



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년02월23일

(11) 등록번호 10-1495017

(24) 등록일자 2015년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C12N 15/82* (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)

*C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0120893

(22) 출원일자 2013년10월10일

심사청구일자 2013년10월10일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020070115325 A

GenBank Accession Number CP002684

(2011.05.05.)

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

신정섭

서울 성북구 길음로9길 50, 910동 2501호 (길음동, 길음뉴타운9단지)

김윤영

서울 은평구 통일로63길 15, (녹번동)

정광욱

서울 동대문구 무학로34길 50, 3층 (용두동)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 5 항

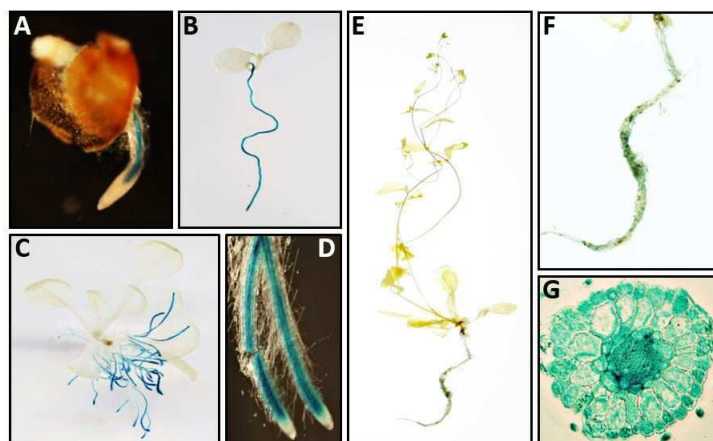
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 뿌리 조직 특이적 발현 프로모터

(57) 요약

본 발명은 식물체에서 뿌리 조직 특이적 발현을 유도하는 애기장대 *bZIP4* 유전자 프로모터(서열번호 1), 상기 프로모터를 포함하는 식물체 뿌리 조직 특이 발현 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 식물체의 뿌리 조직에서 발현시키는 방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의한 식물 뿌리 특이적 발현 프로모터는 식물체 뿌리 조직에서만 다른 조직보다 특이적으로 발현을 유도한다. 따라서 이 프로모터는 식물의 영양생장기와 수확기에 다른 조직을 제외한 뿌리 조직에서만 유전자 발현을 유도하여 우수 형질의 저장뿌리를 수확하거나, 동일 조직에서 유용 단백질을 생산하고자 하는 형질전환 식물체 개발에 효과적으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



A: 2일째 식물. B: 7일째 식물. C: 20일째 식물. D: C의 뿌리를 확대한 사진.

E: 발아 4주 째. F: E의 뿌리를 확대한 사진. G: C의 뿌리의 횡단면을 관찰.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201107013055530010300

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

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

기 여 율 1/2

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2011.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110015848

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원\_핵심연구

연구과제명 식물의 노화와 스트레스 관련 신규 유전자들의 기능과 신호전달 메커니즘 분석

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2012.04.30

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 식물체의 뿌리 조직 특이적 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

제1항 기재의 프로모터를 증폭하기 위한 서열번호 2 및 서열번호 3으로 표시되는 PCR용 프라이머 세트.

## 명세서

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 뿌리 조직 특이적 발현 프로모터에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 애기장대 유래 At1g59530 유전자의 프로모터인 염기서열 중 식물체의 뿌리에 특이적으로 발현을 유도하는 염기서열, 상기 염기서열을 포함하는 식물체 뿌리 발현 재조합 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 식물체 뿌리에 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

작물분자유종은 모든 종(種)의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 계능 단위로만 가능하던 육종기술을 유전자 단위로 끌어내려 무한대의 육종 효과를 미세하게 조절할 수 있다는 측면에서 차세대 농업을 이끌어 갈 핵심적인 기술이다. 이러한 작물분자유종 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 것이라는 가능성이 제시되고(Hohn et al., 1982, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96: 193-236), 상기 프로모터의 염기서열이 밝혀지고(Ode11 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 진행되

