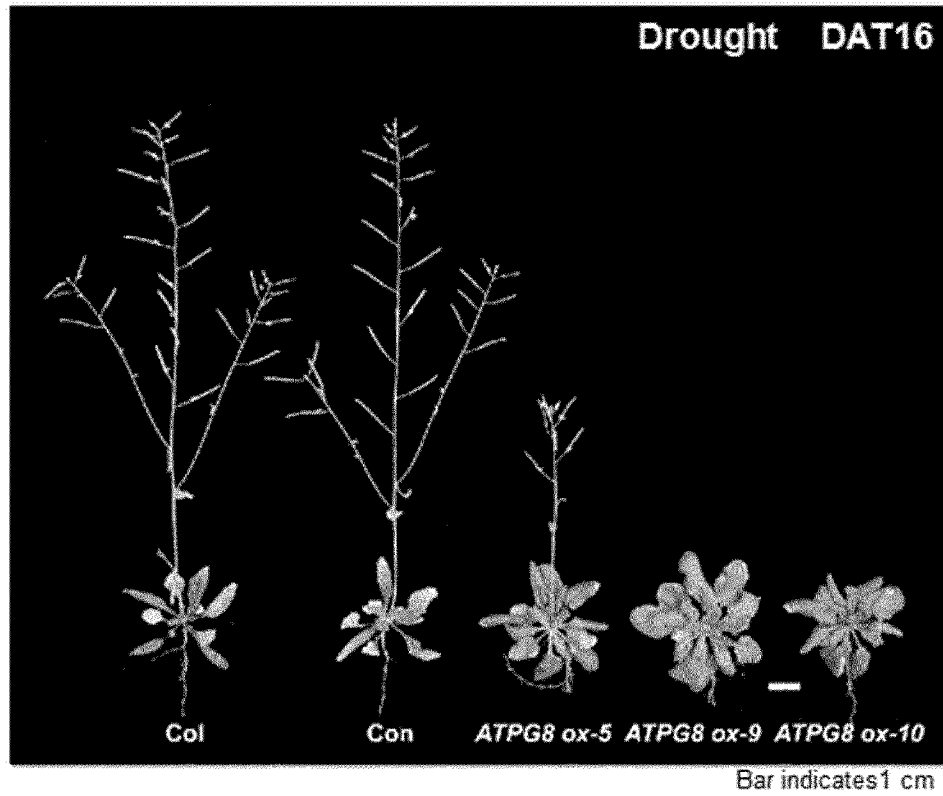
[Fig. 12]



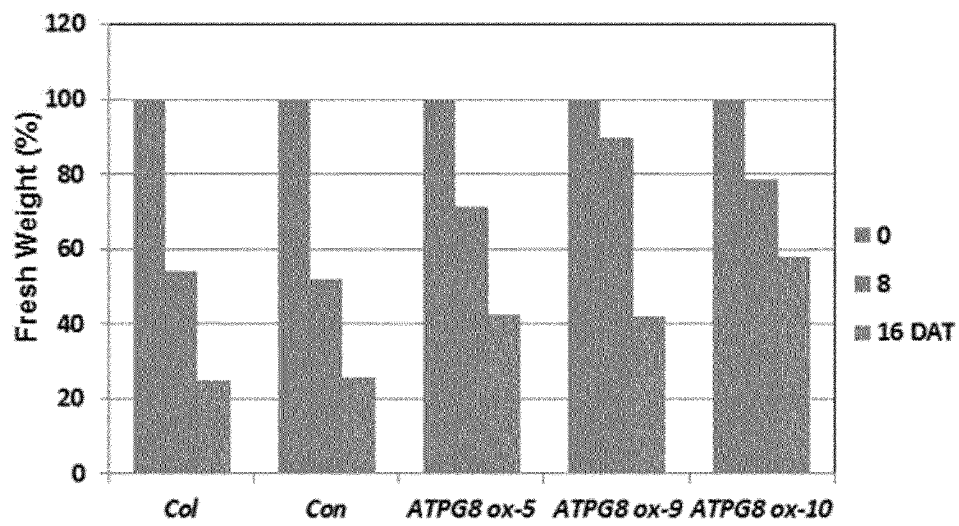
[Fig. 13]