어서 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] 뿌리는 식물을 지탱해주는 줄기와 함께 식물체를 지탱해주는 지지작용과 토양 속에 있는 물과 무기 양분을 흡수하는 흡수작용, 또한 식물의 광합성 결과 만들어진 양분이 뿌리에 저장되는 저장작용이 일어난다. 이러한 뿌리의 중요성으로 인하여 우수한 형질의 작물의 뿌리를 생육과정 중 건강하게 유지시키는 것은 중요하며 특히, 뿌리 작물들은 생산량과 수확량에 밀접한 관계를 가진다.

[0007] 하지만 세계적으로 기후변화는 가속화되고 있고 기상재해의 발생빈도 및 그 규모가 확대되고 있으며 이로 인한 병충해 피해 사례가 날로 늘고 피해 범위도 점점 확대되고 있다. 예를 들어, 뿌리 응애의 경우 구근의 바깥부위, 구근과 뿌리 사이에서 생존하다 고온다습한 토양조건에서 병원균들과 복합 발생해 구근에 치명적인 피해를 주어 채소, 생강, 구근 화훼류 등 각종 농작물의 뿌리에 피해를 주고 있으며 작은 뿌리파리의 경우 묘중 이거나 모종을 이식하는 유기물 또는 배지 속에서 발생하는 어린 뿌리를 가해함으로써 줄기와 잎을 시들게 하는 피해를 주고 있다. 이처럼 토양 전염성 식물 병해충은 땅속의 뿌리 등에 침입하여 서류, 곡류, 채소, 화훼류 등 여러 종류의 작물에 막대한 피해를 주고 있다.

[0008] 이러한 병해충의 방제로 주로 합성 화학 살균제에 의존하고 있으나 이는 생태계 파괴, 환경오염 및 인체에 대한 독성 문제가 있어 무차별적으로 사용할 수 없는 실정이며 미생물을 이용하거나 천적을 이용하는 등의 다양한 자연친화적 방제 요법이 개발되고 있지만 아직 더 많은 연구들이 이루어져야 하는 실정이다.

[0009] 따라서 고품질 농작물을 이용하여 농업경제력을 강화하기 위해서는, 작물의 생육과정 중 뿌리의 발달에 병해충의 피해를 최소화시킬 수 있는 효과적인 대책을 수립하는 것이 무엇보다 중요하다. 이러한 이유로, 병해충 스트레스 저항성을 가진 단백질을 뿌리 조직에 발현시킬 수 있다면 식량이나 식품, 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물 특히, 뿌리작물에서 농업적 형질 개량이나 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 사용이 기대될 수 있다.

[0010] 본 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 등록특허 제10-0987009호 (2010.10.12), 대한민국 등록특허 제10-0987008호 (2010.10.12), 대한민국 등록특허 제10-0987007호 (2010.10.12), 및 대한민국 등록특허 제10-0953763호 (2010.04.21)에는 뿌리 특이 발현 프로모터가 개시되어 있다. 그러나, 뿌리 조직 특이적 발현을 유도하는 애기장대 유래 At1g59530 유전자의 프로모터에 대해 알려진 바는 없다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0987009호 (2010.10.12)  
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0987008호 (2010.10.12)  
(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-0987007호 (2010.10.12)

(특허문헌 0004) 대한민국 등록특허 제10-0953763호 (2010.04.21)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상기 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 식물의 뿌리 조직에 특이적 발현을 유도하는 Basic Leucine Zipper 4 (이하 *bZIP4*라 함.) 프로모터의 염기서열을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 *bZIP4* 프로모터를 포함하는 식물체 형질전환용 벡터 및 이에 의해 형질전환된 형질전환 식물체를 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 식물체의 뿌리 조직 특이적 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 2 및 서열번호 3으로 표시되는 PCR용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0020] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0021] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 애기장대 TAIR/ATTED DB를 이용하여 뿌리 특이적 발현을 보이는 At1g59530 유전자의 프로모터 부위를 클로닝하여 뿌리 조직 특이적인 발현을 유도하는 *bZIP4* 프로모터를 제작하였으며 애기장대 형질전환체에서 동일 프로모터의 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0022] 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 분리된 식물체의 뿌리 조직 특이적 프로모터를 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 뿌리 조직 특이적으로 발현하는 애기장대의 At1g59530 유전자 프로모터이다. 따라서, 본 발명에 의한 상기 프로모터는 뿌리 조직에서 목적 유전자의 발현을 유도시킬 수 있다.
- [0024] 상기 프로모터의 DNA 염기서열(서열번호 1)은 애기장대 At1g59530 유전자의 코딩 시퀀스의 번역개시 부위로부터 -1 내지 -2242bp에서 유래된 것을 특징으로 한다(도 1 참조). 본 발명의 뿌리 조직 특이적 프로모터는 상기 서열번호 1의 염기서열뿐만 아니라 상기 서열번호 1의 염기서열의 일부 염기가 치환, 결실 또는 부가된 변형서열로서 뿌리 조직 특이적 프로모터 활성을 나타내는 염기서열을 포함한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현 벡터를 제공한다. 바람직하게 본 발명은 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물체의 뿌리 조직 특이 재조합 발현 벡터를 제공한다.
- [0026] 본 발명에 있어, '발현 벡터'란 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백

질을 코딩하는 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 식물체의 뿌리 조직 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 발현 벡터 내에 포함될 수 있다.

[0027]

본 발명에 있어, '작동 가능하게 연결(operably linked)' 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합할 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란, 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 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 발현 벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 *bZIP4* 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입함으로써 제조할 수 있다. 따라서 본 발명에 사용될 수 있는 벡터로 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 벡터가 있으며, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라면 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 pBI101 벡터를 이용하여 *bZIP4* promoter::GUS 발현벡터를 제조하였다.

[0029]

본 발명에 있어서, '목적 단백질'이란 본 발명의 프로모터에 의해 식물체의 뿌리 조직에서 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 천연으로 존재하지 않는 단백질을 말하며, 상기 내인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연으로 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 벡터에 본 발명의 애기장대 *bZIP4* 프로모터를 GUS 유전자의 상류부분에 작동가능하게 연결한 재조합 발현 벡터 *bZIP4* promoter::GUS를 제조하였다. 상기 외래 유전자는 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.

[0030]

나아가 본 발명의 뿌리 조직 특이적 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 두과작물인 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, 뿌리로 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 뿌리에서 강화하려는 경우에는 관련 물질대사경로의 생합성 유전자 등을 들 수 있으나, 여기에 한정되지 않고, 본 발명의 뿌리 조직 특이 프로모터를 사용하여 조절될 수 있는 각종 목적 단백질을 코딩하는 유전자들이 포함될 수 있다.

[0031]

그러므로 본 발명의 프로모터를 이용한다면 식물체의 뿌리 조직을 섭취하는 작물의 경우, 유용한 목적 단백질을 식물체의 뿌리에서 발현시킴으로써 뿌리와 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 뿌리 조직 특이적 재조합 발현 벡터로 형질전환된 식물세포 및 식물체를 제공한다. 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현 벡터는 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 식물 세포내로 도입할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터를 식물 세포내로 도입하는 방법으로는, 제한 없이 당해 공지된 방법이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 염화칼슘( $\text{CaCl}_2$ ) 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 *bZIP4* 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 뿌리에 특이적으로 발현시키는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0034] 본 발명은 또한, 1) 서열번호 1의 염기서열을 갖는 *bZIP4* 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 2) 상기 형질전환된 식물체의 뿌리 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 양파일 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한 애기장대 *bZIP4* 유전자 프로모터를 클로닝하기 위한 서열번호 2 및 서열번호 3으로 표시되는 PCR용 프라이머 세트(도 2의 S와 AS)를 제공한다. 상기 프라이머 세트를 이용하여 클로닝 효율을 높일 수 있다.