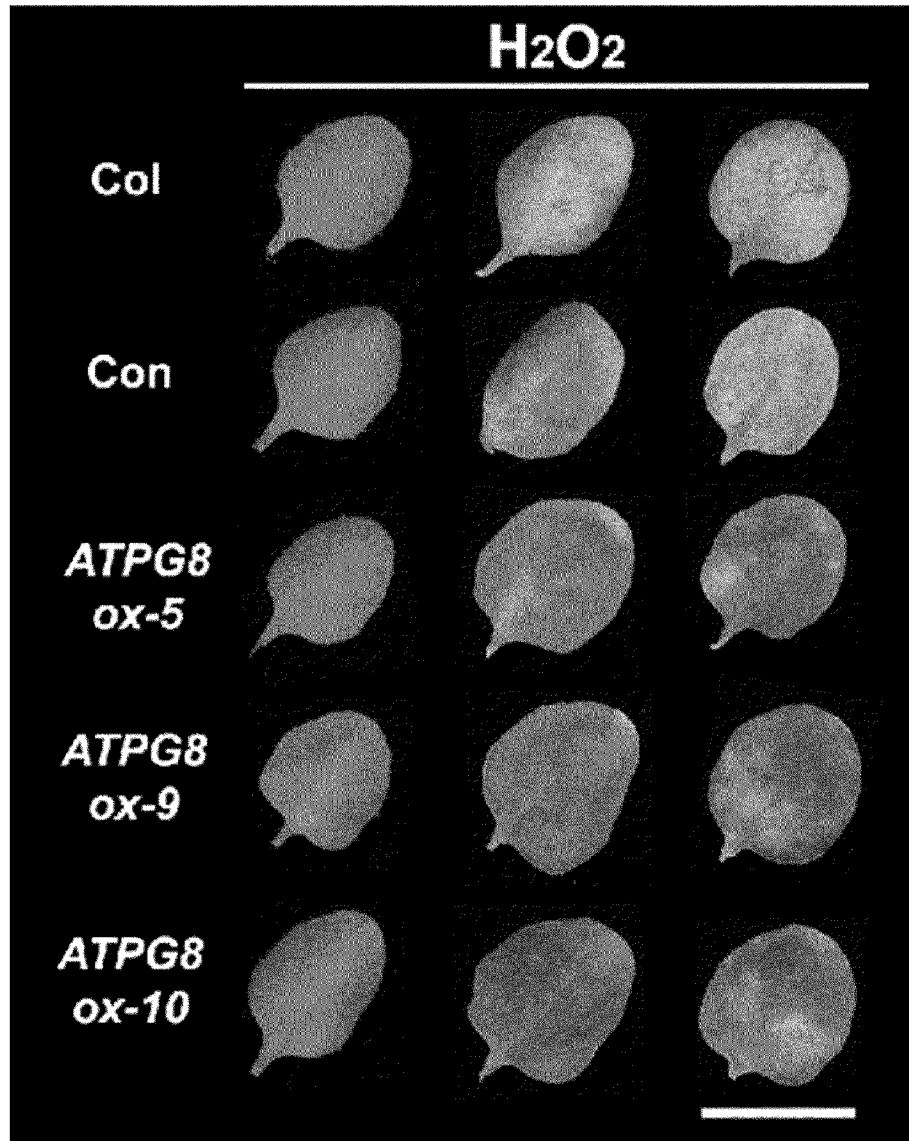
[Fig. 14]



[Fig. 15]

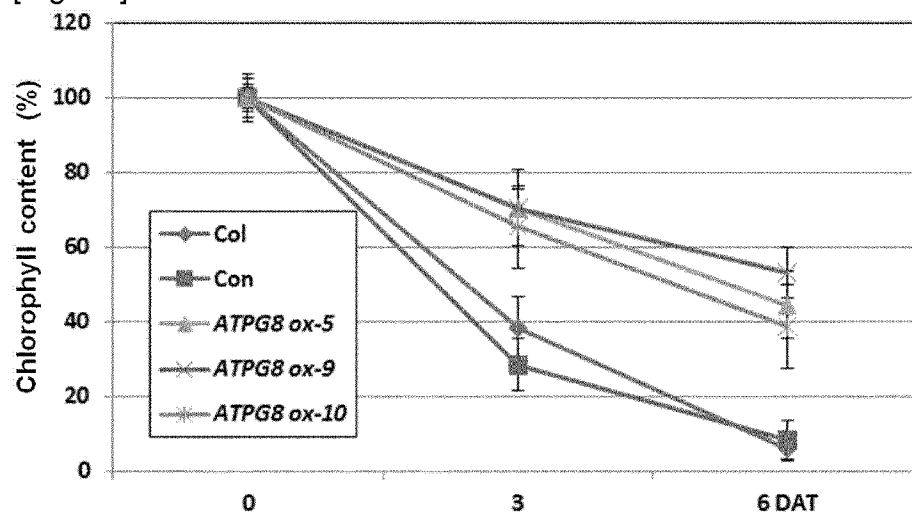


[Fig. 16]



Bar indicates 1cm

[Fig. 17]



[Fig. 18]