### 발명의 효과

[0037] 상술한 바와 같이 본 발명은 애기장대 At1g59530 유전자의 프로모터 부위에 관한 것으로서 이는 식물의 뿌리 조직 특이적인 발현을 유도한다. 그러므로 본 발명은 병해충 스트레스 저항성 관련 유전자 등의 발현을 식물의 영양생장과 수확기에 다른 조직을 제외한 뿌리 조직에서만 유도하여 우수 형질의 저장뿌리를 수확하거나, 동일 조직에서 유용 단백질을 생산하고자 하는 형질전환 식물체 개발에 효과적으로 이용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명에 의한 애기장대 유래 *bZIP4* 프로모터의 염기서열을 나타낸 도면.  
 도 2는 본 발명에 의한 프로모터 클로닝을 위해 사용한 프라이머 세트를 나타내는 도면.  
 도 3은 본 발명에 의한 애기장대 유래 *bZIP4* 유전자의 프로모터를 포함하는 일시적 발현 벡터를 나타내는 모식도.  
 도 4는 본 발명에 의한 *ProbZIP4*를 이용하여 일시적인 발현을 뿌리에서 분석한 결과를 나타내는 도면.  
 도 5는 본 발명에 의한 *ProbZIP4* 부분을 결실 (deletion)시켜 발현을 뿌리에서 비교 분석한 결과를 나타내는 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. 애기장대 *bZIP4* 유전자의 프로모터 클로닝

[0041] 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)의 총 gDNA (genomic DNA)을 template로 하여 양 말단에 *Hind* (5' 말단)과 *Bam*HI (3' 말단)를 포함하는 S와 AS 프라이머 (도 2 참조)를 이용하여 *bZIP4* (At1g59530) 유전자 프로모터 (promoter) 2,242 bp를 PCR 기법으로 증폭하여 PCR 산물을 확보하였다.

[0042] PCR 산물 말단을 각 제한 효소로 절단 한 후, 레프트보더 (left boarder)와 라이트보더 (right boarder) 사이에 GUS (beta-glucuronidase)를 가지는 식물 형질전환용 바이너리벡터 (binary vector)인 pBI101 벡터에 클로닝 하였다 (도 3 참조). 이 클론을 해독 (sequencing)한 결과 정확한 염기서열이 클로닝 (cloning) 되었음을 확

인할 수 있었다 (도 1 참조, 서열번호 1).

[0043]

**실시예 2. *bZIP4* 프로모터의 애기장대 형질전환**

[0044]

도 3의 벡터를 아그로박테리움 (*Agrobacterium* GV3101)에 냉-해동 (Freeze-thaw) 방법 (An, G. 1987, Methods in Enzymology)으로 도입하였다. 형질전환된 아그로박테리움은 꽃침지방법 (flower dipping, Clough와 Bent, 1998, The Plant Journal)으로 애기장대를 형질전환시켰다. 형질전환시킨 애기장대를 카나마이신 (Kanamycin)이 50 mg/ml 함유된 식물용 MS (Murashige and Skoog) 배지에 선발 (screening)하여 형질전환된 식물체를 확보하였다.

[0045]

**실시예 3. 형질전환된 애기장대의 조직 화학적 염색 분석**

[0046]

ProbZIP4 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)의 총 gDNA (genomic DNA) 벡터의 형질전환체 식물에서 *bZIP4* 유전자 프로모터의 활성을 조직별로 확인하기 위해 GUS의 발현 분석을 하였다. 이를 위하여, 선발된 형질전환 식물을 키운 후 각 조직별로 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-glu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -glucuronidase) 1 mM, 100 mM sodium phosphate(pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1 % 트리톤(Triton) X-100을 함유하는 용액에 담가 37°C에서 12시간 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 100% 에탄올을 계속적 갈아주면서 조직에 존재하는 색소를 제거하였다.

[0047]

형질전환 식물체 GUS의 활성을 분석해 본 결과, 종자 발아 된지 2일 정도 식물체, 7일 정도 식물체, 20일 정도 된 식물체의 뿌리 조직에서 특이적으로 GUS의 발현이 보이는 것을 확인하였다 (도 4의 A-D). 또한 4주 정도 된 식물체의 GUS의 발현을 분석한 결과 다른 조직에서는 GUS의 발현을 관찰할 수 없는 반면에 뿌리 조직에서만 특이적으로 발현되는 것을 확인하였다 (도 4의 E-F). GUS 활성이 있는 뿌리의 횡단면을 확인해 보면 뿌리의 전체적으로 GUS의 활성이 나타나는 것을 확인 (도 4의 G)하였다. 그리고 *bZIP4* 유전자 프로모터를 -2,071 bp로 결실 (deletion) 시켜서 만든 형질전환체와 비교를 해본 결과 뿌리에서의 GUS의 활성이 기존의 -2,242 bp 프로모터 부분으로 구축한 형질전환체에 비해 현저히 저해되는 양상이 나타났다 (도 5). 이 결과는 *bZIP4* 프로모터의 2,242 bp와 1,071의 171 bp 부분이 *bZIP4*의 뿌리 활성에 중요하며 이 부분에 활성에 필요한 cis-element가 있는 것으로 예측되어진다.

[0048]

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

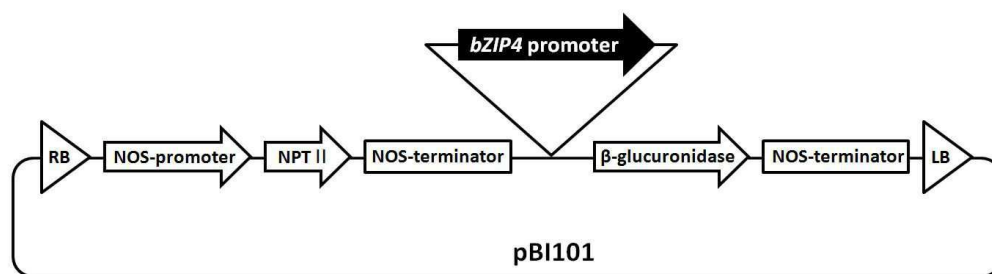
#### bZIP4 프로모터의 전체 염기서열

```
actctggaatgaagcgtaggaacagaaagttgtgtgtttgtctaaatgttttttttctactttgattgaatattcctttgtgatgttactcgactatgtggtt
accacaaccactgttattacctcaaggaataaaatgaaagtaaagttgtgaatttgcaatcatcaagtctatatgttttggtactcttctgttagtataatgttg
actcgctcagcctactttgacaaacagaatgaatttcggttagttaaactcaaggtccggttattatataaaacttaagttcggttcggatcgataaactttgat
tcagtttggttcggttttttaggtcgatccctatgagatacagatgtcttgcatagaagtagaagatatggtatttaacatgtgaaataaaacagcttttgc
catctttgttggaactttacttgagaatgtggaatgctaagaataaaaagaaattagggttagacaaataaggaggaagcacatgaatccaactctgttggt
agacatttcttattagatgacaaaactgttttaggttaaactaaggtgtatagctttctaagaaaaggaattgtgttaaatatagatcggtgttagacattt
cctaattagatgacaaaactgttatctgaggttaaaactaatgtcttattttaataacaaaaggaattatgttaatatagagagtcggttatagaagttgt
gaaaatgtgaatgcatgttttagtccacttacaaaaagccacaaaagtcacaaacagtggaactttggattttctgaaacgtgattacaaaggtcaaaatat
aagaatgatgttctttaacatctttgccctggaaataattgtaggcacaaaaaaatgacccattatctaaattttaatttaacaaaaaaataaagtaaa
ataggcaagattgggtttataccccaatgggagaaatatttcaatgtcacagtattataaattttaacggataaatttcttcaaaacatgtaagatttacga
aaatcgtacgaatatattaccctacttaataaaaaaaatgattcaaaattataatgatactataaagagaatgcagctgtatttcttctgtattgtttac
ttatcttactaaaaagataaagaaatccaaacacataataaataaactaagacgtaatatgtttttagattcttcgccaatgaagctctcatctctt
cctctgtgtcagaacctacacacattttcccttaagtcttaacttaataagttgtgtagaaacttaaaaaaatctttatgtatagagtttatctgatattt
tttgtcaattacatgtacttaatatgcgagcttgaatctggaatcgtttctagcagtagaaggataaagtcggtgccctcttttatcacattgaaaaaaagta
tatgaaatgatgcattttattgggttgaactctgaactactgagtagtatataccaagaaatcttacacaaaattggtctaataactaatatatttttagggcc
ccaaatcaaaattttatgtcttgccaagggaaggatcggtcatgtagattgatagtaacacacagacaatactaacagaaaccaataggctataaatcct
attcattttattttttacaatatagttattttacaagttttcagatattattgacctctagtttttccaattatagtttaaatggtgacaaccttaaacac
ccagtcctttatattaatcaaaaaacaaaaaaacaaaaaaacaataatcttacaatgacaatgtgaaattaatacactatctctgtagttaaaagta
gtgctacgaaagtataaaagttaaaagcagtatcaacaaaaggataaaaggataaaaaacaaaagttaaaataatacagtaataatgttatctag
agcactaatcgacaaacattccaattaatctcttagattgactctgattatgacattaacttagcacttttttagtggaacaataaccccaatgtgagccca
catgttattcctcattctctataaatagccactcttggttcattttgaatcctccctcctctagctttcattctctagctttaacacaaattataccaatatct
tttgcacttacatca
```

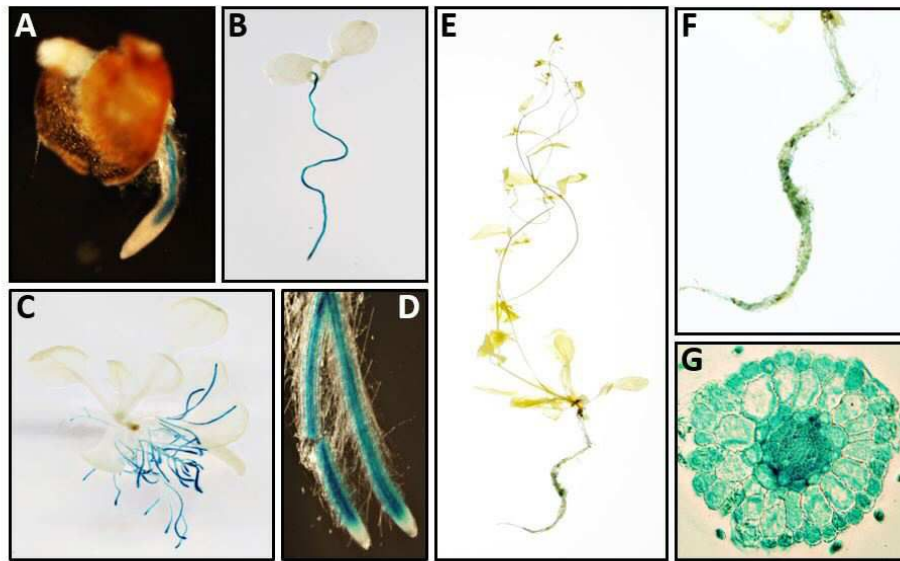
### 도면2

| 프로모터 클로닝에 사용한 Primer                                                           |
|--------------------------------------------------------------------------------|
| S: 5'-CAT AAG CTT CAC ACT CTG GAA TGA AGC GTA GGA AAC-3'(서열번호2)                |
| AS: 5'- CAT GGA TCC TGA TGT AAG TGG CAA AAG ATA TTG GTA TAA TTT GTG -3'(서열번호3) |

### 도면3

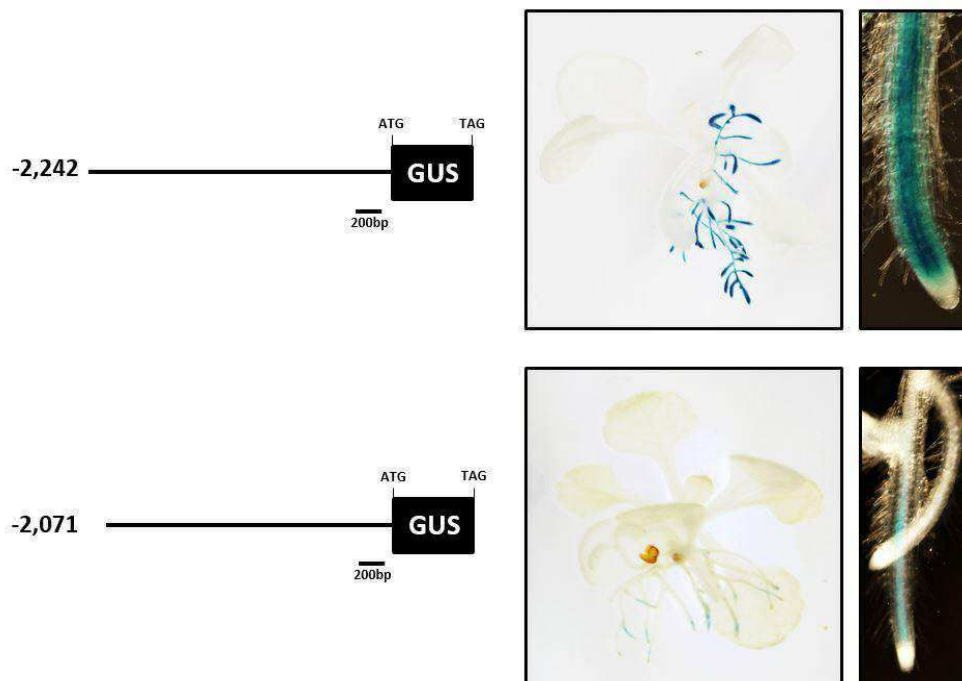


도면4



A: 2일째 식물. B: 7일째 식물. C: 20일째 식물. D: C의 뿌리를 확대한 사진.  
E: 발아 4주 째. F: E의 뿌리를 확대한 사진. G: C의 뿌리의 횡단면을 관찰.

도면5



## 서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION  
<120> Promoter for directing the root specific expression

<130> P11-130923-01  
 <160> 3  
 <170> Kopatent In 2.0  
 <210> 1  
 <211> 2242  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana  
 <400> 1

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| actctggaat gaagcgtagg aaacagaagt ttgtgtgttt tgtctaaatg tttttttttt  | 60   |
| ttgtactttg attgaatatt ccttttgtga tgttactcga ctatgtgggtt taccacaacc | 120  |
| actgttatta cctcaaggaa taaatgaaag taaagtgtg aatttgcaat catcaagtct   | 180  |
|                                                                    |      |
| atatgttttg gctactcttc ttgttttagta taatgtggac tcgctcagcc tatactttga | 240  |
| caaacagaat gaatttcggt tagttaatca aggtccggtt atttatataa aacttaagtt  | 300  |
| cggttcggat cgataaatct ttgattcagt ttggttcgggt ttttaggtcg atccctatga | 360  |
| gatacagatg tcttgcatag aaagtataga agatatggta tttaaacatg tgaataaaaa  | 420  |
| cagctttttg ccatcttttg ttggacttta cttgagaatg tggaaatgcta aagaataaaa | 480  |
| agaaattagg gtagacaaat aaggaggaag cacatgaatc caactcttgg tggtagacat  | 540  |
| ttcttattag atgacaaaac tctgttttag gttaaaactaa ggtgtatagc tttctaagaa | 600  |
|                                                                    |      |
| aaggaattgt gttaaaatat agatcggttg ttagacattt cctaattaga tgacaaaact  | 660  |
| ctgtatctga ggtaaaacta atgcttctat ttttaataca aaaaggaatt atgttaatat  | 720  |
| atagagagtc gggtatagaa gttgtgaaaa tgtgaatgca tgttttagtc cacttacaaa  | 780  |
| aagccacaaa aagtcacaaa cagtggactt tggattttct tgaacgtga ttacaaggt    | 840  |
| caaaaataaa gaatagtatg ttctttaaca tcttttgccc tggaaataat tgtaggcaaa  | 900  |
| aaaaaaatga ccattatct aaatttttaa ttttaacaaa aaataaagta aaataggcaa   | 960  |
| gattggtttt ataccccaat ggagaaatat ttcaatatgt cacagtatta taaattttaa  | 1020 |
|                                                                    |      |
| cggataaatt ttctttcaaa acatgtaaag atttacgaaa atacgtacga atatatttac  | 1080 |
| cctacttaat taaaaaaaa atgattcaaa attataatga tactataaag agaatgcagc   | 1140 |
| tgtagtttca cttgtattgt ttactttatc ttactaaaaa gataagaaaa tccaaacaca  | 1200 |
| taataataaa actaagacgt aatatgcttt ttgttagatt cttcgccatt aagctaagct  | 1260 |
| ctcatcttct tectcttgtg tcaagaccta cacaccattt tctcccctaa gtcttaactt  | 1320 |
| aataagttgt gtagaaactt aaaaaaaatc ttttatgtat agagttttat ctgatatttt  | 1380 |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| ttttgtcaat tacatgtact taatatgcga gcttgaatct ggaatcgttt ctagcagtag  | 1440 |
| aaggataaag tgcgtgccct ctttttatca cattgaaaa aaagtatatg aaaatgatgc   | 1500 |
| attttattgg ttggaactct gaacctactg agtatctata ccaagaaatc ttacacaaaa  | 1560 |
| ttggtctaata aactaatata tttttgagg ccccaaatca aaattttatg tgcttgtgcc  | 1620 |
| aaggaaggat cggicatgat agattgatag taacacaacg acaataactaa cagaaaccaa | 1680 |
| taggctataa atcctattca ttttttttt tttacaatat agttatatat tacaagtttt   | 1740 |
| tcagatatta ttgacctct agtattttac caattatata gtttaaatgg tgacaacctt   | 1800 |
| aaacaccag tccttttat taatcaaaaa aacaaaaaaa aacaaaaaaa acaataatct    | 1860 |
| tacaatgaca atgtgaaatt aatacactat ctctgtagtt aaaaagtagt gctacgaaag  | 1920 |
| tgataaaagt taaaaagcag tatccaaaca aaaggataaa aagataaaa aaacaaaagt   | 1980 |
| taaaaataa cagtaataat gttatctaga gcactaatcg acaaacattc caattaatct   | 2040 |
| cttagattga ctctgattat gacattaata cttagcactt ttttagtgga caatataacc  | 2100 |
| ccaatgtgag tcccacatgt tattctctat tcctctctat aaatagccac tcttggttca  | 2160 |
| ttttgaatcc tccccttct ctctagcttt cattctctag ctttaacaca aattatacca   | 2220 |
| atatcttttg ccacttacat ca                                           | 2242 |
| <210> 2                                                            |      |
| <211> 36                                                           |      |
| <212> DNA                                                          |      |
| <213> Artificial Sequence                                          |      |
| <220><223> PCR PRIMER                                              |      |
| <400> 2                                                            |      |
| cataagcttc acactctgga atgaagcgta ggaaac                            | 36   |
| <210> 3                                                            |      |
| <211> 45                                                           |      |
| <212> DNA                                                          |      |
| <213> Artificial Sequence                                          |      |
| <220><223> PCR PRIMER                                              |      |
| <400> 3                                                            |      |
| catggatcct gatgtaagtg gcaaaagata ttgtgataat ttgtg                  | 45   |